

# H O M M E A N I M A L E N V I R O N N E M E N T

Quel est le principal réservoir d'Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu dans le Sud-Ouest de l'océan Indien ?



N . G A Y

Homme, animal, environnement : quel est le principal réservoir d'Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu dans le Sud-Ouest de l'océan Indien ?

Thèse présentée et soutenue par **Noellie Gay** le 27 Septembre 2019 pour l'obtention du grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LA REUNION, UFR SCIENCES ET TECHNOLOGIES  
Spécialité : Épidémiologie

Composition du jury de thèse :

Professeur Philippe Gasque, Université de la Réunion

Professeure Marianne Van Der Sande, Institut de Médecine Tropicale, Anvers, Belgique

Docteur Jean-Yves Madec, Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, Lyon, France

Professeure Fabienne Remize, Université de la Réunion

Docteur Philippe Laurent, Université de la Réunion

Docteur Huynh Bich-Trâm, Institut Pasteur de Paris

Invité :

Docteur Olivier Belmonte, Centre Hospitalier Universitaire Félix-Guyon

Sous la direction :

Docteur Éric Cardinale, Centre de coopération internationale agronomique pour le développement, St Denis, Réunion

Docteur Olivier Belmonte, Centre Hospitalier Universitaire Félix-Guyon, St Denis, Réunion



## Préface :

## Liste des productions scientifiques :

### *Articles acceptés dans le cadre de cette thèse*

**Article 1. Gay N**, Belmonte O, Collard J-M, Halifa M, Issack MI, Mindjae S, Palmyre P, Ibrahim AA, Rasamoelina H, Flachet L, Filleul L, Cardinale E. Review of antibiotic resistance in the Indian Ocean Commission: a human and animal health issue. *Front Public Health*. 5:162. doi: 10.3389/fpubh.2017.00162.

**Article 3. Gay N**, Leclaire A, Laval M, Miltgen G, Jégo M, Stéphane R, Jaubert J, Belmonte O, Cardinale E. Risk factors of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Producing Enterobacteriaceae Occurrence in Farms in Reunion, Madagascar and Mayotte Islands, 2016-2017. *Vet Sci*. 5(1). pii: E22. doi: 10.3390/vetsci5010022.

**Article 4.** Cohard A, Leclaire A, Belmonte O, Benkimoun S, Etheves MA, Le Minter G, Lagadec E, Mavingui P, Tortosa P, Cardinale E, **Gay N**. Prévalence des Entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération chez *Rattus* sp. à La Réunion et Mayotte, 2013-2014. *Journal of Tropical Livestock Science*, sous presse.

### *Articles en cours*

**Article 2. Gay N**, Lugagne Delpon N, Miltgen G, Belmonte O, Cardinale E. Reunion, a sentinel island for multidrug resistant bacteria surveillance in Southwestern Indian Ocean: a retrospective survey in hospitalized patients in 2015-2017.

**Article 5. Gay N**, Ramahatafandry ITH, Rabenanrasana MAN, Panandiniaina HP, Rakotonindrina MF, Grobois V, Metras R, Collard JM, Cardinale E. Small scale farming in Madagascar: individual and environmental factors of Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase Enterobacteriaceae colonization in human.

### *Rapports produits et autorisations obtenues*

Rapports annuels d'activité pour l'Agence Régionale de Santé de l'océan Indien (2017/2018/2019).

Demande de conformité à la Commission nationale de l'information et des libertés – Autorisation N°2210928 v 0 obtenue 10/01/2019 ([Annexe 2](#))

Demande d'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques – Autorisation N° APAFIS#10948-2017080114229218 v1 ([Annexe 4](#)).

Dossier de présentation au comité d'éthique pour la recherche biomédicale auprès du ministère de la sante publique de Madagascar – Autorisation N° 020/MSANP/CERBM obtenue le 26/02/2018 ([Annexe 8](#)).

### **Communications orales en 1<sup>er</sup> auteur**

**Gay N**, Belmonte O, Filleul L, Cardinale E. Patient country of residence : a keystone for an early detection of antibiotic resistance at hospital. 2<sup>nd</sup> International Caparica Conference in Antibiotic Resistance, Caparica, Portugal, 12-15 Juin 2017.

Cardinale E, Rasamoelina H, Cetre-Sossah C, Collard JM, JM Heraut, **Gay N**. Le concept « Une seule santé » dans l'océan Indien ; un concept en mouvement ! 120 ans de l'IPM, Antananarivo, Madagascar, 28-30 Mai 2018.

**N. Gay**, O. Belmonte, E. Cardinale. Explicative factors of antibiotic resistance in Indian ocean intensive livestock production. 15<sup>th</sup> International Symposium of Veterinary Epidemiology and Economics, Chiang Mai, Thaïlande, 12-16 Novembre 2018.

**Gay N**, Ramahatafandry I, Rabenandrasana N, Rakotonindrina F, Panandiniaina H, Collard JM, Cardinale E. One health approach of antimicrobial resistance in Madagascar, 2018. The 59<sup>th</sup> ITM Colloquium: Antibiotic Resistance from Research To Action, Phnom Penh, Cambodge, 5-7 décembre 2018.

### **Posters**

Y. Abbade, A. Cohard, M.A. Etheves, O. Belmonte, E. Cardinale, **N. Gay**. Prevalence of third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae among urban rats (*Rattus* sp.) in Reunion Island, 2017-2018. 15<sup>th</sup> International Symposium of Veterinary Epidemiology and Economics, Chiang Mai, Thaïlande, 12-16 Novembre 2018. ([Annexe 5](#)).

**N Gay**, I Ramahatafandry, N Rabenandrasana, F Rakotonindrina, H Panandiniaina, E Loire, A Rieux, JM Collard, E Cardinale. One health approach of antibacterial resistance in Madagascar, 2018. 59<sup>th</sup> ITM Colloquium: Antibiotic Resistance from Research To Action, Phnom Penh, Cambodge, 5-7 décembre 2017 ([Annexe 6](#)).

**N Gay**. Antimicrobial resistance in low-income countries – How to stop transmission ? Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, 8 octobre 2019 ([Annexe 7](#)).

### **Vulgarisation scientifique**

**Gay N**, De Valicourt L. 2017. ANTIBIORESISTANCE et Plan ECOANTIBIO Cultur'agri 1ere édition, Bourg Murat, La Réunion, 11 Mai 2017.

**Gay N**, Cardinale E. 2017. Les rats sont-ils des indicateurs de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement ? Réseau d'innovation et transfert agricole, Saint-Pierre, La Réunion, 9 Novembre 2017.

**Gay N**, Rabenandrasana N. La résistance aux antibiotiques un défi pour la santé des hommes, des animaux et de l'environnement dans l'océan Indien. Rencontre avec un chercheur à l'Institut Français de Madagascar, Antananarivo, Madagascar, 20 octobre 2018.

### *Mémoire des stagiaires encadrés pendant la thèse*

COHARD Audrey, Master 2. Estimation du portage d'Entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération et productrices de Bêta-lactamases à spectre étendu chez les populations de *Rattus* sp. à La Réunion et à Mayotte en 2013-2014 et 2017. Soutenu le 03/10/2017, SupAgro Montpellier.

Yemna Abbade, Licence 2. Estimation du portage d'Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu chez les rats urbains à La Réunion, 2017-2018 soutenu le 27 mai 2019, Université de la Réunion, St Denis.

Marie Florence Rakotonindrina, thèse d'école vétérinaire. Transmission de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques entre l'homme en communauté et les animaux domestiques à Madagascar, 2018. Université d'Antananarivo. Soutenance à venir.

Harielle Prisca Panandiniaina, thèse d'école vétérinaire. Transmission de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques entre l'homme en communauté et les animaux d'élevage à Madagascar, 2018. Université d'Antananarivo. Soutenance à venir.

### *Obtention de financements*

Bourse de thèse de trois ans obtenue auprès de l'Agence Régionale de Santé de l'océan Indien.

Financement du projet « Prévalence et facteurs protecteurs du portage de bactéries multi-résistantes en élevage à la Réunion » par l'appel à projet Eco antibio2.

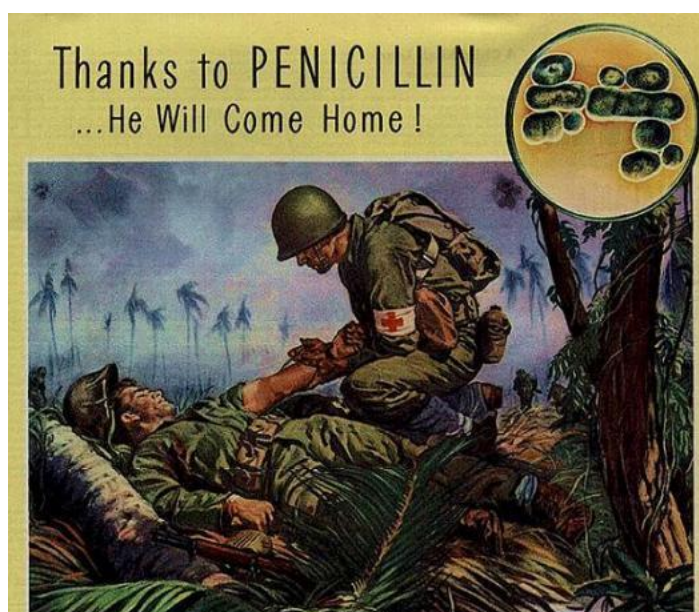
Financement du projet « Identification de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques chez les populations de rats à Mayotte, 2018-2019 » par l'Agence Régionale de Santé sur CONVENTION N° /2017/ARSOI/DVSS.

Travel grant of the Institut de Médecine Tropicale d'Anvers pour le 59<sup>th</sup> ITM Colloquium: Antibiotic Resistance from Research To Action, Phnom Penh, Cambodge.

### *Prix/distinctions*

Prix de la meilleure présentation orale « ShortGun » pour la présentation « Patient country of residence: a keystone for an early detection of antibiotic resistance at hospital », 2<sup>nd</sup> International Caparica Conference in Antibiotic Resistance, Caparica, Portugal, 12-15 Juin 2017.

Lauréate du programme L'Oréal-UNESCO pour les femmes et la science France. Remise du prix le 8 octobre 2019 au Muséum national d'histoire Naturelle de Paris, France.



**Publicité des laboratoires Schenley producteurs de pénicilline industriellement  
([www.nationalww2museum.org](http://www.nationalww2museum.org))**

## Remerciements

Ce travail de thèse a été financé par l'Agence Régionale de Santé de l'Océan Indien. Je tiens donc à exprimer toute ma gratitude à l'ARS OI qui s'engage dans la lutte contre la résistance bactérienne aux antibiotiques. Merci plus particulièrement à François Chieze, Olivier Reilhes et Frédéric Munoz.

Éric Cardinale pour la confiance inébranlable accordée et la liberté offerte d'explorer mon potentiel de chercheuse en herbe ! Merci d'avoir dit OUI si souvent (sauf pour le mariage) et d'être allé au bout de cette aventure avec moi.

Olivier Belmonte pour ses relectures assidues, le partage de son expertise, son précieux appui pour mon projet « rats », les données de dépistage du CHU et les analyses microbiologiques pour le projet « animal d'élevage ». Merci aussi à son équipe de biologistes.

Laurent Filleul pour m'avoir beaucoup appris durant ma première année de thèse. Merci pour son important investissement professionnel dans mon travail et les valeurs véhiculées. Plus généralement merci à la CIRE OI.

Aux membres de mon comité de thèse : Christian Ducrot, Anne Berger Carbone, Camille Lebarbenchon et Nathalie Lugagne pour la bienveillance et les recommandations avisées ces dernières années.

### ***L'équipe Bactex et l'Institut Pasteur de Madagascar***

Jean-Marc Collard pour son accueil dans le laboratoire de bactériologie de l'Institut Pasteur de Madagascar. Merci d'avoir cru en mon projet de recherche et en moi. Tu m'as permis de réaliser l'étude « clé de voute » de ma thèse. J'aime ton éthique au travail et j'ai énormément appris à ton contact. En espérant pouvoir travailler à nouveau avec toi dans les années à venir.

Noah pour m'avoir appuyé si souvent pour notre projet de recherche, tu es un grand chercheur, tes efforts seront récompensés. Soholery pour la traduction de mes questionnaires pour le comité d'éthique. A toute l'équipe pour les gâteaux au chocolat, la bonne humeur dans ce petit bureau, même lorsque la connexion internet était capricieuse.

André Spiegel pour l'accueil dans ce bel établissement qu'est l'Institut Pasteur de Madagascar, en espérant que nos chemins se re-re-re-croisent.

Laurence Baril pour l'accueil de Florence dans son Unité d'épidémiologie, son aide précieuse avec le passage du comité d'éthique de mon projet. J'admire ta capacité de travail et ton courage.

Hélène Guis, Samuel et leur petite famille. Hélène parce que tu es intègre et que le monde devrait te ressembler. Merci de m'avoir permis de m'intégrer si vite.



Daouda pour les cafés du matin et les conseils en géographie de la santé.

Romain Girod, Christine Cazanove pour être mes amis depuis ces nombreuses années.

Florence et Harielle avec qui nous nous sommes retroussées les manches ... par canicule, pluie et presque neige (il fait froid sur les Hauts-Plateaux de Madagascar). Je vous souhaite de réaliser vos rêves, je vous dois beaucoup et me sens plus riche depuis que vous avez croisé mon chemin.

Ilo pour ton professionnalisme, ta gentillesse et ton appui pour mener à bien l'étude One Health à Madagascar. Tu as vraiment été mon bras droit durant le projet. La prochaine PhD, ce sera toi !

Dr Hanta pour ton indispensable implication permettant l'inclusion des ménages et ton intégrité professionnelle. Que tes jolis projets fleurissent !

Claudia, Chloé, Anthony, Cesare, Bebe, Flo, Ade pour les bons moments à Tana et pour être devenus des amis.

### ***L'équipe du CIRAD Réunion***

Claire Garros, Annelise Tran pour leur appui administratif, scientifique, leurs précieux conseils et les relectures de ma thèse. Merci pour votre éthique et pour m'avoir accompagné vers la ligne d'arrivée.

Catherine Cêtre-Soussah, Anaïs Etheve pour leur aide précieuse face à ma panique devant les commandes de consommables de dernière minute. Sans vous, je n'aurais pu tenir mon calendrier. Merci pour l'aide technique en bactériologie d'Anaïs, notamment pour les stages d'Audrey et de Yemna.

Marion Haramboure qui a rendu ma vie au bureau tellement drôle. Ton amitié m'est précieuse. Tu as la chance d'être une chercheuse à haut potentiel en toute décontraction (vivement ta participation à ma thèse en 180s).

Cécile Squarzoni-Diaw, Morgane Laval, Johny Hoarau, Floriane Boucher, Renaud Levantidis pour les bons moments au bureau. Louise Veron merci pour la bonne compagnie au CYROI by night. Morgane, merci pour ton investissement dans le projet « Animal d'élevage », sans ton travail rien n'aurait été possible.

Mes dératiseuses Audrey Cohard et Yemna Abbade pour leur courage, leur gentillesse, les mots d'amour et les cafés. J'ai beaucoup appris à votre contact.

Adrien Rieux parce qu'on a formé une super équipe et que c'était très agréable de travailler avec toi. Merci pour ton professionnalisme, le temps toujours accordé et surtout ta gentillesse. J'espère pouvoir travailler à nouveau avec toi à l'avenir car c'était vraiment sympa.

### ***L'équipe du CIRAD Montpellier***

Au secrétariat ASTRE pour la réactivité des assistantes. Un merci particulier à Marie-Anne Dutour pour s'être occupée des réservations pour ma soutenance (et les moments de convivialité), Catherine Richard pour son aide efficace pour la mise en forme du présent document, Denise Bastron et Betty Medouga pour leur gestion solide de mon existence administrative.

François Roger pour sa bienveillance, sa confiance, son aide précieuse et variée (bagagiste, fournisseur officiel de bureau, coordinateur AMR, ...). Toujours de bons conseils et une gestion généreuse de ses équipes.

Etienne Loire pour avoir été un référent Montpelliérain à la cool et pour t'être impliqué dans mon projet à Madagascar sans restriction. Merci d'avoir su écouter. Bon...on le marque enfin ce but ?!

Vladimir et Facundo pour avoir toujours pris le temps de mettre au clair les concepts et les aspects pratiques des statistiques sous R. Merci pour votre patience et votre pédagogie.

Julie Reveillaud pour les cafés sciences, le courage que tu m'as donné et ton amitié.

Raphaëlle Metras pour tes relectures attentives et tes conseils avisés... «stars hangout with stars».

Jean-Mathieu Bart pour les conseils rédactionnels très avisés et son intérêt pour mon travail car il n'y a pas que la trypano dans la vie.

Mes collègues de bureau, Delphine, Gabriel et Mounira qui ont rendu mon quotidien très agréable.

Les autres ASTRIens Elena, Gabriel, David, Alizée, Christian, Sylvain pour les pauses café récréatives ET instructives. C'est fou tout ce qu'on peut partager autour d'un café !

A la bande des stagiaires pour le tea time et les moments d'échange. A mon petit choucou Anthony.

### ***Des interactions variées***

Vincent Enouf et son équipe à la plateforme P2M de l'Institut Pasteur de Paris pour le séquençage rapide et l'intérêt pour ma recherche.

Julien Jaubert pour son intérêt envers mes travaux de recherche, sa gentillesse et son professionnalisme. Plus généralement à son équipe pour les manips de laboratoire sur les microarray.

Alexandre Leclaire pour sa pédagogie, son appui en bactériologie sur le projet « compartiment animal d'élevage ». C'était très agréable d'interagir avec toi.

Nathalie Lugagne pour le temps toujours accordé et l'éthique au travail. Hippocrate n'est pas un simple rappel de ton cursus médical. Merci aussi à l'équipe d'hygiénistes qui évite que les vilaines bactéries contaminent les patients. C'est votre lutte au quotidien, parfois dans des conditions difficiles, pour cela vous devez être remerciés !

L'UMR PIMIT plus particulièrement Pablo Tortosa, Erwan Legadec, Gildas Le Minter et Patrick Mavingui pour l'accès aux précieux prélèvements conservés en bio-banque dans le cadre du projet « rongeurs » et les interactions riches.

***Enfin, la vie personnelle parce que ça compte***

A Sergio pour les kilos que je n'ai pas perdu et l'amitié infaillible....

A « ma bébé » pour ton amitié chère, les fous rires et le partage des crises existentielles du doctorant, courage tu y es presque aussi.

A ceux que j'ai la chance de connaître depuis quelques années en dépit des décalages horaires et des océans qui nous séparent souvent (Antoine Gaut'ch, Nadia, Max, MA, Mariko, Left, Marianne, Marion, Corinne et Lulu, Benoit, Freeda, Rico, Sylvie, chouchou, Anaïs, les vieilles morues et les autres).

Brigitte pour la relecture attentive de ma thèse et ta bienveillance.

Damien pour m'avoir supporté.

A tout ceux que je n'ai pas cité et qui ont fait de cette thèse une aventure.

Enfin, à mon père et ma mère qui ont fait de moi une femme libre de croire en ses rêves.

**« Tout ce qu'on m'a enseigné, toutes les sciences humaines que j'ai étudiées et approfondies, toutes les recherches enfin que j'ai faites sur le principe et l'essence des choses, ne m'ont servi qu'à savoir que je ne sais rien »**

**Socrate**

## Résumé

La résistance bactérienne aux antibiotiques impacte la santé humaine, animale et l'agriculture au niveau international. Les Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (EBLSE), des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques, sont une priorité sanitaire pour le Sud-Ouest de l'Océan Indien (SOOI), à savoir Madagascar, Maurice, Mayotte, Les Seychelles, l'Union des Comores et La Réunion.

L'objectif général de cette thèse était d'identifier, parmi les trois compartiments de l'approche One Health (homme, animal, environnement), le principal réservoir d'EBLSE dans le SOOI.

La prévalence d'EBLSE a été estimée pour chaque compartiment pris indépendamment (approche sectorielle) et par une approche holistique les connectant spatialement et temporellement.

Ces deux approches ont permis d'identifier les animaux d'élevage comme le probable réservoir principal d'EBLSE dans le SOOI. L'approche holistique suggère une perméabilité des trois compartiments à Madagascar.

Si l'hypothèse d'un réservoir majeur d'EBLSE chez les animaux d'élevage est plausible, sa contribution à la colonisation humaine pourrait varier entre les territoires du SOOI. En effet, l'exposition de l'homme à ce réservoir pourrait être limitée pour les territoires à revenu élevé (Seychelles, La Réunion) mais substantielle pour les territoires à revenu faible (Madagascar, Union des Comores), particulièrement en l'absence de sécurité des aliments, de système d'assainissement et d'accès à l'eau potable.

Quantifier la contribution relative du compartiment animal d'élevage dans la colonisation par les EBLSE de l'homme en population générale dans les pays à faible revenu constitue un axe de recherche essentiel. De ces connaissances découlera une meilleure adaptation des stratégies de contrôle de l'antibiorésistance dans le SOOI et plus généralement dans les territoires à faible revenu qui pourraient être des amplificateurs de ce phénomène sanitaire.

## Mots Clés

Résistance aux antibiotiques, Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu, environnement, animal d'élevage, Homme, One Health, Océan Indien, Madagascar.

## Abstract

Bacterial antibiotic drug resistance is a worldwide health issue affecting human, animal, and agriculture. Extended-spectrum bêta-lactamase-producing Enterobacteriaceae (ESBL-E), multidrug-resistant bacteria, are a main health priority for the South-western Indian Ocean (SWIO) composed of islands (i.e. Madagascar, Maurice, Mayotte, Les Seychelles, l'Union des Comores et La Réunion).

The main objective of this PhD thesis was estimating the ESBL-E prevalence in the three « One Health approach » compartments (human, animal, environment) in order to identify the main ESBL-E reservoir in IO.

This prevalence was independently estimated for each compartment by a sectorial approach and by a holistic approach connecting all compartments spatially and temporally.

Both approaches suggest that livestock could be the main ESBL-E reservoir in IO and point out permeability between these three compartments in Madagascar.

If the idea of a main reservoir of ESBL-E in livestock seems plausible, its contribution to human colonisation could differ between SWIO territories. Indeed, human direct and/or indirect exposure to this reservoir could be reduced in high-income countries (i.e. Seychelles, La Réunion) but significant for low-income countries (i.e. Madagascar, Union des Comores). In the absence, or reduced application, of food safety, sanitation, and drinking water access, the exposure to ESBL-E from livestock could be substantial in SWIO low-income countries.

Consequently, the relative contribution of livestock in human ESBL-E subsequent colonisation could be significant in low-income countries but currently understudied. Research on that topic should strengthen antibiotic drug resistance control measures in low sanitation contexts.

## Keywords

Antibiotic drug resistance, Extended-spectrum bêta-lactamase-producing Enterobacteriaceae, environment, livestock, Human, One Health, Indian Ocean, Madagascar.

## Table des matières

Introduction .....	17
Les objectifs de la thèse .....	23
Partie 1 : Contexte et état de l'art.....	27
Chapitre 1. Les bactéries multi-résistantes dans la zone du Sud-Ouest de l'océan Indien : lesquelles surveiller, chez quels hôtes réservoirs et dans quels territoires ? Une revue de la littérature .....	27
Article 1. Review of antibiotic resistance in the Indian Ocean Commission: a human and animal health issue .....	29
Résultats majeurs .....	51
Chapitre 2. Les Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (EBLSE) : la vie privée d'un ennemi public.....	53
<i>La photo de famille</i> .....	53
<i>Le succès de propagation des EBLSE</i> .....	54
<i>Le tractus intestinal des vertébrés : un réservoir d'EBLSE</i> .....	58
Partie 2 : Une approche sectorielle du concept « One Health » ; estimer le niveau de colonisation ou de contamination par les EBLSE de chaque compartiment. ....	65
Chapitre 3. Les hommes : un système de surveillance épidémiologique des BMR pour le Sud-Ouest de l'océan Indien .....	65
Article 2. Reunion, a sentinel island for multidrug-resistant bacteria surveillance in South-western Indian Ocean: a retrospective survey in hospitalized patients, 2015-2017	67
Résultats majeurs .....	77
Chapitre 4. Quels facteurs de risque d'occurrence d'EBLSE dans les élevages intensifs de porcs, volailles et bovins à La Réunion, Mayotte et Madagascar, 2016-2017 ? .....	79
Article 3. Risk factors of Extended-Spectrum $\beta$ -Lactamase Producing Enterobacteriaceae occurrence in farms in Réunion, Madagascar and Mayotte Island, 2016-2017	81
Résultats majeurs .....	104
Chapitre 5. L'environnement : les rats comme marqueurs de la contamination environnementale par les EBLSE.....	107
Article 4. Prévalence des Entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération chez <i>Rattus</i> sp. à La Réunion et Mayotte, 2013-2014 ..	109
Résultats majeurs .....	123
Chapitre 6. Etude des déterminants de la colonisation par les EBLSE du compartiment humain à Madagascar : facteurs intrinsèques et extrinsèques en lien avec les autres compartiments .....	125

Article 5. Small scale farming in Madagascar: individual and environmental factors of Extended Spectrum $\beta$ -Lactamase Enterobacteriaceae colonization in humans <sup>128</sup>	
Résultats majeurs .....	149
I. Une approche utile pour identifier le principal réservoir d'EBLSE dans le SOOI .....	152
I.1. Les limites méthodologiques des approches sectorielle et holistique pour estimer la prévalence d'EBLSE dans les trois compartiments dans le SOOI ....	152
I.2. L'élevage comme réservoir d'EBLSE : un faisceau de preuves, une plausibilité biologique et une cohérence avec la littérature .....	155
II. L'exposition de l'homme au compartiment animal d'élevage est-elle variable selon les territoires du Sud-Ouest de l'océan Indien ? .....	157
II.1. Contact direct avec les animaux d'élevage .....	158
II.2. L'exposition environnementale aux fèces provenant de l'élevage	161
II.3. La consommation de produits d'origine animale.....	164
III. Une stratégie de lutte contre la résistance bactérienne aux antibiotiques adaptée aux territoires .....	166
Les perspectives .....	169
Références.....	173
Annexe 1. Engagement de non plagiat .....	189
Annexe 2. Déclaration de conformité de la Commission nationale de l'information et des libertés .....	190
Annexe 3. Questionnaires utilisés dans l'étude du chapitre 4 (Article 3) .....	191
Annexe 4. Notification obtention du comité d'éthique projet rongeurs.....	194
Annexe 5. Poster Prevalence of third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae among urban rats ( <i>Rattus</i> sp.) in Reunion Island, 2017-2018.....	195
Annexe 6. Poster One Health approach of antibacterial resistance in Madagascar, 2018.....	196
Annexe 7. Poster Antimicrobial resistance in low-income countries – How to stop transmission ? .....	197
Annexe 8. Autorisation du comité d'éthique de la recherche biomédicale, Madagascar .....	198
Annexe 9. Enquête préliminaire sur la composition des ménages en espèces animales .....	199

## Liste des tableaux

### Chapitre 1 :

#### Article 1

Table 1. Evolution of antibiotic resistance of <i>S. aureus</i> from 2001 to 2014 in Indian Ocean Commission .....	49
Table 2. Evolution of antibiotic resistance of Enterobacteriaceae from 2004 to 2013 in Indian Ocean Commission .....	50

### Chapitre 2 :

Table 1. Résistances naturelles, ou innées, des Entérobactéries.....	55
--	----

### Chapitre 3 :

#### Article 2

Table 1. Comparison of MRB colonization according to the patients's territory of residence (2015-2017) using Reunion (France) as a reference.....	72
---	----

### Chapitre 4 :

#### Article 3

Table 1. Prevalence of ESBL-E in livestock production farms of Reunion, Mayotte and Madagascar, 2016-2017.....	86
Table 2. Diversity of the ESBL-E species isolated in chromogenic agar from livestock production farms of Reunion, Mayotte and Madagascar, 2016-2017.....	88
Table 3. Antibiogram results of ESBL-E from livestock production farms of Reunion, Mayotte, and Madagascar, 2016-2017.....	90
Table 4. ESBL genes identified in a subset of <i>E. coli</i> isolated from poultry, pig and beef cattle production farms in Reunion, Mayotte and Madagascar, 2016-2017.....	92
Table 5. Bivariate explanatory factors of ESBL-E occurrence in livestock from Reunion, Mayotte and Madagascar, 2016-2017.....	93
Table 6. Best model explaining ESBL-E occurrence in poultry, pig and cow production (including all territories), 2016-2017.....	94

### Chapitre 5 :

#### Article 4

Table 1. Espèces d'Entérobactéries résistantes aux C3G identifiées chez les rats de Mayotte et de La Réunion et résistances des Entérobactéries identifiées aux antibiotiques testés, 2013-2014 .....	115
Table 2. Déterminants du portage d'Entérobactéries résistantes aux C3G chez <i>Rattus sp.</i> à La Réunion et à Mayotte, 2013-2014 .....	119

### Chapitre 6 :

#### Article 5

Table 1. Réservoirs, sample size, ESBL-E positive individuals, ESBL-E colonization rates with random effect, and proportion of each species in the households included in the survey, Madagascar 2018.....	134
Table 2. Final model of factors associated with ESBL-E colonization at the household level, Madagascar 2018.....	135
Table 3. Explanatory factors of ESBL-E colonization at the individual level.....	137



## Liste des figures

### Introduction :

Figure 1. Chronologie de l'apparition de la résistance aux antibiotiques (Ventola 2015) 19

Figure 2. Territoires réunis au sein de la Commission de l'océan Indien (source : [www.habarizacomores.com](http://www.habarizacomores.com)) 21

Figure 3. Représentation schématique de l'approche One Health intégrant la santé des hommes, des animaux et des écosystèmes 25

### Chapitre 1 :

Figure 4. L'Union des Comores et Mayotte 28

### Chapitre 2 :

Figure 5. Arbre phylogénétique présentant la similarité des gènes de type CTX-M et leur répartition en différents groupes (D'Andrea, Arena *et al.* 2013). 57

Figure 6. Gènes *bla<sub>CTX-M</sub>* identifiés chez l'homme entre 2009 et 2017 (Bevan, Jones *et al.* 2017) 59

Figure 7. Distribution des gènes BLSE identifiés chez les Entérobactéries provenant d'animaux d'élevage (volailles, porcs, bovins) et de viande de volaille (Michael, Freitag *et al.* 2015) 60

Figure 8. La colonisation par les EBLSE et les excréta : la partie immergée de l'iceberg 62

### Chapitre 3 :

#### Article 2

Figure 1. MRB colonization rates according to the patient country of residence in South-western Indian Ocean 71

### Chapitre 5 :

Figure 1. Distribution spatiale et caractérisation du milieu de vie autour du point de capture des rats porteurs d'ERC3G à La Réunion en 2013-2014 117

Figure 2. Distribution spatiale et caractérisation du milieu de vie autour du point de capture des rats porteurs d'ERC3G à Mayotte en 2014 118

Figure 9. Représentation schématique de la prévalence d'EBLSE estimée en partie 2 dans les trois compartiments de l'approche One Health 124

### Chapitre 6 :

#### Article 6

Figure 1. Distribution of ESBL-E human prevalence in households 135

### Discussion Générale :

Figure 10. Pourcentage d'études quantifiant les déterminants de l'antibiorésistance chez l'homme (Chatterjee, Modarai *et al.* 2018) 166

### Les perspectives :

Figure 11. Flux de transmission potentiels de bactéries résistantes aux antibiotiques entre compartiments (UK 2014) 170

### Annexe 7 :

Figure 12. Pourcentage des individus enquêtés possédant une à quatre espèces animales (n=70) 199

Figure 13. Distribution des espèces animales possédées par les personnes enquêtées (n=70) 200

Figure 14. Distribution des espèces animales possédées par les personnes enquêtées correspondant au critère d'inclusion (n=23) 200

## Abréviations

BMR : bactéries multi-résistantes aux antibiotiques

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CIRAD : Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement

COI : Commission de l'Océan Indien

C1G : céphalosporine de première génération

C3G : Céphalosporine de 3eme génération

EBLSE : Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu

EHEC : *E. coli* entéro-hémorragiques

EPC : Entérobactéries productrices de carbapénèmases

ERC3G : Entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3eme génération

FAO : Food and Agriculture Organisation

OIE : Organisation mondiale de la Santé animale

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

SOOI : Sud-Ouest de l'Océan Indien



## **Introduction : la résistance bactérienne aux antibiotiques est un problème sanitaire majeur**

Certaines espèces bactériennes et champignons (*Penicillium* sp., *Aspergillus* sp.) produisent des antibiotiques qui sont des **substances détruisant ou bloquant la croissance d'autres micro-organismes présents dans le même environnement**. Cette stratégie confère un avantage évolutif pour le micro-organisme producteur d'antibiotiques en le rendant plus compétitif que les individus non producteurs de son espèce (compétition intra-spécifique) et/ou d'espèces différentes (compétition interspécifique) (Wright 2007).

Les micro-organismes possèdent des mécanismes pour se protéger de l'action des substances toxiques qu'ils produisent, ou que d'autres produisent, il s'agit du phénomène de la résistance aux antibiotiques (Chen, Yuan *et al.* 2016). Ce sont des gènes spécifiques présents dans le micro-organisme qui confèrent cette propriété de résistance aux antibiotiques. Les gènes de résistance aux antibiotiques sont largement diversifiés et retrouvés dans un ensemble d'environnements, par exemple. le tractus intestinal des vertébrés, l'eau, le sol, les plantes (Fitzpatrick and Walsh 2016). Plus de 177 gènes de résistance ont été identifiés chez des bactéries du sol de 17 zones non perturbées et isolées de l'Arctique en 2015 (Van Goethem, Pierneef *et al.* 2018). Ce « pool » de gènes de résistance présents dans l'environnement est appelé le résistome, il existe depuis plusieurs milliard d'années, bien avant l'ère des antibiotiques modernes (D'Costa, King *et al.* 2011).

En 1928, Alexander Fleming débuta une série d'expérimentations sur le genre bactérien *Staphylococcus*. Il découvrit fortuitement l'effet inhibiteur d'un champignon *Penicillium notatum* sur ses cultures bactériennes et sur d'autres bactéries pathogènes (Tan and Tatsumura 2015). Il extrait alors la pénicilline qui fut le premier antibiotique et constitua une révolution médicale permettant de soigner des infections bactériennes mortelles (Ligon 2004). Cependant, dès 1940, avant même sa commercialisation (1943), il fut constaté l'acquisition de la capacité des bactéries à y résister (Abraham and Chain 1988).

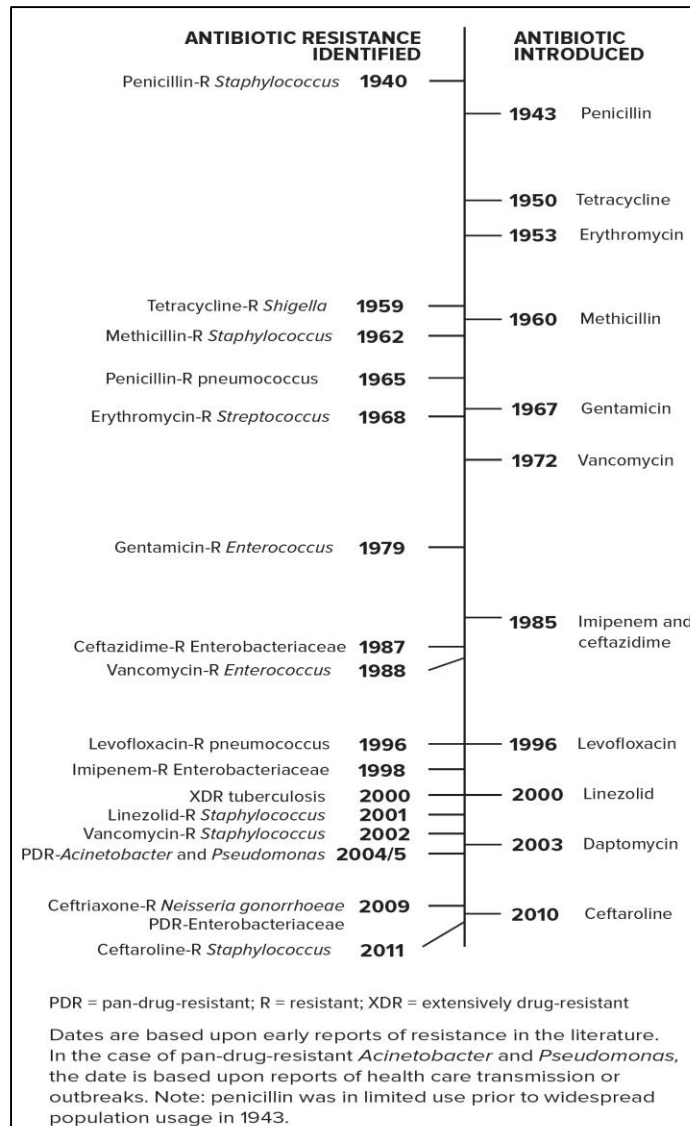
Si l'exposition aux antibiotiques (tels que la tétracycline), par voie alimentaire, a été démontrée chez des populations nubiennes du Soudan datant de 350-550 ans avant JC (Nelson, Dinardo *et al.* 2010),

l'usage des antibiotiques n'a cessé d'augmenter pour soigner les infections chez l'homme et rapidement pour un usage vétérinaire (par exemple pour les mammites des vaches laitières (Foley EG 1946)). L'usage massif des antibiotiques a conduit à sélectionner / favoriser les bactéries possédant des gènes de résistance aux antibiotiques qui sont les seules à survivre. Cela étant particulièrement vrai pour les bactéries pathogènes qui sont exposées aux antibiotiques.

En 1946, Alexander Fleming alertait déjà sur les risques de surconsommation de la pénicilline :

« Le public va demander ... [de la pénicilline] et à partir de là débutera une époque...d'abus. Les microbes sont éduqués pour résister à la pénicilline et les « penicillin-fast organisms » peuvent être transmis à d'autres personnes jusqu'à atteindre une personne souffrant de septicémie ou de pneumonie que la pénicilline ne pourra pas sauver. Dans un tel cas, la personne inconsciente qui joue avec la pénicilline est moralement responsable de la mort de la personne qui succombe d'une infection par un organisme résistant à la pénicilline. J'espère que le mal pourra être évité. » [traduit de l'anglais à partir de l'article Penicillin's finder assays in future, New York Times, 1945, vol 21].

En résumé, les bactéries possédant la capacité de résister aux antibiotiques ont un avantage évolutif et n'ont cessé de se propager. Comme nous pouvons le voir dans la frise chronologique ci-contre (figure 1), après la commercialisation d'un nouvel antibiotique, des bactéries pathogènes capables d'y résister sont identifiées dans la décennie. Ceci contraint donc à l'usage d'antibiotiques plus récents sélectionnant à leur tour de nouvelles résistances. Or, cette augmentation globale de la résistance aux antibiotiques s'est accompagnée de l'échec de la découverte de nouveaux traitements antibactériens (Brown and Wright 2016).



**Figure 1. Chronologie de l'apparition de la résistance aux antibiotiques (Ventola 2015)**

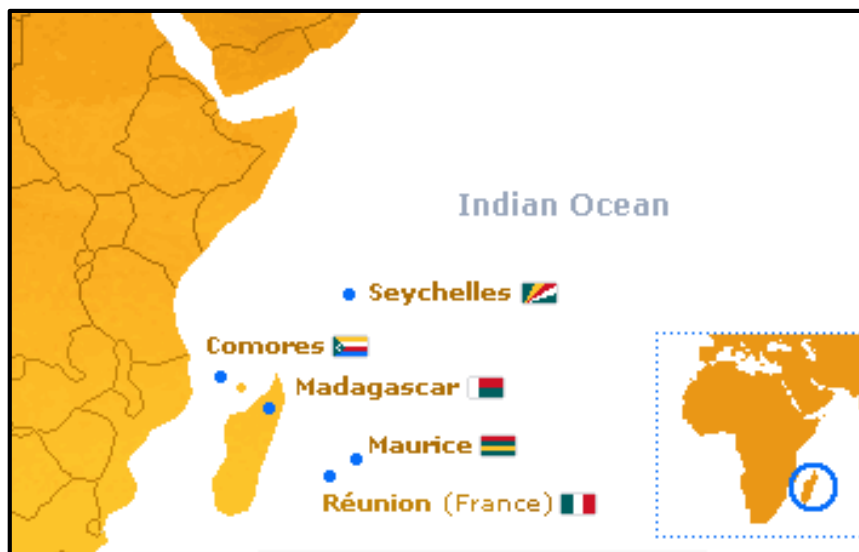
A l'échelle planétaire, la résistance aux antibiotiques est reconnue comme un problème sanitaire majeur pour l'agriculture, la santé humaine et animale. Elle fait l'objet d'un plan mondial de lutte depuis 2015 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) puisqu'elle menace notre capacité à soigner les maladies infectieuses courantes (OMS 2016) ; des maladies qui étaient faciles à traiter redeviennent à nouveaux mortelles avec l'émergence de bactéries pathogènes multi-résistantes. Selon les projections de Jim O'Neill (2014), si aucune stratégie de lutte contre la résistance aux antimicrobiens n'est mise en place, dix millions de personnes pourraient mourir d'infections bénignes incurables en 2050, ce qui en ferait la première cause de mortalité à travers le monde avant le cancer (8,2 millions de décès) (O'Neill 2014).

Au sens strict, **les bactéries multi-résistantes (BMR) sont des bactéries qui présentent une résistance à au moins un agent de chaque classe d'antibiotique dans trois classes d'antibiotiques différentes** (Magiorakos, Srinivasan *et al.* 2012). La première détection de la majorité des BMR, ou des gènes de résistance aux antibiotiques émergents, a eu lieu en milieu hospitalier puis en communauté chez l'homme. Ceci pourrait indiquer chez l'homme une diffusion progressive des BMR avec comme point de départ leur émergence en milieu hospitalier (Mirelis, Navarro *et al.* 2003, Munday, Whitehead *et al.* 2004). Cela a été le cas pour le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) en 1961 en Angleterre (Jevons 1961), les Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (EBLSE) en 1983 en Allemagne (Knothe, Shah *et al.* 1983) ou les Entérobactéries productrices de carbapénèmases (EPC) avec le gène *bla<sub>NDM-1</sub>* en 2008 chez un patient suisse ayant été hospitalisé en Inde (Yong, Toleman *et al.* 2009).

Quant au plasmide portant la résistance à la colistine, avec le gène *mcr-1*, il a été identifié pour la première fois dans des prélèvements de porcs de 2012 avant d'être détecté chez l'homme (Liu, Wang *et al.* 2016). La première identification des mêmes BMR chez les animaux a souvent eu lieu plus tardivement (par exemple les SARM causant des mammites chez les vaches dans les années 70 en Belgique (Aires-de-Sousa 2017) ; EBLSE chez un chien en 1988 au Japon (Matsumoto, Ikeda *et al.* 1988)). Cette détection de BMR plus tardive chez l'animal pourrait traduire un biais de surveillance puisque davantage de ressources sont allouées aux analyses microbiologiques en santé humaine.

L'émergence de nouvelles BMR et de gènes de résistances aux antibiotiques semble avoir comme origine des environnements sous pression antibiotique forte tels que les hôpitaux et les élevages. Ainsi, des isolats de *Salmonella enterica* sérovar Thyphimurium présentant des résistances à l'ampicilline, dues à la présence du gène *bla<sub>TEM-1</sub>*, datant d'une période antérieure à la mise sur le marché de l'antibiotique (1961) questionnent une origine animale de la résistance (cette espèce bactérienne est connue pour coloniser les animaux d'élevage) (Tran-Dien, Le Hello *et al.* 2018). En effet, l'usage de pénicilline G comme additif alimentaire chez les animaux d'élevage dès la fin des années 50 pourrait avoir favorisé la transmission de la résistance à l'ampicilline avant d'être transmis à l'homme par voie alimentaire (Tran-Dien, Le Hello *et al.* 2018).

La Commission de l'océan Indien (COI) est une organisation inter-gouvernementale qui regroupe les territoires de Madagascar (pays à faible revenu), Maurice (pays à revenu intermédiaire), l'Union des Comores (pays à faible revenu), La Réunion (pays à revenu élevé, France) et Les Seychelles (pays à revenu élevé) (figure 2). L'un des objectifs de la COI est de renforcer la surveillance épidémiologique et la veille sanitaire pour ces territoires insulaires vulnérables aux émergences de maladies infectieuses (Renault, Solet *et al.* 2007). Dès 2015, la résistance aux antibiotiques a été reconnue comme une priorité de santé publique pour les territoires de la COI (COI 2015).



**Figure 2. Territoires réunis au sein de la Commission de l'océan Indien**

(source : [www.habarizacomores.com](http://www.habarizacomores.com))

Dans cette thèse les territoires de la COI et de Mayotte (archipel des Comores) sont regroupés sous la dénomination Sud-Ouest de l'Océan Indien (SOOI) (plus de détails [partie 1](#)).

A ce jour, aucun système de surveillance épidémiologique des BMR commun à l'ensemble des territoires de la COI n'est opérationnel (COI 2015), ni au sein de chaque territoire (hormis La Réunion en milieu hospitalier). Ceci ne permet pas d'avoir une vision claire :

- i) des niveaux de contamination par les BMR des différents secteurs (élevage, environnement, homme) ;
- ii) des caractéristiques épidémiologiques des groupes d'individus à risque d'infection et/ou de colonisation par des BMR ;



iii) de la distribution de ces résistances aux antibiotiques dans l'espace et le temps.

Dès les années 1970, le concept de « One medicine » apparaît comme la reconnaissance des interactions étroites entre l'homme et les animaux favorables à la nutrition, la cohabitation et la santé de tous (Schwabe 1969). Ce concept a évolué avec la nécessité d'une gestion des risques de propagation d'agents infectieux zoonotiques due aux interactions entre les trois réservoirs : homme, animal et environnement. Ceci nécessitant la mutualisation des moyens pour la détection et la gestion des risques en santé publique et vétérinaire (Kahn 2006).

Le concept « One Health » a été mis concrètement en application en 2008 pour réduire les risques de maladies infectieuses à l'interface animal-homme-écosystème faisant suite à la pandémie d'Influenza aviaire hautement pathogène (émergence 2003, Chine) (FAO 2008). Depuis 2016, la tripartite (Food and Agriculture Organisation (FAO) /OMS/ Organisme mondial de la santé animale (OIE)) reconnaît le concept « One Health » comme fondamental pour lutter contre la propagation de la résistance bactérienne aux antibiotiques dans les trois compartiments : homme, animal et environnement (FAO 2016).

**Trois points clés sur la résistance aux antibiotiques :**

- La résistance aux antibiotiques est un phénomène naturel qui existait avant la découverte des antibiotiques modernes.
- L'usage massif d'antibiotiques suite à leur commercialisation a favorisé la sélection des bactéries résistantes dont certaines pathogènes (induisant des maladies).
- Les BMR conduisent à des échecs thérapeutiques.

**« Les bactéries résistantes aux antibiotiques émergent aussi bien chez l’homme, les animaux ou l’environnement et peuvent se propager de l’un à l’autre, mais aussi d’un pays à l’autre. La résistance bactérienne aux antibiotiques ne connaît ni frontières géographiques, ni barrière d’espèces »**

[https://www.who.int/foodsafety/areas\\_work/antimicrobial-resistance/tripartite/en/](https://www.who.int/foodsafety/areas_work/antimicrobial-resistance/tripartite/en/)

## Les objectifs de la thèse

L’objectif général de ce travail de thèse était d’identifier, parmi les trois compartiments du concept « One Health » (l’homme, l’animal et l’environnement), le principal réservoir d’Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (EBLSE) dans le SOOI.

Plus spécifiquement les objectifs suivants ont été traités :

En [première partie](#), une revue de la littérature des données disponibles a été réalisée pour identifier les tendances épidémiologiques de la résistance bactérienne aux antibiotiques chez l’homme et l’animal dans le SOOI ([chapitre 1](#)).

Les EBLSE ayant été identifiées comme une priorité de santé publique et de santé vétérinaire par cet état de l’art, une revue bibliographique plus spécifique visait à les décrire biologiquement, définir leurs mécanismes de résistance aux antibiotiques et les clés de leur succès de propagation ([chapitre 2](#)).

En [seconde partie](#), une attention particulière a été portée sur l’estimation de la prévalence d’EBLSE dans les trois compartiments de l’approche « One Health » et l’identification des déterminants de cette prévalence dans le SOOI.

Les compartiments ont été appréhendés de manière indépendante.

- Pour étudier la prévalence de colonisation par les EBLSE du compartiment humain : depuis 2015 au Centre Hospitalier-Universitaire (CHU) Félix Guyon (La Réunion) un dépistage systématique de la colonisation par les BMR est effectué en routine pour l’ensemble des patients arrivant de

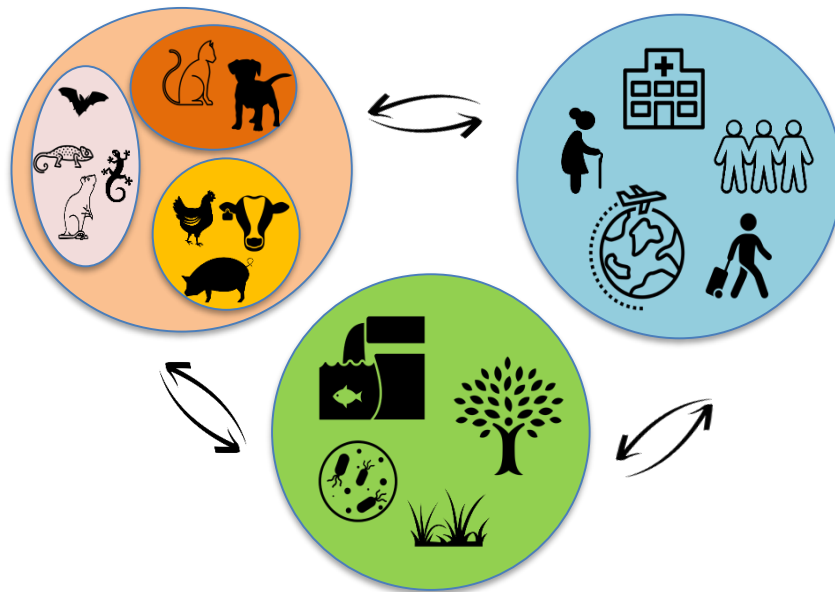
l'étranger. Une cartographie de la prévalence de colonisation par les BMR chez les patients résidant dans les territoires du SOOI a été proposée à partir de ces données ([chapitre 3](#)).

- Pour étudier la prévalence inter-élevage d'EBLSE dans les élevages intensifs : une étude transversale menée en 2016-2017 a permis d'estimer le pourcentage d'élevages intensifs contaminés par les EBLSE dans les filières porcs, volailles de chair et de bovins à viande à La Réunion, Mayotte et Madagascar. Des déterminants de la prévalence inter-élevage d'EBLSE par territoire et filière d'élevage ont été identifiés ([chapitre 4](#)).
- Pour étudier la distribution des EBLSE dans l'environnement : les zones géographiques potentiellement contaminées par les EBLSE à La Réunion ont été identifiées en utilisant les rats (*Rattus rattus* et *Rattus norvegicus*) comme bio-indicateurs ([chapitre 5](#)).

En [troisième partie](#), une approche holistique combinant simultanément les trois compartiments a permis, dans un premier temps, d'identifier les déterminants de la colonisation par les EBLSE du compartiment humain en communauté à Madagascar. Dans un second temps, cette étude transversale visait à estimer la prévalence de colonisation et de contamination par les EBLSE des trois compartiments de l'approche One Health (figure 3), connectés spatialement et temporellement, dans la commune d'Andoharanofotsy en 2018.

Des hypothèses de transmission d'EBLSE entre compartiments ont été inférées dans un pays en développement ([chapitre 6](#)).

L'ensemble des résultats obtenus ont été synthétisés dans la [discussion générale](#) du manuscrit et des [perspectives](#) à ce travail de thèse suggérées.



**Figure 3. Représentation schématique de l'approche One Health intégrant la santé des hommes, des animaux et des écosystèmes**



## Partie 1 : Contexte et état de l'art

### Chapitre 1. Les bactéries multi-résistantes dans la zone du Sud-Ouest de l'océan Indien : lesquelles surveiller, chez quels hôtes réservoirs et dans quels territoires ? Une revue de la littérature

A La Réunion la situation épidémiologique des BMR en milieu hospitalier est suivie au travers d'un réseau national de prévention des infections associées aux soins mis en place depuis 2008 (CPIAS-Reunion 2016). Aucune synthèse des connaissances sur la situation épidémiologique des BMR dans les autres territoires de l'océan Indien n'avait été réalisée auparavant.

Ce constat a conduit à rassembler les documents publiés sur la résistance bactérienne aux antibiotiques pour le SOOI avec l'objectif général de déterminer quelles étaient les BMR les plus identifiées dans chaque territoire, leurs niveaux de prévalence (pourcentage de cas porteur/infecté par une BMR pour une population cible) et/ou les niveaux de résistance aux antibiotiques observés chez les espèces bactériennes isolées (nombre de bactéries résistantes à un antibiotique donné sur le nombre de bactéries de la même espèce testés pour ce même antibiotique).

Les objectifs spécifiques de cette revue visaient à répondre aux interrogations suivantes :

- Quelles sont les espèces bactériennes présentant les niveaux de résistance les plus élevés pour un panel d'antibiotiques (profils phénotypiques et gènes de résistances) dans les territoires du SOOI ?
- Quels sont les territoires les plus affectés par ces BMR ?
- Quels sont les hôtes (espèces vertébrées) les plus colonisés ou infectés par des BMR ?
- Pouvons-nous dégager des priorités de recherche et des recommandations relatives à la surveillance épidémiologique et au contrôle des BMR pour le SOOI ?

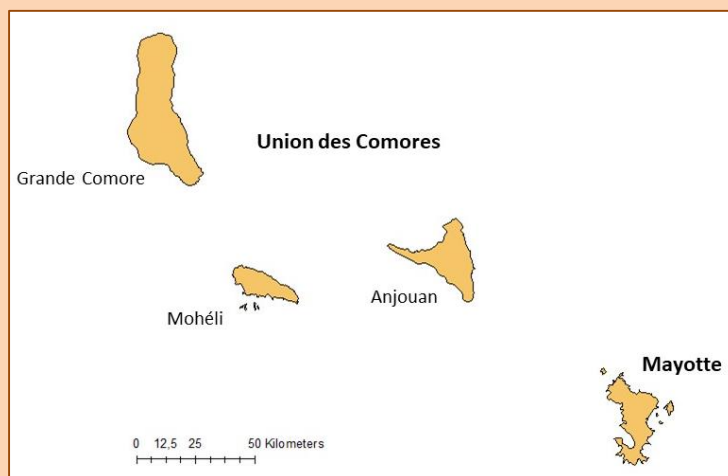
Ce travail a été réalisé pour les territoires de la COI et le territoire de Mayotte.

### Pourquoi avoir inclus Mayotte dans ce travail ?

Mayotte est un département français d'outre-mer qui se situe géographiquement dans l'Union des Comores (figure 4).

L'Union des Comores, colonisée par la France jusqu' à 1974, est composée de plusieurs îles. Seule Mayotte a souhaité rester française lors des référendums de 1974 et 1976. En conséquence l'île possède des infrastructures médicales d'un standard français et donc européen, ce qui n'est pas le cas de l'Union des Comores (pays à faible revenu). Néanmoins, l'île de Mayotte n'est pas reconnue par la communauté internationale et ne fait donc pas officiellement partie de la COI.

Au vu de sa proximité géographique avec l'Union des Comores, des échanges de voyageurs, de patients et de denrées avec les autres territoires du SOOI et des spécificités sanitaires propres à cette île, il était approprié de l'inclure dans cette analyse en tant qu'unité géographique indépendante.



**Figure 4. L'Union des Comores et Mayotte**

Les résultats de ce travail ont été publiés dans la revue *Frontiers in Public Health* en 2017.

---

**Article 1.** Gay N, Belmonte O, Collard J-M, Halifa M, Issack MI, Mindjae S, Palmyre P, Ibrahim AA, Rasamoelina H, Flachet L, Lilleul L, Cardinale E. Review of antibiotic resistance in the Indian Ocean Commission: a human and animal health issue. *Front Public Health*. 5:162. doi: 10.3389/fpubh.2017.00162

---

## **Article 1. Review of antibiotic resistance in the Indian Ocean Commission: a human and animal health issue**

Noellie Gay<sup>1\*</sup>, Olivier Belmonte<sup>2</sup>, Jean-Marc Collard<sup>4</sup>, Mohamed Halifa<sup>5</sup>, Mohammad Iqbal Issack<sup>6</sup>, Saindou Mindjae<sup>7</sup>, Philippe Palmyre<sup>8</sup>, Abdul Aziz Ibrahim<sup>8</sup>, Harena Rasamoelina<sup>9</sup>, Loïc Flachet<sup>9</sup>, Laurent Filleul<sup>3</sup>, Éric Cardinale<sup>1,9</sup>

1 AnimalS, health, Territories, Risks and Ecosystems Unit, Department of Animal Health, French Agricultural Research Center for International Development, Montpellier, France.

2 Bacteriology laboratory, Félix Guyon Hospital, Saint-Denis, Reunion, France.

3 Regional Unit of Indian Ocean, Santé Publique France, French national public health agency, Reunion, France.

4 Experimental bacteriology Unit, Pasteur Institute of Madagascar, Antananarivo, Madagascar.

5 El Maroof hospital, Moroni, Union of Comoros.

6 Central Health Laboratory, Victoria Hospital, Candos, Mauritius.

7 General Direction of Health, Moroni, Union of Comoros.

8 Victoria Hospital, Victoria, Mahé, Seychelles.

9 Health Monitoring Unit, Indian Ocean Commission, Port-Louis, Mauritius.

### **Corresponding author**

noellie.gay@cirad.fr

### **Abstract**

Antimicrobial Resistance (AMR) is a major threat to human, animal health and environment worldwide. For human, transmission occurred through a variety of routes both in health care settings and community. In animals, AMR was reported in livestock, pets and wildlife; transmission of AMR can be zoonotic with the probably most important route being food-borne transmission. The Indian Ocean Commission (IOC), composed of Comoros, Madagascar, Mauritius, Reunion (France) and Seychelles recognized the surveillance of AMR in both animal and human as a main public health priority for the region. Mayotte, French overseas territory, located in Comoros archipelago, was also included in this review.

This review summarized our best epidemiological knowledge regarding AMR in Indian Ocean. We documented the prevalence, phenotypic and genotypic profiles of prone to resistance Gram-positive and Gram-negative bacteria both in animals and humans. Our review clearly pointed out Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase and Carbapenemase producing Enterobacteriaceae as main human and animal health issue in IOC. However, publications on AMR are scarce, particularly in Comoros, Mayotte and



Seychelles. Thus, research and surveillance priorities were recommended i) estimating the volume of antimicrobial drugs used in livestock and human medicine in the different territories (mainly Third Generation Cephalosporin (3GC); ii) developing a “One Health” surveillance approach with epidemiological indicators as zoonotic foodborne pathogen (i.e. couple *Escherichia Coli*-resistance to 3GC/ Carbapenems); iii) screening travelers with a history of hospitalization and consumption of antibiotic drug returning from at risk areas (e.g. mcr-1 transmission with China or hajj pilgrims) allowing an early warning detection of the emergence for quick control measures implementation in IOC.

### **Keywords**

Indian Ocean, Epidemiology, Antimicrobial resistance, One Health, Prevalence, Surveillance, Zoonosis

### **Introduction**

Increasing global Antimicrobial Resistance (AMR) is a major threat to human and animal endangering decades of improvements in health care outcomes. It endangers modern human and veterinary medicine and undermines food safety (FAO, 2016).

In humans, the global burden of AMR is longer duration of illness, higher lethality, increasing costs of treatment, and inability to cure infected patient (Laxminarayan *et al.*, 2013). In animals, antibiotic drugs use in terrestrial and aquatic animals maintains food safety, animal welfare, and protect livelihoods (Pagel and Gautier, 2012).

Transmission of AMR to human can be zoonotic taking place through a variety of routes where the food-borne route is probably the most important (Wegener, 2012). Direct transmission also occurs for specific bacteria species (e.g. methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*).

The Indian Ocean Commission (IOC) is composed of five countries: Comoros, Madagascar, Mauritius, Reunion (France) and Seychelles. Mayotte, French overseas territory located in Comoros archipelago was also included in the study. In 2015, the IOC identified AMR surveillance in both animal and human as a main priority for territories (COI, 2015). However, AMR burden is not well evaluated but epidemiological trends in IOC should be identified.

Our systematic review objective was summarizing epidemiological knowledge and trends of AMR in

prone-to-multidrug resistance bacteria species (Magiorakos *et al.*, 2012), faecal-oral and foodborne bacteria in human and animals in IOC. We documented the prevalence, phenotypic and genotypic profiles of resistance of the selected bacteria in i) Gram-positive and ii) Gram-negative bacteria.

### **Material and methods**

The study performed from January to March 2017 included articles and conference abstracts published from 1990 to December 2016. Bacteria species included in the different searches were those prone to develop multidrug resistance as defined by Magiorakos *et al.* (2012) (i.e. *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. and the genus Enterobacteriaceae), faecal-oral and foodborne bacterial species (*Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and *Shigella* spp.). We used available articles obtained through match searches using Google Scholar (<http://scholar.google.com>), PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) and Web of Knowledge (<http://apps.webofknowledge.com/>). Relevant information was obtained for phenotypic and genotypic profiles of resistance in selected bacteria using its name combined with related terms (resistance, antimicrobial, antibiotic, Comoros, Seychelles, Reunion Island, Madagascar, Mayotte, Indian Ocean, epidemiology). Included publications were those documenting the prevalence, phenotypic and genotypic profiles of resistances of selected bacteria, others were excluded.

### **Results and discussion**

A total of 42 articles were considered relevant for the review.

#### **a. Gram-positive bacteria**

##### ***Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* is one of the most common causes of nosocomial and community infections (von Eiff *et al.*, 2001). Since 1960s, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) were isolated (McCaig *et al.*, 2006) and became a major nosocomial pathogen (Mulligan *et al.*, 1993).

In Madagascar, MRSA was increasing from 2001 to 2014 as observed in table 1 with rising rate of resistance to oxacillin and ceftoxitin. MRSA nasal carriage in community was observed with a prevalence of 14.8% in 2011 (Rasamiravaka *et al.*, 2013, 2016). Overall resistances were higher for widely available

drugs (Randrianirina *et al.*, 2007a). Moreover, 9.0% of veterinary students were asymptomatic MRSA carriers (Rasamiravaka *et al.*, 2016). Increasing rate of resistance to gentamicin (42.9%) and vancomycin (7.1%) was observed in MRSA isolates (Rasamiravaka *et al.*, 2016). Nonetheless, vancomycin and tigecycline are the last drugs demonstrating therapeutic efficacy for MRSA and are compromised by the reduced susceptibility in *S. aureus* (Hu *et al.*, 2016). Phenotypic resistance observed in Madagascar was of concern (Rasamiravaka *et al.*, 2016), confirmation by a antimicrobial reference laboratory for genotyping should be considered.

In Mauritius, in May 2010, among all *S. aureus* isolated in hospitalized patients' infections 37.8% were MRSA (Issack *et al.*, 2011) and 39% were MRSA in July 2014 (Issack, 2016a). All *S. aureus* tested were susceptible to vancomycin (Issack *et al.*, 2011; Issack, 2016a).

In Reunion, MRSA increased from 16.0% in 1997 to 23.0% in 2000 and decreased to less than 15.0% in 2006/07 (Belmonte *et al.*, 2008). *S. aureus* rate of resistance to all antibiotic drugs decreased from 1997 to 2007, with the exception of the fusidic acid (16.0% in 2007). Since 1998, *S. aureus* susceptibility profile changed tending to be more resistant to aminoglycosides and quinolones (Belmonte *et al.*, 2008).

In the other territories, literature remains absent and no publication was found regarding prevalence and antibiotic resistance profiles of *S. aureus* in humans, livestock and pets.

MRSA epidemiological trends should be better addressed in Comoros, Mayotte, Reunion and Seychelles. Rates of resistances for widely available oral agents observed in Madagascar could point out a drug overuse in this territory as well as in Mauritius.

Burden of MRSA in livestock and pets should be addressed particularly as they can directly contaminate veterinary, breeders or other animals (Moodley *et al.*, 2008).

### ***Enterococcus* spp.**

*Enterococcus* spp. are opportunistic bacteria often involved in nosocomial infections, mainly urinary tract infections, endocarditis, wounds and bacteremia (Murray, 2000). Discovered end of 1980's (Woodford *et al.*, 1995), vancomycin-resistant enterococci (VRE) represents a major problem in healthcare settings worldwide.

In Madagascar, in 2006-2008, rate of resistance to vancomycin in *Enterococcus* spp. was 3.3% and was high for lincomycin (90.0%) (Randrianirina *et al.*, 2010). In 2011-2013, one *E. faecalis* resistant to vancomycin (5.6%) was isolated during an uropathogenic survey (Rasamiravaka *et al.*, 2015).

In Mauritius, in May 2010 and July 2014, all *Enterococcus* spp. isolated in hospitalized patients were susceptible to vancomycin (Issack *et al.*, 2011; Issack, 2016a).

In Reunion, Picot *et al.* (2010) did not detect any VRE in 2005 (Picot *et al.*, 2010). In other territories, no publication was found for both humans and animals.

Thus, epidemiological situation of VRE is not clear in IOC but doesn't seem being a main issue both in animals and humans. Identifying drug uses in livestock remains necessary as glycopeptide (e.g avoparcin) use in livestock was correlated with VRE incidence in human populations (van den Bogaard and Stobberingh, 2000).

## **b. Gram-negative bacteria**

### ***Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen causing nosocomial infections (Zhanel *et al.*, 2010). Some strains have been found to be resistant to nearly all antibiotics (Ventola, 2015).

In Madagascar, in 2006-2008, *P. aeruginosa* isolates showed a moderate resistance to penicillin (piperacillin 12.8% and ticarcillin 31.9%) but were susceptible to ceftazidime and imipenem (Randrianirina *et al.*, 2010).

In Mauritius, in May 2010, *P. aeruginosa* isolated in hospitalized patients showed high rate of resistance to antibiotic tested with 51.5% to aminoglycosides (52% gentamicin and 51% amikacin), 47% for ceftazidime, 73% for ciprofloxacin and 40% for meropenem (Issack *et al.*, 2011). In July 2014, a similar survey pointed a decrease of all resistance tested (42% for gentamicin, 29% for amikacin, 30% for ceftazidime, 47% for ciprofloxacin and 27% for meropenem) (Issack, 2016a)

In Reunion, rates of resistance to imipenem increased from 1997 to 2005 (5.9% to 6.1%) (Picot *et al.*, 2010). Outbreaks of *P. aeruginosa* were reported in a neonatal care unit (Gérardin *et al.*, 2006; Naze *et al.*, 2010) but susceptibility testing of strain was not performed. In Reunion, between 2010-2012, OXA-

221 was identified in *P. aeruginosa* associated with  $\beta$ -lactamases and carbapenemase production (Jeannot *et al.*, 2012). The Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase OXA-145 was describe in 2011 in *P. aeruginosa* and conferred resistance to 3GC and monolactams (Hocquet *et al.*, 2011).

Trends regarding *P. aeruginosa* in IOC are not clear but acquisition of new gene of resistance to  $\beta$ -lactams is of concern. Rate of resistance to carbapenems identified in Mauritius are high even if decreasing. Identifying its burden in nosocomial infection is needed as well as aminoglycoside resistance. Recommended treatment for pseudomonas infection usually includes  $\beta$ -lactams and aminoglycosides.

### ***Acinetobacter* spp.**

*Acinetobacter baumannii* is a troublesome pathogens for health care institutions, its ability to acquire resistance determinants, is making it threatening the current antibiotic era (Peleg *et al.*, 2008).

In Madagascar, in 2006-2008, a prevalence of *A. baumannii* of 8.8% was identified in infections diagnosed at hospital, the resistance to ceftazidime (62.0%) and imipenem was high (45.7%) (Randrianirina *et al.*, 2010). Among strains collected between 2006-2009 92.5% were resistant to imipenem and 94.3% to ceftazidime (Andriamanantena *et al.*, 2010). No resistance to carbapenems was reported among ten uropathogenic isolates in community (2011-2013) (Rasamiravaka *et al.*, 2015) but this restricted sample could not reflect the epidemiological situation. The dissemination of multidrug-resistant OXA-23-producing *A. baumannii* in hospitals of Antananarivo (Andriamanantena *et al.*, 2010) could emphasize issues regarding failures of infection control in hospitals (Randrianirina *et al.*, 2010).

In Mauritius, in May 2010, *Acinetobacter* spp. isolated in hospitalized patients showed high rate of resistance to antibiotic tested with 86% for gentamicin and 50% for amikacin (both aminoglycosides), 95% for cefotaxime, 85% for ciprofloxacin and 68% for Meropenem (Issack *et al.*, 2011). In July 2014, a similar survey pointed a decreasing rate of resistance for gentamicin, cefotaxime and ciprofloxacin (respectively 79%, 94% and 82%) and increasing for amikacin (58%) and meropenem (74%) (Issack, 2016a).

In Reunion, from 1997-2005, *A. baumannii* rate of resistance decreased to all antibiotic tested (e.g. ceftazidime (74.3% to 68.1%), imipenem (12.9% to 8.3%), and ciprofloxacin (72.9% to 59.7%) (Picot *et al.*, 2010). In 2006, an outbreak of multi-resistant *A. baumannii* phenotype 5 occurred at the hospital, strains were resistant to all  $\beta$ -lactams (Belmonte *et al.*, 2010). A wide variety of *A. baumannii* sequence types was identified at the hospital and could be related to community-acquired infections; one isolate carrying the *bla*<sub>OXA-23</sub><sup>-</sup> gene was identified (Pailhoriès *et al.*, 2015).

In Comoros, the *bla*<sub>OXA-23</sub><sup>-</sup> gene in *A. baumannii* was identified in 2011 (Bonnin *et al.*, 2013).

Pets can be reservoir of *A. baumannii* (Belmonte *et al.*, 2014). In Reunion the prevalence in pets was 8.5% but no isolates were resistant to carbapenems (Pailhoriès *et al.*, 2015). In cattle, the first case of OXA-24<sup>-</sup> producing *A. baumannii* was recently identified (Pailhoriès *et al.*, 2016).

Resistance to carbapenems in *A. baumannii* was observed in Comoros, Madagascar, Reunion and Mauritius. It is of concern for IOC as *A. baumannii* have an affinity with vulnerable patients (Gootz and Marra, 2008). Producing-carbapenemase *A. baumannii*, with the dissemination of OXA-23 enzymes, should be thoroughly monitored, keeping in mind the possible clonal spread of multi-resistant strains in hospital, community and pets.

## Enterobacteriaceae

$\beta$ -lactamases production are the primary cause of resistance among members of the family Enterobacteriaceae. In recent years,  $\beta$ -Lactamases have extensively diversified in response to clinical use of  $\beta$ -Lactams (Liakopoulos *et al.*, 2016).

### i) Extended-Spectrum $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae (ESBLE)

ESBLE confer resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics except cephamycins and carbapenems and are inhibited by clavulanic acid (Kliebe *et al.*, 1985).

ESBLE was first isolated in Madagascar between 2004-2006 in urinary tract infections (Randrianirina *et al.*, 2007b) as observed in table 2. High fecal carriage of ESBLE was identified in both hospital and community with prevalence of 21.3% in two hospitals from 2006-2008 (Randrianirina *et al.*, 2010), 21.2% in a pediatric hospital in 2008 (Andriatahina *et al.*, 2010) and 10.1% in community in 2009

(Herindrainy *et al.*, 2011). Between 2013 and 2014, 18.5% of rectal colonization was estimated among pregnant women at delivery (Chereau *et al.*, 2015). Another study (2015) pointed out 7.1% of Enterobacteriaceae nasal carriage resistance to Third Generation Cephalosporin (3GC) in patients at admission (Micheel *et al.*, 2015). A study conducted from 2012 to 2013 pointed out the burden of ESBLE in early neonatal infection (12.9%); infections were treated with expanded spectrum cephalosporins due to the lack of carbapenems, and resulted in a high lethality (45 %) (Naas *et al.*, 2016). In Madagascar, ESBLE mostly belong to the CTX-M-15 type (Rakotonirina *et al.*, 2013; Naas *et al.*, 2016), widely distributed worldwide (Coque *et al.*, 2008).

In Mauritius, in 2005, rate of resistance to 3GC in Enterobacteriaceae from urine of patients with presumed community-acquired infection was about 9.0% for cefotaxime and 14.7% for cefixime (table 2). Isolates also showed high rates of resistance to fluoroquinolones (26.4% to ciprofloxacin) (Issack *et al.*, 2007). Between 2010 and 2014, an increase of resistance in Enterobacteriaceae isolated in hospitalized patients was observed (46.7% to 50.7% for cefotaxime and 39.2% to 56.1% for ciprofloxacin) (Issack *et al.*, 2011; Issack, 2016a).

In Reunion, prevalence of ESBLE was increasing at hospital with 2.0% in 1997 and 5.8% in 2007 (Belmonte *et al.*, 2010). Broad-spectrum antibiotics use in hospitals was likely correlated with this evolution (Belmonte *et al.*, 2010). In 2013, main ESBLE involved in infections were *Klebsiella pneumoniae* (38.0%), *Escherichia coli* (37.0%) and *Enterobacter cloacae* (24.0%) with 75.0% of the CTX-M-15 type (Robin *et al.*, 2014).

A prevalence of 14.5% ESBLE was estimated among dogs and cats from veterinary clinics of Reunion Island (Belmonte *et al.*, 2013).

In livestock from Comoros, Madagascar, Mauritius and Mayotte, overall 22.7% of livestock sampled were ESBLE carriers. The highest prevalence was observed among pigs (42.0%) and poultry (26%); Main contaminated farms were located in Madagascar (40.5%), Mayotte (26.9%) followed by Mauritius (13.5%) and Comoros (6.7%) (Miltgen *et al.*, 2014).

No publication was found for Seychelles but prevalence of ESBL (mainly represented by *E. coli*, *K. pneumoniae* and *E. cloacae*) in IOC seems increasing both in humans and animals. Broad-spectrum antibiotics overuse is likely correlated with this evolution (Belmonte *et al.*, 2010).

## ii) Carbapenemase producing Enterobacteriaceae (CPE)

In Madagascar first CPE was reported in a community survey of uropathogens implemented in 2011-2013 (Rasamiravaka *et al.*, 2015). Imipenem rate of resistance was 40.0% for *K. pneumoniae*, 15.0% for *E. cloacae* and 2.3% for *E. coli* (Rasamiravaka *et al.*, 2015). The reduced sample size for this study could not reflect global resistances patterns.

In Mauritius, rate of resistance to meropenem in Enterobacteriaceae increased from 0.51% in 2010 to 5.32% in 2014 among hospitalized patients (Issack *et al.*, 2011; Issack, 2016a).

In Reunion, in 2007, resistance to imipenem in Enterobacteriaceae was low (1 to 2 cases by year) (Belmonte *et al.*, 2008).

First detection of New Delhi Methallo- $\beta$ -Lactamase-1 (NDM-1) gene in *K. pneumoniae* in IOC occurred in a Mauritius patient in 2009 (Poirel *et al.*, 2012), in 2011 in Reunion (Cabanes *et al.*, 2012), in 2013-2014 in Madagascar (Chereau *et al.*, 2015).

In Mayotte, an outbreak of CPE involving *E. cloacae* of IMI-1 type occurred at the hospital (Miltgen *et al.*, 2016). First investigations tend to highlight a community source of contamination but further investigations should confirm it (Miltgen *et al.*, 2016).

In animal, no publication was found regarding CPE.

CPE are endangering the ability to cure infectious diseases. NDM-1 fast propagation in IOC is pointing the need of AMR surveillance and alert system. Mauritius seems particularly affected by CPE, their spread could constitute an issue for other territories as few therapeutic alternatives are available to treat infected patients.

## iii) Foodborne and faecal-oral origin Enterobacteriaceae

### 1. Non-typhoidal *Salmonella* spp.



*Salmonella* is a major foodborne pathogen found worldwide. Most human salmonellosis is associated with eating contaminated raw or undercooked chicken, eggs, pork and contaminated water.

In Madagascar, in 2008-2009, *Salmonella* spp. rate of resistance in community-children was low for 3GC (1.2% for ceftazidime and cefotaxime), absent for quinolones and moderated for ampicillin (35.7%) and ticarcillin (35.7%) (Randrianirina *et al.*, 2014).

In Mauritius, in 2009, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis was isolated in humans without resistance identified for all antibiotic tested; transmission by chicken consumption was suspected (Issack *et al.*, 2014). In 2014, *Salmonella* spp. isolated in stools of patients with gastroenteritis were all sensitive to Ampicillin and Ciprofloxacin and presented low resistance to Trimethoprim-sulfamethoxazole (2%) and Nalidixic Acid (1%) (Issack, 2016b).

In Reunion, between 2007-2009, rates of resistance among *Salmonella* spp. isolated in broiler chicken flocks were of 38.3% to streptomycin, 31.8% to tetracycline and 16.8% to ampicillin (Henry *et al.*, 2013) but no resistance to 3GC was identified. *S. Hadar* displayed reduced susceptibility to fluoroquinolones (80.8% to enrofloxacin) (Henry *et al.*, 2013).

In Comoros, no resistance in *Salmonella* spp. was identified between 1987-1988 (Petat *et al.*, 1990).

Publications regarding AMR among *Salmonella* spp. are scarce in IOC. Resistances to quinolones in *Salmonella* spp. seems appearing in Reunion, probably do to its overuse, but not in Mauritius.

## **2. *Campylobacter* spp.**

*Campylobacter* spp. can cause both gastroenteritis and extra-intestinal disease. *C. jejuni* and *C. coli* are the most often isolated from patients with diarrhea as confirmed in Madagascar in 2010-2012 (70.1% and 23.6% respectively) (Randremanana *et al.*, 2014). Main infection source in humans is undercooked chicken, raw or unpasteurized milk, and cross-contamination from the environment (Humphrey *et al.*, 2007).

In Madagascar, rate of resistance in *Campylobacter* spp. was moderate in community children in 2008-2009, with overall resistance of 24.8% for amoxicillin, 2.2% for ciprofloxacin, 1.8% for erythromycin

and 1.1% for tetracycline (Randrianirina *et al.*, 2014). Rate of resistance was higher for *C. coli* (Randrianirina *et al.*, 2014).

In animals, *Campylobacter* spp. collected in 2005-2006 from chicken neck-skin in Madagascar presented 35.8% of resistance to ampicillin, 18.3% to erythromycin, 5.5% to ciprofloxacin and 3.7% to nalidixic acid (Garin *et al.*, 2012).

In Mauritius, in 2014, *Campylobacter* spp. isolated in gastroenteritis cases presented high resistance to Quinolones with 51% of resistance to ciprofloxacin and 4% to erythromycin (Issack, 2016b). High quinolone resistance in *Campylobacter* spp. is probably due to antibiotic overuse in veterinary medicine (Issack, 2016b).

Publications regarding AMR among *Campylobacter* spp. are scarce in IOC particularly in animals. Resistance to quinolones in Mauritius could be due to its overuse in poultry industry (Issack, 2016b).

### **3. *Shigella* spp.**

*Shigella* spp. is responsible for dysentery predominating in developing countries (Kahsay and Muthupandian, 2016).

In Madagascar, in 1988-1989, resistances in *S. dysenteriae* started being observed (Cassel-Béraud *et al.*, 1990). In 2008-2009, rate of resistance in community children were high for widely used drugs (e.g. 79.9% for trimethoprim-sulfamethoxazole, 62.8% for amoxicillin, 62.2% for ticarcillin) but no resistance for ciprofloxacin was reported (Randrianirina *et al.*, 2014).

In Comoros, *Shigella* spp. isolated between 1987-1988 did not exhibit significant resistances (Petat *et al.*, 1990).

Few up-to-date publications regarding AMR in *Shigella* spp. were found.

### **Perspectives**

One main challenge regarding this review was the data collection and comparison of AMR patterns between territories in the diversity of study designs (diagnosis isolates vs. systematic detection), antibiogram panels, over different periods of time and targeting various bacteria species. Thus, results

should be interpreted with caution but this attempt of review was not performed before and confirmed that AMR is threatening IOC. Main issue identified for IOC was ESBL and CPE which is in agreement with their increase worldwide over the past decade (Cantón *et al.*, 2012).

Literature was limited in Comoros, Mayotte and Seychelles confirming needs to develop AMR surveillance and research in these territories and scarce for bacterial species: *Enterococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and *Shigella* spp.

In IOC, the SEGA-One Health network was created in 2009 with the objective of monitoring outbreak-prone infections (Solet *et al.*, 2014). It aims to develop a surveillance of AMR in human and animals but disparity of resources between territories and between animal and human health could be a brake in the establishment of such a system.

Thus, priorities should be established:

i) A direct relationship between antibiotic consumption, emergence and dissemination of AMR was demonstrated (The antibiotic alarm, 2013). Estimating the volume of antimicrobial drugs used, types and access (e.g. over-the-counter) is an essential step for IOC. The overuse of 3GC could have driven to selection pressures on bacterial community in both animals and humans observed (i.e. ESBL and CPE in hospitals with carbapenems use). Drugs monitoring could help predicting risks of emergence in territories (Van Boeckel *et al.*, 2015). Research on drug uses and habits in community, by practitioners and in livestock should be explored to adapt control measures.

ii) Integrated AMR One health approach including human, animal and environment in both surveillance and research is clearly needed (e.g. MRSA in veterinarians, *A. baumannii* in pets, humans and livestock, ESBL in livestock and humans). Using standardized indicators (antibiotic drugs-bacteria species couple) for surveillance of AMR patterns across health care settings, countries and host species is essential. One relevant epidemiological indicator, for both animal and human, could be *E. Coli* AMR, particularly 3GC and carbapenems. Surveillance should be accompanied by further investigations regarding genetic support of resistance between hosts for source of contamination and dynamics of propagation between reservoirs identification (human, animal and environment).

iii) Spread of NDM-1-Producing Enterobacteriaceae in IOC confirms needs for strengthening the early warning surveillance system of AMR emergences. The region is connected to hotspots of AMR as Asia (12.0% of traffic) characterized by high AMR prevalence in community (e.g. ESBL in China (Quan *et al.*, 2017), important antibiotic consumption (Van Boeckel *et al.*, 2014), and emergence of new AMR profiles (e.g. NDM-1, mcr-1) (Liu *et al.*, 2016)). Screening of travelers, returning from at risk AMR areas, with a history of hospitalization and consumption of antibiotic drugs abroad has been recently proposed (Armand-Lefevre *et al.*, 2017) and could be relevant for an early emergence detection. However, screening is costly, thus, initiating reflection regarding pooling laboratory resources is essential.

Our article is the first attempt summarizing knowledge regarding AMR in both animal and human health sectors in IOC. This review clearly points out research and surveillance gaps and constitutes a tool for future activities to lead.

#### **Author contribution**

NG performed the review and collected the data from literature; NG wrote the first draft of the manuscript; EC, OB, LF revised and provided first feedback for the manuscript. All authors provided articles, have drafted and revised the work critically for important intellectual contents and approved the final version. All authors agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

#### **Funding**

This article has been funded by the Indian Ocean Health Agency and the European Regional Development Fund “Traquer les Risques Sanitaires dans l’océan Indien avec une approche One Health”.

#### **Acknowledgments**

Félix Guyon Hospital for technical laboratory support.

### Conflict of interest Statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

### References

- Andriamanantena, T. S., Ratsima, E., Rakotonirina, H. C., Randrianirina, F., Ramparany, L., Carod, J. F., *et al.* (2010). Dissemination of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* in various hospitals of Antananarivo Madagascar. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 9, 17. doi:10.1186/1476-0711-9-17.
- Andriatahina, T., Randrianirina, F., Hariniana, E. R., Talarmin, A., Raobijaona, H., Buisson, Y., *et al.* (2010). High prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric unit in Madagascar. *BMC Infect Dis* 10, 204. doi:10.1186/1471-2334-10-204.
- Armand-Lefevre, L., Ruppé, E., and Andremont, A. (2017). ESBL-producing Enterobacteriaceae in travellers: doctors beware. *Lancet Infect Dis* 17, 8–9. doi:10.1016/S1473-3099(16)30417-0.
- Belmonte, O., Pailhoriès, H., Kempf, M., Gaultier, M.P., Lemarié, C., Ramont, C., Joly-Guillou, M.L., Eveillard, M. (2014). High prevalence of closely-related *Acinetobacter baumannii* in pets according to a multicentre study in veterinary clinics, Reunion Island. *Vet Microbiol* 170, 446–450. doi:10.1016/j.vetmic.2014.01.042.
- Belmonte, O., Pailhoriès, H., Kempf, M., Gaultier, M.P., Lotteau, H., Legendre, P., Holzapfel, G., Melot, P., Losfelt, T., Venturini, L., Plazanet, D., Lemercier, I., Teppe, K., Severin, W., Joly-Guillou, M.L., Eveillard, M. (2013). Prevalence of multiresistant gram-negative bacteria in pets according to a cross-sectional study conducted in veterinary clinics, La Reunion Island. in: Federation of European Microbiological Societies. *5<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists*. 2013 July; Leipzig, Germany.
- Belmonte, O., Drouet, D., Alba, J., Moiton, M.P., Kuli, B., Lugagne-Delpon, N., Murlan, C., Jaffar-Bandjee, M. C. (2010). [Evolution of Enterobacteriaceae resistance to antibiotics in Reunion Island: emergence of extended-spectrum beta-lactamases]. *Pathol Biol* 58, 18–24. doi:10.1016/j.patbio.2009.07.021.
- Belmonte, O., Moiton, M.P., Drouet, D., Lefort, Y., Alba, J., Jaffar-Bandjee, M. C. (2008). Particularité de l'écologie bactérienne réunionnaise: actualité au Centre hospitalier Félix Guyon (CHFG). in: Société de pathologie infectieuse de langue française editor. *Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse*. 2008 Dec; Paris, France.
- Bonnin, R. A., Poirel, L., Benoit-Cattin, T., and Nordmann, P. (2013). Ceftazidime-susceptible and imipenem-non-susceptible OXA-58-producing *Acinetobacter baumannii* from the Comoros archipelago. *Int J Antimicrob Agents* 41, 297–298. doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.11.002.
- Cabanes, F., Lemant, J., Picot, S., Simac, C., Cousty, J., Jalin, L., *et al.* (2012). Emergence of

- Klebsiella pneumoniae and Salmonella metallo-beta-lactamase (NDM-1) producers on reunion island. *J Clin Microbiol* 50, 3812. doi:10.1128/JCM.01029-12.
- Cantón, R., Akóva, M., Carmeli, Y., Giske, C. G., Glupczynski, Y., Gniadkowski, M., *et al.* (2012). Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 18, 413–431. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03821.x.
- Cassel-Béraud, A. M., Coulanges, P., Richard, C., and Vaslet, I. (1990). [Antibiotic resistance of strains of Shigella dysenteriae and flexneri isolated in Tananarive and on the east coast of Madagascar]. *Bull Soc Pathol Exot* 83, 31–36. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2190702>.
- Chereau, F., Herindrainy, P., Garin, B., Huynh, B. T., Randrianirina, F., Padget, M., *et al.* (2015). Colonization of extended-spectrum-  $\beta$ -lactamase- and NDM-1-producing Enterobacteriaceae among pregnant women in the community in a low-income country: A potential reservoir for transmission of multiresistant Enterobacteriaceae to neonates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 3652–3655. doi:10.1128/AAC.00029-15
- COI (2015). Rapport annuel 2015. Commission de l’Océan Indien. Port Saint Louis. 114 p. Available at: [http://commissionoceanindien.org/fileadmin/resources/SG/Rapport annuel 2015.pdf](http://commissionoceanindien.org/fileadmin/resources/SG/Rapport%20annuel%202015.pdf).
- Coque, T. M., Novais, A., Carattoli, A., Poirel, L., Pitout, J., Peixe, L., *et al.* (2008). Dissemination of clonally related Escherichia coli strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis* 14, 195–200. doi:10.3201/eid1402.070350.
- European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (2015). *Comité de l’antibiogramme de la Société Française de Microbiologie- Recommandation 2015*. Strasbourg. Available at: [http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFMV2\\_030915.pdf](http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFMV2_030915.pdf) [Accessed March 9, 2017].
- FAO (2016). *Drivers, dynamics and epidemiology of antimicrobial resistance in animal production*. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>.
- Garin, B., Gouali, M., Wouafo, M., Percec, A. M., Pham, M. T., Ravaonindrina, N., *et al.* (2012). Prevalence, quantification and antimicrobial resistance of Campylobacter spp. on chicken neck-skins at points of slaughter in 5 major cities located on 4 continents. *Int J Food Microbiol* 157, 102–107. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.020.
- Gérardin, P., Farny, K., Simac, C., Laurent, A. F., Grandbastien, B., and Robillard, P. Y. (2006). [Pseudomonas aeruginosa infections in a neonatal care unit at Reunion Island]. *Arch Pediatr* 13, 1500–1506. doi:10.1016/j.arcped.2006.09.007.
- Gootz, T. D., and Marra, A. (2008). Acinetobacter baumannii: an emerging multidrug-resistant threat. *Expert Rev Anti Infect Ther* 6, 309–325. doi:10.1586/14787210.6.3.309.
- Henry, I., Granier, S., Courtillon, C., Lalande, F., Chemaly, M., Salvat, G., *et al.* (2013). Salmonella enterica subsp. enterica isolated from chicken carcasses and environment at slaughter in Reunion Island: prevalence, genetic characterization and antibiotic susceptibility. *Trop Anim Heal. Prod* 45, 317–326. doi:10.1007/s11250-012-0221-2.
- Herindrainy, P., Randrianirina, F., Ratovoson, R., Ratsima Hariniana, E., Buisson, Y., Genel, N., *et al.* (2011). Rectal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing gram-negative bacilli

- in community settings in Madagascar. *PLoS One* 6, e22738. doi:10.1371/journal.pone.0022738.
- Hocquet, D., Colomb, M., Dehecq, B., Belmonte, O., Courvalin, P., Plésiat, P., *et al.* (2011). Ceftazidime-hydrolysing  $\beta$ -lactamase OXA-145 with impaired hydrolysis of penicillins in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrobial Chemother* 66, 1745-1750. doi:10.1093/jac/dkr187.
- Hu, Q., Peng, H., and Rao, X. (2016). Molecular Events for Promotion of Vancomycin Resistance in Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol* 7, 1601. doi:10.3389/fmicb.2016.01601.
- Humphrey, T., O'Brien, S., and Madsen, M. (2007). Campylobacters as zoonotic pathogens: a food production perspective. *Int J Food Microbiol* 117, 237–257. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.01.006.
- Issack, M. I. (2016a). Antibiotic resistance among hospitalized patients in Mauritius in 2014. in: *Int J Infect Dis*, editor. *17<sup>th</sup> International Congress on Infectious Diseases* 45S, 1-477. doi:10.1016/j.ijid.2016.02.250.
- Issack, M. I. (2016b). Antibiotic resistance among gastrointestinal and respiratory tract bacterial pathogens in Mauritius. in: *Int J Infect Dis*, editor. *17<sup>th</sup> International Congress on Infectious Diseases* 45S, 1-477. doi:10.1016/j.ijid.2016.02.742.
- Issack, M. I., Hendriksen, R. S., Hyytiä-Trees, E., Svendsen, C. A., and Mikoleit, M. (2014). Emergence and clonal dissemination of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis causing salmonellosis in Mauritius. *J Infect Dev Ctries* 8, 454–460. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24727511>.
- Issack, M. I., and Manraj, S. S. (2011). Antibiotic susceptibility of bacteria isolated from hospitalised patients in Mauritius. in: Center for Disease Dynamics Economics and Policy editor. *1st Global Forum on Bacterial Infections: Balancing Treatment Access and Antibiotic Resistance 2011*. 2011 Oct; New Delhi, India. Available at: <https://f1000research.com/posters/1089854> [Accessed March 27, 2017].
- Issack, M. I., Yee Kin Tet, H. Y., and Morlat, P. (2007). Antimicrobial resistance among enterobacteriaceae causing uncomplicated urinary tract infections in Mauritius: consequences of past misuse of antibiotics. *J Chemother* 19, 222–225. doi:10.1179/joc.2007.19.2.222.
- Jeannot, K., Belmonte, O., Fournier, D., Robert-Nicoud, R., Müller, E., Plésiat, P. (2012). Epidémiologie des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE) et des carbapénèmases chez *Pseudomonas aeruginosa* sur l'île de la Réunion. in *Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse*, ed. R. I. de C. Anti-Infectieuse (Paris).
- Kahsay, A. G., and Muthupandian, S. (2016). A review on Sero diversity and antimicrobial resistance patterns of *Shigella* species in Africa, Asia and South America, 2001-2014. *BMC Res Notes* 9, 422. doi:10.1186/s13104-016-2236-7.
- Kliebe, C., Nies, B. A., Meyer, J. F., Tolxdorff-Neutzling, R. M., and Wiedemann, B. (1985). Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 28, 302–307. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3879659>.
- Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A. K., Wertheim, H. F., Sumpradit, N., *et al.* (2013). Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect Dis* 13, 1057–1098.

doi:10.1016/S1473-3099(13)70318-9.

Liakopoulos, A., Mevius, D., and Ceccarelli, D. (2016). A Review of SHV Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. *Front Microbiol* 7, 1374. doi:10.3389/fmicb.2016.01374.

Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., *et al.* (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 16, 161–168. doi:10.1016/S1473-3099(15)00424-7.

Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., *et al.* (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 18, 268–281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.

McCaig, L. F., McDonald, L. C., Mandal, S., and Jernigan, D. B. (2006). Staphylococcus aureus-associated skin and soft tissue infections in ambulatory care. *Emerg Infect Dis* 12, 1715–1723. doi:10.3201/eid1211.060190.

Micheel, V., Hogan, B., Rakotoarivelo, R. A., Rakotozandrindrainy, R., Razafimanatsoa, F., Razafindrabe, T., *et al.* (2015). Identification of nasal colonization with  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in patients, health care workers and students in Madagascar. *Eur J Microbiol Immunol* 5, 116–125. doi:10.1556/EUJMI-D-15-00001.

Miltgen, G., Avril, C., Benoit-Cattin, T., Bonnin, R.A., Tamime, M., Cardinale, E., Traversier, N., Jaffar-Bandjee, M.C., Roquebert, B., Lugagne, N., De Monterra, A.M., Cholley, P., Hocquet, D., Belmonte, O. (2016). Epidémie d'Enterobacter cloacae producteurs de carbapénèmes de type IMI-1 à Mayotte. in: Société de pathologie infectieuse de langue française editor. *Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse*. 2016 Dec; Paris, France.

Miltgen, G., Cardinale, E., Traversier, N., Marichal, A., Jaffar-Bandjee, M.C., Meenowa, D., Jaumally, M.R., Dommergue, L., Moutroifi, Y., Chapuis, F., Rakotoharinome, M., Biarmann, M., Belmonte, O. (2014). Prévalence des entérobactéries BLSE chez les animaux d'élevage sur plusieurs îles de l'Océan Indien. in: Société de pathologie infectieuse de langue française editor. *Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse*. 2014 Dec; Paris, France.

Moodley, A., Nightingale, E. C., Stegger, M., Nielsen, S. S., Skov, R. L., and Guardabassi, L. (2008). High risk for nasal carriage of methicillin-resistant Staphylococcus aureus among Danish veterinary practitioners. *Scand J Work Env. Heal.* 34, 151–157. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18470441>.

Mulligan, M. E., Murray-Leisure, K. A., Ribner, B. S., Standiford, H. C., John, J. F., Korvick, J. A., *et al.* (1993). Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a consensus review of the microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention and management. *Am J Med* 94, 313–328. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8452155>.

Murray, B. E. (2000). Vancomycin-resistant enterococcal infections. *N Engl J Med* 342, 710–721. doi:10.1056/NEJM200003093421007.

Naas, T., Cuzon, G., Robinson, A. L., Andrianirina, Z., Imbert, P., Ratsima, E., *et al.* (2016). Neonatal infections with multidrug-resistant ESBL-producing E. cloacae and K. pneumoniae in Neonatal



- Units of two different Hospitals in Antananarivo, Madagascar. *BMC Infect. Dis.* 16, 275. doi:10.1186/s12879-016-1580-5
- Naze, F., Jouen, E., Randriamahazo, R. T., Simac, C., Laurent, P., Blériot, A., *et al.* (2010). Pseudomonas aeruginosa outbreak linked to mineral water bottles in a neonatal intensive care unit: fast typing by use of high-resolution melting analysis of a variable-number tandem-repeat locus. *J Clin Microbiol* 48, 3146–3152. doi:10.1128/JCM.00402-10.
- Pagel, S. W., and Gautier, P. (2012). Use of antimicrobial agents in livestock. *Rev Sci Tech* 31, 145–188. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22849274>.
- Pailhoriès, H., Belmonte, O., Kempf, M., Lemarié, C., Cuziat, J., Quinqueneau, C., *et al.* (2015). Diversity of Acinetobacter baumannii strains isolated in humans, companion animals, and the environment in Reunion Island: an exploratory study. *Int J Infect Dis* 37, 64–69. doi:10.1016/j.ijid.2015.05.012.
- Pailhoriès, H., Kempf, M., Belmonte, O., Joly-Guillou, M.-L., and Eveillard, M. (2016). First case of OXA-24-producing Acinetobacter baumannii in cattle from Reunion Island, France. *Int. J. Antimicrob. Agents* 48, 763–764. doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.09.005.
- Peleg, A. Y., Seifert, H., and Paterson, D. L. (2008). Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21, 538–582. doi:10.1128/CMR.00058-07.
- Petat, E. A., Martinet, F., Lemmens, P., Ghysels, G., Verhaegen, J., and Vandepitte, J. (1990). Human Salmonella and Shigella infections in Moroni, the capital of Great Comoro Island (1987-1988). *Ann Soc Belg Med Trop* 70, 297–302. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2291695>.
- Picot, S., Rakotomalala, R. S., Farny, K., Simac, C., and Michault, A. (2010). [Evolution of resistance to antibiotics from 1997 to 2005 in the Reunion Island]. *Med Mal Infect* 40, 617–624. doi:10.1016/j.medmal.2010.04.001.
- Poirel, L., Lascols, C., Bernabeu, S., and Nordmann, P. (2012). NDM-1-producing Klebsiella pneumoniae in Mauritius. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 598–599. doi:10.1128/AAC.05639-11.
- Quan, J., Zhao, D., Liu, L., Chen, Y., Zhou, J., Jiang, Y., *et al.* (2017). High prevalence of ESBL-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in community-onset bloodstream infections in China. *J Antimicrob Chemother* 72, 273–280. doi:10.1093/jac/dkw372.
- Rakotonirina, H. C., Garin, B., Randrianirina, F., Richard, V., Talarmin, A., and Arlet, G. (2013). Molecular characterization of multidrug-resistant extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolated in Antananarivo, Madagascar. *BMC Microbiol* 13, 85. doi:10.1186/1471-2180-13-85.
- Randremanana, R. V, Randrianirina, F., Sabatier, P., Rakotonirina, H. C., Randriamanantena, A., Razanajatovo, I. M., *et al.* (2014). Campylobacter infection in a cohort of rural children in Moramanga, Madagascar. *BMC Infect Dis* 14, 372. doi:10.1186/1471-2334-14-372.
- Randrianirina, F., Ratsima, E. H., Ramparany, L., Randremanana, R., Rakotonirina, H. C., Andriamanantena, T., *et al.* (2014). Antimicrobial resistance of bacterial enteropathogens isolated from stools in Madagascar. *BMC Infect Dis* 14, 104. doi:10.1186/1471-2334-14-104.

- Randrianirina, F., Vaillant, L., Ramarokoto, C. E., Rakotoarijaona, A., Andriamanarivo, M. L., Razafimahandry, H. C., *et al.* (2010). Antimicrobial resistance in pathogens causing nosocomial infections in surgery and intensive care units of two hospitals in Antananarivo, Madagascar. *J Infect Dev Ctries* 4, 74–82. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20212337>.
- Randrianirina, F., Soares, J.-L., Ratsima, E., Carod, J.-F., Combe, P., Grosjean, P., *et al.* (2007a). In vitro activities of 18 antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* isolates from the Institut Pasteur of Madagascar. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 6, 5. doi:10.1186/1476-0711-6-5.
- Randrianirina, F., Soares, J. L., Carod, J. F., Ratsima, E., Thonnier, V., Combe, P., *et al.* (2007b). Antimicrobial resistance among uropathogens that cause community-acquired urinary tract infections in Antananarivo, Madagascar. *J Antimicrob Chemother* 59, 309–312. doi:10.1093/jac/dkl466.
- Rasamiravaka, T., Nirinarimanana, A. J., and Rasamindrakotroka, A. (2016). Evaluation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in Malagasy students. *African J. Clin. Exp. Microbiol.* 17, 250–255. Available at: <http://www.ajol.info/index.php/ajcem/article/view/140134> [Accessed March 9, 2017].
- Rasamiravaka, T., Shaista Sheila, H. S., Rakotomavojaona, T., Rakoto-Alson, A. O., and Rasamindrakotroka, A. (2015). Changing profile and increasing antimicrobial resistance of uropathogenic bacteria in Madagascar. *Med Mal Infect* 45, 173–176. doi:10.1016/j.medmal.2015.03.006.
- Rasamiravaka, T., Rasoanandrasana, S., Zafindraibe, N. J., Rakoto Alson, A. O., and Rasamindrakotroka, A. (2013). Evaluation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in Malagasy patients. *J Infect Dev Ctries* 7, 318–322. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23592641>.
- Robin, F., Beyrouthy, R., Vaux, S., Belmonte, O., Picot, S., Bonnet, R. (2014). Epidemiologie des souches d'entérobactéries productrices de BLSE à la Réunion. in *Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse* (Paris: Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse).
- Runel-Belliard, C., Collet, L., and Hebert, J. C. (2009). [Children's soft tissue infections in tropical countries. Prospective study in Mayotte]. *Bull Soc Pathol Exot* 102, 162–166. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19739411>.
- Solet, J.L., Lepec, R., Flachet, L., Assoumani, Y., Randrianarivo-Solofoniaina, A.E., Nundlall, T.R., Polycarpe, D., Gedeon, J., Filleul, L. (2014). The SEGA Network: epidemiological surveillance and response in the Indian Ocean. *Bull. épidémiologique Hebd.* 7, 130–135. Available at: [http://invs.santepubliquefrance.fr//beh/2014/7/pdf/2014\\_7\\_2.pdf](http://invs.santepubliquefrance.fr//beh/2014/7/pdf/2014_7_2.pdf).
- The antibiotic alarm (2013). *Nature* 495, 141. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23495392>.
- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., *et al.* (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 5649–5654. doi:10.1073/pnas.1503141112.
- Van Boeckel, T. P., Gandra, S., Ashok, A., Caudron, Q., Grenfell, B. T., Levin, S. A., *et al.* (2014).

- Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet Infect Dis* 14, 742–750. doi:10.1016/S1473-3099(14)70780-7.
- van den Bogaard, A. E., and Stobberingh, E. E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Int J Antimicrob Agents* 14, 327–335. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10794955>.
- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T* 40, 277–283. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25859123>.
- von Eiff, C., Becker, K., Machka, K., Stammer, H., and Peters, G. (2001). Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *N Engl J Med* 344, 11–16. doi:10.1056/NEJM200101043440102.
- Wegener, H. (2012). “Antibiotic resistance-Linking human and animal health,” in *Improving Food Safety Through a One Health Approach: Workshop Summary*, 418. Available at: <http://www.nap.edu/catalog/13423/improving-food-safety-through-a-one-health-approach-workshop-summary>.
- Woodford, N., Johnson, A. P., Morrison, D., and Speller, D. C. (1995). Current perspectives on glycopeptide resistance. *Clin Microbiol Rev* 8, 585–615. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8665471>.
- Zhanel, G. G., DeCorby, M., Adam, H., Mulvey, M. R., McCracken, M., Lagacé-Wiens, P., et al. (2010). Prevalence of antimicrobial-resistant pathogens in Canadian hospitals: results of the Canadian Ward Surveillance Study (CANWARD 2008). *Antimicrob Agents Chemother* 54, 4684–4693. doi:10.1128/AAC.00469-10.

**Table 1. Evolution of antibiotic resistance of *S. aureus* from 2001 to 2014 in Indian Ocean Commission**

Country	Population	Year	Study design	Sample type	Isolates number	OXA/CEF	PEN	ERY	LIN	SXT	GEN	Reference
Madagascar	Com	2001-2005	Laboratory surveillance	Pus, genital, urine, respiratory	68	6.5%	87.9%	14.6%	6.1%	16.8%	1.9%	(Randrianina et al., 2007a)
Madagascar	Hosp	2001-2005	Laboratory surveillance	Surgical wounds, pus, hemoculture	506	4.4%	91.2%	10.3%	7.3%	13.2%	0.0%	(Randrianina et al., 2007a)
Reunion	Hosp	2007	Laboratory surveillance	Unknown (diagnostic specimen)	--	13%	85.0%	18.0%	11%	0.4%	0.8%	(Belmonte et al., 2008)
Madagascar	Hosp	2010	Laboratory surveillance	Surgical wounds, pus, burn, urine, respiratory	103	13.6%	92.2%	19.4%	5.8	NI	3.9%	(Randrianina et al., 2010)
Mauritius	Hosp	2010	Laboratory surveillance	Unknown (diagnostic specimen)	127	37.8%	95.3%	27.6%	NI	NI	NI	(Issack et al., 2011)
Madagascar	Com	2011	Cross-sectional study	Nasal swabs	45	38.8%	100.0%*	66.7%*	31.1%*	68.9%*	4.4%*	(Rasamiravaka et al., 2013)
Madagascar	Com	2011-2013	Laboratory surveillance	Urine	48	8.3%	75.0%	NI	NI	58.3%	NI	(Rasamiravaka et al., 2015)
Madagascar	Com (veterinarian)	2013-2014	Cross-sectional study	Nasal swabs	30	46.7%	100%	60.0%	NI	76.7%	20%	(Rasamiravaka et al., 2016)
Madagascar	Com (veterinarian)	2013-2014	Cross-sectional study	Nasal swabs	14	100.0%*	100%*	64.3%*	NI	71.4%*	42.9%*	(Rasamiravaka et al., 2016)
Mauritius	Hosp	2014	Laboratory surveillance	Blood culture, pus, burn, urine, swab, respiratory intravascular catheter	140	39.0%	NI	31.0%	NI	NI	NI	(Issack, 2016a)

OXA: oxacillin/CEF: cefoxitin, PEN: penicillin, ERY: erythromycin, LIN: lincomycin, SXT: trimethoprim sulfamethoxazole, GEN: gentamicin; NI: not identified; \* Resistance in MRSA strains

**Table 2. Evolution of antibiotic resistance of Enterobacteriaceae from 2004 to 2013 in Indian Ocean Commission**

Country/Year	Population	Study design	Sample type	Isolates number	ESBL carriers/individuals tested	ESBLE/Enterobacteriaceae tested	AMX	CAZ/ CEF	GEN	NAL	CIP	SXT	Bacterial Species
Madagascar 2004-2006	Com	Laboratory surveillance	urine	775	NI	3.8%	15.6%	4.0%/ -	9.2%	24.5%	15.4%	64.8%	<i>E. Coli, K. Pneumoniae, Proteus spp., Enterobacter spp., Citrobacter spp.</i>
Mauritius 2005	Com	Laboratory surveillance	Urine	224	NI	12.9%	1.60%	- / 9.0%	9.9%	34.0%	26.4%	49.5%	<i>E. Coli, Klebsiella spp., Proteus spp.</i>
Reunion 2006-2007	Hosp	Laboratory surveillance	Unknown (diagnostic specimen)	240*	NI	5.8%	NI	NI	67.0%	NI	74.0%	75.0%	<i>E. Coli, E. Cloacae, K. Pneumoniae</i>
Madagascar 2006-2008	Hosp	Laboratory surveillance	Surgical wounds, pus, burn, urine, respiratory	249	NI	21.3%	69.0%	26.0%/26.0%	31.0%	52.0%	41.0%	71.0%	<i>E. Coli, K. Pneumoniae, Proteus spp., Enterobacter spp., Citrobacter spp.</i>
Madagascar 2008	Hosp	Cohort study	Stool	30*	57,10%	NI	100.0%	86.2%	91.4%	62.0%	50.0%	96.5%	<i>E. Coli, K. Pneumoniae</i>
Madagascar 2008	Com	Cohort study	Stool	58*	22,10%	NI	100.0%	90.0%	76.7%	63.3%	46.7%	93.3%	<i>E. Coli, K. Pneumoniae</i>
Madagascar 2008-2009	Com	Cross-sectional study	Stool	195	NI	3.1%	1.0%	1.5%/3.1%	1.0%	10.8%	3.1%	84.6%	<i>E. Coli</i>
Madagascar 2009	Com	Cross-sectional study	Stool	53*	NI	NI	100.0%	NI	NI	68.6%	60.8%	90.2%	<i>E. Coli, K. Pneumoniae, Enterobacter spp., Citrobacter spp.</i>
Mauritius 2010	Hosp	Laboratory surveillance	Unknown (diagnostic specimen)	195	NI	NI	NI	46.7%	50.6%	NI	39.2%	NI	<i>E. Coli, K. Pneumoniae</i>
Madagascar 2011-2013	Com	Laboratory surveillance	Urine	224*	NI	33.0%	58.0%	30.4%- 30.4%	NI	NI	NI	69.2%	<i>E. Coli, Citrobacter spp., K. pneumoniae, Proteus spp., Serratia spp.</i>
Madagascar 2013-2014	Pregnant women	Cohort study	Stool	66*	18.5%	NI	NI	NI	NI	NI	36.0%	NI	<i>E. Coli, Citrobacter freundii, K pneumoniae, Enterobacter cloaca, Morganella morganii.</i>
Mauritius 2014	Hosp	Laboratory surveillance	Blood culture, pus, burn, urine, swab, respiratory intravascular catheter	301	NI	NI	NI	50.7%	33.2%	NI	56.1%	NI	<i>E. Coli, K. Pneumoniae</i>

AMX: amoxicillin, AMC: amoxicillin + clavulanic acid, CAZ: ceftazidime, SXT: trimethoprim sulfamethoxazole, GEN: gentamicin, CIP: ciprofloxacin, NAL: nalidixic acid, CEF: cefotaxim; NI: not identified; \*ESBL isolates only

## Résultats majeurs

La revue de la littérature réalisée a permis d'établir que les Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (EBLSE) étaient une problématique sanitaire commune pour les hommes et les animaux dans l'ensemble des territoires du SOOI en 2017. Les Entérobactéries productrices de carbapénèmases (EPC) semblaient être un phénomène épidémiologique encore émergent chez l'homme avec une probable dynamique spécifique dans les hôpitaux de l'île Maurice.

Une augmentation de la prévalence et/ou des niveaux de résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G) chez les Entérobactéries a été observée dans les territoires du SOOI (à l'exception des Seychelles en l'absence d'étude publiée). Des EBLSE étaient identifiées dans les élevages avicoles et porcins de l'ensemble des territoires du SOOI (hors Seychelles en l'absence d'étude). Néanmoins, les études publiées sur les EBLSE étaient disparates en termes de plans d'étude et ne permettaient pas de comparaisons des niveaux de colonisation des hommes et des animaux entre les territoires. La mise en place d'indicateurs épidémiologiques communs à l'ensemble des territoires du SOOI pour la quantification et le suivi du fardeau sanitaire des BMR serait nécessaire pour la réalisation d'un travail plus complet.

Ainsi, l'état de l'art réalisé a permis d'identifier des besoins en terme de recherche, de veille et de surveillance des BMR dans le SOOI. Un besoin spécifique de quantifier le fardeau sanitaire des BMR dans l'Union des Comores, Mayotte et les Seychelles était identifié.

Comme préconisé par l'OMS, les systèmes de surveillance épidémiologique de la résistance aux antibiotiques devraient suivre (i) les infections par des organismes résistants et (ii) les volumes d'antibiotiques utilisés chez l'animal, l'homme et en agriculture (WHO 2016).

La proximité entre territoires insulaires du SOOI contribue à la modification des dynamiques épidémiologiques des territoires au travers des échanges de denrées alimentaires (Grami, Mansour *et al.* 2016, Campos, Mourao *et al.* 2018) et de flux de voyageurs (Oteo, Perez-Vazquez *et al.* 2010). Une surveillance épidémiologique des BMR commune à tous les territoires apparaît comme un outil essentiel de cette lutte et pourrait inclure :

## *Chapitre 1 - Les bactéries multi-résistantes dans la zone du Sud-Ouest de l'océan Indien*

- Un suivi de la consommation d'antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire. Ce suivi devrait apprécier la part informelle de la vente du médicament qui est très représentée dans certains territoires, dont Madagascar (Mattern 2017).

- Un renforcement des capacités laboratoire localement puis régionalement avec un laboratoire de référence (l'Institut Pasteur de Madagascar depuis 2018) et l'usage d'un panel commun d'antibiotiques testés dans les différents territoires.

- Un suivi d'indicateurs épidémiologiques communs avec le suivi de couples bactéries/résistances aux antibiotiques dans l'ensemble des territoires apporterait une vision globale de la situation dans le temps et l'espace (*Escherichia coli* est le modèle utilisé dans les projets de surveillance des EBLSE dans les trois compartiments par l'OMS/FAO/OIE (AGISAR 2018)).

En résumé, les EBLSE étaient, selon les données de la littérature, les BMR les plus détectées dans la zone, leur présence était avérée dans l'ensemble des territoires en 2017. Elles étaient à la fois impliquées dans des infections (urinaires, pulmonaires, nosocomiales) (Robin, R. *et al.* 2014) et colonisaient de manière asymptomatique le tractus des hommes et des animaux du SOOI (Miltgen G. 2014).

La revue de la littérature réalisée ([chapitre 1](#)) a soulevé des questions relatives aux niveaux de contamination par les EBLSE des compartiments homme ([chapitre 3](#)), animal ([chapitre 4](#)) et environnement ([chapitre 5](#)) dans les territoires du SOOI. Dans le chapitre suivant, la vie privée de cet ennemi public vous est présentée ([chapitre 2](#)).

## Chapitre 2. Les Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (EBLSE) : la vie privée d'un ennemi public

### La photo de famille

Les Entérobactéries, famille Enterobacteriaceae, appartiennent à une grande famille bactérienne comprenant une soixantaine de genres et plus de 250 espèces actuellement identifiées (Alnajjar and Gupta 2017). Les Entérobactéries sont ubiquitaires et se développent dans le tractus digestif des vertébrés et dans l'environnement (eau, sol). Elles ont comme caractéristique commune de posséder une paroi pauvre en peptidoglycane, ce qui les fait apparaître en rose avec la coloration de Gram, elles sont qualifiées de bactéries à Gram négatif.

#### Rappel sur la coloration de Gram :

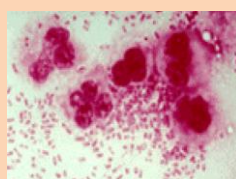
La coloration de Gram doit son nom au bactériologiste danois Hans Christian Gram qui a mis au point ce protocole en 1884. Cette technique de coloration permet de classer les bactéries en deux catégories à partir des propriétés de la paroi de la bactérie :

- **Gram positif** : bactérie possédant une paroi riche en peptidoglycane apparaissant en violet après coloration.
- **Gram négatif** : paroi pauvre en peptidoglycane colorée en rose après coloration.

Gram positif



Gram négatif



[https://www.univ-nantes.fr/medias/fichier/diagnostic\\_microbiocaillon\\_1168617032984.pdf](https://www.univ-nantes.fr/medias/fichier/diagnostic_microbiocaillon_1168617032984.pdf)

Les Entérobactéries peuvent être commensales et devenir pathogènes par opportunisme notamment chez les individus immunodéprimés (patients HIV positifs, sous chimiothérapie, ou après une greffe) ou être strictement pathogènes (par exemple *Escherichia coli* entérotoxique).



## Chapitre 2 – Les EBLSE : la vie privée d'un ennemi public

Les espèces les plus impliquées dans les infections chez l'homme sont *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* que ce soit dans les pays développés (par exemple pour les infections nosocomiales en France (Arnaud 2018)) ou dans les pays à revenu modéré ou faible (par exemple chez les nouveau-nés en milieu hospitalier (Zaidi, Huskins *et al.* 2005), ou dans les infections urinaires communautaires en Ethiopie (Abejew, Denboba *et al.* 2014)). Les mêmes espèces sont aussi impliquées dans des infections en médecine vétérinaire (par exemple. EHEC chez les jeunes animaux, principalement les porcs et les veaux (Nagy and Fekete 2005)). Certaines Entérobactéries provoquent des symptômes pour des hôtes spécifiques, comme *Salmonella enterica* sérovar Pullorum chez les volailles (Li, Zhu *et al.* 2019) et *Salmonella enterica* sérovar Choleraesuis chez les porcs (Hurd, McKean *et al.* 2002) ou encore *Salmonella enterica* sérovar Dublin chez les bovins (El Sayed, Sapriel *et al.* 2018).

### *Le succès de propagation des EBLSE*

#### **Des résistances naturelles**

Les résistances naturelles (ou encore intrinsèques ou innées) aux antibiotiques sont des caractéristiques propres aux différentes espèces bactériennes. Les Entérobactéries, dont *Escherichia coli*, sont naturellement résistantes à la pénicilline G et à l'oxacilline (tableau 1). Ces résistances intrinsèques à l'espèce bactérienne permettent de définir le spectre d'activité de l'antibiotique. Ainsi, l'usage de pénicilline G est réduit aux bactéries à Gram positif (par exemple *Staphylococcus aureus*) et inefficace sur les Entérobactéries.

**Table 1. Résistances naturelles, ou innées, des Entérobactéries pour les bêta-lactamines (Cavallo 2004)**

Espèces	PE	OX	A	AM	TI	TC	PI	C1	FO	CT	M	CX	CA	IM
	N	A	M	C	C	C	P	G	X	T	A	M	Z	P
<i>Escherichia coli</i>	R	R												
<i>Proteus mirabilis</i>	R	R												
<i>Shigella spp.</i>	R	R												
<i>Salmonella spp</i>	R	R												
<i>Klebsiella spp.</i>	R	R	R		R					R				
<i>Citrobacter koseri</i>	R	R	R		R					R				
<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	R	R				R	R	R				
<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	R	R	R				R	R					
<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R	R				R	R					
<i>Serratia marcescens</i>	R	R	R	R				R			R	R		
<i>Proteus vulgaris</i>	R	R	R					R					R	
<i>Morganella morganii</i>	R	R	R	R				R					R	
<i>Providencia stuarto</i>	R	R	R	R				R						
<i>Yersinia enterocolitica</i>	R	R	R	R	R			R	R		R	R		

R : résistance naturelle, PEN : pénicilline G, OXA : oxacilline, AM : aminopénicillines, TIC : ticarcilline, TCC : ticarcilline + acide clavulanique, PIP : pipéracilline, C1G : céphalosporine de première génération, FOX : céfoxitine, CTT : céfotétan, MA : céfuroxime, CTX : céfotaxime, CAZ : céftazidime, IMP : imipénème.

Dès les années 1960, les pénicillines (par exemple l'ampicilline, la carbénicilline) et leurs combinaisons avec des inhibiteurs des bêta-lactamases (par exemple l'amoxicilline et l'acide clavulanique), mises sur le marché, ont permis le traitement des infections dues aux Entérobactéries (Wellington, Boxall *et al.* 2013).

### **Des résistances acquises**

Dans les années 1980, des souches de *Klebsiella pneumoniae* résistantes à ces antibiotiques ont été décrites (Knothe, Shah *et al.* 1983). Cette résistance correspondait à l'acquisition de gènes de type *bla<sub>TEM</sub>* (Temoneira) ou *bla<sub>SHV</sub>* (sulphydryl variable) par ces Entérobactéries. La présence de ces gènes permet la **production d'enzymes de type bêta-lactamases qui hydrolysent les antibiotiques de la classe des bêta-lactamines.**

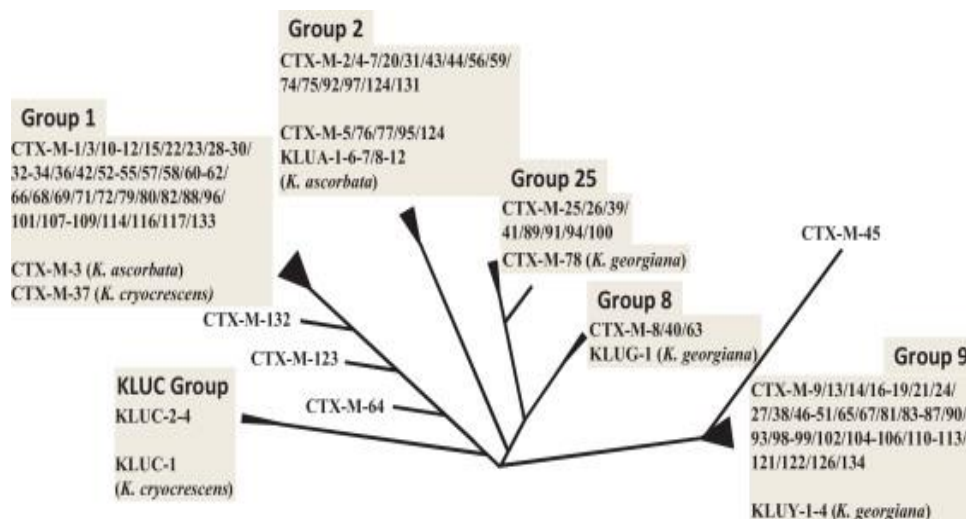
## Chapitre 2 – Les EBLSE : la vie privée d'un ennemi public

La diffusion des gènes de résistance  $bla_{SHV}$  et  $bla_{TEM}$  chez les Entérobactéries a provoqué un recours accru aux aminosides (par exemple la gentamicine, l'amikacine), aux C3G (par exemple la céfotaxime, la ceftazidime) et aux quinolones ou fluoroquinolones (par exemple la ciprofloxacine). Parallèlement, la diffusion de résistances aux aminoglycosides, émergée vers la fin des années 1970, renforçait encore l'utilisation substantielle des C3G (mises sur le marché dans les années 1980) et de quinolones (Wellington, Boxall *et al.* 2013).

Une première description de gènes  $bla_{CTX-M}$  (CTX pour céfotaxime et M pour Munich) était faite en 1989 (Bauernfeind, Grimm *et al.* 1990). Ces gènes ont permis aux Entérobactéries **d'étendre leur résistance aux C3G** (telles que la céfotaxime, le ceftriaxome, la ceftazidime, le céfépime) et monobactames (par exemple l'aztréonam) d'où leur nom « **Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu** » (EBLSE). Elles sont inhibées par l'acide clavulanique et le tazobactam et entraînent un usage accru de carbapénèmes (par exemple l'imipénème, le méropénème), classe d'antibiotiques de dernière ligne thérapeutique.

En 2019, 35 familles de gènes permettant la production de BLSE étaient décrites (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/submit-beta-lactamase/>), consulté le 12/03/2019). Les gènes les plus répandus chez les Entérobactéries appartiennent au type  $bla_{CTX-M}$  (Bonnet 2004, Coque, Novais *et al.* 2008, Cantón, Akóva *et al.* 2012) et environ 180 gènes  $bla_{CTX-M}$  actuellement décrits (<https://www.lahey.org/studies/other.asp>). Ces gènes ont été classés en cinq grands groupes ( $bla_{CTX-M-1}$ ,  $bla_{CTX-M-9}$ ,  $bla_{CTX-M-8}$ ,  $bla_{CTX-M-25}$  et  $bla_{CTX-M-2}$ ) différenciables à l'aide de leur séquence d'acides aminés (Boyd, Tyler *et al.* 2004). L'ensemble de ces groupes auraient pour ancêtre commun des Entérobactéries environnementales du genre *Kluyvera* sp. (*Kluyvera cryocrescens*, *Kluyvera ascorbata* et *Kluyvera georgina*) (figure 5).

Les premières mobilisations des bêta-lactamases chromosomiques présentes chez *Kluyvera* sp. vers des Entérobactéries pathogènes ont été possibles par l'intermédiaire d'un plasmide (Decousser, Poirel *et al.* 2001, Humeniuk, Arlet *et al.* 2002).



**Figure 5. Arbre phylogénétique présentant la similarité des gènes de type CTX-M et leur répartition en différents groupes (D'Andrea, Arena *et al.* 2013).**

### **La transmission horizontale de gènes de résistance aux C3G**

Les plasmides sont des molécules d'ADN circulaires présentes dans les bactéries. Ils se répliquent de manière autonome par rapport au chromosome bactérien et peuvent porter les éléments leur permettant de se conjuguer (transmission entre bactéries du plasmide par contact direct). Ils sont des vecteurs de gènes de résistance aux antibiotiques et permettent l'acquisition de matériel génétique étranger par transfert horizontal entre différentes espèces bactériennes (échange inter-espèce) ou au sein de la même espèce (échange intra-espèce). En plus de cette capacité de transmission horizontale, les plasmides sont transmis par les bactéries à leur descendance (transmission verticale).

Les plasmides de plus de 50kb sont les plus susceptibles de posséder plusieurs gènes de résistances aux antibiotiques, ce qui peut favoriser leur sélection (Carattoli 2013). Ainsi, les plasmides portant des gènes de type CTX-M peuvent posséder d'autres gènes conférant des co-résistances, notamment aux fluoroquinolones et aux aminosides (Poirel, Leviandier *et al.* 2006).

## Chapitre 2 – Les EBLSE : la vie privée d'un ennemi public

Les mécanismes de répllication sont essentiels aux plasmides et permettent de les classer. Deux plasmides partageant le même mécanisme de répllication ne peuvent pas cohabiter dans la même bactérie. On parle alors de groupes d'incompatibilité. En 2011, 27 groupes d'incompatibilité distincts étaient identifiés chez les Entérobactéries (Carattoli 2011). Des combinaison plasmides-gènes de résistance aux C3G sont connus pour se propager de manière épidémique tels que *bla<sub>CTX-M-1</sub>/IncI1* ; *bla<sub>CTX-M-1</sub>/IncN* ; *bla<sub>CTX-M-15</sub>/ IncF* (Madec and Haenni 2018).

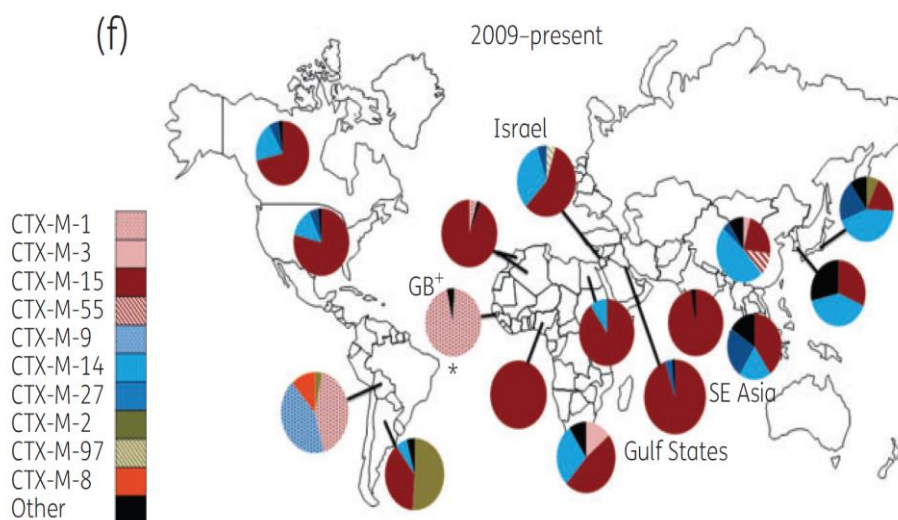
Finalement, les plasmides ont aussi joué un rôle déterminant dans le succès de dissémination des gènes de type *bla<sub>CTX-M</sub>* chez les Entérobactéries (Carattoli 2013).

### *Le tractus intestinal des vertébrés : un réservoir d'EBLSE*

Nous avons vu que les sphères non pathogéniques ont joué un rôle central dans l'origine des déterminants de la résistance aux antibiotiques (Martinez 2009) ; elles constituent des « réservoirs » des EBLSE. Ainsi, le tube digestif des vertébrés est une source d'Entérobactéries, de plasmides et de gènes de résistance aux antibiotiques. La colonisation du tractus digestif par les EBLSE assure leur propagation, les fèces libérées dans l'environnement pouvant potentiellement contaminer l'eau, la nourriture et l'environnement (Hawkey 2008).

### **Colonisation de l'homme par les EBLSE**

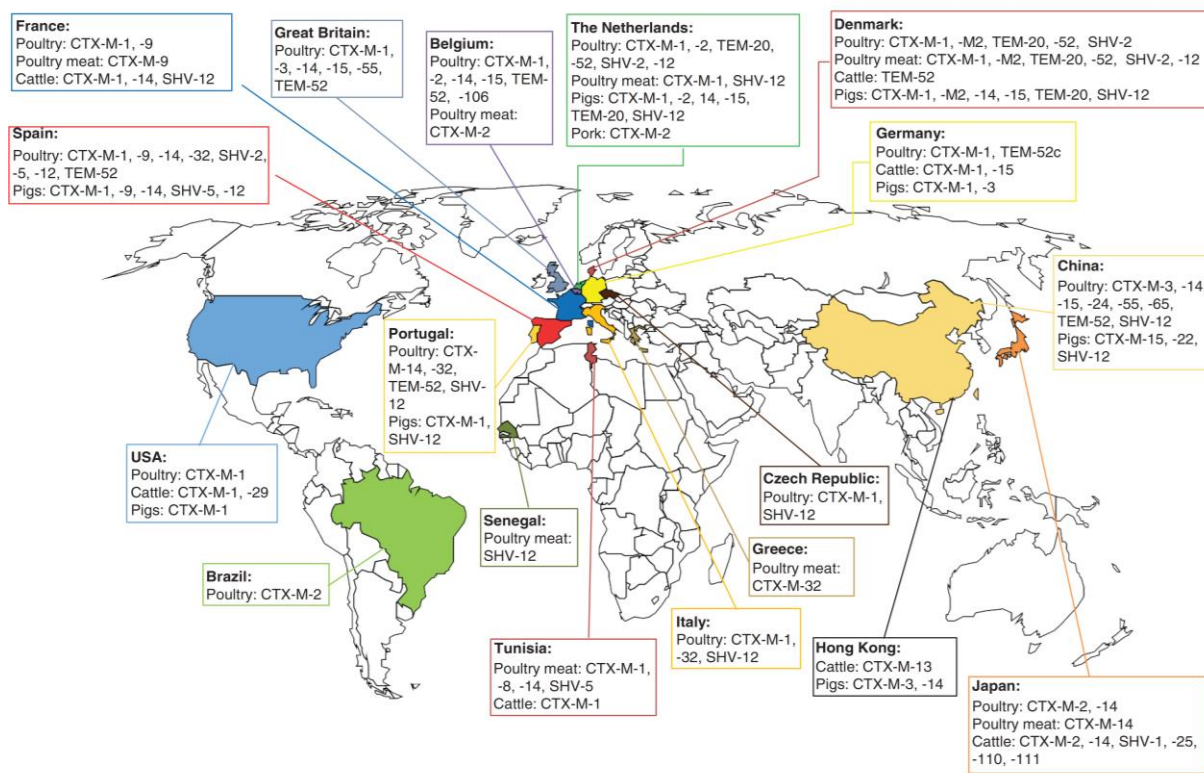
La colonisation par les EBLSE chez les patients hospitalisés a été identifiée comme un facteur de risque pour le développement subséquent d'infections du sang ou de septicémies (Alevizakos, Karanika *et al.* 2016, Cornejo-Juarez, Suarez-Cuenca *et al.* 2016, Stupica, Lusa *et al.* 2017). Pour les EBLSE colonisant l'homme, les gènes *bla<sub>CTX-M-15</sub>* et *bla<sub>CTX-M-14</sub>* sont les plus répandus à travers le monde en 2019. Depuis les années 2000, *bla<sub>CTX-M-15</sub>* a connu une augmentation de son aire de répartition avec son identification dans l'ensemble des régions du monde (Bevan, Jones *et al.* 2017). *bla<sub>CTX-M-14</sub>* possède une aire de distribution restreinte à l'Asie et l'Espagne (figure 6) (Bevan, Jones *et al.* 2017). Le gène *bla<sub>CTX-M-15</sub>* est localisé sur des plasmides de type IncF chez l'homme (Marcade, Deschamps *et al.* 2009). Cette famille de plasmides possède un spectre d'hôte étroit avec des mécanismes lui conférant une bonne stabilité chez les Entérobactéries du tube digestif même sans pression antibiotique (Carattoli 2009).



**Figure 6. Gènes *bla*<sub>CTX-M</sub> identifiés chez l'homme entre 2009 et 2017 (Bevan, Jones *et al.* 2017)**

### **Colonisation des animaux d'élevage par les EBLSE**

La propagation de EBLSE touche à la fois les filières de production animale (aviaire, porcine, bovine) et les animaux de compagnie (essentiellement chiens, chats) (Seiffert *et al.*, 2013). En 2018, les gènes prédominants chez les animaux d'élevage sont *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>TEM-52</sub> et *bla*<sub>SHV12</sub> (*bla*<sub>CMY-2</sub> en Amérique du Nord) (Madec and Haenni 2018). Le gène *bla*<sub>CTX-M-1</sub> prédomine en élevage en Europe (figure 7) et est majoritairement associé à des plasmides de type IncI1 (Bortolaia, Guardabassi *et al.* 2010, van Hoek, Veenman *et al.* 2018).



**Figure 7. Distribution des gènes BLSE identifiés chez les Entérobactéries provenant d'animaux d'élevage (volailles, porcs, bovins) et de viande de volaille (Michael, Freitag *et al.* 2015)**

Lorsque  $bla_{CTX-M-15}$  est identifié chez les animaux d'élevage, il est davantage porté par des plasmides de type IncI1 (Carattoli, Villa *et al.* 2018) contre IncF chez l'homme. Les plasmides appartenant aux groupes d'incompatibilité IncI1, IncN, IncF et IncHI1 sont le plus fréquemment observés dans les animaux de rente et les produits carnés (Madec and Haenni 2018).

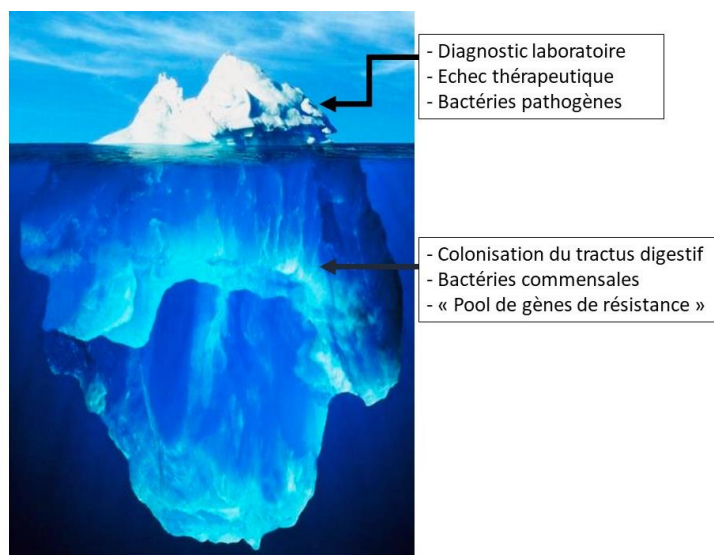
Finalement, le tractus digestif constitue un réservoir majeur d'EBLSE. La libération des fèces dans l'environnement des hommes et des animaux permet la diffusion potentielle d'EBLSE et leur persistance dans différentes parties de l'écosystème. Ces EBLSE peuvent ensuite coloniser un nouvel hôte ou l'infecter secondairement (Hawkey 2018).

### **La contamination par les EBLSE de l'environnement**

Les Entérobactéries, telles que *E. coli*, ont démontré un taux de survie élevé dans l'environnement conduisant à une accumulation de la bactérie dans les élevages et à proximité (van Bunnik, Ssematimba *et al.* 2014). Cette contamination environnementale peut induire des contaminations indirectes. Dans le même sens, les hôpitaux ont été identifiés comme source d'*E. coli* productrices de BLSE, des gènes *bla<sub>CTX-M-15</sub>* ont été retrouvés dans les eaux usées des établissements en Inde (Diwan, Chandran *et al.* 2012). Les effluents jouent un rôle dans la propagation des EBLSE et de leurs gènes de résistance dans les cours d'eau avec une accumulation en bas de bassin versant (Amos, Hawkey *et al.* 2014).

Nous pouvons schématiser la problématique des EBLSE par le phénomène de l'iceberg (figure 8) (Morris 1957). La partie émergée de l'iceberg, donc visible, représente les échecs thérapeutiques aux C3G et les résistances aux bêta-lactamines observées en laboratoire. La partie immergée représente la colonisation du tractus digestif par les EBLSE, non symptomatique, et plus généralement les bactéries commensales constituant une réserve de gènes de résistances aux antibiotiques. Cette partie invisible constitue une caractéristique épidémiologique des Entérobactéries leur permettant de diffuser dans l'environnement pour contaminer un hôte secondairement. Les pays en développement ne disposant pas toujours d'évacuation des eaux usées, de latrines ou encore de systèmes de purification de l'eau de boisson, leurs populations animales et humaines restent fortement exposées au risque de contamination par les EBLSE (Hawkey 2018).





**Figure 8. La colonisation par les EBLSE et les excréta : la partie immergée de l'iceberg**

Ces pays n'ont pas tous atteint la « transition épidémiologique » définie comme le passage d'une structure de mortalité à dominante infectieuse à une structure de mortalité à dominante chronique et dégénérative (Omran 2005). L'augmentation progressive de la colonisation par les EBLSE du tractus digestif des hommes et animaux représente « une bombe à retardement » pour les infections nécessitant l'usage de bêta-lactamines et autres classes d'antibiotiques de première ligne thérapeutique. Les Entérobactéries commensales peuvent transférer horizontalement les gènes de résistance aux bactéries pathogènes ou infecter directement les individus immunodéprimés.

Dans l'océan Indien, peu de données étaient disponibles sur les gènes des EBLSE circulant dans les compartiments homme, animaux et environnement. Chez l'homme, *bla<sub>CTX-M-15</sub>* serait majoritaire dans les infections causées par des EBLSE en milieu hospitalier à Madagascar et La Réunion (Rakotonirina, Garin *et al.* 2013, Robin, R. *et al.* 2014, Naas, Cuzon *et al.* 2016) comme cela est le cas dans les différentes régions du monde.

**Trois points clés à retenir sur les EBLSE :**

- La propagation mondiale des EBLSE constitue l'un des phénomènes de résistance les plus importants jamais enregistré (Hawkey and Jones 2009).
- Le tractus intestinal des mammifères abrite des EBLSE. Les fèces libérées dans l'environnement exposent les populations animales et humaines à un risque de contamination, particulièrement dans les pays en développement.
- Les EBLSE provoquent un usage accru de carbapénèmes, les EPC diffusent progressivement.

Dans la [partie 1](#), nous avons identifié les EBLSE comme une problématique sanitaire commune à l'ensemble des territoires du SOOI ([chapitre 1](#)) puis abordé les clés de leur succès de diffusion, la colonisation du tractus digestif de l'homme, de l'animal et la contamination environnementale ([chapitre 2](#)). L'estimation de la prévalence d'EBLSE dans les compartiments : homme, animal et environnement permettrait de hiérarchiser les sources potentielles d'exposition aux EBLSE et d'offrir des propositions ciblées d'action contre cette menace sanitaire. Ce travail est appréhendé en [partie 2](#). L'estimation de la prévalence de colonisation par les BMR chez les patients provenant des territoires du SOOI est présentée au [chapitre 3](#).



**Partie 2 : Une approche sectorielle du concept « One Health » ;  
estimer le niveau de colonisation ou de contamination par les  
EBLSE de chaque compartiment.**

Chapitre 3. Les hommes : un système de surveillance épidémiologique des  
BMR pour le Sud-Ouest de l’océan Indien



**Une mère et son enfant, Mayotte 2017**

Nous avons vu dans le [chapitre 1](#) que les EBLSE étaient une problématique commune à l’ensemble des territoires du SOOI. Dans le [chapitre 2](#), la colonisation du tractus digestif de l’homme par les EBLSE a été abordée ainsi que ses conséquences potentielles dans les pays en développement. Un besoin d’estimer les niveaux de colonisation par les BMR dans les territoires du SOOI a été identifié.

Ainsi, le niveau de colonisation par les EBLSE du compartiment humain a été estimé au travers d’une étude rétrospective des patients admis au CHU Félix Guyon, principal établissement de La Réunion.

Depuis 2010, le Haut Conseil de la Santé Publique en France recommande un dépistage systématique à l'hôpital de la colonisation par des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques des patients rapatriés de l'étranger (HCSP 2010). A La Réunion, ce dépistage rectal et nasal systématique des patients hospitalisés a été renforcé depuis 2015 pour inclure tout séjour à l'étranger (résidence à l'étranger, séjour à l'étranger dans les trois mois précédents, antécédent d'hospitalisation à l'étranger dans l'année précédente, arrivée à l'hôpital par évacuation sanitaire) (Nathalie Lugagne, comité de lutte contre les infections nosocomiales, communication personnelle, le 09 juin 2017).

L'objectif principal était d'estimer la prévalence de colonisation par les EBLSE chez l'homme pour établir leur cartographie dans les différents territoires du SOOI.

Secondairement, la colonisation des patients du SOOI par d'autres BMR (EPC, SARM, Entérocoques résistants à la vancomycine, *Acinetobacter* sp., et *Pseudomonas* sp. multi-résistants aux antibiotiques selon la définition de Magiorakos (Magiorakos, Srinivasan *et al.* 2012)) a été estimée.

En définitive, y a-t-il des dynamiques épidémiologiques particulières concernant les BMR chez l'homme en fonction des territoires de l'océan Indien ?

Les données utilisées pour ce travail ont fait l'objet d'une déclaration de conformité auprès de la Commission Nationale de l'Information et des Libertés ([Annexe 2](#)).

Les résultats de ce travail seront soumis à la revue Tropical Medicine & International Health.

---

**Article 2. Gay N, Lugagne N, Miltgen G, Belmonte O, Cardinale E. Reunion, a sentinel island for multidrug resistant bacteria surveillance in South-western Indian Ocean : a retrospective survey in hospitalized patients : 2015-2017.**

---

## Article 2. Reunion, a sentinel island for multidrug-resistant bacteria surveillance in South-western Indian Ocean: a retrospective survey in hospitalized patients, 2015-2017

Noellie Gay<sup>1\*</sup>, Nathalie Lugagne<sup>2</sup>, Guillaume Miltgen<sup>3,4</sup>, Olivier Belmonte<sup>3</sup>, Eric Cardinale<sup>1,5</sup>

1. UMR ASTRE (CIRAD, INRA, Univ Montpellier), Montpellier, France.
2. Nosocomial infection Unit, Felix-Guyon University hospital, Saint-Denis, La Reunion, France.
3. Bacteriology laboratory, Felix-Guyon University hospital, Saint-Denis, La Reunion, France.
4. UMR PIMIT (CNRS 9192, INSERM U1187, IRD 249, Université de La Réunion), Saint-Denis, La Reunion, France.
5. Health Monitoring Unit, Indian Ocean Commission, Port-Louis, Mauritius

**Keywords:** Epidemiology; hospital; Indian Ocean; multidrug resistance; screening

Running head: MDR colonization in patients from Indian ocean

### Abstract

Antimicrobial resistance was identified as a public health priority for the South-western Indian ocean (SWIO) (Comoros, Madagascar, Mauritius, Mayotte (France), Reunion (France), and Seychelles). Except for Reunion, multidrug-resistant Bacteria (MRB) colonization rates in hospitalized patients from SWIO islands are still unknown in 2019. Based on exhaustive laboratory data, we provided the first estimation of MRB colonization rates in hospitalized patients residing in SWIO territories (2015-2017). The survey pointed out significantly higher overall MRB colonization rates in patients from Comoros, Madagascar Mayotte, and Seychelles when compared to Reunion (France). Extended-spectrum betalactamase producing Enterobacteriaceae was a generalized public health issue in SWIO residing patients. Specific epidemiological dynamics were pointed out in Mayotte and Seychelles patients for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and in Mauritius patients for carbapenemase producing Enterobacteriaceae (CPE). MRB colonization and transmission in health

care settings in these territories should be investigated locally to confirm trends. Our results raised attention on CPE circulation in patients which probably needs local control measures strengthening. Use of standardized MRB estimates obtained in our study could be the first step towards a regional MRB surveillance for SWIO.

## INTRODUCTION

Since the 90's, an increase of the prevalence of multidrug-resistant bacteria (MRB) was observed in Reunion (France).<sup>1</sup> Epidemiological surveillance at Reunion hospitals pointed out similar incidence trends as in main France territory in 2015 (*i.e.* Occitanie region) for extended-spectrum betalactamase producing Enterobacteriaceae (ESBL-E) and lower incidence for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).<sup>2</sup>

South-western Indian Ocean (SWIO) is composed of islands: Union of Comoros, Madagascar, Mauritius, Mayotte (France), Reunion (France), and Seychelles. Antimicrobial resistance was considered as a main public health priority for the area since 2015.<sup>3</sup> Based on literature, extended-spectrum betalactamase producing Enterobacteriaceae (ESBL-E) and carbapenemase producing Enterobacteriaceae (CPE) were identified as a main public and veterinary health issue for SWIO territories.<sup>4</sup> However, the absence of MRB surveillance network in other SWIO territories prevented from identifying local MRB epidemiological dynamics and to implement targeted action plans, particularly in health care settings.

Felix-Guyon University hospital, in Reunion, is well suited for medical evacuations and receives most of the evacuated patients from the territories of SWIO. Since 2015, a MRB screening strategy adapted from national recommendation<sup>5</sup> was implemented for all patients residing abroad, arriving through medical evacuation, visiting a foreign country within the three preceding months, and/or hospitalized abroad in the past year was implemented. Furthermore, in Felix-Guyon hospital all intensive care patients are screened at admission in order to avoid introduction of MRB in the unit.

Based on exhaustive laboratory data, we estimated the prevalence of MRB (*i.e.* ESBL-E, CPE, MRSA, vancomycin-resistant enterococci, and both multidrug-resistant *Acinetobacter* sp., and

*Pseudomonas* sp.) colonization in hospitalized patients residing in SWIO. This study provided the first estimation of the MRB colonization rates in patients from SWIO territories using a comparable design setting and pointed out probable local MRB dynamics in SWIO local hospitals.

## METHODS

### Data collection, inclusion criteria, and statistical analyses

We performed a retrospective survey on all patients admitted to the Felix-Guyon University hospital in Reunion from 2015 to 2017 (main hospital). Only SWIO residing patients were included. All these patients were screened for MRB detection (i.e. anal and nasal swabbing) and patients admitted to intensive care unit were used as baseline for odds ratio estimations as all patients from Reunion intensive care were screened for MRB.

The MRB included were MRSA, ESBL-E, carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE), vancomycin-resistant enterococci (VRE), and both multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. (AB), and *Pseudomonas* sp. as defined by Magiorakos *et al.*<sup>6</sup>

A patient was considered MRB positive if carrier of one, or more than one MRB. MRB colonization rates in patients were compared according to their country of residence using  $\chi^2$  test with Fisher correction or Fisher exact test if theoretical frequency were less than 5. Odds ratio were calculated with Reunion patients as reference and threshold was set at p-values <0.05. Confidence intervals were estimated using the Woolf method. The statistical analyses were performed using R software version 3.4.2.

The study was approved by the French national commission on data protection and liberties (reference 2210228 v0, 10<sup>th</sup> of January 2019).



### **Bacterial isolates and antibiotic susceptibility testing**

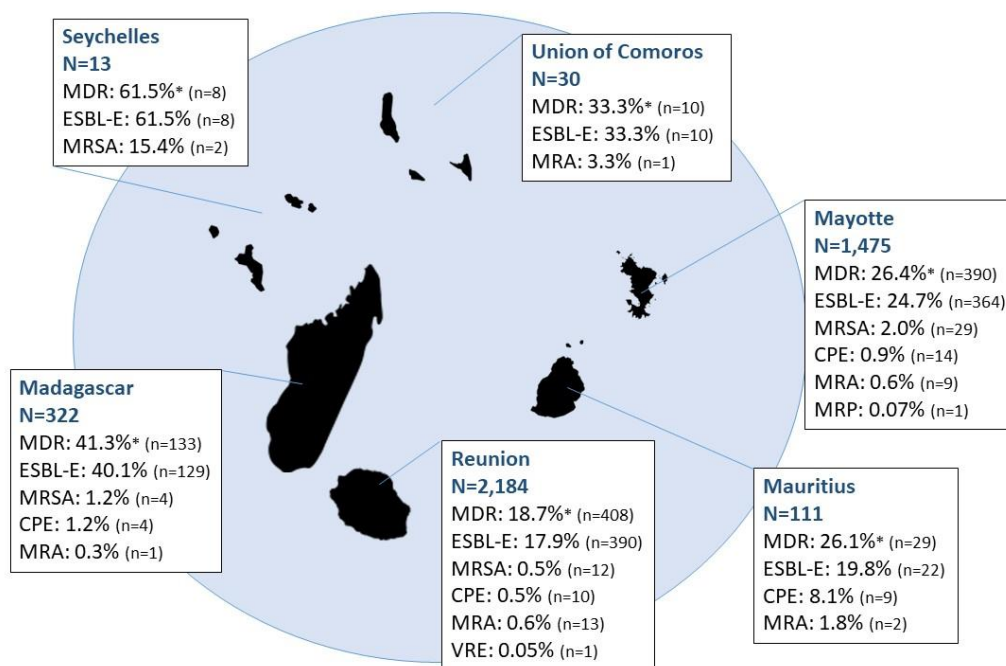
Bacterial isolates were routinely obtained at hospital laboratory and species identified for all isolates using MALDI-TOF mass spectrometry (Bruker Daltonics, Breme, Germany). ESBL-E, and CPE were screened using two selective chromogenic agar ChromID-ESBL and ChromID CARBA SMART (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France). ESBL-E phenotypes were confirmed using combined disk synergy testing.

Gram-positive bacteria (MRSA and VRE) were detected using respectively Chrom-ID MRSA SMART and Chrom-ID VRE agar (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France). Multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. (MRA) and *Pseudomonas* sp. (MRP) were identified using additionally Drigalski agar plate with ceftazidime disk. All MRB were checked by antibiogram using disc diffusion method according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2015 recommendations.<sup>7</sup> CPE and VRE were all confirmed by PCR using the GenXpert system (Cepheid, Sunnyvale, USA).

## **RESULTS**

From the 1<sup>st</sup> of January 2015 to the 31<sup>th</sup> of December 2017, a total of 4,135 hospitalized patients from SWIO territories were included in the survey. Overall 23.7% (978/4,135) of patients were found positive for MRB colonization.

If the number of hospitalized patients according to their territory of residence varied widely (from 13 in Seychelles to 2,184 in Reunion), high MRB colonization rates were observed for patients residing in Seychelles and Madagascar (61.5% and 41.3% respectively) (Figure 1). Among all MRB positive patients, 94.4% (923/978) were ESBL-E carriers. MRB colonization rates varied according to the patient's country of residence.



**Figure 1. MRB colonization rates according to the patient country of residence in South-western Indian Ocean**

\* A MRB positive patient could be carrier of more than one MRB; MRB: multidrug-resistant bacteria; ESBL-E: extended-Spectrum Betalactamase producing Enterobacteriaceae; MRSA: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; CPE: carbapenemases-producing Enterobacteriaceae; MRA: multidrug-resistant *Acinetobacter* sp.; VRE: vancomycin-resistant enterococci.; MRP: multidrug-resistant *Pseudomonas* sp.

MRB colonized patients were significantly higher in SWIO (excluding Mauritius patients) when compared to patients from Reunion as a baseline (Table 1). MRSA colonization rates were significantly higher in Seychelles and Mayotte hospitalized patients than in Reunion patients. CPE colonization rates were significantly higher in patients residing in Mauritius when compared to Reunion patients.

**Table 1. Comparison of MRB colonization rates according to the patient’s territory of residence (2015-2017) using Reunion (France) as reference.**

	MRB positive patients			ESBL-E			MRSA			CPE		
	Patients (n)	OR (95% CI)	Prevalence (95% CI)	OR (95% CI)	Prevalence (95% CI)	OR (95% CI)	Prevalence (95% CI)	OR (95% CI)	Prevalence (95% CI)	OR (95% CI)	Prevalence (95% CI)	
Seychelles	13	7.4 [2.4-22.6]**	61.5% [35.5%-82.3%]	7.4 [2.4-22.6]**	61.5% [35.5%-82.3%]	32.9 [6.6-164.6]**	15.6% [04.3%-42.23%]	-	-	-	-	
Madagascar	322	3.1 [2.4-3.9]*	41.3% [36.1%-46.8%]	3.1 [2.4-3.9]**	40.1% [34.9%-45.5%]	2.3 [0.7-7.1]	01.2% [0.01-0.03]	2.7 [0.9-8.8]	01.2% [0.01-0.03]	-	-	
Comores	30	2.3 [1.1-5.0]*	33.3% [19.2%-51.2%]	2.3 [1.1-5.0]*	33.3% [19.2%-51.2%]	-	-	-	-	-	-	
Mayotte	1,475	1.7 [1.4-1.9]**	26.4% [24.3%-28.8%]	1.5 [1.3-1.8]**	24.7% [22.6%-26.9%]	3.6 [1.9-7.1]**	2.0% [01.4%-02.8%]	2.1 [0.9-4.7]	1.0% [0.6%-1.6%]	-	-	
Mauritius	111	1.6 [1.1-2.5]*	26.1% [18.9%-35.0%]	1.1 [0.7-1.8]	19.8% [13.5%-28.2%]	-	-	19.2 [7.6-48.2]**	8.1% [4.3%-14.7%]	-	-	
Reunion <sup>b</sup>	2,184	1 (ref)	18.7% [17.1%-20.4%]	1 (ref)	17.9% [16.3%-19.5%]	1 (ref)	0.5% [0.3%-1.0%]	1 (ref)	0.4% [0.3%-0.8%]	-	-	

MRB positive patient could be carrier of more than one MRB; MRB: multidrug-resistant bacteria; ESBL-E: extended-Spectrum Betalactamase-producing Enterobacteriaceae; MRSA: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; CPE: carbapenemases-producing Enterobacteriaceae

## DISCUSSION

This study pointed out significantly higher MRB colonization rates in hospitalized patients from Comoros, Madagascar, Mayotte and Seychelles when compared to patients from Reunion. ESBL-E seems to be a generalized sanitary issue for SWIO whereas specific epidemiological trends were observed for MRSA and CPE. Higher MRSA colonization rates were reported in Mayotte and Seychelles patients and higher CPE colonization rate was identified in Mauritius residing patients ( $p < 0.001$ ) when compared to Reunion patients. These results could be the first step of a regional hospital-based MRB surveillance as expected by the Indian ocean commission since 2015.<sup>3</sup>

Our survey was based on the biggest sample size of SWIO individuals ever reported in the literature. Patient residence country is a known risk factor for MRB infection and carriage.<sup>8-11</sup> Individuals included in the study were probably looking for care on Reunion after treatment in facilities of their home countries. Thus, MRB colonization rates estimated were probably approximates of the epidemiological situation regarding MRB in local hospitals. However, the socio-economic status of patients seeking care on Reunion was unknown (probable people with higher incomes than the general local population) but probably favor access to healthcare, medicine, and hygiene and thus probably underestimate MRB colonization in local health care settings; poverty identified as a risk factor of MRB colonization.<sup>12</sup> Furthermore, use of intensive care unit patient's screening as reference data could over-estimate odds ratio as fewer Reunion patients should have been hospitalized in the preceding months (risk factor for MRB acquisition<sup>13</sup>) when compared to SWIO patients arriving to Reunion. Thus, Reunion intensive care unit were a probable estimate of the community-acquired MRB. Furthermore, the small number of hospitalized patients from Seychelles and Comoros could limit our interpretations and local investigation are needed to confirm trends.

If ESBL-E occurrence in IOC was already highlighted as a public health issue both in community and hospitals<sup>4</sup>, our analysis confirmed it quantitatively. For instance, ESBL-E colonization rate estimated in Madagascar was high (40.1%) which is in accordance with traveler's colonization rates reported for the literature ranging from 33.3% (1/3)<sup>14</sup> to 57.1% (4/7)<sup>15</sup> in 2013-2013 but higher than the ESBL-E colonization of 18.5% reported in community in 2013-2014<sup>16</sup>. High CPE colonization rate of

repatriated patients from Mauritius was already reported<sup>17</sup> which could confirm CPE circulation in Mauritius hospitals and/or community. Important fluxes of travelers from India were probably contributing to MRB epidemiological changes in Mauritius as NDM-producing isolates are considered endemic in India<sup>18</sup>. Finally, comparisons of MRB colonization rates for specific MDR (i.e. MRA, MRP) were difficult to provide in other SWIO territories and Mayotte as no data were available.

Finally, our study offered the first cartography of MDR colonization in SWIO. MDR colonization might constitute a risk of introduction in another country healthcare system. Reunion is a medically attractive territory which could provide the first MRB hospital-based surveillance for SWIO. The suitability of this regional MRB surveillance system should be confirmed.

Acknowledgements: Laurent Filleul for study design and methodology advices.

Financial support: This project was ordered and funded by the Indian Ocean Health Agency and the INTERREG FEDER TROI 2018-2020 under the DP One health Indian Ocean ([www.onehealth-oi.org](http://www.onehealth-oi.org)).

Disclosure: None declared.

## REFERENCES

1. Belmonte O, Drouet D, Alba J, Moiton MP, Kuli B, Lugagne-Delpon N, Mourlan C, Jaffar-Bandjee, MC. 2010. Evolution of Enterobacteriaceae resistance to antibiotics in Reunion Island: emergence of extended-spectrum beta-lactamases. *Pathol Biol* 58: 18-24.
2. Surveillance des bactéries multirésistantes dans les établissements de santé en France. Réseau BMR-Raisin, France. Résultats 2015. Saint Maurice: Santé publique France; 2017. 112p. Available at: <http://invs.santepubliquefrance.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-infectieuses/2017/Surveillance-des-bacteries-multiresistantes-dans-les-etablissements-de-sante-en-France>. Accessed March 18, 2018.
3. Rapport Annuel 2015. Commission de l’Océan Indien. Port Saint Louis. 2015. Available at: <http://commissionoceanindien.org/fileadmin/resources/SG/Rapport%20annuel%202015.pdf>. Accessed January 15, 2018.

4. Gay N, *et al.* 2017. Review of antibiotic resistance in the Indian Ocean Commission: a human and animal health issue. *Front Public Health* 5: 162.
5. Haut conseil de la Santé Publique. 2010. Dépistage du portage digestif des bactéries commensales multirésistantes aux antibiotiques importées en France à l'occasion du rapatriement de patients en provenance de l'étranger et maîtrise de leur diffusion. 37 pages.
6. Magiorakos AP, *et al.* 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 18: 268-281.
7. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. 2015. Société Française de Microbiologie. Available at: [http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFM\\_EUCAST\\_V1\\_2015.pdf](http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFM_EUCAST_V1_2015.pdf). Accessed December 12, 2017.
8. Megraud F, Coenen S, Versporten A, Kist M, Lopez-Brea M, Hirschl AM, Andersen LP, Goossens H, Glupczynski Y, Study Group participants. 2013. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut* 62: 34-42.
9. Manns BJ, Fanning EA, Cowie RL. 1997. Antituberculosis drug resistance in immigrants to Alberta, Canada, with tuberculosis, 1982-1994. *Int J Tuberc Lung Dis* 1: 225-230.
10. Laifer G, Widmer AF, Simcock M, Bassetti S, Trampuz A, Frei R, Tamm M, Battegay M, Fluckiger U. 2007. TB in low-Incidence Country: Differences Between New Immigrants, Foreign-Born Residents and Native Residents. *Am J Med*. 120: 350-356.
11. Bryce A, Costelloe C, Hawcroft C, Wootton M, Hay AD. 2016. Faecal carriage of antibiotic resistant *Escherichia coli* in asymptomatic children and associations with primary care antibiotic prescribing: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 16:359.
12. Herindrainy P, Randrianirina F, Ratovoson R, Ratsima Hariniana E, Buisson Y, Genel N, *et al.* 2011. Rectal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in community settings in Madagascar. *PLoS One* 6: e22738.

13. Colodner R, Rock W, Chazan B, Keller N, Guy N, Sakran W, Raz R. 2004. Risk factors for the development of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in nonhospitalized patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23: 163-167.

14. Arcilla MS, *et al.* 2017. Import and spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae by international travellers (COMBAT study): a prospective, multicentre cohort study. *Lancet Infect Dis* 17: 78-85.

15. Ruppé E, *et al.* 2015. High Rate of Acquisition but Short Duration of Carriage of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae After Travel to the Tropics. *Clin Infect Dis* 61: 593-600.

16. Chereau F, Herindrainy P, Garin B, Huynh BT, Randrianirina F, Padget M, Piola P, Guillemot D, Delarocque-Astagneau E. 2015. Colonization of extended-spectrum-beta-lactamase- and NDM-1-producing Enterobacteriaceae among pregnant women in the community in a low-income country: a potential reservoir for transmission of multiresistant Enterobacteriaceae to neonates. *Antimicrob Agents Chemother*, 59: 3652-3655.

17. Holman AM, Allyn J, Miltgen G, Lugagne N, Traversier N, Picot S, Lignereux A, Oudin C, Belmonte O, Allou N. 2017. Surveillance of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in the Indian Ocean Region between January 2010 and December 2015. *Mad Mal Infect* 47: 333-339.

18. Dortet L, Cuzon G, Nordmann P. Dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in France, 2012. 2014. *J Antimicrob Chemother* 69: 623-627.

## Résultats majeurs

Le travail réalisé a permis, pour la première fois, d'établir une cartographie de la prévalence de colonisation par les EBLSE chez les patients résidant dans les différents territoires du SOOI. Une problématique sanitaire commune à l'ensemble des territoires (hors Maurice) a été confirmée avec une prévalence de colonisation par les EBLSE significativement plus élevée par rapport aux patients de La Réunion. Les patients résidant à Madagascar avaient une probabilité trois fois plus élevée d'être colonisés par des EBLSE par rapport à un patient habitant à La Réunion.

Des dynamiques épidémiologiques plus spécifiques semblaient émerger pour les patients résidant dans certains territoires. C'est le cas pour la colonisation par *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline chez les patients résidant aux Seychelles et à Mayotte et la colonisation par des EPC chez les patients résidant à Maurice. Les patients résidant à Maurice avaient une probabilité 19 fois supérieure d'être colonisé par une EPC par rapport aux patients résidant à La Réunion.

En conclusion, bien que basé sur un échantillon de convenance, le travail réalisé fournissait les premières estimations de la prévalence de colonisation des hommes par des BMR dans le SOOI. Cette estimation de la prévalence des BMR pourrait à la fois manquer de précision pour les territoires dont l'échantillon était réduit (plus particulièrement pour les Seychelles) et d'exactitude puisque l'usage d'un échantillon de convenance ne permettait pas un tirage aléatoire des individus inclus dans l'étude. En outre, l'exposition des individus à différentes sources d'EBLSE n'a pas été pris en compte (par exemple les antécédents de prise d'antibiotiques).

Ce travail pourrait ouvrir la voie à la mise en place d'un système régional de surveillance épidémiologique des BMR à partir du site sentinelle de La Réunion. Des systèmes de surveillance basés sur le dépistage de voyageurs avait déjà été suggérés et ont démontré leur utilité pour pallier au manque de surveillance dans certains territoires (Guerin, Grais *et al.* 2007). L'évaluation de la pertinence du système de surveillance épidémiologique des BMR développé devrait être envisagée à la lumière de ses limites méthodologiques. Sa pérennisation permettrait le suivi de la prévalence des BMR dans le temps pour les différents territoires du SOOI et pourrait constituer un outil d'aide à la décision pour la COI. En outre, la question de la circulation de bactéries hautement résistantes



aux antibiotiques telles que les EPC à l'hôpital et en communauté à l'île Maurice devrait être adressée.

**Trois points clés sur le « compartiment homme »**

- La problématique sanitaire généralisée des EBLSE, les patients des Seychelles et Madagascar potentiellement plus concernés
- Une dynamique épidémiologique spécifique des EPC à Maurice
- Une pérennisation de ce travail pour un système de surveillance régional des BMR ?

Dans le [chapitre 3](#) nous avons confirmé la distribution régionale des EBLSE dans l'océan Indien, dans le compartiment humain, en utilisant les données de dépistage de l'hôpital de La Réunion. Dans le chapitre suivant ([chapitre 4](#)), l'estimation de la prévalence inter-élevage d'EBLSE dans les filières intensives de porcs naisseurs/engraisseurs, volailles de chair et bovins à viande de La Réunion, Mayotte et Madagascar a été effectuée. Les facteurs expliquant cette prévalence inter-élevage d'EBLSE ont été explorés.

## Chapitre 4. Quels facteurs de risque d'occurrence d'EBLSE dans les élevages intensifs de porcs, volailles et bovins à La Réunion, Mayotte et Madagascar, 2016-2017 ?



© Morgane Laval

### **Elevage intensif de volailles de chair, Mayotte 2017**

Le [Chapitre 3](#) a permis d'estimer une prévalence d'EBLSE élevée chez l'homme dans les territoires du SOOI (hors Réunion et Maurice) à l'aide des données de dépistage de BMR chez les patients hospitalisés. La prévalence inter-élevage d'EBLSE dans les filières intensives dans trois territoires du SOOI a été mise en parallèle.

Une étude transversale a été réalisée dans les élevages intensifs de porcs naisseurs/engraisseurs, de volailles de chair et de bovins à viande à Madagascar, La Réunion et Mayotte en 2016-2017. La présence ou l'absence de contamination par les EBLSE des élevages intensifs était analysée au travers des pratiques d'élevage.

Ce travail visait à répondre aux interrogations suivantes :

- Y-a-t-il des filières d'élevage plus contaminées par les EBLSE dans l'ensemble des territoires ?

*Chapitre 4 – Quels facteurs de risque d'occurrence d'EBLSE dans les élevages intensifs*

- Y a-t-il des territoires où la contamination des élevages intensifs est plus élevée ?

- Existe-t-il des pratiques d'élevage expliquant la présence ou l'absence d'EBLSE en élevage intensif.

Secondairement, la caractérisation des enzymes BLSE des *E. coli* identifiées dans les différentes filières et territoires a été réalisée.

Les questionnaires utilisés pour les entretiens des éleveurs sont disponibles dans l'[Annexe 3](#).

Les résultats de ce travail ont été publiés dans Veterinary Sciences en 2018.

---

**Article 3. Gay N, Leclaire A, Laval M, Miltgen G, Jégo M, Stéphane R, Jaubert J, Belmonte O, Cardinale E.** Risk factors of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Producing Enterobacteriaceae Occurrence in Farms in Reunion, Madagascar and Mayotte Islands, 2016-2017. Vet Sci. 5(1). pii: E22. doi: 10.3390/vetsci5010022.

---

### Article 3. Risk factors of Extended-Spectrum $\beta$ -Lactamase Producing Enterobacteriaceae occurrence in farms in Réunion, Madagascar and Mayotte Island, 2016-2017

Noellie Gay <sup>1,\*</sup>, Leclaire Alexandre <sup>2</sup>, Morgane Laval <sup>1</sup>, Guillaume Miltgen <sup>2</sup>, Maël Jego <sup>1</sup>, Ramin Stéphane <sup>1</sup>, Julien Jaubert <sup>2</sup>, Olivier Belmonte <sup>2</sup>, Eric Cardinale <sup>1</sup>

<sup>1</sup> CIRAD, UMR ASTRE, F-97418 Sainte-Clotilde, La Réunion, France

ASTRE, Univ Montpellier, CIRAD, INRA, Montpellier, France; noellie.gay@cirad.fr; eric.cardinale@cirad.fr; laval.morgane1@gmail.com

<sup>2</sup> Bacteriology laboratory, Félix Guyon Hospital, Saint-Denis, Reunion, France; olivier.belmonte@chu-reunion.fr; alexandre.leclaire@yahoo.fr; guillaume.miltgen@chu-reunion.fr

\* Correspondence: noellie.gay@cirad.fr, Tel.: +262-693-828-223

Received: 5 January 2018; Accepted: 19 February 2018; Published: 23 February 2018

**Abstract:** In South Western Indian ocean (IO), Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase producing Enterobacteriaceae (ESBL-E) are a main public health issue. In livestock, ESBL-E burden was unknown. The aim of this study was estimating the prevalence of ESBL-E on commercial farms in Reunion, Mayotte and Madagascar and genes involved. Secondly, risk factors of ESBL-E occurrence in broiler, beef cattle and pig farms were explored. In 2016-2017, commercial farms were sampled using boot swabs and samples stored at 4°C before microbiological analysis for phenotypical ESBL-E and gene characterization. A dichotomous questionnaire was performed. Prevalences observed in all production types and territories were high, except for beef cattle in Reunion which differed significantly. The most common ESBL gene was *bla*<sub>CTX-M-1</sub>. Generalized linear models explaining ESBL-E occurrence varied between livestock production sectors and allowed identifying main protective (e.g. water quality control and detergent use for cleaning) and risk factors (e.g. recent antibiotic use, other farmers visiting the exploitation, pet presence). This study is the first to explore tools for antibiotic resistance management in IO farms. It provides interesting hypothesis to explore about antibiotic use in IO territories and ESBL-E transmission between pig, beef cattle and humans in Madagascar.

**Keywords:** Indian ocean; livestock; Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase producing Enterobacteriaceae; risk factors; CTX-M; enzymes

---

## 1. Introduction

Extended-spectrum  $\beta$ -Lactamase producing Enterobacteriaceae (ESBL-E) is a public and veterinary health burden worldwide and particularly in West Indian ocean countries (Gay, Belmonte *et al.* 2017). These multi-resistant bacteria have been identified as a priority in terms of epidemiological surveillance in humans and animals from the Indian Ocean Commission (IOC) state members (i.e. Comoros, Madagascar, Mauritius, Reunion, and Seychelles) and Mayotte (French oversea territory) (Gay, Belmonte *et al.* 2017).

ESBL-E are resistant to almost all beta-lactam antibiotic drugs including third generation cephalosporin (3GC), co-resistance are often observed with other classes of antibiotics such as fluoroquinolones, aminoglycosides, sulfonamides, and tetracyclins, leading to the use of last-resort antibiotics (i.e. carbapenems) in ESBL-E infections in humans (Blaak, van Hoek *et al.* 2015).

The occurrence of ESBL-E has been identified in broiler and swine farms in Europe (Mesa, Blanc *et al.* 2006, Leverstein-van Hall, Dierikx *et al.* 2011, Ewers, Bethe *et al.* 2012) and the CTX-M  $\beta$ -lactamases is the most frequently detected enzyme in livestock, especially *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (Ewers, Bethe *et al.* 2012).

Selection pressure exerted by antibiotic drugs on microbiota favors carriage and persistence of ESBL-E in humans (hospital and community) (Grall, Lazarevic *et al.* 2017, van Duijkeren, Wielders *et al.* 2017), livestock and pets (Cortes, Blanc *et al.* 2010, Dierikx, van Duijkeren *et al.* 2012, Grall, Lazarevic *et al.* 2017); thus, all could act as potential reservoirs of ESBL-E.

The main known risk factor identified in ESBL-E occurrence in livestock was “use of 3GC or fourth generation cephalosporin (4GC) (ceftiofur, cefoperazone and cefquinome) in the last 12 months” in dairy and pig farms (Snow, Warner *et al.* 2012, Hammerum, Larsen *et al.* 2014).

Other risk factors such as storage of slurry in a pit, operating an open herd policy and infrequent cleaning of calf feeding equipment were also identified in dairy farms (4), and fish ponds presence in poultry farms of Vietnam (Nguyen, Carrique-Mas *et al.* 2015).

In IOC no estimate of ESBL-E prevalence in livestock was available. Thus, the aim of this study was first estimate the prevalence of ESBL-E on beef cattle, broiler and pig commercial farms in Reunion, Mayotte and Madagascar Islands, and identify ESBL enzymes occurrence in each production type and territory. Secondly, potential risk factors of ESBL-E occurrence in poultry, beef cattle and pig farms were explored.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1. Study Population*

Reunion and Mayotte are French overseas territories located in South Western Indian ocean. Reunion with an area of 2512 km<sup>2</sup> is home for around 850 996 people (INSEE 2016). In Reunion, 156 poultry producers, 340 pig producers and 331 beef cattle producers are structured in official breeding organization and could be considered as intensive or partially free ranging (Eric Cardinale, Personal Communication).

Mayotte with an area of 374 km<sup>2</sup> is home for around 235 132 people (INSEE 2016). One hundred fifty modern poultry producers and 3600 beef cattle farms are recorded in this territory (DGAL 2011). However, twenty poultry producers and 320 beef cattle producers are structured in breeding official organizations (Philippe Merot, Personal Communication).

Madagascar is the fifth largest island in the world, with a land mass of 587,000 km<sup>2</sup> and 24.24 million inhabitants in 2016 (WorldBank Group, 2015). Its economy is based essentially on agriculture and tourism; producer census was not available at the Direction of Veterinary Services of the Ministry of Livestock Production (Michel Rakotoharinome, Personal Communication).

### *2.2. Sampling*

From February to August 2016, broiler, pigs, and beef cattle farms were sampled in Reunion. Due to a foot-and-mouth outbreak in Mauritius Island, sampling had to be stopped in beef cattle in Reunion for sanitary reasons. Sampling was reported to August 2017 for beef cattle. In Mayotte, beef cattle and broiler were sampled from September to October 2016, no pig farms were present in this territory due to mostly Muslim community representation; thus, no sample of pigs was collected. In Madagascar, sampling was performed in November 2016. Beef cattle were sampled in Antsirabe, broiler in Mahitsy and pig farms in Imerintsiasosika, known to be key production sites. It is to be noted that broiler and beef cattle farms from Mayotte and Madagascar could also raise few hen and dairy cattle in the farm without being the main commercial activity.

In each territory, the sample size of thirty breeding farms of each livestock production sector were targeted. Samples were collected using boot swabs Sterisox<sup>®</sup>. Number of samples depended on the house's surface area, one Sterisox<sup>®</sup> covered 100m<sup>2</sup> of building. If possible all boxes were visited and livestock gathering points (e.g. water pond, watering trough) were also sampled. Number of samples per farm varied between one to five.

All samples were immediately maintained at 4 °C before analyses proceeded within 48 hours after reception (transport within the day for Reunion and within one week for Mayotte and Madagascar).

No ethical approval was needed as noninvasive sampling methods were used to identify farm ESBL-E sanitary status.

### 2.3. Laboratory Investigations

#### 2.3.1. ESBL-E Phenotype

Sterisox® boot swabs were incubated 20±4h at room temperature with 100 ml of physiological water and 900 µL of Brain-Heart Infusion broth (BioMérieux SA). Ten µL of the enriched suspension was directly streaked onto selective chromogenic agar plates (ChromID-ESBL, Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) and incubated overnight at 37°C under aerobic condition. Presumptive ESBL-producers were sub-cultured individually on Drigalski lactose agar, and bacterial species identification performed using MALDI-TOF mass spectrometry (Bruker Daltonics, Breme, Germany). All Enterobacteriaceae isolates identified, one or more by positive farms, were considered ESBL-E if confirmed by the combination disc test according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines (EUCAST 2015). Thus, Muller Hinton agar with cefotaxime, ceftazidime, cefixime and cefepime disks with and without clavulanic acid allowed testing. The result was considered positive if the inhibition zone diameter was ≥5 mm larger with clavulanic acid than without for at least on cephalosporin tested.

If ESBL-E were identified, antibiograms were performed on isolates with ertapenem (ETP), nalidixic acid (NA), ofloxacin (OFL), gentamicin (GEN), Amikacin (AMK), trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT) and tetracyclin (TCN) tested.

#### 2.3.2. Characterization of ESBL genes

ESBL-producing isolates were randomly selected per livestock production sector for each territory (except Reunion with 35 *E. coli* isolates). Total DNA was extracted using the NucliSens® Easymag® system (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) according to the manufacturer's instructions. Extracted eluates were stored at -80°C. Molecular characterization was performed using Check-MDR CT103XL array test (Check-Points Health B.V., Wageningen, Netherlands) for identification of ESBL genes (i.e. encoding BEL, CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9, CTX-M-8/25, GES-ESBL, PER, SHV-ESBL, TEM-ESBL, VEB) and discriminated ESBL and non-ESBL TEM and SHV variants. The

assay consisted in a two-step amplification process of the ESBL target sequences, followed by a colorimetric microarray detection of the reaction products. Image analysis and interpretation were provided by Check-Points "5-2-2015" software.

#### *2.4. Questionnaire*

A dichotomous questionnaire to assess potential risk factors on farms was developed. Data regarding farm building, biosecurity measures, breeding practices including management of knackery, water quality, quarantine, and effluent, vector control, cleaning and disinfection techniques, use of antibiotics, and questions related to the breed like housing system and origins of animals were collected (See questionnaire annex). Answers were cross-checked by direct observation and corrected if necessary.

#### *2.5. Risk factors analyzes*

A farm was considered positive if at least one boot swab was found positive for ESBL-E in bacteriological analysis. A farm was considered negative if all boot swabs samples were negative for ESBL-E.

Explanatory variables considered for analysis were categorical. If fewer than five observations recorded in a category the variable was excluded. The variable to be explained was ESBL-E occurrence in the livestock production sector in each territory. Bivariate analyzes were performed using Fisher test ( $p < 0.05$ ).

For generalized linear models (GLM), a preliminary step aimed at evaluating association between explicative variables and ESBL-E farm status with bivariate analyzes in each livestock production sectors (including all three territories). Factors associated with ESBL-E positivity with a p-value  $< 0.20$  were offered to a full model form multivariate analysis (GLM). The variable territory was not included in models as it was significantly associated with others variables. Interactions between variables were not including in the models. The preferred model was the one with the minimum Akaike information criterion (AIC). Goodness of fit test were also performed. R software was used to perform statistical analysis (<https://www.r-project.org/>).



### 3. Results

#### 3.1. Prevalence Observed, Bacterial Diversity, and Antibigram Results

In Reunion, high prevalences were observed in poultry (70.0%±16.7%) and pig farms (53.3%±18.2) (Table 1.). Prevalence differed significantly between livestock production type in Reunion (p-value<0.001) with a low prevalence observed in beef cattle farms (3.7%±5.1%). In Mayotte and Madagascar, no difference in prevalence was observed between livestock type in each territory (p-value > 0.05).

Comparing prevalence among poultry production in the three territories, no difference was observed (p-value=0.94). In pig production, the prevalence differed significantly between Madagascar and Reunion (p-value<0.005). Finally, in beef cattle the prevalence between the three territories differed significantly (p-value<0.001).

**Table 1. Prevalence of ESBL-E in livestock production farms of Reunion, Mayotte and Madagascar, 2016-2017.**

Territory	N (positive farm)	ESBL-E positive farms	p-value <sup>(1)</sup>	p-value <sup>(2)</sup>
<b>Reunion</b>			<b>&lt;0.001</b>	
Poultry	30 (21)	70.0 % [53.3-86.7]	-	0.94
Pigs	30 (16)	53.3 % [35.1-71.5]	-	<0.005
Beef cattle	54 (2)	03.7% [00.0-08.8]	-	<0.001
<b>Mayotte</b>			<b>0.70</b>	
Poultry	23 (17)	73.9 % [55.6-92.2]	-	-
Beef cattle	19 (13)	68.4 % [47.1-89.7]	-	-
<b>Madagascar</b>			<b>0.16</b>	
Poultry	30 (21)	70,0% [53.6-86.7]	-	-
Pigs	30 (26)	86,7% [74.3-99.1]	-	-
Beef cattle	30 (20)	66,7% [49.5-83.9]	-	-

N: total livestock commercial farms sampled.

<sup>(1)</sup> P-value of Fisher test regarding occurrence between livestock production type in each territory

<sup>(2)</sup> P-value of Fisher test regarding occurrence in each livestock production type between each territory

In Reunion, four different species were found among Enterobacteriaceae isolates with two species (*Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae complex*) in both poultry and beef cattle farms, three species in pig (*E. coli*, *Klebsiella pneumonia*, and *Citrobacter freundii*) (Table 2.).

In Mayotte, Enterobacteriaceae diversity was reduced to *E. coli* and *E. cloacae* complex in both poultry and beef cattle production.

In Madagascar, an important diversity of species was found among Enterobacteriaceae isolates with six different species identified in all types of production. Species diversity varied according to the production type with five species identified in pig production, three in beef cattle and poultry production.

The main represented species in all territories and all types of production was *E. coli* with 89.0% (n=307) of all Enterobacteriaceae isolates (N=345), 95.1% (n=292) out of them being ESBL producers.

**Table 2. Diversity of the ESBL-E species isolated in chromogenic agar from livestock production farms of Reunion, Mayotte and Madagascar, 2016-2017.**

	Reunion						Mayotte				Madagascar						
	N (% ESBL-E)	Poultry		Pig		Cattle		Poultry		Cattle		Poultry		Pig		Cattle	
		n	ESBL-E (%)	n	ESBL-E (%)	n	ESBL-E (%)	n	ESBL-E (%)	n	ESBL-E (%)	n	ESBL-E (%)	n	ESBL-E (%)	n	ESBL-E (%)
<i>Citrobacter freundii</i>	6 (100.0%)	-	-	2	2 (100.0%)	-	-	-	-	-	-	-	-	4	4 (100.0%)	-	-
<i>Escherichia coli</i>	307 (95.1%)	145	136 (93.8%)	45	40 (88.9%)	2	2 (100.0)	19	19 (100.0%)	17	17 (100.0%)	28	28 (100.0%)	29	28 (96.6%)	22	22 (100.0%)
<i>Escherichia hermannii</i>	2 (100.0%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2 (100.0%)
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	13 (92.3%)	1	1 (100.0%)	-	-	1	0 (00.0%)	1	1 (100.0%)	1	1 (100.0%)	1	1 (100.0%)	6	6 (100.0%)	2	2 (100.0%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11 (100.0%)	-	-	2	2 (100.0%)	-	-	-	-	-	-	2	2 (100.0%)	7	7 (100.0%)	-	-
<i>Morganella morganii</i>	2 (100.0%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2 (100.0%)	-	-

No phenotypic resistance to ertapenem (ETP) was identified in ESBL-E isolates (Table 3.). Resistance to nalidixic acid (NA) was high in ESBL producing *E. coli* in beef cattle from Reunion (50.0%) and in Madagascar both in poultry (28.6%) and pig (25.0%) farms. Resistance to ofloxacin (OFX) was high in ESBL producing *E. coli* in pig production both in Madagascar (21.4%) and Reunion (25.0%). Resistance to gentamicin (GEN) was elevated in ESBL producing *K. pneumoniae* in Madagascar. No resistant profile to amikacin (AKN) was identified in all territories. In ESBL producing *E. coli* trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT) resistance was high in Reunion both in poultry and pig production (75.0% and 87.5% respectively). ESBL producing *E. coli* most resistant profiles to tetracycline (TE) were observed in Madagascar (i.e. 92.9% in broiler, 75.0% in pigs and 50.0% in beef cattle).

**Table 3. Antibiogram results of ESBL-E from livestock production farms of Reunion, Mayotte, and Madagascar, 2016-2017.**

	ETP			NA			OFL			GEN			AMIK			SXT			TCN			
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	ND
Reunion																						
Broiler																						
E. Coli (N=136)	136 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	102 (75.0%)	5 (03.7%)	29 (21.3%)	131 (96.3%)	2 (01.5%)	3 (02.2%)	128 (94.1%)	0 (00.0%)	8 (05.9%)	134 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	34 (25.0%)	0 (00.0%)	102 (75.0%)	33 (24.3%)	0 (00.0%)	65 (47.8%)	38 (27.9%)
E. Cloacae (N=1)	1 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	1 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	1 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	1 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	1 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	1 (100.0%)	1 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)
Pig																						
E. coli (N=40)	39 (97.5%)	1 (02.5%)	0 (00.0%)	29 (72.5%)	1 (02.5%)	10 (25.0%)	30 (75.0%)	0 (00.0%)	10 (25.0%)	35 (87.5%)	0 (00.0%)	5 (12.5%)	40 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	5 (12.5%)	0 (00.0%)	35 (87.5%)	5 (12.5%)	1 (02.5%)	23 (57.5%)	11 (27.5%)
C. Freundii (N=2)	2 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	2 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	2 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	2 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	2 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	2 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	2 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)
K. Pneumoniae (N=2)	1 (50.0%)	1 (50.0%)	0 (00.0%)	1 (50.0%)	0 (00.0%)	1 (50.0%)	1 (50.0%)	0 (00.0%)	1 (50.0%)	2 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	2 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	1 (50.0%)	2 (100.0%)	1 (50.0%)	1 (50.0%)	0 (00.0%)	1 (50.0%)	1 (50.0%)
Beef cattle																						
E. Coli (N=2)	2 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	1 (50.0%)	0 (00.0%)	1 (50.0%)	1 (50.0%)	1 (50.0%)	0 (00.0%)	2 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	2 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	2 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	2 (100.0%)	0 (00.0%)
Mayotte																						
Broiler																						
E. Coli (N=19)	19 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	14 (73.7%)	4 (21.1%)	1 (05.3%)	19 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	18 (94.7%)	0 (00.0%)	1 (05.3%)	19 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	14 (73.7%)	0 (00.0%)	5 (26.3%)	3 (15.8%)	0 (00.0%)	16 (84.2%)	0 (00.0%)
E. Cloacae (N=1)	1 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	1 (100.0%)	0 (00.0%)	1 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	1 (100.0%)	1 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	1 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	1 (100.0%)	0 (00.0%)
Beef cattle																						
E. coli (N=16)*	16 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	7 (43.8%)	5 (31.3%)	4 (25.0%)	14 (87.5%)	2 (12.5%)	0 (00.0%)	12 (75.0%)	0 (00.0%)	4 (25.0%)	16 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	15 (93.8%)	0 (00.0%)	1 (06.3%)	12 (75.0%)	0 (00.0%)	4 (25.0%)	0 (00.0%)
E. Cloacae (N=1)	1 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	1 (100.0%)	1 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	1 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	1 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	1 (100.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	0 (00.0%)	1 (100.0%)	0 (00.0%)

Chapitre 4 – Quels facteurs de risque d'occurrence d'EBLSE dans les élevages intensifs

Madagascar	ETP			NA			OFL			GEN			AMK			SXT			TCN			
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	
Broiler	28 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	13 (46.4%)	7 (25.0%)	8 (28.6%)	22 (78.6%)	3 (10.7%)	3 (10.7%)	27 (96.4%)	0 (0.00%)	1 (03.6%)	28 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	27 (96.4%)	0 (0.00%)	1 (03.6%)	1 (03.6%)	1 (03.6%)	26 (92.9%)	
E. coli (N=28)	28 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	13 (46.4%)	7 (25.0%)	8 (28.6%)	22 (78.6%)	3 (10.7%)	3 (10.7%)	27 (96.4%)	0 (0.00%)	1 (03.6%)	28 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	27 (96.4%)	0 (0.00%)	1 (03.6%)	1 (03.6%)	1 (03.6%)	26 (92.9%)	
E. cloacae (N=1)	1 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (100.0%)	
K. pneumoniae (N=2)	2 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (100.0%)	0 (0.00%)	1 (100.0%)	1 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	2 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (100.0%)	
Pig																						
E. coli (N=28)	28 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	13 (46.4%)	8 (28.6%)	7 (25.0%)	20 (71.4%)	2 (07.1%)	6 (21.4%)	28 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	28 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	28 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	7 (25.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	21 (75.0%)
E. cloacae (N=6)	6 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	2 (33.3%)	2 (33.3%)	2 (33.3%)	6 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	4 (66.7%)	0 (0.00%)	2 (33.3%)	6 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	4 (66.7%)	0 (0.00%)	2 (33.3%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	6 (100.0%)
C. freundii (N=4)	4 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	4 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	4 (100.0%)	1 (25.0%)	0 (0.00%)	3 (75.0%)	4 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (25.0%)	0 (0.00%)	3 (75.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	4 (100.0%)
M. morganii (N=6)	6 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	6 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	6 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	6 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	6 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	6 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	6 (100.0%)	
K. pneumoniae (N=7)	7 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	3 (42.9%)	4 (57.1%)	5 (71.4%)	0 (0.00%)	2 (28.6%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	7 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	7 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	7 (100.0%)	
Beef cattle																						
E. coli (N=22)	22 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	15 (68.2%)	3 (13.6%)	4 (18.2%)	18 (81.8%)	3 (13.6%)	1 (04.5%)	21 (95.5%)	0 (0.00%)	1 (04.5%)	22 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	21 (95.5%)	0 (0.00%)	1 (04.5%)	11 (50.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	11 (50.0%)
E. cloacae (N=2)	2 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	2 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	2 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	2 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	2 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	2 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	2 (100.0%)	
E. hermannii (N=2)	2 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	2 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	2 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	2 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	2 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	2 (100.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	2 (100.0%)	

ETP: ertapenem; NA: nalidixic acid; OFL: Ofloxacin; GEN: gentamicin; AMK: amikacin; SXT: trimethoprim/sulfamethoxazole; TCN: tetracyclin;

\* One ESBL producing E. coli was lost at the laboratory. Antibiograms was performed on 16 of the 17 ESBL-E.

### 3.2. ESBL Identification

ESBL-producing isolates were randomly selected per livestock production sector for each territory, except for Poultry in Reunion. The most common ESBL gene identified in all territories and production type was *bla*<sub>CTX-M-1</sub> which accounted for 53.7% (n=49) of all *E. coli* isolates tested (N=95), followed by *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (29.5%, n=28) (Table 4.). The higher diversity in ESBL gene was found in poultry production from all territories.

**Table 4. ESBL genes identified in a subset of *E. coli* isolated from poultry, pig and beef cattle production farms in Reunion, Mayotte and Madagascar, 2016-2017.**

Territory / Production type	<i>E. coli</i> tested	ESBL genes identified (%)							
		ND	CTX-M-1 group				CTX-M-9 group	SHV	TEM
Enzymes			CTX-M-1	CTX-M-3	CTX-M-15	CTX-M-32			
<b>Reunion</b>									
Poultry	35	3	29 (90.6%)					1 (3.1%)	2 (6.3%)
Pigs	10	-	7 (70.0%)	1 (10.0%)	2 (20.0%)				
Beef cattle	2	-	2 (100.0%)						
<b>Mayotte</b>									
Poultry	10	1	7 (77.8%)	1 (11.1%)	1 (11.1%)				
Beef cattle	10	3	1 (14.3%)		5 (71.4%)	1 (14.3%)			
<b>Madagascar</b>									
Poultry	10	-	5 (50.0%)		2 (20.0%)		3 (30.0%)		
Pigs	9*	-			9 (100.0%)				
Beef cattle	9*	-			9 (100.0%)				
<b>TOTAL</b>	<b>95</b> (100.0%)	<b>7</b> (7.4%)	<b>51</b> (53.7%)	<b>2</b> (2.1%)	<b>28</b> (29.5%)	<b>1</b> (1.1%)	<b>3</b> (3.2%)	<b>1</b> (1.1%)	<b>2</b> (2.1%)

\* Only 9 *E. coli* were tested: ND: failure, not determined

3.3. Explanatory Factors of ESBL-E Occurrence in Livestock Sectors Production in Reunion, Madagascar and Mayotte, 2016-2017

Univariate Odds Ratios (ORs) for the occurrence of ESBL-E in each livestock production sectors and territory are presented in (Table 5.). Premises building constructed after 1999 were associated with an increased probability of ESBL-E occurrence in broiler production in Reunion. In pig production, changing shoes/boots before entering the building was associated with an increase of ESBL-E occurrence whereas rodent control by a company and two disinfections between two consecutive batches of fattening pigs were associated with a decreased probability of ESBL-E occurrence.

In Madagascar, absence of chick introduction in the farm (self-production) in broiler farms was associated with decreased ESBL-E occurrence. Clearing space around the farm was associated with a decreased probability of ESBL-E occurrence in beef cattle production.

**Table 5. Bivariate explanatory factors of ESBL-E occurrence in livestock from Reunion, Mayotte and Madagascar, 2016-2017.**

Country	Livestock	Variable	OR, IC95%	p-value
Reunion	Broiler	Premises building constructed >1999	12.72 [1.25-671.77]	0.01
		Change clothes before entering house/pen	6.52 [0.92-80.50]	0.05
		Change shoes/boots before entering house/pen	13.62 [1.35-716.37]	0.01
	Pigs	Rodent control by a company	0.11 [0.01-0.75]	0.01
		Lightning in the building	0.18 [0.01-2.13]	0.04
		Two disinfections between two consecutive batches	0 [0-0.92]	0.04
	Beef cattle cows	-	-	-
Madagascar	Broiler	Chicks produced in the farm	0 [0.00-0.91]	0.02
	Pigs	Use of antibiotic for prophylaxis	0.09 [0.00-1.36]	0.05
	Beef cattle	Clearing space around the building	0 [0.00-0.94]	0.03
		Clean condition around the farm	0 [0-1.94]	0.003
Mayotte	Broiler	Distance from another poultry farm (>500 m)	13.39 [0.79-883.37]	0.04
	Beef cattle	-	-	-

Generalized linear models explaining ESBL-E occurrence (all territories included) varied between livestock production (Table 6). In broiler, “water quality control” was identified was associated with decreased of ESBL-E occurrence (OR: 0.12); the best model selected the variables “distance to another farm”, “foot bath at entrance”, “water quality” and “water storage tank” (AIC: 93.98).



In pig production, “other farmers visiting the farm”, “soak the floor”, “detergent use for cleaning” and “antibiotic use recently” were identified in the best model (AIC: 65.09).

For beef cattle, the best model kept “livestock size”, “antibiotic use”, “disinfestation”, “clearing space around the building”, “pet presence” and “water storage tank” (AIC: 83.53).

**Table 6. Best model explaining ESBL-E occurrence in poultry, pig and cow production (including all territories), 2016-2017.**

Dependent variables	Independent variables	Adj. OR (CI95%)	p-value	AIC
Broiler occurrence (a)	Distance elev oth species >500m	3.18 (0.65-15.56)	0.15	93.68
	Distance elev oth species <500m	0.99 (0.26-4.39)	0.99	
	Foot bath at room entrance	5.89 (0.61-57.17)	0.13	
	Water quality control	0.12 (0.02-0.82)	0.03	
	Water storage tank	2.58 (0.85-7.79)	0.09	
Pig occurrence* (b)	Farmers visits	14.15 (1.17-171.35)	0.04	65.09
	Soak the floor	22.34 (1.51-330.98)	0.02	
	Detergent use for cleaning	0.12 (0.02-0.75)	0.02	
	Antibiotic use recently (< 1 year)	8.82 (1.09-71.4)	0.04	
Beef cattle occurrence (c)	Livestock size > 25	0.07 (0.02-0.28)	<0.001	83.53
	Antibiotic drug use recently (< 1 year)	3.94 (1.04-14.98)	0.04	
	Disinfestation	0.19 (0.04-0.91)	0.04	
	Clearing space around the building	0.19 (0.04-0.91)	0.09	
	Water storage tank	0.38 (0.11-1.35)	0.14	
	Pet presence	6.87 (1.13-41.67)	0.04	

\*Reunion and Madagascar only, (a) Intercept = 0.01376, null deviance : 99.832, model d.f.= 4;

(b) Intercept = -2.7919, null deviance : 73.304, model d.f.= 3; (c) Intercept = 0.9959, null deviance : 132.027, model d.f.= 5.

#### 4. Discussion

Our study pointed out high ESBL-E prevalence in Madagascar, Reunion and Mayotte livestock commercial farms. Overall ESBL genes diversity in *E. coli* was reduced with  $bla_{CTX-M-1}$  mainly identified. In Madagascar, all genes identified in pig and beef cattle were  $bla_{CTX-M-15}$ , main enzyme observed in humans (Rakotonirina, Garin *et al.* 2013, Naas, Cuzon *et al.* 2016). It could confirm circulation of ESBL-E between human and livestock. Concrete factors associated with an increased risk of ESBL-E occurrence in farms were identified such as pet presence, farmer visits and recent antibiotic use. Finally, biosecurity and hygienic measures (e.g. disinfection, water quality control, detergent use) were globally reducing ESBL-E occurrence in IOC farms.

Our study clearly pointed a high ESBL-E prevalence in Madagascar, Reunion (except beef cattle) and Mayotte. Prevalence estimate was not accurate as obtained with a limited sample size; Madagascar ESBL-E prevalence calculated could neither estimate the overall prevalence in this large territory nor be the reflect of livestock farms diversity. If ESBL characterization allowed, for the first time, to identify a circulation of  $bla_{CTX-M-1}$  in all livestock types, the limited number of ESBL found in each livestock and IO territory (N=10) cannot rule out patterns. Less diversity was expected by livestock type (e.g. in poultry in each territory, pigs from Reunion and beef cattle from Mayotte) and could highlight needs of further enzyme identification as diversity could not be captured as a whole.

No phenotypic resistance to ertapenem in ESBL-E isolates was identified, which is in accordance with the absence of carbapenemase producing Enterobacteriaceae (CPE) detection in IO livestock in 2018 (Gay, Belmonte *et al.* 2017). However, use of CPE selective media would be more suitable for CPE detection. Resistance to fluoroquinolone could be low in Mayotte as no resistance to ofloxacin was observed, but should be confirmed as few isolates were tested. Hypothesis about risk factors identification in our study was opportunistic and case control or cohort study designs to rule out ESBL-E control measures would be needed. Furthermore, antibiotic drug use recently was identified as increasing ESBL-E occurrence in IO farms but the farmers were not able to tell which antibiotic drug was used. Further studies should be undertaken to evaluate antibiotic drugs consumption and practices in IO farms.

In broiler production estimated prevalence in IO territories was higher than 50.0% reported in 2012 in Germany (Dahms, Hubner *et al.* 2015), but similar to 70.0% reported in Japan in 2007 (19). In India, in 2014, among 87.0% of ESBL-E were detected in broiler and 42.0% in layer farms (Brower, Mandal *et al.* 2017). In pig farms, the prevalence in IO was higher than 8.3% reported in pigs in Japan in 2007 (Hiroi,

Yamazaki *et al.* 2012). For Madagascar it was similar to the 88.2% of ESBL-E positive farms observed in 2012 in Germany (Dahms, Hubner *et al.* 2015). ESBL-E occurrence of Mayotte and Madagascar beef cattle farms were similar to data reported from other studies in Germany with 73.3% of farms tested positive in 2011 to 2012 (Bavaria) (Schmid, Hormansdorfer *et al.* 2013) and 54.4% in 2012 in Mecklenburg-Vorpommern (Dahms, Hubner *et al.* 2015). In Reunion, the prevalence of ESBL-E in beef cattle farms tends to be significantly lower than in other territories. It could reflect effectiveness of the French governmental antibiotic reduction plan (Ecoantibio) in Reunion and better biosecurity applied. Mayotte is a French oversea territory, breeding practices are clearly different from Reunion with mixed livestock farms and could explain observed differences.

Finally, the high ESBL-E prevalence observed in IO territories could point important antibiotic drug use and/or misuse, including cephalosporins. This is particularly true for pigs in Madagascar where high antibiotic residues were reported in pork products at abattoirs (22).

Main ESBL-E co-resistance were observed in Madagascar (i.e. ofloxacin, tetracyclin, nalidixic acid, and gentamicin) and Reunion (i.e. ofloxacin, nalidixic acid, and trimethoprim/sulfamethoxazole). High ESBL-E co-resistance observed in Madagascar could point out a drug overuse, particularly for widely available oral agents (Gay, Belmonte *et al.* 2017). Nalidixic acid resistant isolates were resistant to ofloxacin in Reunion and Madagascar pig productions as observed in majority of cases (Pereira, Siler *et al.* 2014). Fluoroquinolone resistance was high in ESBL producing *E. coli* in pig production of both territories which could indicate past or present use/misuse of this critically important antimicrobial drug. Pig production was identified as the most important antibiotic consumer worldwide (Van Boeckel, Brower *et al.* 2015). French national data indicated that fluoroquinolones use was higher in cattle production than in pig and poultry production (ANSES 2016); trends, not estimated in IO French overseas territories, could differ from mainland France.

The most common ESBL gene identified in *E. coli* isolates tested was *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (54.4%) as observed in food-producing animals in European countries (Coque, Baquero *et al.* 2008). CTX-M  $\beta$ -lactamase is largely located on plasmids, which allows the horizontal transfer between enterobacteriaceae (Rodriguez, Thomas *et al.* 2014) and explains the current epidemic spread of this enzyme worldwide.

Overall ESBL gene diversity was reduced in our study with circulation of few genes by production type (e.g. *bla*<sub>CTX-M-1</sub> in pig and poultry from Reunion and *bla*<sub>CTX-M-15</sub> in pigs and beef cattle in Madagascar). It probably indicated a common past source of contamination with introduction of ESBL-E carriers and diffusion due to close contact in livestock as reported with *bla*<sub>CTX-M-14</sub> in cattle from the United Kingdom

(Snow, Warner *et al.* 2012). Thus, overall introduction/exchanges of ESBL-E between reservoirs and environment seems limited as observed by Dorado-Garcia in the Netherlands (2005-2015) (Dorado-Garcia, Smid *et al.* 2017). A more diverse ESBL genes pool was identified in IO poultry production with at least three different genes detected in each territory. Most of ESBL genes were *bla*<sub>CTX-M-1</sub> but SHV-ESBL and TEM-ESBL genes were also identified as in Dutch broilers (Huijbers, Graat *et al.* 2014). This diversity of ESBL genes in poultry could be related to close contact with poultry house surrounding environment. Interestingly, *bla*<sub>CTX-M-15</sub> was observed in pig production, beef cattle and poultry from Mayotte and Madagascar; It is the main enzyme observed in humans in IO (Rakotonirina, Garin *et al.* 2013, Naas, Cuzon *et al.* 2016) and circulation of ESBL-E between human and livestock could be suspected.

In broiler farms, “Premises building constructed after 1999” and “change of shoes/boots before entering the building” were significantly increasing ESBL-E occurrence in Reunion. Both factors were difficult to explain as related to improved biosecurity measures. Antibiotic drug use could be higher in modern farms and “change of shoes/boots” was identified also as a risk factor ESBL-E occurrence in Vietnam poultry production (Nguyen, Carrique-Mas *et al.* 2015) confirming that further investigations are needed to identify a potential confounding explanatory factor. In Madagascar, “chick production in the farm” significantly reduced occurrence of ESBL-E. This is in accordance with a vertical ESBL-E transmission into the production chain through external introduction such as imported day-old grandparent chickens as in Dutch poultry farms (Dierikx, van Essen-Zandbergen *et al.* 2010). In all IO territories, “water quality control” was a protective factor of ESBL-E occurrence in commercial farms. It was in accordance with studies on *Campylobacter* spp. that showed that electrolyzed water or chlorinated-water allowed reducing bacterial presence (Mead, Hudson *et al.* 1995, Park, Hung *et al.* 2002). Rural surface water may become a large reservoir of antibiotic residues and resistant bacteria (Zhang, Li *et al.* 2014), thus, in order to minimize transmission of enteropathogens, drinking water should be of potable quality to ensure freedom from enteric pathogens (Cox and Pavic 2010).

In pig farms, both “rodent control” and “two disinfections between two consecutive batches” were significantly reducing ESBL-E occurrence in Reunion. Both measures are related to biosecurity and hygiene helping to control disease and antibiotic resistance spread (Schmithausen, Kellner *et al.* 2015). In all IO territories, “recent antibiotic use”, “soak the floor” and “farmer visits” were associated with an increase of ESBL-E occurrence in pig production whereas “detergent use for cleaning” was associated with a decreased occurrence. ESBL-E occurrence could be more determined by the presence or absence of cephalosporin use at the farm as in Dutch pig production (Dohmen, Dorado-Garcia *et al.* 2017). “Others farmer visits” has never been identified as increasing ESBL-E occurrence and could be

more related to the frequency of visits as observed with the veterinarian in cattle farms in Israel (Adler, Sturlesi *et al.* 2015). Visitors could contribute to ESBL-E introduction and could carry/share material that favor transmission pathways. Detergent use for cleaning was associated with a decreased ESBL-E occurrence in IO pig production. Using effective detergent for cleaning was identified to decrease the risk of batch infection by Enterobacteriaceae such as *Salmonella* sp. (36). However, “soak floor” practice in IO pig farm production could be explained by wrong biosecurity practices; for instance, let water for a too short period could not allow complete cleaning. For instance, a period of one-hour soak time may could be insufficient to demonstrate a significant difference in organic matter removal in pig pens (37). Thus, cleaning and disinfection processes are a cornerstone in ESBL-E eradication which was obtained in pig farms under specific disinfection procedures (Schmithausen, Kellner *et al.* 2015).

In beef cattle production, “clearing space around the building” and “clean condition around the farm” reduced significantly ESBL-E occurrence in Madagascar. This explanatory variable could be related to a confounding factor; garbage presence in the farm probably attracting potential ESBL-E reservoirs such as dogs, cats or rodents. Accordingly, pet presence in the farm was identified as increasing ESBL-E occurrence in IO beef cattle farms. This finding was in accordance with Santman-Berends *et al.*, 2017 (Santman-Berends, Gonggrijp *et al.* 2017) which found cat presence as an explanatory factor of ESBL-E occurrence in organic herds in the Netherlands in 2011. It could be due to the fact that pets could be both given antibiotic drugs by owners and/or play a role of reservoir/vector of ESBL-E from the close environment. Furthermore, “recent antibiotic use” was associated with an increased ESBL-E occurrence in beef cattle farms. However, 3rd or 4th generation cephalosporin use in IO beef cattle farm was not studied while use was estimated to increase by nearly 4 times ESBL producing *E. coli* in dairy farms if used in the last 12 months (Snow, Warner *et al.* 2012).

Factors associated with a decrease of ESBL-E occurrence in IO beef cattle farms were “livestock size” and “disinfection”. IO big farms, herd size (>25 cattle), could apply stricter biosecurity measures. However, Adler *et al.* (2017) reported that an increased density was associated with more ESBL-E carriage in Israeli cattle farms (Adler, Sturlesi *et al.* 2015). As discussed before, cleaning and disinfection seems to be cornerstones in ESBL-E management and hygiene paucity was identified as a risk factors of ESBL-E occurrence on dairy farms (e.g. storage of slurry in a pit, infrequent cleaning of feeding equipment) (Snow, Warner *et al.* 2012).

In IO ESBL-E occurrence in 2016-2017 was high probably pointing out antibiotic drug overuses and/or misuses and particularly cephalosporins. The situation could be reversible if better practices were implemented regarding antibiotic use. For instance, in the Netherlands in 2010-2011, 20% of

prevalence was observed if no cephalosporin was used (3CG and 4CG) within the preceding year in pig farms and 79% if those antibiotics were used (Hammerum, Larsen *et al.* 2014).

*Bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene, mainly identified in humans both in hospital and community, was observed in IO livestock and particularly Madagascar. Further investigations, including complete genome sequencing, are needed to evaluate the hypothesis of ESBL-E transmission and diffusion between reservoirs in this territory. Finally, interesting factors related to biosecurity and hygiene measures in commercial farms were identified (e.g. controlled water, disinfection, rodent control) to control ESBL-E occurrence.

## 5. Conclusions

Finally, this study in IOC commercial farms pointed out high ESBL-E prevalences in livestock, except beef cattle in Reunion. It highlighted probable antibiotic overuse/misuse in farms contributing in ESBL-E selection. It confirmed the need to evaluate consumption and use of antibiotic drugs in IOC territories. Concrete protective and risk factors of ESBL-E occurrence (e.g. pet presence, detergent use for cleaning) were identified, even if further investigations are needed to reinforce these results. This study is the first to explore the situation of antibiotic drug resistance in farm animals and explore potential tools for management of ESBL-E in IO farms. As a whole, it confirms the need for improving in biosecurity and hygienic measures as efficient means to reduce antibiotic resistance in livestock. Finally, it provides interesting hypotheses to explore about ESBL-E transmission between food-producing animals and humans in Madagascar and developing countries.

**Acknowledgments:** French Regional Health Agency and the European Regional Development Fund “Traquer les Risques Sanitaires dans l’océan Indien avec une approche One Health” funded this research project. Florence Naze, Marie-Gladys Robert and Anais Etheve for support regarding laboratory experiments; Catherine Cêtre-Sossah and Johny Hoarau for sampling.

**Author Contributions:** E.C. and O.B. conceived and designed the experiments; M.L., M.J. collected samples in the field; A.L., G.M., A.E. S.R performed the laboratory experiments; N.G. analyzed the data and provided analysis tools; N.G. wrote the paper.” Authorship must be limited to those who have contributed substantially to the work reported.

**Conflicts of Interest:** “The authors declare no conflict of interest. ”

## References

- Gay N, Belmonte O, Collard JM, Halifa M, Issack MI, Mindjae S, *et al.* Review of Antibiotic Resistance in the Indian Ocean Commission: A Human and Animal Health Issue. *Front Public Health.* 2017;5:162.
- Blaak H, van Hoek AH, Hamidjaja RA, van der Plaats RQ, Kerkhof-de Heer L, de Roda Husman AM, *et al.* Distribution, Numbers, and Diversity of ESBL-Producing *E. coli* in the Poultry Farm Environment. *PLoS One.* 2015;10(8):e0135402.
- Mesa RJ, Blanc V, Blanch AR, Cortes P, Gonzalez JJ, Lavilla S, *et al.* Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J Antimicrob Chemother.* 2006;58(1):211-5.
- Ewers C, Bethe A, Semmler T, Guenther S, Wieler LH. Extended-spectrum beta-lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(7):646-55.
- Leverstein-van Hall MA, Dierikx CM, Cohen Stuart J, Voets GM, van den Munckhof MP, van Essen-Zandbergen A, *et al.* Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(6):873-80.
- van Duijkeren E, Wielders CCH, Dierikx CM, van Hoek A, Hengeveld P, Veenman C, *et al.* Long-term carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in the general population in the Netherlands. *Clin Infect Dis.* 2017.
- Grall N, Lazarevic V, Gaia N, Couffignal C, Laouenan C, Ilic-Habensus E, *et al.* Unexpected persistence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in the faecal microbiota of hospitalised patients treated with imipenem. *Int J Antimicrob Agents.* 2017;50(1):81-7.
- Dierikx CM, van Duijkeren E, Schoormans AH, van Essen-Zandbergen A, Veldman K, Kant A, *et al.* Occurrence and characteristics of extended-spectrum-beta-lactamase- and AmpC-producing clinical isolates derived from companion animals and horses. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(6):1368-74.
- Cortes P, Blanc V, Mora A, Dahbi G, Blanco JE, Blanco M, *et al.* Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(9):2799-805.
- Snow LC, Warner RG, Cheney T, Wearing H, Stokes M, Harris K, *et al.* Risk factors associated with extended spectrum beta-lactamase *Escherichia coli* (CTX-M) on dairy farms in North West England and North Wales. *Prev Vet Med.* 2012;106(3-4):225-34.

Hammerum AM, Larsen J, Andersen VD, Lester CH, Skovgaard Skytte TS, Hansen F, *et al.* Characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* obtained from Danish pigs, pig farmers and their families from farms with high or no consumption of third- or fourth-generation cephalosporins. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(10):2650-7.

Nguyen VT, Carrique-Mas JJ, Ngo TH, Ho HM, Ha TT, Campbell JI, *et al.* Prevalence and risk factors for carriage of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* on household and small-scale chicken farms in the Mekong Delta of Vietnam. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(7):2144-52.

INSEE. Évolution de la population totale au 1er janvier 2015. [Estimates of the total population as of 1 January 2015]. 2016.

DGAL. Mayotte: Synthèse illustrée du recensement agricole 2010. 2011.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Société Française de Microbiologie. 2015.

Naas T, Cuzon G, Robinson AL, Andrianirina Z, Imbert P, Ratsima E, *et al.* Neonatal infections with multidrug-resistant ESBL-producing *E. cloacae* and *K. pneumoniae* in Neonatal Units of two different Hospitals in Antananarivo, Madagascar. *BMC Infect Dis.* 2016;16:275.

Rakotonirina HC, Garin B, Randrianirina F, Richard V, Talarmin A, Arlet G. Molecular characterization of multidrug-resistant extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolated in Antananarivo, Madagascar. *BMC Microbiol.* 2013;13:85.

Dahms C, Hubner NO, Kossow A, Mellmann A, Dittmann K, Kramer A. Occurrence of ESBL-Producing *Escherichia coli* in Livestock and Farm Workers in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany. *PLoS One.* 2015;10(11):e0143326.

Hiroi M, Yamazaki F, Harada T, Takahashi N, Iida N, Noda Y, *et al.* Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in food-producing animals. *J Vet Med Sci.* 2012;74(2):189-95.

Brower CH, Mandal S, Hayer S, Sran M, Zehra A, Patel SJ, *et al.* The Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Multidrug-Resistant *Escherichia coli* in Poultry Chickens and Variation According to Farming Practices in Punjab, India. *Environ Health Perspect.* 2017;125(7):077015.

Schmid A, Hormansdorfer S, Messelhauser U, Kasbohrer A, Sauter-Louis C, Mansfeld R. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* on Bavarian dairy and beef cattle farms. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(9):3027-32.



Rakotoharinome M, Pognon D, Randriamparany T, Ming JC, Idoumbin JP, Cardinale E, *et al.* Prevalence of antimicrobial residues in pork meat in Madagascar. *Trop Anim Health Prod.* 2014;46(1):49-55.

Pereira RV, Siler JD, Ng JC, Davis MA, Grohn YT, Warnick LD. Effect of on-farm use of antimicrobial drugs on resistance in fecal *Escherichia coli* of preweaned dairy calves. *J Dairy Sci.* 2014;97(12):7644-54.

Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, Robinson TP, *et al.* Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(18):5649-54.

ANSES. Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2015. Anses rapport annuel. 2016.

Hunter JE, Shelley JC, Walton JR, Hart CA, Bennett M. Apramycin resistance plasmids in *Escherichia coli*: possible transfer to *Salmonella typhimurium* in calves. *Epidemiol Infect.* 1992;108(2):271-8.

Coque TM, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill.* 2008;13(47).

Alexander TW, Yanke LJ, Topp E, Olson ME, Read RR, Morck DW, *et al.* Effect of subtherapeutic administration of antibiotics on the prevalence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria in feedlot cattle. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(14):4405-16.

Rodriguez I, Thomas K, Van Essen A, Schink AK, Day M, Chattaway M, *et al.* Chromosomal location of blaCTX-M genes in clinical isolates of *Escherichia coli* from Germany, The Netherlands and the UK. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;43(6):553-7.

Dorado-Garcia A, Smid JH, van Pelt W, Bonten MJM, Fluit AC, van den Bunt G, *et al.* Molecular relatedness of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from humans, animals, food and the environment: a pooled analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2017.

Huijbers PM, Graat EA, Haenen AP, van Santen MG, van Essen-Zandbergen A, Mevius DJ, *et al.* Extended-spectrum and AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in broilers and people living and/or working on broiler farms: prevalence, risk factors and molecular characteristics. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(10):2669-75.

Dierikx C, van Essen-Zandbergen A, Veldman K, Smith H, Mevius D. Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. *Vet Microbiol.* 2010;145(3-4):273-8.

Park H, Hung YC, Brackett RE. Antimicrobial effect of electrolyzed water for inactivating *Campylobacter jejuni* during poultry washing. *Int J Food Microbiol.* 2002;72(1-2):77-83.

Mead GC, Hudson WR, Hinton MH. Effect of changes in processing to improve hygiene control on contamination of poultry carcasses with campylobacter. *Epidemiol Infect.* 1995;115(3):495-500.

Zhang X, Li Y, Liu B, Wang J, Feng C, Gao M, *et al.* Prevalence of veterinary antibiotics and antibiotic-resistant *Escherichia coli* in the surface water of a livestock production region in northern China. *PLoS One.* 2014;9(11):e111026.

Dohmen W, Dorado-Garcia A, Bonten MJ, Wagenaar JA, Mevius D, Heederik DJ. Risk factors for ESBL-producing *Escherichia coli* on pig farms: A longitudinal study in the context of reduced use of antimicrobials. *PLoS One.* 2017;12(3):e0174094.

Adler A, Sturlesi N, Fallach N, Zilberman-Barzilai D, Hussein O, Blum SE, *et al.* Prevalence, Risk Factors, and Transmission Dynamics of Extended-Spectrum-beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: a National Survey of Cattle Farms in Israel in 2013. *J Clin Microbiol.* 2015;53(11):3515-21.

Martelli F, Lambert M, Butt P, Cheney T, Tatone FA, Callaby R, Rabie A, Gosling RJ, Fordon S, Corcker G, Davies RH, Smith RP. Evaluation of an enhanced cleaning and disinfection protocol in salmonella contaminated pig holdings in the United Kingdom. *PLoS One.* 2017;12(6):e0178897.

Hancox LR, Le Bon M, Dodd CE, Mellits KH. Inclusion of detergent in a cleaning regime and effect on microbial load in livestock housing. *Vet Rec.* 2013;173(7):167.

Schmithausen RM, Kellner SR, Schulze-Geisthoevel SV, Hack S, Engelhart S, Bodenstern I, *et al.* Eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and of Enterobacteriaceae expressing extended-spectrum beta-lactamases on a model pig farm. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81(21):7633-43.

Santman-Berends IM, Gonggrijp MA, Hage JJ, Heuvelink AE, Velthuis A, Lam TJ, *et al.* Prevalence and risk factors for extended-spectrum beta-lactamase or AmpC-producing *Escherichia coli* in organic dairy herds in the Netherlands. *J Dairy Sci.* 2017;100(1):562-71.

## Résultats majeurs

L'étude réalisée entre 2016 et 2017 dans les territoires de Madagascar, de La Réunion et de Mayotte montrait une prévalence d'EBLSE inter-élevage élevée dans les filières intensives de bovins à viande (hors Réunion), de porcs naisseurs/engraisseurs et de volailles de chair.

Pour l'ensemble des territoires aucune filière d'élevage ne semblait plus impactée que les autres. Néanmoins, des disparités dans la prévalence inter-élevage d'EBLSE étaient observées entre les territoires. Ce taux de positivité était significativement plus élevé pour les élevages de bovins à viande (66,7 %) et de porcs (86,7 %) à Madagascar par rapport à ceux de La Réunion (3,7 % et 53,3 % respectivement). Il était significativement supérieur à Mayotte (68,4 %) qu'à La Réunion pour l'élevage intensif de bovins à viande.

Globalement, comme dans le compartiment homme ([chapitre 3](#)), la colonisation par les EBLSE des animaux d'élevage était significativement moindre à La Réunion par rapport aux autres territoires (hors filière volailles).

Tous territoires confondus, le contrôle de la qualité de l'eau a été identifié comme un facteur protecteur de la contamination par les EBLSE des élevages de volailles. Pour les élevages de porcs et de bovins à viande, les mesures de désinfection des bâtiments avec des détergents et la diminution de l'usage d'antibiotiques paraissaient centrales dans le contrôle des EBLSE.

Des gènes *bla*<sub>CTX-M-15</sub> identifiés chez l'homme à Madagascar (Naas, Cuzon *et al.* 2016) ont aussi été retrouvés dans l'ensemble des filières d'élevage de ce territoire. Bien que fondée sur un faible nombre d'échantillons, cette observation pourrait indiquer une transmission des EBLSE entre les compartiments homme et animal à Madagascar (cette hypothèse sera testée dans la partie 3 du manuscrit), comme cela a aussi été noté au Ghana (Falgenhauer, Imirzalioglu *et al.* 2018).

En résumé, le compartiment animal d'élevage semble être un réservoir majeur d'EBLSE. Cependant, il reste difficile d'estimer clairement le fardeau sanitaire des EBLSE dans ce compartiment car le protocole d'étude reposait sur l'estimation d'une prévalence inter-élevage d'EBLSE (pourcentage d'élevages positifs pour la présence d'EBLSE) et non d'une prévalence globale par filière d'élevage (pourcentage d'animaux colonisés par filière et territoire). Bien que la typologie de l'élevage (intensif versus traditionnel) n'était pas identifiée comme un déterminant de la prévalence de résistances aux antibiotiques chez les élevages de porcs en Europe (Mircovich C 2004), une prévalence supérieure en élevage intensif dans l'Océan Indien ne peut être exclue. En effet, l'élevage intensif pourrait être favorable aux transmissions d'EBLSE interindividuelles.

La contribution de l'élevage familial dans la problématique sanitaire des EBLSE devrait être estimée dans l'océan Indien, cela particulièrement à Madagascar où il occupe une place importante dans la vie économique du pays avec 80,0 % de la population malgache impliquée dans une activité agricole (<http://www.banquemondiale.org/fr/country/madagascar/overview>). Conséquemment, la contribution des animaux d'élevage à la problématique globale des EBLSE devait être évaluée à Madagascar.

**Trois points clés sur « compartiment animal de rente »**

- Une prévalence inter-élevage élevée toutes filières confondues (de 53,3 % à 86,7 %), hors filière bovin, Réunion
- Les élevages intensifs de bovins et de porcs étaient plus contaminés à Madagascar et à Mayotte qu'à La Réunion.
- Les gènes *bla<sub>CTX-M-15</sub>* identifiés majoritairement chez l'homme étaient présents dans toutes les filières d'élevage à Madagascar.

Une prévalence inter-élevage d'EBLSE élevée dans l'ensemble des filières intensives de porcs naisseurs/engraisseurs, de volailles de chair et de bovins à viande a été estimée dans les territoires étudiés (hors bovins à La Réunion) dans le [chapitre 4](#). Une contamination environnementale par les EBLSE à proximité de ces élevages ne peut être exclue. Les zones géographiques contaminées par les EBLSE à La Réunion ont été caractérisées à l'aide de rats servant de bio-indicateurs dans le [chapitre 5](#).



## Chapitre 5. L'environnement : les rats comme marqueurs de la contamination environnementale par les EBLSE

Le Chapitre 4 a permis d'estimer une prévalence d'EBLSE inter-élevage élevée dans les filières intensives de porcs naisseurs/engraisseurs, bovins à viande et de volailles de chair de La Réunion (hors bovins), Mayotte et Madagascar.

Les Entérobactéries, telles que *E. coli*, sont capables de survivre plus de 100 jours dans l'environnement à proximité des élevages et l'accumulation de la bactérie peut conduire à des événements secondaires de transmission (van Bunnik, Ssematimba *et al.* 2014). L'environnement à proximité des hôpitaux a aussi été identifié comme une source d'EBLSE (Diwan, Chandran *et al.* 2012).

Les rats possèdent un mode de vie synanthrope en tirant profit de la proximité à l'homme qui leur offre abris et nourriture. Ces mammifères ont été proposés comme indicateurs de la contamination environnementale par les EBLSE dans une étude berlinoise (Guenther, Wuttke *et al.* 2013).

Des rats (*Rattus rattus* et *Rattus norvegicus*) ont été capturés en 2013-2014 selon un gradient altitudinal à La Réunion couvrant des zones urbaines, rurales et montagneuses. A Mayotte, sur la même période, ils provenaient de zones « peu perturbées » ne couvrant que peu d'écotypes (échantillon de convenance). La prévalence de colonisation des EBLSE et ERC3G a été estimée pour ces deux territoires.

L'objectif principal était d'identifier des zones éventuelles de contamination par les EBLSE et ERC3G à La Réunion.

Les questions adressées secondairement étaient :

- Quelle est la prévalence d'Entérobactéries résistantes aux C3G et des EBLSE chez les rats à La Réunion (*Rattus rattus* et *Rattus norvegicus*) et à Mayotte (*Rattus rattus*) en 2013-2014 ?

- Quels sont les déterminants de la colonisation par les EBLSE des rats de La Réunion et Mayotte ?

i) d'une part au travers de l'étude de facteurs intrinsèques (masse, sexe) chez les rats de Mayotte et La Réunion.

ii) d’autre part au travers de l’étude de facteurs extrinsèques liés à l’environnement (occupation du sol) dans lequel le rat évolue (plus spécifiquement à La Réunion).

Ce projet a reçu l’autorisation d’utiliser des animaux à des fins scientifiques, il est référé sous l’identifiant APAFIS#10948-2017080114229218 v1 ([Annexe 4](#))

Les résultats de ce travail ont été soumis à la Revue d’élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux en 2018.

---

**Article 4.** Cohard A, Leclaire A, Belmonte O, Benkimoun S, Etheves MA, Le Minter G, Lagadec E, Mavingui P, Tortosa P, Cardinale E, **Gay N.** Prévalence des Entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération chez *Rattus* sp. à La Réunion et Mayotte, 2013-2014. Journal of Tropical Livestock Science (accepté avec des révisions mineures le 13/05/2019)

---

## Article 4. Prévalence des Entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération chez *Rattus* sp. à La Réunion et Mayotte, 2013-2014

Audrey COHARD<sup>1</sup>, Alexandre LECLAIRE<sup>2</sup>, Olivier BELMONTE<sup>2</sup>, Samuel BENKIMOUN<sup>1</sup>, Marie-Anaïs ETHEVES<sup>1</sup>, Gildas LE MINTER<sup>3</sup>, Erwan LAGADEC<sup>3</sup>, Patrick MAVINGUI<sup>3</sup>, Pablo TORTOSA<sup>3</sup>, Éric CARDINALE<sup>1</sup>, Noellie GAY<sup>1\*</sup>

1. CIRAD, UMR 117, Animal, Santé, Territoires, Risques et Ecosystèmes, Montpellier, France.
2. Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Felix-Guyon, Saint-Denis, La Réunion, France.
3. UMR Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical, CNRS 9192, INSERM U1187, IRD 249, Université de La Réunion, Saint-Denis, La Réunion, France.

\* Téléphone : 07.68.70.00.14 /email : [noellie.gay@cirad.fr](mailto:noellie.gay@cirad.fr)

### MOTS-CLES

*Rattus* sp., résistance aux antibiotiques, Entérobactéries, épidémiologie, Réunion, Mayotte

### RESUME

Les Entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération (ERC3G) constituent un fardeau sanitaire majeur pour les hommes et les animaux dans l'océan Indien. Les rats, au mode de vie synanthrope, en sont des réservoirs avérés. Nous avons utilisé les rats comme des bio-indicateurs environnementaux de l'occurrence d'ERC3G. L'objectif principal de cette étude exploratoire était de générer des hypothèses concernant la contamination environnementale par les ERC3G dans les deux territoires français de l'océan Indien. Cet objectif a été adressé par i) l'estimation de la prévalence des ERC3G et des Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (EBLSE) chez les rats des deux territoires en 2013-2014 et ii) l'identification des déterminants de ce portage chez les rats (traits d'histoire de vie et occupation du sol). En 2013-2014, des rats ont été échantillonnés selon un gradient altitudinal à La Réunion et à Mayotte sur plusieurs sites peu anthropisés.

Sur un échantillon de convenance de 198 et 138 rats à La Réunion et à Mayotte, respectivement, la prévalence des ERC3G s'élevait à 5,1% et 8,7% et celle des EBLSE à 0,5% et 0,8%. La masse, la longueur de la queue et la proportion de terrains agricole dans le domaine vital du rat étaient des déterminants du portage d'ERC3G à La Réunion. A Mayotte, les déterminants de ce portage étaient une masse faible et le site de capture du rat avec un cluster de cas positifs dans une localité spécifique. Finalement, les résultats obtenus semblent indiquer une faible contamination de l'environnement par les ERC3G à La



Réunion et Mayotte en 2013-2014. A La Réunion L’hypothèse d’une contamination environnement par l’épandage de lisier a été soulevée nécessitant des investigations complémentaires.

## **SUMMARY**

Enterobacteriaceae resistant to third generation cephalosporin (ER3GC) are a main public health and veterinary issue in Indian Ocean. Rats are synanthropic reservoirs of these multiresistant bacteria. They were used as environmental bioindicators of ER3GC in this exploratory survey. Our main objective was generating hypothesis about ER3GC environmental contamination in French Indian ocean territories. The objective was addressed with i) the estimation of the ER3GC and extended spectrum Beta-lactamase producing Enterobacteriaceae (ESBL-E) prevalence in Reunion and Mayotte rats in 2013-2014 and ii) the identification of the determinants of ER3GC carriage in rats in both territories (life history trait and land use).

In 2013-2014, rats were sampled in Reunion according to an altitudinal gradient and Mayotte in different sites (both are french oversea territories).

Convenience sample of 198 and 138 rats from Reunion and Mayotte, respectively, allowed estimating a prevalence of 5.1% and 8.7% of ER3GC, and 0.5% and 0.8% of ESBL-E (Reunion and Mayotte respectively). In Reunion, rat mass, tail length and proportion of agricultural land in the rat’s home range were significantly correlated with ER3GC carriage. In Mayotte, small mass and catch site (geographical cluster of positive cases) were explanatory factors of ER3GC carriage in rats. Thus, ER3GC prevalence in rats was moderate and could point limited ER3GC environmental contamination in both territories. Interesting hypothesis about ER3GC contamination in Reunion due to manuring the cultures arose and should be investigated further.

## **1. INTRODUCTION**

Depuis les années 90, les professionnels de santé doivent faire face à l’émergence d’Entérobactéries multi-résistantes aux antibiotiques, d’abord en milieu hospitalier puis progressivement en milieu communautaire (i.e. médecine de ville). Ces bactéries multi-résistantes aux antibiotiques (BMR) sont caractérisées par leur résistance à au moins trois familles d’antibiotiques (Magiorakos, Srinivasan et al. 2012). Parmi elles, les Entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération (ERC3G) qui possèdent plusieurs mécanismes de résistance dont les plus communs sont la production de bêta-lactamases à spectre étendu (EBLSE) (i.e. gènes de résistance aux antibiotiques à localisation plasmidique) et la présence du gène AmpC (i.e. gène de résistance aux antibiotiques à localisation chromosomique).

Les infections aux ERC3G constituent un enjeu sanitaire mondial en raison de la difficulté à trouver des thérapies antibiotiques efficaces. La propagation des ERC3G entraîne l’augmentation de la consommation d’antibiotiques de dernière ligne thérapeutique, notamment les carbapénèmes, et la multiplication d’échecs thérapeutiques (Zahar, Bille et al. 2009). En outre, les Entérobactéries sont des bactéries commensales du tube digestif qui peuvent devenir pathogènes pour leur hôte par opportunisme. Le portage digestif d’ERC3G par les hommes et les animaux participe à leur succès de propagation. En effet, les fèces libérées dans l’environnement permettent de contaminer de nouveaux hôtes (e.g. contamination de l’eau, de la nourriture ou juste de l’environnement direct) (Hawkey 2008).

Dans le Sud-Ouest de l’océan Indien, le fardeau sanitaire des ERC3G, dont les EBLSE, est généralisé à tous les territoires pour l’homme et l’animal (Gay, Belmonte et al. 2017).

En 2016, la surveillance des BMR en milieu hospitalier a permis d’identifier La Réunion comme étant la 4<sup>ème</sup> région française en termes d’incidence en EBLSE ; aucune estimation hospitalière n’est disponible en 2019 à Mayotte. De nombreuses inconnues persistent dans ces deux départements français de l’océan Indien, d’une part sur la prévalence des BMR des hommes en communauté (ville) et d’autre part sur leur distribution dans l’environnement (appréhendant indirectement l’exposition des populations animales et humaines).

Les rats ont été identifiés comme étant des réservoirs d’Entérobactéries multi-résistantes aux antibiotiques (Guenther et al., 2012). Les rats sont des omnivores opportunistes pouvant utiliser toutes les ressources alimentaires disponibles (Soubeyran et al., 2011). Ils sont présents dans tout type d’habitat que ce soit en milieu urbain, agricole ou peu perturbé (Himsworth et al., 2014). Ces mammifères ont été utilisés comme indicateurs de la contamination environnementale par les ERC3G

en milieu urbain en Allemagne (Guenther, Wuttke et al. 2013), au Canada (Himsworth, Zabek et al. 2015), en Guinée (Schaufler, Nowak et al. 2018) mais aussi en milieu agricole (Literal et al. 2009).

En nous basant sur les résultats de ces études, les rats ont été utilisés comme des indicateurs des niveaux de résistance aux antibiotiques dans l'environnement dans les territoires français de l'océan Indien.

L'objectif principal de cette étude exploratoire était de générer des hypothèses concernant la contamination environnementale par les ERC3G dans les deux territoires français de l'océan Indien.

Les objectifs secondaires étaient :

(i) d'estimer la prévalence globale d'Entérobactéries résistantes aux C3G et d'EBLSE chez les rats à l'échelle des territoires de La Réunion et à Mayotte en 2013-2014 ;

(ii) d'identifier les déterminants (traits d'histoire de vie et occupation du sol) du portage d'Entérobactéries résistantes aux C3G par les rats à La Réunion et à Mayotte.

## 2. MATERIEL ET METHODES

### 2.1. Plan d'échantillonnage

Dans le cadre du projet LeptOI, des rats ont été capturés entre Février 2011 et Février 2014 selon un gradient altitudinal à La Réunion et dans des zones peu perturbées à Mayotte. Au total, 858 rats (i.e. *R. rattus* et *R. norvegicus*) ont été capturés à La Réunion (Guernier, Lagadec et al. 2016) et 289 rats (i.e. *R. rattus*) à Mayotte (Lagadec, Gomard et al. 2016). Seuls les intestins de 138 rats provenant des zones peu perturbées de Mayotte étaient disponibles en bio-banque.

Pour les deux territoires, une taille d'échantillon de 196 rats a été calculée à partir d'une prévalence attendue de 15,0% comme estimée chez les rats urbains de Berlin (Guenther, Wuttke et al. 2013), avec un risque d'erreur de 5,0% et une précision absolue de 5,0%.

Les animaux échantillonnés dans le cadre de cette étude ont été euthanasiés en accord avec les directives européennes concernant la protection animale (Directive 2010/63/EU). Le Comité d'Ethique du CYROI n° 11 a approuvé le protocole, de même que le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche sous l'accréditation 03387 (LeptOI) et 03584 (BatMan).

## **2.2. Analyses de laboratoire**

Après dissection, différents organes des rats étaient prélevés et conservés en bio-banque à -80°C. Les intestins de rats ont été broyés puis placés à 37°C (+/- 1°C) pendant 18h (+/- 2h) dans 50 mL d'eau peptonée (Jazmati, Hein et al. 2016). L'ensemencement était ensuite réalisé sur une gélose ChromID ESBL (Gélose chromID ESBL, bioMérieux SA) puis les boîtes incubées à 37°C (+/- 1°C) pendant 24h (+/- 3h). Un test Oxydase était réalisé sur les colonies présentes, puis les colonies Oxydases négatives ont été identifiées au niveau spécifique par spectrométrie de masse (MALDI-TOF, Bruker).

Un ou deux antibiogrammes ont été réalisés sur chaque espèce d'Entérobactérie identifiée selon les recommandations de l'EUCAST (EUCAST 2015) afin de distinguer l'hyperproduction de céphalosporinases d'une production de BLSE.

## **2.3. Analyses spatiales et statistiques**

Afin de caractériser l'environnement dans un rayon de 200m autour du point de capture de l'animal, des cartes d'occupation du sol SPOT5 ont été utilisées (Antenne SEAS-OI, 2014) (Exemple pour La Réunion en annexe). Ce périmètre correspond au domaine vital du rat (Rahelinirina, Duplantier et al. 2010). Les zones tampon de 200m ont été réalisées à l'aide du logiciel Qgis Version 2.18.13.

Des régressions logistiques binaires (fonction de lien Logit) ont été réalisées entre la variable réponse « présence/absence de bactéries résistantes aux céphalosporines » et les variables explicatives pour identifier les déterminants du portage. Ces analyses univariées ont été réalisées pour chaque territoire sur les données de trait d'histoire de vie des rats collectées sur les individus échantillonnés et d'occupation du sol extrait des cartes Raster SPOT5 (Antenne SEAS-OI, 2014). Il s'agissait de caractéristiques biologiques telles que le sexe, l'espèce, la maturité de l'animal, la longueur de la queue (i.e. proxy de l'âge de l'animal et identification de l'espèce), du corps, la masse de l'animal, et de caractéristiques liées aux types d'occupation du sol (Annexe). Dans un second temps, ces régressions logistiques binaires ont été réalisées sur l'ensemble des données des deux territoires en excluant les données d'occupation du sol, trop disparates entre les deux territoires. Le logiciel R version 3.4.2 a été utilisé pour réaliser ces analyses.

## **3. RESULTATS/ DISCUSSION**

### **3.1. Caractéristiques des Entérobactéries résistantes aux C3G et des EBLSE isolées chez les rats de Mayotte et de La Réunion, 2013-2014**

Parmi les rats porteurs d'ERC3G de La Réunion et de Mayotte en 2013-2014, cinq espèces bactériennes étaient identifiées (Tableau 1). Pour les deux territoires confondus, la majorité (52,2%) des Entérobactéries identifiées appartenait à l'espèce *Citrobacter freundii* et 30,4% à l'espèce *Enterobacter cloacae*. *Escherichia coli* a été identifiée chez un rat de Mayotte.

Parmi les ERC3G, on observait majoritairement des profils de résistance acquise à la ticarcilline (TIC) mais une sensibilité conservée aux aminosides (i.e. gentamicine (GM), amikacine (AN)) et à l'acide nalidixique (AN). Les profils de résistances des deux Entérobactéries identifiées comme productrices de BLSE ne différaient pas des autres Entérobactéries hyper-productrices de céphalosporinases.

Bien que les effectifs d'ERC3G étaient réduits, les profils de résistance montraient des différences entre les deux territoires. Plus de 40,0% des souches de *C. freundii* et *E. cloacae* isolées chez les rats de Mayotte présentaient des phénotypes résistants ou intermédiaires à l'ertapénème (ERM), un antibiotique de dernière ligne thérapeutique. En outre, la résistance à la tétracycline (TE) était observée uniquement à Mayotte (i.e. *E. coli* et *E. cloacae*). Des phénotypes d'*E. coli* résistants à la TE avaient aussi été rapportés chez des rats au Sénégal en 2007 (Literak et al., 2009) et au Vietnam en 2012 (Nhung et al., 2015). En conséquence, les pressions de sélection antibiotiques sur les Entérobactéries de Mayotte pourraient être supérieures celles exercées à La Réunion. L'identification de résistance aux carbapénèmes chez les rats à Mayotte soulève l'hypothèse d'une diffusion de bactéries résistantes à ces traitements de dernière ligne thérapeutique hors du milieu hospitalier. Les mécanismes de résistance observée à l'ERM, notamment chez *C. freundii*, devraient être investigués pour éventuellement confirmer l'acquisition d'un plasmide conférant une production de carbapénémases.

**Table 1. Espèces d’Entérobactéries résistantes aux C3G identifiées chez les rats de Mayotte et de La Réunion et résistances des Entérobactéries identifiées aux antibiotiques testés, 2013-2014**

Territoire	Espèces identifiées	N	CFM	CTX	CAZ	FEP	TIC	ERM	AMC	TE	CFR	SXT	OFX
Réunion	<i>Citrobacter freundii</i> <sup>a</sup> *	5 <sup>a</sup>	4R/1S	4R/1S	4R/1S	5S	5R	5S	5R	5S	5R	5S	4S/1R
	<i>Enterobacter cloacae</i> *	5	4R/1S	5R	4R/1I	4S/1I	5R	5S	5R	5S	5R	5S	5S
	<i>Hafnia alvei</i>	1	1R	1R	1R	1S	1S	1S	1R	1S	1R	1S	1S
Mayotte	<i>Citrobacter freundii</i>	7	7R	7R	7R	6S/1R	7R	6S/1R	7R	6S/1R	6R/1S	7S	6S/1R
	<i>Enterobacter cloacae</i>	3	3R	3R	3R	1S/2I	3R	1S/2I	3R	3S	3R	3S	3S
	<i>Escherichia coli</i>	1 <sup>a</sup>	1R	1R	1R	1S	1R	1S	1S	1R	1R	1R	1S
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	1R	1R	1R	1S	1R	1S	1R	1S	1R	1S	1S
<b>Total</b>		<b>23</b>	<b>21R/2S22R</b>	<b>1S21R/1I</b>	<b>1S19S/3I</b>	<b>1R22R/1S20S/2I</b>	<b>1R22R/1S21S</b>	<b>2R22R/1S22S/1R21S/2R</b>					

un rat était porteur de deux espèces différentes d’Entérobactéries résistantes aux C3G

<sup>a</sup> une EBLSE identifiée

AM : Amoxicilline ; CFM : Céfixime ; CTX : Céfoxime ; CAZ : Ceftazidime ; FEP : Céfépime ; TIC : Ticarcilline ; ERM : Ertapénème ; AMC : Amoxicilline + Acide clavulanique ; TE : Tétracycline ; CFR : Céfadroxil ; SXT : Bactrim ; OFX : Ofloxacine ; GM : Gentamicine ; AN : Amikacine ; NA : Acide nalidixique  
 R : Résistant ; I : Intermédiaire ; S : Sensible  
 Toutes les espèces d’Entérobactéries testées étaient résistantes à l’amoxicilline (AM) et sensibles aux antibiotiques gentamicine (GM), amikacine (AN) et acide nalidixique (AN).

### 3.2. Prévalence des ERC3G et des EBLSE à La Réunion et Mayotte, 2013-2014

Une prévalence de 5,1% [2,0%-8,1%] d'ERC3G a été estimée chez les rats de La Réunion, contre 8,7% [4,0%-13,4%] à Mayotte. La prévalence d'ERC3G observée à Mayotte n'était pas supérieure à celle observée à La Réunion (p-value = 0,3).

A La Réunion en 2013-2014, un rat était porteur d'une EBLSE, soit une prévalence de 0,5% [0,0%-1,5%]. A Mayotte en 2014, un rat était porteur d'une EBLSE, soit une prévalence de 0,8% [0,0%-2,1%]. Aucune différence de la prévalence d'EBLSE n'était observée entre les deux territoires (p-value = 1,0).

Les prévalences d'ERC3G et d'EBLSE obtenues dans les deux territoires étudiés étaient inférieures à la prévalence de 16,0% obtenue à Berlin en 2010 (Guenther, Wuttke et al. 2013). Par conséquent, la prévalence attendue, utilisée à priori dans le calcul de la taille d'échantillon de cette étude était surestimée. Cette inexactitude réduit la précision de la prévalence obtenue à La Réunion. Malgré cette limite, la comparaison de la prévalence d'ERC3G estimée avec les données de la littérature reste pertinente et suggère une contamination environnementale limitée à La Réunion en comparaison avec d'autres territoires. A Berlin en 2010, sur 56 *R. norvegicus* capturés, une prévalence de 16,0% d'*E. coli* productrices de bêta-lactamase à spectre étendu était observée (Guenther et al., 2013). A Hong-Kong, de 2008 à 2013, une prévalence d'EBLSE de 13,4% chez *R. rattus* et *R. norvegicus* était estimée (N= 491) (Ho et al., 2015).

Au Sénégal en 2007, la prévalence d'ERC3G de 2,2% chez *R. rattus*, (N=45) (Literak et al., 2009) était comparable avec ceux de La Réunion (p-value = 0,7). Les captures réalisées dans le cadre de cette étude provenaient de zones non habitées.

Finalement, la sous-représentation des rats provenant de milieux urbains dans les échantillons de La Réunion et Mayotte par rapport aux études réalisées à Hong-Kong et à Berlin pourrait expliquer une part des différences de prévalence d'ERC3G estimées entre ces territoires.

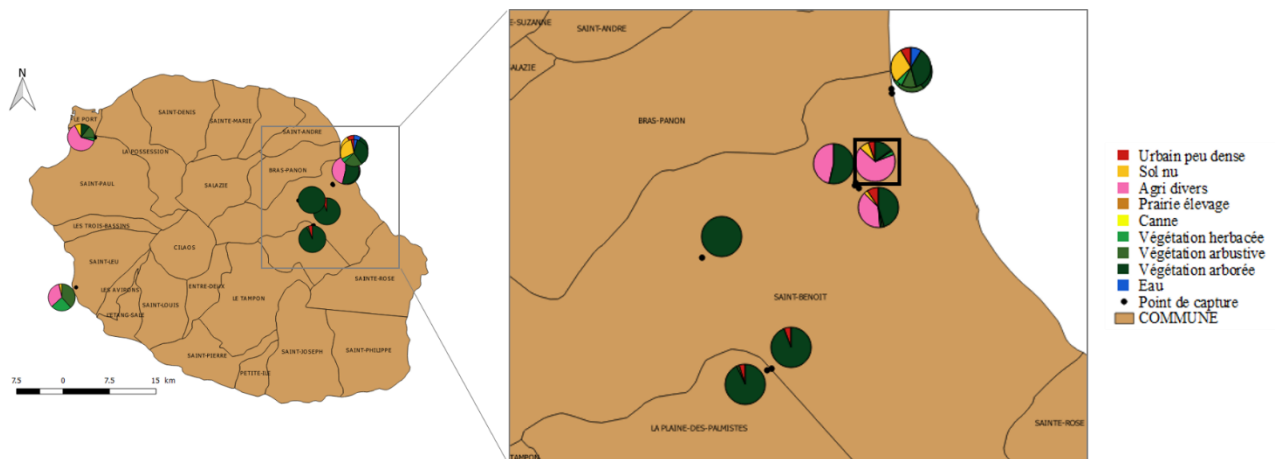
En effet, le portage des ERC3G par les rats en milieux urbains pourrait être influencé par la présence et l'activité de l'homme, et notamment la présence de déchets contaminés constituant une source de nourriture pour ces mammifères (Himsworth et al., 2014). En France, des bactéries résistantes aux antibiotiques de dernière génération tels que les céphalosporines de dernières générations et les carbapénèmes ont été détectées dans les eaux à proximité d'hôpitaux ou en zone péri-urbaine (Almakki, 2017).

L'urbanisation de Mayotte en 2014 et de La Réunion en 2013-2014 reste limitée à l'échelle du territoire et pourrait expliquer les niveaux de prévalence faibles observés. Ainsi, l'habitat du rat semble jouer un

rôle central dans le portage de BMR comme l’avait proposé d’autres auteurs (Guenther, Wuttke et al. 2013) qu’il est nécessaire de considérer.

### 3.3. Occupation du sol et déterminants du portage

L’usage de cartes d’occupation du sol a permis d’identifier le milieu agricole comme un déterminant du portage d’ERC3G des rats à La Réunion (Figure 1 ; Tableau 2). Ce portage était associé à l’augmentation de la proportion de terrains agricoles dans un rayon de 200m autour du point de capture de l’animal. Cette observation pourrait indiquer une contamination du rat par l’épandage de lisier de porc dans les champs à La Réunion. En effet, l’élevage de porc peut être un réservoir important de BMR avec 53,3% d’élevages porcins positifs à la présence d’EBLSE à La Réunion en 2016 (Gay, Leclair et al. 2018). En ce sens, le portage d’ERC3G était significativement supérieure pour les petits mammifères capturés à proximité d’élevages porcins au Canada (Kozak, Boerlin et al. 2009). Dans le même sens la prévalence d’*E. coli* résistantes aux antibiotiques était significativement plus élevée chez les rats capturés à proximité des élevages au Vietnam (Nhung, Cuong et al. 2015). L’hypothèse d’une contamination environnementale par l’épandage de lisier devrait-être testée à La Réunion.

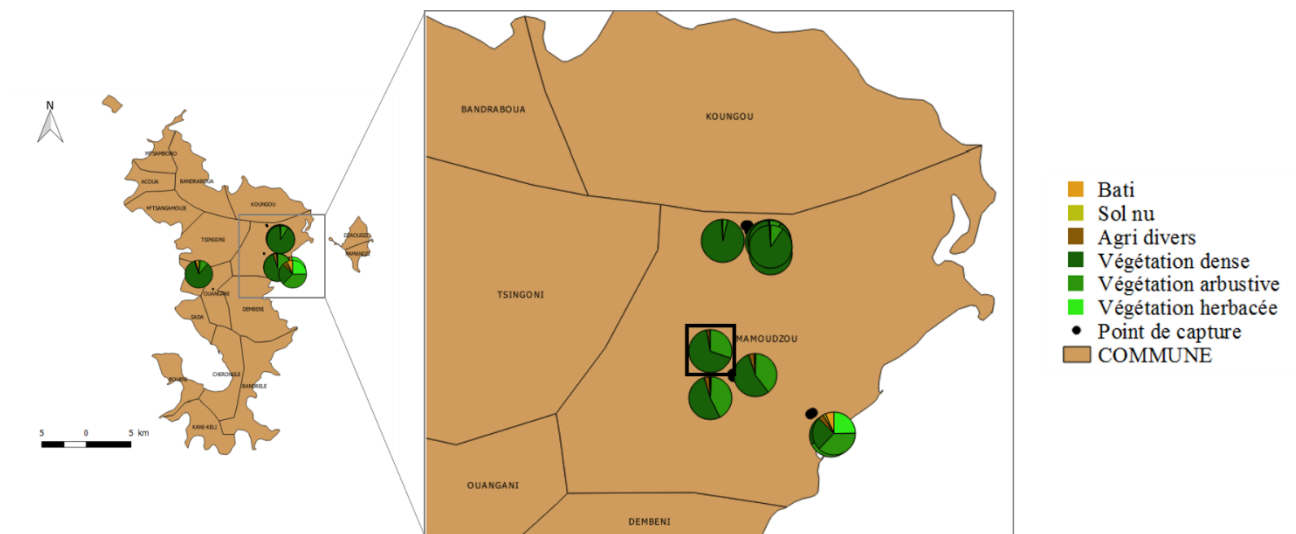


Le diagramme encadré correspond au rat porteur d’une EBLSE.

**Figure 1. Distribution spatiale et caractérisation du milieu de vie autour du point de capture des rats porteurs d'ERC3G à La Réunion en 2013-2014**



A Mayotte aucun déterminant du portage d'ERC3G lié à l'occupation du sol n'a été identifié (Figure 2 ; Tableau 2).



Le diagramme encadré correspond au rat porteur d'une EBLSE.

**Figure 2. Répartition spatiale et caractérisation du milieu de vie autour du point de capture des rats porteurs d'ERC3G à Mayotte en 2014**

Les rats capturés à Mayotte provenaient principalement de milieux peu perturbés, l'ensemble des types d'habitat dans ce territoire n'a pas été échantillonné. En effet, seuls cinq sites de capture ont été utilisés avec l'absence de représentation des milieux urbains et agricoles. Un effet site significatif était observé sur le portage d'ERC3G dans la « forêt de convalescence ». Par conséquent, une (des) caractéristique(s) du site de la « Forêt de convalescence », non identifiable(s) par la cartographie de l'occupation du sol, pourrait influencer le portage d'ERC3G par les rats. Une étude complémentaire devrait être réalisée afin de confirmer une exposition réelle au ERC3G dans la zone et identifier une potentielle source de contamination.

Un plan d'échantillonnage assurant une meilleure représentation des différents types d'occupation du sol devrait être envisagée à Mayotte pour affiner l'étude des zones d'exposition au ERC3G.

**Tableau 2. Déterminants du portage d’ERC3G chez *Rattus sp.* à La Réunion et à Mayotte, 2013-2014**

Territoire	Variable	Moyenne	Moyenne	p-value
		rats positifs	rats négatifs	
<b>Réunion</b>	Longueur du corps	196,1 cm	185,5 cm	0,06
	<b>Longueur de la queue</b>	<b>386,9 cm</b>	<b>207,9 cm</b>	<b>0,04</b>
	<b>Masse</b>	<b>155,2%</b>	<b>132,2%</b>	<b>0,05</b>
	<b>Proportion de terrains agricoles (rayon 200m)</b>	<b>25,4%</b>	<b>10,5%</b>	<b>0,05</b>
<b>Mayotte</b>	<b>Site de capture “Forêt de convalescence”</b>	--	--	<b>0,05</b>
	<b>Masse</b>	<b>126,8</b>	<b>148,4</b>	<b>0,02</b>
Tout territoire	Longueur de la queue	295,2	214,4	0,06

Des tendances particulières relatives aux traits d’histoires de vie des rats propres à chaque territoire ont été observées. A La Réunion, les rats présentant des masses élevées et une queue plus allongée étaient plus porteurs d’ERC3G. La masse des rats est connue pour être un bon estimateur de l’âge et de la maturité sexuelle des individus (Morris, 1972). Cette observation est en accord avec une plus grande capacité de dispersion des individus matures qui leur confère une probabilité de rencontre accrue avec l’agent pathogène, cela a été observé pour le portage de leptospirose chez les rats plus âgés (Himsworth et al., 2013).

A l’inverse, à Mayotte, les animaux de faible masse présentaient un portage supérieur. Il est connu chez les rats que les réponses morphologiques peuvent varier en fonction d’un ensemble de déterminants intrinsèques (e.g. régime alimentaire, prédation, compétitions, génétique) (Russell, Ringler et al. 2011) ou extrinsèques (latitude, température, précipitations) (Yom-Tov and Geffen 2006). Ces différences entre les deux territoires pourraient donc être expliquées par d’autres paramètres non mesurés par notre plan d’étude (coupe transversale), leur étude nécessiterait un suivi longitudinal des animaux. Aucune différence morphologique entre rats de sites différents n’était observée à Mayotte.

Cette étude est la première tentative pour évaluer la distribution des BMR dans l’environnement à l’échelle des territoires de Mayotte et de la Réunion. L’utilisation des rats comme indicateurs biologiques de la contamination environnementale par les ERC3G a permis de soulever l’hypothèse d’une source de contamination par l’épandage de lisier de porc à La Réunion. Cette hypothèse devrait être confirmée par des études environnementales. En effet, identifier puis contrôler les sources d’exposition aux BMR des populations animales et humaines est un pilier des actions de lutte contre le fléau sanitaire de l’antibiorésistance.

## REMERCIEMENTS

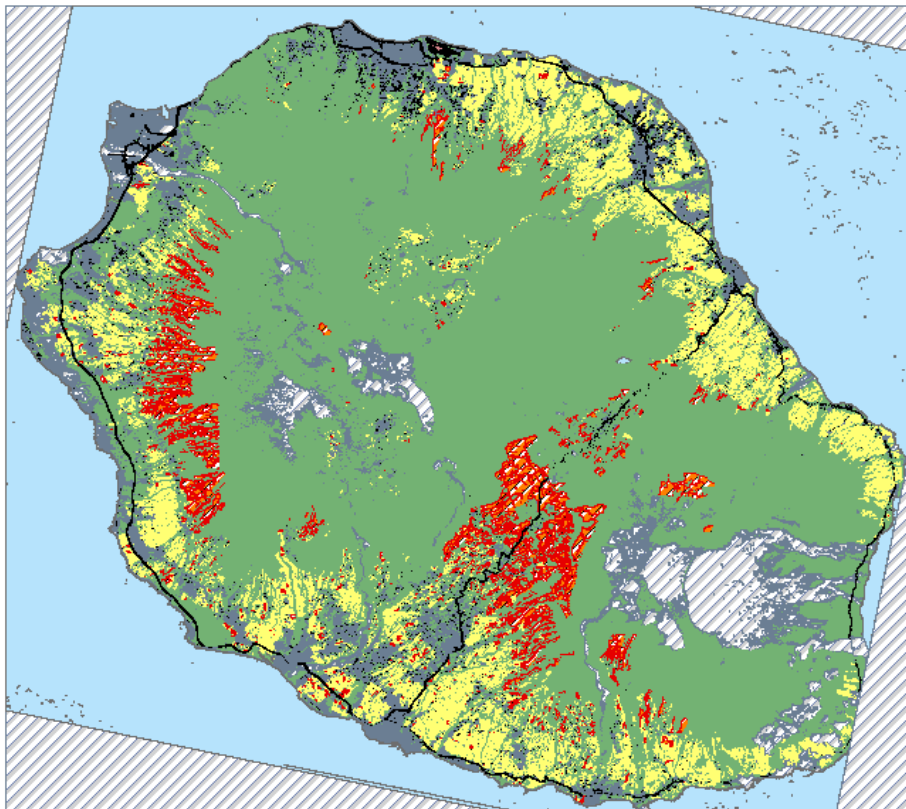
Ce travail a été financé par l'Agence Régionale de Santé et le Fond Européen pour le Développement "Traquer les Risques Sanitaires dans l'Océan Indien avec une approche One Health". Les échantillons proviennent du programme de recherche LeptOI, financé par le Fond Européen de Développement Régional (FEDER POCT #32913)

## REFERENCES

- Almakki A.Q.M., 2017. Résistance aux antibiotiques dans des eaux urbaines péri-hospitalières considérées dans un continuum hydrologique. Thèse Doct., Université Montpellier, Montpellier, France, 239 p.
- ANSM, 2016. Liste des antibiotiques critiques : Actualisation 2015. Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé, Saint-Denis, France, 14 p.
- Antenne SEAS-OI, 2014. Spot5. SEAS-OI, IRD, ESPACE-DEV, Université de La Réunion, [www.seas-oi.org/web/guest/ressources](http://www.seas-oi.org/web/guest/ressources) (consulté le 20/01/2018)
- Debaere O., 2016. Ecoantibio : premier plan de réduction des risques d'antibiorésistance en médecine vétérinaire (2012-2016). *Bull. Acad. Vét. France*, **169** (3): 186-189, doi: 10.4267/2042/61876EUCAST. 2015. 'Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie', *Société Française de Microbiologie*.
- Gay, N., O. Belmonte, J. M. Collard, M. Halifa, M. I. Issack, S. Mindjae, P. Palmyre, A. A. Ibrahim, H. Rasamoelina, L. Flachet, L. Filleul, and E. Cardinale. 2017. 'Review of Antibiotic Resistance in the Indian Ocean Commission: A Human and Animal Health Issue', *Front Public Health*, 5: 162.
- Gay, N., A. Leclaire, M. Laval, G. Miltgen, M. Jego, R. Stephane, J. Jaubert, O. Belmonte, and E. Cardinale. 2018. 'Risk Factors of Extended-Spectrum beta-Lactamase Producing Enterobacteriaceae Occurrence in Farms in Reunion, Madagascar and Mayotte Islands, 2016-2017', *Vet Sci*, 5.
- Guenther, S., J. Wuttke, A. Bethe, J. Vojtech, K. Schaufler, T. Semmler, R. G. Ulrich, L. H. Wieler, and C. Ewers. 2013. 'Is fecal carriage of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in urban rats a risk for public health?', *Antimicrob Agents Chemother*, 57: 2424-5.
- Guernier, V., E. Lagadec, C. Cordonin, G. Le Minter, Y. Gomard, F. Pages, M. C. Jaffar-Bandjee, A. Michault, P. Tortosa, and K. Dellagi. 2016. 'Human Leptospirosis on Reunion Island, Indian Ocean: Are Rodents the (Only) Ones to Blame?', *PLoS Negl Trop Dis*, 10: e0004733.
- Hawkey, P. M. 2008. 'Prevalence and clonality of extended-spectrum beta-lactamases in Asia', *Clin Microbiol Infect*, 14 Suppl 1: 159-65.
- Himsworth, C. G., E. Zabek, A. Desruisseau, E. J. Parmley, R. Reid-Smith, C. M. Jardine, P. Tang, and D. M. Patrick. 2015. 'Prevalence and Characteristics of *Escherichia Coli* and *Salmonella* Spp. In the Feces of Wild Urban Norway and Black Rats (*Rattus Norvegicus* and *Rattus Rattus*) from an Inner-City Neighborhood of Vancouver, Canada', *J Wildl Dis*, 51: 589-600.
- Jazmati, N., R. Hein, and A. Hamprecht. 2016. 'Use of an Enrichment Broth Improves Detection of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Clinical Stool Samples', *J Clin Microbiol*, 54: 467-70.
- Kozak, G. K., P. Boerlin, N. Janecko, R. J. Reid-Smith, and C. Jardine. 2009. 'Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada', *Appl Environ Microbiol*, 75: 559-66.
- Lagadec, E., Y. Gomard, G. Le Minter, C. Cordonin, E. Cardinale, B. Ramasindrazana, M. Dietrich, S. M. Goodman, P. Tortosa, and K. Dellagi. 2016. 'Identification of *Tenrec ecaudatus*, a Wild Mammal

- Introduced to Mayotte Island, as a Reservoir of the Newly Identified Human Pathogenic *Leptospira mayottensis*', *PLoS Negl Trop Dis*, 10: e0004933.
- Literak, I., M. Dolejska, A. Cizek, C.A.T Djigo, A. Konecny, and P. Koubek. 2009. Reservoirs of antibiotic-resistant Enterobacteriaceae among animals sympatric to humans in Senegal : extended-spectrum beta-lactamases in bacteria in a black rat (*Rattus rattus*). *African Journal of Microbiology Research*. 3 : 751-754.
- Magiorakos, A. P., A. Srinivasan, R. B. Carey, Y. Carmeli, M. E. Falagas, C. G. Giske, S. Harbarth, J. F. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olsson-Liljequist, D. L. Paterson, L. B. Rice, J. Stelling, M. J. Struelens, A. Vatopoulos, J. T. Weber, and D. L. Monnet. 2012. 'Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance', *Clin Microbiol Infect*, 18: 268-81.
- Nhung, N. T., N. V. Cuong, J. Campbell, N. T. Hoa, J. E. Bryant, V. N. Truc, B. T. Kiet, T. Jombart, N. V. Trung, V. B. Hien, G. Thwaites, S. Baker, and J. Carrique-Mas. 2015. 'High levels of antimicrobial resistance among escherichia coli isolates from livestock farms and synanthropic rats and shrews in the Mekong Delta of Vietnam', *Appl Environ Microbiol*, 81: 812-20.
- Rahelinirina, S., J. M. Duplantier, J. Ratovonjato, O. Ramilijaona, M. Ratsimba, and L. Rahalison. 2010. 'Study on the movement of *Rattus rattus* and evaluation of the plague dispersion in Madagascar', *Vector Borne Zoonotic Dis*, 10: 77-84.
- Russell, J. C., D. Ringler, A. Trombini, and M. Le Corre. 2011. 'The island syndrome and population dynamics of introduced rats', *Oecologia*, 167: 667-76.
- Schaufler, K., K. Nowak, A. Dux, T. Semmler, L. Villa, L. Kourouma, K. Bangoura, L. H. Wieler, F. H. Leendertz, and S. Guenther. 2018. 'Clinically Relevant ESBL-Producing *K. pneumoniae* ST307 and *E. coli* ST38 in an Urban West African Rat Population', *Front Microbiol*, 9: 150.
- Yom-Tov, Y., and E. Geffen. 2006. 'Geographic variation in body size: the effects of ambient temperature and precipitation', *Oecologia*, 148: 213-8.
- Zahar, J. R., E. Bille, D. Schnell, F. Lanternier, F. Mechai, V. Masse, X. Nassif, and O. Lortholary. 2009. '[Extension of beta-lactamases producing bacteria is a worldwide concern]', *Med Sci (Paris)*, 25: 939-44.

ANNEXE



**Legend**

0 4,25 8,5 17 Kilometers

**cla\_run\_2014\_fin\_2975**

<all other values>

**occol\_name**

agri\_divers

canne

eau

no\_data

prairie\_elevage

sol\_nu

urbain\_dense

urbain\_peu\_dense

vegetation\_arboree

vegetation\_arbustive

vegetation\_herbacee

Raster d'occupation du sol SPOT5, La Réunion 2014 ([www.seas-oi.org](http://www.seas-oi.org))

## Résultats majeurs

L’étude transversale de la contamination environnementale par les EBLSE à La Réunion utilisant les rats comme bio-indicateurs indiquait que la proportion de terrains agricoles dans le domaine vital du rat était un facteur expliquant la colonisation de son tractus digestif par les d’Entérobactéries résistantes aux C3G. Ainsi, l’épandage des fèces d’animaux dans les zones agricoles et/ou la présence d’élevages serait une source potentielle de contamination de l’environnement à La Réunion.

La prévalence d’Entérobactéries résistantes aux C3G chez les rats de La Réunion de 5,1 % [2,0 %-8,1 %] ne différait pas significativement de celle estimée à Mayotte de 8,7 % [4,0 %-13,4 %]. Cette prévalence de colonisation par les EBLSE était globalement faible en comparaison de celle obtenue dans la littérature en zone urbaine berlinoise en 2010 (Guenther, Wuttke *et al.* 2013), un seul rat colonisé par une EBLSE étant identifié dans chaque territoire respectivement.

La masse, la longueur de la queue étaient des facteurs explicatifs intrinsèques de la colonisation par les EBLSE chez les rats étudiés. Ces variables biologiques sont des estimateurs de l’âge et de la maturité sexuelle des individus (Morris, 1972).

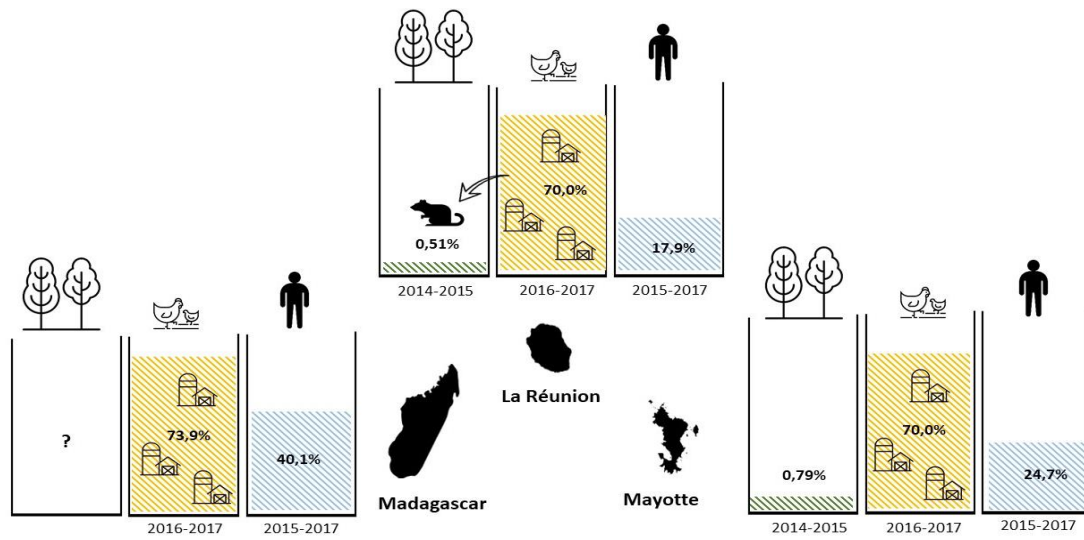
Il serait nécessaire de confirmer le génotype de la résistance à l’ertapénème observé chez une Entérobactérie de Mayotte. L’hypothèse d’une circulation communautaire d’EPC dans le territoire de Mayotte ayant été émise suite à une épidémie d’EPC à gène *bla<sub>IMI-1</sub>* de 2015 à 2017 (Miltgen, Bonnin *et al.* 2018). La confirmation de cette résistance chez un rat pourrait renforcer l’hypothèse d’une source environnementale et/ou communautaire d’EPC à Mayotte.

### Trois points clés sur le « compartiment environnement »

- Une prévalence globale faible des ERC3G et EBLSE chez les rats à La Réunion.
- Les zones agricoles de La Réunion potentiellement contaminées par les EBLSE provenant du compartiment élevage.
- L’environnement intervient pour maintenir les EBLSE avec des contaminations subséquentes d’hôtes vertébrés.

Bien que basée sur des indicateurs différents, l’étude de la prévalence inter-élevage d’EBLSE suggérait un rôle important du compartiment animal comme réservoir d’EBLSE ([chapitre 4](#)) induisant des contaminations potentielles de l’environnement ([chapitre 5](#)).

Dans la [partie 2](#) de cette thèse, nous avons soulevé l’hypothèse d’une source substantielle d’EBLSE dans le compartiment animal d’élevage dans l’océan Indien (figure 9). Des prévalences d’EBLSE supérieures dans les compartiments homme et animal d’élevage à Madagascar étaient estimées par rapport à La Réunion. Cependant, le niveau de contamination par les EBLSE de l’environnement dans ce territoire n’a pas été appréhendé. Le compartiment pourrait jouer un rôle majeur dans la transmission d’EBLSE dans les pays en développement facilité par des systèmes d’assainissement peu performants et un faible niveau d’hygiène (Alvarez-Uria, Gandra *et al.* 2016).



**Figure 9. Représentation schématique de la prévalence d’EBLSE estimée en partie 2 dans les trois compartiments de l’approche One Health**

En conséquence, nous avons souhaité étudier les déterminants de la colonisation par les EBLSE de l’homme via l’interaction avec les deux autres compartiments à Madagascar. Ce travail est abordé au travers d’une approche holistique dans la [partie 3](#).

### Partie 3 : Une approche holistique du concept One Health pour caractériser les déterminants de la colonisation de l'homme en milieu communautaire

Chapitre 6. Etude des déterminants de la colonisation par les EBLSE du compartiment humain à Madagascar : facteurs intrinsèques et extrinsèques en lien avec les autres compartiments



#### Usage de la traction animale à Madagascar, 2018

L'estimation des niveaux de colonisation/contamination par les EBLSE des compartiments animal d'élevage et homme suggérait Madagascar comme un point chaud de circulation d'EBLSE dans le SOOI ([chapitre 3](#) et [4](#)). Les gènes *bla*<sub>CTX-M-15</sub> déjà identifiés chez l'homme à Madagascar (Naas, Cuzon *et al.* 2016) étaient trouvés dans l'ensemble des filières d'élevage intensif de ce territoire. Ceci était potentiellement en faveur d'une transmission d'EBLSE entre les compartiments homme et animal à Madagascar et indiquait une probable perméabilité des différents compartiments entre eux.

Cette perméabilité entre compartiments a déjà été observée chez certaines populations humaines ayant des contacts rapprochés avec les animaux tels que les éleveurs de porcs (Dohmen, Bonten *et*



*al.* 2015) et de volailles (Huijbers, Graat *et al.* 2014, Dorado-Garcia, Smid *et al.* 2017). Ces études étaient majoritairement réalisées dans des pays développés où les interactions entre hommes et animaux restent réduites, en dehors des animaux de compagnie.

Dans les pays en développement, l'élevage familial offre une sécurité alimentaire et une source de revenus pour le ménage (Faye 2001). A Madagascar, l'élevage familial est commun et occupe une place prépondérante dans la production nationale, particulièrement la production avicole (Mraidî 2014). Cela a été confirmé par une enquête préliminaire réalisée dans la commune d'étude le 7 août 2018 ([Annexe 9](#)). Sur les 67 personnes interrogées habitant la commune d'Andoharanofotsy 100,0% rapportaient posséder au moins un animal. Parmi les personnes interrogées 32,9% correspondaient au critère d'inclusion utilisé dans l'étude. L'élevage traditionnel pourrait être un réservoir conséquent d'EBLSE, comme proposé dans la [partie 2](#), constituant une source d'exposition aux EBLSE des hommes en milieu communautaire. En outre, la contamination de l'environnement par les EBLSE serait une voie de transmission majeure vers le compartiment humain dans les pays à faible revenu (Asaduzzaman 2018).

Dans les pays à revenu faible et intermédiaire, un manque d'études sur les facteurs de colonisation par les EBLSE de l'homme en communauté, en lien avec les autres compartiments, était constaté (Chatterjee, Modarai *et al.* 2018).

Une étude transversale réalisée dans la commune d'Andoharanofotsy à Madagascar entre avril et octobre 2018 a inclus des individus animaux, humains et des prélèvements d'eau de boisson provenant de 70 ménages. Ainsi, les trois compartiments de l'approche One Health étaient connectés d'un point de vu spatial et temporel.

Les critères d'inclusion d'un ménage étaient la possession d'au moins trois espèces animales différentes, la localisation du ménage dans la commune d'Andoharanofotsy et son consentement à la participation à l'étude.

L'objectif principal de cette étude était d'identifier les déterminants de la colonisation par les EBLSE de l'homme en communauté en relation avec les compartiments environnement et animaux (élevage et domestique).

Les questions adressées secondairement étaient :

- Quelle est la prévalence d'EBLSE dans chaque compartiment à Madagascar ?
  
- Quels sont les déterminants intrinsèques (tels que l'âge, les antécédents d'hospitalisation, le soin des animaux) de la colonisation par les EBLSE chez l'homme en communauté (approche individu centrée) ?
  
- Quels sont les déterminants extrinsèques (tels que la composition en espèces animales du ménage, l'altitude du ménage et les caractéristiques de l'habitat) de la colonisation par les EBLSE chez l'homme en communauté (approche ménage centrée) ?

Ce projet a reçu l'autorisation du comité d'éthique de la recherche biomédicale de Madagascar référencé sous le N°031-MSANP/CERBM ([Annexe 8](#)).

Ces travaux seront soumis avant décembre 2019.

---

**Article 5. Gay N.** Ramahatafandry ITH, Rabenanrasana MAN, Panandiniaina HP, Rakotonindrina MF, Grosbois V, Metras R, Collard JM, Cardinale E. Small scale farming in Madagascar : individual and environmental factors of Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase Enterobacteriaceae colonization in human

---

## Article 5. Small scale farming in Madagascar: individual and environmental factors of Extended Spectrum $\beta$ -Lactamase Enterobacteriaceae colonization in humans

Noellie GAY<sup>1\*</sup>, Ilo Tsimok'Haja RAMAHATAFANDRY<sup>2</sup>, Mamitina Alain Noah RABENANRASANA<sup>3</sup>, Harielle Prisca PANANDINIAINA<sup>3</sup>, Marie Florence RAKOTONINDRINA<sup>3</sup>, Vladimir GROSOBOIS<sup>3</sup>, Raphaëlle METRAS<sup>3</sup>, Jean-Marc COLLARD<sup>2</sup>, Éric CARDINALE<sup>1</sup>.

1. Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, Montpellier, France.
2. Direction des Services Vétérinaire, Antananarivo, Madagascar.
3. Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo, Madagascar.

### Abstract

low-income countries, risk factors of Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase Enterobacteriaceae (ESBL-E) colonization in humans are still understudied especially when considering exposure to the environment and animals in rural setting. We performed a cross-sectional survey in Andoharanofotsy township, Madagascar, 2018. Households owning at least three different animal species were included in the survey in order to i) estimate ESBL-E colonization rates in each animal species, humans, and drinking water; and ii) explore factors associated with ESBL-E colonization in humans both at the household and individual levels (generalized linear models and generalized linear mixed models were used respectively). ESBL-E colonization rates with random effect ranged from 20.6% (95% CI 04.8%-33.2%) in cats to 78.6% (95% CI 49.8%-98.1%) in turkey; 33.3% (95% CI 27.7%-38.8%) of humans were colonized and 11.4% (95% CI 05.4%-20.2%) of human drinking water ESBL-E contaminated. At the household level, factors positively associated with ESBL-E colonization rate in humans was owning pig(s); conversely, elevation of the household, and animal medical treatment in the past six months were negatively associated with human ESBL-E colonization in the household. At the individual level, swimming activity and having taken medical treatment in the six months prior to the survey were positively associated with individual ESBL-E colonization. This community-based survey of ESBL-E in a rural area of Madagascar reinforced the idea of a One health approach to fight antimicrobial resistance.

## Background

Madagascar is one of the poorest countries in the world with 75.0% of the population living with less than 1.9 USD per day and agriculture as livelihood for 80.0% of the population (<http://www.worldbank.org/en/country/madagascar/overview>). Low- and middle-income countries are particularly affected by antimicrobial resistance (AMR) with antibiotic misuses, lack of laboratory diagnosis (Mendelson, Rottingen *et al.* 2016) and inadequate food safety controls (Nadimpalli, Delarocque-Astagneau *et al.* 2018). High Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase Enterobacteriaceae (ESBL-E) colonization in humans was reported both in humans and animals in Madagascar (Gay, Belmonte *et al.* 2017). In hospital settings, 21.3% of patients were ESBL-E colonized in Antananarivo (capital city) in 2006-2008 (Randrianirina, Vaillant *et al.* 2010), and 21.2% of children were colonized in a pediatric ward in 2008 (Andriatahina, Randrianirina *et al.* 2010). In human community, 10.1% of ESBL-E colonization was reported in 2009 in three communes of Antananarivo (Herindrainy, Randrianirina *et al.* 2011), whilst 18.5% of pregnant women in the cities of Moramanga and Antananarivo were ESBL-E colonized at delivery 2013-2014 (Chereau, Herindrainy *et al.* 2015). Regarding animals, 86.7% of semi-intensive main pig farms, 66.7% of beef cattle farms, and 70.0% of poultry farms were ESBL-E positive in 2016 in the townships of Imerintsiatosika, Antsirabe and Mahitsy respectively (Gay *et al.*, 2018).

At the household level, private indoors access to drinking water and living in an individual house were factors positively associated with ESBL-E colonization in pregnant women (Chereau, Herindrainy *et al.* 2015) whereas ESBL-E colonization was related to low socio-economic status of the household in another study (Herindrainy, Randrianirina *et al.* 2011).

Risk factors of ESBL-E colonization in human communities in Madagascar remains therefore patchy and unclear, highlighting the need of community-based surveys in order to explore the impact of human exposure to its spatially close environment and other ESBL-E potential reservoirs (drinking water, farm-animals, and pets).

The purposes of this cross-sectional survey were to: i) estimate the ESBL-E colonization rates in each animal species, humans, and drinking water in a rural setting of Madagascar and ii) explore factors associated with ESBL-E colonization in humans at both the household and individual levels.

## **Methods**

### ***Study design and location***

Andoharanofotsy township is a small rural town, located 12 km South from Antananarivo, the capital of Madagascar. Andoharanofotsy township covers 7.4 km<sup>2</sup>, it has 49,181 inhabitants (census, 2008), and is composed of eight fokontanys (i.e. primary administrative unit) that are small geographical units of about 0.90 km<sup>2</sup> (median).

A cross-sectional study was performed in Andoharanofotsy township, Antananarivo district, Madagascar, from April to October 2018, during the dry season. This study was conducted in accordance with the Malagasy Law and approved by the ethical committee on biomedical human research (N° 031-MSANP/CERBM).

### ***Data collection***

#### ***Selection of participants and collection of biological samples***

A target sample of 381 human individuals was estimated assuming an expected prevalence of 20.0% (Chereau, Herindrainy *et al.* 2015), an acceptable error of 5%, and 95% level of confidence.

The household inclusion criteria were i) inhabiting in Andoharanofotsy township ii) owning at least three different animal species (livestock and/or pets), and agree to participate in the survey. The list of households following the inclusion criteria was established by fokontany chiefs, Andoharanofotsy mayor, community workers, and veterinarians. Based on that list, at least four households by fokontany were randomly selected, and visited between 6-7am before household's members released animals and left for work.

In each household, all consenting human individuals and all animals present at the visit (livestock and pets) were sampled using rectal swabs. A subset of ten animals was sampled if more than 20 individuals of given species were present (i.e. flesh chicken).

Furthermore, 500ml of drinking water intended for human and/or animal use were taken (both if water sources were different).

### **Questionnaires**

Questionnaires were used to collect information at both the household level and the human individual level. At the household levels, data were collected regarding location (GPS coordinates, elevation), total number of animals owned, family member composition (sex and age), habitat characteristics (shared with other family, individual house), roof, wall and ground types), common source of water with animals (Y/N), animal disease in the six past months (Y/N), medical treatment of animal owned (Y/N), antibiotics use in the six past months in animal owned (Y/N).

For human individuals, data collected were: age, sex, occupation, animal farming activity (Yes/No), water contact activities (fishing, paddy field work, draw the water, swim), disease in the six last months (Yes/No), if yes disease details, hospitalization in the six last months (Yes/No), medical treatment taken in the six last months (Yes/No), antibiotics taken in the six last months (Yes/No), if yes antibiotic details, animal species the person care, children care at home (Yes/No).

### **Bacteriology and susceptibility testing**

After sampling, all swabs were immediately maintained at 4°C and laboratory analyses performed the same day within two hours after reception at the laboratory.

Swabs were suspended in a Luria Bertani broth (BioMérieux SA, Marcy l'Etoile, France) and incubated 24 h at 35±2°C with shaking. Ten (10) µL of the enriched suspension was directly streaked onto selective chromogenic agar plates (CHROMagar ESBL, CHROMagar, Paris, France) and



At the individual level, the associations between ESBL-E colonization in humans and categorical factors were explored at univariate level using GLMM (Logit link function), odds ratio with 95% CI and p values were calculated with likelihood ratio test. An initial GLMM was performed on categorical factors with p value less than or equal to 0.2 in the univariate analysis and the best model minimized the AIC using both forward and backward procedure. Adjusted odds ratio were estimated using variables of the final model (age, swim, and treatment in the past 6 months) and p value calculated using likelihood ratio test. AIC and adjusted R<sup>2</sup> are reported for null, initial, and final multivariable logistic regression model to show goodness-of-model fit.

## Results

### *ESBL-E colonization rates in each reservoir*

In total, 350 humans, 1002 animals, and 92 drinking water samples were taken from 70 households from April to October 2018. Presence of animal species in households varied widely with poultry present in 67 households (95.7% of the households owning poultry), dogs were the second species most represented species (71.4%) (Table 1).

Among the 350 people sampled, 118 were ESBL-E colonization. ESBL-E colonization rates with random effect showed heterogeneity between reservoirs ranging from absent (i.e. rabbits, guinea pigs, turtles, sheep, pigeons, quail, parrots, peacocks) to 78.6% (95%CI 49.8%-98.1%) for turkeys.

Among the 591 ESBL-producing Enterobacteriaceae identified, 516 were *E. coli*, 55 were *Klebsiella* sp., and 20 were *Enterobacter* sp (Annex 1, see antibiotic susceptibility testing profiles).



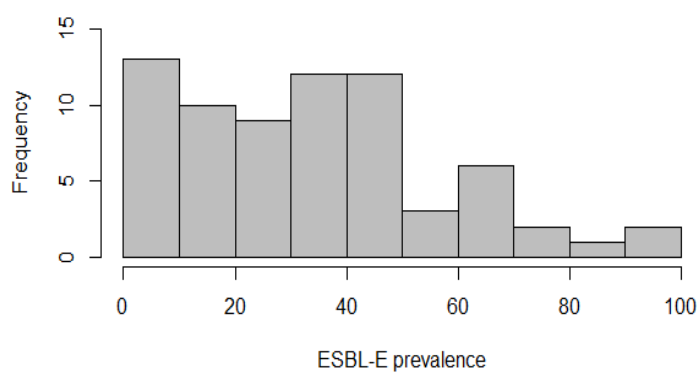
**Table 1.** Reservoirs, sample size, ESBL-E positive individuals, ESBL-E colonization rates with random effect, and proportion of each species in the households included in the survey, Madagascar 2018

Reservoirs *	n	+ ESBL-E	ESBL-E prevalence with random effect household [95% CI]	Presence of the reservoir in households (%)
Turkeys	14	11	78.6% [49.8%-98.1%]	6 (0.8.6%)
Pigs	88	66	74.6% [57.8%-87.9%]	29 (41.4%)
Goose	51	32	61.6% [39.3%-77.8%]	13 (18.6%)
Ducks	85	51	60.0% [49.4%-72.4%]	25 (35.7%)
Dogs	95	47	49.9% [37.0%-63.5%]	50 (71.4%)
Humans	350	118	33.3% [27.7%-38.8%]	70 (100.0%)
Poultry	411	143	32.1% [24.3%-40.1%]	67 (95.7%)
Horses	10	3	30.0% [07.5%-71.1%]	3 (04.3%)
Cows	88	22	25.8% [13.1%-41.8%]	16 (22.9%)
Cats	73	17	20.6% [04.8%-33.2%]	41 (58.6%)
Drinking water for animal <sup>a</sup>	70	16	22.9% [14.1%-33.6%]	70 (100.0%)
Drinking water for humans	70	8	11.4% [05.4%-20.2%]	70 (100.0%)
Total vertebrate hosts*	1352	511	36.6% [31.9%-41.4%]	--

\*Drinking water was not included, rabbits (N = 35), guinea pigs (N = 19), turtles (N=11), sheep (N = 7), pigeons (N = 8), quail (N = 5), parrots (N = 1) were not presented as no individual was found positive for ESBL-E colonization but accounted in the total. ESBL positive could be colonized by one or more than one ESBL-producing bacteria. <sup>a</sup> if water source not common with human

### **Investigating factors of ESBL-E colonization in human at the household level**

ESBL-E colonization in human households ranged from 0.0% to 100.0% (median 33.3% and mean 35.0%) in Andoharanofotsy township (Figure 1).



**Figure 1.** Distribution of ESBL-E human prevalence in households

At the household level, ESBL-E colonization was associated with a lower elevation, low cat abundance, pig presence, and higher fokontany population density in univariate analyses (p value<0.05, Annex 3).

In the multivariate analysis an increased ESBL-E colonization in humans was positively associated with a decreased elevation, pig presence, the absence of animal treatment in the 6 past months (Table 2).

**Table 2.** Final model of factors associated with ESBL-E colonization at the household level, Madagascar 2018

<b>Explanatory factors</b>	Adjusted OR [95% CI]	Beta coefficient	SE	LRT p value**
<b>Elevation (100m)</b>	<b>0.1 [0.0-0.7]</b>	<b>-2.22</b>	<b>1.00</b>	<b>0.03</b>
Men in household	0.9 [0.7-1.0]	-0.14	0.08	0.08
Cat abundance	0.8 [0.6-1.1]	-0.21	0.14	0.12
Dog ESBL-E colonization	0.6 [0.3-1.1]	-0.52	0.33	0.11
<b>Pig presence</b>	<b>2.1 [1.2-3.7]</b>	<b>0.74</b>	<b>0.29</b>	<b>0.01</b>
<b>Animal medical treatment &lt;6 months</b>	<b>0.5 [0.3-0.96]</b>	<b>-0.65</b>	<b>0.32</b>	<b>0.04</b>

LRT, likelihood ratio test ; Akaike Information criterion, null model= 206.7, final model= 140.3  $\Delta$ AIC = 66.7. Final model residual deviance was 46.94 on 43 degrees of freedom.  $\chi^2$  goodness-of-fit=38.2 (p value = 0.68). Fadden Pseudo-R<sup>2</sup>: 0.38.

***Investigating factors of human ESBL-E colonization at the individual level***

In total 70 households were included in our survey with 350 human individuals. Households were composed of a median of five people; household composition ranged from one to eleven people. Among individuals, median age was 21 years-old, 52.6% (184/350) were males, and 21.4% reported animal farming activities (75/350).

At the univariate level, factors associated with ESBL-E individual colonization in humans were being older, reporting animal farming activities, and having taken a medical treatment in the six past months (Table 3). At the multivariable level being older and medical treatment in the six past months were associated with individual ESBL-E colonization.

**Table 3.** Explanatory factors of ESBL-E colonization at the individual level

	N	+	-	% ESBL-E positive	OR CI 95%	Univariate p value	Adjusted OR CI 95%	Multivariate P value
<b>Sex</b>								0.31
Male	184	66	118	35.9%	1.2 [0.8-1.9]	0.43	1.3 [0.8-2.0]	
Female	166	52	114	31.3%	1		1	
<b>Age</b>						<b>0.03</b>		0.06
[0-8]	61	12	49	19.7%	1		1	
[8-16]	79	23	56	29.1%	1.7 [0.8-3.8]		1.8 [0.8-4.2]	0.14
[16-33]	92	32	60	34.8%	<b>2.2 [1.0-4.8]</b>		2.1 [1.0-4.6]	0.07
[33-48]	55	23	32	41.8%	<b>2.9 [1.3-6.9]</b>		2.7 [1.2-6.3]	<b>0.02</b>
[48-64]	49	20	29	40.8%	<b>2.8 [1.2-6.7]</b>		2.6 [1.1-6.3]	<b>0.03</b>
[64-80]	14	8	6	57.1%	<b>5.4 [1.6-19.6]</b>		<b>5.9 [1.4-22.0]</b>	<b>0.01</b>
<b>Animal farming activity</b>						<b>0.05</b>		0.34
Yes	75	33	42	45.3%	<b>1.8 [1.0-3.0]</b>		1.4 [0.8-2.4]	
No	275	85	190	30.9%	1		1	
<b>Human care</b>						0.94		0.99
Yes	13	5	8	38.5%	1.2 [0.4-3.8]		1.0 [0.3-3.3]	
No	337	113	224	33.5%	1		1	
<b>Water contact types</b>								
<b>- To Fish</b>						0.33		0.32
Yes	22	10	12	45.5%	1.7 [0.7-4.1]		1.6 [0.6-4.0]	
No	328	108	220	32.9%	1		1	
<b>- To work in paddy fields</b>						0.82		0.82
Yes	44	16	28	36.4%	1.1 [0.6-2.2]		0.9 [0.5-1.8]	
No	306	102	204	33.3%	1		1	
<b>- To draw the water</b>						0.58		0.84
Yes	184	65	119	35.3%	1.2 [0.7-1.8]		1.1 [0.7-1.7]	
No	166	53	113	31.9%	1		1	
<b>- To swim</b>						<b>0.01</b>		<b>0.02</b>
Yes	7	6	1	85.7%	12.4 [2.1-235.2]		9.1 [1.5-175.3]	<b>0.05</b>
No	343	112	231	32.7%	1		1	
<b>Disease in the past 6 months</b>						0.69		<b>0.01</b>
Yes	293	97	196	33.1%	0.8 [0.5-1.6]		0.4 [0.2-0.8]	<b>0.01</b>
No	57	21	36	36.8%	1		1	
<b>Hospitalization within the past year</b>						0.79		0.18
Yes	2	0	2	0.0%	--		--	
No	348	118	230	33.9%	--		--	
<b>Treatment in the past 6 months</b>						<b>0.01</b>		<b>0.02</b>

*Chapitre 6– Déterminants de la colonisation par les EBLSE du compartiment humain à Madagascar*

Yes	219	85	134	38.8%	<b>1.9 [1.2-3.1]</b>	<b>1.8 [1.1-3.0]</b>	<b>0.02</b>
No	131	33	98	25.2%	1	1	
<b>Antibiotic treatment in the past</b>						0.14	0.78
<b>6 months</b>							
Yes	114	45	69	39.5%	1.5 [0.9-2.3]	1.1 [0.6-1.9]	
No	236	73	163	30.9%	1	1	
<b>Children care</b>						0.14	0.99
Yes	32	15	17	46.9%	1.8 [0.9-3.8]	1.0 [0.3-3.3]	
No	318	103	215	32.4%	1	1	

The best model included the following factors: Age, Swim, Treatment in the past 6 months (best model). OR were adjusted with the following factors. Akaike Information criterion, null model 449.4, initial model 441.6, final 438.2 (( $\Delta$ AIC (final/null) = 11;  $\Delta$ AIC (final/initial): 14). Adjusted  $R^2$ , null model 0, initial model 0.075, final 0.07. Final model residual deviance was 422 (p value = 0.002) and  $\chi^2=348$  (p value = 0.4) on 342 degrees of freedom.

## Discussion

This cross-sectional survey pointed out high ESBL-E colonization rates in animal species in Andoharanofotsy township in Madagascar in 2018. ESBL-E colonization rates ranged from 20.6% (95%CI 04.8%-33.2%) in cats to 78.6% (95% CI 49.8%-98.1%) in turkey; 33.3% of humans were ESBL-E colonized and 11.4% (95% CI 05.4%-20.2%) of human drinking water was ESBL-E contaminated. At the household level, the ESBL-E colonization of human was positively associated with low elevation, pig presence and absence of animal treatment in the past six months. At the individual level, swimming and having taken a treatment in the past six months were associated with human ESBL-E colonization.

To our knowledge this study was the first community-based survey on antimicrobial resistance in Madagascar as other studies were implemented at hospital wards or in pediatric cohorts (Herindrainy, Rabenandrasana *et al.* 2018, Huynh, Kermorvant-Duchemin *et al.* 2018).

ESBL-E colonization estimates could neither be extrapolated for Andoharanofotsy township population nor to the Malagasy population due to selection bias (i.e. only household owning at least three animal species included). The human ESBL-E colonization rate in our survey (33.3%) was at least twice higher than estimates reported previously in literature (i.e. 10.1% in 2009 (Herindrainy, Randrianirina *et al.* 2011), 18.5% in 2013-2014 (Chereau, Herindrainy *et al.* 2015)). This figure could be explained by higher animal exposure in household sampled than in the general population, animal contacts known as a risk factor of ESBL-E colonization (de Been, Lanza *et al.* 2014, Huijbers, Graat *et al.* 2014, Dorado-Garcia, Smid *et al.* 2017). However, ESBL-E estimations eventually offered a better picture of the community colonization as previous surveys focused on individuals at hospital entrance that is to say individuals able to pay health care access. Poor socio-economic status increased ESBL-E colonization in Madagascar (Herindrainy, Randrianirina *et al.* 2011) and India (Alsan, Kammili *et al.* 2018).

Identification of pig presence in households as increasing human ESBL-E colonization suggest potential transmission between animals and their owners or a similar exposure to a same contamination source. Direct contact with pigs increased ESBL-E colonization in farmers in the Netherlands (Dohmen, Bonten *et al.* 2015). Low elevation of the household was also associated with human ESBL-E colonization which could be related to fecal infiltration and contamination of water runoff. Downstream water was reported to be more *Escherichia coli* contaminated in Australia (Boon and Cattnach 1999) and ESBL-E prevalence increased dramatically in downstream river sediment in United Kingdom (Amos, Hawkey *et al.* 2014). As the study was small-scale (township level) associations between ESBL-E colonization with watershed fecal contamination should be

explored at a large scale. A meta-analysis results pointed direct association between antibiotic use in livestock and antibiotic resistant bacteria in humans (Tang, Caffrey *et al.* 2017). At the opposite, lower ESBL-E colonization in human was observed when a medical treatment was given to animals in the six past months which should question confounding factors such as income of the household. Medical treatment was not antibiotic treatment (documented in our survey) and could be related to a better animal care (e.g. vitamin or worming).

At individual level, no association between ESBL-E colonization and contaminated water was found as hypothesized in a previous study on pregnant women in Madagascar (Chereau, Herindrainy *et al.* 2015) but was identified for swimming activity. High antibiotic consumption was proposed as a risk factor a ESBL-E colonization (Chereau, Herindrainy *et al.* 2015) ; increased ESBL-E colonization was observed in individuals reporting to take medical treatment in the six past months (probable recall bias for individuals who cannot remember that it was an antibiotic treatment). Investigated factors of ESBL-E colonization in humans were related to animal contacts, farming, individual occupation activities, water consumption, and children care but foodborne transmission routes were not explored in that study. However, in low or middle-income countries, foodborne transmission could play an important role in human ESBL-E colonization (e.g. meat and dried fish as probable route of ESBL-E transmission in Cambodia) (Nadimpalli, Vuthy *et al.* 2019).

Our community-based survey pointed out high ESBL-E prevalence estimates in animals, humans and drinking water in a rural area of Madagascar. Associations between ESBL-E colonization in humans, the animal owned and environmental factors were identified. This study confirms the needs to consider antimicrobial resistance with a One health approach. Phenotypic characterization of ESBL-

E was used for the study. To gain insight into potential ESBL-E transmission routes to human, characterization of the resistance genes and bacterial genome should be considered. Furthermore, if direct contact with animals is a risk factor of ESBL-E colonization, indirect transmission such as food and environmental exposure to fecal contamination should complete the investigation of ESBL-E transmission routes to humans in low-income countries.

### **Acknowledgement**

This project was funded by the Indian Ocean Health Agency (Noellie Gay PhD grant) and the INTERREG FEDER TROI 2018-2020 under the DP One health Indian Ocean ([www.onehealth-oi.org](http://www.onehealth-oi.org)).

### **Biographical Sketch**

Noellie Gay is an epidemiologist with a strong experience in emerging disease outbreaks. She was both involved in research and epidemiological surveillance in epidemic contexts. Her research interests are mainly related to transmission patterns of zoonotic diseases from wildlife and drivers of emergences. From 2016 to 2019 she implemented research projects on One Health approach of antimicrobial resistance in Indian Ocean.



Annex 1. ESBL-producing Enterobacteriaceae antibiotic susceptibility testing profiles

Bacterial species	N	BLSE	TIC	TCC	CEF	AMC	ATM	CTX	CZD								
			R	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S				
<i>Klebsiella</i> sp.	55	100.0%	0.0%	72.0%	28.0%	96.0%	4.0%	25.5%	74.5%	34.5%	45.5%	20.0%	90.9%	9.1%	0.0%	63.6%	18.2%
<i>Enterobacter</i> sp. <sup>a</sup>	20	95.0%	5.0%	70.9%	29.1%	94.5%	5.0%	100.0%	0.0%	55.0%	35.0%	10.0%	95.0%	5.0%	0.0%	70.0%	15.0%
<i>Escherichia coli</i> <sup>b</sup>	516	100.0%	0.0%	65.0%	35.0%	100.0%	0.0%	5.6%	94.4%	67.1%	24.0%	8.9%	97.9%	1.7%	0.4%	65.9%	18.6%

FEP	IPM	ETP	NAL	CIP	FOX	CXM	GM																
R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S												
21.8%	9.1%	0.0%	0.0%	100.0%	1.8%	0.0%	98.2%	16.4%	81.8%	1.8%	69.1%	81.8%	1.8%	69.1%	0.0%	0.0%	100.0%	92.7%	7.3%	49.1%	0.0%	50.9%	
35.0%	5.0%	0.0%	0.0%	100.0%	10.0%	10.0%	85.0%	0.0%	45.0%	55.0%	80.0%	10.0%	10.0%	85.0%	10.0%	10.0%	100.0%	5.0%	100.0%	0.0%	60.0%	0.0%	40.0%
53.7%	40.7%	5.6%	0.4%	99.6%	0.4%	1.2%	98.4%	30.0%	56.6%	64.5%	11.4%	24.0%	1.0%	98.1%	99.2%	0.8%	7.6%	2.7%	89.7%				

<sup>a</sup> 12 cephalosporinase hyperproducing *Enterobacter* sp. isolates were not presented here. <sup>b</sup> nine cephalosporinase chromosomal hyperproducing *E. coli* isolates were not presented here ; AMX not presented as 100% of all bacterial species were resistant.

**Annex 2.** Categorical factors explaining ESBL-E colonization rates of the households

sampled

	n	%	ESBL-E colonization rates	OR CI 95%	LRT p value
<b>Fokontany</b>					<b>0.24</b>
Belambanana	7	10.0%	49.2%	2.8 [1.3-6.6]	
Andoharanofotsy	7	10.0%	40.2%	2.5 [1.0-6.0]	
Volotra	4	5.7%	42.0%	1.8 [0.6-4.7]	
Iavoloha	11	15.7%	42.7%	1.8 [0.8-4.0]	
Ambohimanala	12	17.1%	34.0%	1.4 [0.6- 3.1]	
Mahalovolona	8	11.4%	27.2%	1.3 [0.5-3.2]	
Mahabo	8	11.4%	32.8%	1.2 [0.5-3.0]	
Morarano	13	18.6%	22.9%	1	
<b>House shared</b>					<b>0.46</b>
With other households	33	47.1%	38.4%	1.3 [0.8-2.0]	
Individual house	31	44.3%	32.5%	1	
Room shared	6	8.6%	29.4%	0.8 [0.3-1.9]	
<b>Wall type</b>					<b>0.10</b>
Wood	2	2.9%	66.7%	4.2 [1.1-20.1]	
Concrete	5	7.1%	34.6%	1.3 [0.6-2.6]	
Brick	63	90.0%	34.0%	1	
<b>Roof type</b>					<b>0.86</b>
Tiles	2	2.9%	32.5%	1.0 [0.2-3.8]	
Sheet metal	67	95.7%	35.2%	1	
Straw	1	1.4%	25.0%	0.6 [0.1-2.9]	
<b>Floor type</b>					<b>0.16</b>

*Chapitre 6– Déterminants de la colonisation par les EBLSE du compartiment humain à Madagascar*

Wood	7	10.0%	53.1%	1.9 [0.9-4.0]
Clay	4	5.7%	43.8%	1.5 [0.5-3.8]
Concrete	39	55.7%	34.7%	1
Tiles	20	28.6%	27.6%	0.8 [0.5-1.4]
<b>Source of water for humans</b>				<b>0.22</b>
Standpipe	33	47.1%	37.1%	1.3 [0.8-2.1]
Well	37	52.9%	33.1%	1
<b>Water result</b>				<b>0.71</b>
Positive	9	12.9%	35.1%	1.1 [0.6-2.1]
Negative	61	87.1%	35.0%	1
<b>Presence of rodents reported</b>				<b>0.19</b>
Yes	54	77.1%	33.3%	1
No	16	22.9%	40.6%	1.4 [0.8-2.3]
<b>Toilets</b>				<b>1</b>
Yes	70	100.0%	35.0%	
<b>Toilets shared with other families</b>				<b>0.89</b>
Yes	36	51.4%	35.7%	1.0 [0.7-1.6]
No	34	48.6%	34.3%	1
<b>Disease in animal owned in the past six months</b>				<b>0.16</b>
Yes	25	35.7%	30.6%	0.7 [0.5-1.1]
No	45	64.3%	37.4%	1
<b>Medical treatment of animal owned in the past six months</b>				<b>0.16</b>
Yes	25	35.7%	31.3%	0.7 [0.4-1.1]
No	45	64.3%	37.1%	1
<b>Antibiotic treatment of animal owned in the past six months</b>				<b>0.42</b>

*Chapitre 6 – Etude des déterminants de la colonisation par les EBLSE du compartiment humain à Madagascar*

Yes	19	27.1%	32.7%	0.8 [0.5-1.4]
No	51	72.9%	35.9%	1

---

**Presence of animal species in the household \***

- Pigs				<b>0.002</b>
Yes	29	41.4%		2.0 [1.3-3.2]
No	41	58.6%		1

---

\* Only animal species with p value <0.2 were presented here. LRT, likelihood ratio test

**Annex 3.** Quantitative factors explaining ESBL-E colonization rates in households sampled

	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>Med</b>	<b>OR CI 95%</b>	<b>LRT p value</b>
<b>Elevation (100 m)</b>	1253	1324	1266	0.2 [0.03-0.70]	<b>0.02</b>
Family size	2	15	5	0.9 [0.9-1.0]	0.24
<b>Number of men</b>	0	8	3	0.9 [0.8-1.0]	<b>0.20</b>
Number of women	0	8	3	1.0 [0.8-1.1]	0.71
<b>Fokontany population density (inhabitants/km<sup>2</sup>)</b>	1748	14937	5784	1.0 [1.0-1.0]	<b>0.04</b>
Number of animal species owned	3	8	4	1.1 [0.9-1.4]	0.21
Cattle abundance	0	17	0	1.0 [0.9-1.0]	0.61
Duck abundance	0	10	0	1.1 [0.9-1.2]	0.38
<b>Cat abundance</b>	0	4	1	0.8 [0.6-0.96]	<b>0.02</b>
Dog abundance	0	7	1	1.0 [0.9-1.2]	0.93
Rabbit abundance	0	8	0	1.0 [0.8-1.1]	0.55
Turkey abundance	0	5	0	1.1 [0.8-1.5]	0.51
Goose abundance	0	10	0	0.9 [0.8-1.1]	0.33
Pig abundance	0	13	0	1.0 [1.0-1.1]	0.38
Poultry abundance	0	12	5	1.0 [0.9-1.1]	0.71
Cattle ESBL-E colonization	0.0%	100.0%	21.7%	2.1 [0.4-10.3]	0.36
Duck ESBL-E colonization	0.0%	100.0%	66.7%	1.5 [0.5-5.1]	0.46
Cat ESBL-E colonization	0.0%	100.0%	0.0%	1.2 [0.5-2.4]	0.68
<b>Dog ESBL-E colonization</b>	<b>0.0%</b>	<b>100.0%</b>	<b>50.0%</b>	<b>0.6 [0.3-1.1]</b>	<b>0.13</b>
Turkey ESBL-E colonization	0.0%	100.0%	90.0%	0.8 [0.1-5.7]	0.81
Goose ESBL-E colonization	0.0%	100.0%	50.0%	0.4 [0.1-2.0]	0.25
Pig ESBL-E colonization	0.0%	100.0%	92.3%	1.1 [0.5-2.4]	0.76
Poultry ESBL-E colonization	0.0%	100.0%	30.0%	1.6 (0.8-3.3)	0.21

Animal species owned by less than 5 households were not included in the analysis. LRT, likelihood ratio test

## Reference

Akaike, H. 1981. 'Citation Classic - a New Look at the Statistical-Model Identification', *Current Contents/Engineering Technology & Applied Sciences*: 22-22.

Alsan, M., N. Kammili, J. Lakshmi, A. Xing, A. Khan, M. Rani, P. Kolli, D. A. Relman, and D. K. Owens. 2018. 'Poverty and Community-Acquired Antimicrobial Resistance with Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing Organisms, Hyderabad, India', *Emerg Infect Dis*, 24: 1490-96.

Amos, G. C., P. M. Hawkey, W. H. Gaze, and E. M. Wellington. 2014. 'Waste water effluent contributes to the dissemination of CTX-M-15 in the natural environment', *J Antimicrob Chemother*, 69: 1785-91.

Andriatahina, T., F. Randrianirina, E. R. Hariniana, A. Talarmin, H. Raobijaona, Y. Buisson, and V. Richard. 2010. 'High prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric unit in Madagascar', *BMC Infect Dis*, 10: 204.

Boon, P. I., and M. Cattanaach. 1999. 'Antibiotic resistance of native and faecal bacteria isolated from rivers, reservoirs and sewage treatment facilities in Victoria, south-eastern Australia', *Lett Appl Microbiol*, 28: 164-8.

Chereau, F., P. Herindrainy, B. Garin, B. T. Huynh, F. Randrianirina, M. Padget, P. Piola, D. Guillemot, and E. Delarocque-Astagneau. 2015. 'Colonization of extended-spectrum-beta-lactamase- and NDM-1-producing Enterobacteriaceae among pregnant women in the community in a low-income country: a potential reservoir for transmission of multiresistant Enterobacteriaceae to neonates', *Antimicrob Agents Chemother*, 59: 3652-5.

de Been, M., V. F. Lanza, M. de Toro, J. Scharringa, W. Dohmen, Y. Du, J. Hu, Y. Lei, N. Li, A. Tooming-Klunderud, D. J. Heederik, A. C. Fluit, M. J. Bonten, R. J. Willems, F. de la Cruz, and W. van Schaik. 2014. 'Dissemination of cephalosporin resistance genes between *Escherichia coli* strains from farm animals and humans by specific plasmid lineages', *PLoS Genet*, 10: e1004776.

Dohmen, W., M. J. Bonten, M. E. Bos, S. van Marm, J. Scharringa, J. A. Wagenaar, and D. J. Heederik. 2015. 'Carriage of extended-spectrum beta-lactamases in pig farmers is associated with occurrence in pigs', *Clin Microbiol Infect*, 21: 917-23.

Dorado-Garcia, A., J. H. Smid, W. van Pelt, M. J. M. Bonten, A. C. Fluit, G. van den Bunt, J. A. Wagenaar, J. Hordijk, C. M. Dierikx, K. T. Veldman, A. de Koeijer, W. Dohmen, H. Schmitt, A. Liakopoulos, E. Pacholewicz, Tjgm Lam, A. G. Velthuis, A. Heuvelink, M. A. Gonggrijp, E. van Duijkeren, Aham van Hoek, A. M. de Roda Husman, H. Blaak, A. H. Havelaar, D. J. Mevius, and D. J. J. Heederik. 2017. 'Molecular relatedness of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from humans, animals, food and the environment: a pooled analysis', *J Antimicrob Chemother*.

Gay, N., O. Belmonte, J. M. Collard, M. Halifa, M. I. Issack, S. Mindjae, P. Palmyre, A. A. Ibrahim, H. Rasamoelina, L. Flachet, L. Filleul, and E. Cardinale. 2017. 'Review of Antibiotic Resistance in the Indian Ocean Commission: A Human and Animal Health Issue', *Front Public Health*, 5: 162.

Herindrainy, P., M. A. N. Rabenandrasana, Z. Z. Andrianirina, F. M. J. Rakotoarimanana, M. Padget, A. de Lauzanne, A. Ndir, E. Kermorvant-Duchemin, B. Garin, P. Piola, J. M. Collard, D. Guillemot, B. T. Huynh, E. Delarocque-Astagneau, and Birdy study group. 2018. 'Acquisition of extended spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae in neonates: A community based cohort in Madagascar', *PLoS One*, 13: e0193325.

Herindrainy, P., F. Randrianirina, R. Ratovoson, E. Ratsima Hariniana, Y. Buisson, N. Genel, D. Decré, G. Arlet, A. Talarmin, and V. Richard. 2011. 'Rectal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in community settings in Madagascar', *PLoS One*, 6: e22738.

Huijbers, P. M., E. A. Graat, A. P. Haenen, M. G. van Santen, A. van Essen-Zandbergen, D. J. Mevius, E. van Duijkeren, and A. H. van Hoek. 2014. 'Extended-spectrum and AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in broilers and people living and/or working on broiler farms: prevalence, risk factors and molecular characteristics', *J Antimicrob Chemother*, 69: 2669-75.

Huynh, B. T., E. Kermorvant-Duchemin, P. Herindrainy, M. Padget, F. M. J. Rakotoarimanana, H. Feno, E. Hariniaina-Ratsima, T. Rahelivao, A. Ndir, S. Goyet, P. Piola, F. Randrianirina, B. Garin, J. M. Collard, D. Guillemot, and E. Delarocque-Astagneau. 2018. 'Bacterial Infections in Neonates, Madagascar, 2012-2014', *Emerg Infect Dis*, 24: 710-17.

Mendelson, M., J. A. Rottingen, U. Gopinathan, D. H. Hamer, H. Wertheim, B. Basnyat, C. Butler, G. Tomson, and M. Balasegaram. 2016. 'Maximising access to achieve appropriate human antimicrobial use in low-income and middle-income countries', *Lancet*, 387: 188-98.

Nadimpalli, M., E. Delarocque-Astagneau, D. C. Love, L. B. Price, B. T. Huynh, J. M. Collard, K. S. Lay, L. Borand, A. Ndir, T. R. Walsh, D. Guillemot, Infections Bacterial, and Group antibiotic-Resistant Diseases among Young children in low-income countries Study. 2018. 'Combating Global Antibiotic Resistance: Emerging One Health Concerns in Lower- and Middle-Income Countries', *Clin Infect Dis*, 66: 963-69.

Nadimpalli, M., Y. Vuthy, A. de Lauzanne, L. Fabre, A. Criscuolo, M. Gouali, B. T. Huynh, T. Naas, T. Phe, L. Borand, J. Jacobs, A. Kerleguer, P. Piola, D. Guillemot, S. Le Hello, E. Delarocque-Astagneau, and Birdy study group. 2019. 'Meat and Fish as Sources of Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli*, Cambodia', *Emerg Infect Dis*, 25.

Randrianirina, F., L. Vaillant, C. E. Ramarokoto, A. Rakotoarijaona, M. L. Andriamanarivo, H. C. Razafimahandry, J. Randrianomenjanahary, J. R. Raveloson, E. R. Hariniana, J. F. Carod, A. Talarmin, and V. Richard. 2010. 'Antimicrobial resistance in pathogens causing nosocomial infections in surgery and intensive care units of two hospitals in Antananarivo, Madagascar', *J Infect Dev Ctries*, 4: 74-82.

Tang, K. L., N. P. Caffrey, D. B. Nobrega, S. C. Cork, P. E. Ronksley, H. W. Barkema, A. J. Polachek, H. Ganshorn, N. Sharma, J. D. Kellner, and W. A. Ghali. 2017. 'Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis', *Lancet Planet Health*, 1: e316-e27.

## **Résultats majeurs**

L'étude transversale réalisée en 2018 dans une zone rurale de Madagascar constitue l'une des premières analyses des facteurs de colonisation par les EBLSE en lien avec les autres compartiments de l'approche One Health.

Ce travail a permis, d'une part, d'estimer la prévalence d'EBLSE dans les trois compartiments et d'autre part, d'identifier des facteurs explicatifs extrinsèques et intrinsèques de la colonisation par les EBLSE du compartiment homme en milieu communautaire.

La prévalence d'EBLSE estimée pour les animaux d'élevage (soit 78,6 % chez les dindes, 74,6 % chez les porcs, 61,6 % chez les oies) était supérieure à celle des autres compartiments (33,3 % pour les hommes, 11,4 % et 22,9 % pour l'eau à destination de la consommation humaine et animale respectivement).

Pour les facteurs extrinsèques, l'altitude (OR : 10, pour baisse d'altitude de 100m), la présence de porcs dans le ménage (OR : 2.1 [1.2-3.7]) et l'usage d'antibiotiques chez les animaux élevés (OR : 0.5 [0.3-0.9]) étaient significativement associés à la colonisation par les EBLSE du compartiment humain. Les facteurs intrinsèques de la colonisation par les EBLSE des individus étaient l'âge, les antécédents de prise de médicaments (OR : 1.8 [1.1-3.0]) et la pratique de la natation (OR : 9.1 [1.5-175.3]).

Ce travail suggère la perméabilité des compartiments entre eux. L'environnement (notamment l'altitude du ménage et la pratique individuelle de la natation) et les animaux présents dans le ménage (la présence de porcs) étaient des facteurs de risque de colonisation par les EBLSE des hommes. L'altitude est un déterminant peu reporté dans la littérature en 2019 et pourrait être l'indicateur d'une contamination de l'eau par l'infiltration d'EBLSE (ruissellement des fèces et des EBLSE des ménages de plus haute altitude vers ceux en plus basse altitude).



**Trois points clés sur les EBLSE à Madagascar « One Health sur le terrain »**

- Le compartiment animal d'élevage constitue un réservoir majeur d'EBLSE.
- La composition du ménage en espèces animales est associée à son niveau de colonisation par les EBLSE, ceci suggère des transmissions entre compartiments.
- Le rôle de l'eau comme véhicule d'EBLSE est proposé.

Dans la [partie 2](#) ([chapitre 3](#), [4](#), [5](#)) la prévalence d'EBLSE dans les différents compartiments a été évaluée indépendamment. Dans le [chapitre 6](#), l'approche holistique suggérait une perméabilité des compartiments entre eux avec une prévalence de colonisation par les EBLSE du compartiment humain associée aux deux autres compartiments. Ces résultats indiquent des transmissions potentielles d'EBLSE entre compartiments. Dans la dernière partie du manuscrit la [discussion générale](#) sera abordée.

## Discussion générale



© Morgane Laval

### **Bovin au piquet, Mayotte 2017**

L'objectif général de ce travail de thèse était d'estimer la prévalence d'EBLSE dans les trois compartiments de l'approche One Health (homme, animal et environnement) pour en identifier le principal réservoir dans le Sud-Ouest de l'océan Indien. Pour répondre à cet objectif deux approches ont été utilisées qui mettent en évidence le rôle des animaux d'élevage comme réservoir majeur d'EBLSE dans le SOOI

La première approche sectorielle, par compartiment, a permis d'estimer des prévalences d'EBLSE inter-élevage élevées (pourcentage d'élevages positif) dans les filières d'élevage intensif (à l'exception de l'élevage bovin à La Réunion) ([chapitre 4](#)). [Au chapitre 5](#), la présence de terrains agricoles dans le domaine vital des rats était identifiée comme un déterminant de leur colonisation par les EBLSE. La seconde approche holistique, connectant les trois compartiments spatialement et temporellement, renforçait encore l'idée d'un réservoir substantiel d'EBLSE chez les animaux d'élevage, y compris en élevage familial ([partie 3](#)).

Ainsi, malgré les biais de notre approche méthodologique ([I.1](#)), les résultats de la thèse sont plausibles ([I.2](#)) et supportent l'hypothèse d'un rôle des animaux d'élevage comme réservoir majeur d'EBLSE dans le SOOI.

## *I. Une approche utile pour identifier le principal réservoir d'EBLSE dans le SOOI*

### **I.1. Les limites méthodologiques des approches sectorielle et holistique pour estimer la prévalence d'EBLSE dans les trois compartiments dans le SOOI**

L'étude sectorielle de la prévalence d'EBLSE n'a pas pu être réalisée simultanément dans les trois compartiments de l'approche One Health dans l'ensemble des territoires du SOOI. Le niveau de contamination environnementale par les EBLSE estimé en 2014 à Mayotte et La Réunion pourrait ne pas représenter celui de 2017 et reste ainsi difficilement comparable avec les données animales et humaines recueillies plus tardivement (2015 à 2017).

D'autre part, l'usage de différents protocoles d'étude selon les compartiments de l'approche One Health ne permet pas de comparaison directe de la prévalence d'EBLSE.

Pour le compartiment homme ([chapitre 3](#)), le protocole d'étude était basé sur un échantillon de convenance avec l'inclusion de patients hospitalisés à La Réunion résidant dans les territoires du SOOI. Cette étude impliquait des biais d'imprécision (faible nombre de patients pour certains territoires) et d'inexactitude (non aléatoire) dans l'estimation de la prévalence de colonisation par les EBLSE des patients provenant des territoires du SOOI. Le biais d'imprécision doit être particulièrement questionné pour l'estimation de la prévalence des BMR aux Seychelles et aux Comores en raison d'un recrutement limité de patients ( $n \leq 30$ ). Le biais d'inexactitude provient principalement du fait que les patients se déplaçant à La Réunion pour une hospitalisation appartenaient probablement à des catégories sociales aisées (hors Mayotte, territoire français avec des échanges privilégiés avec La Réunion). En outre, la prise en compte des facteurs de risque de colonisation par les EBLSE des patients manque pour une interprétation fine des résultats (par

exemple les antécédents d'usage d'antibiotiques et d'hospitalisation, la notion de voyage à l'étranger, le contact avec les animaux). Dans ce sens, l'exposition des patients aux autres compartiments (environnement, animal) n'a pas été documentée pour inférer des hypothèses sur des sources communautaires de colonisation par les EBLSE des hommes dans les territoires du SOOI.

Pour le compartiment animal d'élevage ([chapitre 4](#)), la prévalence d'EBLSE inter-élevage (pourcentage d'élevages positifs) n'offre qu'une vision partielle de la situation sanitaire des EBLSE dans les territoires étudiés. L'estimation de la prévalence d'EBLSE chez l'animal d'élevage (pourcentage d'individus d'une certaine espèce animale colonisés par les EBLSE au sein d'une population donnée) aurait été plus appropriée. Un échantillonnage à deux degrés avec tirage aléatoire des « unités élevage » puis un second tirage aléatoire des unités « individus » ou un échantillonnage en grappes aurait offert une estimation de la prévalence d'EBLSE offrant une base de comparaison entre compartiments. En outre, la négativité d'élevages prélevés incite à questionner notre capacité de détection d'EBLSE avec un nombre réduit de prélèvements par pédichiffonnette. De plus, si la contribution de l'environnement dans la contamination des élevages était suggérée par l'étude des facteurs de risque, l'exposition des animaux associée à l'activité humaine n'a pas été considérée (par exemple la gestion des effluents, la consommation d'antibiotiques par les éleveurs, etc.).

Pour le compartiment environnement ([chapitre 5](#)), la contamination par les EBLSE a été indirectement appréhendée en utilisant les rats comme indicateurs biologiques. Ce modèle a prouvé son utilité pour évaluer la contamination par les EBLSE du milieu urbain en Allemagne (Guenther, Wuttke *et al.* 2013). Cependant, l'utilisation de ce bio-indicateur présente des limites. Premièrement, il s'agit d'une évaluation indirecte du niveau de contamination de l'environnement par les EBLSE offrant donc une imprécision quant au niveau réel de contamination de l'environnement. Ainsi, si les rats de zones agricoles sont plus colonisés par des EBLSE, ils ne permettent pas d'évaluer le niveau d'émission d'EBLSE provenant des élevages ou de l'épandage de lisier dans les zones agricoles. Une estimation directe par des prélèvements environnementaux (sol, eau) était envisageable mais plus difficilement comparable avec la prévalence de colonisation par les EBLSE des autres compartiments. Deuxièmement, les rats sont considérés comme des

## Discussion Générale

marqueurs à l'échelle du micro-habitat et possèdent un domaine vital réduit d'environ 0.13 km<sup>2</sup> (Rahelinirina, Duplantier *et al.* 2010). L'usage de ce modèle biologique nécessite un effort d'échantillonnage soutenu. Ceci semble peu viable pour un suivi de la contamination environnementale dans le temps et probablement insuffisant pour capturer des phénomènes de contamination à l'échelle d'un territoire. L'usage d'autres bio-indicateurs, tels que les chats et chiens divagants ou de canidés sauvages, s'est avéré pertinent dans d'autres territoires (Tamang, Nam *et al.* 2012, Mo, Urdahl *et al.* 2018). Une comparaison de la prévalence de colonisation par les EBLSE de tels bio-indicateurs entre les différents territoires du SOOI apporterait une information sur les territoires dont la contamination environnementale est supérieure et éventuellement les zones géographiques incriminées dans un territoire spécifique (par exemple, les zones agricoles à La Réunion).

L'approche sectorielle soulève la difficulté de comparer la prévalence d'EBLSE entre les territoires du SOOI et les trois compartiments. Cette difficulté est soulevée dans notre revue de la littérature ([chapitre 1](#)) pour la comparaison des prévalences de BMR estimées dans le cadre de différentes études. Elle était aussi soulignée par d'autres revues systématiques (Huynh, Padget *et al.* 2015, Rousham, Unicomb *et al.* 2018) et par le groupe de coordination inter-agence des Nations Unies sur la résistance aux antibiotiques (IACG 2018). En effet, l'utilisation de différentes stratégies d'échantillonnage, de prélèvements (par exemple, l'usage d'un écouvillon ou la collecte de selles), de transport et de conservation, de méthodes de détection au laboratoire et de formatage des résultats met en exergue les limites à la comparaison des résultats entre compartiments et l'intérêt de l'usage d'un protocole de surveillance standardisé.

L'approche holistique a été mise en place à Madagascar pour pallier aux biais de l'approche sectorielle, elle reposait sur une étude transversale incluant les trois compartiments simultanément. L'étude était basée sur un protocole d'échantillonnage et des prélèvements collectés, conservés et analysés au laboratoire de manière similaire. Cette étude a confirmé une prévalence de colonisation par les EBLSE supérieure dans le compartiment animal d'élevage, y compris en élevage familial ([chapitre 6](#)). Ces résultats renforcent l'idée d'un réservoir principal d'EBLSE dans le compartiment animal d'élevage dans le SOOI.

Néanmoins, il faut souligner que l'estimation de la prévalence d'EBLSE dans les trois compartiments présente des biais d'inexactitude limitant son extrapolation à la population générale. Ces biais d'inexactitude sont liés à l'absence de tirage au sort des individus inclus dans l'étude (agrégation au sein du ménage pris en compte dans les modèles statistiques utilisés) et à la sélection de ménages possédant au moins trois espèces animales.

## **I.2. L'élevage comme réservoir d'EBLSE : un faisceau de preuves, une plausibilité biologique et une cohérence avec la littérature**

La plausibilité biologique d'un réservoir substantiel d'EBLSE est reliée aux fortes densités d'animaux confinés en bâtiments favorables aux transmissions interindividuelles (particulièrement en élevage intensif). Les densités animales en élevage sont favorables aux transferts d'agents infectieux entre les individus (Pappas 2013). Une étude réalisée au Danemark dans trois élevages a montré une rapide augmentation de la prévalence d'EBLSE estimée à 0,0 %-24,0 % à l'introduction des poussins, elle augmentait à 96,0 %-100,0% après une semaine et s'établissait à 100,0 % au moment de l'abattage (Dierikx, van der Goot *et al.* 2013).

Les résultats de notre étude ([chapitre 4](#)) ont montré que les prévalences d'EBLSE inter-élevage estimées à La Réunion, Mayotte et Madagascar variaient de 53,3 % à 86,7 % en 2016-2017 (hors bovins, Réunion) toutes filières confondues (volailles de chair, porcs, bovins à viande). Elles étaient comparables à celles reportées en Allemagne en 2012 (plus précisément 88,2 % en élevage de porcs, 50,0 % en élevage de volailles et 54,5 % pour les élevages de bovins à viande (Dahms, Hubner *et al.* 2015), 86,7 % dans les élevages mixtes de bovins (Schmid, Hormansdorfer *et al.* 2013)). Ces prévalences d'EBLSE inter-élevage élevées suggèrent une prévalence d'EBLSE élevée (pourcentage d'individus d'une certaine espèce animale colonisés par les EBLSE au sein d'une population donnée), particulièrement pour les filières volailles et porcs connues pour favoriser la circulation d'agents infectieux (Stalder, Rogers *et al.* 2017).

## Discussion Générale

Cependant, les résultats de cette étude ont mis en évidence une baisse de la prévalence d'EBLSE inter-élevage associée à l'augmentation du cheptel de bovins à viande dans les trois territoires. Ces résultats sont cohérents avec différentes études menées en Angleterre et aux Pays Bas qui montraient que la taille du cheptel de bovins laitiers n'était pas corrélée à la prévalence de colonisation par les EBLSE (Randall, Heinrich *et al.* 2014, Santman-Berends, Gonggrijp *et al.* 2017). Ainsi, la transmission interindividuelle d'EBLSE pourrait être réduite dans les élevages de bovins (viande ou laitier) (Hordijk, Mevius *et al.* 2013), probablement liée à une plus importante séparation physique des individus.

Si la réduction de l'usage d'antibiotiques a permis une inflexion des résistances observées entre 2011 et 2017 dans les prélèvements infectieux en médecine vétérinaire en France (ANSES 2018), il serait nécessaire de confirmer cette tendance dans les départements français d'outre-mer tels que La Réunion et Mayotte (actuellement non inclus dans le réseau de surveillance RESAPATH (ANSES 2018)). En effet, nos résultats suggèrent une contradiction entre la baisse de l'usage d'antibiotiques en élevage à Mayotte et La Réunion, due à la réglementation européenne prévoyant l'arrêt de l'usage des antibiotiques comme promoteurs de croissance dès 2006 (Sanders P 2011), et une prévalence d'EBLSE encore élevée. Ces résultats questionnent en particulier la diminution effective du recours réel aux antibiotiques à usage vétérinaire à Mayotte. Si l'usage d'aliments médicamenteux reste peu probable, l'importation d'antibiotiques à usage vétérinaire en provenance d'autres pays, hors SOOI, a été observée sans être quantifiée (Laure Dommergues, Coopadem, communication personnelle, le 24 mai 2019). A Madagascar, les classes d'antibiotiques utilisés, leur origine et les quantités utilisées d'antibiotiques en élevage reste méconnu.

En outre, les corrélations entre la réduction de l'usage d'antibiotiques et la diminution de la colonisation par les ERC3G ne s'avèrent pas nécessairement linéaires comme observé dans certaines filières d'élevage entre 2004 et 2014 aux Pays-Bas (Dorado-Garcia, Mevius *et al.* 2016). Ainsi, en 2015, une prévalence de 91,7 % d'ERC3G était estimée à partir de prélèvements de poulet de chair en France (Casella, Nogueira *et al.* 2017) malgré la politique de réduction de l'usage des antibiotiques dans le pays.

Le rôle de réservoir d'EBLSE joué par l'élevage pourrait être maintenu malgré la réduction de l'usage d'antibiotiques ou en l'absence de traitement antibiotique. Une étude longitudinale réalisée au Danemark en 2013 dans un élevage biologique de volailles de chair montrait une nette augmentation de la prévalence d'EBLSE en 48h après l'arrivée des volailles en l'absence d'administration d'antibiotiques (van Hoek, Veenman *et al.* 2018). Les transferts horizontaux de gènes de résistance dans le tractus digestif des animaux permettraient la multiplication des EBLSE au sein des élevages (van Hoek, Veenman *et al.* 2018). Il a été montré que le maintien par les bactéries de plasmides porteurs de gènes de résistance était peu coûteux en terme de valeur adaptative (Loftie-Eaton, Bashford *et al.* 2017, Stalder, Rogers *et al.* 2017). Plus spécifiquement, le gène de résistance *bla<sub>CTX-M-14</sub>* porté par le plasmide pCT était maintenu dans *E. coli* en l'absence de pression antibiotique (Cottell, Webber *et al.* 2012). Conséquemment, malgré les mesures prises ou à prendre préconisant de limiter l'usage d'antibiotiques en élevage, ce réservoir pourrait s'avérer substantiel pour les années à venir avant d'en voir infléchir les tendances dans le SOOI.

Cependant, le fait que les animaux d'élevage soient un réservoir d'EBLSE quantitativement important dans le SOOI n'en fait pas nécessairement un risque sanitaire pour l'homme. Ce risque doit être relié au niveau d'exposition de l'homme à ce réservoir, exposition qui pourrait être différente entre les territoires de la zone du SOOI.

## *II. L'exposition de l'homme au compartiment animal d'élevage est-elle variable selon les territoires du Sud-Ouest de l'océan Indien ?*

Rappelons qu'un risque sanitaire est la rencontre entre une population et une exposition, dans le cadre de ce travail celle de l'homme en communauté avec le compartiment animal d'élevage, débouchant sur un évènement de santé (être colonisé ou non par une EBLSE). Si cette rencontre entraîne un risque accru de colonisation par une EBLSE pour l'homme, il peut être considéré comme un facteur de risque. Dans le sens inverse, l'homme peut aussi constituer une source d'exposition



## *Discussion Générale*

pour l'animal, mais à notre connaissance aucune d'étude n'appréhende à ce jour le risque sanitaire des EBLSE sous cet angle.

Les expositions potentielles au réservoir animal d'élevage pouvant induire une colonisation par les EBLSE chez l'homme reposent principalement sur :

- i) le contact direct avec les animaux d'élevage ([II.1](#)),
- ii) l'exposition environnementale aux fèces provenant de l'élevage, ([II.2](#))
- iii) la consommation de produits d'origine animale ([II.3](#)).

Or l'exposition de l'homme aux animaux d'élevage n'est pas similaire entre les territoires et pose la question d'un risque sanitaire différentiel pour les populations humaines du SOOI. Cette différence est abordée sous l'angle du niveau de revenu du pays établi par la Banque mondiale. A ce titre, nous proposons une dichotomie entre les pays à revenu élevé et intermédiaire de la tranche supérieure tels que La Réunion, les Seychelles et Maurice et les pays à revenu faible et intermédiaire de la tranche inférieure tels Madagascar et l'Union des Comores. Bien que cette classification soit imparfaite car elle n'apporte pas d'éléments clairs sur l'état sanitaire du pays (par exemple, le niveau d'accès aux soins de la population, l'état du système d'assainissement et d'accès à l'eau potable) elle s'avère utile pour résumer les contextes sanitaires des pays du SOOI.

### **II.1. Contact direct avec les animaux d'élevage**

#### ***Les preuves dans les pays à revenu élevé et intermédiaire de la tranche supérieure***

Une colonisation par les EBLSE supérieure à celle de la population générale a été observée chez des populations humaines en contact avec les animaux d'élevage tels que les éleveurs aux Pays-Bas et au Danemark (de Been, Lanza *et al.* 2014, Huijbers, Graat *et al.* 2014). La prévalence de colonisation par les EBLSE était plus élevée chez les éleveurs séjournant plus de deux heures quotidiennes dans

le bâtiment d'élevage de volailles (Huijbers, Graat *et al.* 2014). De même, chez les éleveurs de porcs des Pays-Bas en 2011 une association entre la colonisation par les EBLSE et le nombre d'heures à travailler dans l'élevage chaque semaine était notée (Dohmen, Bonten *et al.* 2015). Une méta-analyse réalisée aux Pays-Bas indiquait une similarité des séquences d'*E. coli* BLSE entre les agriculteurs et les animaux d'élevage (plus particulièrement avec les poulets et les porcs) (Dorado-Garcia, Smid *et al.* 2017). Néanmoins, une sectorisation claire des gènes de résistance et plasmides entre les animaux et les hommes en population générale était observée et suggère peu de transmission entre les deux compartiments aux Pays-Bas, hormis la sous-population des éleveurs (Dorado-Garcia, Smid *et al.* 2017).

Cette sectorisation des EBLSE pourrait être une tendance générale pour les pays à revenu élevé et intermédiaire de la tranche supérieure du SOOI. A La Réunion, à Mayotte, aux Seychelles et à Maurice (spécifiquement pour les volailles et les porcs), l'élevage serait majoritairement structuré, intensif et localisé en zones rurales (Éric Cardinale, CIRAD, communication personnelle, le 28 mars 2019). L'élevage intensif limite probablement les contacts directs entre population générale et animaux d'élevage. Néanmoins, le part de l'élevage familial au sein de l'activité d'élevage devrait être clairement estimée dans ces quatre territoires pour appréhender l'exposition des populations humaines aux animaux d'élevage. L'élevage familial pourrait être bien substantiel en milieu rural à Mayotte et à Maurice, plus spécifiquement pour l'élevage caprin (lié à la pratique de l'hindouisme, religion majoritaire sur le territoire) (Éric Cardinale, CIRAD, communication personnelle, le 28 mars 2019).

### ***Les preuves dans les pays à revenu faible et intermédiaire de la tranche inférieure***

Peu d'études ont estimé la prévalence et caractérisé les profils de résistance des BMR, dont les EBLSE, chez les animaux d'élevage et les éleveurs dans les pays à revenu modéré ou faible (Rousham, Unicomb *et al.* 2018).

La colonisation par les EBLSE n'était pas significativement supérieure chez les éleveurs familiaux de volailles par rapport à la population générale au Vietnam (Nguyen, Jamrozny *et al.* 2019). Les gènes de résistance identifiés étaient majoritairement de type *bla*<sub>CTX-M-55</sub> chez les volailles et *bla*<sub>CTX-M-27</sub> chez

## *Discussion Générale*

l'homme. Ceci indiquait une faible contribution de l'élevage de volailles dans la colonisation par les EBLSE des éleveurs familiaux. Similairement, des profils de résistance significativement différents étaient identifiés chez *E. coli* colonisant les éleveurs et leurs animaux en 2007 au Ghana (Donkor, Newman *et al.* 2012).

Dans notre étude transversale réalisée à Madagascar en 2018, les hommes impliqués dans l'élevage familial étaient significativement plus colonisés par les EBLSE (analyse univariée) mais cette association disparaissait en analyses multivariées lorsque l'âge des individus était considéré comme un facteur de confusion de cette association, les adultes étant plus impliqués dans des activités d'élevage. En outre, la prévalence de colonisation par les EBLSE était significativement supérieure dans les ménages possédant un ou des porcs. Ceci peut indiquer des contacts potentiels avec les porcs favorables à des transferts d'EBLSE.

Dans les pays à faible revenu, l'élevage familial peut occuper une place centrale dans la subsistance et la sécurité alimentaire des ménages (Faye 2001). La pratique de cette activité implique la rencontre fréquente entre l'homme en population générale et les animaux d'élevage. Dans le SOOI, l'élevage familial pourrait entraîner des contacts fréquents entre les hommes en population générale et les animaux d'élevage dans l'Union des Comores, à Mayotte en zones rurales, à Madagascar. Or la proximité aux animaux et leur divagation dans les villages favorisent les contacts directs entre les compartiments avec des risques potentiels de transmission de bactéries résistantes aux antibiotiques. Cet aspect a été peu étudié à ce jour.

En résumé, des preuves de transmission directe homme/animaux ont été identifiées chez des éleveurs en Europe mais pas dans les pays à revenu faible et intermédiaire de la tranche inférieure. Cependant, l'absence de preuves de transmission d'EBLSE dans ces pays entre homme et animal n'étant pas la preuve de l'absence de ce mode de transmission. Cette absence de preuve pourrait être expliquée par :

- i) un biais de surveillance, la majorité des études ayant été réalisées dans les pays à revenu élevé.
- ii) le rôle de l'usage d'antibiotiques en élevage dans la colonisation par les EBLSE des éleveurs.

En effet, l'usage d'antibiotiques en élevage serait un facteur de risque de la colonisation par les bactéries résistantes aux antibiotiques chez les personnes en contact avec les animaux d'après une récente méta-analyse (Tang, Caffrey *et al.* 2017). Ceci était observé au Vietnam car si la colonisation par les EBLSE n'était pas supérieure pour les individus impliqués dans les soins animaux, l'usage d'antibiotiques chez les animaux le mois précédent était un facteur de risque de colonisation par les EBLSE des éleveurs (Nguyen, Jamrozy *et al.* 2019).

Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de comparer la prévalence de colonisation par les EBLSE des travailleurs impliqués dans l'élevage intensif avec la population générale à Madagascar et les communautés d'agriculteurs ruraux supposés utiliser peu d'antibiotiques (FAO 2016). Néanmoins, des incertitudes demeurent sur un usage moindre d'antibiotiques en élevage familial avec des situations variables selon les pays (Cuong, Padungtod *et al.* 2018). Un usage anarchique des antibiotiques en élevage, circulant sans prescription médicale, était suggéré à Madagascar, de même que la miniaturisation des doses utilisées (Michel Rakotoharinome, direction des services vétérinaires de Madagascar, communication personnelle, le 27 juin 2018).

## II.2. L'exposition environnementale aux fèces provenant de l'élevage

### ***Les preuves dans les pays à revenu élevé et intermédiaire de la tranche supérieure***

La proximité aux élevages n'a pas été identifiée comme un déterminant de la colonisation par les EBLSE des populations humaines au Danemark et aux Pays-Bas (Huijbers, de Kraker *et al.* 2013, Wielders, van Hoek *et al.* 2017).

Néanmoins, une forte concentration d'EBLSE dans les matières fécales provenant d'élevages intensifs de volailles et leur émission dans l'environnement était constatée en Allemagne (Laube, Friese *et al.* 2014). La prévalence d'EBLSE élevée en filières porcs et volailles à La Réunion ([chapitre 4](#)) et l'augmentation de la colonisation par les EBLSE des rats proches des élevages et/ou des terrains

## *Discussion Générale*

agricoles ([chapitre 5](#)) suggèrent la possibilité d'une contamination de l'environnement due à cette activité d'élevage sur l'île.

Les gènes CTX-M persistant jusqu'à une année dans le sol après l'épandage de lisier de bovin était observés en France (Hartmann, Locatelli *et al.* 2012). Les BMR étaient maintenues dans les nappes phréatiques plusieurs mois après l'épandage de lisier de porc indiquant leur dissémination dans les bassins versants (Byrne-Bailey, Gaze *et al.* 2009).

Selon Wellington, la majeure part des coliformes fécaux trouvés dans les bassins versants européens proviennent d'infiltrations après l'épandage de lisier (Wellington, Boxall *et al.* 2013). Ceci n'a pas été confirmé aux Pays-Bas où la contamination des eaux de surface par les EBLSE était liée au rejet d'eaux usées épurées d'origine domestique et non à une activité d'élevage (Dorado-Garcia, Smid *et al.* 2017).

Conséquemment, le niveau d'exposition de la population générale dans les territoires du SOOI possédant un élevage de type intensif devrait être évaluée. L'exposition environnementale aux EBLSE provenant de l'élevage pourrait être variable selon les populations humaines des territoires du SOOI en fonction : i) de l'urbanisation de l'île ; ii) de la présence de stations d'épuration des eaux usées de l'élevage (principalement à La Réunion et aux Seychelles).

### ***Les preuves dans les pays à revenu faible et intermédiaire de la tranche inférieure***

Peu d'études réalisées dans les pays à revenu modéré ou faible ont documenté les liens entre animaux d'élevage et contamination par les EBLSE de l'environnement. Nos résultats sur l'estimation d'une prévalence d'EBLSE en élevage intensif de porcs, de volailles et de bovins à viande à Madagascar ([chapitre 4](#)) suggèrent une probable contamination de l'environnement à proximité en l'absence de gestion des eaux usées provenant de l'élevage.

Outre l'élevage intensif, les résultats de l'approche holistique ([chapitre 6](#)) indiquent une prévalence d'EBLSE supérieure dans les ménages malgaches possédant un ou plusieurs porcs avec une probable exposition du ménage aux fèces des animaux. D'autre part, ils suggèrent un rôle de véhicule d'EBLSE

joué par l'eau avec l'identification de la pratique de la natation comme un déterminant de la colonisation par les EBLSE des hommes à Madagascar.

Ces résultats sont cohérents avec une étude menée en Tanzanie chez les populations humaines d'Arusha, mettant en évidence le partage de l'eau des hommes avec leurs animaux d'élevage et la faune sauvage comme l'un des facteurs de risque de colonisation par *E. coli* multi-résistantes aux antibiotiques (Caudell, Mair *et al.* 2018).

Ainsi, la contribution de l'eau contaminée par les animaux d'élevage dans la colonisation subséquente des hommes par les EBLSE devrait être mieux évaluée dans les territoires où l'élevage familial occupe une place importante.

En résumé, l'exposition environnementale de l'homme aux EBLSE provenant du compartiment animal d'élevage pourrait être variable entre les territoires du SOOI. L'intensification de la production animale, observée dans les pays à fort revenu du SOOI, est susceptible de constituer une source de pollution environnementale à proximité. La problématique de l'exposition humaine aux fèces provenant de l'élevage devrait être adressée en l'absence d'épuration des eaux usées de l'élevage ainsi que pour l'épandage de lisier et la contamination subséquentes des cultures (par exemple la production de légumes (Richter, Du Plessis *et al.* 2019)).

L'exposition à cette source pourrait être conséquente dans les pays à faible revenu. En effet, l'accès à l'eau potable reste difficile dans de nombreuses zones rurales, notamment dans l'Union des Comores et à Madagascar. Plus généralement à travers le monde plus de deux milliards de personnes consommeraient de l'eau de surface contaminée par les excréments (Bain, Cronk *et al.* 2014). Ainsi, la contamination de l'eau de surface par les élevages (familiaux et modernes) pourrait être un véhicule substantiel d'EBLSE dans les pays à bas revenus comme Madagascar ou l'Union des Comores. Cependant, la contribution de l'eau contaminée par des coliformes dans la colonisation subséquente des hommes et animaux par les EBLSE demeure à ce jour non quantifiée.

### II.3. La consommation de produits d'origine animale

#### ***Les preuves dans les pays à revenu élevé et intermédiaire de la tranche supérieure***

Les produits d'origine animale contiennent des quantités abondantes de bactéries ainsi que leurs gènes de résistance aux antibiotiques. Ces bactéries peuvent se multiplier ou survivre dans ces aliments, par exemple, l'espèce *E. coli* survit dans la viande de bœuf hachée conservée au frais de un à huit jours (Alexander, Inglis *et al.* 2010).

L'hypothèse d'une colonisation par les EBLSE dans la communauté humaine par la consommation de volailles était soulevée aux Pays-Bas en 2011 (Overdeest, Willemsen *et al.* 2011). La même étude a été remise en question par l'usage du séquençage qui apporte plus de précision que le typage par séquençage multilocus (de Been, Lanza *et al.* 2014, Overdeest, Heck *et al.* 2014). Malgré cela la viande de volaille reste une source probablement importante pour la transmission d'EBLSE vers l'homme (Lazarus, Paterson *et al.* 2015). Néanmoins, aux Pays-Bas l'exposition aux EBLSE de la population générale serait supérieure avec la consommation de bœuf, notamment le steak tartare (viande de bœuf crue) par rapport à un filet de poulet (Evers, Pielaat *et al.* 2017).

En résumé, la contribution des produits carnés dans la colonisation par les EBLSE de l'homme n'a pas été identifiée clairement et fait encore débat.

#### ***Les preuves dans les pays à revenu faible et intermédiaire de la tranche inférieure***

Une récente étude menée au Cambodge indiquait une transmission probable d'EBLSE par la consommation de volaille et de poisson séché (Nadimpalli, Vuthy *et al.* 2019). L'acquisition de gènes de résistances au chloramphénicol chez l'homme en communauté étant probablement liée à la consommation de produits carnés (Nadimpalli, Vuthy *et al.* 2019). En outre, une association entre les volumes de lait cru consommés et la colonisation par des *E. coli* résistantes aux antibiotiques chez les populations Massaï était identifiée (Caudell, Mair *et al.* 2018).

Or la sécurité sanitaire des aliments est rarement assurée dans les pays à revenu faible et intermédiaire de la tranche inférieure. Ainsi, en Malaisie, 48,8% des morceaux de poulet vendus sur les marchés de la ville de Selangor étaient contaminés par des *E. coli* BLSE en 2012-2013 (Aliyu,

Saleha *et al.* 2016). Au Kenya, 27,0% de viandes bovines vendues au détail étaient contaminées par des *E. coli* multi-résistantes aux antibiotiques (période de temps indéterminée) (Kariuki 2013).

Peu d'études documentent les niveaux de contamination par les EBLSE des aliments d'origine animale dans les pays à faible revenu suggérant un besoin de surveillance. Par ailleurs, la part de la colonisation par EBLSE chez l'homme attribuable à une alimentation d'origine animale reste mal connue.

La proportion de colonisation de l'homme par les EBLSE attribuable à l'alimentation carnée pourrait varier entre les territoires en fonction de leur niveau de sécurité sanitaire des aliments.

La sécurité sanitaire des aliments implique le contrôle des conditions d'élevage, de l'abattage et de la distribution du produit d'origine animale (par exemple, respect de la chaîne du froid et de l'hygiène chez les restaurateurs). A La Réunion, à Mayotte, à Maurice et aux Seychelles, des normes de sécurité sanitaire des aliments sont effectives, ainsi, l'exposition alimentaire aux EBLSE minime. Seule la consommation de produits animaux crus ou insuffisamment cuits pourrait présenter un risque pour la colonisation des hommes par les EBLSE en population dans ces territoires (par exemple la consommation de sushis (Vitas, Naik *et al.* 2018) et de steak tartare (Evers, Pielaat *et al.* 2017)).

Dans les pays à faible revenu, l'intensité et l'étendu de l'exposition aux EBLSE par voie alimentaire et le risque sanitaire subséquent de colonisation de l'homme pourrait être significativement supérieur. En effet, l'absence de chaîne du froid et de contrôle à l'abattage permet la prolifération bactérienne sous des températures extérieures élevées et de mesures d'hygiène précaires.

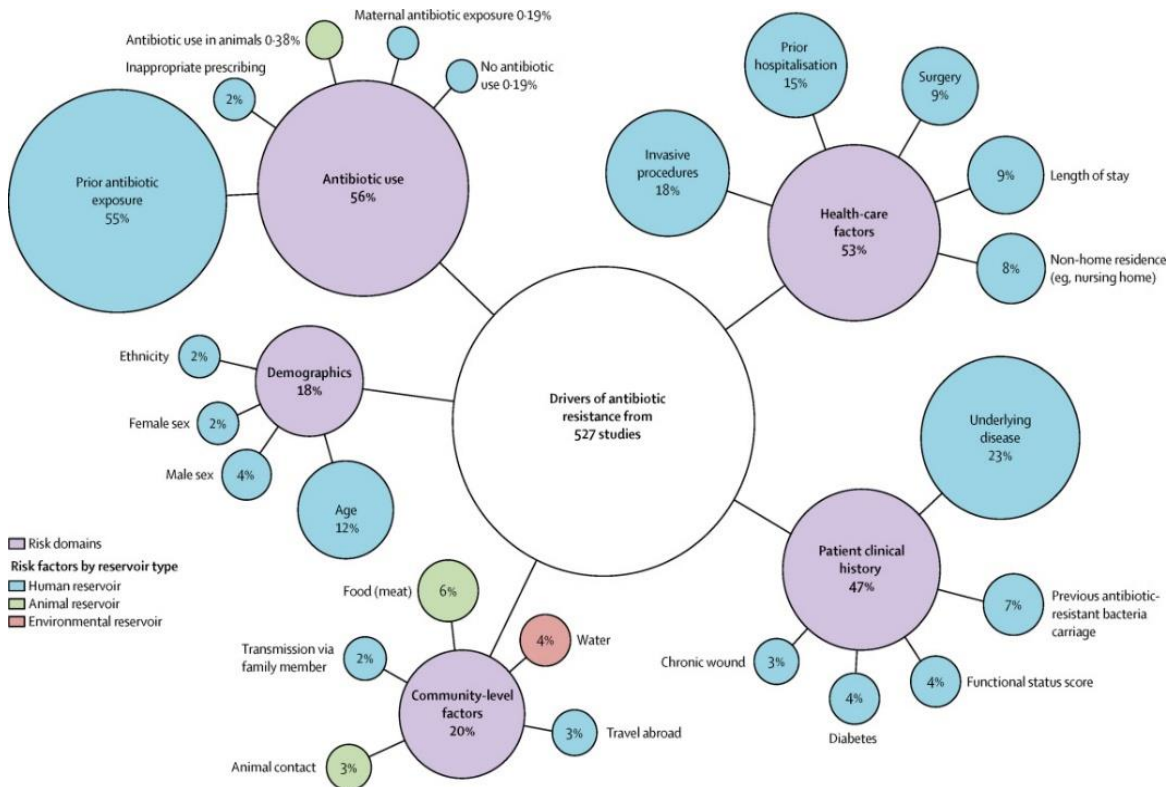
Quantitativement l'alimentation pourrait constituer une voie de transmission majeure d'EBLSE, et de BMR plus généralement, entre animaux et hommes (Capita and Alonso-Calleja 2013). Cette exposition des populations humaines étant supérieure dans les pays à faible revenu comme Madagascar ou les Comores en raison de l'absence de contrôle sanitaire dans les élevages, à l'abattage (mis en place à Madagascar, sans être systématique) et lors de la distribution des produits d'origine animale.



### III. Une stratégie de lutte contre la résistance bactérienne aux antibiotiques adaptée aux territoires

Le risque sanitaire pour la santé humaine lié directement ou indirectement au compartiment animal d'élevage pourrait être peu comparable entre territoires et zones géographiques. Si les voies possibles de transmission sont semblables quel que soit le contexte, l'intensité de l'exposition directe ou indirecte au réservoir animal d'EBLSE pourrait être significativement différente.

Dans les pays à revenu élevé, la colonisation par les EBLSE du compartiment humain en communauté semble majoritairement liée à la fréquentation d'établissement de soins (particulièrement les unités de soins intensifs), aux antécédents cliniques (par exemple la prise d'antibiotiques, certaines maladies chroniques, ou des actes particuliers de soin (pose d'un cathéter)) (figure 11), sans oublier la notion de voyages dans des pays à forte prévalence d'EBLSE au niveau communautaire, notamment ceux à revenu faible (McNulty, Lecky *et al.* 2018).



**Figure 10. Pourcentage d'études quantifiant les déterminants de l'antibiorésistance chez l'homme (Chatterjee, Modarai *et al.* 2018)**

Ainsi, la colonisation de l'homme par les EBLSE dans les pays à revenu élevé semble faiblement associée à l'exposition au réservoir animal d'élevage. Si le contact direct entre hommes et animaux entraînant des transferts d'EBLSE a été documenté, il reste finalement limité à des populations humaines spécifiques (catégories socio-professionnelles et zones géographiques). L'environnement pourrait être un véhicule d'EBLSE vers l'homme à partir du réservoir animal d'élevage, notamment via l'épandage de lisier ou en l'absence d'épuration de l'eau usée pour les élevages intensifs. Cependant, la contribution de cette voie de contamination à la colonisation humaine est peu connue. Finalement, la contamination par l'alimentation dans la colonisation de l'homme par les BMR fait encore débat avec des risques plus spécifiques pour les produits animaux non cuits.

La mise en place de mesures de régulation de l'usage d'antibiotiques en élevage a prouvé son efficacité en Europe (Dorado-Garcia, Mevius *et al.* 2016) même si l'inversion des tendances de l'antibiorésistance n'est pas nécessairement linéaire. Ceci doit être conjoint au maintien de conditions sanitaires convenables et à l'usage de la vaccination dans les élevages pour prévenir les infections bactériennes.

Dans les pays à revenu faible, l'acquisition de bactéries résistantes aux antibiotiques pourrait être principalement liée à une exposition aux EBLSE communautaire, environnementale ou alimentaire, auquel s'ajoutent les risques d'acquisition d'EBLSE liés aux soins hospitaliers des hommes. Cet accès aux soins hospitaliers pourrait ne constituer qu'une source secondaire de colonisation par les EBLSE en communauté dans les pays à faible revenu.

Ainsi, la colonisation de l'homme par les EBLSE associée à l'exposition au réservoir animal d'élevage pourrait être supérieure dans ces pays. En effet, le contact direct entre les animaux d'élevage et les hommes est davantage susceptible de survenir dans des communautés où l'élevage familial est commun. Deux voies majeures de transmission d'EBLSE du réservoir animal d'élevage apparaissent particulièrement pertinentes en pays à revenu faible. La première voie de transmission est liée à l'absence de contrôle de la contamination de l'environnement et de l'eau de surface par les fèces des animaux. En l'absence de système d'assainissement par le retraitement des eaux usées et d'accès à l'eau potable, cette exposition environnementale aux EBLSE pourrait être

## Discussion Générale

substantielle mais encore mal appréhendée. La seconde voie de transmission est liée à l'absence de sécurité sanitaire des aliments. La transmission de bactéries résistantes aux antibiotiques via la consommation de légumes contaminés et de produits d'origine animale pourrait être conséquente. L'accroissement de la demande en produits animaux, lié à l'urbanisation, la croissance démographique et l'élévation des niveaux de vie dans les pays à revenu modéré ou faible, conduit à une intensification de l'élevage (Laxminarayan and Chaudhury 2016). Cette demande est à mettre en parallèle de mesures de biosécurité dans les élevages et de contrôles sanitaires à l'abattage limités ou absents.

En résumé, les résultats de la thèse suggèrent que les stratégies de contrôle doivent aller au-delà de la seule réduction de l'usage d'antibiotiques, stratégie adoptée prioritairement dans les pays à fort revenu. Ainsi, l'accès à l'eau potable, l'assainissement, l'hygiène et la sécurité sanitaire des aliments semblent être des clés de voute pour la gestion du risque sanitaire lié à la résistance aux antibiotiques dans les territoires où la [transition épidémiologique](#) n'a pas été atteinte.

Ce travail de thèse met en exergue la nécessité d'étudier des dynamiques épidémiologiques de transmission de BMR probablement plus complexes dans les pays à faible revenu. Des axes de recherche sont suggérées dans la dernière partie, [les perspectives](#), de ce manuscrit.



**Officine commercialisant des antibiotiques à usage vétérinaire, Madagascar 2018**

## Les perspectives

Le travail réalisé est la première tentative de quantification du fardeau sanitaire des EBLSE dans l'océan Indien avec une approche One Health. Cette thèse suggère une contribution majeure du compartiment animal d'élevage à la problématique globale des EBLSE dans la zone du SOOI (nécessité d'investigations complémentaires dans l'Union des Comores, Maurice et aux Seychelles).

Désormais la contribution relative des animaux d'élevage dans la contamination par les EBLSE de l'homme en communauté reste à estimer clairement dans différents contextes géographiques et particulièrement dans des systèmes tropicaux plus complexes.

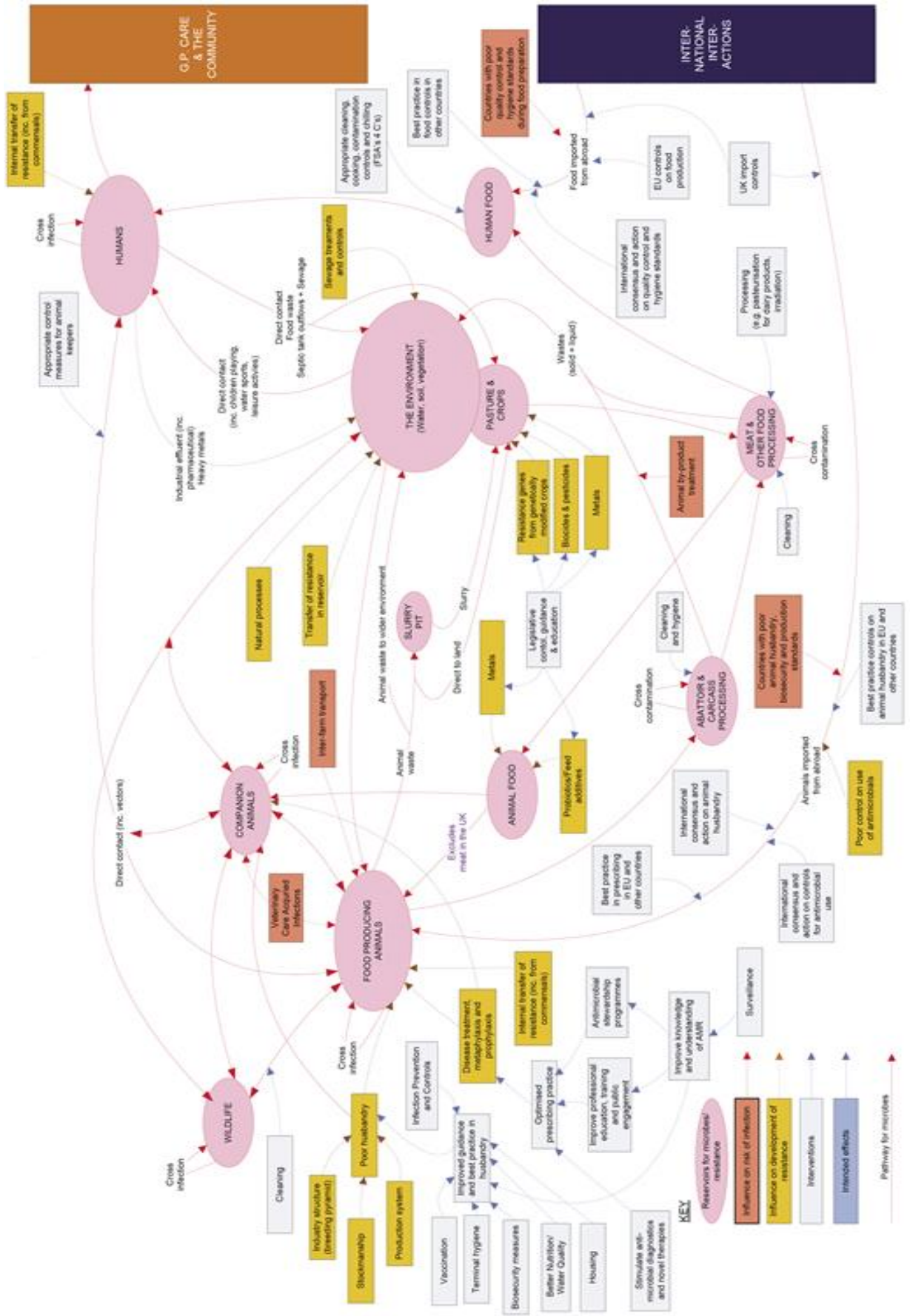
Une perspective à ce travail de thèse consistera à caractériser les gènes, les plasmides et les génomes bactériens de l'étude transversale à Madagascar pour en inférer des hypothèses sur les voies majeures de transmission entre compartiments.

Dans les années à venir, des travaux de recherche devront être entrepris pour :

- 1) Estimer la colonisation par les EBLSE de chaque compartiment et suivre sa dynamique dans le temps et l'espace.
- 2) Estimer la contribution relative de chaque voie de transmission d'EBLSE dans la colonisation de l'homme en communauté dans différents contextes géographiques.

Au vu de la diversité des voies potentielles de transmission d'Entérobactéries résistantes aux antibiotiques (figure 12), la part relative des facteurs suivants dans la colonisation humaine entre territoires pourrait être estimée : soins médicaux, alimentation, eau de consommation, assainissement et hygiène.

Figure 11. Flux de transmission potentiels de bactéries résistantes aux antibiotiques entre compartiments (UK 2014)



En ce sens, le SOOI constitue une zone d'intérêt pour les études épidémiologiques comparatives sur la résistance bactérienne aux antibiotiques avec un panel de contextes sanitaires incluant divers niveaux d'accès à l'eau potable, d'assainissement, de régulation de l'usage des antibiotiques ou encore de sécurité sanitaire des aliments.

Une analyse de risque de la colonisation humaine par les EBLSE tenant compte des niveaux d'émission et d'exposition aux EBLSE provenant de l'élevage devrait être réalisée dans la zone insulaire du SOOI.

De ces connaissances découlera une meilleure adaptation des stratégies de contrôle de l'antibiorésistance dans les territoires du SOOI et plus généralement dans les territoires à faible revenu qui pourraient être des amplificateurs de ce phénomène sanitaire.



## Références

- Abejew, A. A., A. A. Denboba and A. G. Mekonnen (2014). "Prevalence and antibiotic resistance pattern of urinary tract bacterial infections in Dessie area, North-East Ethiopia." BMC Res Notes **7**: 687.
- Abraham, E. P. and E. Chain (1988). "An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940." Rev Infect Dis **10**(4): 677-678.
- Adler, A., N. Sturlesj, N. Fallach, D. Zilberman-Barzilai, O. Hussein, S. E. Blum, E. Klement, M. J. Schwaber and Y. Carmeli (2015). "Prevalence, Risk Factors, and Transmission Dynamics of Extended-Spectrum-beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: a National Survey of Cattle Farms in Israel in 2013." J Clin Microbiol **53**(11): 3515-3521.
- AGISAR (2018). "WHO Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (AGISAR) Report of the 7th meeting." Geneva: World Health Organization.
- Aires-de-Sousa, M. (2017). "Methicillin-resistant Staphylococcus aureus among animals: current overview." Clin Microbiol Infect **23**(6): 373-380.
- Alevizakos, M., S. Karanika, M. Detsis and E. Mylonakis (2016). "Colonisation with extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae and risk for infection among patients with solid or haematological malignancy: a systematic review and meta-analysis." Int J Antimicrob Agents **48**(6): 647-654.
- Alexander, T. W., G. D. Inglis, L. J. Yanke, E. Topp, R. R. Read, T. Reuter and T. A. McAllister (2010). "Farm-to-fork characterization of Escherichia coli associated with feedlot cattle with a known history of antimicrobial use." Int J Food Microbiol **137**(1): 40-48.
- Aliyu, A. B., A. A. Saleha, A. Jalila and Z. Zunita (2016). "Risk factors and spatial distribution of extended spectrum beta-lactamase-producing- Escherichia coli at retail poultry meat markets in Malaysia: a cross-sectional study." BMC Public Health **16**: 699.
- Alnajar, S. and R. S. Gupta (2017). "Phylogenomics and comparative genomic studies delineate six main clades within the family Enterobacteriaceae and support the reclassification of several polyphyletic members of the family." Infect Genet Evol **54**: 108-127.
- Alvarez-Uria, G., S. Gandra and R. Laxminarayan (2016). "Poverty and prevalence of antimicrobial resistance in invasive isolates." Int J Infect Dis **52**: 59-61.
- Amos, G. C., P. M. Hawkey, W. H. Gaze and E. M. Wellington (2014). "Waste water effluent contributes to the dissemination of CTX-M-15 in the natural environment." J Antimicrob Chemother **69**(7): 1785-1791.
- ANSES (2016). "Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2015." Anses rapport annuel.
- ANSES (2018). "Résapath, réseau d'épidémiologie de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales, bilan 2017." 155 pages.



## Références

- Arnaud (2018). "Surveillance du réseau de surveillance des bactéries multirésistantes aux antibiotiques (BMR) de 2012 à 2016." Bulletin national CPIas **10**.
- Asaduzzaman, M. (2018). "Antimicrobial resistance: an urgent need for a planetary and ecosystem approach." Lancet Planet Health **2**(3): e99-e100.
- Bain, R., R. Cronk, R. Hossain, S. Bonjour, K. Onda, J. Wright, H. Yang, T. Slaymaker, P. Hunter, A. Pruss-Ustun and J. Bartram (2014). "Global assessment of exposure to faecal contamination through drinking water based on a systematic review." Trop Med Int Health **19**(8): 917-927.
- Bauernfeind, A., H. Grimm and S. Schweighart (1990). "A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*." Infection **18**(5): 294-298.
- Bevan, E. R., A. M. Jones and P. M. Hawkey (2017). "Global epidemiology of CTX-M beta-lactamases: temporal and geographical shifts in genotype." J Antimicrob Chemother **72**(8): 2145-2155.
- Blaak, H., A. H. van Hoek, R. A. Hamidjaja, R. Q. van der Plaats, L. Kerkhof-de Heer, A. M. de Roda Husman and F. M. Schets (2015). "Distribution, Numbers, and Diversity of ESBL-Producing *E. coli* in the Poultry Farm Environment." PLoS One **10**(8): e0135402.
- Bonnet, R. (2004). "Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes." Antimicrob Agents Chemother **48**(1): 1-14.
- Bortolaia, V., L. Guardabassi, M. Trevisani, M. Bisgaard, L. Venturi and A. M. Bojesen (2010). "High diversity of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates from Italian broiler flocks." Antimicrob Agents Chemother **54**(4): 1623-1626.
- Boyd, D. A., S. Tyler, S. Christianson, A. McGeer, M. P. Muller, B. M. Willey, E. Bryce, M. Gardam, P. Nordmann and M. R. Mulvey (2004). "Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada." Antimicrob Agents Chemother **48**(10): 3758-3764.
- Brower, C. H., S. Mandal, S. Hayer, M. Sran, A. Zehra, S. J. Patel, R. Kaur, L. Chatterjee, S. Mishra, B. R. Das, P. Singh, R. Singh, J. P. S. Gill and R. Laxminarayan (2017). "The Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Multidrug-Resistant *Escherichia Coli* in Poultry Chickens and Variation According to Farming Practices in Punjab, India." Environ Health Perspect **125**(7): 077015.
- Brown, E. D. and G. D. Wright (2016). "Antibacterial drug discovery in the resistance era." Nature **529**(7586): 336-343.
- Byrne-Bailey, K. G., W. H. Gaze, P. Kay, A. B. Boxall, P. M. Hawkey and E. M. Wellington (2009). "Prevalence of sulfonamide resistance genes in bacterial isolates from manured agricultural soils and pig slurry in the United Kingdom." Antimicrob Agents Chemother **53**(2): 696-702.
- Campos, J., J. Mourao, L. Silveira, M. Saraiva, C. B. Correia, A. P. Macas, L. Peixe and P. Antunes (2018). "Imported poultry meat as a source of extended-spectrum cephalosporin-resistant CMY-2-producing *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Minnesota in the European Union, 2014-2015." Int J Antimicrob Agents **51**(1): 151-154.
- Cantón, R., M. Akóva, Y. Carmeli, C. G. Giske, Y. Glupczynski, M. Gniadkowski, D. M. Livermore, V. Miriagou, T. Naas, G. M. Rossolini, Ø. Samuelsen, H. Seifert, N. Woodford, P. Nordmann and E. N. o.

- Carbapenemases (2012). "Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe." Clin Microbiol Infect **18**(5): 413-431.
- Capita, R. and C. Alonso-Calleja (2013). "Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry." Crit Rev Food Sci Nutr **53**(1): 11-48.
- Carattoli, A. (2009). "Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae." Antimicrob Agents Chemother **53**(6): 2227-2238.
- Carattoli, A. (2011). "Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids." Int J Med Microbiol **301**(8): 654-658.
- Carattoli, A. (2013). "Plasmids and the spread of resistance." Int J Med Microbiol **303**(6-7): 298-304.
- Carattoli, A., L. Villa, D. Fortini and A. Garcia-Fernandez (2018). "Contemporary IncI1 plasmids involved in the transmission and spread of antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae." Plasmid.
- Casella, T., M. C. L. Nogueira, E. Saras, M. Haenni and J. Y. Madec (2017). "High prevalence of ESBLs in retail chicken meat despite reduced use of antimicrobials in chicken production, France." Int J Food Microbiol **257**: 271-275.
- Caudell, M. A., C. Mair, M. Subbiah, L. Matthews, R. J. Quinlan, M. B. Quinlan, R. Zadoks, J. Keyyu and D. R. Call (2018). "Identification of risk factors associated with carriage of resistant Escherichia coli in three culturally diverse ethnic groups in Tanzania: a biological and socioeconomic analysis." Lancet Planet Health **2**(11): e489-e497.
- Cavallo, J. D., Fabre, R., Jehl, F., Rapp, C., Garrabé, E. (2004). "Bêtalactamines " EMC - Maladies Infectieuses **1**: 129-202.
- Chatterjee, A., M. Modarai, N. R. Naylor, S. E. Boyd, R. Atun, J. Barlow, A. H. Holmes, A. Johnson and J. V. Robotham (2018). "Quantifying drivers of antibiotic resistance in humans: a systematic review." Lancet Infect Dis **18**(12): e368-e378.
- Chen, B., K. Yuan, X. Chen, Y. Yang, T. Zhang, Y. Wang, T. Luan, S. Zou and X. Li (2016). "Metagenomic Analysis Revealing Antibiotic Resistance Genes (ARGs) and Their Genetic Compartments in the Tibetan Environment." Environ Sci Technol **50**(13): 6670-6679.
- COI (2015). Rapport annuel 2015.
- Coque, T. M., F. Baquero and R. Canton (2008). "Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe." Euro Surveill **13**(47).
- Coque, T. M., A. Novais, A. Carattoli, L. Poirel, J. Pitout, L. Peixe, F. Baquero, R. Cantón and P. Nordmann (2008). "Dissemination of clonally related Escherichia coli strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15." Emerg Infect Dis **14**(2): 195-200.
- Cornejo-Juarez, P., J. A. Suarez-Cuenca, P. Volkow-Fernandez, J. Silva-Sanchez, H. Barrios-Camacho, E. Najera-Leon, C. Velazquez-Acosta and D. Vilar-Compte (2016). "Fecal ESBL Escherichia coli carriage as a risk factor for bacteremia in patients with hematological malignancies." Support Care Cancer **24**(1): 253-259.
- Cortes, P., V. Blanc, A. Mora, G. Dahbi, J. E. Blanco, M. Blanco, C. Lopez, A. Andreu, F. Navarro, M. P. Alonso, G. Bou, J. Blanco and M. Llagostera (2010). "Isolation and characterization of potentially

## Références

pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain." Appl Environ Microbiol **76**(9): 2799-2805.

Cottell, J. L., M. A. Webber and L. J. Piddock (2012). "Persistence of transferable extended-spectrum-beta-lactamase resistance in the absence of antibiotic pressure." Antimicrob Agents Chemother **56**(9): 4703-4706.

Cox, J. M. and A. Pavic (2010). "Advances in enteropathogen control in poultry production." J Appl Microbiol **108**(3): 745-755.

CPIAS-Reunion (2016). "Réseau de surveillance régional des résistances au antibiotiques La Réunion, 2016." 48.

Cuong, N. V., P. Padungtod, G. Thwaites and J. J. Carrique-Mas (2018). "Antimicrobial Usage in Animal Production: A Review of the Literature with a Focus on Low- and Middle-Income Countries." Antibiotics (Basel) **7**(3).

D'Andrea, M. M., F. Arena, L. Pallecchi and G. M. Rossolini (2013). "CTX-M-type beta-lactamases: a successful story of antibiotic resistance." Int J Med Microbiol **303**(6-7): 305-317.

D'Costa, V. M., C. E. King, L. Kalan, M. Morar, W. W. Sung, C. Schwarz, D. Froese, G. Zazula, F. Calmels, R. Debruyne, G. B. Golding, H. N. Poinar and G. D. Wright (2011). "Antibiotic resistance is ancient." Nature **477**(7365): 457-461.

Dahms, C., N. O. Hubner, A. Kossow, A. Mellmann, K. Dittmann and A. Kramer (2015). "Occurrence of ESBL-Producing *Escherichia coli* in Livestock and Farm Workers in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany." PLoS One **10**(11): e0143326.

de Been, M., V. F. Lanza, M. de Toro, J. Scharringa, W. Dohmen, Y. Du, J. Hu, Y. Lei, N. Li, A. Tooming-Klunderud, D. J. Heederik, A. C. Fluit, M. J. Bonten, R. J. Willems, F. de la Cruz and W. van Schaik (2014). "Dissemination of cephalosporin resistance genes between *Escherichia coli* strains from farm animals and humans by specific plasmid lineages." PLoS Genet **10**(12): e1004776.

Decousser, J. W., L. Poirel and P. Nordmann (2001). "Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A beta-lactamase from *Kluyvera cryocrescens*." Antimicrob Agents Chemother **45**(12): 3595-3598.

DGAL (2011). "Mayotte: Synthèse illustrée du recensement agricole 2010."

Dierikx, C., A. van Essen-Zandbergen, K. Veldman, H. Smith and D. Mevius (2010). "Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry." Vet Microbiol **145**(3-4): 273-278.

Dierikx, C. M., J. A. van der Goot, H. E. Smith, A. Kant and D. J. Mevius (2013). "Presence of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in the broiler production pyramid: a descriptive study." PLoS One **8**(11): e79005.

Dierikx, C. M., E. van Duijkeren, A. H. Schoormans, A. van Essen-Zandbergen, K. Veldman, A. Kant, X. W. Huijsdens, K. van der Zwaluw, J. A. Wagenaar and D. J. Mevius (2012). "Occurrence and characteristics of extended-spectrum-beta-lactamase- and AmpC-producing clinical isolates derived from companion animals and horses." J Antimicrob Chemother **67**(6): 1368-1374.

- Diwan, V., S. P. Chandran, A. J. Tamhankar, C. Stalsby Lundborg and R. Macaden (2012). "Identification of extended-spectrum beta-lactamase and quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from hospital wastewater from central India." J Antimicrob Chemother **67**(4): 857-859.
- Dohmen, W., M. J. Bonten, M. E. Bos, S. van Marm, J. Scharringa, J. A. Wagenaar and D. J. Heederik (2015). "Carriage of extended-spectrum beta-lactamases in pig farmers is associated with occurrence in pigs." Clin Microbiol Infect **21**(10): 917-923.
- Dohmen, W., A. Dorado-Garcia, M. J. Bonten, J. A. Wagenaar, D. Mevius and D. J. Heederik (2017). "Risk factors for ESBL-producing *Escherichia coli* on pig farms: A longitudinal study in the context of reduced use of antimicrobials." PLoS One **12**(3): e0174094.
- Donkor, E. S., M. J. Newman and D. Yeboah-Manu (2012). "Epidemiological aspects of non-human antibiotic usage and resistance: implications for the control of antibiotic resistance in Ghana." Trop Med Int Health **17**(4): 462-468.
- Dorado-Garcia, A., D. J. Mevius, J. J. Jacobs, I. M. Van Geijlswijk, J. W. Mouton, J. A. Wagenaar and D. J. Heederik (2016). "Quantitative assessment of antimicrobial resistance in livestock during the course of a nationwide antimicrobial use reduction in the Netherlands." J Antimicrob Chemother **71**(12): 3607-3619.
- Dorado-Garcia, A., J. H. Smid, W. van Pelt, M. J. M. Bonten, A. C. Fluit, G. van den Bunt, J. A. Wagenaar, J. Hordijk, C. M. Dierikx, K. T. Veldman, A. de Koeijer, W. Dohmen, H. Schmitt, A. Liakopoulos, E. Pacholewicz, T. Lam, A. G. Velthuis, A. Heuvelink, M. A. Gonggrijp, E. van Duijkeren, A. van Hoek, A. M. de Roda Husman, H. Blaak, A. H. Havelaar, D. J. Mevius and D. J. J. Heederik (2017). "Molecular relatedness of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from humans, animals, food and the environment: a pooled analysis." J Antimicrob Chemother.
- El Sayed, F., G. Sapriel, N. Fawal, A. Gruber, T. Bauer, B. Heym, C. Dupont, H. J. Garchon, J. L. Gaillard, M. Rottman and S. Le Hello (2018). "In-Host Adaptation of *Salmonella enterica* Serotype Dublin during Prosthetic Hip Joint Infection." Emerg Infect Dis **24**(12): 2360-2363.
- EUCAST (2015). "Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie." Société Française de Microbiologie.
- Evers, E. G., A. Pielaat, J. H. Smid, E. van Duijkeren, F. B. Vennemann, L. M. Wijnands and J. E. Chardon (2017). "Comparative Exposure Assessment of ESBL-Producing *Escherichia coli* through Meat Consumption." PLoS One **12**(1): e0169589.
- Ewers, C., A. Bethe, T. Semmler, S. Guenther and L. H. Wieler (2012). "Extended-spectrum beta-lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective." Clin Microbiol Infect **18**(7): 646-655.
- Falgenhauer, L., C. Imirzalioglu, K. Oppong, C. W. Akenten, B. Hogan, R. Krumkamp, S. Poppert, V. Levermann, O. Schwengers, N. Sarpong, E. Owusu-Dabo, J. May and D. Eibach (2018). "Detection and Characterization of ESBL-Producing *Escherichia coli* From Humans and Poultry in Ghana." Front Microbiol **9**: 3358.

## Références

- FAO (2016). Drivers, dynamics and epidemiology of antimicrobial resistances in animal production, Food and Agriculture Organization, Rome, Italy.
- FAO, O., WHO (2016). "Antimicrobial Resistance: A manual for developing national action plans."
- FAO, O., WHO, INSIC, UNICEF, WB (2008). "Contributing to One World, One Health: A Strategic Framework for Reducing Risks of Infectious Diseases at the Animal–Human–Ecosystems Interface."
- Faye, B. (2001). "Le rôle de l'élevage dans la lutte contre la pauvreté." *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.* **54**(3-4): 231-238.
- FELIN (2015). "RESEAU DE SURVEILLANCE REGIONAL DES RESISTANCES AUX ANTIBIOTIQUES LA REUNION."
- Fitzpatrick, D. and F. Walsh (2016). "Antibiotic resistance genes across a wide variety of metagenomes." *FEMS Microbiol Ecol* **92**(2).
- Foley EG, L. S., Hartley NJ (1946). "The effect of penicillin on staphylococci and streptococci commonly associated with bovine mastitis." *J Food Technol* **8**(129–133).
- Gay, N., O. Belmonte, J. M. Collard, M. Halifa, M. I. Issack, S. Mindjae, P. Palmyre, A. A. Ibrahim, H. Rasamoelina, L. Flachet, L. Filleul and E. Cardinale (2017). "Review of Antibiotic Resistance in the Indian Ocean Commission: A Human and Animal Health Issue." *Front Public Health* **5**: 162.
- Grall, N., V. Lazarevic, N. Gaia, C. Couffignal, C. Laouenan, E. Ilic-Habensus, I. Wieder, P. Plesiat, C. Angebault, M. E. Bougnoux, L. Armand-Lefevre, A. Andremont, X. Duval and J. Schrenzel (2017). "Unexpected persistence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in the faecal microbiota of hospitalised patients treated with imipenem." *Int J Antimicrob Agents* **50**(1): 81-87.
- Grami, R., W. Mansour, W. Mehri, O. Bouallegue, N. Boujaafar, J. Y. Madec and M. Haenni (2016). "Impact of food animal trade on the spread of mcr-1-mediated colistin resistance, Tunisia, July 2015." *Euro Surveill* **21**(8): 30144.
- Guenther, S., J. Wuttke, A. Bethe, J. Vojtech, K. Schaufler, T. Semmler, R. G. Ulrich, L. H. Wieler and C. Ewers (2013). "Is fecal carriage of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in urban rats a risk for public health?" *Antimicrob Agents Chemother* **57**(5): 2424-2425.
- Guerin, P. J., R. F. Grais, J. A. Rottingen, A. J. Valleron and G. Shigella Study (2007). "Using European travellers as an early alert to detect emerging pathogens in countries with limited laboratory resources." *BMC Public Health* **7**: 8.
- Guernier, V., E. Lagadec, C. Cordonin, G. Le Minter, Y. Gomard, F. Pages, M. C. Jaffar-Bandjee, A. Michault, P. Tortosa and K. Dellagi (2016). "Human Leptospirosis on Reunion Island, Indian Ocean: Are Rodents the (Only) Ones to Blame?" *PLoS Negl Trop Dis* **10**(6): e0004733.
- Hammerum, A. M., J. Larsen, V. D. Andersen, C. H. Lester, T. S. Skovgaard Skytte, F. Hansen, S. S. Olsen, H. Mordhorst, R. L. Skov, F. M. Aarestrup and Y. Agero (2014). "Characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* obtained from Danish pigs, pig farmers and their families from farms with high or no consumption of third- or fourth-generation cephalosporins." *J Antimicrob Chemother* **69**(10): 2650-2657.

- Hartmann, A., A. Locatelli, L. Amoureux, G. Depret, C. Jolivet, E. Gueneau and C. Neuwirth (2012). "Occurrence of CTX-M Producing *Escherichia coli* in Soils, Cattle, and Farm Environment in France (Burgundy Region)." Front Microbiol **3**: 83.
- Hawkey, P. M. (2008). "Prevalence and clonality of extended-spectrum beta-lactamases in Asia." Clin Microbiol Infect **14 Suppl 1**: 159-165.
- Hawkey, P. M. (2018). "The 2017 Garrod Lecture: Genes, guts and globalization." J Antimicrob Chemother **73**(10): 2589-2600.
- Hawkey, P. M. and A. M. Jones (2009). "The changing epidemiology of resistance." J Antimicrob Chemother **64 Suppl 1**: i3-10.
- HCSP (2010). "Dépistage du portage digestif des bactéries commensales multirésistantes aux antibiotiques importées en France à l'occasion du rapatriement de patients en provenance de l'étranger et maîtrise de leur diffusion." Haut Conseil de la Santé Publique: 37 pages.
- Hiroi, M., F. Yamazaki, T. Harada, N. Takahashi, N. Iida, Y. Noda, M. Yagi, T. Nishio, T. Kanda, F. Kawamori, K. Sugiyama, T. Masuda, Y. Hara-Kudo and N. Ohashi (2012). "Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in food-producing animals." J Vet Med Sci **74**(2): 189-195.
- Hordijk, J., D. J. Mevius, A. Kant, M. E. H. Bos, H. Graveland, A. B. Bosman, C. M. Hartskeerl, D. J. J. Heederik and J. A. Wagenaar (2013). "Within-farm dynamics of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in veal calves: a longitudinal approach." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **68**(11): 2468-2476.
- Huijbers, P. M., M. de Kraker, E. A. Graat, A. H. van Hoek, M. G. van Santen, M. C. de Jong, E. van Duijkeren and S. C. de Greeff (2013). "Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in humans living in municipalities with high and low broiler density." Clin Microbiol Infect **19**(6): E256-259.
- Huijbers, P. M., E. A. Graat, A. P. Haenen, M. G. van Santen, A. van Essen-Zandbergen, D. J. Mevius, E. van Duijkeren and A. H. van Hoek (2014). "Extended-spectrum and AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in broilers and people living and/or working on broiler farms: prevalence, risk factors and molecular characteristics." J Antimicrob Chemother **69**(10): 2669-2675.
- Humeniuk, C., G. Arlet, V. Gautier, P. Grimont, R. Labia and A. Philippon (2002). "Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types." Antimicrob Agents Chemother **46**(9): 3045-3049.
- Hurd, H. S., J. D. McKean, R. W. Griffith, I. V. Wesley and M. H. Rostagno (2002). "Salmonella enterica infections in market swine with and without transport and holding." Appl Environ Microbiol **68**(5): 2376-2381.
- Huynh, B. T., M. Padget, B. Garin, P. Herindrainy, E. Kermorvant-Duchemin, L. Watier, D. Guillemot and E. Delarocque-Astagneau (2015). "Burden of bacterial resistance among neonatal infections in low income countries: how convincing is the epidemiological evidence?" BMC Infect Dis **15**: 127.
- IACG (2018). "Surveillance and monitoring for antimicrobial use and resistance."

## Références

- INSEE (2016). "Évolution de la population totale au 1er janvier 2015. [Estimates of the total population as of 1 January 2015].".
- Jazmati, N., R. Hein and A. Hamprecht (2016). "Use of an Enrichment Broth Improves Detection of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Clinical Stool Samples." J Clin Microbiol **54**(2): 467-470.
- Jevons (1961). "Celbenin-resistant staphylococci." Br Med J **1**: 124-125.
- Kahn, L. H. (2006). "Confronting zoonoses, linking human and veterinary medicine." Emerg Infect Dis **12**(4): 556-561.
- Kariuki, S., Onsare, R., Mwituria, J., Ng'etich, R., Nafula, C., Karimi, K., Karimi, P., Njeruh, F., Irungu, P. & Mitema, E (2013). "FAO/WHO Project Report. Improving Food Safety in Meat Value Chains in Kenya. ." Food Protection Trends: 172-179.
- Knothe, H., P. Shah, V. Krcmery, M. Antal and S. Mitsuhashi (1983). "Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens." Infection **11**(6): 315-317.
- Kozak, G. K., P. Boerlin, N. Janecko, R. J. Reid-Smith and C. Jardine (2009). "Antimicrobial resistance in Escherichia coli isolates from swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada." Appl Environ Microbiol **75**(3): 559-566.
- Lagadec, E., Y. Gomard, G. Le Minter, C. Cordonin, E. Cardinale, B. Ramasindrazana, M. Dietrich, S. M. Goodman, P. Tortosa and K. Dellagi (2016). "Identification of Tenrec ecaudatus, a Wild Mammal Introduced to Mayotte Island, as a Reservoir of the Newly Identified Human Pathogenic Leptospira mayottensis." PLoS Negl Trop Dis **10**(8): e0004933.
- Laube, H., A. Friese, C. von Salviati, B. Guerra and U. Rosler (2014). "Transmission of ESBL/AmpC-producing Escherichia coli from broiler chicken farms to surrounding areas." Vet Microbiol **172**(3-4): 519-527.
- Laxminarayan, R. and R. R. Chaudhury (2016). "Antibiotic Resistance in India: Drivers and Opportunities for Action." PLoS Med **13**(3): e1001974.
- Lazarus, B., D. L. Paterson, J. L. Mollinger and B. A. Rogers (2015). "Do human extraintestinal Escherichia coli infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins originate from food-producing animals? A systematic review." Clin Infect Dis **60**(3): 439-452.
- Leverstein-van Hall, M. A., C. M. Dierikx, J. Cohen Stuart, G. M. Voets, M. P. van den Munckhof, A. van Essen-Zandbergen, T. Platteel, A. C. Fluit, N. van de Sande-Bruinsma, J. Scharinga, M. J. Bonten, D. J. Mevius and E. s. g. National (2011). "Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains." Clin Microbiol Infect **17**(6): 873-880.
- Li, Q., Y. Zhu, K. Yin, L. Xu, C. Yin, Y. Li, J. Ren, Y. Yuan and X. Jiao (2019). "Purification of recombinant IpaJ to develop an indirect ELISA-based method for detecting Salmonella enterica serovar Pullorum infections in chickens." BMC Vet Res **15**(1): 3.
- Ligon, B. L. (2004). "Penicillin: its discovery and early development." Semin Pediatr Infect Dis **15**(1): 52-57.

- Liu, Y. Y., Y. Wang, T. R. Walsh, L. X. Yi, R. Zhang, J. Spencer, Y. Doi, G. Tian, B. Dong, X. Huang, L. F. Yu, D. Gu, H. Ren, X. Chen, L. Lv, D. He, H. Zhou, Z. Liang, J. H. Liu and J. Shen (2016). "Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study." *Lancet Infect Dis* **16**(2): 161-168.
- Loftie-Eaton, W., K. Bashford, H. Quinn, K. Dong, J. Millstein, S. Hunter, M. K. Thomason, H. Merrikh, J. M. Ponciano and E. M. Top (2017). "Compensatory mutations improve general permissiveness to antibiotic resistance plasmids." *Nat Ecol Evol* **1**(9): 1354-1363.
- Madec, J. Y. and M. Haenni (2018). "Antimicrobial resistance plasmid reservoir in food and food-producing animals." *Plasmid* **99**: 72-81.
- Magiorakos, A. P., A. Srinivasan, R. B. Carey, Y. Carmeli, M. E. Falagas, C. G. Giske, S. Harbarth, J. F. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olsson-Liljequist, D. L. Paterson, L. B. Rice, J. Stelling, M. J. Struelens, A. Vatopoulos, J. T. Weber and D. L. Monnet (2012). "Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance." *Clin Microbiol Infect* **18**(3): 268-281.
- Marcade, G., C. Deschamps, A. Boyd, V. Gautier, B. Picard, C. Branger, E. Denamur and G. Arlet (2009). "Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases." *J Antimicrob Chemother* **63**(1): 67-71.
- Martinez, J. L. (2009). "The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria." *Proc Biol Sci* **276**(1667): 2521-2530.
- Matsumoto, Y., F. Ikeda, T. Kamimura, Y. Yokota and Y. Mine (1988). "Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins." *Antimicrob Agents Chemother* **32**(8): 1243-1246.
- Mattern, C. (2017). "Le marché informel du médicament à Madagascar : une revanche populaire." *Université catholique de Louvain*.
- McNulty, C. A. M., D. M. Lecky, L. Xu-McCrae, D. Nakiboneka-Ssenabulya, K. T. Chung, T. Nichols, H. L. Thomas, M. Thomas, A. Alvarez-Buylla, K. Turner, S. Shabir, S. Manzoor, S. Smith, L. Crocker and P. M. Hawkey (2018). "CTX-M ESBL-producing Enterobacteriaceae: estimated prevalence in adults in England in 2014." *J Antimicrob Chemother* **73**(5): 1368-1388.
- Mead, G. C., W. R. Hudson and M. H. Hinton (1995). "Effect of changes in processing to improve hygiene control on contamination of poultry carcasses with campylobacter." *Epidemiol Infect* **115**(3): 495-500.
- Mesa, R. J., V. Blanc, A. R. Blanch, P. Cortes, J. J. Gonzalez, S. Lavilla, E. Miro, M. Muniesa, M. Saco, M. T. Tortola, B. Mirelis, P. Coll, M. Llagostera, G. Prats and F. Navarro (2006). "Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage)." *J Antimicrob Chemother* **58**(1): 211-215.
- Michael, G. B., C. Freitag, S. Wendlandt, C. Eidam, A. T. Fessler, G. V. Lopes, K. Kadlec and S. Schwarz (2015). "Emerging issues in antimicrobial resistance of bacteria from food-producing animals." *Future Microbiol* **10**(3): 427-443.



## Références

- Miltgen, G., R. A. Bonnin, C. Avril, T. Benoit-Cattin, D. Martak, A. Leclaire, N. Traversier, B. Roquebert, M. C. Jaffar-Bandjee, N. Lugagne, L. Filleul, M. Subiros, A. M. de Montera, P. Cholley, M. Thouverez, L. Dortet, X. Bertrand, T. Naas, D. Hocquet and O. Belmonte (2018). "Outbreak of IMI-1 carbapenemase-producing colistin-resistant *Enterobacter cloacae* on the French island of Mayotte (Indian Ocean)." Int J Antimicrob Agents **52**(3): 416-420.
- Miltgen G., C. E., Traversier N, Marichal A, Jaffar-Bandjee M.C.,Meenowa D.,Jaumally M.R., Dommergue L., Moutroifi Y., Chapuis F.,Rakotoharinome M., Biarmann M., Belmonte O. (2014). Prévalence des entérobactéries BLSE chez les animaux d'élevage sur plusieurs îles de l'Océan Indien. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris, France.
- Mircovich C, C. C., Sanders P, Bayon-Auboyer M-H, Dubroca S, Rugraff Y (2004). "Modes d'élevage des porcs et prévalence de *E. coli* résistants aux antimicrobiens." Journées Recherche Porcine **36**: 365-370.
- Mirelis, B., F. Navarro, E. Miro, R. J. Mesa, P. Coll and G. Prats (2003). "Community transmission of extended-spectrum beta-lactamase." Emerg Infect Dis **9**(8): 1024-1025.
- Mo, S. S., A. M. Urdahl, K. Madslie, M. Sunde, L. L. Nesse, J. S. Slette-meas and M. Norstrom (2018). "What does the fox say? Monitoring antimicrobial resistance in the environment using wild red foxes as an indicator." PLoS One **13**(5): e0198019.
- Morris (1957). "Uses of Epidemiology." Edinburgh.
- Mraidi, R. (2014). "Modélisation et contrôle de la transmission du virus de la maladie de Newcastle dans les élevages aviaires familiaux de Madagascar." Université de La Réunion, France: 202 pages.
- Munday, C. J., G. M. Whitehead, N. J. Todd, M. Campbell and P. M. Hawkey (2004). "Predominance and genetic diversity of community- and hospital-acquired CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in York, UK." J Antimicrob Chemother **54**(3): 628-633.
- Naas, T., G. Cuzon, A. L. Robinson, Z. Andrianirina, P. Imbert, E. Ratsima, Z. N. Ransiarisoa, P. Nordmann and J. Raymond (2016). "Neonatal infections with multidrug-resistant ESBL-producing *E. cloacae* and *K. pneumoniae* in Neonatal Units of two different Hospitals in Antananarivo, Madagascar." BMC Infect Dis **16**: 275.
- Nadimpalli, M., Y. Vuthy, A. de Lauzanne, L. Fabre, A. Criscuolo, M. Gouali, B. T. Huynh, T. Naas, T. Phe, L. Borand, J. Jacobs, A. Kerleguer, P. Piola, D. Guillemot, S. Le Hello, E. Delarocque-Astagneau and B. s. group (2019). "Meat and Fish as Sources of Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli*, Cambodia." Emerg Infect Dis **25**(1).
- Nagy, B. and P. Z. Fekete (2005). "Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine." Int J Med Microbiol **295**(6-7): 443-454.
- Nelson, M. L., A. Dinardo, J. Hochberg and G. J. Armelagos (2010). "Brief communication: Mass spectroscopic characterization of tetracycline in the skeletal remains of an ancient population from Sudanese Nubia 350-550 CE." Am J Phys Anthropol **143**(1): 151-154.
- Nguyen, V. T., J. J. Carrique-Mas, T. H. Ngo, H. M. Ho, T. T. Ha, J. I. Campbell, T. N. Nguyen, N. N. Hoang, V. M. Pham, J. A. Wagenaar, A. Hardon, Q. H. Thai and C. Schultsz (2015). "Prevalence and

- risk factors for carriage of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* on household and small-scale chicken farms in the Mekong Delta of Vietnam." J Antimicrob Chemother **70**(7): 2144-2152.
- Nguyen, V. T., D. Jamroz, S. Matamoros, J. J. Carrique-Mas, H. M. Ho, Q. H. Thai, T. N. M. Nguyen, J. A. Wagenaar, G. Thwaites, J. Parkhill, C. Schultsz and T. H. Ngo (2019). "Limited contribution of non-intensive chicken farming to ESBL-producing *Escherichia coli* colonization in humans in Vietnam: an epidemiological and genomic analysis." J Antimicrob Chemother **74**(3): 561-570.
- Nhung, N. T., N. V. Cuong, J. Campbell, N. T. Hoa, J. E. Bryant, V. N. Truc, B. T. Kiet, T. Jombart, N. V. Trung, V. B. Hien, G. Thwaites, S. Baker and J. Carrique-Mas (2015). "High levels of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* isolates from livestock farms and synanthropic rats and shrews in the Mekong Delta of Vietnam." Appl Environ Microbiol **81**(3): 812-820.
- O'Neill, J. (2014). "Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nation."
- Omran, A. R. (2005). "The epidemiologic transition: a theory of the epidemiology of population change. 1971." Milbank Q **83**(4): 731-757.
- OMS (2016). "Plan d'action mondial pour combattre la résistance aux antimicrobiens." Bibliothèque de l'OMS: 32.
- Oteo, J., M. Perez-Vazquez and J. Campos (2010). "Extended-spectrum [beta]-lactamase producing *Escherichia coli*: changing epidemiology and clinical impact." Curr Opin Infect Dis **23**(4): 320-326.
- Overdeest, I., I. Willemsen, M. Rijnsburger, A. Eustace, L. Xu, P. Hawkey, M. Heck, P. Savelkoul, C. Vandenbroucke-Grauls, K. van der Zwaluw, X. Huijsdens and J. Kluytmans (2011). "Extended-spectrum beta-lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, The Netherlands." Emerg Infect Dis **17**(7): 1216-1222.
- Overdeest, I. T., M. Heck, K. van der Zwaluw, X. Huijsdens, M. van Santen, M. Rijnsburger, A. Eustace, L. Xu, P. Hawkey, P. Savelkoul, C. Vandenbroucke-Grauls, I. Willemsen, J. van der Ven, C. Verhulst and J. A. Kluytmans (2014). "Extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella* spp. in chicken meat and humans: a comparison of typing methods." Clin Microbiol Infect **20**(3): 251-255.
- Pappas, G. (2013). "Socio-economic, industrial and cultural parameters of pig-borne infections." Clin Microbiol Infect **19**(7): 605-610.
- Park, H., Y. C. Hung and R. E. Brackett (2002). "Antimicrobial effect of electrolyzed water for inactivating *Campylobacter jejuni* during poultry washing." Int J Food Microbiol **72**(1-2): 77-83.
- Pereira, R. V., J. D. Siler, J. C. Ng, M. A. Davis, Y. T. Grohn and L. D. Warnick (2014). "Effect of on-farm use of antimicrobial drugs on resistance in fecal *Escherichia coli* of preweaned dairy calves." J Dairy Sci **97**(12): 7644-7654.
- Poirel, L., C. Leviandier and P. Nordmann (2006). "Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA and QnrS in Enterobacteriaceae isolates from a French university hospital." Antimicrob Agents Chemother **50**(12): 3992-3997.
- Rahelinirina, S., J. M. Duplantier, J. Ratovonjato, O. Ramilijaona, M. Ratsimba and L. Rahalison (2010). "Study on the movement of *Rattus rattus* and evaluation of the plague dispersion in Madagascar." Vector Borne Zoonotic Dis **10**(1): 77-84.

## Références

- Rakotonirina, H. C., B. Garin, F. Randrianirina, V. Richard, A. Talarmin and G. Arlet (2013). "Molecular characterization of multidrug-resistant extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolated in Antananarivo, Madagascar." BMC Microbiol **13**: 85.
- Randall, L., K. Heinrich, R. Horton, L. Brunton, M. Sharman, V. Bailey-Horne, M. Sharma, I. McLaren, N. Coldham, C. Teale and J. Jones (2014). "Detection of antibiotic residues and association of cefquinome residues with the occurrence of Extended-Spectrum beta-Lactamase (ESBL)-producing bacteria in waste milk samples from dairy farms in England and Wales in 2011." Res Vet Sci **96**(1): 15-24.
- Renault, P., J. L. Solet, D. Sissoko, E. Balleydier, S. Larrieu, L. Filleul, C. Lassalle, J. Thiria, E. Rachou, H. de Valk, D. Ilef, M. Ledrans, I. Quatresous, P. Quenel and V. Pierre (2007). "A major epidemic of chikungunya virus infection on Reunion Island, France, 2005-2006." Am J Trop Med Hyg **77**(4): 727-731.
- Richter, L., E. M. Du Plessis, S. Duvenage and L. Korsten (2019). "Occurrence, Identification, and Antimicrobial Resistance Profiles of Extended-Spectrum and AmpC beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae from Fresh Vegetables Retailed in Gauteng Province, South Africa." Foodborne Pathog Dis.
- Robin, F., B. R., V. S., B. O, P. S and B. R (2014). Épidémiologie des souches d'entérobactéries productrices de BLSE à La Réunion. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris, France.
- Robinson, T. P., D. P. Bu, J. Carrique-Mas, E. M. Fevre, M. Gilbert, D. Grace, S. I. Hay, J. Jiwakanon, M. Kakkar, S. Kariuki, R. Laxminarayan, J. Lubroth, U. Magnusson, P. Thi Ngoc, T. P. Van Boeckel and M. E. Woolhouse (2016). "Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue." Trans R Soc Trop Med Hyg **110**(7): 377-380.
- Rodriguez, I., K. Thomas, A. Van Essen, A. K. Schink, M. Day, M. Chattaway, G. Wu, D. Mevius, R. Helmuth, B. Guerra and S.-E. consortium (2014). "Chromosomal location of blaCTX-M genes in clinical isolates of Escherichia coli from Germany, The Netherlands and the UK." Int J Antimicrob Agents **43**(6): 553-557.
- Rousham, E. K., L. Unicomb and M. A. Islam (2018). "Human, animal and environmental contributors to antibiotic resistance in low-resource settings: integrating behavioural, epidemiological and One Health approaches." Proc Biol Sci **285**(1876).
- Russell, J. C., D. Ringler, A. Trombini and M. Le Corre (2011). "The island syndrome and population dynamics of introduced rats." Oecologia **167**(3): 667-676.
- Sanders P, B.-M. A., Chauvin C, Toulain P-L (2011). "Utilisation des antibiotiques en élevage et enjeux de santé publique." INRA Productions Animales **24**(2): 199-204.
- Santman-Berends, I., M. A. Gonggrijp, J. J. Hage, A. E. Heuvelink, A. Velthuis, T. Lam and G. van Schaik (2017). "Prevalence and risk factors for extended-spectrum beta-lactamase or AmpC-producing Escherichia coli in organic dairy herds in the Netherlands." J Dairy Sci **100**(1): 562-571.

- Santman-Berends, I. M., M. A. Gonggrijp, J. J. Hage, A. E. Heuvelink, A. Velthuis, T. J. Lam and G. van Schaik (2017). "Prevalence and risk factors for extended-spectrum beta-lactamase or AmpC-producing *Escherichia coli* in organic dairy herds in the Netherlands." *J Dairy Sci* **100**(1): 562-571.
- Schmid, A., S. Hormansdorfer, U. Messelhauser, A. Kasbohrer, C. Sauter-Louis and R. Mansfeld (2013). "Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* on Bavarian dairy and beef cattle farms." *Appl Environ Microbiol* **79**(9): 3027-3032.
- Schmithausen, R. M., S. R. Kellner, S. V. Schulze-Geisthoevel, S. Hack, S. Engelhart, I. Bodenstein, N. Al-Sabti, M. Reif, R. Fimmers, B. Korber-Irrgang, J. Harlizius, A. Hoerauf, M. Exner, G. Bierbaum, B. Petersen and I. Bekeredjian-Ding (2015). "Eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and of Enterobacteriaceae expressing extended-spectrum beta-lactamases on a model pig farm." *Appl Environ Microbiol* **81**(21): 7633-7643.
- Schwabe, C. W. (1969). "Veterinary Medicine and Human Health." *Williams and Wilkins, Baltimore*.
- Snow, L. C., R. G. Warner, T. Cheney, H. Wearing, M. Stokes, K. Harris, C. J. Teale and N. G. Coldham (2012). "Risk factors associated with extended spectrum beta-lactamase *Escherichia coli* (CTX-M) on dairy farms in North West England and North Wales." *Prev Vet Med* **106**(3-4): 225-234.
- Stalder, T., L. M. Rogers, C. Renfrow, H. Yano, Z. Smith and E. M. Top (2017). "Emerging patterns of plasmid-host coevolution that stabilize antibiotic resistance." *Sci Rep* **7**(1): 4853.
- Stupica, D., L. Lusa, M. N. Klevisar, S. Terzic, M. Pirs, M. M. Premru and F. Strle (2017). "Should we consider faecal colonisation with extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in empirical therapy of community-onset sepsis?" *Int J Antimicrob Agents* **50**(4): 564-571.
- Tamang, M. D., H. M. Nam, G. C. Jang, S. R. Kim, M. H. Chae, S. C. Jung, J. W. Byun, Y. H. Park and S. K. Lim (2012). "Molecular characterization of extended-spectrum-beta-lactamase-producing and plasmid-mediated AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from stray dogs in South Korea." *Antimicrob Agents Chemother* **56**(5): 2705-2712.
- Tan, S. Y. and Y. Tatsumura (2015). "Alexander Fleming (1881-1955): Discoverer of penicillin." *Singapore Med J* **56**(7): 366-367.
- Tang, K. L., N. P. Caffrey, D. B. Nobrega, S. C. Cork, P. E. Ronksley, H. W. Barkema, A. J. Polachek, H. Ganshorn, N. Sharma, J. D. Kellner and W. A. Ghali (2017). "Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis." *Lancet Planet Health* **1**(8): e316-e327.
- Tran-Dien, A., S. Le Hello, C. Bouchier and F. X. Weill (2018). "Early transmissible ampicillin resistance in zoonotic *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in the late 1950s: a retrospective, whole-genome sequencing study." *Lancet Infect Dis* **18**(2): 207-214.
- UK, G. (2014). "Antimicrobial resistance (AMR) systems map."
- Van Boeckel, T. P., C. Brower, M. Gilbert, B. T. Grenfell, S. A. Levin, T. P. Robinson, A. Teillant and R. Laxminarayan (2015). "Global trends in antimicrobial use in food animals." *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**(18): 5649-5654.

## Références

- van Bunnik, B. A., A. Ssematimba, T. J. Hagenaars, G. Nodelijk, M. R. Haverkate, M. J. Bonten, M. K. Hayden, R. A. Weinstein, M. C. Bootsma and M. C. De Jong (2014). "Small distances can keep bacteria at bay for days." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(9): 3556-3560.
- van Duijkeren, E., C. C. H. Wielders, C. M. Dierikx, A. van Hoek, P. Hengeveld, C. Veenman, A. Florijn, A. Lotterman, L. A. M. Smit, J. T. van Dissel, C. B. M. Maassen and S. C. de Greeff (2017). "Long-term carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in the general population in the Netherlands." Clin Infect Dis.
- Van Goethem, M. W., R. Pierneef, O. K. I. Bezuidt, Y. Van De Peer, D. A. Cowan and T. P. Makhalanyane (2018). "A reservoir of 'historical' antibiotic resistance genes in remote pristine Antarctic soils." Microbiome **6**(1): 40.
- van Hoek, A., C. Veenman, A. Florijn, P. M. C. Huijbers, E. A. M. Graat, S. de Greeff, C. M. Dierikx and E. van Duijkeren (2018). "Longitudinal study of ESBL *Escherichia coli* carriage on an organic broiler farm." J Antimicrob Chemother **73**(12): 3298-3304.
- Ventola, C. L. (2015). "The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats." P T **40**(4): 277-283.
- Vitas, A. I., D. Naik, L. Perez-Etayo and D. Gonzalez (2018). "Increased exposure to extended-spectrum beta-lactamase-producing multidrug-resistant Enterobacteriaceae through the consumption of chicken and sushi products." Int J Food Microbiol **269**: 80-86.
- Wellington, E. M., A. B. Boxall, P. Cross, E. J. Feil, W. H. Gaze, P. M. Hawkey, A. S. Johnson-Rollings, D. L. Jones, N. M. Lee, W. Otten, C. M. Thomas and A. P. Williams (2013). "The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria." Lancet Infect Dis **13**(2): 155-165.
- WHO (2016). At UN, global leaders commit to act on antimicrobial resistance.
- Wielders, C. C. H., A. van Hoek, P. D. Hengeveld, C. Veenman, C. M. Dierikx, T. P. Zomer, L. A. M. Smit, W. van der Hoek, D. J. Heederik, S. C. de Greeff, C. B. M. Maassen and E. van Duijkeren (2017). "Extended-spectrum beta-lactamase- and pAmpC-producing Enterobacteriaceae among the general population in a livestock-dense area." Clin Microbiol Infect **23**(2): 120 e121-120 e128.
- Wright, G. D. (2007). "The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity." Nat Rev Microbiol **5**(3): 175-186.
- Yom-Tov, Y. and E. Geffen (2006). "Geographic variation in body size: the effects of ambient temperature and precipitation." Oecologia **148**(2): 213-218.
- Yong, D., M. A. Toleman, C. G. Giske, H. S. Cho, K. Sundman, K. Lee and T. R. Walsh (2009). "Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-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**(12): 5046-5054.
- Zaidi, A. K., W. C. Huskins, D. Thaver, Z. A. Bhutta, Z. Abbas and D. A. Goldmann (2005). "Hospital-acquired neonatal infections in developing countries." Lancet **365**(9465): 1175-1188.

Zhang, X., Y. Li, B. Liu, J. Wang, C. Feng, M. Gao and L. Wang (2014). "Prevalence of veterinary antibiotics and antibiotic-resistant *Escherichia coli* in the surface water of a livestock production region in northern China." PLoS One **9**(11): e111026.



# Annexes

## Annexe 1. Engagement de non plagiat



Pôle Recherche  
Ecoles doctorales

### LETTRE D'ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

Je, soussigné(e) Gay Noellie en ma qualité de doctorant(e) de l'Université de La Réunion, déclare être conscient(e) que le plagiat est un acte délictueux passible de sanctions disciplinaires. Aussi, dans le respect de la propriété intellectuelle et du droit d'auteur, je m'engage à systématiquement citer mes sources, quelle qu'en soit la forme (textes, images, audiovisuel, internet), dans le cadre de la rédaction de ma thèse et de toute autre production scientifique, sachant que l'établissement est susceptible de soumettre le texte de ma thèse à un logiciel anti-plagiat.

Fait à Saint-Denis le: 26/06/2019

Signature :

Extrait du Règlement intérieur de l'Université de La Réunion  
(validé par le Conseil d'Administration en date du 11 décembre 2014)

#### Article 9. Protection de la propriété intellectuelle – Faux et usage de faux, contrefaçon, plagiat

L'utilisation des ressources informatiques de l'Université implique le respect de ses droits de propriété intellectuelle ainsi que ceux de ses partenaires et plus généralement, de tous tiers titulaires de ces droits.

En conséquence, chaque utilisateur doit :

- utiliser les logiciels dans les conditions de licences souscrites ;
- ne pas reproduire, copier, diffuser, modifier ou utiliser des logiciels, bases de données, pages Web, textes, images, photographies ou autres créations protégées par le droit d'auteur ou un droit privatif, sans avoir obtenu préalablement l'autorisation des titulaires de ces droits.

#### La contrefaçon et le faux

Conformément aux dispositions du code de la propriété intellectuelle, toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle d'une œuvre de l'esprit faite sans le consentement de son auteur est illicite et constitue un délit pénal.

L'article 444-1 du code pénal dispose : « Constitue un faux toute altération frauduleuse de la vérité, de nature à cause un préjudice et accomplie par quelque moyen que ce soit, dans un écrit ou tout autre support d'expression de la pensée qui a pour objet ou qui peut avoir pour effet d'établir la preuve d'un droit ou d'un fait ayant des conséquences juridiques ».

L'article L335\_3 du code de la propriété intellectuelle précise que : « Est également un délit de contrefaçon toute reproduction, représentation ou diffusion, par quelque moyen que ce soit, d'une œuvre de l'esprit en violation des droits de l'auteur, tels qu'ils sont définis et réglementés par la loi. Est également un délit de contrefaçon la violation de l'un des droits de l'auteur d'un logiciel (...) ».

**Le plagiat** est constitué par la copie, totale ou partielle d'un travail réalisé par autrui, lorsque la source empruntée n'est pas citée, quel que soit le moyen utilisé. Le plagiat constitue une violation du droit d'auteur (au sens des articles L 335-2 et L 335-3 du code de la propriété intellectuelle). Il peut être assimilé à un délit de contrefaçon. C'est aussi une faute disciplinaire, susceptible d'entraîner une sanction.

Les sources et les références utilisées dans le cadre des travaux (préparations, devoirs, mémoires, thèses, rapports de stage...) doivent être clairement citées. Des citations intégrales peuvent figurer dans les documents rendus, si elles sont assorties de leur référence (nom d'auteur, publication, date, éditeur...) et identifiées comme telles par des guillemets ou des italiques.

Les délits de contrefaçon, de plagiat et d'usage de faux peuvent donner lieu à une sanction disciplinaire indépendante de la mise en œuvre de poursuites pénales.



## Annexe 2. Déclaration de conformité de la Commission nationale de l'information et des libertés



RÉCÉPISSÉ

**DÉCLARATION DE CONFORMITÉ À  
UNE MÉTHODOLOGIE DE  
RÉFÉRENCE**

Numéro de déclaration

**2210928 v 0**

du 10 janvier 2019

Monsieur GAY Noellie  
CENTRE DE COOPÉRATION INTERNATIONALE EN  
RECHERCHE AGRONOMIQUE POUR LE  
DÉVELOPPEMENT  
UMR 117 ASTRE  
TAA-117 / E - CAMPUS INTERNATIONAL DE  
BAILLARGUET  
TAA-117 / E - CAMPUS INTERNATIONAL DE  
BAILLARGUET

**A LIRE IMPÉRATIVEMENT**

La délivrance de ce récépissé atteste que vous avez transmis à la CNIL un dossier de déclaration formellement complet. Vous pouvez désormais mettre en oeuvre votre traitement de données à caractère personnel.

La CNIL peut à tout moment vérifier, par courrier, par la voie d'un contrôle sur place ou en ligne, que ce traitement respecte l'ensemble des dispositions de la loi du 6 janvier 1978 modifiée en 2004. Afin d'être conforme à la loi, vous êtes tenu de respecter tout au long de votre traitement les obligations prévues et notamment :

- 1) La définition et le respect de la finalité du traitement,
- 2) La pertinence des données traitées,
- 3) La conservation pendant une durée limitée des données,
- 4) La sécurité et la confidentialité des données,
- 5) Le respect des droits des intéressés : information sur leur droit d'accès, de rectification et d'opposition.

Pour plus de détails sur les obligations prévues par la loi « informatique et libertés », consultez le site internet de la CNIL : [www.cnil.fr](http://www.cnil.fr).

**Organisme déclarant**

**Nom :** CENTRE DE COOPÉRATION INTERNATIONALE EN  
RECHERCHE AGRONOMIQUE POUR LE DÉVELOPPEMENT

**N° SIREN ou SIRET :**  
331596270 00016

**Service :** UMR 117 ASTRE

**Code NAF ou APE :**  
7219Z

**Adresse :** TAA-117 / E - CAMPUS INTERNATIONAL DE  
BAILLARGUET TAA-117 / E - CAMPUS INTERNATIONAL DE  
BAILLARGUET

**Tél. :** 04 67 61 58 00  
**Fax. :**

**Code postal :** 34398

**Ville :** MONTPELLIER CEDEX 5

**Finalité :** MR3 - Recherches dans le domaine de la santé sans recueil du  
consentement

**Transferts d'informations hors de l'Union européenne :** Non

Fait à Paris, le 10 janvier 2019  
Par délégation de la commission

Isabelle FALQUE PIERROTIN  
Présidente

### Annexe 3. Questionnaires utilisés dans l'étude du chapitre 4 (Article 3)

#### Supplementary Materials: Risk factors of Extended-Spectrum $\beta$ -Lactamase producing Enterobacteriaceae occurrence in farms in Reunion, Madagascar and Mayotte Islands, 2016–2017

Noellie Gay \*, Alexandre Leclaire, Morgane Laval, Guillaume Miltgen, Maël Jégo, Ramin Stéphane, Julien Jaubert, Olivier Belmonte and Eric Cardinale

Name and code of the farmer : ..... Territory : .....

Date : / / 16

Animal species	Herd size

#### Building

Presence of a water source near	River	Pond	Purification station or other	None
If yes, distance from the farm	<100m	>100m		
Closed building	Yes	No		
Concrete access to building	Yes	No		
More than one building	Yes	No		
if Yes Building number in the exploitation	1	2		$\geq 2$
Age of the livestock exploitation				
Other livestock species in the farm	No	Cow	Pig	Poultry
Distance from another farm (same species)	< 500 m		> 500 m	
Distance from another farm (other species raised)	< 500 m		> 500 m	
If Yes Type of species	Cow		Pig	Other :
Vegetable production on the farm	Yes	No	Type :	
Clean condition around the farm	Yes	No		

## Hygiene and biosecurity

Hygiene measure				
Presence of a vestibule at building entrance	Yes	No		
Boot bath at building entrance	Yes	No		
Presence of a lavabo closeby	Yes	No	Showers ?	
Change of work clothes at building entrance	Yes	No		
Change of shoes/boots at building entrance	Yes	No		
Clothes and shoes	Durty	Clean		
Entrance frequency in the building by day	≤3	4	≥4	
Other farmers visiting the exploitation	Yes	No		
Share equipement with an other exploitation	Yes	No		
Share workers with an other exploitation	Yes	No		
Boot bath at building entrance	Yes	No		
Respect of biosecurity measures	Yes	No		
Rendering				
Management of dead livestock	Consumption	Buried	Burned	Thrown
Water				
Type of water used in the exploitation	Public	River	Rain Other: well, etc.	
Water storage presence	Yes	No		
Potable quality control	Yes	No		
Water filtration	Yes	No		
Water treatment	Yes	No		
Water quality control	Yes	No		
Cleaning of water pipes	Yes	No	No pipes	
Vector control				
Rodent presence	Yes	No		
Rodent control	None	By farmer	By a society	
If yes Type of control	Poison	Traps	Other :	
Clearing around the farm	Yes	No		
Desinfestation	Yes	No		
Pet presence in the farm	Yes	No	Species :	
Could bird enter the building	Yes	No		
Presence of flies	Elevated	Moderate		
Quarantine				
If buying breeding stock				
Quarantine before entering the stock	Yes	No		
Quarantaine in a different building	Yes (>50m)	Yes (10-50m)	No	

All in all out practice	Yes	No	
Cleaning before next batch	Yes	No	
<b>Effluents</b>			
Manure storage on exploitation	Yes		No
Spreading of the manure on the exploitation	Yes		No
Si Yes			
Distance from the farm			
Spreading of the manure on another farm	Yes		No
<b>Cleaning and disinfection</b>			
Scraping manure	Yes	No	
Soaking surface	Yes	No	
Water use for cleaning	Public	River	rain Other :
Detergent use for cleaning	Yes	No	
Cleaned surfaces	Ground	Ceiling	Wall
		Through	
Application	Bucket	Sprayer	Lather Other :
Pickling	Yes	No	
Lightning in the building	Good	Moderate	Bad
Crawlspace	Yes	No	
Two desinfectations	Yes	No	
Clean condition around the farm	Clean	Durty	

**B – Antibiotic use :**

➤ **Motivation :** Therapeutic Prophylactic

**Last antibiotic treatment :** <1 year >1 year

**Antibiotic use in :** previous livestock sampled one

## Annexe 4. Notification obtention du comité d'éthique projet rongeurs



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR,  
DE LA RECHERCHE ET DE L'INNOVATION

Paris, le 06 NOV. 2017

### Objet : Notification d'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques

Direction générale  
de la recherche  
et de l'innovation

Service de la performance,  
du financement et de la  
contractualisation avec les  
organismes de recherche

Département de la culture  
scientifique et des relations  
avec la société

Cellule Animaux utilisés à des  
Fins Scientifiques – AFIS –

Affaire suivie par  
Virginie Vallet  
Chargée de mission  
Responsable de la cellule AFIS

Mél.  
virginie.vallet-erdtmann  
@recherche.gouv.fr

Plateforme  
apafis.demat@recherche.gouv.fr

1 rue Descartes  
75231 Paris Cedex 05

En application des dispositions du code rural et de la pêche maritime, notamment ses articles R.214-87 à R.214-126, le projet :

- référencé sous le numéro APAFIS#10948-2017080114229218 v1,
- ayant pour titre : Evaluation du portage de bactéries multi-résistantes à la Réunion et Mayotte chez les populations de Rattus spp,
- déposé par l'Etablissement Utilisateur : GIP CYROI, numéro d'agrément A974001, dont le responsable est Monsieur Christian MERIAU
- et dont la responsabilité de la mise en œuvre générale du projet et de sa conformité à l'autorisation est assurée par : Monsieur Éric CARDINALE,

est autorisé.

L'autorisation de projet est accordée, sous réserve de la validité de l'agrément de l'Etablissement Utilisateur, pour une durée de 2 ans à compter de l'autorisation.

Le projet précité a été évalué sur le plan éthique par le Comité d'éthique en expérimentation animale N°114 et a reçu un avis favorable.

Ce projet ne fera pas l'objet, à l'issue de sa réalisation, d'une appréciation rétrospective.

Pour la ministre et par délégation  
l'adjointe au chef du service de la performance, du  
financement et de la contractualisation avec les  
organismes de recherche

Christine COSTE

Monsieur Christian MERIAU  
GIP CYROI

## Annexe 5. Poster Prevalence of third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae among urban rats (*Rattus* sp.) in Reunion Island, 2017-2018

### Prevalence of third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae among urban rats (*Rattus* sp.) in Reunion Island, 2017-2018



Y. Abbade<sup>1</sup>, A. Cohard<sup>1</sup>, M.A. Etheves<sup>1</sup>, O. Belmonte<sup>2</sup>, E. Cardinale<sup>1</sup>, N. Gay<sup>1\*</sup>



\*noellie.gay@cirad.fr

<sup>1</sup> CIRAD, UMR ASTRE, F-97490 Ste Clotilde, Réunion, France.

ASTRE, CIRAD, INRA, Univ Montpellier, Montpellier, France. Address: CYROI 2 rue Maxime Rivière, Sainte-Clotilde, Réunion

<sup>2</sup> Bacteriology laboratory, Félix Guyon Hospital, Saint-Denis, Reunion, France.

#### Introduction

In South-western Indian ocean, Enterobacteriaceae resistant to third-generation cephalosporins (ER3GC) are a main public and veterinary health issue in 2018 [1].

In Reunion, ERC3G epidemiology in humans (except hospitals), animals, and environment remained unclear.

Rats were used as bioindicators of ER3GC environmental occurrence due to:

- ✓ Synanthropic ecology => close proximity to humans.
- ✓ Antibiotic drugs contaminations => ER3GC selection in rat digestive tract.

#### Study objectives were:

- Estimate the prevalence of ER3GC in Reunion urban rats, 2017-2018.
- Identify area displaying probable ER3GC environmental contaminations.



#### Methods

##### • Sampling strategy:

Sample size calculated of **196 rats**.

Expected prevalence of 15.0% [2], acceptable error of 5.0%, and confidence level of 95.0%.

##### • Sampling:

From May 2017 to July 2018, 198 rats (*Rattus rattus* and *R. norvegicus*) were captured in urban area of Reunion.

##### • Laboratory:

- ✓ Rat intestines were cultured on selective media plates.
- ✓ Bacterial species were identified using MALDI-TOF.
- ✓ Antibiograms on Enterobacteriaceae (EUCAST, 2017).

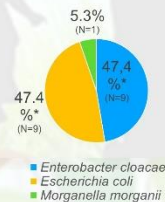
- ESBL-E identification: synergic test using Mueller Hinton media with cloxacillin.

#### Results

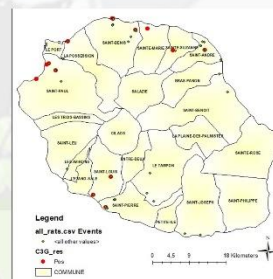
2017-2018, ER3GC prevalence in urban rats was:

- **9.1% [5.8%-13.9%]** of ER3GC positive rats.

##### ERC3G bacterial species:



\* One rat carried two bacterial species



**No geographical cluster of ER3GC positive rats found.**

#### Discussion

**Comparable methodology, overall similar prevalences...**



**13.4% [10.4%-16.4%]**  
Hong Kong, China, 2008-2013 [4]

**20.7% [7.5%-35.8%]**  
Guinea, West Africa 2015 [3]



**16.0% [6.2%-25.8%]**  
Reinfeld, Germany, 2010 [2]

#### Conclusion

ER3GC prevalence in urban rats from Reunion does not differ from other studies.

Limited ER3GC urban environmental contamination highlighted.

➔ **Environment close to farms ?**

#### References

- [1] N. Gay, O. Belmonte, J.M. Collard, M. Haifa, M.J. Issack, S. Mindjap, P. Palmyre, A.A. Ibrahim, H. Rasamoelina, L. Flachat, L. Filleul, E. Cardinale. 2017. Review antibiotic resistance in the Indian ocean commission: a human and animal health issue. Front. Public Health. 5: 162. doi: 10.3389/fpubh.2017.00162. eCollection 2017.
- [2] S. Guenther, J. Wuttke, A. J. Vojtech, K. Schaeffer, T. Semmler, R.G. Ulrich, L.H. Wieler, C.E. 2013. « Is Fecal Carriage of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Urban Rats a Risk for Public Health? », Antimicrob. Agents Chemother. 57(6): 2424-2425.
- [3] Katharina Schaeffer, Kathrin Nowak, Ariane Düx, Torsten Semmler, Laura Villa, Laye Kourouma, Karim Bangoura, Lothar H. Wieler, Fabian H. Leendertz and Sebastian Guenther. « Clinically Relevant ESBL-Producing *K. pneumoniae* ST1307 and *E. coli* ST38 in an Urban West African Rat Population ». Frontiers in Microbiology, Volume 9, Numero 150, published in march 2018.
- [4] Ho PL, Lo WU, Lai EL, Law PY, Leung SM, Wang Y, Chow KH. 2015. Clonal diversity of CTX-M producing, multidrug resistant *Escherichia coli* from rodents. Journal of Medical Microbiology. 64: 185-190.

# Annexe 6. Poster One Health approach of antibacterial resistance in Madagascar, 2018



## One health approach of antibacterial resistance in Madagascar, 2018



Gay N.<sup>1,3</sup>, Ramahatafandry I.<sup>2</sup>, Rabenandrasana N.<sup>3</sup>, Rakotonindrina F.<sup>1,3</sup>, Panandiniaina H.<sup>1,3</sup>, Loire, E.<sup>1</sup>, Rieux, A.<sup>4</sup>, Collard J.M.<sup>3</sup>, Cardinale E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UMR ASTRE, French Agricultural Research Center for International Development, Montpellier, France, <sup>2</sup> Department of Veterinary Services, Ministry of Agriculture and Livestock, Antananarivo, Madagascar, <sup>3</sup> Experimental Bacteriology Unit, Pasteur Institute of Madagascar, Antananarivo, Madagascar, <sup>4</sup> UMR PVBMT French Agricultural Research Center for International Development, Saint-Pierre, Reunion.

Email: noellie.gay@cirad.fr / gnoellie@hotmail.com

### Hotspot of antibacterial resistance in South Western Indian ocean



Madagascar is located South East of Africa.

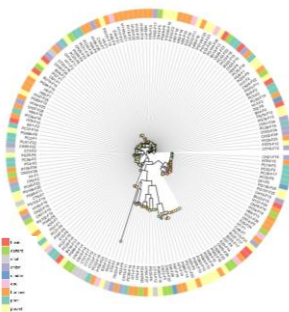
High prevalence of Extended Spectrum Beta-Lactamase-producing Enterobacteriaceae (ESBL-E) reported [1-2]:

ESBL-E carriage in community and family farming livestock was poorly addressed. Patterns of ESBL-producing *Escherichia coli* between humans and animals in low income country were unknown.

Study objectives were:

- 1) Estimate the **closeness** of ESBL-producing *Escherichia coli* carried by **humans, pets, livestock, and drinking water**.
- 2) Identify **determinants** of ESBL-producing *Escherichia coli* carriage in **animals & humans**.

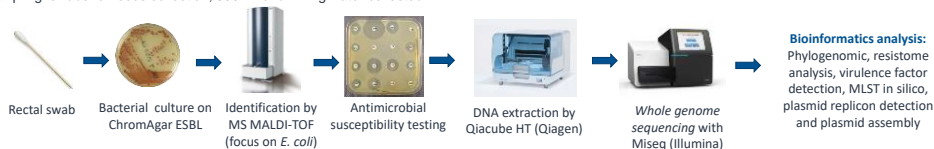
### ESBL-producing *E. coli* in reservoirs closeness (preliminary data)



- **181 *E. coli* sequences (28 households).**
- **25 clusters of *E. coli* detected (99.0% homology).**
- **18 clusters of humans & animals: 13/18 involved poultry, 10/18 ducks, cattle & pigs (8/10).**
- **2 clusters with humans only: same households (one probable water contamination).**
- **5 clusters of animals only.**

### Methods

- ✓ Location: Andoharanfotsy, Antananarivo district, Madagascar.
- ✓ Inclusion: **household owning ≥ three animal species** (livestock &/or domestic)
- ✓ Sample size: 385 humans; 20.0% prevalence basis [1], 0.04 acceptable error, and 95.0% confidence level (CI).
- ✓ Ethical approval obtained (N°031-MSANP/CERBM).
- ✓ Sampling: swabs for feces collection, 500 ml of drinking water collected.



### References

- [1] Chereau, F., P. Herindrainy, B. Garin, B. T. Huynh, F. Randrianirina, M. Padget, P. Piola, D. Guillemot, and E. Delarocque-Astagneau. 2015. 'Colonization of extended-spectrum-beta-lactamase- and NDM-1-producing Enterobacteriaceae among pregnant women in the community in a low-income country: a potential reservoir for transmission of multiresistant Enterobacteriaceae to neonates', *Antimicrob Agents Chemother*, 59: 3652-5.
- [2] N. Gay, A. Leclerc, M. Laval, G. Miltgen, M. Jégo, R. Stéphane, J. Jaubert, O. Belmonte, E. Cardinale. 2017. Risk factors of Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae occurrence in farms in Reunion, Madagascar and Mayotte islands, 2016-2017. *Vet Sci*, 5(1): 22.
- [3] P. Herindrainy, F. Randrianirina, R. Ratovoson, E. Ratsima Hariniana, Y. Buisson, N. Genel, D. Decré, G. Arlet, A. Talarmin, and V. Richard. 2011. Rectal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in community settings in Madagascar. *PLoS One*, 6: e22738

### In short

❖ Among ESBL-producing *E. coli* clusters, **72.2% involved poultry probably pointing out foodborne transmission in Madagascar.**

❖ **Farming activity was a determinant of the human carriage.**

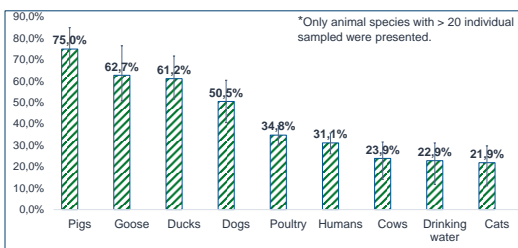
❖ **Old animals carried more ESBL-producing *E. coli*.**

High ESBL-producing *E. coli* carriage observed in smallholders farms probably related to **low sanitation and antibiotic global misuses.**

**Probable transmission pathways of ESBL-producing *E. coli* between human, animal, and through drinking water will be further explored in Madagascar (preliminary data presented here).**

### Determinants of ESBL-producing *E. coli* carriage

May-October 2018, 350 humans, and 1002 animals (70 households) sampled. Prevalence ranged from **21.9% to 75.0%** for **cats and pigs** respectively.



➤ **Farming activity** associated with ESBL-producing *E. coli* carriage in human individuals ( $p=0.002$ ).

➤ Among 350 people included 114 reported taking antibiotics in the last six months (32.6%). The main antibiotic used was **Amoxicillin** (79.0%).

➤ Prevalence in all animal species was significantly **higher in adults than youngs** ( $p=0.03$ ).



## Annexe 7. Poster Antimicrobial resistance in low-income countries – How to stop transmission ?



### INTRODUCTION



Madagascar is a hotspot of antibiotic resistance in Indian Ocean.

High prevalence of Extended Spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* (ESBL-EC) reported for humans and livestock [1, 2].

ESBL-EC are gut commensals; they can exchange antibiotic resistance genes with pathogenic bacteria.



Few ESBL-EC transmission events between farmers and livestock have been reported worldwide.

It suggests low ESBL-EC transmission between animals and humans.

However, all studies have been implemented in high-income countries.

Are transmission patterns similar in low-income countries?

Study objectives were:

i) Estimate the ESBL-EC rate of colonisation of animals, humans, and drinking water in a rural area of Madagascar.

ii) Identify ESBL-EC phylogenetic closeness between reservoirs.

### MATERIALS AND METHODS

In 2018, 70 households located in Andoharanofotsy township, Antananarivo district, were sampled.

Household inclusion criteria  $\geq 3$  animal species.



Fecal samples were collected using swabs and 500ml of drinking water taken in each household. All samples were stored at  $4.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$  for  $5 \pm 2$  hours.

Swabs were streaked onto chromogenic agar plates incubated overnight at  $35.0 \pm 2^\circ\text{C}$ .



Bacterial species were identified with Mass spectrometry and antibiogram performed on *E. coli* according to 2017 EUCAST standard [3].

One ESBL-EC was sequenced by positive carrier at the Institut Pasteur.

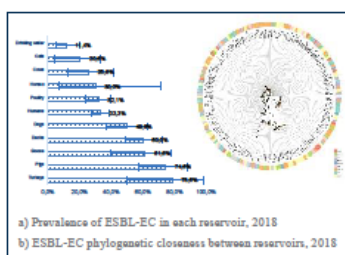
Phylogenetic analysis were performed.

### RESULTS

350 humans, 1,002 animals and 92 drinking water were analysed.

33.3% of humans were positive for ESBL-EC.

Pigs, goose, and ducks were significantly more ESBL-EC colonised than humans.



Preliminary analysis of 181 ESBL-EC sequences pointed out 25 clusters (99.0% homology).

- 18 clusters involved human & animal : 72.2% were poultry
- 5 involved animal & animal
- 1 cluster involved human & water
- 1 cluster involved human & human

### CONCLUSION

Animals could play an important role in human antimicrobial resistance colonisation in Madagascar and low-income countries.

Indeed, if hospitalisation is a well known pattern of ESBL-EC acquisition for humans, poultry meat consumption is still underexplored.

Low food safety could be an important source of ESBL-EC colonisation for humans in low-income countries. Further investigations are needed.

### REFERENCES

- [1] Chereau F., Herindrany P., Garin B., Huynh B.T., Randrianirina F., Padget M., Piola P., Guillemot D. and Delarouque-Astagneu E. 2015. Colonization of extended-spectrum beta-lactamase- and NDM-1-producing Enterobacteriaceae among pregnant women in the community in a low-income country: a potential reservoir for transmission of multiresistant Enterobacteriaceae to neonates, Antimicrob Agents Chemother, 59: 3652-5.
- [2] Gay N., Leclerc A., Laval M., Miltgen M., Jégo M., Ramin S., Jaubert J., Belmonte O., Cardinale E. 2017. Risk factors of Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae occurrence in farms in Reunion, Madagascar and Mayotte islands, 2016-2017. Vet Sci, 5(1):22.
- [3] EUCAST. 2017. Available at: [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/) [27/08/2019]





## Annexe 8. Autorisation du comité d'éthique de la recherche biomédicale, Madagascar

REPOBLIKAN'I MADAGASIKARA  
Fitiavana-Tanindrazana-Fandrosoana

MINISTÈRE DE LA SANTÉ PUBLIQUE  
-----  
COMITE D'ETHIQUE DE LA RECHERCHE  
BIOMEDICALE  
-----

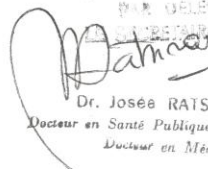
N° 021 - MSANP/CERBM

### AUTORISATION

Après consultation et avis favorable du Comité d'Ethique de la Recherche Biomédicale auprès du Ministère de la Santé, Mme Noellie GAY et Dr Jean Marc COLLARD, Institut Pasteur de Madagascar sont autorisés à effectuer la recherche intitulée : « **Etude de la transmission de bactéries résistantes aux antibiotiques entre l'homme et l'animal** » financé par InterREG (projet/TROI/Réseau ONE HEALTH/2017/Financement N°18-66)

Antananarivo, le 30 MAR. 2018

LE MINISTRE  
DE LA SANTÉ PUBLIQUE  
PAR DELEGATION  
M. JOSÉE RATSIRARSON

  
Dr. Josée RATSIRARSON  
Docteur en Santé Publique et épidémiologie  
Docteur en Médecine

## Annexe 9. Enquête préliminaire sur la composition des ménages en espèces animales

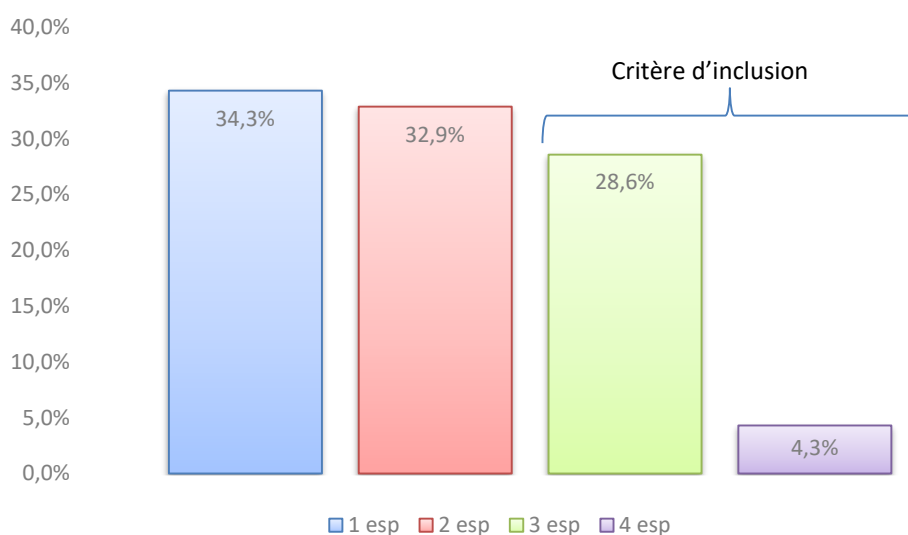
Une enquête a été réalisée lors du jour de marché à Andoharanofotsy, le 07/08/2018.

Son objectif était :

- i) d'évaluer la composition en espèces animales des ménages ;
- ii) d'estimer la proportion de ménages possédant trois espèces animales ou plus dans la commune d'Andoharanofotsy (critère d'inclusion utilisé pour l'étude réalisée au chapitre 6).

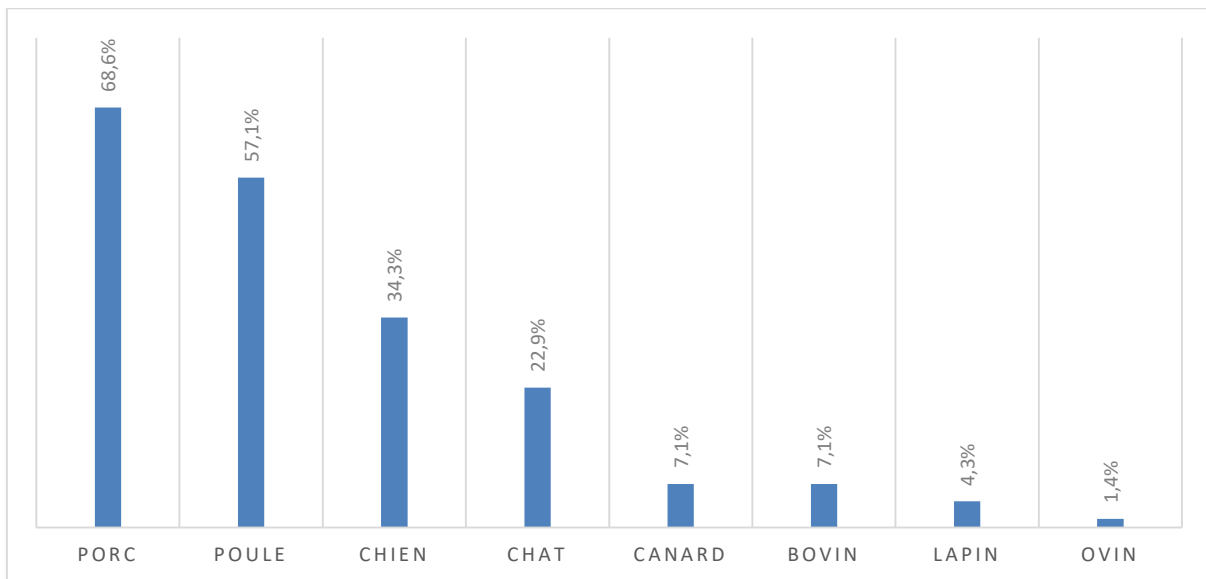
Sur 70 personnes interrogées, 100,0 % possédaient au moins une espèce animale au domicile.

Au total 23 individus possédaient trois espèces animales ou plus, ainsi 32,9 % des personnes enquêtées correspondaient au critère d'inclusion (figure 13).



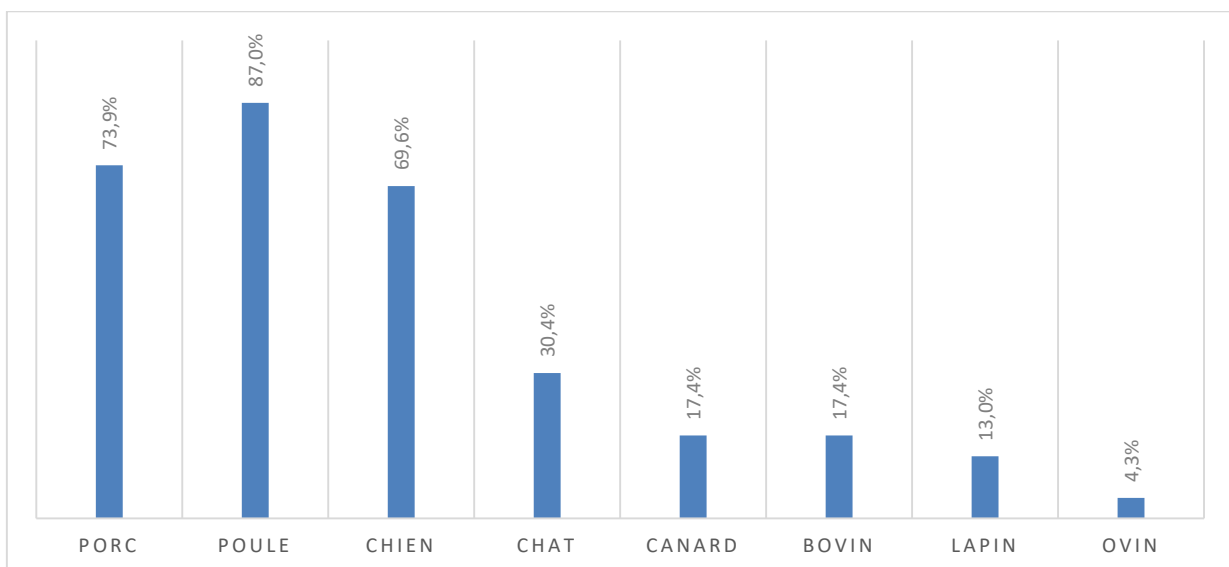
**Figure 12. Pourcentage des individus enquêtés possédant une à quatre espèces animales (n=70)**

Parmi l'ensemble des personnes enquêtées 68,6 % possédaient au moins un porc et 57,1 % au moins une poule (figure 14).



**Figure 13. Distribution des espèces animales possédées par les personnes enquêtées (n=70)**

Parmi les individus correspondant au critère d'inclusion 73,9 % possédaient au moins un porc et 87,0 % au moins une poule (figure 15).



**Figure 14. Distribution des espèces animales possédées par les personnes enquêtées correspondant au critère d'inclusion (n=23)**

L'enquête réalisée au marché d'Andoharanofotsy était basée sur un plan d'échantillonnage non aléatoire conduisant à des biais de sélection. La structure de la population n'étant pas connue dans la commune il n'était pas possible d'effectuer un redressement à partir des caractéristiques des ménages

de la population générale. Ainsi, il est probable que les ménages à faible revenu aient été sous-estimés dans l'échantillon ayant moins accès aux biens de consommation vendus sur le marché.

Ce travail nous a permis d'évaluer rapidement la composition en espèces animales dans les ménages correspondant à notre critère d'inclusion. En effet, les poules et les chiens étaient bien représentés dans l'étude réalisée [chapitre 6](#) (95,7 % et 71,5 % respectivement) mais finalement les porcs ont été moins échantillonnés (41,5 % des ménages en possédaient au moins un contre 73,9 % dans l'enquête). Ce qui appuie l'hypothèse d'une sous-représentation des ménages à bas revenu dans l'enquête au marché, l'achat d'un porc étant plus onéreux que celui d'une volaille.



Vue d'artiste de colonies de bactéries d'espèces différentes, aquarelle sur papier  
© Thanh Minh Luong, 2007