

RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES EN MILIEU URBAIN : LE RAT SURMULOT COMME SENTINELLE ?

ANTIBIOTIC RESISTANCE IN THE URBAN ENVIRONMENT: THE BROWN RAT AS SENTINEL?

Amélie DESVARS-LARRIVE^{1,2} , Werner RUPPITSCH³ , Sarah LEPUSCHITZ³ , Michael P. SZOSTAK¹ ,
Joachim SPERGSE¹ , Andrea T. FEßLER⁴ , Stefan SCHWARZ⁴ , Stefan MONECKE^{5,6,7} ,
Ralf EHRICHT^{5,7} , Chris WALZER^{1,8} , Igor LONCARIC¹ 

Manuscrit initial reçu le 24 mars 2024 (communication orale présentée le 23 mars 2023), manuscrit révisé reçu le 27 mai 2024, accepté le 22 juin 2024

RÉSUMÉ

Le rôle des rats bruns urbains en tant que porteurs de bactéries résistantes aux antimicrobiens a été peu étudié. Notre étude visait à évaluer la prévalence de la résistance aux antimicrobiens chez les rats urbains sur deux sites densément peuplés de Vienne en Autriche. De 2016 à 2017, nous avons échantillonné l'intestin et le nasopharynx de 62 rats bruns. La culture et la caractérisation des isolats ont été réalisées à l'aide d'une combinaison de techniques microbiologiques et génétiques. Nous avons mis en évidence, chez 9/62 rats, huit souches d'*Escherichia coli* multirésistantes ainsi que deux souches d'*Enterobacter xiangfangensis* ST114 (complexe *Enterobacter cloacae*) productrices de New Delhi métallo- β -lactamase, présentant une résistance étendue aux antibiotiques. De plus, 44 staphylocoques résistants à la méthicilline, appartenant à sept espèces, ont été identifiés chez 37 rats. Notre étude démontre le rôle potentiel des rats urbains comme réservoir de bactéries multirésistantes et l'importance des mesures de contrôle des rongeurs en ville.

Mots-clés : rat surmulot, urbain, Autriche, antimicrobiens, résistance

ABSTRACT

Despite their ubiquitous presence, the role of urban brown rats as carriers of antimicrobial-resistant bacteria has received limited attention. Our study aimed to estimate the prevalence of antimicrobial resistance among urban rats at two densely populated locations in Vienna, Austria. During 2016-2017, we captured and sampled the intestine and nasopharynx of 62 brown rats. Culture and subsequent characterisation of the isolates and their antimicrobial profiles were conducted using a combination of microbiological and genetic techniques. Overall, in 9/62 rats, we evidenced the presence of eight multidrug-resistant *Escherichia coli* strains and two extensively drug-resistant New Delhi metallo- β -lactamase-producing *Enterobacter xiangfangensis* ST114 (*Enterobacter cloacae* complex) strains. Furthermore, 44 methicillin-resistant staphylococci were identified in 37 rats, representing seven distinct staphylococcal species. Our study underscores the potential of urban brown rats as reservoir of multidrug-resistant bacteria and the importance of effective rodent control measures to ensure public health in urban settings.

Keywords: brown rat, urban, Austria, antimicrobial, resistance

1- Université de médecine vétérinaire de Vienne, Veterinaerplatz 1, 1210 Vienne, Autriche,

amelie.desvars@vetmeduni.ac.at ; Michael.Szostak@vetmeduni.ac.at ; joachim.spergser@vetmeduni.ac.at ; igor.loncaric@vetmeduni.ac.at

2- Complexity Science Hub Vienna, Josefstädter Strasse 39, 1080 Vienne, Autriche

3- Austrian Agency for Health and Food Safety, Waehringerstrasse 25a, 1090 Vienne, Autriche, werner.ruppitsch@ages.at ; sarah.lepuschitz@ages.at

4- Freie Universität Berlin, Kaiserswerther Strasse 16-18, 14195 Berlin, Allemagne, andrea.fessler@fu-berlin.de ; Stefan.Schwarz@fu-berlin.de

5- Leibniz Institute of Photonic Technology, Albert-Einstein-Straße 9, 07745 Jena, Allemagne, stefan.monecke@leibniz-ipht.de ; Ralf.Ehrich@leibniz-ipht.de

6- Technische Universität Dresden, Potthoff-Bau, Hettnerstraße 3, 01069 Dresden, Allemagne

7- InfectoGnostics Research Campus, Philosophenweg 7, 07743 Jena, Allemagne

8- Wildlife Conservation Society, 2300 Southern Boulevard Bronx, New York 10460, États-Unis, cwalzer@wcs.org



INTRODUCTION

L'émergence d'agents pathogènes multirésistants aux antibiotiques, difficiles, voire impossibles, à traiter, devient une préoccupation mondiale pour la santé humaine et animale (Centers for Disease Control and Prevention 2013, European Centre for Disease Prevention and Control 2017). Les Enterobacteriaceae productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE), les Enterobacteriaceae résistantes aux carbapénèmes, et le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA) sont reconnus comme une menace pour la santé publique (Centers for Disease Control and Prevention 2013). L'un des gènes de carbapénémase récemment décrits, le gène de la New Delhi metallo- β -lactamase-1 (NDM-1), est situé sur des plasmides portant plusieurs autres gènes de résistance aux antimicrobiens, ce qui fait de NDM-1 un défi majeur pour les traitements (Walsh & Toleman 2011).

Plus de la moitié de la population mondiale humaine vit aujourd'hui en milieu urbain et, d'ici 2030, cette proportion devrait augmenter jusqu'à 60 % (World Health Organization & UN-Habitat 2016). La densité de la population humaine, les interactions accrues avec la faune urbaine et le microclimat de la ville, plus chaud, favorisent l'émergence de zoonoses transmises par la faune sauvage (Hassell *et al.* 2017). Cependant, dans ce contexte, le rôle de la faune sauvage en tant que réservoir et/ou vecteur de résistance aux antimicrobiens (RAM) demeure mal compris. Les rats bruns sauvages (*Rattus norvegicus*), ou rats surmulots, pourraient jouer un rôle particulièrement pertinent, car ils sont des commensaux de l'homme, se nourrissent de déchets humains et colonisent le système d'égouts, où ils ont des interactions fréquentes avec les excréments humains. Ainsi, ils sont exposés aux résidus antimicrobiens d'origine anthropique et peuvent potentiellement acquérir, transporter et propager des bactéries multirésistantes (Guenther *et al.* 2012 ; Hansen *et al.* 2016). Or, on sait peu de choses sur leur rôle dans l'épidémiologie des RAM.

Des Enterobacteriaceae résistantes aux antimicrobiens ont été isolées chez des rats urbains dans la cité portuaire du Pirée en Grèce (Burriel *et al.* 2008), à Berlin en Allemagne (Guenther *et al.* 2012), à Hong Kong (Ho *et al.* 2015), à Vancouver au Canada (Himsworth *et al.* 2015) et, plus récemment, à São Paulo au Brésil (Sano *et al.* 2023). La prévalence de MRSA et de *Staphylococcus pseudintermedius* résistant à la méticilline (methicillin-resistant *S. pseudintermedius*, MRSP) chez les rats urbains a été étudiée à Vancouver au Canada (Himsworth *et al.* 2014 ; Himsworth *et al.* 2013), tandis que Hansen *et al.* ont décrit le résistome des rats bruns urbains en Malaisie, à Hong Kong et au Danemark (Hansen *et al.* 2016).

Étant donné que chaque ville présente un contexte environnemental, épidémiologique, et socio-économique particulier, les études locales sont nécessaires pour évaluer le rôle des rats urbains dans l'épidémiologie des RAM. Notre objectif principal était de déterminer si les rats urbains de deux endroits très fréquentés du centre-ville de Vienne, en Autriche, portaient i) des Enterobacteriaceae productrices de BLSE et/ou porteuses de gènes de résistance aux fluoroquinolones et ii) des bactéries du genre *Staphylococcus* résistantes à la méticilline.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Captures

Pour la capture des rats surmulots, 20 à 60 pièges Manufrance (280 × 100 × 100 mm) ont été posés sur 17 nuits, entre le 12 septembre 2016 et le 6 juin 2017, dans deux endroits situés dans le centre-ville de Vienne, capitale de l'Autriche : (i) à Karlsplatz (dix nuits), l'un des endroits les plus touristiques de la ville, et (ii) sur une promenade le long du canal du Danube (sept nuits). Ces sites ont été choisis car des rats étaient observés pendant la journée (alors que *R. norvegicus* est considéré comme une espèce nocturne (Feng & Himsworth 2014)), suggérant une population de rats abondante, et potentiellement un risque accru de transmission d'agents pathogènes. Les pièges ont été installés entre 17h00 et 19h30 et relevés entre 6h00 et 8h00 le lendemain.

Collecte des échantillons

Les animaux capturés ont été transférés vivants au laboratoire où les échantillons ont été collectés. Les rats ont été anesthésiés avec de l'isoflurane à 5 % avant euthanasie induite par une surdose de barbituriques administrée par voie intra-péritonéale. Nous avons collecté des échantillons pharyngiens et intra-nasaux à l'aide d'écouvillons stériles. Les écouvillons ont été placés individuellement dans un milieu de transport Amies jusqu'à la mise en culture. Des tissus de l'intestin grêle et du côlon ont aussi été collectés de manière aseptique. Les échantillons fraîchement collectés ont été transportés à 4°C à l'Institut de Microbiologie de l'Université Vétérinaire de Vienne, Autriche.



Caractérisation des isolats d'Enterobacteriaceae

Enterobacteriaceae productrices de β -lactamases

Pour chaque animal, les échantillons de tissus intestinaux ont été poolés (intestin grêle et côlon), pré-cultivés dans de l'eau peptonée tamponnée, supplémentée avec 1 mg/L de céfotaxime, puis cultivés à 37°C pendant une nuit sur gélose MacConkey supplémentée avec 1 mg/L de céfotaxime.

Enterobacteriaceae résistantes aux fluoroquinolones

En parallèle, les échantillons intestinaux ont été cultivés à 37°C pendant une nuit dans du bouillon MacConkey, puis cultivés sur gélose MacConkey supplémentée avec 0,06 mg/L de ciprofloxacine.

Identification des Enterobacteriaceae

Les différents isolats d'Enterobacteriaceae ont été identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Nous avons testé les isolats pour la production de BLSE à l'aide de disques contenant de la céfotaxime et de la ceftazidime, avec ou sans acide clavulanique, selon les normes du Clinical and Laboratory Standards Institute (2014). De plus, nous avons utilisé des disques contenant 30 μ g de céfoxitine ou 5 μ g de ciprofloxacine pour rechercher, respectivement, les isolats produisant des β -lactamases de type C (AmpC) ou résistants aux fluoroquinolones. Les phénotypes BLSE et AmpC ont été confirmés par le test MASTDISCS ID AmpC et BLSE. Nous avons testé la sensibilité des isolats d'Enterobacteriaceae à certains agents antimicrobiens par la méthode de diffusion sur disque selon les directives du Clinical and Laboratory Standards Institute (2014). *Escherichia coli* ATCC 25922 et *S. aureus* ATCC 25923 ont servi de souches de contrôle de qualité.

Nous avons caractérisé les gènes de résistance à l'aide d'un test miniaturisé basé sur une micropuce. Nous avons effectué un sérotypage et détecté les gènes de résistance et les principaux gènes de virulence des isolats d'*E. coli* à l'aide du kit *E. coli* PanType AS-2. Une PCR a été réalisée pour la détection des gènes *bla* et *qnr*, suivie du séquençage des produits amplifiés (Loncaric *et al.* 2013 ; Nordmann *et al.* 2011). Les séquences ont été alignées dans BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) et comparées avec les séquences de référence disponibles dans GenBank et la base de données du National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/beta-lactamase-data-resources/>). Par ailleurs, pour les isolats résistants à la ciprofloxacine, les régions de *gyrA* et *parC* déterminant la résistance aux quinolones ont été séquencées après amplification par PCR (Everett *et al.* 1996).

Le phylogroupe des isolats d'*E. coli* a été déterminé en utilisant la méthode d'attribution en quadruplex (Clermont *et al.* 2013). Les isolats ont ensuite été soumis à un typage multilocus (multilocus sequence typing, MLST) (Wirth *et al.* 2006). Les profils alléliques et les séquences type (ST) ont été déterminés en interrogeant le site Web MLST d'*E. coli* (http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/allele_st_search). Nous avons effectué une analyse par MLST du complexe *Enterobacter cloacae* selon le protocole recommandé par Miyoshi-Akiyama *et al.* (2013). La parenté clonale des deux isolats identifiés comme appartenant au complexe *En. cloacae* porteurs de *bla*_{NDM-1} a été évaluée par séquençage complet du génome : d'abord l'ADN bactérien a été isolé à l'aide du kit MagAttract HMW DNA et des bibliothèques prêtes à être séquencées ont été préparées avec le kit de préparation de bibliothèque d'ADN Nextera XT. Les isolats ont été séquencés à l'aide de la plateforme Illumina MiSeq avec une longueur de lecture de 2 × 300 pb (Lepuschitz *et al.* 2018). L'assemblage *de novo* des séquences brutes a été réalisé avec SPAdes v.3.9.0 (Bankevich *et al.* 2012), et l'identification des espèces a été effectuée avec JSpecies et l'outil d'analyse ANIb (identité nucléotidique moyenne via BLAST) (Richter *et al.* 2016). Nous avons utilisé la base de données Comprehensive Antibiotic Resistance Database (<https://card.mcmaster.ca/home>) pour identifier les gènes conférant une résistance aux antimicrobiens (Jia *et al.* 2017).

Finalement, la présence de plasmides a été déterminée à l'aide de PlasmidFinder 1.3 disponible sur le serveur web du Center for Genomic Epidemiology (<http://www.genomicepidemiology.org/>) (Carattoli *et al.* 2014). Nous avons réalisé des expériences de conjugaison avec des isolats porteurs du gène *bla* en tant que donneurs, puis confirmé et caractérisé les transconjugants comme décrit précédemment (Loncaric *et al.* 2013). Les expériences d'électrotransformation ont été conduites avec un GenePulser II et les plasmides conjugués et transférables ont été typés (Carattoli *et al.* 2014).



Caractérisation des isolats de *Staphylococcus* spp.

Pour chaque animal, les échantillons pharyngiens et nasaux ont été poolés, incubés toute la nuit dans un bouillon tryptique soja avec 6,5 % de NaCl, puis ensemencés sur un BBL CHROMagar MRSA II et une gélose de Mueller-Hinton avec 2,5 % de NaCl, 2 mg/L d'oxacilline et 20 mg/L d'aztréonam. Pour chaque boîte de gélose, un échantillon de chaque type de colonie a été sélectionné et cultivé sur le même milieu. La résistance à la méticilline a été confirmée par une méthode de diffusion sur disque avec 30 µg de céfoxitine ou 1 µg d'oxacilline (Clinical and Laboratory Standards Institute 2014).

Les gènes *mecA* et *mecC* ont été amplifiés par PCR (Loncaric *et al.* 2019) et les espèces de staphylocoques résistants à la méticilline (methicillin-resistant *Staphylococcus*, MRS) ont été caractérisées par amplification PCR et séquençage du gène *rpoB* (Mellmann *et al.* 2006). Ces MRS porteurs des gènes *mecA* ou *mecC* ont été testés pour leur susceptibilité à certains agents antimicrobiens en utilisant la méthode de diffusion sur disque selon les recommandations du Clinical and Laboratory Standards Institute (2014). La détection des gènes de résistance et de virulence a été réalisée à l'aide du kit de génotypage *S. aureus* 2.0 DNA microarray (Monecke *et al.* 2011). Nous avons également analysé les MRSA, MRSP, MR *Staphylococcus epidermidis* (methicillin-resistant *S. epidermidis*, MRSE) et MR *Staphylococcus haemolyticus* (methicillin-resistant *S. haemolyticus*, MRSH) par typage *dru*, tandis que les MRSA et MRSP ont été aussi examinés par typage *spa* (Harmsen *et al.* 2003). Finalement, nous avons analysé les éléments du chromosome SCCmec (staphylococcal cassette chromosome *mec*) de certains isolats sélectionnés à l'aide d'un DNA-based-microarray (Monecke *et al.* 2018).

RÉSULTATS

Captures

Au total, 73 rats bruns ont été capturés (Figure 1). Parmi eux, 14 n'ont pas pu être analysés. Trente-six rats capturés à Karlsplatz (dont 18 étaient des mâles) et 26 capturés sur la promenade du canal du Danube (15 mâles) ont finalement été inclus dans l'étude.



Figure 1 : Rat brun (*Rattus norvegicus*) capturé à Karlsplatz, Vienne, Autriche, dans un piège Manufrance.

Caractérisation des isolats d'Enterobacteriaceae

Dix Enterobacteriaceae résistantes à la cefotaxime ont été isolées des échantillons intestinaux chez 9/62 rats. Parmi ces Enterobacteriaceae, nous avons identifié huit isolats d'*E. coli* et deux membres du complexe *En. cloacae*, caractérisés comme *En. xiangfangensis* par l'analyse ANIb basée sur le séquençage complet du génome. Les dix isolats étaient sensibles à l'amikacine. Sept isolats d'*E. coli* présentaient le phénotype ESBL. Un isolat d'*E. coli* et les deux isolats identifiés comme *En. xiangfangensis* présentaient le phénotype AmpC et ESBL. Quatre *E. coli* et les deux *En. xiangfangensis* étaient également résistants à la tétracycline et aux fluoroquinolones. Les isolats d'*En. xiangfangensis* étaient aussi résistants aux carbapénèmes. Selon Sweeney *et al.* (2018), ces deux isolats peuvent être considérés comme extrêmement résistants aux antibiotiques (Figure 2).

Les isolats d'*E. coli* appartenaient à trois phylogroupes distincts : B1, C et E. Le MLST a détecté sept STs différents d'*E. coli* (ST34, ST38, ST58, ST101, ST361, ST1079, ST1431) tandis que les deux isolats d'*En. xiangfangensis* ont été identifiés comme ST114. Les deux isolats d'*En. xiangfangensis* étaient porteur du gène NDM-1 sur un plas-



mide similaire au type IncH (numéro d'accès GenBank : CP016921). PlasmidFinder a identifié ce plasmide comme appartenant au groupe IncHI2.

Chez sept des huit isolats d'*E. coli*, des gènes de la famille *bla*_{CTX-M} ont été détectés, seuls (trois isolats) ou en combinaison avec d'autres gènes *bla* (quatre isolats). Un isolat d'*E. coli* portait les gènes *bla*_{CMY-2} et *bla*_{TEM-1}. Les deux isolats d'*En. xiangfangensis* portaient quatre gènes *bla* (*bla*_{NDM-1}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM-176} et *bla*_{OXA-1}). Les gènes *sul2* et *aadA1* étaient les gènes non β -lactamases les plus fréquemment détectés. Des substitutions d'acides aminés ont été détectées dans les gènes *gyrA* et *parC*. Les gènes *hemL* (codant pour la glutamate-1-semialdéhyde amino-transférase) et *iss* (augmentation de la survie dans le sérum) étaient les déterminants de virulence les plus fréquemment détectés parmi les isolats d'*E. coli*. Le transfert de résistance a été démontré pour les gènes *bla*, par conjugaison de trois isolats d'*E. coli* produisant des ESBL en tant que donneurs avec soit *E. coli* J53 résistant à l'azide de sodium, soit *E. coli* MT 102 résistant à l'azide de sodium et à la rifampicine en tant que receveurs. En utilisant les deux isolats d'*En. xiangfangensis* comme donneurs, le transfert du gène *bla*_{NDM-1} par conjugaison ou transformation a échoué, mais le transfert des gènes *bla*_{CTX-M} a été réussi.

Caractérisation des *Staphylococcus* spp. résistants à la méticilline

Quarante-quatre MRS appartenant à sept espèces ont été isolés chez 37 des 62 rats. Parmi eux, nous avons identifié un MRSA (prévalence dans la population de rats : 1,6 %), un MRSP, un MRSE, un MRSH, un MR *S. xylosus* et deux espèces du groupe *Staphylococcus sciuri*, à savoir MR *S. fleurettii* (n = 37 isolats ; 54,8 %) et MR *S. sciuri* (n = 2 ; 3,2 %) (Figure 2). Tous les MRS étaient positifs pour le gène *mecA*, à l'exception de MR *S. xylosus* qui portait *mecC*. Tous les MR *S. fleurettii* et le MR *S. xylosus* étaient sensibles à tous les agents antimicrobiens non β -lactamines testés. Les six autres isolats de staphylocoques MR étaient classés comme multirésistants (Sweeney et al. 2018). L'isolat MRSA appartenait au complexe clonal 398. Il était du type *spa* t011, *dru* dt11a, et était positif pour les hémolysines et, le régulateur génique accessoire (*agr*) du groupe I et le type de capsule 5, et appartenait au type SCCmec VT + *czrC*, comme la souche MRSA ST398/isolat S0385 (numéro d'accès GenBank : AM990992.1). L'isolat MRSP présentait le type *spa* t02 et le type *dru* dt11av. L'isolat MRSH appartenait au type SCCmec V, mais la séquence *dru* n'a pas pu être amplifiée. L'isolat MRSE appartenait au type *dru* dt10a et présentait un gène pseudo SCCmec. Le typage SCCmec additionnel a révélé que les membres du groupe *S. sciuri* portaient différents éléments SCCmec irréguliers. L'isolat MR *S. xylosus* positif pour *mecC* portait le complexe génique *mec* de type E.

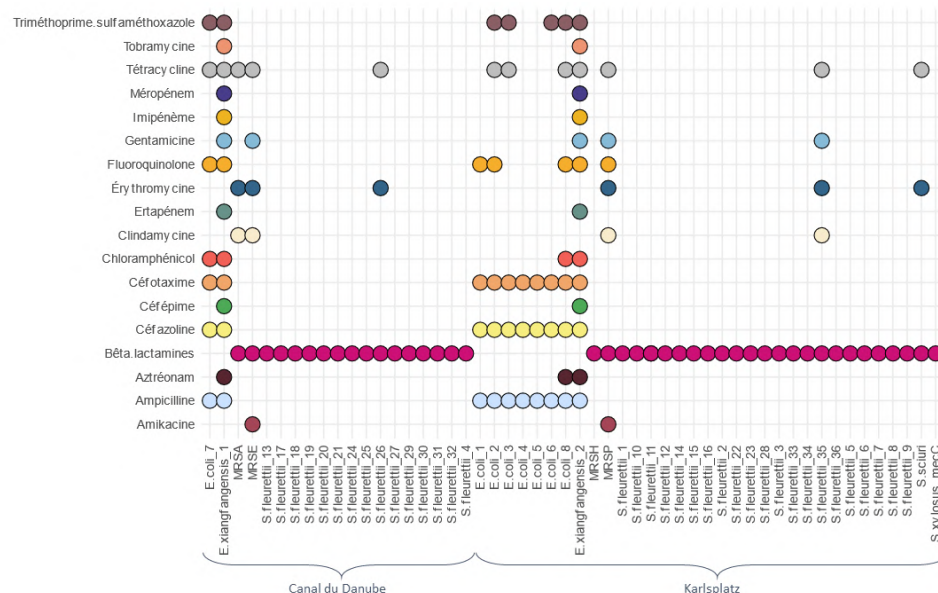


Figure 2 : Phénotypes des bactéries résistantes aux antimicrobiens, identifiées sur le site canal du Danube et sur le site Karlsplatz à Vienne en Autriche, en 2016-2017. L'axe vertical représente les antimicrobiens testés, tandis que l'axe horizontal présente les différents isolats (espèce bactérienne et numéro d'identification pour les isolats appartenant à la même espèce).



Prévalence des bactéries résistantes aux antimicrobiens

La majorité des rats échantillonnés présentaient une résistance aux antimicrobiens, avec une prévalence globale de 62,9 % (39/62). Douze des 39 rats positifs présentaient une co-colonisation avec deux (dix rats), trois (1 rat) ou quatre (1 rat) isolats résistants aux antimicrobiens. Sept rats positifs pour les Enterobacteriaceae étaient également positifs pour les MRS (Figure 3).

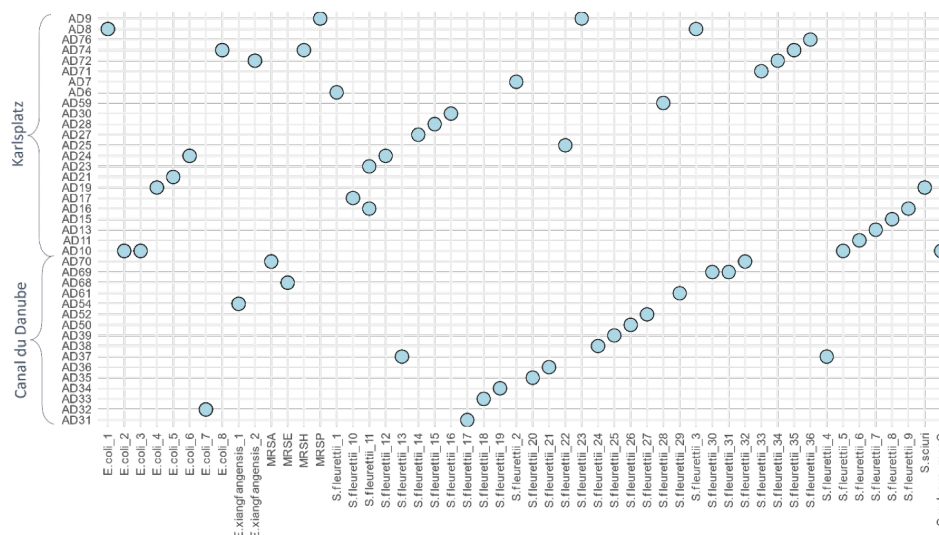


Figure 3 : Aperçu des résultats par rat et par site d'étude, montrant la co-colonisation des individus par une, deux, trois ou quatre bactéries résistantes. L'axe vertical représente les rats identifiés par un code unique ; l'axe horizontal représente les isolats identifiés dans l'étude (espèce bactérienne et numéro d'identification pour les isolats appartenant à la même espèce).

Numéros d'accès des séquences nucléotidiques

Les génomes des deux isolats d'*En. xiangfangensis* ont été déposés sous la référence PRJNA517386 dans la base de données NCBI BioProject.

DISCUSSION

À notre connaissance, il s'agit du premier isolement de souches appartenant au complexe *En. cloacae* productrices de NDM-1 en Autriche, bien que NDM-1 ait été décrit dans le complexe *En. cloacae* dans d'autres pays (Annavajhala *et al.* 2019). L'isolat a été identifié comme *En. xiangfangensis* portant simultanément les gènes *bla*_{NDM-1}, *bla*_{CTX-M-15}, un gène similaire à *bla*_{TEM}, le gène plasmidique de résistance aux quinolones *qrmB1*, et divers autres gènes de résistance. De plus, il s'agit du premier rapport de la présence de MRSE, MRSH, MR *S. xyloso* positif pour *mecC*, et de souches membres du groupe *S. sciuri* résistantes à la méticilline chez le rat brun en milieu urbain.

La prévalence des Enterobacteriaceae multirésistantes chez les rats bruns urbains à Vienne en Autriche (14,5 %) est similaire à celle signalée à Berlin en Allemagne (13,6 %) (Guenther *et al.* 2012) et à Hong Kong (13,9 %) (Ho *et al.* 2015). En revanche, au Pirée en Grèce, 61,5 % des rats urbains portaient des souches d'*E. coli* multirésistantes (Burriel *et al.* 2008), tandis qu'à Vancouver au Canada, la prévalence était de 6,5 % (Himsworth *et al.* 2015). Neuf des dix isolats d'Enterobacteriaceae viennois étaient porteurs d'un gène *bla*_{CTX-M} (ESBL), tandis qu'un isolat portait un gène *bla*_{CMY-2} (AmpC). Étant donné que la propagation de ces gènes est fortement facilitée par transfert horizontal via des plasmides (Rozwandowicz *et al.* 2018), nos résultats suggèrent que les rats pourraient jouer un rôle dans la dissémination des β -lactamases de type ESBL et AmpC entre les réservoirs humains, animaux et environnementaux.



À ce jour, deux *Klebsiella pneumoniae* productrices de NDM-1 ont été isolées en Autriche, chez des patients originaires du Pakistan et du Kosovo, et une *E. coli* productrice de NDM-1 a été isolée chez un patient originaire d'Inde (Zarfel *et al.* 2011). Les espèces du complexe *En. cloacae* ont récemment émergé comme cause d'épidémies nosocomiales et d'infections bactériennes difficiles à traiter, et les clones ST114 sont considérés comme des clones ayant un potentiel épidémique élevé (Izdebski *et al.* 2015). Par conséquent, la détection précoce de l'émergence de résistance aux carbapénèmes dans la faune sauvage urbaine est essentielle pour la surveillance, la prévention, et le contrôle des RAM.

Notre étude met en évidence une prévalence élevée des staphylocoques résistants à la méticilline chez les rats bruns urbains (59,7 %), ainsi qu'une importante diversité d'espèces. Le MRSA a été isolé chez 3,5 % (22/637) des rats bruns urbains échantillonnés à Vancouver (Himsworth *et al.* 2014), ce qui confirme la faible prévalence des MRSA dans la population de rats surmulots mise en évidence dans notre étude (1,2 %). Nous avons caractérisé un isolat MRSA CC398 VT type *spa* t011 et *dru* dt11a. Himsworth *et al.* (2014) ont mis en évidence des lignées génétiques de MRSA communes à l'homme, au bétail et aux rats, suggérant que les rats peuvent être une source d'infection pour l'homme et le bétail. En Autriche, le MRSA CC398 avait déjà été signalé chez le bétail et les animaux de compagnie (Loncaric *et al.* 2014), ainsi que chez des patients humains (Krziwanek *et al.* 2008). Par ailleurs, Himsworth *et al.* (2013) ont estimé la prévalence du MRSP chez les rats bruns urbains de Vancouver à 2,1 % (5/237), ce qui est proche de la prévalence observée à Vienne (1,6 %). De plus, les auteurs suggèrent la possibilité de transmission de MRSP entre les chiens et les rats. Enfin, nous avons identifié un MR *S. xylosus* positif pour *mecC* (négatif pour *mecA*). Cet isolat a été décrit par Loncaric *et al.* (2019) dans le cadre d'une enquête de cinq ans sur les staphylocoques à coagulase négative porteurs du gène *mecC* et isolés chez 767 animaux sauvages en Autriche, parmi lesquels le rat brun.

Bien que l'interaction entre les réservoirs de RAM chez la faune urbaine et les risques pour la santé humaine demeure floue, la prévalence globale des RAM que nous avons observée chez les rats échantillonnés est préoccupante. Plusieurs rats colonisés par des isolats multirésistants, dont un *En. xiangfangensis* ST114 résistant aux carbapénèmes, ont été capturés à Karlsplatz dans un jardin négligé, utilisé par les sans-abris comme dortoir en été. Cette proximité particulière accroît le risque de propagation de bactéries résistantes aux antimicrobiens des rats à l'homme. En milieu urbain, les personnes sans-abri, marginalisées, ou vivant dans des quartiers défavorisés, sont les plus vulnérables aux maladies transmises par les rongeurs (Leibler *et al.* 2016) ; c'est pourquoi la lutte contre les rongeurs doit rester une priorité pour la santé publique urbaine. Douze des rats capturés portaient plus d'un isolat résistant, ce qui indique un rôle potentiel des rats urbains comme « creuset » pour le transfert horizontal de gènes entre des espèces bactériennes potentiellement acquises à différents endroits et à différents moments (Hansen *et al.* 2016). En effet, dans l'écosystème des eaux usées, les rats sont exposés aux RAM par un contact direct avec des bactéries résistantes aux antimicrobiens, mais aussi avec des éléments génétiques mobiles, tels que des bactériophages ou des plasmides, porteurs de gènes de résistance aux antimicrobiens (Hansen *et al.* 2016 ; Lood *et al.* 2017 ; Rozwandowicz *et al.* 2018).

Les principales limitations de notre étude résident dans la faible taille de l'échantillon ($n = 62$) et le petit nombre de sites étudiés ($n = 2$). Une taille d'échantillon plus grande aurait amélioré la précision de l'estimation de la prévalence, offrant ainsi une image plus détaillée de l'épizootiologie des RAM chez les rats urbains. Un plus grand nombre de sites aurait fourni des informations sur la variabilité spatiale et les facteurs de risque environnementaux des RAM dans la ville. De plus, des données sur les isolats résistants aux antimicrobiens provenant des animaux domestiques et des patients humains à Vienne auraient donné une vue d'ensemble plus complète de la situation épidémiologique.

En raison de leur omniprésence dans les villes, de leurs contacts réguliers avec les effluents d'égouts et les déchets humains, de leur alimentation généraliste et opportuniste, ainsi que de la taille relativement restreinte de leur domaine vital (Feng & Himsworth 2014), les rats bruns constituent une espèce sentinelle idéale pour détecter les variations à petite échelle de la distribution et, potentiellement, des sources de RAM (Furness *et al.* 2017). En effet, les rats peuvent révéler la présence d'agents pathogènes circulant à des niveaux infra-cliniques, qui ne sont pas encore détectables dans les populations humaines. Bien que la surveillance des eaux usées offre des avantages économiques, logistiques et éthiques (Clarke *et al.* 2024 ; Gholipour *et al.* 2024), elle présente des limitations en termes



de standardisation, d'interprétation des données, de sensibilité des méthodes de détection, et de représentativité de la résistance humaine aux antibiotiques (Chau *et al.* 2022 ; Gholipour *et al.* 2024). En conclusion, la surveillance des rats urbains représente une approche complémentaire qui permettrait de renforcer la surveillance globale des RAM. Utiliser les rats comme bio-indicateurs dans les programmes de surveillance permettrait d'intégrer une approche « One Health » de la RAM dans les écosystèmes urbains, améliorant ainsi la détection précoce, le suivi de la dynamique d'agents pathogènes et l'évaluation des risques pour la santé humaine.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Diana Suzana Gliga et Margaret Odom pour leur assistance sur le terrain.

Nous remercions également Ines Engelmann, Annett Reissig et Elke Müller pour leur excellente assistance technique.

Cette recherche a été financée par une bourse postdoctorale accordée par l'Université de Médecine Vétérinaire de Vienne, Autriche (FU-282-PDC).

CONFLITS D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêt.

COMITÉ D'ÉTHIQUE

Nous avons suivi les normes institutionnelles et nationales pour les soins et l'utilisation des animaux dans la recherche.

Cette étude a été approuvée par le comité institutionnel d'éthique et de bien-être animal et par l'autorité nationale (GZ 68.205/0196-WF/V/3b/2016).

RÉFÉRENCES

- Annavajhala MK, Gomez-Simmonds A, Uhlemann A-C. Multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* complex emerging as a global, diversifying threat. *Front Microbiol.* 2019;10(44).
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, *et al.* SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol.* 2012;19(5):455-77.
- Burriel AR, Kritas SK, Kontos V. Some microbiological aspects of rats captured alive at the port city of Piraeus, Greece. *Int J Environ Health Res.* 2008;18(2):159-64.
- Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, *et al.* *In silico* detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(7):3895-903.
- Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Atlanta, Georgia: CDC; 2013.
- Chau KK, Barker L, Budgell EP, Vihta KD, Sims N, Kasprzyk-Hordern B, *et al.* Systematic review of wastewater surveillance of antimicrobial resistance in human

populations. *Environ Int.* 2022;162:107171.

- Clarke LM, O'Brien JW, Murray AK, Gaze WH, Thomas KV. A review of wastewater-based epidemiology for antimicrobial resistance surveillance. *Journal of Environmental Exposure Assessment.* 2024;3(1):7.
- Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports.* 2013;5(1):58-65.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement: Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2016. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2017.
- Everett MJ, Jin YF, Ricci V, Piddock LJ. Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(10):2380-6.



- Feng AYT, Himsworth CG. The secret life of the city rat: a review of the ecology of urban Norway and black rats (*Rattus norvegicus* and *Rattus rattus*). Urban Ecosyst. 2014;17(1):149-62.
- Furness LE, Campbell A, Zhang L, Gaze WH, McDonald RA. Wild small mammals as sentinels for the environmental transmission of antimicrobial resistance. Environ Res. 2017;154(Supplement C):28-34.
- Gholipour S, Shamsizadeh Z, Halabowski D, Gwenzi W, Nikaeen M. Combating antibiotic resistance using wastewater surveillance: Significance, applications, challenges, and future directions. Sci Total Environ. 2024;908:168056.
- Guenther S, Bethe A, Fruth A, Semmler T, Ulrich RG, Wieler LH, et al. Frequent combination of antimicrobial multiresistance and extraintestinal pathogenicity in *Escherichia coli* isolates from urban rats (*Rattus norvegicus*) in Berlin, Germany. PLoS One. 2012;7(11):e50331.
- Hansen TA, Joshi T, Larsen AR, Andersen PS, Harms K, Møllerup S, et al. Vancomycin gene selection in the microbiome of urban *Rattus norvegicus* from hospital environment. Evol Med Public Health. 2016;2016(1):219-26.
- Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothgänger J, Claus H, Turnwald D, et al. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. J Clin Microbiol. 2003;41(12):5442-8.
- Hassell JM, Begon M, Ward MJ, Fèvre EM. Urbanization and disease emergence: dynamics at the wildlife-livestock-human interface. Trends Ecol Evol. 2017;32(1):55-67.
- Himsworth CG, Miller RR, Montoya V, Hoang L, Romney MG, Al-Rawahi GN, et al. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by wild urban Norway rats (*Rattus norvegicus*). PLoS One. 2014;9(2):e87983.
- Himsworth CG, Patrick DM, Parsons K, Feng A, Weese JS. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in rats. Emerg Infect Dis. 2013;19(1):169-70.
- Himsworth CG, Zabek E, Desruisseau A, Parmley EJ, Reid-Smith R, Jardine CM, et al. 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. 2015;51(3):589-600.
- Ho P-L, Lo W-U, Lai EL, Law PY, Leung SM, Wang Y, et al. Clonal diversity of CTX-M-producing, multi-drug-resistant *Escherichia coli* from rodents. J Med Microbiol. 2015;64(2):185-90.
- Izdebski R, Baraniak A, Herda M, Fiett J, Bonten MJM, Carmeli Y, et al. MLST reveals potentially high-risk international clones of *Enterobacter cloacae*. J Antimicrob Chemother. 2015;70(1):48-56.
- Jia B, Raphenya AR, Alcock B, Waglechner N, Guo P, Tsang KK, et al. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. Nucleic Acids Res. 2017;45(D1):D566-D73.
- Krziwanek K, Luger C, Sammer B, Stumvoll S, Stammler M, Sagel U, et al. MRSA in Austria—an overview. Clin Microbiol Infect. 2008;14(3):250-9.
- Leibler JH, Zakhour CM, Gadhoke P, Gaeta JM. Zoonotic and vector-borne infections among urban homeless and marginalized people in the United States and Europe, 1990–2014. Vector Borne Zoonotic Dis. 2016;16(7):435-44.
- Lepuschitz S, Huhulescu S, Hyden P, Springer B, Rattei T, Allerberger F, et al. Characterization of a community-acquired-MRSA USA300 isolate from a river sample in Austria and whole genome sequence based comparison to a diverse collection of USA300 isolates. Sci Rep. 2018;8(1):9467.
- Loncaric I, Kübber-Heiss A, Posautz A, Ruppitsch W, Lepuschitz S, Schauer B, et al. Characterization of mecC gene-carrying coagulase-negative *Staphylococcus* spp. isolated from various animals. Vet Microbiol. 2019;230:138-44.
- Loncaric I, Künzel F, Licka T, Simhofer H, Spargser J, Rosengarten R. Identification and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from Austrian companion animals and horses. Vet Microbiol. 2014;168(2):381-7.
- Loncaric I, Stalder GL, Mehinagic K, Rosengarten R, Hoelzl F, Knauer F, et al. Comparison of ESBL – and AmpC producing Enterobacteriaceae and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from migratory and resident population of rooks (*Corvus frugilegus*) in Austria. PLoS One. 2013;8(12):e84048.
- Lood R, Ertürk G, Mattiasson B. Revisiting antibiotic resistance spreading in wastewater treatment plants - Bacteriophages as a much neglected potential transmission vehicle. Front Microbiol. 2017;8:2298-.
- Mellmann A, Becker K, von Eiff C, Keckevoet U, Schumann P, Harmsen D. Sequencing and staphylococci identification. Emerg Infect Dis. 2006;12(2):333-6.
- Miyoshi-Akiyama T, Hayakawa K, Ohmagari N, Shimajima M, Kirikae T. Multilocus sequence typing (MLST) for characterization of *Enterobacter cloacae*. PLoS One. 2013;8(6):e66358.
- Monecke S, Coombs G, Shore AC, Coleman DC, Akpaka P, Borg M, et al. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Sta-*



phylococcus aureus. PLoS One. 2011;6(4):e17936.

- Monecke S, Slickers P, Gawlik D, Müller E, Reissig A, Ruppelt-Lorz A, *et al.* Molecular typing of ST239-MRSA-III from diverse geographic locations and the evolution of the SCCmec III element during its intercontinental spread. Front Microbiol. 2018;9:1436.
- Nordmann P, Poirel L, Carrër A, Toleman MA, Walsh TR. How to detect NDM-1 producers. J Clin Microbiol. 2011;49(2):718-21.
- Richter M, Rosselló-Móra R, Oliver Glöckner F, Peplies J. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. Bioinformatics. 2016;32(6):929-31.
- Rozwandowicz M, Brouwer MSM, Fischer J, Wagenaar JA, Gonzalez-Zorn B, Guerra B, *et al.* Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother. 2018;73(5):1121-37.
- Sano E, Esposito F, Fontana H, Fuga B, Cardenas-Arias A, Moura Q, *et al.* One health clones of multidrug-resistant *Escherichia coli* carried by synanthropic

animals in Brazil. One Health. 2023;16:100476.

- Sweeney MT, Lubbers BV, Schwarz S, Watts JL. Applying definitions for multidrug resistance, extensive drug resistance and pandrug resistance to clinically significant livestock and companion animal bacterial pathogens-authors' response. J Antimicrob Chemother. 2018.
- Walsh TR, Toleman MA. The new medical challenge: why NDM-1? Why Indian? Expert Rev Anti Infect Ther. 2011;9(2):137-41.
- Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, *et al.* Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. Mol Microbiol. 2006;60(5):1136-51.
- World Health Organization & UN-Habitat. Global report on urban health: equitable healthier cities for sustainable development. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2016.
- Zarfel G, Hoenigl M, Leitner E, Salzer HJF, Feierl G, Masoud L, *et al.* Emergence of New Delhi metallo-lactamase, Austria. Emerg Infect Dis. 2011;17(1):129-30.

