



**THÈSE**  
**EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE**  
**DOCTORAT**

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie **Filière :** Sciences Biologiques  
**Spécialité :** Microbiologie Appliquée

**Présentée par**  
**MESBAH ZEKAR Ferielle**

*Thème*

**Prévalence et résistance aux antibiotiques de souches de  
bacilles à Gram négatif isolés à partir des fruits et légumes**

**Soutenue le : 29/10/2022**

**Devant le Jury composé de :**

<b>Mme. OUKIL Naima</b>	<b>MCA</b>	Univ. de Bejaia	Président
<b>Mr. TOUATI Abdelaziz</b>	<b>Professeur</b>	Univ. de Bejaia	Directeur de thèse
<b>Mr. MILLEMANN Yves</b>	<b>Professeur</b>	ENVE/ANSES., Maison Alfort	Co-Directeur
<b>Mme. FARADJI Samia</b>	<b>MCA</b>	Univ. de Bejaia	Examineur
<b>Mr. LOUCIF Lotfi</b>	<b>MCA</b>	Univ. de Batna 1	Examineur

**Année Universitaire : 2022/2023**

## Remerciements

*Cette thèse a été rendue possible grâce à une convention de Co-encadrement entre le laboratoire d'écologie microbienne de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia (Algérie) et l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) de Maisons-Alfort (France), et grâce au Programme National Exceptionnel (PNE) de réhabilitation résidentielle d'Algérie.*

*Je tiens à remercier toutes personnes qui ont participé à ce travail et m'ont soutenu pour la réalisation de cette modeste thèse. Je souhaite exprimer toute ma gratitude à mes encadreurs : **TOUATI Abdelaziz**, **MILLEMANN Yves** et **GRANIER Sophie**, grâce auxquels cette thèse a pu se réaliser.*

*Je remercie infiniment **TOUATI A. Aziz** pour son encadrement, la transmission de son savoir-faire, ses fructueuses remarques et ses encouragements.*

*Je remercie **Yves MILLEMANN** pour avoir accepté la Codirection de cette thèse. Je tiens à le remercier sincèrement pour sa confiance et ses valeureuses remarques qui m'ont permis d'accomplir ce travail.*

*Je remercie **Sophie Granier** pour l'intérêt qu'elle a porté en acceptant de suivre et de Co-encadrer toutes mes manipulations au sein de la Mission Antibio-Résistance de ANSES. Ce manuscrit est un résultat de sa disponibilité et ses pertinentes remarques qui m'ont permis de bien analyser les choses. Je la remercie pour son enthousiasme et ses encouragements.*

*Je remercie infiniment **Muriel MARAUL** pour la précieuse aide qu'elle m'a apporté et pour son amitié. Je remercie également **Sabine Delannoy** pour l'aide quelle m'a apporté.*

*Ce travail est dédié*

*à : Mes parents, mon beau-père, mon époux, et mes enfants : Danyah, Adam,*

*Dany. A la mémoire de ma belle-mère que di l'accueil dans son paradis.*

## Table des matières

### Liste des tableaux

### Liste des figures

### INTRODUCTION 1

#### SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Sources et voies de contamination des fruits et légumes par les micro-organismes	8
I.1. Epidémies associées aux fruits et légumes	8
I.2. Sources et voies de contamination des fruits et légumes	13
I.2.1. Introduction d'agents pathogènes dans le sol par l'application du fumier ou compost	14
I.2.2. Eau d'irrigation	15
I.2.3. L'environnement du sol	17
I.2.4. Animaux et insectes	19
I.3. Survie des agents pathogènes sur et dans les fruits et légumes	20
I.4. Précautions pour réduire la contamination bactérienne des fruits et légumes	20
II. $\beta$ -lactamases à spectre étendu dans l'environnement agricole	23
II.1. Généralités	23
II.2. Sources potentielles de bactéries productrices de BLSE dans l'environnement agricole	25
II.2.1. Légumes et fruits	25
II.2.2. Sol	26
II.2.3. Eau	27
II.2.4. Fumier, environnement agricole et déchets	28
II.3. Mouvement des bactéries résistantes et des gènes de résistance	28
II.3.1. Transfert horizontal de gènes entre bactéries à l'interface environnementale	29
II.3.2. Transmission clonale de bactéries productrices de BLSE aux interfaces	30

#### MATERIEL ET METHODES

1. Echantillonnage	31
2. Analyse microbiologique	33
2.1. Isolement et identification des bacilles à Gram négatif résistant aux C3G	33
2.2. Détermination de la sensibilité des souches isolées aux antibiotiques	34
2.3. Détermination des phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines	36
2.3.1. Détection d'une $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE)	36
2.3.2. Détection des carbapénèmes	37

3. Détection des gènes de résistance aux $\beta$ -lactamines (BLSE) par Check-MDR CT101 et les gènes de résistance aux carbapénèmes par microarray Check-MDR CT103	39
4. Caractérisation moléculaire des gènes de résistance par le séquençage du génome entier (NGS)	43

## **RESULTATS**

Etude 1: From farms to markets: Gram-negative bacteria resistant to third-generation cephalosporins in fruits and vegetables in a region of North Africa	44
Etude 2: Occurrence of Third-Generation Cephalosporins Resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> in Fresh Fruits and Vegetables Purchased at Markets in Algeria.	74
<b>DISCUSSION</b>	92
<b>CONCLUSION</b>	106
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	109
<b>ANNEXES</b>	128

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b>	Agents étiologiques les plus fréquemment impliqués dans les maladies transmises par les fruits et légumes	9
<b>Tableau 2</b>	Epidémies bactériennes d'origine alimentaire liées aux fruits et légumes	10
<b>Tableau 3</b>	Tableau récapitulatif du type et du nombre d'échantillons analysés issus de différentes fermes et marchés de Bejaia	31
<b>Tableau 4</b>	Scores d'identification des bactéries	34
<b>Tableau 5</b>	Liste des antibiotiques testés	35

## Liste des figures

Figure 1	Facteurs de risque environnementaux pour la contamination des fruits et légumes	13
Figure 2	Facteurs affectant la survie des agents pathogènes dans les milieux de culture des produits	16
Figure 3	Sort des agents pathogènes dans le sol amendé avec du fumier	19
Figure 4	Localisation géographique des différentes fermes et marchés	32
Figure 5	Disposition des disques d'antibiotiques dans le DD-test	37
Figure 6	Interprétation du CARBA NP test	39
Figure 7	Présentation du Check-MDR CT101 test	42



# **Introduction**

## **Introduction**

Les fruits et légumes frais sont une composante essentielle d'un régime alimentaire sain qui fournit des antioxydants, des minéraux, des vitamines et d'autres composés qui favorisent le bien-être (Jung et al., 2014). C'est pourquoi un grand nombre d'institutions de santé publique encouragent la consommation de fruits et légumes, et recommandent de manger au moins cinq fruits et légumes par jour pour se protéger contre une série de maladies cardiovasculaires et de cancers (Abadias et al., 2008; Callejón et al., 2015; Xylia et al., 2019). En 2003, l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation mondiale de la santé (OMS) ont lancé une initiative mondiale visant à promouvoir la consommation de fruits et légumes pour la santé, en recommandant une consommation minimale de 400 g de fruits et légumes par jour (Hölzel et al., 2018). Suite à cette recommandation, la consommation de fruits et légumes en tant qu'ingrédients d'un régime alimentaire sain a augmenté et a gagné en popularité dans le monde entier (Rico et al., 2007; van Hoek et al., 2015).

Cependant, les fruits et légumes frais ont récemment été de plus en plus reconnus comme des vecteurs potentiels de maladies d'origine alimentaire (Lynch et al., 2009; Olaimat and Holley, 2012). Les agents pathogènes d'origine alimentaire ont été identifiés comme des causes importantes de morbidité et de mortalité, en particulier dans les pays en développement, et des sommes considérables sont consacrées aux dépenses sociales et médicales (Garedew et al., 2016). Selon les estimations annuelles de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), 30 % des habitants des pays développés souffrent de maladies d'origine alimentaire, et jusqu'à 2 millions de décès sont enregistrés dans les pays en développement (WHO World Health Organization, 2013). Les maladies d'origine alimentaire ont exercé une pression sur les services médicaux, contribué à la détresse économique et politique, exacerbé la malnutrition et entraîné des souffrances humaines. Il existe plusieurs agents tels que des produits chimiques, des agents pathogènes et des parasites, qui peuvent altérer les aliments à différents moments du processus de production et de préparation des aliments (Allos et al., 2004). La question de la sécurité alimentaire devient progressivement un défi pour la santé publique dans de nombreux pays et les contaminants biologiques, en particulier les bactéries, constituent la principale cause des maladies d'origine alimentaire (Garedew et al., 2016).

Actuellement, des études épidémiologiques ont établi un lien entre une part importante des maladies d'origine alimentaire et l'ingestion de produits contaminés par des bactéries

pathogènes d'origine alimentaire (Yeni et al., 2016). Bien que la notion conventionnelle soit que les maladies d'origine alimentaire proviennent généralement des produits de viande et de volaille, les légumes et les fruits ont été impliqués dans diverses épidémies d'origine alimentaire (Westrell et al., 2009). Ainsi, les maladies d'origine alimentaire liées aux produits cultivés en plein champ, en particulier les légumes verts à feuilles, ont augmenté proportionnellement, ce qui a entraîné une charge importante pour la santé publique et de multiples épidémies dans le monde entier. Le fait que les fruits et légumes frais soient généralement consommés crus ou légèrement transformés explique également pourquoi ils constituent d'importants vecteurs de propagation des bactéries pathogènes. Ces bactéries peuvent avoir été initialement liées à des aliments d'origine humaine ou animale ou liées à l'environnement de l'exploitation (Berger et al., 2010; Callejón et al., 2015).

Une augmentation significative des épidémies ou des cas de maladies d'origine alimentaire associés à la consommation de fruits et légumes frais a été signalée. Cette augmentation est en grande partie due à une augmentation générale de la consommation de fruits et légumes frais, à la mondialisation de l'industrie des fruits et légumes et à une surveillance plus efficace (Havelaar et al., 2010). L'augmentation de la consommation de produits frais est probablement due aux efforts des gouvernements du monde entier pour promouvoir une alimentation saine, aux avantages pour la santé associés à la consommation de fruits et légumes frais et à la facilité d'accès aux fruits et légumes frais locaux (Berger et al., 2010). De nombreuses épidémies de maladies d'origine alimentaire dans de nombreux pays ont été associées à la consommation de fruits et légumes frais contaminés, comme les germes de graines de fenugrec contaminés par *Escherichia coli* O104:H4 en Europe en 2011, et les tomates et épinards contaminés par *Salmonella* et *E. coli* O157 aux États-Unis d'Amérique en 2013 (Hackl et al., 2013). La contamination microbienne, avant et après la récolte; pendant la préparation, la manipulation et le traitement des produits frais d'origine végétale devient une préoccupation actuelle. Avec cette préoccupation s'accompagne le phénomène de la résistance des bactéries aux antibiotiques.

Il existe de nombreux facteurs capables de compromettre l'intégrité microbiologique des produits tout au long du continuum de la ferme à la fourchette, qui ont tous des conséquences potentiellement fatales. De nombreuses circonstances peuvent compromettre la sécurité des fruits et légumes dans les exploitations agricoles. Nombre d'entre elles découlent du fait que l'agriculture s'est intensifiée au fil des ans et que les champs de fruits et légumes sont souvent situés près des zones de production animale, ce qui entrelace les liens écologiques entre les

animaux sauvages, le bétail et les fruits et légumes (Strawn et al., 2013). Dans de nombreux cas, cela prédispose les fruits et légumes aux dangers avant récolte. L'utilisation de sols, d'eau d'irrigation et de fumier contaminés pour la culture des produits est une source importante de risques avant la récolte. Les animaux sauvages et les insectes ont également été impliqués dans la transmission d'agents pathogènes aux produits. En général, les produits frais sont cultivés en plein champ où ils sont constamment exposés à une contamination microbienne avant la récolte par de l'eau d'irrigation contaminée, des sols agricoles, du fumier brut ou mal composté et/ou des fèces déposées par des animaux domestiques ou sauvages intrusifs, qui traversent le continuum de la ferme à la table (Park et al., 2015). Les fruits et légumes frais peuvent également être contaminés par les équipements de récolte, les usines de transformation, les travailleurs sur le terrain et les processus commerciaux tout au long du continuum de la ferme à la table, au stade post-récolte (Jung et al., 2014).

Bien que les parasites et les virus soient impliqués dans les épidémies liées aux produits frais, les pathogènes bactériens représentent le principal danger microbien impliqué dans les maladies d'origine alimentaire liées aux produits frais (Berger et al., 2010). Les bactéries telles que *E. coli* pathogène (et *E. coli* O157:H7), *Klebsiella spp*, *Salmonella spp*, *Enterobacter spp*, *Citrobacter spp*, *Shigella spp* et *Listeria monocytogenes* sont les plus impliquées (Callejón et al., 2015; Kozak et al., 2013). Chez l'homme, ce groupe de bactéries d'origine alimentaire produit des syndromes cliniques qui vont de la fièvre, de la diarrhée légère, des maux de tête, des vomissements, des crampes musculaires et des douleurs abdominales à des problèmes plus complexes comme la colite hémorragique (*E. coli* O157:H7), l'intoxication par entérotoxine (*E. coli* O157:H7, *E. coli* pathogène, *Shigella*), la septicémie (*Salmonella spp.*), la dysenterie (*Shigella spp.*), les fausses couches chez les femmes enceintes (*Listeria monocytogenes*), les complications auto-immunes et la méningite (*Enterobacter spp.*), le groupe "à risque" comprenant les nourrissons, les femmes enceintes, les personnes immunodéprimées et les personnes âgées étant plus touché (Yeni et al., 2016). En outre, des micro-organismes opportunistes, auparavant considérés comme non pathogènes, sont présents dans les produits frais et peuvent provoquer des infections graves chez un hôte immunodéprimé. Par exemple, des bactéries opportunistes, telles que *Klebsiella spp.* et *Enterobacter spp.* ont été trouvées sur des légumes (p. ex. choux, poivrons et tomates) sur des marchés de détail dans différents contextes (Al-Kharousi et al., 2016; Osterblad et al., 1999).

La consommation crue de nombreux légumes frais, feuillus ou non, de légumes-racines, de germes et de fruits entraîne l'exposition des humains à des agents pathogènes bactériens

d'origine alimentaire, y compris des bactéries résistantes aux antibiotiques (Hölzel et al., 2018; Ülger et al., 2018). En outre, les produits frais représentent une voie d'exposition humaine aux bactéries résistantes aux antibiotiques et ont souvent servi de réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques, ce qui représente une menace majeure pour la santé publique (Liu and Song, 2019; van Hoek et al., 2015). Au cours des dernières décennies, on a constaté que l'exposition à des agents pathogènes résistants aux antimicrobiens par le biais de la chaîne alimentaire était de plus en plus souvent à l'origine d'épidémies d'origine alimentaire (Pérez-Rodríguez and Mercanoglu Taban, 2019). Considérés comme l'une des révolutions médicales du XX<sup>ème</sup> siècle, les antibiotiques ont apporté un immense bénéfice à l'humanité, en permettant de soigner de nombreuses infections bactériennes, et en faisant diminuer considérablement le taux de mortalité. Par ailleurs l'utilisation des antibiotiques comme traitement dans chacune des niches écologiques (Homme, animaux, plantes) entraîne la sélection de souches résistantes qui deviennent un réservoir de gènes de résistance. Ces gènes de résistance peuvent être ainsi échangés entre les bactéries d'une niche à une autre (da Costa et al., 2013; Durso and Cook, 2014). Les isolats environnementaux *d'Enterobacteriaceae* qui ont acquis une résistance aux céphalosporines de troisième génération (C3G) constituent une menace cruciale pour la santé publique en tant que source de traits de résistance pour les souches bactériennes pathogènes qui pourraient conduire à un échec de l'antibiothérapie (Blaak et al., 2014).

Dans ce contexte, l'une des principales préoccupations de santé publique au niveau mondial est l'émergence de bactéries à Gram négatif présentant une résistance aux C3G, aux carbapénèmes et à la colistine (van Hoek et al., 2015). Les  $\beta$ -lactamines, essentiellement les C3G et les carbapénèmes, sont les principaux choix thérapeutiques pour traiter les infections causées par des bactéries Gram-négatives résistantes (Bassetti et al., 2015). Cependant, la résistance à ces antibiotiques a augmenté ces dernières années, principalement par la production de  $\beta$ -lactamases. Diverses  $\beta$ -lactamases ont été identifiées dans le monde, notamment des pénicillinases, des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE), des céphalosporinases (AmpC) et des carbapénémases (Ye et al., 2019). Dans ces conditions, l'alternative approuvée est la colistine, mais sa réutilisation en pratique clinique a conduit à l'apparition de bactéries résistantes à la colistine, notamment par transfert horizontal (*mcr*) (Liu and Song, 2019).

Le transfert de ces bactéries Gram-négatives multirésistantes vers les fruits et légumes peut se faire au cours de la production via les déjections animales, par l'utilisation d'eau

d'irrigation contaminée, ou être lié à l'homme au stade post-récolte, ainsi qu'au cours du transport, de la conservation et de la transformation par les manipulateurs (Richter et al., 2019). L'ingestion de bactéries résistantes aux antibiotiques pose un problème potentiel de santé publique car elles sont capables de coloniser l'intestin et d'échanger des gènes de résistance avec les bactéries intestinales lors de leur passage dans les intestins, ce qui facilite leur dissémination ultérieure dans l'environnement (van Hoek et al., 2015). Des producteurs de BLSE, de céphalosporinase et de carbapénèmase isolées de fruits et légumes frais ont été signalés dans plusieurs pays du monde (Touati et al., 2017; Usui et al., 2019; van Hoek et al., 2015; Zurfluh et al., 2015).

Le rôle de l'alimentation dans l'exposition humaine aux bactéries résistantes aux antimicrobiens, y compris les agents pathogènes zoonotiques, ainsi que les bactéries commensales et environnementales servant de réservoir pour les gènes de résistance, devient un problème croissant de sécurité alimentaire (Campos et al., 2013; Zurfluh et al., 2015). Cette contamination peut donc se produire par différents moyens, tels que l'exposition des produits au fumier, au sol, à l'eau d'irrigation ou aux fèces animales hébergeant ces microorganismes. Cette contamination peut également survenir lors de la récolte, de la manipulation post-récolte ou de la distribution en raison du non-respect des mesures élémentaires de sécurité et d'hygiène alimentaire (Abadias et al., 2008; Seo and Matthews, 2014).

Les informations concernant la nature et l'écologie des bactéries résistantes aux antibiotiques associées aux fruits et légumes frais sont limitées. De plus, aucune étude sur ce sujet n'a été réalisée en Algérie à ce jour. Cette présente étude s'inscrit dans le cadre des activités de recherche menées par l'équipe de pathogénie bactérienne et antibiorésistance du laboratoire d'écologie microbienne dirigée par le Professeur TOUATI A. de l'Université A. MIRA de Bejaia (Algérie).

Préalablement les travaux de recherche réalisés par les différents membres de l'équipe d'antibiorésistance sous la direction du Pr. TOUATI étaient orientés vers la recherche des souches multirésistantes dans les milieux en contact direct ou étroit avec les antibiotiques (clinique, environnement hospitalier, effluents, etc.) puis dans le portage fécal chez les animaux. En 2013, nous avons entamé nos travaux de recherche dans le domaine de la sécurité alimentaire, pour voir si la nourriture pourrait être un véhicule direct ou indirect de transmission des bactéries résistantes à l'Homme.

Notre travail de thèse s'est développé dans le cadre d'un projet collaboratif entre le laboratoire d'Ecologie Microbienne de l'université A. MIRA de Bejaia et l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail de Maisons-Alfort. Nos travaux de recherche ont été initiés pour donner suite à l'importance du sujet actuelle de l'antibiorésistance dans le domaine alimentaire et plus spécifiquement dans les fruits et légumes, vu le manque de documentations sur cette importante catégorie d'aliment.

L'objectif global de ce présent travail est l'évaluation de la contamination des fruits et légumes par des bacilles à Gram négatif résistants aux antibiotiques et la caractérisation phénotypique et moléculaire des mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif. Pour ce faire, nous avons énuméré nos objectifs comme suite :

- A. Evaluer la fréquence ou le degré de contamination des fruits et légumes par les bacilles à Gram négatif résistants aux céphalosporines de troisième génération sur un échantillon de 491 fruits et légumes obtenus de différentes fermes maraichères et de différents marchés de Bejaia. Notre objectif s'étend également sur l'environnement agricole, et pour cela 90 échantillons de sol et 45 échantillons des eaux d'irrigation ont été analysés.
- B. Identifier les étapes et les sources de contamination des fruits et légumes : Afin d'identifier l'étape ou les étapes (s) et la ou les sources de contaminations des fruits et légumes, l'étude a été portée sur deux environnements différents : marchés vs fermes maraichères. Pour cela 310 échantillons de fruits et légumes achetés de différents marchés de Bejaia et 181 échantillons de fruits et légumes obtenus de différentes fermes maraichères de Bejaia ont été analysés, ainsi que 90 échantillons de sol et 45 échantillons d'eaux d'irrigation.
- C. Déterminer la sensibilité aux antibiotiques des souches de *Klebsiella pneumoniae* sélectionnées parmi les bactéries à Gram négatif résistantes aux C3G isolées à partir de fruits et légumes achetés au niveau des marchés de Bejaia et caractériser le support moléculaire de la résistance aux antimicrobiens chez ces souches de *K. pneumoniae*-MDR.

Nos travaux de thèse nous ont permis de rédiger le présent manuscrit qui est répartie parties présentées comme suit :

1. Une introduction ;
2. Revue de la littérature, qui s'articule autour des voies et des sources de la contamination des fruits et légumes par les microorganismes. Ainsi qu'un rappel sur les mécanismes de résistance des bacilles à Gram négatif, notamment par la production de BLSE ;
3. Méthodologie de travail qui consiste en la caractérisation phénotypique, moléculaire et épidémiologique des souches multirésistantes isolées des fruits et légumes analysés ;
4. Résultats des travaux de recherche ;
5. Discussion autour de la contamination des fruits et légumes par des bacilles à Gram négatif résistants aux C3G et l'impact de la présence de ces microorganismes sur les fruits et légumes sur la santé publique ;
6. Conclusion et perspectives.

# **Synthèse Bibliographique**

## **I. Sources et voies de contamination des fruits et légumes par les micro-organismes**

### **I.1. Epidémies associées aux fruits et légumes**

Les avantages nutritionnels et sanitaires de la consommation de fruits et légumes ont été reconnus et largement diffusés. Cela a entraîné des changements dans les habitudes alimentaires de l'homme, de nombreux consommateurs incorporant davantage de fruits et de légumes dans leurs repas. En conséquence, la production mondiale de fruits et légumes a connu une croissance exponentielle au cours des dernières décennies. La demande accrue de produits a entraîné des modifications telles que l'utilisation accrue d'amendements du sol, l'utilisation de sources d'eau alternatives et l'augmentation des importations et des exportations dans le domaine de l'agriculture (Beuchat, 2002). Certaines de ces modifications ont toutefois un fort potentiel pour compromettre la sécurité des fruits et légumes. Les dangers biologiques les plus importants pour la sécurité des fruits et légumes sont d'origine zoonotique ou humaine et peuvent être classés en bactéries sporulées, bactéries non sporulées, virus, parasites et prions (James, 2005).

La plupart des études et des efforts de surveillance ont identifié des contaminants bactériens dans les épidémies de maladies d'origine alimentaire. On trouve donc dans la littérature une quantité disproportionnée d'informations sur la contamination bactérienne. Cela peut s'expliquer par le fait que les espèces bactériennes ont été incriminées dans beaucoup plus d'épidémies, mais que d'autres groupes microbiens - virus et parasites - ont été peu étudiés. Les agents étiologiques les plus fréquemment impliqués sont présentés dans le tableau 1.

**Tableau 1 : Agents étiologiques les plus fréquemment impliqués dans les maladies transmises par les fruits et légumes (Alegbeleye et al., 2018)**

<b>Bactéries</b>	<b>Virus</b>	<b>Parasites</b>	<b>Champignons</b>
<i>Salmonella</i>	Virus de l'hépatite A	<i>Cyclospora</i>	<i>Alternaria</i>
<i>Escherichia coli</i>	Rotavirus	<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Fusarium</i>
<i>Campylobacter</i>	Norovirus	<i>Giardia</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Vibrio</i>	Norwalk	<i>Trichinelle</i>	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Sapovirus	<i>Ascaris</i>	
<i>Bacille cereus</i>	Calicivirus	<i>Trichuris trichiurie</i>	
<i>Shigella</i>		<i>Toxoplasma gondii</i>	
<i>Clostridium</i>			
<i>Yersinia</i>			
<i>Pseudomonas</i>			
<i>Aeromonas</i>			
<i>Staphylocoques</i>			
<i>Enterobacter spp.</i>			
<i>Brucella spp</i>			

Des produits spécifiques sont plus souvent liés à des incidents de maladies d'origine alimentaire ; par exemple, les légumes verts comme la laitue et les épinards, ainsi que les herbes fraîches comme le persil et le basilic sont des sources classiques d'infections bactériennes (Berger et al., 2010; Denis et al., 2016). Les baies, les oignons verts, les melons, les graines germées et les tomates sont également des fruits et légumes de haut niveau de priorité (Denis et al., 2016; Olaimat and Holley, 2012).

Une liste non exhaustive des épidémies bactériennes liées à la consommation de fruits et légumes est présentée dans le tableau 2.

**Tableau 2 : Epidémies bactériennes d'origine alimentaire liées aux fruits et légumes (Alegbeleye et al., 2018; Heaton and Jones, 2008; Wadamori et al., 2017)**

Véhicule alimentaire	Pays	Agent pathogène	Nombre de cas	Nombre d'hospitalisations	Nombre de morts
Germes (luzerne, trèfle cru)	USA	<i>Escherichia coli</i>	59	17	0
Salade	USA	<i>E. coli</i>	33	7	0
Mélange d'épinards et de printemps	USA	<i>E. coli</i>	33	13	0
Salade	USA	<i>E. coli</i>	84	45	0
Noisettes	USA	<i>E. coli</i>	8	4	0
Epinards	USA	<i>E. coli</i>	199	102	3
Épinard	Canada	<i>E. coli O157:H7</i>	1	NS.	NS.
Laitue	Canada	<i>E. coli O157:H7</i>	29	NS.	NS.
Oignons	Canada	<i>E. coli O157:H7</i>	235	NS.	NS.
Cresson	Royaume-Uni	<i>E. coli O157</i>	NS.	NS.	NS.
Salade	Royaume-Uni	<i>E. coli O157:H7</i>	161	60	2
Laitue, concombre	Royaume-Uni	<i>E. coli O96</i>	50	NS.	NS.
Salades emballées	USA	<i>Listeria monocytogenes</i>	19	19	1
Pommes	USA	<i>L. monocytogenes</i>	35	34	7
Germes de soja	USA	<i>L. monocytogenes</i>	5	5	2
Cantaloup	USA	<i>L. monocytogenes</i>	147	143	33
Céleri	USA	<i>L. monocytogenes</i>	10	NS.	5
Melons	USA	<i>L. monocytogenes</i>	147	NS.	33
Pommes au caramel (préemballées)	USA	<i>L. monocytogenes</i>	35	31	7
Salade de maïs	Italie	<i>L. monocytogenes</i>	1566	292	0
Germes (luzerne, trèfle cru)	USA	<i>Salmonella</i>	506	65	0
Pistaches	USA	<i>Salmonella</i>	11	2	0
Concombres	USA	<i>Salmonella</i>	991	221	6
Germes de soja	USA	<i>Salmonella</i>	115	NS.	0

*Synthèse bibliographique*

Mangues	USA	<i>Salmonella</i>	127	33	0
Pignons de pin	USA	<i>Salmonella</i>	43	2	0
Papayes	USA	<i>Salmonella</i>	106	10	0
Papayes	USA	<i>Salmonella</i>	7	4	0
Papayes	USA	<i>Salmonella</i>	4	2	0
Papayes	USA	<i>Salmonella</i>	14	5	1
Papayes	USA	<i>Salmonella</i>	210	67	1
Piments	USA	<i>Salmonella</i>	1442	286	2
Cantaloup	USA	<i>Salmonella</i>	332	113	3
Tomates	USA	<i>Salmonella</i>	111	22	0
Tomates/poivrons	États-Unis et Canada	<i>Salmonella</i>	1442	NS.	NS.
Salades	Royaume-Uni	<i>Salmonella</i>	4	NS.	NS.
Germes (Luzerne)	Australie	<i>Salmonella</i>	100	NS.	NS.
Melon de roche	Australie	<i>Salmonella</i>	97	NS.	NS.
Laitue (préemballée)	Australie	<i>Salmonella</i>	144	NS.	NS.
Germes (Luzerne)	Canada	<i>Salmonella</i>	NS.	NS.	NS.
Salade de fruit	Canada	<i>Salmonella</i>	NS.	NS.	NS.
Salade	Canada	<i>Salmonella</i>	34	NS.	NS.
Cantaloups	Canada	<i>Salmonella</i>	NS.	NS.	NS.
Germes d'oignon	Canada	<i>Salmonella</i>	20	NS.	NS.
Germes (Luzerne)	Canada	<i>Salmonella</i>	78	NS.	NS.
Cantaloups	Canada	<i>Salmonella</i>	2	NS.	NS.
Concombres	Canada	<i>Salmonella</i>	12	NS.	NS.
Tomates	Canada	<i>Salmonella</i>	7	NS.	NS.
Germes de haricot mungo	Canada	<i>Salmonella</i>	84	NS.	NS.
Pousses de haricots mungo	Canada	<i>Salmonella</i>	8	NS.	NS.
Epinard	Suède	<i>Salmonella</i>	177	46	0
Germes (Luzerne)	Suède	<i>Salmonella</i>	51	0	0
Carottes	Canada	<i>Shigella sonnei</i>	4	NS.	NS.
Cantaloups	Mexico	<i>Salmonella</i>	NS	NS	NS

Synthèse bibliographique

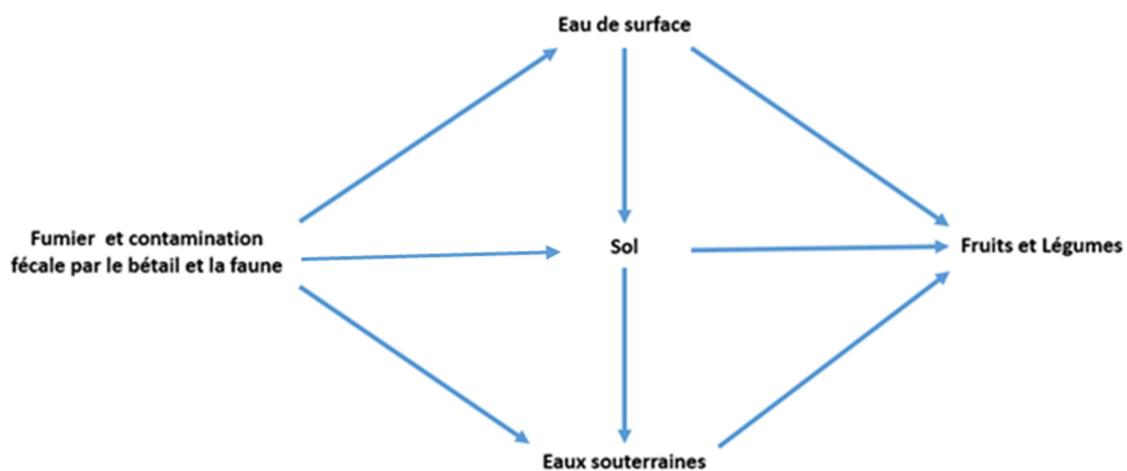
Basilic	Royaume-Uni	<i>Salmonella</i>	32	NS	NS
Épinard	Canada	<i>Shigella sonnei</i>	31	NS.	NS.
Pois	Suède	<i>Shigella dysenteriae</i>	35	0	0
Laitue	Norvège	<i>Shigella sonnei</i>	110	0	0
Pois	Norvège et Danemark	<i>Shigella sonnei</i>	14	0	0
Maïs nain	Danemark	<i>Shigella sonnei</i>	201	0	0
Carottes crues	Finlande	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	125	0	0
Laitue iceberg	Finlande	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	47	16	1

**Légende:** NS : Non spécifié

## I.2. Sources et voies de contamination des fruits et légumes

Les voies et les sources possibles de contamination des produits frais sont nombreuses, et des efforts intensifs ont été déployés pour comprendre avec précision les mécanismes exacts par lesquels les agents pathogènes sont introduits dans les fruits et légumes. Les sources et les voies de contamination des produits frais varient selon les zones de production. Cela s'explique par le fait que chaque exploitation présente une combinaison distincte de facteurs de risque environnementaux tels que la topographie, les interactions entre l'utilisation des terres et le climat. Les combinaisons de ces facteurs de risque environnementaux particuliers influencent la fréquence et la transmission des agents pathogènes d'origine alimentaire et ont ensuite un impact sur le risque de contamination des produits frais (Kotzekidou, 2016; Strawn et al., 2013).

Principalement, les agents pathogènes peuvent contaminer les produits frais " sur le terrain " par diverses voies, notamment : les dépôts atmosphériques, l'absorption de sols et d'eaux souterraines contaminés (Harris et al., 2006; Lynch et al., 2009), l'utilisation de fumier et de compost bruts (ou mal traités), l'exposition à de l'eau contaminée (irrigation ou inondation), le transfert par les insectes, ou par la contamination fécale générée par le bétail ou les animaux sauvages (Uyttendaele et al., 2015). La figure 1 présente une représentation schématique des principales voies de contamination des fruits et légumes.



**Figure 1 : Facteurs de risque environnementaux pour la contamination des fruits et légumes (Alegbeleye et al., 2018)**

### **I.2.1. Introduction d'agents pathogènes dans le sol par l'application du fumier ou compost**

L'utilisation de matières organiques telles que les excréments du bétail, les lisiers, les déchets d'abattoirs, les boues d'épuration ainsi que les résidus de traitement des déchets municipaux et industriels comme amendements du sol est très répandue (Goss et al., 2013). Bien qu'ils constituent une source rentable de nutriments à des fins agricoles, la recherche démontre que le fumier brut ainsi que le fumier contaminé (ou mal traité) constituent un risque important de contamination pathogène pour les produits frais (Manyi-Loh et al., 2016). Les agents pathogènes peuvent se propager par l'interaction directe de la surface des légumes avec le fumier, ou par l'éclaboussement de particules de sol ou de fumier (contaminées) sur les légumes par la pluie ou l'irrigation par aspersion, ou par des vecteurs. En outre, les tas de fumier stockés à proximité des zones de culture peuvent constituer un risque de contamination en raison du ruissellement (James, 2005).

Dans de nombreuses régions du monde, les systèmes de culture biologique utilisent davantage de fumier que les producteurs conventionnels, et le traitement chimique contre les agents pathogènes est interdit en agriculture biologique. Il a donc été affirmé que les produits biologiques présentaient un risque de sécurité plus important que leurs homologues non biologiques, bien qu'il n'existe pas de preuves sans équivoque à l'appui de cette affirmation (Johannessen et al., 2005; Maffei et al., 2016).

La survie des agents pathogènes dans le fumier et les biosolides dépend de facteurs tels que la source de fumier, le processus de production et les caractéristiques, la technique de traitement appliquée, les facteurs physicochimiques comme le pH et l'humidité relative, l'incidence des antagonistes ou des prédateurs, les conditions météorologiques, la dessiccation, l'aération, le type de sol, le degré d'incorporation du fumier, entre autres (Ingham et al., 2004; Wood, 2013).

La composition du fumier, qui est déterminée en grande partie par la formulation des aliments, dicte le profil des agents pathogènes présents dans le fumier ainsi que leur capacité à persister même après le traitement (Franz et al., 2005). Certains chercheurs ont proposé que le régime alimentaire des bovins puisse influencer l'incidence d'espèces bactériennes représentatives, *E. coli O157:H7* et *Salmonella*, dans le fumier. Ces agents pathogènes persistent plus longtemps dans le fumier des bovins nourris avec des aliments riches en

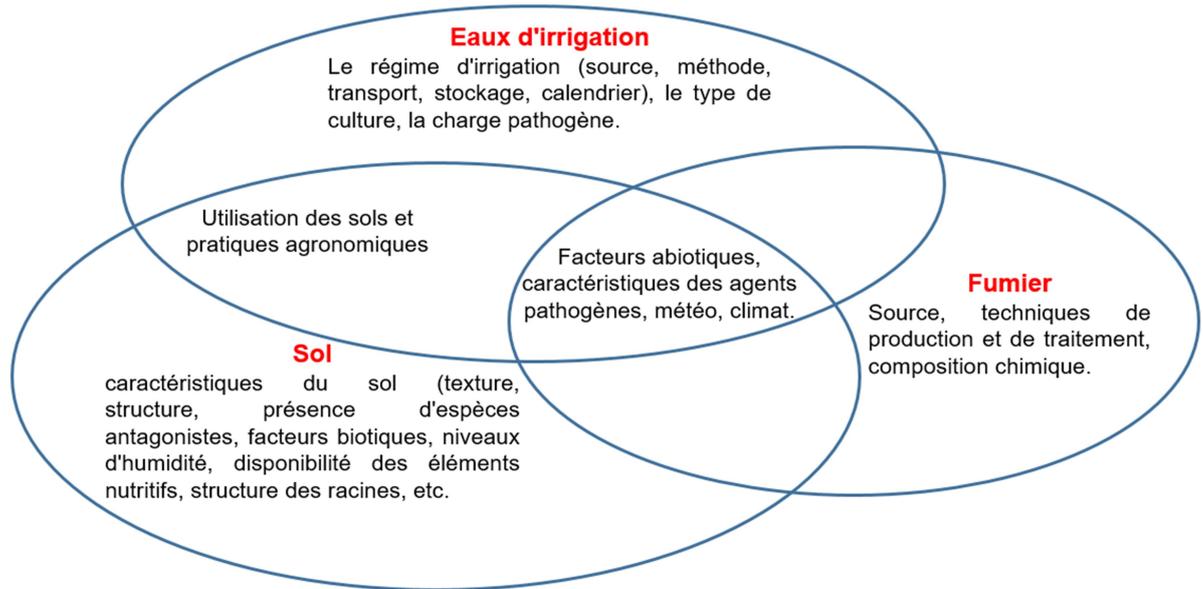
énergie mais pauvres en fibres, que dans celui des animaux nourris avec des aliments pauvres en énergie et riches en fibres (Franz et al., 2005).

Les techniques de traitement du fumier, telles que le compostage, la digestion aérobie et anaérobie, la granulation, la stabilisation alcaline, le conditionnement, la déshydratation et le séchage thermique, sont utilisées depuis longtemps pour traiter le fumier avant son application comme engrais. Bien que nombre d'entre eux soient raisonnablement efficaces, des préoccupations ont été soulevées quant à leur capacité à éliminer de manière satisfaisante les bactéries pathogènes (Day et al., 1998; Lorin et al., 2016).

### **I.2.2. Eau d'irrigation**

L'eau d'irrigation a été identifiée comme une source potentielle de contamination des fruits et légumes. Étant une exigence commune et essentielle pour la production végétale, l'eau doit être fournie aux plantes lorsque cela est nécessaire, et les sources d'eau d'irrigation sont utilisées pour compléter les précipitations limitées dans de nombreuses régions (Faour-Klingbeil et al., 2016; Kirby et al., 2003). Les enquêtes épidémiologiques et les études expérimentales indiquent que l'eau d'irrigation contaminée pourrait effectivement être une source d'agents pathogènes d'origine alimentaire sur les fruits et légumes (Steele and Odumeru, 2004).

Divers facteurs, dont le régime d'irrigation (méthode et moment de l'irrigation), les sources d'eau d'irrigation, le type de culture et les pratiques d'utilisation des terres dans l'exploitation, influencent l'étendue et la fréquence de la contamination pathogène des produits frais (Figure 2) (Olaimat and Holley, 2012). D'autres facteurs tels que la concentration de l'agent pathogène, la souche de l'agent pathogène, les conditions météorologiques, l'état de la plante et la physiologie ont également des répercussions importantes sur la sécurité des produits frais (Uyttendaele et al., 2015).



**Figure 2 : Facteurs affectant la survie des agents pathogènes dans les milieux de culture des produits frais (Alegbeleye et al., 2018).**

La qualité microbienne de l'eau d'irrigation dépend principalement de la source de l'eau. Par ordre croissant de risque de contamination microbienne, les sources d'eau d'irrigation peuvent être classées comme suit : eau potable ou eau de pluie, eaux souterraines profondes, eaux souterraines peu profondes, puits, eaux de surface et eaux usées brutes ou insuffisamment traitées (James, 2005). La qualité microbienne de l'eau de pluie ou de l'eau récupérée par la pluie est relativement bonne (Uyttendaele et al., 2015). L'eau souterraine (ou eau de forage) est généralement sûre sur le plan microbiologique, sauf si elle a été contaminée par des écoulements de surface ou d'autres sources de contamination proches de l'aquifère (Valipour et al., 2015). Les eaux de surface (canaux ouverts, les étangs, les lacs, les rivières et les ruisseaux) ; qui sont la source prédominante des eaux d'irrigation dans de nombreux pays, sont beaucoup plus sensibles à la contamination pathogène par rapport aux eaux souterraines (Uyttendaele et al., 2015). Les rejets d'eaux usées, la contamination des fosses septiques, les égouts pluviaux, la défécation sauvage et du bétail, le ruissellement des champs contaminés, les effluents industriels et municipaux peuvent tous potentiellement contaminer les eaux de surface (James, 2005). Les eaux usées sont généralement de mauvaise qualité chimique et microbiologique. Elles nécessitent donc un traitement poussé avant de pouvoir être utilisées en toute sécurité pour irriguer les cultures. Les sources d'eau (autres que la pluie) utilisées pour irriguer les produits ne sont généralement que peu ou pas traitées dans de nombreux cas (Steele and Odumeru, 2004).

La capacité d'un agent pathogène à survivre (ou à persister) dans l'environnement (et sur les produits frais) est un déterminant essentiel du risque d'infection humaine. Les risques réels associés aux agents pathogènes présents dans l'eau d'irrigation dépendent de nombreuses variables, notamment des conditions environnementales telles que la température, le pH et les rayons UV (Alegbeleye et al., 2018). D'autres facteurs tels que la charge excrétée de l'agent pathogène, sa période de latence avant qu'il ne devienne infectieux, sa capacité à se multiplier efficacement en dehors d'un hôte mammifère, sa dose infectieuse pour les humains, la concurrence inhibitrice de la microflore indigène ainsi que la réponse de l'hôte jouent également un rôle pertinent. Les bactéries et les virus survivent plus longtemps dans les eaux souterraines que dans les eaux de surface parce que les eaux souterraines ont tendance à être plus fraîches, offrent une protection contre la lumière du soleil et ont une activité biologique moindre (Steele and Odumeru, 2004). Ces groupes de microorganismes ne durent généralement pas plus de 45 et 15 jours dans les eaux de surface et les eaux usées, respectivement. À l'inverse, les parasites (œufs/kystes) peuvent survivre jusqu'à 60 jours, voire plusieurs mois, dans les eaux de surface et les eaux usées (Bihn, 2022).

### **I.2.3. L'environnement du sol**

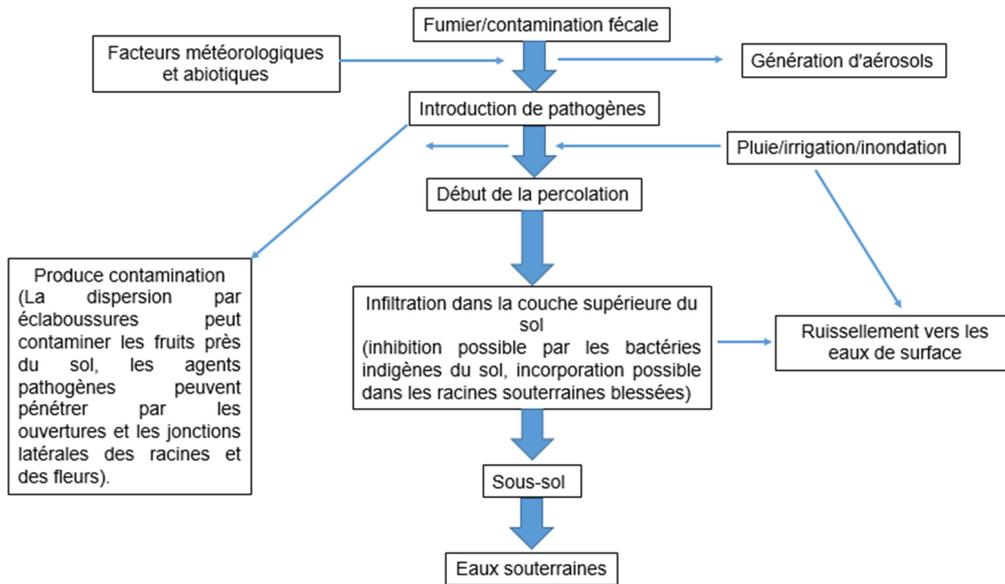
Les sols abritent généralement un consortium abondant de micro-organismes, dont certains sont des agents pathogènes pour l'homme tels que *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* et *Aeromonas* (Warriner et al., 2009). Ils peuvent donc servir de support à la contamination des plantes par les graines, les racines ou les surfaces. De nombreux agents pathogènes résidant dans le sol se sont adaptés à la survie dans le sol, les spores persistant indéfiniment. Cependant, étant donné que de nombreux sols agricoles sont prédisposés à des sources ponctuelles et non ponctuelles de contamination pathogène, des agents pathogènes allochtones peuvent être continuellement introduits dans les environnements pédologiques. Parmi les principales sources d'agents pathogènes dans les sols figurent l'utilisation d'eau d'irrigation et de fumier contaminés, le pâturage des animaux, les déchets solides municipaux et d'autres effluents (Santamaría and Toranzos, 2003).

Le devenir, la survie et la récalcitrance des agents pathogènes dans le sol dépendent de facteurs tels que le type de sol, l'humidité du sol, le pH, la température, la disponibilité des nutriments, les pratiques agronomiques, ainsi que les interactions biologiques du sol. Le potentiel matriciel du sol (niveaux d'humidité) est déterminé par les propriétés du sol et les apports d'eau par les précipitations et/ou l'irrigation et il a été démontré qu'il s'agit de l'un des

facteurs les plus critiques influençant le transport et la survie des microorganismes dans le sol (Manyi-Loh et al., 2016).

Les pratiques agronomiques telles que l'amélioration du sol et la méthode d'application du fumier influencent la survie des agents pathogènes dans le sol. Les stratégies d'amélioration des sols (application d'engrais inorganiques et organiques, de compost, de biosolides et d'autres résidus) augmentent considérablement la charge en nutriments des sols (Diacono and Montemurro, 2010). Un approvisionnement facile en nutriments essentiels favorise la croissance des agents pathogènes. L'application de compost modifie les conditions du sol à long terme en augmentant régulièrement le pH, ce qui, par conséquent, affecte la survie des agents pathogènes dans le sol (Sharma and Reynnells, 2016).

Après l'application de fumier sur les terres, si le fumier appliqué est contaminé, il est probable que les agents pathogènes se déplacent dans la matrice du sol, soit verticalement, soit horizontalement. L'ampleur du mouvement affectera la distribution et le sort final des agents pathogènes. Certains se répandront dans le sol et se fixeront aux racines. D'autres peuvent être entraînés vers les eaux de surface ou percoler vers les aquifères, contaminant potentiellement les sources d'eau d'irrigation. Les agents pathogènes présents dans le fumier contaminé peuvent donc être rapidement transportés dans les systèmes pédologiques. Le succès du transport et de la distribution dépend toutefois des capacités de survie inhérentes à l'agent pathogène ainsi que de la présence et de la structure des systèmes racinaires des plantes (Figure 3) (Avery et al., 2004; Kisluk and Yaron, 2012).



**Figure 3 : Sort des agents pathogènes dans le sol amendé avec du fumier (Alegbeleye et al., 2018)**

#### I.2.4. Animaux et insectes

Outre les animaux d'élevage, dont le rôle de réservoir d'agents pathogènes entériques a été établi, les animaux sauvages tels que les oiseaux, les reptiles, les rongeurs, les amphibiens, certains helminthes et les insectes comme les mouches et les coléoptères peuvent également servir de véhicules aux agents pathogènes pour contaminer les milieux de culture et les produits frais (Beuchat, 2002). Le bétail et les animaux sauvages peuvent avoir accès aux zones de culture soit en raison de l'utilisation des terres adjacentes (élevage), soit par intrusion (Jay-Russell et al., 2014). Les oiseaux tels que les mouettes, les pigeons, les poulets, les étourneaux, les canards migrateurs et les grues du Canada sont porteurs d'agents pathogènes tels que *E. coli*, *Salmonella* et *Campylobacter* (Wani et al., 2004). Les insectes sont généralement omniprésents dans les champs de culture et ont donc un accès illimité aux produits. Les mouches à charbon, les mouches des fruits, les cafards et d'autres insectes agissent comme des vecteurs mécaniques et biologiques pour contaminer les fruits et légumes sur le terrain (Martínez-Pérez et al., 2020).

Les reptiles, notamment les serpents, les lézards, les caméléons, les tortues, ainsi que d'autres ophidiens, sauriens et chéloniens, ont été trouvés porteurs de bactéries entériques comme *Salmonella* (Beuchat, 2002). De nombreux rongeurs sauvages sont des porteurs asymptomatiques d'agents pathogènes comme *Salmonella* et *Campylobacter*. Ils sont capables

d'amplifier le nombre d'agents pathogènes dans l'environnement et de les transférer à d'autres animaux d'élevage et aux produits (Meerburg and Kijlstra, 2007). Les rongeurs commensaux (souris domestiques et rats) représentent une menace particulière en raison de leur écologie (ils vivent à proximité du bétail) et de leur fécondité élevée (Witmer and Pitt, 2012).

### **I.2.5. L'Homme**

L'hygiène personnelle des travailleurs agricoles est considérée comme une importante source qui influence sur le transfert de bactéries pathogènes aux produits frais. Des coliformes ont été isolés à partir de produits frais à différentes étapes de la production et de transformation, quoi que les coliformes soient souvent considérés comme un indicateur de contamination fécale animale et humain (Berger CN., 2010).

### **I.3. Survie des agents pathogènes sur et dans les fruits et légumes**

Les toxi-infections alimentaires résultant de la consommation de produits contaminés dépendent de facteurs spécifiques. Premièrement, le produit doit être contaminé par un agent pathogène, qui doit survivre jusqu'au moment de la consommation à des niveaux suffisants pour provoquer une maladie. Dans de nombreux cas, la dose nécessaire pour provoquer une maladie est très faible, ce qui indique que le micro-organisme n'a besoin que de contaminer l'aliment pour survivre sans nécessairement se reproduire (Harris et al., 2006). La survie et la croissance des agents pathogènes sont influencées par le type d'organisme, le type de produit, les conditions environnementales sur le terrain, ainsi que l'état physiologique de la plante et de l'agent pathogène (Deering et al., 2012). La survie et la prolifération des agents pathogènes entériques sur les produits sont considérablement améliorées si la barrière protectrice est compromise par des dommages physiques ou biologiques (tels que des perforations ou des meurtrissures), la destruction par les insectes ou la dégradation par des agents pathogènes des plantes (Alegbeleye et al., 2018).

### **I.4. Précautions pour réduire la contamination bactérienne des fruits et légumes**

Pour parvenir à un niveau acceptable de sécurité microbiologique des fruits et légumes, il est essentiel de contrôler la contamination environnementale dans le champ en prenant des précautions appropriées avant la récolte. Un facteur fondamental à prendre en compte est l'état ou la qualité des champs de culture. Les champs sur lesquels des animaux sauvages ou domestiques ont été récemment mis en pâture, qui ont été soumis à des inondations ou qui ont pu être précédemment contaminés par du fumier, constituent un risque microbiologique inacceptable (Turbé et al., 2010). Les zones de culture doivent être protégées des inondations,

et la contamination fécale et le fumier doivent être traité de manière adéquate avant d'être appliqués comme engrais. De plus, des zones tampons appropriées (barrières physiques) telles que des monticules, des bermes de déviation, des tampons végétaux ainsi que des fossés doivent être érigés entre les régions de pâturage des animaux et les zones de culture des produits frais. Il convient d'adopter des méthodes appropriées d'élimination des déchets d'élevage et de gestion des déchets généraux de l'exploitation pour garantir la sécurité (James, 2005; Olaimat and Holley, 2012).

De nombreux experts ont souligné la nécessité de surveiller, réglementer et contrôler la qualité microbiologique de l'eau d'irrigation. Plusieurs normes régionales et internationales existent pour l'utilisation de l'eau d'irrigation et les pratiques visant à prévenir l'incidence de la contamination bactérienne (Uyttendaele et al., 2015). Dans les cas où l'eau de surface est la source d'eau d'irrigation, le drainage de l'eau contaminée dans le réservoir d'eau de surface peut être empêché en construisant des fossés, des bandes tampons, ainsi que des systèmes de rétention et de drainage. Les points de débordement potentiels doivent être identifiés et éliminés. Il est également important de déterminer les points (potentiels) de contamination, car les mesures de contrôle seront forcément plus efficaces si elles sont axées sur l'élimination de la contamination à la source (Pachepsky et al., 2011). Des puits d'irrigation, des fosses septiques fonctionnelles, des systèmes d'approvisionnement en eau et d'évacuation des eaux usées devraient être installés et correctement entretenus, en particulier pendant les périodes de précipitations excessives, afin de prévenir la contamination par des agents pathogènes (Olaimat and Holley, 2012).

Dans le cadre d'un ensemble de mesures d'hygiène visant à prévenir le transfert d'agents pathogènes d'origine alimentaire, les animaux sauvages, les oiseaux, les mouches et les rongeurs doivent être contrôlés dans les zones de cultures (Jung et al., 2014).

Étant donné que, dans de nombreuses épidémies importantes, les germes de graines de légumes ont été impliqués comme source initiale d'inoculum, l'élimination des bactéries des graines avant la plantation est devenue cruciale. Des méthodes de traitement chimique ou physique sont généralement utilisées pour décontaminer les graines, dans le but de réduire les risques d'apparition de maladies transmises par les germes. Une considération importante est la préservation de la viabilité des semences. Le dosage du traitement choisi doit être capable d'inactiver les agents pathogènes sans nuire à la viabilité des semences (Buck and Walcott, 2003).

Les critères de sécurité et les réglementations sont pour la plupart spécifiques à une région, il est cependant essentiel de faire respecter ces réglementations, de s'assurer que les producteurs y adhèrent et il est nécessaire d'améliorer constamment les normes ; si de nouvelles informations sont disponibles, les réglementations doivent être immédiatement mises à jour. Il est nécessaire de développer des systèmes de surveillance et de suivi et de générer des bases de données solides pour d'autres régions également (Köpke et al., 2007).

Enfin, et surtout, il est nécessaire de veiller à ce que les producteurs soient conscients de leur rôle dans la garantie de la sécurité alimentaire. Les producteurs doivent être encouragés à adopter les meilleures pratiques agricoles possibles pour garantir la sécurité des produits. Il est également important d'informer les consommateurs des risques possibles et des stratégies d'atténuation appropriées. Il existe des notions erronées et des idées fausses, qui doivent être corrigées rapidement. Par exemple, de nombreuses personnes pensent qu'il n'est pas nécessaire de laver les fruits et légumes issus de l'agriculture biologique (Manyi-Loh et al., 2016).

## **II. $\beta$ -lactamases à spectre étendu dans l'environnement agricole**

### **II.1. Généralités**

Les maladies infectieuses sont actuellement une cause importante de morbidité et de mortalité dans le monde. L'apparition de la résistance aux antimicrobiens a considérablement accru l'impact des maladies infectieuses, en termes de nombre d'infections, ainsi que les coûts de santé supplémentaires. Bien que nous disposions d'un très grand nombre d'agents antimicrobiens parmi lesquels choisir pour le traitement potentiel des infections, il existe une résistance antimicrobienne documentée pour chacun d'entre eux, et cette résistance survient peu de temps après l'approbation de l'utilisation d'un nouveau médicament. Les agents antimicrobiens peuvent être divisés en groupes en fonction de leur mécanisme d'activité antimicrobienne. Les principaux groupes sont : les agents qui inhibent la synthèse de la paroi cellulaire, dépolarisent la membrane cellulaire, inhibent la synthèse des protéines, inhibent la synthèse des acides nucléiques et inhibent les voies métaboliques des bactéries. On pourrait penser qu'avec un tel éventail de mécanismes, nous aurions un meilleur contrôle sur les bactéries. Malheureusement, une mauvaise gestion des agents antimicrobiens a contribué à l'énorme problème de résistance auquel nous sommes aujourd'hui confrontés. Parmi les facteurs qui ont contribué à l'aggravation du problème de la résistance, on peut citer : l'augmentation de la consommation de médicaments antimicrobiens, tant par les humains que par les animaux, et la prescription inappropriée d'une thérapie antimicrobienne (Reygaert, 2018).

La résistance aux antibiotiques est définie comme "la résistance d'un micro-organisme à un antibiotique auquel il était auparavant sensible, de sorte que les traitements standard deviennent inefficaces et que les infections persistent et peuvent se propager à d'autres" (Alanis, 2005). La résistance aux antibiotiques est l'un des défis fondamentaux affectant la santé publique, causant chaque année, selon les estimations, 23 000 décès et un coût sociétal global d'environ 55 milliards de dollars par an rien qu'aux États-Unis (US) (Demirjian et al., 2015). L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a publié une liste des micro-organismes résistants aux antibiotiques (MRA) les plus critiques contre lesquels de nouveaux antibiotiques doivent être développés de toute urgence. Parmi les agents pathogènes " de la plus haute priorité ", les entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) ont été identifiées comme une menace mondiale émergente en raison de leur prévalence croissante dans diverses niches écologiques ces dernières années, après avoir été

principalement identifiées en médecine humaine dans le passé (Enoch et al., 2012; Reuland et al., 2014).

Les  $\beta$ -lactamines constituent la plus grande classe d'antibiotiques. Leur mécanisme d'action consiste à inhiber la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne en formant un adduit stable avec le domaine peptidase des protéines de liaison à la pénicilline (PLP), bloquant ainsi la réticulation des peptides et entraînant la mort cellulaire. Il existe quatre grandes classes de  $\beta$ -lactamines : les pénicillines, les céphalosporines, les monobactames et les carbapénèmes. Le mécanisme de résistance aux  $\beta$ -lactamines le plus courant chez les bactéries Gram-négatives est la production de  $\beta$ -lactamases ou d'enzymes qui hydrolysent la liaison amide des  $\beta$ -lactamines, désactivant l'antibiotique et sa capacité à inhiber les PLP. Les Gram négatifs producteurs de  $\beta$ -lactamases les plus problématiques et les plus difficiles à traiter comprennent les entérobactéries productrices de BLSE et les entérobactéries productrices de carbapénémases. Sur la base de leurs structures tertiaires, quatre groupes de  $\beta$ -lactamases (classes A, B, C et D) circulent dans le monde. Les enzymes des classes A, C et D possèdent un résidu sérine nucléophile nécessaire à l'hydrolyse des  $\beta$ -lactamines ; les enzymes de la classe B sont des métallo- $\beta$ -lactamases qui ont besoin de  $Zn^{2+}$  pour leur activité (Papp-Wallace, 2019).

Les BLSE peuvent hydrolyser les céphalosporines à spectre élargi, notamment le céfotaxime, la céftriaxone, la ceftazidime ou le céfépime et les monobactames. Plus de 1 000 variantes de BLSE sont connues, notamment les types SHV, TEM, OXA et CTX-M (Allen et al., 2010; Jia et al., 2017). Au cours des années 1990, les familles des  $\beta$ -lactamases TEM- et SHV- portées par *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* étaient les principaux membres des BLSE (Coque et al., 2008). Ces dernières années, la répartition géographique des bactéries productrices de BLSE a considérablement augmenté, en particulier, l'incidence des BLSE de type CTX-M a considérablement augmenté au cours de la dernière décennie. La plupart des bactéries productrices de BLSE codent les gènes BLSE sur des plasmides facilitant la propagation rapide par transfert horizontal de gènes entre bactéries (Teng et al., 2019).

Les BLSE de type CTX-M dont des dérivées de l'enzyme chromosomique de *Kluyvera spp*, ces enzymes sont des céphalosporinases naturelles. Elles ont largement diffusé dans de nombreuses espèces différentes, y compris *K pneumoniae*. Contrairement aux BLSE de type TEM et SHV, les enzymes CTX-M sont également largement répandues chez les *E coli* pathogènes. La propagation mondiale d'*E coli* ST131 exprimant à la fois des enzymes de type

CTX-M et une résistance aux fluoroquinolones a sérieusement compliqué le traitement empirique des infections urinaires communautaires dans de nombreuses régions (Rice, 2012).

## **II.2. Sources potentielles de bactéries productrices de BLSE dans l'environnement agricole**

### **II.2.1. Fruits et légumes**

Le premier rapport d'isolats de GNB produisant des BLSE à partir de légumes et de fruits a été signalé en 2014 aux Pays-Bas. Des souches de *Rahnella aquatilis*, *Serratia fonticola* et *Pantoea agglomerans* ont été identifiés comme porteuses de  $bla_{\text{RAHN-1}}$  et  $bla_{\text{RAHN-2}}$  et  $bla_{\text{FONA-1}}$ ,  $bla_{\text{FONA-2}}$ ,  $bla_{\text{FONA-3/6}}$  et  $bla_{\text{FONA-5}}$ , respectivement. Les *Enterobacteriaceae* productrices de BLSE isolées de légumes et de l'environnement étaient toutes des espèces environnementales (Blaak et al., 2014).

Comme les isolats provenant de l'homme, des animaux et de l'environnement, les BLSE CTX-M est le type le plus rapportés dans les légumes. Iseppi et al. ont rapporté une prévalence des souches productrices de BLSE dans les légumes frais de 83,3 % (20/24). Parmi les 20 isolats bactériens provenant de salades, 80 % (16/20) ont été identifiés comme des souches productrices de BLSE. La PCR et le séquençage ont confirmé la présence de  $bla_{\text{SHV-12}}$ ,  $bla_{\text{CTX-M-1}}$ ,  $bla_{\text{CTX-M-15}}$ , et  $bla_{\text{RHAN-1}}$  (Iseppi et al., 2018). Dans une étude néerlandaise, 1216 légumes obtenus dans des magasins néerlandais en 2012 et 2013 ont été analysés pour déterminer la prévalence des bactéries résistantes aux céphalosporines de 3ème génération (C3G) sur des produits frais cultivés dans le sol et éventuellement consommés crus. Dans l'ensemble, des entérobactéries résistantes au C3G ont été détectées sur 5,2 % des légumes. La contamination par des entérobactéries résistantes au C3G a été observée le plus fréquemment dans les légumes racines et les légumes bulbes (prévalence moyenne de 4,4 %), et moins fréquemment dans les légumes tiges (prévalence de 1,6 %) et les légumes à feuilles (prévalence moyenne de 0,6 %) (van Hoek et al., 2015). Pour déterminer si des entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) sont présentes dans les salades, les fruits frais coupés et les germes sur le marché suisse, Nüesch-Inderbinen et al. ont rapporté une prévalence de 5 % d'entérobactéries productrices de BLSE. L'identification des souches et l'analyse PCR des gènes ont révélé la présence de *Kluyvera ascorbata* portant le gène  $bla_{\text{CTX-M-2-like}}$ , d'*Enterobacter cloacae* portant le gène  $bla_{\text{CTX-M-15}}$ , et de 10 *Serratia spp.* portant les gènes  $bla_{\text{FONA-2}}$  et  $bla_{\text{FONA-2-like}}$  (Nüesch-Inderbinen et al., 2015). Une étude allemande a décrit l'isolement de sept souches d'*E. coli* producteurs de BLSE collectés dont deux souches étaient positives pour le gène  $bla_{\text{CTX-M-14}}$ , deux autres isolats portaient le gène

*bla*<sub>CTX-M-15</sub>, trois autres souches étaient positives pour les gènes *bla*<sub>CTX-M-65</sub>, *bla*<sub>CTX-M-125</sub> et *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, respectivement (Freitag et al., 2018).

En Afrique, la première GNB positive aux BLSE et/ou aux céphalosporinases enregistrée a été observée en 2019 en Afrique du Sud. Des échantillons d'eau, de sol, de produits frais et de surfaces de contact (n = 288) provenant de deux systèmes commerciaux de production d'épinards ont été analysés pour détecter les entérobactéries productrices de BLSE/AmpC. Au total, 14,58 % (42/288) des échantillons se sont révélés contaminés par des isolats BLSE/AmpC. Ces échantillons comprenaient 15,28 % (11/72) d'eau et 12,12 % (16/132) d'épinards récoltés et transformés, tandis que 25 % (15/60) d'échantillons d'épinards vendus au détail se sont révélés contaminés. Les espèces dominantes identifiées étaient *Serratia fonticola* (45,86 %), *Escherichia coli* (20,83 %) et *Klebsiella pneumoniae* (18,75 %). La caractérisation génotypique a révélé la domination du type BLSE CTX-M du groupe 1, suivi par TEM et SHV (Richter et al., 2019).

### II.2.2. Sol

Le sol contient divers antibiotiques naturels, et les résidus d'antibiotiques dans le sol contaminé par le fumier animal, les eaux usées et d'autres sources, peuvent servir de pression sélective antimicrobienne aux bactéries et développer un résistome aux antibiotiques (Jones-Dias et al., 2016; Tripathi and Cytryn, 2017). La prévalence des bactéries productrices de BLSE, mesurée par le dépistage des gènes *bla*<sub>CTX-M</sub> à l'aide d'une méthode de PCR en temps réel, était de 18,3 % (22/120) dans des échantillons de sol obtenus dans la région de Bourgogne en France, où les élevages de bovins à viande sont densément implantés (Hartmann et al., 2012). Dans une autre étude, les sols soumis à des pratiques agricoles intensives (grands apports de pesticides) présentaient la prévalence la plus élevée d'*E. coli* producteurs de BLSE par rapport aux sols soumis à des pratiques extensives (petits apports de pesticides) et biologiques (aucun apport de pesticides), ce qui montre que les types de sols peuvent affecter la prévalence des bactéries productrices de BLSE (Jones-Dias et al., 2016). Bien que les impacts anthropiques soient essentiels pour accélérer l'apparition de BMR dans le sol, les échantillons de sol prélevés dans des zones non perturbées, sans activité humaine et sans pression sélective antimicrobienne, contenaient encore des BMR, notamment des isolats producteurs de  $\beta$ -lactamases AmpC (codées sur le chromosome) et de BLSE (Upadhyay et al., 2016). Dans une étude similaire, des déterminants de résistance aux  $\beta$ -lactamines nouveaux et anciens ont été trouvés en l'absence de pression sélective dans des zones sans activité anthropique en Alaska, ce qui suggère que le microbiote du sol peut contribuer au

développement de la résistance aux antibiotiques de manière naturelle (Allen et al., 2010). Cependant, l'occurrence de la résistance aux antibiotiques dans les régions éloignées et les sols des fermes d'élevage pourrait être différente, car la résistance aux antibiotiques dans les zones vierges est causée par des microorganismes existant naturellement sans impact anthropique, alors que la plupart des sols dans les fermes sont facilement influencés par les activités humaines. En outre, la prévalence des bactéries résistantes aux carbapénèmes dans le tractus gastro-intestinal des bovins qui ont été mis au pâturage était positivement associée à l'abondance relative des gamma-proteobacteria, producteurs majeurs d'antibiotiques, dans les échantillons de sol, ce qui suggère que les bactéries résistantes aux carbapénèmes peuvent se transmettre à l'interface du bétail et du sol, et des études supplémentaires seront nécessaires pour comprendre la direction de la transmission de la RA entre le sol et le bétail (Markland et al., 2019).

### **II.2.3. Eau**

Des bactéries productrices de BLSE ont également été trouvées dans les ressources en eau proches de l'environnement agricole. Au total, six isolats d'*E. coli* porteurs des gènes *bla*<sub>TEM</sub> et *bla*<sub>CMY-2</sub> (6/116, 5 %) ont été obtenus à partir de 35 échantillons d'eau utilisés pour boire et laver le bétail laitier en Thaïlande (Hinthong et al., 2017). Dans une étude similaire, l'eau des enclos des bovins contenait les gènes codant pour des BLSE et des carbapénémases, ce qui suggère que l'eau des exploitations bovines pourrait être une autre source de bactéries productrices de BLSE (Noyes et al., 2016). Les eaux usées des stations d'épuration et des hôpitaux présentent une prédominance plus élevée de bactéries productrices de BLSE par rapport aux eaux de surface aux Pays-Bas (Blaak et al., 2014) et des résultats similaires ont été obtenus dans une autre étude en Tunisie, où les eaux usées contenaient plus de bactéries productrices de BLSE que les eaux de surface, 42,1 % (24/57) contre 1,7 % (1/57) (Ben Said et al., 2016). En revanche, les eaux de surface en Suisse (rivières et lacs) et au Bangladesh (lac) présentaient une prévalence plus élevée, 36,2 % (21/58) et 75 % (3/4), respectivement (Haque et al., 2014; Zurfluh et al., 2015). Des études substantielles ont montré la présence de gènes de résistance aux  $\beta$ -lactamines, y compris les dérivés *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub> et *bla*<sub>OXA-2</sub>, dans les boues d'épuration en Europe (Henriques et al., 2006; Mesa et al., 2006). Les boues d'épuration peuvent fournir des conditions idéales pour le transfert horizontal de gènes en raison des concentrations élevées de bactéries. Étant donné que les eaux usées contribuent à la présence de bactéries résistantes aux antibiotiques dans les eaux de surface et dans le sol par le biais de l'irrigation et des inondations, les bovins qui paissent dans les pâturages pourraient être

exposés aux bactéries productrices de BLSE par les eaux usées, directement ou indirectement (Blaak et al., 2014; Devarajan et al., 2016; Gaze et al., 2011).

#### **II.2.4. Fumier, environnement agricole et déchets**

Aux États-Unis, environ 14 millions de kilogrammes d'antibiotiques, dont l'utilisation est approuvée chez les animaux destinés à la consommation, ont été vendus en 2016 et environ 6,8 millions de tonnes de fumier animal ont été épandues sur les pâturages pour la production de fourrage et d'ensilage ainsi que sur les champs agricoles comme engrais pour fournir des nutriments aux cultures et améliorer la qualité du sol (FDA, 2017). Par conséquent, la pression sélective continue exercée par les résidus d'antibiotiques dans le sol traité peut faciliter l'acquisition de nouveaux gènes de résistance aux antibiotiques par les microorganismes. Le sol traité avec du fumier de bovins présente une plus grande abondance de bactéries résistantes aux  $\beta$ -lactamines que le sol non traité, ce qui montre que le sol amendé avec du fumier pourrait comprendre davantage de bactéries résistantes (Udikovic-Kolic et al., 2014). Le résistome du fumier de vache, y compris les gènes de résistance aux  $\beta$ -lactames, aux phénicolés, aux aminoglycosides et à la tétracycline, a montré une faible identité des séquences protéiques par rapport aux gènes de référence connus, ce qui suggère que le fumier pourrait être porteur de divers nouveaux gènes de résistance (Wichmann et al., 2014). En raison des résidus d'antibiotiques dans le fumier de bovins, les fumiers d'animaux peuvent présenter une prévalence relativement plus élevée de bactéries résistantes aux antibiotiques par rapport aux autres réservoirs signalés dans les environnements agricoles (Hou et al., 2015).

#### **II.3. Mouvement des bactéries résistantes et des gènes de résistance**

Les gènes de résistance peuvent être transférés à d'autres bactéries, même au sein d'un genre lointainement apparenté, par le biais du transfert horizontal de gènes avec des éléments mobiles tels que les bactériophages, les plasmides et les transposons (Andersson and Hughes, 2010). Cependant, en raison de l'ampleur et de la complexité de la transmission et de l'occurrence naturelle des BMR aux interfaces, le processus par lequel la résistance est transférée entre les différents compartiments est mal compris (Horigan et al., 2016).

### II.3.1. Transfert horizontal de gènes entre bactéries à l'interface environnementale

La présence de résidus antibiotiques ou d'environnements à haute densité et haute complexité accélère le transfert horizontal de gènes entre les bactéries, ce qui entraîne la propagation et le partage des gènes de résistance aux interfaces entre le bétail, l'homme et l'environnement (Andersson and Hughes, 2014; Sommer et al., 2017). Parmi les mécanismes de transfert horizontal de gènes, la conjugaison est le mécanisme le plus courant de propagation des gènes de résistance entre les bactéries. La plupart des gènes de résistance sont situés sur des éléments génétiques mobiles, ce qui facilite le transfert des gènes de résistance entre les bactéries (Karkman et al., 2018). Le transfert horizontal de gènes a été signalé dans un environnement diversifié, y compris les bactéries du sol et les agents pathogènes humains qui partagent des gènes de résistance et des régions flanquantes des gènes de résistance (von Wintersdorff et al., 2016). Les gènes de résistance identifiés dans le sol concernaient les  $\beta$ -lactames, les aminoglycosides, les phénicolés, les sulfamides et les tétracyclines, et ces gènes de résistance présentaient une forte identité avec ceux trouvés dans les pathogènes cliniques (Forsberg et al., 2012). En outre, Nesme et al. ont trouvé des gènes de résistance provenant de différents environnements (sol, océan et fèces humaines), et ont montré que le sol et les fèces humaines partageaient des gènes de résistance, ce qui suggère que les gènes circulent entre ces environnements (Nesme et al., 2014). De plus, plusieurs éléments génétiques mobiles tels que les plasmides conjugatifs comprenant les groupes d'incompatibilité (Inc) F, A/C, N, HI2, II et K avec des séquences d'insertion spécifiques telles que les éléments *ISEcpI* et *ISCR1* sont fréquemment signalés avec les BLSE (Irrgang et al., 2018), indiquant que ces éléments transposables sont fortement associés à l'acquisition indépendante des gènes BLSE. Des plasmides IncN codant pour CTX-M-1 ont été trouvés dans des bactéries isolées de porcs, d'agriculteurs et d'environnements agricoles, ce qui indique la propagation de plasmides IncN conjugatifs avec les gènes *bla*<sub>CTX-M</sub> parmi les porcs, les agriculteurs et les environs (Moodley and Guardabassi, 2009). Lifshitz et al. ont signalé que les isolats dérivés de bovins et de communautés étaient apparentés les uns aux autres en partageant CTX-M-15 et les éléments génétiques mobiles qui l'entourent (familles Tn3 ou IS1380) (Lifshitz et al., 2018). *ISEcpI*-CTX-M-1- $\Delta$ orf477, a été identifié indépendamment des origines plasmidiques telles que l'homme, les bovins et les porcs, ce qui démontre que les éléments génétiques mobiles sont des unités critiques pour la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques entre différents environnements (Jakobsen et al., 2015). Les éléments *ISEcpI* sont également

connus pour augmenter les niveaux d'expression des BLSE en fournissant un promoteur en amont des gènes BLSE (Vandecraen et al., 2017).

### II.3.2 Transmission clonale de bactéries productrices de BLSE aux interfaces

Les types de séquençage (ST) croisés dans les populations humaines et animales et dans l'environnement ont été identifiés en Tanzanie. Les *E. coli* ST38, ST131 et ST2852 producteurs de BLSE ont été isolés à travers ces trois interfaces, montrant la dissémination d'isolats clonaux indépendamment des sources d'origine (Seni et al., 2018). Dans une autre étude, la parenté moléculaire entre les isolats producteurs de BLSE issus de populations humaines et animales était sensiblement proche (Dorado-García et al., 2018). Dorado-García et al. ont réalisé une méta-analyse des isolats producteurs de BLSE provenant de 35 études menées aux Pays-Bas afin de comprendre les principaux types de gènes de BLSE, les réplicons plasmidiques et les ST d'*E. coli*). Les isolats des humains qui vivent près des fermes ont montré une plus grande similarité avec les isolats de leurs animaux, y compris les poulets de chair et les porcs, tandis que les isolats des humains dans la population générale étaient similaires avec les échantillons cliniques humains, les eaux de surface et d'égout, et les oiseaux sauvages (Dorado-García et al., 2018). Dahms et al ont signalé que les travailleurs agricoles, qui entraient fréquemment en contact avec le bétail, étaient porteurs de ST identiques avec les isolats de bovins, ce qui indique un transfert zoonotique de bactéries productrices de BLSE entre les humains et leurs animaux (Dahms et al., 2015). De même, des *E. coli* uropathogènes producteurs de BLSE provenant de diverses sources (bétail, humains, eaux de surface et aliments) partageaient le ST10 porteur du CTX-M-1 (Müller et al., 2016). Dans les exploitations avicoles, les isolats d'*E. coli* producteurs de BLSE provenant de toutes les mouches parasites des oiseaux et du fumier excréte portaient des ST identiques avec le gène *bla*<sub>TEM-52</sub>, ce qui suggère un transfert clonal entre les mouches et les oiseaux se produisant dans les exploitations avicoles (Blaak et al., 2014).

# **Matériel et Méthodes**

## MATERIEL ET METHODES

### 1. Echantillonnage

Un total de 491 échantillons de fruits et légumes habituellement consommés crus ont été acquis au niveau de sept différentes fermes et au niveau de cinq marchés de Bejaia, durant avril 2013 jusqu'à mars 2014 (tableau 3 et figure 4 ; voir également tableaux en annexes). Tous les échantillons ont été acheminés au niveau du laboratoire d'écologie microbienne, dans des conditions aseptiques et dans une glacière, pour être étudiés. Afin de détecter l'origine de contamination de ces échantillons par les bactéries multirésistantes de fruits et légumes, des échantillons de sol et de l'eau d'irrigation ont été également analysés (le sol est prélevé avant et après épandage).

**Tableau 3 : Tableau récapitulatif du type et du nombre d'échantillons analysés issus de différentes fermes et marchés de Bejaia**

Fermes / Marchés	Eau d'irrigation	Sol	Fruits/Légumes
Ferme 1	9	18	35
Ferme 2	9	21	41
Ferme 3	9	18	35
Ferme 4	9	24	54
Ferme 5	3	3	6
Ferme 6	3	3	6
Ferme 7	3	3	5
Idimco	NA	NA	148
Centre-ville	NA	NA	24
Ihadaden	NA	NA	78
Lekhmis	NA	NA	48
Royal	NA	NA	12

NA : Non applicable

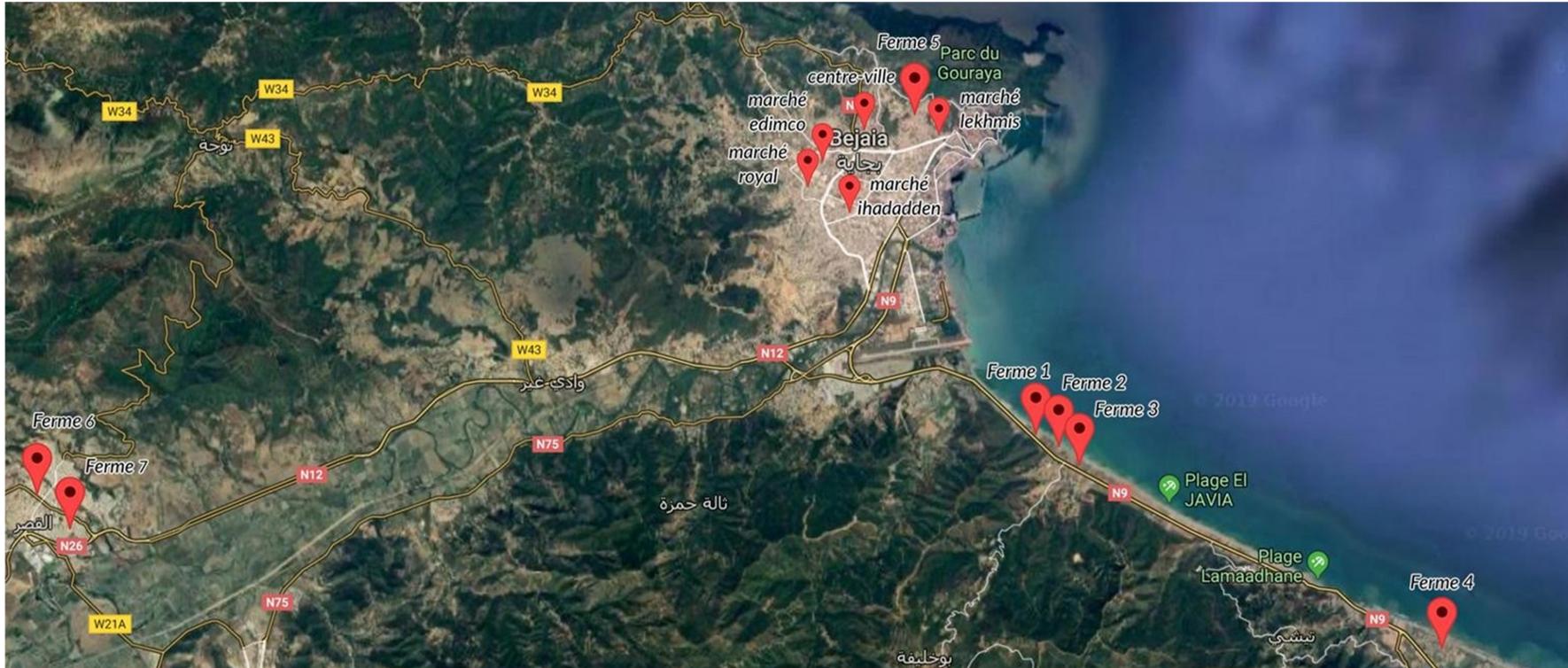


Figure 4 : Localisation géographique des différentes fermes et marchés

## **2. Analyse microbiologique**

### **2.1. Isolement et identification des bacilles à Gram négatif résistant aux C3G**

Les échantillons ont été enrichis dans de l'eau peptonée tamponnée, après 24h un isolement a été effectué sur gélose Mac Conkey additionné de 8 µg/ml de ceftazidime et de 8 µg/ml de vancomycine. Ensuite les échantillons ont été incubés 24h à 37°C. Après incubation, les boîtes ont été examinées. Les colonies caractéristiques des bacilles à Gram négatif ont été prélevées et purifiées par repiquages successifs sur le même milieu d'isolement

Les différentes souches ont été identifiées après coloration de Gram et le test d'oxydase, en utilisant une galerie API 20E pour les entérobactéries, et une culture à 44°C pour les souches d'*Acinetobacter baumannii*. Une confirmation de l'identification de toutes les souches isolées est effectuée par la spectroscopie de masse MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Time-Of-Flight).

#### **2.1.1. Galerie API 20E**

C'est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries à Gram négatif, dont les entérobactéries. Elle comporte 20 micro-tubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Ces micro-tubes ont été inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation (18h-24h à 37°C) se traduisaient par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

#### **2.1.2. MALDI-TOF**

Le principe se base sur l'ionisation des protéines bactériennes par un rayon laser et la création de pics caractéristiques (spectre). A partir d'une base de données de spectres, le logiciel associé recherche la correspondance à l'espèce de la bactérie selon un indice de fiabilité entre les deux spectres.

De façon succincte, le spectromètre est composé de trois éléments principaux : une chambre d'ionisation produisant des ions en phase gazeuse, un analyseur séparant les ions selon le rapport masse sur charge ( $m/z$ ) et un détecteur transformant le courant ionique en courant électrique et générant un spectre de masse caractérisant l'échantillon. Le spectre obtenu est ensuite comparé à une collection de spectres contenus dans des bases de données de façon à identifier la souche bactérienne.

Les résultats d'identification des bactéries sont donnés avec le logiciel MALDI Biotyper par un score compris entre zéro et trois (Tableau ). On considère qu'une bactérie est identifiée de façon fiable lorsque le score d'identification est supérieur à 1,9.

**Tableau 4 : Score d'identification des bactéries**

Score	0-1.7	1.7-1.9	1.9-3
Couleur	Rouge	Jaune	Vert
Identification	Aucune	Genre bactérien	Espèce bactérienne

## 2.2. Détermination de la sensibilité des souches isolées aux antibiotiques

La sensibilité des souches vis-à-vis de différentes familles d'antibiotiques a été déterminée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013) et par des plaques Sensititre EUVSEC pour la détermination des CMI (détermination des concentrations minimales inhibitrices).

### 2.2.1. Antibiogramme

Des géloses Mueller-Hinton ont étéensemencées, à l'aide d'un écouvillon, à partir d'une culture bactérienne jeune (18h à 24h) à 0.5 Mac Farland ( $\approx 10^8$  UFC/ml) diluée au 1/100. Les disques d'antibiotiques ont été déposés à la surface des géloses à l'aide d'un distributeur automatique. Les boîtes ont été ensuite incubées pendant 16 à 18 h à  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . La souche de contrôle utilisée durant les antibiogrammes réalisé est E.coli ATCC25922. Au total 30 antibiotiques ont été testés (tableau 4).

À l'aide d'un automate SirScan, les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques d'antibiotiques ont été mesurés et l'interprétation en bactérie Sensible (S) Intermédiaire (I) ou Résistante (R) a été effectuée selon les critères définis par le CLSI.

Tableau 5 : Liste des antibiotiques testés

Antibiotiques	Abréviation	Charge	Famille
Ampicilline	AM	10µg	β-lactamines
Amoxicilline-acide clavulanique	AMC	20µg + 10µg	β-lactamines
Ticarcilline	TIC	75µg	β-lactamines
Céphalothine	KF	30µg	β-lactamines
Céfoxitine	FOX	30µg	β-lactamines
Céfuroxime	CMX	30µg	β-lactamines
Céfamandole	MA	30µg	β-lactamines
Céfotaxime	CTX	30µg	β-lactamines
Céftazidime	CAZ	30µg	β-lactamines
Céftriaxone	CRO	30µg	β-lactamines
Céfépime	FEP	30µg	β-lactamines
Aztréonam	ATM	30µg	β-lactamines
Ertapénème	ERT	10µg	β-lactamines
Imipénème	IMP	10µg	β-lactamines
Témocilline	TEM	30µg	β-lactamines
Céfotaxime-AC. Clavulanique	CTC	30µg + 10µg	β-lactamines
Céftazidime-AC. Clavulanique	CZC	30µg + 10µg	β-lactamines
Chloramphénicol	C	30µg	Phénicol
Gentamycine	CN	10µg	Aminosides
Streptomycine	S	10 UI	Aminosides
Kanamycine	K	30 UI	Aminosides
Tétracycline	TE	30 UI	Tétracycline
Tigécycline	TGC	15µg	Tétracycline
Colistine	CT	10µg	Polymyxine
Acide nalidixique	NA	30µg	Quinolones
Ofloxacin	OFX	5µg	Fluoroquinolones
Ciprofloxacine	CIP	5µg	Fluoroquinolones
Triméthoprime- Sulphaméthoxazole	SXT	1.25µg +23.75µg	Sulfamides
Sulfamide	ST	300µg	Sulfamides
Triméthoprime	TMP	5µg	Sulfamides

### **2.2.2. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)**

La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) vis-à-vis de Ertapénème et l'Imipénème est réalisée pour les souches qui présentées un diamètre réduit à l'Ertapénème et Témocilline et/ou l'Imipénème à l'aide des plaques Sensititre EUVSEC2.

Les plaques Sensititre est une méthode de micro-bouillon qui fournit des résultats qualitatifs (sensible ou résistant) et quantitatifs de concentration minimale inhibitrice (CMI). Les plaques se présentent sous forme de puits dosés avec des antibiotiques à des dilutions appropriées (milieu séché). Les 96 puits sont ensuiteensemencés par une suspension bactérienne, bien sceller les plaques par un film adhésif puis incubées pendant 18 à 24 h à  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

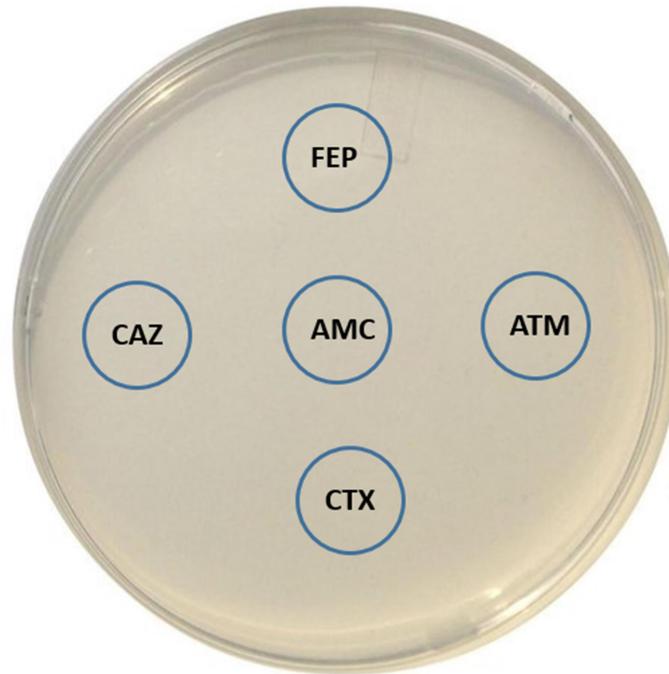
Les résultats sont lus soit manuellement ou automatiquement à l'aide d'un Sensititre AutoReader. La concentration minimale inhibitrice, est la plus faible concentration d'antibiotique où il n'y a pas de croissance bactérienne visible. La souche de référence *E. coli* ATCC 25922 a été utilisée comme souche témoin.

### **2.3. Détermination des phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines**

#### **2.3.1. Détection d'une $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE)**

Pour la détection d'une  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE), un DD-test entre les disques de céfotaxime, ceftazidime, céfépime et aztréonam, ainsi qu'un disque d'amoxicilline-acide clavulanique a été effectué.

Le DD-test est réalisé sur une gélose Mueller Hinton avec des disques de céfotaxime (30  $\mu\text{g}$ ), ceftazidime (30  $\mu\text{g}$ ), aztréonam(30  $\mu\text{g}$ ), cefepime (30  $\mu\text{g}$ ) et un disque d'amoxicilline-clavulanate (20 $\mu\text{g}$  + 10 $\mu\text{g}$ ) positionnés à une distance de 30 mm (centre à centre) (Figure 5). Le test est considéré comme positif lorsqu'une synergie est obtenue entre les disques de céfotaxime et/ou ceftazidime, aztréonam, cefepime et le disque d'amoxicilline-clavulanate, ce qui donne souvent une zone de forme caractéristique appelée "bouchon de champagne" (Drieux et al., 2008).



**Figure 5 : Disposition des disques d'antibiotiques dans le DD-test**

### 2.3.2. Détection des carbapénèmases

Concernant la production de carbapénèmases, un carba-NP test a été réalisé selon le protocole élaboré par Nordmann et *al.* (Nordmann et al., 2012). Ce test est un test biochimique de détection rapide de l'activité carbapénémase des entérobactéries. Le principe de ce test repose sur l'identification d'une acidification du milieu liée à l'hydrolyse d'un carbapénème par une carbapénémase. L'indicateur de pH change de couleur lorsque le milieu devient acide (Figure 6).

#### Réactifs utilisés

- Tubes Eppendorf de 1.5 ml
- Imipenem + cilastatin (poudre pour solution injectable IV)
- Tampon de lyse: B-PERII (Bacterial Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific. Pierce).
- Rouge de phénol en poudre (Thermo-Fisher Scientific)
- ZnSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O en poudre (Sigma-Aldrich),
- Contrôles négatif (*E. coli* de phénotype de sensibilité sauvage) et positif (*K. pneumoniae* OXA-48 et *K. pneumoniae* KPC-2)

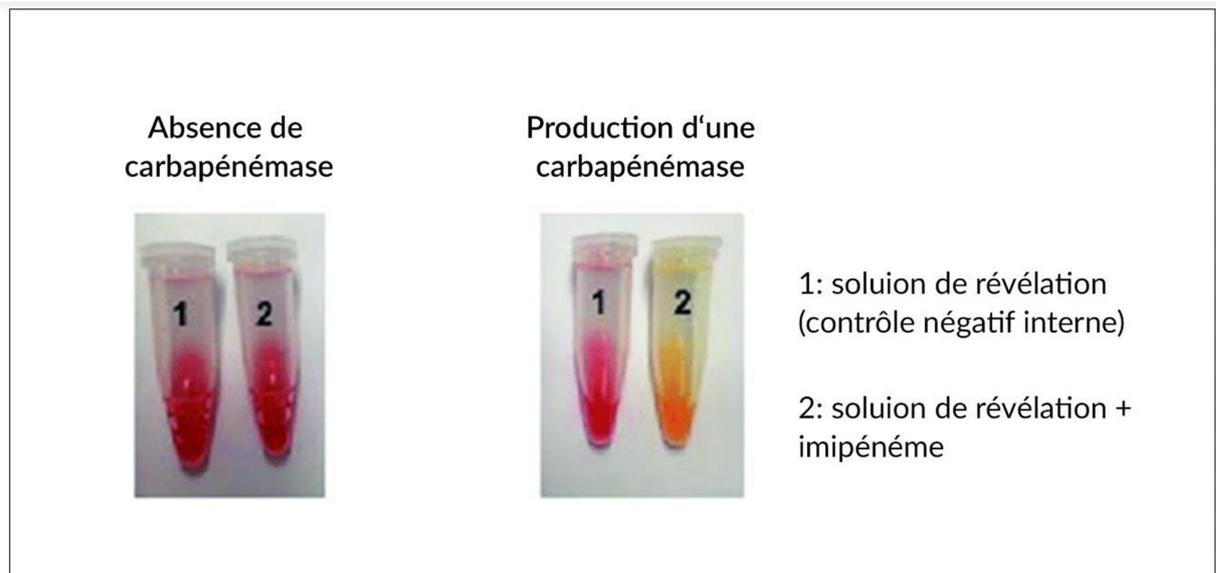
### **Préparation et conservation de la Solution A**

1. Préparer une solution concentrée de rouge phénol 0.5% poids/volume
2. Mélanger 2 ml de la solution concentrée de rouge phénol (bien vortexer avant pipetage pour resuspendre correctement la solution concentrée de rouge phénol) dans 16.6 ml d'eau distillée
3. Ajuster le pH à 7.8 en ajoutant, goutte à goutte une solution de NaOH (1 N)
4. Ajouter 180 µl d'une solution de ZnSO<sub>4</sub>, 10 mM pour obtenir une concentration finale de ZnSO<sub>4</sub> 0.1 mM

La Solution A est stable à température ambiante pendant une semaine et peut être conservée pendant plusieurs mois à -20°C.

### **Protocole**

1. Ajouter 100 µl de 20 mM du tampon de lyse Tris-HCl (B-PERIL, Bacterial Protein Extraction Reagent. Thermo Scientific, Pierce) dans 2 tubes Eppendorf de 1.5 ml
2. Bien resuspendre 1/4 à 1/3 (environ 3 à 5 colonies) d'une öse calibrée (10 µl) de colonies bactériennes dans les 100 µl de 20 mM du tampon de lyse Tris-HCl. Les colonies bactériennes peuvent être obtenues directement à partir d'un antibiogramme autour du disque de carbapénème).
3. Vérifier que les bactéries ont bien été remises en suspension. Si besoin mélanger par pipetage (de haut en bas) pour bien dissocier les colonies bactériennes dans le tampon de lyse
4. Pour chaque souche à tester, ajouter (i) 100 µl de Solution A dans le premier tube Eppendorf puis (ii) 100 µl de Solution A + imipénème (12 mg/ml) dans le second tube Eppendorf
5. Incuber à 37°C pendant un maximum de 2 heures
6. Les résultats sont interprétés comme positifs s'il y a virage du rouge vers le jaune du tube contenant la solution additionnée d'imipénème (IMP) (Figure 6).



**Figure 6 : Interprétation du CARBA NP test**

### 3. Détection des gènes de résistance aux $\beta$ -lactamines (BLSE) par Check-MDR CT101 et les gènes de résistance aux carbapénèmes par microarray Check-MDR CT103

Le principe du système de diagnostic Check-points est basé sur la reconnaissance moléculaire spécifique des séquences cibles d'ADN et l'amplification avec des amorces universelles. Chaque cible d'ADN est reconnue par une sonde spécifique qui contient un code unique correspondant à une position unique sur la puce. Les sondes sont constituées de deux segments, qui sont joints par l'ADN ligase lorsqu'ils correspondent parfaitement à l'ADN cible. Seules les sondes connectées entraîneront des produits d'amplification. Les sondes qui diffèrent de l'ADN cible ne donneront pas de produits d'amplification, même en cas de différence d'un seul nucléotide.

Les produits d'amplification sont hybridés et visualisés par détection colorimétrique. Les puces à ADN sont contenues dans des tubes dits CP Array tubes (figure 7B), qui sont insérés dans le lecteur Check-Points (figure 7C) une fois la réaction de détection terminée. Cela génère une image (figure 7D) qui est analysée par un logiciel dédié. Le résultat final est représenté sous forme d'un tableau (figure 7E).

Le protocole comprend trois étapes principales : étape de reconnaissance d'ADN, étape d'amplification d'ADN et l'étape de détection. Avant la réalisation de ces trois étapes, une culture bactérienne est réalisée et une extraction de l'ADN est effectuée avec le kit Instagene matrix (Bio-rad). Après extraction, l'ADN est quantifié et dilué si nécessaire (concentration d'ADN entre 5 et 50 ng/ $\mu$ L est recommandée).

## **Protocole**

### **ETAPE A : RECONNAISSANCE DE L'ADN**

1. Décongeler la solution A et l'ADN puis mélanger.
2. Ajouter 5 µl de solution A dans chaque tube PCR. Ajouter 10 µl de chaque échantillon d'ADN.
3. Fermer les tubes et centrifuger brièvement. Mélanger en tapotant les tubes PCR (la solution doit avoir une couleur bleue uniforme). Centrifuger brièvement à nouveau.
4. Mettre dans le thermocycleur et lancer le programme du run CP step A, vol. : 18 µl.
  - **1 cycle** : 95°C pendant 3min
  - **24 cycles** : 95°C pendant 30 sec + 65°C pendant 5 min
  - **1 cycle** : 98°C pendant 2 min
  - 4°C environ 2,5h

### **ETAPE B: AMPLIFICATION DE L'ADN**

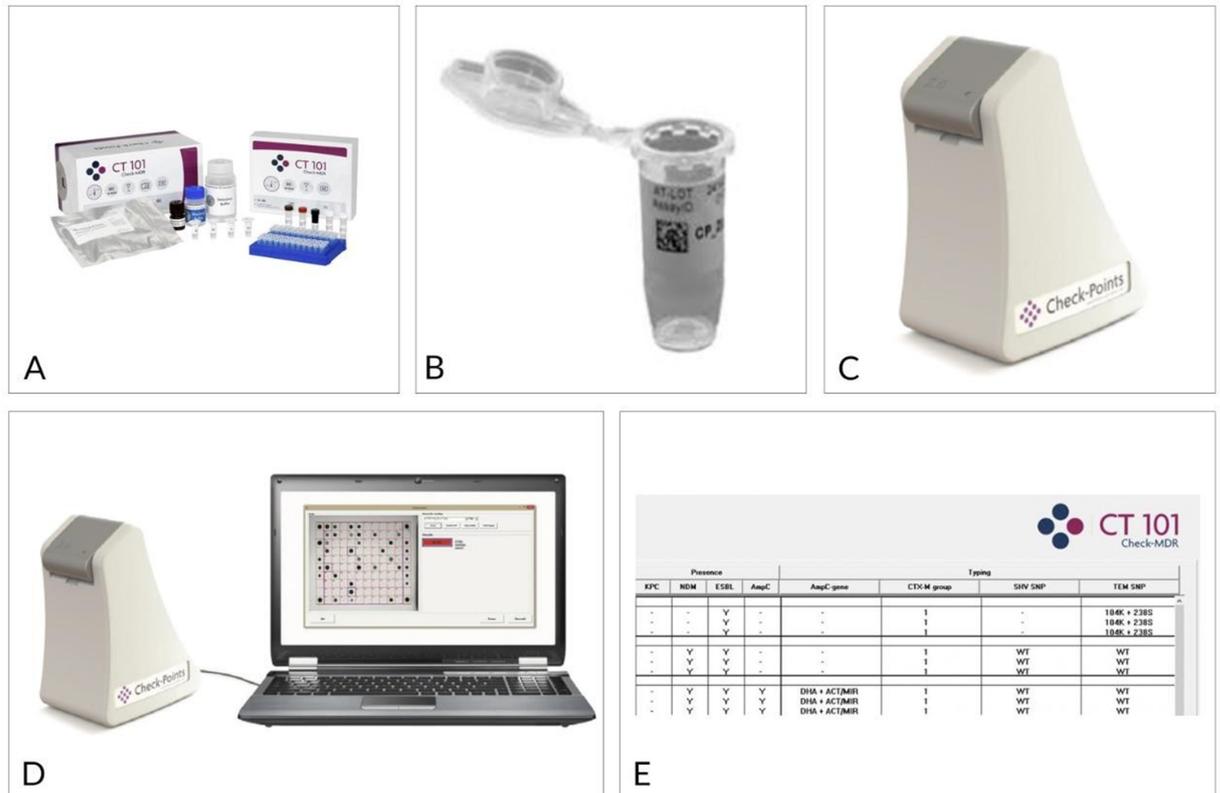
1. Centrifuger brièvement une fois que l'étape A est finie
2. Préparer le BC-mix
  - Décongeler la Solution B, mélanger et centrifuger brièvement
  - Décongeler la Solution C
  - Mélanger les deux solutions en commençant par la solution B, puis solution C en homogénéisant (3 up & down avec la pipette)
  - Vortexer
  - Centrifuger brièvement
3. Ajouter 30 µl du BC-mix fraîchement préparé dans chacun des tubes PCR. Fermer les tubes et mélanger en tapotant chaque tube PCR. Centrifuger brièvement
4. Mettre les tubes PCR dans le thermocycleur et lancer le programme du run CP step B, vol. : 48 µl
  - **1 cycle** : 95°C pendant 10 min
  - **35 cycles** : 95°C pendant 5 sec + 55°C pendant 30 sec + 72°C pendant 30 sec
  - **1 cycle** 98°C pendant 2min
  - 4°C environ 1,5 h
5. Centrifuger brièvement quand l'étape B est finie

Aller dans la pièce ou l'étape de détection a lieu ou bien conserver les tubes PCR soit à 4°C si la détection a lieu dans les 24h, soit à -20°C si la détection à lieu dans les 2 semaines.

### **ETAPE DE DETECTION**

1. Commencer à préparer le nombre d'ArrayTube nécessaires pour la détection, environ 10 min avant la fin de l'étape B (1 ArrayTube pour 3 tubes PCR). Faire chauffer le thermomixer à 50°C
2. Placer les ArrayTube dans le thermomixer à 50°C
3. Ajouter 300 µl de tampon de détection dans chaque ArrayTube. Incuber 2 min sous agitation (400 rpm).
4. Enlever le tampon de détection et répéter étape 3
5. Remplacer le tampon de détection par 300 µl de tampon de détection frais
6. Prendre les échantillons de l'étape B. Si les échantillons sont stockés plus de 2h après la fin de l'étape B, ils doivent être chauffés à 95°C pendant 2min (thermocycleur) et centrifuger brièvement.
7. Transférer 10 µl de chaque tube PCR dans le ArrayTube correspondant (Dans 1 ArrayTube : 3 échantillons, donc 3x10 µl =30 µl). Ne pas enlever les ArrayTube du thermomixer. Ajouter l'échantillon directement dans le tampon de détection et faire up & down avec la pipette.
8. Fermer le couvercle du ArrayTube. Incuber 30 min à 50°C sous agitation (400 rpm)
9. UN ArrayTube à la fois, enlever du thermomixer, remplacer le tampon de détection par 300 µl le tampon de blocage et remettre le tube dans le thermomixer a 50°C. Incuber 5 min à 50°C sous agitation (400 rpm).
10. Remplacer le tampon de blocage par 300 µl de tampon de blocage frais. Ajuster la température du thermomixer a 30°C Incuber 10 min.
11. Pendant ce temps, préparer la dilution de la solution conjuguée avec le tampon de détection en utilisant le tableau (Mettre la solution conjuguée dans le tampon de détection et faire 3 up & down avec la pipette et vortexer 30 sec).
12. Enlever totalement le tampon de blocage. Ajouter 150 µl de la dilution de la solution conjuguée. Incuber 15min, à 30°C, agitation 400 rpm.
13. Enlever la solution conjuguée. Ajouter 600 µl du tampon de détection. Incuber 2min, à 30°C sous agitation (400 rpm).
14. Remplacer le tampon de détection par 600 µl de tampon de détection frais. Incuber 2min, à 30°C sous agitation (400 rpm).

15. Enlever le tampon de détection. Ajouter 150 µl de solution de coloration dans chaque ArrayTube. Incuber 15 min à température ambiante.
16. Analyse de l'image tout de suite après les 15min.



**Figure 7. Présentation du Check-MDR CT101 test**

A) Check-MDR CT101, B) CP Array Tube, C) Check-Points Tube Reader, D) Présentation du résultat final de l'étape de détection et E) Tableau récapitulatif des résultats.

#### **4. Caractérisation moléculaire des gènes de résistance par le séquençage du génome entier (WGS)**

Le NGS est de plus en plus appliqué à la compréhension et à la gestion des maladies infectieuses. Cela inclut le séquençage de génomes microbiens à des fins d'identification en laboratoire d'agents infectieux, de détection de marqueurs de résistance aux antibiotiques et de surveillance de la santé publique de groupes épidémiologiques et d'épidémies.

Le principe de base, dans tous séquençage d'un génome, constitue à fragmenter de façon aléatoire ce génome pour obtenir des petits fragments d'ADN de quelques milliers de paires de bases, faciles à manipuler. Les extrémités d'une partie de ces fragments sont ensuite séquencées puis assemblées sur la base de leur chevauchement grâce à des programmes informatiques pour essayer de produire une séquence complète.

Le séquençage du génome entier (WGS) des souches de *K. pneumoniae* productrices de BLSE et AmpC a été réalisé à la plateforme ICM au niveau de l'hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France. L'extraction de l'ADN est effectuée par E.Z.N.A.® Bacterial DNA Kit (OmegaBio-tek, Norcross, USA) suivant les instructions du fabricant. La fragmentation des acides nucléiques a été réalisée par ultrasons, la bibliothèque d'ADN a été préparée à l'aide du kit KAPA (Roche Sequencing Solutions, Pleasanton, CA, USA) et le séquençage a été réalisé à l'aide de la technologie MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA). Les lectures brutes ont été coupées (longueur minimale, 35 pb; score de qualité, 0,03) et assemblées de novo dans CLC Genomics Workbench 7.5.1.

Les résultats ont été interprétés à l'aide du CGE server (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>). L'identification des *K. pneumoniae* a été réalisée par KmerFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/KmerFinder/>), les gènes de résistance par Resfinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) et le type de ST par MLST (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>).

# Résultats

## **Etude 1: From farms to markets: Gram-negative bacteria resistant to third-generation cephalosporins in fruits and vegetables in a region of North Africa.**

### **Présentation de l'étude**

Le rôle des aliments dans l'exposition humaine à des bactéries résistantes aux antibiotiques est un problème de sécurité alimentaire croissant. La contribution des fruits et légumes consommés crus à cette exposition est encore incertaine.

Un total de 491 échantillons de fruits et légumes collectés dans 5 marchés et 7 fermes dans la région de Bejaia a été analysé afin d'évaluer le niveau de contamination des fruits et légumes par des bactéries à Gram négatif résistantes aux céphalosporines de troisième génération. Un total de 90 échantillons de sol et 45 échantillons d'eau d'irrigation ont été également prélevés au niveau des sept fermes afin de les évaluer en tant que sources potentielles de contamination de fruits et légumes. Tous les échantillons ont été analysés sur des milieux sélectifs contenant de la ceftazidime. En parallèle les échantillons ont été également isolés sur milieu Hektoen afin de détecter la présence de Salmonelle.

L'identification des souches isolées a été réalisée par spectrométrie de masse MALDI-TOF. La sensibilité aux antibiotiques a été déterminée par la méthode de diffusion des disques sur gélose Mueller Hinton. La production de carbapénémases a été recherchée par le CARBA NP test.

Cette étude a permis l'identification de 30 bactéries au niveau des échantillons issus des fermes, et elles étaient presque toutes des espèces bactériennes non fermentaires (*Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Ochrobactrum*) sauf une souche d'*Enterobacter cloacae* et deux souches de *Citrobacter murlinae*, isolé sur un échantillon de concombre et deux tomates. Une plus grande diversité d'espèces bactériennes et de profils de résistance a été observée au niveau des fruits et légumes issus des marchés ; les *Enterobacteriaceae* (n = 41) étaient aussi fortement représentées que les bactéries non fermentaires (n = 37). Parmi les *Enterobacteriaceae*, 11 isolats de *Klebsiella pneumoniae* étaient productrices de BLSE et deux AmpC.

**Article 1: From farms to markets: Gram-negative bacteria resistant to third-generation cephalosporins in fruits and vegetables in a region of North Africa**

**Running title: Antimicrobial resistance in fresh produce**

**Feriel Mesbah Zekar<sup>1,2</sup>, Sophie A. Granier<sup>2</sup>, Muriel Marault<sup>2</sup>, Lydia Yaici<sup>1</sup>, Benoit Gassiloud<sup>3</sup>, Charles Manceau<sup>4</sup>, Abdelaziz Touati<sup>1</sup> and Yves Millemann<sup>2,5\*</sup>**

<sup>1</sup>Laboratoire d'écologie microbienne, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia, Bejaia, Algeria.

<sup>2</sup>Laboratory for food safety, ANSES, Université Paris-Est, Maisons-Alfort, France.

<sup>3</sup>Nancy Laboratory for Hydrology, ANSES, Nancy, France.

<sup>4</sup>Angers Laboratory for Plant Health, ANSES, Angers, France.

<sup>5</sup>Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Université Paris-Est, Maisons-Alfort, France.

**\* Corresponding author: [yves.millemann@vet-alfort.fr](mailto:yves.millemann@vet-alfort.fr); +33 1 43 96 71 23**

**Keywords: antimicrobial resistance, Gram negative bacteria, third-generation cephalosporin, fruits, vegetables, farm, market, North Africa.**

Number of words: 4017

Number of tables and figures: 8 Tables + 0 Figures Supplementary material: 4 Tables

**Abstract (300 words)**

The role of food in human exposure to antimicrobial-resistant bacteria is a growing food safety issue. The contribution of fruits and vegetables eaten raw to this exposure is still unclear. The evaluation of contamination levels of fruits, vegetables and the agricultural environment by third-generation cephalosporin (3GC)-resistant Gram-negative bacteria was performed by analysing 491 samples of fruits and vegetables collected from 5 markets and 7 farms in Bejaia area, north-eastern Mediterranean coast of Algeria. 90 soil samples and 45 irrigation water samples were also sampled in farms in order to assess them as potential inoculum sources. All samples were investigated at the same time on ceftazidime-containing selective media for 3GC-resistant Gram-negative bacteria detection and on Hektoen media, for *Salmonella spp* presence.

The bacteria isolated (n=30) from fruits and vegetables, soil and irrigation water collected in the farms were almost all non-fermenting bacterial species (*Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Ochrobactrum*) except one strain of *Enterobacter cloacae* and two strains of *Citrobacter murlinae*, isolated on one cucumber and two tomato samples in the same farm. Greater diversity in bacterial species and antimicrobial resistance profiles was observed at markets: *Enterobacteriaceae* (n=41) were as strongly represented as non-fermenting bacteria (n=37). Among *Enterobacteriaceae*, *Enterobacter cloacae* (n=21) and *Klebsiella pneumoniae* (n=13) were the most common isolates. Most of the *Klebsiella pneumoniae* isolates were extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producers (n=11). No *Salmonella spp.* was recovered in any sample.

This study showed that fruits and vegetables including those which may be eaten up raw constitute a reservoir of 3GC-resistant Gram-negative bacteria and multi-drug resistant-bacteria in general that can be transferred to humans through food. The general public should be informed of this hazard for health in order to encourage good domestic hygiene practices. In addition, further investigation is needed throughout the production chain to enrol professionals in actions to reduce this contamination.

## 1 Introduction

Fresh fruits and vegetables are essential components of a healthy human diet. They provide essential nutrients, such as vitamins, fibers, minerals, and have many health benefits. Therefore, a large number of public health institutions encourage the consumption of fruits and vegetables, and recommend eating at least five fruits and vegetables daily to protect against a range of cardiovascular diseases and cancers (Abadias et al., 2008, Callejón et al., 2015). Currently, there is a growing demand for these fresh fruits and vegetables for health benefits and at the same time, as lifestyles are changing, current trends show a decrease in the time spent preparing meals (Abadias et al., 2008).

In fact, fresh fruits and vegetables have recently become increasingly recognized as potential vehicles of foodborne diseases (Lynch et al., 2009, Olaimat and Holley, 2012). Many food-borne illness outbreaks in numerous countries have been associated with consumption of contaminated fresh fruits and vegetables, such as fenugreek seed sprouts contaminated with *Escherichia coli* O104:H4 in Europe in 2011, and tomatoes and spinach contaminated with *Salmonella* and *E.coli* O157 in the United States of America in 2013 (AIT 2013).

The use of antibiotics to treat humans and animals or in agriculture can lead to the selection of antibiotic-resistant bacteria that escape in the environment (Durso and Cook, 2014). Environmental isolates of *Enterobacteriaceae* that have acquired resistance to third-generation cephalosporins (3GCs) constitute a crucial threat for public health as a source of resistance traits for pathogenic bacterial strains that could lead to a failure in antibiotherapy (Blaak et al., 2014).

The role of food in human exposure to antimicrobial-resistant bacteria, including zoonotic pathogens, as well as commensal and environmental bacteria serving as a reservoir for resistance genes, is becoming a growing food safety issue (Campos et al., 2013, Zurfluh et al., 2015). This contamination may thus occur by different means, such as exposure of products to manure, soil, irrigation water or animal faeces harboring these microorganisms. This contamination can also occur during harvesting, post-harvest handling, or distribution due to lack of compliance with elementary food safety and hygiene measures (Abadias et al., 2008, Seo and Matthews, 2014).

*Enterobacteriaceae* are part of the environmental microflora and include common animals' commensals. *Enterobacteriaceae* strains ingested through food may contain Extended Spectrum Beta Lactamases (ESBL) and plasmidic AmpC (pAmpC) genes found on mobile genetic elements. These isolates can then colonize humans or their genes can be

transferred to other bacteria during transit in the intestinal tract (Thanner et al., 2016).

There is limited information concerning the nature and ecology of antibiotic-resistant bacteria associated with fresh fruits and vegetables (Ruimy et al., 2010, Blaak et al., 2014, Valdman et al., 2014, Reuland et al., 2014). In addition, no study on that topic has been performed in Algerian date. The aim of our study was therefore firstly to evaluate the level of contamination of fruits, vegetables and the agricultural environment by 3GC-resistant Gram-negative bacteria; secondly, to search for the source of this contamination; and thirdly, to determine the resistance phenotype of these isolates. To establish whether ESBL-producing *Enterobacteriaceae* on fresh fruits and vegetables reflect those present in the farm environment, fruits and vegetables were collected in farms and at the market as well.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Sampling**

A total number of 491 fruit and vegetable samples were collected from seven selected farms and five markets in Bejaia area, Algeria, during a time-period from April 2013 to March 2014. Farms in the vicinity of Bejaia were contacted in order to ask them access for research purposes. Four large farms and three small family farms allowed full access to their agricultural exploitation. During each visit, samples were taken on any production ready for harvesting. Large farms were each sampled four times; the family farms were sampled only once. A total of 181 samples collected from the farms were analysed, including 126 tomatoes, 6 zucchini, 12 cucumbers, 21 chilies and peppers, 1 lettuce, 1 celery, 2 parsleys, 2 mints, 2 garlies, 3 chards, 3 onions and 2 walnuts. A set of 165 out of these samples originated from large commercial farms while the 16 remaining samples were collected from small family farms (Table S1). In addition, 135 samples of soil and irrigation water were sampled in all places (Table S1). All farms use poultry droppings, manure, and fertilizer for soil fertilization (Table S1).

In parallel, 310 samples were collected in five selected markets located inside the city of Bejaia. During each of the visits to the markets, the sampler behaved like a average Algerian consumer and shopped the most common fruits and vegetables from the regular Algerian regimen. The plant samples included 41 lettuces, 51 tomatoes, 4 cucumbers, 6 celeries, 10 mints, 9 beets, 14 apples, 26 chilies, 28 peppers, 30 grapes, 2 dates, 3 prickly-pears, 11 parsleys, 15 peaches, 24 watermelons, 7 pears, 16 carrots, 7 fennels, 3 turnips and 3 nectarines (Table S2).

For fruit and vegetable samples, we have recorded sample name, date (season), country of origin, number of samples, irrigation water type and the type of fertilization, depending on the availability (Table S1 and S2). Information on irrigation water and soil at different farms were also recorded (Table S1).

All samples were collected aseptically and then packaged in sterile polyethylene zip bags and transported to the laboratory in aseptic conditions in a cold box within two hours. All samples were analysed within 2 hours after their arrival at the laboratory. A sharp sterile knife was used to cut samples in sterile trays.

## **2.2. Microbiological analysis**

### **2.2.1. Detection of *Salmonella***

#### ***Water and soil samples***

Isolation of *Salmonella* from irrigation water was carried out by membrane filtration. About 3 liters of irrigation water were filtered through a 0.45 µm filtration membrane. The filter membranes were then placed in 50 mL of buffered peptone water (BPW) (Fluka), and incubated at 37°C for 18±2h (NF EN ISO 19250) for enrichment.

Soil samples (25 g each) were suspended in 225 mL of BPW (Fluka), vigorously shaken and the suspensions were then incubated at 37°C for 18 ± 2h.

#### ***Fruit and vegetable samples***

*Salmonella* detection was performed following the ISO standard NF EN ISO 6579. In brief, 25 g of samples of fruit or vegetable were placed aseptically in a sterile plastic bag containing 225 mL of buffered peptone water (BPW), vigorously shaken and the suspensions were then incubated at 37°C for 18 ± 2h.

After pre-enrichment, 0.1 mL of each of these incubated samples was then inoculated in 10 mL of Rappaport-Vassiliadis (RV) broth (Fluka), while in parallel 1 mL of the pre-enriched sample was inoculated in 10 mL Muller-Kauffmann (MK) broth (Fluka). Afterwards, these two different broths were incubated at 41.5 ± 1°C and 37°C, respectively for 24 ± 3h. After incubation, 10 µL of culture from each enrichment broth were streaked on Hektoen enteric agar (HE) plates (Fluka).

Presumptive *Salmonella* isolates were screened biochemically on triple sugar iron (TSI) and identified with an API 20E system (Bio-Merieux, Marcy L'Etoile, France).

### **2.2.2. Isolation and identification of 3GC-resistant Gram-negative bacteria**

In parallel to *Salmonella* detection, 10 µL of the overnight culture in BPW (see above)

was streaked onto MacConkey's agar (MAC) plates (Fluka) supplemented with 8 mg/L of ceftazidime and incubated for 18-24 hours at 37°C for isolation of 3GC-resistant Gram-negative bacteria. Vancomycin was added to the medium (8 mg/L) to ensure inhibition of the growth of Gram-positive bacteria. One colony per each morphology and color observed on the agar plate after incubation was preserved. Each preserved isolate, *Enterobacteriaceae* or not, was identified by MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry) using a Microflex LT® and Biotype 3.0 software (Bruker Daltonik, GmbH, Germany). Analyses were performed on bacterial cells grown for 21± 3h on plate count agar (PCA) at 36±2°C. Direct spotting of bacteria cells and full protein extraction using absolute ethanol, formic acid and acetonitrile were performed following the manufacturer's recommendations with the aim of obtaining a correct identification score. After drying each spot at room temperature, 1 µL matrix 1 HCCA ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile/2.5% trifluoroacetic acid) was added before analysis. A bacterial test standard (BTS, Bruker Daltonik, Germany) was also included bacterial sample lots to assess the efficiency of the process. The identification criteria used were those recommended by the manufacturer. Log scores  $\geq 2$  were considered reliable for species identifications, log scores  $\geq 1.7$  and  $< 2.0$  were defined as reliable for genus identification, and log scores  $< 1.7$  as non-reliable identification.

### 2.3. Antimicrobial susceptibility testing

Antibiotic susceptibility was tested by the disk diffusion method according to the CLSI protocol (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012) on Mueller-Hinton agar (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette France). *E. coli* ATCC 25922 was used as a control strain and antimicrobials tested on all isolates were (abbreviations and amounts in parentheses): amoxicillin/clavulanic acid (AMC; 30 µg), ampicillin (AMP; 10 µg), cefalothin (CEF; 30 µg), cefuroxime (CXM; 30 µg), cefamandole (FAM; 30 µg), ceftriaxone (CRO; 30 µg), cefotaxime (CTX; 30 µg), ceftazidime (CAZ; 30 µg), ticarcillin (TIC; 75 µg), cefoxitin (FOX; 30 µg), aztreonam (ATM; 30 µg), cefepime (FEP; 30 µg), temocillin (TMC; 30 µg), ertapenem (ETP; 10 µg), imipenem (IMP; 10 µg), chloramphenicol (CHL, 30 µg), trimethoprim (TMP; 5 µg), sulfonamides (SSS; 300 µg), cotrimoxazole (SXT; 1.25+23.75 µg), streptomycin (STR, 10 U), gentamicin (GEN; 10 µg), kanamycin (KAN; 30 UI), tetracycline (TET; 30 UI), tigecycline (TGC; 15 µg), nalidixic acid (NAL; 30 µg), ciprofloxacin (CIP; 5 µg), pefloxacin (PEF, 5 µg), cefotaxime+clavulanic acid (CTC; 30+10 µg), ceftazidime+clavulanic acid (CZC; 30+10 µg) (Bio-Rad). Colistin disk (CST; 10 µg) was used on each plate on quality

management purposes to ensure the absence of contamination and assess the bacterial identification (Bio-Rad).

Isolates were classified as susceptible, intermediate or resistant according to the clinical interpretative criteria recommended by the CLSI (CLSI, 2013). Multi-drug resistance (MDR) was considered when the isolates were resistant to three or more antibiotic classes (Magiorakos et al. 2012). The detection of ESBL phenotype was performed by either the double disk synergy test (EUCAST, 2013) or combinaison disk test with cefotaxime and ceftazidime (CLSI, 2013, EUCAST, 2013). AmpC phenotype, due to production of an acquired cephalosporinase, was considered present in isolates resistant to ceftazidime and ceftazidime (EUCAST, 2013). Finally, to be able to detect an ESBL phenotype in presence of a cephalosporinase, combinaison disk test with cefepime were performed and inhibition diameters were compared. For combinaison disk tests, a 5 mm difference at least was considered as positive for ESBL presence (EUCAST, 2013).

#### **2.4. Detection of carbapenemases**

To rapidly identify carbapenemase producers in *Enterobacteriaceae*, the Carba NP test and a CIM test (carbapenem inactivation method) were performed according to the methods described by Nordmann et al. (2012) and Van der Zwaluw et al. (2015), respectively.

#### **2.5. Statistical methods**

Factors associated with contamination of fruits and vegetables by 3GC-resistant Gram negative bacteria were analysed using the Chi2 test, according to the place of isolation (farms versus markets), consumption modes (raw vs cooked vs raw/cooked), distance to the soil (above vs on vs in the soil) and the season (autumn vs winter vs spring vs summer). Statistical analyses were performed with MS Excel. The Bonferroni correction has also been applied on the set of data: this correction is based on rejecting the null hypothesis if the likelihood of the observed data under the null hypotheses is low. If multiple comparisons are done or multiple hypotheses are tested, the chance of a rare event increases, and therefore, the likelihood of incorrectly rejecting a null hypothesis increases. The Bonferroni correction compensates for that increase by testing each individual hypothesis at a significance level of  $\alpha / m$ . where  $\alpha$  is the desired overall alpha level and  $m$  is the number of hypotheses.

### 3. Results

#### 3.1. Microbiological evaluation of fruits, vegetables, soil and water samples

In total, 108 different 3GC-resistant Gram-negative bacteria were isolated from all samples (97 isolates from fruits and vegetables and 11 from soil and water); while no *Salmonella* was recovered from any of the samples. A large number of fruits and vegetables, 84 out of 491 (17%) (Table 1), were found positive for the occurrence of Gram-negative bacteria resistant to 3GC and other antibiotic classes. In total, 97 different 3GC-resistant Gram-negative bacteria were isolated from 84 positive samples. The contamination frequency of each category of fruits and vegetables varied greatly among selected farms and markets.

In the farms, nearly 10% (18/181) of sampled fruits and vegetables were contaminated with Gram-negative bacteria resistant to 3GC; among them, only 4% (7/165) of the samples collected on the four large commercial farms were found to be positive, while 69% (11/16) of the samples collected from the three small familial farms were contaminated. At the markets, an overall higher and significantly different contamination frequency was found, with 21% (66/310) of the samples found to be positive (Table 1).

The soil and irrigation water contamination frequency (agricultural environment) on farms was also 5% (5/90) and 9% (4/45) respectively.

Fruits and vegetables were found contaminated by a variety of bacteria (Tables 2 and 3).

The 108 different bacterial isolates from this study were identified by MALDI-TOF-MS. MALDI-TOF allowed the identification of species for 95 strains, and identification of the genus for 13 other strains with an orientation towards the most likely species.

In the farms, a total number of 19 different bacterial strains were isolated from the 18 positive samples of fruits and vegetables: 16 of them were identified as non-fermenting bacteria, whereas only 3 (3/19) were identified as *Enterobacteriaceae* (Table 2). By contrast, a total number of 78 different bacterial strains were isolated from the 66 positive samples of fruits and vegetables collected at the markets: we found as many samples contaminated with non-fermenting bacteria (37/78) as with *Enterobacteriaceae* (41/78) (Table 3).

Only eleven 3GC-resistant bacteria were isolated from samples of soil and water (Table 4). All of them are non-fermenting bacteria.

In summary, a total of 44 *Enterobacteriaceae* isolates resistant to expanded-spectrum cephalosporins (3GC) were isolated from 491 fruit and vegetable samples (Tables 2 and 3), including 21 *Enterobacter cloacae*, 13 *Klebsiella pneumoniae*, 3 *Citrobacter freundii*, 3 *Citrobacter murlinae*, 1 *E. asburiae*, 1 *E. aerogenes* and 2 *Kluyvera ascorbata*. Among these

isolates, only three were collected in the farms: 2 *C. murlinae* isolates (tomato and cucumber) and 1 *E. cloacae* isolate (tomato). All of them were recovered on the same farm (farm no.4) (Table 2). At markets, places of origin of fruits and vegetables contaminated by 3GC-resistant *Enterobacteriaceae* were multiple (Table 3).

Frequency of contamination and species distribution did not differ according to the type of fruits or vegetables. This contamination frequency was different regarding the way the vegetable is to be eaten, i.e. raw or cooked (Table 5). In this case, the contamination of fruits and vegetables usually eaten raw or cooked was significantly different: contamination of vegetables usually eaten cooked was 39%, nevertheless, the contamination of fruits and vegetables usually eaten raw is not negligible, 17%. The fact that fruits or vegetables are in close contact with the soil or not (Table 6) appears to be a determining factor, with fruits and vegetables grown on or in the soil being more contaminated. When considering the season (Table 7), fruits and vegetables grown in autumn and winter were more contaminated.

### 3.2. Antimicrobial susceptibility

A total of 97 suspected 3GC-resistant Gram-negative bacteria isolate from 84 positive fruit and vegetable samples and the 11 non-fermenting bacteria isolates from soil and irrigation water were analyzed using disc diffusion. All isolates were confirmed to be resistant to cefotaxime and ceftazidime.

Resistance profiles were diverse: non-fermenting bacterial strains were resistant to 3<sup>rd</sup> generation cephalosporins, but with roughly a wild-type profile, while *Enterobacteriaceae* exhibited profiles pointing to acquired resistance to 3<sup>rd</sup> generation cephalosporins and other antimicrobial classes.

Regarding other beta-lactams, all *Enterobacteriaceae* isolates were resistant to different generations of cephalosporins, including 1<sup>st</sup> generation cephalosporins (CEF), 2<sup>nd</sup> Generation cephalosporins (CXM, FAM, except FOX (73%)), and 3<sup>rd</sup> generation cephalosporins (CTX, CAZ, CRO); 27% of them were resistant to 4<sup>th</sup> generation cephalosporins (FEP), all of them were resistant to ampicillin and ticarcillin (AMP, TIC), 95% were resistant to AMC, and 78% to monobactam (ATM) (Table 8).

All tested *Enterobacteriaceae* isolates were susceptible to imipenem by disc diffusion. However, *Enterobacter cloacae*, *E. asburiae* and *E. aerogenes* showed decreased susceptibility to ertapenem ( $\leq 23$  mm). Nonetheless, these isolates tested negative for carbapenemase production by both Carba NP test and CIM test.

Resistance to non-beta-lactams antibiotics was also encountered: resistance was

observed to sulphonamides (29% SXT, 31% TMP and 20% SSS), aminoglycosides (20% GEN, 27% KAN, and 16% STR), tetracyclines (11% TET, 7% TGC), fluoroquinolones (18% CIP, 36% PEF, and 11% NAL) and phenicols (7% CHL) (Table 8).

The proportion of isolates belonging to the different species identified in this study and that are resistant to studied antimicrobial agents are shown in Table 8. ESBL producing bacteria were *Klebsiella pneumoniae* strains (n=11) , while AmpC producers belonged to various bacterial species (2 *Klebsiella pneumoniae*, 3 *Citrobacter murliniae* and 3 *Citrobacter freundii*).

#### 4. Discussion

Our results document the presence of ESBL-producing and AmpC harboring *Enterobacteriaceae* in retail raw fruits and vegetables that were isolated in Algeria, which implies that vegetables may be a source of resistance genes for human microflora. These results are in accordance with other studies identifying vegetables as a possible route for the dissemination of resistance genes in the community (Mesa et al., 2006, Reuland et al., 2014, Ben Said et al., 2015, Zurfluh et al., 2015). Bacteria that were found in this study are not specifically related to fruits and vegetables; they are also frequently isolated from animals or humans. Indeed, *Enterobacteriaceae* such as *E. cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* and *Citrobacter* are ubiquitous bacteria that are frequently recovered in the intestines of animals and humans. It is likely that the plants were contaminated indirectly by faecal bacteria from animals during the fertilization process or through direct contact with humans during harvesting, handling and packaging of products due to insufficient hygiene measures (Lynch et al., 2009).

It is interesting to note that no contamination by 3<sup>rd</sup> generation cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* was detected in the agricultural environment (water and soil), unlike Ben Said's study (Ben Said et al., 2015), they detected ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in the soil, water, as well as on fruits and vegetables. This may be due to the fact that the farms where these bacteria were isolated from use treated wastewater, unlike the farms in our study that use drinking water from wells.

Pignato and al. have reported the potential transfer of antibiotic-resistant bacteria through treated-wastewater (TWW) use in agriculture (Pignato et al., 2009). By contrast, Negreanu et al. did not found so clear relationship and concluded that the impact of TWW-associated bacteria on the soil microbiome is on the whole negligible (Negreanu et al., 2012). In addition, Bartz et al found that concentration of coliforms in fruits and vegetables matched

the contamination of workers' hands rather than water contamination, suggesting that irrigation water is the less relevant sample for detecting the source of contamination of fruits and vegetables (Bartz, et al 2017).

The comparison between the results obtained on fruit and vegetable samples from farms with those from markets might confirm the hypothesis of contamination of fruits and vegetables by humans. In fact, contamination of different fruits and vegetables on different successive vendors' stalls by the same bacterial species was documented. For instance, numerous samples at Ihadaden market were harboring *Enterobacter cloacae* (Table S4) with the same resistance profile (Table 8).

The comparison between strains isolated from irrigation water and soil with those found on fruits and vegetables leads to conclude that in our study contamination of fruits and vegetables by *Enterobacteriaceae* does not seem to be mainly linked to the agricultural environment. Schwaiger et al. (2011) did not reach the same results and conclusions; they found that contamination of fruits and vegetables is higher at the farm level. They explain this result by the fact that resistance is at the expense of bacterial viability, since vegetables purchased directly at the farm are probably fresher than at the supermarket, and they have not been exposed to stress factors (Schwaiger et al., 2011). This might also be due to different hygiene procedures applied between harvest and sale that are not documented. In addition, we can probably also explain these divergent results by different procedures concerning hygiene either during cultivation or from harvest to the consumer's plate between Algeria and Germany.

The contamination frequency of fruits and vegetables depends on several parameters: type of fruit and/or vegetable, contact with the soil, and season. Here, fruits and vegetables are contaminated with different bacterial species. Fruits and vegetables cultivated and harvested on the surface or in the soil are more commonly contaminated (30% and 45% respectively), probably due to contact with soil, manure, irrigation water, waste, and animal excrement. This is consistent with findings reported by Ruimy et al. (Ruimy et al., 2010). The variation in fruit and vegetable contamination depending on the season was clearly established. Surprisingly, despite climatic favorable factors in summer and spring contamination was found much higher in winter and autumn (30% and 29%, respectively), than in summer and spring (9% and 8%): the low frequency of contamination of fruits and vegetables in spring could be explained by the fact that fruits and vegetables were harvested in Bejaia and were therefore probably handled to a lesser extent by fewer operators.

This study focused on the detection of 3GC-resistant Gram-negative bacteria from fruits and vegetables, and in addition to 3GC resistance, the isolates showed resistance to between 4 to 10 antimicrobial families used in humans. The detection of human and animal faecal bacterial species with resistance profiles similar to those encountered among hospital isolates is of concern. The abundance of *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* and *Citrobacter* resistant to all  $\beta$ -lactams and other families suggests that fruits and vegetables may constitute a real threat to public health because of the transmissible character of this resistance (Thanner et al., 2016). Even though Ruimy et al. (Ruimy et al., 2010) did not reach the same conclusion, others (Blaak et al., 2014; Reuland et al., 2014; van Hoek et al., 2015; Veldman et al., 2014) tend to find, like here, various multidrug resistant bacteria in fruits and vegetables. *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Ochrobactrum* and *Kluyvera* were frequently encountered. Nevertheless, they are considered to be mostly opportunistic pathogens, associated with patients in poor health conditions, who are frequently immunocompromised.

Many bacteria survive the ingestion process and may contribute to the spread of antimicrobial resistance genes through intestinal tract flora (Schwaiger et al., 2011). The ingestion of bacteria resistant to 3<sup>rd</sup> generation cephalosporins and their hosting in the intestines can cause the spread of ESBLs and AmpC genes to commensal intestinal flora. Exchanges of these genes between commensal and pathogenic bacteria in the intestinal tract can cause infections that are difficult to treat.

Several studies have shown that consumption of fruits and vegetables can constitute a serious risk for health (Ben Said et al., 2015; Blaak et al., 2014; Campos et al., 2013; Veldman et al., 2014; Viswanthan and Randhir Kaur, 2001; Warning et al., 2013; Zurfluh et al., 2015). Washing vegetables before eating them raw might reduce not only the risk of infection by pathogenic bacteria, but also the risk of ingesting, hosting and spreading antibiotic-resistant bacteria (Schwaiger et al., 2011).

## 5. Conclusion

In conclusion, poorly washed or insufficiently cooked fruits and vegetables may constitute a public health hazard as they are associated with Gram-negative bacteria resistant to various antibiotics used to treat critical human infections. Fruits and vegetables grown on and in the soil are the most highly contaminated. Contamination frequency of samples from farms is significantly lower than that of samples from markets. This enhanced contamination at the market might reflect poor practices during harvesting and handling of fruits and

vegetables.

These results should be communicated to the general public and to fruit and vegetable professionals. First, in order to appreciate the need for good domestic hygiene practices, the consumer has to be aware of the health hazards related to consuming fruits and vegetables that are not properly washed. Second, in order to enroll professionals in actions, close observation and evidence of at-risk practices from harvest to retail are needed.

### **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.

### **Author contribution**

FMZ, SAG, AT and YM: designed the study. FMZ: proceeded to sample collection, preparation and bacterial isolation. FMZ, SAG, MM, LY and BG: performed laboratory experiments. FMZ, SAG, CM, AT, and YM: participated to the analyses and discussion of the results.

### **Funding**

This work was financially supported by “Soutien de Programme – Direction Générale de l’Enseignement et de la Recherche” from the French Ministry for Agriculture and by “Programme National Exceptionnel (P.N.E) scholarship” from the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research.

### **Acknowledgements**

Authors are especially grateful to Loic Desquilbet for his assistance in the statistical analysis of the datasets. Authors also would like to acknowledge the master trainees: Kandi Malika, Hammiche Bania, Bendaoud Fazia, Metrouh Amal and Boukhedami Safia for their kind help in sampling collection.

## References

Abadias M., Usall J., Anguera M., Solsana C., and Vinas I. (2008). Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *Int. J. Food Microbiol.* 123(1-2):121-9. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.013.

AIT Austrian Institute of Technology GmbH. (2013). Food of plant origin: production methods and microbiological hazards linked to food-borne disease. Reference: CFT/EFSA/BIOHAZ/2012/01 Lot 1 (Food of plant origin with high water content such as fruits, vegetables, juices and herbs). Supporting Publications 2013; 10(4): EN-402. [253 pp.]. DOI:10.2903/sp.efsa.2013.EN-402.

Bartza FE., Licknessa JS., Herediab N., Fabiszewski de Aceitunoa A., Newmanc KL., Hodgea DW., Jaykud L-A., Gaciab S. and Leona JS. (2017). Contamination of Fresh Produce by Microbial Indicators on Farms and in Packing Facilities: Elucidation of Environmental Routes. *Appl. Environ. Microbiol.* 83:e02984-16. DOI:10.1128/AEM.02984-16.

Ben Said L., Jouini A., Klibi N., Dziri R., Alonso CA., Boudabous A., Ben Slama K., and Torres C. (2015). Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia. *Int. J. Food Microbiol.* 203:86-92. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.023.

Blaak H., van Hoek AHAM., Veenman C., van Leeuwen AED., Lynch G., van Overbeek WM. and de Roda Husman AM. (2014). Extended spectrum  $\beta$ -lactamase- and constitutively AmpC-producing *Enterobacteriaceae* on fresh produce and in the agricultural environment. *Int. J. Food Microbiol.* 168-169:8-16. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.006.

Callejón RM., Rodríguez-Naranjo M., Ubeda C., Hornedo-Ortega R., Garcia-Parrilla MC., and Troncoso AM. (2015). Reported foodborne outbreaks due to produce in the United States and European Union: trends and causes. *Foodborne Pathog. Dis.* 12(1): 32-38. DOI:10.1089/fpd.2014.1821.

Campos J., Mourao J., Pestana N., Peixe L., Novais C. and Antunes P. (2013). Microbiological quality of ready-to-eat salads: An underestimated vehicle of bacteria and clinically relevant antibiotic resistance genes. *Int. J. Food Microbiol.* 166(3):464-70. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.005.

CLSI (2012). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 11<sup>th</sup> Edn CLSI Supplement M02*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

CLSI (2013). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 23<sup>th</sup> Edn CLSI Supplement M100S*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Durso LM. and Cook KL. (2014). Impacts of antibiotic use in agriculture: what are the benefits and risks? *Curr. Opin. Microbiol.* 19:37-44. DOI: 10.1016/j.mib.2014.05.019.

EUCAST(2013). EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 1.0. Available online: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Resistance\\_mechanisms/EUCAST\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_v1.0\\_20131211.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf)

ISO 6579, 2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the detection of *Salmonella spp.* ISO 19250, 2010. Water quality-Detection of *Salmonella spp.*

Lynch MF., Tauxe RV. and Hedberg CW. (2009). The growing burden of food-borne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. *Epidemiol. Infect.* 137(3):307-15. DOI: 10.1017/S0950268808001969.

Magiorakos AP., Srinivasan A., Carey RB., Carmeli Y., Falagas ME., Giske CG., Harbarth S., Hindler JF., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson DL., Rice L B., Stelling J., Struelens MJ., Vatopoulos A., Weber JT. and Monnet DL. (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):268-81. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.

Mesa RJ., Blanc V., Blanch AR., Cortés P., González JJ., Lavilla S., Miró E., Muniesa M., Saco M., Tórtola MT., Mirelis B., Coll P., Llagostera M., Prats G. and Navarro F. (2006). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J. Antimicrob. Chemother* 58(1):211–5. DOI: 10.1093/jac/dkl211.

Negreanu Y., Pasternak Z., Jurkevitch E., and Cytryn E. (2012). Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in agricultural soils. *Environ Sci Technol.* 1;46(9):4800-8. DOI: 10.1021/es204665b.

Nordmann P., Poirel L., and Dortet L. (2012). Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg. Infect. Dis.* 18(9):1503-1507. DOI: 10.3201/eid1809.120355.

Olaimat AO., and Holley RA. (2012). Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. *Food Microbiol.* 32(1):1-19. DOI: 10.1016/j.fm.2012.04.016.

Pignato S., Coniglio MA., Faro G., Weill FX., and Giammanco G. (2009). Plasmid-mediated multiple antibiotic resistance of *Escherichia coli* in crude and treated wastewater used in agriculture. *J Water Health.* 7(2):251-8. DOI: 10.2166/wh.2009.019.

Reuland EA., al Naiemi N., Raadsen SA., Savelkoul PHM., Kluytmans JAJW. and Vandenbroucke-Grauls CMJE. (2014). Prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in raw vegetables. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*; 33(10):1843-6. DOI: 10.1007/s10096-014-2142-7.

Ruimy R., Brisabois A., Bernede C., Skurnik D., Barnat S., Arlet G., Momcilovic S., ElbazS., Moury F., Vibet MA., Courvalin P., Guillemot D., and Andremont A. (2010). Organic and conventional fruits and vegetables contain equivalent counts of Gram-negative bacteria expressing resistance to antibacterial agents. *Environ. Microbiol.* 12(3):608-15. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.02100.x.

Schwaiger K., Helmke K., Hölzel CS. and Bauer J. (2011). Antibiotic resistance in bacteria isolated from vegetables with regards to the marketing stage (farm vs. supermarket). *Int. J. Food Microbiol.* 148(3):191-6. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.06.001.

Seo S. and Matthews KR. (2014). Exposure of *Escherichia coli* O157:H7 to soil, manure, or water influences its survival on plants and initiation of plant defense response. *Food Microbiol.* 38:87-92. DOI: 10.1016/j.fm.2013.08.015.

Thanner S., Drissner D., and Walsh F. (2016). Antimicrobial resistance in agriculture. *mBio* 7(2):e02227-15. DOI:10.1128/mBio.02227-15.

Van Hoek AH, Veenman C., van Overbeek WM., Lynch G., de Roda Husman AM. and Blaak H. (2015). Prevalence and characterization of ESBL- and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* on retail vegetables. *Int. J. Food Microbiol.* 204:1-8. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.014.

Van der Zwaluw K., de Haan A., Pluister GN., Bootsma HJ., de Neeling AJ. and Schouls LM. (2015). The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PLoS One*. DOI: 10.1371/journal.pone.0123690.

Veldman K., Kant A., Dierikx C., van Essen-Zandbergen A., Wit B. and Mevius D. (2014). *Enterobacteriaceae* resistant to third-generation cephalosporins and quinolones in fresh culinary herbs imported from Southeast Asia. *Int.J. Food Microbiol.* 177:72-7. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.014.

Viswanathan P. and Kaur R. (2001). Prevalence and growth of pathogens on salad, vegetables, fruits and sprouts. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 203(3): 205-13. DOI:10.1078/S1438-4639(04)70030-9.

Warning A. and Datta AK. (2013). Interdisciplinary engineering approaches to study how pathogenic bacteria interact with fresh produce. *J.Food Eng.* 114(4):426-448. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2012.09.004.

Zurfluh, K., Nüesch-Inderbinen, M., Morach, M., Zihler Berner, A., Hächler, H., Stephan, R. (2015). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing-*Enterobacteriaceae* in vegetables imported from the Dominican Republic, India, Thailand and Vietnam. *Appl. Environ. Microbiol.* 81(9):3115–3120. DOI:10.1128/AEM.00258-15.

**Table 1. Contamination frequency of fruits and vegetables by 3GC-resistant Gram-negative bacteria**

Farms/Markets	number plant samples	number of contaminated samples	Frequency of contamination	95% CI
Farm no.1	35	2	6%	
Farm no.2	41	2	5%	
Farm no.3	35	0	0%	
Farm no.4	54	3	6%	
<b>Total Large farms</b>	<b>165</b>	<b>7</b>	<b>4%</b>	
Farm no.5	6	4	67%	
Farm no.6	5	3	60%	
Farm no.7	5	4	80%	
<b>Total Family farms</b>	<b>16</b>	<b>11</b>	<b>69%</b>	
<b>Total on farms</b>	<b>181</b>	<b>18</b>	<b>10%</b>	<b>[5.36%-14.37%]<sup>#</sup></b>
Market Bejaia ville	24	3	13%	
Market Idimco-Bejaia	148	24	16%	
Market Ihadaden-Bejaia	78	23	29%	
Market Lekhmis-Bejaia	48	8	17%	
Market Royal	12	8	67%	
<b>Total on markets</b>	<b>310</b>	<b>66</b>	<b>21%</b>	<b>[16.47%-25.53%]<sup>\$</sup></b>
<b>Grand total</b>	<b>491</b>	<b>84</b>	<b>17%</b>	<b>[13.68%-20.32%]</b>

<sup>#,\$</sup> Values followed by different signs were found significantly different by Chi<sup>2</sup> test (Table S3).

**Table 2. Description of samples positive for 3GC-resistant Gram-negative bacteria in the Bejaia farms**

Farms	Contaminated plants	<i>Enterobacteriaceae</i>	non-fermenting Gram-negative bacteria
Farm no.1	Tomato (2)* (fruit)		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Ochrobactrum intermedium</i>
Farm no.2	Zucchini (2)* (fruit)		<i>Acinetobacter spp.</i> , <i>Pseudomonas spp.</i>
Farm no.4	Cucumber (fruit) Tomato (2)* (fruit)	<i>Citrobacter murlinae</i> <i>Citrobacter murlinae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i>	
Farm no.5	Lettuce (leaf) Mint (leaf) Onion (blub) Walnuts (fruit)		<i>Acinetobacter spp.</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas monteilii</i> <i>Pseudomonas putida</i>
Farm no.6	Garlic (corm) Chard (leaf) Parsley (leaf)		<i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas putida</i>
Farm no.7	Garlic (corm) Onion (blub) Parsley (leaf) Chard (root)		<i>Pseudomonas putida</i> group <i>Acinetobacter pittii</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Pseudomonas monteilii</i>

**Table 3. Description of samples positive for 3GC-resistant Gram-negative bacteria at Bejaia markets**

Market	Wilaya of origin	Contaminated fruit/vegetable	<i>Enterobacteriaceae</i>	non-fermenting Gram-negative bacteria
Market Bejaia ville	Bejaia	Watermelon (3)* (fruit)	<i>Enterobacter cloacae, Enterobacter asburiae</i>	<i>Comamonas aquatica</i>
Market Lekhmis	Algiers	Turnip (root)		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
		Fennel (blub and leaf)		<i>Acinetobacter pittii</i>
		Carrot (root)		
	Biskra	Celery (leaf)		<i>Acinetobacter pittii</i>
		Mint (2)* (leaf)		
Oued Souf Sahara	Tomato (fruit)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Acinetobacter pittii</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	
Market Royal	Bejaia	Pepper (fruit)		<i>Acinetobacter pittii</i>
		Cucumber (fruit)		<i>Acinetobacter pittii</i>
		Carrot (root)		<i>Acinetobacter pittii</i>
	Algiers	Beet (root)		<i>Acinetobacter spp.</i>
	Biskra	Lettuce (leaf)		<i>Acinetobacter pittii</i>
		Parsley (leaf)	<i>Klebsiella pneumoniae, Enterobacter cloacae, Citrobacter freundii</i>	<i>Acinetobacter pittii</i>
		Tomato (fruit)		<i>Acinetobacter pittii</i>
	Celery (leaf)		<i>Acinetobacter pittii</i>	
Market Idimco	Sétif	Parsley (3)* (leaf)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia, Stenotrophomonas maltophilia</i>
		Mint (2)* (leaf)		

Market	Wilaya of origin	Contaminated fruit/vegetable	<i>Enterobacteriaceae</i>	non-fermenting Gram-negative bacteria
		Celery (2)* (leaf)	<i>Klebsiella pneumoniae, Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia, Ochrobactrum intermedium</i>
		Lettuce (4)* (leaf)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia, Ochrobactrum intermedium, Ochrobactrum intermedium</i>
	Jijel	Tomato (2)* (fruit)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Ochrobactrum intermedium</i>
	Biskra	Tomato (fruit)		
		Pepper (fruit)	<i>Citrobacter murlinae, Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Ochrobactrum intermedium</i>
	Blida	Chili (fruit)		<i>Stenotrophomonas spp.</i>
	Tipaza	Peach (fruit)		<i>Acinetobacter spp.</i>
		Tomato (2)* (fruit)		
	Sahara	Lettuce (leaf)	<i>Enterobacter cloacae</i>	
	Ain Dafla	Fennel (blub and leaf)	<i>Klebsiella pneumoniae, Citrobacter freundii</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia, Acinetobacter pittii</i>
		Carrot (root)		<i>Acinetobacter spp.</i>
	Alger	Beet (root)	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Stenotrophomonas spp.</i>
	Skikda	Tomato (fruit)		<i>Ochrobactrum intermedium</i>
Market Ihadaden	Tipaza	Tomato (fruit)	<i>Enterobacter cloacae</i>	
	Oued Souf	Pepper (fruit)	<i>Enterobacter cloacae, Kluyvera ascorbata</i>	<i>Ochrobactrum intermedium</i>
	Blida	Nectarine (fruit)	<i>Enterobacter cloacae</i>	

Market	Wilaya of origin	Contaminated fruit/vegetable	<i>Enterobacteriaceae</i>	non-fermenting Gram-negative bacteria
	Tiaret	Carrot (root)	<i>Enterobacter cloacae, Klebsiella</i>	
	Bejaia	Pear (fruit)	<i>pneumoniae</i>	
		Carrot (2)* (root)	<i>Enterobacter cloacae</i>	
		Grape (fruit)	<i>Enterobacter cloaca, Kluyvera ascorbata</i>	<i>Ochrobactrum intermedium</i>
	Sétif	Beet (2)* (root)	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Ochrobactrum intermedium</i>
		Lettuce (5)* (leaf)	<i>Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Ochrobactrum intermedium, Stenotrophomonas maltophilia</i>
	Algiers	Chili (fruit)	<i>pneumoniae</i>	<i>Ochrobactrum intermedium</i>
		Chili (fruit)	<i>Enterobacter cloacae, Klebsiella</i>	<i>Ochrobactrum intermedium</i>
		Cucumber (fruit)	<i>pneumoniae</i>	
		Apple (fruit)	<i>Enterobacter cloacae</i>	
		Peach (2)* (fruit)	<i>Enterobacter cloacae</i>	
		Pear (fruit)	<i>Enterobacter cloacae</i>	
			<i>Enterobacter cloacae</i>	
			<i>Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae</i>	
		<i>Enterobacter cloacae</i>		

\* When indicated, number in parentheses shows number of samples contaminated by one bacterial strain.

**Table 4. Soil and irrigation water samples contaminated with 3GC- resistant Gram-negative bacteria in Bejaia farms.**

Farms	Samples	Number of samples	Number of positive samples	Gram- negative bacteria
Farm no. 1	Soil	18	0	
	Irrigation water	9	1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Farm no. 2	Soil	21	1	<i>Pseudomonas spp.</i>
	Irrigation water	9	1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Farm no. 3	Soil	18	0	
	Irrigation water	9	1	<i>Acinetobacter pittii</i>
Farm no. 4	Soil	24	0	
	Irrigation water	9	1	<i>Acinetobacter pittii</i>
Farm no. 5	Soil	3	2	<i>Pseudomonas monteilii, Pseudomonas spp.</i>
	Irrigation water	3	0	
Farm no. 6	Soil	3	1	<i>Pseudomonas putida, Pseudomonas spp., Comamonas aquatica</i>
	Irrigation water	3	0	
Farm no. 7	Soil	3	1	<i>Pseudomonas putida_Group</i>
	Irrigation water	3	0	

**Table 5. Frequency of fruits and vegetables contaminated with 3GC-resistant Gram-negative bacteria according to usual consumption mode.**

Usual consumption mode	Number of samples	Number of positive samples	Frequency of contamination	95% CI
Raw <sup>a</sup>	158	27	17%	[11.14%-22.86%] <sup>\$</sup>
Cooked <sup>b</sup>	28	11	39%	[21.1%-57.7%] <sup>#</sup>
Raw/Cooked <sup>c</sup>	305	46	15%	[10.99%-19.01%] <sup>\$</sup>

<sup>a</sup> Fruits or vegetables considered usually eaten raw: cucumber, date, prickly pear, lettuce, nectarine, walnut, watermelon, peach, pear, apple, grape.

<sup>b</sup> Fruits or vegetables considered usually eaten cooked: beet, chard, courgette, fennel, turnip.

<sup>c</sup> Fruits or vegetables indifferently eaten raw or cooked: garlic, carrot, celery, mint, onion, parsley, chili, pepper, tomato.

<sup>#,\$</sup> Values followed by different signs were found significantly different by Chi<sup>2</sup> test (Table S3).

**Table 6. Contamination frequency of fruits and vegetables by 3GC-resistant Gram-negative bacteria according to their distance from the soil.**

Contact with soil	Number of samples	Number of positive samples	Frequency of contamination	CI 95%
Above				
• Tree <sup>a</sup>	76	9	12%	[6.50%-21.20%] <sup>#</sup>
• Bush <sup>b</sup>	252	21	8%	[4.65%-11.35%] <sup>#</sup>
at the soil surface <sup>c</sup>	130	39	30%	[22.12%-37.88%] <sup>\$</sup>
In the soil <sup>d</sup>	33	15	45%	[29.40%-61.60%] <sup>\$</sup>

<sup>a</sup> Fruits and vegetables considered harvested on trees: date, prickly pear, nectarine, nut, peach, pear, apple, grape.

<sup>b</sup> Fruits and vegetables considered harvested on bushes: chili, pepper, tomato.

<sup>c</sup> Fruits and vegetables considered harvested on the ground: chard, cucumber, lettuce, watermelon, celery, mint, parsley, courgette, fennel.

<sup>d</sup> Fruits and vegetables considered harvested from the soil: beet, garlic, carrot, onion, turnip.

<sup>#,\$</sup> Values followed by different signs were found significantly different by Chi<sup>2</sup> test (see Table S3).

**Table 7. Contamination frequency of fruits and vegetables by 3GC-resistant Gram-negative bacteria depending on the season.**

Season	Number of samples	Number of positive samples	Frequency of contamination	CI 95%
Autumn	78	23	29.49%	[20.10%-39.90%] <sup>#</sup>
Winter	113	34	30.08%	[21.62%-38.54%] <sup>#</sup>
Spring	52	4	7.69%	[3.00%-18.20%] <sup>\$</sup>
Summer	248	23	9.27%	[5.44%-12.56%] <sup>\$</sup>

<sup>#,\$</sup> Values followed by different signs were found significantly different by Chi2 test (see Table S3).

**Table 8. General characteristics of 3GC-resistant *Enterobacteriaceae* obtained from fruits and vegetables in Bejaia, north-easternAlgeria.**

Isolate name	Bacteria I Species	Fruits/vegetables	Origin	Antimicrobial resistance profile *	ESBL phenotype	AmpC phenotype
A	<i>Citrobacter murlinae</i>	Tomato	Farm no.4	AMP TIC AMC CEF FAM CXM FOX CTXCAZ CRO	No	Yes
E	<i>Citrobacter murlinae</i>	Cucumber	Farm no.4	AMP TIC AMC CEF FAM CXM FOX CTXCAZ CRO	No	Yes
N5	<i>Citrobacter murlinae</i>	Tomato	Market Idimco-Bejaia	AMP TIC AMC CEF FAM CXM FOX CTXCAZ CRO ATM	No	Yes
C5	<i>Citrobacter freundii</i>	Tomato	Market Idimco-Bejaia	AMP TIC AMC CEF FAM CXM FOX CTXCAZ CRO ATM	No	Yes
B9	<i>Citrobacter freundii</i>	Fennel	Market Idimco-Bejaia	AMP TIC AMC CEF FAM CXM FOX CTXCAZ CRO KAN ERT	No	Yes
K10	<i>Citrobacter freundii</i>	Parsley	Market Royal	AMP TIC AMC CEF FAM CXM FOX CTXCAZ CRO ERT	No	Yes
E5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Mint	Market Idimco-Bejaia	AMP TIC AMC CEF FAM CXM CTX CAZCRO FEP ATM GEN KAN PEF CIP SXT TMP	Yes	No
H5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Parsley	Market Idimco-Bejaia	AMP TIC AMC CEF FAM CXM CTX CAZCRO FEP ATM GEN KAN PEF CIP SXT TMP	Yes	No
M5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Mint	Market Idimco-Bejaia	AMP TIC AMC CEF FAM CXM CTX CAZ CRO FEP ATM GEN KAN PEF CIP TMP	Yes	No
L5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Tomato	Market Idimco-Bejaia	AMP TIC CEF FAM CXM CTX CAZ CROFEP ATM GEN PEF	Yes	No

*Résultats : Article 1*

Q5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Lettuce	Market Idimco-Bejaia	AMP TIC AMC CEF FAM CXM CTX CAZCRO FEP ATM GEN KAN PEF CIP SXTTMP	Yes	No
K5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Tomato	Market Idimco-Bejaia	AMP TIC AMC CEF FAM CXM CTX CAZCRO FEP ATM GEN KAN PEF CIP SXT TMP	Yes	No

Résultats : Article 1

	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Beet	Market Ihadaden-Bejaia	AMP TIC CEF FAM CXM CTX CAZ CRO FEP ATM KAN STR TET TGC PEF SXT TMP SSS CHL	Yes	No
2K7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Peach	Market Ihadaden-Bejaia	AMP TIC CEF FAM CXM CTX CAZ CRO ATM STR PEF SXT TMP SSS CHL	Yes	No
2L7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Carrot	Market Ihadaden-Bejaia	AMP TIC AMC CEF FAM CXM CTX CAZ CRO FEP ATM GEN KAN STR PEF NAL CIP SXT TMP SSS	Yes	No
Z7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Lettuce	Market Ihadaden-Bejaia	AMP TIC AMC CEF FAM FOX CXM CTX CAZ KAN PEF CIP SSS	No	Yes
O7VF	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Lettuce	Market Ihadaden-Bejaia	AMP TIC CEF FAM CXM CTX CAZ CRO FEP ATM KAN STR TET TGC PEF SXT TMP SSS CHL	Yes	No
G8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Celery	Market Lekhmis-Bejaia	AMP TIC AMC CEF FAM CXM FOX CTX CAZ CRO ATM STR TET TGC NAL PEF SXT TMP SSS	No	Yes
M10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Parsley	Market Royal	AMP TIC AMC CEF FAM CXM CTX CAZ CRO FEP ATM KAN GEN STR TET SXT TMP SSS	Yes	No
B	<i>Enterobacter cloacae</i>	Tomato	Farm no.4	AMP TIC AMC CEF FAM CXM FOX CTX CAZ CRO ERT PEF	No	Yes
D5	<i>Enterobacter cloacae</i>	Peach	Market Idimco-Bejaia	AMP TIC AMC CEF FAM CXM FOX CTX CAZ CRO ATM ERT	No	Yes
17	<i>Enterobacter asburiae</i>	Watermelon	Market Bejaia ville	AMP TIC AMC CEF FAM CXM FOX CTX CAZ CRO ATM ERT	No	Yes
14	<i>Enterobacter cloacae</i>	Watermelon	Market Bejaia ville	AMP TIC AMC CEF FAM CXM FOX CTX CAZ CRO NAL PEF ERT	No	Yes
A7	<i>Enterobacter cloacae</i>	Cucumber	Market Ihadaden-Bejaia	AMP TIC AMC CEF FAM CXM FOX CTX CAZ CRO ATM ERT	No	Yes

Résultats : Article 1

J7	<i>Enterobacter cloacae</i>	Chili	Market Ihadaden-Bejaia	AMP TIC AMC CEF FAM CXM FOX CTX CAZ CRO ATM ERT	No	Yes
M7	<i>Enterobacter cloacae</i>	Carrot	Market Ihadaden-Bejaia	AMP TIC AMC CEF FAM CXM FOX CTX CAZ CRO ATM ERT SXT TMP SSS	No	Yes
N7	<i>Enterobacter cloacae</i>	Tomato	Market Ihadaden-Bejaia	AMP TIC AMC CEF FAM CXM FOX CTX CAZ CRO ATM ERT	No	Yes
O7VC	<i>Enterobacter cloacae</i>	Lettuce	Market Ihadaden-Bejaia	AMP TIC AMC CEF FAM CXM FOX CTX CAZ CRO ATM ERT	No	Yes
S7	<i>Enterobacter cloacae</i>	Pepper	Market Ihadaden-Bejaia	AMP TIC AMC CEF FAM CXM FOX CTX CAZ CRO ATM ERT	No	Yes
W7	<i>Enterobacter cloacae</i>	Pear	Market Ihadaden-Bejaia	AMP TIC AMC CEF FAM CXM FOX CTX CAZ CRO ATM ERT	No	Yes
Y7	<i>Enterobacter cloacae</i>	Lettuce	Market Ihadaden-Bejaia	AMP TIC AMC CEF FAM CXM FOX CTX CAZ CRO ATM ERT	No	Yes
2B7	<i>Enterobacter cloacae</i>	Lettuce	Market Ihadaden-Bejaia	AMP TIC AMC CEF FAM CXM FOX CTX CAZ CRO NAL	No	Yes
X7	<i>Enterobacter cloacae</i>	Pear	Market Ihadaden-Bejaia	AMP TIC AMC CEF FAM CXM FOX CTX CAZ CRO ATM ERT	No	Yes
2C7	<i>Enterobacter cloacae</i>	Nectarine	Market Ihadaden-Bejaia	AMP TIC AMC CEF FAM CXM FOX CTX CAZ CRO ATM ERT	No	Yes

Résultats : Article 1

2J7	<i>Enterobacter cloacae</i>	Beet	Market Ihadaden-Bejaia	AMP TIC AMC CEF FAM CXM FOX CTX CAZ CRO ATM ERT NAL PEF	No	Yes
2I7	<i>Enterobacter cloacae</i>	Peach	Market Ihadaden-Bejaia	AMP TIC AMC CEF FAM CXM FOX CTX CAZ CRO ATM ERT	No	Yes
2O7	<i>Enterobacter cloacae</i>	Carrot	Market Ihadaden-Bejaia	AMP TIC AMC CEF FAM CXM FOX CTX CAZ CRO ATM ERT	No	Yes
2P7	<i>Enterobacter cloacae</i>	Grape	Market Ihadaden-Bejaia	AMP TIC AMC CEF FAM CXM FOX CTX CAZ CRO ATM ERT	No	Yes
2Q7	<i>Enterobacter cloacae</i>	Chili	Market Ihadaden-Bejaia	AMP TIC AMC CEF FAM CXM FOX CTX CAZ CRO ATM ERT	No	Yes
2R7	<i>Enterobacter cloacae</i>	Apple	Market Ihadaden-Bejaia	AMP TIC AMC CEF FAM CXM FOX CTX CAZ CRO ERT	No	Yes
B8	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Mint	Market Lekhmis-Bejaia	AMP TIC AMC CEF FAM CXM FOX CTX CAZ CRO ATM ERT	No	Yes
L10	<i>Enterobacter cloacae</i>	Parsley	Market Royal	AMP TIC AMC CEF FAM CXM FOX CTX CAZ CRO ATM ERT STR TET SXT TMP SSS	No	Yes

\* AMP: ampicillin, TIC: ticarcillin, AMC: amoxicillin-clavulanic acid, CEF: cephalotin, FAM: cefamandole, CXM: cefuroxime, FOX: cefoxitin, CTX: cefotaxime, CAZ: ceftazidime, CRO: ceftriaxone, FEP: cefepime, ATM: aztreonam, ERT: ertapenem, GEN: gentamicin, KAN: kanamycin, STR: streptomycin, TET: tetracycline, TGC: tigecycline, CIP: ciprofloxacin, PEF: pefloxacin, NAL: nalidixic acid, SXT: trimethoprim-sulfamethoxazole, TMP: trimethoprim, SSS: sulfamide, CHL: chloramphenicol, TEM: temocillin.

***Supplementary  
Material***

**From farms to markets: Gram-negative bacteria resistant to third-generation cephalosporins in fruits and vegetables in a region of North Africa**

**Feriel Mesbah Zekar<sup>1, 2</sup>, Sophie A. Granier<sup>2</sup>, Muriel Marault<sup>2</sup>, Lydia Yaici<sup>1</sup>, Benoit Gassil-loud<sup>3</sup>, Charles Manceau<sup>4</sup>, Abdelaziz Touati<sup>1</sup> and Yves Millemann<sup>\*2, 5</sup>**

**\* Corresponding authors: [yves.millemann@vet-alfort.fr](mailto:yves.millemann@vet-alfort.fr); +33 1 43 96 71 23**

**Supplementary Table 1. Identified contaminations of fruits and vegetables sampled from Bejaia farms.**

Season	Farms	Samples	Number of samples	Number of positive samples	Isolated species	Remarks
Spring (26/05/13)	Farm #1  (large commercial farm)	Water	3	1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Potable(Well)
		Soil	6	0	N/A*	Poultry droppings
		Tomato	10	0	N/A	
	Farm #2  (large commercial farm)	Water	3	1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Potable(Well)
		Soil	3	1	<i>Pseudomonas spp.</i>	Poultry droppings
			3	0	N/A	Chemical fertilizer
			3	0	N/A	Manure
		Tomato	10	0	N/A	
		Zucchini	6	2	<i>Acinetobacter spp., Pseudomonas spp.</i>	

Season	Farms	Samples	Number of samples	Number of positive samples	Isolated species	Remarks
	Farm #3 (large commercial farm)	Water	3	1	<i>Acinetobacter pittii</i>	Potable (Well)
		Soil	6	0	N/A	Chemical fertilizer
		Tomato	10	0	N/A	
	Farm #4 (large commercial farm)	Water	3	1	<i>Acinetobacter pittii</i>	Potable (Well)
		Soil	6	0	N/A	Mulching
		Tomato	10	1	<i>Citrobacter murlinae</i>	
		Cucumber	6	1	<i>Citrobacter murlinae</i>	
Summer (26/06/13)	Farm #1 (large commercial farm)	Water	3	0	N/A	Potable (Well)
		Soil	9	0	N/A	Poultry droppings
		Tomato	18	2	<i>Ochrobactrum intermedium/Stenotrophomonas maltophilia</i>	

Season	Farms	Samples	Number of samples	Number of positive samples	Isolated species	Remarks
	Farm #2 (large commercial farm)	Water	3	0	N/A	Potable (Well)
		Soil	3	0	N/A	Poultry droppings
			3	0	N/A	Chemical fertilizer
			3	0	N/A	Manure
		Tomato	18	0	N/A	
	Farm #3 (large commercial farm)	Water	3	0	N/A	Potable (Well)
		Soil	9	0	N/A	Chemical fertilizer
		Tomato	18	0	N/A	
	Farm #4	Water	3	0	N/A	Potable (Well)

Season	Farms	Samples	Number of samples	Number of positive samples	Isolated species	Remarks
	(large commercial farm)	Soil	9	0	N/A	Mulching
		Tomato	18	1	<i>Enterobacter cloacae</i>	
Summer (18/07/13)	Farm #1  (large commercial farm)	Water	3	0	N/A	Potable (Well)
		Soil	3	0	N/A	Poultry droppings
		Tomato	7	0	N/A	
	Farm #2  (large commercial farm)	Water	3	0	N/A	Potable (Well)
		Soil	3	0	N/A	
		Pepper	7	0	N/A	
	Farm #3	Water	3	0	N/A	Potable (Well)

Season	Farms	Samples	Number of samples	Number of positive samples	Isolated species	Remarks	
	(large commercial farm)	Soil	3	0	N/A		
		Tomato	7	0	N/A		
	Farm #4 (large commercial farm)	Water	3	0	N/A	Potable (Well)	
		Soil	9	0	N/A		
		Pepper	7	0	N/A		
		Chilli	7	0	N/A		
		Cucumber	6	0	N/A		
	Winter (03/03/14)	Farm #5 (small family farm)	Water	1	0	N/A	Potable (Well)
			Soil	3	2	<i>Pseudomonas putida/Pseudomonas monteilii</i>	Manure
Mint			1	1	<i>Pseudomonas putida</i>		
Lettuce			1	1	<i>Acinetobacter spp., Pseudomonas spp.</i>		

Season	Farms	Samples	Number of samples	Number of positive samples	Isolated species	Remarks
		Chard	1	0	N/A	
		Onion	1	1	<i>Pseudomonas monteilii</i>	
		Celery	1	0	N/A	
		Walnuts	1	1	<i>Pseudomonas putida</i>	
	Farm #6 (small family farm)	Water	1	0	N/A	Potable (Well)
		Soil	3	1	<i>Pseudomonas putida/Pseudomonas monteilii/Comamonas aquatica</i>	Manure
		Walnuts	1	0	N/A	
		Onion	1	0	N/A	
		parsley	1	1	<i>Pseudomonas putida</i>	
		Garlic	1	1	<i>Pseudomonas putida</i>	
		Chard	1	1	<i>Pseudomonas putida</i>	

Season	Farms	Samples	Number of samples	Number of positive samples	Isolated species	Remarks
Winter (15/03/14)	Farm #7 (small family farm)	Water	1	0	N/A	Potable (River)
		Soil	3	1	<i>Pseudomonas putida_Group</i>	Manure
		Mint	1	0	N/A	
		Chard	1	1	<i>Pseudomonas monteilii</i>	
		parsley	1	1	<i>Pseudomonas spp.</i>	
		Garlic	1	1	<i>Pseudomonas putida_Group</i>	
		Onion	1	1	<i>Acinetobacter pittii</i>	

\* N/A not applicable

Supplementary Table 2. Identified contaminations of fruits and vegetables sampled from Bejaia markets.

Seasons	Markets	Sellers	Origin	Samples	Number of samples	Number of positive samples	Isolated species
Summer (28/7/13)	Idimco	Seller #1	Skikda	Tomato	6	0	N/A*
		Seller # 2	Tipaza	Tomato	4	1	<i>Citrobacter murlinae</i>
				Pepper	5	0	N/A
		Seller #3	Bejaia	Chili	4	0	N/A
			Sétif	Parsley	3	1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
		Seller #4	Sétif	Mint	4	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
		Seller #5	Skikda	Tomato	6	0	N/A
		Seller #6	Tipaza	Pepper	6	0	N/A
		Seller #7	Tipaza	Peach	6	0	N/A
				Tomato	4	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
		Seller #8	Sétif	Mint	4	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
				Parsley	4	2	<i>Klebsiella pneumoniae/ Stenotrophomonas maltophilia</i>
				Celery	4	2	<i>Stenotrophomonas maltophilia/ Ochrobactrumintermedium</i>

Seasons	Markets	Sellers	Origin	Samples	Number of samples	Number of positive samples	Isolated species
		Seller #9	Skikda	Tomato	6	1	<i>Ochrobactrum intermedium</i>
		Seller #10	Sétif	Lettuce	10	1	<i>Ochrobactrum intermedium</i>
		Seller #11	Blida	Peach	6	1	<i>Enterobacter cloacae</i>
		Seller #12	Spain	Grapes	5	0	N/A
		Seller #13	Jijel	Tomato	4	2	<i>Klebsiella pneumoniae/Citrobacter freundii</i>
		Seller #14	Spain	Grapes	5	0	N/A
		Seller #15	Spain	Grapes	5	0	N/A
		Seller #16	Sétif	Lettuce	10	3	<i>Klebsiella pneumoniae/Ochrobactrum intermedium/Stenotrophomonas maltophilia</i>
Summer (3/8/13)	Centre-ville	Seller #19	Bejaia	Watermelon	24	3	<i>Enterobacter cloacae/Enterobacter asburiae/Comamonasaquatica</i>
Autumn (28/10/13)	Ihadaden	Seller #20	Tipaza	Tomato	3	1	<i>Enterobacter cloacae</i>
		Seller #21	Bejaia	Pepper	3	0	N/A
		Seller #22	Bejaia	Pears	4	1	<i>Enterobacter cloacae</i>
		Seller #23	Bejaia	Carrot	3	2	<i>Enterobacter cloacae/Kluyvera ascorbata</i>

Seasons	Markets	Sellers	Origin	Samples	Number of samples	Number of positive samples	Isolated species
		Seller #24	Oued Souf	Pepper	4	2	<i>Enterobacter cloacae/Ochrobactrum intermedium/Kluyvera ascorbata</i>
		Seller #25	Sétif	Beet	5	2	<i>Klebsiella pneumoniae/Enterobacter cloacae/Ochrobactrum intermedium</i>
		Seller #26	Sétif	Lettuce	4	2	<i>Klebsiella pneumoniae/Stenotrophomonas maltophilia/Enterobacter cloacae/Ochrobactrum intermedium</i>
		Seller #27	Sétif	Lettuce	4	3	<i>Klebsiella pneumoniae/Enterobacter cloacae/Ochrobactrum intermedium/Enterobacter cloacae</i>
		Seller #28	Algiers	Chili	6	1	<i>Enterobacter cloacae</i>
		Seller #29	Algiers	Cucumber	2	1	<i>Enterobacter cloacae</i>
		Seller #30	Sétif	Chili	4	1	<i>Enterobacter cloacae/Ochrobactrum intermedium</i>
		Seller #31	Algiers	Apple	4	1	<i>Enterobacter cloacae</i>
		Seller #32	Algiers	Grapes	6	0	N/A
		Seller #33	Algiers	Peach	3	2	<i>Klebsiella pneumoniae/Enterobacter cloacae</i>
		Seller #34	Blida	Nectarine	3	1	<i>Enterobacter cloacae</i>

Seasons	Markets	Sellers	Origin	Samples	Number of samples	Number of positive samples	Isolated species
		Seller #35	Bejaia	Tomato	4	0	N/A
		Seller #36	Bejaia	prickly-pears	3	0	N/A
		Seller #37	Bejaia	Grapes	4	0	N/A
		Seller #38	Algiers	Pears	3	1	<i>Enterobacter cloacae</i>
		Seller #39	Bejaia	Grapes	5	1	<i>Enterobacter cloacae</i>
		Seller #40	Tiaret	Carrot	1	1	<i>Klebsiella pneumoniae/Enterobacter cloacae</i>
Winter (06/01/14)	Lekhmis	Seller #41	Sahara	Tomato	1	0	N/A
				Pepper	1	0	N/A
		Seller #42	Algiers	Turnip	1	1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
				Beet	1	0	N/A
				Fennel	1	1	<i>Acinetobacter pittii</i>
		Tipaza	Media	Lettuce	1	0	N/A
				Apple	1	0	N/A
				Carrot	1	0	N/A

Seasons	Markets	Sellers	Origin	Samples	Number of samples	Number of positive samples	Isolated species
			Ain Defla	Tomato	1	0	N/A
		Seller #43	Bejaia	Fennel	1	0	N/A
				Carrot	1	0	N/A
				Turnip	1	0	N/A
		Seller #44	Biskra	Date	1	0	N/A
		Seller #45	Sahara	Turnip	1	0	N/A
			Blida	Apple	1	0	N/A
			Bejaia	Lettuce	1	0	N/A
		Seller #46	Biskra	Pepper	1	0	N/A
				Chili	1	0	N/A
				Lettuce	1	0	N/A
				Tomato	1	0	N/A
		Seller #47	Biskra	Celery	1	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
				Mint	1	1	<i>Enterobacter aeruginosa</i>

Seasons	Markets	Sellers	Origin	Samples	Number of samples	Number of positive samples	Isolated species
				Lettuce	1	0	N/A
				Parsley	1	0	N/A
		Seller #48	Sahara	Carrot	1	0	N/A
				Pepper	1	0	N/A
				Chili	1	0	N/A
		Seller #49	Oued souf	Tomato	1	1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
				Pepper	1	0	N/A
		Seller #50	Biskra	Mint	1	1	<i>Acinetobacter pittii</i>
				Parsley	1	0	N/A
		Seller #51	Sahara	Tomato	1	1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
				Chili	1	0	N/A
				Pepper	1	0	N/A
		Seller #52	Sahara	Lettuce	1	0	N/A
		Seller #53	Boumerdes	Fennel	1	0	N/A

Seasons	Markets	Sellers	Origin	Samples	Number of samples	Number of positive samples	Isolated species
				Carrot	1	0	N/A
				Lettuce	1	0	N/A
		Seller #54	Algiers	Apple	1	0	N/A
		Seller #55	Algiers	Carrot	1	1	<i>Acinetobacter pittii</i>
				Lettuce	1	0	N/A
				Fennel	1	0	N/A
		Seller #56	Biskra	Chili	2	0	N/A
		Seller #57	Bejaia	Date	1	0	N/A
		Seller #58	Bejaia	Parsley	1	0	N/A
		Seller #59	Bejaia	Apple	1	0	N/A
		Seller #60	Sétif	Beet	1	0	N/A
Winter (03/02/14)	Idimco	Seller #1	Sahara	Chili	1	0	N/A
				Tomato	1	0	N/A
		Seller #2	Bejaia	Carrot	1	0	N/A

Seasons	Markets	Sellers	Origin	Samples	Number of samples	Number of positive samples	Isolated species	
		Seller #3	Tiaret	Apple	1	0	N/A	
		Seller #4	Media	Apple	1	0	N/A	
		Seller #5	Algiers	Beet	1	1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	
			Ain Defla	Carrot	1	1	<i>Acinetobacter pittii</i>	
				Fennel	1	1	<i>Citrobacter freundii</i>	
		Seller #6	Algiers	Carrot	1	0	N/A	
				Algiers	Fennel	1	0	N/A
				Sahara	Tomato	1	0	N/A
				Ain Defla	Lettuce	1	0	N/A
		Seller #7	Blida	Apple	1	0	N/A	
		Seller #8	Biskra	Tomato	1	0	N/A	
					Pepper	1	0	N/A
					Chili	1	1	<i>Acinetobacter pittii</i>
		Seller #9	Sahara	Lettuce	1	1	<i>Stenotrophomonas maltophilia/Acinetobacter pittii</i>	

Seasons	Markets	Sellers	Origin	Samples	Number of samples	Number of positive samples	Isolated species
				Cucumber	1	0	N/A
		Seller #10	M'Sila	Carrot	1	0	N/A
		Seller #11	Biskra	Tomato	1	1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
		Seller #12	Biskra	Pepper	1	1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
	Chili			1	0	N/A	
	Tomato			1	0	N/A	
		Seller #13	Sahara	Tomato	1	0	N/A
				Lettuce	1	0	N/A
		Seller #14	Biskra	Pepper	1	0	N/A
				Chili	1	0	N/A
				Lettuce	1	0	N/A
		Seller #15	Biskra	Chili	1	0	N/A
				Pepper	1	0	N/A
		Seller #16	Algiers	Fennel	1	0	N/A

Seasons	Markets	Sellers	Origin	Samples	Number of samples	Number of positive samples	Isolated species
				Carrot	1	0	N/A
				Lettuce	1	0	N/A
				Tomato	1	0	N/A
			Oued souf	Carrot	1	0	N/A
		Seller #17	Biskra	Tomato	1	0	N/A
		Seller #18	Biskra	Chili	1	0	N/A
		Royal	Seller #61	Bejaia	Pepper	1	1
Winter (11/02/14)	Royal	Seller #61	Biskra	Chili	1	0	N/A
				Parsley	1	1	<i>Klebsiella pneumoniae/ Enterobacter cloacae/ Citrobacterfreundii/Acinetobacter pittii</i>
				Tomato	1	1	<i>Acinetobacter pittii</i>
				Celery	1	1	<i>Acinetobacter pittii</i>
			Algiers	Beet	1	1	<i>Acinetobacter pittii</i>
				Lettuce	1	1	<i>Acinetobacter pittii</i>
				Apple	1	0	N/A

Seasons	Markets	Sellers	Origin	Samples	Number of samples	Number of positive samples	Isolated species
			Bejaia	Apple	1	0	N/A
				Cucumber	1	1	<i>Acinetobacter pittii</i>
				Carrot	1	1	<i>Acinetobacter pittii</i>
			Spain	Apple	1	0	N/A

\* N/A not applicable

**Supplementary Table 3. Results of conducted statistical analyses.**

	<b>Chi<sup>2</sup> calculated value</b>	<b>P-value (α)</b>	<b>Chi<sup>2</sup> threshold</b>
Farms vs Markets	7.55	0.005 (0.05)	3.84
Raw vs cooked vs raw/cooked	6.41	0.04 (0.017)	5.99
Raw vs cooked	4.23	0.03 (0.05)	3.84
Raw vs raw/cooked	0.22	0.63 (0.05)	3.84
Cooked vs raw/cooked	6.41	0.01 (0.05)	3.84
Tree vs bush vs on vs in the ground	31.94	5.38 (0.012)	7.81
Above vs on vs in the ground	31.50	1.44 (0.017)	5.99
Above vs on the ground	21.79	3.03 (0.05)	3.84
Above vs in the ground	22.46	2.14 (0.05)	3.84
Tree vs bush	0.7	0.4 (0.05)	3.84
Tree vs on the ground	5.75	0.01 (0.05)	3.84
Tree vs in the ground	8.84	0.002 (0.05)	3.84
Bush vs on the ground	21.05	4.45 (0.05)	3.84
Bush vs in the ground	22.75	1.84 (0.05)	3.84
On vs in the ground	1.33	0.24 (0.05)	3.84
Autumn vs winter vs spring vs summer	24.59	1.87 (0.012)	7.81
Autumn vs winter vs spring	7.15	0.02 (0.017)	5.99
Autumn vs winter vs summer	20.87	2.92 (0.017)	5.99
Autumn vs spring vs summer	15.83	0.0003 (0.017)	5.99
Winter vs spring vs summer	20.07	4.36 (0.017)	5.99
Autumn vs winter	0.004	0.94 (0.05)	3.84
Autumn vs spring	6.17	0.01 (0.05)	3.84
Autumn vs summer	13.85	0.0001 (0.05)	3.84
Winter vs spring	6.81	0.009 (0.05)	3.84
Winter vs summer	17.34	3.10 (0.05)	3.84
Spring vs summer	0.11	0.73 (0.05)	3.84

**Supplementary Table 4. List of samples found positive for *Enterobacter cloacae* at Ihadaden market.**

<b>Code</b>	<b>Seller</b>	<b>fruit/vegetable</b>	<b>origin</b>	<b>seasons</b>	<b>species</b>
N7	Seller no. 20	tomato	Tipaza	autumn	<i>Enterobacter cloacae</i>
W7	Seller no. 22	pear	Bejaia	autumn	<i>Enterobacter cloacae</i>
S7	Seller no. 24	pepper	Oued Souf	autumn	<i>Enterobacter cloacae</i>
Y7	Seller no. 26	lettuce	Sétif	autumn	<i>Enterobacter cloacae</i>
O7VC	Seller no. 27	lettuce	Sétif	autumn	<i>Enterobacter cloacae</i>
2Q7	Seller no. 28	chili	Algiers	autumn	<i>Enterobacter cloacae</i>
A7	Seller no. 29	cucumber	Algiers	autumn	<i>Enterobacter cloacae</i>
J7	Seller no. 30	chili	Sétif	autumn	<i>Enterobacter cloacae</i>
2I7	Seller no. 33	peach	Algiers	autumn	<i>Enterobacter cloacae</i>
2C7	Seller no. 34	nectarine	Blida	autumn	<i>Enterobacter cloacae</i>
X7	Seller no. 38	pear	Algiers	autumn	<i>Enterobacter cloacae</i>
2P7	Seller no. 39	grape	Bejaia	autumn	<i>Enterobacter cloacae</i>
2O7	Seller no. 40	carrot	Tiaret	autumn	<i>Enterobacter cloacae</i>

## **Etude 2: Occurrence of Third-Generation Cephalosporins Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Fresh Fruits and Vegetables Purchased at Markets in Algeria.**

### **Présentation de l'étude**

*Klebsiella pneumoniae* est un agent pathogène opportuniste qui est souvent difficile à traiter en raison de sa multirésistance aux antibiotiques. Ces microorganismes peuvent être transmis à l'Homme via la chaîne alimentaire.

A partir des échantillons issus de différents marchés de Bejaia, 13 isolats de *Klebsiella pneumoniae* ont été identifiés par MALDI-TOF. La sensibilité des souches aux antibiotiques a été testée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé. Le séquençage du génome entier (WGS) a été effectué pour déterminer le type de séquence (ST), le groupe d'incompatibilité des plasmides (Inc.) et la présence de gène de résistance aux antibiotiques.

Le gène *bla<sub>CTX-M-15</sub>* a été identifié dans 11 isolats de *Klebsiella pneumoniae* productrices de BLSE. Le gène *aac(6')-Ib-cr* a été identifié dans 8 des 13 isolats. Le typage par MLST a mis en évidence cinq ST différentes, à savoir ST14, ST45, ST219, ST236 et ST882.

**Occurrence of third-generation cephalosporins-resistant *Klebsiella pneumoniae* in fresh fruits and vegetables purchased at markets in Algeria**

Ferielle MESBAH ZEKAR<sup>a,b</sup>, Sophie A. GRANIER<sup>\*b,c</sup>, Abdelaziz TOUATI<sup>a</sup> and Yves MILLEMANN<sup>b,d</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire d'Ecologie Microbienne, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia, Algeria.

<sup>b</sup> Université Paris-Est, Anses, Laboratory for Food Safety, F- 94701 Maisons- Alfort, France.

<sup>c</sup> Anses, Fougères Laboratory, F-35306 Fougères, France

<sup>d</sup> Université Paris-Est, Ecole Nationale Vétérinaire d' Alfort, F - 94704 Maisons-Alfort, France.

**\* Corresponding author:**

Sophie A. Granier, NRL for Antimicrobial Resistance, Anses, Laboratoire de Fougères, 10B, rue Claude Bourgelat, Javené, CS 40608, 35306 FOUGERES cedex, France, T :

+33 2 99 17 27 69, [sophie.granier@anses.fr](mailto:sophie.granier@anses.fr)

**ABSTRACT**

This study aimed to characterize 3rd generation cephalosporin (3GC) resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from fresh fruits and vegetables purchased at Bejaia city, Algeria.

*Klebsiella pneumoniae* isolates were identified by MALDI- TOF. Susceptibility to antibiotics was tested by the disk diffusion method. Whole genome sequencing was carried out to determine ST (Sequence Type), plasmid incompatibility group ( Inc), and acquired antimicrobial resistance gene presence.

A total of thirteen 3 GC-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains were isolated. Whole genome sequencing identified *bla*<sub>CTX-M-15</sub> in eleven ESBL-*Klebsiella pneumoniae* and *bla*<sub>DHA-1</sub> in two AmpC-*K. pneumoniae*. The *aac(6')Ib-cr* gene was identified in 8 out of 13 isolates. MLST evidenced five different sequence types, namely ST14, ST45, ST219, ST236, and ST882.

MDR- *Klebsiella pneumoniae* contaminated fresh fruits and vegetables, often eaten raw and inappropriately washed, may represent an underestimated public health threat. This study highlights that hygiene measures during harvesting and retail process are of utmost importance to limit further ESBL/ AmpC spread to consumer households.

## INTRODUCTION

*Klebsiella pneumoniae* is an opportunistic pathogen responsible for various community and hospital-acquired infections.<sup>1</sup> It usually causes urinary tract infections, and pneumonia and affects debilitated or immunocompromised patients.<sup>2</sup> Importantly, *Klebsiella pneumoniae* readily colonizes human mucosal surfaces, including the gastrointestinal tract and oropharynx.<sup>3,4</sup> From these sites, *Klebsiella pneumoniae* strains can gain entry to other tissues and cause severe infections in humans. *Klebsiella pneumoniae* raises key therapeutic issues due to the high incidence of multidrug-resistant isolates, resulting in the remaining few therapeutic options.<sup>5</sup>

Extended-Spectrum-Beta-Lactamases (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates have been described in various countries<sup>6-9</sup> and their associated resistance to antibiotics varies between countries. According to Navon - Venezia et al.,<sup>1</sup> data retrieved from the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network for the years 2005 -2015 show that Eastern and South-Western Europe, as well as Mediterranean countries, are endemic for ESBL-producing *K. pneumoniae*, exceeding 50 %–60% of non-susceptibility to third-generation cephalosporins, fluoroquinolones, and aminoglycosides.

The role of food in human exposure to such antimicrobial-resistant bacteria is still unclear; nevertheless, it is becoming a growing food safety issue. *Enterobacteriaceae* strains ingested through food may contain ESBL and plasmidic AmpC (pAmpC) genes carried by mobile genetic elements and colonize human commensal flora. *Klebsiella pneumoniae*, being a common contaminant of either plant- or animal-based foods, is likely to play a key role in introducing into the human gut environmental strains.<sup>10</sup>

This study aimed to characterize by whole genome sequencing a collection of *Klebsiella pneumoniae* strains resistant to third-generation cephalosporins isolated from fruits and vegetables purchased at Bejaia city, Algeria.

## MATERIAL AND METHODS

### Sampling

A total of 310 samples of fruits and vegetables were purchased in five markets located inside the city of Bejaia, Northeastern Algeria, between April 2013 and March 2014. The sampling procedure has been previously described.<sup>11</sup> During a total of seven visits to markets, the sampler behaved as an average consumer and shopped for seasonal fruits and vegetables from the regular Algerian regimen. Most of the products were domestically produced: 294/310 fruit and vegetable samples originating from Algeria. The province of origin also called wilaya – Algeria is divided into 48 wilayas –each sample was recorded. Detailed information on the 310 samples is recorded in Supplementary Table 2 from Mesbah- Zekar et al.<sup>11</sup>

### Microbiological analysis and antimicrobial susceptibility tests

The bacterial isolation procedure has been previously described.<sup>11</sup> Briefly, twenty-five grams of fruits and vegetables samples were placed aseptically in a sterile plastic bag containing 225 mL of buffered peptone water (BPW), vigorously shaken and the suspensions were then incubated at 37°C for 18 h. After pre-enrichment, 10µL of BPW was streaked onto MacConkey's agar (MAC) plates (Fluka) supplemented with 8mg/ L of ceftazidime and incubated for 18 –24 h at 37°C for isolation of 3<sup>rd</sup> GC- resistant *Klebsiella pneumoniae*. The isolates were further identified by MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) using a Microflex LT® and Biotype 3.0 software (Bruker Daltonik, GmbH, Germany).

Each *Klebsiella pneumoniae* isolate was tested for antimicrobial susceptibility against 29 antibiotics from 7 classes by the disk diffusion method according to the CLSI recommendations, as detailed by Mesbah Zekar et al.<sup>11</sup> Isolates were classified as susceptible, intermediate, or resistant according to the clinical interpretative criteria recommended by the CLSI.<sup>12</sup> Multi-drug resistance (MDR) was considered when the isolate was resistant to three or more antimicrobial classes.<sup>13</sup> ESBL production was detected by a double-disk synergy test as previously described.<sup>14</sup> Presence of carbapenemase activity was explored by two methods.<sup>15, 16</sup>

## Genomic analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolates

Total DNA was extracted using E.Z.N.A.® Bacterial DNA Kit (Omega Biotek, Norcross, USA) as per the manufacturer's instructions.

Whole genome sequencing (WGS) of *Klebsiella pneumoniae* strains was performed at the ICM platform, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France. Nucleic acid fragmentation was performed by ultrasound, the DNA library was prepared using a KAPA kit (Roche Sequencing Solutions, Pleasanton, CA, USA) and the sequencing was performed using MiSeq technology (Illumina, San Diego, CA, USA). Raw reads were trimmed (minimum length, 35 bp; quality score, 0.03) and assembled de novo in CLC Genomics Workbench 7.5.1.

The CGE server (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>) was used to reassess *Klebsiella pneumoniae* identification (Kmer Finder),<sup>17</sup> to identify acquired antimicrobial resistance genes (Resfinder),<sup>18</sup> plasmid presence (Plasmid Finder),<sup>19</sup> plasmids typing (pMLST)<sup>19</sup> and strains typing (MLST).<sup>20</sup>

## RESULTS

### Extended-Spectrum beta-lactamases-producing *Klebsiella pneumoniae* collection

Thirteen *Klebsiella pneumoniae* strains resistant to 3<sup>rd</sup> generation cephalosporins were recovered from fruits and vegetables usually consumed raw (mint, tomato, parsley, lettuce, beet, peach, carrot, and celery) purchased at different markets in Bejaia city (Table 1).

Antimicrobial susceptibility profile tests are summarized in Table 1. All thirteen *Klebsiella pneumoniae* isolates were resistant to some penicillins [ampicillin (AMP) and ticarcillin (TIC)], some 1<sup>st</sup> generation cephalosporins [cephalothin (CEF)], some 2<sup>nd</sup> generation cephalosporins [cefuroxime (CXM) and cefamandole (FAM)] and some 3<sup>rd</sup> generation cephalosporins [cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), and ceftriaxone (CRO)]; 85% of them were resistant to 4<sup>th</sup> generation cephalosporins [cefepime (FEP)], 69% were resistant to amoxicillin-clavulanate (AMC), and 92 % to aztreonam (ATM) (Table 1). Only 15% were resistant to cefoxitin (FOX). All isolates were susceptible to imipenem and ertapenem. Nonetheless, the absence of carbapenemase activity was double-checked by both the Carba NP test and the CIM test.

Resistance to non-beta-lactam antibiotics was also observed, including resistance to sulfonamides [trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT) = 77%, trimethoprim (TMP) = 85 %, and sulfonamides (SSS) =54%), aminoglycosides [gentamicin (GEN) = 54%, kanamycin (KAN) = 77%, and streptomycin (STR) = 54%), tetracyclines [tetracycline (TET) = 31%,

tigecycline (TGC) = 23 %)], (fluoro)quinolones [pefloxacin (PEF) = 92%; ciprofloxacin (CIP) = 54%, and nalidixic acid (NAL) = 15%)] and phenicols [chloramphenicol (CHL) = 23%]] (Table 1).

Among the thirteen isolates, eleven of them were found to be ESBL- producers and the two other strains were pAmpC producers.

### Genomic analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolates

The eleven ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates harbored multiple beta-lactamases: *bla*<sub>SHV-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>SHV-101</sub>, *bla*<sub>SHV-28</sub>, and *bla*<sub>TEM-1B</sub>. They also acquired resistance genes able to impair the effectiveness of fluoroquinolones (*qnrS1*, *aac(6')Ib-cr*, *qnrB66*), aminoglycosides (*aph(3')-Ia*, *aaA2*, *strB*, *strA*, *aac(6')Ib-cr*, *aac(3)-IIa*), sulfonamides (*sul1*, *sul2*), trimethoprim (*dfrA12*, *dfrA14*), tetracyclines (*tet(A)*), fosfomycin (*fosA*), macrolides-lincosamides-streptogramins (MLS) (*mph(A)*) and phenicols (*catA2*) (Table 2).

The two pAmpC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates harbored *aac(6') Ib-cr*, *aph(3')-Ia*, *aadA1*, *strB*, and *strA* genes encoding resistance to aminoglycosides, *bla*<sub>DHA-1</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>SHV-101</sub>, *bla*<sub>TEM-1D</sub>, and *bla*<sub>SHV-60</sub> encoding resistance to beta-lactams, *aac(6')Ib-cr* and *qnrB4* encoding resistance to fluoroquinolones, *fosA* to fosfomycin, *mph(A)* to MLS, *catB3* to phenicols, *aee-3* to rifampicin, *sul1* to sulfonamides, *dfrA1* to trimethoprim and *tet(A)* to tetracyclines (Table 2).

Plasmid replicons were identified in all 13 isolates. IncFII plasmid replicon type was the most frequently present (11/13). Only one isolate harbored an IncR replicon.

Multilocus sequence typing of the 13 *Klebsiella pneumoniae* isolates lead to the identification of five different sequence types (ST): ST14, ST219, ST882, ST45, and ST 236 (Table 2). The same CTX -M-15/SHV-28/OXA-1 producing ST14 *Klebsiella pneumoniae* clone was found in different vegetables purchased from five different sellers (# 4, # 7, #8, #13, #16) in the same market (Idimco). At the Ihaddadn market, CTX-M-15 producing ST219 *Klebsiella pneumoniae* clone was found in vegetables purchased from three different sellers (#25, #27, #33), while an ST882 *Klebsiella pneumoniae* clone was recovered from seller #26 (DHA - 1/OXA-1) and an ST45 clone from seller #40 (CTX- M- 15/TEM-1B/SHV-1/OXA-1). A different ST45 clone (CTX-M-15/SHV-1/ OXA-1) was also detected at Royal market, which is located about 500 meters from Ihaddadn. At the Lekhmis market, only an ST236 clone was isolated.

In other words, according to the vendor's location, ST14 appeared to be specific to the

Idimco market, ST236 to the Lekhmis market, ST882 and ST219 to the Ihaddadn market, and finally ST45 to both the Ihaddadn market and Royal market. Interestingly, different varieties of fruits and vegetables were contaminated with several ESBL/AmpC-producing *Klebsiella pneumoniae*, in particular, those purchased at Idimco (ST14) and Ihaddadn market (ST45, ST219, and ST882). No sequence type was associated with any specific fruit or vegetable. Half of the 3 GC-resistant *Klebsiella pneumoniae* contaminated fruits and vegetables (7/13) were produced in Sétif Wilaya, where ST14 (n=4) was the most frequent sequence type isolated. Remarkably, outside Sétif Wilaya, no sequence type was isolated twice from two different items produced in the same Wilaya.

## DISCUSSION

The contribution of fruits and vegetables, often eaten raw, to human exposure to antimicrobial-resistant bacteria is considered relevant due to the high consumption frequency.<sup>21</sup> However, data are still scarce compared to meat contamination and it remains difficult to identify the source of contamination of fruits and vegetables. One of the aims of this study was to characterize 3<sup>rd</sup> GC-resistant *K. pneumoniae* isolated from fresh fruits and vegetables purchased at Bejaia city, Algeria.

All *Klebsiella pneumoniae* strains in this study produced beta-lactamases conferring resistance to almost all beta-lactam antibiotics, including 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> generation cephalosporins. All of them were considered multidrug-resistant ( $\geq 3$  drugs belonging to different classes<sup>13</sup>). Veldman et al. also reported the identification of such MDR -*K. pneumoniae*, in fresh culinary herbs, imported from South East Asia, highlighting the potential human health risk associated with their consumption.<sup>22</sup> The ESBL/pAmpC genes identified in this study were associated with other genes conferring resistance to quinolones, aminoglycosides, fosfomycin, tetracyclines, phenicols, sulfonamides and/ or trimethoprim. The emergence of multiple resistances towards different antibiotic classes is frequently found in hospital-adapted *K. pneumoniae* isolates due to the accumulation of antibiotic resistance genes that may be encoded on multiple plasmids.<sup>1,10</sup>

The *bla*<sub>CTX-M-15</sub> was predominant in our study: this observation is in line with the worldwide expansion of this ESBL enzyme.<sup>23</sup> Of note, CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* had been reported in Algerian hospitals.<sup>8</sup> ESBL gene variants detected in our study also correspond to the previously most frequently found variants in Algeria among clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates<sup>8,24-26</sup> as well as in animals.<sup>27</sup> Moreover, such isolates

had also been detected in food.<sup>22,28</sup>

Herein, all isolates harbored one or more PMQR genes (*aac(6)-Ib-cr* and/ or *qnrS1*). The *aac(6)-Ib-cr*, conferring both resistance to aminoglycosides and quinolones, was detected in 8/13 isolates. The *aac(6)-Ib-cr* gene had already been associated with ESBL-encoding genes in clinical *K. pneumoniae* isolated in Algerian hospitals.<sup>26, 29-31</sup> Even if the co-location of PMQR and ESBL genes on the same IncF plasmid type was not demonstrated here, the co-location of *bla*<sub>CTX-M</sub> and quinolone resistance mechanisms on the same plasmid has already been described in *K. pneumoniae* isolated from culinary herbs.<sup>22</sup> Carattoli et al. already described in 2009 the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene, often associated with *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, and *aac(6)-Ib-cr* resistance genes and located on plasmids belonging to the IncF group.<sup>32</sup> IncF plasmids are conjugative and range between 45 and 200 kb. They are associated in the literature with the global spread of *bla*<sub>CTX-M-15</sub> in human *E. coli*.<sup>33</sup>

In several instances, the same major clone was found on the same date at different sellers located in the same market, which may reflect immediate cross-contamination, through handling practices by sellers or consumers. Indeed, the consumer can touch different fruits and vegetables before buying, which makes the consumer a possible vehicle of transmission of bacteria to fruits and vegetables or from one fruit/vegetable to another. The contamination may also have been mediated through transport equipment, or even environmental factors such as dust. More precisely, the detection of ST45 at different markets (Ihaddadn and Royal) may be due to the transport equipment or dust or the seller's handling practices. ST14 was detected on two different plants (mint and parsley) at the same booth (seller 8): contamination might be associated with improper handling practices or a contaminated environment. ST219 and ST14 were found at Ihaddadn market and Idimco market respectively, on different fruits and vegetables from different sellers, who are working not far from each other: this may reflect immediate cross-contamination, through poor hygiene in the booth or when the consumers are handling the produces while shopping.

Of note, ST14 *K. pneumoniae* carrying *bla*<sub>CTX-M-15</sub> had been isolated in a Tanzanian hospital in the context of neonatal sepsis.<sup>34</sup> An ST45 had been also isolated in an Algerian hospital environment.<sup>26</sup> An ST219 ESBL and carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* had been isolated from wound infection in a burn unit in Annaba, Algeria in 2015.<sup>35</sup> Furthermore, ST219 and ST882 isolates had already been detected on sandwiches in Bejaia city,<sup>28</sup> one may emphasize that these sandwiches are composed of meat and vegetables

and both studies were conducted at the same period in the same city. The detection of the same sequence type in different environments (fresh fruits and vegetables, sandwiches, hospital) raises concerns and encourages further investigations. Thus, to be able to assess a clonal link between these MDR-*Klebsiella pneumoniae* detection events, MLST is not discriminatory enough. Indeed, to accurately trace back sources of contamination, WGS-based approaches such as cgMLST or wgMLST, or pairwise single-nucleotide polymorphism (SNP) distance typing would have been more powerful than MLST.<sup>36,37</sup> Unfortunately WGS data of isolates from previous Algerian studies were not available, while MLST was.<sup>26, 28,35</sup>

The diversity of ST detected among these isolates of MDR-*Klebsiella pneumoniae* indicates that the dissemination of resistance is not associated with the spread of a unique clone but rather with the dissemination of plasmids carrying these genes. Ben Said et al. reported the same conclusion.<sup>38</sup> Moreover, due to the high diversity in acquired resistance genes, high plasmid load, variability of GC content, and broad ecological range, Wyres and Holt qualified *K. pneumoniae* as “a key trafficker in drug resistance genes”.<sup>10</sup>

While foods of animal origin are mostly eaten cooked or transformed, the fruits and vegetables tested herein are very often eaten raw and improperly washed. The possibility of transfer of ESBL/AmpC-producing bacteria to the human gut via raw food consumption needs to be explored. Even though no direct evidence of human colonization by a single *Klebsiella pneumoniae* clone originating from ingested food exists so far,<sup>10</sup> different authors have also highlighted the potential health hazard derived from the consumption of raw food containing multi-resistant bacteria.<sup>22,38-41</sup>

## CONCLUSION

Detection of such MDR-*Klebsiella pneumoniae* suggests that fruits and vegetables may constitute an underestimated threat to public health, as this source of household contamination is poorly studied. It is of interest to note that fruits and vegetables contaminated by these MDR -*Klebsiella pneumoniae* are often eaten raw and improperly washed, which may cause the transfer of ESBL/AmpC producers to the human gut. Antimicrobial resistance surveillance programs are mostly focused to date on the food of animal origin. Monitoring antimicrobial resistance reservoirs in food from non-animal origin should also be considered.

Finally, formal identification of the source(s) of contamination of fruits and vegetables detected at retail is foreseen. Further studies at each step of the production chain are needed to be able to promote science-based hygiene measures to limit the further spread of

ESBL/AmpC-carrying bacteria to our households.

### **NUCLEOTIDE SEQUENCE ACCESSION NUMBERS**

Whole genome assemblies were deposited in Genbank under BioProject accession number PRJNA482637.

### **FUNDING**

This work was financially supported by “Soutien de Programme – Direction Générale de l’Enseignement et de la Recherche” from the French Ministry for Agriculture and by “Programme National Exceptionnel (P.N.E)” from the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors would like to thank Muriel Marault for technical assistance and Sabine Delannoy for assistance and advice on genomic data analysis

### **AUTHOR DISCLOSURE STATEMENT**

The authors declare no competing financial interests linked to this study.

### **REFERENCES**

1. Navon-Venezia S., Kondratyeva K., and Carattoli A. 2017. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. FEMS Microbiol Rev 41: 252-275.
2. Podschun R., and Ullmann U. 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev 11: 589-603.
3. Bagley S.T. 1985. Habitat association of *Klebsiella* species. Infect Control 6: 52-8.
4. Dao T.T., Liebenthal D., Tran T.K., Ngoc Thi Vu B., Ngoc Thi Nguyen D., Thi Tran H.K., Thi Nguyen C.K., Thi Vu H.L., Fox A., Horby P. and others. 2014. *Klebsiella pneumoniae* oropharyngeal carriage in rural and urban Vietnam and the effect of alcohol consumption. PLoS One 9: e91999.
5. Theuretzbacher U. 2013. Global antibacterial resistance: The never-ending story. J Glob Antimicrob Resist 1: 63-69.

6. Berrazeg M., Diene S.M., Drissi M., Kempf M., Richet H., Landraud L., and Rolain J.M. 2013. Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. PLoS One 8: e61428.
7. Long S.W., Olsen R.J., Eagar T.N., Beres S.B., Zhao P., Davis J.J., Brettin T., Xia F., and Musser J.M. 2017. Population Genomic Analysis of 1,777 Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates, Houston, Texas: Unexpected Abundance of Clonal Group 307. MBio 8: e00489-17.
8. Messai Y., Iabadene H., Benhassine T., Alouache S., Tazir M., Gautier V., Arlet G., and Bakour R. 2008. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). Pathol Biol (Paris) 56: 319-25.
9. Yadav K.K., Adhikari N., Khadka R., Pant A.D., and Shah B. 2015. Multidrug resistant *Enterobacteriaceae* and extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli*: a cross-sectional study in National Kidney Center, Nepal. Antimicrob Resist Infect Control 4: 42.

10. Wyres K.L., and Holt K.E. 2018. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drugresistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Curr Opin Microbiol* 45: 131-139.
11. Mesbah Zekar F., Granier S.A., Marault M., Yaici L., Gassilloud B., Manceau C., Touati A., and Millemann Y. 2017. From Farms to Markets: Gram-Negative Bacteria Resistant to Third-Generation Cephalosporins in Fruits and Vegetables in a Region of North Africa. *Frontiers in Microbiology* 8: 1569.
12. CLSI. 2013. M100-S23: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty third Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute,,Wayne, PA.
13. Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C.G., Harbarth S., Hindler J.F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B. and others. 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.
14. EUCAST. 2013. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 1.0. pp. 40.
15. Nordmann P., Poirel L., and Dortet L. 2012. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 18: 1503-7.
16. van der Zwaluw K., de Haan A., Pluister G.N., Bootsma H.J., de Neeling A.J., and Schouls L.M. 2015. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low- cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PLoS One* 10: e0123690.
17. Larsen M.V., Cosentino S., Lukjancenko O., Saputra D., Rasmussen S., Hasman H., Sicheritz-Ponten T., Aarestrup F.M., Ussery D.W., and Lund O. 2014. Benchmarking of methods for genomic taxonomy. *J Clin Microbiol* 52: 1529-39.
18. Zankari E., Hasman H., Cosentino S., Vestergaard M., Rasmussen S., Lund O.,

- Aarestrup F.M., and Larsen M.V. 2012. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 67: 2640-4.
19. Carattoli A., Zankari E., Garcia-Fernandez A., Voldby Larsen M., Lund O., Villa L., Moller Aarestrup F., and Hasman H. 2014. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 3895-903.
20. Larsen M.V., Cosentino S., Rasmussen S., Friis C., Hasman H., Marvig R.L., Jelsbak L., Sicheritz-Ponten T., Ussery D.W., Aarestrup F.M. and others. 2012. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol* 50: 1355-61.
21. Holzel C.S., Tetens J.L., and Schwaiger K. 2018. Unraveling the Role of Vegetables in Spreading Antimicrobial-Resistant Bacteria: A Need for Quantitative Risk Assessment. *Foodborne Pathog Dis* 15: 671-688.
22. Veldman K., Kant A., Dierikx C., van Essen-Zandbergen A., Wit B., and Mevius D. 2014. *Enterobacteriaceae* resistant to third-generation cephalosporins and quinolones in fresh culinary herbs imported from Southeast Asia. *Int J Food Microbiol* 177: 72-7.
23. Canton R., and Coque T.M. 2006. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 9: 466-75.
24. Gharout-Sait A., Touati A., Benallaoua S., Guillard T., Brasme L., Madoux J., and de Champs C. 2012. CTX-M from community-acquired urinary tract infections in Algeria. *African Journal of Microbiology Research* 6.
25. Touati A., Benallaoua S., Forte D., Madoux J., Brasme L., and de Champs C. 2006. First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Bejaia, Algeria. *Int J Antimicrob Agents* 27: 397-402.
26. Zenati K., Sahli F., Garcia V., Bakour S., Belhadi D., Rolain J.M., and Touati A. 2017. Occurrence and clonal diversity of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* recovered from inanimate surfaces in Algerian hospital environment: First report of armA, qnrB and aac(6)-Ib-cr genes. *J Glob Antimicrob Resist* 10: 148-153.
27. Bachiri T., Bakour S., Ladjouzi R., Thongpan L., Rolain J.M., and Touati A. 2017.

- High rates of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in wild boars and Barbary macaques in Algeria. *J Glob Antimicrob Resist* 8: 35-40.
28. Yaici L., Haenni M., Metayer V., Saras E., Mesbah Zekar F., Ayad M., Touati A., and Madec J.Y. 2017. Spread of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in the community through ready-to-eat sandwiches in Algeria. *Int J Food Microbiol* 245: 66-72.
29. Batah R., Loucif L., Olaitan A.O., Boutefnouchet N., Allag H., and Rolain J.M. 2015. Outbreak of *Serratia marcescens* coproducing ArmA and CTX-M-15 mediated high levels of resistance to aminoglycoside and extended-spectrum beta-lactamases, Algeria. *Microb Drug Resist* 21: 470-6.
30. Belbel Z., Chettibi H., Dekhil M., Ladjama A., Nedjai S., and Rolain J.M. 2014. Outbreak of an armA methyltransferase-producing ST39 *Klebsiella pneumoniae* clone in a pediatric Algerian hospital. *Microb Drug Resist* 20: 310-5.
31. Gharout-Sait A., Touati A., Guillard T., Brasme L., and de Champs C. 2015. Molecular characterization and epidemiology of cefoxitin resistance among *Enterobacteriaceae* lacking inducible chromosomal ampC genes from hospitalized and non-hospitalized patients in Algeria: description of new sequence type in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Braz J Infect Dis* 19: 187-95.
32. Carattoli A. 2009. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 2227-38.
33. Rozwandowicz M., Brouwer M.S.M., Fischer J., Wagenaar J.A., Gonzalez-Zorn B., Guerra B., Mevius D.J., and Hordijk J. 2018. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 73: 1121-1137.
34. Mshana S.E., Hain T., Domann E., Lyamuya E.F., Chakraborty T., and Imirzalioglu C. 2013. Predominance of *Klebsiella pneumoniae* ST14 carrying CTX-M-15 causing neonatal sepsis in Tanzania. *BMC Infect Dis* 13: 466.
35. Mellouk F.Z., Bakour S., Meradji S., Al-Bayssari C., Bentakouk M.C., Zouyed F., Djahoudi A., Boutefnouchet N., and Rolain J.M. 2017. First Detection of VIM-4-

Producing *Pseudomonas aeruginosa* and OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Northeastern (Annaba, Skikda) Algeria. *Microb Drug Resist* 23: 335-344.

36. Pightling A.W., Pettengill J.B., Luo Y., Baugher J.D., Rand H., and Strain E. 2018. Interpreting whole-genome sequence analyses of foodborne bacteria for regulatory applications and outbreak investigations. *Front Microbiol* 9: 1482.

37. Van Walle I., Guerra B., Borges V., André Carriço J., Cochrane G., Dallman T., Franz E., Karpíšková R., Litrup E., Mistou M.Y. and others. 2019. EFSA and ECDC technical report on the collection and analysis of whole genome sequencing data from food-borne pathogens and other relevant microorganisms isolated from human, animal, food, feed and food/feed environmental samples in the joint ECDC-EFSA molecular typing database. EFSA Supporting Publications 16.

38. Ben Said L., Jouini A., Klibi N., Dziri R., Alonso C.A., Boudabous A., Ben Slama K., and Torres C. 2015. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia. *Int J Food Microbiol* 203: 86-92.

39. Blaak H., van Hoek A.H., Veenman C., Docters van Leeuwen A.E., Lynch G., van Overbeek W.M., and de Roda Husman A.M. 2014. Extended spectrum ss-lactamase- and constitutively AmpC-producing *Enterobacteriaceae* on fresh produce and in the agricultural environment. *Int J Food Microbiol* 168-169: 8-16.

40. Schwaiger K., Helmke K., Holzel C.S., and Bauer J. 2011. Antibiotic resistance in bacteria isolated from vegetables with regards to the marketing stage (farm vs. supermarket). *Int J Food Microbiol* 148: 191-6.

41. van Hoek A.H., Veenman C., van Overbeek W.M., Lynch G., de Roda Husman A.M., and Blaak H. 2015. Prevalence and characterization of ESBL- and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* on retail vegetables. *Int J Food Microbiol* 204: 1-8.

**Table 1: characteristics of MDR-*Klebsiella pneumoniae* isolated from fresh fruits and vegetables purchased in Bejaia city**

Isolate number	Fruit/vegetable	Place of isolation	Seller number	Antibiotic resistance profile*	Beta-lactamase phenotype
2D7	Beet	Ihaddaden Market	Seller 25	AMP TIC CEF FAM CXM CTX CAZ CRO FEP ATM PEF STR KAN TET TGC SSS SXT TMP CHL	ESBL
07VF	Lettuce	Ihaddaden Market	Seller 27	AMP TIC CEF FAM CXM CTX CAZ CRO FEP ATM PEF STR KAN TET TGC SSS SXT TMP CHL	ESBL
2K7	Peach	Ihaddaden Market	Seller 33	AMP TIC CEF FAM CXM CTX CAZ CRO ATM PEF STR SSS SXT TMP CHL	ESBL
Z7	Lettuce	Ihaddaden Market	Seller 26	AMP TIC AMC CEF FAM FOX CXM CTX CAZ CRO PEF CIP KAN SSS	AmpC
2L7	Carrot	Ihaddaden Market	Seller 40	AMP TIC AMC CEF FAM CXM CTX CAZ CRO FEP ATM NAL PEF CIP STR KAN GEN SSS SXT TMP	ESBL
E5	Mint	Idimco Market	Seller 4	AMP TIC AMC CEF FAM CXM CTX CAZ CRO FEP ATM KAN GEN PEF CIP SXT TMP	ESBL
L5	Tomato	Idimco Market	Seller 7	AMP TIC CEF FAM CXM CTX CAZ CRO FEP ATM GEN PEF	ESBL
M5	Mint	Idimco Market	Seller 8	AMP TIC AMC CEF FAM CXM CTX CAZ CRO FEP ATM KAN GEN PEF CIP TMP	ESBL
H5	Parsley	Idimco Market	Seller 8	AMP TIC AMC CEF FAM CXM CTX CAZ CRO FEP ATM KAN GEN PEF CIP SXT TMP	ESBL
K5	Tomato	Idimco Market	Seller 13	AMP TIC AMC CEF FAM CXM CTX CAZ CRO FEP ATM KAN GEN PEF CIP SXT TMP	ESBL
Q5	Lettuce	Idimco Market	Seller 16	AMP TIC AMC CEF FAM CXM CTX CAZ CRO FEP ATM KAN GEN PEF CIP SXT TMP	ESBL
G8	Celery	Lekhmis Market	Seller 47	AMP TIC AMC CEF FAM FOX CXM CTX CAZ CRO ATM NAL PEF STR TET TGC SSS SXT TMP	AmpC
M10	Parsley	Royal Market	Seller 61	AMP TIC AMC CEF FAM CXM CTX CAZ CRO FEP ATM KAN GEN STR TET SSS SXT TMP	ESBL

\* AMP: ampicillin, TIC: ticarcillin, AMC: amoxicillin-clavulanic acid, CEF: cephalotin, FAM: cefamandole, CXM: cefuroxime, FOX: cefoxitin, CTX: cefotaxime, CAZ: ceftazidime, CRO: ceftriaxone, FEP: cefepime, ATM: aztreonam, GEN: gentamicin, KAN: kanamycin, STR: streptomycin, TET: tetracycline, TGC: tigecycline, CIP: ciprofloxacin, PEF: pefloxacin, NAL: nalidixic acid, SXT: trimethoprim-sulfamethoxazole, TMP: trimethoprim, SSS: sulfonamides, CHL: chloramphenicol.

**Table 2: Characterization of MDR-*Klebsiella pneumoniae* isolated from fresh fruits and vegetables purchased at Bejaia city.**

Isolate	Resistance genes to										Replicon type	pMLST [FII:FIA:FIB]	MLST
	Aminoglycosides	Beta-lactams	Quinolones	Fosfomycins	MLS <sup>a</sup>	Phenicol	Ansamycins	Sulfonamides	Tetracyclines	Trimethoprim			
2D7	<i>aph(3')-Ia, aadA2, strB, strA</i>	<i>bla<sub>SHV13</sub>, bla<sub>CTXM15</sub></i>	<i>qnrS1, oqxB, oqxA</i>	<i>fosA</i>	<b><i>mph(A)</i></b>	<i>catA2</i>	NF <sup>b</sup>	<i>sul1, sul2</i>	<i>tet(A)</i>	<i>dfrA12</i>	IncFII(K)	[K7:A:-B-]	ST-219
O7VF	<i>aph(3')-Ia, aadA2, strB, strA</i>	<i>bla<sub>SHV13</sub>, bla<sub>CTXM15</sub></i>	<i>qnrS1, oqxB, oqxA</i>	<i>fosA</i>	<b><i>mph(A)</i></b>	<i>catA2</i>	NF	<i>sul1, sul2</i>	<i>tet(A)</i>	<i>dfrA12</i>	IncFII(K)	[K7:A:-B-]	ST-219
2K7	<i>aadA2, strB, strA</i>	<i>bla<sub>SHV13</sub>, bla<sub>CTXM15</sub></i>	<i>qnrS1, oqxB, oqxA</i>	<i>fosA</i>	<b><i>mph(A)</i></b>	<i>catA2</i>	NF	<i>sul1, sul2</i>	NF	<i>dfrA12</i>	IncFII(K)	[K7:A:-B-]	ST-219
Z7	<b><i>aac(6')Ib-cr, aph(3')-Ia</i></b>	<i>bla<sub>SHV43</sub>, bla<sub>CTXM15</sub>, bla<sub>SHV001</sub></i>	<b><i>aac(6')Ib-cr, qnrB4, oqxB, oqxA</i></b>	<i>fosA</i>	<b><i>mph(A)</i></b>	<i>catB3</i>	<b><i>ARR-3</i></b>	<i>sul1</i>	NF	NF	IncFIB(K), <b>IncR</b>	Unknown ST	ST-882
2L7	<b><i>aac(6')Ib-cr, aac(3)-IIa, strB, strA</i></b>	<i>bla<sub>TEM18</sub>, bla<sub>SHV53</sub>, bla<sub>CTXM15</sub>, bla<sub>OXM4</sub></i>	<b><i>aac(6')Ib-cr, qnrB66, oqxB, oqxA</i></b>	<i>fosA</i>	NF	<i>catB3</i>	NF	<i>sul2</i>	NF	<i>dfrA14</i>	IncFIB(K)	Unknown ST	ST-45
E5	<b><i>aac(6')Ib-cr, aac(3)-IIa</i></b>	<i>bla<sub>SHV26</sub>, bla<sub>CTXM15</sub>, bla<sub>OXM4</sub></i>	<b><i>aac(6')Ib-cr, qnrB66, oqxB, oqxA</i></b>	<i>f fosA</i>	NF	<i>catB3</i>	NF	NF	NF	<i>dfrA14</i>	IncFII, IncFIB(K)	[K9:A:-B-]	ST-14
L5	<i>aac(3)-IIa</i>	<i>bla<sub>SHV26</sub>, bla<sub>CTXM15</sub></i>	<i>qnrB66, oqxB, oqxA</i>	<i>fosA</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	IncFII, IncFIB(K)	[K9:A:-B-]	ST-14
M5	<b><i>aac(6')Ib-cr, aac(3)-IIa</i></b>	<i>bla<sub>SHV26</sub>, bla<sub>CTXM15</sub>, bla<sub>OXM4</sub></i>	<b><i>aac(6')Ib-cr, qnrB66, oqxB, oqxA</i></b>	<i>fosA</i>	NF	<i>catB3</i>	NF	NF	NF	<i>dfrA14</i>	IncFII, IncFIB(K)	[K9:A:-B-]	ST-14
H5	<b><i>aac(6')Ib-cr, aac(3)-IIa</i></b>	<i>bla<sub>SHV26</sub>, bla<sub>CTXM15</sub>, bla<sub>OXM4</sub></i>	<b><i>aac(6')Ib-cr, qnrB66, oqxB, oqxA</i></b>	<i>fosA</i>	NF	<i>catB3</i>	NF	NF	NF	<i>dfrA14</i>	IncFII, IncFIB(K)	[K9:A:-B-]	ST-14
K5	<b><i>aac(6')Ib-cr, aac(3)-IIa</i></b>	<i>bla<sub>SHV26</sub>, bla<sub>CTXM15</sub>, bla<sub>OXM4</sub></i>	<b><i>aac(6')Ib-cr, qnrB66, oqxB, oqxA</i></b>	<i>fosA</i>	NF	<i>catB3</i>	NF	NF	NF	<i>dfrA14</i>	IncFII, IncFIB(K)	[K9:A:-B-]	ST-14
Q5	<b><i>aac(6')Ib-cr, aac(3)-IIa</i></b>	<i>bla<sub>SHV26</sub>, bla<sub>CTXM15</sub>, bla<sub>OXM4</sub></i>	<b><i>aac(6')Ib-cr, qnrB66, oqxB, oqxA</i></b>	<i>fosA</i>	NF	<i>catB3</i>	NF	NF	NF	<i>dfrA14</i>	IncFII, IncFIB(K)	[K9:A:-B-]	ST-14
G8	<i>aadA1, strB, strA</i>	<i>bla<sub>SHV15</sub>, bla<sub>TEM109</sub>, bla<sub>SHV40</sub></i>	<i>qnrB4, oqxB, oqxA</i>	<i>fosA</i>	NF	NF	NF	<i>sul1</i>	<i>tet(A)</i>	<i>dfrA1</i>	IncFII, IncFIB(K), IncFIA(HI1)	[K9:A13:B-]	ST-236
M10	<b><i>aac(6')Ib-cr, aac(3)-IIa, strB, strA</i></b>	<i>bla<sub>SHV15</sub>, bla<sub>CTXM15</sub>, bla<sub>OXM4</sub></i>	<b><i>aac(6')Ib-cr, oqxB, oqxA</i></b>	<i>fosA</i>	NF	<i>catB3</i>	NF	<i>sul2</i>	<i>tet(A)</i>	<i>dfrA14</i>	<b>IncFII</b> , IncFIB(K), IncFII(K)	[F2:A:-B-]	ST-45

Genes indicated in **black and bold** were identified with 100% length coverage and 100% identity, genes indicated in black were identified with 100% coverage length and identity  $\geq 90\%$ , genes indicated in grey were identified with covered length  $\geq 60\%$  and  $< 100\%$ , identity range between 90%-100% of the partially aligned sequence;<sup>a</sup> MLS = Macrolides-lincosamides-streptogramins, <sup>b</sup> NF = Not Found

# **Discussion**

## **Discussion**

Considérés comme l'une des révolutions médicales du XX<sup>ème</sup> siècle, les antibiotiques ont apporté un immense bénéfice à l'humanité, en modifiant le profil des maladies infectieuses et de la démographie humaine. Les nombreux antibiotiques et les différentes classes ont permis la diminution considérable du taux de mortalité. Cependant, l'utilisation des antibiotiques comme traitement dans différentes niches écologiques a entraîné la sélection de souches résistantes qui deviennent un réservoir de gènes de résistance. Ces gènes de résistance peuvent être ainsi échangés entre les bactéries d'une niche à une autre (da Costa et al., 2013).

Plusieurs études ont été réalisées concernant la résistance des bactéries à Gram négatif dans le domaine hospitalier spécifiquement, et de nombreux auteurs ont rapporté un risque important lié aux bactéries multirésistantes dans ce domaine. Ces dernières décennies, les scientifiques ont commencé à s'intéresser non seulement au domaine hospitalier mais aussi au domaine de la sécurité alimentaire, afin de vérifier si la nourriture pourrait être un véhicule direct ou indirect de transmission de bactéries résistantes vers l'Homme. Plus récemment, les recherches ont été orientées vers les fruits et légumes qui sont une catégorie importante dans l'alimentation humaine.

Au cours des dernières décennies, on a constaté que l'exposition à des agents pathogènes résistants aux antimicrobiens par le biais de la chaîne alimentaire était de plus en plus souvent à l'origine d'épidémies d'origine alimentaire (Pérez-Rodríguez and Mercanoglu Taban, 2019).

Les fruits et légumes peuvent être contaminés par des agents pathogènes bactériens en de multiples points de leur chaîne de production et d'approvisionnement par contact direct avec des déchets fécaux pendant l'exploitation agricole, comme l'irrigation par les eaux usées et l'utilisation de biosolides ou de fumier animal comme engrais. La contamination peut également se produire pendant le transport et la manipulation des produits. Bien que ces voies de contamination potentielles aient été bien étudiées pour les agents pathogènes traditionnels, leurs contributions relatives à la contamination des fruits et légumes par les BRA, les ARG et les résidus d'antimicrobiens n'ont pas été quantifiées (Arnold et al., 2016; Chee-Sanford et al., 2009; Jung et al., 2014).

Les travaux réalisés dans cette étude avaient pour objectif global, l'évaluation de la contamination des fruits et légumes par des bacilles à Gram négatif résistants aux céphalosporines de troisième génération et la caractérisation phénotypique et moléculaire des

mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif isolés des fruits et légumes issu de sept fermes maraichères et cinq marchés de Béjaia.

Nos résultats documentent la présence d'*Enterobacteriaceae* productrices de BLSE et porteuses d'AmpC dans les fruits et légumes crus vendus au détail qui ont été isolés en Algérie, ce qui implique que les légumes peuvent être une source de gènes de résistance pour la microflore humaine. Ces résultats sont en accord avec d'autres études identifiant les légumes comme une voie possible pour la dissémination des gènes de résistance dans la communauté (Ben Said et al., 2015; Mesa et al., 2006; Reuland et al., 2014; Zurfluh et al., 2015). Les bactéries retrouvées dans cette étude ne sont pas spécifiquement liées aux fruits et légumes, elles sont aussi fréquemment isolées chez les animaux ou les humains. En effet, les entérobactéries telles que *E. cloacae*, *K. pneumoniae* et *Citrobacter* sont des bactéries ubiquitaires fréquemment retrouvées dans les intestins des animaux et des humains. Il est probable que les plantes aient été contaminées indirectement par des bactéries fécales provenant d'animaux pendant le processus de fertilisation ou par contact direct avec l'homme pendant la récolte, la manipulation et le conditionnement des produits en raison de mesures d'hygiène insuffisantes (Lynch et al., 2009).

Il est intéressant de noter qu'aucune contamination par des entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération n'a été détectée dans l'environnement agricole (eau et sol), contrairement à l'étude de Ben Said (Ben Said et al., 2015), ils ont détecté des entérobactéries productrices de BLSE dans le sol, l'eau, ainsi que sur les fruits et légumes. Cela peut être dû au fait que les fermes où ces bactéries ont été isolées utilisent des eaux usées traitées, contrairement aux fermes de notre étude qui utilisent de l'eau potable provenant de puits.

Pignato et al. ont signalé le transfert potentiel de bactéries résistantes aux antibiotiques par l'utilisation d'eaux usées traitées (EUT) en agriculture (Pignato et al., 2009). En revanche, Negreanu et al. n'ont pas trouvé de relation aussi claire et ont conclu que l'impact des bactéries associées aux eaux usées traitées sur le microbiome du sol est dans l'ensemble négligeable (Negreanu et al., 2012). En outre, Bartz et al ont constaté que la concentration de coliformes dans les fruits et légumes correspondait à la contamination des mains des travailleurs plutôt qu'à la contamination de l'eau, ce qui suggère que l'eau d'irrigation est l'échantillon le moins pertinent pour détecter la source de contamination des fruits et légumes (Bartz et al., 2017).

La comparaison entre les résultats obtenus sur des échantillons de fruits et légumes provenant de fermes avec ceux provenant de marchés pourrait confirmer l'hypothèse d'une contamination des fruits et légumes par l'homme. En effet, la contamination de différents fruits et légumes sur différents étals de vendeurs successifs par les mêmes espèces bactériennes a été documentée. Par exemple, de nombreux échantillons au marché d'Ihadaden abritaient *Enterobacter cloacae* avec le même profil de résistance.

La comparaison entre les souches isolées de l'eau d'irrigation et du sol avec celles trouvées sur les fruits et légumes permet de conclure que dans notre étude, la contamination des fruits et légumes par les *Enterobacteriaceae* ne semble pas être principalement liée à l'environnement agricole. Schwaiger et al. ne sont pas parvenus aux mêmes résultats et conclusions ; ils ont constaté que la contamination des fruits et légumes est plus élevée au niveau de l'exploitation agricole. Ils expliquent ce résultat par le fait que la résistance se fait au détriment de la viabilité bactérienne, puisque les légumes achetés directement à la ferme sont probablement plus frais qu'au supermarché, et qu'ils n'ont pas été exposés à des facteurs de stress (Schwaiger et al., 2011). Cela pourrait également être dû aux différentes procédures d'hygiène appliquées entre la récolte et la vente qui ne sont pas documentées. En outre, nous pouvons probablement aussi expliquer ces résultats divergents par des procédures différentes concernant l'hygiène soit pendant la culture, soit de la récolte à l'assiette du consommateur entre l'Algérie et l'Allemagne.

La fréquence de contamination des fruits et légumes dépend de plusieurs paramètres : type de fruit et/ou de légume, contact avec le sol, saison. Dans ce cas, les fruits et légumes sont contaminés par différentes espèces bactériennes. Les fruits et légumes cultivés et récoltés en surface ou dans le sol sont plus fréquemment contaminés (30% et 45% respectivement), probablement en raison du contact avec le sol, le fumier, l'eau d'irrigation, les déchets et les excréments d'animaux. Ceci est cohérent avec les résultats rapportés par Ruimy et al. (Ruimy et al., 2010). La variation de la contamination des fruits et légumes en fonction de la saison a été clairement établie. De manière surprenante, malgré des facteurs climatiques favorables en été et au printemps, la contamination a été trouvée beaucoup plus élevée en hiver et en automne (30 % et 29 %, respectivement), qu'en été et au printemps (9 % et 8 %) : la faible fréquence de contamination des fruits et légumes au printemps pourrait s'expliquer par le fait que les fruits et légumes ont été récoltés à Bejaia et ont donc probablement été manipulés dans une moindre mesure par moins d'opérateurs.

Cette étude s'est concentrée sur la détection de bactéries Gram-négatives résistantes au 3GC à partir de fruits et légumes. En plus de la résistance au 3GC, les isolats ont montré une résistance à 4 à 10 familles d'antimicrobiens utilisés chez l'homme. La détection d'espèces bactériennes fécales humaines et animales présentant des profils de résistance similaires à ceux rencontrés chez l'homme. La détection d'espèces bactériennes fécales humaines et animales présentant des profils de résistance similaires à ceux rencontrés parmi les isolats hospitaliers est préoccupante. L'abondance de *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* et *Citrobacter* résistants à toutes les  $\beta$ -lactamines et à d'autres familles suggère que les fruits et légumes peuvent constituer une réelle menace pour la santé publique en raison du caractère transmissible de cette résistance (Thanner et al., 2016) . Même si Ruimy et al. (Ruimy et al., 2010) ne sont pas arrivés à la même conclusion, d'autres (Blaak et al., 2014; Reuland et al., 2014; van Hoek et al., 2015; Veldman et al., 2014) tendent à retrouver, comme ici, diverses bactéries multirésistantes dans les fruits et légumes. *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Ochrobactrum* et *Kluyvera* ont été fréquemment rencontrées. Néanmoins, ils sont considérés comme des agents pathogènes opportunistes, associés à des patients en mauvaise santé, souvent immunodéprimés.

De nombreuses bactéries survivent au processus d'ingestion et peuvent contribuer à la propagation des gènes de résistance aux antimicrobiens par la flore du tractus intestinal (Schwaiger et al., 2011). L'ingestion de bactéries résistantes aux céphalosporines de 3ème génération et leur hébergement dans les intestins peut entraîner la propagation des BLSE et des gènes AmpC à la flore intestinale commensale. Les échanges de ces gènes entre les bactéries commensales et pathogènes du tractus intestinal peuvent provoquer des infections difficiles à traiter.

Plusieurs études ont montré que la consommation de fruits et légumes peut constituer un risque sérieux pour la santé (Ben Said et al., 2015; Blaak et al., 2014; Campos et al., 2013; Veldman et al., 2014; Viswanathan and Kaur, 2001; Zurfluh et al., 2015). Le lavage des légumes avant de les consommer crus pourrait réduire non seulement le risque d'infection par des bactéries pathogènes, mais aussi le risque d'ingérer, d'héberger et de propager des bactéries résistantes aux antibiotiques (Schwaiger et al., 2011).

La contribution des fruits et légumes, souvent consommés crus, à l'exposition humaine aux bactéries résistantes aux antimicrobiens est considérée comme pertinente en raison de leur fréquence de consommation élevée (Hölzel et al., 2018) . Cependant, les données sont encore

rare par rapport à la contamination de la viande, et il reste difficile d'identifier la source de contamination des fruits et légumes. L'un des objectifs de cette étude était de caractériser les souches de *K. pneumoniae* résistantes aux C3G isolées à partir de fruits et légumes frais achetés dans la ville de Bejaia, Algérie.

Toutes les souches de *K. pneumoniae* de cette étude produisaient des bêta-lactamases conférant une résistance à presque tous les antibiotiques bêta-lactames, y compris les céphalosporines de 3ème et 4ème génération. Toutes ont été considérées comme multirésistantes. Veldman et al. ont également rapporté l'identification de tels MDR -*K. pneumoniae*, dans des herbes culinaires fraîches importées d'Asie du Sud-Est, soulignant le risque potentiel pour la santé humaine associé à leur consommation (Veldman et al., 2014). Les gènes BLSE et pAmpC identifiés dans cette étude étaient associés à d'autres gènes conférant une résistance aux quinolones, aux aminoglycosides, à la fosfomycine, aux tétracyclines, aux phénicolés, aux sulfamides et/ou au triméthoprim. L'émergence de résistances multiples à différentes classes d'antibiotiques est fréquemment observée dans les isolats de *K. pneumoniae* adaptés aux hôpitaux en raison de l'accumulation de gènes de résistance aux antibiotiques qui peuvent être codés sur plusieurs plasmides (Navon-Venezia et al., 2017; Wyres and Holt, 2018).

Le gène *bla*<sub>CTX-M-15</sub> était prédominant dans notre étude. Cette observation est en accord avec l'expansion mondiale de cette enzyme BLSE (Canton et al., 2012). A noter que des *K. pneumoniae* producteurs de CTX-M-15 avaient été signalés dans des hôpitaux algériens.(Messai et al., 2008). Les variants du gène de la BLSE détectés dans notre étude correspondent également aux variants précédemment les plus fréquemment trouvés en Algérie parmi les isolats cliniques de *K. pneumoniae* (Gharout-Sait et al., 2012; Messai et al., 2008; Touati et al., 2006; Zenati et al., 2017) ainsi que chez les animaux (Bachiri et al., 2017). De plus, de tels isolats avaient également été détectés dans des aliments (Yaici et al., 2017).

Ici, tous les isolats étaient porteurs d'un ou plusieurs gènes PMQR (*aac(6)-Ib-cr* et/ou *qnrS1*). Le gène *aac(6)-Ib-cr*, conférant à la fois une résistance aux aminoglycosides et aux quinolones, a été détecté dans 8/13 isolats. Le gène *aac(6)-Ib-cr* avait déjà été associé à des gènes codant pour des BLSE dans des *K. pneumoniae* cliniques isolés dans des hôpitaux algériens.(Batah et al., 2015; Belbel et al., 2014; Gharout-Sait et al., 2015; Zenati et al., 2017) Même si la co-localisation des gènes PMQR et ESBL sur le même type de plasmide IncF n'a pas été démontrée dans cette étude, la co-localisation des mécanismes de résistance *bla*<sub>CTX-M</sub>

et quinolone sur le même plasmide a déjà été décrite chez *K. pneumoniae* isolé d'herbes culinaires (Veldman et al., 2014). Carattoli et al. ont déjà décrit en 2009 les gènes *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, souvent associés aux gènes de résistance *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, et *aac(6)-Ib-cr* et localisés sur des plasmides appartenant au groupe IncF (Carattoli, 2009). Les plasmides IncF sont conjugatifs et ont une taille comprise entre 45 et 200 kb. Ils sont associés dans la littérature à la propagation mondiale du *bla*<sub>CTX-M-15</sub> dans les souches d'*E. coli* humains (Rozwandowicz et al., 2018). Une étude réalisée en Chine a révélé que *K. pneumoniae* isolé d'un échantillon d'orange était positif pour neuf gènes de résistance, dont *mcr-1*, *bla*<sub>SHV-110</sub>, *qnrS1* et *fosA6* (Yang et al., 2019).

Des souches d'entérobactéries ingérées via l'alimentation peuvent comporter des gènes de BLSE et d'AmpC qui se trouvent sur des éléments génétiques mobiles, ce qui a été démontré par l'étude d'Alena Skockova et al., des souches d'*E. coli* avec des gènes de résistance tel que *bla*<sub>TEM</sub>, *tet(A)* et *tet(B)* ont été retrouvées sur les échantillons de légumes crus et sur les graines germées vendus en République Tchèque (Skočková et al., 2013). L'étude de Njage et Buys soulignent le potentiel de transmission de gènes BLSE et d'AmpC d'*E. coli* provenant d'eau d'irrigation aux isolats de laitue (Njage and Buys, 2015).

Ces isolats bactériens peuvent coloniser les humains ou pourrait transférer leurs gènes de résistance à d'autres bactéries au cours du passage au niveau du tractus intestinal. Plusieurs études soutiennent le fait que le transfert de gènes de résistance entre des souches d'origine alimentaire et humaine dans l'intestin humain est très probable (Hart et al., 2006; Huddleston, 2014; Ramchandani et al., 2005). Une étude menée aux Pays-Bas donne une preuve indirecte du transfert des gènes BLSE depuis les volailles vers l'homme via la chaîne alimentaire. Un total de 35 % des isolats humains analysés contiennent des gènes BLSE, dont 19 % contiennent des gènes génétiquement identiques aux gènes isolés dans la viande du poulet (Leverstein-van Hall et al., 2011).

A plusieurs reprises, le même clone majeur a été trouvé à la même date chez différents vendeurs situés sur le même marché, ce qui peut refléter une contamination croisée immédiate, à travers les pratiques de manipulation des vendeurs ou des consommateurs. En effet, le consommateur peut toucher différents fruits et légumes avant d'acheter, ce qui fait de lui un vecteur possible de transmission des bactéries aux fruits et légumes ou d'un fruit/légume à un autre. La contamination peut également avoir été médiée par le matériel de transport, ou même par des facteurs environnementaux tels que la poussière. Plus précisément, la détection de ST45 sur différents marchés (Ihaddadn et Royal) peut être due au

matériel de transport, à la poussière ou aux pratiques de manipulation du vendeur. ST14 a été détecté sur deux plantes différentes (menthe et persil) dans le même stand (vendeur 8) : la contamination peut être associée à des pratiques de manipulation inappropriées ou à un environnement contaminé. ST219 et ST14 ont été trouvés au marché d'Ihaddadn et au marché d'Idimco respectivement, sur différents fruits et légumes provenant de vendeurs différents, qui travaillent non loin les uns des autres : cela peut refléter une contamination croisée immédiate, due à une mauvaise hygiène sur le stand ou lorsque les consommateurs manipulent les produits en faisant leurs courses.

A noter que *K. pneumoniae* ST14 porteur de *bla*<sub>CTX-M-15</sub> avait été isolé dans un hôpital tanzanien dans le cadre d'une septicémie néonatale (Mshana et al., 2013). Une souche de *K. pneumoniae* ST45 avait également été isolée dans un environnement hospitalier algérien (Zenati et al., 2017). Une souche *K. pneumoniae* productrice de BLSE et de carbapénèmase ST219 avait été isolé lors de l'infection d'une plaie dans un service de brûlés à Annaba, en Algérie, en 2015 (Mellouk et al., 2017). De plus, des isolats ST219 et ST882 avaient déjà été détectés sur des sandwichs dans la ville de Bejaia (Yaici et al., 2017). On peut souligner que ces sandwichs sont composés de viande et de légumes et que les deux études ont été menées à la même période dans la même ville. La détection du même type de séquence dans des environnements différents (fruits et légumes frais, sandwich, hôpital) soulève des inquiétudes et encourage des investigations supplémentaires. Ainsi, pour être en mesure d'évaluer une encre clonale entre ces événements de détection de *K. pneumoniae* MDR, la MLST n'est pas suffisamment discriminante. En effet, pour retracer avec précision les sources de contamination, les approches basées sur le WGS telles que la cgMLST ou la wgMLST ou le typage par paires de polymorphisme mononucléotidique (SNP) par distance auraient été plus puissantes que la MLST (Pightling et al., 2018). Malheureusement, les données WGS des isolats des études algériennes précédentes n'étaient pas disponibles, alors que la MLST l'était (Mellouk et al., 2017; Yaici et al., 2017; Zenati et al., 2017).

La diversité des ST détectée parmi ces isolats de *K. pneumoniae* MDR indique que la dissémination de la résistance n'est pas associée à la propagation d'un clone unique mais plutôt à la dissémination de plasmides portant ces gènes. Ben Said et al. ont rapporté la même conclusion (Ben Said et al., 2015). De plus, en raison de la grande diversité des gènes de résistance acquis, de la charge plasmidique élevée, de la variabilité du contenu GC et de la large gamme écologique, Wyres et Holt ont qualifié *K. pneumoniae* de "trafiquant clé de gènes de résistance aux médicaments" (Wyres and Holt, 2018).

Alors que les aliments d'origine animale sont le plus souvent consommés cuits ou transformés, les fruits et légumes testés ici sont très souvent consommés crus et mal lavés. La possibilité d'un transfert de bactéries productrices de BLSE/AmpC vers l'intestin humain via la consommation d'aliments crus doit être explorée. Bien qu'il n'existe à ce jour aucune preuve directe de la colonisation de l'homme par un seul clone de *K. pneumoniae* provenant d'aliments ingérés, 10 auteurs différents ont également souligné le risque potentiel pour la santé lié à la consommation d'aliments crus contenant des bactéries multirésistantes (Ben Said et al., 2015; Blaak et al., 2014; Schwaiger et al., 2011; Veldman et al., 2014).

Aucune souche de *Salmonella* spp. n'a été trouvée dans notre étude. Rahman et al. ont observé que les échantillons de laitue étaient fortement contaminés par *Salmonella* spp., suivis par la coriandre, les épinards, le persil et les germes (Rahman et al., 2021). Plus de 100 000 échantillons de divers types de produits frais ont été étudiés aux États-Unis entre 2002 et 2012, ce qui a permis de détecter la présence de *Salmonella* spp. dans 51 sérotypes différents sur 152 échantillons. Sur les 51 sérotypes de *Salmonella*, 10 étaient résistants à différents antibiotiques. Les sérotypes de *Salmonella* identifiés étaient Oranienburg, Montevideo, Agona, Havana, Thompson, Poona, Kentucky, Tucson, Veneziana et un était inconnu, Tucson étant le plus répandu. Les sérotypes de *Salmonella* résistants aux antibiotiques Thompson, Poona et Kentucky ont été trouvés sur des échantillons de laitue (23,1 %), tandis que le sérotype Oranienburg a été trouvé sur un échantillon de cantaloup (6,7 %) (Reddy et al., 2016). Une autre étude menée en Malaisie a isolé des *S. enteritidis* multirésistants sur des carottes, résistants à l'AMP, l'AMX, le triméthoprim (TMP), l'acide nalidixique (NA), le triméthoprim-sulfaméthoxazole (SXT) et le chloramphénicol (CHL) (Kuan et al., 2017). Dans une étude en Thaïlande, *S. Stanley*, *S. Schwarzengrund* et *S. Rissen* ont été isolés à partir d'échantillons de laitue, parmi lesquels *S. Schwarzengrund* était résistant à l'AMP, au CHL et à la NA, tandis que *S. Rissen* était résistant à l'AMP, au SXT et au TET, et *S. Stanley* était résistant à la NA (Niyomdecha et al., 2016). Deux études menées en Malaisie ont révélé que d'autres sérotypes de *Salmonella*, tels que *S. Corvallis*, *S. Typhimurium* et *S. Enteritidis*, avaient été détectés dans des échantillons de légumes à feuilles, de water dropwort et de long bean, et qu'ils étaient par conséquent résistants à plusieurs antibiotiques (Abatcha et al., 2018; Najwa et al., 2015). Une étude réalisée au Mexique a observé des *Salmonella* multirésistantes dans des échantillons de laitue et de carotte avec une résistance à l'AMP, à la céphalotine (CHT), à la CHL, à la TET, à la CIP, à la NA, à la streptomycine (STR) et à la SXT (Miranda et al., 2009).

Dans une étude menée en République tchèque, Skočková et al. a détecté le gène de résistance à l'ampicilline *bla*<sub>TEM</sub>, et les gènes de résistance à la tétracycline *tetA* et *tetB* dans des *E. coli* isolés à partir d'échantillons d'asperges, de rucola, de poireaux et de radis (Skočková et al., 2013). Dans une étude réalisée en Chine, le gène de résistance à la colistine mobile (*mcr-1*) médié par un plasmide a été détecté dans des *E. coli* isolés à partir d'un échantillon de pomme, qui portait également dix autres gènes de résistance, notamment *aadA2*, *aadA1*, *floR*, *cmlA1*, *sul2*, *sul3*, *tetA*, *tetM*, *dfrA12*, *mdfA* (Yang et al., 2019). Des *E. coli* positifs pour Mcr-1 ont également été isolés de la carotte, du pak choi, de la laitue, de la tomate, de l'épinard et du concombre, et étaient résistants à la colistine (CST), à l'AMP, au GEN, au NA, au TET, au CIP, au céfotaxime (CTX), à la kanamycine (KAN), à la lévofloxacine (LVX), à la doxycycline (DOX) et à la fosfomycine (FOS) (Liu et al., 2019; Manageiro et al., 2020; Wood et al., 2015). Une étude menée en République tchèque a révélé que la majorité des isolats d'*E. coli* (13 sur 15) provenant de 108 échantillons de légumes crus étaient positifs pour un ou plusieurs ARG, notamment *qac*, *sul1*, *tetA*, *int*, *sul1*, *sul3*, *mer* et *tetB* (Pleva et al., 2018). Une étude menée en Allemagne a rapporté que 7 échantillons de légumes sur 245 étaient positifs pour des *E. coli* producteurs de  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE), et tous les isolats producteurs de BLSE étaient positifs pour les gènes *bla*<sub>CTX-M</sub> conférant une résistance aux céphalosporines de troisième génération (3GC) (Freitag et al., 2018).

Rahman et al. ont trouvé 25 articles traitant des risques sanitaires liés à la consommation de produits frais contaminés par des agents pathogènes résistants à un ou plusieurs antibiotiques. Cependant, les articles inclus dans cette revue n'ont pas effectué d'évaluation des risques de maladies d'origine alimentaire potentielles dues à la consommation de produits frais contaminés. Au lieu de cela, ces articles mentionnaient de manière générale que la consommation de légumes feuillus et non feuillus crus ou peu transformés peut être une source potentielle de maladies d'origine alimentaire et de maladies bactériennes invasives. En outre, la consommation de légumes contaminés sans traitement thermique ni cuisson peut permettre aux bactéries résistantes aux antibiotiques de survivre dans l'aliment et d'atteindre le passage gastro-intestinal humain (Rahman et al., 2021). De nombreuses études ont rapporté que les produits crus pouvaient être un vecteur de transmission des ARG à la flore intestinale commensale humaine (Abriouel et al., 2008; Iseppi et al., 2018; Kim et al., 2015; Shah et al., 2015). Les risques pour la santé publique associés à l'exposition aux BAR, en particulier aux *Enterobacteriaceae* résistantes aux 3GC, sont divers, allant du risque de maladies difficiles à

traiter, à la colonisation et au portage asymptomatique, au simple passage dans les intestins humains par des espèces environnementales (Pleva et al., 2018; van Hoek et al., 2015).

Les sources de contamination des produits frais par des agents pathogènes bactériens avant la récolte sont diverses et comprennent, entre autres, les sols, l'eau d'irrigation ou le fumier animal. *E. coli*, *Salmonella* spp. et *Staphylococcus* spp. ont été détectés dans les sols agricoles (Yang et al., 2019). Les espèces de *Pseudomonas*, en raison de leur présence dans les réservoirs environnementaux (par exemple, le sol et l'eau), sont fréquemment trouvées sur les légumes. Les légumes feuillus et non feuillus tels que les carottes présentent un risque élevé de contamination par des bactéries transmises par le sol, qu'elles proviennent du microbiote naturel du sol ou de l'engrais utilisé dans le sol (Allydice-Francis and Brown, 2012). Le fumier animal non traité était la cause la plus fréquente de propagation des bactéries résistantes aux antibiotiques avant la récolte dans les produits frais (Abatcha et al., 2018; Abriouel et al., 2008; Skočková et al., 2013). Les légumes à feuilles tels que le persil et les épinards d'eau qui poussent autour des marécages ou sur les berges des rivières peuvent être contaminés par les eaux usées rejetées dans ces plans d'eau par les industries, les abattoirs ou les usines de transformation (Abatcha et al., 2018). Les eaux de ruissellement des fermes d'élevage qui contiennent des BRA et des ARG, en raison de l'utilisation intensive d'antibiotiques dans l'alimentation et le traitement des animaux, peuvent contaminer l'eau d'irrigation, qui peut ensuite transférer les BRA aux produits frais. Les eaux usées municipales, traitées ou non, sont utilisées pour l'irrigation dans de nombreuses régions du monde ; l'absence d'installations de traitement des eaux usées est l'une des principales raisons de l'utilisation d'eaux usées non traitées dans les exploitations agricoles des pays à faible revenu, ce qui augmente le risque potentiel de contamination des produits par les bactéries résistantes aux antibiotiques (Shah et al., 2015).

Une mauvaise manipulation des produits frais pendant le traitement post-récolte, y compris la coupe, le lavage ou la désinfection, le transport, l'emballage ou le stockage, peut également créer des opportunités de contamination microbienne croisée (Iseppi et al., 2018; Usui et al., 2019). L'utilisation d'eau contaminée pendant le lavage post-récolte et la réutilisation de l'eau de lavage ont été mentionnées comme des raisons de la contamination des produits frais par des pathogènes bactériens (Skočková et al., 2013). La présence de particules de sol contaminées qui demeurent sous forme de résidus sur les produits frais après la récolte a été mentionnée comme une source potentielle de contamination des légumes par *Arcobacter* spp (González et al., 2017). Les mauvaises pratiques d'hygiène et d'assainissement

des manipulateurs d'aliments sont souvent négligées lorsqu'il s'agit de manipuler des légumes et des fruits sur les marchés de détail, alors qu'elles peuvent également être des sources importantes de contamination (Yang et al., 2019).

Les programmes de surveillance de la résistance aux antimicrobiens se concentrent principalement sur les aliments d'origine animale, mais la surveillance des réservoirs de résistance aux antimicrobiens dans les aliments d'origine non animale est tout aussi importante. Il s'agissait notamment de précautions générales visant à minimiser l'émergence et la propagation des BAAR, comme le contrôle de l'utilisation médicale et vétérinaire des antibiotiques. Pour prévenir la contamination des produits avant la récolte par les BAAR, plusieurs études ont recommandé d'éliminer correctement le fumier, de le traiter avant de l'utiliser comme engrais et d'améliorer la qualité de l'eau d'irrigation (Rahman et al., 2021). Pour prévenir la contamination post-récolte, les études ont suggéré que : (1) des pratiques d'assainissement et d'hygiène standard devraient être suivies par toutes les parties prenantes qui sont impliquées dans la production alimentaire et la chaîne d'approvisionnement ; (2) l'eau insalubre ou contaminée (recueillie dans les cours d'eau ou stockée dans des récipients ouverts) utilisée pour laver et arroser les fruits et légumes par les vendeurs devrait être réglementée et surveillée pour éviter toute contamination croisée potentielle ; (3) il faut utiliser des désinfectants sans chlore pour laver, sécher et emballer ou cirer les produits après la récolte ; et (4) quel que soit le type de marché, il faut améliorer les récipients et l'hygiène personnelle des vendeurs (Rahman et al., 2021). Les parties prenantes doivent respecter les bonnes pratiques agricoles et de fabrication afin de garantir la sécurité alimentaire des consommateurs (de Vasconcelos Byrne et al., 2016). En outre, des programmes de sensibilisation aux risques sanitaires liés à la consommation de fruits et légumes non lavés ou mal lavés peuvent être mis en œuvre (Raphael et al., 2011). Un lavage minutieux à l'eau claire et l'utilisation de produits chimiques antibactériens de qualité alimentaire pour tremper les légumes crus pendant une durée déterminée peuvent éliminer les agents pathogènes et réduire considérablement la charge microbienne.

Les rôles que jouent le bétail et la faune sauvage dans la contamination pathogène des fruits et légumes ainsi que leur épidémiologie à travers la chaîne alimentaire sont mal connus. Il est difficile de comparer les études disponibles car certaines ont utilisé des animaux naturellement contaminés, tandis que d'autres ont utilisé des animaux inoculés expérimentalement. Les mécanismes exacts de transport/transfert des agents pathogènes des matières fécales animales ou du fumier/sol contaminé vers les fruits et légumes via les

éclaboussures ne sont pas encore bien compris. Par exemple, il sera utile de comprendre les facteurs spatiaux spécifiques qui influencent le transfert des agents pathogènes des boulettes fécales aux fruits et légumes. Les temps de survie des agents pathogènes dans les contaminants fécaux, le fumier et les sols amendés par le fumier ne sont pas uniformes, ce qui reflète les conditions variables dans lesquelles bon nombre des études disponibles ont été menées. Le devenir des agents pathogènes à la surface du sol, la relation entre les agents pathogènes dérivés du fumier et les particules du sol, ainsi que les états dans lesquels se trouvent les agents pathogènes dans le lisier ou les mélanges de fumier, doivent être étudiés plus avant. Il convient d'étudier les mécanismes exacts d'absorption ou de (transmission) des agents pathogènes du fumier contaminé ou des sols amendés par le fumier aux plantes, en particulier dans les champs. Cela facilitera la conception de normes de sécurité des produits scientifiquement fondées. La majorité des études disponibles sur le transport des agents pathogènes dans les sols ont été réalisées en utilisant des sols naturels homogénéisés dans des colonnes de sol conçues en laboratoire. La diversification des conditions expérimentales facilitera le développement d'interventions efficaces au niveau des producteurs qui réduiront effectivement la probabilité de contamination des produits sur le terrain.

Il existe des opinions divergentes parmi les experts sur une variété de questions relatives à la sécurité des produits. En ce qui concerne les facteurs, les mécanismes et les principes qui favorisent l'internalisation compétente et la persistance des pathogènes sur les produits, il existe de nombreuses variations. Les études disponibles sont difficiles à comparer, en grande partie parce qu'elles ont été menées dans des circonstances physicochimiques, des types de microcosmes et des conditions expérimentales différents et qu'elles ont utilisé des souches distinctes. La plupart des études ont été menées dans des conditions environnementales disparates, et les données météorologiques précises nécessaires à l'interprétation des résultats provenant des diverses sources font défaut. Les résultats d'études portant sur une variété de culture peuvent en effet ne pas s'appliquer à d'autres variétés, par exemple, les données sur les pommes ne s'appliquent pas nécessairement à tous les fruits à pépins et les données sur la laitue romaine ne s'appliquent pas nécessairement à tous les légumes à feuilles. Dans la mesure du possible, les variétés présentant un plus grand potentiel de survie des agents pathogènes doivent être sélectionnées pour les recherches expérimentales. Une autre considération pertinente pour la sélection des cultures est la préférence pour les variétés qui sont indigènes à la région en question. Parmi les autres questions controversées apparemment triviales, citons la question de savoir si les feuilles extérieures sont beaucoup plus susceptibles

d'être contaminées par éclaboussures que les feuilles intérieures et si le potentiel de survie sur la face abaxiale des feuilles est plus élevé que sur la face adaxiale. Les implications des cellules dormantes, non divisées, des "persister" de certains agents pathogènes des plantes sur la capacité à résister aux stress environnementaux et à survivre longtemps, ainsi que les questions relatives à la résistance liée, font toujours l'objet d'un important débat de recherche. En outre, même si le dépôt atmosphérique semble être une voie peu commune de contamination pathogène pour les produits, il a été documenté comme une voie potentiellement importante (Beuchat, 2002; Harris et al., 2006).

Bien que de nombreuses études disponibles aient fait des efforts rigoureux pour simuler les circonstances de culture des produits, il est extrêmement difficile de créer des conditions environnementales précises/exactes dans un laboratoire. La plupart des études sont menées dans des conditions de laboratoire contrôlées. Des facteurs tels que l'activité biologique du sol, du fumier, de l'eau et des cultures, la chimie du sol et de l'eau ainsi que les éléments météorologiques tels que le vent, l'intensité des UV, la température et les précipitations sont tout simplement impossibles à reproduire dans des conditions de laboratoire. Les systèmes modèles à l'échelle du laboratoire peuvent fournir des détails importants sur le rôle des variables environnementales sur la croissance et la survie des agents pathogènes dans les environnements agricoles, mais la moindre modification des protocoles expérimentaux peut affecter la survie des agents pathogènes dans les agroécosystèmes. Malheureusement, les études réelles sur le terrain sont sujettes à des perturbations dues à des événements environnementaux imprévus tels que des conditions météorologiques extrêmes et des dommages déclenchés par des agents biologiques, notamment des insectes ou l'apparition de maladies végétales.

Il est donc hautement souhaitable de réaliser davantage d'études sur le terrain (où les pratiques et conditions agricoles typiques sont étroitement simulées) pour mieux comprendre le phénomène de la persistance. Des questions de sécurité et d'éthique limitent toutefois l'utilisation d'agents pathogènes en serre et la recherche sur le terrain. Des stratégies visant à améliorer les processus de bioconfinement et de décontamination existants doivent être développées et optimisées dès que possible. Une autre solution possible est de développer et d'optimiser des stratégies qui tiendront compte des variations expérimentales dans le développement de systèmes modèles. Une évaluation et une identification des variables environnementales qui influencent le sort des organismes testés devraient être incluses dans les plans expérimentaux. Cependant, malgré une planification méticuleuse, un essai sur le

terrain peut ne pas donner de résultats exploitables en raison de facteurs qui échappent au contrôle du chercheur. Par conséquent, il peut être nécessaire d'effectuer d'autres essais répétés. En outre, les pratiques agronomiques et de gestion agricole ne sont pas uniformes dans toutes les régions, et les pratiques de production diffèrent considérablement d'une région à l'autre en fonction des saisons et des régimes climatiques au sein d'une même région. Elles dépendent souvent de l'échelle de l'exploitation, du type de pratiques agricoles, etc. Les risques associés aux systèmes de culture conventionnels sont forcément différents de ceux des systèmes qui associent l'élevage intensif et les cultures arables. Outre les études générales, une approche au cas par cas doit être envisagée dans la mesure du possible (si les ressources financières et techniques, ainsi que d'autres circonstances, le permettent) car les opérations agricoles varient considérablement d'une exploitation à l'autre, ce qui influe sur le potentiel d'apparition, de survie, de prolifération et de dissémination des agents pathogènes.

# **Conclusion**

## Conclusion

Le potentiel des fruits et légumes à héberger des agents pathogènes est désormais bien reconnu, et il a été établi que les fruits et légumes sont un vecteur de maladies d'origine alimentaire. Les sources et voies d'entrée diverses et complexes des agents pathogènes entériques dans les fruits et légumes ont fait l'objet de nombreuses recherches. L'interaction entre l'utilisation des terres, la gestion de l'eau, les conditions météorologiques et les propriétés et sources spécifiques des agents pathogènes s'est avérée avoir des conséquences importantes sur la sécurité microbiologique des fruits et légumes frais. Des tentatives ont été faites pour comprendre le profil microbien général des produits frais, le comportement, le devenir et le transport des agents pathogènes, ainsi que leur localisation dans et sur les parties des plantes. Il existe de nombreuses informations sur les facteurs qui influent sur la contamination et la persistance des agents pathogènes sur les produits frais. À la lumière des preuves disponibles, des efforts importants doivent être déployés pour surveiller efficacement et illustrer les tendances récentes de l'apparition de maladies d'origine alimentaire associées à la consommation de fruits et légumes. Des partenariats et une collaboration entre tous les acteurs concernés, les producteurs commerciaux, les praticiens de la santé publique, les experts vétérinaires et de la sécurité alimentaire et les biologistes de terrain sont nécessaires pour garantir la sécurité des fruits et légumes livrés aux consommateurs.

Enfin, la nécessité de contrôler toutes les voies d'entrée potentielles des agents pathogènes a été établie et est constamment mise à l'épreuve par les régulateurs et autres spécialistes. Il existe de nombreux autres facteurs le long de la chaîne de production alimentaire qui peuvent prédisposer les produits à la contamination microbienne. Cependant, il est de la plus haute importance d'éviter et de contrôler la contamination microbienne des produits au stade de la pré-récolte. En effet, il a été démontré que le fumier, l'eau et le sol contaminés contaminent effectivement les produits, et la décontamination des produits, des sols arables pollués et des eaux souterraines s'est avérée être une entreprise très difficile et coûteuse.

La détection de ces *K. pneumoniae* MDR suggère que les fruits et légumes pourraient constituer une menace sous-estimée pour la santé publique, car cette source de contamination domestique est peu étudiée. Il est intéressant de noter que les fruits et légumes contaminés par ces *K. pneumoniae* MDR sont souvent consommés crus et mal lavés, ce qui peut entraîner le transfert des producteurs de BLSE/AmpC vers l'intestin humain. En fait, les programmes de

surveillance de la résistance aux antimicrobiens se sont surtout concentrés jusqu'à présent sur les aliments d'origine animale. La surveillance des réservoirs de résistance aux antimicrobiens dans les aliments d'origine non animale devrait également être envisagée. Enfin, il est prévu d'identifier formellement la ou les sources de contamination des fruits et légumes détectés au détail. D'autres études à chaque étape de la chaîne de production sont nécessaires pour pouvoir promouvoir des mesures d'hygiène fondées sur la science afin de limiter la propagation des bactéries porteuses de BLSE/AmpC dans nos foyers.

Les agents pathogènes multirésistants constituent une menace majeure pour la santé publique mondiale en raison de la fréquence croissante de la résistance aux antimicrobiens et de la réduction de l'efficacité des antibiotiques. Le manque de compréhension de la manière dont les entérobactéries productrices de BLSE apparaissent à l'interface du bétail, de la faune et de l'environnement, entrave notre capacité à développer des stratégies d'atténuation. La modélisation mathématique quantitative des risques de transmission des ARG/ARM peut aider à identifier les points de contrôle aux interfaces. Des technologies à haute résolution peuvent être nécessaires pour identifier avec précision les voies de transmission des MRA, afin de faciliter le suivi des agents pathogènes responsables dans les situations d'épidémie. On dispose de peu d'informations pour déterminer le porteur/réservoir naturel critique des bactéries productrices de BLSE. Des stratégies d'atténuation efficaces, telles que la gestion des exploitations, la biosécurité et l'hygiène, pourraient faciliter la réduction des bactéries productrices de BLSE dans le bétail. De nouvelles stratégies sont nécessaires pour combiner les connaissances des aspects environnementaux, animaux et bactériens afin de s'attaquer à ce problème mondial.

En conclusion, les fruits et légumes mal lavés ou insuffisamment cuits peuvent constituer un danger pour la santé publique car ils sont associés à des bactéries Gram-négatives résistantes à divers antibiotiques utilisés pour traiter des infections humaines critiques. Les fruits et légumes cultivés sur et dans le sol sont les plus contaminés. La fréquence de contamination des échantillons provenant des fermes est nettement inférieure à celle des échantillons provenant des marchés. Cette contamination accrue sur le marché pourrait refléter de mauvaises pratiques lors de la récolte et de la manipulation des fruits et légumes.

Ces résultats doivent être communiqués au grand public et aux professionnels des fruits et légumes. Tout d'abord, afin d'apprécier la nécessité de bonnes pratiques d'hygiène

domestique, le consommateur doit être conscient des risques sanitaires liés à la consommation de fruits et légumes qui ne sont pas correctement lavés. Deuxièmement, afin d'inciter les professionnels à agir, il faut observer de près et mettre en évidence les pratiques à risque, de la récolte à la vente au détail.

Nos travaux de recherche ont montré la réelle présence de  $\beta$ -lactamases (BLSE et pAmpC) dans les fruits et légumes habituellement consommés crus. D'autres études sur les fruits et légumes ont abouti aux mêmes conclusions du fait du transfert de gènes de résistance à l'homme via la consommation de fruits et légumes contaminées. Il est donc temps d'agir. La protection de la santé humaine nécessite le développement immédiat et la mise en œuvre de stratégies de gestion des risques par les autorités de chaque pays pour l'utilisation des  $\beta$ -lactamines, fluoroquinolones et autres antibiotiques.

Nos travaux ont montré la présence de  $\beta$ -lactamases dans les fruits et légumes. Néanmoins, l'origine et les voies de transmission de ces enzymes sur les fruits et légumes sont probablement plus complexes et nécessitent une plus profonde analyse. Ceci ouvre de nouvelles perspectives de recherche, qui peuvent être résumées comme suit :

- a) Elargir notre échantillonnage sur les différentes wilayas d'Algérie,
- b) Suivre le fruit ou le légume tout au long de sa chaîne de commercialisation, de la ferme jusqu'à l'assiette du consommateur, afin de définir l'étape et la source de contamination,
- c) Echanger et comparer avec d'autres pays, afin de définir les clones qui circulent,
- d) Etudier la pathogénicité et les facteurs de virulence des souches d'*Enterobacteriaceae* isolées dans notre étude pour identifier leur éventuelle incrimination dans les infections,
- e) Tester des méthodes de désinfection des fruits et légumes, afin d'avoir un produit de meilleure qualité pour la santé et mettre en place des règles d'hygiène.

# **Références bibliographiques**

## **Références bibliographiques**

- Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., Viñas, I., 2008. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *Int J Food Microbiol* 123, 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.013>
- Abatcha, M.G., Effarizah, M.E., Rusul, G., 2018. Prevalence, antimicrobial resistance, resistance genes and class 1 integrons of *Salmonella* serovars in leafy vegetables, chicken carcasses and related processing environments in Malaysian fresh food markets. *Food Control* 91, 170–180. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.039>
- Abriouel, H., Omar, N.B., Molinos, A.C., López, R.L., Grande, M.J., Martínez-Viedma, P., Ortega, E., Cañamero, M.M., Galvez, A., 2008. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. *Int J Food Microbiol* 123, 38–49. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.067>
- Alanis, A.J., 2005. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch Med Res* 36, 697–705. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.06.009>
- Alegbeleye, O.O., Singleton, I., Sant’Ana, A.S., 2018. Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review. *Food Microbiol* 73, 177–208. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.003>
- Al-Kharousi, Z.S., Guizani, N., Al-Sadi, A.M., Al-Bulushi, I.M., Shaharoon, B., 2016. Hiding in Fresh Fruits and Vegetables: Opportunistic Pathogens May Cross Geographical Barriers. *Int J Microbiol* 2016, 4292417. <https://doi.org/10.1155/2016/4292417>
- Allen, H.K., Donato, J., Wang, H.H., Cloud-Hansen, K.A., Davies, J., Handelsman, J., 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol* 8, 251–259. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2312>
- Allos, B.M., Moore, M.R., Griffin, P.M., Tauxe, R.V., 2004. Surveillance for sporadic foodborne disease in the 21st century: the FoodNet perspective. *Clin Infect Dis* 38 Suppl 3, S115-120. <https://doi.org/10.1086/381577>
- Allydice-Francis, K., Brown, P.D., 2012. Diversity of Antimicrobial Resistance and Virulence Determinants in *Pseudomonas aeruginosa* Associated with Fresh Vegetables. *Int J Microbiol* 2012, 426241. <https://doi.org/10.1155/2012/426241>
- Andersson, D.I., Hughes, D., 2014. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Microbiol* 12, 465–478. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3270>

- Andersson, D.I., Hughes, D., 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol* 8, 260–271. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2319>
- Arnold, K.E., Williams, N.J., Bennett, M., 2016. “Disperse abroad in the land”: the role of wildlife in the dissemination of antimicrobial resistance. *Biol Lett* 12, 20160137. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2016.0137>
- Avery, S.M., Moore, A., Hutchison, M.L., 2004. Fate of *Escherichia coli* originating from livestock faeces deposited directly onto pasture. *Lett Appl Microbiol* 38, 355–359. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01501.x>
- Bachiri, T., Bakour, S., Ladjouzi, R., Thongpan, L., Rolain, J.M., Touati, A., 2017. High rates of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in wild boars and Barbary macaques in Algeria. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 8, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.10.005>
- Bartz, F.E., Lickness, J.S., Heredia, N., Fabiszewski de Aceituno, A., Newman, K.L., Hodge, D.W., Jaykus, L.-A., García, S., Leon, J.S., 2017. Contamination of Fresh Produce by Microbial Indicators on Farms and in Packing Facilities: Elucidation of Environmental Routes. *Appl Environ Microbiol* 83, e02984-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.02984-16>
- Bassetti, M., Pecori, D., Sibani, M., Corcione, S., De Rosa, F.G., 2015. Epidemiology and Treatment of MDR *Enterobacteriaceae*. *Curr Treat Options Infect Dis* 7, 291–316. <https://doi.org/10.1007/s40506-015-0065-1>
- Batah, R., Loucif, L., Olaitan, A.O., Boutefnouchet, N., Allag, H., Rolain, J.-M., 2015. Outbreak of *Serratia marcescens* Coproducing ArmA and CTX-M-15 Mediated High Levels of Resistance to Aminoglycoside and Extended-Spectrum Beta-Lactamases, Algeria. *Microbial Drug Resistance* 21, 470–476. <https://doi.org/10.1089/mdr.2014.0240>
- Belbel, Z., Chettibi, H., Dekhil, M., Ladjama, A., Nedjai, S., Rolain, J.-M., 2014. Outbreak of an armA Methyltransferase-Producing ST39 *Klebsiella pneumoniae* Clone in a Pediatric Algerian Hospital. *Microbial Drug Resistance* 20, 310–315. <https://doi.org/10.1089/mdr.2013.0193>
- Ben Said, L., Jouini, A., Alonso, C.A., Klibi, N., Dziri, R., Boudabous, A., Ben Slama, K., Torres, C., 2016. Characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)- and pAmpC beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* of water samples in Tunisia. *Sci Total Environ* 550, 1103–1109. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.042>
- Ben Said, L., Jouini, A., Klibi, N., Dziri, R., Alonso, C.A., Boudabous, A., Ben Slama, K., Torres, C., 2015. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia. *Int J Food Microbiol* 203, 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.023>

- Berger, C.N., Sodha, S.V., Shaw, R.K., Griffin, P.M., Pink, D., Hand, P., Frankel, G., 2010. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environ Microbiol* 12, 2385–2397. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02297.x>
- Beuchat, L.R., 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes Infect* 4, 413–423. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(02\)01555-1](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(02)01555-1)
- Bihn, E., 2022. Survey Of Current Water Use Practices On Fresh Fruit And Vegetable Farms And Evaluation Of Microbiological Quality Of Surface Waters Intended For Fresh Produce Production.
- Blaak, H., van Hoek, A.H.A.M., Veenman, C., Docters van Leeuwen, A.E., Lynch, G., van Overbeek, W.M., de Roda Husman, A.M., 2014. Extended spectrum  $\beta$ -lactamase- and constitutively AmpC-producing *Enterobacteriaceae* on fresh produce and in the agricultural environment. *Int J Food Microbiol* 168–169, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.006>
- Buck, J.W., Walcott, R., 2003. Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables. Online. *Plant Health Progress* 121.
- C, L., K, B., N, V., Jm, C., 2008. Control of enteric pathogens in ready-to-eat vegetable crops in organic and “low input” production systems: a HACCP-based approach. *Journal of applied microbiology* 105. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03794.x>
- Callejón, R.M., Rodríguez-Naranjo, M.I., Ubeda, C., Hornedo-Ortega, R., Garcia-Parrilla, M.C., Troncoso, A.M., 2015. Reported foodborne outbreaks due to fresh produce in the United States and European Union: trends and causes. *Foodborne Pathog Dis* 12, 32–38. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1821>
- Campos, J., Mourão, J., Pestana, N., Peixe, L., Novais, C., Antunes, P., 2013. Microbiological quality of ready-to-eat salads: an underestimated vehicle of bacteria and clinically relevant antibiotic resistance genes. *Int J Food Microbiol* 166, 464–470. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.005>
- Canton, R., Gonzalez-Alba, J.M., Galán, J.C., 2012. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Frontiers in Microbiology* 3.
- Carattoli, A., 2009. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 2227–2238. <https://doi.org/10.1128/AAC.01707-08>
- Chee-Sanford, J.C., Mackie, R.I., Koike, S., Krapac, I.G., Lin, Y.-F., Yannarell, A.C., Maxwell, S., Aminov, R.I., 2009. Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste. *J Environ Qual* 38, 1086–1108. <https://doi.org/10.2134/jeq2008.0128>

- Coque, T.M., Baquero, F., Canton, R., 2008. Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Euro Surveill* 13, 19044.
- da Costa, P.M., Loureiro, L., Matos, A.J.F., 2013. Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: the interface between humans, animals and the environment. *Int J Environ Res Public Health* 10, 278–294. <https://doi.org/10.3390/ijerph10010278>
- Dahms, C., Hübner, N.-O., Kossow, A., Mellmann, A., Dittmann, K., Kramer, A., 2015. Occurrence of ESBL-Producing *Escherichia coli* in Livestock and Farm Workers in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany. *PLoS One* 10, e0143326. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143326>
- Day, D.L., Funk, T.L., Hatfield, J.L., Stewart, B.A., 1998. Processing manure: physical, chemical and biological treatment. *Animal waste utilization: effective use of manure as a soil resource* 243–282.
- de Vasconcelos Byrne, V., Hofer, E., Vallim, D.C., de Castro Almeida, R.C., 2016. Occurrence and antimicrobial resistance patterns of *Listeria monocytogenes* isolated from vegetables. *Braz J Microbiol* 47, 438–443. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.033>
- Deering, A.J., Mauer, L.J., Pruitt, R.E., 2012. Internalization of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in plants: A review. *Food Research International, Salmonella in Foods: Evolution, Strategies and Challenges* 45, 567–575. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.058>
- Demirjian, A., Sanchez, G.V., Finkelstein, J.A., Ling, S.M., Srinivasan, A., Pollack, L.A., Hicks, L.A., Iskander, J.K., 2015. CDC Grand Rounds: Getting Smart About Antibiotics. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 64, 871–873. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6432a3>
- Denis, N., Zhang, H., Leroux, A., Trudel, R., Bietlot, H., 2016. Prevalence and trends of bacterial contamination in fresh fruits and vegetables sold at retail in Canada. *Food Control* 67. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.047>
- Devarajan, N., Laffite, A., Mulaji, C.K., Otamonga, J.-P., Mpiana, P.T., Mubedi, J.I., Prabakar, K., Ibelings, B.W., Poté, J., 2016. Occurrence of Antibiotic Resistance Genes and Bacterial Markers in a Tropical River Receiving Hospital and Urban Wastewaters. *PLoS One* 11, e0149211. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149211>
- Df, M., Ey, B., M, L., Dw, S., Bd, F., 2016. Microbiology of organic and conventionally grown fresh produce. *Brazilian journal of microbiology* : [publication of the Brazilian Society for Microbiology] 47 Suppl 1. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.006>

- Diacono, M., Montemurro, F., 2010. Long-Term Effects of Organic Amendments on Soil Fertility. A Review. *Agronomy for Sustainable Development* 30. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-0394-0\\_34](https://doi.org/10.1007/978-94-007-0394-0_34)
- Dorado-García, A., Smid, J.H., van Pelt, W., Bonten, M.J.M., Fluit, A.C., van den Bunt, G., Wagenaar, J.A., Hordijk, J., Dierikx, C.M., Veldman, K.T., de Koeijer, A., Dohmen, W., Schmitt, H., Liakopoulos, A., Pacholewicz, E., Lam, T.J.G.M., Velthuis, A.G., Heuvelink, A., Gonggrijp, M.A., van Duijkeren, E., van Hoek, A.H.A.M., de Roda Husman, A.M., Blaak, H., Havelaar, A.H., Mevius, D.J., Heederik, D.J.J., 2018. Molecular relatedness of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from humans, animals, food and the environment: a pooled analysis. *J Antimicrob Chemother* 73, 339–347. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx397>
- Drieux, L., Brossier, F., Sougakoff, W., Jarlier, V., 2008. Phenotypic detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. *Clinical Microbiology and Infection* 14, 90–103. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01846.x>
- Durso, L.M., Cook, K.L., 2014. Impacts of antibiotic use in agriculture: what are the benefits and risks? *Curr Opin Microbiol* 19, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.05.019>
- Enoch, D.A., Brown, F., Sismey, A.W., Mlangeni, D.A., Curran, M.D., Karas, J.A., Cone, D.B., Aliyu, S.H., Dhanji, H., Doumith, M., Maharjan, S., Meunier, D., Woodford, N., 2012. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a UK district hospital; an observational study. *J Hosp Infect* 81, 270–277. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2012.05.006>
- Faour-Klingbeil, D., Murtada, M., Kuri, V., Todd, E.C.D., 2016. Understanding the routes of contamination of ready-to-eat vegetables in the Middle East. *Food Control* 62, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.024>
- FDA, U., 2017. Summary report on antimicrobials sold or distributed for use in food-producing animals.
- Forsberg, K.J., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E.M., Sommer, M.O.A., Dantas, G., 2012. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science* 337, 1107–1111. <https://doi.org/10.1126/science.1220761>
- Franz, E., van Diepeningen, A.D., de Vos, O.J., van Bruggen, A.H.C., 2005. Effects of cattle feeding regimen and soil management type on the fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar typhimurium in manure, manure-amended soil, and lettuce. *Appl Environ Microbiol* 71, 6165–6174. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.6165-6174.2005>
- Freitag, C., Michael, G.B., Li, J., Kadlec, K., Wang, Y., Hassel, M., Schwarz, S., 2018. Occurrence and characterisation of ESBL-encoding plasmids among *Escherichia coli*

- isolates from fresh vegetables. *Vet Microbiol* 219, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.03.028>
- Garedew, L., Hagos, Z., Zegeye, B., Addis, Z., 2016. The detection and antimicrobial susceptibility profile of *Shigella* isolates from meat and swab samples at butchers' shops in Gondar town, Northwest Ethiopia. *J Infect Public Health* 9, 348–355. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2015.10.015>
- Gautam, S.S., KC, R., Leong, K.W., Mac Aogáin, M., O'Toole, R.F., 2019. A step-by-step beginner's protocol for whole genome sequencing of human bacterial pathogens. *J Biol Methods* 6, e110. <https://doi.org/10.14440/jbm.2019.276>
- Gaze, W.H., Zhang, L., Abdousslam, N.A., Hawkey, P.M., Calvo-Bado, L., Royle, J., Brown, H., Davis, S., Kay, P., Boxall, A.B.A., Wellington, E.M.H., 2011. Impacts of anthropogenic activity on the ecology of class 1 integrons and integron-associated genes in the environment. *ISME J* 5, 1253–1261. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.15>
- Gharout-Sait, A., Touati, A., Benallaoua, S., Guillard, T., Brasme, L., Madoux, J., Champs, C.D., 2012. CTX-M from community-acquired urinary tract infections in Algeria. *AJMR* 6, 5306–5313. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.1478>
- Gharout-Sait, A., Touati, A., Guillard, T., Brasme, L., de Champs, C., 2015. Molecular characterization and epidemiology of cefoxitin resistance among *Enterobacteriaceae* lacking inducible chromosomal ampC genes from hospitalized and non-hospitalized patients in Algeria: description of new sequence type in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Braz J Infect Dis* 19, 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2014.12.001>
- González, A., Bayas Morejón, I.F., Ferrús, M.A., 2017. Isolation, molecular identification and quinolone-susceptibility testing of *Arcobacter* spp. isolated from fresh vegetables in Spain. *Food Microbiol* 65, 279–283. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.02.011>
- Goss, M., Tubeileh, A., Goorahoo, D., 2013. A Review of the Use of Organic Amendments and the Risk to Human Health. *Advances in Agronomy* 120, 275–379. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407686-0.00005-1>
- Gs, J., Gb, B., Bt, H., S, B., Y, W., Lm, R., 2005. Potential uptake of *Escherichia coli* O157:H7 from organic manure into crisphead lettuce. *Applied and environmental microbiology* 71. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2221-2225.2005>
- Hackl, E., Hölzl, C., Konlechner, C., Sessitsch, A., 2013. Food of plant origin: production methods and microbiological hazards linked to food-borne disease. Reference: CFT/EFSA/BIOHAZ/2012/01 Lot 1 (Food of plant origin with high water content such as fruits, vegetables, juices and herbs). EFSA Supporting Publications 10, 402E. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2013.EN-402>

- Haque, A., Yoshizumi, A., Saga, T., Ishii, Y., Tateda, K., 2014. ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in environmental water in Dhaka, Bangladesh. *J Infect Chemother* 20, 735–737. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2014.07.003>
- Harris, L., Farber, J., Beuchat, L.R., Parish, M., Suslow, T., Garrett, E.H., Busta, F., 2006. Outbreaks Associated with Fresh Produce: Incidence, Growth, and Survival of Pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2, 78–141. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00031.x>
- Hart, W.S., Heuzenroeder, M.W., Barton, M.D., 2006. A study of the transfer of tetracycline resistance genes between *Escherichia coli* in the intestinal tract of a mouse and a chicken model. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 53, 333–340. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2006.00967.x>
- Hartmann, A., Locatelli, A., Amoureux, L., Depret, G., Jolivet, C., Gueneau, E., Neuwirth, C., 2012. Occurrence of CTX-M Producing *Escherichia coli* in Soils, Cattle, and Farm Environment in France (Burgundy Region). *Front Microbiol* 3, 83. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00083>
- Havelaar, A.H., Brul, S., de Jong, A., de Jonge, R., Zwietering, M.H., Ter Kuile, B.H., 2010. Future challenges to microbial food safety. *Int J Food Microbiol* 139 Suppl 1, S79-94. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.015>
- Heaton, J.C., Jones, K., 2008. Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *J Appl Microbiol* 104, 613–626. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03587.x>
- Henriques, I., Moura, A., Alves, A., Saavedra, M.J., Correia, A., 2006. Analysing diversity among beta-lactamase encoding genes in aquatic environments. *FEMS Microbiol Ecol* 56, 418–429. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00073.x>
- Hinthong, W., Pumipuntu, N., Santajit, S., Kulpeanprasit, S., Buranasinsup, S., Sookrung, N., Chaicumpa, W., Aiumurai, P., Indrawattana, N., 2017. Detection and drug resistance profile of *Escherichia coli* from subclinical mastitis cows and water supply in dairy farms in Saraburi Province, Thailand. *PeerJ* 5, e3431. <https://doi.org/10.7717/peerj.3431>
- Hölzel, C.S., Tetens, J.L., Schwaiger, K., 2018. Unraveling the Role of Vegetables in Spreading Antimicrobial-Resistant Bacteria: A Need for Quantitative Risk Assessment. *Foodborne Pathog Dis* 15, 671–688. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2501>
- Horigan, V., Kosmider, R.D., Horton, R.A., Randall, L., Simons, R.R.L., 2016. An assessment of evidence data gaps in the investigation of possible transmission routes of extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* from livestock to

- humans in the UK. *Prev Vet Med* 124, 1–8.  
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.12.020>
- Hou, J., Wan, W., Mao, D., Wang, C., Mu, Q., Qin, S., Luo, Y., 2015. Occurrence and distribution of sulfonamides, tetracyclines, quinolones, macrolides, and nitrofurans in livestock manure and amended soils of Northern China. *Environ Sci Pollut Res Int* 22, 4545–4554. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3632-y>
- Huddleston, J.R., 2014. Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Infect Drug Resist* 7, 167–176.  
<https://doi.org/10.2147/IDR.S48820>
- Ingham, S.C., Losinski, J.A., Andrews, M.P., Breuer, J.E., Breuer, J.R., Wood, T.M., Wright, T.H., 2004. *Escherichia coli* contamination of vegetables grown in soils fertilized with noncomposted bovine manure: garden-scale studies. *Appl Environ Microbiol* 70, 6420–6427. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6420-6427.2004>
- Irrgang, A., Hammerl, J.A., Falgenhauer, L., Guiral, E., Schmoger, S., Imirzalioglu, C., Fischer, J., Guerra, B., Chakraborty, T., Käsbohrer, A., 2018. Diversity of CTX-M-1-producing *E. coli* from German food samples and genetic diversity of the blaCTX-M-1 region on IncII ST3 plasmids. *Vet Microbiol* 221, 98–104.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.06.003>
- Iseppi, R., de Niederhäusern, S., Bondi, M., Messi, P., Sabia, C., 2018. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase, AmpC, and MBL-Producing Gram-Negative Bacteria on Fresh Vegetables and Ready-to-Eat Salads Sold in Local Markets. *Microb Drug Resist* 24, 1156–1164.  
<https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0198>
- Jakobsen, L., Bortolaia, V., Bielak, E., Moodley, A., Olsen, S.S., Hansen, D.S., Frimodt-Møller, N., Guardabassi, L., Hasman, H., 2015. Limited similarity between plasmids encoding CTX-M-1  $\beta$ -lactamase in *Escherichia coli* from humans, pigs, cattle, organic poultry layers and horses in Denmark. *J Glob Antimicrob Resist* 3, 132–136.  
<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2015.03.009>
- James, J., 2005. Overview of Microbial Hazards in Fresh Fruit and Vegetables Operations, in: *Microbial Hazard Identification in Fresh Fruit and Vegetables*. pp. 1–36.  
<https://doi.org/10.1002/0470007761.ch1>
- Jay-Russell, M.T., Madigan, J.E., Bengson, Y., Madigan, S., Hake, A.F., Foley, J.E., Byrne, B.A., 2014. Salmonella Oranienburg isolated from horses, wild turkeys and an edible home garden fertilized with raw horse manure. *Zoonoses Public Health* 61, 64–71.  
<https://doi.org/10.1111/zph.12043>
- Jia, B., Raphenya, A.R., Alcock, B., Waglechner, N., Guo, P., Tsang, K.K., Lago, B.A., Dave, B.M., Pereira, S., Sharma, A.N., Doshi, S., Courtot, M., Lo, R., Williams, L.E., Frye, J.G., Elsayegh, T., Sardar, D., Westman, E.L., Pawlowski, A.C., Johnson, T.A.,

- Brinkman, F.S.L., Wright, G.D., McArthur, A.G., 2017. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res* 45, D566–D573. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1004>
- Johannessen, G.S., Bengtsson, G.B., Heier, B.T., Bredholt, S., Wasteson, Y., Rørvik, L.M., 2005. Potential uptake of *Escherichia coli* O157:H7 from organic manure into crisphead lettuce. *Appl Environ Microbiol* 71, 2221–2225. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2221-2225.2005>
- Jones-Dias, D., Manageiro, V., Caniça, M., 2016. Influence of agricultural practice on mobile bla genes: IncI1-bearing CTX-M, SHV, CMY and TEM in *Escherichia coli* from intensive farming soils. *Environ Microbiol* 18, 260–272. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13021>
- Jung, Y., Jang, H., Matthews, K.R., 2014. Effect of the food production chain from farm practices to vegetable processing on outbreak incidence. *Microb Biotechnol* 7, 517–527. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12178>
- Karkman, A., Do, T.T., Walsh, F., Virta, M.P.J., 2018. Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water. *Trends Microbiol* 26, 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.09.005>
- Kim, H.-S., Chon, J.-W., Kim, Y.-J., Kim, D.-H., Kim, M., Seo, K.-H., 2015. Prevalence and characterization of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in ready-to-eat vegetables. *Int J Food Microbiol* 207, 83–86. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.049>
- Kirby, R., Bartram, J., Carr, R., 2003. Water in food production and processing: Quantity and quality concerns. *Food Control* 14, 283–299. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(02\)00090-7](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(02)00090-7)
- Kisluk, G., Yaron, S., 2012. Presence and persistence of *Salmonella enterica* serotype typhimurium in the phyllosphere and rhizosphere of spray-irrigated parsley. *Appl Environ Microbiol* 78, 4030–4036. <https://doi.org/10.1128/AEM.00087-12>
- Köpke, U., Kraemer, J., Leifert, C., 2007. Pre-harvest strategies to ensure the microbiological safety of fruit and vegetables from manure-based production systems. *Handbook of Organic Food Safety and Quality* 413–429. <https://doi.org/10.1533/9781845693411.3.413>
- Kotzekidou, P., 2016. Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods, *Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods*.
- Kozak, G.K., MacDonald, D., Landry, L., Farber, J.M., 2013. Foodborne outbreaks in Canada linked to produce: 2001 through 2009. *J Food Prot* 76, 173–183. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-126>

- Kuan, C.H., Rukayadi, Y., Ahmad, S.H., Radzi, C.W.J.W.M., Kuan, C.S., Yeo, S.K., Thung, T.Y., New, C.Y., Chang, W.S., Loo, Y.Y., Tan, C.W., Ramzi, O.S.B., Fadzil, S.N.M., Nordin, Y., Kwan, S.Y., Son, R., 2017. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis* isolated from vegetable farms and retail markets in Malaysia. *International Food Research Journal* 24, 1831–1839.
- Leverstein-van Hall, M.A., Dierikx, C.M., Cohen Stuart, J., Voets, G.M., van den Munckhof, M.P., van Essen-Zandbergen, A., Platteel, T., Fluit, A.C., van de Sande-Bruinsma, N., Scharinga, J., Bonten, M.J.M., Mevius, D.J., National ESBL surveillance group, 2011. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin Microbiol Infect* 17, 873–880. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03497.x>
- Lifshitz, Z., Sturlesi, N., Parizade, M., Blum, S.E., Gordon, M., Taran, D., Adler, A., 2018. Distinctiveness and Similarities Between Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Cattle and the Community in Israel. *Microb Drug Resist* 24, 868–875. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0407>
- Liu, B.-T., Li, X., Zhang, Q., Shan, H., Zou, M., Song, F.-J., 2019. Colistin-Resistant *mcr*-Positive *Enterobacteriaceae* in Fresh Vegetables, an Increasing Infectious Threat in China. *Int J Antimicrob Agents* 54, 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.04.013>
- Liu, B.-T., Song, F.-J., 2019. Emergence of two *Escherichia coli* strains co-harboring *mcr*-1 and *bla* NDM in fresh vegetables from China. *Infect Drug Resist* 12, 2627–2635. <https://doi.org/10.2147/IDR.S211746>
- Lorin, H.E., Costa, M.S. de M., COSTA, L.A., Pereira, D.C., Carneiro, L.J., 2016. Stabilization of confined beef cattle manure: characteristics of produced fertilizers. *Engenharia Agrícola* 36, 877–885.
- Lynch, M.F., Tauxe, R.V., Hedberg, C.W., 2009. The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. *Epidemiol Infect* 137, 307–315. <https://doi.org/10.1017/S0950268808001969>
- Maffei, D.F., Batalha, E.Y., Landgraf, M., Schaffner, D.W., Franco, B.D.G.M., 2016. Microbiology of organic and conventionally grown fresh produce. *Braz J Microbiol* 47 Suppl 1, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.006>
- Manageiro, V., Jones-Dias, D., Ferreira, E., Caniça, M., 2020. Plasmid-Mediated Colistin Resistance (*mcr*-1) in *Escherichia coli* from Non-Imported Fresh Vegetables for Human Consumption in Portugal. *Microorganisms* 8, 429. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030429>

- Manyi-Loh, C.E., Mamphweli, S.N., Meyer, E.L., Makaka, G., Simon, M., Okoh, A.I., 2016. An Overview of the Control of Bacterial Pathogens in Cattle Manure. *Int J Environ Res Public Health* 13, 843. <https://doi.org/10.3390/ijerph13090843>
- Markland, S., Weppelmann, T.A., Ma, Z., Lee, S., Mir, R.A., Teng, L., Ginn, A., Lee, C., Ukhanova, M., Galindo, S., Carr, C., DiLorenzo, N., Ahn, S., Mah, J.-H., Kim, H.-Y., Mai, V., Mobley, R., Morris, J.G., Jeong, K.C., 2019. High Prevalence of Cefotaxime Resistant Bacteria in Grazing Beef Cattle: A Cross Sectional Study. *Front Microbiol* 10, 176. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00176>
- Martínez-Pérez, P.A., Hyndman, T.H., Fleming, P.A., 2020. Haematology and blood chemistry in free-ranging quokkas (*Setonix brachyurus*): Reference intervals and assessing the effects of site, sampling time, and infectious agents. *PLoS One* 15, e0239060. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239060>
- Meerburg, B.G., Kijlstra, A., 2007. Role of rodents in transmission of *Salmonella* and *Campylobacter*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87, 2774–2781. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3004>
- Mellouk, F.Z., Bakour, S., Meradji, S., Al-Bayssari, C., Bentakouk, M.C., Zouyed, F., Djahoudi, A., Boutefnouchet, N., Rolain, J.M., 2017. First Detection of VIM-4-Producing *Pseudomonas aeruginosa* and OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Northeastern (Annaba, Skikda) Algeria. *Microb Drug Resist* 23, 335–344. <https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0032>
- Mesa, R.J., Blanc, V., Blanch, A.R., Cortés, P., González, J.J., Lavilla, S., Miró, E., Muniesa, M., Saco, M., Tórtola, M.T., Mirelis, B., Coll, P., Llagostera, M., Prats, G., Navarro, F., 2006. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J Antimicrob Chemother* 58, 211–215. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl211>
- Messai, Y., Iabadene, H., Benhassine, T., Alouache, S., Tazir, M., Gautier, V., Arlet, G., Bakour, R., 2008. Prevalence and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). *Pathologie Biologie* 56, 319–325. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2008.05.008>
- Miranda, J.M., Mondragón, A.C., Martínez, B., Guarddon, M., Rodríguez, J.A., 2009. Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* from different raw foods in Mexico. *J Food Prot* 72, 966–971. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-72.5.966>
- Moodley, A., Guardabassi, L., 2009. Transmission of IncN plasmids carrying blaCTX-M-1 between commensal *Escherichia coli* in pigs and farm workers. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 1709–1711. <https://doi.org/10.1128/AAC.01014-08>

- Mshana, S.E., Hain, T., Domann, E., Lyamuya, E.F., Chakraborty, T., Imirzalioglu, C., 2013. Predominance of *Klebsiella pneumoniae* ST14 carrying CTX-M-15 causing neonatal sepsis in Tanzania. *BMC Infect Dis* 13, 466. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-466>
- Müller, A., Stephan, R., Nüesch-Inderbilen, M., 2016. Distribution of virulence factors in ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from the environment, livestock, food and humans. *Sci Total Environ* 541, 667–672. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.135>
- Najwa, M.S., Rukayadi, Y., Ubong, A., Loo, Y.Y., Chang, W.S., Lye, Y.L., Thung, T.Y., Aimi, S.A., Malcolm, T.T.H., Goh, S.G., Kuan, C.H., Yoshitsugu, N., Nishibuchi, M., Son, R., 2015. Quantification and antibiotic susceptibility of *Salmonella* spp., *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in raw vegetables (ulam). *International Food Research Journal* 22, 1761–1769.
- Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., Carattoli, A., 2017. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 41, 252–275. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux013>
- Negreanu, Y., Pasternak, Z., Jurkevitch, E., Cytryn, E., 2012. Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in agricultural soils. *Environ Sci Technol* 46, 4800–4808. <https://doi.org/10.1021/es204665b>
- Nesme, J., Cécillon, S., Delmont, T.O., Monier, J.-M., Vogel, T.M., Simonet, P., 2014. Large-scale metagenomic-based study of antibiotic resistance in the environment. *Curr Biol* 24, 1096–1100. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.036>
- Niyomdech, N., Mungkorakaew, N., Samosornsuk, W., 2016. SEROTYPES AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF *SALMONELLA ENTERICA* ISOLATED FROM PORK, CHICKEN MEAT AND LETTUCE, BANGKOK AND CENTRAL THAILAND. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 47, 31–39.
- Njage, P.M.K., Buys, E.M., 2015. Pathogenic and commensal *Escherichia coli* from irrigation water show potential in transmission of extended spectrum and AmpC  $\beta$ -lactamases determinants to isolates from lettuce. *Microb Biotechnol* 8, 462–473. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12234>
- Nordmann, P., Poirel, L., Dortet, L., 2012. Rapid Detection of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 18, 1503–1507. <https://doi.org/10.3201/eid1809.120355>
- Noyes, N.R., Yang, X., Linke, L.M., Magnuson, R.J., Dettenwanger, A., Cook, S., Geornaras, I., Woerner, D.E., Gow, S.P., McAllister, T.A., Yang, H., Ruiz, J., Jones, K.L., Boucher, C.A., Morley, P.S., Belk, K.E., 2016. Resistome diversity in cattle and the

- environment decreases during beef production. *Elife* 5, e13195. <https://doi.org/10.7554/eLife.13195>
- Nüesch-Inderbinen, M., Zurfluh, K., Peterhans, S., Hächler, H., Stephan, R., 2015. Assessment of the Prevalence of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in Ready-to-Eat Salads, Fresh-Cut Fruit, and Sprouts from the Swiss Market. *J Food Prot* 78, 1178–1181. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-018>
- Olaimat, A.N., Holley, R.A., 2012. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. *Food Microbiol* 32, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.04.016>
- Osterblad, M., Pensala, O., Peterzéns, M., Helenius, H., Huovinen, P., 1999. Antimicrobial susceptibility of *Enterobacteriaceae* isolated from vegetables. *J Antimicrob Chemother* 43, 503–509. <https://doi.org/10.1093/jac/43.4.503>
- Pachepsky, Y., Shelton, D., Patel, J., Mandrell, R., 2011. Irrigation Waters as a Source of Pathogenic Microorganisms in Produce. A Review. *Advances in Agronomy - ADVAN AGRON* 113, 73–138. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386473-4.00007-5>
- Papp-Wallace, K.M., 2019. The latest advances in  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitor combinations for the treatment of Gram-negative bacterial infections. *Expert Opin Pharmacother* 20, 2169–2184. <https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1660772>
- Park, S., Navratil, S., Gregory, A., Bauer, A., Srinath, I., Szonyi, B., Nightingale, K., Anciso, J., Jun, M., Han, D., Lawhon, S., Ivanek, R., 2015. Multifactorial effects of ambient temperature, precipitation, farm management, and environmental factors determine the level of generic *Escherichia coli* contamination on preharvested spinach. *Appl Environ Microbiol* 81, 2635–2650. <https://doi.org/10.1128/AEM.03793-14>
- Pérez-Rodríguez, F., Mercanoglu Taban, B., 2019. A State-of-Art Review on Multi-Drug Resistant Pathogens in Foods of Animal Origin: Risk Factors and Mitigation Strategies. *Front Microbiol* 10, 2091. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02091>
- Pightling, A.W., Pettengill, J.B., Luo, Y., Baugher, J.D., Rand, H., Strain, E., 2018. Interpreting Whole-Genome Sequence Analyses of Foodborne Bacteria for Regulatory Applications and Outbreak Investigations. *Front Microbiol* 9, 1482. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01482>
- Pignato, S., Coniglio, M.A., Faro, G., Weill, F.X., Giammanco, G., 2009. Plasmid-mediated multiple antibiotic resistance of *Escherichia coli* in crude and treated wastewater used in agriculture. *J Water Health* 7, 251–258. <https://doi.org/10.2166/wh.2009.019>
- Pleva, P., Janalí-ková, M., Pavlí-čková, S., Lecomte, M., Godillon, T., Holko, I., 2018. Characterization of *Escherichia coli* strains isolated from raw vegetables.

- Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences 12, 304–312.  
<https://doi.org/10.5219/897>
- Rahman, M., Alam, M.-U., Luies, S.K., Kamal, A., Ferdous, S., Lin, A., Sharior, F., Khan, R., Rahman, Z., Parvez, S.M., Amin, N., Hasan, R., Tadesse, B.T., Taneja, N., Islam, M.A., Ercumen, A., 2021. Contamination of Fresh Produce with Antibiotic-Resistant Bacteria and Associated Risks to Human Health: A Scoping Review. *Int J Environ Res Public Health* 19, 360. <https://doi.org/10.3390/ijerph19010360>
- Ramchandani, M., Manges, A.R., DebRoy, C., Smith, S.P., Johnson, J.R., Riley, L.W., 2005. Possible animal origin of human-associated, multidrug-resistant, uropathogenic *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis* 40, 251–257. <https://doi.org/10.1086/426819>
- Raphael, E., Wong, L.K., Riley, L.W., 2011. Extended-spectrum Beta-lactamase gene sequences in gram-negative saprophytes on retail organic and nonorganic spinach. *Appl Environ Microbiol* 77, 1601–1607. <https://doi.org/10.1128/AEM.02506-10>
- Reddy, S.P., Wang, H., Adams, J.K., Feng, P.C.H., 2016. Prevalence and Characteristics of Salmonella Serotypes Isolated from Fresh Produce Marketed in the United States. *J Food Prot* 79, 6–16. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-274>
- Reuland, E.A., Al Naiemi, N., Raadsen, S.A., Savelkoul, P.H.M., Kluytmans, J. a. J.W., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., 2014. Prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in raw vegetables. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33, 1843–1846. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2142-7>
- Reygaert, W.C., 2018. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol* 4, 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- Rice, L.B., 2012. Mechanisms of Resistance and Clinical Relevance of Resistance to  $\beta$ -Lactams, Glycopeptides, and Fluoroquinolones. *Mayo Clin Proc* 87, 198–208. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2011.12.003>
- Richter, L., Du Plessis, E.M., Duvenage, S., Korsten, L., 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* 16, 421–427. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2558>
- Rico, D., Martín-Diana, A.B., Barat, J.M., Barry-Ryan, C., 2007. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. *Trends in Food Science & Technology* 18, 373–386. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.03.011>
- Rozwandowicz, M., Brouwer, M.S.M., Fischer, J., Wagenaar, J.A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., Mevius, D.J., Hordijk, J., 2018. Plasmids carrying antimicrobial resistance

- genes in *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother 73, 1121–1137. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx488>
- Ruimy, R., Brisabois, A., Bernede, C., Skurnik, D., Barnat, S., Arlet, G., Momcilovic, S., Elbaz, S., Moury, F., Vibet, M.-A., Courvalin, P., Guillemot, D., Andremont, A., 2010. Organic and conventional fruits and vegetables contain equivalent counts of Gram-negative bacteria expressing resistance to antibacterial agents. Environ Microbiol 12, 608–615. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02100.x>
- Santamaría, J., Toranzos, G., 2003. Enteric pathogens and soil: A short review. International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology 6, 5–9. <https://doi.org/10.1007/s10123-003-0096-1>
- Schwaiger, K., Helmke, K., Hölzel, C.S., Bauer, J., 2011. Antibiotic resistance in bacteria isolated from vegetables with regards to the marketing stage (farm vs. supermarket). International Journal of Food Microbiology 148, 191–196. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.06.001>
- Segerman, B., 2020. The Most Frequently Used Sequencing Technologies and Assembly Methods in Different Time Segments of the Bacterial Surveillance and RefSeq Genome Databases. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 10.
- Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P.-E., Rolain, J.M., Raoult, D., 2009. Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. Clinical Infectious Diseases 49, 543–551. <https://doi.org/10.1086/600885>
- Seni, J., Moremi, N., Matee, M., van der Meer, F., DeVinney, R., Mshana, S.E., D Pitout, J.D., 2018. Preliminary insights into the occurrence of similar clones of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in humans, animals and the environment in Tanzania: A systematic review and meta-analysis between 2005 and 2016. Zoonoses Public Health 65, 1–10. <https://doi.org/10.1111/zph.12387>
- Seo, S., Matthews, K.R., 2014. Exposure of *Escherichia coli* O157:H7 to soil, manure, or water influences its survival on plants and initiation of plant defense response. Food Microbiol 38, 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.08.015>
- Shah, M.S., Eppinger, M., Ahmed, S., Shah, A.A., Hameed, A., Hasan, F., 2015. Multidrug-resistant diarrheagenic *E. coli* pathotypes are associated with ready-to-eat salad and vegetables in Pakistan. J Korean Soc Appl Biol Chem 58, 267–273. <https://doi.org/10.1007/s13765-015-0019-9>
- Sharma, M., Reynnells, R., 2016. Importance of Soil Amendments: Survival of Bacterial Pathogens in Manure and Compost Used as Organic Fertilizers. Microbiol Spectr 4. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PFS-0010-2015>

- Skočková, A., Karpíšková, R., Koláčková, I., Cupáková, Š., 2013. Characteristics of *Escherichia coli* from raw vegetables at a retail market in the Czech Republic. *Int J Food Microbiol* 167, 196–201. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.011>
- Sommer, M.O.A., Munck, C., Toft-Kehler, R.V., Andersson, D.I., 2017. Prediction of antibiotic resistance: time for a new preclinical paradigm? *Nat Rev Microbiol* 15, 689–696. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.75>
- Steele, M., Odumeru, J., 2004. Irrigation water as source of foodborne pathogens on fruit and vegetables. *J Food Prot* 67, 2839–2849. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-67.12.2839>
- Strawn, L.K., Fortes, E.D., Bihn, E.A., Nightingale, K.K., Gröhn, Y.T., Worobo, R.W., Wiedmann, M., Bergholz, P.W., 2013. Landscape and meteorological factors affecting prevalence of three food-borne pathogens in fruit and vegetable farms. *Appl Environ Microbiol* 79, 588–600. <https://doi.org/10.1128/AEM.02491-12>
- Teng, L., Lee, S., Ginn, A., Markland, S.M., Mir, R.A., DiLorenzo, N., Boucher, C., Prosperi, M., Johnson, J., Morris, J.G., Jeong, K.C., 2019. Genomic Comparison Reveals Natural Occurrence of Clinically Relevant Multidrug-Resistant Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains. *Appl Environ Microbiol* 85, e03030-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.03030-18>
- Thanner, S., Drissner, D., Walsh, F., 2016. Antimicrobial Resistance in Agriculture. *mBio* 7, e02227-02215. <https://doi.org/10.1128/mBio.02227-15>
- The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015, 2016. . *EFSA Journal* 14, e04634.
- Touati, A., Benallaoua, S., Forte, D., Madoux, J., Brasme, L., de Champs, C., 2006. First report of CTX-M-15 and CTX-M-3  $\beta$ -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Béjaïa, Algeria. *International Journal of Antimicrobial Agents* 27, 397–402. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.12.007>
- Touati, A., Mairi, A., Baloul, Y., Lalaoui, R., Bakour, S., Thighilt, L., Gharout, A., Rolain, J.-M., 2017. First detection of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 in fresh vegetables from Béjaïa city, Algeria. *J Glob Antimicrob Resist* 9, 17–18. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.02.006>
- Tripathi, V., Cytryn, E., 2017. Impact of anthropogenic activities on the dissemination of antibiotic resistance across ecological boundaries. *Essays Biochem* 61, 11–21. <https://doi.org/10.1042/EBC20160054>
- Turbé, A., Toni, A., Benito, P., Lavelle, Patrick, Lavelle, Perrine, Camacho, N., Putten, W., Labouze, E., Mudgal, S., 2010. Soil biodiversity: functions, threats and tools for policy makers. Report for European Commission.

- Udikovic-Kolic, N., Wichmann, F., Broderick, N.A., Handelsman, J., 2014. Bloom of resident antibiotic-resistant bacteria in soil following manure fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 15202–15207. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409836111>
- Ülger, T.G., Songur, A.N., Çırak, O., PınarÇakıroğlu, F., Ülger, T.G., Songur, A.N., Çırak, O., PınarÇakıroğlu, F., 2018. Role of Vegetables in Human Nutrition and Disease Prevention, Vegetables - Importance of Quality Vegetables to Human Health. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.77038>
- Upadhyay, S., Mustafa, M., Joshi, S.R., 2016. Naturally evolving extended spectrum cephalosporin resistance in soil borne isolates of *Enterobacteriaceae*. *National Academy Science Letters* 39, 181–184.
- Usui, M., Ozeki, K., Komatsu, T., Fukuda, A., Tamura, Y., 2019. Prevalence of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Bacteria on Fresh Vegetables in Japan. *J Food Prot* 82, 1663–1666. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-138>
- Uyttendaele, M., Jaykus, L.-A., Amoah, P., Chiodini, A., Cunliffe, D., Jacxsens, L., Holvoet, K., Korsten, L., Lau, M., McClure, P., Medema, G., Sampers, I., Rao Jasti, P., 2015. Microbial Hazards in Irrigation Water: Standards, Norms, and Testing to Manage Use of Water in Fresh Produce Primary Production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14, 336–356. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12133>
- Valipour, M., gholami sefidkouhi, mohammad ali, Eslamian, S., 2015. Surface irrigation simulation models: A review. *International Journal of Hydrology Science and Technology* 5, 51. <https://doi.org/10.1504/IJHST.2015.069279>
- van Hoek, A.H.A.M., Veenman, C., van Overbeek, W.M., Lynch, G., de Roda Husman, A.M., Blaak, H., 2015. Prevalence and characterization of ESBL- and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* on retail vegetables. *Int J Food Microbiol* 204, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.014>
- Vandecraen, J., Chandler, M., Aertsen, A., Van Houdt, R., 2017. The impact of insertion sequences on bacterial genome plasticity and adaptability. *Crit Rev Microbiol* 43, 709–730. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1303661>
- Veldman, K., Kant, A., Dierikx, C., van Essen-Zandbergen, A., Wit, B., Mevius, D., 2014. *Enterobacteriaceae* resistant to third-generation cephalosporins and quinolones in fresh culinary herbs imported from Southeast Asia. *Int J Food Microbiol* 177, 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.014>
- Viswanathan, P., Kaur, R., 2001. Prevalence and growth of pathogens on salad vegetables, fruits and sprouts. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 203, 205–213. [https://doi.org/10.1078/S1438-4639\(04\)70030-9](https://doi.org/10.1078/S1438-4639(04)70030-9)

- von Wintersdorff, C.J.H., Penders, J., van Niekerk, J.M., Mills, N.D., Majumder, S., van Alphen, L.B., Savelkoul, P.H.M., Wolffs, P.F.G., 2016. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front Microbiol* 7, 173. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>
- Wadamori, Y., Gooneratne, R., Hussain, M.A., 2017. Outbreaks and factors influencing microbiological contamination of fresh produce. *J Sci Food Agric* 97, 1396–1403. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8125>
- Wani, S.A., Samanta, I., Bhat, M.A., Nishikawa, Y., 2004. Investigation of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in avian species in India. *Lett Appl Microbiol* 39, 389–394. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01586.x>
- Warriner, K., Huber, A., Namvar, A., Fan, W., Dunfield, K., 2009. Recent advances in the microbial safety of fresh fruits and vegetables. *Adv Food Nutr Res* 57, 155–208. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(09\)57004-0](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(09)57004-0)
- Westrell, T., Ciampa, N., Boelaert, F., Helwigh, B., Korsgaard, H., Chríel, M., Ammon, A., Mäkelä, P., 2009. Zoonotic infections in Europe in 2007: a summary of the EFSA-ECDC annual report. *Euro Surveill* 14, 19100.
- WHO and FAO announce global initiative to promote consumption of fruit and vegetables [WWW Document], n.d. URL <https://www.who.int/news/item/11-11-2003-who-and-fao-announce-global-initiative-to-promote-consumption-of-fruit-and-vegetables> (accessed 11.19.22).
- WHO World Health Organization, n.d. Food Safety and Food Borne Illness. WHO Media Center Fact Sheet, Food Safety Department.
- Wichmann, F., Udikovic-Kolic, N., Andrew, S., Handelsman, J., 2014. Diverse antibiotic resistance genes in dairy cow manure. *mBio* 5, e01017. <https://doi.org/10.1128/mBio.01017-13>
- Witmer, G., Pitt, W., 2012. Invasive Rodents In The United States: Ecology, Impacts, And Management. *Invasive Species: Threats, Ecological Impact and Control Methods* 26, 47–75. <https://doi.org/10.5070/V426110437>
- Wood, J.L., 2013. Examination of microbiological quality of in-field leafy vegetables and identification of on-farm generic *Escherichia coli* transmission dynamics. University of British Columbia. <https://doi.org/10.14288/1.0073924>
- Wood, J.L., Chen, J.C., Friesen, E., Delaquis, P., Allen, K.J., 2015. Microbiological survey of locally grown lettuce sold at farmers' markets in Vancouver, British Columbia. *J Food Prot* 78, 203–208. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-199>

- .Wyres, K.L., Holt, K.E., 2018. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Current Opinion in Microbiology, Antimicrobials \* Microbial systems biology* 45, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.04.004>
- Xylia, P., Botsaris, G., Chrysargyris, A., Skandamis, P., Tzortzakis, N., 2019. Variation of microbial load and biochemical activity of ready-to-eat salads in Cyprus as affected by vegetable type, season, and producer. *Food Microbiol* 83, 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.05.013>
- Yaici, L., Haenni, M., Métayer, V., Saras, E., Mesbah Zekar, F., Ayad, M., Touati, A., Madec, J.-Y., 2017. Spread of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in the community through ready-to-eat sandwiches in Algeria. *International Journal of Food Microbiology* 245, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.01.011>
- Yang, F., Shen, C., Zheng, X., Liu, Y., El-Sayed Ahmed, M.A.E.-G., Zhao, Z., Liao, K., Shi, Y., Guo, X., Zhong, R., Xu, Z., Tian, G.-B., 2019. Plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-1 in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from market retail fruits in Guangzhou, China. *Infect Drug Resist* 12, 385–389. <https://doi.org/10.2147/IDR.S194635>
- Ye, C., Li, Q., Li, X., Park, C.G., He, Y., Zhang, Y., Wu, B., Xue, Y., Yang, K., Lv, Y., Ying, X.-L., Ding, H.-H., Cai, H., Alkraiem, A.A., Njiri, O., Tembo, J., Huang, H.-P., Li, A.-Y., Gong, J., Qin, J., Cheng, B., Wei, X., Sun, Z., Zhang, S.-S., Zhang, P., Zheng, G.-X., Li, W., Kan, B., Yan, M., Xiding, X., Huo, X., Zeng, Y., Peng, H., Fu, Y., Klena, J.D., Skurnik, M., Jiang, L.-Y., Chen, T., 2019. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Interacts with CD209 Receptors To Promote Host Dissemination and Infection. *Infect Immun* 87, e00100-19. <https://doi.org/10.1128/IAI.00100-19>
- Yeni, F., Yavaş, S., Alpas, H., Soyer, Y., 2016. Most Common Foodborne Pathogens and Mycotoxins on Fresh Produce: A Review of Recent Outbreaks. *Crit Rev Food Sci Nutr* 56, 1532–1544. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.777021>
- Zenati, K., Sahli, F., Garcia, V., Bakour, S., Belhadi, D., Rolain, J.M., Touati, A., 2017. Occurrence and clonal diversity of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* recovered from inanimate surfaces in Algerian hospital environment: First report of armA, qnrB and aac(6′)-Ib-cr genes. *J Glob Antimicrob Resist* 10, 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.05.015>
- Zurfluh, K., Nüesch-Inderbinen, M., Morach, M., Zihler Berner, A., Hächler, H., Stephan, R., 2015. Extended-spectrum-β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolated from vegetables imported from the Dominican Republic, India, Thailand, and Vietnam. *Appl Environ Microbiol* 81, 3115–3120. <https://doi.org/10.1128/AEM.00258-15>

# **Annexes**

## ANNEXES

**Tableau 1.** Type et nombre des différents échantillons prélevés au niveau des fermes de Bejaia.

Saison	Ferme maraichère	Echantillon	Nombre d'échantillon	
Printemps (26/05/13)	Ferme n°1	Eau d'irrigation	3	
		Sol	6	
		Tomate	10	
	Ferme n°2	Eau d'irrigation	3	
		Sol	9	
		Tomate	10	
		Courgette	6	
	Ferme n°3	Eau d'irrigation	3	
		Sol	6	
		Tomate	10	
	Ferme n°4	Eau d'irrigation	3	
		Sol	6	
		Tomate	10	
		Concombre	6	
	Eté (26/06/13)	Ferme n°1	Eau d'irrigation	3
			Sol	9
Tomate			18	
Ferme n°2		Eau d'irrigation	3	
		Sol	9	
		Tomate	18	
Ferme n°3		Eau d'irrigation	3	
		Sol	9	
		Tomate	18	
Ferme n°4		Eau d'irrigation	3	
		Sol	9	
		Tomate	18	
Eté (18/07/13)	Ferme n°1	Eau d'irrigation	3	
		Sol	3	
		Tomate	7	
	Ferme n°2	Eau d'irrigation	3	
		Sol	3	
		Poivron	7	
	Ferme n°3	Eau d'irrigation	3	
		Sol	3	
		Tomate	7	
	Ferme n°4	Eau d'irrigation	3	
		Sol	9	
		Poivron	7	
		Piment	7	
		Concombre	6	

Saison	Ferme maraichère	Echantillon	Nombre d'échantillon
Hiver (03/03/14)	Ferme n°5	Eau d'irrigation	1
		Sol	3
		Menthe	1
		Laitue	1
		Blette	1
		Oignon	1
		Cèleri	1
		Noix	1
	Ferme n°6	Eau d'irrigation	1
		Sol	3
		Noix	1
		Oignon	1
		Persil	1
		Ail	1
Hiver (15/03/14)	Ferme n°7	Eau d'irrigation	1
		Sol	3
		Menthe	1
		Blette	1
		Persil	1
		Ail	1
		Oignon	1

**Tableau 2.** Type et nombre des différents fruits et légumes achetés au niveau des marchés de Bejaia.

Saison	Marché	Vendeur	Origine	Type d'échantillon	Nombre d'échantillon
Eté (28/7/13)	Idimco	Vendeur n°1	Skikda	Tomate	6
		Vendeur n°2	Tipaza	Tomate	4
				Poivron	5
		Vendeur n°3	Bejaia	Piment	4
				Sétif	Persil
		Vendeur n°4	Sétif	Menthe	4
		Vendeur n°5	Skikda	Tomate	6
		Vendeur n°6	Tipaza	Poivron	6
		Vendeur n°7	Tipaza	Pêche	6
				Tomate	4
		Vendeur n°8	Sétif	Menthe	4
				Persil	4
				Cèleri	4
		Vendeur n°9	Skikda	Tomate	6
		Vendeur n°10	Sétif	Laitue	10
		Vendeur n°11	Blida	Pêche	6
Vendeur n°12	Espagne	Raisins	5		
Vendeur n°13	Jijel	Tomate	4		
Vendeur n°14	Espagne	Raisins	5		
Vendeur n°15	Espagne	Raisins	5		
Vendeur n°16	Sétif	Laitue	10		
Eté (3/8/13)	Centre-ville	Vendeur n°19	Bejaia	Pastèque	24
Automne (28/10/13)	Ihadaden	Vendeur n°20	Tipaza	Tomate	3
		Vendeur n°21	Bejaia	Poivron	3
		Vendeur n°22	Bejaia	Poire	4
		Vendeur n°23	Bejaia	Carotte	3
		Vendeur n°24	Oued Souf	Poivron	4
		Vendeur n°25	Sétif	Betterave	5
		Vendeur n°26	Sétif	Laitue	4
		Vendeur n°27	Sétif	Laitue	4
		Vendeur n°28	Alger	Piment	6
		Vendeur n°29	Alger	Concombre	2
		Vendeur n°30	Sétif	Piment	4
		Vendeur n°31	Alger	Pomme	4
		Vendeur n°32	Alger	Raisins	6
		Vendeur n°33	Alger	Pêche	3
		Vendeur n°34	Blida	Nectarine	3
		Vendeur n°35	Bejaia	Tomate	4
		Vendeur n°36	Bejaia	Figues de Barbarie	3
Vendeur n°37	Bejaia	Raisins	4		

Saison	Marché	Vendeur	Origine	Type d'échantillon	Nombre d'échantillon
Hiver (06/01/14)	Lekhmis	Vendeur n°38	Alger	Poire	3
		Vendeur n°39	Bejaia	Raisins	5
		Vendeur n°40	Tiaret	Carotte	1
		Vendeur n°41	Sahara	Tomate	1
				Poivron	1
		Vendeur n°42	Alger	Navet	1
				Betterave	1
				Fenouil	1
			Tipaza	Laitue	1
				Pomme	1
			Media	Carotte	1
			Ain Defla	Tomate	1
		Vendeur n°43	Bejaia	Fenouil	1
				Carotte	1
				Navet	1
		Vendeur n°44	Biskra	Date	1
		Vendeur n°45	Sahara	Navet	1
			Blida	Pomme	1
			Bejaia	Laitue	1
		Vendeur n°46	Biskra	Poivron	1
				Piment	1
				Laitue	1
				Tomate	1
		Vendeur n°47	Biskra	Céleri	1
				Menthe	1
				Laitue	1
				Persil	1
Vendeur n°48	Sahara	Carotte	1		
		Poivron	1		
		Piment	1		
Vendeur n°49	Oued souf	Tomate	1		
		Poivron	1		
Vendeur n°50	Biskra	Menthe	1		
		Persil	1		
Vendeur n°51	Sahara	Tomate	1		
		Piment	1		
		Poivron	1		
Vendeur n°52	Sahara	Laitue	1		
Vendeur n°53	Boumerdes	Fenouil	1		
		Carotte	1		
		Laitue	1		
Vendeur n°54	Alger	Pomme	1		
Vendeur n°55	Alger	Carotte	1		
		Laitue	1		

Saison	Marché	Vendeur	Origine	Type d'échantillon	Nombre d'échantillon	
				Fenouil	1	
		Vendeur n°56	Biskra	Piment	2	
		Vendeur n°57	Bejaia	Date	1	
		Vendeur n°58	Bejaia	Persil	1	
		Vendeur n°59	Bejaia	Pomme	1	
		Vendeur n°60	Sétif	Betterave	1	
Hiver (03/02/14)	Idimco	Vendeur n°1	Sahara	Piment	1	
				Tomate	1	
		Vendeur n°2	Bejaia	Carotte	1	
		Vendeur n°3	Tiaret	Pomme	1	
		Vendeur n°4	Media	Pomme	1	
				Betterave	1	
		Vendeur n°5	Alger	Carotte	1	
				Fenouil	1	
				Carotte	1	
		Vendeur n°6	Alger	Fenouil	1	
				Sahara	Tomate	1
				Ain Defla	Laitue	1
				Blida	Pomme	1
		Vendeur n°7	Biskra	Tomate	1	
				Poivron	1	
				Piment	1	
		Vendeur n°8	Sahara	Laitue	1	
				Concombre	1	
		Vendeur n°9	M'Sila	Carotte	1	
		Vendeur n°10	Biskra	Tomate	1	
		Vendeur n°11	Biskra	Poivron	1	
				Piment	1	
				Tomate	1	
		Vendeur n°12	Sahara	Tomate	1	
				Laitue	1	
		Vendeur n°13	Biskra	Poivron	1	
				Piment	1	
				Laitue	1	
		Vendeur n°14	Biskra	Poivron	1	
	Piment			1		
Laitue	1					
Piment	1					
Vendeur n°15	Biskra	Poivron	1			
		Poivron	1			
Vendeur n°16	Alger	Fenouil	1			
		Carotte	1			
		Laitue	1			
		Tomate	1			
	Oued souf	Carotte	1			
Vendeur n°17	Biskra	Tomate	1			
Vendeur n°18	Biskra	Piment	1			
	Royal	Vendeur n°61	Bejaia	Poivron	1	

	<b>Marché</b>	<b>Vendeur</b>	<b>Origine</b>	<b>Type d'échantillon</b>	<b>Nombre d'échantillon</b>
Hiver (11/02/14)	Royal	Vendeur n°61	Biskra	Piment	1
				Persil	1
				Tomate	1
				Céleri	1
			Alger	Betterave	1
				Laitue	1
				Pomme	1
			Bejaia	Pomme	1
				Concombre	1
				Carotte	1
			Espagne	Pomme	1

## Résumé

Le rôle des aliments dans l'exposition humaine à des bactéries résistantes aux antibiotiques est un problème de sécurité alimentaire important. L'objectif principal de notre étude était l'évaluation de la contamination des fruits et légumes par des bacilles à Gram négatif résistants aux céphalosporines de troisième génération, et la caractérisation phénotypique et moléculaire des mécanismes de résistance aux antibiotiques chez ces bacilles à Gram négatif. Un total de 491 échantillons de fruits et légumes issus de 5 marchés et 7 fermes maraichères de Bejaia, côte nord-est de la Méditerranée algérienne, ont été analysés. Un total de 90 échantillons de sol et 45 échantillons d'eau d'irrigation issus de 7 différentes fermes ont été également analysés. L'ensemble des méthodes et techniques réalisées ont permis l'isolement de bacilles à Gram négatif multirésistants aux antibiotiques. Les bactéries isolées dans les fruits et les légumes, le sol et l'eau d'irrigation collectées dans les fermes étaient presque toutes des espèces bactériennes non fermentaires. Une plus grande diversité d'espèces bactériennes et de profils de résistance aux antimicrobiens a été observée sur les marchés ; les *Enterobacteriaceae* étaient aussi fortement représentées que les bactéries non fermentaires. Parmi les *Enterobacteriaceae*, les isolats de *K. pneumoniae* étaient des producteurs de bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE). Le séquençage du génome entier a permis l'identification de *bla*<sub>CTX-M-15</sub> dans 11 souches de BLSE et *bla*<sub>DHA</sub> dans deux pAmpC. Le gène *aac(6')Ib-cr* a été identifié dans 8/13 souches de *Klebsiella pneumoniae*. Les clones détectés sont de cinq types : ST14, ST45, ST219, ST236 et le ST882. Cette étude a montré que les fruits et légumes peuvent constituer un réservoir de bactéries à Gram négatif multi-résistantes, qui peuvent être transférées à l'homme par la nourriture, ce qui peut représenter une menace sous-estimée pour la santé publique. Cette étude souligne que les mesures d'hygiène lors de la récolte et de la vente sont d'une importance capitale pour limiter la propagation de bactéries multirésistantes aux consommateurs.

**Mots clés :** Fruits et légumes, résistance aux céphalosporines de troisième génération (C3G), Algérie, fermes maraichères, marchés, bactéries à Gram négatif, *Klebsiella pneumoniae*.

## Abstract

The role of food in human exposure to antimicrobial-resistant bacteria is a growing food safety issue. The aim of this study was the evaluation of contamination levels of fruits, vegetables and the agricultural environment by third-generation cephalosporin (3GC)-resistant Gram-negative bacteria and molecular characterization of antibiotic resistance mechanisms in these Gram-negative bacilli. A total of 491 fruits and vegetables samples collected from 5 markets and 7 farms in Bejaia area, north-eastern Mediterranean coast of Algeria. 90 soil samples and 45 irrigation water samples collected from farms were also analyzed. The different methods used allowed the isolation of Gram-negative bacteria resistant to different antibiotics. The bacteria isolated from fruits and vegetables, soil and irrigation water collected in the farms were almost all non-fermenting bacterial species. Greater diversity in bacterial species and antimicrobial resistance profiles was observed at markets; Enterobacteriaceae were as strongly represented as non-fermenting bacteria. Among Enterobacteriaceae, the *Klebsiella pneumoniae* isolates were extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producers. WGS identified *bla*<sub>CTX-M-15</sub> in 11 extended-spectrum-beta-lactamases (ESBL)-*K. pneumoniae* and *bla*<sub>DHA</sub> in 2 AmpC-*K. pneumoniae*. The *aac(6')Ib-cr* gene was identified in 8 out of 13 isolates. Five different STs were reported ST14, ST45, ST219, ST236 et le ST882. This study showed that fruits and vegetables constitute a reservoir of multi-drug-resistant Gram-negative bacteria that can be transferred to humans through food. Which may represent an underestimated threat to public health. This study highlights that hygiene measures during harvesting and retail process are of utmost importance to limit further multiresistant bacteria spread to the consumer.

**Keywords:** fruits and vegetables, 3rd-generation cephalosporin (3GC) resistance, Algeria, farm, market, Gram negative bacteria, *Klebsiella pneumoniae*

## ملخص

يعد دور الغذاء في تعرض الإنسان للبكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية مسألة مهمة في سلامة الغذاء. الهدف الرئيس من دراستنا هو تقييم مستوى تلوث الفواكه والخضروات والبيئة الزراعية بالسلالات البكتيرية العنصوية سالبة الجرام المقاومة للجيل الثالث من السيفالوسبورين، والدراسة الظاهرية والجزيئية لآليات مقاومة هذه العصيات سالبة الجرام للمضادات الحيوية. تم تحليل 491 عينة من الفواكه والخضروات التي تم جمعها من 5 أسواق و7 مزارع مختلفة في بجاية، شمال شرق ساحل البحر المتوسط في الجزائر. كما تم تحليل 90 عينة من التربة و45 عينة من مياه الري. تم استخدام طرق مختلفة لعزل البكتيريا سالبة الجرام متعددة المقاومة للمضادات الحيوية. جميع أنواع البكتيريا المعزولة من الفواكه، والخضروات، مياه الري والتربة التي تم الحصول عليها من المزارع بكتيريا غير مخمرة. بينما لوحظ تنوع أكبر في أنواع البكتيريا ومظاهر المقاومة للمضادات الحيوية في الفواكه والخضروات التي تم شراؤها من الأسواق، حيث وجدت البكتيريا المعوية بقدر البكتيريا غير المخمرة. من بين بكتيريا الأمعاء كانت *klebsiella pneumoniae* منتجة للـ BLSE. سمحت تقنية الـ WGS بتحديد جينات الـ *bla*<sub>CTX-M-15</sub> في 11 من *klebsiella pneumoniae*-BLSE و *bla*<sub>DHA</sub> في 2 من *klebsiella pneumoniae*-AmpC. تم التعرف على الجين *aac(6')Ib-cr* في 8 عزلات من أصل 13 عزلة *klebsiella pneumoniae*. أظهر تحليل MLST تنوع وراثي بين السلالات حيث تم تحديد 5 أنواع من الـ ST: ST14, ST219, ST45, ST882, ST236. أظهرت هذه الدراسة أن الفواكه والخضروات تشكل مصدرا للبكتيريا سالبة الجرام متعددة المقاومة للمضادات الحيوية، والتي يمكن نقلها إلى البشر من خلال الغذاء. كما تسلط هذه الدراسة الضوء على تدابير النظافة التي يجب أخذها بالاعتبار أثناء عملية الحصاد والبيع للحد من انتشار البكتيريا المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية.

الكلمات المفتاحية: الفواكه والخضروات، مقاومة الجيل الثالث من السيفالوسبورين، الجزائر، مزارع، أسواق، عصيات سلبية الجرام، *klebsiella pneumoniae*