

**Université de Montpellier
Ecole Doctoral GAIA
(Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau)**

Habilitation à Diriger des Recherches

Ecologie de Vibrio cholerae et épidémiologie du choléra.

Dossier de candidature

Guillaume CONSTANTIN DE MAGNY

**UMR-MIVEGEC (UM – IRD 224 – CNRS 5290)
« Maladies Infectieuses et Vecteurs :
Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle »**

Sommaire

1	CURRICULUM VITAE	7
2	LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	8
2.1	ARTICLES SCIENTIFIQUES	8
2.2	CHAPITRES D'OUVRAGES	10
2.3	COMMUNICATIONS INTERNATIONALES.....	10
2.4	DIFFUSIONS GRAND PUBLIC ET AUTRES MEDIA	12
3	ENSEIGNEMENTS ET ENCADREMENTS	13
4	CONTRATS DE RECHERCHE, FINANCEMENTS.....	14
5	RESUME DES TRAVAUX SCIENTIFIQUES EFFECTUES	16
5.1	ÉCOLOGIE FONCTIONNELLE DU DEUG AU DEA :	16
5.2	ÉCOLOGIE DES MALADIES INFECTIEUSES :	18
5.2.1	<i>Doctorat : le cas du choléra en Afrique.....</i>	<i>18</i>
5.2.2	<i>Post-doctorat : écologie de <u>Vibrio cholerae</u> et ses conséquences épidémiologiques</i>	<i>22</i>
5.2.3	<i>Écologie du choléra en Afrique, test de l'hypothèse du réservoir environnemental.....</i>	<i>27</i>
	Élargissement conceptuel à l'écologie de la Santé.....	27
	Écologie de <u>Vibrio cholerae</u> et l'épidémiologie du choléra au Sénégal.....	29
	Transfert opérationnel des recherches fondamentales sur l'écologie de <u>Vibrio cholerae</u> pour les acteurs institutionnels de la riposte aux épidémies de choléra en Afrique.	32
	Conclusions sur le test de l'hypothèse de l'environnement aquatique comme réservoir pérenne de l'agent étiologique du choléra en Afrique.	33
5.2.4	<i>Dynamique du choléra en Afrique</i>	<i>34</i>
	Mobilité humaine dérivée du BigData de la téléphonie mobile pour alimenter la modélisation de la dynamique des épidémies de choléra	34
	Phénotype et génotype des souches atypique de <u>Vibrio cholerae</u> O1 Ogawa de la dernière épidémie de choléra au Sénégal.....	36
	Dynamique des épidémies de choléra entre la Mauritanie et le Bénin	37
5.2.5	<i>Ulcer de Burulli au Cameroun.....</i>	<i>38</i>
5.3	NOUVELLES PERSPECTIVES DE RECHERCHE, L'ANTIBIORESISTANCE.....	39
5.3.1	<i>Antibiorésistance des infections nosocomiales au Sénégal.....</i>	<i>40</i>
	Staphylococcus aureus résistant à la méticilline (SARM).....	40
	Phagothérapie, <u>Klebsiella pneumoniae</u> et <u>Acinetobacter baumannii</u> impliquées dans les infections associées aux soins.	42
	Mécanismes d'émergence des résistances dans l'environnement marin.....	47
	Mécanismes d'émergence des résistances dans l'environnement fluvial	48
	Bio-informatique et Génomique de la résistance	49
6	BIBLIOGRAPHIE.....	50
7	TIRES A PART DES PRINCIPAUX TRAVAUX SCIENTIFIQUES.....	52

SOMMAIRE DES FIGURES

FIGURE 1 : TESTS DE STIGMATES.	16
FIGURE 2 : GRENOUILLE DES CHAMPS (<u>RANA ARVALIS</u>) MALE, CAPTUREE A VRED LE 26 AVRIL 1999.	17
FIGURE 3 : RESOLUTION TEMPS-FREQUENCE DE L'APPROCHE PAR ONDELETTES. (A) EXEMPLES D'ONDELETTES ET DE LEURS BOITES TEMPS-FREQUENCE REPRESENTANT LA DISTRIBUTION DE VARIANCE (ENERGIE) CORRESPONDANTE. LORSQUE L'ECHELLE A DIMINUE, LA RESOLUTION TEMPORELLE S'AMELIORE MAIS LA RESOLUTION EN FREQUENCE SE DEGRADE ET EST DECALEE VERS LES HAUTES FREQUENCES. INVERSEMENT, SI A AUGMENTE, LES BOITES SE DEPLACENT VERS LA REGION DES BASSES FREQUENCES ET LA HAUTEUR DES BOITES DEVIENT PLUS COURTE (AVEC UNE MEILLEURE RESOLUTION EN FREQUENCE) MAIS LEUR LARGEUR S'ALLONGE (AVEC UNE MAUVAISE RESOLUTION TEMPORELLE). (B) CONTRAIREMENT AUX ONDELETTES, TOUTES LES BOITES DE LA TRANSFORMEE DE FOURIER A FENETRE SONT OBTENUES PAR UN DECALAGE DANS LE TEMPS OU EN FREQUENCE D'UNE FONCTION UNIQUE, CE QUI PRODUIT LES MEMES ETALEMENTS DE VARIANCE SUR TOUT LE PLAN TEMPS-FREQUENCE.	19
FIGURE 4 : ANALYSE DE COHERENCE EN ONDELETTES (EN UTILISANT LA FONCTION D'ONDELETTE DE MORLET) ET ANALYSES DE SYNCHRONIE DE TOUTES LES SERIES TEMPORELLES ETUDIEES POUR LE GHANA. (A) INCIDENCE/IOI ; (B)	

INCIDENCE/PRECIPITATIONS ; (C) INCIDENCE/LSTA1 ; (D) IOI/PRECIPITATIONS ; (E) IOI/LSTA1 ; ET (F) LSTA1/LSTA2. LE PANNEAU DE GAUCHE MONTRE LA COHERENCE EN ONDETTES DES DIFFERENTES SERIES (AXE DES X : TEMPS EN ANNEE ; AXE DES Y : PERIODE EN ANNEE). LA PUISSANCE EST CODEE DE FAIBLES VALEURS, EN BLEU FONCE, A DES VALEURS ELEVEES, EN ROUGE FONCE. LES LIGNES POINTILLEES BLANCHES INDIQUENT LE NIVEAU DE SIGNIFICATION $\alpha = 5\%$ CALCULE APRES UNE ANALYSE DE BOOTSTRAP SUR 1000 SERIES. LA ZONE INTERIEURE AU SEIN DU CONE D'INFLUENCE (LIGNE NOIRE) INDIQUE LA REGION NON INFLUENCEE PAR LES EFFETS DE BORD. LE PANNEAU DE DROITE MONTRE LES COMPOSANTS OSCILLANTS CALCULES AVEC LA TRANSFORMATION EN ONDETTES DANS LA BANDE DE PERIODE DE 2 A 3 ANS. LIGNES NOIRES : PREMIERE VARIABLE ; LIGNE ORANGE PALE : DEUXIEME VARIABLE.

..... 20

FIGURE 5 : A GAUCHE EST ILLUSTRÉ L'ARCHITECTURE DU MODÈLE DÉTERMINISTE AVEC S POUR LES SUSCEPTIBLES, I LES INFECTÉS, D LES PERSONNES DÉCÉDÉES DE LA MALADIE, ET R LES GUÉRIS. À DROITE IL S'AGIT DU SYSTÈME D'ÉQUATIONS DIFFÉRENTIELLES QUI DÉCRIT L'ÉVOLUTION DE CHACUN DES COMPARTIMENTS EN FONCTION DU TEMPS.

..... 21

FIGURE 6 : DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES OBSERVÉES ET PRÉDICTION DES MODÈLES AJUSTÉS. POUR KOLKATA, (A) DYNAMIQUES TEMPORELLES DES CAS DE CHOLÉRA OBSERVÉS, DU MODÈLE AJUSTÉ ET DU MODÈLE DE VALIDATION CROISÉE, PRÉSENTES RESPECTIVEMENT EN NOIR, ROUGE ET BLEU. (B) NUAGE DE POINTS DES CAS DE CHOLÉRA OBSERVÉS PAR RAPPORT À (i) CAS DE CHOLÉRA PRÉDITS PAR LE MODÈLE AJUSTÉ EN CERCLES ROUGES, ET (ii) CAS DE CHOLÉRA PRÉDITS PAR LE MODÈLE DE VALIDATION CROISÉE EN CERCLES BLEUS. LA LIGNE NOIRE REPRÉSENTE UN ACCORD PARFAIT ENTRE LES CAS PRÉDITS ET OBSERVÉS. POUR MATLAB, C IDENTIQUE À A. D IDENTIQUE À B. 23

FIGURE 7 : PRÉVISION IMMÉDIATE DE LA PROBABILITÉ DE PRÉSENCE DE *VIBRIO CHOLÉRAE* O1 POUR LE 9 JUIN 2007, GÉNÉRÉE PAR LE SYSTÈME DE PRÉDICTION DES PATHOGÈNES DE LA BAIE DE CHESAPEAKE. LES TERRES SONT COLOREES EN VERT ET LES FRONTIÈRES DES ÉTATS SONT INDIQUÉES EN NOIR. 24

FIGURE 8 : TEMPÉRATURE DE L'EAU EN DEGRÉS CELSIUS (DIAMANTS NOIRS, AXE Y) ET DÉTECTION DE *V. PARAHAEMOLYTICUS* DANS L'EAU (BARRES BLEUES) ET LE PLANCTON [200 μ M (BARRES VERTES) ET 64 μ M (BARRES MAGENTA)]. LA TEMPÉRATURE DE L'EAU EST MOYENNÉE SUR TOUS LES SITES POUR CHAQUE MOIS D'ÉCHANTILLONNAGE ET LES BARRES COLOREES MONTRENT AU MOINS 1 ÉCHANTILLON POSITIF POUR CETTE FRACTION SUR TOUS LES SITES POUR CHAQUE MOIS D'ÉCHANTILLONNAGE. 25

FIGURE 9 : DISTRIBUTION MENSUELLE DES GENRES SELON LE NOMBRE DE FOIS OÙ ILS ÉTAIENT DOMINANTS AU COURS DE LA PÉRIODE D'ÉCHANTILLONNAGE DE 45 MOIS, DE MARS 2004 À SEPTEMBRE 2007 À BAKERGANJ, BANGLADESH. 25

FIGURE 10 : SCHEMAS D'INCIDENCE ACCUMULÉE QUOTIDIENNEMENT DU CHOLÉRA (A) ET DE PRÉCIPITATIONS (B) POUR QUATRE RÉGIONS DU SÉNÉGAL EN 2005. LES SCHEMAS POUR LES RÉGIONS DE DAKAR, THIES, SAINT-LOUIS ET DIOURBEL SONT REPRÉSENTÉS PAR DES LIGNES NOIRES PLEINES, DES LIGNES GRISSES PLEINES, DES LIGNES NOIRES EN POINTILLES ET DES LIGNES GRISSES EN POINTILLES, RESPECTIVEMENT. 26

FIGURE 11 : DIFFÉRENTS COMPOSANTS DE LA NICHE D'UN PATHOGÈNE HUMAIN ET COMMENT ILS PEUVENT ÊTRE UTILISÉS POUR SON CONTRÔLE. LES BOÎTES VERTES ET BLEUES REPRÉSENTENT LES RESSOURCES ET LES INTERACTIONS SITUÉES AU NIVEAU INTER- ET INTRA-HÔTE, RESPECTIVEMENT. LES BOÎTES ROUGES DÉCRIVENT LES PRINCIPALES MÉTHODES ACTUELLEMENT UTILISÉES EN SANTÉ PUBLIQUE ET LEUR IMPACT POSITIF OU NÉGATIF SUR LES COMPOSANTS DE LA NICHE (PAR EXEMPLE, LA VACCINATION DIMINUE LE NOMBRE D'INDIVIDUS SUSCEPTIBLES ET AUGMENTE L'IMMUNITÉ DE LA POPULATION) 28

FIGURE 12 : (A) LA VISION ÉPIDÉMIOLOGIQUE CLASSIQUE DES RELATIONS ENTRE LA SANTÉ HUMAINE, LA SANTÉ ANIMALE ET LES MODIFICATIONS DE L'ÉCOSYSTÈME. LES PROBLÈMES DE SANTÉ HUMAINE SONT INTERPRÉTÉS SELON UNE VISION OÙ SEULS LES EFFETS DES CHANGEMENTS DE L'ÉCOSYSTÈME SUR LA SANTÉ HUMAINE SONT PRIS EN COMPTE (VOIR LES FLECHES). (B) RELATIONS POTENTIELLES MULTIPLES ENTRE LA SANTÉ HUMAINE, LA SANTÉ ANIMALE ET LA SANTÉ DE L'ÉCOSYSTÈME, OÙ TOUS LES COMPOSANTS INTERAGISSENT LES UNS AVEC LES AUTRES ; UNE ÉPIDÉMIE GRAVE AFFECTANT L'ENSEMBLE DES POPULATIONS DE GRANDS RUMINANTS DANS LA SAVANE D'AFRIQUE DE L'EST, PAR EXEMPLE, PEUT AVOIR DES CONSÉQUENCES MAJEURES SUR LA STABILITÉ DE CET ÉCOSYSTÈME PARTICULIER DANS SON ENSEMBLE. 29

FIGURE 13 : ISOLEMENT SUR MILIEU SPÉCIFIQUE DES COLONIES DE *VIBRIO ALGNOLYTICUS* (GAUCHE), *VIBRIO VULNIFICUS* (CENTRE), ET *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* (DROITE) ISOLÉES À PARTIR DES PRÉLEVEMENTS SUR SAINT-LOUIS EN 2016. 30

FIGURE 14 : SITES D'ÉCHANTILLONNAGE AUTOUR DE LA PÉNINSULE DU CAP-VERT, SÉNÉGAL, AFRIQUE DE L'OUEST. LA PÉNINSULE DU CAP-VERT A ÉTÉ DIVISÉE EN TROIS ZONES PRINCIPALES : NORD, OUEST ET SUD (LIGNES EN POINTILLES). EN CONSIDÉRANT X COMME LA PREMIÈRE LETTRE DU SITE D'ÉCHANTILLONNAGE, TOUS LES SITES ONT ÉTÉ IDENTIFIÉS SUR LA CARTE PAR (i) LA POSITION DE L'ÉCHANTILLONNAGE DES MICROPLASTIQUES (NX), (ii) LA POSITION DE L'EFFLUENT D'EAUX USÉES LE PLUS PROCHE (EX), ET (iii) LA POSITION DE L'ÉCHANTILLONNAGE DE L'EAU ET DES SÉDIMENTS (NOM DU SITE). EC = EFFLUENT CAMBERENE, NY = FILET YOFF TONGHOR, EY = EFFLUENT YOFF

TONGHOR, FN = FILET NGOR, EN = EFFLUENT NGOR, FO = FILET OUAKAM, EO = EFFLUENT OUAKAM, FM = FILET MADELEINES, FH1 = FILET HANN1, EH1 = EFFLUENT HANN1, FH2 = FILET HANN2 ET EH2 = EFFLUENT HANN2. UN DIAGRAMME CIRCULAIRE STATISTIQUE CARACTERISE LA GRANULOMETRIE DES SEDIMENTS EN POURCENTAGE POUR TOUS LES SITES (ARGILE, LIMON FIN ET GROSSIER, SABLE FIN ET GROSSIER).	31
FIGURE 15 :	32
FIGURE 16 : ILLUSTRATION DE LA COUVERTURE DU LIVRE DU PR. R. PIARROUX "CHOLERA. HAÏTI 2010-2018, HISTOIRE D'UN DESASTRE".	34
FIGURE 17 : NOMBRE DE NOUVEAUX CAS RAPPORTES (LIGNE ROUGE) ET MODELISES PAR SEMAINE EN 2005 POUR L'ENSEMBLE DU PAYS DU SENEGAL (A), ET POUR LES REGIONS DE DIOURBEL (B), DAKAR (C) ET THIES (D). LES LIGNES BLEUES CORRESPONDENT AUX SIMULATIONS DU MODELE (EQS. 1-4) AVEC LE MEILLEUR ENSEMBLE DE PARAMETRES POSTERIEURS. LES BANDES OMBREES CORRESPONDENT AUX PERCENTILES 2,5-97,5 DE L'INCERTITUDE LIEE A L'ESTIMATION DES PARAMETRES (BLEU FONCE) ET DE L'INCERTITUDE TOTALE EN SUPPOSANT UNE ERREUR GAUSSIENNE HOMOSCEDASTIQUE (BLEU CLAIR). LES CAS MODELISES SOUS L'HYPOTHESE D'UNE REDUCTION DE TRANSMISSION DE 10 % (LIGNE VERTE PLEINE) ET 20 % (LIGNE VERTE EN POINTILLES) A TOUBA PENDANT LE GRAND MAGAL DE TOUBA SONT EGALEMENT INDICUES.	35
FIGURE 18 : ODDS RATIOS DE LA PREVALENCE DU CHOLERA SELON LA COUVERTURE EN EAU ET ASSAINISSEMENT (INTERVALLE DE CONFIANCE A 95 %). STATISTIQUES Z POUR LE ODDS RATIOS (HYPOTHESE NULLE H0 : ODDS RATIO = 1) NS, NON SIGNIFICATIF, *P < 0,05, ***P < 0,001.	36
FIGURE 19 : ÉLECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE DES EXEMPLES DE PRODUITS PCR DES ISOLATS DE <i>VIBRIO CHOLERA</i> O1 EN UTILISANT <i>tcpA</i> (CLASSIQUE ET EL TOR).	37
FIGURE 20 : ARBRE COUVRANT DE POIDS MINIMAL BASE SUR LES TYPES MLVA DE 257 ISOLATS DE <i>V. CHOLERA</i> PROVENANT DE PLUSIEURS RECENTES EPIDEMIES DE CHOLERA EN AFRIQUE DE L'OUEST. CHAQUE TYPE MLVA EST REPRESENTÉ PAR UN NŒUD (ET UN NUMERO UNIQUE), ET LA TAILLE DES NŒUDS REFLETE LE NOMBRE D'ISOLATS DE CHAQUE TYPE MLVA. LES LIGNES PLEINES INDIQUENT LE VARIANT DE LOCUS SIMPLE LE PLUS PROBABLE, TANDIS QUE LES LIGNES EN POINTILLES INDIQUENT LE VARIANT DE LOCUS DOUBLE LE PLUS PROBABLE. LES COULEURS REFLETENT LE PAYS DISTINCT ET L'ANNEE D'ORIGINE DE L'ISOLAT. LES DIAGRAMMES CIRCULAIRES INDIQUENT LES SOUCHES PROVENANT DE DIFFERENTES PERIODES OU PAYS PRESENTANT UN TYPE MLVA IDENTIQUE. LES DEUX SOUCHES REPRESENTÉES PAR LES TYPES MLVA #1 ET #44 ONT ÉTÉ ISOLÉES A PARTIR D'ÉCHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX EN GUINÉE (ENCERCLÉES EN ROUGE). LES ÉTIQUETTES A A G INDIQUENT LES ISOLATS PROVENANT DU GHANA, DU TOGO ET DE LA GUINÉE.	37
FIGURE 21 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES CHANGEMENTS SAISONNIERS ET DES LIENS POSSIBLES ENTRE L'ENVIRONNEMENT, LA PRESENCE DE <i>MYCOBACTERIUM ULCERANS</i> , L'EXPOSITION HUMAINE ET L'INCIDENCE DE L'ULCERE DE BURULI (BU) DANS LE DISTRICT D'AKONOLINGA ET LA VALLEE DE LA RIVIERE NYONG, AU CAMEROUN, DE 2002 A 2012. POUR UNE MEILLEURE VISUALISATION DES RETARDS, 18 MOIS SONT PRESENTES. A) PRECIPITATIONS MENSUELLES MOYENNES ET DEBIT MOYEN DE LA RIVIERE NYONG (ANNEXE TECHNIQUE EN LIGNE, HTTP://WWWNC.CDC.GOV/EID/ARTICLE/21/8/14-1336-TECHAPP1.PDF). S SAISON SECHE, COURTE SAISON SECHE. B) PREVALENCE DE <i>M. ULCERANS</i> DANS L'ENVIRONNEMENT AQUATIQUE (POURCENTAGE D'ÉCHANTILLONS POSITIFS POUR <i>M. ULCERANS</i>) (14). C) ABONDANCE ESTIMÉE DES HETEROPTERES POSITIFS POUR <i>M. ULCERANS</i> (EXPRIMÉE EN % DE L'ABONDANCE MAXIMALE) (14). D) NOMBRE MEDIAN MENSUEL DE CAS DE BU DETECTES DANS LE DISTRICT D'AKONOLINGA, 2002-2012 (CETTE ÉTUDE). E) ACTIVITES SELECTIONNEES IMPLIQUANT DES CONTACTS AVEC DES ENVIRONNEMENTS A RISQUE ÉLEVÉ DE BU (T. GILES-VERNICK, COMM. PERS., 2015).....	38
FIGURE 22 : ANALYSE PHYLOGENETIQUE DES SOUCHES D' <i>ACINETOBACTER BAUMANII</i> RESISTANTES AUX CARBAPENEMES ISOLÉES LORS D'INFECTIONS NOSOCOMIALES. LES SOUCHES DE L'ÉTUDE AU SENEGAL ONT LEUR DENOMINATION COLOREE EN ORANGE. LES RONDS COLORES CORRESPONDENT AUX SEQUENCES TYPES TANDIS QUE LES CARRÉS COLORES AUX ZONES GEOGRAPHIQUES DE LEUR ORIGINE.	45
FIGURE 23 : MORPHOLOGIE DES PLAQUES DE LYSE DES BACTERIOPHAGES vKPIN17 (A) ET vKPIN18 (B) EN UTILISANT UNE SOUCHE CLINIQUE DE <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> KP26 ISOLÉE D'UNE INFECTION ASSOCIÉE AUX SOINS DANS LE CENTRE HOSPITALIER POUR ENFANTS ALBERT ROYER DE FANN A DAKAR. LES DEUX BACTERIOPHAGES LYTIQUES ONT ÉTÉ ISOLÉS A PARTIR DE DEUX EAUX USÉES COMMUNAUTAIRES.....	45
FIGURE 24 : L'EFFICACITE DE PLAQUAGE DES PHAGES vKPIN31 ET vKPIN32 SUR DES SOUCHES SENSIBLES, DESIGNÉES PAR LEUR TYPE K RESPECTIF ENTRE CROCHETS, A ÉTÉ ÉVALUÉE. UNE SÉRIE DE DILUTIONS STANDARDISÉES DE STOCKS DE PHAGES (2×10^{10} PFU/ML) POUR vKPIN31 ET vKPIN32 A ÉTÉ DÉPOSÉE EN TACHES SUR CHAQUE SOUCHE HÔTE, ET LE NIVEAU D'INFECTIOSITÉ A ÉTÉ ÉVALUÉ.	46

SOMMAIRE DES TABLES

TABLE 1 : LISTE DES VARIABLES ET PARAMETRES DU MODELE SIDR.	21
TABLE 2 : TABLEAU RECAPITULATIF DU DETAILS DES SOUCHES ISOLEES DANS LE PROJET.	41
TABLE 3 : RESISTANCES AUX ANTIBIOTIQUES DES SOUCHES DE <i>K. PNEUMONIAE</i> ISOLEES DANS L'ETUDE.	44
TABLE 4 : PROFILS GENETIQUES DE RESISTANCE DES 28 SOUCHES DE <i>K. PNEUMONIAE</i> ISOLEES DANS L'ETUDE.	44

Le texte relatif à l'intégrité scientifique :

Je déclare avoir respecté, dans la conception et la rédaction de ce mémoire d'HDR, les valeurs et principes d'intégrité scientifique destinés à garantir le caractère honnête et scientifiquement rigoureux de tout travail de recherche, visés à l'article L.211-2 du Code de la recherche et énoncés par la Charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et la Charte d'intégrité scientifique de l'Université de Montpellier. Je m'engage à les promouvoir dans le cadre de mes activités futures d'encadrement de recherche.

1 Curriculum Vitae

Guillaume CONSTANTIN DE MAGNY

CRCN – IRD

Né le 1 mars 1976 à Bron (Rhône), France.

UMR MIVEGEC (UM-IRD 224-CNRS 5290)

Maladies Infectieuses et Vecteurs : Écologie, Génétique, Évolution et Contrôle

Centre IRD de Montpellier

BP64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France

Téléphone : +33 4 67 41 63 70

Courriel : guillaume.demagny@ird.fr

Site internet : <http://www.mivegec.ird.fr>

• POSTES OCCUPES

- 2010-** Chargé de Recherche (2^{ème} classe - 2010, 1^{ère} classe – 2015, CRCN -2017 Ech 08 - 2021) à l'IRD, unité MIVEGEC (UM – IRD UR 224 - CNRS UMR 5290), Montpellier, France.
- 2006 – 2010** Post-doctorant, « University of Maryland Institute for Advanced Computer Studies», Université du Maryland, College Park, MD, USA.
- 2003 – 2006** Ingénieur d'étude 2^{ème} classe IRD UMR GEMI, Montpellier, France.
- 2001 – 2002** Consultant scientifique en biostatistiques, « Analyses des données de captures de grands pélagiques dans l'Océan Indien » (Société 2iE technologie), Montpellier, France.

• MISSIONS LONGUES DUREES et AFFECTATION

- 2013 (2 mois)** Clinique des Maladies Infectieuses, Centre Hospitalo-Universitaire de Fann, Dakar, Sénégal.
- 2014 (2 mois)** Unité de Bactériologie Expérimentale, Institut Pasteur de Dakar, Dakar, Sénégal.
- 2015 - 2019** Affectation à l'Unité de Bactériologie Expérimentale, Institut Pasteur de Dakar, Dakar, Sénégal.

• ACTIVITES D'EVALUATION

Journaux : Frontiers in Microbiology, PLoS Medecin, PLoS Neglected Tropical Diseases, Journal of Health Population and Nutrition, BMC Biology, British Medical Journal, International Journal Health Geographics, Health Policy and Planning, Comptes-rendus de l'académie des Sciences.

Projets de Recherches : Agence Nationale de la Recherche (ANR) et l'ERC, Master 1 d'écologie appliquée de l'université de Franche-Comté, l'Appel à Projets 2017 de la Région Nouvelle-Aquitaine, Bourse SCAC ambassade de France à Dakar (de 2015 à 2019), Grant Wellcome Trust.

2 Liste des publications et communications

2.1 ARTICLES SCIENTIFIQUES

Au 15 avril 2024, 28 publications dans des revues à comité de lecture, 9 chapitres de livre.

Les noms des étudiants et post-docs (co)encadrés sont soulignés dans la liste de publication complète ci-dessous.

Lo S., Ba B.S., Ahmet Niang, A., N'Diaye I., Diop M., **Constantin de Magny G.** Investigation of potentially pathogenic Vibrionaceae in Saint-Louis city, Senegal. Pan African Medical Journal, *In press*.

N'Diaye I., Debarbieux L., Diagne M., Sow O., Cissé A., Ba B.S., Fall C., Dieye Y., Dia N., Seck A., and **Constantin de Magny G.** Complete Genome Sequences of Two *Klebsiella pneumoniae* Phages from Dakar, Senegal. Microbiology Resource Announcements, *In press*.

N'Diaye I., Ba B. S., Thiam F., Boye M. M., Sow O., Cissé A., NDiaye B., Diallo T. A., Fall C., Dieye Y., Dièye B., Dieng A., Diop A., **Constantin de Magny G.** and Seck A. (2023). Antibiotic Resistance and Virulence Factors of Extended-Spectrum Beta- Lactamase-Producing *Klebsiella Pneumoniae* Involved in Healthcare-Associated Infections in Dakar, Senegal. Archives of Microbiology and Immunology. 7 (2023): 65-75. DOI:10.26502/ami.936500105

Sonko A., Brehmer P., **Constantin de Magny G.**, Le Pennec G., Ba B. S., Diankha O., Fall M., Linossier I., Henry M., N'Diaye I., Faye S., Kande Y., Galgani F. (2023). Pollution assessment around a big city in West Africa reveals high concentrations of microplastics and microbiologic contamination. Regional Studies in Marine Science Volume 59, April 2023, 102755. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2022.102755>

Sonko A., Copin D., Brehmer P., Diop C., **Constantin de Magny G.**, Fall M., Kande Y., Moulin P., Faye N. S., Faye S., Linossier I., Le Pennec G. (2022). Assessment of the global toxicity of marine sediments from the Dakar peninsula (Senegal, West Africa), Environ Monit Assess 2022 Dec 9;195(1):185. doi: 10.1007/s10661-022-10635-2.

Graveleau J, Reserva ME, Keita A, Molinari R and **Constantin de Magny G (2021)** Influence of Community-Led Total Sanitation and Water Coverages in the Control of Cholera in Madarounfa, Niger (2018). Front. Public Health 9:643079. doi: 10.3389/fpubh.2021.643079

Moore S, Dongdem AZ, Opore D, Cottavoz P, Fookes M, Sadji AY, Dzotsi E, Dogbe M, Jeddi F, Bidjada B, Piarroux M, Valentin OT, Glèlè CK, Rebaudet S, Sow AG, **Constantin de Magny G**, Koivogui L, Dunoyer J, Bellet F, Garnotel E, Thomson N, Piarroux R. (2018), Dynamics of cholera epidemics from Benin to Mauritania. PLoS Negl Trop Dis. 2018 Apr 9;12(4):e0006379. doi: 10.1371/journal.pntd.0006379.

Ba B.S., Diallo MH, Seck A, Wane AA, **Constantin de Magny G**, Boye CS-B, Sow AI and Gassama-Sow A (2017) Identification of Atypical El Tor *V. cholerae* O1 Ogawa Hosting SXT Element in Senegal, Africa. Front. Microbiol. 8:748. doi: 10.3389/fmicb.2017.00748

Finger, F., Genolet, T., Mari, L., **Constantin de Magny G.**, Manga, N. M., Rinaldo, A., et Bertuzzo, E. (2016). Mobile phone data highlights the role of mass gatherings in the spreading of cholera outbreaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 6421-6.

Landier J., **Constantin de Magny G.**, Garchitorena A., Guégan J.-F., Gaudart J., Marsollier L., Le Gall P., Giles-Vernick T., Fontanet A., Eyangoh S., Texier G., (2015) Seasonal variations in Buruli Ulcer incidence, Central Africa, 2002-2012. *Emerging Infectious Diseases*; 21(8): 1414–1417. doi:

Constantin de Magny G., Hasan, N. A., & Roche, B. (2014). How community ecology can improve our understanding of cholera dynamics. *Frontiers in Microbiology*, 5 (137). doi:10.3389/fmicb.2014.00137

Haley, B. J., Kokashvili, T., Tskshvediani, A., Janelidze, N., Mitaishvili, N., Grim, C. J., **Constantin de Magny G.**, et al. (2014). Molecular Diversity and Predictability of *Vibrio parahaemolyticus* along the Georgian coastal zone of the Black Sea. *Frontiers in Microbiology*.

Roche, B., Broutin, H., Choisy, M., Godreuil, S., **Constantin de Magny, G.**, Chevaleyre, Y., et al. (2014). Optimal control of infectious diseases in low-income countries: the niche reduction approach. *BMC Public Health*, 14, art. 753 [9 p. en ligne]. ISSN 1471-2458.

Constantin de Magny G., Thiaw W., Kumar V., Diop B.M., Gueye L., Kamara M., Roche B., Murtugudde R., and Colwell R.R.. (2012) Cholera outbreak in Senegal in 2005: Was Climate a Factor? *PLoS One*, 7(8):e44577. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044577>

Banakar V., **Constantin de Magny G.**, Jacobs J., Murtugudde R., Huq A., Wood R., Colwell R.R. (2012): Temporal and Spatial Variability in the Distribution of *Vibrio vulnificus* in the Chesapeake Bay: A Hindcast Study. *EcoHealth Journal*: 1-12, DOI: 10.1007/s10393-011-0736-4

Constantin de Magny G., Mozumder P.K., Grim C.J., Hasan N.A., Naser M.N., Alam M., Sack R.B., Huq A., Colwell R.R. (2011) Role of Zooplankton Diversity in *Vibrio cholerae* Population Dynamics and in the Incidence of Cholera in the Bangladesh Sundarbans. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(17):6125-6132, DOI: 10.1128/AEM.01472-10

Akanda A. S., Jutla A. S., Alam M., **Constantin de Magny G.**, Siddique A. K., Sack R. B., Huq A., Colwell R. R., Islam S. (2011). Hydroclimatic Influences on Seasonal and Spatial Cholera Transmission Cycles: Implications for Public Health Intervention in the Bengal Delta. *Water Resour. Res.*, 47, W00H07, doi:10.1029/2010WR009914.

Saumitou-Laprade P., Vernet P., Vassiliadis C., Hoareau Y., **Constantin de Magny G.**, Dommée B., and Lepart J. (2010) A completely novel self-incompatibility system explains high male frequencies in an androdioecious plant, *Science*. 2010 Mar 26;327(5973):1648-50.

Constantin de Magny G., Long W., Brown C.W., Hood R., Huq A., Murtugudde R., Colwell R.R. (2009) Predicting Distribution of *Vibrio* spp. in the Chesapeake Bay: *Vibrio cholerae* Case Study, *EcoHealth Journal*. 2009 Sep;6(3):378-89. Epub 2010 Feb 10

Constantin de Magny G., Colwell R.R. (2009). Cholera and Climate: A Demonstrated Relationship. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*. 120: 119-128.

Constantin de Magny G., Murtugudde R., Sapiano M.R.P., Nizam A., Brown C.W., Busalacchi A.J., Yunus M., Nair B.G., Gil A.I., Lanata C.F., Calkins J., Manna B., Rajendran K., Bhattacharya M.K., Huq A., Sack R.B., Colwell R.R. (2008) Environmental Signatures Associated with Cholera Epidemics, *PNAS*, Nov 18,105(46):17676-81. Epub 2008 Nov 10.

Philippon S., Broutin H., **Constantin de Magny G.**, Toure K., Diakite C.H., Fourquet N., Courel M.F., Sultan B., Guégan J.F. (2008). Meningococcal Meningitis in Mali: A long-term study of persistence and spread. *International Journal of Infectious Diseases*, 1st August 2008 on-line publication. doi:10.1016/j.ijid.2008.05.1223.

Broutin H., Philippon S., **Constantin de Magny G.**, Courel M.F., Sultan B., Guégan J.F. (2007). Comparative study of meningitis dynamics across nine African countries: a global perspective. *International Journal of Geographic Health*, July 10, 6:29.

Constantin de Magny G., Guégan J.F., Petit M., Cazelles B. (2007). Regional-scale climate-variability synchrony of cholera epidemics in West Africa. *BMC Infectious Diseases*, 7:20, doi:10.1186/1471-2334-7-20.

Cazelles B., Chavez M., **Constantin de Magny G.**, Guégan J.F. and Hales S. (2007). Time dependent

spectral analysis of epidemiological time series with wavelets. *Journal of the Royal Society Interface*, 14 Feb 2007, Page FirstCite, DOI 10.1098/rsif.2007.0212.

Constantin de Magny G., Cazelles B., and Guégan J.F. (2006). The Cholera threat to humans in Ghana is influenced by both global and regional climatic variability. *EcoHealth* Vol 3 Issue iv.

Constantin de Magny G., Paroissin C., Cazelles B., de Lara M., Delmas J.F. and Guégan J.F. (2005). Modeling environmental impacts of plankton reservoirs on cholera population dynamics *European Series in Applied and Industrial Mathematics (ESAIM): Proceedings, Mathematics and applications to biology and medicine* (eds. E. Cancès and J.F. Gerbeau), EDP Sciences, Paris, France. 14: 156-173.

Caby B., **Constantin de Magny G.**, Godin J., Marchyllie M. (2001). Découverte de la Grenouille des champs (*Rana arvalis* Nilsson 1842) Anura, Ranidae dans le département du Nord. *Bull. Soc. Herpét. de F.* 95 / 5-18.

2.2 CHAPITRES D'OUVRAGES

Constantin de Magny, G. (2015) Une écologie de la santé en expansion. *Biofutur*. 361: 47-49

Constantin De Magny, G. (2015). Ecologie de la santé : Nouvelle perspectives en santé publique. In M. Vittecoq, B. Roche, F. Prugnotte, F. Renaud & F. Thomas (Eds.), *Les Maladies Infectieuses* (p. 305-329). Paris: De Boeck Solal.

R.R. Colwell, **G. Constantin de Magny** (2008) Climate, Ocean, and Cholera. In *Ocean: An Illustrated Atlas*, p 307 (eds. Earle S.A, Glover L.K.). National Geographic Society Books.

G. Constantin de Magny, F. Renaud, P. Durand, J.F. Guégan. (2008). Ecology of Health: the Macroscope as a new Tool! In: *Ecology and Evolution of Parasitism*, pp 129-138 (eds. THOMAS F., GUEGAN J.F., RENAUD F.). Oxford University Press.

Guégan J.F. **Constantin de Magny G.**, Durand P. and Renaud F. (2007). Ecologie de la Santé : le Macroscope, un Nouvel Outil ! In: *Ecologie et Evolution des Systèmes Parasités*, pp 301-344 (eds. THOMAS F., GUEGAN J.F., RENAUD F.). De Boeck Université, Paris, France.

Guégan J.F. and **Constantin de Magny G.** (2007). Epidemiology in a Changing World: the Need for a Bigger Picture! In: *Encyclopedia of Infectious Diseases: Modern Methodologies, Chapter 33*, pp 567-587 (ed. TIBAYRENC M.). Wiley & Sons Ltd., Chichester, USA.

Constantin de Magny G., Desruisseaux M., Petit M. (2006) De la statistique élémentaire à l'analyse de co-inertie. In: Petit Michel (ed.), Huynh Frédéric (ed.). *Halieutique et environnement océanique : le cas de la pêche palangrière à l'espadon depuis l'île de la Réunion*. Paris (FRA) : IRD, 2006, p. 95-118. ISBN 2-7099-1583-9

Desruisseaux M. Petit M., **Constantin de Magny G.**, Huynh F. (2006) Essai d'utilisation des réseaux de neurones. In: Petit Michel (ed.), Huynh Frédéric (ed.). *Halieutique et environnement océanique : le cas de la pêche palangrière à l'espadon depuis l'île de la Réunion*. Paris (FRA) : IRD, 2006, p. 171-179. ISBN 2-7099-1583-9

Constantin de Magny G. and Choisy M. (2004). Mathematical and technological tools: when cholera meets the satellite. In: *Biodiversity and Global Change, Chapter V*, pp 126-128 (eds. Barbault R., Chevassus-au-Louis B.), ADPF/MAE editions, Paris. *Also in French version.*

2.3 COMMUNICATIONS INTERNATIONALES

G. Constantin de Magny. Modeling the role of mass gatherings in the spreading of cholera outbreaks in Senegal using human mobility estimates derived from mobile phone records. 2016 Vibrio Conference, 29/03-2/04 2016, Roscoff, France. (*oral communication*)

G. Constantin de Magny. Moving toward cholera prediction: Modeling the 2004-2008 epidemics in Senegal. ASTMH, 62nd Annual Meeting, November 15-17, 2013, Washington DC, USA. (*invited oral communication*)

G. Constantin de Magny, W. Thiaw, V. Kumar, N.M. Manga, B.M. Diop, L. Gueye, M. Kamara, B. Roche, R. Murtugudde, and R.R. Colwell. Quel role pour le climat dans l'épidémie de cholera au Sénégal en 2005 ? 6^{ème} congrès de la Société Ouest Africaine de Parasitologie, 18-20 décembre 2012, Dakar, Sénégal. (*oral communication*)

G. Constantin de Magny, R. Murtugudde, and R. Colwell. Are outbreaks of cholera in Africa related to high impact weather events? NIAID, 1st conference on Bacterial Waterborne and Emerging Infectious Diseases: Collaborative Research Opportunities in North Africa and the Middle East. January 31 - February 3, 2011, Nicosia, Cyprus (*invited oral communication*)

G. Constantin de Magny, W. Long, C.W. Brown, R. Murtugudde and R. Colwell. Forecasting distribution of waterborne pathogens in the Chesapeake Bay: *Vibrio cholerae* Case Study. January 2010, 90th American Meteorological Society Annual Meeting. Atlanta, GA, USA. (*invited oral communication*)

G. Constantin de Magny. Ecology of *Vibrio cholerae*, epidemiology of cholera: What role for climate? December 2009, 1st Seminar for European and American Research on Climate and Health. French Embassy, Washington D.C., USA. (*invited oral communication*)

G. Constantin de Magny, M.R.P. Sapiano, R. Murtugudde, N.C. Sharma, M. Yunus, B. G. Nair, K. Rajendran, A. Huq, R. B. Sack, and R. R. Colwell. Seasonal and Interannual Dynamics of Cholera Epidemics in Asia. December 2009, 2nd International Conference on Infectious disease dynamics. Athens, Greece. (*oral communication*)

G. Constantin de Magny, Raghu Murtugudde, W. Thiaw, R. Colwell. Are outbreaks of cholera in Africa related to high impact weather / climate events? 20-24 July 2009, *The third AMMA International conference*, Ouagadougou, Burkina Faso. (*oral communication*)

G. Constantin de Magny. When epidemiology of cholera meets ecology of *Vibrio cholerae*. June 2009, seminar at the Forgy International Center, NIH, Bethesda, MD, USA. (*invited oral communication*)

G. Constantin de Magny, R. Murtugudde, M.R.P. Sapiano, A. Nizam, C. W. Brown, A. J. Busalacchi, M. Yunus, B. G. Nair, B. Manna, K. Rajendran, M. K. Bhattacharya, A. Huq, R. B. Sack, and R. R. Colwell. Environmental Signatures associated with cholera epidemics.

G. Constantin de Magny, R. Murtugudde, C.W. Brown, W. Long, R. Hood and R.R. Colwell. Is Human Pathogen Prediction possible in Chesapeake Bay?. December 2008, 1st International Conference on Infectious disease dynamics. Asilomar, CA, USA. (*Posters*)

G. Constantin de Magny. Cholera and Climate: a Demonstrated Relationship. October 17, 2008, 121st meeting of the American Clinical and Climatological Association, Ponte Vedra Beach, FL, USA. (*invited oral communication*)

G. Constantin de Magny and R.R. Colwell. Oceans, Climate, Infectious Disease, And Human Health: From Gene Probes To Remote Sensing. July 2008, *International Geoscience and Remote Sensing Symposium*. Boston, MA, USA. (*oral communication*)

G. Constantin de Magny. Human Pathogen Prediction System in the Chesapeake Bay. July 2008, 1st Ocean and Human Health Gordon research Conferences. Tilton, NH, USA. (*Poster*)

G. Constantin de Magny, R. Murtugudde, C.W. Brown, W. Long, R. Hood and R.R. Colwell. Human Pathogen Prediction System in the Chesapeake Bay. May 2008, *Chesapeake Community Modeling Program Symposium*. Annapolis, MD, USA. (*oral communication*)

G. Constantin de Magny. Ecology of cholera: integrated approaches from monitoring to prediction. April 2008, seminar at the Climate Prediction Center, NOAA, Camp Spring, MD, USA. (*invited oral communication*)

G. Constantin de Magny R. Murtugudde, C.W. Brown, R. Hood and R.R. Colwell. Is Global Prediction of Cholera Possible? Preliminary study in the Chesapeake Bay, Maryland USA. December 2007, *Vibrio 2007 – The biology of vibrios*. Institut Pasteur de Paris, Paris, France. (*poster*)

G. Constantin de Magny. Ecology of cholera: integrated approach from survey to prediction. November 2007, *seminar at the Microbiology Laboratory, Environment, Microbiology and Phycotoxine Departement - IFREMER*, Plouzané, France. (*invited oral communication*)

G. Constantin de Magny and R.R. Colwell. Ocean, Bay, Pond and Ecology of Infectious Diseases: the cholera paradigm. October 2007, *seminar at the University of Maryland Center for Environmental Science - Horn Point Laboratory*, Cambridge, Maryland, USA. (*invited oral communication*)

G. Constantin de Magny, M. Petit, J.F. Guégan, and B. Cazelles. Regional-scale synchrony of cholera epidemics in the Equatorial Atlantic Coast (Gulf of Guinea). February 2007, *seminar at the Earth System Science Interdisciplinary Center*, University of Maryland, USA. (*invited oral communication*)

G. Constantin de Magny, B. Cazelles, J.F. Guégan. Regional-scale synchrony of cholera epidemics in West Africa with climate variability. October 2006, *EcoHealth ONE*, University of Madison, WI, USA. (*oral communication*)

G. Constantin de Magny, B. Cazelles, M. Petit, J.F. Guégan. Regional-scale synchrony of cholera epidemics in West Africa. September 2006, September 2006, *The Eighteenth Conference of the International Society of Environmental Epidemiology*, Paris, France. Book of Abstracts p 329. (*oral communication*)

G. Constantin de Magny, B. Cazelles, J.F. Guégan. Regional-scale synchrony of cholera epidemics in the Equatorial Atlantic Coast (Gulf of Guinea). November 2005, *Vibrio 2005*, University of Ghent, Belgium. (*oral communication*)

G. Constantin de Magny, B. Cazelles, M. Petit, J.F. Guégan. Trophic Cascades and Disease: Modeling Cholera Cases Population Dynamics. August 2005, *1st International Conference on Health and Biodiversity*, Galway, Ireland. (*invited oral communication*)

G. Constantin de Magny, B. Cazelles, M. Petit, J.F. Guégan. Regional-Scale Synchrony of Cholera Epidemics in the Equatorial Atlantic Coast (Gulf of Guinea). April 2005, *5th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Copenhagen, Denmark. (*oral communication*)

G. Constantin de Magny, M. Petit and J.F. Guégan. Ecological epidemiology: towards predicting cholera outbreaks. July 2004, *IX European Multicollloquium Of Parasitology (EMOP)*, Valencia, Spain. (*poster*)

Participation to the *7th International Meeting on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases (MEEGID VII)*, July 2004, Valencia, Spain.

J.F. Guégan, H. Broutin, **G. Constantin de Magny**, B. Roche, and M. Choisy. Macroecology of population dynamics of infectious diseases: connecting geographical distributions with population processes. 2004, *Conférences Jacques-Monod 2004*, Roscoff, France.

2.4 DIFFUSIONS GRAND PUBLIC ET AUTRES MEDIA

Importance de l'écologie de la santé CREES (2020) <https://lejournal.cnrs.fr/billets/face-aux-pandemies-les-sciences-de-lecologie-sont-plus-que-jamais-necessaires>. Collectif de scientifiques du Centre de Recherches en Ecologie et Evolution de la Santé, les auteurs ont été classés par ordre alphabétiques. Tribune publiée sur le site du journal du CNRS.

Deux articles dans le journal de l'IRD "Sciences au Sud".

Reportage TV5 Monde : Sénégal : la pollution menace la presqu'île de Dakar. (2017)
<https://information.tv5monde.com/afrique/senegal-la-pollution-menace-la-presquile-de-dakar-27911>

Reportage AWATOX France 24 (2017) : <https://www.france24.com/fr/20171208-focus-senegal-pollution-economie-tourisme-sante-ecologie>

Reportage Production IRD (2018) : Pollution marine au Sénégal : AWATOX, projet de démonstration sur la presqu'île de Dakar. <https://www.youtube.com/watch?v=Q0-PXzpNXbs>

Journée Mondiale pour l'environnement, 5 juin 2018 à Tivaouane, Sénégal sur sollicitation de la DEEC du MEED du Sénégal.

Journée de restitution publique du projet AWATOX et marche citoyenne, 17 novembre 2017 à Dakar, Sénégal.

Interview Radio (RFI 2005).

3 Enseignements et Encadrements

• Enseignements

2010-2014 : Master of Public Health, Ecole des Hautes Etudes de Santé Publique (EHESP), Paris

Module M2: Global environmental change and health, "Climate Change and Infectious Diseases" (3 hours)

Master of Ecology and Biodiversity, University of Montpellier II

Module M2 STIC: Emerging Diseases and Global Change, "Climate Change and re-emergence of infectious agents" (3 hours)

M2 DIPHE module: Quantitative Epidemiology (module leader, 24 hours), "Modelling epidemic dynamics" (2 x 3 hours)

DEESC module: Dynamics of Epidemics, Environment, Societies and Control, "Environmental epidemiology: the case of cholera" (2 hours)

2018 : Master of Parasitology, Cheikh Anta Diop University, Dakar

• Encadrements

Master :

2009 : Vinita Banakar, M2 University of Maryland, College Park, USA.

2011 : Vincent Nouchi, M1 Observatoire de Versailles Saint Quentin en Yvelines et Département de Physique, Sciences pour l'Ingénieur, mécanique, Environnement.

2013 : Katy Fawcett, Erasmus Mundus Master Programme in Evolutionary Biology (MEME).

2014 : Leny CALVEZ, M1 Interactions Micro-organismes Hôtes Pathogènes (IMHE).

2015 : Abdourahmane FALL, Thèse de Pharmacie, Faculté de Pharmacie de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar. Co-encadrement avec le Pr Fafa Cissé, CHNU de Fann, Sénégal.

2016 : Amidou SONKO, M2 Biotoxicologie appliquée à l'environnement, l'industrie et la santé

2018 : Issa NDIAYE, M2 Bactériologie, UCAD, Dakar, Sénégal

Thèse :

2020-2024 : Issa N'Diaye, UCAD/Institut Pasteur de Dakar, encadrant principal le Professeur A. Seck de l'IPD, co-encadrement. Sujet : « La phagothérapie comme outil de lutte contre les bactéries multi-résistantes impliquées dans les infections nosocomiales : identification des bactériophages performants et essais d'application »

Post-Doctorant :

2016 : Dr Bissoume Samb Bâ, projet UNICEF (2016/2017)

4 Contrats de recherche, financements

Octobre 2011 : " Approche pour relier des anomalies climatiques et la dynamique des *Vibrio* pathogènes humains dans les systèmes –marins côtiers français ". GIS Climat – Environnement – Société. PI : Sylvie Jousseume, (UMR 8212 LSCE): 35 000 euros.

Octobre 2012 : « Dépistage systématique des vibrions chez les patients admis pour diarrhées au CHR de Saint-Louis, Sénégal ». Co-responsable avec : Seynabou Lô (UGB, Sénégal) : 5 000 euros

Mai 2012 : « Etude intégrative de l'éco-épidémiologie du choléra en Afrique », ACI type 3 DSS de l'IRD. Responsable : G. Constantin de Magny, 2 000 euros

Mai 2013 : « Ecologie des populations naturelles de *Vibrio* spp. au Sénégal», ACI type 3 DSS de l'IRD. Responsable : G. Constantin de Magny, 2 000 euros

Février 2014 : « *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) en France et au Sénégal : liens épidémiologiques et génétiques.», BUSR de l'UM1. Responsable : P. Corne, co-porteur : G. Constantin de Magny, 24 900 euros.

Juin 2015 : « Evaluation of a simple dipstick test for detection of *Vibrio cholerae* O1 and O139 in environmental water in West Africa», UNICEF. PI : G. Constantin de Magny, co-PI : Amy G. Sow (IPD), F. Bellet et J. Dunoyer (UNICEF WCARO), 40 000 dollars.

Mars 2017 : « Operational transfer of a simple dipstick test for detection of *Vibrio cholerae* O1 and O139 in environmental water in Niger», ECHO Dakar via l'UNICEF. PI : G. Constantin de Magny, co PI : Amy G. Sow (IPD), F. Bellet et J. Gauthier (UNICEF WCARO), 25 000 euros.

Mars 2017 : « Cholera modeling in West Africa based on cell phone data mobility », ECHO Dakar via l'UNICEF. PI : G. Constantin de Magny, co PI : Amy G. Sow (IPD), F. Bellet et J. Gauthier (UNICEF WCARO), 30 000 euros.

Septembre 2017 : « Campagne de prélèvement et d'analyse de l'efficacité des pastilles bi-couches de la société Aquasure pour clarifier et désinfecter l'eau prélevée directement dans l'environnement en vue de la commercialisation au Sénégal ». L'expertise que j'ai dirigée pour un montant de 10 000€ a été réalisée au Laboratoire de Sécurité Alimentaire et d'Hygiène de l'Environnement de l'IPD.

Avril 2019 : « Etiologie des diarrhées aiguës sanglantes au Sénégal », CDC, PI : Bissoume Samb Bâ (IPD), co-PI : G. Constantin de Magny, 250 000 dollars, renouvelé en 2021.

Juillet 2019 : « Evaluation de la qualité de l'eau récréative en vue de l'organisation d'épreuves aquatiques des JOJ », CIO, Co-Pi : G. Constantin de Magny, P. Brehmer (LEMAR) 38 000 euros.

Octobre 2021 : « Écologie du pathobiome et du résistome marins pour la gestion de la santé et de l'alimentation », soumis à l'appel à projets de recherche dans le cadre du Programme National de Recherche Environnement-Santé-Travail (PNR EST) piloté par l'Anses. PI Jean-Christophe Auguet (44 mois), 196 959€.

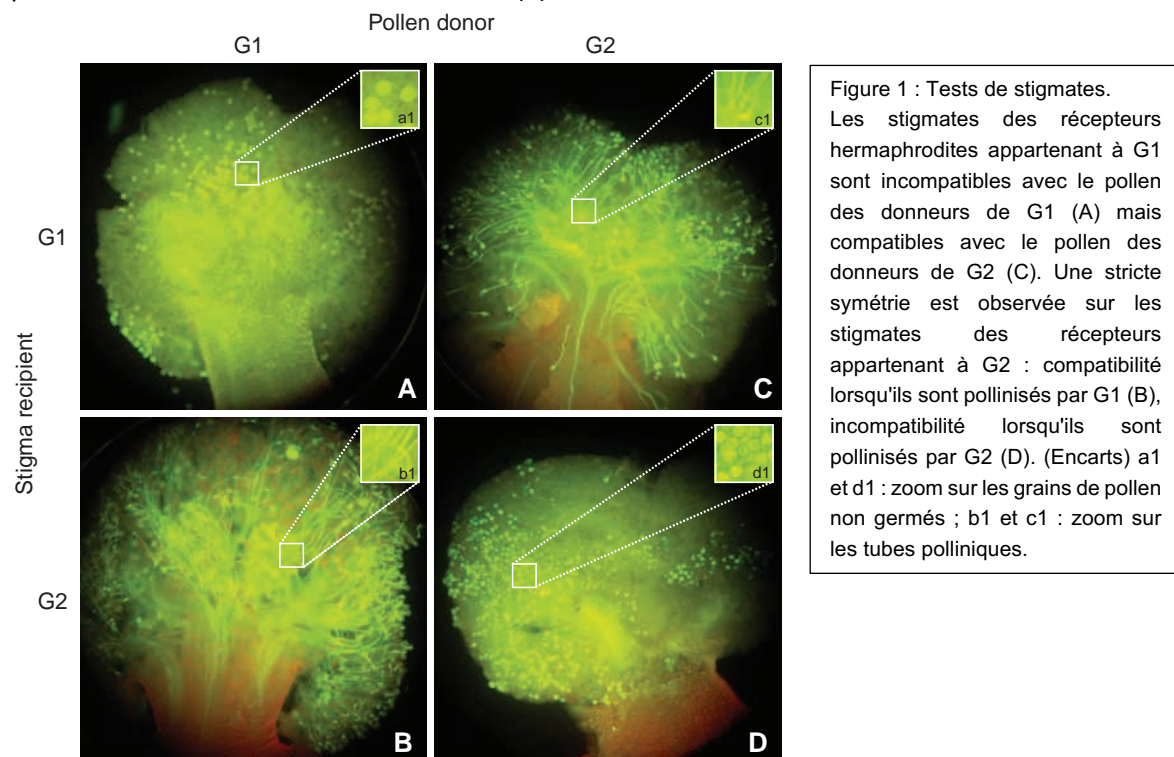
5 Résumé des travaux scientifiques effectués

La thématique/discipline qui caractérise mes recherches et ma carrière est l'écologie et dynamique des populations avec comme finalité la compréhension de l'écologie des maladies infectieuses. Mon approche combine études de terrain, expériences de laboratoire, outils moléculaires et modèles mathématiques, et utilise une très grande diversité de modèles biologiques (plantes sauvages ou d'intérêts agronomiques, amphibiens, grands pélagiques, bactéries, virus).

5.1 ECOLOGIE FONCTIONNELLE DU DEUG AU DEA :

De formation universitaire à l'université des Sciences et Technologie de Lille (Lille 1), j'ai entamé mon cursus avec un parcours en DEUG SV option « Biostage » (1997), Licence Biologie des Organismes (1998), puis Maîtrise « Biologie des Populations et des Ecosystèmes », option « Gestion des systèmes écologiques » (1999). En DEUG, j'ai réalisé mon stage de la filière biostage de 8 semaines ponctuées par un rapport et une soutenance au laboratoire de biologie végétale appliquée du Museum d'Histoire Naturelle de Paris sur la systématique et génétique de la carotte sauvage de la presqu'île de Quiberon.

Durant ma licence de biologie des organismes, j'ai réalisé des stages volontaires au laboratoire de Génétique et Evolution des Populations Végétales, UMR CNRS 8016 Lille 1, sur la génétique, l'évolution et l'écologie des populations végétales. J'ai assisté une doctorante sur ses travaux de thèse sur l'évolution et maintien de l'androdioécie : étude théorique et approches expérimentales chez *Phillyrea angustifolia* L. (Figure 1). Cette contribution à ces recherches a permis de produire une publication dans la revue Science en 2010 (1).



Dans la continuité de cette expérience entre la licence et la maîtrise, j'ai contribué à la recherche portant sur la diversité génétique des populations de nénuphars jaunes de l'Escaut dans le Nord.

En Maîtrise, j'ai réalisé mon stage de la filière en binôme sur l'inventaire et la cartographie des espèces d'amphibiens et de reptiles de la réserve naturelle volontaire de la grande tourbière de Vred, pour le Parc Naturel Régional de la Scarpe et de l'Escaut (1999) et décrit une espèce de grenouille rare encore non décrite dans cette région et donné lieu à une publication dans le bulletin de la société herpétologique de France ¹.



Figure 2 : Grenouille des champs (*Rana arvalis*) mâle, capturée à Vred le 26 avril 1999.

¹ B. Caby, G. Constantin de Magny, J. Godin, M. Marchyllie. Observation de la Grenouille des champs *Rana arvalis* Nilsson, 1842 (Anura, Ranidae) dans le département du Nord (France). 2000, Bulletin de la Société herpétologique de France, 95, 5-18.

Entre la maîtrise et le DEA, j'ai contribué aux recherches d'un doctorant de l'unité GENETROP de l'IRD de Montpellier où j'ai abordé les aspects de gestion des ressources génétiques des espèces de caféiers, plantes cultivées d'intérêt économique majeur pour les pays d'Afrique de l'Ouest, au sein de l'UR IRD « Diversité et Génomes des Plantes Cultivées » (Montpellier, responsable scientifique : Dr M. Noirot). C'est là que j'ai commencé à m'impliquer dans la recherche pour le développement et au Sud.

J'ai ensuite complété ma formation universitaire en statistiques et mathématiques appliquées à la biologie par un DEA d'analyse et modélisation des systèmes biologiques (université Claude Bernard, Lyon). Mon stage de Master co-encadré entre le CIRAD-Forêt (Montpellier et Kourou en Guyane) et le laboratoire de Biométrie et de Biologie Evolutive de l'université Claude Bernard. Mon stage a porté sur la dynamique spatiale de *Wacapoua americana*, une essence naturelle de la forêt tropicale guyanaise (responsable scientifique : Dr S. Gourlet-Fleury, CIRAD-Fôret). J'ai réalisé l'échantillonnage complet de la population étudiée sur le terrain et le génotypage des individus à Kourou. La seconde partie du stage consistait en l'analyse de la structuration spatiale de la population en intégrant les données génétiques acquises dans un système d'information géographique (SIG) élaboré à partir de données géographiques géoréférencées de l'ensemble des individus étudiés (responsables scientifiques : Drs J.-P. Pascal et D. Chessel, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, UCBL, Lyon). Ce travail, à la fois de terrain, de laboratoire et d'analyses statistiques m'a permis d'acquérir de nouvelles compétences sur l'utilisation de SIG, la spatialisation de données hétérogènes ainsi que sur l'analyse de la dynamique spatiale d'un modèle biologique en milieu tropical.

Entre le DEA et le doctorat, j'ai réalisé deux expertises pour l'unité ESPACE de l'IRD de Montpellier, en qualité d'ingénieur d'étude en Biostatistique (2001-2002), sur l'analyse et la modélisation de données de pêche dans l'océan Indien. J'ai réalisé les analyses statistiques descriptives de la base de données des espèces pélagiques capturées 1/ par la technique de la palangre et 2/ par la technique de la pêche à la senne en relation avec les paramètres biophysiques du milieu appréhendés par télédétection spatiale. Les données environnementales se présentaient sous formes d'images et de cartes de synthèse reçues et traitées in situ par la station de Surveillance de l'Environnement Assistée par Satellites (SEAS) de l'IRD de La Réunion. Ce travail a servi par la suite à développer des modèles de prédiction de la présence de ces espèces par la surveillance en temps réel de l'environnement marin (plusieurs chapitres dans un ouvrage des éditions IRD).

En résumé sur mon cursus universitaire du DEUG au Doctorat :

Mon cursus est un parcours guidé par ma passion de l'écologie et de la compréhension du vivant. Initialement dans le domaine de l'écologie végétale mais plus largement ensuite sur l'écologie et l'évolution. J'ai utilisé les outils à la fois de la biologie moléculaire que de la télédétection et de la biostatistique et la modélisation pour la compréhension de la dynamique des populations en milieu tempéré comme tropical.

5.2 ECOLOGIE DES MALADIES INFECTIEUSES :

5.2.1 Doctorat : le cas du choléra en Afrique

J'ai ensuite complété ma formation par un doctorat en écologie et biologie évolutive (université Montpellier 2). J'ai réalisé ma thèse (2003-2006), dirigée par le Dr JF Guégan (UMR IRD/CNRS 2724 'Génétique et Evolution des Maladies Infectieuses') et co-dirigée par le Dr M Petit (Unité ESPACE IRD) intitulée « Evolution Climatique et Santé : Eco-épidémiologie du choléra en

Afrique ». C'est au cours du doctorat que je me suis pleinement spécialisé sur l'écologie des maladies infectieuses. J'ai développé et mis à profit mes compétences en analyse et modélisation, ainsi qu'en télédétection spatiale, pour le développement d'outil d'aide à la prédiction du risque, en les appliquant à l'épidémiologie des maladies infectieuses et à la prédiction du risque sanitaire pour les populations des pays de Sud.

Le choléra, dû aux souches pathogènes de la bactérie *Vibrio cholerae*, représente un important problème de santé publique dans les pays du Sud. La nature autochtone de *V. cholerae* dans le milieu aquatique rappelle que cette bactérie, avant d'être pathogène pour l'homme, joue un rôle écologique dans son écosystème. Cette dernière propriété implique une influence directe des conditions environnementales et climatiques sur la présence, la persistance et l'abondance de la bactérie dans l'écosystème aquatique et donc indirectement sur l'émergence du choléra chez l'homme. Cette relation choléra/environnement a déjà été étudiée en Asie et en Amérique du Sud mais aucune étude ne s'était alors intéressée à la situation sur le continent le plus affecté, l'Afrique.

Dans un premier temps, j'ai analysé les dynamiques de cas de choléra dans différents pays d'Afrique de l'Ouest et du Nord par les analyses d'ondelettes. Le principe de l'analyse en ondelette est détaillé et illustré dans l'article Cazelles *et al.* (2007) en particulier au travers de la Figure 3 (2).

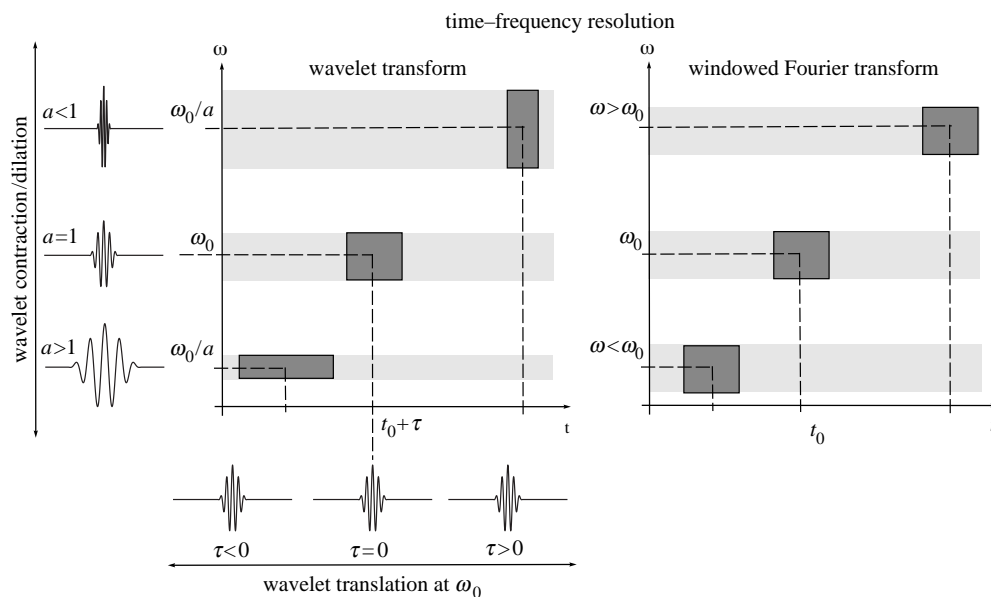


Figure 3 : Résolution temps-fréquence de l'approche par ondelettes. (a) Exemples d'ondelettes et de leurs boîtes temps-fréquence représentant la distribution de variance (énergie) correspondante. Lorsque l'échelle a diminue, la résolution temporelle s'améliore mais la résolution en fréquence se dégrade et est décalée vers les hautes fréquences. Inversement, si a augmente, les boîtes se déplacent vers la région des basses fréquences et la hauteur des boîtes devient plus courte (avec une meilleure résolution en fréquence) mais leur largeur s'allonge (avec une mauvaise résolution temporelle). (b) Contrairement aux ondelettes, toutes les boîtes de la transformée de Fourier à fenêtre sont obtenues par un décalage dans le temps ou en fréquence d'une fonction unique, ce qui produit les mêmes étalements de variance sur tout le plan temps-fréquence.

J'ai ensuite exploré la relation entre la dynamique de cas de choléra à l'échelle d'un pays, le Ghana, et d'une part (i) la variabilité locale du climat et de l'environnement côtier (i.e. précipitations, température de surface terrestre (LSTA) et océanique) et d'autre part (ii) la variabilité globale du climat (i.e. Indice de l'Oscillation Indienne (IOI)). Les analyses ont montré l'association entre la dynamique de cas de choléra au Ghana à la fin des années 1980 et les différentes variables climatiques et environnementales prises en compte dans l'étude comme illustré sur la Figure 4 (3).

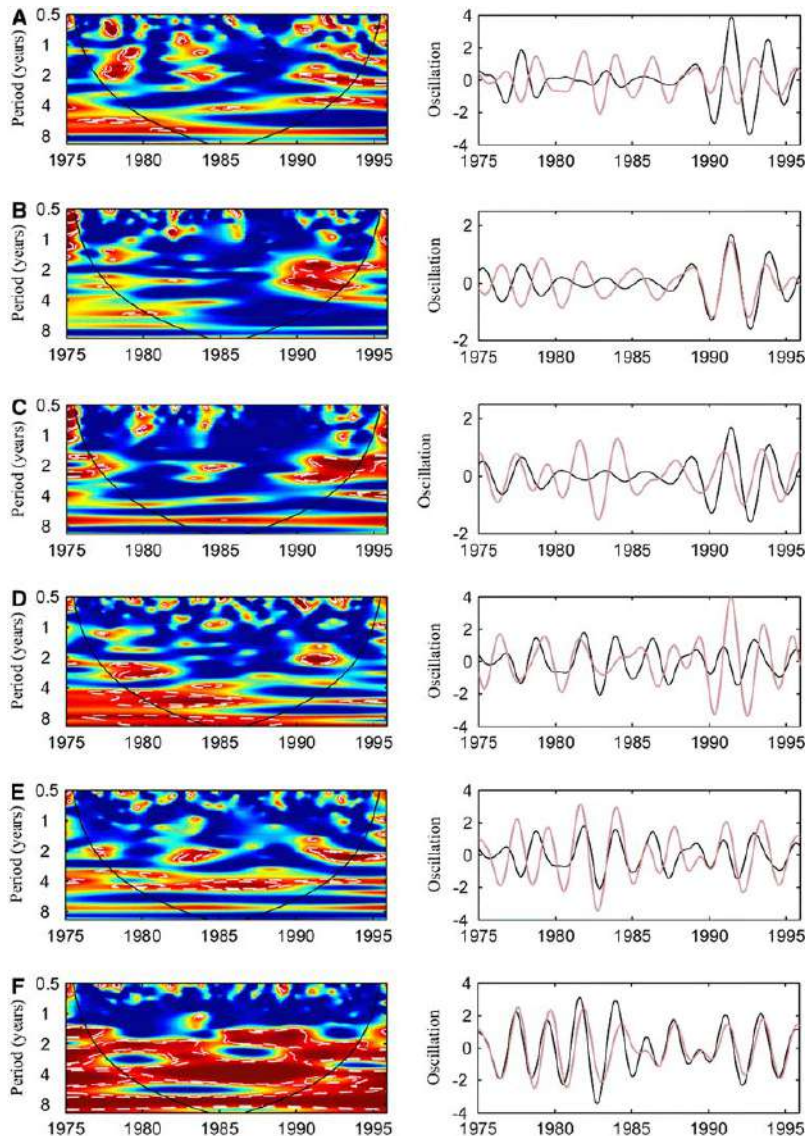


Figure 4 : Analyse de cohérence en ondelettes (en utilisant la fonction d'ondelette de Morlet) et analyses de synchronie de toutes les séries temporelles étudiées pour le Ghana. (A) incidence/IOI ; (B) incidence/précipitations ; (C) incidence/LSTA1 ; (D) IOI/précipitations ; (E) IOI/LSTA1 ; et (F) LSTA1/LSTA2. Le panneau de gauche montre la cohérence en ondelettes des différentes séries (axe des x : temps en année ; axe des y : période en année). La puissance est codée de faibles valeurs, en bleu foncé, à des valeurs élevées, en rouge foncé. Les lignes pointillées blanches indiquent le niveau de signification $\alpha = 5\%$ calculé après une analyse de bootstrap sur 1000 séries. La zone intérieure au sein du cône d'influence (ligne noire) indique la région non influencée par les effets de bord. Le panneau de droite montre les composants oscillants calculés avec la transformation en ondelettes dans la bande de période de 2 à 3 ans. Lignes noires : première variable ; ligne orange pâle : deuxième variable.

Ensuite, j'ai comparé les dynamiques de cas de choléra dans cinq pays limitrophes du littoral du Golfe de Guinée avant d'explorer le lien entre ces dynamiques et la variabilité climatique locale (précipitations) et plus globale (Indice de l'Oscillation Indienne). Les analyses ont montré que, pour la période d'étude de 1975 à 2002, il existait : (i) une périodicité commune à 2-3 ans, entre 1989 et 1994 pour les séries climatiques et toutes les séries épidémiologiques, exceptée celle qui concerne la Côte d'Ivoire ; (ii) un synchronisme des épidémies dans ces cinq pays pour cette même période et (iii) une cohérence significative entre les dynamiques de cas de choléra (excepté pour la Côte d'Ivoire) et les variables climatiques (4). Ces résultats apportent de nouveaux éléments de réflexion sur la compréhension de la dynamique du choléra en Afrique (1 publication dans BMC Infectious Diseases). En effet, là où la maladie est décrite et acceptée être à l'état épidémique, la dynamique des cas de choléra apparaît également sensible à la variabilité climatique locale et globale, et ce, de façon non constante au cours du temps. Cette influence du climat sur la dynamique des cas de choléra est désormais mise en évidence au travers de régions géographiques situées sur trois continents distincts et des populations humaines hétérogènes comme l'Amérique du Sud (Pérou), l'Asie (Bangladesh) et l'Afrique (Golfe de Guinée).

Je me suis également focalisé sur l'étude du choléra en Algérie entre 1986 et 1998, dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Youssef Laïd, de l'Institut National de Santé Publique (INSP) algérien. L'analyse de la persistance de la maladie en fonction de critères populationnels (taille et densité) et la mise en évidence de la périodicité inter-annuelle du choléra centrée sur 4 ans ont permis d'approfondir la compréhension de la dynamique spatiale et temporelle de la maladie dans ce pays.

Enfin, au cours de ma participation à une université européenne d'été en « Mathématiques et applications en biologie et en médecine » (Août 2004), j'ai élaboré au sein d'un groupe de travail, un premier modèle prédictif du risque sanitaire pour le choléra, élaboré et paramétré en fonction de données épidémiologiques et environnementales observées pour le Mozambique et la Somalie. Le risque est la résultante de deux composantes distinctes : l'aléa et la vulnérabilité. L'aléa caractérise le phénomène lui-même, physique ou biologique (dans le cas du choléra c'est le bloom phytoplanctonique qui correspond à une mesure indirecte de la densité de pathogènes dans l'environnement), et la vulnérabilité rend compte du statut épidémiologique de la population dans la zone concernée par le risque. Le modèle utilisé est un modèle déterministe en temps continu à plusieurs compartiments, élaboré de manière à intégrer directement la variabilité environnementale à partir des images satellites de concentration en chlorophylle-a (Figure 5) (5).

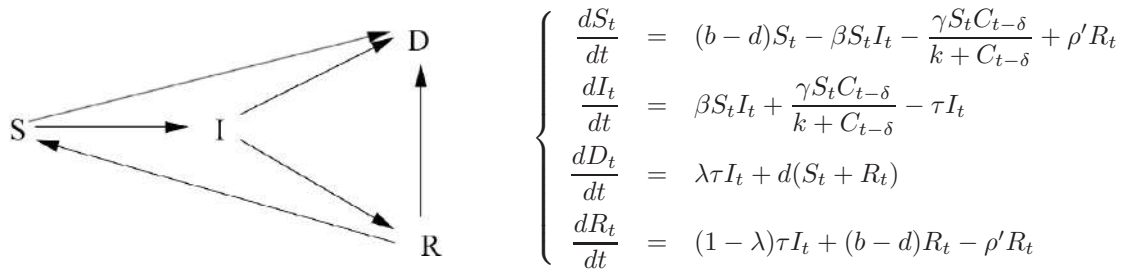


Figure 5 : A gauche est illustré l'architecture du modèle déterministe avec S pour les susceptibles, I les infectés, D les personnes décédées de la maladie, et R les guéris. A droite il s'agit du système d'équations différentielles qui décrit l'évolution de chacun des compartiments en fonction du temps.

Dans la Table 1 est détaillé la liste des variables et paramètres du modèle SIDR.

Table 1: Liste des variables et paramètres du modèle SIDR.

Symbol	Description
Variables	
S	number of susceptible individuals
I	number of infected individuals
D	number of dead individuals (not only due to cholera)
R	number of recovered individuals
C	concentration of chlorophyll a (mg/m^3)
Parameters	
H	initial total population
b	human birth rate in % (only for susceptible and recovered individuals)
d	human death rate in % (only for susceptible and recovered individuals)
δ	delay parameter (month^{-1})
β	contact infection rate from infected individuals to susceptible individuals (month^{-1})
k	quantity of phytoplankton yields 50% chance of catching cholera (mg/m^3)
τ	removed rate (month^{-1})
λ	case-fatality rate (%)
ρ'	loss of immunity rate (month^{-1})
γ	contact infection rate from contaminated water to susceptible individuals (month^{-1})

L'objectif à long terme d'un tel modèle est son intégration dans un système opérationnel de prédiction du risque cholérique. Les premiers résultats, encourageants, ouvrent une perspective d'optimisation du modèle.

Ce couplage télédétection-modélisation pour modéliser la dynamique du choléra ouvre des champs d'applications très importants, dans l'aide au développement en particulier. La prédiction du risque épidémique permettrait une gestion optimisée des moyens sanitaires et de prévention à déployer lors d'épidémie.

En résumé sur mon Doctorat :

C'est au cours de mon doctorat que j'ai pleinement contribué à la compréhension de la dynamique du choléra en Afrique en lien avec la variabilité climatique associant l'écologie, la modélisation et l'épidémiologie de cette maladie infectieuse humaine d'origine bactérienne.

En parallèle de mes travaux de thèse, j'ai également contribué aux recherches sur la dynamique de la méningite en Afrique par des approches d'analyse de données et de modélisation de la fréquence, distribution et propagation des épidémies. Cela a donné lieu à ma contribution dans 2 publications de rang A (International Journal of Infectious Diseases, International Journal of Geographic Health). J'ai aussi participé à une campagne en mer au large du delta du Rhône, IFREMER-Brest : prélèvements phyto- et zoo planctoniques et bactériologiques.

5.2.2 Post-doctorat : écologie de Vibrio cholerae et ses conséquences épidémiologiques

J'ai inscrit pleinement mes recherches dans la continuité de la compréhension de l'écologie des maladies infectieuses au Sud et du choléra chez l'homme. Je me suis focalisé sur la compréhension de l'écologie de *Vibrio cholerae* et ses conséquences épidémiologiques dans les pays en développement (Inde, Bangladesh, Sénégal) dans le cadre de mon post-doctorat au sein du laboratoire du Professeur Rita R. Colwell au « Center for Bioinformatics and Computational Biology » à l'Université du Maryland, aux Etats-Unis, sur un financement de la NOAA (programme 'Oceans and Human Health Initiative').

Mon travail s'articulait autour de quatre projets de recherche :

(1) La caractérisation du signal saisonnier de l'environnement côtier mesuré par télédétection spatiale ainsi que du climat dans la dynamique des épidémies de choléra en Inde (Kolkata) et Bangladesh (Matlab). L'objectif de ce travail en collaboration avec les épidémiologistes de Kolkata et Matlab était de modéliser la dynamique de transmission du choléra en intégrant la variabilité environnementale mesurée par télédétection spatiale (1 publication dans PNAS) (6).

Il existe une base mécanistique permettant d'attendre jusqu'à deux mois de décalage pour les pics de chlorophylle-a (CHL), de Sea Surface Temperature (SST) et de précipitations dans ces facteurs influençant le choléra. Une approche mécanistique permet de traduire une compréhension prédictive empirique en une prédiction quantitative pour le choléra. Pour exploiter le processus de manière empirique, les variables incluses dans le modèle ont été prises à la fois du mois coïncident et avec un décalage d'un mois (t-1). Les données CHL incluaient également un décalage de deux mois (t-2). Des variables indicatrices pour les moyennes trimestrielles des cas de choléra représentant le cycle annuel ont été incluses dans le modèle ainsi que le log du nombre de cas de choléra du mois précédent. Ce dernier est analogue à la technique de différenciation couramment utilisée dans une régression

linéaire des moindres carrés ordinaires (adaptée pour des modèles linéaires généralisés sur une échelle logarithmique), éliminant l'effet de « persistance » résultant de la dépendance à la densité dans la transmission du choléra. Ces deux variables ont été incluses comme paramètres fixes dans les modèles pour éliminer l'autocorrélation résiduelle.

Un modèle linéaire généralisé (GLM) avec une distribution de Poisson et une liaison logarithmique a été utilisé pour modéliser les données. Comme c'est souvent le cas avec de telles données, une forte surdispersion était apparente et a été prise en compte en utilisant un GLM quasi-Poisson ajusté en utilisant le logiciel R. Ce modèle estime le degré de surdispersion et gonfle les erreurs standard en conséquence.

Les résultats des prédictions des modèles avec les données observées sont illustrés dans la Figure 6.

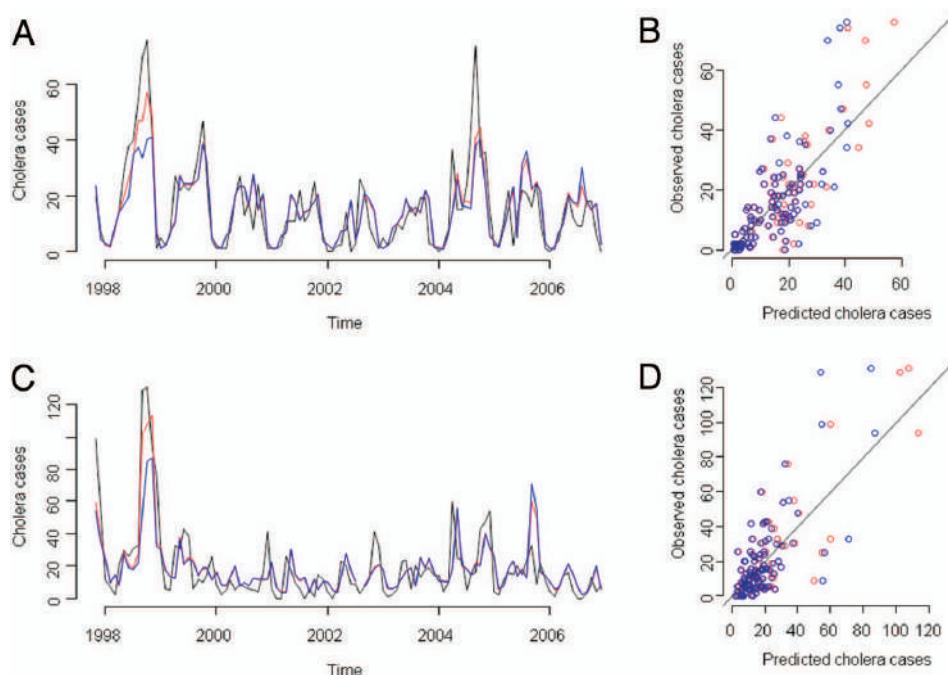
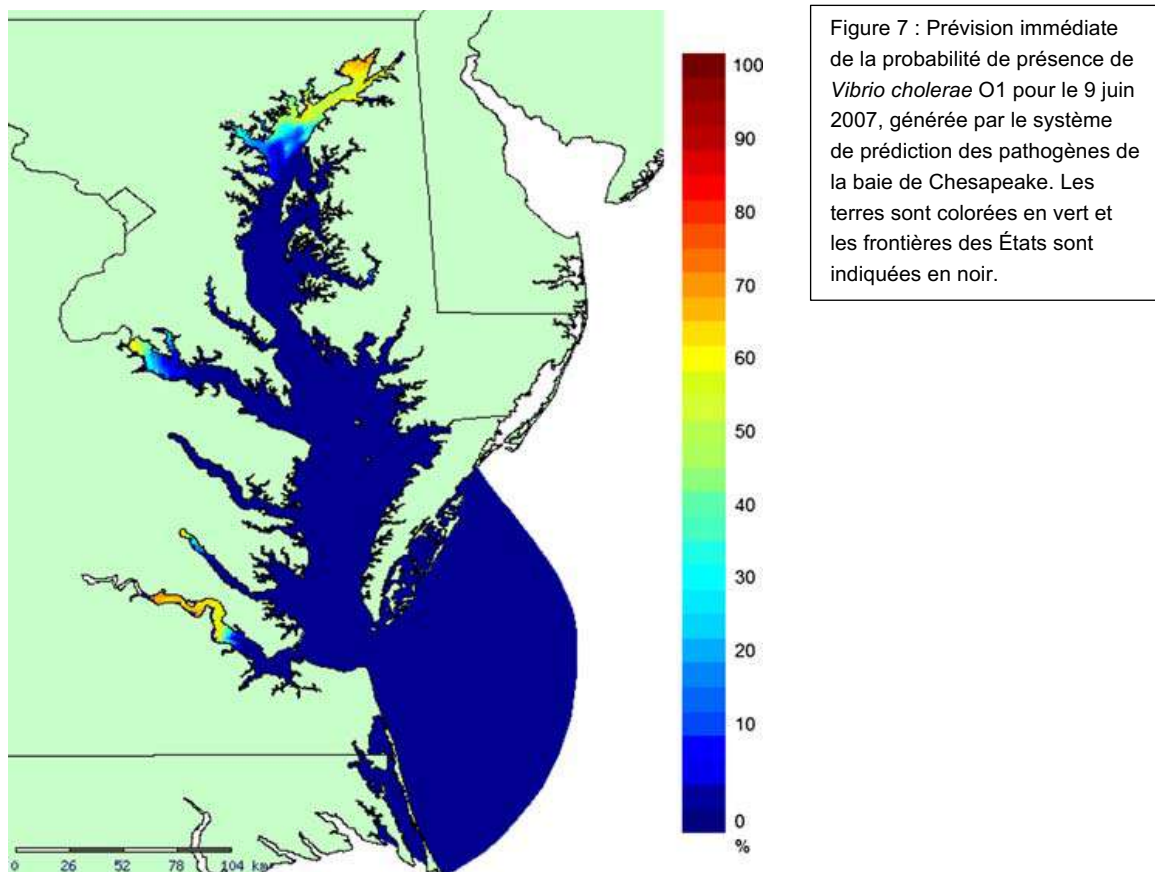


Figure 6 : Données épidémiologiques observées et prédiction des modèles ajustés. Pour Kolkata, (A) dynamiques temporelles des cas de choléra observés, du modèle ajusté et du modèle de validation croisée, présentés respectivement en noir, rouge et bleu. (B) Nuage de points des cas de choléra observés par rapport à (i) cas de choléra prédits par le modèle ajusté en cercles rouges, et (ii) cas de choléra prédits par le modèle de validation croisée en cercles bleus. La ligne noire représente un accord parfait entre les cas prédits et observés. Pour Matlab, C identique à A. D identique à B.

En parallèle, j'ai contribué par une approche similaire à montrer que la propagation du choléra dans le bassin hydrographique du Ganges-Brahmaputra-Meghna se propagent du printemps à l'automne et de la zone côtière vers l'intérieur des terres (7).

(2) La prédiction de la présence probable de *V. cholerae* O1 dans la Chesapeake Bay à l'aide d'un modèle écosystémique intégrant la prédiction climatique, le « Chesapeake Rutgers Regional Ocean Modeling System » (ChesROMS) (8). Ce travail, en collaboration avec les climatologues et océanographes de Earth System Science Interdisciplinary Center (ESSIC, University of Maryland - NOAA), principalement le Pr R. Murtugudde, correspond à une étude rétrospective sur plus de 15 ans de la probabilité de présence journalière de *V. cholerae* O1 dans la Chesapeake Bay dont les résultats ont servi pour la mise en place des campagnes de prélèvements microbiologique et planctonique dans la baie.

Un système a été mis en place pour prédire la probabilité de présence de *V. cholerae* dans les eaux de surface de la baie de Chesapeake, dans le but de fournir des prévisions de l'occurrence de cette bactérie ainsi que d'autres espèces pathogènes de *Vibrio* associées (9). La prédiction a été réalisée en utilisant un modèle d'habitat empirique multivarié disponible, estimant la probabilité de présence de *V. cholerae* basée sur une gamme de températures et de salinités dans la baie, avec des prédictions hydrodynamiques de la température et de la salinité ambiantes. Les prédictions expérimentales ont permis à la fois une meilleure compréhension de la variabilité in situ de *V. cholerae*, y compris l'identification de points chauds potentiels d'occurrence, et une utilité en tant que système d'alerte précoce.



Par extension, j'ai contribué aux recherches combinant la diversité génétique et la prédictibilité des *Vibrio parahaemolyticus* sur la zone côtière géorgienne de la mer Noire. Nous avons montré qu'il existe une certaine variabilité des souches de *V. parahaemolyticus* sur la présence de facteurs de virulence et que la dynamique des populations bactériennes de cette espèce est principalement influencée par la température de l'eau (10). **Ces travaux ont contribué à la thèse d'un étudiant de l'université du Maryland, Brad Haley.**

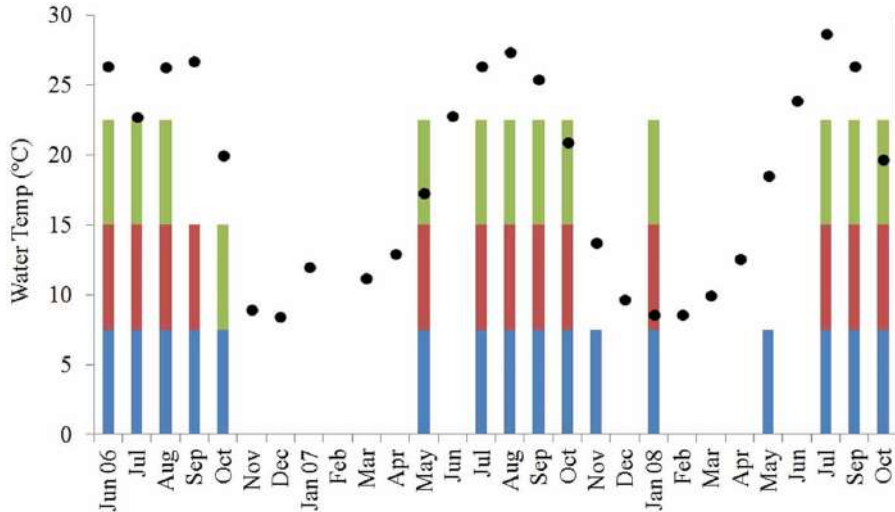


Figure 8 : Température de l'eau en degrés Celsius (diamants noirs, axe Y) et détection de *V. parahaemolyticus* dans l'eau (barres bleues) et le plancton [200 µm (barres vertes) et 64 µm (barres magenta)]. La température de l'eau est moyennée sur tous les sites pour chaque mois d'échantillonnage et les barres colorées montrent au moins 1 échantillon positif pour cette fraction sur tous les sites pour chaque mois d'échantillonnage.

(3) Etude sur le long terme de la diversité et de la dynamique spatio-temporelle des espèces planctoniques (réservoirs de *V. cholerae*) et d'abondance des bactéries pathogènes dans l'environnement aquatique de deux localités rurales au Bangladesh (11). Dans le cadre de ce projet « Epidemiology of Cholera and Ecology of *Vibrio cholerae* in Bangladesh » financé par le National Institutes of Health, j'ai réalisé les analyses de données sur l'étude de la relation à l'échelle locale entre l'épidémiologie du choléra et l'évolution de la diversité des espèces zooplanctoniques présentes dans les principales sources d'approvisionnement en eaux de ces populations.

Les communautés de zooplancton chitineux de plusieurs plans d'eau ont été analysées afin de comprendre l'interaction de la composition de la population de zooplancton avec la dynamique de population de *V. cholerae* pathogène et l'incidence du choléra. Deux groupes de zooplancton dominants ont été constamment associés à la détection de *V. cholerae* et/ou à l'occurrence de cas de choléra, à savoir les rotifères et les cladocères, en plus des copépodes. Les différences locales indiquent qu'il existe des facteurs écologiques subtils pouvant influencer les interactions entre *V. cholerae*, ses hôtes planctoniques et l'incidence du choléra (11).

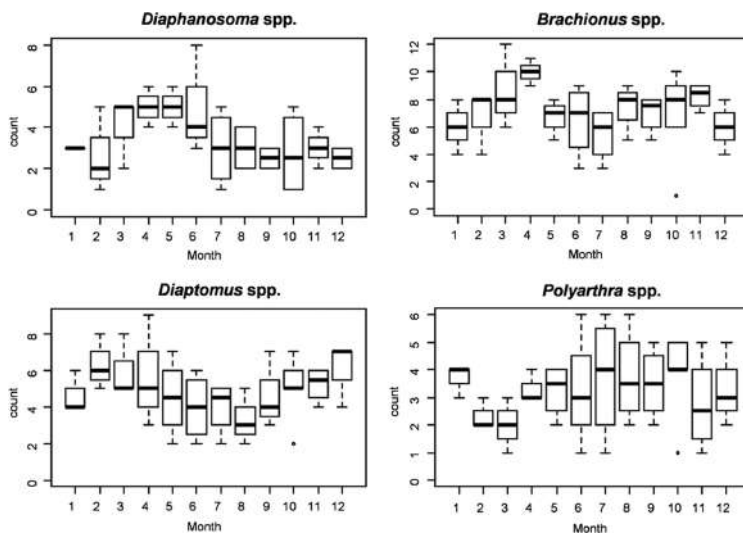


Figure 9 : Distribution mensuelle des genres selon le nombre de fois où ils étaient dominants au cours de la période d'échantillonnage de 45 mois, de mars 2004 à septembre 2007 à Bakerganj, Bangladesh.

Ces travaux ont contribué à la thèse d'un étudiant du Bangladesh de l'université du Maryland, Nur Hasan.

(4) Influence du régime des précipitations sur la dynamique de transmission du choléra au Sénégal. Par une étude rétrospective de la dynamique des cas de choléra en 2005, nous avons caractérisé et quantifié le régime de précipitation à l'origine de la recrudescence de cas de choléra dans la région de Dakar et aux alentours. J'ai montré que ce n'est pas la quantité totale de pluie tombée lors de l'hivernage de 2005, mais la rapidité et la continuité d'intenses précipitations sur une courte période temps (7 jours) qui est à l'origine de la reprise épidémique.

En 2005, il y a eu 31 719 cas de choléra, avec 458 décès, en République du Sénégal. Nous avons enquêté rétrospectivement sur l'origine climatique des inondations dévastatrices survenues à la mi-août 2005 dans la région de Dakar au Sénégal et sur l'épidémie subséquente de choléra ainsi que sur le schéma des épidémies de choléra dans trois autres régions du pays. Nous avons comparé les modèles de précipitations entre 2002 et 2005 et la relation entre le gradient de température de surface de la mer (SST) dans l'océan Atlantique tropical et les précipitations au Sénégal pour 2005. Les résultats ont montré un schéma spécifique de précipitations dans toute la région de Dakar en août 2005, et l'anomalie de précipitations associée a coïncidé avec une exacerbation de l'épidémie de choléra. La comparaison des schémas de précipitations et épidémiologiques a révélé que la dynamique temporelle des précipitations, qui était abrupte et intense, était vraisemblablement le facteur déterminant Figure 10. L'analyse du gradient de SST a montré que la variabilité de la SST dans l'océan Atlantique en 2005 différait de celle de 2002 à 2004, en raison d'un mode méridional Atlantique proéminent. L'influence de ces précipitations intenses sur la transmission du choléra dans une région densément peuplée et surpeuplée était détectable à la fois à Dakar et à Thiès, au Sénégal. Ainsi, les prévisions de précipitations à haute résolution à des échelles de temps sous-saisonnnières devraient ouvrir la voie à un système d'alerte précoce en Afrique pour le choléra et, par conséquent, déclencher une préparation aux épidémies.

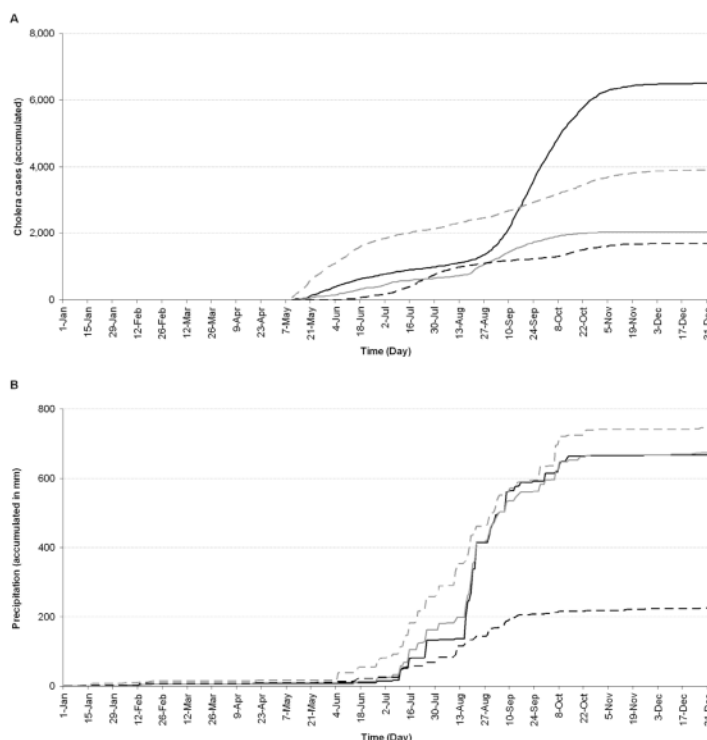


Figure 10 : Schémas d'incidence accumulée quotidiennement du choléra (A) et de précipitations (B) pour quatre régions du Sénégal en 2005. Les schémas pour les régions de Dakar, Thiès, Saint-Louis et Diourbel sont représentés par des lignes noires pleines, des lignes grises pleines, des lignes noires en pointillés et des lignes grises en pointillés, respectivement.

En résumé des activités de post-doctorat :

Mes recherches se résument par l'écologie et de la compréhension du vivant et des recherches à l'interface entre écologie, santé humaine, sciences de l'environnement et modélisation. J'accorde une priorité absolue à mettre mes efforts et compétences au service de l'aide au développement et du développement durable au Sud que ce soit sur les thématiques, les terrains ou les collaborations avec les pays du Sud.

5.2.3 Écologie du choléra en Afrique, test de l'hypothèse du réservoir environnemental.

J'ai été recruté en 2010 au GEMI UMR IRD CNRS et mon activité de recherche se focalise sur l'application des concepts d'écologie pour la compréhension de la dynamique de transmission de maladies infectieuses dans les pays du Sud. Je m'intéresse principalement à (i) l'influence de la variabilité climatique et environnementale sur la transmission de maladies à transmission hydrique, (ii) l'étude de populations naturelles des principaux pathogènes humains du genre *Vibrio* sp., et (iii) sur les concepts en écologie et leur application en santé publique. Ces aspects sont très largement abordés dans un souci d'amélioration de la compréhension de la dynamique de ces maladies et des politiques de santé publique dans les pays du Sud.

Élargissement conceptuel à l'écologie de la Santé

Par la suite dans mes recherches, j'ai élargi mes contributions à la réflexion théorique à propos de l'écologie de la santé et des maladies infectieuses. En effet, en écologie et dynamique des populations le concept de niche est clairement établi. La niche écologique est une notion regroupant le rôle d'une espèce dans l'écosystème. Cette notion d'hyper-volume à n dimensions regroupe l'habitat, le régime alimentaire, les activités ainsi que les relations d'une espèce avec le milieu et avec les autres espèces. Il est alors possible de l'appliquer à l'écologie des agents pathogènes et en particulier ceux impliqués dans les maladies infectieuses qui font des ravages dans les pays du Sud.

Bien que la plupart des agents pathogènes semblent difficiles à éradiquer, il est surprenant de constater que les activités humaines sont les principaux moteurs du taux élevé d'extinction des organismes supérieurs en raison de l'altération de leur écologie et de leur évolution, c'est-à-dire de leur "niche". Au cours des dernières décennies, l'accumulation d'études écologiques et évolutives axées sur les maladies infectieuses a montré que la niche d'un agent pathogène comporte plus de dimensions que le seul système immunitaire visé par la vaccination et le traitement. En effet, elle se situe à différents niveaux intra- et inter-hôtes, à des échelles spatiales et temporelles très différentes. Après avoir développé une définition précise de la niche d'un pathogène, nous avons détaillé comment les avancées majeures dans le domaine de l'écologie et de la biologie évolutive des maladies infectieuses peuvent éclairer la planification et la mise en œuvre de la lutte contre les maladies infectieuses dans les pays tropicaux soumis à des contraintes économiques difficiles. Nous avons proposé un développement de la manière dont l'approche pourrait se traduire dans des cas appliqués, ses avantages et ses contraintes, et avons conclu sur la nécessité d'une telle approche pour le contrôle des agents pathogènes dans les pays à faible revenu (12).

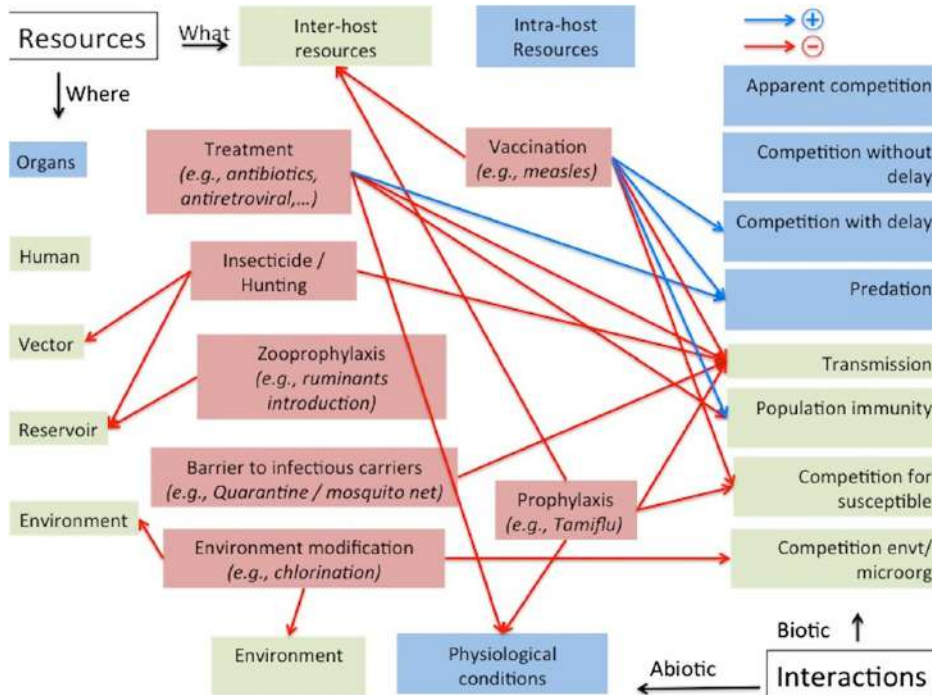


Figure 11 : Différents composants de la niche d'un pathogène humain et comment ils peuvent être utilisés pour son contrôle. Les boîtes vertes et bleues représentent les ressources et les interactions situées au niveau inter- et intra-hôte, respectivement. Les boîtes rouges décrivent les principales méthodes actuellement utilisées en santé publique et leur impact positif ou négatif sur les composants de la niche (par exemple, la vaccination diminue le nombre d'individus susceptibles et augmente l'immunité de la population).

J'ai alors appliqué ce concept à celui de l'amélioration de la compréhension de la dynamique des épidémies de choléra. Comprendre l'émergence et la réémergence saisonnière du choléra est un défi en raison de la dynamique complexe des différents protagonistes. L'abondance de *Vibrio cholerae*, l'agent causal du choléra est un habitant naturel des environnements aquatiques, fluctue en fonction de facteurs abiotiques et biotiques. Cependant, les facteurs régulant la structure de la population de *V. cholerae* et la dynamique saisonnière ne sont pas encore totalement compris. L'étude des changements temporels et de la variabilité de la composition des communautés aquatiques en relation avec l'occurrence ou l'abondance de *V. cholerae* semble très prometteuse mais reste sous-explorée. Les progrès récents de la métagénomique, facilités par le séquençage ultra-profond à haut débit, ont grandement amélioré notre capacité à explorer plus largement et plus profondément les communautés microbiennes, y compris la compréhension de la structure et de la fonction de la communauté, ainsi que les compétitions inter- et intra-spécifiques (13).

La finalité de cette recherche conceptuelle autour de l'écologie des maladies infectieuses, a été synthétisée au travers de ma contribution à l'ouvrage « Les maladies Infectieuses » édité par M. Vittecoq, B. Roche, F. Prugnolle, F. Renaud & F. Thomas (De Boeck Solal, 2015) par un chapitre entier consacré à l'Écologie de la santé : Nouvelle perspectives en santé publique. Du point de vue historique, la compréhension de la dynamique des maladies transmissibles relève des domaines de l'épidémiologie et plus spécifiquement de l'infectiologie. Ces disciplines s'intéressent aux causes directes de ces maladies, aux modalités de leur propagation ainsi qu'à leur prévention. Des exemples récents ont montré l'intérêt de prendre aussi en considération l'existence de processus physiques, écologiques ou évolutifs, lesquels interviennent à des échelles de temps et d'espace plus larges.

L'individu hôte a été considéré pendant longtemps comme seul référentiel pour comprendre les causes et les conséquences des infections. Dans ce chapitre, j'ai illustré à l'aide de plusieurs exemples récents comment ce changement de référentiel contribuera significativement à l'accroissement des connaissances en épidémiologie et en santé publique. Comme le propose Joël de Rosnay (1975) dans son ouvrage intitulé *Le Macroscopie*, vers une vision globale, il est nécessaire d'apprendre à utiliser, en plus du microscope, un nouvel instrument nommé «macroscopie».

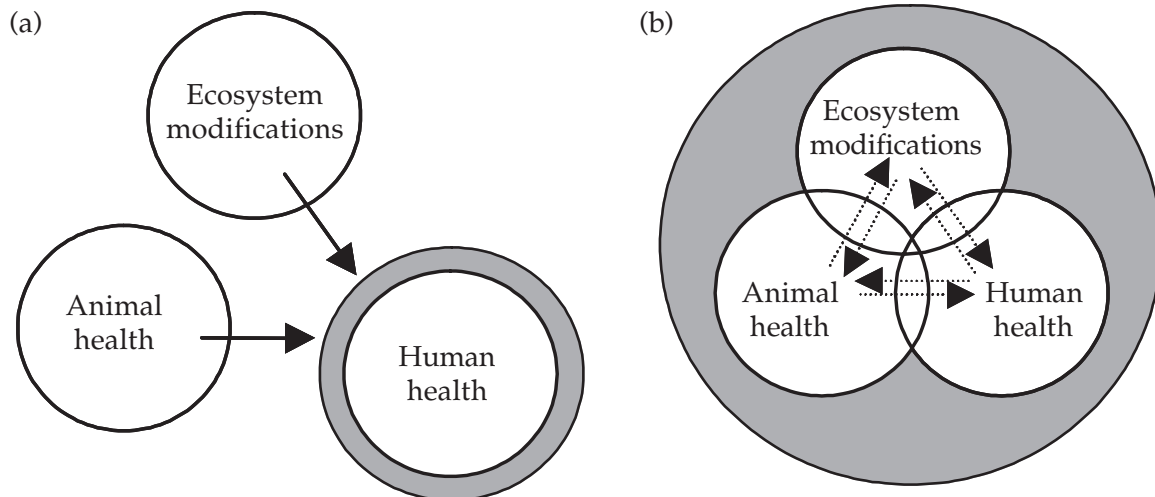


Figure 12 : (a) La vision épidémiologique classique des relations entre la santé humaine, la santé animale et les modifications de l'écosystème. Les problèmes de santé humaine sont interprétés selon une vision où seuls les effets des changements de l'écosystème sur la santé humaine sont pris en compte (voir les flèches). (b) Relations potentielles multiples entre la santé humaine, la santé animale et la santé de l'écosystème, où tous les composants interagissent les uns avec les autres ; une épidémie grave affectant l'ensemble des populations de grands ruminants dans la savane d'Afrique de l'Est, par exemple, peut avoir des conséquences majeures sur la stabilité de cet écosystème particulier dans son ensemble.

Si le microscope est un outil formidable dans la compréhension des maladies, il est maintenant indispensable d'utiliser aussi le macroscopie pour analyser de manière plus globale l'ensemble des forces et des paramètres impliqués dans l'émergence et la diffusion d'agents infectieux ou parasitaires. Pour envisager de résoudre les problèmes de santé des populations dans le monde, il est nécessaire avant tout d'élargir le cadre conventionnel des fenêtres d'étude dans lesquelles sont analysées habituellement les interactions hôte(s)-pathogène(s). Il n'est plus possible d'ignorer l'importance de facteurs ou de processus distaux et non causaux exerçant une influence directe, ou plus souvent indirecte, sur la nature et la qualité de ces associations.

Écologie de Vibrio cholerae et l'épidémiologie du choléra au Sénégal

Le programme de recherche que j'ai développé porte sur la compréhension de la dynamique des épidémies de choléra en Afrique pour améliorer la lutte contre la maladie et accroître la capacité des autorités sanitaires dans la prise de décision des politiques de prévention et de riposte. L'objectif ultime est le développement d'un outil de prédiction de la dynamique du choléra en intégrant toutes les composantes déterminantes comme l'écologie de la bactérie dans l'environnement, la dynamique du pathogène intra-hôte (en particulier l'immunité) et inter-hôtes (en particulier le taux de contact, migration/mobilité, campagne de vaccination) ainsi que la variabilité des facteurs climatiques déterminants dans la transmission de la maladie.

L'Afrique sub-saharienne est la plus exposée au choléra à l'exception ces dernières années d'Haïti. Le Sénégal est à près de 10 années post-épidémie et c'est justement pour cela que mon projet

tire toute sa justification. Il est primordial de pouvoir déterminer si l'environnement est un réservoir pérenne de la bactérie toxigène responsable du choléra plusieurs années après une épidémie de grande ampleur entre 2004 et 2008 avec plus de 40 000 cas. Mais aussi de savoir quel est le niveau d'immunité de la population. Pour cela 2 scénarios se dessinent. Soit il est nul et alors on se retrouve dans la situation d'Haïti en octobre 2009 avec une population totalement susceptible confrontée à l'introduction de la maladie via des individus contaminés et vraisemblablement symptomatiques du choléra. Ce qui peut également indiquer que la population n'est pas exposée au pathogène, que ce soit via des porteurs asymptomatiques ou même l'environnement. Soit il est non nul, et alors il y a une exposition, négligeable ou non dépendante du degré d'immunité de la population, soit par contact asymptomatique ou faiblement symptomatique non détecté par le système surveillance sanitaire, ou par exposition à l'environnement jouant possiblement le rôle de réservoir pérenne de la bactérie toxigène.

Ce projet comportait ainsi 3 objectifs principaux. Le premier est de comprendre l'émergence du choléra et sa dynamique en Afrique de l'Ouest au travers de l'étude approfondie de l'écologie de la bactérie *Vibrio cholerae* dans son environnement aquatique naturel au contact des populations humaines. Il s'agit de poursuivre l'analyse des prélèvements d'eaux dans des contextes urbains à forts potentiels épidémiques au Sénégal pour caractériser l'habitat et la communauté bactérienne dans laquelle *Vibrio cholerae* est présente et prolifère (projet Fondation Mérieux, 5000€ PI : Dr Seynabou Lô, Université Gaston Berger à Saint-Louis, Co-PI : Dr Constantin de Magny). Les récents résultats obtenus sur Saint-Louis permettent d'établir un précédent dans la surveillance et l'évaluation du risque. Une publication est sous presse dans le journal Pan-African Medical Journal (2024).



Figure 13 : Isolement sur milieu spécifique des colonies de *Vibrio alginolyticus* (gauche), *Vibrio vulnificus* (centre), et *Vibrio parahaemolyticus* (droite) isolées à partir des prélèvements sur Saint-Louis en 2016.

Dans la continuité de cet objectif, j'ai contribué au projet de démonstration de la mesure de la pollution marine sur la presqu'île du Cap Vert au Sénégal en collaboration avec le Dr Patrice Brehmer du LEMAR. Nous avons réalisé plusieurs missions sur le terrain et rassemblé les résultats dans un rapport remis aux autorités sénégalaise en novembre 2017. Brièvement, cette étude visait spécifiquement à faire (i) un inventaire bibliographique des études menées sur le milieu marin et côtier au Sénégal voire dans la sous-région, (ii) un point de l'état de l'art en terme de suivi et de control incluant les normes marine et côtière en terme de pollution et contamination, et enfin (iii) évaluer, sur la presqu'île du Cap-Vert, la perception du niveau de pollution par les populations, la qualité des sédiments, la qualité de l'eau ainsi que la présence de microplastiques en terme d'identification et d'abondance mais également la présence des oiseaux (inventaire des oiseaux observés) comme indicateur de pollution. La qualité des sédiments a été déterminée par l'étude (i) de la toxicité globale des sédiments (TGS), (ii) de la quantification du mercure et (iii) de certains paramètres comme la Granulométrie, le Carbone et l'Azote. La qualité de l'eau a été étudiée à deux niveaux : (i)

microbiologique i.e. les indicateurs de contamination fécale et d'efficacité de traitement des eaux usées : *Escherichia coli*, entérocoques intestinaux et la détermination de certaines bactéries pathogènes comme les salmonelles et vibrions ; (ii) chimique. Les résultats scientifiques nous indiquent que les sédiments de la presqu'île du Cap-Vert présentent tous une certaine toxicité vis à vis des espèces aquatiques benthiques. La qualité microbiologique est mauvaise sauf pour les sites d'Almadies-Vivier, Ouakam, Iles de la Madeleine et Port de Dakar (14).

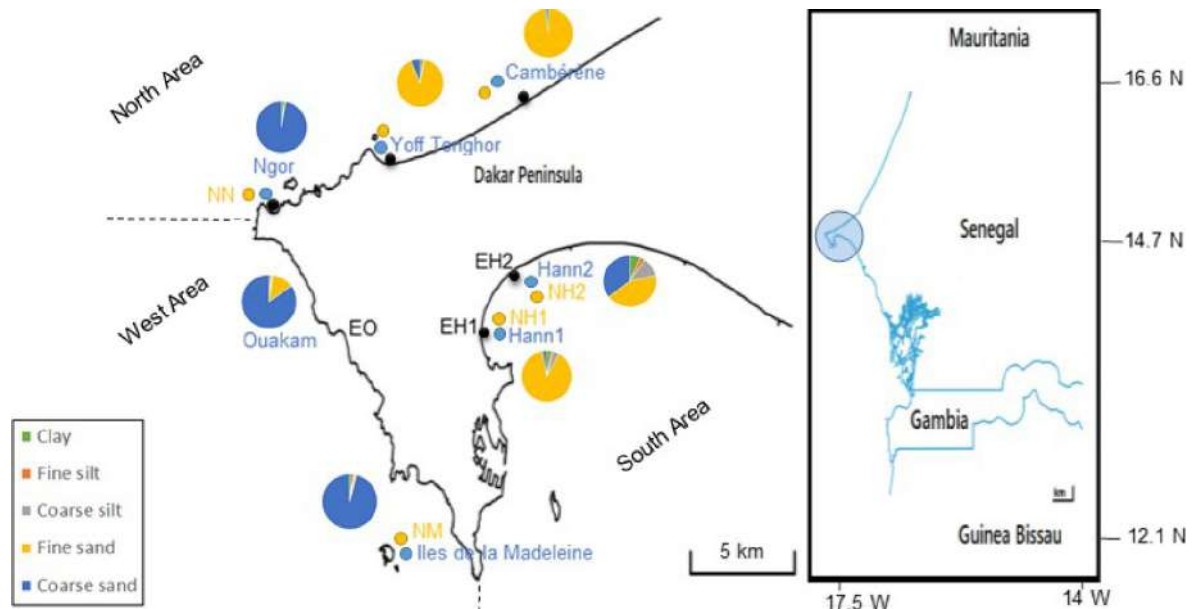


Figure 14 : Sites d'échantillonnage autour de la péninsule du Cap-Vert, Sénégal, Afrique de l'Ouest. La péninsule du Cap-Vert a été divisée en trois zones principales : Nord, Ouest et Sud (lignes en pointillés). En considérant X comme la première lettre du site d'échantillonnage, tous les sites ont été identifiés sur la carte par (i) la position de l'échantillonnage des microplastiques (NX), (ii) la position de l'effluent d'eaux usées le plus proche (EX), et (iii) la position de l'échantillonnage de l'eau et des sédiments (nom du site). EC = Effluent Cambéréne, NY = Filet Yoff Tonghor, EY = Effluent Yoff Tonghor, FN = Filet Ngor, EN = Effluent Ngor, FO = Filet Ouakam, EO = Effluent Ouakam, FM = Filet Madeleines, FH1 = Filet Hann1, EH1 = Effluent Hann1, FH2 = Filet Hann2 et EH2 = Effluent Hann2. Un diagramme circulaire statistique caractérise la granulométrie des sédiments en pourcentage pour tous les sites (argile, limon fin et grossier, sable fin et grossier).

Dans ce dernier, on observe des *Vibrio cholerae* non toxigènes et *Vibrio vulnificus* qui présentent des risques de santé publique. Idem pour la qualité physicochimique qui globalement mauvaise. Les concentrations en ETM sont globalement élevées (Al, Cd, Cr, Co, Cu, Hg, Ni et Zn) à l'exception du Fe et Mn qui sont inférieurs aux critères de « protection de la vie aquatique » (effets aigus et chroniques). La moyenne des facteurs de pollution de chaque métal pour la presqu'île a permis de classer les ETM par ordre de pollution décroissante : Cu, Ni, Cr, Cd, Co, Al, Hg, Zn, Mn et Fe dont les deux derniers sont en dessous du seuil canadien considéré. L'analyse des microplastiques révèle des concentrations et densités très fortes à Cambéréne, à Ngor, à Hann1 et à Hann2. Les macroplastiques sont fortement observées à Cambéréne et à Hann1 (15).

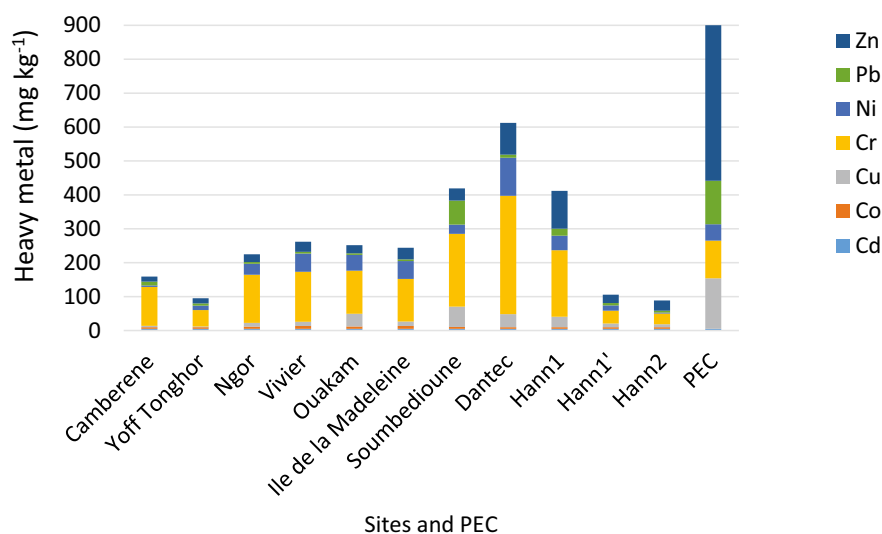


Figure 15 :

Contenu des éléments traces métalliques mesurés dans les sédiments (fraction > 100 µm) de la péninsule du Cap-Vert par rapport à la Concentration Probable d'Effet (PEC).

Deux publications, une thèse et des communications en congrès sont issues de ce travail pour l'instant et continue d'être valorisé. **Ces travaux ont contribué à la thèse de deux étudiants de l'UCAD de Dakar au Sénégal, Dr Amidou Sonko et Yoba Kande.**

Dans la continuité de ce travail, les interactions qui ont émergées suite aux partages de ces données avec le Comité National Olympique Sportif Sénégalais (CNOSS) et le Bureau Opérationnel du Suivi du Plan Sénégal Emergent (BOS PSE) à l'occasion de la candidature du Sénégal pour organiser les Jeux Olympiques de la Jeunesse en 2022, ont permis d'aboutir, suite à l'obtention de l'organisation par le Sénégal, à l'invitation pour l'IRD de siéger de façon permanente au comité Ad Hoc de suivi de l'organisation des JOJ en 2022. La contribution se focalise principalement sur les mesures de la qualité de l'eau pour les épreuves aquatiques en eaux libres. Un contrat de prestation scientifique a été finalisé pour réaliser 5 semaines d'analyses pour un montant de 37000€. Outre le fait de produire les résultats des analyses demandées, nous en avons profité pour greffer nos questions de recherches dans la continuité de nos projets sur ce thème de la pollution marine. Une fois encore, nous n'avons pas détecté la présence de *Vibrio cholerae* toxigène dans les prélèvements.

Transfert opérationnel des recherches fondamentales sur l'écologie de Vibrio cholerae pour les acteurs institutionnels de la riposte aux épidémies de choléra en Afrique.

Le deuxième objectif est de réaliser un transfert opérationnel de ces connaissances sur l'écologie de l'agent pathogène et l'épidémiologie du choléra pour les acteurs principaux impliqués dans la riposte aux épidémies au travers d'une méthode simple, rapide et peu coûteuse de détection des sources d'eaux contaminées par les vibrions cholériques. Les différents projets financés par l'UNICEF dont j'étais le PI (40 000\$, 2015) ont permis de réaliser 5 missions dans la sous-région (2 en Guinée-Bissau, 1 en République Démocratique du Congo, 1 au Bénin), ainsi qu'une étude plus ciblée au Niger (PI : G. Constantin de Magny, 30 000€, 2017). La première étude sur la Guinée-Bissau, le Bénin et la RDC a montré l'absence totale de la persistance de *Vibrio cholerae* toxigène hors contexte de transmission du choléra dans la population. Résultats similaires obtenus sur l'étude menée à Saint-Louis au Sénégal ou encore dans les prélèvements dans les eaux côtières de la presqu'île du Cap Vert à Dakar. Seul 2 échantillons d'eau ont révélé la présence de *Vibrio cholerae* O1 toxigène lors de la

mission en RDC. Le premier prélèvement concerne le stockage d'eau au domicile du patient et le second, l'échantillon pris au point de puisage du même patient dans le lac à proximité. La deuxième étude menée au Niger a produit les mêmes résultats à savoir l'absence de détection des *Vibrio cholerae* toxigènes dans les prélèvements environnementaux. Dans ces deux études, les TDR avait été confirmés par des PCR.

Conclusions sur le test de l'hypothèse de l'environnement aquatique comme réservoir pérenne de l'agent étiologique du choléra en Afrique.

Les différents projets et résultats accumulés sur ces années de recherche depuis mon recrutement en 2010 ont montré que l'environnement ne joue pas le rôle de réservoir persistant de la bactérie toxigène Vibrio cholerae responsable du choléra chez l'homme. Si cette dernière est retrouvée présente dans l'environnement, c'est lié à une transmission active du choléra dans la population humaine à proximité. Ce résultat a été par la suite confirmé par l'étude publiée dans Science en 2017 par François-Xavier Weill et al. intitulée "Genomic history of the seventh pandemic of cholera in Africa" (16). Les résultats basés sur les données génomiques de 1070 isolats de Vibrio cholerae O1, dans 45 pays africains et sur une période de 49 ans, montrent que les épidémies passées étaient attribuables à une seule lignée élargie. Cette lignée a été introduite au moins 11 fois depuis 1970, dans deux régions principales, l'Afrique de l'Ouest et l'Afrique de l'Est/Sud, provoquant des épidémies qui ont duré jusqu'à 28 ans. Les cinq dernières introductions en Afrique, toutes en provenance d'Asie, concernaient des sous-lignées multirésistantes qui ont remplacé les sous-lignées sensibles aux antibiotiques après 2000. Ce cadre phylogénétique décrit la périodicité de l'introduction des lignées et les voies stables de propagation du choléra, ce qui devrait contribuer à la conception rationnelle des mesures de lutte contre le choléra en Afrique.

La question posée de l'environnement comme habitat pérenne de l'agent étiologique du choléra en Afrique méritait qu'on la pose d'autant plus dans le contexte de la controverse de l'origine du choléra en Haïti. En effet, deux thèses étaient en opposition. Celle de l'introduction accidentelle par le déploiement de soldats de la FORPRONU soutenue et étayée par le Pr Renaud Piarroux, versus la thèse de l'origine environnementale 9 mois après les perturbations telluriques du séisme qui a dévasté Haïti le 12 janvier 2010 soutenue par le Pr Rita Colwell. Controverse qui a pris fin suite à l'accumulation des évidences scientifiques démontrant sans équivoque l'introduction accidentelle du choléra en Haïti par les casques bleues népalais en provenance de Katmandou ou sévissait au même moment une importante épidémie de choléra ².

² Choléra. Haïti 2010-2018, histoire d'un désastre. Par Pr Renaud Piarroux, CNRS Editions 301 pages.

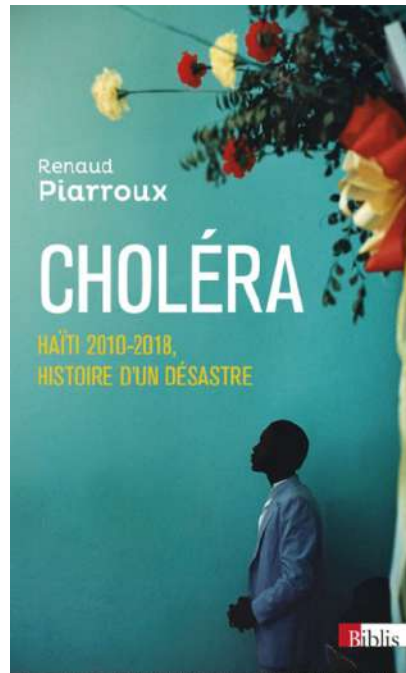


Figure 16 : Illustration de la couverture du livre du Pr. R. Piarroux "Choléra. Haïti 2010-2018, Histoire d'un désastre".

Le 1^{er} décembre 2016, le secrétaire général de l'ONU Ban Ki-moon devant l'assemblée générale de l'ONU prononce un discours où il reconnaît officiellement le rôle qu'ont joué les Nations unies dans l'épidémie de choléra qui ravage le pays : « Nous n'avons tout simplement pas fait assez concernant l'épidémie de choléra et sa propagation. [...] Nous sommes profondément désolés pour notre rôle. » Pour la première fois, il présente les excuses de l'organisation : « Au nom des Nations unies, je vais vous le dire très clairement : nous nous excusons auprès du peuple haïtien. »

5.2.4 Dynamique du choléra en Afrique

Mobilité humaine dérivée du BigData de la téléphonie mobile pour alimenter la modélisation de la dynamique des épidémies de choléra

Enfin, le troisième objectif est de développer la modélisation des déterminismes de la transmission du choléra, comme la mobilité humaine. Pour cela, un premier article a été publié dans la revue PNAS (2016) et détaille le modèle de transmission du choléra qui intègre la mobilité des populations via les informations extraites du bigdata d'un opérateur mobile historique au Sénégal ainsi que les précipitations (17). Cette étude a été une contribution majeure aux connaissances et applications de la dynamique et de l'épidémiologie du choléra. Cette approche a suscité un vif intérêt de la part de l'UNICEF pour transposer ce modèle à plus large échelle en Afrique de l'Ouest et le tester en mode prédiction temps réel. Conjointement avec l'EPFL de Lausanne et l'université de Florence en Italie, nous avons obtenus en mars 2017 un financement de 10 000€ par ECHO Sénégal via le projet choléra de l'UNICEF (PI : G Constantin de Magny, Co-PI : Enrico Bertuzzo) sur cette thématique nous a permis d'initier de nouveaux travaux sur la modélisation de la dynamique du choléra au Niger dans un premier temps. Certaines limitations dans la disponibilité des données ne nous ont pas permis de mener à bien ce projet.

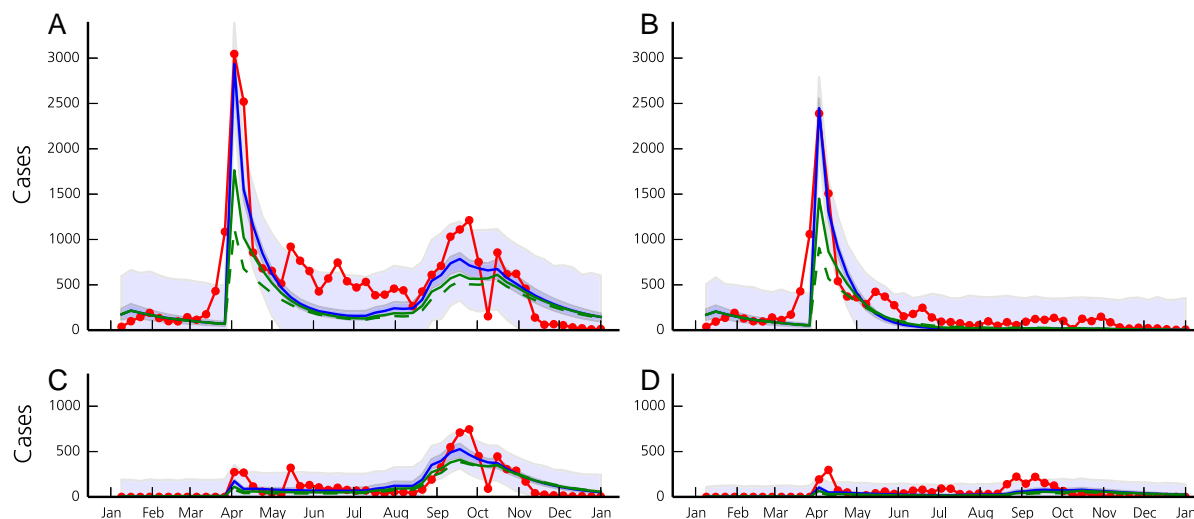


Figure 17 : Nombre de nouveaux cas rapportés (ligne rouge) et modélisés par semaine en 2005 pour l'ensemble du pays du Sénégal (A), et pour les régions de Diourbel (B), Dakar (C) et Thiès (D). Les lignes bleues correspondent aux simulations du modèle (Eqs. 1–4) avec le meilleur ensemble de paramètres postérieurs. Les bandes ombrées correspondent aux percentiles 2,5–97,5 de l'incertitude liée à l'estimation des paramètres (bleu foncé) et de l'incertitude totale en supposant une erreur gaussienne homoscedastique (bleu clair). Les cas modélisés sous l'hypothèse d'une réduction de transmission de 10 % (ligne verte pleine) et 20 % (ligne verte en pointillés) à Touba pendant le Grand Magal de Touba sont également indiqués.

A la suite de ces recherches, j'ai également pu contribuer à une étude sur l'impact des actions de prévention, sensibilisation et éducation à l'hygiène lors d'épidémie de choléra. Cette étude a fait l'objet d'une publication dans la revue *Frontiers of Public Health* en 2021 où j'étais dernière auteur. Ces interventions comprennent des programmes d'eau, d'assainissement et d'hygiène (WASH) dont l'influence sur le contrôle du choléra a été jusqu'à présent peu quantifiée. Compte tenu du nombre limité d'études sur l'Assainissement Total Piloté par la Communauté (ATPC) et les couvertures en eau liées au contrôle du choléra, l'objectif de notre travail est de déterminer si ces interventions dans les hotspots du choléra (zones géographiques vulnérables à la transmission de la maladie) ont un impact significatif sur la transmission du choléra. Dans cette étude, nous avons examiné les données recueillies dans 125 villages du district de Madarounfa (Niger) lors de l'épidémie de choléra de 2018. En utilisant un modèle dit de « hurdle », nos résultats montrent qu'un accès complet à un assainissement amélioré diminue significativement la probabilité de choléra de 91% ($P < 0,0001$) par rapport aux villages qui n'ont pas du tout accès à l'assainissement (18).

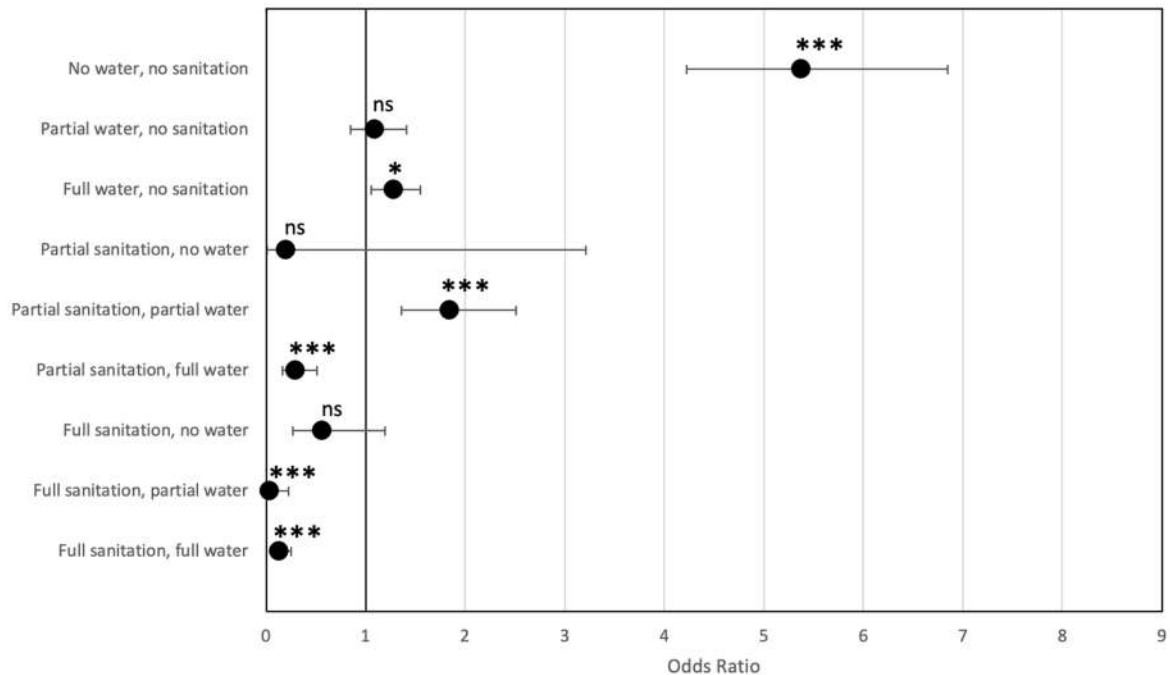


Figure 18 : Odds ratios de la prévalence du choléra selon la couverture en eau et assainissement (intervalle de confiance à 95 %). Statistiques Z pour le Odds ratios (hypothèse nulle H0 : Odds ratio = 1) ns, non significatif, *P < 0,05, ***P < 0,001.

Si l'on considère uniquement les villages touchés par le choléra dans la zone étudiée, les cas de choléra diminuent d'un facteur 4,3 dans les villages où il existe un accès partiel à des sources d'eau de qualité au moins, tandis que l'accès total à des sources d'eau améliorées diminue les cas de choléra d'un facteur 6,3 par rapport aux villages sans accès à l'eau ($P < 0,001$). En outre, les villages sans accès à l'eau potable et à l'assainissement sont 6,7 fois plus ($P < 0,0001$) susceptibles de contracter le choléra. En revanche, les villages bénéficiant d'un assainissement complet et d'une couverture en eau sont 9,1 fois moins ($P < 0,0001$) susceptibles de contracter le choléra. Les résultats de notre étude suggèrent qu'un accès significatif à l'eau et à l'assainissement amélioré au niveau du village constitue une barrière solide contre la transmission du choléra. Cependant, il faut une couverture complète du village par le ATPC pour observer un impact fort sur le choléra, car un accès partiel n'a qu'un impact limité.

Phénotype et génotype des souches atypique de Vibrio cholerae O1 Ogawa de la dernière épidémie de choléra au Sénégal

Par ailleurs, j'ai pu contribuer par mon expertise et données à deux études supplémentaires sur le choléra. La première a porté sur l'identification d'un élément SXT (facteur de résistance) atypique d'El Tor *Vibrio cholerae* O1 Ogawa au Sénégal, en Afrique publié en 2017 dans la revue *Frontiers in Microbiology*. En 2004-2005, le Sénégal a connu une importante épidémie de choléra avec un nombre de cas s'élevant à plus de 31 719 et environ 458 décès (CFR, 1,44%). Dans cette étude rétrospective, cinquante isolats ont été sélectionnés au hasard sur un total de 403 isolats de *V. cholerae* biotype El Tor sérovar Ogawa provenant de toutes les régions du Sénégal pendant l'épidémie de choléra de 2004-2005. Les isolats ont été caractérisés à l'aide de méthodes phénotypiques et génotypiques (19).

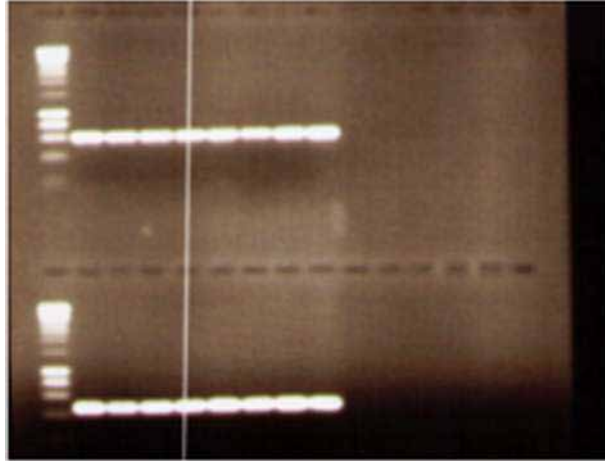


Figure 19 : Électrophorèse sur gel d'agarose des exemples de produits PCR des isolats de *Vibrio cholerae* O1 en utilisant *tcpA* (classique et El Tor).

L'analyse des profils de résistance aux antibiotiques a révélé la prédominance du phénotype S-Su-TCY-Tsu (90 % des isolats). La caractérisation moléculaire de la résistance aux antibiotiques a révélé la présence de l'élément SXT, un élément d'intégration chromosomique auto-transmissible dans tous les isolats. La plupart des isolats de *V. cholerae* avaient une cassette de virulence intacte (86%) (gènes *ctx*, *zot*, *ace*). Tous les isolats testés ont donné une amplification avec les amorces pour le CT classique, et 10/50 (20%) des isolats portaient le *ctxB* classique et El Tor. L'étude révèle la présence de *V. cholerae* O1 El Tor atypique lors de l'épidémie de choléra au Sénégal en 2004-2005.

Dynamique des épidémies de choléra entre la Mauritanie et le Bénin

La seconde a porté sur une étude de la dynamique des épidémies de choléra entre la Mauritanie et le Bénin (Moore *et al.* 2018, PLoS NTD). Cette étude fournit la première vision cohérente de la dynamique des épidémies de choléra dans une grande partie de l'Afrique de l'Ouest (20).

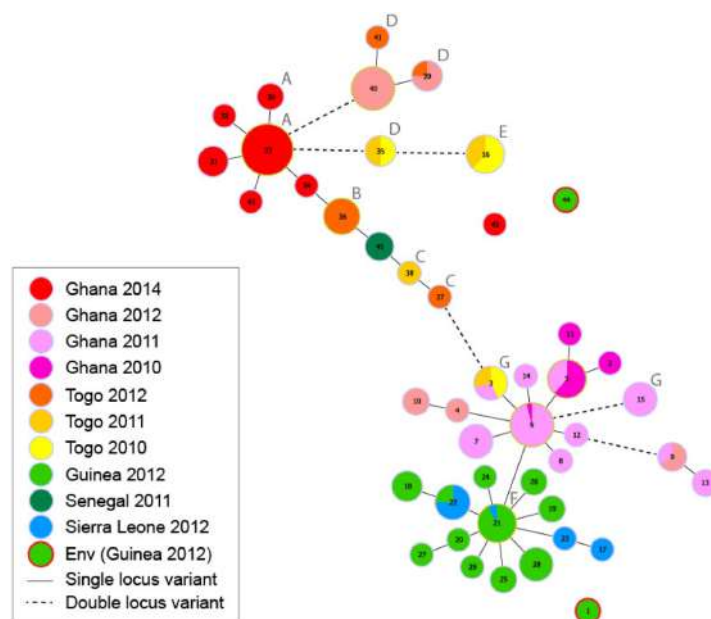


Figure 20 : Arbre couvrant de poids minimal basé sur les types MLVA de 257 isolats de *V. cholerae* provenant de plusieurs récentes épidémies de choléra en Afrique de l'Ouest. Chaque type MLVA est représenté par un nœud (et un numéro unique), et la taille des nœuds reflète le nombre d'isolats de chaque type MLVA. Les lignes pleines indiquent le variant de locus simple le plus probable, tandis que les lignes en pointillés indiquent le variant de locus double le plus probable. Les couleurs reflètent le

pays distinct et l'année d'origine de l'isolat. Les diagrammes circulaires indiquent les souches provenant de différentes périodes ou pays présentant un type MLVA identique. Les deux souches représentées par les types MLVA #1 et #44 ont été isolées à partir d'échantillons environnementaux en Guinée (encerclées en rouge). Les étiquettes A à G indiquent les isolats provenant du Ghana, du Togo et de la Guinée.

Cet aperçu épidémiologique montre que de 2009 à 2015, au moins 54% des cas déclarés ont concerné des populations vivant dans les trois zones urbaines d'Accra, Freetown et Conakry. Ces résultats peuvent servir de guide pour mieux cibler les efforts de prévention et de contrôle du choléra dans les points chauds identifiés en Afrique de l'Ouest.

5.2.5 Ulcer de Buruli au Cameroun.

En parallèle avec mes activités principales de recherche, j'ai collaboré avec Jordi Landier de l'Institut Pasteur de Paris et du Cameroun sur la dynamique de l'Ulcer de Buruli au Cameroun entre 2002 et 2012. Nous avons montré que l'incidence de l'Ulcer de Buruli dans cette région varie de manière significative en fonction des saisons et nous avons lié ces variations aux fluctuations de la présence de *Mycobacterium ulcerans* dans l'environnement, qui sont probablement dues à la dynamique des écosystèmes d'eau douce de la rivière Nyong. A Akonolinga, pendant la haute saison des pluies, lorsque le risque de transmission de *M. ulcerans* semble être le plus élevé, les populations devraient accroître leurs comportements proactifs et les efforts de détection des cas devraient être intensifiés au cours des mois suivants pour assurer un diagnostic précoce et l'accès aux soins (Landier *et al. Emerging Infectious Diseases*, 2015) (21).

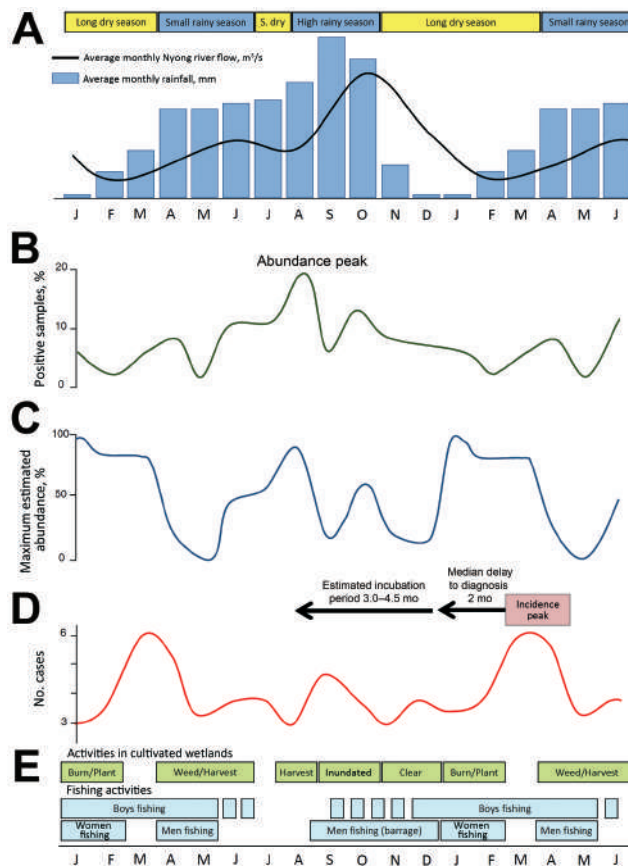


Figure 21 : Représentation schématique des changements saisonniers et des liens possibles entre l'environnement, la présence de *Mycobacterium ulcerans*, l'exposition humaine et l'incidence de l'ulcère de Buruli (BU) dans le district d'Akonolinga et la vallée de la rivière Nyong, au Cameroun, de 2002 à 2012. Pour une meilleure visualisation des retards, 18 mois sont présentés. A) Précipitations mensuelles moyennes et débit moyen de la rivière Nyong (annexe technique en ligne,

<http://wwwnc.cdc.gov/EID/article/21/8/14-1336-Techapp1.pdf>). S saison sèche, courte saison sèche. B) Prévalence de *M. ulcerans* dans l'environnement aquatique (pourcentage d'échantillons positifs pour *M. ulcerans*) (14). C) Abondance estimée des hétéroptères positifs pour *M. ulcerans* (exprimée en % de l'abondance maximale) (14). D) Nombre médian mensuel de cas de BU détectés dans le district d'Akonolinga, 2002–2012 (cette étude). E) Activités sélectionnées impliquant des contacts avec des environnements à risque élevé de BU (T. Giles-Vernick, comm. pers., 2015).

5.3 NOUVELLES PERSPECTIVES DE RECHERCHE, L'ANTIBIORESISTANCE

Après près de 20 années à m'investir sur la thématique de l'écologie des maladies infectieuses et principalement sur l'écologie de *Vibrio cholerae* et l'épidémiologie du choléra, j'ai acquis une expérience solide sur la dynamique des populations bactériennes dans l'environnement et de l'influence de la variabilité de l'habitat sur le risque d'émergence et la dynamique des maladies infectieuses à transmission hydrique au Sud. L'évolution théorique et conceptuelle de la compréhension de l'émergence des maladies infectieuses depuis ma thèse n'a cessé d'évoluer. En effet, l'ouvrage « La santé : une approche écosystémique » de Jean Lebel, directeur de recherche au Centre de Recherches pour le Développement International (CRDI) du Canada et rapporteur de ma thèse en 2006, est l'un des ouvrages fondateurs de l'approche OneHealth actuellement en plein essor face à la nécessité absolue d'avoir une approche intégrative sur la compréhension et la gestion des émergences des maladies infectieuses et de l'intégration dans une science de la durabilité.

Il est maintenant acquis sans ambiguïté que la santé humaine, animale et végétale sont interdépendantes et conditionnées à la santé de nos écosystèmes qui les abritent.

Désormais, l'aboutissement de cette dynamique a abouti à la définition et à l'adoption des Objectifs de Développement Durable (ODD), également nommés Objectifs mondiaux, par les Nations Unies en 2015. Ils sont un appel mondial à agir pour éradiquer la pauvreté, protéger la Planète et faire en sorte que tous les êtres humains vivent dans la paix et la prospérité d'ici à 2030. Les 17 ODD sont intégrés - reconnaissant que les interventions dans un domaine affecteront les résultats dans d'autres et que le développement doit équilibrer les aspects sociaux, économiques et environnementaux. La créativité, le savoir-faire, la technologie et les ressources financières de toute la société seront nécessaires pour atteindre les Objectifs dans tous les contextes.

Les antibiotiques, médicaments indispensables à la santé humaine, voient aujourd'hui leur efficacité menacée. Leur mauvaise utilisation pour les maladies humaines, ainsi que leur utilisation intensive en agriculture, entraînent l'apparition de bactéries développant des résistances qui est un phénomène constituant l'une des préoccupations actuelles majeures à l'échelle mondiale. Dès 1950, des bactéries pathogènes devenues résistantes aux antibiotiques usuels ont été mises en évidence, et ce phénomène n'a depuis cessé d'augmenter. La mauvaise utilisation et l'utilisation intensive des antibiotiques dans la santé humaine et animale exercent une pression sélective sur les molécules et contre sélectionnent les germes de plus en plus résistants.

L'OMS affirme que la résistance aux antibiotiques atteint désormais des niveaux dangereusement élevés dans toutes les régions du monde et ajoute que, si nous ne prenons pas des mesures d'urgence, nous entrerons bientôt dans une ère post-antibiotique dans laquelle des infections courantes et de petites blessures seront à nouveau mortelles. La situation pose donc des enjeux très importants, d'abord de santé publique, car elle risque d'entraîner le retour de nombreuses maladies mortelles aujourd'hui contrôlées voire presque éradiquées grâce aux antibiotiques, mais elle pose également un très important enjeu économique, car les mesures à prendre afin de lutter contre cette

résistance ont déjà, et auront certainement de plus en plus, un coût considérable pour les États. Les pays du Sud sont tout autant voire plus exposés encore à ces risques.

L'eau est l'élément centrale et majeur du moteur de la dynamique de l'émergence, de la persistance et diffusion de l'antibiorésistance. Les eaux sont très largement contaminées par les antibiotiques et par les bactéries, dont une grande partie est désormais résistante. L'eau est présente et essentielle à toutes les populations humaines, animales et végétales. L'antibiorésistance constitue donc un enjeu très important dans l'approche «One health» et il est primordial d'agir d'une manière commune afin d'inverser la tendance.

La question de recherche que je souhaite désormais explorer se porte sur les mécanismes biologiques, écologiques, évolutifs et les dynamiques écologiques qui alimentent le risque d'émergence, de persistance et de diffusion de l'antibiorésistance dans les pays du Sud.

Ce projet de recherche va s'articuler sur 2 axes de recherche.

AXE 1 : Caractérisation des résistances dans l'environnement et chez l'homme dans bactéries multirésistantes responsables des principales infections nosocomiales au Sud.

Afin de pouvoir comprendre les mécanismes et la dynamique à l'origine de l'émergence, persistance et diffusion de la résistance, il est essentiel de les caractériser. Les deux principaux compartiments auxquels je m'intéresse sont l'environnement, et plus précisément l'eau et l'homme.

5.3.1 Antibiorésistance des infections nosocomiales au Sénégal.

***Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM)**

Dès 2014, je me suis déjà intéressé à l'un des pathogènes de la liste ESKAPE, à savoir *Staphylococcus aureus*. Les infections nosocomiales à *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) et l'émergence de SARM communautaires constituent un problème majeur de santé publique au Nord comme au Sud. En raison des relations socio-économiques très étroites entre le Sénégal et la France, la dissémination de clones de SARM est probable entre ces deux pays. Cependant, il y a peu de données récentes sur l'épidémiologie moléculaire de SARM en Afrique. Les objectifs de ce projet sont d'explorer la population de SARM isolés dans différents centres de soins et hôpitaux de Dakar au Sénégal et de comparer les profils génétiques et phénotypiques à ceux observés dans un hôpital français (CHRU de Montpellier). Pour cela, nous avons mené une étude prospective, multicentrique avec comme critère l'inclusion des patients hospitalisés ou vus en consultation ayant un prélèvement positif à SARM. L'identification des souches s'est faite selon les méthodes microbiologiques standard. La sensibilité aux antibiotiques a été déterminée par la méthode de diffusion en gélose. Le typage moléculaire quant à lui a par les techniques spa typing, MultiLocus Sequence Typing (MLST), détermination des gènes codant la toxine PVL, ainsi que la caractérisation des gènes de résistance et facteurs de virulence par la technique des puces à ADN. Plus de 200 gènes et allèles de ces facteurs de résistance et virulence ont été révélés. La caractérisation s'est faite sur près de 350 souches de SARM (200 au CHRU de Montpellier et 150 souches au CHNU de Fann à Dakar) isolées consécutivement sur une même période.

Dans le cadre de ce projet SARM (UM/MIVEGEC/CHNU de Fann, PI : Dr P. Corne, Co-PI : G. Constantin de Magny, montant : 25 000€, 2015) avec le Dr Amadou Diop. Fin 2018, il a pu bénéficier d'une mobilité Sud/Nord et venir 2 mois à MIVEGEC à Montpellier pour finaliser les analyses, faire l'objet du transfert de compétences et valoriser les résultats. Je me suis investi davantage sur les données générées par ce projet sur la caractérisation génétique des SARM au Sénégal par les bio-puces

à ADN afin de finaliser la production du premier article. Les résultats obtenus sur le Sénégal montrent une diversité des 22 clones de SARM identifiés dominée par ST152, CC15 MSSA (PVL+), CC30-MSSA (PVL+), CC-15 MSSA (PVL-) et CC121 MSSA (PVL+) avec respectivement 25,5%, 12,4%, 11%, 9,7% et 8%. Sur les 145 souches analysées, 15 sont des SARM, avec une prédominance des clones USA300 et pédiatriques. Le gène PVL est prédominant dans notre étude et est présent dans 92 des 145 souches (63,4%). L'émergence des SARM, qu'ils soient d'origine communautaire ou hospitalière, est une réalité au Sénégal. Une surveillance épidémiologique permanente est nécessaire pour gérer ce problème et détecter les nouveaux variants et les nouvelles résistances. La publication est en circulation entre les auteurs.

Table 2 : Tableau récapitulatif des détails des souches isolées dans le projet.

Clonal Complexe	Strain type	n (% of Total)	Communautaire (n=68)	Hospitaliers (n=77)	n (% of Total)
CC152		38 (0,26)			
	CC152-MSSA [PVL+]		9	27	36 (0,25)
	CC152-MSSA		1	1	2 (0,01)
CC15		32 (0,22)			
	CC15-MSSA [PVL+]		12	6	18 (0,12)
	CC15-MSSA		6	8	14 (0,1)
CC30		17 (0,12)			
	CC30-MSSA [PVL+]		8	8	16 (0,11)
	CC30-MSSA			1	1 (0,01)
CC121		12 (0,08)			
	CC121-MSSA [PVL+]		8	4	12 (0,08)
CC8		11 (0,08)			
	ST8-MRSA-IV [PVL+/ACME+], USA300		2	6	8 (0,06)
	CC8-MSSA		1	1	2 (0,01)
	ST254-MRSA-IV+V, UK-EMRSA-10/Hannover EMRSA		1		1 (0,01)
CC6		9 (0,06)			
	CC6-MSSA		5	3	8 (0,06)
	CC6-MRSA-IV, WA MRSA-51		1		1 (0,01)
CC5		8 (0,06)			
	CC5-MSSA		2	2	4 (0,03)
	CC5-MRSA-IV, Paediatric clone		2		2 (0,01)
	CC5-MRSA-IV, Paediatric clone [edinA+], WA MRSA-65		1	1	2 (0,01)
CC1		6 (0,04)			
	CC1-MSSA		3	3	6 (0,04)
CC97		3 (0,02)			
	CC97-MSSA		2	1	3 (0,02)
CC45 (agr I)		3 (0,02)			
	CC45-MSSA		1	2	3 (0,02)
CC88		2			
	CC88-MSSA		1		1 (0,01)
	CC88-MRSA-IV [PVL+]		1		1 (0,01)
CC101		2 (0,01)			
	CC101-MSSA			2	2 (0,01)
CC361		2 (0,01)			
	CC361-MSSA		1	1	2 (0,01)

Ce premier projet a permis de construire un nouveau partenariat entre l'IRD, l'UM, et le CHNU de Fann à Dakar. J'ai assuré la mise en œuvre du projet pour la partie au Sénégal, de la rédaction, à la construction du partenariat, à la collecte des échantillons jusqu'à leur caractérisation et à la valorisation des résultats. Un article sur les résultats du Sénégal est en circulation entre les auteurs. Une seconde publication sur les données combinée France/Sénégal sera produite ultérieurement. **En outre, ce projet a déjà permis la production en 2015 d'une thèse en doctorat de pharmacie de l'UCAD présentée par Abdourahmane FALL, intitulée « *Staphylococcus aureus* en France et au Sénégal : liens épidémiologiques et génétiques ».** Il y a eu aussi une autre thèse pour l'obtention du diplôme d'état

de docteur en pharmacie à l'Université de Montpellier soutenus en 2017 par Thibault Bertolotti et intitulée « Etude génétique comparative de souches de staphylococcus aureus isolées à Dakar et à Montpellier ».

Phagothérapie, Klebsiella pneumoniae et Acinetobacter baumannii impliquées dans les infections associées aux soins.

Par la suite, je me suis engagé dans l'encadrement et le soutien de la thèse de l'étudiant sénégalais, Issa N'Diaye, que je co-encadre avec le Pr Seck de l'UCAD. La thèse porte sur le sujet « Recherche innovante sur les bactériophages performants contre les bactéries multirésistantes de *Klebsiella pneumoniae* et *Acinetobacter baumannii* impliquées dans les infections associées aux soins : identification et essai d'application in vitro ». En effet, ces deux espèces font elles aussi parties de la liste dite 'ESKAPE'.

La résistance des bactéries aux antibiotiques est un phénomène de plus en plus répandu dans le monde entier. L'utilisation intensive et de surcroît mal contrôlée de ces antibiotiques a conduit à exercer une pression de sélection et à contre sélectionner les souches bactériennes résistantes aussi bien chez les humains, les animaux et dans l'environnement. Ainsi l'émergence de bactéries multi résistantes à la majorité des antibiotiques disponibles sur le marché constitue aujourd'hui un problème majeur de santé publique en l'absence de nouvelles molécules. Les maladies infectieuses d'origine bactérienne représentent une menace de plus en plus importante avec l'émergence de ce phénomène de résistance de plus en plus présent pour un plus grand nombre de pathogène.

Parmi les nouvelles stratégies de contrôle des maladies infectieuses d'origine bactérienne, la phagothérapie se positionne comme la solution la plus avantageuse en remplacement des antibiotiques. C'est dans ce contexte que nous avons initié ce projet de recherche en thèse sur les deux principaux pathogènes responsables des infections nosocomiales les plus résistantes aux antibiotiques au Sénégal. Il s'agit de *Klebsiella pneumoniae* connue autrefois sous le nom de pneumobacille de Friedlander, est une entérobactérie, c'est-à-dire un bacille à Gram négatif. Elle est naturellement présente dans l'intestin, dans les voies aériennes supérieures de l'homme et des animaux à sang chaud : on dit que c'est une bactérie commensale. Elle colonise jusqu'à 30% des individus au niveau des muqueuses digestives et nasopharyngées. Cette bactérie se trouve aussi dans l'eau, les sols, les végétaux et la poussière (contamination par des matières fécales). C'est aussi un agent pathogène responsable de diverses infections (pneumonies, septicémies, infections urinaires, infections intestinales, affections rénales). Un certain nombre de souches de *Klebsiella pneumoniae* ont développé des résistances multiples aux antibiotiques (MDR), dont certaines sont XDR soit résistantes à au moins trois produits antibiotiques de seconde ligne. Et il s'agit de *Acinetobacter baumannii*, une bactérie à Gram négatif du genre *Acinetobacter*. Il s'agit d'un germe de maladie opportuniste chez l'Homme, particulièrement chez les personnes immuno-déprimées et que l'on trouve aussi comme agent d'infections nosocomiales où sa transmission est manuportée. Il a aussi été isolé du sol et de l'eau dans l'environnement. Tout comme pour *K. pneumoniae*, certaines souches présentent de très fort niveau de résistance aux antibiotiques.

L'essor récent du renouveau d'intérêt de la phagothérapie dans la lutte contre les infections bactériennes en échec thérapeutique a été le principal moteur de ce projet. En effet, il est primordial que l'Afrique, et le Sénégal principalement prenne cette dynamique de recherche de l'utilisation des phages dans la lutte contre les résistances. C'est d'autant plus important qu'une approche intégrative

comme l'approche OneHealth était absolument nécessaire afin d'améliorer les capacités à prévenir ces maladies et les combattre. Cette approche est particulièrement importante dans les pays du Sud qui subissent en première ligne ces émergences. Tout comme dans le choléra, l'environnement est un compartiment essentiel à intégrer dans les recherches sur l'émergence et la persistance des résistances aux antibiotiques, qui plus est pour ces deux pathogènes qui se trouvent aussi dans l'eau, le sol ou encore les végétaux.

L'objectif de ce projet est de récolter une vingtaine de souches de chacune des espèces issues d'infections nosocomiales et dont les profils de résistances sont des résistances multiples aux antibiotiques (MDR) voir certaines XDR, soit résistantes à au moins trois produits antibiotiques de seconde ligne. Il est aussi prévu d'isoler et caractériser les phages isolés de l'environnement aquatique de Dakar qui sont efficaces contre ces bactéries. Le but est d'étudier les mécanismes d'action lytique des phages sur ces bactéries en vue de contribuer à accroître la capacité de les utiliser ultérieurement dans une phagothérapie.

Dans le premier article intitulé "Antibiotic Resistance and Virulence Factors of Extended-Spectrum Beta- Lactamase-Producing *Klebsiella Pneumoniae* Involved in Healthcare- Associated Infections in Dakar, Senegal" dont l'objectif était d'investiguer les facteurs phénotypiques et génotypiques de la résistance aux antibiotiques et les facteurs de virulence des souches de *K. pneumoniae* ESBL isolées d'infections associées aux soins de santé à Dakar, au Sénégal (22).

Ces isolats de *K. pneumoniae* ESBL ont montré une résistance élevée aux antibiotiques tels que les β -lactames, les aminoglycosides, les cyclines, les fluoroquinolones et le triméthoprime-sulfaméthoxazole. Parmi ces souches, dix (10) étaient résistantes aux carbapénèmes et à la céfoxitine (17,8%, n=5), au chloramphénicol (25%, n=7) et à la fosfomycine (28,5%, n=8), considérés comme les antibiotiques les plus actifs contre les isolats de *K. pneumoniae* ESBL. Dix-huit (18) souches ont été considérées comme MDR et dix (10) souches comme XDR. Pour les gènes associés à la résistance phénotypique, la résistance aux β -lactames était conférée principalement par les gènes *bla_{SHV}* (24/28), *bla_{TEM}* (20/28) et *bla_{CTX-M}*, avec toutes les souches portant le gène *bla_{CTX-M15}*. Le gène *OXA-48* (6/28) était responsable de la résistance aux carbapénèmes, et d'autres gènes tels que IMP, VIM, NDM et OXA-23 n'ont pas été détectés. Les gènes de résistance plasmidique *qnrB* (16/28), *qnrS* (11/28) et *aac(6')-Ib* (21/28) étaient principalement responsables de la résistance aux fluoroquinolones et aux aminoglycosides. De plus, 3 des 6 gènes de virulence recherchés, les plus associés à la pathogénicité de *Klebsiella pneumoniae*, ont été trouvés dans ces souches avec *uge* (19/28), *mrKD* (21/28) et *fyuA* (13/28).

Table 3 : Résistances aux antibiotiques des souches de *K. pneumoniae* isolées dans l'étude.

Group	Antibiotics	Resistance Rate N (%)
β-lactams	Amoxicillin + clavulanic acid	28 (100)
	Ticarcillin + clavulanic acid	28 (100)
	Piperacillin + tazobactam	22 (78.5)
	Cefoxitin	5 (17.8)
	Cefotaxim	28 (100)
	Ceftazidime	28 (100)
	Cefepime	28 (100)
Monobactams	Aztreonam	28 (100)
Carbapenems	Ertapenem	9 (32.1)
	Meropenem	6 (21.4)
	Imipenem	6 (21.4)
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin	27 (96.4)
	Norfloxacin	23 (82.1)
Aminoglycosides	Gentamicin	21 (75)
	Tobramycin	23 (82.1)
	Amikacin	20 (71.4)
Cyclins	Tetracycline	28 (100)
	Minocyclin	28 (100)
	Doxycyclin	28 (100)
Phosphonic acids	Fosfomycin	8 (28.5)
Phenicols	Chloramphenicol	7 (25)
Folate pathway inhibitor	trimethoprim/sulfamethoxazole	26 (92.8)

Table 4 : Profils génétiques de résistance des 28 souches de *K. pneumoniae* isolées dans l'étude.

Group	Resistance Genes	N (%)
β-lactams	<i>bla_{CTX-M1}</i>	28 (100)
	<i>bla_{CTX-M15}</i>	28 (100)
	<i>bla_{TEM}</i>	20 (71.4)
	<i>bla_{SHV}</i>	24 (85.7)
	<i>bla_{OXA-1}</i>	21 (75)
Carbapenems	<i>OXA-48</i>	6 (21.4)
Fluoroquinolons	<i>gyrB</i>	3 (10.7)
	<i>parE</i>	1 (3.6)
	<i>qnrA</i>	1 (3.6)
	<i>qnrB</i>	16 (57.1)
	<i>qnrC</i>	1 (3.6)
	<i>qnrD</i>	1 (3.6)
Aminoglycosides	<i>qnrS</i>	11 (39.3)
	<i>aac(6)-Ib</i>	21 (75)

Dans un second article, intitulé "Whole genome analysis of Carbapenem Resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from healthcare-associated infections in Dakar, Senegal", l'objectif est d'étudier les profils de résistance aux antimicrobiens (AMR) et à réaliser une analyse complète du génome entier sur les souches de CRAB isolées des infections associées aux soins de santé (HAIs) à Dakar, au Sénégal (Figure 22). Les isolats ont démontré un niveau alarmant de résistance à plusieurs classes d'antibiotiques, les classant comme extrêmement résistants aux médicaments. Sur le plan génétique, ils ont présenté entre 30 et 51 gènes liés à la résistance contre diverses classes d'antibiotiques. Cela incluait des gènes conférant une résistance aux β-lactames (comme *blaOXA-23*, *blaNDM-1*, *blaOXA-51*, *blaCTX-M15*), aux aminoglycosides (y compris *ANT(3'')-IIa*, *APH(3'')-Ib*, *APH(3')-Ia*), aux fluoroquinolones (comme *qnrS1*, *qnrB17*, pompe d'efflux *AdeFGH*), au fosfomycine (y compris *fos2A*, *fosA6*, *AbaF*), et à la tétracycline (y compris *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(39)*). De plus, les isolats de CRAB hébergeaient divers éléments génétiques mobiles (MGEs) tels que des plasmides, des séquences d'insertion (ISs) et des intégrons. Ces MGEs possèdent le potentiel de transfert horizontal vers d'autres bactéries pathogènes Gram-négatives, exacerbant la dissémination de la résistance aux carbapénèmes et d'autres gènes de résistance aux antimicrobiens, en particulier dans les environnements hospitaliers.

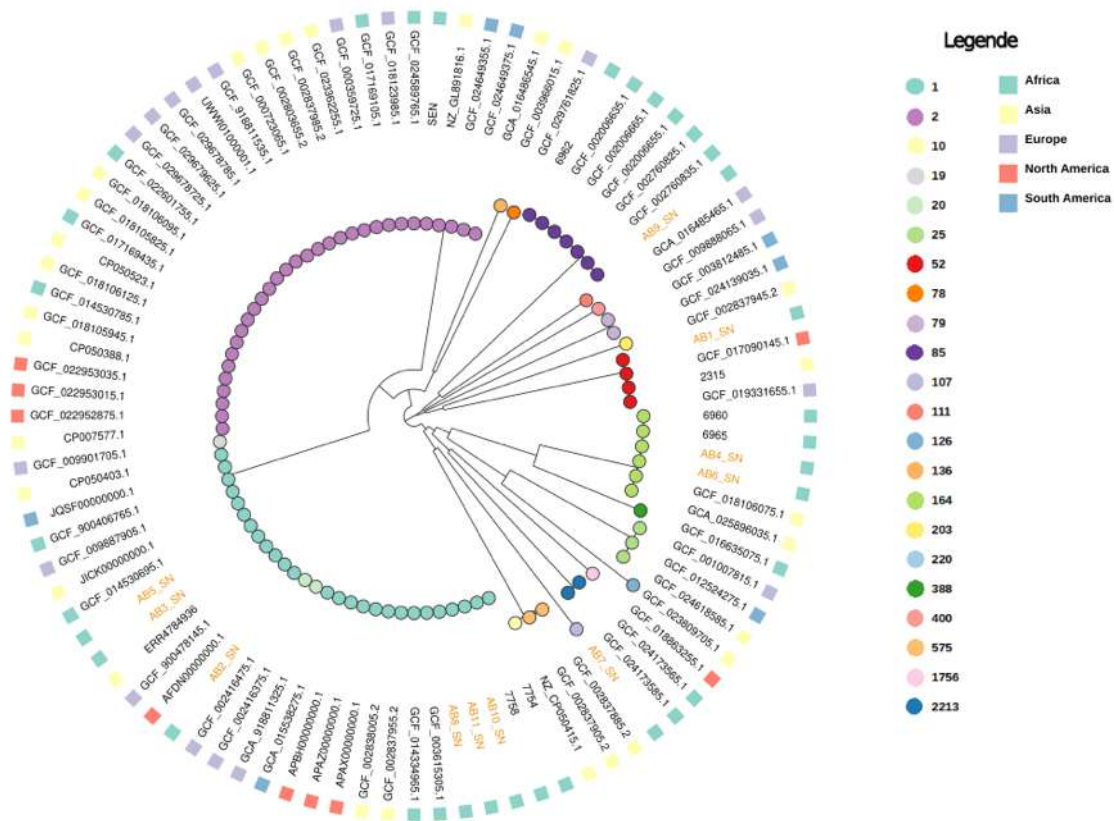


Figure 22 : Analyse phylogénétique des souches d'*Acinetobacter baumannii* résistantes aux carbapénèmes isolées lors d'infections nosocomiales. Les souches de l'étude au Sénégal ont leur dénomination colorée en orange. Les ronds colorés correspondent aux séquences types tandis que les carrés colorés aux zones géographiques de leur origine.

Dans un troisième article sous presse dans la revue Microbiology Resource Announcements intitulé " Complete Genome Sequences of Two *Klebsiella pneumoniae* Bacteriophages from Dakar, Senegal", l'objectif est de publier la ressource génétique issue du séquençage de deux bactériophages (phages) de *Klebsiella pneumoniae* isolés à partir d'eau usée collectée à Dakar, au Sénégal. Le phage vKpIN17 appartient au genre Przondovirus au sein de la famille Autigraphiviridae, avec des génomes d'ADN double brin (dsDNA), tandis que le vKpIN18 appartient au genre Webervirus de la famille Drexelviridae (Figure 23).

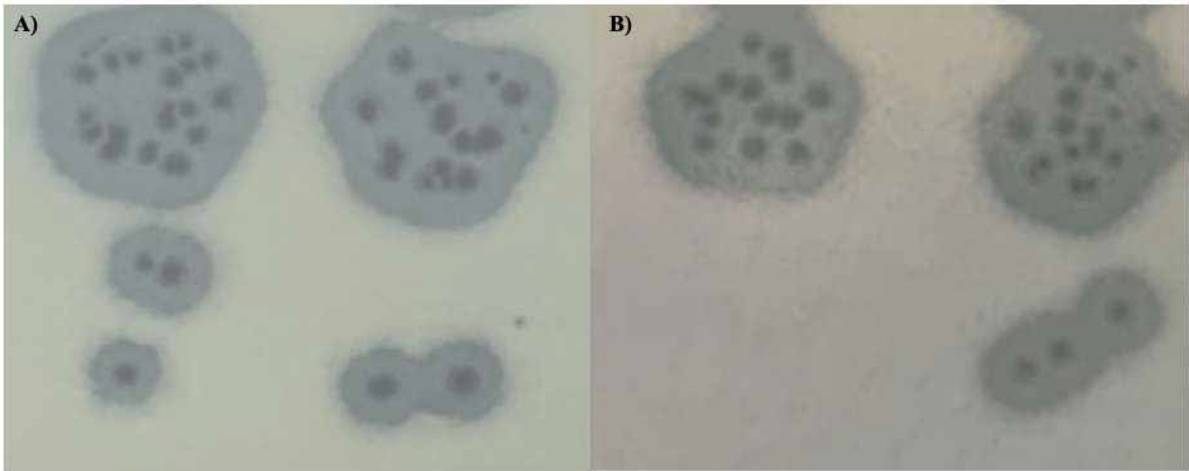


Figure 23 : Morphologie des plaques de lyse des bactériophages vKpIN17 (A) et vKpIN18 (B) en utilisant une souche clinique de *Klebsiella pneumoniae* KP26 isolée d'une infection associée aux soins dans le centre hospitalier pour enfants Albert Royer de Fann à Dakar. Les deux bactériophages lytiques ont été isolés à partir de deux eaux usées communautaires.

Un quatrième article est en cours de révision dans la revue Scientific Reports intitulé " Characterization and genome analysis of lytic bacteriophages vKpIN31 and vKpIN32, with broad host range and anti-biofilm potential against Hospital Acquired Infections Multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* in Dakar, Senegal". Cette étude visait à isoler des phages locaux présentant une haute spécificité, une activité lytique puissante et une efficacité anti-biofilm contre les souches de *K. pneumoniae* MDR isolées d'infections chez des patients hospitalisés sénégalais.

Des bactériophages, ou phages, ont été isolés à partir d'échantillons d'eau usée en utilisant des souches cliniques de *K. pneumoniae*. Deux phages, vKpIN31 et vKpIN32, ont été caractérisés pour leur spectre d'hôte, leur stabilité dans des conditions de température et de pH variables, leur cinétique de croissance en une étape, leurs activités lytiques et antibiofilm in vitro, ainsi que leur analyse génomique. Parmi les 28 souches différentes englobant 20 types de locus K différents, vKpIN31 et vKpIN32 ont infecté respectivement 12 et 9 souches avec des types de locus K distincts. La courbe de croissance en une étape a révélé une période de latence de 25 et 20 minutes pour vKpIN31 et vKpIN32, avec des tailles d'explosion de $5,6 \times 10^3$ et $3,2 \times 10^3$ PFU/cellule, respectivement.

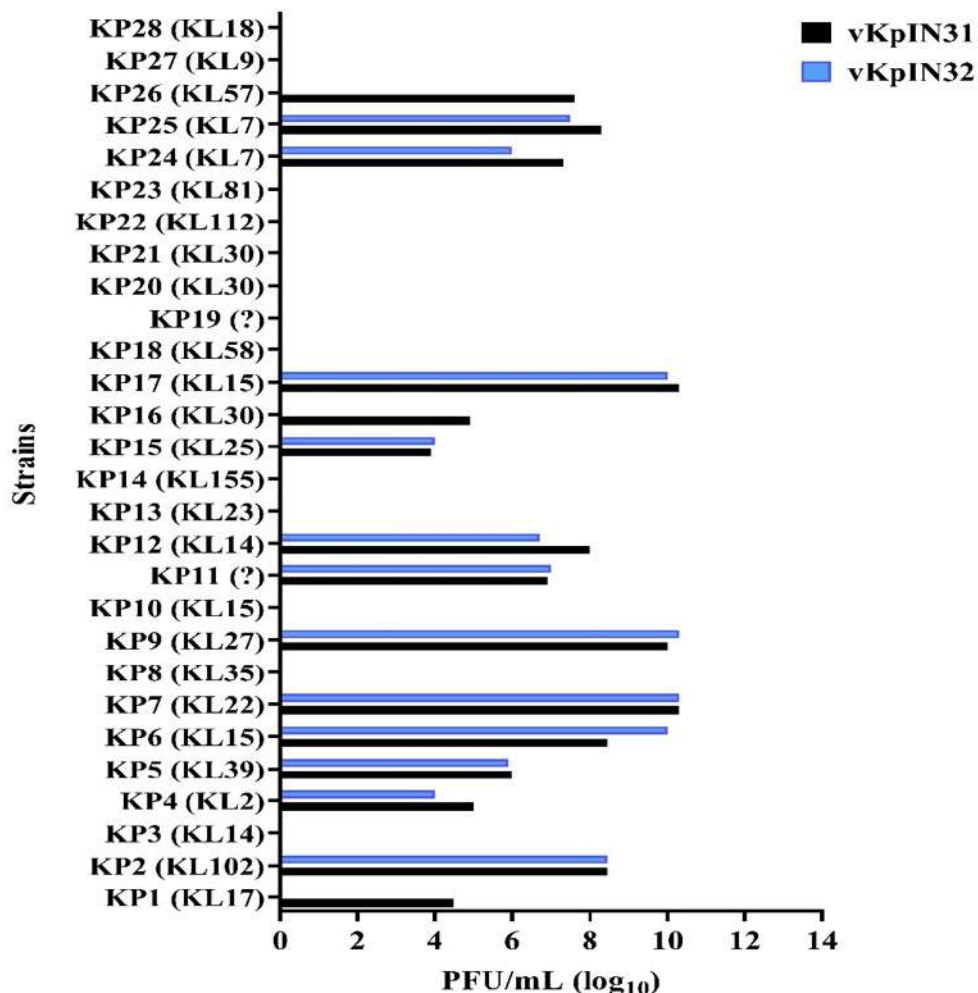


Figure 24 : L'efficacité de plaquage des phages vKpIN31 et vKpIN32 sur des souches sensibles, désignées par leur type K respectif entre crochets, a été évaluée. Une série de dilutions standardisées de stocks de phages (2×10^{10} PFU/mL) pour vKpIN31 et vKpIN32 a été déposée en taches sur chaque souche hôte, et le niveau d'infectiosité a été évalué.

Les phages isolés ont présenté une stabilité thermique et de pH. L'activité lytique des phages isolés a été évaluée à différentes multiplicités d'infection (MOI) - spécifiquement, MOI 1, 10^{-1} et 10^{-3} . Remarquablement, toutes les MOI ont montré des réductions substantielles de la croissance des

bactéries hôtes. De plus, les deux phages ont démontré une activité anti-biofilm marquée, réduisant la biomasse adhérente dans les biofilms préformés de 24 heures et 48 heures. L'analyse génomique a identifié vKpIN31 et vKpIN32 comme des virus d'ADN double brin appartenant à la classe des Caudoviricetes, à la famille des Demereviridae, à la sous-famille des Sugarlandvirus et au genre Sugarlandvirus, avec des tailles estimées de 77 115 pb et 109 095 pb, respectivement. Notamment, aucun gène associé à un cycle de vie tempéré, à des intégrases, à des éléments transposables, à une résistance aux antibiotiques ou à la virulence bactérienne n'a été détecté dans leurs génomes. vKpIN31 et vKpIN32 représentent des candidats prometteurs pour la thérapie par phages contre les infections causées par *K. pneumoniae* MDR.

L'étudiant est en dernière année et la collecte des échantillons, la caractérisation phénotypique et génotypique des résistances est réalisée. Déjà deux articles ont été publiés sur le sujet. Deux autres sont en cours d'évaluation. "N'Diaye I., *et al.* Characterization and genome analysis of lytic bacteriophages vKpIN31 and vKpIN32, with broad host range and anti-biofilm potential against Hospital Acquired Infections Multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* in Dakar, Senegal. Scientific report" ainsi que " N'Diaye I., *et al.* Whole genome analysis of Carbapenem Resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from healthcare-associated infections in Dakar, Senegal. Journal of Global Antimicrobial Resistance".

L'étudiant est désormais en cours de rédaction de son manuscrit de thèse en vue de la soutenance avant fin 2024.

Par ailleurs, grâce à ce sujet innovant, l'étudiant a obtenu à deux reprises le soutien de l'Ambassade de France au travers de bourse d'échange entre la France et le Sénégal dans le cadre du programme SCAC pour des séjours de 3 mois (2022, 2023) en partenariat avec l'équipe Bactériophage, bactérie, hôte dirigée par le Pr Laurent Debarbieux (Institut Pasteur de Paris).

AXE 2 : Mécanismes d'émergence des résistances dans l'environnement au Sud.

L'eau est un élément majeur dans le mécanisme d'émergence des résistances. Quelle soit dite douce ou marine, ces deux environnements sont des contributeurs essentiels à ces mécanismes.

Mécanismes d'émergence des résistances dans l'environnement marin

La plupart des recherches sur les maladies infectieuses et les résistances aux antibiotiques se sont concentrées sur les systèmes intérieurs, et peu d'efforts ont été consacrés aux habitats marins. Cependant, les environnements marins, et en particulier les environnements côtiers, peuvent servir de foyers de transmission pour bactéries potentiellement pathogènes et les résistances en raison des agrégations concentrées de bactéries provenant de différentes sources, tant marines que terrestres, où des bactéries liées à l'environnement, à l'homme et/ou à l'animal peuvent coexister, au moins temporairement. Ce mélange et les conditions très altérées des écosystèmes marins côtiers (anthropisation, contaminants, résidus pharmaceutiques, etc.) peuvent affecter les interactions entre les espèces, sélectionner les résistances et déclencher l'émergence de maladies. Le risque de propagation d'infections et/ou de résistance lié à l'habitat marin ou aux produits marins constitue donc un défi majeur pour la santé mondiale.

C'est pour cela, que je me suis associé au projet NEMESIS porté par le Dr JC Auguet de l'UMR MARBEC intitulé « Unravelling the ecology of the mariNE pathobioME and reSIStome for health and food management (NEMESIS) », financé par l'ANSES pour 197 000€.

Ce projet vise à mieux comprendre les risques sanitaires liés aux pathogènes marins et aux résistances aux antimicrobiens (RAM) dans des zones contrastées de la côte vietnamienne grâce à un cadre interdisciplinaire intégrant les connaissances en matière d'écologie, d'épidémiologie, de microbiologie et de société. Il y a quatre défis principaux à relever :

1) L'inventaire des bactéries pathogènes potentielles présentes dans les habitats marins et leurs réservoirs est mal documenté. En utilisant des méthodes moléculaires à haut débit, notre objectif est de découvrir la diversité, la distribution et l'écologie de ces pathogènes présents dans l'environnement marin et la faune marine.

2) L'efficacité du transfert des pathogènes et de leur résistance entre les habitats marins et le bétail humain ou la production aquacole marine n'étant pas bien comprise. Nous utiliserons la métagénomique comparative pour identifier les voies préférentielles de circulation entre l'habitat marin et les cohortes à haut risque.

3) Les connaissances sur les pratiques antimicrobiennes dans les élevages aquacoles de cages marines sont assez limitées et on sait peu de choses sur la conscience qu'ont les éleveurs du risque lié à la supplémentation en antibiotiques pour leur propre santé ou celle des consommateurs. Notre objectif ici est de mieux comprendre les pratiques d'aquaculture dans les fermes de cages marines et la perception par les éleveurs du risque lié à la supplémentation en antibiotiques en utilisant des entretiens semi-dirigés et des observations ethnographiques du comportement sanitaire.

4) Le risque sanitaire pour l'homme et la production aquacole marine lié au pathobiome marin et au résistome n'a jamais été estimé. Notre objectif sera de faire une évaluation quantitative du risque microbien (QMRA) en combinant les données sociales et les données microbiologiques.

C'est dans ce 4^{ème} défis que je suis impliqué au côté du Dr Ramses DJIDJOU-DEMASSE, chercheur à MIVEGEC et modélisateur.

Le projet est actuellement dans la première phase de collecte des données.

Mécanismes d'émergence des résistances dans l'environnement fluvial

Les fleuves font parties des environnements aquatiques particulièrement concernées par la problématique de l'antibiorésistance. C'est à ce titre que je suis impliqué dans la mise en place d'un projet ambitieux de grande envergure sur l'étude de la contribution des grands fleuves et de leur embouchure dans la transmission et la dissémination de la RAM et leur impact sur la santé humaine, animale et environnementale.

Ce projet vise trois grands fleuves et leur embouchure en Europe, Asie et Afrique : le Rhône, le Mékong et le Fleuve Sénégal. Ce projet « Une Santé » intégrera des recherches en microbiologie, génomique, santé humaine et vétérinaire, écologie, chimie, hydrologie, épidémiologie, et anthropologie de la santé. Il est conjointement porté entre le Dr Anne-Laure Banuls de MIVEGEC, responsable de l'équipe GENESYS à MIVEGEC, et du Dr Christian Lienhardt de l'UMI 233 TransVIHMI.

Les résultats attendus de ce projet permettront de déterminer la distribution et les flux des bactéries résistantes et des gènes de résistance entre les différents compartiments et le long des fleuves, mais aussi d'identifier le rôle des divers facteurs physiques, géographiques, climatiques et chimiques dans l'émergence et la dissémination de la RAM entre terre et mer, l'environnement, l'animal et l'homme. L'analyse globale et comparative des trois fleuves et de leur embouchure

permettra de prédire la dynamique de la RAM dans un contexte de changement climatique en utilisant un modèle mécanistique de distribution des espèces incorporant les données environnementales. C'est dans cette dernière partie que j'interviendrai.

Bio-informatique et Génomique de la résistance

Conscient que la compréhension de ma thématique doit se faire par l'observation des mécanismes à toutes les échelles. L'échelle moléculaire est le point de départ de cela et la génomique bactérienne au travers de l'analyse des données de séquençage haut-débit est devenue incontournable. J'ai suivi une première formation en 2022 organisée par le Dr. J. Hayer, post-doctorante à GeneSys sur le sujet. Je souhaite compléter ces connaissances et savoirs par des formations complémentaires et plus avancées. Cela me permettra de gagner en autonomie sur la compréhension des résistances et des mécanismes d'émergence.

L'équipe accueille également en septembre 2023 Mr Thomas Vitré qui fera son master de Bio-informatique de l'UM en alternance pour 24 mois. Ce sera un renforcement des compétences dans le sujet.

Enfin, l'équipe offre l'opportunité de s'appuyer sur les plateformes de F. Chevenet, IR IRD, qui développe la plateforme EVOLAPS permettant de visualiser la reconstruction phylogéographique. Cette plateforme sera un outil essentiel dans la visualisation des données à propos de la résistance.

6 Bibliographie

1. Saumitou-Laprade P, Vernet P, Vassiliadis C, Hoareau Y, Constantin de Magny G, Dommée B, Lepart J. 2010. A self-incompatibility system explains high male frequencies in an androdioecious plant. *Science (New York, NY)* 327:1648–50.
2. Cazelles B, Chavez M, Constantin de Magny G, Guégan J-F, Hales S. 2007. Time-dependent spectral analysis of epidemiological time-series with wavelets. *Journal of the Royal Society Interface the Royal Society* 4:625–636.
3. Constantin De Magny G, Cazelles B, Guégan JF. 2006. Cholera threat to humans in Ghana is influenced by both global and regional climatic variability. *EcoHealth* 3:223–231.
4. Constantin de Magny G, Guégan J-F, Petit M, Cazelles B. 2007. Regional-scale climate-variability synchrony of cholera epidemics in West Africa. *BMC infectious diseases* 7:20.
5. Guillaume Constantin de Magny, Paroissin C, Cazelles B, de Lara M, Delmas J-F, Guégan J-F. 2005. Modeling environmental impacts of plankton reservoirs on cholera population dynamics. *ESAIM: Proceedings* 14:156–173.
6. Constantin de Magny G, Murtugudde R, Sapiano MRP, Nizam A, Brown CW, Busalacchi AJ, Yunus M, Nair GB, Gil AI, Lanata CF, Calkins J, Manna B, Rajendran K, Bhattacharya MK, Huq A, Sack RB, Colwell RR. 2008. Environmental signatures associated with cholera epidemics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:17676–17681.
7. Akanda AS, Jutla AS, Alam M, Constantin de Magny G, Siddique a K, Sack RB, Huq A, Colwell RR, Islam S. 2011. Hydroclimatic influences on seasonal and spatial cholera transmission cycles: Implications for public health intervention in the Bengal Delta. *Water Resources Research* 47:11 PP.
8. Constantin de Magny G, Long W, Brown CW, Hood RR, Huq A, Murtugudde R, Colwell RR. 2009. Predicting the distribution of *Vibrio* spp. in the Chesapeake Bay: A *Vibrio cholerae* case study. *EcoHealth* 6.
9. Banakar V, Constantin de Magny G, Jacobs J, Murtugudde R, Huq A, Wood RJ, Colwell RR. 2012. Temporal and spatial variability in the distribution of *Vibrio vulnificus* in the Chesapeake Bay: a hindcast study. *EcoHealth* 8:456–67.
10. Haley BJ, Kokashvili T, Tskshvediani A, Janelidze N, Mitaishvili N, Grim CJ, Constantin de Magny G, Chen AJ, Taviani E, Eliashvili T, Tediashvili M, Whitehouse CA, Colwell RR, Huq A. 2014. Molecular diversity and predictability of *Vibrio parahaemolyticus* along the Georgian coastal zone of the Black Sea. *Frontiers in Microbiology* 5.
11. Constantin de Magny G, Mozumder PK, Grim CJ, Hasan N a, Naser MN, Alam M, Sack RB, Huq A, Colwell RR. 2011. Role of Zooplankton Diversity in *Vibrio cholerae* Population Dynamics and in the Incidence of Cholera in the Bangladesh Sundarbans. *Applied and Environmental Microbiology* 77:6125–6132.
12. Roche B, Broutin H, Choisy M, Godreuil S, Constantin de Magny G, Chevalere Y, Zucker J-D, Breban R, Cazelles B, Simard F. 2014. The niche reduction approach: an opportunity for optimal control of infectious diseases in low-income countries? *BMC Public Health* 14:753.
13. Constantin de Magny G, Hasan NA, Roche B. 2014. How community ecology can improve our understanding of cholera dynamics. *Frontiers in Microbiology* 5.
14. Sonko A, Brehmer P, Constantin De Magny G, Penneç GL, Ba BS, Diankha O, Fall M, Linossier I, Henry M, N'Diaye I, Faye S, Kande Y, Galgani F. 2023. Pollution assessment around a big city in West Africa reveals high concentrations of microplastics and microbiologic contamination. *Regional Studies in Marine Science* 59:102755.
15. Sonko A, Copin D, Brehmer P, Diop C, Constantin De Magny G, Fall M, Kande Y, Moulin P, Faye NS, Faye S, Linossier I, Le Penneç G. 2023. Assessment of the global toxicity of marine sediments from the Dakar peninsula (Senegal, West Africa). *Environ Monit Assess* 195:185.
16. Weill F-X, Domman D, Njamkepo E, Tarr C, Rauzier J, Fawal N, Keddy KH, Salje H, Moore S, Mukhopadhyay AK, Bercion R, Luquero FJ, Ngandjio A, Dosso M, Monakhova E, Garin B, Bouchier C,

- Pazzani C, Mutreja A, Grunow R, Sidikou F, Bonte L, Breurec S, Damian M, Njanpop-Lafourcade B-M, Sapriel G, Page A-L, Hamze M, Henkens M, Chowdhury G, Mengel M, Koeck J-L, Fournier J-M, Dougan G, Grimont PAD, Parkhill J, Holt KE, Piarroux R, Ramamurthy T, Quilici M-L, Thomson NR. 2017. Genomic history of the seventh pandemic of cholera in Africa. *Science* 358:785–789.
17. Finger F, Genolet T, Mari L, Constantin de Magny G, Manga NM, Rinaldo A, Bertuzzo E. 2016. Mobile phone data highlights the role of mass gatherings in the spreading of cholera outbreaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113:6421–6426.
18. Graveleau J, Reserva ME, Keita A, Molinari R, Constantin De Magny G. 2021. Influence of Community-Led Total Sanitation and Water Coverages in the Control of Cholera in Madarounfa, Niger (2018). *Frontiers in Public Health* <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.643079>.
19. Sambe-Ba B, Diallo MH, Seck A, Wane AA, Constantin De Magny G, Boye CS-B, Sow AI, Gassama-Sow A. 2017. Identification of Atypical El Tor *V. cholerae* O1 Ogawa Hosting SXT Element in Senegal, Africa. *Front Microbiol* 8:748.
20. Moore S, Dongdem AZ, Opare D, Cottavoz P, Fookes M, Sadjji AY, Dzotsi E, Dogbe M, Jeddi F, Bidjada B, Piarroux M, Valentin OT, Glèlè CK, Rebaudet S, Sow AG, Constantin De Magny G, Koivogui L, Dunoyer J, Bellet F, Garnotel E, Thomson N, Piarroux R. 2018. Dynamics of cholera epidemics from Benin to Mauritania. *PLoS Negl Trop Dis* 12:e0006379.
21. Landier J, Constantin de Magny G, Garchitorena A, Guégan J-F, Gaudart J, Marsollier L, Le Gall P, Giles-Vernick T, Eyangoh S, Fontanet A, Texier G. 2015. Seasonal Patterns of Buruli Ulcer Incidence, Central Africa, 2002–2012. *Emerging Infectious Diseases* 21:1414–1417.
22. Ndiaye I, Sambe Ba B, Thiam F, Moustapha Boye M, Sow O. 2023. Antibiotic Resistance and Virulence Factors of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella Pneumoniae* Involved in Healthcare-Associated Infections in Dakar, Senegal. *Arch Microbiol Immunology* 07.

7 Tirés à part des principaux travaux scientifiques

- (1) Constantin de Magny G, Murtugudde R, Sapiano MRP, Nizam A, Brown CW, Busalacchi AJ, Yunus M, Nair GB, Gil AI, Lanata CF, Calkins J, Manna B, Rajendran K, Bhattacharya MK, Huq A, Sack RB, Colwell RR. 2008. Environmental signatures associated with cholera epidemics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:17676–17681.
- (2) Finger F, Genolet T, Mari L, Constantin de Magny G, Manga NM, Rinaldo A, Bertuzzo E. 2016. Mobile phone data highlights the role of mass gatherings in the spreading of cholera outbreaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113:6421–6426.
- (3) Graveleau J, Reserva ME, Keita A, Molinari R, Constantin De Magny G. 2021. Influence of Community-Led Total Sanitation and Water Coverages in the Control of Cholera in Madarounfa, Niger (2018). *Frontiers in Public Health* <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.643079>.
- (4) Ndiaye I, Sambe Ba B, Thiam F, Moustapha Boye M, Sow O. 2023. Antibiotic Resistance and Virulence Factors of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella Pneumoniae* Involved in Healthcare-Associated Infections in Dakar, Senegal. *Arch Microbiol Immunology* 07.

Environmental signatures associated with cholera epidemics

Guillaume Constantin de Magny^a, Raghu Murtugudde^b, Mathew R. P. Sapiano^b, Azhar Nizam^c, Christopher W. Brown^{b,d}, Antonio J. Busalacchi^b, Mohammad Yunus^e, G. Balakrish Nair^f, Ana I. Gil^g, Claudio F. Lanata^{g,h}, John Calkinsⁱ, Byomkesh Manna^f, Krishnan Rajendran^f, Mihir Kumar Bhattacharya^f, Anwar Huq^j, R. Bradley Sack^k, and Rita R. Colwell^{a,j,l,1}

^aInstitute for Advanced Computer Studies, ^bEarth System Science Interdisciplinary Center, and ^lMaryland Pathogen Research Institute, College of Chemical and Life Sciences, University of Maryland, College Park, MD 20742; ^cDepartment of Biostatistics, Emory University Rollins School of Public Health, Atlanta, GA 30329; ^dSatellite Climate Studies Branch, National Oceanic and Atmospheric Administration, College Park, MD 20742; ^eInternational Centre for Diarrhoeal Disease Research, Bangladesh, Dhaka, 1000, Bangladesh; ^fNational Institute of Cholera and Enteric Diseases, Beliaghata, Kolkata 700010, India; ^gInstituto de Investigacion Nutricional, Lima 12, Peru; ^hSchool of Medicine, Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, Lima 12, Peru; ⁱEnvironmental Systems Research Institute, Inc., Vienna, VA 22182; and ^jDepartment of International Health and ^kDepartment of Environmental Health, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, MD 21205

Contributed by Rita R. Colwell, September 26, 2008 (sent for review August 1, 2008)

The causative agent of cholera, *Vibrio cholerae*, has been shown to be autochthonous to riverine, estuarine, and coastal waters along with its host, the copepod, a significant member of the zooplankton community. Temperature, salinity, rainfall and plankton have proven to be important factors in the ecology of *V. cholerae*, influencing the transmission of the disease in those regions of the world where the human population relies on untreated water as a source of drinking water. In this study, the pattern of cholera outbreaks during 1998–2006 in Kolkata, India, and Matlab, Bangladesh, and the earth observation data were analyzed with the objective of developing a prediction model for cholera. Satellite sensors were used to measure chlorophyll a concentration (CHL) and sea surface temperature (SST). In addition, rainfall data were obtained from both satellite and *in situ* gauge measurements. From the analyses, a statistically significant relationship between the time series for cholera in Kolkata, India, and CHL and rainfall anomalies was determined. A statistically significant one month lag was observed between CHL anomaly and number of cholera cases in Matlab, Bangladesh. From the results of the study, it is concluded that ocean and climate patterns are useful predictors of cholera epidemics, with the dynamics of endemic cholera being related to climate and/or changes in the aquatic ecosystem. When the ecology of *V. cholerae* is considered in predictive models, a robust early warning system for cholera in endemic regions of the world can be developed for public health planning and decision making.

ecology | epidemiology | microbiology | remote sensing

Vibrio cholerae, a serious pathogen for humans, has been the subject of intense study for more than a century, yet the discovery that this bacterium is a natural inhabitant of riverine, estuarine, and coastal waters throughout both temperate and tropical regions of the world was made only relatively recently (1). Before the late 1970s, transmission of cholera was believed to occur exclusively by person-to-person contact, with epidemics initiated by contaminated water and food. In 1855, Sir John Snow hypothesized that devastating epidemics of cholera are caused by contaminated drinking water (2). In his time, the germ theory of disease had not been proven nor accepted and, obviously, it was not understood that the epidemic strain of *V. cholerae* was a bacterium naturally occurring in the aquatic environment (1, 3).

It is now recognized that *V. cholerae* is a component of coastal and estuarine microbial ecosystems, with the copepod species of zooplankton that comprise the aquatic fauna of rivers, bays, estuaries and the open ocean serving as host for the bacterium (4–7). *V. cholerae* can be found attached to the carapace and in the gut of copepods in large numbers, the copepod essentially serving as a vector for this human pathogen (1, 8, 9). A single copepod, for example, can contain as many as 10^3 – 10^5 *V. cholerae*

cells (10). Because a concentration of 10^9 ml⁻¹ *V. cholerae* comprises an infective dose, ingestion of untreated water containing a relatively small number of copepods carrying *V. cholerae* can initiate the disease (11). Therefore, conditions favorable for multiplication of copepods and related chitinous zooplankton species for which *V. cholerae* is commensal or symbiotic will result in an increase in the number of *V. cholerae*. The importance of copepods in cholera transmission was demonstrated in a study showing that the number of cholera cases in Bangladeshi villages was significantly reduced when a simple filtration method that effectively removed the plankton and particulate matter was used to treat drinking water (12, 13).

Another advance in understanding cholera epidemics was made with the discovery that the epidemics are significantly influenced by climatic factors (1, 13–17). Several environmental drivers of the seasonal cycle of cholera in India and Bangladesh where cholera is endemic have been identified (1, 18). Ocean surveillance by satellite remote sensing was used to monitor changes in sea surface temperature (SST) and sea surface height (SSH) in the Bay of Bengal. The pattern of changes in these parameters were shown to be related to *V. cholerae* dynamics in coastal, estuarine, and riverine waters of the Bay of Bengal and to the cholera epidemics caused by these bacteria in that region of the world (14). That is, the distinct seasonal pattern of cholera, in countries where the disease is endemic has been correlated with environmental factors and climate that drive both copepod population dynamics and the seasonal peaks in abundance of *V. cholerae* in the aquatic ecosystem of the Bay of Bengal. Given this relationship, it is concluded that the variables related to copepod population dynamics can serve as a proxy for the estimation of *V. cholerae* abundance in the environment.

Lobitz *et al.* (14) were the first to explore the now well recognized relationship between SST, SSH and cholera incidence using remote sensing, describing changes in coastal ecosystems significantly related to the annual cyclic pattern of cholera epidemics. Significant progress has since been made in

Author contributions: G.C.d.M., R.M., A.J.B., and R.R.C. designed research; G.C.d.M., R.M., M.R.P.S., and C.W.B. performed research; G.C.d.M., R.M., M.R.P.S., A.N., C.W.B., M.Y., G.B.N., A.I.G., C.F.L., J.C., B.M., K.R., M.K.B., A.H., R.B.S., and R.R.C. analyzed data; and G.C.d.M., R.M., M.R.P.S., A.N., C.W.B., A.J.B., G.B.N., A.I.G., C.F.L., J.C., K.R., A.H., R.B.S., and R.R.C. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

¹To whom correspondence should be addressed at: Institute for Advanced Computer Studies, Biomolecular Sciences Building 296, Room 3103, University of Maryland, College Park, MD 20742. E-mail: rcolwell@umiacs.umd.edu.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0809654105/DCSupplemental.

© 2008 by The National Academy of Sciences of the USA

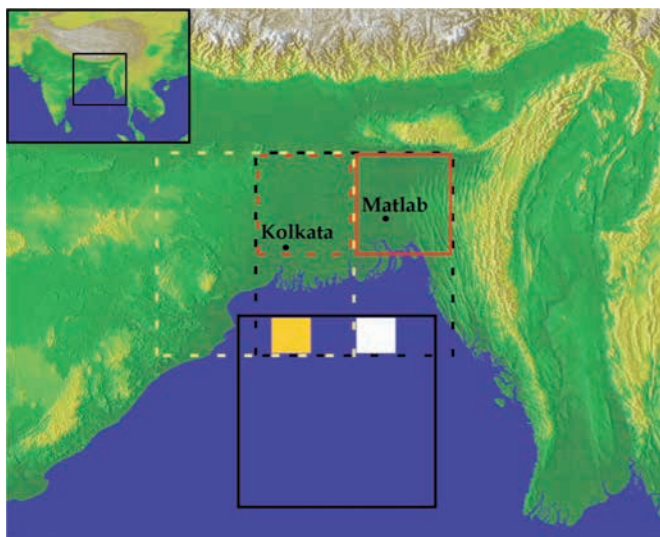


Fig. 1. Map showing the region from which the environmental and epidemiological data were obtained. Locations for extraction of the monthly mean values for CHL and SST are indicated by (i) one degree resolution squares, orange for Kolkata (centered in 20.5N/88.5E) and white for Matlab (centered in 20.5N/90.5E), and for (ii) the five degree box average for both sites by the black solid line square (centered in 18.5N/89.5E). Locations where monthly mean rainfall values were obtained are indicated as follows: (i) two and half degree resolution points for Kolkata are delimited by a red dashed line square (centered in 23.75N/88.75E) and for Matlab by a red solid line square (centered in 23.75N/91.25E), and (ii) for the five degree box average for Kolkata by the yellow dashed line square (centered in 22.5N/87.5E) and for Matlab by the black dashed square (centered in 22.5N/90.0E). Background image represents the ground elevation coded from dark green, the lowest value, to white, the highest [The Global Land One-kilometer Base Elevation (GLOBE) NOAA, NGDC; (<http://www.ngdc.noaa.gov/mgg/topo/globe.html>); (48)].

modeling interannual variability of cholera epidemics in Bangladesh, employing mathematical models to reproduce the seasonal cycle of cholera (19, 20). In one such study, a significant correlation was found between selected environmental variables, namely precipitation, SST, and CHL, with cholera cases in a single epidemic during 2000–2001 in KwaZulu-Natal, South Africa (21). In that analysis, SST and CHL data were estimated from satellite sensor measurements, and a conclusive finding was that robust predictive associations require multiyear analyses (21).

Here, we report on the association between selected environmental variables and confirmed cholera cases in two separate human populations resident in Kolkata, India, and Matlab, Bangladesh, in the northern Bay of Bengal, a marginal sea of the Indian Ocean (Fig. 1). Different satellite-derived data (CHL and SST) for the nearest coastal environment for each of the two geographical areas, and local rainfall during a nine year period (Fig. 2), September 1997–December 2006, for which all three environmental datasets were available, were analyzed. To determine which environmental signatures were associated with cholera epidemics in Kolkata and in Matlab, and to demonstrate the capacity to predict cholera, a historical approach was taken in modeling the relationship between the dynamics of the cholera epidemics and related environmental factors.

Results

For Kolkata, a positive relationship was observed between the number of cholera cases and CHL anomaly (CHL_{ano}) for both the single grid-point and the box-averaged values (see *Materials and Methods* and Fig. 1 for details). A 1 mg/m^3 increase in monthly mean CHL_{ano} for the single grid-point value was

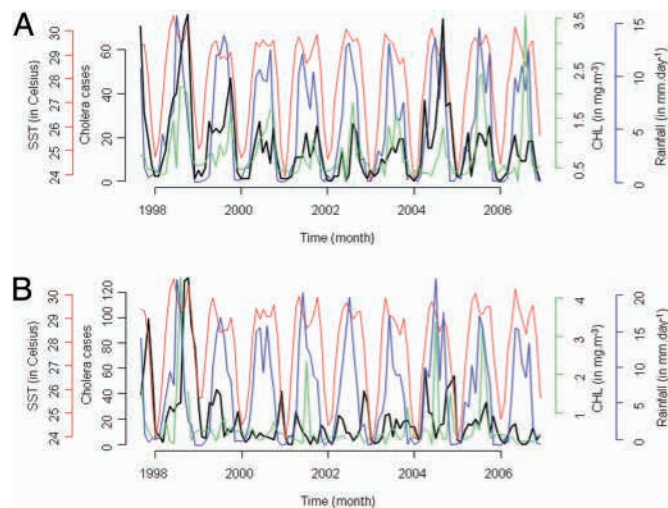


Fig. 2. Epidemiological and environmental dynamics for (A) Kolkata, India, and (B) Matlab, Bangladesh. The cholera cases, the CHL, the SST and the rainfall are shown in black, green, red and blue lines, respectively.

associated with an increase of 32.5% [95% confidence interval (CI) = 8.3%–62.0%] in the number of cholera cases, after controlling for the annual cycle and the “persistence” effect arising from density dependence in cholera transmission.

The relationship described above for CHL_{ano} was also observed for the single grid-point value of rainfall anomaly (PRE_{ano}) and the number of cholera cases in Kolkata. A 1 mm/day increase in monthly mean PRE_{ano} was associated with an increase of 6.5% [95% CI = 1.6%–11.7%] in the number of cholera cases, after controlling for the annual cycle and the “persistence” effect.

The final model for Kolkata is

$$y|\eta \sim \text{Po}(\mu, \sigma^2)$$

$$\log(\mu) = \eta = \beta_0 + \beta_1 I_{MAM} + \beta_2 I_{JJA} + \beta_3 I_{SON} + \beta_4 \log(1 + chol_{t-1}) + \beta_5 CHL_t + \beta_6 Rain_t \quad [1]$$

where coefficients are detailed in Table 1. Observed cholera case time-series and the prediction of both the fitted model and the fitted cross-validation model are displayed in Fig. 3A. The comparison of observed cholera cases against the prediction of the fitted models (Fig. 3B) shows that the cross-validation model tends to underestimate more of the highest values of cholera cases than the fitted model. The pseudo R^2 value for the fitted model is equal to 88.17%.

In contrast to CHL_{ano} , the PRE_{ano} five degree grid box average was not retained in the model, suggesting that the major effects of precipitation occur locally rather than at a large scale, reflecting localized precipitation, even in a large scale monsoon system (22). SST was not retained in the model, either with the single grid point anomaly or with the five degree grid box average. It could be because of collinearity between the variables, most of the variance likely being already explained by CHL_{ano} and PRE_{ano} .

For Matlab, a positive relationship was observed between number of cholera cases and the single grid-point data for CHL_{ano} , with a one month lag. A 1 mg/m^3 increase in the monthly mean CHL_{ano} was related to the number of cholera cases increasing by 31.4% [95% CI = 13.0%–52.7%], after controlling for the annual cycle and the “persistence” arising from density dependence in cholera transmission. When the model was run using a five degree box for the averaged data, a positive

Table 1. Summary of the model obtained for Kolkata, India, and Matlab, Bangladesh

	Model parameters								
	Intercept	I_{MAM}^*	I_{JJA}^*	I_{SON}^*	$\text{Log}(\text{chol}_{t-1})^*$	CHL_t	Rain_t	CHL_{t-1}	Df
Kolkata									
Coefficient	-0.264	1.597	1.524	1.476	0.578	0.281	0.063		103
P value	0.39	1.10^{-7}	4.10^{-7}	1.10^{-6}	9.10^{-12}	7.10^{-3}	9.10^{-3}		
SE	0.31	0.28	0.28	0.29	0.07	0.10	0.02		
Matlab									
Coefficient	0.676	0.674	0.168	0.659	0.637			0.273	103
P value	2.10^{-2}	2.10^{-3}	0.44	9.10^{-4}	2.10^{-14}			5.10^{-4}	
SE	0.29	0.22	0.22	0.19	0.07			0.08	

*As described in *Materials and Methods*, this parameter was maintained in the model without considering the P value.

relationship was observed between CHL_{ano} and the number of cholera cases. Upwelling occurs mainly along the coast of the Bay of Bengal, thus the five degree box yielded a significantly weakened coastal upwelling signal. As for Kolkata, SST was not retained in the model presumably because of the same reasons. The final model for Matlab is

$$y|\eta \sim \text{Po}(\mu, \sigma^2)$$

$$\log(\mu) = \eta = \beta_0 + \beta_1 I_{MAM} + \beta_2 I_{JJA} + \beta_3 I_{SON} + \beta_4 \log(1 + \text{chol}_{t-1}) + \beta_5 CHL_{t-1} \quad [2]$$

where coefficients are detailed in Table 1. Observed cholera case time series and the prediction of both the fitted model, and the fitted cross-validation model are displayed in Fig. 3C. The contrast of observed cholera cases against the prediction of the fitted models (Fig. 3D) shows that the cross-validation model tends to underestimate more of the peak cholera case values than the fitted model, with both models overestimating the low number of cholera cases. The pseudo R^2 value for the fitted model is equal to 71.46%.

Discussion

Environmental factors were found to be statistically significant in two different geographical locations of the Indian continent in directly influencing the dynamics of cholera epidemics. A relationship between the short time lag (one month), coincident environmental conditions, and cholera epidemics was observed. Interestingly, despite the geographical proximity of Kolkata and Matlab, the effect of the environmental variables examined in this study was clearly different. These regional differences strongly indicate an important effect of the local environment and local zooplankton populations on the dynamics of cholera epidemics.

Indeed for Kolkata, higher values of CHL_{ano} reflected the more intense algal blooms than normal that occurred and led to larger zooplankton populations that were comprised mainly of crustacean copepods, a natural aquatic host for *V. cholerae* (1, 8, 9). From the analyses of the Dhaka, Bangladesh data, it was concluded that the tidal intrusion of coastal water carrying plankton into inland water could initiate increased human contact with the cholera vibrio (14), because water used for daily hygiene, personal consumption, and religious rites (e.g., ablu-

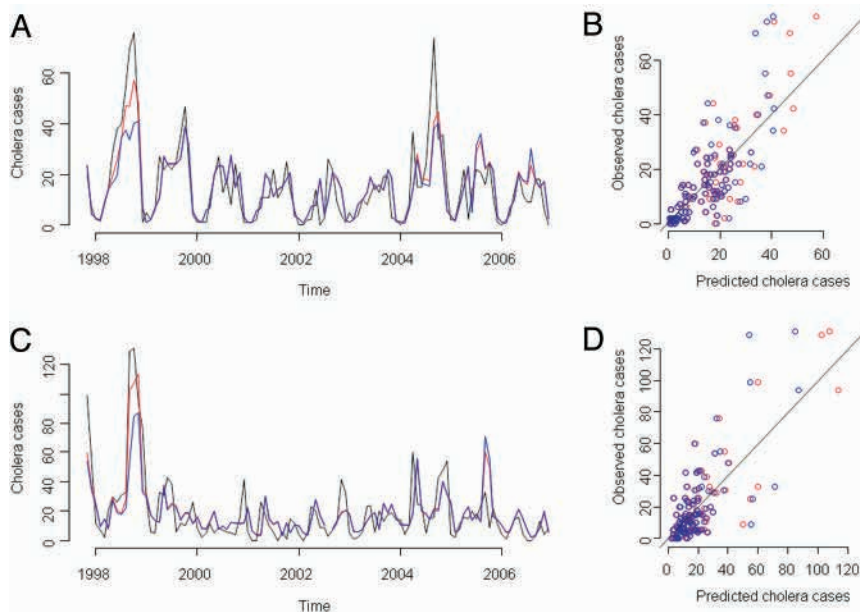


Fig. 3. Observed epidemiological data and prediction of fitted models. For Kolkata, (A) temporal dynamics of observed cholera cases, fitted model and cross-validation model shown in black, red and blue, respectively. (B) Scatterplot of observed cholera cases against (i) predicted cholera cases by fitted model in red circles, and (ii) predicted cholera cases by cross-validation model in blue circles. Black line represents perfect agreement between predicted and observed cases. For Matlab, C same as A. D same as B.

tions) in rural areas of Bangladesh and India is taken directly from local rivers or ponds essentially untreated (13, 23, 24). The relationship observed for PRE_{ano} similarly reflects the effect of unusually heavy precipitation influencing cholera transmission by feeding surface runoff into streams and rivers flooding the water supply (15, 16). It also can have a direct role in cholera dynamics by increasing nutrient runoff, inducing river enrichment responsible for local algal blooms (25, 26). During intense rainfall events, the tidal intrusion of coastal water carrying plankton into inland water influencing cholera transmission may be minimized by the increase of the river flows. We concluded that both factors are influencing cholera transmission independently.

For Matlab, the relationship between number of cholera cases and CHL_{ano} was as expected. Matlab comprises a densely populated cluster of villages in a flat, low altitude region representing a dense, natural hydrological system intersected by the Dhanagana River and having a strong tidal influence. The relative proximity of Matlab to the coastal region of the Bay of Bengal can explain both the significant relationship of CHL_{ano} with cholera and the one month lag for Matlab, because Matlab lies further inland than Kolkata.

It is evident that each location requires a different model because of local or regional specificity. While CHL was determined to be important in influencing the dynamics of cholera epidemics in both locations within the same month or with one month lag, a longer lead time was found to be necessary for the environmental factors to be useful in predicting epidemics of cholera and give health workers time to formulate plans, disseminate warnings and recommendations to the public. Nevertheless, even a short lead time, at the submonthly time scale, can provide sufficient warning so that precautionary measures can be taken to save lives. In this context, the robust results obtained in this study indicate that increasing the lead time for prediction in dynamic or statistical regional climate and/or ocean forecast models, will provide a valuable tool for public health purposes. A functional model for an early warning system will require finer temporal resolution of acquired data, particularly for Kolkata where the relationship appears to be submonthly although most likely a data-limitation issue at present. For practical applications of these models, environmental as well as epidemiological data need to be collected and compiled expediently to provide useful and reliable predictions of the onset, epidemics, and trends of cholera based on environmental variability. The environmental variables related to cholera dynamics in this study, rainfall and CHL, as well as predictable phenomena, such as the Madden-Julian Oscillation, El Niño-Southern Oscillation, and the more recently proposed Indian Ocean Dipole/Zonal mode (27–31), clearly point to the potential for prediction of cholera with a significant lead time. A simple statistical model presented here that incorporates only local environmental conditions, nevertheless, yielded significant statistical association between cholera and selected environmental factors.

Obviously, not all of the variance in the number of cholera cases in each region can be explained by this method alone, because cholera epidemics involve a complex and critical interplay of intrinsic dynamics with extrinsic drivers (20). For example, cholera is no longer a disease threat for developed countries, including the United States, even though the presence of *V. cholerae* O1 in the waters of the Chesapeake Bay and coastal states of the Gulf of Mexico has long been known (32–34). Because good sanitation is practiced and safe drinking water is available to the populations of the region, cholera epidemics no longer occur. However, *V. cholerae* does remain as a naturally occurring inhabitant year round in those aquatic environments, with the same spring and fall peaks in number of the cholera bacteria, and a similar relationship with its copepod host (32, 35).

The results of this study provide a foundation on which to build a predictive capacity for cholera epidemics, hence, an early warning system for enhancing public health measures, especially for developing countries and areas of the world undergoing social disruption or climate change. Better spatial resolutions of the satellite datasets as well as finer temporal resolution, i.e., ground based network stations, will improve our ability to predict cholera outbreaks. It will also allow a continued environmental data validation as well as alleviate the problem of missing satellite data because of clouds or other potential technical issues. Selected environmental factors serve effectively as indicators for cholera, but an integrative, mechanistic and interdisciplinary model combining satellite and ground observations will be required. The Aquarius (<http://aquarius.gsfc.nasa.gov/index.php>) satellite mission, designed to measure global sea surface salinity, to be launched in 2009, will provide additional useful information because salinity has a critical influence on the ecology of *V. cholerae* (15, 36–38).

Subseasonal-to-interannual time-scale operational forecast systems that employ statistical forecasting tools and combine local ecosystem, coastal, and ocean data, including SST, SSH, CHL, and zooplankton concentration, from mechanistic hydrodynamic and ecosystem modeling to analysis of climate parameters from coupled climate forecast models (rainfall, river runoff, air temperature, and humidity) may prove more useful for Kolkata, where time-resolved environmental parameters to obtain submonthly lead times are needed, compared with Bangladesh, where the environmental lead time appears to be longer.

A fully integrated model for cholera prediction that takes into account the demographic components of human populations exposed to endemic cholera and the complexity of cholera epidemiology, as well as climate, and the environment, ecology and the genomics of *V. cholerae* will continue to be a focus of our research. Interannual variability of cholera (15, 20, 39, 40) and the strong El Niño that occurred in 1998 were found to be associated with the largest number of cholera cases for both Kolkata and Matlab and offer challenging examples of cholera and climate interaction.

Materials and Methods

Data for Matlab, Bangladesh, and Kolkata, India, included in the analyses correspond to the monthly number of admitted patients for cholera symptoms individually confirmed by culture. The clinical specimens from which *V. cholerae* was isolated were from patients admitted either to the International Center for Diarrhoeal Diseases Research, Bangladesh (ICDDR, B) or to the Infectious Diseases Hospital of the National Institute of Cholera and Enteric Diseases (NICED) in Kolkata, India. Methods used for isolation and culture of *V. cholerae* have been reported elsewhere (41, 42). Additional computations detailed in [supporting information \(SI\) Text](#) showed no differences in using the monthly accumulation of cholera cases as a response variable in models instead of incidence.

Rainfall data used in the analyses were taken from the monthly merged satellite/gauge estimates of the Global Precipitation Climatology Project (GPCP) Version 2 (43). These data provide merged ocean/land estimates. Source of the monthly SSTs was Reynolds and Smith (44), generated from the NOAA Optimally Interpolated (v2) product provided by the National Climatic Data Center (www.ncdc.noaa.gov). CHL estimates were derived from the Sea-viewing Wide Field of View (SeaWiFS) sensor launched in 1997 (45), and provided by the NASA Goddard Distributed Active Archive Center (<http://daac.gsfc.nasa.gov>). CHL data are available by month from September, 1997 to the present. The spatial resolution of CHL and SST was a one degree grid and that for the rainfall data comprised a two-and-a-half degree grid. CHL and SST data were extracted from the measurements taken off the coast of the Bay of Bengal, whereas rainfall data (over land and ocean) were extracted coincident with the study locations (see Fig. 1). To evaluate potential differences at local or regional scale in the relationships between cholera cases and environmental variables, we also computed a five degree box-average for the environmental variables. For CHL and SST, it corresponds to the mean computed over a five by five square of data at one degree resolution, i.e., a mean of twenty five pixels (Fig. 1). For PRECIP, it corresponds to a parameter mean computed

over a five by five square of data at two-and-half degree grid resolution, i.e., a mean of four pixels (Fig. 1). Because the three environmental datasets show a strong seasonal pattern (Fig. S1), anomalies were computed to remove the effect of the annual cycle, which can result in spurious relationships between cotrending variables. The anomalies were constructed by calculating the climatological mean for each month and subtracting these means from each corresponding month from the original data.

Environmental factors for the months preceding the cholera outbreaks proved to be important. That is, for CHL, phytoplankton biomass increases followed by an increase in the zooplankton population, the latter harboring *V. cholerae*, both associated with an increase in SST. This process, however, is not instantaneous and a lag time of one to two months was used for an increase in the *V. cholerae* population after the increase in SST and CHL had occurred. A time lag after precipitation is mechanistically justified because precipitation during months preceding a cholera outbreak feeds streams and rivers with surface runoff, thereby playing its unique role in the initiation of cholera outbreaks, especially when flooding occurs (15, 16). The chain of these climate events and their lead times provide the basis for prediction of cholera outbreaks, and were exploited to demonstrate feasibility of prediction, hence an early warning system.

There is a mechanistic basis for expecting up to two months lag for CHL, SST, and rainfall peaks in these drivers of cholera. A mechanistic approach allows translation of an empirical predictive understanding into quantitative prediction for cholera. To exploit the process empirically, variables included in the model were taken from both the coincident month and a one-month lag (t-1). CHL data also included a two-month lag (t-2). Indicator variables for quarterly means of cholera cases representing the annual cycle were included in the model as well as log number of cholera cases for the previous month. The latter is analogous to the differencing technique commonly used in an ordinary least squares linear regression (adapted for generalized linear models on a log scale), removing the "persistence" effect arising from density-dependence in cholera transmission (19). Both variables were included as fixed parameters in the models to remove residual autocorrelation.

A generalized linear model (GLM) with a Poisson distribution and a log link was used to model the data (46). As is common with such data, strong over-dispersion was apparent and was accommodated by using a quasi-Poisson GLM fitted using the R software package. This model estimates the degree of overdispersion and inflates standard errors accordingly. For the quasi-Poisson model, the constraint of equal mean and variance is relaxed so that the variance of the response is related to the mean μ by

$$\text{Var}(Y) = \sigma^2 \mu \quad [3]$$

where σ^2 is the (constant) dispersion parameter. Our model for counts in the presence of overdispersion can thus be written as

$$\begin{aligned} y|\eta &\sim \text{Po}(\mu, \sigma^2) \\ \log(\mu) &= \eta = \beta_0 + \beta_1 I_{\text{MAM}} + \beta_2 I_{\text{JJA}} + \beta_3 I_{\text{SON}} \\ &+ \beta_4 \log(1 + \text{chol}_{t-1}) + \beta_5 \text{CHL}_t \\ &+ \beta_6 \text{CHL}_{t-1} + \beta_7 \text{CHL}_{t-2} + \beta_8 \text{SST}_t \\ &+ \beta_9 \text{SST}_{t-1} + \beta_{10} \text{Rain}_t + \beta_{11} \text{Rain}_{t-1}, \end{aligned} \quad [4]$$

where y represents the observed counts, η is the fitted model, Po represents the Poisson distribution, the β_j are the model parameters, and I_{MAM} , I_{JJA} , and I_{SON} represent the quarterly mean of cholera case index for March–April–May, June–July–August, and September–October–November, respectively and were used to remove any remaining annual cycle. Hypotheses of environmental factors driving cholera dynamics in the two locations was tested by using a 5% rejection range for significant variables. To evaluate the models computed on the whole dataset, cross-validations predictions were also made from the model by predicting cholera cases for each year using the final model structure, i.e., with only significant parameters, but estimating coefficients on the data set without data for the year under consideration. Then we assembled each predicted year to construct the cross-validation predictions for the whole period. The pseudo R^2 proposed by (47) was used as a model diagnostic estimate adapted for quasi-Poisson model. Like the estimate of R^2 commonly used for ordinary least squares linear regression, this statistical can be interpreted as the percentage of variability explained by the model.

SI. Further information is available in *SI Text* and *Fig. S2*.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank the donor countries and agencies that provide unrestricted support to the International Centre for Diarrhoeal Disease Research, Bangladesh, for its operation and research; and the three referees for their constructive remarks and useful comments. This work was supported by National Oceanic and Atmospheric Administration Grant S0660009, Oceans and Human Health Initiative, and National Institutes of Health Grant 1 R01 AI39129.

- Colwell RR (1996) Global climate and infectious disease: The cholera paradigm. *Science* 274:2025–2031.
- Snow J (1855) *On the Mode of Communication of Cholera* (J. Churchill, London) 2nd Ed, pp 1–162.
- Johnson S (2006) *The Ghost Map: The Story of London's Most Terrifying Epidemic—And How It Changed Science, Cities, and the Modern World* (Riverhead Books, New York) p 320.
- Colwell RR, Kaper J, Joseph SW (1977) *Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, and other vibrios: Occurrence and distribution in Chesapeake Bay* *Science* 198:394–396.
- Huq A, et al. (1983) Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. *Appl Environ Microbiol* 45:275–283.
- Islam MS, Drasar BS, Sack RB (1994) The aquatic flora and fauna as reservoirs of *Vibrio cholerae*: A review. *J Diarr Dis Res* 12:87–96.
- Kaper JB, Morris JG, Jr, Levine MM (1995) Cholera. *Clin Microbiol Rev* 8:48–86.
- Nalin DR, Daya V, Reid A, Levine MM, Cisneros L (1979) Adsorption and growth of *Vibrio cholerae* on chitin. *Infect Immun* 25:768–770.
- Rawlings TK, Ruiz GM, Colwell RR (2007) Association of *Vibrio cholerae* O1 El Tor and O139 Bengal with the copepods *Acartia tonsa* and *Eurytemora affinis*. *Appl Environ Microbiol* 73:7926–7933.
- Colwell RR, Spira WM (1992) The ecology of *Vibrio cholera*. *Cholera*, eds Barua D, Greenough WB (Plenum Medical Book Co., New York), 3rd Ed, pp 107–127.
- Cash RA, et al. (1974) Response of man to infection with *Vibrio cholerae*. I. Clinical, serologic, and bacteriologic responses to a known inoculum. *J Infect Dis* 129:45–52.
- Huq A, et al. (1996) A simple filtration method to remove plankton-associated *Vibrio cholerae* in raw water supplies in developing countries. *Appl Environ Microbiol* 62:2508–2512.
- Colwell RR, et al. (2003) Reduction of cholera in Bangladeshi villages by simple filtration. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:1051–1055.
- Lobitz B, et al. (2000) Climate and infectious disease: Use of remote sensing for detection of *Vibrio cholerae* by indirect measurement. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:1438–1443.
- Lipp EK, Huq A, Colwell RR (2002) Effects of global climate on infectious disease: The cholera model. *Clin Microbiol Rev* 15:757–770.
- Pascual M, Bouma MJ, Dobson AP (2002) Cholera and climate: Revisiting the quantitative evidence. *Microbes Infect* 4:237–245.
- Ruiz-Moreno D, Pascual M, Bouma M, Dobson A, Cash B (2007) Cholera seasonality in Madras (1901–1940): Dual role for rainfall in endemic and epidemic regions. *Ecohealth* 4:52–62.
- Bouma MJ, Pascual M (2001) Seasonal and interannual cycles of endemic cholera in Bengal 1891–1940 in relation to climate and geography. *Hydrobiologia* 460:147–156.
- Pascual M, Rodo X, Ellner SP, Colwell R, Bouma MJ (2000) Cholera dynamics and El Niño–Southern Oscillation. *Science* 289:1766–1769.
- Koelle K, Rodo X, Pascual M, Yunus M, Mostafa G (2005) Refractory periods and climate forcing in cholera dynamics. *Nature* 436:696–700.
- Mendelsohn J, Dawson T (2007) Climate and cholera in KwaZulu-Natal, South Africa: The role of environmental factors and implications for epidemic preparedness. *Int J Hyg Environ Health* 211:156–162.
- Goswami BN, Venugopal V, Sengupta D, Madhusoodanan MS, Xavier PK (2006) Increasing trend of extreme rain events over India in a warming environment. *Science* 314:1442–1445.
- Huq A, et al. (2005) Critical factors influencing the occurrence of *Vibrio cholerae* in the environment of Bangladesh. *Appl Environ Microbiol* 71:4645–4654.
- Sack RB, et al. (2003) A 4-year study of the epidemiology of *Vibrio cholerae* in four rural areas of Bangladesh. *J Infect Dis* 187:96–101.
- Rao DVS (1973) Effects of environmental perturbations on short-term phytoplankton production off Lawsons-Bay, a tropical coastal embayment. *Hydrobiologia* 43:77–91.
- Valsaraj CP, Rao VNR (1994) Nitrogen limitation in the tropical waters of the Bay of Bengal. *Hydrobiologia* 286:139–148.
- Chen D, Cane MA (2008) El Niño prediction and predictability. *J Computational Phys* 227:3625–3640.
- Saji NH, Goswami BN, Vinayachandran PN, Yamagata T (1999) A dipole mode in the tropical Indian Ocean. *Nature* 401:360–363.
- Webster PJ, Moore AM, Loschnigg JP, Leben RR (1999) Coupled ocean-atmosphere dynamics in the Indian Ocean during 1997–98. *Nature* 401:356–360.
- Murtugudde R, McCreary JP, Busalacchi AJ (2000) Oceanic processes associated with anomalous events in the Indian Ocean with relevance to 1997–1998. *J Geophys Res Oceans* 105:3295–3306.
- Waliser D, et al. (2006) The experimental MJO prediction project. *Bull Amer Meteor Soc* 87:425–431.
- Heidelberg JF, Heidelberg KB, Colwell RR (2002) Seasonality of Chesapeake Bay bacterioplankton species. *Appl Environ Microbiol* 68:5488–5497.

33. Louis VR, et al. (2003) Predictability of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol* 69:2773–2785.
34. Castaneda Chavez Mdel R, Pardo Sedas V, Orrantia Borunda E, Lango Reynoso F (2005) Influence of water temperature and salinity on seasonal occurrences of *Vibrio cholerae* and enteric bacteria in oyster-producing areas of Veracruz, Mexico. *Mar Pollut Bull* 50:1641–1648.
35. Heidelberg JF, Heidelberg KB, Colwell RR (2002) Bacteria of the gamma-subclass Proteobacteria associated with zooplankton in Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol* 68:5498–5507.
36. Singleton FL, Attwell R, Jangi S, Colwell RR (1982) Effects of temperature and salinity on *Vibrio cholerae* growth. *Appl Environ Microbiol* 44:1047–1058.
37. Huq A, West PA, Small EB, Huq MI, Colwell RR (1984) Influence of water temperature, salinity, and pH on survival and growth of toxigenic *Vibrio cholerae* serovar O1 associated with live copepods in a laboratory microcosms. *Appl Environ Microbiol* 48:420–424.
38. Colwell RR (2000) Viable but nonculturable bacteria: A survival strategy. *J Infect Chemother* 6:121–125.
39. Constantin de Magny G, Guégan JF, Petit M, Cazelles B (2007) Regional-scale climate-variability synchrony of cholera epidemics in West Africa. *BMC Infect Dis* 7:20.
40. Constantin de Magny G, Cazelles B, Guégan JF (2006) The cholera threat to humans in Ghana is influenced by both global and regional climatic variability. *EcoHealth* 3:223–231.
41. Basu A, et al. (2000) *Vibrio cholerae* O139 in Calcutta, 1992–1998: Incidence, antibiograms, and genotypes. *Emerg Infect Dis* 6:139–147.
42. Longini IM, Jr, et al. (2002) Epidemic and endemic cholera trends over a 33-year period in Bangladesh. *J Infect Dis* 186:246–251.
43. Adler RF, et al. (2003) The version-2 global precipitation climatology project (GPCP) monthly precipitation analysis (1979–Present). *J Hydrometeorol* 4:1147–1167.
44. Reynolds RW, Rayner NA, Smith TM, Stokes DC, Wang WQ (2002) An improved in situ and satellite SST analysis for climate. *J Climate* 15:1609–1625.
45. McClain CR, et al. (1998) Science quality SeaWiFS data for global biosphere research. *Sea Techn* 39:10–16.
46. McCullagh P, Nelder JA (1998) *Generalized linear models* (Chapman & Hall/CRC, Boca Raton) 2nd Ed, pp xix, pp 511 .
47. Nagelkerke NJD (1991) A note on a general definition of the coefficient of determination. *Biometrika* 78:691–692.
48. GLOBE Task Team and others (Hastings DA, Paula K. Dunbar, Gerald M. Elphinstone, Mark Bootz, Hiroshi Murakami, Hiroshi Maruyama, Hiroshi Masaharu, Peter Holland, John Payne, Nevin A. Bryant, Thomas L. Logan, J.-P. Muller, Gunter Schreier, and John S. MacDonald) (1999) The Global Land One-kilometer Base Elevation (GLOBE) Digital Elevation Model, Version 1.0. (National Oceanic and Atmospheric Administration, National Geophysical Data Center).

Mobile phone data highlights the role of mass gatherings in the spreading of cholera outbreaks

Flavio Finger^a, Tina Genolet^a, Lorenzo Mari^b, Guillaume Constantin de Magny^c, Noël Magloire Manga^d, Andrea Rinaldo^{a,e,1}, and Enrico Bertuzzo^{a,1}

^aLaboratory of Ecohydrology, École Polytechnique Fédérale Lausanne, 1015 Lausanne, Switzerland; ^bDipartimento di Elettronica, Informazione e Bioingegneria, Politecnico di Milano, 20133 Milano, Italy; ^cMaladies Infectieuses et Vecteurs: Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle, Institute of Research for Development, 64501 Montpellier, France; ^dService des Maladies Infectieuses et Tropicales de l'Hôpital de la Paix, Unité de Formation et de Recherche en Sciences de la Santé, Université Assane Seck de Ziguinchor, 27000 Ziguinchor, Senegal; and ^eDipartimento dell'Ingegneria Civile, Edile ed Ambientale, Università di Padova, 35131 Padova, Italy

Contributed by Andrea Rinaldo, April 5, 2016 (sent for review November 12, 2015; reviewed by Vittoria Colizza and Aaron A. King)

The spatiotemporal evolution of human mobility and the related fluctuations of population density are known to be key drivers of the dynamics of infectious disease outbreaks. These factors are particularly relevant in the case of mass gatherings, which may act as hotspots of disease transmission and spread. Understanding these dynamics, however, is usually limited by the lack of accurate data, especially in developing countries. Mobile phone call data provide a new, first-order source of information that allows the tracking of the evolution of mobility fluxes with high resolution in space and time. Here, we analyze a dataset of mobile phone records of ~150,000 users in Senegal to extract human mobility fluxes and directly incorporate them into a spatially explicit, dynamic epidemiological framework. Our model, which also takes into account other drivers of disease transmission such as rainfall, is applied to the 2005 cholera outbreak in Senegal, which totaled more than 30,000 reported cases. Our findings highlight the major influence that a mass gathering, which took place during the initial phase of the outbreak, had on the course of the epidemic. Such an effect could not be explained by classic, static approaches describing human mobility. Model results also show how concentrated efforts toward disease control in a transmission hotspot could have an important effect on the large-scale progression of an outbreak.

mobile phone call data | cholera epidemics | spatially explicit epidemiological models | waterborne disease

Human mobility is undisputedly one of the main spreading mechanisms of infectious diseases. Understanding the propagation of an epidemic in a population at any spatial scale of analysis inevitably calls for the understanding of the underlying mobility patterns (1–6). Researchers have commonly focused on infectious diseases transmitted through direct contact between persons (e.g., refs. 1–4). The key role of human mobility has only recently been acknowledged also for water-related diseases (where transmission is mediated by water, which influences the habitat's suitability for the pathogen and/or its possible intermediate hosts), as highlighted by the development and widespread application of spatially explicit epidemiological models (7–10). Such models translate our comprehension of the mechanisms driving disease transmission [such as rainfall (10)] and spread [such as hydrologic transport of pathogens (8, 11) besides human mobility] into a simplified mathematical form. They may be used not only to predict the spatiotemporal pattern of the spread of a disease (12–14) but also to test alternative model implementations (15), or to evaluate the effects of various interventions on disease dynamics (16–18).

To include population movement in epidemiological models, researchers often rely on approaches such as gravity (e.g., ref. 19) or radiation (20) models, where the fluxes between any two sites are expressed as a function of their relative distance and the embedded population distribution. Such models have primarily been developed and tested for countries in the western world, where transportation networks are dense and efficient, supraregional travel is cheap, and regular commuting patterns are predominant. Lack

of data has so far frustrated a thorough validation of such models in the developing world, where mobility drivers and patterns may be different than those of western countries. In some applications, the absence of information about mobility fluxes has been circumvented by inferring the parameters of the mobility model directly from epidemiological data (9, 10, 17). This, however, contributes to increasing uncertainty in model identification because many different factors concur in the spreading of an epidemic. Another important shortcoming of current mobility models is their inability to adapt to seasonal and subseasonal changes in mobility patterns.

With the increasing diffusion of mobile phones, which have become very widely used even in developing countries (21, 22), a new source of information about human mobility has emerged. Each time a phone emits or receives a call or text message, the antenna that the cell phone is logged into is registered by the service provider, along with the time of the event (23). It is thus possible to track the movement of cell phone users as they advance from antenna to antenna. Suitably aggregated and properly anonymized to prevent privacy issues (24), a sample of this data can be used to estimate fluxes of people between areas in a region by assigning a set of antennas to each geographical area in the study domain (e.g., based on administrative boundaries). The resolution in time can be as high as the typical frequency of calls allows, whereas the spatial resolution is limited only by the typical distance between two antennas (23). Using mobile phone records of a sufficiently large number of users, one can thus estimate human mobility fluxes with high accuracy, including spatiotemporal

Significance

Big data and, in particular, mobile phone data are expected to revolutionize epidemiology, yet their full potential is still untapped. Here, we take a significant step forward by developing an epidemiological model that accounts for the spatiotemporal patterns of human mobility derived by directly tracking properly anonymized mobile phone users. Such data allow us to investigate, with an unprecedented level of detail, the effect that mass gatherings can have on the spreading of waterborne diseases like cholera. Identifying and understanding transmission hotspots opens the way to the implementation of novel disease control strategies.

Author contributions: F.F., L.M., A.R., and E.B. designed research; F.F., T.G., and E.B. performed research; F.F., G.C.d.M., and N.M.M. analyzed data; and F.F., L.M., A.R., and E.B. wrote the paper.

Reviewers: V.C., INSERM; and A.A.K., University of Michigan.

The authors declare no conflict of interest.

Freely available online through the PNAS open access option.

¹To whom correspondence may be addressed. Email: andrea.rinaldo@epfl.ch or enrico.bertuzzo@epfl.ch.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1522305113/-DCSupplemental.

variability across a variety of scales (24), and without resorting to any particular model.

A number of recent studies focus on the use of mobile phone data to extract human mobility patterns in developing countries at different scales in space and time (25–27). Others compare the movement patterns extracted from mobile records to traditional data sources such as censuses (28) and surveys (29). Several studies deal with the comparison with human mobility models (21, 30). In the context of infectious disease spread in developing countries, this new source of information enables previously unseen kinds of analyses. Examples are the derivation of magnitude and destination of population fluxes following a sudden outbreak (25, 31), and the quantification of the importance of human mobility and its seasonal variations on the spread of disease in terms of increased outbreak risk in and infectious pressure on connected areas (5, 30, 32–34).

Mass gatherings, such as pilgrimages, sport events, or music festivals, can be critical in the spread of infectious diseases via various transmission routes (35, 36). When it comes to orofecally transmitted diseases, such as shigellosis (37) or cholera (38, 39), insufficient safe drinking water supply and sanitary infrastructure related to overcrowding are often the main causes of local disease outbreaks and subsequent spread by homecoming infected attendees. To model the effect of mass gatherings, one needs to account for the spatiotemporal dynamics of human mobility and the associated short-term fluctuations of population distribution. Mobility models and static data sources, such as censuses or surveys, are therefore unsuitable. Conversely, mobile phone records contain all required information at the desired timescales and thus represent an excellent new data source for epidemiological models.

Here, we study the cholera epidemic that spread throughout Senegal in 2005. A distinctive feature of this outbreak was its sudden flare. It started from the order of magnitude of hundreds of cases per week during the first 3 mo of the year, localized in the region of Diourbel and surroundings, and abruptly jumped to thousands of cases at the end of March, rapidly spreading to 10 out of 11 regions of the country, with over 27,000 reported cases (Table 1). Anecdotal evidence (38, 40, 41) suggests that this first peak was related to a religious pilgrimage, the Grand Magal de Touba (GMdT), that took place in late March when an estimated 3 million pilgrims traveled to Touba in the region of Diourbel. During later stages, the outbreak evolved, showing distinct dynamics in different regions of the country, rainfall and the associated floods being important drivers, especially in the capital city of Dakar (39).

Here we develop a spatially explicit, fully mechanistic model for the 2005 Senegal cholera outbreak, based on previous work (10, 14, 42). In addition to human mobility, we take into account rainfall as an important driver of disease transmission (10, 39), and we incorporate the effect of overcrowding by assuming an increase in exposure and contamination rates caused by unusually high density of people, and the related pressure on water and sanitation infrastructures (*Materials and Methods*). Daily population fluxes between the 123 arrondissements of Senegal (Fig. S1A) are estimated from a dataset of roughly 150,000 randomly selected mobile phone users tracked during the entire year 2013 (*Materials and Methods* and ref. 43). We specifically aim at testing the role played by human mobility and mass gatherings in the spread of a cholera epidemic, with implications for disease control.

Results

Fig 1 shows the evolution of the estimated number of mobile people (i.e., people having left their home arrondissement on a given day) throughout the year 2013. Seasonal fluctuations, weekly patterns, and sudden peaks can clearly be identified. The latter correspond to mass gatherings, most notably the GMdT [which took place twice in 2013 (*Materials and Methods*)], and during which the number of people traveling outside their home

Table 1. Regions of Senegal (as of 2005) with their population (2005 estimates), total number of reported cases during the epidemic, cumulative incidence, and mobile phone sample size (relative to 2013 population)

Region	Population, ×10 ⁶	Cases	Incidence, ‰	Sample size, ‰
Dakar	2.62	6,573	2.51	22.64
Diourbel	1.22	11,772	9.61	4.11
Fatick	0.64	1,928	3.00	4.63
Kaolack	1.06	1,014	0.96	5.19
Kolda	0.89	57	0.06	3.86
Louga	0.68	1,806	2.64	5.43
Matam	0.50	0	0	7.12
Saint-Louis	0.75	1,653	2.20	8.99
Tambacounda	0.58	87	0.15	6.11
Thiès	1.28	2,515	1.97	9.60
Ziguinchor	0.31	124	0.40	9.79

arrondissement almost doubles with respect to an average day. Fig. 1B shows the estimated fraction of people present in every arrondissement of Senegal during the GMdT. Major differences can be noted with respect to the yearly average (Fig. 1C). People traveled to Touba from all over the country, and the estimated number of people present during the GMdT in the arrondissement where the city is located was nearly 6 times its usual population.

Model results and estimated uncertainties of the best performing model are shown in Fig. 2 (total cases and the regions most severely hit) and Fig. S2 (all regions). The values of the calibrated parameters are reported in Table S1. The model accurately reproduces the important peak of cases in Diourbel coinciding with the GMdT (coefficient of determination between modeled and reported weekly cases $R^2 = 0.78$ in the region of Diourbel) as well as the spread of the disease throughout Senegal by pilgrims returning to their homes. The second peak, most probably related to the rainy season, is also well reproduced ($R^2 = 0.72$ in the region of Dakar). The overall value of R^2 , computed using all data points in all regions, is equal to 0.77. Fig. 3 shows the spatial distribution of cases in the country during the GMdT, and during two other key periods of the outbreak according to the reported cases and to our model.

A comparison of different models (*Supporting Information* and Table S2) shows that the ones including both human mobility fluxes between arrondissements and the effect of overcrowding outperform other models. Including either of the two mechanisms individually, however, is not sufficient to reproduce all features of the epidemic correctly (Fig. S3). In addition, a model adopting a calibrated gravity model performs poorly compared with models using mobile phone data to estimate human mobility. The inclusion of rainfall as a driver of the disease enables our model to capture the autumn peak in addition to the one related to the GMdT (Table S2 and Fig. S3). Finally, it appears that both the correction of bias in mobile phone ownership and the calibration of the initial number of infected in Diourbel improve the model performance.

Potential effects of localized interventions in Touba during the GMdT, such as improving sanitation and access to clean drinking water (*Materials and Methods*), are reported in Fig. 2. Under the assumptions of our model, these actions could have led to considerably lower numbers of new cases during the pilgrimage as well as all over the country during later stages of the outbreak (*Supporting Information*). For instance, a reduction of the rates of exposure and contamination by 10% (20%) in Touba during the GMdT could have led to a reduction of the total number of cases of 23% (38%) in Diourbel and 18% (34%) in the whole country (Fig. S4 and Table S3).

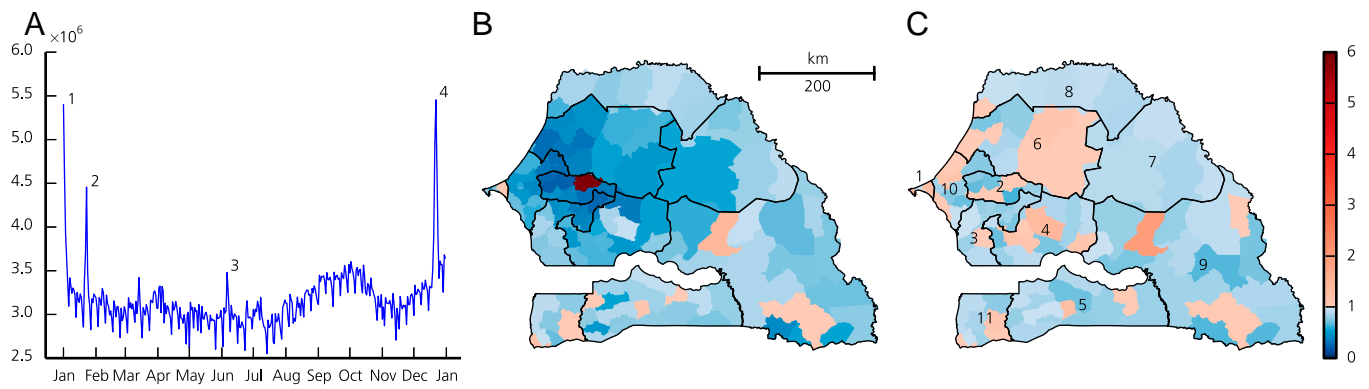


Fig. 1. (A) Daily evolution of the total number of moving people (i.e., people leaving their home arrondissement) throughout 2013 estimated from mobile phone records. Numbered peaks correspond to the following mass gatherings: GMdT (1 and 4), Gamou de Tivaouane (2), and Magal de Kazu Rajab (3). (B and C) Number of people present in each arrondissement on December 22, 2013, during the GMdT (B) and averaged over the year (C) divided by the number of people living there. Regions (according to the 2005 subdivision; see *Supporting Information*) are numbered as follows: Dakar (1), Diourbel (2), Fatick (3), Kaolack (4), Kolda (5), Louga (6), Matam (7), Saint-Louis (8), Tambacounda (9), Thiès (10), and Ziguinchor (11).

Discussion

The case study of the 2005 Senegal cholera outbreak illustrates the crucial role played by human mobility (and its spatiotemporal variability) in a cholera epidemic whose sudden flare and subsequent spread can be explained by the repercussions of a mass gathering that took place during the initial phase of the outbreak. Indeed, the temporary high density of people in Touba during the pilgrimage and the related pressure on water, sanitation, and health infrastructure are likely to have created favorable conditions for cholera transmission. After the initial peak, homecoming infected pilgrims spread the disease throughout vast parts of the country. No approach to quantify human mobility other than mobile phone data analysis could have provided the required level of detail to capture such phenomena. In addition, the comparison of different models shows that the actual epidemiological dynamic cannot be reproduced accurately without including mobility fluxes and the related effect of overcrowding, nor does the use of a gravity model lead to acceptable results.

The high temporal and spatial resolution of the mobility patterns extracted from mobile phone data allows identification of disease transmission hotspots suggesting intervention strategies to control the evolution of an epidemic, whose expected benefits can be evaluated using epidemiological models. In our case study, concentrated effort to reduce the transmission rate at the mass gathering site, for example, providing safe drinking water or sanitation for a higher number of people, could have had important effects, preventing numerous infections not only locally but throughout the whole country (*Supporting Information*).

Although our model has a high explanatory power at the whole-country scale and in regions with high cumulative incidence, it does not perform equally well in less affected regions. Although the timing of disease introduction and rainfall-related autumn peaks is well captured in all regions, the simulated temporal evolution of the number of cases deviates from the reported numbers of cases, especially in some of the regions less impacted by the disease. Possible reasons for this include higher influence

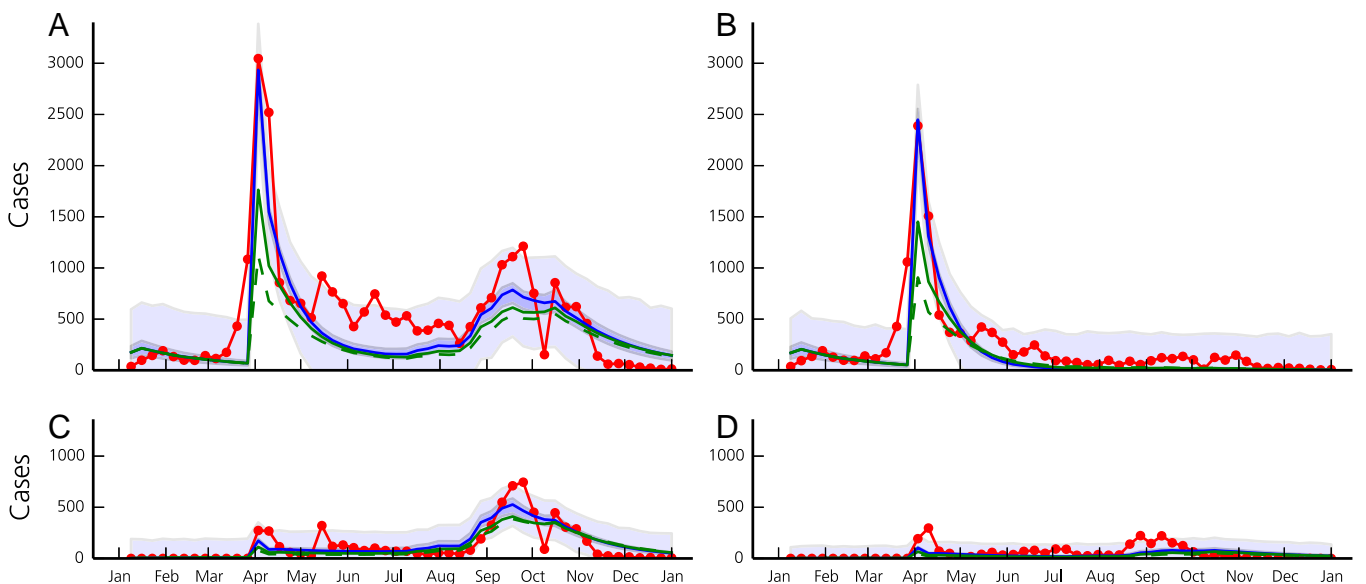


Fig. 2. Reported (red line) and modeled number of new cases per week for the entire country of Senegal (A), and for the regions of Diourbel (B), Dakar (C), and Thiès (D). Blue lines correspond to runs of the model (Eqs. 1–4) with the best posterior parameter set. Shaded bands correspond the 2.5–97.5 percentiles of the uncertainty related to parameter estimation (dark blue) and of the total uncertainty assuming Gaussian, homoscedastic error (light blue). Modeled cases under the assumption of a 10% (solid green line) and 20% (dashed green line) reduction in transmission in Touba during the GMdT are also shown.

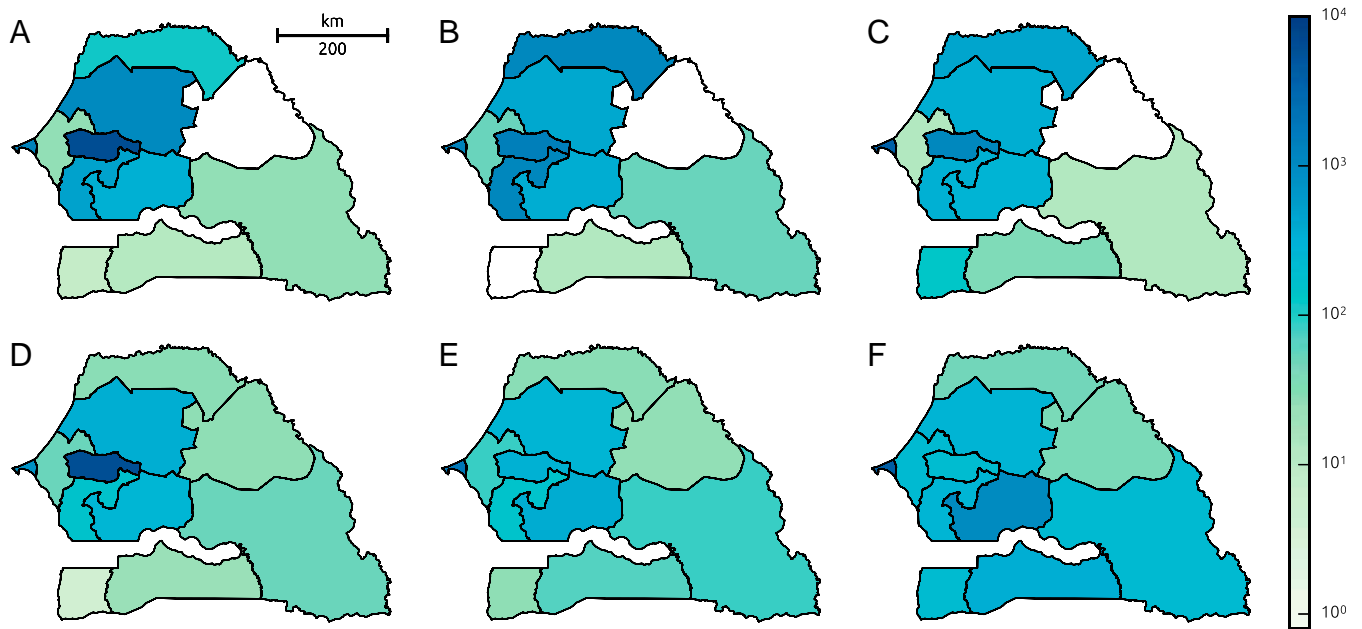


Fig. 3. Spatial distribution of reported (A–C) and modeled (D–F) cases from March 28 to May 29, the first weeks after the GMdT (A and D), from June 30 to September 4 (B and E), and from September 5 to December 31 (C and F).

of demographic stochasticity when the number of infected is low (*Supporting Information*), but also biased case reporting and/or identification (39) in regions with lower numbers of cases or with low population density (e.g., Matam). Also, one should consider that our likelihood formulation emphasizes peak values because it includes a square error term (*Supporting Information*).

Even if mobile phone data provide an excellent source of information about human mobility, several downsides still exist. One of them is the strong assumptions (*Materials and Methods* and ref. 34) made when translating mobile phone records to human mobility patterns, especially considering that they are difficult to validate due to the lack of alternative data sources. Studies comparing different methods and their underlying assumptions would be necessary to determine the sensitivity of the resulting mobility patterns. In addition, a potential source of inaccuracy in the analysis of mobile phone data is the possible presence of a bias in device ownership. A Kenya-based case study (44) has shown that mobile phone owners are more likely to be wealthy, male, and well educated, and that a bias exists between urban and rural populations. Urbanites with higher incomes tend to travel more often and farther, leading to overestimations of frequency and distance of trips (45). In our study, this effect was at least partially addressed by the introduction of a parameter (*Materials and Methods*) accounting for the underrepresentation of people staying at their home node. The values taken by this parameter during calibration might indeed indicate the presence of a bias, but might also be due to the fact that long-distance human mobility has played a major role in the propagation of the outbreak only during the pilgrimage, whereas local factors, such as precipitation and flooding, might have been more important in later stages. Additional sources of bias could arise from the fact that not all social classes are equally represented among the pilgrims (46), as well as from the uneven coverage of the mobile phone network between different areas of the country.

The reconstruction of the 2005 mobility matrix from that of 2013 (*Materials and Methods*) is based on the implicit assumption that general mobility patterns on relevant scales did not change significantly between the two years. Although several ways of reconstructing the 2005 mobility matrix have been compared (*Supporting Information*), their validity cannot be verified, due to the lack of alternative data sources. Among numerous factors that might have

influenced mobility patterns is the cholera outbreak itself, which might have led to behavioral change of individuals in 2005, in turn affecting the disease dynamics (3, 42, 47).

In conclusion, we demonstrate that mobile phone records allow for an accurate quantification of spatiotemporal fluctuations in human mobility, whether short term, seasonal, or during rare events such as mass gatherings. The resulting mobility patterns allow for a deeper understanding of epidemiological dynamics. Inclusion in epidemiological models is straightforward and may lead to higher accuracy with respect to other approaches, as human movement patterns can be directly derived from data rather than inferred from models (e.g., gravity or radiation).

Materials and Methods

Mobile Phone Data and Inference of Human Mobility Patterns. Human mobility has been estimated from a dataset containing the locations of calls and text messages (hereafter calls) made by 146,352 randomly selected users throughout the year 2013 at arrondissement level (Fig. 1 and Table 1). The dataset has been temporarily released by an important Senegalese mobile phone provider, for the D4D-Senegal challenge (43) and can no longer be legally accessed. A record in the dataset consists of an anonymous user identification, a time stamp, and the arrondissement where the call was made. First the home of each user, e.g., the arrondissement where the most calls were made during night hours (1900 to 0700 hours), was determined. Then, for every day t , the quantity $Q_{ij}(t)$ was computed as the number of calls made while in arrondissement j by users with home node i divided by the total number of calls made by users with home node i . Under the assumption that the number of phone calls made by a user while in arrondissement j is proportional to the time spent there, the value $Q_{ij}(t)$ represents the community-level average fraction of time that users living in arrondissement i spend in arrondissement j during day t . $Q_{ij}(t)$ thus represent the fraction of time spent at the home arrondissement (34). The quantity $Q_{ij}(t)$ is provided (*Datasets S1 and S2*) to ensure the reproducibility of the results only. For any other use, a request should be submitted to Orange/Sonatel.

As the Islamic calendar is based on a lunar scheme with 354 d per year, the dates of the pilgrimages change within every Gregorian year. The GMdT, for instance, took place twice in 2013, on January 1 and December 22, whereas, in 2005, it was held just once, on March 29. To develop a model for the 2005 cholera outbreak, it was thus necessary to reconstruct the 2005 mobility matrix accordingly. For the purpose of this study, we averaged the human mobility matrix throughout 2013, excluding only the periods of the two occurrences of the GMdT. We used the resulting mobility matrix for all days in

2005, except for the period of the GMdT (March 29 ± 3 d), which, in turn, was assigned the mobility of the December 2013 event. Alternative ways of reconstructing the mobility matrix of 2005 from that of 2013, also accounting for seasonal components in the mobility and/or for other pilgrimages, have been tested but were not retained in model selection (*Supporting Information*, Fig. S1C, and Table S4).

Spatially Explicit Epidemiological Model. The spatially explicit epidemiological model used herein builds on previous work (10, 14, 16, 42). The model domain is the country of Senegal, each *arrondissement* (Fig. S1A, $N = 123$) being a node i with population H_i (*Supporting Information*). The population of each node i is subdivided into three compartments, namely susceptibles S_i , infected I_i , and recovered R_i . Every node is considered to have an ambient bacterial concentration B_i of *Vibrio cholerae*. We thus get the following set of differential equations describing the evolution of $4 \times N$ state variables (terms and parameters of the equations will be explained hereafter):

$$\frac{dS_i}{dt} = \mu(H_i - S_i) - \mathcal{O}_i(t)\mathcal{F}_i(t)S_i + \rho R_i \quad [1]$$

$$\frac{dI_i}{dt} = \sigma \mathcal{O}_i(t)\mathcal{F}_i(t)S_i - (\gamma + \mu + \alpha)I_i \quad [2]$$

$$\frac{dR_i}{dt} = \gamma I_i + (1 - \sigma)\beta_i(t)\mathcal{O}_i(t)\mathcal{F}_i(t)S_i - (\rho + \mu)R_i \quad [3]$$

$$\frac{dB_i}{dt} = -\mu_B B_i + \frac{\rho}{aH_i} [1 + \lambda J_i(t)]\mathcal{O}_i(t)\mathcal{G}_i(t) \quad [4]$$

where

$$\mathcal{O}_i(t) = \exp\left(\frac{\omega}{H_i} \sum_{j=1}^N M_{ij}(t)H_j\right) \quad [5]$$

$$\mathcal{F}_i(t) = \beta \sum_{j=1}^N M_{ij}(t) \frac{B_j}{K + B_j} \quad [6]$$

$$\mathcal{G}_i(t) = \sum_{j=1}^N M_{ij}(t)I_j. \quad [7]$$

The population is assumed to be in demographic equilibrium, with per capita birth and natural death rate μ . Equations of different nodes are coupled via the human mobility matrix $M_{ij}(t)$, which is derived matrix $Q_{ij}(t)$ estimated from mobile phone data. To account for a possible underestimation of the number of people staying at their home node due to, e.g., bias in mobile phone ownership (44, 45), we introduce a calibration parameter c that relates the two matrices as follows:

$$M_{ii}(t) = cQ_{ii}(t) \quad [8]$$

$$M_{ij}(t) = c_j^i(t)Q_{ij}(t), \quad j \neq i \quad [9]$$

$$c_i^i(t) = \frac{1 - cQ_{ii}(t)}{\sum_{h \neq i} Q_{ih}(t)}, \quad [10]$$

where $c_j^i(t)$ ensures that rows sum to 1.

Susceptibles living at node i get infected at rate $\mathcal{O}_i(t)\mathcal{F}_i(t)$. $\mathcal{F}_i(t)$ is the rate at which a person living at node i comes into contact with contaminated water at node j during day t and becomes infected depending on the bacterial concentration B_j through a semisaturation function with parameter K

and rate of exposure β . $\mathcal{O}_i(t)$ accounts for the effects of the increase in exposure and contamination rate due to the increased population density (overcrowding). This increase is modeled as an exponential function with the exponent composed of parameter ω and the number of people present at the node at time t divided by its actual population. We assume that only a fraction σ of infections are symptomatic. Asymptomatically infected hosts do not significantly contribute to the bacterial load in the environment, nor die of cholera (14, 16, 48), and can thus, for the purpose of the model, be considered recovered immediately. Symptomatically infected people may recover at rate γ or die from cholera-unrelated causes at rate μ or from cholera at rate α , whereas those who recover lose their acquired immunity at rate ρ or die from causes not related to cholera.

Bacteria are shed at rate ρ by infected $\mathcal{G}_i(t)$ present at node i at time t and reach the local environmental compartment, whose size is proportional to the population H_i with a proportionality constant a . The contamination of the environment is increased by local rainfall $J_i(t)$ via parameter λ (10) (*Supporting Information*), and by overcrowding through the factor $\mathcal{O}_i(t)$. The environmental bacteria population decays with rate μ_B . We define $B_i^* = B_i/K$. Expressing the system of equations in this term, parameters a and K get absorbed in $\theta = \rho/aK$ so that the number of free parameters is reduced by 2.

The model (Eqs. 1–4) was solved numerically. Model outputs are the number of new cases per *arrondissement* and week, which are upscaled to the regional level for calibration and comparison with reported data (Table 1 and *Supporting Information*). Six parameters were estimated by using values from the literature, and another six were calibrated (Table S1), including the number of cholera cases present in the region of Diourbel in January 2005 (initial condition). Calibration was done using a method based on Markov chain Monte Carlo (MCMC) (*Supporting Information* and ref. 49).

To determine relevant processes to be included in the model and to find an appropriate compromise between accuracy and model complexity, hereby preventing overfitting, eight candidate models were compared using the Deviance Information Criterion (DIC) (50). Processes and mechanisms tested for their significance are the coupling of the local models in individual *arrondissements* through human mobility fluxes, the overcrowding effect, the correction of bias in mobile phone ownership, the inclusion of precipitation, and the calibration of the initial number of infected in Diourbel as a parameter. We also include a model that makes use of a gravity model instead of mobile phone data to determine human mobility. The model presented above (Eqs. 1–4) is selected as the best performing candidate. Descriptions of all other candidate models, as well as results of the model comparison, are reported in *Supporting Information*. A discrete, stochastic version of the model has also been implemented to verify the validity of the assumption of continuous variables underlying Eqs. 1–4, which proves reasonable (*Supporting Information* and Fig. S5).

Potential Effects of Local Interventions. To investigate the potential effects of local interventions, we ran our best fit model with 10% and 20% reduction of the rates of exposure to contaminated water and bacterial shedding. Such reductions are assumed to be concentrated in Touba during the GMdT, and could have been achieved by providing additional drinking water and sanitation facilities to the pilgrims (*Supporting Information*).

ACKNOWLEDGMENTS. Anonymous mobile phone data were made temporarily available by Orange and Sonatel within the framework of the D4D-Senegal challenge. The authors thank Dr. Malang Coly from the Office of the WHO representation in Dakar for his help in obtaining the cholera case data, and Prof. Renato Casagrandi and Prof. Marino Gatto (Politecnico di Milano) for useful discussions on the analysis of mobile phone data. F.F., E.B., and A.R. acknowledge support from the Swiss National Science Foundation project "Dynamics and controls of large-scale cholera outbreaks" (DYCHO CR2312 138104).

- Colizza V, Barrat A, Barthélemy M, Vespignani A (2006) The role of the airline transportation network in the prediction and predictability of global epidemics. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(7):2015–2020.
- Balcan D, et al. (2009) Multiscale mobility networks and the spatial spreading of infectious diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(51):21484–21489.
- Meloni S, et al. (2011) Modeling human mobility responses to the large-scale spreading of infectious diseases. *Sci Rep* 1:62.
- Bajardi P, et al. (2011) Human mobility networks, travel restrictions, and the global spread of 2009 H1N1 pandemic. *PLoS One* 6(1):e16591.
- Wesolowski A, et al. (2012) Quantifying the impact of human mobility on malaria. *Science* 338(6104):267–270.
- Tizzoni M, et al. (2014) On the use of human mobility proxies for modeling epidemics. *PLoS Comput Biol* 10(7):e1003716.
- Chao DL, Halloran ME, Longini IM, Jr (2011) Vaccination strategies for epidemic cholera in Haiti with implications for the developing world. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(17):7081–7085.
- Gurarie D, Seto EYW (2009) Connectivity sustains disease transmission in environments with low potential for endemicity: Modelling schistosomiasis with hydrologic and social connectivities. *J R Soc Interface* 6(35):495–508.
- Mari L, et al. (2012) Modelling cholera epidemics: The role of waterways, human mobility and sanitation. *J R Soc Interface* 9(67):376–388.
- Rinaldo A, et al. (2012) Reassessment of the 2010–2011 Haiti cholera outbreak and rainfall-driven multiseason projections. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(17):6602–6607.
- Bertuzzo E, et al. (2008) On the space-time evolution of a cholera epidemic. *Water Resour Res* 44(1):W01424.
- Bertuzzo E, et al. (2011) Prediction of the spatial evolution and effects of control measures for the unfolding Haiti cholera outbreak. *Geophys Res Lett* 38(6):L06403.
- Reiner RC, Jr, et al. (2012) Highly localized sensitivity to climate forcing drives endemic cholera in a megacity. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(6):2033–2036.
- Bertuzzo E, Finger F, Mari L, Gatto M, Rinaldo A (2014) On the probability of extinction of the Haiti cholera epidemic. *Stochastic Environ Res Risk Assess*, 10.1007/s00477-014-0906-3.

15. Mari L, et al. (2015) On the predictive ability of mechanistic models for the Haitian cholera epidemic. *J R Soc Interface* 12(104):20140840.
16. Kühn J, et al. (2014) Glucose- but not rice-based oral rehydration therapy enhances the production of virulence determinants in the human pathogen *Vibrio cholerae*. *PLoS Negl Trop Dis* 8(12):e3347.
17. Tuite AR, et al. (2011) Cholera epidemic in Haiti, 2010: Using a transmission model to explain spatial spread of disease and identify optimal control interventions. *Ann Intern Med* 154(9):593–601.
18. Azman AS, et al. (2012) Urban cholera transmission hotspots and their implications for reactive vaccination: evidence from Bissau city, Guinea bissau. *PLoS Negl Trop Dis* 6(11):e1901.
19. Erlander S, Stewart NF (1990) *The Gravity Model in Transportation Analysis – Theory and Extensions* (VSP Books, Zeist, The Netherlands).
20. Simini F, González MC, Maritan A, Barabási A-L (2012) A universal model for mobility and migration patterns. *Nature* 484(7392):96–100.
21. Palchykov V, Mitrović M, Jo H-H, Saramäki J, Pan RK (2014) Inferring human mobility using communication patterns. *Sci Rep* 4:6174.
22. Wesolowski A, et al. (2014) Commentary: Containing the ebola outbreak - the potential and challenge of mobile network data. *PLoS Curr* 6:1.
23. Candia J, et al. (2008) Uncovering individual and collective human dynamics from mobile phone records. *J Phys A Math Theor* 41:224015.
24. de Montjoye Y-A, Hidalgo CA, Verleysen M, Blondel VD (2013) Unique in the crowd: The privacy bounds of human mobility. *Sci Rep* 3:1376.
25. Lu X, Bengtsson L, Holme P (2012) Predictability of population displacement after the 2010 Haiti earthquake. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(29):11576–11581.
26. Lu X, Wetter E, Bharti N, Tatem AJ, Bengtsson L (2013) Approaching the limit of predictability in human mobility. *Sci Rep* 3:2923.
27. Perkins TA, et al. (2014) Theory and data for simulating fine-scale human movement in an urban environment. *J R Soc Interface* 11(99):20140642.
28. Wesolowski A, et al. (2013) The use of census migration data to approximate human movement patterns across temporal scales. *PLoS One* 8(1):e52971.
29. Wesolowski A, et al. (2014) Quantifying travel behavior for infectious disease research: A comparison of data from surveys and mobile phones. *Sci Rep* 4:5678.
30. Bengtsson L, et al. (2015) Using mobile phone data to predict the spatial spread of cholera. *Sci Rep* 5:8923.
31. Bengtsson L, Lu X, Thorson A, Garfield R, von Schreeb J (2011) Improved response to disasters and outbreaks by tracking population movements with mobile phone network data: A post-earthquake geospatial study in Haiti. *PLoS Med* 8(8):e1001083.
32. Tatem AJ, et al. (2014) Integrating rapid risk mapping and mobile phone call record data for strategic malaria elimination planning. *Malar J* 13:52.
33. Wesolowski A, et al. (2015) Quantifying seasonal population fluxes driving rubella transmission dynamics using mobile phone data. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(35):11114–11119.
34. Mari L, et al. (2015) Uncovering the impact of human mobility on schistosomiasis via mobile phone data. *Netmob Conference 2015: Data for Development Challenge Senegal* (Mass Inst Technol, Cambridge, MA), pp 71–97.
35. Abubakar I, et al. (2012) Global perspectives for prevention of infectious diseases associated with mass gatherings. *Lancet Infect Dis* 12(1):66–74.
36. Memish ZA, et al. (2015) Mass gathering and globalization of respiratory pathogens during the 2013 Hajj. *Clin Microbiol Infect* 21(6):571.e1–571.e8.
37. Wharton M, et al. (1990) A large outbreak of antibiotic-resistant shigellosis at a mass gathering. *J Infect Dis* 162(6):1324–1328.
38. World Health Organization (2008) *Cholera Country Profile: Senegal* (World Health Org, Geneva).
39. de Magny GC, et al. (2012) Cholera outbreak in Senegal in 2005: Was climate a factor? *PLoS One* 7(8):e44577.
40. International Federation of Red Cross and Red Crescent Societies (2007) *Senegal: Cholera Final Report* (Int Fed Red Cross Red Crescent Soc, Geneva), DREF Bull 05ME020.
41. Echenberg M (2011) *Africa in the Time of Cholera: A History of Pandemics from 1817 to the Present* (Cambridge Univ Press, Cambridge, UK).
42. Mari L, et al. (2012) On the role of human mobility in the spread of cholera epidemics: Towards an epidemiological movement ecology. *Ecohydrology* 5(5):531–540.
43. de Montjoye Y-A, Smoreda Z, Trinquart R, Ziemlicki C, Blondel VD (2014) D4D-Senegal: The second mobile phone data for development challenge, arXiv:1407:4885.
44. Wesolowski A, Eagle N, Noor AM, Snow RW, Buckee CO (2012) Heterogeneous mobile phone ownership and usage patterns in Kenya. *PLoS One* 7(4):e35319.
45. Wesolowski A, Eagle N, Noor AM, Snow RW, Buckee CO (2013) The impact of biases in mobile phone ownership on estimates of human mobility. *J R Soc Interface* 10(81):20120986.
46. Boone C (2003) *Political Topographies of the African State: Territorial Authority and Institutional Choice* (Cambridge Univ Press, Cambridge, UK).
47. Funk S, Salathé M, Jansen VAA (2010) Modelling the influence of human behaviour on the spread of infectious diseases: A review. *J R Soc Interface* 7(50):1247–1256.
48. King AA, Ionides EL, Pascual M, Bouma MJ (2008) Inapparent infections and cholera dynamics. *Nature* 454(7206):877–880.
49. Foreman-Mackey D, Hogg DW, Lang D, Goodman J (2013) emcee: the MCMC hammer. *Publ Astron Soc Pac* 125(925):306–312.
50. Spiegelhalter DJ, Best NG, Carlin BP, Van Der Linde A (2002) Bayesian measures of model complexity and fit. *J R Stat Soc Ser A Stat Soc* 64(4):583–639.
51. Linard C, Gilbert M, Snow RW, Noor AM, Tatem AJ (2012) Population distribution, settlement patterns and accessibility across Africa in 2010. *PLoS One* 7(2):e31743.
52. Koelle K, Rodó X, Pascual M, Yunus M, Mostafa G (2005) Refractory periods and climate forcing in cholera dynamics. *Nature* 436(7051):696–700.
53. Sorooshian S, Dracup JA (1980) Stochastic parameter estimation procedures for hydrologic rainfall-runoff models: Correlated and heteroscedastic error cases. *Water Resour Res* 16(2):430–442.
54. Gelman A, Carlin J, Stern H, Rubin D (2003) *Bayesian Data Analysis* (CRC Press, Boca Raton, FL), 2nd Ed.
55. Gillespie DT (1977) Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions. *J Phys Chem* 81(25):2340–2361.
56. Central Intelligence Agency (2013) *The World Factbook 2013-14* (Central Intell Agency, Washington, DC).
57. Codeço CT (2001) Endemic and epidemic dynamics of cholera: The role of the aquatic reservoir. *BMC Infect Dis* 1:1.

Supporting Information

Finger et al. 10.1073/pnas.1522305113

Study Domain and Administrative Subdivision of Senegal

The domain of our study is the country of Senegal, subdivided into 123 arrondissements as of 2013 (Fig. S1). The administrative subdivision of the country changed in 2008; in particular, the number of regions changed from 11 to 14. Epidemiological data refer to the regions as of 2005. To upscale the model output from the 2013 arrondissement scale to that of the epidemiological data, each 2013 arrondissement was assigned to a 2005 region. For 2013 arrondissements belonging to more than one 2005 region, cases were assigned proportionally to the population living in each region.

Data

Mobile Phone Records. Mobile phone call records belong to a dataset that was released by Orange/Sonatel, an important mobile phone provider in Senegal, for the D4D-Senegal challenge (d4d.orange.com/en, accessed on November 10, 2015) (43). The dataset used herein has been coarse-grained by the provider from antenna to arrondissement level (*Study Domain and Administrative Subdivision of Senegal*) and contains the arrondissement where 146,352 randomly selected users were located while making calls or sending text messages throughout the year 2013.

Population. Spatially distributed population estimates for the year 2010 with a resolution of ~100 m were obtained from AfriPop (www.afripop.org, accessed on November 14, 2014) (51) and spatially aggregated to the 123 arrondissements of Senegal. As the total population of Senegal increased by 15% between 2005 and 2010, an average growth rate per region was computed using official data from the Agence Nationale de la Statistique et de la Démographie (www.ansd.sn, accessed on November 14, 2014), and the population in each arrondissement was adapted accordingly.

Cholera Cases. Reported cholera case data were obtained from the website of the Senegalese Ministry of Health (39) and from the World Health Organization national office in Dakar.

Precipitation. Daily remotely acquired precipitation estimates (Climate Prediction Center/Famine Early Warning System Daily Estimates) for the year 2005 with a resolution of ~0.1° were obtained from the National Oceanic and Atmospheric Administration (www.cpc.ncep.noaa.gov/products/fews/rfe.shtml, accessed on October 14, 2015). They have been spatially averaged over each of the 123 arrondissements.

Initial Conditions

The initial conditions characterize the epidemiological state of the population at the beginning of January 2005. An initial number of cases was assigned to each arrondissement in Diourbel, the region where the first cases were reported, which was either manually fixed (one case per arrondissement) or calibrated (see *Parameter Estimation* and Table S2). The rest of the population is assumed to be susceptible. We consider that there is no initial immunity, because the last major cholera epidemic in Senegal had occurred in 1996 (38) and thus the period between the two events is much longer than reported immunity duration in endemic settings (52). The initial bacterial concentration is assumed to be in equilibrium with the initial number of infected in absence of mobility: $B_{i,0}^* = I_{i,0} \theta / (\mu_B H_i)$ (10, 16).

Parameter Estimation

Although some parameters were assigned using values from the literature (Table S1), others (number depending on the model;

Model Selection and Table S2) were calibrated, including the initial number of cases in the region of Diourbel, equally distributed among arrondissements. Model calibration was performed using a parallel implementation of the MCMC method called emcee PT sampler (49), which allows exchange of information among walkers. To explore the largest possible portion of the parameter space, a total of 300 walkers running at three different “temperatures,” which set the probability of accepting jumps to less favorable regions, and starting from the region of a well-performing hand-tuned parameter set were used. We used wide uniform priors (Table S1). The walkers were run up to visual convergence (5,000–8,000 iterations), and all but the last 1,000 iterations were discarded as burn-in.

The models were evaluated against reported numbers of cases in all 11 regions. Weekly cumulative cases C_i were computed from the model using the following equation:

$$C_i(\tau) = \sigma \int_{\tau-\Delta t}^{\tau} \mathcal{O}_i(t) \mathcal{F}_i(t) S_i dt$$

where τ corresponds to the end of the week and Δt is 1 wk. The results were then upscaled from the arrondissement to the regional scale for comparison with reported cases. Model likelihood was computed assuming mutually independent, homoscedastic, and normally distributed residuals (53) across regions.

Model Selection

Processes. We compared the performance of eight different models with the goal of evaluating the importance of individual processes, namely bias correction, human mobility fluxes, overcrowding, and precipitation. The results are presented in Table S2. We evaluated models that consider mobile phone data to be unbiased ($c = 1$) (model B) or with a fixed initial condition (one initial case in each arrondissement of Diourbel, model C). In model D, the mobile phone data are used to determine temporal variations in population distribution due to human mobility, and thus to account for overcrowding, whereas the mobility fluxes between individual arrondissements are not considered. Model E includes mobility fluxes but not the overcrowding. Model F does not take into account human mobility at all. The absence of fluxes in models D and F leads to a de facto uncoupling of the local models, which makes it necessary to calibrate the initial number of cases and equally distribute them among arrondissements. Model G does not take precipitation into account, and Model H adapts the gravity model (see ref. 10 for implementation) instead of mobile phone data to determine human mobility. Fig. S3 shows the modeled cases for models D, E, and G.

Models were compared using the DIC (50, 54) as well as the coefficient of determination. DIC, which allows for the ranking of different models while preventing overfitting, is straightforward to compute from the output of our Bayesian calibration procedure, as it is based on the likelihood values of the posterior distribution. Results show that models including human mobility (to estimate fluxes between arrondissements and/or overcrowding effect) clearly outperform model F, which does not account for those effects. The gravity model does not provide an appropriate description of human mobility for the case of this study. Indeed, model H provides a reasonable fit for the region with the highest number of cases; however, lacking a proper description of spatiotemporal variations of human mobility, it does not correctly capture the spread of the disease to other regions. This also leads to convergence problems and unrealistic posterior parameter values. The overcrowding effect

alone leads to a model performing relatively well (model D), which, however, does not correctly reproduce the spread of the epidemic, and which is outcompeted by models accounting also for human mobility fluxes between the arrondissements (models A and B). The bias correction of mobility data leads to a slight improvement in model performance, as does the calibration of the initial number of infected in Diourbel. Interesting insight is provided by the results of model G, implying that the overall results can still be reasonably good without rainfall, but that its addition is necessary to be able to capture the autumn peak in Dakar (among other regions), previously associated with rainfall (39).

Alternative Ways of Reconstructing the Mobility of 2005. The mobility matrix extracted from the mobile phone records contains information not only about mobility during exceptional events such as the GMdT or other pilgrimages (Fig. 2) but also about seasonal and subseasonal variations of mobility. To exploit this information, and to test if its use leads to improvements in model performance with respect to our baseline mobility matrix presented in *Materials and Methods*, we compared five alternative mobility matrices by incorporating them into our best performing model (A) and recalibrating the baseline mobility matrix, as presented in the *Materials and Methods*. For variant I, we averaged the human mobility matrix throughout 2013, excluding only the periods of the two occurrences of the GMdT. We used the resulting mobility matrix for all days in 2005, except for the period of the GMdT (± 3 d), which in turn was assigned the mobility of the GMdT that had taken place in December 2013. The purpose of this mobility matrix is to test if seasonal and subseasonal variations of mobility other than the GMdT should also be considered in our model (instead of assuming constant mobility throughout the year, except from the GMdT). For variant II, we thus first extracted the seasonal signal, defined as the mobility matrix excluding the effect of the GMdT as well as other important and clearly identifiable mobility pulses. We followed the following procedure: (i) exclusion of both editions of the GMdT and replacement by the average mobility of the previous and following weeks; (ii) step *i* with four other clearly identifiable mobility pulses caused by the following events: Gamou de Tivaouane, Magal de Porokhane, Magal de Kazu Rajab, and Magal de Darou Mouhty; (iii) step *i* with four irregularities present in the mobility matrix, identified by visual inspection, which might correspond to cell phone network breakdowns or electric power cuts; (iv) application of a 7-d moving average to smooth out the weekly cycle and get a purely seasonal signal, and (v) determination of individual contribution of the GMdT by subtracting the seasonal signal from the original mobility matrix during the period of the event.

The contribution of the GMdT in December 2013 was then added to the seasonal signal during the period of the GMdT 2005 to obtain a mobility matrix for the entire year 2005. Variant III was the same as variant II, except that, in addition to the GMdT, we also added the contribution of four other events (Gamou de Tivaouane, Magal de Porokhane, Magal de Kazu Rajab, and Magal de Darou Mouhty) to the seasonal signal; variant IV was the same as variant I, but without considering the GMdT, e.g., constant mobility throughout the year; and variant V was the same as variant II, but without considering the GMdT, e.g., considering the seasonal variation of mobility only.

Variants IV and V have been included to evaluate if the mobility during the GMdT is essential for our model to perform well. Results of the comparison are shown in Table S4. A comparison of the countrywide number of mobile people every day according to variants I–III is shown in Fig. S1C.

The comparison of model performance under different assumptions about mobility shows that the inclusion of the GMdT in

the mobility matrix is crucial for the model to perform well, but that including the baseline seasonality as well as additional but smaller mass gatherings decreases the model's ability to reproduce the data. This might be due to the fact that the seasonality in 2005 was different from the one in 2013, or that mobility was of high importance only during the GMdT but not during the rest of the year.

Impact of Reduced Transmission During the GMdT

We tested several scenarios to quantify the influence of control measures that could possibly have attenuated the 2005 cholera epidemic. Modeling results suggest Touba as a promising focal point for actions aimed at containing disease spread. Therefore, we focused our attention on interventions localized (in space and/or) time around the GMdT. We assume that by providing additional sanitation facilities and clean drinking water, a reduction of disease transmission through a reduced bacterial shedding rate (parameter θ), also accounting for a reduced contamination of environmental water bodies with fecal matter (16), and through a reduced rate of exposure to contaminated water (parameter β) can be achieved. We run our best performing model reducing both relevant parameters by a varying percentage in Touba either only during the GMdT (± 10 d) or throughout the year. The resulting numbers of avoided cases are shown in Fig. S4 and Table S4. According to our model, the number of avoided cases increases with the duration of the interventions not only in Diourbel but throughout Senegal. When reducing exposure and contamination only during the GMdT, the number of avoided cases grows less rapidly than when applying the reductions throughout the year, which might be the result of less cases and smaller bacterial population in Touba just before the GMdT.

Effects of Demographic Stochasticity

To investigate the possible effect of demographic stochasticity associated with the discrete nature of the transmission processes, we implemented a discrete stochastic formulation of the model. In particular, we considered all possible discrete events (birth, death, infection, recovery, and immunity loss) and modeled their temporal occurrence using the Gillespie algorithm (55). Bacterial concentration was modeled as a continuous variable. Details on the model implementation can be found in Bertuzzo et al. (14). Fig. S5 compares the results obtained with the continuous and the discrete formulations of model A. For the first half of the year, where the peak related to the pilgrimage occurs, the two formulations produce very similar patterns, with the discrete formulation expectedly exhibiting higher variance among different realizations. During the second half of the year, the number of cases predicted by the discrete model is slightly lower than that according to the continuous one. This difference is due to the fact that, according to the discrete model, the epidemic goes locally extinct during the low phase in some areas, whereas the continuous model predicts a small but positive prevalence of infection instead. With the arrival of rainfall, such areas show a much quicker response in the continuous model than in the discrete one.

The continuous approximation cannot correctly reproduce extinction dynamics. This causes slight discrepancies between the two model formulations. However, the main features of the epidemic remain unaffected by the continuous approximations, and the discrepancies are limited to few areas with a small number of cases. On the other hand, the continuous assumption has significant operational advantages; in particular, it allows the fast simulation of the $\mathcal{O}(10,000)$ runs that are needed to calibrate the model and the formal model comparison. Overall, for the specific scope of this study, we deem the continuous approximation reasonable.

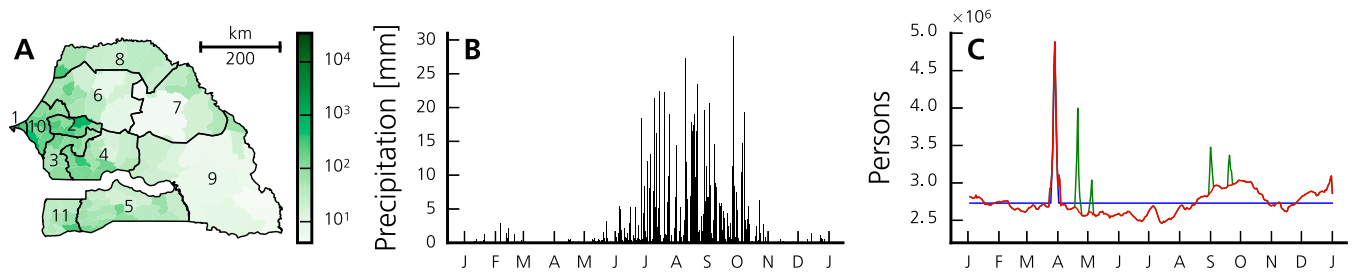


Fig. S1. Additional data. (A) Population density (people per square kilometer) per arrondissement in Senegal (2010). Regions (according to the 2005 subdivision) are numbered as follows: Dakar (1), Diourbel (2), Fatick (3), Kaolack (4), Kolda (5), Louga (6), Matam (7), Saint-Louis (8), Tambacounda (9), Thiés (10), and Ziguinchor (11). (B) Daily precipitation depth in 2005 averaged over all arrondissements. (C) Evolution of the total number of moving people (i.e., people leaving their home arrondissement) throughout 2005 according to variants I (blue), II (red), and III (green) (*Model Selection*). The first spike, present in all variants, corresponds to the GMdT. The four spikes present only in variant 3 correspond to the following events (in chronological order): Gamou de Tivaouane, Magal de Porokhane, Magal de Kazu Rajab, and Magal de Darou Mouhty.

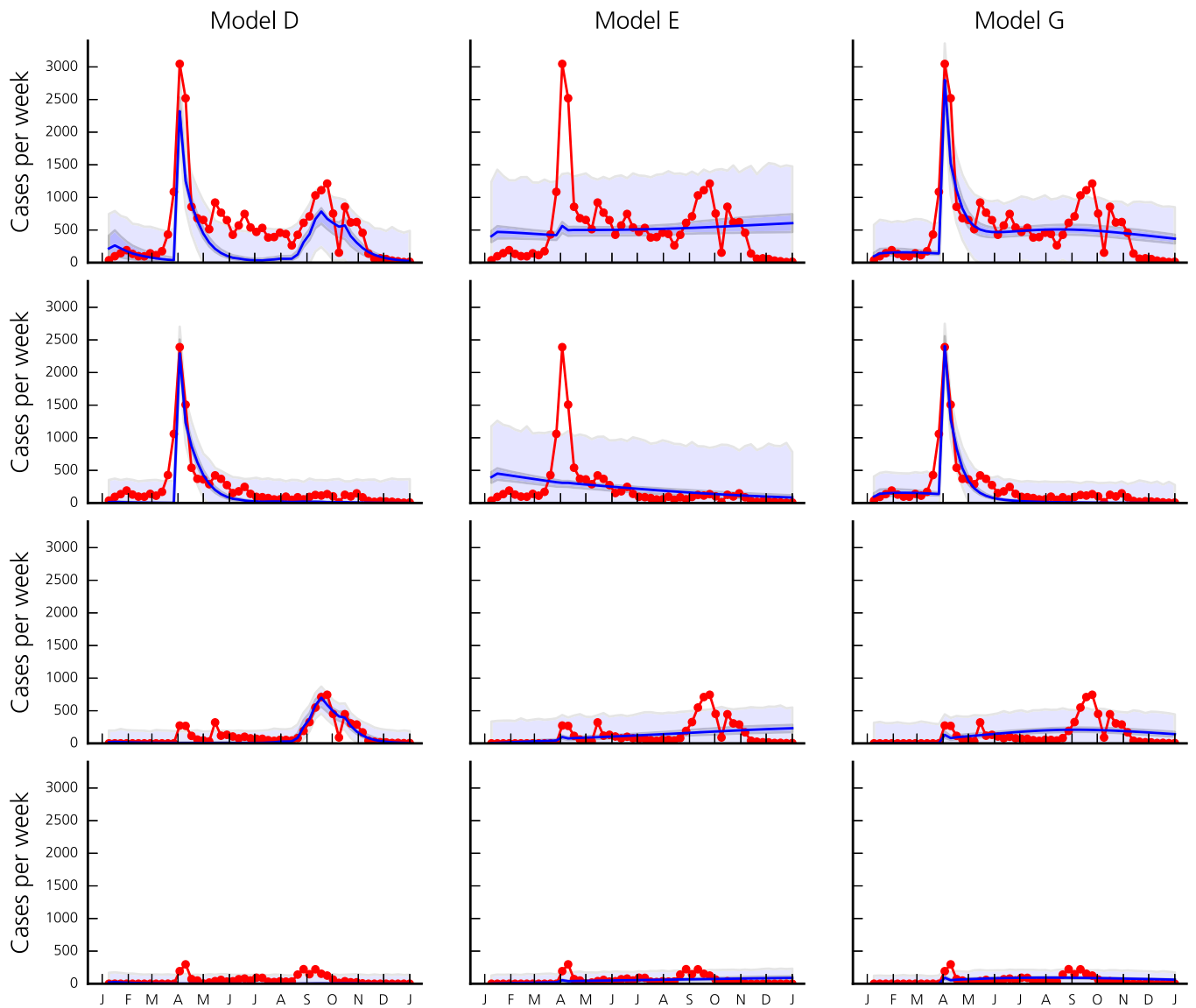


Fig. S3. Reported (red line) and modeled number of new cases per week for the entire country of Senegal (first row), and for the regions of Diourbel (second row), Dakar (third row), and Thiés (last row) according to models D (first column, not including mobility fluxes), E (second column, not including the overcrowding effect), and G (third column, not including rainfall). Blue lines correspond to model runs with the best posterior parameter set. Shaded bands shown correspond to the 2.5–97.5 percentiles of the uncertainty related to parameter estimation (dark blue) and of the total uncertainty assuming Gaussian, homoscedastic error (light blue).

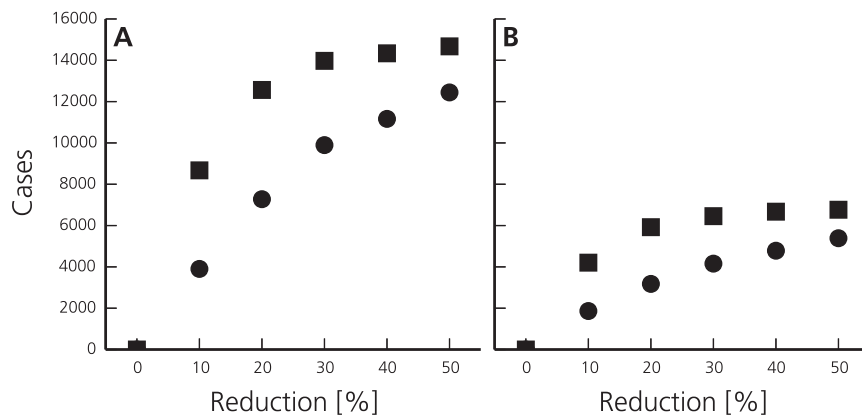


Fig. S4. Modeled number of total avoided cases in 2005 overall Senegal (A) and in the region of Diourbel (B) when reducing the rates of exposure to contaminated water and bacterial shedding by a varying percentage in Touba during the GMdT only (± 10 d, circles) and throughout the year (squares).

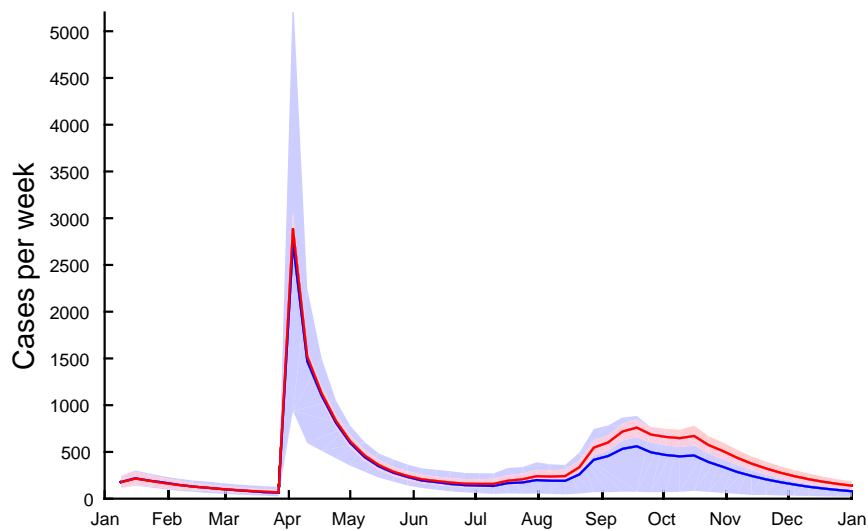


Fig. S5. Modeled number of new cases per week in the entire country of Senegal according to the continuous (red) and the discrete stochastic (blue) implementations of model A. Red shaded areas correspond to the 2.5–97.5 percentiles of the uncertainty related to the posterior parameter of the continuous model. Blue shaded areas correspond to 2.5–97.5 percentiles over 1,000 model runs using parameter sets drawn from the posterior distribution of the continuous model. Solid lines show the median.

Table S1. Fixed and calibrated parameters of the best performing model (A in Table S2)

Parameter	Units	Prior	Value	Reference
Fixed				
γ	d^{-1}		0.2	(10)
μ	d^{-1}		$1/(61 \times 365)$	(56)
α	d^{-1}		0.004	(10, 12)
μ_B	d^{-1}		0.2	(10, 12)
ρ	d^{-1}		1/600	(52)
β	d^{-1}		1	(10, 11, 57)
Calibrated				
θ	d^{-1}	[0, 2]	0.34 [0.28 0.41]	
λ	mm^{-1}	[0, 1]	0.049 [0.040 0.061]	
σ	–	[0, 0.5]	0.019 [0.016 0.021]	
ω	–	[0, 2]	0.86 [0.824 0.889]	
c	–	[1, 2]	1.40 [1.375 1.410]	
I_0^*	–	[1, 500]	301 [204 416]	

For the calibrated parameters, the 95% confidence intervals of the posterior distribution are also shown.
*Initial number of infected in the region of Diourbel equally distributed among arrondissements.

Table S2. Comparison of models including different mechanisms (see *Model Selection*) using the DIC as well as the coefficient of determination R^2 , computed including weekly case data from all or from one selected region

Model	Mobility fluxes*	Overcrowding*	Precipitation	Bias correction [†]	IC [‡]	Parameters	Log-likelihood [§]	DIC	R^2 overall	R^2 Dakar	R^2 Diourbel	R^2 Thiés
A	+	+	+	+	c	6	-3,256	6,533	0.77	0.72	0.78	0.20
B	+	+	+	-	c	5	-3,328	6,669	0.71	0.68	0.69	0.41
C	+	+	+	+	d	5	-3,279	6,573	0.75	0.73	0.75	0.04
D	-	+	+	+	a	6	-3,308	6,631	0.72	0.71	0.75	-0.47
E	+	-	+	+	c	5	-3,595	7,204	0.25	0.10	0.08	-0.02
F	-	-	+	-	a	4	-3,641	7,295	0.12	0.60	-0.19	0.31
G	+	+	-	+	c	5	-3,302	6,615	0.73	0.22	0.81	0.13
H [¶]	+	+	+	-	c	7	-3,459	6,943	0.54	-0.50	0.73	-0.50

+, Denotes the inclusion of the corresponding mechanism in the model; -, denotes its absence.

*Note that human mobility fluxes and overcrowding both depend on human mobility estimates but can be taken into account separately. See *Model Selection* for more details.

[†]Absence of bias correction with $c = 1$.

[‡]Initial number of infected; a, calibrated (all arrondissements); c, calibrated (only Diourbel); and d, fixed (only Diourbel).

[§]Highest log-likelihood value in the posterior sample.

[¶]For model H, human mobility has been determined using a gravity model (e.g., ref. 10) instead of deriving it from mobile phone data.

Table S3. Estimated (according to model A) number of cases and percentage of avoided cases in all regions in 2005 when reducing the rates of exposure to contaminated water and bacterial shedding in Touba by 10% or 20% during the GMdT or during the entire year

Region	Modeled cases	10% during GMdT	20% during GMdT	10% entire year	20% entire year
Dakar	7,062	12	21	20	34
Diourbel	8,276	23	38	51	72
Fatick	579	19	41	47	68
Kaolack	1,609	17	41	50	71
Kolda	435	16	47	54	74
Louga	940	25	47	53	73
Matam	90	28	48	55	74
Saint-Louis	104	28	47	53	69
Tambacounda	341	24	47	54	71
Thiés	1,802	21	42	45	65
Ziguinchor	229	3	37	46	62
Senegal	21,467	18	34	40	59

Table S4. Recalibration of model A using different mobility matrices (*Model Selection*)

Mobility matrix	Log-likelihood*	DIC	R^2 overall	R^2 Dakar	R^2 Diourbel	R^2 Thiés
I	-3,256	6,533	0.77	0.72	0.78	0.20
II	-3,306	6,632	0.73	0.38	0.79	-0.25
III	-3,267	6,559	0.76	0.74	0.77	0.15
IV	-3,474	6,974	0.51	-0.50	0.66	-0.51
V	-3,579	7,229	0.30	-0.49	0.32	-0.51

*Highest log-likelihood value in the posterior sample.

Dataset S1. List of all arrondissements in Senegal together with their region and department (2013 administrative subdivision)

[Dataset S1](#)

Columns report: a unique number identifying each arrondissement, the region name, the department name, the arrondissement name.

Dataset S2. Quantity $Q_{ij}(t)$, which represents the community-level average fraction of time that users living in arrondissement i spend in arrondissement j during day t , as estimated from mobile phone data

[Dataset S2](#)

Arrondissements are ordered as in Dataset S1. The file is organized as a series of matrices, one for every day t , which are separated by an empty line and identified with a sequential number indicating the day of the year. This dataset is provided only for reproducibility of the results. For any other use, a request should be submitted to Orange/Sonatel. The original dataset used to estimate this quantity can no longer be legally accessed.



Influence of Community-Led Total Sanitation and Water Coverages in the Control of Cholera in Madarounfa, Niger (2018)

Julien Graveleau^{1*}, Maria Eleanor Reserva², Alama Keita³, Roberto Molinari^{4†} and Guillaume Constantin De Magny^{5,6†}

¹ West and Central Africa Regional Office, UNICEF, Dakar, Senegal, ² Health Systems Strengthening Unit-Health Section, West and Central Africa Regional Office, UNICEF, Dakar, Senegal, ³ Niger Country Office, UNICEF, Niamey, Niger, ⁴ Department of Mathematics and Statistics, Auburn University, Auburn, AL, United States, ⁵ Centre for Research on the Ecology and Evolution of Diseases (CREES), Montpellier, France, ⁶ MIVEGEC (Université de Montpellier, UMR CNRS 5290, IRD 229), Institut de Recherche pour le Développement Délégation Occitanie, Montpellier, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Yimin Zhang,
Zhejiang University, China

Reviewed by:

Godfrey Bwire,
Ministry of Health, Uganda
Shigui Yang,
Zhejiang University, China

*Correspondence:

Julien Graveleau
jgraveleau@unicef.org

†These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Infectious Diseases - Surveillance,
Prevention and Treatment,
a section of the journal
Frontiers in Public Health

Received: 17 December 2020

Accepted: 24 February 2021

Published: 29 April 2021

Citation:

Graveleau J, Reserva ME, Keita A,
Molinari R and Constantin De
Magny G (2021) Influence of
Community-Led Total Sanitation and
Water Coverages in the Control of
Cholera in Madarounfa, Niger (2018).
Front. Public Health 9:643079.
doi: 10.3389/fpubh.2021.643079

Every year, cholera affects 1.3–4.0 million people worldwide with a particularly high presence in Africa. Based on recent studies, effective targeting interventions in hotspots could eliminate up to 50% of cases in Sub-Saharan Africa. Those interventions include Water, Sanitation, and Hygiene (WASH) programs whose influence on cholera control, up to the present, has been poorly quantified. Among the few studies available, D’Mello-Guyett et al. underline how the distribution of hygiene kits is a promising form of intervention for cholera control and that the integration of a WASH intervention at the point of admission of suspected cases is new in cholera control efforts, particularly in outbreaks and complex emergencies. Considering the limited number of studies on Community-Led Total Sanitation (CLTS) and water coverages related to cholera control, the aim of our work is to determine whether these interventions in cholera hotspots (geographic areas vulnerable to disease transmission) have significant impact on cholera transmission. In this study, we consider data collected on 125 villages of the Madarounfa district (Niger) during the 2018 cholera outbreak. Using a hurdle model, our findings show that full access to improved sanitation significantly decreases the likelihood of cholera by 91% ($P < 0.0001$) compared to villages with no access to sanitation at all. Considering only the villages affected by cholera in the studied area, cholera cases decrease by a factor of 4.3 in those villages where there is partial access to at least quality water sources, while full access to improved water sources decreases the cholera cases by a factor of 6.3 when compared to villages without access to water ($P < 0.001$). In addition, villages without access to safe water and sanitation are 6.7 times ($P < 0.0001$) more likely to get cholera. Alternatively, villages with full sanitation and water coverage are 9.1 ($P < 0.0001$) less likely to get cholera. The findings of our study suggest that significant access to improved water and sanitation at the village level offer a strong barrier against cholera transmission. However, it requires full CLTS coverage of the village to observe a strong impact on cholera, as partial access only has a limited impact.

Keywords: cholera, WASH, Africa, hurdle model, odd-ratio

INTRODUCTION

The relationship between cholera and contaminated drinking water was first established by John Snow in the mid-19th century (1, 2). Following these findings, access to safe water and improved sanitation in high-income countries over the past two centuries has definitively eliminated cholera transmission of toxigenic *Vibrio cholerae* (3). Despite this progress, the seventh pandemic of cholera is still ongoing since the 1960s, particularly in Sub-Saharan African countries where the majority of the burden is usually reported with the exception of unprecedented cholera outbreaks like that in Haiti between 2010 and 2019 (4) or Yemen since 2016 (5). Basic safe water and sanitation access remains a challenge (58 and 36% coverage, respectively) (6).

The fact that waterborne diseases that are transmitted through the fecal–oral route, like diarrheal diseases, has been largely studied, leading to guidelines and standards (7–10). Among the programs that can be implemented at the community level to improve sanitation, Community-Led Total Sanitation (CLTS) is an innovative methodology for mobilizing communities to completely eliminate open defecation (OD). Communities are facilitated to conduct their own appraisal and analysis of OD and take their own action to become open defecation-free (ODF). The result of becoming ODF is usually the construction of toilets, latrines that avoid fecal matter directly contaminating the environment.

Based on recent studies, effective targeting interventions in hotspots could eliminate up to 50% of cases in Sub-Saharan Africa (11). Among the few studies available, D'Mello-Guyett et al. (12) underline how the distribution of hygiene kits is a promising form of intervention for cholera control and that the integration of a WASH intervention at the point of admission of suspected cases is new in cholera control efforts, particularly in outbreaks and complex emergencies (12). Even though the relationship between cholera and Water, Sanitation, and Hygiene (WASH) has long been established (13), the beneficial impact of water and sanitation projects like CLTS, specifically in cholera hotspots, is often challenged due to the lack of evidence and the complexity in demonstrating such an impact (e.g., long-term implementation of WASH projects, availability of data, sustainability of WASH projects) (14). Questioning has increased over the past years, as oral cholera vaccines (OCVs) have shown short- to medium-term impacts on cholera (15), creating a tendency to promote medical solutions over WASH solutions whose benefits, among others, are not limited to their impact on cholera. Aside from mapping the outbreak of cholera under the guidelines of the Millennium Development Goals (MDGs) and the Sustainable Development Goals (SDGs) of the United Nations (16), the few existing references on cholera control either exclusively focus on the use of OCVs (17, 18) or on their joint usage with WASH interventions (19, 20). To the best of our knowledge, only one study highlights the use of hygiene kit distribution as a promising intervention for cholera control, particularly in outbreaks and complex emergencies (12).

For all these reasons, this work intends to present the results of a study carried out for the Madarounfa district (Niger),

which was classified as a hotspot according to the World Health Organization Global Cholera Task Force definition (21), concentrating over the time period between 1994 and 2017, recording 13 outbreaks with an average duration of 14 weeks (22). The most recent cholera outbreak occurred in 2018, officially resulting in 2,628 cases and 42 deaths. Indeed, over the past few years, WASH projects that include CLTS have been implemented in Madarounfa in order to create ODF communities, improve hygiene practices, and demand access to safe drinking water. These conditions allowed to perform a cross-sectional study collecting data on population and its health and sanitation conditions from 125 villages in the district. Among these villages, 14 did not have access to sanitation or water, 79 had partial access to both water and/or sanitation, and 32 had full sanitation and water coverage. Combining this information with other socio-environmental factors (see further on), this study therefore seeks to determine if differences exist in the burden of cholera between villages of the Madarounfa district based on their water and CLTS coverages while taking into account other available influential factors.

MATERIALS AND METHODS

Data Sources

We collected all available data on cholera, past or present WASH programs, population census, and socio-environmental information at the village level for Madarounfa district (Niger) for the year 2018 over different sources (Internet, public reports available locally, and professionals from the Health district and Hydraulic and Sanitation district). Usually, data are compiled at a national or provincial level. In the case of this study, most of the data were collected directly at the district level for village level type of information and had to be compiled by ourselves. The sources of data included the Madarounfa district report on CLTS for 2018; line-listing of cholera cases from health centers of the Health District of Madarounfa in 2018; REF2017-REGMI database from the “Ministry of Hydraulic and Sanitation” providing information on water infrastructures, water coverage, and GPS data; MADA-POP-2017-25CSI providing population data from 2017 based on projection from last census; Community Development Plans (CDP-2018–2022) from Gabi, Safo, and Sarkin Yamma providing socio-environmental information. Finally, distances between villages and between surface water and villages were measured directly through the dedicated tools proposed by the Google Earth website to see if these factors could be associated with cholera transmission.

The data were collected in December 2018 in Madarounfa district from the Maradi Province. Field visits in the studied areas were also carried out between December 2018 and April 2019 to cross-check information through observational methods.

Finally, other sources of information such as JMP 2018 (23) or “Niger cholera factsheet” (from Regional Cholera Platform¹) was used to compare the area of study to the national context.

¹<https://www.platformecholera.info/index.php/bonus-page-2/national-strategies-plans/niger>

Community Led Total Sanitation Context

CLTS aims to create ODF certification, which means that 100% of the households have at least basic access to sanitation and have hand-washing facilities. Based on data collected from the 125 studied villages, 53 villages (i.e., 42%) have been certified in recent years, with 100% of the village households reporting sanitation and hand-washing facilities. Some villages were not yet involved in CLTS projects, as 40% of the villages had no access to sanitation (which means no household of this village had access to basic sanitation). Only 22 villages (i.e., 18%) had partial access to sanitation (ranging from 29 to 97% of CLTS involvement coverage in those villages), as they either were still involved in CLTS projects or did not complete the CLTS project. Villages were classified based on three levels of CLTS coverage determined as follows: (1) villages with no access to sanitation (0% coverage); (2) villages with partial access (ranging from 1 to 99% of the household with latrine and hand-washing facility) to sanitation; (3) villages with full CLTS coverage (100% of the household with latrine and hand-washing facility).

In the studied area, the main sources of unsafe water are rivers, lakes, dams, or open wells. Functioning hand pumps and tap stands (from small water networks with deep boreholes) were considered basic drinking water sources. Basic drinking water services are defined as drinking water from an improved source (piped water, boreholes or tube wells, protected dug wells, protected springs) according to the WHO/UNICEF Joint Monitoring Program (JMP) for Water Supply, Sanitation, and Hygiene, provided collection time is not more than 30 min for a round trip and number of users <500 persons per water point.

Water-related data are reported in **Table 1**, summarizing the number of cholera cases, number of villages, and total inhabitants as a contingency table with two entries. The first entry is the aggregation of these data with the water coverage categorized into three levels: (1) Villages with no access to basic water services representing 24 villages (i.e., 19% of the sample of villages); (2) Villages with partial access to basic water services (36 villages with water coverage ranging from 33 to 94%). For this level, villages with more than 500 persons per basic water source and villages with both safe and unsafe water sources were considered; (3) Villages with full basic water services coverage

(65 villages representing 52% of the studied villages), which refer to all villages with maximum 500 persons per safe water point and no alternative unsafe water source. The second entry is the aggregation of these data with CLTS coverage categorized into three levels: (1) Villages with no sanitation coverage representing 50 villages (i.e., 40% of the sample of villages); (2) Villages with partial sanitation coverage (22 villages with sanitation coverage ranging from 29 to 97%); (3) Villages with full sanitation coverage (53 villages representing 42.4% of the studied villages).

With 52% of the studied villages having access to basic water coverage and 42% having access to basic sanitation, the studied area is above Niger's standards but remains representative of the national picture. In fact, based on JMP (2017) (6), only 50% of the people of Niger have access to basic water services and 14% have access to basic sanitation.

Village Stratification

The study sample collects data on 125 villages including 41 villages from the Gabi Commune, 26 villages from the Safo Commune, and 58 from the Sarkin Yamma Commune for a total population targeted by the study of 135,680 persons in 2018. The last census in Safo reports 79,024 inhabitants, 101,704 inhabitants in Gabi, and 44,704 inhabitants in Sarkin Yamma, as 60.2% of the population of those three targeted communes were considered due to lack of data in some villages. Three communes over the five existing ones of Madarounfa district were included in this study.

Data Compilation for the Study

A final database was created for the study compiling all the available data for each village therefore including the following variables: (1) number of inhabitants; (2) number of cholera cases from the 2018 outbreak; (3) prevalence of cholera per 1,000 inhabitants from the 2018 outbreak; (4) water coverage at the village level; (5) sanitation coverage per village; (6) distance between each village and the nearest cholera-affected village; (7) distance between a village and the nearest surface water; (8) availability of road access to the village.

With the exact GPS location of the 125 studied villages (from REF2017-REGMI database of the "Ministry of Hydraulic and Sanitation"), it was possible to measure the distances between villages and the nearest affected villages as well as the nearest

TABLE 1 | Number of villages, inhabitants, and cholera cases based on their basic water access levels and Community-Led Total Sanitation (CLTS) coverage levels.

	Villages without access to basic water			Villages with partial access to basic water			Villages with at least full basic water access		
	# of villages	Inhabitants	Cholera cases	# of villages	Inhabitants	Cholera cases	# of villages	Inhabitants	Cholera cases
Villages without sanitation coverage	14	5,435	81	16	24,058	73	20	41,425	147
Villages with partial sanitation coverage	1	898	0	8	8,99	46	13	16,073	13
Villages with full sanitation coverage	9	4,483	7	12	11,578	1	32	22,741	8

Abbreviation of number.

surface water points (often a river). Road access to the village was also captured through satellite imagery as a potential influencing factor on the burden of cholera per village.

Data Analysis

In this study, we choose to analyze the data according to two methodologies, the odds ratios (ORs) as a statistic that quantifies the strength of the association between two events and commonly used in epidemiology and a statistical class model motivated by an excess of zeros in the data, the hurdle model. Such statistical approaches on CLTS effects on cholera epidemiology are aimed to detail evidence on the degree of CLTS involvement of the population to sustainably impact the transmission of cholera.

Odds Ratios

ORs were calculated to quantify the association of CLTS and water coverages to the prevalence of cholera in order to identify any correlation. Since OR measures the association but does not quantify the impact of sanitation and water coverages and the prevalence of cholera, a hurdle model was used to test for these possible relationships.

Hurdle Model

The reason for choosing a hurdle model was to account for the numerous zero cholera cases (77 villages out of 125) and because we were interested in understanding the factors that discriminate between the presence or not of cholera, on one side, and the factors that are associated with reducing the prevalence of cholera if observed, on the other side. Based on these choices, we chose a binomial distribution to model the presence or absence of cholera, while a negative binomial distribution was used for the positive cases since a Poisson model did not account for the overdispersion (24). This kind of model is particularly adapted for count data and is used in many applications such as biology, epidemiology, and public health (25, 26). In order to deliver numerically stable results, we projected the prevalence rate of each village onto a standardized population of 10,000 people under the assumption that this would not greatly affect the final statistical tests. By doing so, we do not need to use weights in the modeling process.

To test the influence of CLTS interventions on the prevalence of cholera, we used a three-level factor variable for access to improved water source (none, partial, or full access to improved water source). A three-level factor variable was also used for sanitation (none, partial, or full access to improved sanitation). Concurrently, we also added non-WASH variables, namely, distance to the nearest open-water source (in meters), distance of village to the nearest contaminated village (in meters), and access to dust road as explanatory factors.

For the hurdle model analysis, we first fit a full hurdle model with all the explanatory variables (Model 1). Then, we ran two models each with WASH and non-WASH factors only (Model 2 and Model 3, respectively). For both water and sanitation factor variables, we used no water access and no sanitation as the base level.

A log-likelihood test was performed by comparing the fit of the full hurdle model to the fit of WASH and non-WASH models.

By removing predictor variables from a model, the model will likely fit less well with a lower log likelihood, but it is necessary to test whether the observed difference in model fit is statistically significant. Having log-likelihood results that are statistically significant will conclude that the less restrictive model (i.e., full hurdle model) is said to fit the data significantly better than the more restrictive model (i.e., WASH or non-WASH models).

RESULTS

General Information on the Studied Villages

The Community Development Plans of the studied areas revealed that they are constituted of 92% Haoussa people, 5% Peulhs, 1% Touaregs, and 2% coming from other tribes, with 99% of the overall population being Muslim (27–29). All communes report eight children on average per woman and around nine persons per household. Children under 15 years old represent 54% of the population. From an economic point of view, all the villages mention agriculture as the main source of livelihood and animal breeding as the secondary source of income. Climatic factors such as rainfall (max: 686 mm/year to min: 498 mm/year) and temperature (between 40°C in April/May to 18°C in January/February) are similar between villages.

The dunes and sandy areas represent about half of the area studied, and it is used for seasonal agriculture during the rainy season. The valleys represent one quarter of the area of the three communes where most of the population lives and practices irrigation in small vegetable gardens (+300 m altitude as the lowest point of the studied area). The remaining area is made of bushes used from grassing in higher and rocky land (+514 m as the highest point of the studied area).

Finally, it is important to notice that the area targeted for the study has never benefited from a cholera vaccination campaign. We have concluded to a similarity between the communes and villages studied.

Incidence of Cholera

The incidence of cholera in villages with respect to the level of WASH coverage is illustrated in **Figure 1**. It shows clearly that cholera incidence is negatively related to the level of WASH coverage, with higher incidence in the villages located in the south of the area where most of the WASH coverage is between medium to no WASH coverage.

The distribution of cholera cases, inhabitants, and number of villages regarding both the basic water access and the access to sanitation levels are presented in **Table 1**.

Odds Ratios

Using OR, strong links between CLTS and water coverages and prevalence of cholera were detected. Findings show that villages without access to safe water and sanitation are 5.38 times more likely to get cholera (95% confidence interval from 4.22 to 6.85; $P < 0.0001$). Alternatively, villages with full sanitation and water coverage are 7.88 less likely to get cholera (OR 0.13; 95% confidence interval 0.06–0.26; $P < 0.0001$) (**Figure 2**).

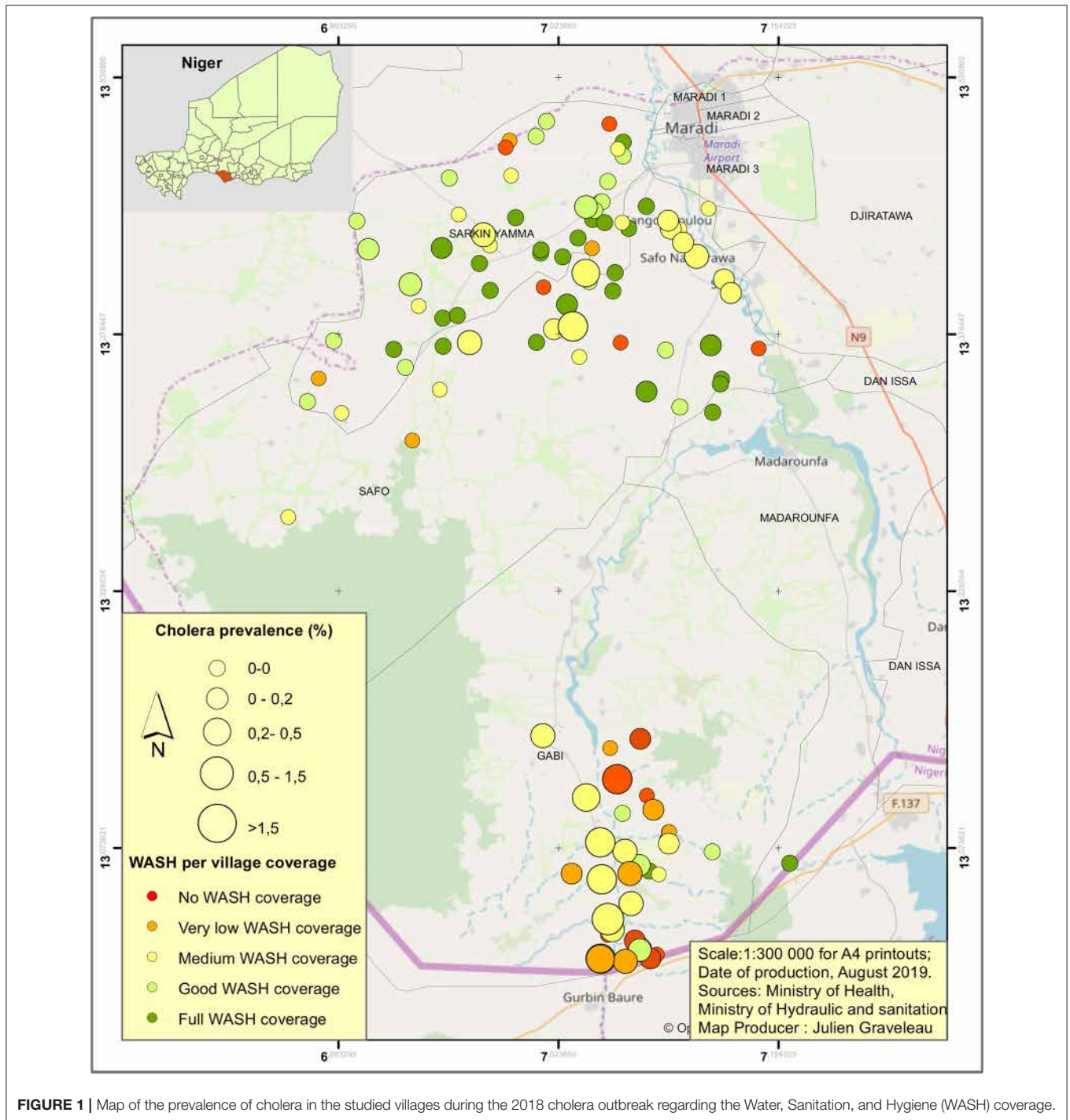


FIGURE 1 | Map of the prevalence of cholera in the studied villages during the 2018 cholera outbreak regarding the Water, Sanitation, and Hygiene (WASH) coverage.

Figure 2 shows that if partial access to safe water already has an impact on the risk of cholera (compared to no access), it seems that full CLTS coverage (capturing both sanitation and hand-washing facilities) is required at the village level to observe a significant impact. However, CLTS (sanitation and hygiene) has a stronger impact on cholera than only water access, as we observe that prevalence remains high at 1.28 (95% confidence interval from 1.05 to 1.55; $P < 0.0001$) for villages with full water

coverage but no sanitation. Once full CLTS is reached, prevalence of cholera drops significantly regardless of water coverage of the village.

In the dataset, the prevalence rate of cholera was 14.9 per 1,000 inhabitants in villages without water or sanitation (81 cases of cholera over 5,435 inhabitants), and only 0.4 per 1,000 inhabitants in villages with full access to sanitation and water (eight cases over 22,741 inhabitants).

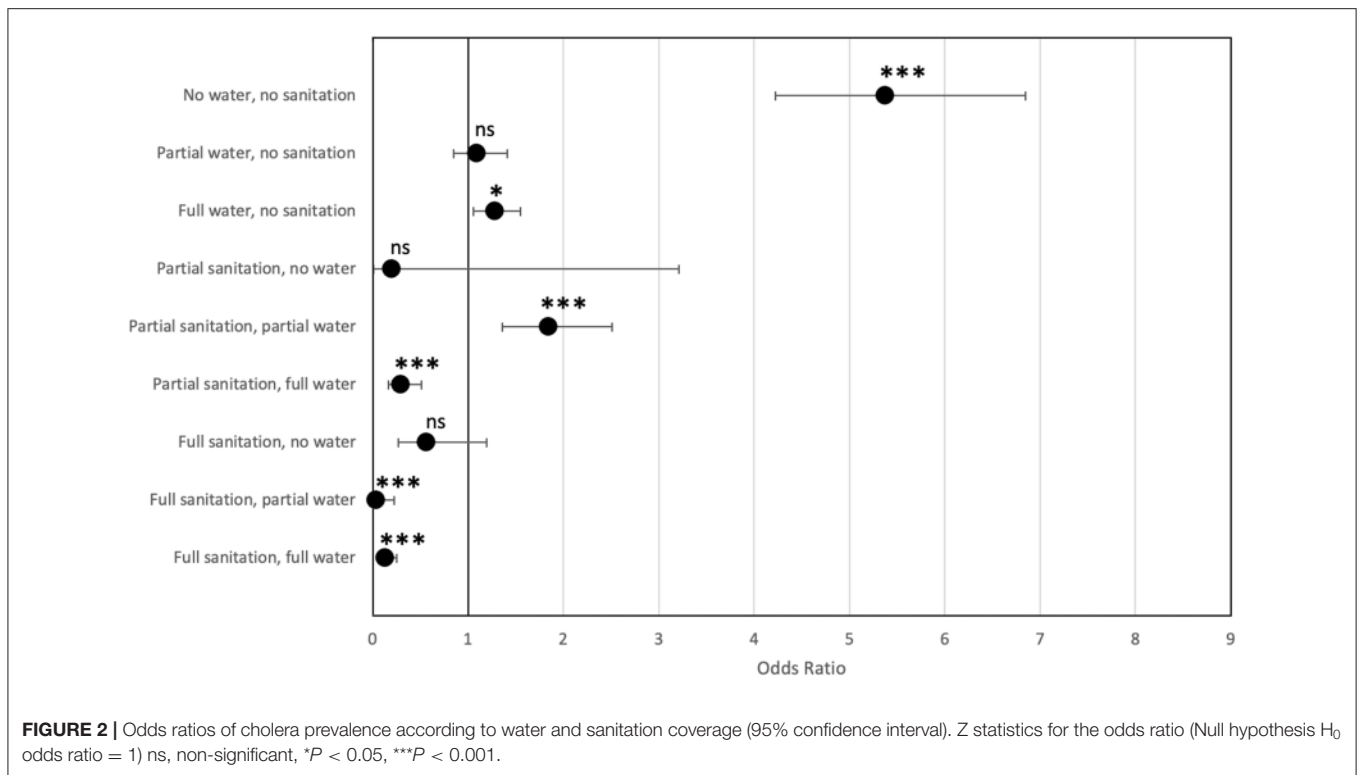


TABLE 2 | The log-likelihood test results between full Hurdle Model vs. Water, Sanitation, and Hygiene (WASH) only (model 1 vs. model 2) or vs. Non-WASH (model 1 vs. model 3).

Model	Log likelihood
Full Hurdle Model vs. WASH only (Model 1 vs. Model 2)	-309.55
Full Hurdle Model vs. Non-WASH (Model 1 vs. Model 3)	-325.59***

*** $P < 0.0001$.

Hurdle Models

The log-likelihood test results detailed in **Table 2** determined that the WASH-only model (Model 2) shows the best goodness-of-fit.

In terms of its contribution to the likelihood of cholera cases, only fully improved sanitation level shows significant contribution. Compared to the base case of having no access to improved sanitation at all, full access to improved sanitation decreases the likelihood of cholera by 91%, resulting as significant at a 99% confidence level ($P < 0.01$). Water access, both full and partial, is not significant to cholera cases at this level. None of the non-WASH factors, namely, distance to the nearest open-water source (in meters), distance of village to the nearest contaminated village (in meters), and access to dust road as explanatory factors, is significant (**Figure 1**).

When cholera cases actually occur, access to improved water sources corresponds to a decrease in cases of cholera. Cholera cases decrease by a factor of 4.354 where partial access to improved water source is observed, while full access to improved water source decreases it by a factor of 6.315. This is significant at

a 99% confidence level ($P < 0.01$). Full sanitation corresponds to a decrease of cholera cases by a factor for 4.923 times compared to having no access to improved sanitation. Non-WASH factors are statistically equivalent to zero. The results are similar when running WASH-only and non-WASH-only specifications (**Figure 2**).

One village of interest (Village Kabobi) has a disproportionate high prevalence of cholera compared to the rest of the villages (30). While not having a considerable impact in terms of conclusions (see **Supplementary Material 1**), we chose to exclude this village from the analysis given the possible effects that outliers can have when performing statistical estimation and testing (30). In this sense, we therefore preferred to underestimate the impact of CLTS on cholera outbreaks rather than the contrary (**Table 3**). With this in mind, the analysis (without the outlier) showed that full sanitation access has significant impact both when considering the likelihood of observing cholera cases and when having a relation with case magnitude when cholera cases are actually observed. The likelihood of cholera cases decreases by 91%, significant at a 99% confidence level ($P < 0.01$), with full sanitation access. Partial sanitation access decreases the likelihood by 78%, significant at a 95% confidence level ($P < 0.05$). When cholera cases are actually observed, cases decrease by a factor of 0.3 when there is full access to sanitation, which is lower, but still significant at a 95% confidence level ($P < 0.05$), compared to the analysis with Village Kabobi. Non-WASH factors considered in our models remain non-significant (**Supplementary Material 1**).

TABLE 3 | Full and partial [Water, Sanitation, and Hygiene (WASH) and non-WASH] hurdle models with village Kabobi.

Variables	Model (1)		Model (2)	
	Coefficients	Transformed [#]	Coefficients	Transformed [#]
COUNT MODEL				
Water Access–Partial	–1.471** (0.520)	–4.354**	–1.429** (0.524)	0.239**
Water access–Full	–1.843*** (0.500)	–6.315***	–1.696*** (0.463)	0.183***
Sanitation–Partial	0.518 (0.439)	0.518	0.521 (0.449)	1.683
Sanitation–Full	–1.594*** (0.434)	–4.923***	–1.547*** (0.442)	0.213***
Distance to Water	0.000016 (0.0000349)	1.000		
Distance to contaminated village	NA (NA)	NA		
Road access	0.246 (0.388)	0.246		
Log Theta	0.092 (0.13)	0.092	–0.118 (0.228)	
Intercept	5.342*** (0.395)	5.342***	5.555*** (0.432)	258.485***
ZERO HURDLE MODEL				
Water access–Partial	1.133 (0.668)	0.756	1.062 (0.647)	0.743
Water access–Full	1.281 (0.653)	0.782	1.168 (0.616)	0.763
Sanitation—Partial	–1.306 (0.6004)	0.213	–1.442 (0.567)	0.191
Sanitation–Full	–2.298*** (0.628)	0.091***	–2.526*** (0.519)	0.074***
Distance to water	–0.000042 (0.000163)	0.499		
Distance to contaminated village	–0.0000841 (0.000215)	0.484		
Road access	0.0606 (0.513)	0.499		
Intercept	0.178 (0.665)	0.544	–0.204 (0.499)	

Standard errors in parentheses. *** $P < 0.0001$, ** $P < 0.01$.

[#]Zero-part coefficients uses of logit link function; plogis() function was applied to transform the coefficients. The count-part coefficients were transformed via exponentiation.

DISCUSSION

In this study, we aimed to test the hypothesis of a significant association of the water and CLTS coverages on the burden of cholera during the 2018 cholera outbreak in Madarounfa, Niger. Both employed statistical methods point to a significant decrease of the burden of cholera with an increase of safe water access and CLTS coverages. OR results showed that villages without access to safe water and sanitation are 6.66 times (95% confidence interval from 5.2 to 8.53; $P < 0.0001$) more likely to get cholera. Alternatively, villages with full sanitation and full water coverages are 9.1 less likely to get cholera (OR 0.11; 95% confidence interval 0.05–0.22; $P < 0.0001$).

Using a hurdle model on the 125 villages, findings show that full access to improved sanitation and hygiene significantly

decreases the likelihood of observing cholera by 91% ($P < 0.0001$) compared to the villages with no access to improved sanitation at all.

Considering villages affected by cholera within the area of study, partial access to improved water sources decreases the cases of cholera by a factor of 4.3, while full access to improved water decreases the number of cholera cases by a factor of 6.3 compared to villages without access to water.

We did not find any other significant factors such as distance to nearest contaminated villages, distance to nearest surface water, or road access to have an influence on the burden of cholera at the village level.

Our results on cholera are consistent with the findings of discussing the positive health impacts of sanitation on diarrhea, even when the only water available was unimproved (8). In

addition, water improvements did not result in a reduction of cholera if sanitation remained unimproved, as shown for the health impacts of diarrhea (8). As for diarrhea, we showed that synergy of improvements in water and sanitation together is producing larger impacts than the case when implemented in the absence of the order, specifically in the rural context of our study.

Focusing more specifically on previous studies about the association between water, sanitation, and hygiene exposures and cholera, Wolfe et al. (13) in their systematic review and meta-analysis unexpectedly found that no sanitation factor or improved water source (with the exception of bottled water) was significantly protective against cholera. In this study, they do not doubt the effectiveness of these interventions, confirming that the risk factors are consistently risky, and that factors that are expected to interrupt cholera transmission indeed have the potential to do so but are not always effective due to the complexity of the transmission of cholera (13). Their main argument is because cholera is transmitted *via* multiple pathways, and intervention on one of them may not be enough to cut down the transmission. This is because individual interventions can have a different level of effectiveness, depending on the context. Despite the fact that the current sanitation ladder does not include waste treatment, they argued that the households that climbed the ladder from open defecation to improved sanitation have a reasonable epidemiological foundation. Considering this in our study, we were nevertheless able to find a significant association between the level of water coverage and sanitation and cholera transmission. With this statement, we however do not mean to imply that these are the only factors that explain and contribute to the containment (or outbreak) of cholera.

With the above discussion in mind, we must underline possible limitations of this study, starting from the cross-sectional nature of the data collection process. Indeed, the data were collected within a fixed time frame as a result of the cholera outbreak and therefore cannot provide a more general overview of the phenomenon as, for example, a longitudinal study would. Secondly, given the complexity of the hurdle model, which requires a considerable number of parameters to estimate, the sample size of 125 villages (for a population of 135,680 persons) is not exactly large, thereby relying more on the asymptotic approximation of the test statistics in the model (and possibly affecting the power of the analysis). Despite this, we still observed significant factors affecting the response variable. This is even more evident when including the outlier village of Kabobi (which reported an excessive prevalence of cholera compared to the others). However, note that due to data limitations on the field, we have not tried all possible combinations of models, so the inclusion of other variables remains a plausibility.

Some disparities were observed regarding the size of villages and their water and sanitation coverage. In fact, villages in Safo's Commune have an average of 2,144 inhabitants per village, while villages in Gabi and Sarkin Yamma are significantly smaller, with 807 inhabitants on average per village. More importantly, the villages without access to safe water are some of the smallest villages with an average of 450 inhabitants. Regarding water access, 87% (13 over 15) of the villages with more than 2,000 inhabitants have full water coverage. On the contrary, with regard to sanitation, the biggest villages are the ones with the

poorest sanitation coverage. In fact, villages that reached full CLTS coverage have an average population of 752 inhabitants. Those facts can be explained by the fact that the CLTS approach is recommended globally for villages with fewer than 1,500 inhabitants for good implementation (bigger villages can be targeted by the CLTS approach but will be split into suburbs). Moreover, for water supply access, development partners and government tend to prioritize the biggest villages to target a higher number of beneficiaries and deliver a more sizable impact. Finally, before targeting villages with the CLTS approach, access to water is considered a selection criterion for the village prior to any sanitation project. This will result in an underrepresentation number of villages without water but involved in completed or partially completed CLTS projects ($n = 10$).

Nevertheless, findings were proven significant, and villages studied have similar features (cultural, socio-economical, or environmental factors), which limit the influence of other factors other than their water and sanitation coverage. The main differences observed and considered between villages are environmental factors such as the presence of surface water (lake, rivers) often in lower lands, which also influence land use. Some environmental factors were considered in the study; however, we should not exclude the possibility of other factors (collective immunity, local beliefs, etc.), which could have influenced our findings but were not captured in our study.

The findings suggest that significant access to safe water and sanitation at the village level offer a strong barrier against cholera. Hence, if aiming for the elimination of cholera, findings show that partial improved water access could be enough to limit cholera; however, for a stronger impact, full sanitation and hygiene coverage are recommended, as the presence of these facilities shows more significant influence than water access on cholera. This is totally complementary to all other known factors such surveillance (early detection and reporting) and infection prevention and control, treatment of cases, and vaccination, which are just as important in the prevention and control of cholera.

One of the limitations to achieve that objective will be the sustainability of CLTS services. If the area studied was targeted recently by CLTS projects, a 2016 study on CLTS in Niger (UNICEF) shows that 5 years after ODF certification, 39% of households in ODF villages reported reversion to open defecation. In that case, CLTS and water coverages are certainly not the only factor influencing the burden of cholera, as sustainability of those WASH services is probably the key to long-term impact on cholera.

Keeping in mind the limitations of our observational and cross-sectional study, we found a strong and significant association between improved access to water and sanitation (or both) to reduce the cholera transmission during the 2018 outbreak in Madarounfa. It also shed light on the need for more studies on this specific subject with more controlled and large-scale data collection schemes. This will undoubtedly strengthen the knowledge on cholera elimination, but more than that, it will help produce more tailored recommendations for each context to improve the effectiveness of the measures to be taken to reduce cholera transmission.

Overall, the study confirms recent findings mentioning that targeting cholera in key hotspots is an efficient approach and that sanitation, hygiene, and better water access have potential to significantly reduce the likelihood of cholera.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JG and GC contributed to the conceptualization and funding acquisition. JG and AK contributed to data curation. JG, MR, RM, and GC contributed to the formal analysis. JG, MR, AK, RM, and GC contributed to the investigation, writing, review, and editing. JG, MR, and RM contributed to the methodology. JG contributed to the project administration. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This research was supported by the United Nations International Children's Emergency Fund in West and Central Africa Regional

Office, Senegal and institutional funds from the Institut de Recherche pour le Développement, France.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge the populations of Madarounfa District Niger. We kindly thank UNICEF for providing support to collect the data. We would also like to especially thank Ms. Aicha Arzika Issoufou from the Health Surveillance and Epidemic Response Division, Mr. Abdoul Karimou Sakola, director of the Madarounfa Department of Hydraulics and Sanitation, Mr. Yaou Zoumbeye, head of Sanitation Division of Maradi, Mr. Habibou Jika, Hygiene and Sanitation technician of the Madarounfa Medical District, and Mr. Mahaman Nourou Sanoussi, WASH Officer at UNICEF Maradi office. We gratefully acknowledge Jolly Ann Maulit from UNICEF WCARO in Dakar for their relevant comments and editions.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2021.643079/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Snow J. *On the Mode of Communication of Cholera*. London: John Churchill (1849).
- Goldstein BD. John snow, the broad street pump and the precautionary principle. *Environ Dev*. (2012) 1:3–9. doi: 10.1016/j.envdev.2011.12.002
- Sack DA. A new era in the history of cholera: the road to elimination. *Int J Epidemiol*. (2013) 42:1537–40. doi: 10.1093/ije/dyt229
- World Health Organization. Cholera, 2017. *Wkly Epidemiol Rec*. (2018) 93:489–500.
- World Health Organization. Cholera, 2019. *Weely Epidemiol Rec*. (2020) 95:441–8. Available online at: <http://www.who.int/wer>
- UNICEF. *WHO/UNICEF Joint Monitoring Programme for Water Supply, Sanitation and Hygiene (JMP) | UN_Water*. New York, NY (2018).
- Esrey SA, Potash JB, Roberts L, Shiff C. Effects of improved water supply and sanitation on ascariasis, diarrhoea, dracunculiasis, hookworm infection, schistosomiasis, and trachoma. *Bull World Health Organ*. (1991) 69:609–21.
- Esrey SA. Water, waste, and well-being: a multicountry study. *Am J Epidemiol*. (1996) 143:608–23. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a008791
- Anderson Y, Bohan P. Disease surveillance waterborne outbreaks. In: *Water quality: Guidelines, Standards Health. Assessment of Risk Risk Management for Water-Related Infectious Disease*. Fewtrell L, Bartram J. editors. Geneva: World Health Organisation (2001). p. 115–33.
- Hunter PR. *Waterborne Disease: Epidemiology and Ecology*. Hoboken, NJ: Wiley and Sons (1997). doi: 10.1016/S0033-3506(98)00228-5
- Lessler J, Moore SM, Luquero FJ, McKay HS, Grais R, Henkens M, et al. Mapping the burden of cholera in sub-Saharan Africa and implications for control: an analysis of data across geographical scales. *Lancet*. (2018) 391:1908–15. doi: 10.1016/S0140-6736(17)33050-7
- D'Mello-Guyett L, Greenland K, Bonneville S, D'Hondt R, Mashako M, Gorski A, et al. Distribution of hygiene kits during a cholera outbreak in Kasai-Oriental, Democratic Republic of Congo: A process evaluation. *Confl Health*. (2020) 14:51. doi: 10.1186/s13031-020-00294-w
- Wolfe M, Kaur M, Yates T, Woodin M, Lantagne D. A systematic review and meta-analysis of the association between water, sanitation, and hygiene exposures and cholera in case-control studies. *Am J Trop Med Hyg*. (2018) 99:534–45. doi: 10.4269/ajtmh.17-0897
- Schmidt WP. The elusive effect of water and sanitation on the global burden of disease. *Trop Med Int Heal*. (2014) 9:522–7. doi: 10.1111/tmi.12286
- Wierzbica TF. Oral cholera vaccines and their impact on the global burden of disease. *Hum Vaccines Immunother*. (2019) 15:1294–301. doi: 10.1080/21645515.2018.1504155
- Igere BE, Ekundayo CT. Global mapping of cholera *Vibrio* and outbreaks in the Pre-Millennium Development Goals (MDG)/Sustainable Development Goals (SDG) and MDGs/SDGs era of 1990–2019. *Microb Pathog*. (2020) 149:104319. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104319
- Baltazar CS, Rafael F, Langa JPM, Chicumba S, Cavailer P, Gessner BD, et al. Oral cholera vaccine coverage during a preventive door-to-door mass vaccination campaign in Nampula, Mozambique. *PLoS ONE*. (2018) 13:e0198592. doi: 10.1371/journal.pone.0198592
- Chatterjee P, Kanungo S, Dutta S. Challenges for programmatic implementation of killed whole cell oral cholera vaccines for prevention and control of cholera: a meta-opinion. *Expert Opin Biol Ther*. (2018) 18:983–8. doi: 10.1080/14712598.2018.1512578
- Fung ICH, Fitter DL, Borse RH, Meltzer MI, Tappero JW. Modeling the effect of water, sanitation, and hygiene and oral cholera vaccine implementation in Haiti. *Am J Trop Med Hyg*. (2013) 89:633–40. doi: 10.4269/ajtmh.13-0201
- Roskosky M, Acharya B, Shakya G, Karki K, Sekine K, Bajracharya D, et al. Feasibility of a comprehensive targeted cholera intervention in the Kathmandu Valley, Nepal. *Am J Trop Med Hyg*. (2019) 100:1088–97. doi: 10.4269/ajtmh.18-0863
- Global Task Force on Cholera Control (GTFCC) - Surveillance Working. *Interim Guidance Document on Cholera Surveillance*. WHO (2017). Available online at: https://www.who.int/cholera/task_force/GTFCC-Guidance-cholera-surveillance.pdf (accessed November 10, 2020).
- UNICEF. *Cholera Factsheet Niger*. (2018). Available online at: http://plateforme.cholera.info/attachments/article/235/Cholera%20Factsheet_Niger_2017_FINAL.pdf (accessed November 12, 2020).
- UNICEF. *WHO/UNICEF Joint Monitoring Programme for Water Supply, Sanitation and Hygiene (JMP) | UN_Water*. New York, NY (2019).

24. Hilbe JM. *Modeling Count Data*. Cambridge: Cambridge University Press (2014).
25. Kassahun W, Neyens T, Molenberghs G, Faes C, Verbeke G. Marginalized multilevel hurdle and zero-inflated models for overdispersed and correlated count data with excess zeros. *Stat Med*. (2014) 33:4402–19. doi: 10.1002/sim.6237
26. Arab A. Spatial and spatio-temporal models for modeling epidemiological data with excess zeros. *Int J Environ Res Public Health*. (2015) 12:10536–8. doi: 10.3390/ijerph120910536
27. Mairie de Safo Niger. *Plan de développement communal (PDC) de la commune rurale de Safo (2014-2018)*, Niger. Safo (2014).
28. Mairie de Gabi Niger. *Plan du développement communal replanifié 2018-2022, commune rurale de Gabi*, Niger. Gabi (2018).
29. Mairie de Sarkin Yamma Niger. *Plan de Développement communal de la commune rurale de Sarkin Yamma*, Niger. Sarkin Yamma (2018).
30. Maronna RA, Martin RD, Yohai VJ, Salibian-Barrera M. *Robust Statistics: Theory and Methods (with R), 2nd Edition*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc. (2019) doi: 10.1002/9781119214656

Conflict of Interest: 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.

Copyright © 2021 Graveleau, Reserva, Keita, Molinari and Constantin De Magny. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Antibiotic Resistance and Virulence Factors of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella Pneumoniae* Involved in Healthcare-Associated Infections in Dakar, Senegal

Issa NDIAYE^{*,1,7}, Bissoume Sambe BA², Farma THIAM⁸, Mouhamadou Moustapha BOYE², Ousmane SOW¹, Abdoulaye CISSÉ¹, Babacar NDIAYE⁶, Thierno Abdoulaye DIALLO⁶, Cheikh FALL¹, Yakhya DIEYE¹, Baidy DIÈYE³, Assane DIENG², Amadou DIOP³, Guillaume CONSTANTIN DE MAGNY^{4,5} and Abdoulaye SECK^{6,7}

Abstract

Background: Virulent and resistant *Klebsiella pneumoniae* strains are considered as one of the most significant causes of healthcare-associated infections (HAIs). The aim of this study was to investigate the phenotypic and genotypic factors of antibiotic resistance and virulence factors of ESBL *K. pneumoniae* strains isolated from healthcare-associated infections (HAIs) in Dakar, Senegal.

Methods: Twenty-eight strains of *K. pneumoniae* isolated from HAIs were collected from 2018 to 2021 in 2 main hospitals in Dakar. Antibiotic susceptibility and molecular characterization were studied using disk diffusion by the Kirby-Bauer method and PCR, respectively. Virulence factors were also determined by PCR.

Results: These ESBL *K. pneumoniae* isolates showed high resistance to antibiotics such as β -lactams, aminoglycosides, cyclins, fluoroquinolones and trimethoprim-sulfamethoxazole. Among these strains, ten (10) were resistant to carbapenem and ceftazidime (17.8%, n=5), chloramphenicol (25%, n=7) and fosfomycin (28.5%, n=8) considered as the most active antibiotics against ESBL-KP isolates. Eighteen (18) strains were considered as MDR and ten (10) strains as XDR.

For the genes associated to phenotypic resistance, β -lactams resistance was conferred through *bla_{SHV}* (24/28), *bla_{TEM}* (20/28) and mainly by *bla_{CTX-M}*. All strains carried the *bla_{CTX-M15}* gene. *OXA-48* (6/28) gene was found responsible for carbapenem resistance and other genes like IMP, VIM, NDM, OXA-23 were not detected. Plasmids-mediated resistance genes *qnrB* (16/28), *qnrS* (11/28) and *aac(6')-Ib* (21/28), were mostly responsible for resistance to fluoroquinolones and aminoglycosides. Also 3 of 6 virulence genes searched that are the most associated to the pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae* were found on these strains with *uge* (19/28), *mrKD* (21/28) and *fyuA* (13/28).

Conclusion: The ESBL *K. pneumoniae* strains isolated in this study showed a high prevalence of antibiotic resistance and virulence genes. The combination of these factors poses a potential risk for infections that could be highly virulent and difficult to treat. These findings demonstrated the importance of closely monitoring the resistance patterns of *K. pneumoniae* in hospital settings and emphasize the need to monitor effective antibiotic treatments for *K. pneumoniae* infections. Additionally, the scarcity of available data on HAIs, especially the prevalence of multidrug resistance bacteria and virulence factors associated with these HAIs in Senegal, further emphasizes the significance of implementing surveillance programs to better know their prevalence, impact on patient health and on length of hospital stays.

Affiliation:

¹Pôle de Microbiologie, Institut Pasteur de Dakar, Sénégal

²Laboratoire de Bactériologie et Virologie, Hôpital Aristide Le Dantec, Dakar, Sénégal

³Laboratoire de Bactériologie et Virologie, Hôpital Albert Royer, Dakar, Sénégal

⁴MIVEGEC, Université Montpellier, CNRS, IRD, Montpellier, France.

⁵MEEDiN, Montpellier Ecology and Evolution of Disease Network

⁶Laboratoire de Biologie Médicale, Institut Pasteur de Dakar, Sénégal

⁷Faculté de Médecine, Pharmacie et Odontostomatologie, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal

⁸Laboratoire de Biologie Médicale, Hôpital régional de Pikine

⁹World Health Organization WCARO, Dakar, Senegal

*Corresponding author:

Issa Ndiaye, Pole of Microbiology, Institut Pasteur Dakar, 36 Avenue Pasteur, Dakar, BP 220 Senegal.

Citation: Issa NDIAYE, Bissoume Sambe BA, Farma THIAM, Mouhamadou Moustapha BOYE, Ousmane SOW, Abdoulaye CISSÉ, Babacar NDIAYE, Thierno Abdoulaye DIALLO, Cheikh FALL, Yakhya DIEYE, Baidy DIÈYE, Assane DIENG, Amadou DIOP, Guillaume CONSTANTIN DE MAGNY and Abdoulaye SECK. Antibiotic Resistance and Virulence Factors of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella Pneumoniae* Involved in Healthcare-Associated Infections in Dakar, Senegal. Archives of Microbiology and Immunology. 7 (2023): 65-75.

Received: May 01, 2023

Accepted: May 23, 2023

Published: June 07, 2023

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, ESBL, antibiotic resistance, virulence genes, healthcare-associated infections.

Introduction

Antimicrobial resistance is a worldwide major public health problem, leading to elevated rates of illness and mortality, especially in immunocompromised patients [1]. Numerous reports and studies released by international organizations have outlined the far-reaching consequences of this issue on both healthcare and economic levels [2, 3].

Klebsiella pneumoniae is a Gram-negative, non-motile, encapsulated, lactose-fermenting, facultative anaerobic and rod shape bacterium belonging to the *Enterobacteriaceae* family [4]. *Klebsiella pneumoniae* is also among the ESKAPE pathogens which adopt different mechanisms to “escape” from different antimicrobials actions [5] and is frequently associated with a wide range of healthcare associated infections (HAIs) such as pneumonia, bacteremia, urinary tract infection (UTI), soft tissue and burn infections [6]. Infections due to *K. pneumoniae* are difficult to treat because of combination of both expression of virulence factors and emergence of antibiotic resistances [4]. Some hypervirulent serotypes are particularly associated with various clinical syndromes characterized by community-acquired *K. pneumoniae* bacteremia with primary liver abscess, metastatic meningitis and endophthalmitis [7].

Klebsiella pneumoniae strains isolated from HAIs have exhibited a notable degree of antibiotic resistance and epidemiological investigations have identified multiple genes within these *K. pneumoniae* strains that confer resistance to commonly prescribed antibiotics including beta-lactams, fluoroquinolones, aminoglycosides, cyclines, macrolides, lincosamides, folate inhibitors, and phenicol [8]. In low and middle income countries, multidrug resistant *K. pneumoniae* is one important driver of unfavorable outcome in infections, primarily because suitable treatment options are often either unavailable or unaffordable [9].

Resistance of *K. pneumoniae* to antibiotics can be attributed to various mechanisms including modification of antibiotic target sites, alteration of metabolic pathways, activation of efflux pump systems, change in membrane permeability and release of antibiotic-inactivating enzymes [10]. Antibiotic resistance is a complex and multifactorial mechanism resulting from antibiotic exposure in hospital settings. Consequently, the selective pressure created leads to the development of numerous genetic mechanisms of resistance [11]. The acquired resistance over the years has led to the emergence of strains that are classified as Multi Drug-Resistant (MDR), Extensively Drug-Resistant (XDR) and Pan Drug-Resistant (PDR) strains [12].

Pathogenicity of *K. pneumoniae* can be attributed to the presence of virulence genes which encode for different

types of virulence factors. These factors such as adhesin for attachment to host cells, capsules that are antiphagocytic, siderophores that aid the bacterium in its competition with the host for iron and other various endotoxins [13]. Virulence-associated genes searched includes those encoding regulators of mucoid phenotype A (*rmpA*), mucoviscosity associated gene (*magA*), uridine diphosphate galacturonate 4-epimerase gene (*uge*), type 3 fimbriae (*mrKD*), yersiniabactin receptor (*fyuA*) and the iron uptake system gene (*kfu*) which are responsible for colonization, invasion and pathogenicity, and have a predominant role in pathogenicity of *K. pneumoniae* strains isolated from HAIs [13, 14].

In Senegal, it is difficult to assess accurate incidence of healthcare associated infections due to limited research funds and a scarcity of published data. The few studies conducted in Senegal from 2005 to 2019 have shown a prevalence of healthcare associated infections ranging from 6.8% to 13.6% [15-19]. These studies have also identified highly resistant bacteria, including *K. pneumoniae* the most found one. However, none of them have investigated the molecular mechanisms of resistance. Therefore, the aim of this study is to investigate presence of key main virulence factors and the antibiotic resistance profiles of Extended-Spectrum Beta-lactamases (ESBL) strains of *K. pneumoniae* involved in HAIs in Dakar, Senegal, and the relationship between phenotypic and genetic patterns of antibiotic resistance. This is the first study investigating the molecular diversity of HAIs strains in Senegal.

Materials and Methods

Bacterial strains

In this retrospective study, we focused on 28 strains of *K. pneumoniae* isolated during routine laboratory activities from 2018 to 2021 of 2 major hospitals in Dakar, i.e. Hospital Aristide Le Dantec and the Center Albert Royer of Fann. Strains were isolated from various clinical specimens and were considered as hospital acquired if the infection occurs at least 48 hours after the hospitalization. As per international standard or university standard written ethical approval has been collected and preserved by the author(s).

The epidemiological data of collected strains were obtained from the registers at the bacteriology laboratory of each hospital. All laboratory techniques and procedures of isolation, identification, and storage of the included isolates in the current study were performed according to standards microbiological protocols included Gram staining, cultural characteristics on agar media and biochemical testing such as API 20E (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, France) or Vitek2® system (BioMérieux® -France).

The identification of *K. pneumoniae* isolates was then confirmed using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF/MS)

(Vitek MS; BioMérieux, Inc., Marcy-l'Etoile, France) in Pasteur Institute of Dakar.

Antibiotic susceptibility testing

Nineteen (19) antibiotics disks (Bio-Rad) were selected from the standard list proposed by CA-SFM/EUCAST version 2022 and interpreted according to the given guidelines. The cyclins (tetracycline, minocyclin and doxycyclin) were interpreted from the CLSI guidelines, version 2020. Stored cultures of *K. pneumoniae* strains were subcultured in Bromocresol purple (BCP) incubated at 37° for 24 h. Inoculum were adjusted to 1.5×10⁸ CFU, corresponding to 0.5 McFarland and streaked on Mueller Hinton agar (Oxoid, UK) surface with sterile swab. Antimicrobial susceptibility was determined by strain growth zone diameter using the Kirby-Bauer method and interpretation done according to CA-SFM/EUCAST (version 2022) and CLSI guidelines (version 2021).

The presence of an extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) was detected on the antibiogram by the synergy test based on the visualization of a "champagne cork" image between third- or fourth-generation cephalosporins and amoxicillin-clavulanic acid or piperacillin-tazobactam discs. The following 22 antimicrobials disks from Biorad were used: AMP: Ampicillin (10 µg), AMC: amoxicillin-clavulanic acid (20+10 µg), TIC: ticarcillin (75µg), TIM: ticarcillin-clavulanic acid (75+10 µg), FOX: cefoxitin (30 µg), CTX: cefotaxim (30 µg), CAZ: ceftazidime (30 µg), FEP: cefepime (30 µg), AZT: aztreonam (30 µg), IMP: imipenem (10 µg), ERT: ertapenem (10 µg), FOS: fosfomycin (10 µg), CIP: ciprofloxacin (5 µg), NOR: norfloxacin (10 µg), GN: gentamicin (10 µg), TMN: tobramycin (10 µg), AK: amikacin (30 µg), TET: tetracycline (30 µg), MIN: minocyclin (30 µg), DO: doxycyclin (30 µg), CHL: chloramphenicol (30 µg) and SXT: trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg).

Reference strain *E. coli* ATCC 25922 were used for quality control. Bacterial strains that were resistant to a minimum of at least 3 different classes of antibiotics were considered as MDR and those only susceptible to only one or two class of antibiotics and resistant to all sub classes in all classes of antibiotics were considered as XDR and PDR, respectively as previously described [12].

Detection of virulence and antibiotics resistance-associated genes by PCR

DNA extraction by thermolysis

Three colonies of each isolate on nutrient agar plate were picked and suspended in 200µl of distilled water. After vortexing, the cell suspension was boiled for 10 minutes and 150µl of the supernatant was collected after spinning for 10 minutes at 13,000 rpm in a microcentrifuge.

Determination of antimicrobial resistance genes

PCR was performed on Thermocycler 2720 (Applied Biosystems, Lincoln 113 Centre Drive, Foster City, California 94404 USA) to detect 26 antimicrobials resistance-associated genes include: β-lactamase genes (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CTX-M-1} group, *bla*_{CTX-M-2} group, *bla*_{CTX-M-8} group, *bla*_{CTX-M-9} group, *bla*_{CTX-M-25} group and *bla*_{CTX-M-15}), carbapenem resistance-associated genes (*IMP*, *NDM*, *OXA48*, *OXA23*, *VIM* and *KPC*), quinolone resistance-associated genes (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* and *qnrS*) and aminoglycoside resistance-associated genes (*aac(6′)-Ib*, *AadA1*).

Each reaction included positive and negative controls. The PCRs were carried out in 20 µl reaction volume (2.5 µl DNA + 17.5 Master Mix FIREPol® + 0.5µl of each primer). All primers used and PCR thermo cycling conditions in this study are listed in Table 5 and 6 respectively (Supplementary). PCR products were loaded on a 1.5% (w/v) agarose gel stained with ethidium bromide (0.5 mg/mL), electrophoretic migrations were done at 120 volts for 45 min in 1X TAE buffer and amplified fragments visualized using a GelDoc imager (BioRad).

Detection of virulence genes

Distribution of 6 genes (*rmpA*, *mrKD*, *kfu*, *magaA*, *uge*, *fyuA*) associated with the virulence of *K. pneumoniae* were investigated. PCR were carried out with their specific primers and all PCR thermo cycling conditions are listed respectively in Table 7 and Table 8 (Supplementary).

Data were entered and analyzed using Excel.

Results

Total isolates

Twenty-eight (28) *K. pneumoniae* strains isolated from patients with HAIs were collected. Strains were isolated from 2018 to 2021 from different clinical samples: wound (n=14), urine (n=7), bacteremia (n=7).

Antimicrobial susceptibility testing

Among the 22 antibiotics tested, antimicrobial susceptibility tests demonstrated that all the 28 strains were resistant to amoxicillin + clavulanic acid, ticarcillin + clavulanic acid, cefotaxim, ceftazidime, cefepime, aztreonam and cyclins (Table 1). Very high resistance rates (70-96.8%) were found for piperacillin + tazobactam, ciprofloxacin, norfloxacin, gentamicin, tobramycin, amikacin, trimethoprim/sulfamethoxazole. Ertapenem moderate resistance rates were found (32.1%) while a lowest level rate of resistance was found for imipenem (17.8%), cefoxitin (17.8%), chloramphenicol (25%) and fosfomycin (28.5%) (Table 1). Our work has shown ten carbapenem resistant strains in our cohort. Eighteen strains (64.3%) were considered as MDR as

Table 1: Antibiotic Resistance of *K. pneumoniae* strains isolated from healthcare-associated

Group	Antibiotics	Resistance Rate N (%)
β-lactams	Amoxicillin + clavulanic acid	28 (100)
	Ticarcillin + clavulanic acid	28 (100)
	Piperacillin + tazobactam	22 (78.5)
	Cefoxitin	5 (17.8)
	Cefotaxim	28 (100)
	Ceftazidime	28 (100)
	Cefepime	28 (100)
Monobactams	Aztreonam	28 (100)
Carbapenems	Ertapenem	9 (32.1)
	Meropenem	6 (21.4)
	Imipenem	6 (21.4)
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin	27 (96.4)
	Norfloxacin	23 (82.1)
Aminoglycosides	Gentamicin	21 (75)
	Tobramycin	23 (82.1)
	Amikacin	20 (71.4)
Cyclins	Tetracycline	28 (100)
	Minocyclin	28 (100)
	Doxycyclin	28 (100)
Phosphonic acids	Fosfomycin	8 (28.5)
Phenicol	Chloramphenicol	7 (25)
Folate pathway inhibitor	trimethoprim/sulfamethoxazole	26 (92.8)

they were resistant to 1 antibiotic in 3 different classes and 10 strains (35.7) were XDR Table 4.

Gene diversity of antimicrobial resistance genes

The results of the current study showed that all of the strains harbored at least one ESBL gene. Specifically, 22 strains (78.5%) positives for *bla_{TEM}*, 21 (75%) for *bla_{SHV}*, and 21 strains (75%) for *bla_{OXA-1}*. All the strains were positives for *bla_{CTX-M}* with the variant *bla_{CTX-M15}* identified in all of the 28 strains. For carbapenems, among the 10 resistant strains (35%), six (6) were found to carried *OXA-48* gene and were phenotypically resistant to all antibiotics belonging to this

class of antibiotics. The *aac(6')-Ib* gene that confer resistance to aminoglycosides was found in 21 strains (75%). Regarding fluoroquinolone resistance, gene *qnrB* were detected for 16 strains (57.1%), *qnrS* for 11 strains (39.3%), *gyrB* for 3 strains (10.7%) and *parE*, *qnrA*, *qnrC* and *qnrD* for 1 strain respectively (3.6%). (Table 2 and Table 4).

Molecular detection of virulence genes

Three virulence genes were detected in the 28 strains: *uge* (19, 67.8%), *mrKD* (21, 75%) and *fyuA* (13, 46.4%) (Table 3). Among the different virulence genes, we found *mrKD* gene

Table 2: Genotypic resistance profile of 28 *K. pneumoniae* strains isolated from health-care associated infections

Group	Resistance Genes	N (%)
β-lactams	<i>bla_{CTX-M1}</i>	28 (100)
	<i>bla_{CTX-M15}</i>	28 (100)
	<i>bla_{TEM}</i>	20 (71.4)
	<i>bla_{SHV}</i>	24 (85.7)
	<i>bla_{OXA-1}</i>	21 (75)
Carbapenems	<i>OXA-48</i>	6 (21.4)
Fluoroquinolones	<i>gyrB</i>	3 (10.7)
	<i>parE</i>	1 (3.6)
	<i>qnrA</i>	1 (3.6)
	<i>qnrB</i>	16 (57.1)
	<i>qnrC</i>	1 (3.6)
	<i>qnrD</i>	1 (3.6)
	<i>qnrS</i>	11 (39.3)
Aminoglycosides	<i>aac(6')-Ib</i>	21 (75)

Table 3: Distribution of virulence genes amongst the *K. pneumoniae* from health-care associated infections.

Virulence factors	Genes	N (%)
Metabolic enzyme	<i>uge</i>	19 (67.8)
Type 3 fimbriae	<i>mrKD</i>	21 (75)
Yersiniabactin receptor	<i>fyuA</i>	13 (46.4)

Table 4: Characterization of *K. pneumoniae* isolated from healthcare-associated infections

Isolate	Resistance profile	Resistance type	Antibiotic resistance gene	Virulence gene
1KP1	AMC, TIM, TZP, CTX, CAZ, FEP, ATM, CIP, NOR, GM, TMN, AKN, TET, MN, DO, SXT	MDR	<i>blaTEM, blaSHV, blaOXA-1, blaCTX-M15, QnrB, aac(6')-Ib</i>	<i>mrkD, uge</i>
1KP2	AMC, TIM, TZP, FOX, CTX, CAZ, FEP, ATM, ERT, MEM, IMP, CIP, NOR, GM, TMN, AKN, TET, MN, DO, SXT	XDR	<i>blaTEM, blaSHV, blaOXA-1, blaCTX-M15, OXA-48, QnrB, aac(6')-Ib</i>	<i>mrkD, uge</i>
1KP3	AMC, TIM, TZP, FOX, CTX, CAZ, FEP, ATM, ERT, CIP, NOR, FOS, GM, TMN, AKN, TET, MN, DO, SXT	XDR	<i>blaTEM, blaSHV, blaOXA-1, blaCTX-M15, QnrB, aac(6')-Ib</i>	<i>mrkD, uge</i>
1KP4	AMC, TIM, TZP, CTX, CAZ, FEP, ATM, CIP, NOR, FOS, GM, TMN, AKN, TET, MN, DO, SXT	MDR	<i>blaTEM, blaSHV, blaOXA-1, blaCTX-M15, QnrB, QnrD, aac(6')-Ib</i>	<i>mrkD, uge, fyuA</i>
1KP5	AMC, TIM, TZP, CTX, CAZ, FEP, ATM, ERT, MEM, IMP, CIP, NOR, GM, TMN, AKN, TET, MN, DO, SXT	MDR	<i>blaTEM, blaSHV, blaOXA-1, blaCTX-M15, OXA-48, QnrB, aac(6')-Ib</i>	<i>mrkD, uge, fyuA</i>
1KP9	AMC, TIM, TZP, FOX, CTX, CAZ, FEP, ATM, ERT, MEM, IMP, CIP, NOR, FOS, GM, TMN, AKN, TET, MN, DO, SXT	XDR	<i>blaTEM, blaSHV, blaOXA-1, blaCTX-M15, OXA-48, QnrB, aac(6')-Ib</i>	<i>mrkD</i>
1KP10	AMC, TIM, TZP, CTX, CAZ, FEP, ATM, CIP, NOR, FOS, GM, TMN, AKN, TET, MN, DO, SXT	XDR	<i>blaTEM, blaSHV, blaOXA-1, blaCTX-M15, QnrB, aac(6')-Ib</i>	<i>fyuA</i>
1KP11	AMC, TIM, TZP, CTX, CAZ, FEP, ATM, ERT, CIP, NOR, GM, TMN, AKN, TET, MN, DO, SXT	MDR	<i>blaTEM, blaSHV, blaOXA-1, blaCTX-M15, QnrB, aac(6')-Ib</i>	
1KP12	AMC, TIM, TZP, CTX, CAZ, FEP, ATM, ERT, CIP, NOR, GM, TMN, AKN, TET, MN, DO, SXT	MDR	<i>blaSHV, blaOXA-1, blaCTX-M15, QnrB, aac(6')-Ib</i>	<i>mrkD, uge, fyuA</i>
1KP13	AMC, TIM, TZP, CTX, CAZ, FEP, ATM, CIP, NOR, GM, TMN, AKN, TET, MN, DO, SXT	MDR	<i>blaSHV, blaOXA-1, blaCTX-M15, QnrS, aac(6')-Ib</i>	<i>mrkD, uge</i>
1KP14	AMC, TIM, CTX, CAZ, FEP, ATM, CIP, NOR, TET, MN, DO, SXT	MDR	<i>blaSHV, blaCTX-M1, QnrS</i>	
1KP15	AMC, TIM, CTX, CAZ, FEP, ATM, FOS, TET, MN, DO, SXT	MDR	<i>blaTEM, blaCTX-M15, QnrS</i>	
1KP16	AMC, TIM, TZP, FOX, CTX, CAZ, FEP, ATM, ERT, IMP, MEM, CIP, GM, TMN, TET, MN, DO, CHL, SXT	XDR	<i>blaCTX-M15, OXA-48, QnrS</i>	<i>mrkD, uge, fyuA</i>
2KP1	AMC, TIM, TZP, CTX, CAZ, FEP, ATM, CIP, NOR, GM, TMN, AKN, TET, MN, DO, SXT	MDR	<i>blaSHV, blaOXA-1, blaCTX-M15, QnrS, aac(6')-Ib</i>	
2KP3	AMC, TIM, TZP, CTX, CAZ, FEP, ATM, CIP, NOR, GM, TMN, AKN, TET, MN, DO	MDR	<i>blaOXA-1, blaCTX-M15, GyrB, QnrS, aac(6')-Ib</i>	<i>mrkD, uge</i>
2KP4	AMC, TIM, CTX, CAZ, FEP, ATM, CIP, NOR, GM, TMN, TET, MN, DO	MDR	<i>blaTEM, blaSHV, blaCTX-M15, QnrB</i>	
2KP5	AMC, TIM, TZP, FOX, CTX, CAZ, FEP, ATM, ERT, MEM, IMP, CIP, NOR, GM, TMN, AKN, TET, MN, DO, CHL, SXT	XDR	<i>blaTEM, blaSHV, blaOXA-1, blaCTX-M15, OXA-48, QnrS, aac(6')-Ib</i>	<i>mrkD, uge, fyuA</i>
2KP7	AMC, TIM, TZP, CTX, CAZ, FEP, ATM, ERT, CIP, NOR, GM, TMN, AKN, MN, CHL, SXT	XDR	<i>blaTEM, blaSHV, blaOXA-1, blaCTX-M15, OXA-48, QnrS, aac(6')-Ib</i>	<i>mrkD, uge, fyuA</i>
2KP8	AMC, TIM, TZP, CTX, CAZ, FEP, ATM, CIP, NOR, GM, TMN, AKN, TET, MN, DO, SXT	MDR	<i>blaTEM, blaSHV, blaOXA-1, blaCTX-M15, QnrB, aac(6')-Ib</i>	<i>mrkD, uge, fyuA</i>
2KP9	AMC, TIM, TZP, CTX, CAZ, FEP, ATM, ERT, CIP, NOR, FOS, GM, TMN, AKN, TET, MN, DO, CHL, SXT	XDR	<i>blaOXA-1, blaCTX-M15, parE, QnrA, aac(6')-Ib</i>	<i>uge</i>
2KP11	AMC, TIM, CTX, CAZ, FEP, ATM, CIP, TET, MN, DO, SXT	MDR	<i>blaTEM, blaSHV, blaCTX-M1, blaCTX-M15, QnrB</i>	<i>mrkD, uge, fyuA</i>
2KP12	AMC, TIM, CTX, CAZ, FEP, ATM, CIP, TET, MN, DO, SXT	MDR	<i>blaTEM, blaSHV, blaCTX-M1, blaCTX-M15, QnrB</i>	<i>mrkD, uge, fyuA</i>
2KP13	AMC, TIM, TZP, CTX, CAZ, FEP, ATM, CIP, NOR, FOS, GM, TMN, AKN, TET, MN, DO, SXT	XDR	<i>blaTEM, blaSHV, blaOXA-1, blaCTX-M1, blaCTX-M15, GyrB, QnrS, aac(6')-Ib</i>	<i>mrkD, fyuA</i>
2KP14	AMC, TIM, TZP, CTX, CAZ, FEP, ATM, CIP, NOR, GM, TMN, AKN, TET, MN, DO, SXT	MDR	<i>blaOXA-1, blaTEM, blaSHV, blaCTX-M1, blaCTX-M15, QnrB, aac(6')-Ib</i>	<i>mrkD, uge, fyuA</i>
2KP15	AMC, TIM, CTX, CAZ, FEP, ATM, TET, MN, DO, CHL, SXT	MDR	<i>blaTEM, blaCTX-M1, blaCTX-M15, QnrC, QnrS</i>	<i>mrkD, uge, fyuA</i>
2KP16	AMC, TIM, TZP, CTX, CAZ, FEP, ATM, CIP, NOR, TMN, AKN, TET, MN, DO, SXT	MDR	<i>blaOXA-1, blaCTX-M1, blaCTX-M15, QnrS, aac(6')-Ib</i>	<i>mrkD</i>
2KP18	AMC, TIM, TZP, CTX, CAZ, FEP, ATM, CIP, NOR, FOS, GM, TMN, AKN, TET, MN, DO, SXT	MDR	<i>blaTEM, blaSHV, blaOXA-1, blaCTX-M1, blaCTX-M15, QnrB, aac(6')-Ib</i>	<i>mrkD, uge</i>
2KP20	AMC, TIM, TZP, FOX, CTX, CAZ, FEP, ATM, CIP, NOR, FOS, GM, TMN, AKN, TET, MN, DO, SXT	XDR	<i>blaTEM, blaOXA-1, blaCTX-M1, blaCTX-M15, GyrB, QnrB, aac(6')-Ib</i>	<i>mrkD, uge</i>

Citation: Issa NDIAYE, Bissoume Sambe BA, Farma THIAM, Mouhamadou Moustapha BOYE, Ousmane SOW, Abdoulaye CISSÉ, Babacar NDIAYE, Thierno Abdoulaye DIALLLO, Cheikh FALL, Yakhya DIEYE, Baidy DIËYE, Assane DIENG, Amadou DIOP, Guillaume CONSTANTIN DE MAGNY and Abdoulaye SECK. Antibiotic Resistance and Virulence Factors of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella Pneumoniae* Involved in Healthcare-Associated Infections in Dakar, Senegal. Archives of Microbiology and Immunology. 7 (2023): 65-75.

Table 5: Sequencing of primers used in PCR for 32 antimicrobials resistance-associated genes of *K. pneumoniae*

Gene	Oligo sequence (5'-3')	Product size (bp)	Reference
β-lactams genes			
blaTEM	F ATGAGTATTCAACATTCCG	858	Dossouvi et al. 2022[34]
	R CCAATGCTTATTCAGTGAGG		
blaSHV	F TTATCTCCCTGTTAGCCACC	800	Dossouvi et al. 2022[34]
	R GATTTGCTGATTTTCGCTCGG		
CTX-M	F ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC	592	Dossouvi et al. 2022[34]
	R GGGTRAARTARGTSACCAGAAYSAGCGG		
CTX-M-2	F ATGATGACTCAGAGCATTTCGCCG	876	Dossouvi et al. 2022[34]
	R TCAGAAAACCGTGGGTTACGATTTT		
CTX-M-9	F GTGACAAAAGAGAGTGCAACGG	327	Dossouvi et al. 2022[34]
	R ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC		
CTX-M-1	F GGTAAAAAATCACTGCGTC	873	Dossouvi et al. 2022[34]
	R TTACAAACCGTYGGTGACGA		
CTX-M-15	F CACACGTGGAATTTAGGGACT	995	Dossouvi et al. 2022[34]
	R GCCGCTAAGGCGATAAACA		
CTX-M-8	F TGATGAGACATCGCGTTAAG	666	Dossouvi et al. 2022[34]
	R TAACCGTCGGTGACGATTTT		
CTX-M-25	F GCACGATGACATTCCGGG	327	Dossouvi et al. 2022[34]
	R AACCCACGATGTGGGTAGC		
Carbapenems resistance-associated genes			
IMP	F GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC	188	Kaczmarek, Dib-Hajj et al. [35]
	R CCAAACCACTAGGTTATCT		
NDM	F GGTTTGGGGATCTGGTTTTTC	621	Eyvazi, Hakemi-Vala et al. [36]
	R CGGAATGGCTCATCACGATC		
OXA-48	F TTGGTGGCATCGATTATCGG	743	Lee and Choi. [37]
	R GAGCACTTCTTTTGTGATGATGGC		
OXA-23	F TCTGGTTGTACGGTTCAGCA	718	Smyth, O'Flaherty et al. [38]
	R GCAAAAAGCGACAATTTTCC		
VIM 2004	F GTTTGGTTCGCATATCGCAAC	382	Manoharan, Chatterjee et al. [39]
	R AATGCGCAGCACCAGGATAG		
KPC	F CTGCTTGTCTCTCATGGCC	795	Lee and Choi. [37]
	R CCTCGCTGTGCTTGTATCC		
Quinolons resistance-associated genes			
gyrA	F TACACCGGTCAACATTGAGG	647	Dossouvi [40]
	R TTAATGATTGCCGCCGTCGG		
parE	F ATGCGTGCGGCTAAAAAAGTG	289	Dossouvi [41]
	R TCGTCGTCAGGATCGATAC		
gyrB	F TGAATGACCCGCCGTAAGG	309	Dossouvi [41]
	R GCTGTGATAACGCAAGTTGTCGGG		
parC	F GTCTGAACTGGGCCTGAATGC	248	Dossouvi [41]
	R AGCAGCTCGGAATATTTTCGACAA		
qnrA	F TCAGCAAGAGGATTCTA	657	Dossouvi [41]
	R GGCAGCACTATTACTCCC		
qnrB	F TACACCGGTCAACATTGAGG	469	Dossouvi [41]
	R TTAATGATTGCCGCCGTCGG		
qnrC	F GGGTTGTACATTTATTGAATCG	307	Dossouvi [41]
	R CACCTACCCATTTATTTCA		
qnrD	F TGTGATTTTTTCAGGGGTTGA	520	Dossouvi [41]
	R CCTGCTCTCCATCCAACCTC		
qnrS	F ACGACATTGTCAACTGCAA	417	Dossouvi [41]
	R TAAATTGGCACCCCTGTAGGC		
Aminoglycosids resistance-associated genes			
aac(6')-Ib	F TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	482	Dossouvi [41]
	R CTGGAATGCCTGGCGTGTTT		
QepA	F AACTGCTTGAGCCCGTAGAT	596	Dossouvi [41]
	R GTCTACGCCATGGACCTCAC		
AadA1	F TATCCAGCTAAGCGCAACT	447	Heidary, Momtaz et al. [42]
	R ATTTGCCGACTACCTTGGTC		

Citation: Issa NDIAYE, Bissoume Sambe BA, Farma THIAM, Mouhamadou Moustapha BOYE, Ousmane SOW, Abdoulaye CISSÉ, Babacar NDIAYE, Thierno Abdoulaye DIALLO, Cheikh FALL, Yakhya DIEYE, Baidy DIÈYE, Assane DIENG, Amadou DIOP, Guillaume CONSTANTIN DE MAGNY and Abdoulaye SECK. Antibiotic Resistance and Virulence Factors of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella Pneumoniae* Involved in Healthcare-Associated Infections in Dakar, Senegal. Archives of Microbiology and Immunology. 7 (2023): 65-75.

Table 6: Thermo cycling conditions of PCR for 32 antimicrobials resistance-associated genes of *K. pneumoniae*

Genes	Cycling condition					Reference	
	Initial denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	No. Of cycles		Final extension
β-lactams genes							
blaTEM	94°C/10min	94°C/1min	60°C/1min	72°C/2min	30	72°C/10min	Dossouvi et al. 2022[34]
blaSHV	94°C/10min	94°C/1min	60°C/1min	72°C/2min	30	72°C/10min	Dossouvi et al. 2022[34]
CTX-M	95°C/3min	94°C/1min	55°C/1min	72°C/1min	35	72°C/3min	Dossouvi et al. 2022[34]
CTX-M-2	95°C/3min	94°C/1min	56°C/1min	72°C/1min	35	72°C/7min	Dossouvi et al. 2022[34]
CTX-M-9	95°C/3min	94°C/1min	55°C/1min	72°C/1min	35	72°C/3min	Dossouvi et al. 2022[34]
CTX-M-1	95°C/3min	94°C/1min	50°C/1min	72°C/1min	35	72°C/7min	Dossouvi et al. 2022[34]
CTX-M-15	95°C/3min	94°C/1min	50°C/1min	72°C/1min	35	72°C/7min	Dossouvi et al. 2022[34]
CTX-M-8	95°C/3min	94°C/1min	52°C/1min	72°C/1min	35	72°C/7min	Dossouvi et al. 2022[34]
CTX-M-25	95°C/3min	94°C/1min	52°C/1min	72°C/1min	35	72°C/7min	Dossouvi et al. 2022[34]
Carbapenems resistance-associated genes							
IMP	94°C/4min	94°C/40s	52°C/40s	72°C/45s	35	72°C/4min	Kaczmarek, Dib-Hajj et al.
NDM	95°C/3min	94°C/30s	58°C/1min	72°C/1min	30	72°C/7min	Eyvazi, Hakemi-Vala et al. [36]
OXA-48	95°C/3min	94°C/30s	58°C/1min	72°C/1min	30	72°C/7min	Lee and Choi. [37]
OXA-23	95°C/3min	94°C/30s	58°C/1min	72°C/1min	30	72°C/7min	Smyth, O'Flaherty et al. [38]
VIM 2004	95°C/3min	94°C/30s	58°C/1min	72°C/1min	30	72°C/7min	Manoharan, Chatterjee et al. [39]
KPC	95°C/3min	94°C/30s	58°C/1min	72°C/1min	30	72°C/7min	Lee and Choi. [37]
Quinolons resistance-associated genes							
gyrA	94°C/5min	94°C/30s	60°C/1min	72°C/1min	30	72°C/10min	Dossouvi [41]
parE	94°C/5min	94°C/30s	60°C/1min	72°C/1min	30	72°C/10min	Dossouvi [41]
gyrB	94°C/5min	94°C/30s	60°C/1min	72°C/1min	30	72°C/10min	Dossouvi [41]
parC	94°C/5min	94°C/30s	60°C/1min	72°C/1min	30	72°C/10min	Dossouvi [41]
qnrA	94°C/5min	94°C/30s	55°C/1min	72°C/1min	30	72°C/10min	Dossouvi [41]
qnrB	94°C/5min	94°C/30s	55°C/1min	72°C/1min	30	72°C/10min	Dossouvi [41]
qnrC	94°C/5min	94°C/30s	55°C/1min	72°C/1min	30	72°C/10min	Dossouvi [41]
qnrD	94°C/5min	94°C/30s	55°C/1min	72°C/1min	30	72°C/10min	Dossouvi [41]
qnrS	94°C/5min	94°C/30s	55°C/1min	72°C/1min	30	72°C/10min	Dossouvi [41]
Aminoglycosids resistance-associated genes							
aac(6)-Ib	94°C/5min	94°C/30s	55°C/1min	72°C/1min	30	72°C/10min	Dossouvi [41]
QepA	95°C/15min	95°C/60s	55°C/60s	72°C/60s	30	72°C/5min	Dossouvi [41]
AadA1	96°C/6min	95°C/70s	60°C/65s	72°C/90s	33	72°C/8min	Heidary, Momtaz et al. [42]

Citation: Issa NDIAYE, Bissoume Sambe BA, Farma THIAM, Mouhamadou Moustapha BOYE, Ousmane SOW, Abdoulaye CISSÉ, Babacar NDIAYE, Thierno Abdoulaye DIALLO, Cheikh FALL, Yakhya DIEYE, Baidy DIËYE, Assane DIENG, Amadou DIOP, Guillaume CONSTANTIN DE MAGNY and Abdoulaye SECK. Antibiotic Resistance and Virulence Factors of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella Pneumoniae* Involved in Healthcare-Associated Infections in Dakar, Senegal. Archives of Microbiology and Immunology. 7 (2023): 65-75.

Table 7: Sequencing of primers used in PCR for 6 virulence-associated genes of *K. pneumoniae*

Gene	oligo sequence (5'-3')	Product size (bp)	Reference
rmpA	F ACTGGGCTACCTCTGCTTCA	535	Hossain, De Silva et al. [14]
	R CTTGCATGAGCCATCTTTCA		
mrKD	F CCACCAACTATTCCTCGAA	240	Hossain, De Silva et al. [14]
	R ATGGAACCCACATCGACATT		
kfu	F GAAGTGACGCTGTTTCTGGC	797	Hossain, De Silva et al. [14]
	R TTTTCGTGTGGCCAGTGACTC		
magA	F GGTGCTTTTACATCATTGC	1280	Aher, Roy et al. [13]
	R GCAATGGCCATTTGCGTTAG		
uge	F TCTTCACGCCTTCCTTCACT	534	Aher, Roy et al. [13]
	R GATCATCCGGTCTCCCTGTA		
fyuA	F TGATTAACCCCGCGACGGGAA	880	Kanaan, Al-Shadeedi et al. [43]
	R CGCAGTAGGCACGATGTTGTA		

Table 8: Thermo cycling conditions of PCR for 6 virulence-associated genes of *K. pneumoniae*

Genes	Initial denaturation	Cycling condition				No. Of cycles	Final extension	Reference
		Denaturation	Annealing	Extension				
rmpA	95°C/5min	95°C/60s	53°C/60s	72°C/60s	30	72°C/5min	Hossain, De Silva et al. [14]	
mrKD	94°C/4min	94°C/30s	52°C/40s	72°C/60s	30	72°C/10min	Hossain, De Silva et al. [14]	
kfu	94°C/5min	94°C/60s	54°C/45s	72°C/60s	35	72°C/10min	Hossain, De Silva et al. [14]	
magA	94°C/1min	94°C/30s	59°C/45s	72°C/2min	30	72°C/6min	Aher, Roy et al. [13]	
uge	94°C/5min	94°C/60s	54°C/45s	72°C/60s	35	72°C/10min	Aher, Roy et al. [13]	
fyuA	95°C/4min	95°C/50s	58°C/60s	72°C/45s	30	72°C/8min	Kanaan, Al-Shadeedi et al. [43]	

alone in three strains (10.7%), association *mrKD* + *fyuA* in one strain (7.1%), association *mrKD* + *uge* in 7 strains (25%), and association *mrKD* + *uge* + *fyuA* in 11 strains (39.3%).

Discussion

The aim of this study was to investigate the distribution of virulence genes, phenotypic and genotypic patterns of antibiotic resistance among ESBL strains of *K. pneumoniae* isolated from HAIs from 2018 to 2021 in two hospitals (Dantec and Albert Royer) in Dakar, Senegal. In our study, all *K. pneumoniae* isolates showed MDR patterns displaying high rates of resistance to commonly used antibiotics for treating *K. pneumoniae* infections, such as β -lactams (100%), aminoglycosides (82.1%), fluoroquinolones (96.4%), cyclins (100%), Fosfomycin (28.5%) and trimetoprim-sulfamethoxazole (92.8%). A worldwide meta-analysis with 47 studies estimated the prevalence of antibiotic resistance in healthcare-associated MDR *K. pneumoniae* [20]. According to this meta-analysis, the resistance rates to various classes of antibiotics were as follows: β -lactams (91.5%), aminoglycosides (85.1%), quinolones (87.2%), cyclins (34%), sulphonamids (51%), polymyxins (14.9%) and other classes of antibiotics (38.3%).

At the molecular level, the observed high resistance to β -lactam antibiotics can be attributed to the expression of *bla_{TEM}* and *bla_{SHV}* genes that are expressed in 92.8% of the tested strains. Among these strains, 17 (60.7%) carried both *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* and *bla_{CTX-M}* genes. Specifically, *bla_{CTX-M15}*, belonging to the *bla_{CTX-M1}* group, was the only variant identified in our study and is known to be widely distributed globally [21]. The *CTX-M* groups and *bla_{SHV}* are the major ESBLs phenotype worldwide [22] included in HAIs [23]. The *bla_{CTX-M}* genes are predominantly plasmid-encoded [24] and are the predominant β -lactamase conferring resistance in *K. pneumoniae* strains and other gram-negative bacterial to new broad spectrum β -lactam antimicrobials.

Ten *K. pneumoniae* strains were resistant to ertapenem and out of those, six also showed resistance to meropenem and imipenem. In Senegal, different studies have shown variable resistance rate to imipenem in healthcare-associated strains from 6.7 to 11.2% [18, 25, 26] and up to 72.2% [27]. The carbapenemase gene *OXA-48* was detected in 6 strains while it was not found in the four strains that were only resistant to ertapenem. Further investigation may be needed to identify the mechanisms behind this resistance phenotype.

ESBLs genes can also enable bacteria to resist to other classes of antimicrobials and 82.14% and 92.85% of the studied strains are respectively resistant to at least one antibiotic in aminoglycosides and fluoroquinolones family. Twenty (20) strains were resistant to amikacin, 27 (96.4) to ciprofloxacin and 23 (82.1) to norfloxacin.

Three studies conducted in Aristide Le Dantec hospital (Senegal) have investigated the prevalence of antibiotic resistance in healthcare-associated infections (HAIs). The results of these studies have demonstrated varying levels of resistance to aminoglycosides and ciprofloxacin. Specifically, the resistance rates for aminoglycosides were reported as 27%, 80%, and 84.6%, while the resistance rates for ciprofloxacin were found to be 55%, 81.43%, and 87% [18, 26, 28]. Two others studies conducted in the neurosurgery service of Fann Hopsital (Senegal) and the urologic service of Aristide le Dantec hospital have shown prevalence for amikacin resistance respectively of 16.7% [25] and 44.5% [27]. Although it has been used for several years, resistance for fosfomycin and chloramphenicol has remained low in *Klebsiella spp* [29] compared to our study. We found respectively 8/28 (28.5%) and 7/28 (25%) resistant strains for fosfomycin and chloramphenicol antibiotics. Genes encoding quinolone plasmid-mediated resistance *qnrB*, *qnrS* and aminoside resistance gene *aac(6')-Ib* were prevalent at high rates (75%) and are mostly responsible for resistance to fluoroquinolones and aminoglycosides, in concordance with some recent studies [24, 30].

Among the virulence factors investigated, three out of the six targeted genes were detected in the *K. pneumoniae* strains, with varying proportions. The *mrKD* gene encoding for a type 3 fimbriae (adhesins) was found in 21/28 (75%) of the studied isolates and is involved in the adhesion to epithelial, urinary and respiratory cells and promote biofilms development [14]. This finding aligns with the well-established ubiquitous nature of these fimbriae in *K. pneumoniae* [31]. The *fyuA* gene was found in 13/28 strains (46.4%), encoding for a yersiniabactin receptor, one of the most upregulated gene in biofilm formation specially in iron-poor environments such as human urine [32]. Additionnaly, the *uge* gene was found in 19/28 strains (67.8%) and codes for uridine diphosphate galacturonate 4-epimerase, express both smooth lipopolysaccharide (LPS) with O antigen molecules and capsule polysaccharide (K antigen) on the surface of the bacteria. Therefore, this gene is essential for *K. pneumoniae* virulence and strains that carried this gene were more virulent [33].

Our research findings demonstrate the existence of multidrug-resistant strains that owe their resistance to various genes within their genome. The combination of these genes, at times, contributes to an elevated resistance level against different antibiotics. Moreover, specific virulence factors are present, and their expression has the potential to escalate the

severity and/or duration of infections. A sequencing of these strains should provide a better understand of the clones all the factors of virulence and resistance present in these strains and occurrence of mobile genetic elements.

Conclusion

The emergence of multidrug resistant *K. pneumoniae* as a significant aetiologic agent in HAIs poses a growing public health concern not only for Senegal but all over the world. The successful spread of these multidrug resistant *K. pneumoniae* has been largely facilitated by the fact that *K. pneumoniae* itself is a notorious healthcare associated pathogen leading to outbreaks in hospital seetings, in addition to other factors, such as inappropriate use of antibiotics, high-density populations, poor infection control, international travel and medical tourism. This study highlights the need to establish a comprehensive antimicrobial resistance surveillance network in Senegal for *K. pneumoniae* and other major healthcare-associated bacteria. Such a network would enable monitoring of emerging resistance trends and novel resistance mechanisms within hospitals. We also recommend strengthening antimicrobial stewardship rules and implementing robust infection control measures in healthcare facilities to mitigate the selective pressures that drive the emergence and spread of multidrug-resistant strains. By adopting these strategies, we can proactively combat antimicrobial resistance and safeguard patient health in hospital settings.

Ethical Research Approval

As per international standard or university standard written ethical approval has been collected and preserved by the author(s).

Consent for publication

All authors have given their consent for this publication.

Competing interests

The authors have not declared any conflict of interest.

Author's contributions

MMB, AC, FT and OS helped to collect samples and data. MMB, AD, AD were involved in strains isolation and to perform some antibiogram susceptibility testing and contributed to antimicrobial resistance profiles interpretation. BN, FT, CF and YD helped revised the manuscript. BSB, GCDM, AS designed the study, supervised the results analysis and interpretation, and revised the manuscript. NI is the main author hence, participated to the experiment design, performed the lab work, did the bibliographic review, analyzed and interpreted the results, designed the figures and drafted the manuscript.

All the authors have read and approved the submitted version of the manuscript.

Funding

This study was supported by Institutional funds from GCDM at Institut de Recherche pour le Développement, France

References

- O'Neill J. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations. 2014. *Rev Antimicrob Resist* (2014).
- CDC. About Antimicrobial Resistance 2022 [updated October 5, 2022; cited 2023 24/03/2023].
- Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Aguilar GR, Gray A, et al. Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. *Lancet* (2022).
- Lin W-H, Wang M-C, Tseng C-C, Ko W-C, Wu A-B, Zheng P-X, et al. Clinical and Microbiological Characteristics of *Klebsiella Pneumoniae* Isolates Causing Community-Acquired Urinary Tract Infections. *Infection* 38 (2010): 459-64.
- Rice LB. Progress and Challenges in Implementing the Research on Escape Pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol* 31 (2010): S7-S10.
- De Oliveira Garcia D, Doi Y, Szabo D, Adams-Haduch JM, Vaz TM, Leite D, et al. Multiclonal Outbreak of *Klebsiella Pneumoniae* Producing Extended-Spectrum B-Lactamase Ctx-M-2 and Novel Variant Ctx-M-59 in a Neonatal Intensive Care Unit in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 52 (2008): 1790-3.
- Gonzalez-Ferrer S, Peñaloza HF, Budnick JA, Bain WG, Nordstrom HR, Lee JS, et al. Finding Order in the Chaos: Outstanding Questions in *Klebsiella Pneumoniae* Pathogenesis. *Infect and Immun* 89 (2021): e00693- 20.
- Shi W, Li K, Ji Y, Jiang Q, Wang Y, Shi M, et al. Carbapenem and Cefoxitin Resistance of *Klebsiella Pneumoniae* Strains Associated with Porin Ompk36 Loss and Dha-1 B-Lactamase Production. *Braz J Microbiol* 44 (2013): 435-42.
- Huynh B-T, Passet V, Rakotondraso A, Diallo T, Kerleguer A, Hennart M, et al. *Klebsiella Pneumoniae* Carriage in Low-Income Countries: Antimicrobial Resistance, Genomic Diversity and Risk Factors. *Gut microbes* 11 (2020): 1287-99.
- Tenover FC. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Am J Med* 119 (2006): S3-S10.
- Davies J, Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 74 (2010): 417- 33.
- Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas M, Giske C, et al. Multidrug-Resistant, Extensively Drug-Resistant and Pandrug-Resistant Bacteria: An International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance. *Clin Microbiol Infect* 18 (2012): 268-81.
- Aher T, Roy A, Kumar P. Molecular Detection of Virulence Genes Associated with Pathogenicity of *Klebsiella* Spp. Isolated from the Respiratory Tract of Apparently Healthy as Well as Sick Goats. *Refu Vet* 67 (2012): 249-52.
- Hossain S, De Silva B, Dahanayake P, Heo GJ. Phylogenetic Relationships, Virulence and Antimicrobial Resistance Properties of *Klebsiella* Sp. Isolated from Pet Turtles in Korea. *Lett Appl Microbiol* 70 (2020): 71-8.
- Naïma T. Contribution À L'étude Des Infections Nosocomiales À Bactéries Multirésistantes À L'hôpital Principal De Dakar Enquête Prospective Sur 6 Mois. *Bibliothèque centrale de l'université Cheikh Anta Diop de Dakar: Université Cheikh Anta Diop de Dakar* (2011).
- Dia N, Ka R, Dieng C, Diagne R, Dia M, Fortes L, et al. Résultats De L'enquête De Prévalence Des Infections Nosocomiales Au Chnu De Fann (Dakar, Sénégal). *Med Mal Infect* 38 (2008): 270-4.
- Déguénonvo LF, Traoré K, Badiane ND, Ka R, Cissoko Y, Diouf A, et al. Résultats D'une Enquête D'incidence Des Cas D'infections Nosocomiales À Bactéries Multirésistantes Dans Un Centre Hospitalier À Dakar (Sénégal). *Med Mal Infect* 5 (2016).
- Bourzama S. Aspects Épidémiologiques Et Bactériologiques Des Infections Nosocomiales À La Réanimation Du Centre Hospitalier Universitaire Aristide Le Dantec. Etude Prospective Du 1er Janvier Au 30 Juin 2018. *Bibliothèque centrale de l'université Cheikh Anta Diop de Dakar: Université Cheikh Anta Diop de Dakar* (2019).
- ML F. Infections Nosocomiales À La Réanimation Du Centre Hospitalier Universitaire Aristide Le Dantec. Etude Prospective De Novembre 2005 À Octobre 2007. *Bibliothèque centrale de l'université Cheikh Anta Diop de Dakar: Université Cheikh Anta Diop de Dakar* (2008).
- Mohd Asri NA, Ahmad S, Mohamud R, Mohd Hanafi N, Mohd Zaidi NF, Irekeola AA, et al. Global Prevalence of Nosocomial Multidrug-Resistant *Klebsiella Pneumoniae*: A Systematic Review and Meta- Analysis. *Antibiot* 10 (2021): 1508.
- Cantón R, González-Alba J, Galán J. Ctx-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Front Microbiol* (2012).
- Wasfi R, Elkhatib WF, Ashour HM. Molecular Typing and Virulence Analysis of Multidrug Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Clinical Isolates Recovered from Egyptian Hospitals. *Sci Rep* 6 (2016): 1-11.

Citation: Issa NDIAYE, Bissoume Sambe BA, Farma THIAM, Mouhamadou Moustapha BOYE, Ousmane SOW, Abdoulaye CISSÉ, Babacar NDIAYE, Thierno Abdoulaye DIALLO, Cheikh FALL, Yakhya DIEYE, Baidy DIËYE, Assane DIENG, Amadou DIOPI, Guillaume CONSTANTIN DE MAGNY and Abdoulaye SECK. Antibiotic Resistance and Virulence Factors of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella Pneumoniae* Involved in Healthcare-Associated Infections in Dakar, Senegal. *Archives of Microbiology and Immunology*. 7 (2023): 65-75.

23. Sharahi JY, Hashemi A, Ardebili A, Davoudabadi S. Molecular Characteristics of Antibiotic-Resistant *Escherichia Coli* and *Klebsiella Pneumoniae* Strains Isolated from Hospitalized Patients in Tehran, Iran. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 20 (2021): 1-14.
24. Rafai C, Frank T, Manirakiza A, Gaudeuille A, Mbecko J-R, Nghario L, et al. Dissemination of IncF-Type Plasmids in Multiresistant Ctx-M-15-Producing Enterobacteriaceae Isolates from Surgical-Site Infections in Bangui, Central African Republic. *BMC Microbiol* 15 (2015): 1-10.
25. Camara N. Pneumopathie Nosocomiale Acquisée Sous Ventilation Mécanique Chez Le Patient Cérébro-Lésé. *Bibliothèque centrale de l'université Cheikh Anta Diop de Dakar*: Université Cheikh Anta Diop de Dakar (2018).
26. Zbair M. La Résistance Bactérienne Dans Les Infections Nosocomiales : Aspects Épidémiologiques, Cliniques, Thérapeutiques Et Évolutifs À La Réanimation De Hald. *Bibliothèque centrale de l'université Cheikh Anta Diop de Dakar*: Université Cheikh Anta Diop of Dakar (2018).
27. Omari Y. Le Profil De Sensibilité Des Germes Responsables Des Infections Urinaires Nosocomiales Aux Antibiotiques: Université Cheikh Anta Diop of Dakar (2018).
28. Sene MVT. Aspects Épidémiologiques Et Bactériologiques Des Infections Nosocomiales Au Service De Réanimation Du Centre Hospitalier Universitaire Aristide Le Dantec : Étude Rétrospective De Janvier 2013 À Décembre 2014. *Bibliothèque centrale de l'université Cheikh Anta Diop de Dakar*: Université Cheikh Anta Diop de Dakar (2017).
29. Demir T, Buyukguclu T. Evaluation of the in Vitro Activity of Fosfomycin Tromethamine against Gram-Negative Bacterial Strains Recovered from Community- and Hospital-Acquired Urinary Tract Infections in Turkey. *Int J Infect Dis* 17 (2013): e966-e70.
30. Vaziri S, Afsharian M, Mansouri F, Azizi M, Nouri F, Madadi-Goli N, et al. Frequency of Qnr and Aac (6') Ib-Cr Genes among Esbl-Producing *Klebsiella Pneumoniae* Strains Isolated from Burn Patients in Kermanshah, Iran. *Jundishapur J Microbiol* 13 (2020): 1-8.
31. El Fertas-Aissani R, Messai Y, Alouache S, Bakour R. Virulence Profiles and Antibiotic Susceptibility Patterns of *Klebsiella Pneumoniae* Strains Isolated from Different Clinical Specimens. *Pathol Biol* 61 (2013): 209-16.
32. Hancock V, Ferrieres L, Klemm P. The Ferric Yersiniabactin Uptake Receptor Fyua Is Required for Efficient Biofilm Formation by Urinary Tract Infectious *Escherichia Coli* in Human Urine. *Microbiology* 154 (2008): 167-75.
33. Regué M, Hita B, Piqué N, Izquierdo L, Merino S, Fresno S, et al. A Gene, Uge, Is Essential for *Klebsiella Pneumoniae* Virulence. *Infect Immun* 72 (2004): 54-61.
34. Dossouvi KM, Sambe Ba B, Lo G, Cissé A, Ba-Diallo A, Ndiaye I, et al. Molecular Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Extra-Intestinal Pathogenic *Escherichia Coli* Isolated in a University Teaching Hospital Dakar-Senegal. *BioRxiv* (2022).
35. Kaczmarek FM, Dib-Hajj F, Shang W, Gootz TD. High-Level Carbapenem Resistance in a *Klebsiella Pneumoniae* Clinical Isolate Is Due to the Combination of Bla Act-1 B-Lactamase Production, Porin Ompk35/36 Insertional Inactivation, and Down-Regulation of the Phosphate Transport Porin Phoe. *Antimicrob Agents Chemother* 50 (2006): 3396-406.
36. Eyvazi S, Hakemi-Vala M, Hashemi A, Bagheri Bejestani F, Elahi N. Emergence of Ndm-1-Producing *Escherichia Coli* in Iran. *Arch Clin Infect Dis* 13 (2018): e62029.
37. Lee M, Choi T-J. Antimicrobial Resistance Caused by Kpc-2 Encoded by Promiscuous Plasmids of the *Klebsiella Pneumoniae* St307 Strain. *Ann Lab Med* 41 (2021): 86-94.
38. Smyth C, O'Flaherty A, Walsh F, Do TT. Antibiotic Resistant and Extended-Spectrum B-Lactamase Producing Faecal Coliforms in Wastewater Treatment Plant Effluent. *Environ Pollut* 262 (2020): 114244.
39. Manoharan A, Chatterjee S, Mathai D, Group SS. Detection and Characterization of Metallo Beta Lactamases Producing *Pseudomonas Aeruginosa*. *Indian J Med Microbiol* 28 (2010): 241-4.
40. Hu L-F, Li J-B, Ye Y, Li X. Mutations in the Gyra Subunit of DNA Gyrase and the Parc Subunit of Topoisomerase Iv in Clinical Strains of Fluoroquinolone-Resistant Shigella in Anhui, China. *J Microbiol* 45 (2007): 168-70.
41. Dossouvi KM. Caractérisation Moléculaire De La Résistance Aux Fluoroquinolones Des Souches De *Klebsiella Pneumoniae* Uropathogènes Blse Isolées En 2017 Au Laboratoire De Biologie Médicale De L'institut Pasteur De Dakar. In: Dakar IP, editor (2018).
42. Heidary M, Momtaz H, Madani M. Characterization of Diarrheagenic Antimicrobial Resistant *Escherichia Coli* Isolated from Pediatric Patients in Tehran, Iran. *Iranian Red Crescent Medical Journal* 16 (2014).
43. Kanaan MHG, Al-Shadeedi SM, Al-Massody AJ, Ghasemian A. Drug Resistance and Virulence Traits of *Acinetobacter Baumannii* from Turkey and Chicken Raw Meat. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 70 (2020): 101451.