



# Epidémie d'infections à *Pseudomonas aeruginosa* BLSE SHV2a appartenant à un clone émergent ST235 possédant deux allèles du gène de ménage *acsA*?

Guilhem ROYER<sup>1,2</sup>, Frederic FOURREAU<sup>3</sup>, Boris BOULANGER<sup>4</sup>, Melanie  
MERCIER DARTY<sup>5</sup>, David DUCCELLIER<sup>3</sup>, Florence CIZEAU<sup>3</sup>, Anaïs POTRON<sup>6</sup>,  
Nicolas MONGARDON<sup>4</sup>, Jean-Winoc DECOUSSER<sup>1,3,7</sup>

1. Laboratoire de Bactériologie, CHU MONDOR; 2. EA DRF Genoscope LABGeM, CNRS UMR8030, Université d'Evry-Val d'Essonne; 3. Equipe Opérationnelle d'Hygiène, CHU MONDOR,
4. Réanimation Chirurgicale Cardiaque, CHU MONDOR; 5. Plateforme NGS, CHU MONDOR,
6. CNR Pseudomonas, CHU BESANÇON; 7. Equipe DYNAMYC, EA 7380, UPEC, Créteil.

# Contexte - *P. aeruginosa*

- 4<sup>ème</sup> espèce bactérienne responsable d'infections nosocomiales en France (5<sup>ème</sup> en Europe)

ENP 2018, Suetens et al. Eurosurveillance 2018

- Sensibilité aux antibiotiques :

Bactériémie 2014 ONERBA

- Carbapénèmes: **76.9% S**

- Ceftazidime: **87.5% S**

- **4,5%** des souches CAZ R sont **BLSE** (11/246, étude GERPA 2015) = **0.54%**  
des *P. aeruginosa*

Fournier et al. RICA 0215

- Diffusion non clonale

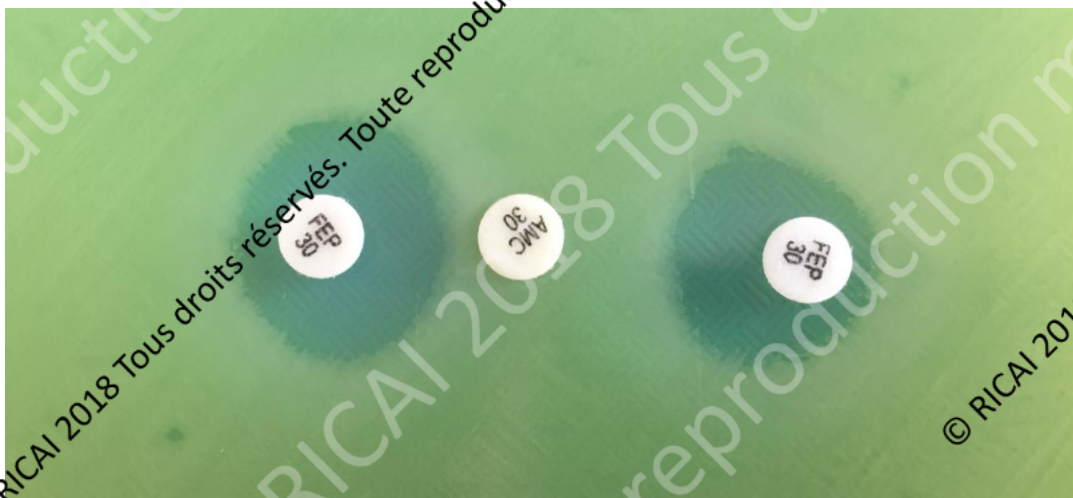
- Opportunisme de certains fonds génétiques au décours de l'acquisition de traits de virulence particuliers

- Acquisition de gènes exogènes (carbapénémase)

- Mutations

# Objectifs de l'étude

- **Description et investigation d'une épidémie** d'infections à *P. aeruginosa* BLSE en Réanimation Chirurgicale cardiaque – CHU MONDOR (AP-HP, 94)
- **Enquête épidémiologique et de pratique**
- Étude du **fond génétique** de la souche impliquée
- **Étude phylogénique** incluant d'autres souches BLSE + génomes du ST concerné



# Matériel et Méthodes



- Séquençage des **génomés complets** (Nextera<sup>®</sup>, MiSeq<sup>®</sup>; Illumina)
- **MLST *in silico*** (Center for Genome Epidemiology - CGE)
- Recherche des **gènes de résistances** (Resfinder – CGE website)
- **Sérotypage** (CNR PYO Besançon Patrick Plésiat – Anais Potron)
- **Comparaison des souches** par détermination d'un schéma de core genome MLST (cgMLST - SeqSphere, Ridom<sup>®</sup>)
- **Analyse des SNPs** : Snippy (<https://github.com/tseemann/snippy>) puis FastTree (modèle « generalized time-reversible » (GTR) + loi gamma).



# Résultats:



- **4 souches** de patients **infectés** entre le 03/05/2018 et le 10/10/2018
  - 1 liquide de drainage médiastinite le 03/05/2018 en Réanimation Chirurgie Cardiaque (passage en Chirurgie cardiaque)
  - 1 Prélèvement Distal Protégé (PDP) le 06/06/2018 en RCC
  - 1 PDP du 25/07/2018 en RCC
  - 1 biopsie osseuse le 10/10/2018 en chirurgie vasculaire (mais antécédent de passage en RCC et chirurgie cardiaque)
- Patients **multitraités** par des antibiotiques (Piperacilline – tazobactam...)
- Acquisition **tardive**: J20, J25, J27, J29,
- **Profil de résistance** (CMI milieu liquide):
  - **I/ R**: TZP (64 mg/l), imipénème (32 mg/L) méropénème (4 mg/), ceftazidime (32 mg/L)
  - **S**: ceftazidime + avibactam ( 2 mg/L) , ceftolozane + tazobactam (1 mg/L) colistine (1 mg/L)

# Mode(s) de transmission?

- **Cas index** : patiente d'origine Serbe?
- **Transmission**: croisée manuportée?  
(observance hygiène des mains 56%)
- Rôle de **réservoir secondaire**: souche retrouvée dans 1 siphon d'un box occupé par un patient infecté
- **Pratiques**: élimination des bassines pour la toilette des patients dans le lave-mains des box / poste de soins
- **Vidoirs avec douchette**



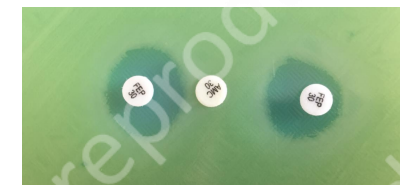
# Résultats

- Sérotypage: O:11
- bla SHV2a + altération porine D2
- MLST: Double allèle *acsa38* / *acsa72* → ST 235 / ST 2613??

• En fait **identification erronée** par bioanalyse des données de WGS

- *acsB*: identification par similarité de séquence (non confirmée par Sanger)
- idem *acsA* 151, 202, 204 and 205

- **ST 235**



Sequence Type: 2613!,235!

Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
acs	100	100	390	390	0	acs_38!
acs	100	100	390	390	0	acs_172!
aro	100	100	438	438	0	aro_11
gua	100	100	373	373	0	gua_3
mut	100	100	442	442	0	mut_13
nuo	100	100	366	366	0	nuo_1
pps	100	100	370	370	0	pps_2
trp	100	100	443	443	0	trp_4

Notes: ! alleles with multiple perfect hits found, multiple STs might be found

! acs: Multiple perfect hits found

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

# Résultats: Comparaison de souche BLSE par cgMLST (HEGP et Mondor)

## Schéma cgMLST ad hoc

4162 gènes pour le core genome

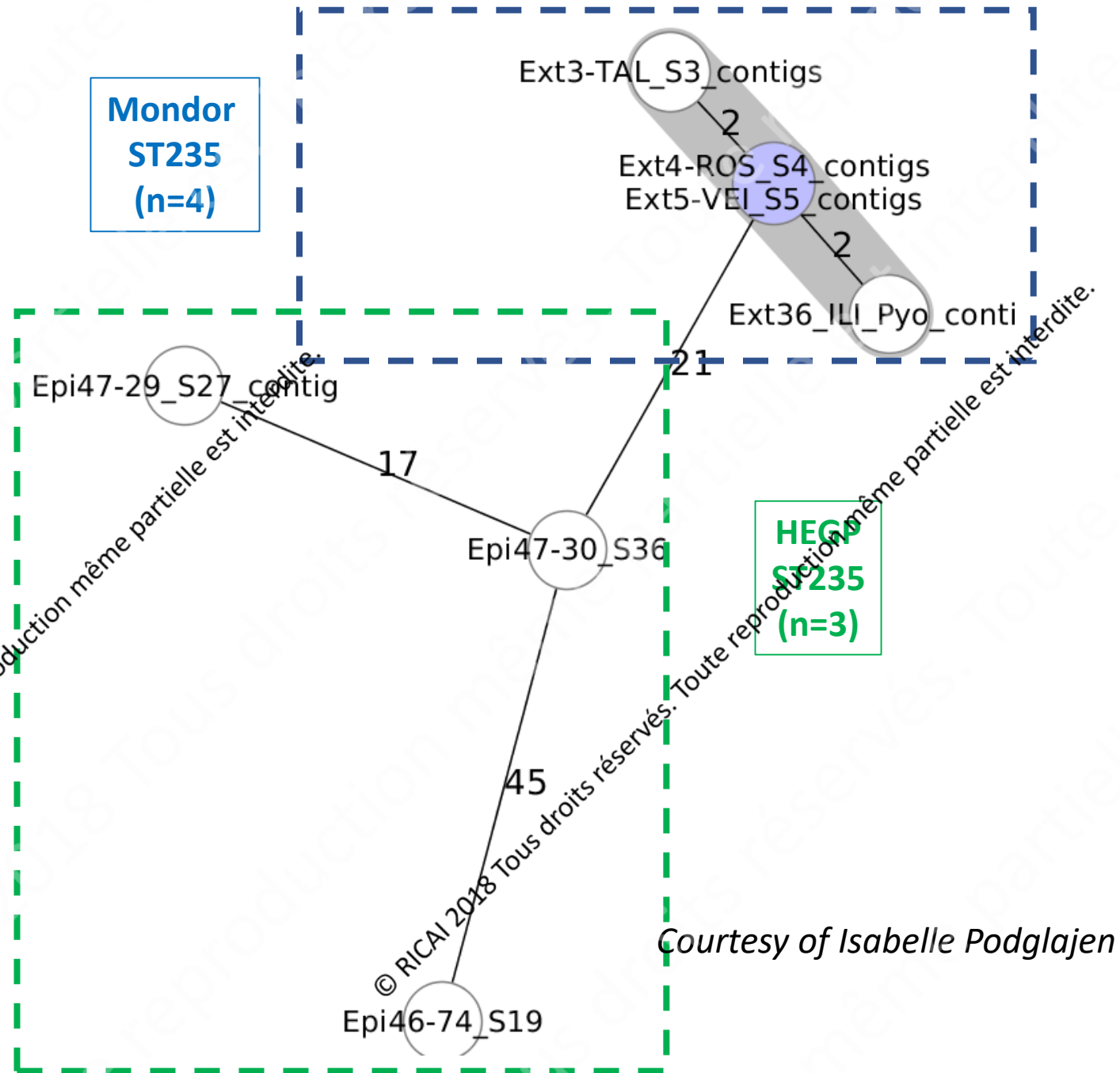
2067 gènes accessoires

- Table de comparaison pour le core genome

Sample ID	Site	#Missing values in Distance Columns	Perc. Good Targets
Epi46-74_S19	HEGP	70	98.3
Ext3-TAL_S3	Mondor	42	99.0
Ext4-ROS_S4	Mondor	28	99.3
Ext5-VEI_S5	Mondor	30	99.3
Ext36_ILI_Pyo	Mondor	30	99.3
Epi47-30_S36	HEGP	31	99.3
Epi47-29_S27	HEGP	28	99.3

- au minimum 98,3% des gènes du core genome sont présents dans les séquences analysées

4162-102= **4 060 gènes** du core genome sont présents dans toutes les souches et peuvent être comparés

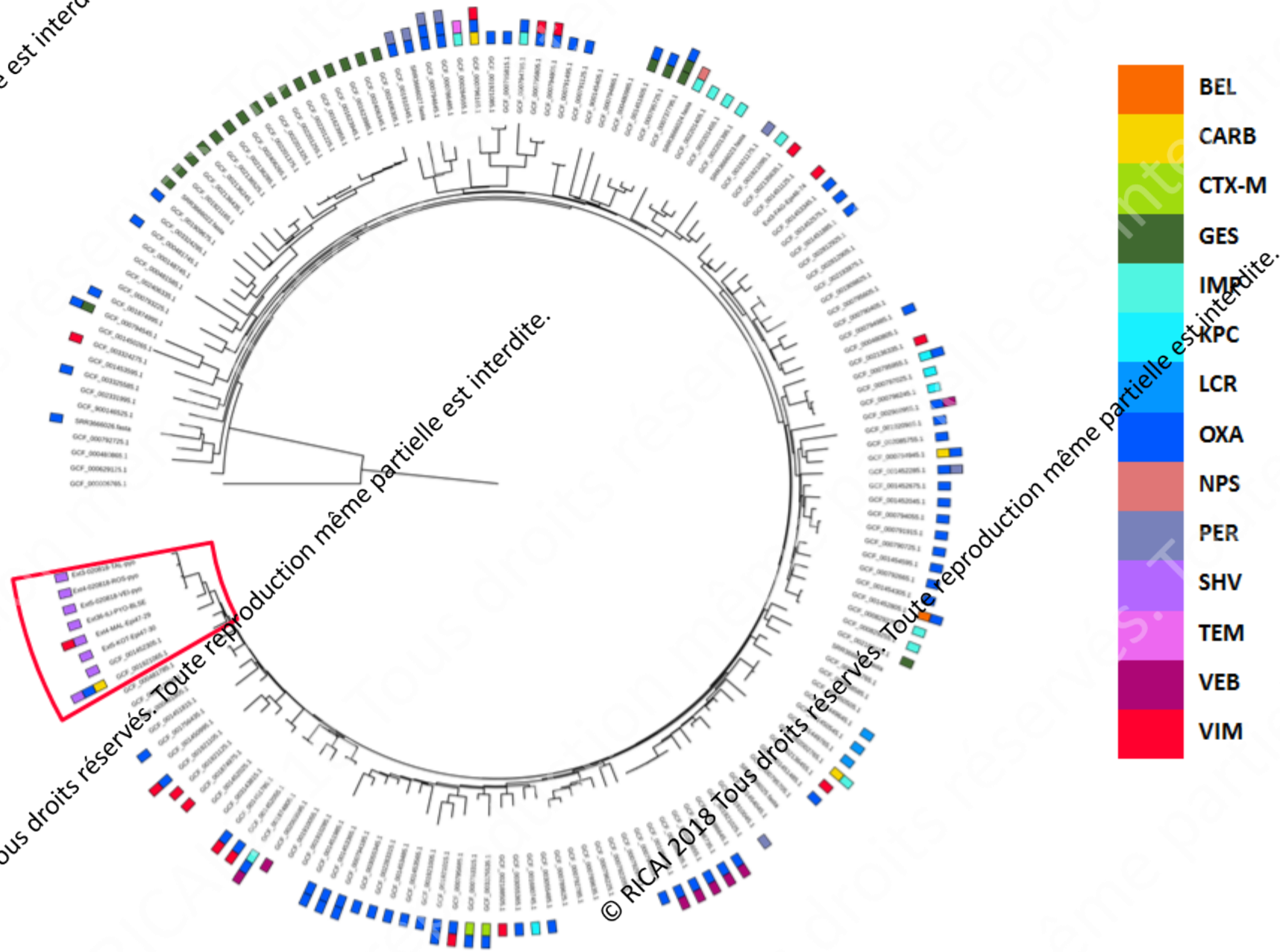


Courtesy of Isabelle Podglajen



# Arbre de distance Mash entre les pyo ST235 (NCBI + Mondor/HEGP) (raciné sur ST549)

- à partir des 164 génomes ST235 disponibles (dont 157 génomes de la base RefSeq) +/- présence de bêta-lactamase
- **Toutes les souches SHV2a** semblent « proches » (souches Mondor identiques + 3 souches HEGP + 1 souche américaine + souche Française )



GCF\_001921065.1 = souche américaine SHV2a du papier de Treepong

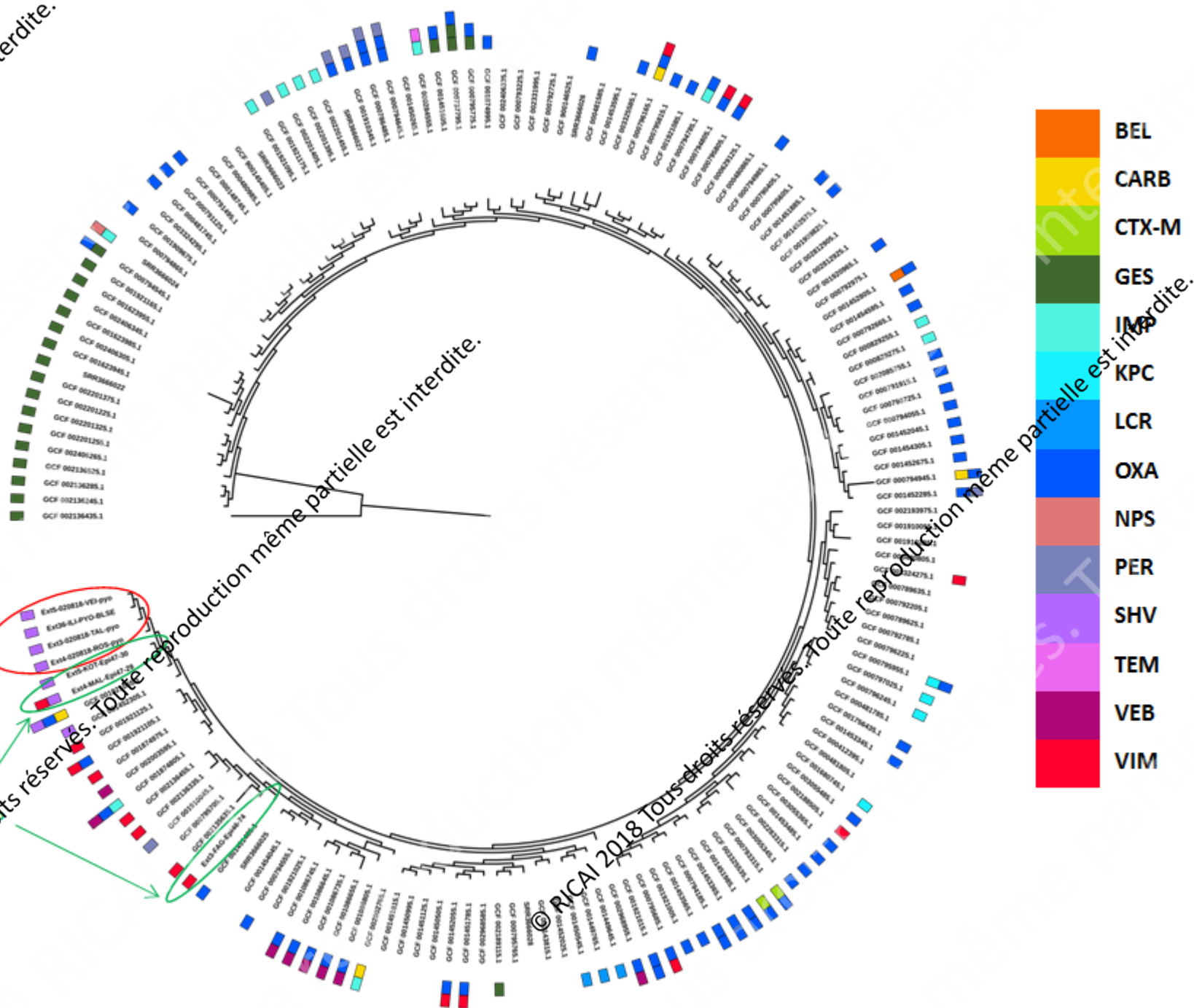
## ➤ Recherche de SNPs (164 génomes)

(régions codantes et non codantes)  
Reference = Ext3-020818-TAL-pyo

- Ext36-ILI-PYO-BLSE : **4**
- Ext4-020818-RCS-pyo : **5**
- Ext5-020818-VEI-pyo : **1**
- Ext5-KOT-Epi47-30 : **1288**
- Ext4-MAL-Epi47-29 : **1348**
- Ext3-FAG-Epi46-74 : **3900**

## ➤ Les souches

**SHV2a** semblent  
« proches »  
(souches Mondor  
identiques + 1  
souches HEGP +1  
souche  
américaine +  
souche  
Française )



© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

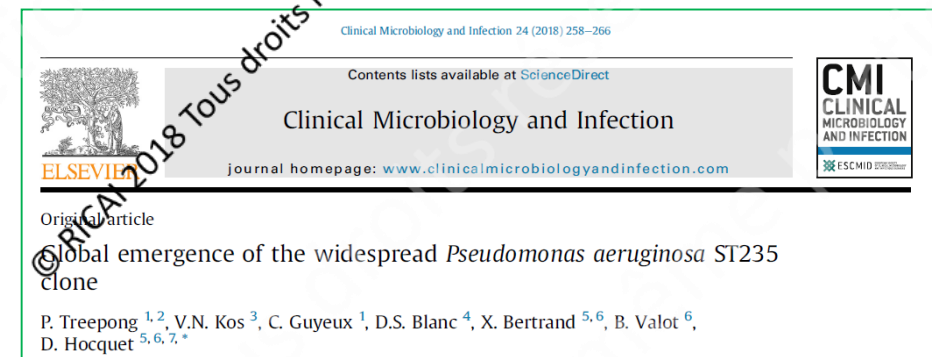
© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

# Discussion



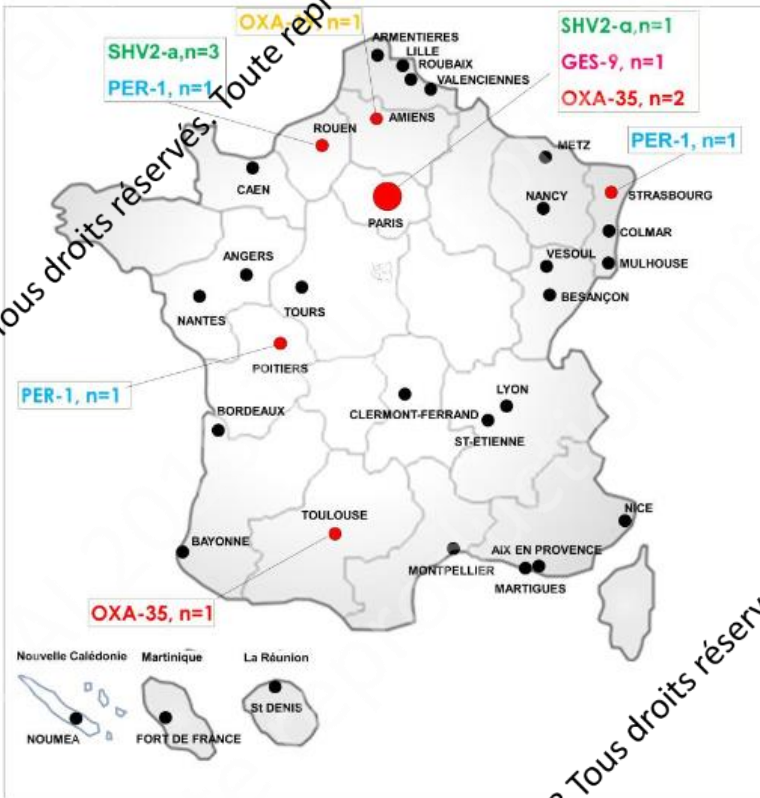
- **Epidémie locale** d'infections à *P. aeruginosa* ST235 BLSE SHV2a
- Espèce à diffusion non clonale mais certains ST/CC sont « successful » en cas d'acquisition de caractères de résistance (+ facteurs de virulence)
  - **Diffusion locale** de la même souche
  - Diffusion de **souches proches qui ont capté elles aussi SHV2a**
- **ST235**: un des (le?) ST qui a le plus diffusé, avec des résistances aux fluoroquinolones, aminosides et bêta-lactamines
  - Oxacillinases
  - Carbapénémases
  - **BLSE**



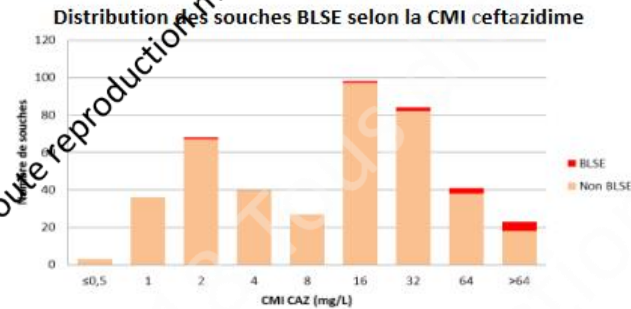
# Discussion

## Prévalence des carbapénèmes et des bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE)

✓ Prévalence des **BLSE** parmi la population CAZ<sup>R</sup> (n=246, 58,6%) : 4,5% (11/246)



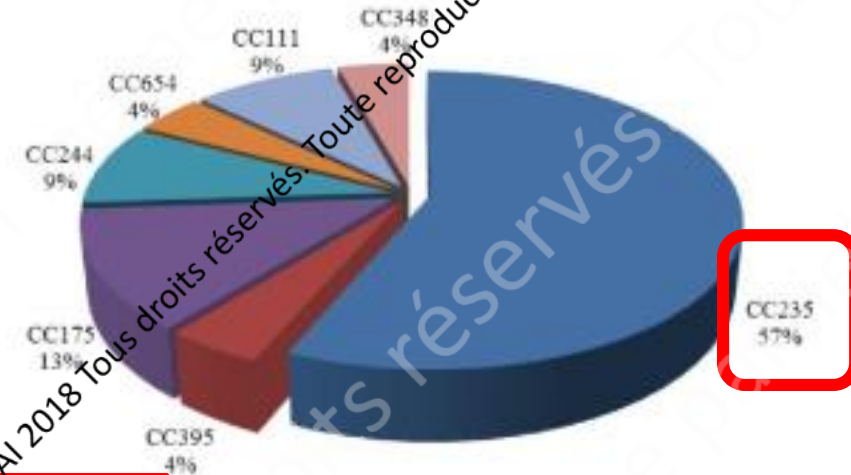
- 4 SHV-2a
- 3 PER-1
- 3 OXA-35 (dont 1 souche CAZ<sup>S</sup>)
- 1 GES-9
- 1 OXA-19



12,5 % parmi les souches avec CMI CAZ > 32 mg/

- **2015**: BLSE = 4,5 % des PYO CAZ R = 0,54% des PYO

- **Rôle du CC 235** dans les souches BLSE et/ou carbapénémase = 57% des souches



Remarque : 2 souches co produisaient une BLSE et une carbapénémase (VIM-4/SHV-2a et VIM-2/OXA-35) → cf. souches HEGP VIM + SHV2a

# Conclusions



- Au sein du **ST235**, description de l'association **d'un fond génétique particulier mais non strictement identique** avec bla SHV2a
- Capacité à diffuser localement
- Support génétique de cette association?
- Attention aux données « brutes » NGS qui viennent parasiter les bases de données type pubMLST.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.