

Résistome et intégrons

Marie-Cécile Ploy

UMR Inserm 1092, Université de Limoges
Service Bactériologie-Virologie-Hygiène, CHU Limoges



Université
de Limoges

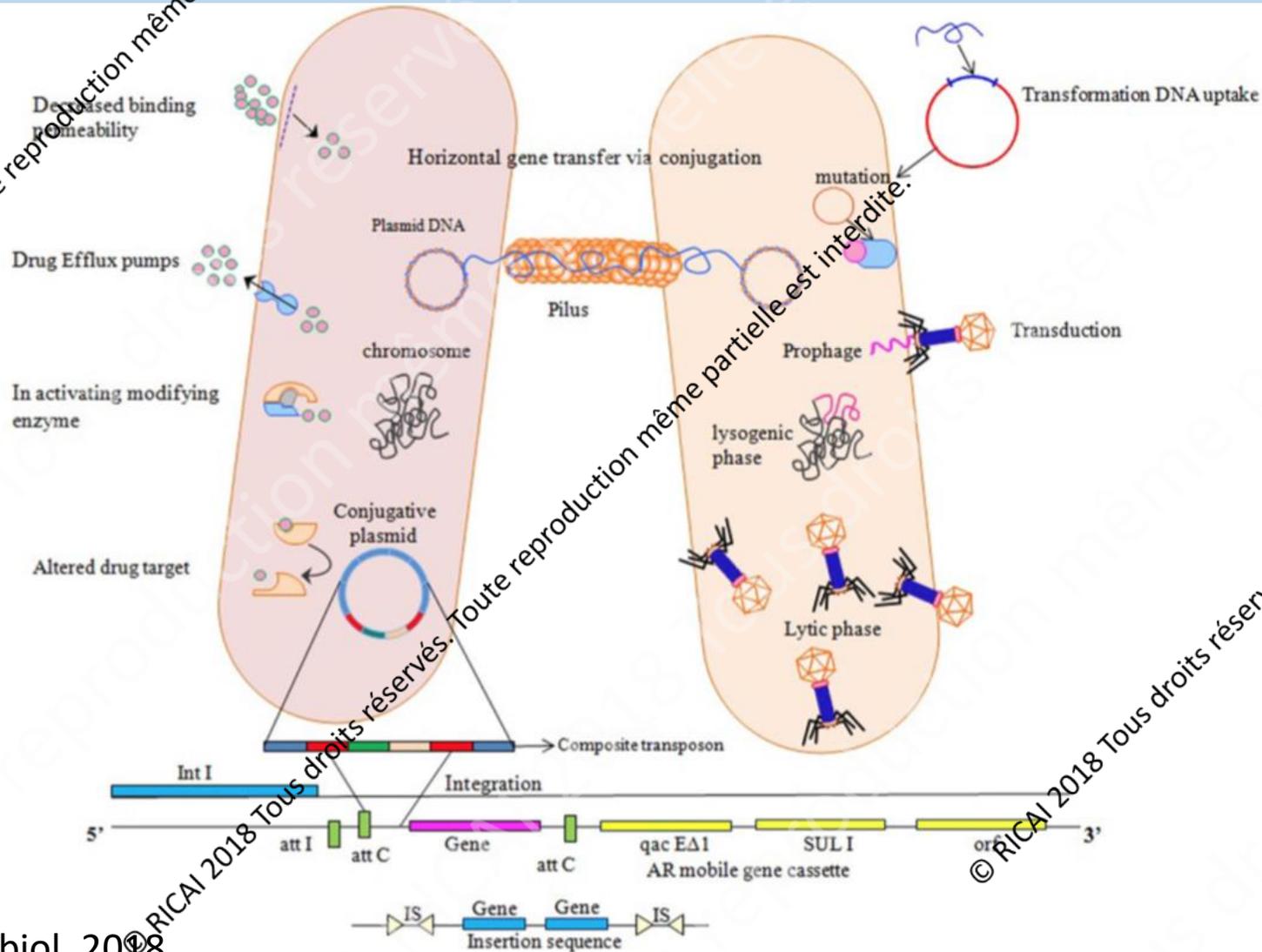


Inserm

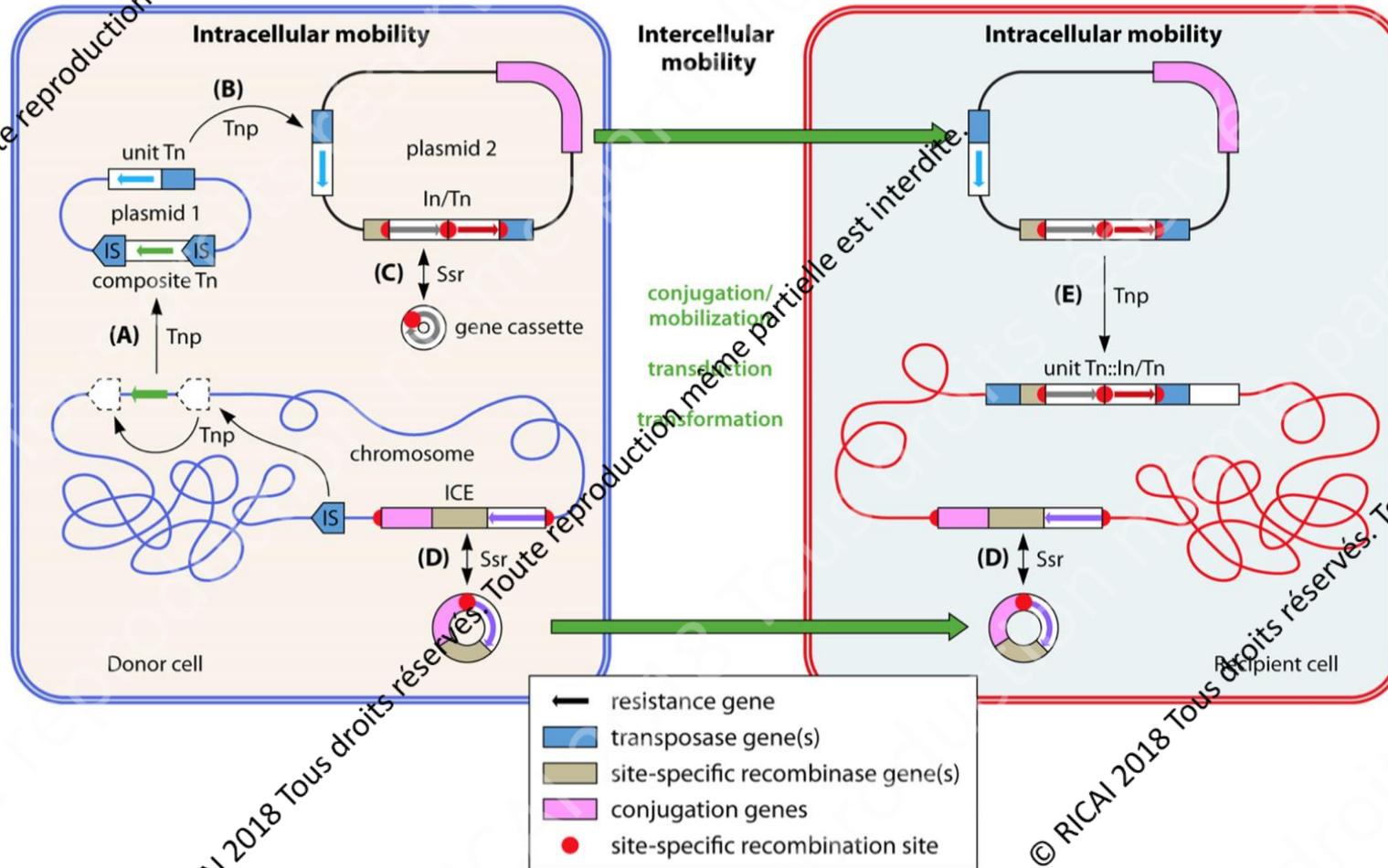
La science pour la santé
From science to health



Diversité des mécanismes de résistance et modes d'acquisition



Diversité des éléments génétiques mobiles



© 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.

Selection and Transmission of Antibiotic-Resistant Bacteria

DAN I. ANDERSSON and DIARMAID HUGHES
Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Uppsala University, Uppsala, Sweden

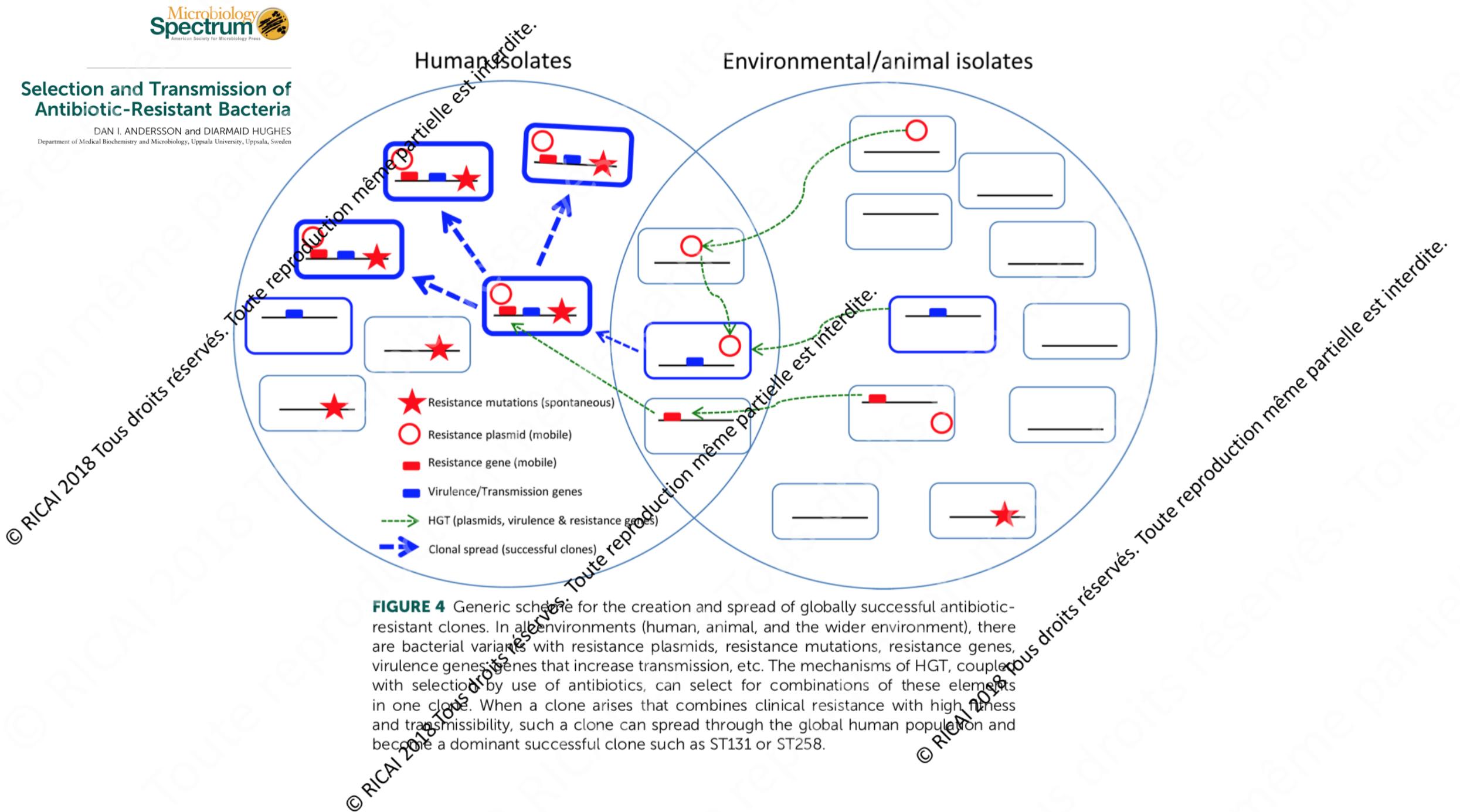


FIGURE 4 Generic scheme for the creation and spread of globally successful antibiotic-resistant clones. In all environments (human, animal, and the wider environment), there are bacterial variants with resistance plasmids, resistance mutations, resistance genes, virulence genes, genes that increase transmission, etc. The mechanisms of HGT, coupled with selection by use of antibiotics, can select for combinations of these elements in one clone. When a clone arises that combines clinical resistance with high fitness and transmissibility, such a clone can spread through the global human population and become a dominant successful clone such as ST131 or ST258.

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

The One Health Triad



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

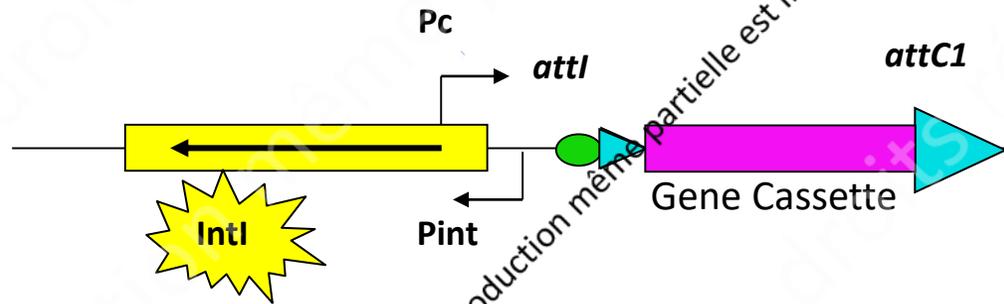
© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

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

Intégrons: definition

Stokes and Hall, 1989

« Bacterial genetic elements able to **acquire** various gene units and [to supply] **the promoter** for the **inserted genes** »

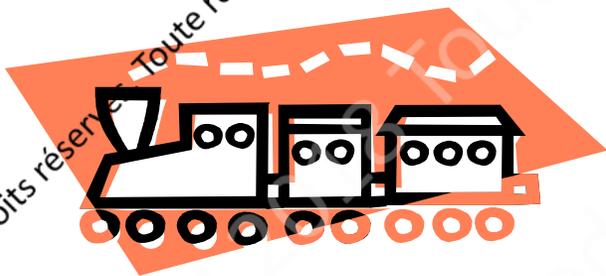
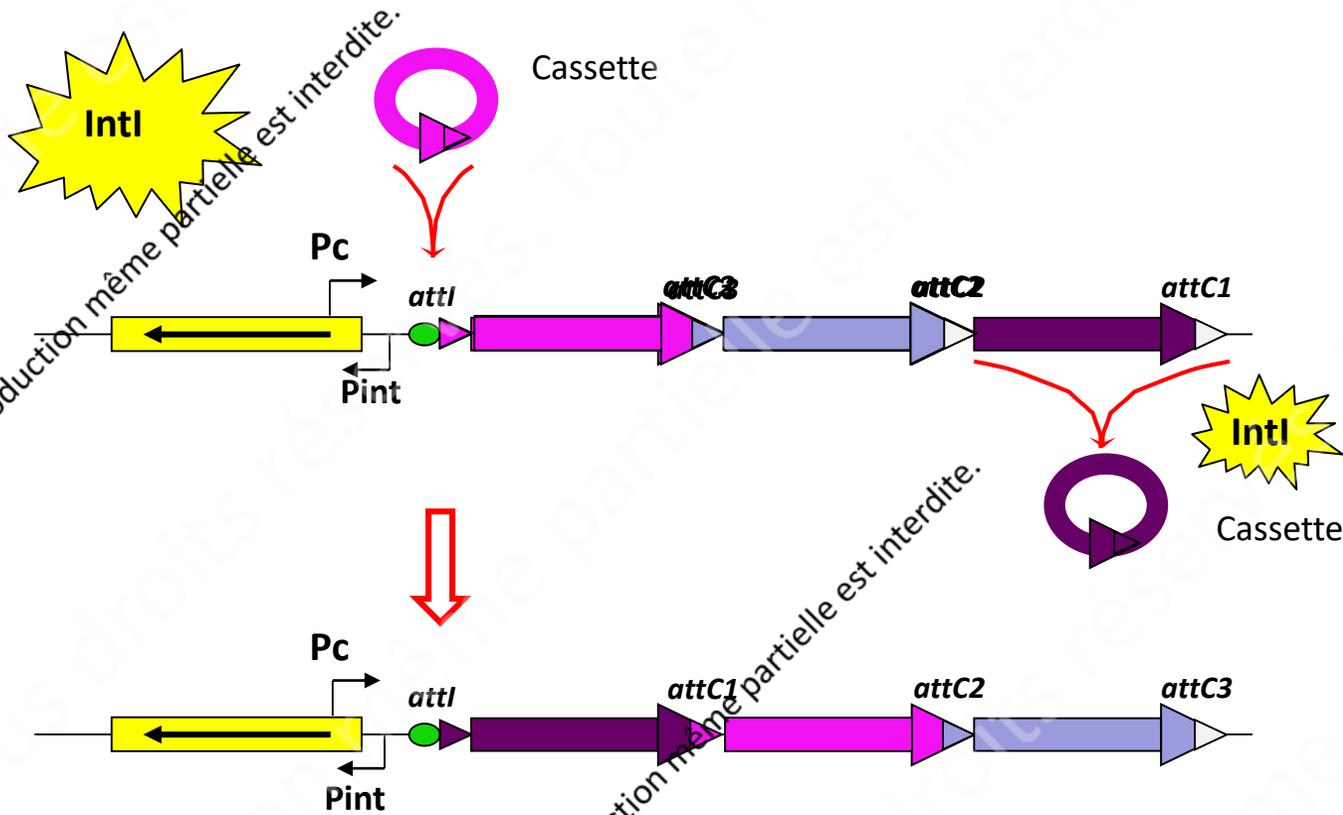


© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

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

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

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



© RICAI 2018 Tous droits réservés.

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

Les 3 classes d'intégrons de résistance

• Classe 1

- Les plus prévalents en termes de bactéries hôtes et de lieux d'isolement
- Les plus impliqués en bactériologie médicale
- La plus grande diversité de cassettes
- Les plus (seuls) recherchés

• Classe 2

- Prévalence moindre
- *int12* interrompu par codon stop
- ↔ Stabilité du réseau de cassettes

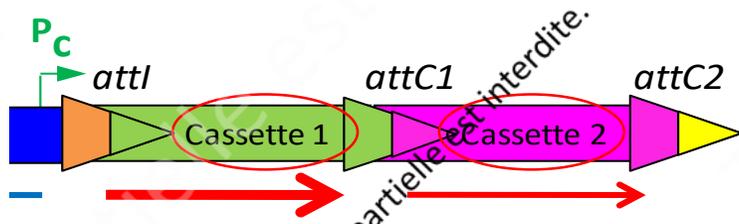
• Classe 3

- Peu décrits (< 10 publications)
- Entérobactéries : cassettes de résistance aux antibiotiques
- *Delftia (gca)* : origine environnementale ?



Barraud et al, 2013

Xu et al, 2009



Les cassettes

- = *orf* + *attC* ; \emptyset promoteur propre
- Unités fonctionnelles indépendantes, non répliquatives, mobilisables de manière individuelle
- Près de 200 cassettes décrites
 - 130 ont un rôle dans la résistance aux antibiotiques ou aux antiseptiques
 - β -lactamines, aminosides, triméthoprime, chloramphénicol, macrolides, rifampicine, quinolones, ammoniums quaternaires
 - Autres (*gcu*) ont des fonctions inconnues



Partridge et al, 2009

Bactéries hôtes

- **Bactéries à Gram négatif (BGN)**

- Entérobactéries +++
- *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*...
- Autres BGN : *Campylobacter*, *Bordetella*...



- Rares descriptions chez des bactéries à Gram positif (BGP)

- **Corynébactéries et apparentés**

- *Mycobacterium fortuitum*, *M. abscessus*
- *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*

Barraud et al, 2011

Partridge et al, 2018, CMR



de 11 à > 50 %
m = 15-30 %



de 0 à > 50 %



de 4 à > 40 %

Lien IR et résistance aux antibiotiques

- Plusieurs études ont souligné ce lien

- **Entérobactéries**

- Association IR et résistance aux aminoglycosides, FQ, pénicillines et inhibiteurs
- Association IR et résistance à au moins 2 antibiotiques
- Résistance à SXT, gentamicine, tobramycine, amoxicilline prédictive de la présence d'IR

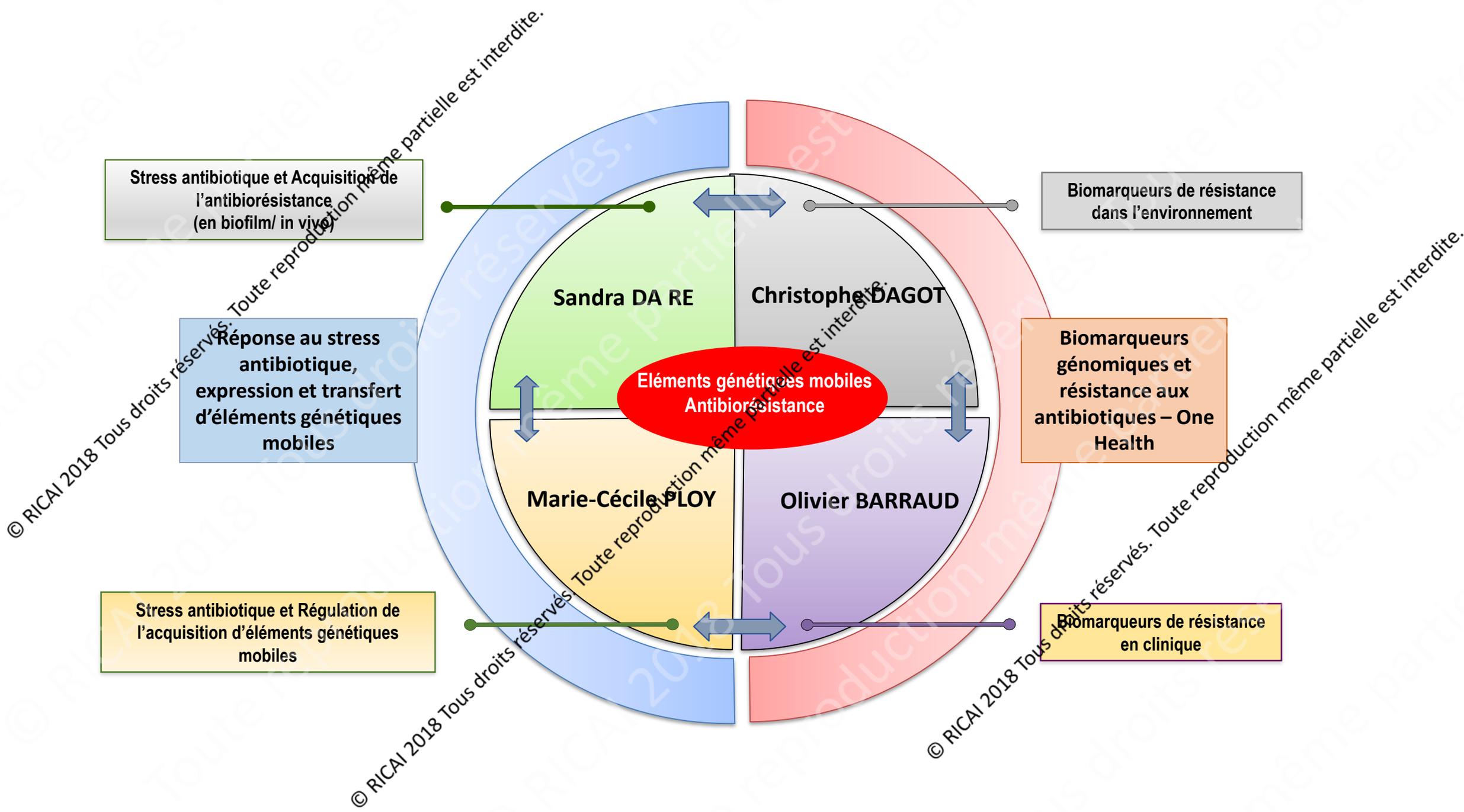
- *A. baumannii* Chang-tai, 2011

Martinez-Frejo et al, 1998

Leverstein-van Hall, 2003

- Problème : hétérogénéité des études

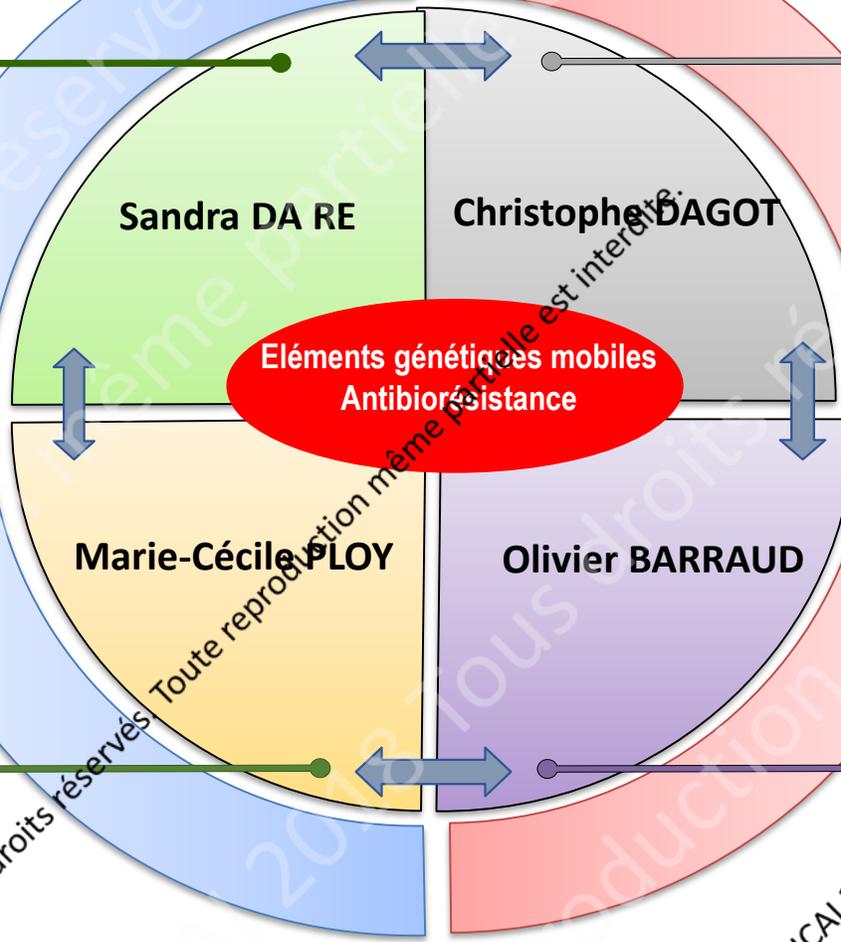
- Choix des antibiotiques, choix des bactéries, définition de la multirésistance, résistance naturelle / résistance acquise....



Stress antibiotique et Acquisition de l'antibiorésistance (en biofilm/ in vivo)

Réponse au stress antibiotique, expression et transfert d'éléments génétiques mobiles

Stress antibiotique et Régulation de l'acquisition d'éléments génétiques mobiles



Biomarqueurs de résistance dans l'environnement

Biomarqueurs génomiques et résistance aux antibiotiques - One Health

Biomarqueurs de résistance en clinique

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

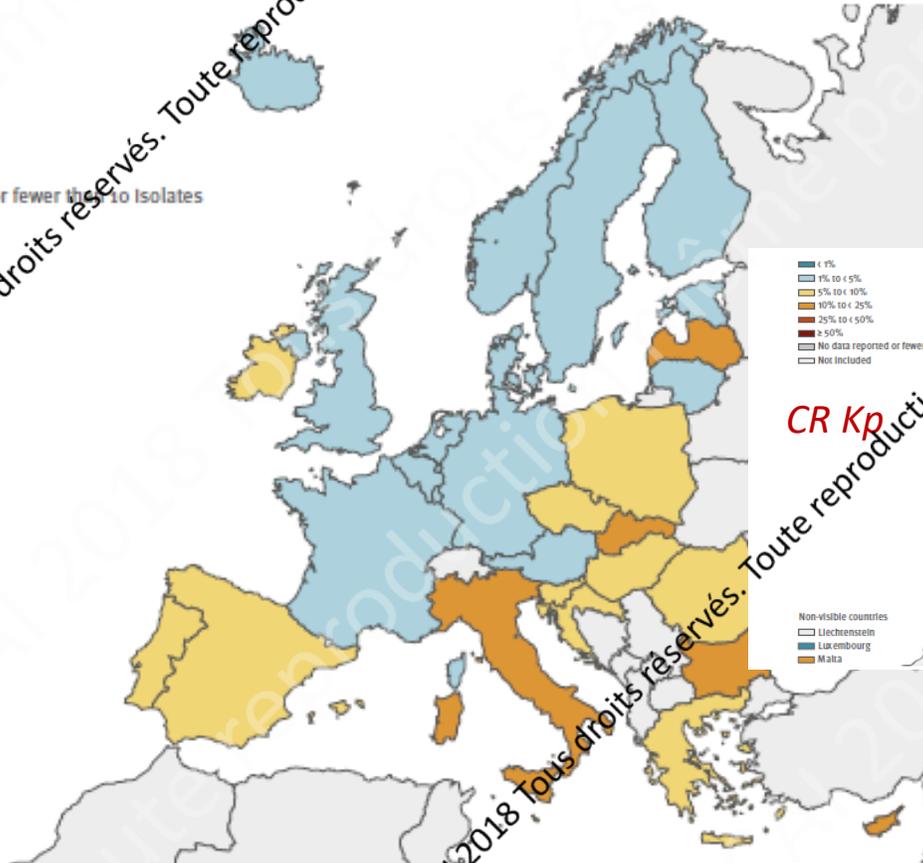
© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

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

Multi-résistance aux antibiotiques

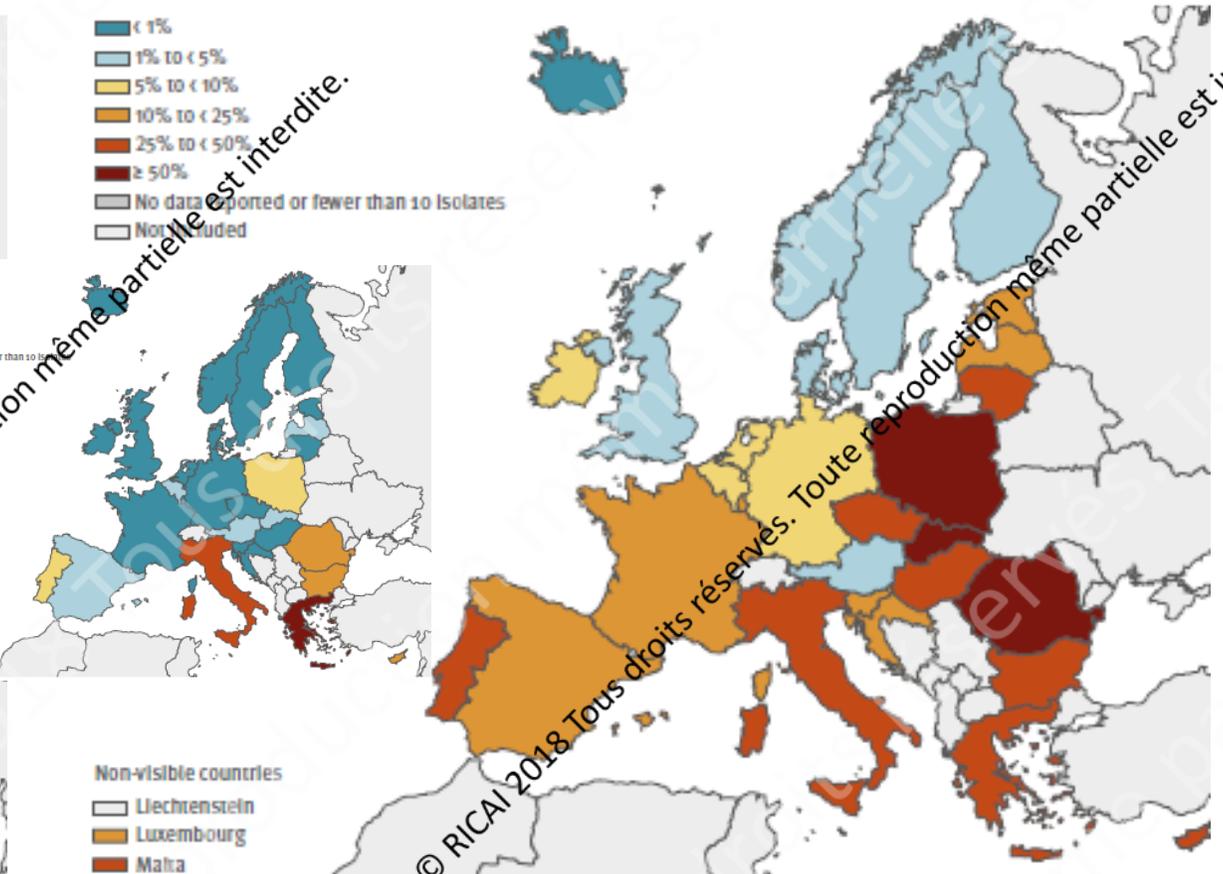
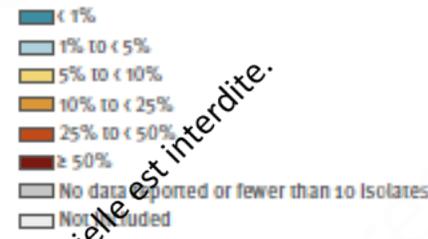
E.coli: Combined resistance to 3CG, FQ & AG,

EU/EAA, 2017



K.pneumoniae: Combined resistance to 3CG, FQ & AG

EU/EAA, 2017



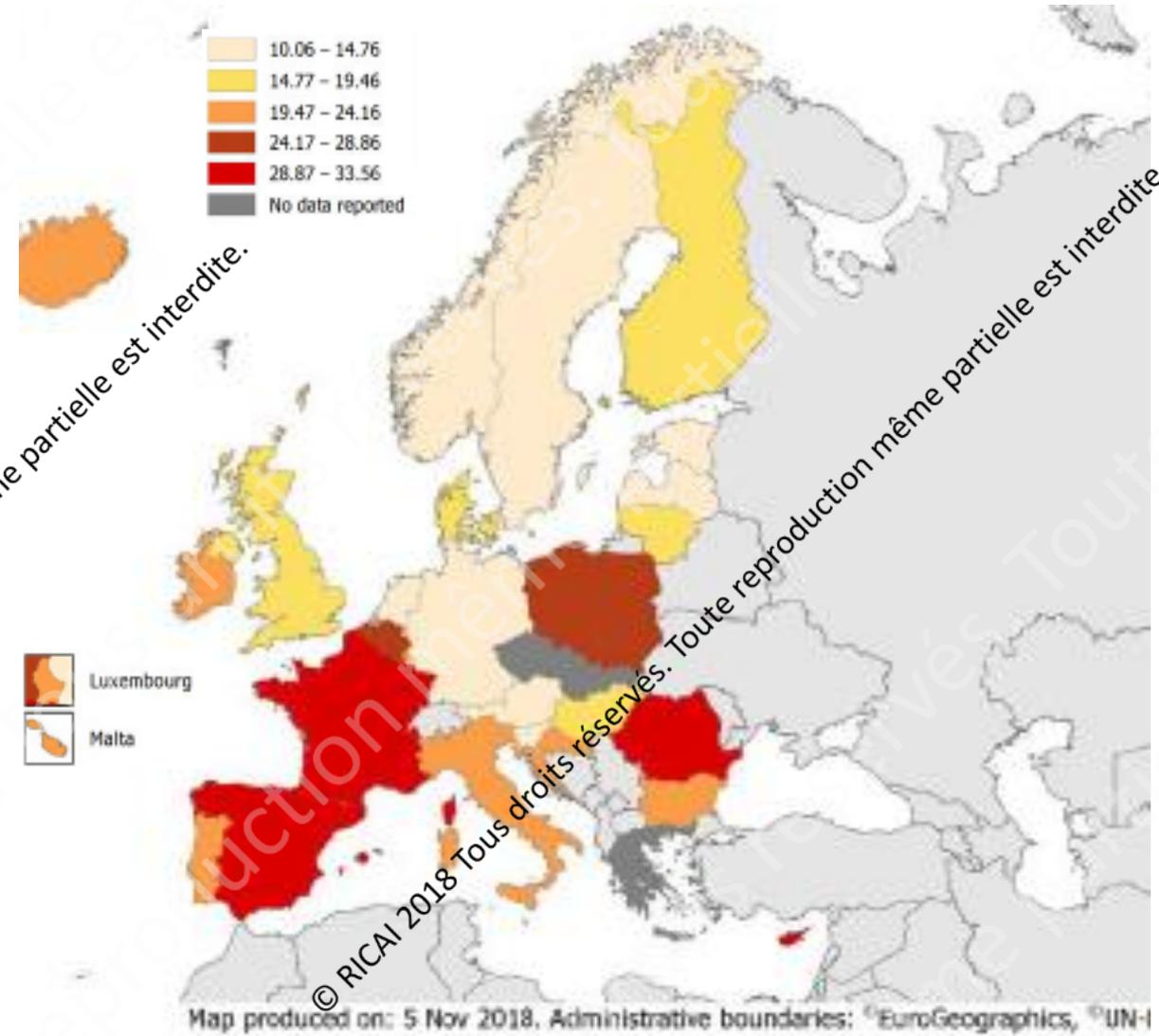
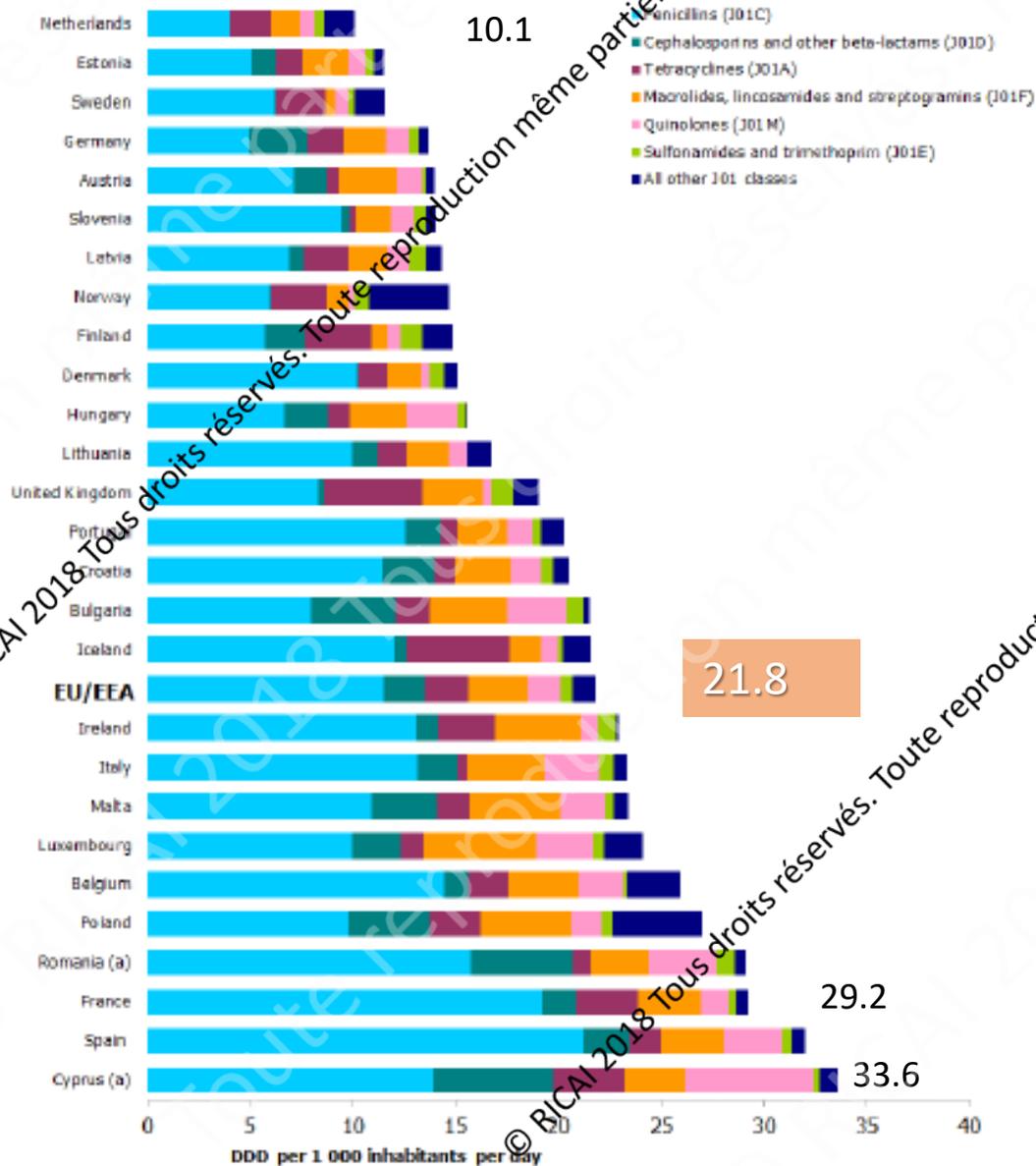
CR Kp

Non-visible countries
 Liechtenstein
 Luxembourg
 Malta

Non-visible countries
 Liechtenstein
 Luxembourg
 Malta

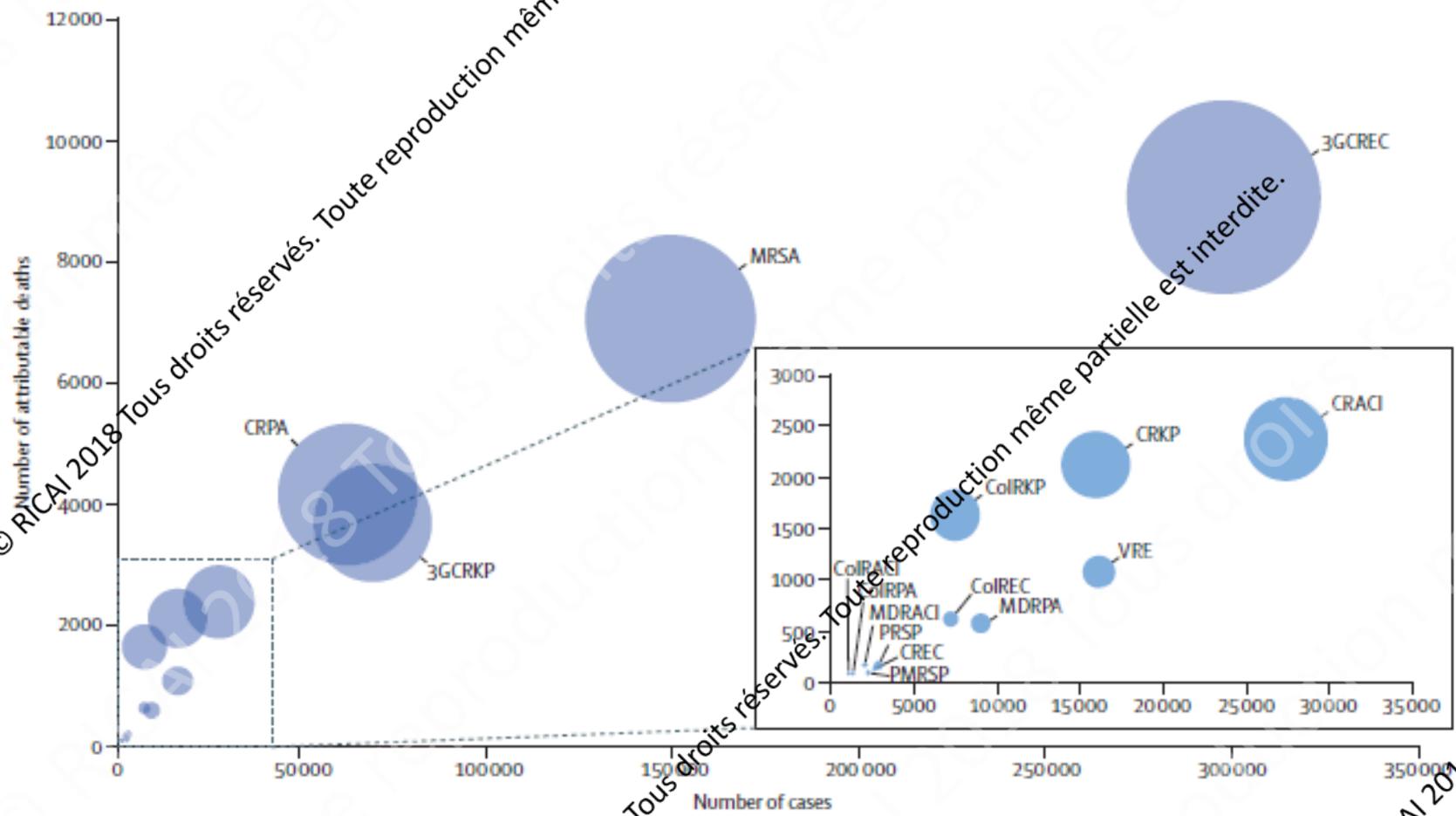
© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Consommation d'antibiotiques en Europe, 2017 (DDD/1000hab.d)



Map produced on: 5 Nov 2018. Administrative boundaries: ©EuroGeographics, ©UN-I

Mortalité attribuable



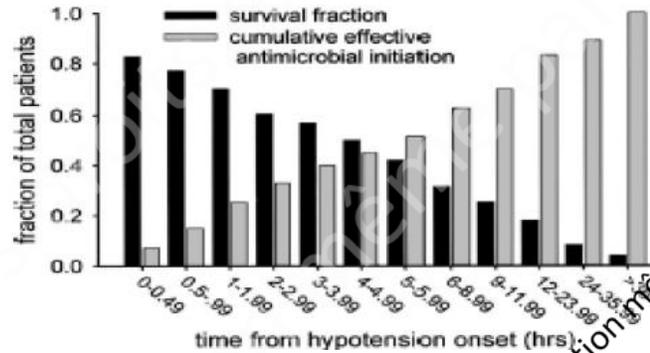
33,110 décès attribuables à la résistance en Europe (6.4/100,000 hab)

Nécessité de trouver de nouveaux biomarqueurs prédictifs de la résistance chez les BGN

- But : éviter une surconsommation des ATB à large spectre
- Difficulté : des centaines de gènes impliqués chez les BGN

Sepsis : urgence thérapeutique

- Réponse inflammatoire systémique de l'organisme face à une infection
- **Nécessité d'une antibiothérapie précoce et adaptée**

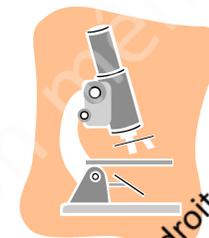


Chaque heure sans ATBthérapie adaptée = \searrow 7,6 % de la probabilité de survie

Kumar, 2006



- mais... que fait le laboratoire ??
 - 36 à 48 h pour obtenir un antibiogramme...
 - Peu ou pas de tests moléculaires rapides...
- → une antibiothérapie probabiliste
 - Large spectre ↔ pression de sélection



Protocole « Hemotion »

Détection des intégrons à partir des flacons d'hémocultures positifs à BGN

- Recherche des IR de classe 1, 2 et 3 par qPCR
à partir de flacons d'hémoculture positifs à BGN

NB : sans extraction, dilution au 1/100^e

- La présence ou l'absence des IR a été confrontée au(x) phénotype(s) de résistance aux ATB des BGN isolés en se focalisant sur des ATB d'intérêt clinique
- Etude prospective observationnelle

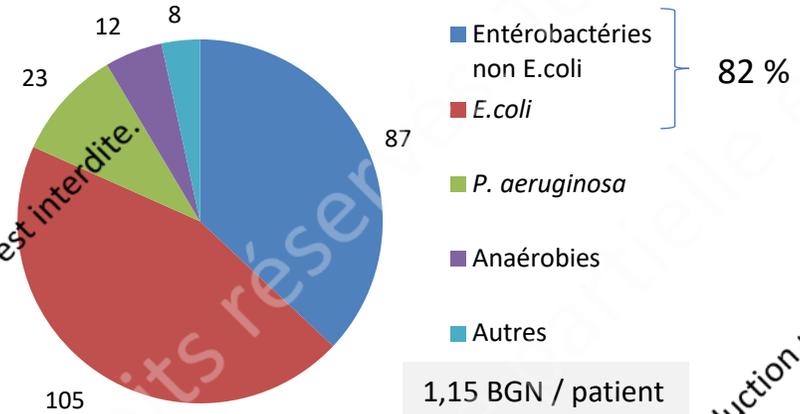


Barraud et al, IJAA, 2014

Résultats

| | |
|------------------------|--------------|
| Nb de patients : | 205 |
| Nb de souches : | 259 |
| Nb de BGN : | 235 |
| Nb d'entérobactéries : | 192 (81,7 %) |
| Nb d' <i>E.coli</i> : | 105 (44,7 %) |

Répartition des BGN



% de patients avec BGN Intégron + : 25,9 %

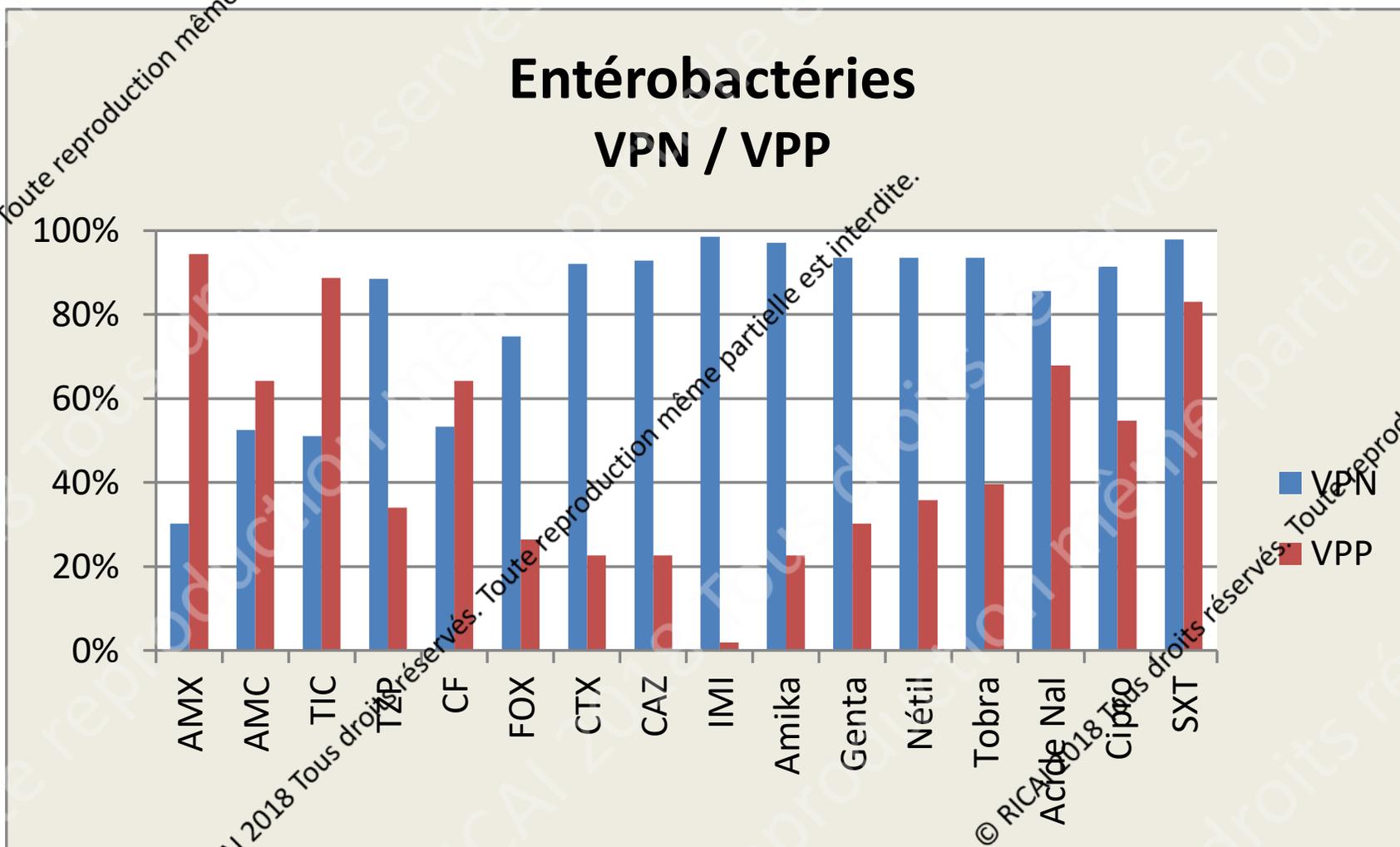
| | BGN | Entérobactéries | Entérobactéries non <i>E.coli</i> | <i>E.coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | Anaérobies | Autres BGN |
|-------------------------------|--------------|-----------------|-----------------------------------|---------------|----------------------|-------------|-------------|
| <i>int11+</i> seul | 50 | 46 | 13 | 33 | 4 | 0 | 0 |
| <i>int12+</i> seul | 4 | 4 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| <i>int11+</i> , <i>int12+</i> | 3 | 3 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| <i>int1+</i> | 57 | 53 | 15 | 38 | 4 | 0 | 0 |
| % <i>int1+</i> | 24,3% | 27,6% | 17,2% | 36,2% | 17,4% | 0,0% | 0,0% |
| <i>int1-</i> | 178 | 139 | 72 | 67 | 19 | 12 | 8 |
| Total | 235 | 192 | 87 | 105 | 23 | 12 | 8 |

Résultats : concordance qPCR HC / BGN

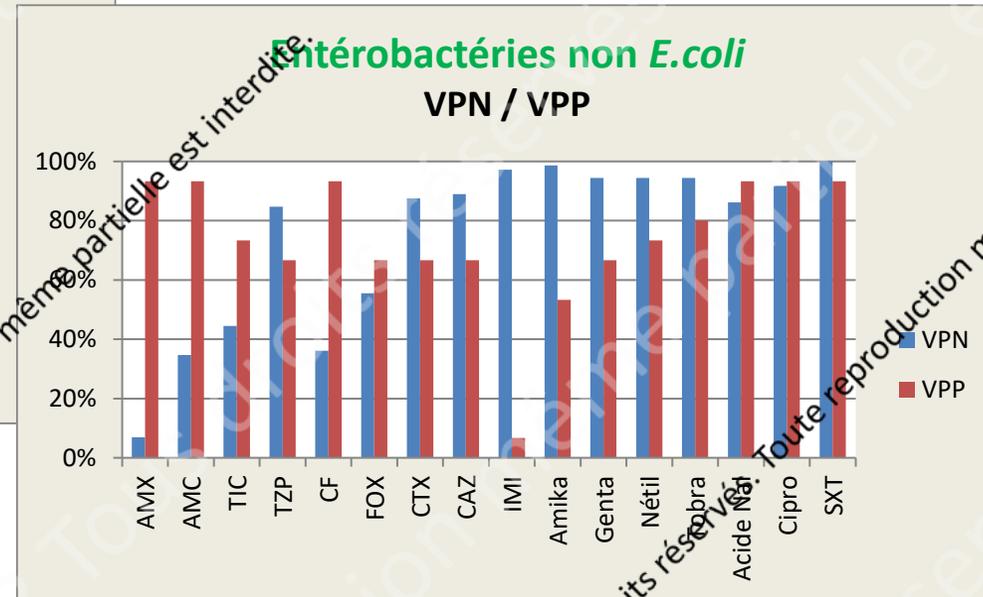
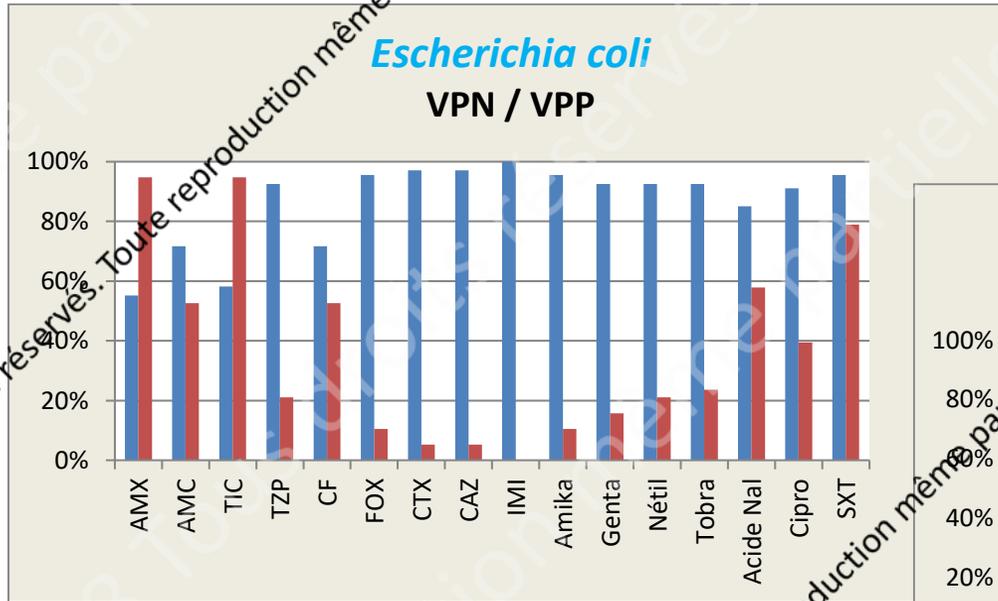
| Triplex qPCR Hémocultures (HC) n =205 | | | | |
|---------------------------------------|--------------------------------|----------------|--------------------------------|---------------|
| | <i>int11</i> + | <i>int12</i> + | <i>int11</i> +, <i>int12</i> + | <i>int1</i> - |
| Isolement d'1 BGN | <i>int11</i> + | 49 | | 2 |
| | <i>int12</i> + | | 7 | |
| | <i>int11</i> +, <i>int12</i> + | | 3 | |
| | <i>int1</i> - | 1 | | 143 |

Concordance de 98,5 %

Résultats : VPP / VPN



Résultats : VPP / VPN



E. coli : VPN vis-à-vis des C3G : 97 %

Autres entérobactéries :

- **VPN : 100 %** vis-à-vis du phénotype BLSE, de la résistance à l'amikacine et de la résistance au cotrimoxazole



IRIS : détection des intégrons dans le sepsis

- Etude observationnelle, descriptive, multicentrique, prospective

- Population étudiée :

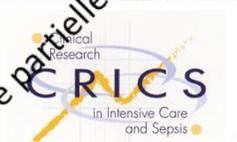
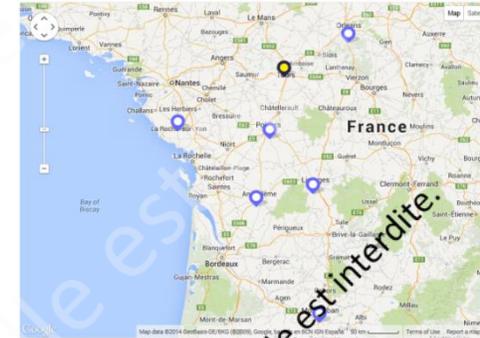
- 409 patients en Sepsis, Sepsis sévère ou choc septique
- à point de départ urinaire (83%) ou intra-abdominal (17%)
- 16% choc septique

- Objectif principal :

Déterminer les VPP et VPN de la détection des intégrons directement à partir des échantillons biologiques (ECBU, liquide péritonéal, bile... + sang) en tant que marqueur de résistance acquise aux ATB

842 échantillons, 650 BGN (95% entérobactéries)

33% des patients avec un liquide biologique intégron +



Résultats : VPP / VPN

| | All sepsis | Urinary sepsis | Intra-abdominal sepsis |
|--------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| NPVs (%) | 94.2 [90.7; 96.6] | 95.7 [93.6; 97.5] | 92.4 [89.2; 95.2] |
| PPVs (%) | 61.5 [52.7; 69.7] | 58.3 [49.4; 66.8] | 69.7 [59.7; 79.3] |

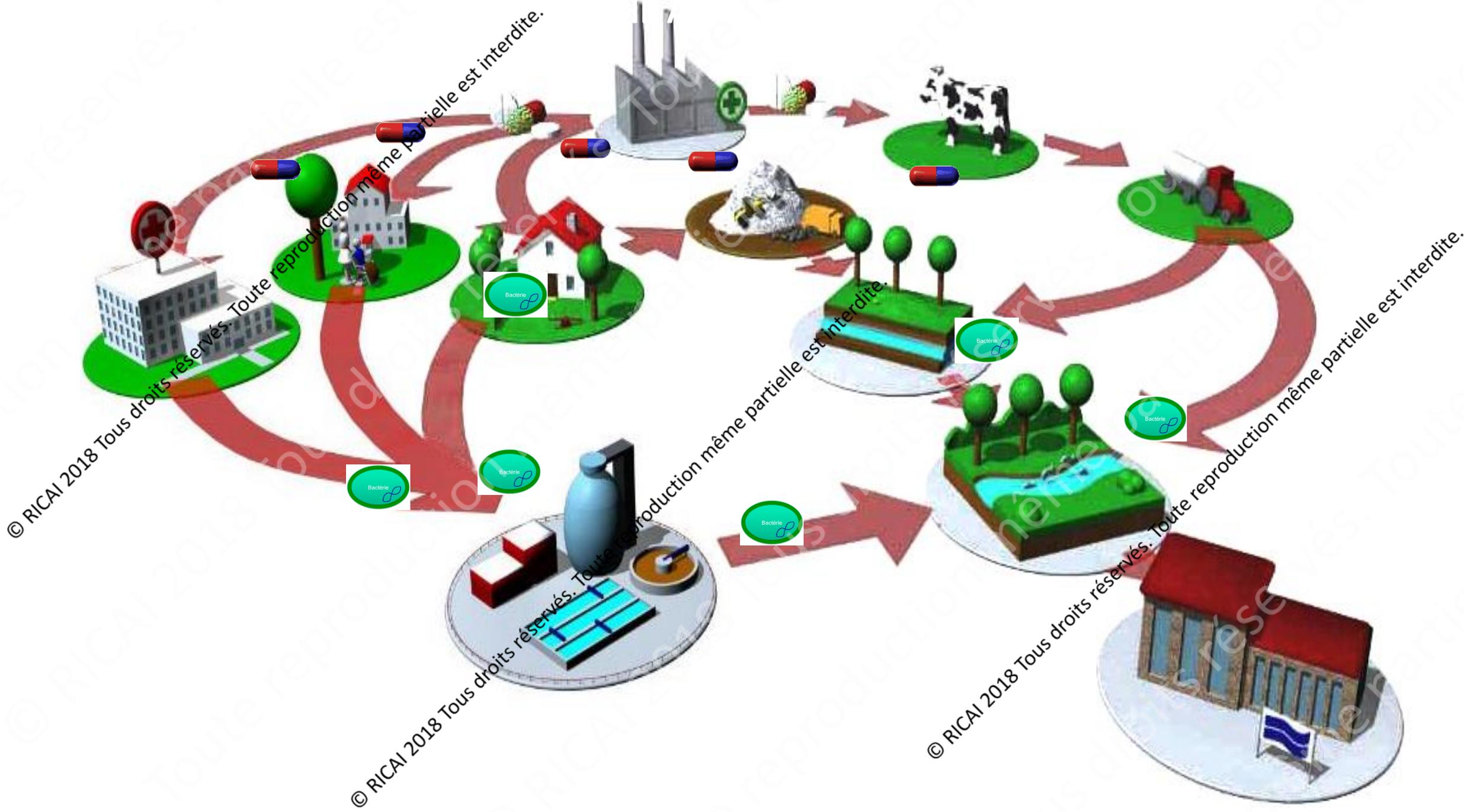
Résultats : VPP / VPN

| NPVs (%) | cefotaxime | gentamicin | fluoro-quinolones | cotrimoxazole |
|-----------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Urinary sepsis | 96.6 [94.3 ; 98.6] | 96.2 [93.5 ; 98.5] | 92.2 [88.8 ; 95.3] | 96.7 [94.3 ; 98.7] |
| Intra-abdominal | 90.2 [81.5 ; 97.6] | 96.8 [91.5 ; 100.0] | 93.6 [86.5 ; 100.0] | 97.6 [93.7 ; 100.0] |

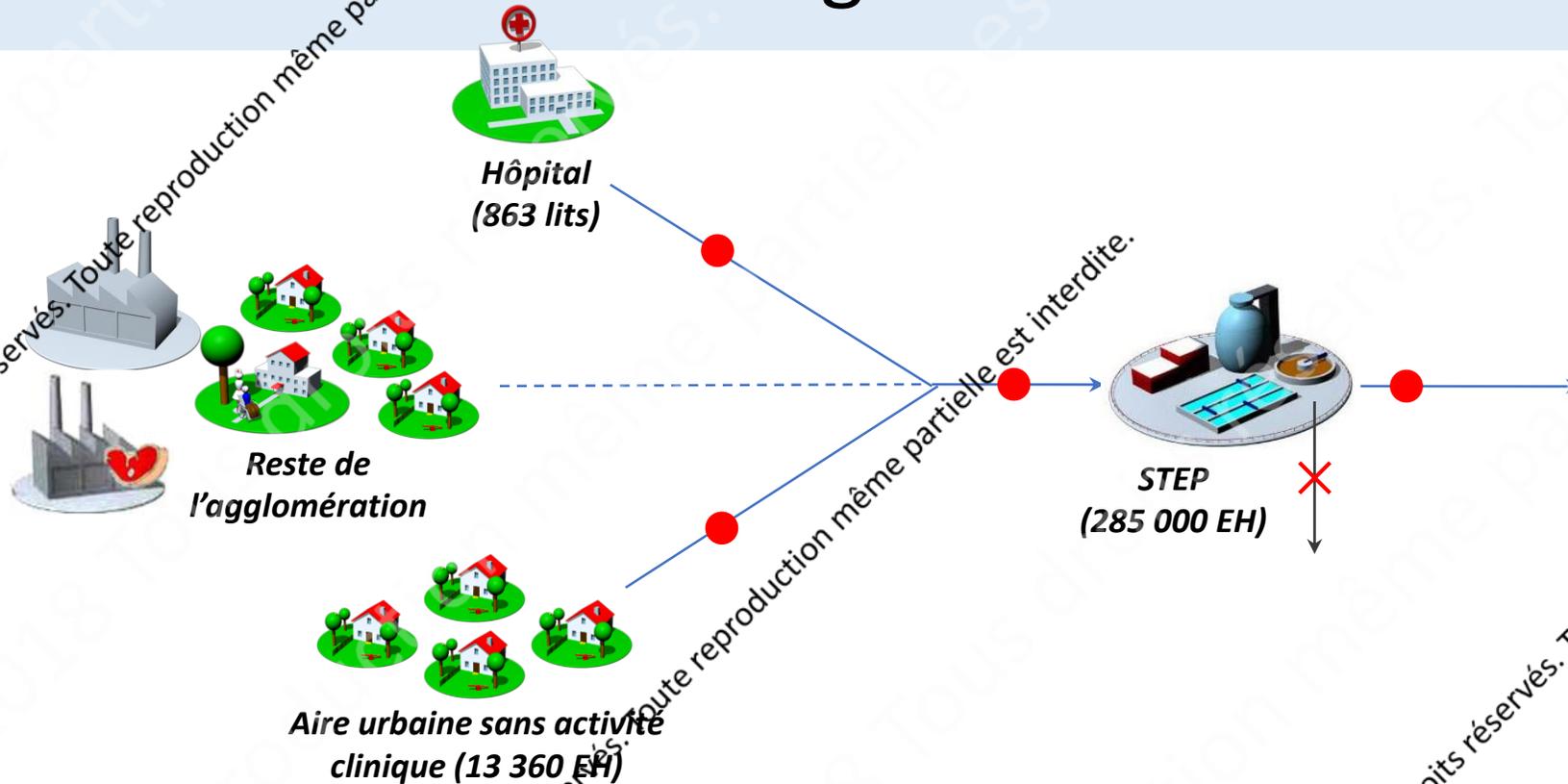
© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

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

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

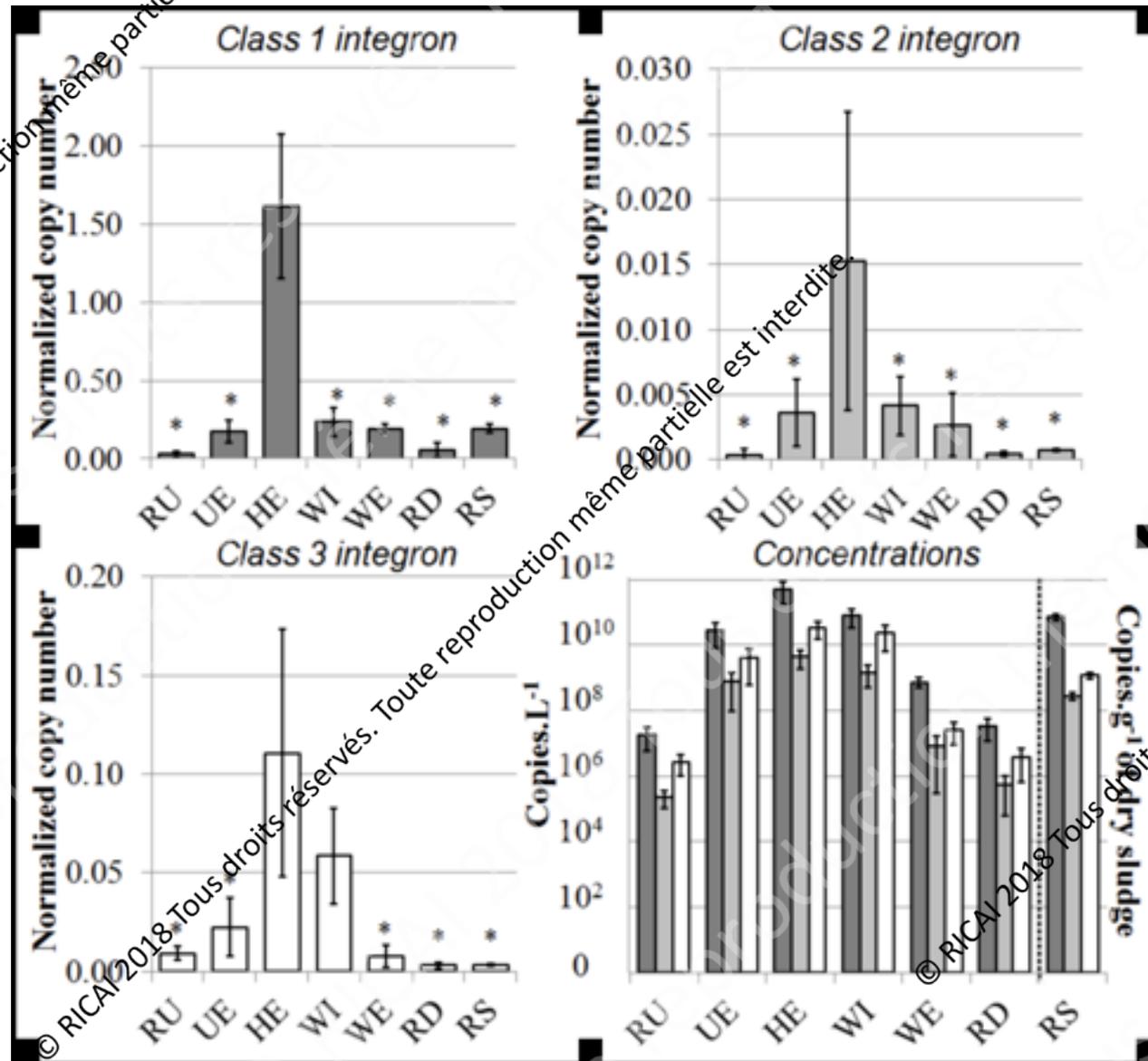


Influence d'un effluent hospitalier sur la dissémination des intégrons



- Prélèvements moyens 24h asservis au débit
- Prélèvements ponctuels ✗
- Prélèvement 3x en semaine = activités cliniques normales
- Prélèvement 3x en week-end = activités cliniques réduites

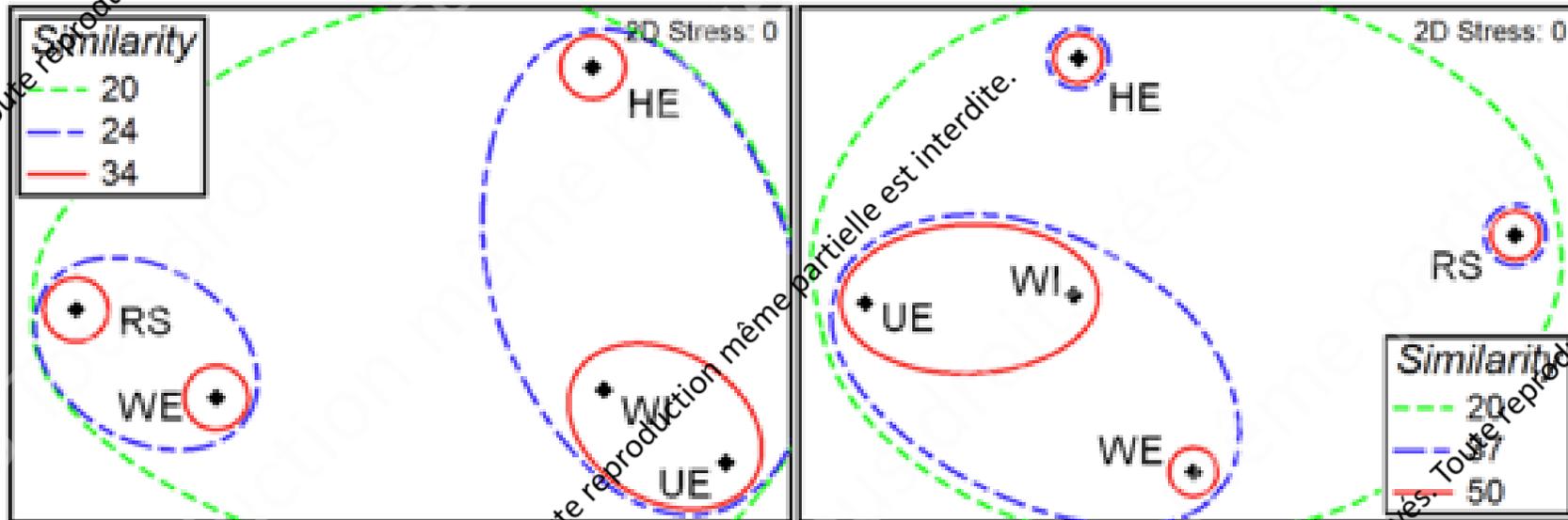
Abondance relative en intégrons (nombre copy inti / nombre de copies d'ADN codant l'ARN16S)



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

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

Diversité des cassettes

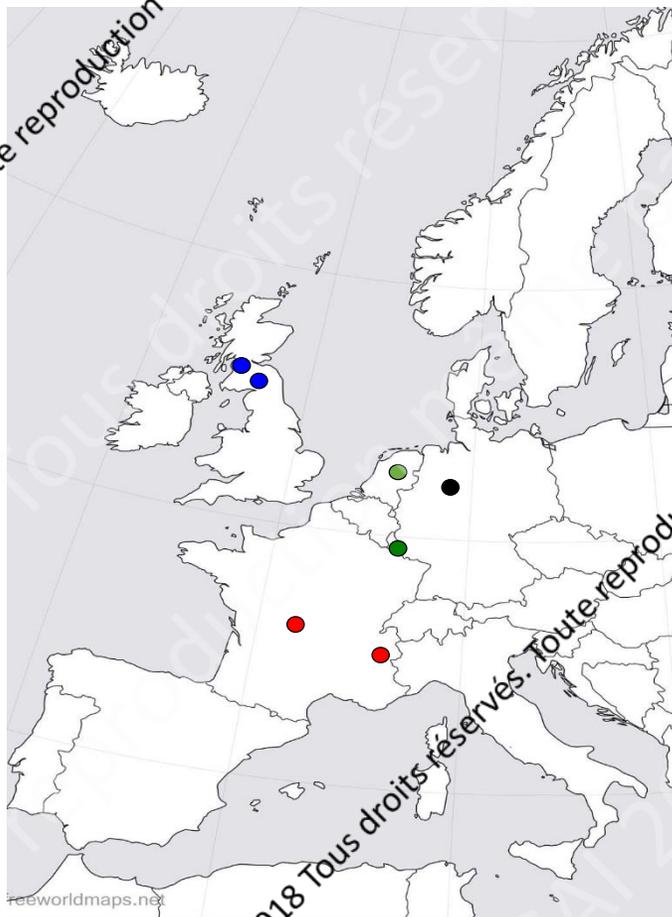


Réseaux de cassettes

Pools de cassettes

Cassettome : signatures spécifiques ?

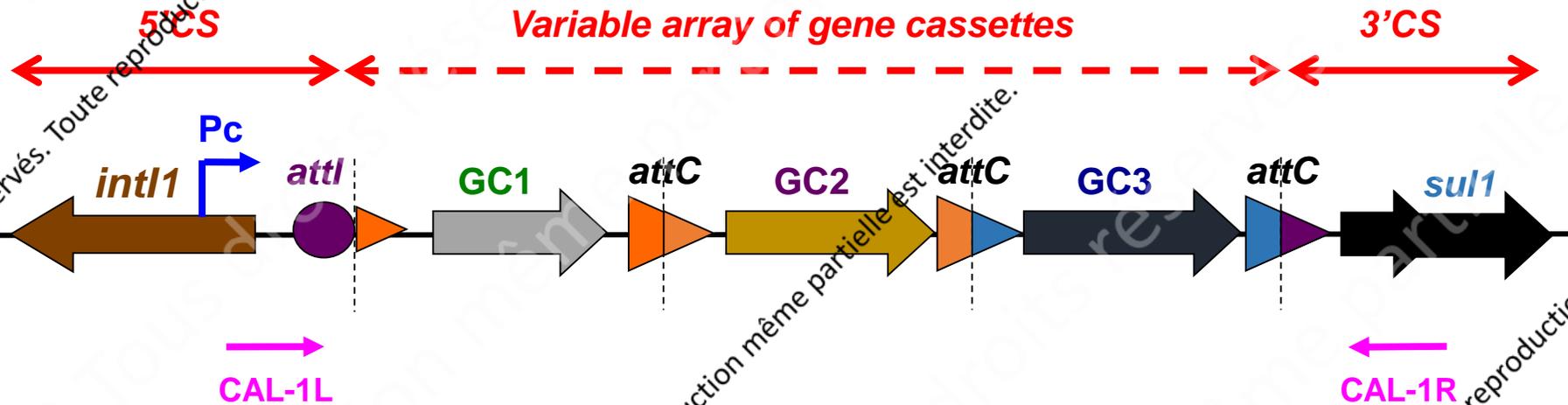
10 Hôpitaux européens



- France: **F1a, F1b, F2**
- Scotland: **S1, S2, S3a, S3b**
- The Netherlands: **N1**
- Luxembourg: **L1**
- Germany: **G1**

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

Amplification des cassettes à partir ADN total effluents



NGS sur les produits de PCR
Ion Proton™ system



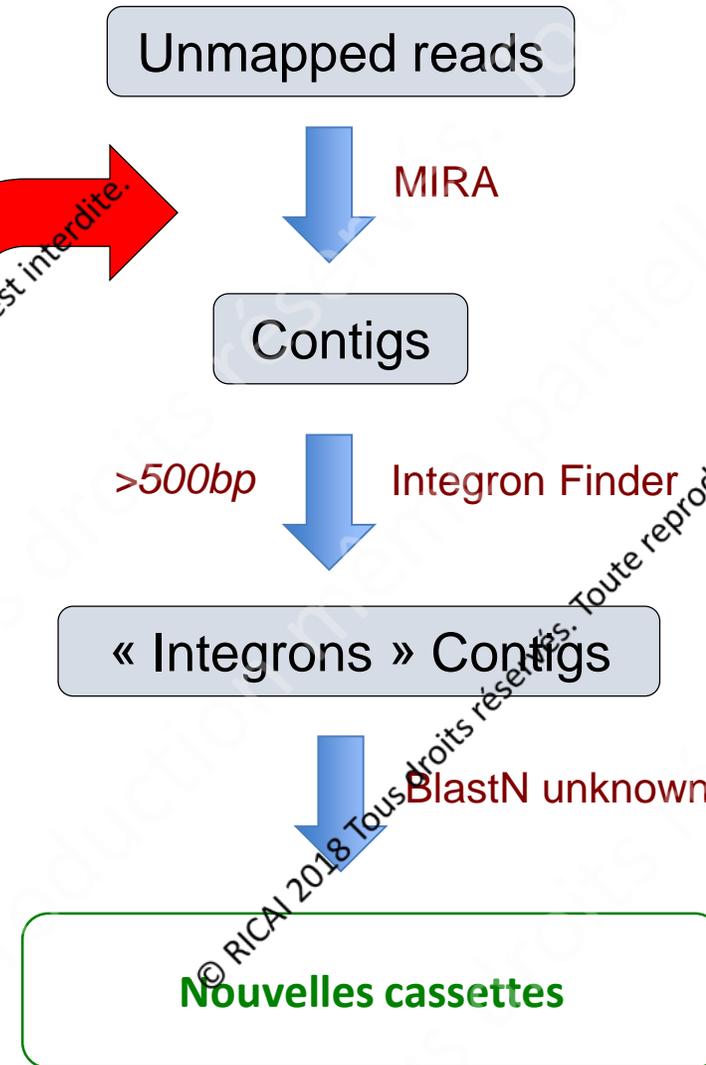
life
technologies™



Raw read mapping

- ✓ 364 gene cassettes connues
 - 145 ATB resistance
 - 216 *gcu*
 - 3 intégrons vides
- Cassettes avec 100% identité sur 50 bp ont été exclues

Assemblage des nouveaux reads

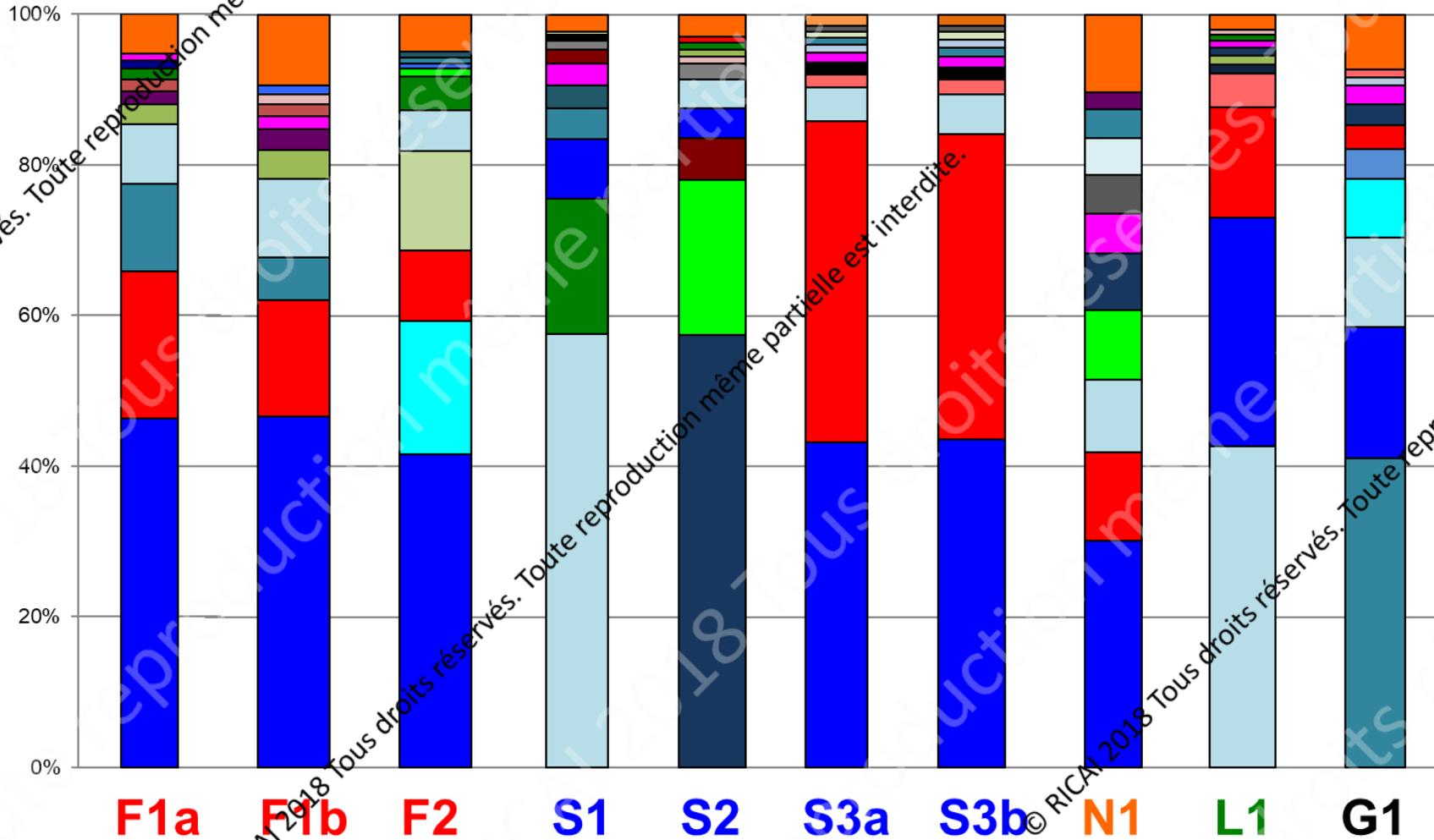


© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

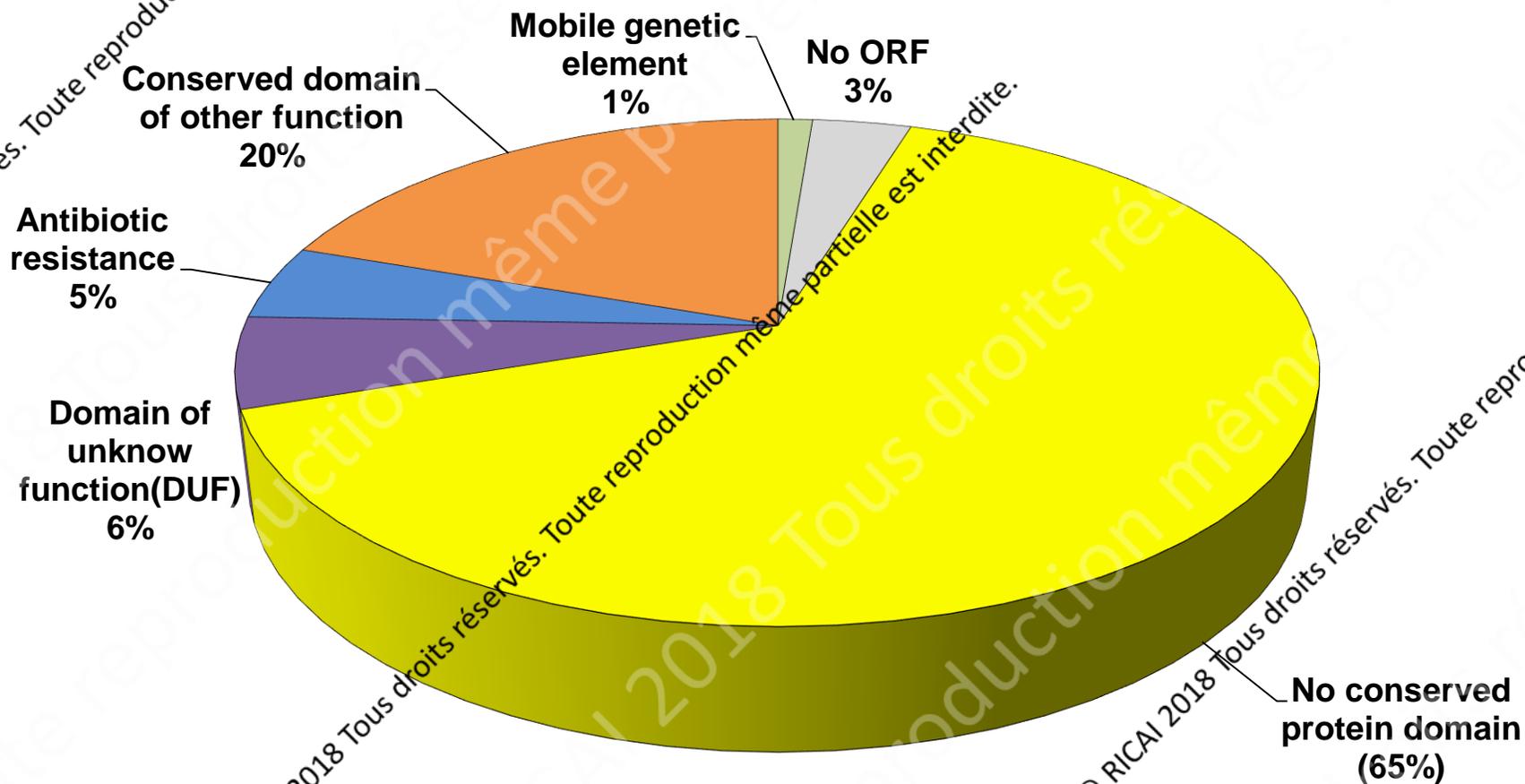
© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

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

Signature spécifique d'hôpital



Nouvelles cassettes

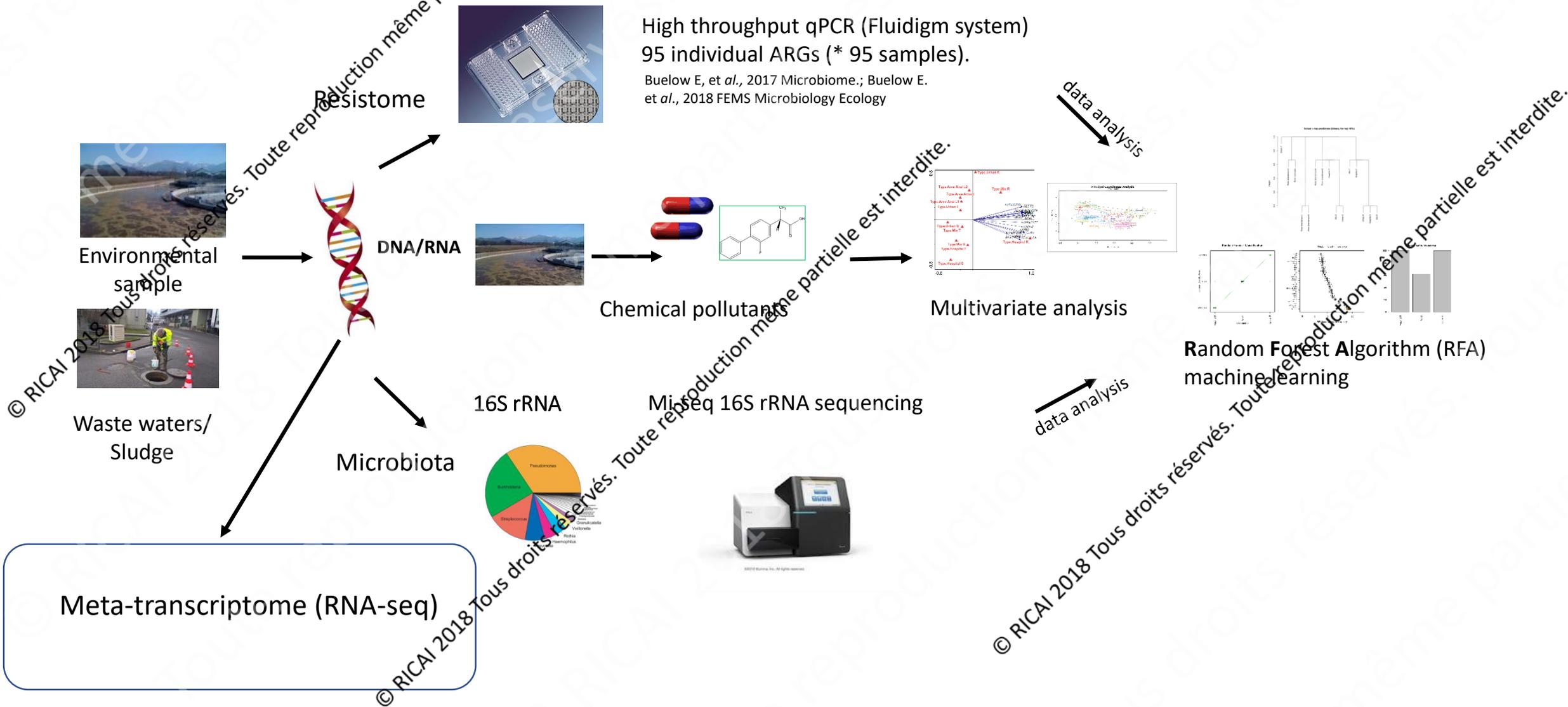


© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

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

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

Analyse de la dynamique du résistome et du microbiome dans des effluents hospitaliers

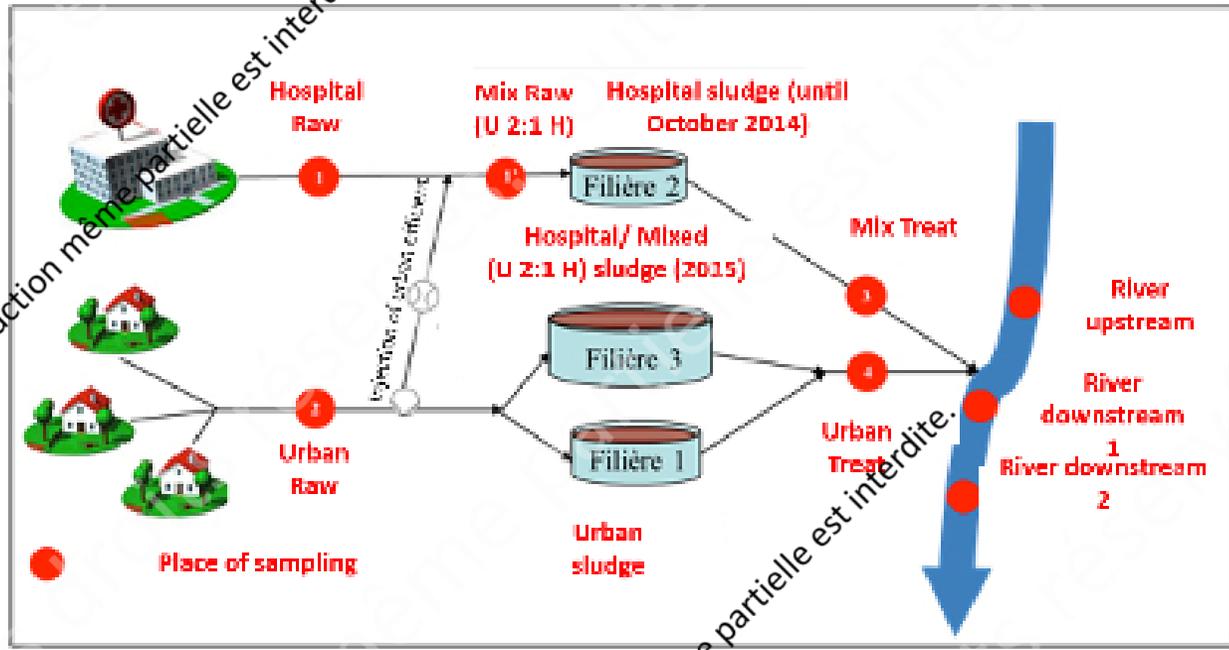


© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

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

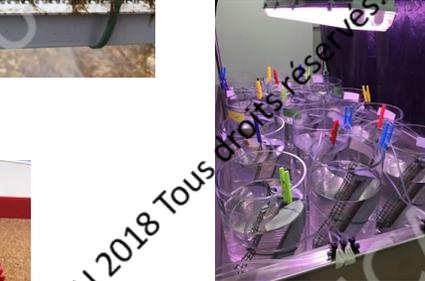
© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

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



Toute reproduction même partielle est interdite.

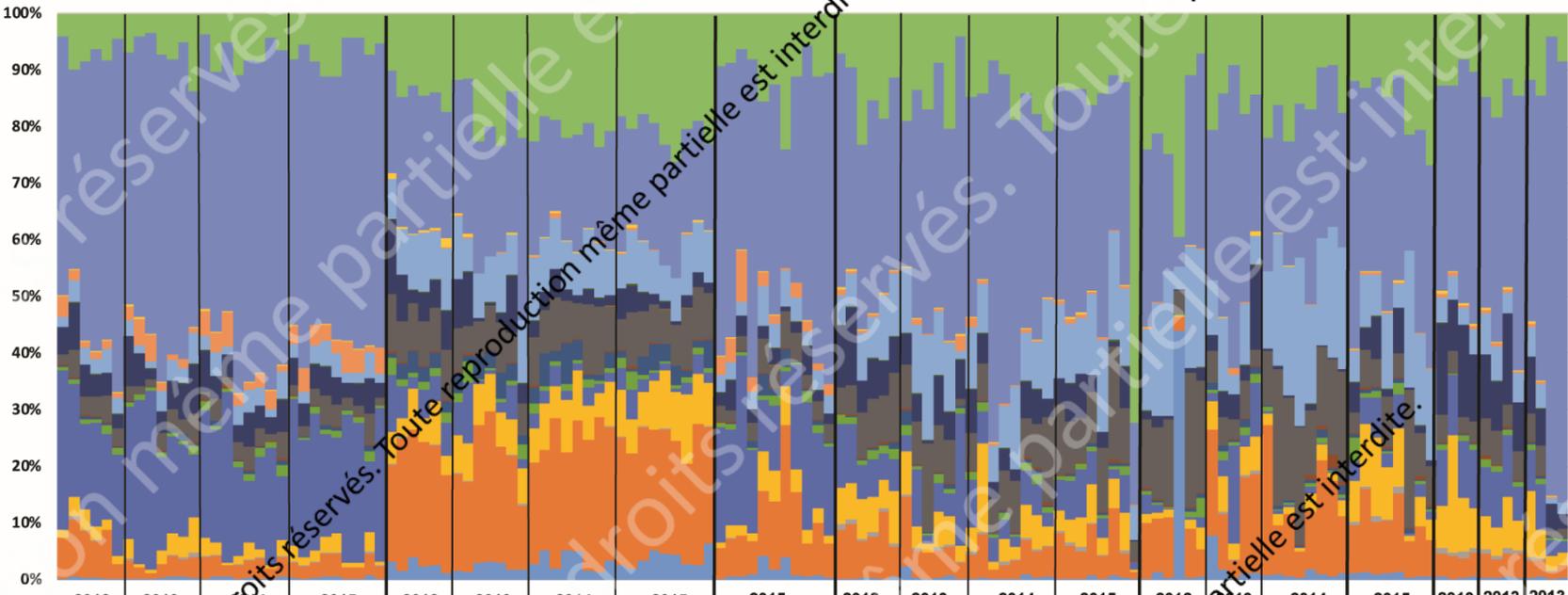
© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.



© RICAI 2018 Tous droits réservés.

resistome

urban R hospital R mix R urban T hospital T mix T Ri Ri1 Ri2

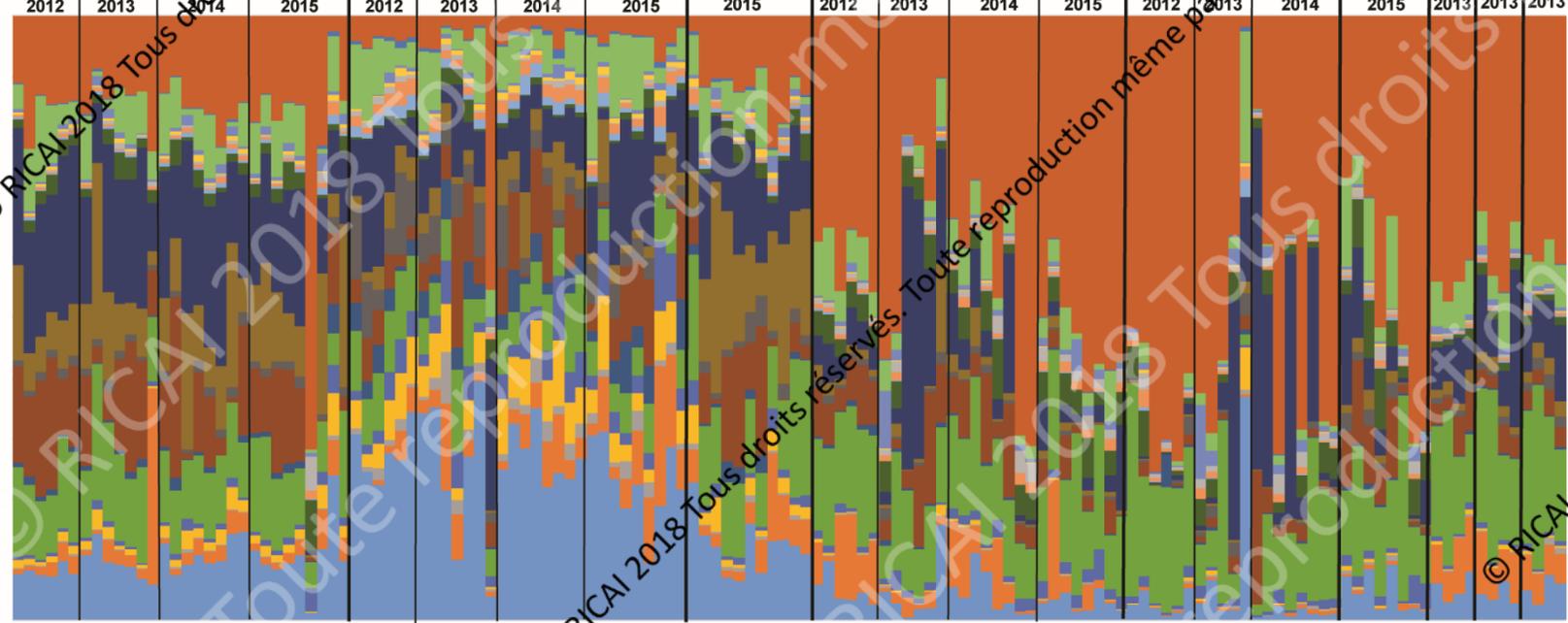


Per sample type :
 R = untreated WW
 T = treated WW
 Ri = river samples

Stable resistome and microbiome over time (year; season)

R:
 no significant changes for resistome (allocated ARG classes) and microbiome

T:
 years seem to differ for the resistome and microbiome of treated wastewaters



microbiome

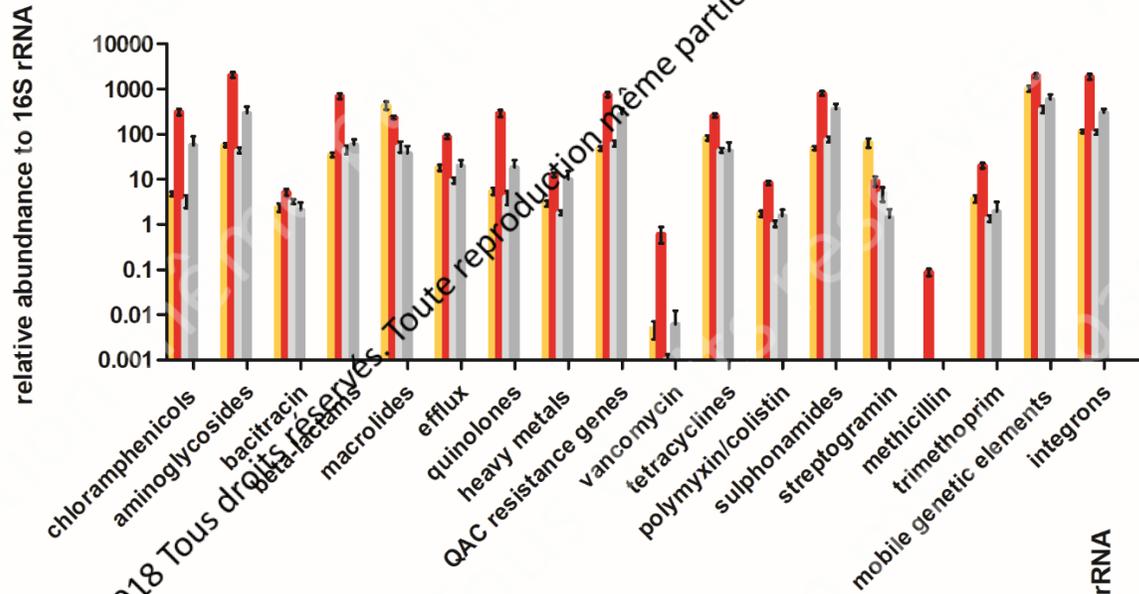
© RICAI 2018

© RICAI 2018

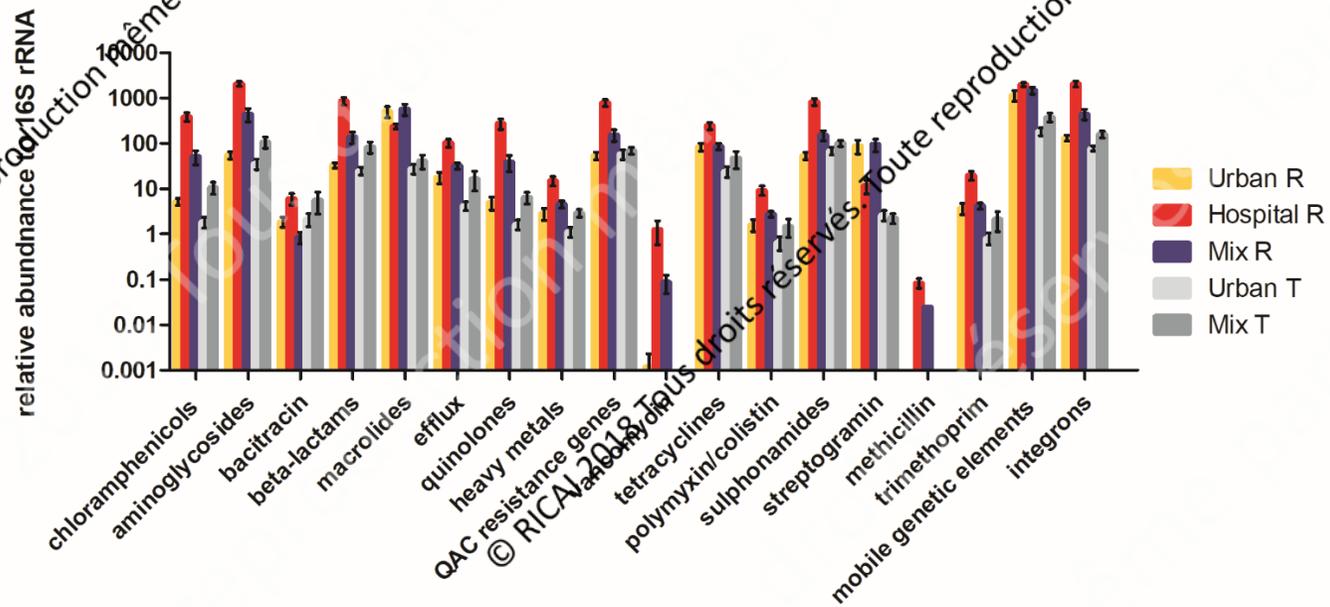
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
2012 2013 2014 2015 2012 2013 2014 2015 2015 2012 2013 2014 2015 2012 2013 2014 2015 2013 2013 2013

Toute reproduction même partielle est interdite.

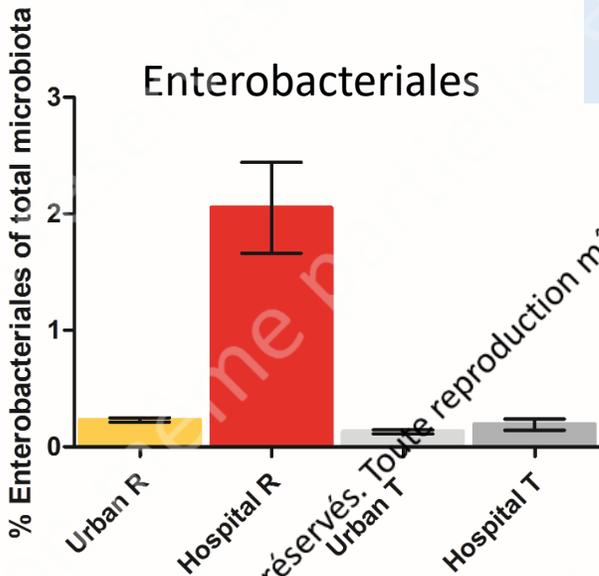
Resistome quantitatif



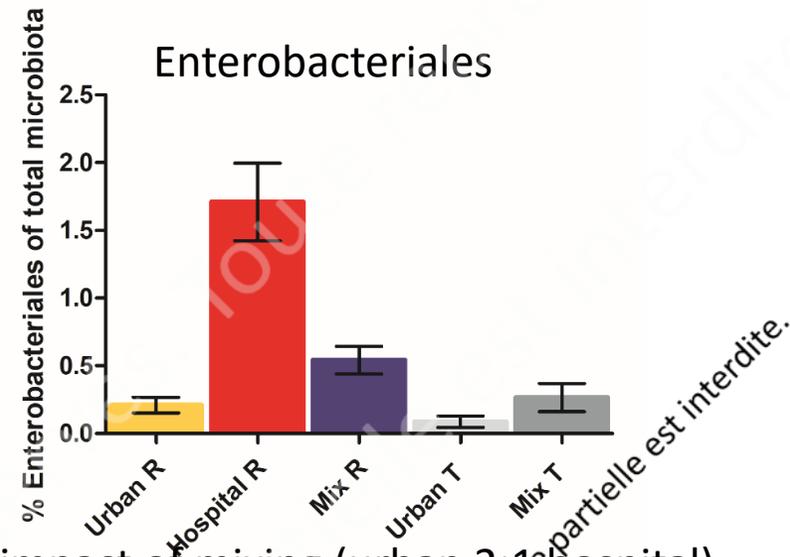
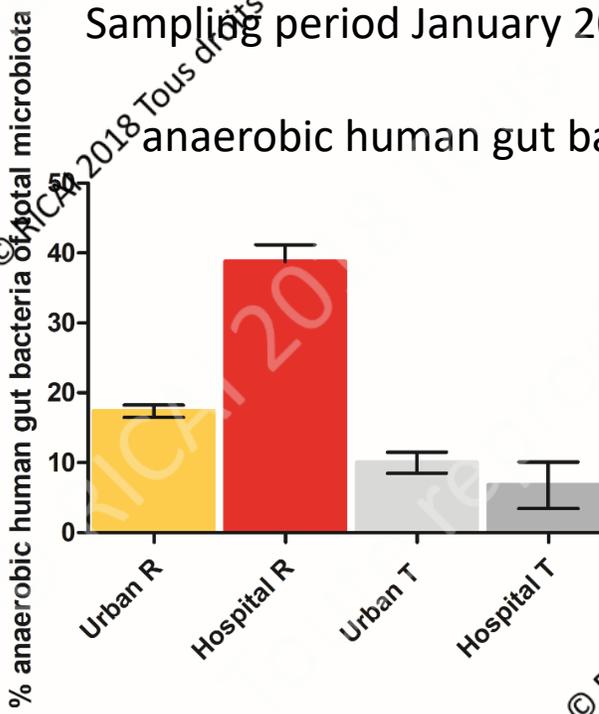
Sampling 2015 – impact of mixing (urban 2:1 hospital)



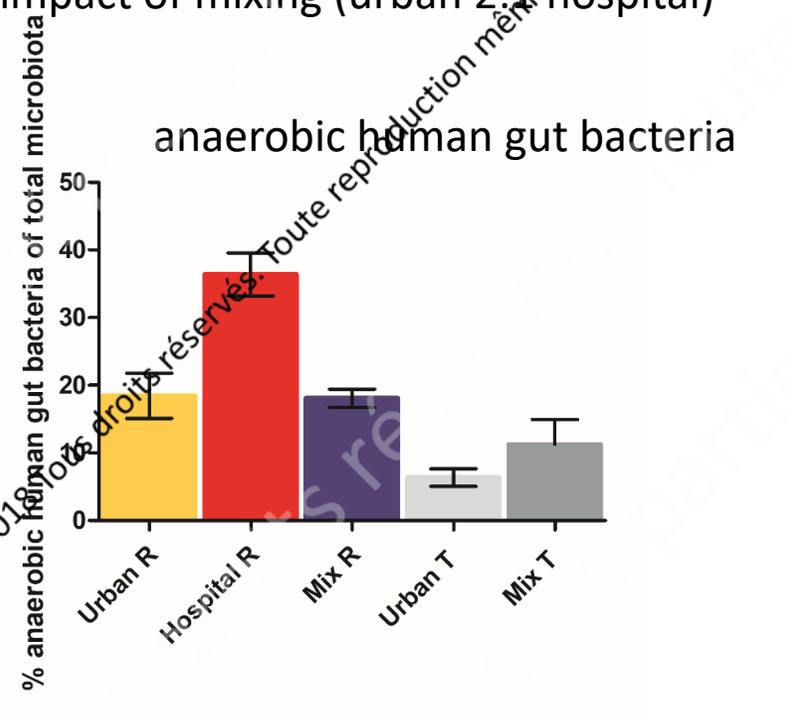
Microbiome



Sampling period January 2012- December 2014



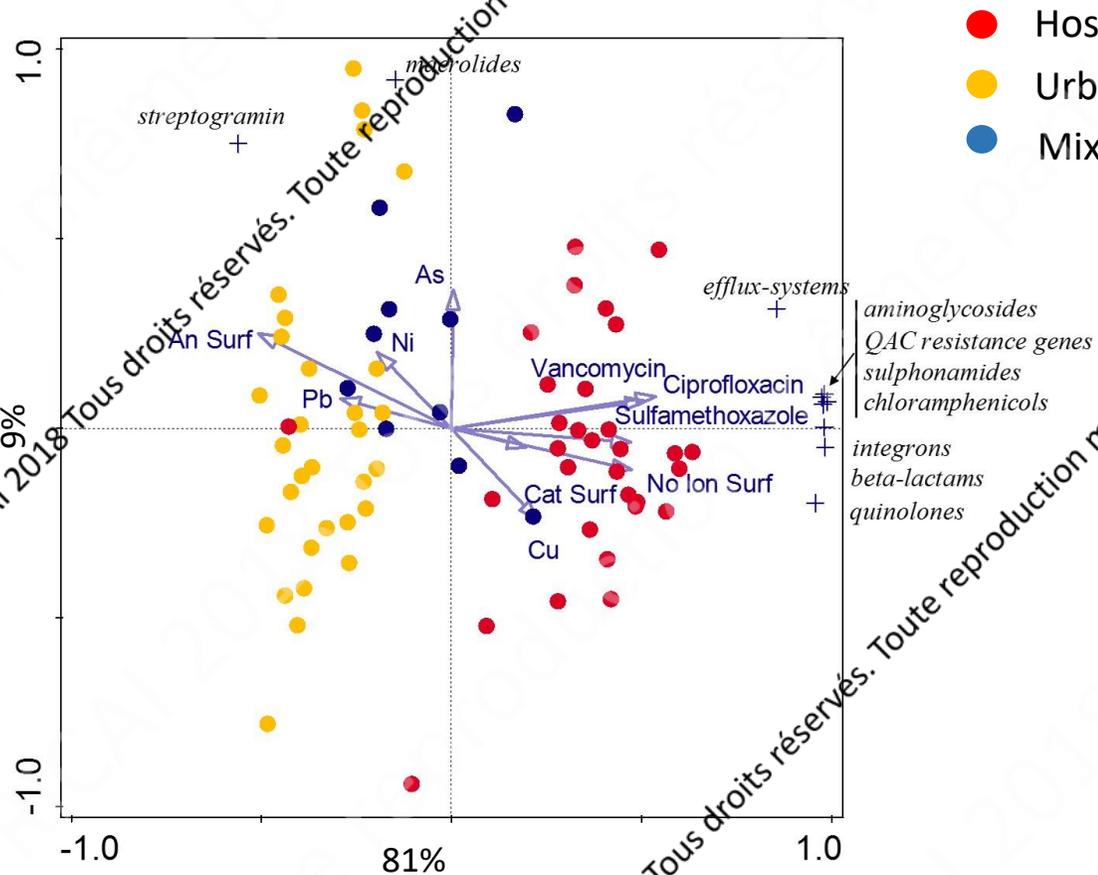
Sampling 2015 – impact of mixing (urban 2:1 hospital)



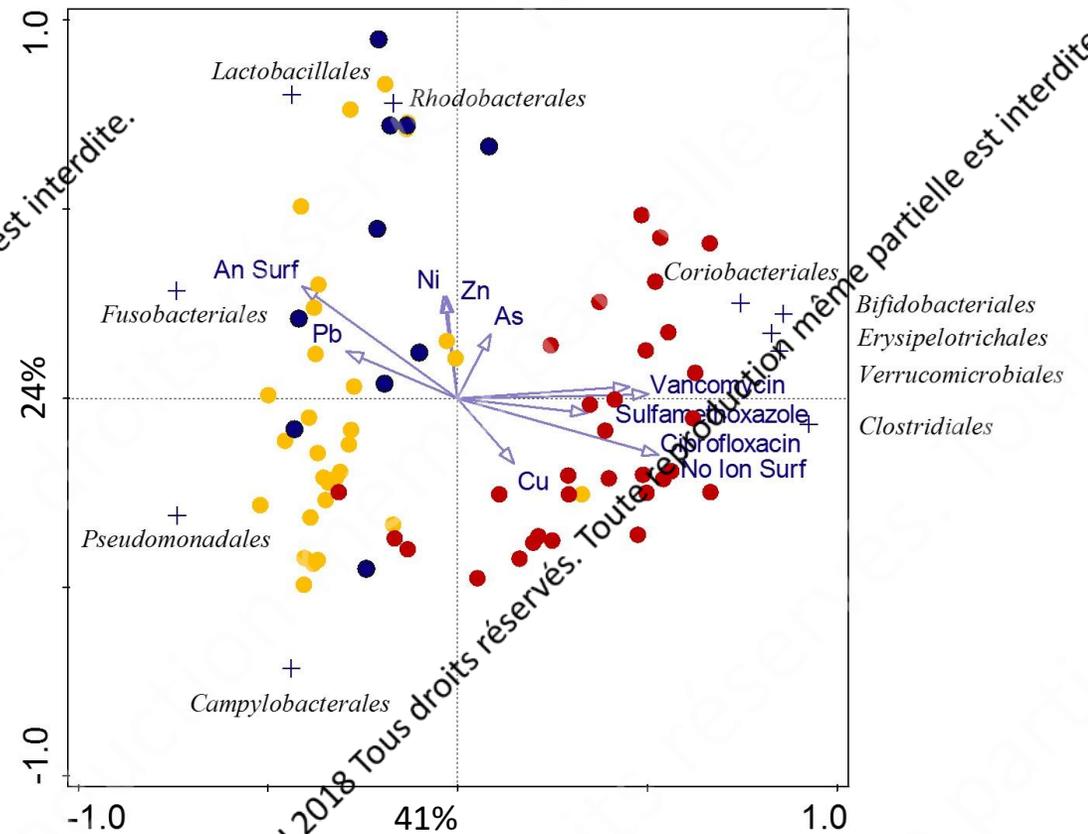
© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

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

Exposome impact sur le Résistome et le Microbiome



PCA showing the dispersal of the **urban (yellow), hospital (red) and mixed (blue) untreated wastewater** samples and their relationship to the **ARG classes (resistome)** and chemicals.

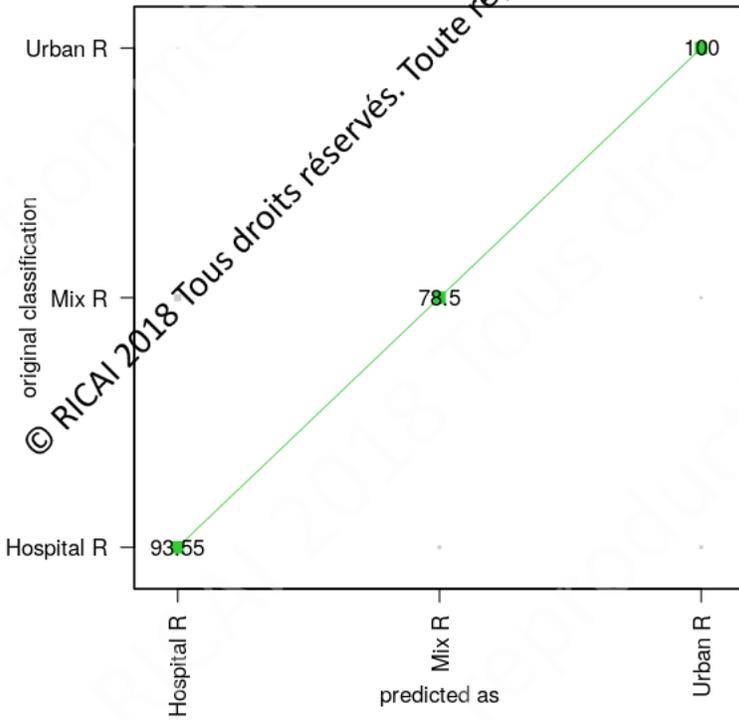


PCA showing the dispersal of the **urban (yellow), hospital (red) and mixed (blue) untreated wastewater** samples and their relationship to the **microbiome** and chemicals.

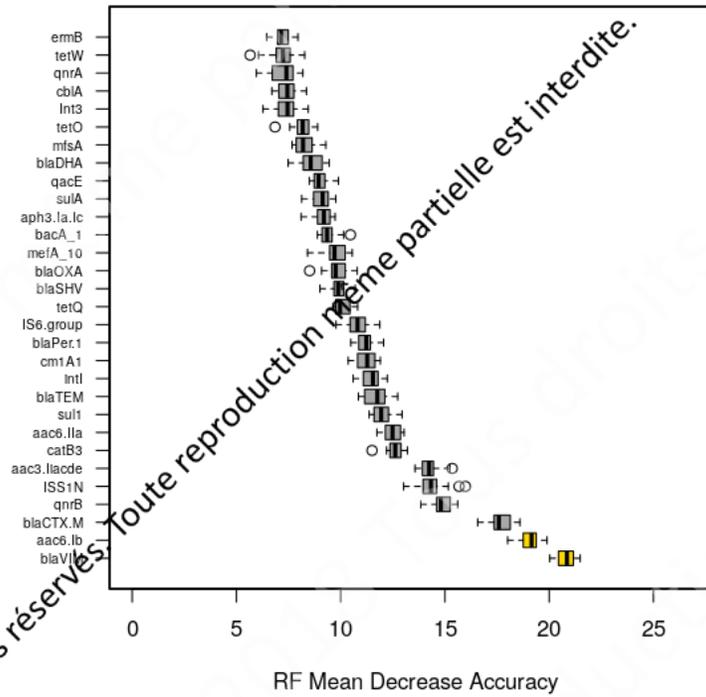
Machine learning prediction

Famille de gènes de résistance

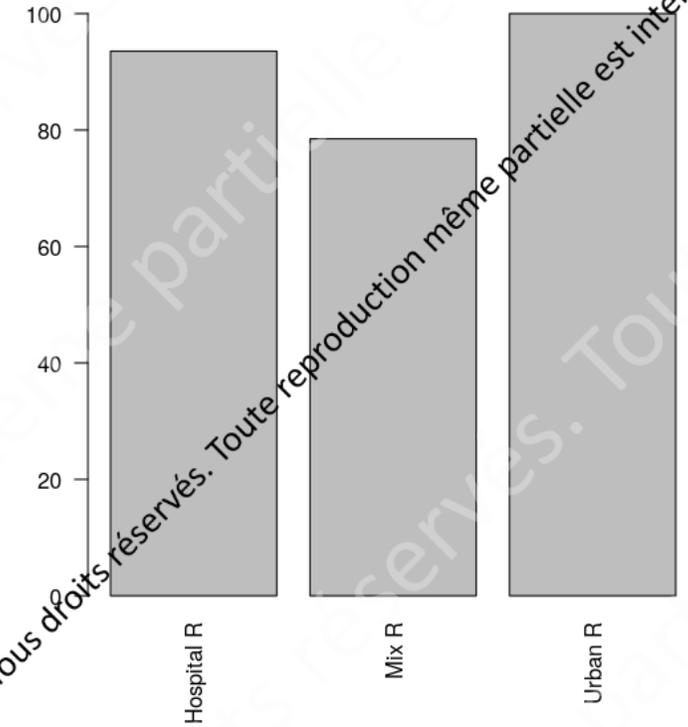
Random Forest - Classification



Random Forest - Importance

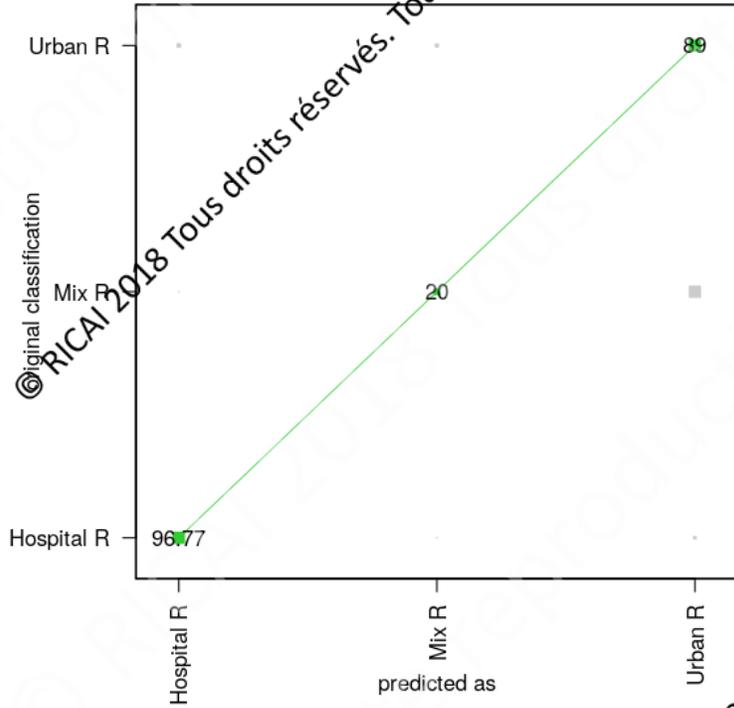


classification success

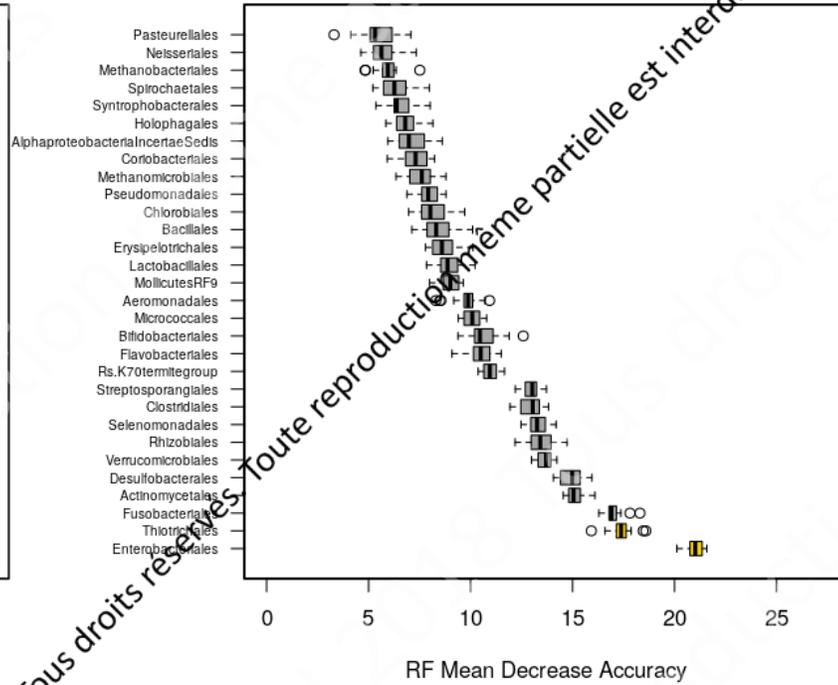


Machine learning prediction Microbiome

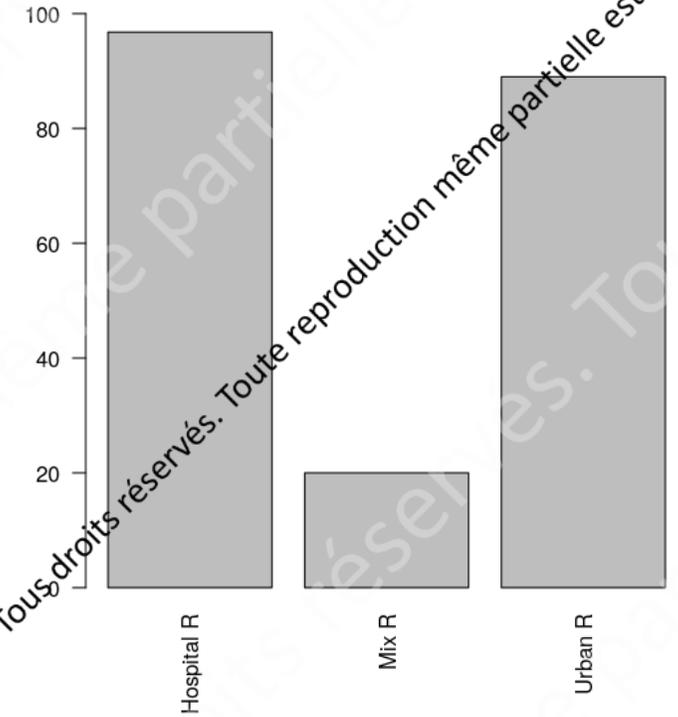
Random Forest - Classification



Random Forest - Importance



classification success





© Olivier Barraud

- Christophe Dagot
- Bruno François
- Elena Buelow
- Thomas Jové
- Delphine Chainier
- Carole Grélaud
- Margaux Gaschet
- Thibault Stalder

