

# Résistome et intégrons

**Marie-Cécile Ploy**

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



Université  
de Limoges

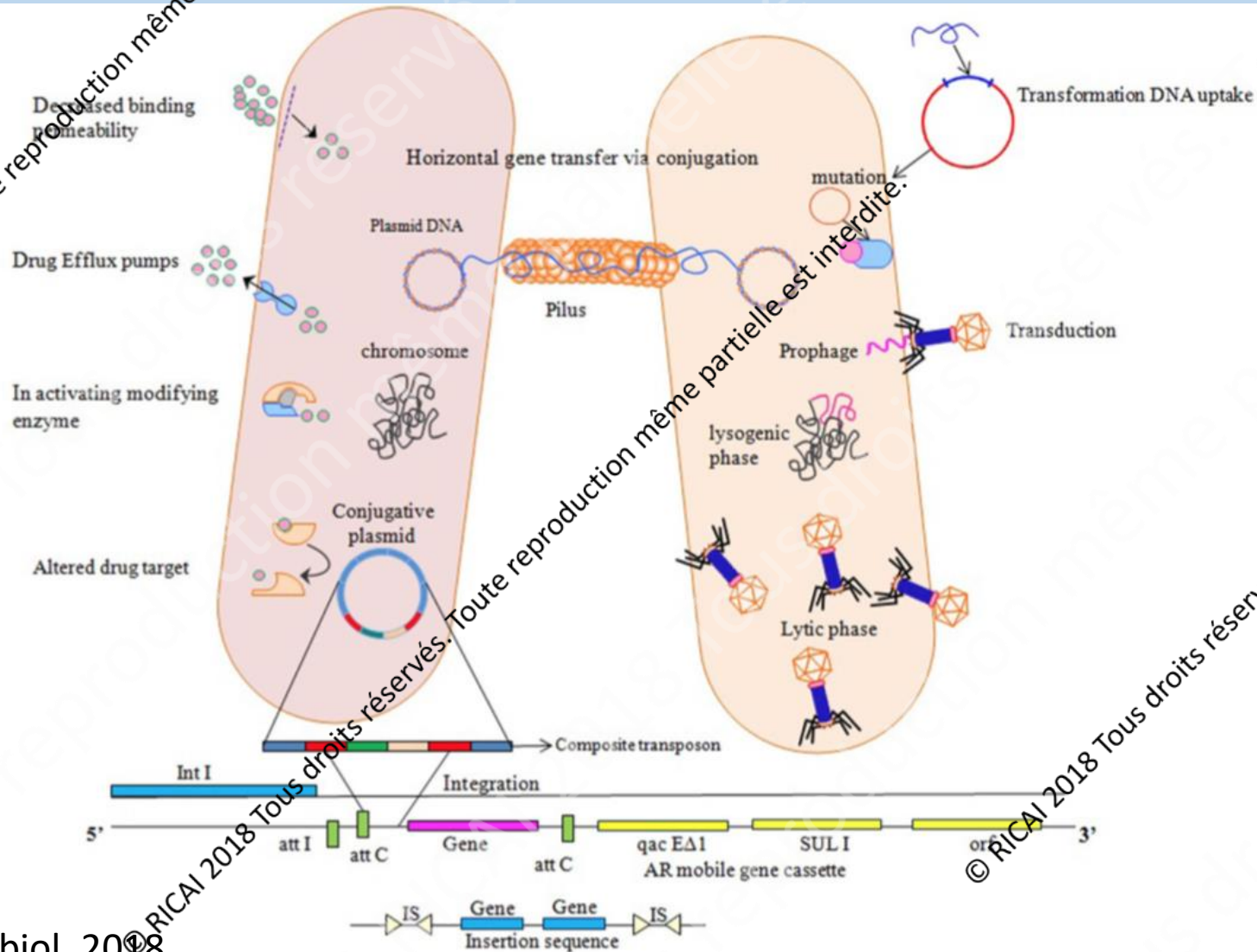


**Inserm**

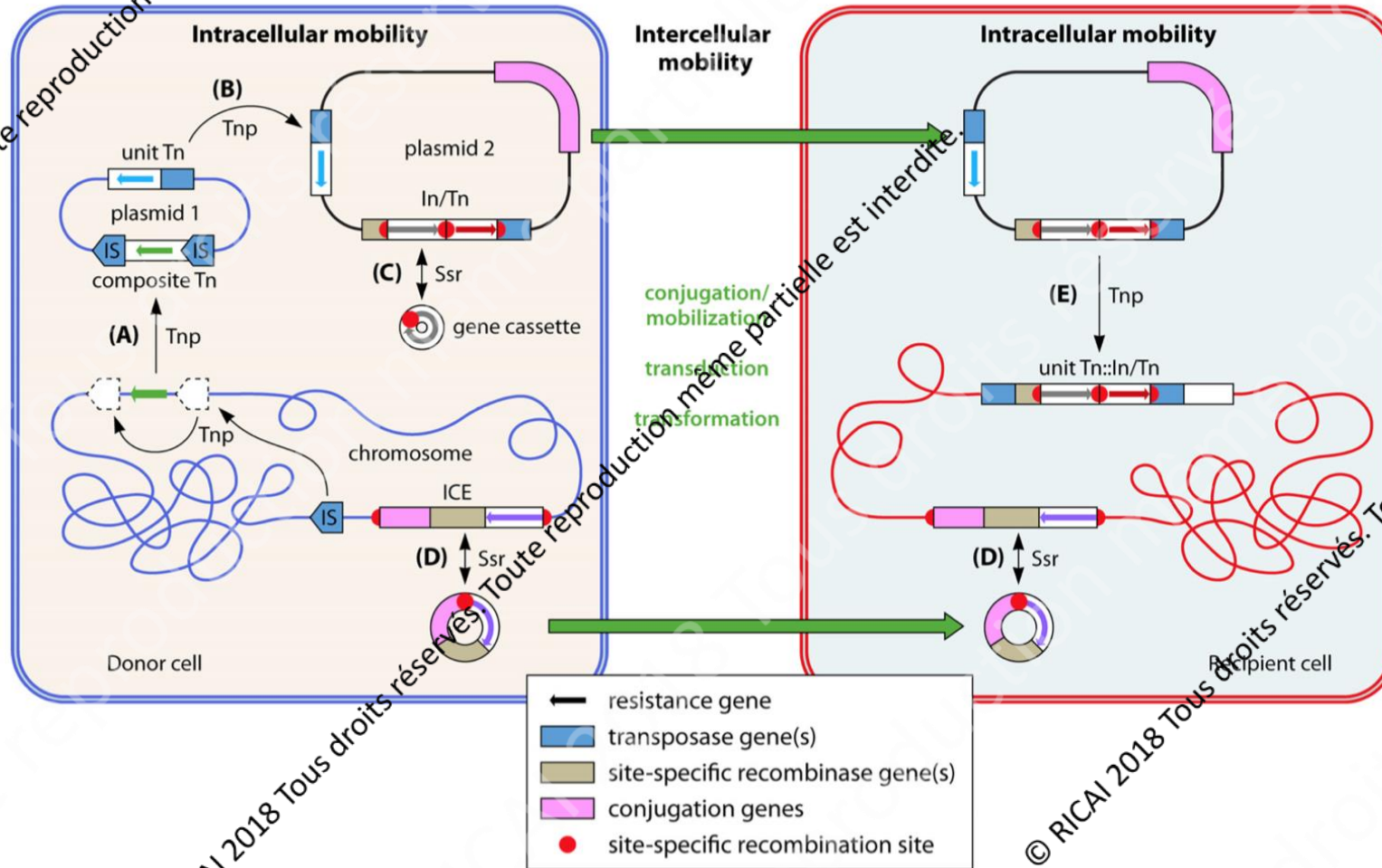
La science pour la santé  
From science to health



# Diversité des mécanismes de résistance et modes d'acquisition



# Diversité des éléments génétiques mobiles



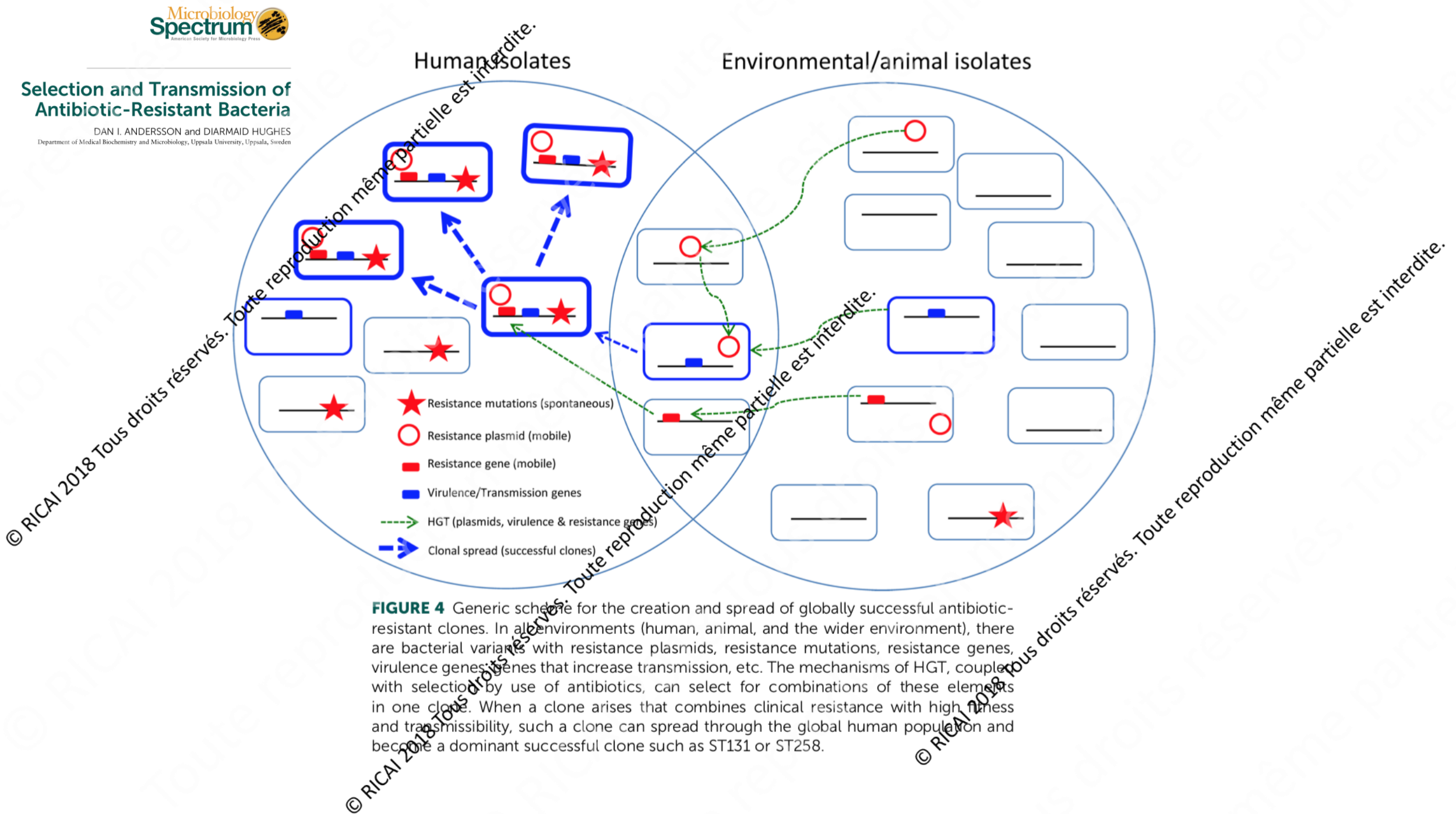
© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© 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



# The One Health Triad



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

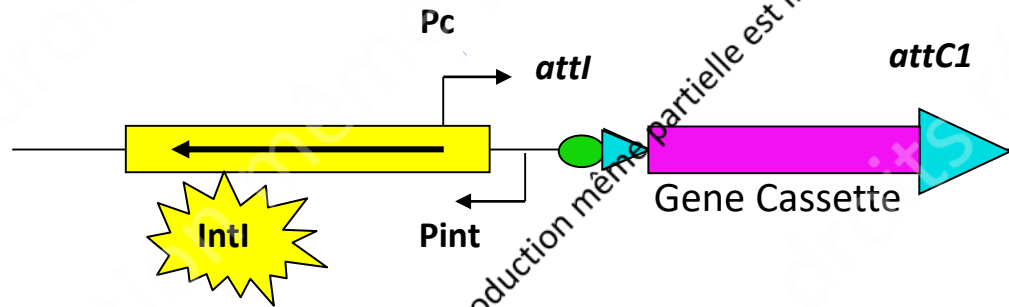
© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

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

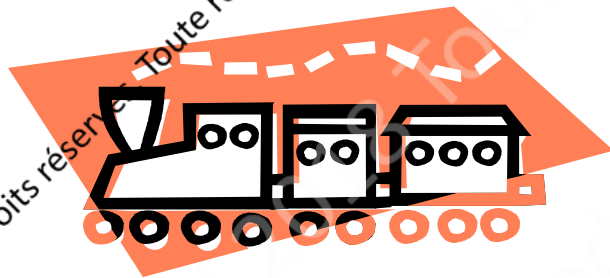
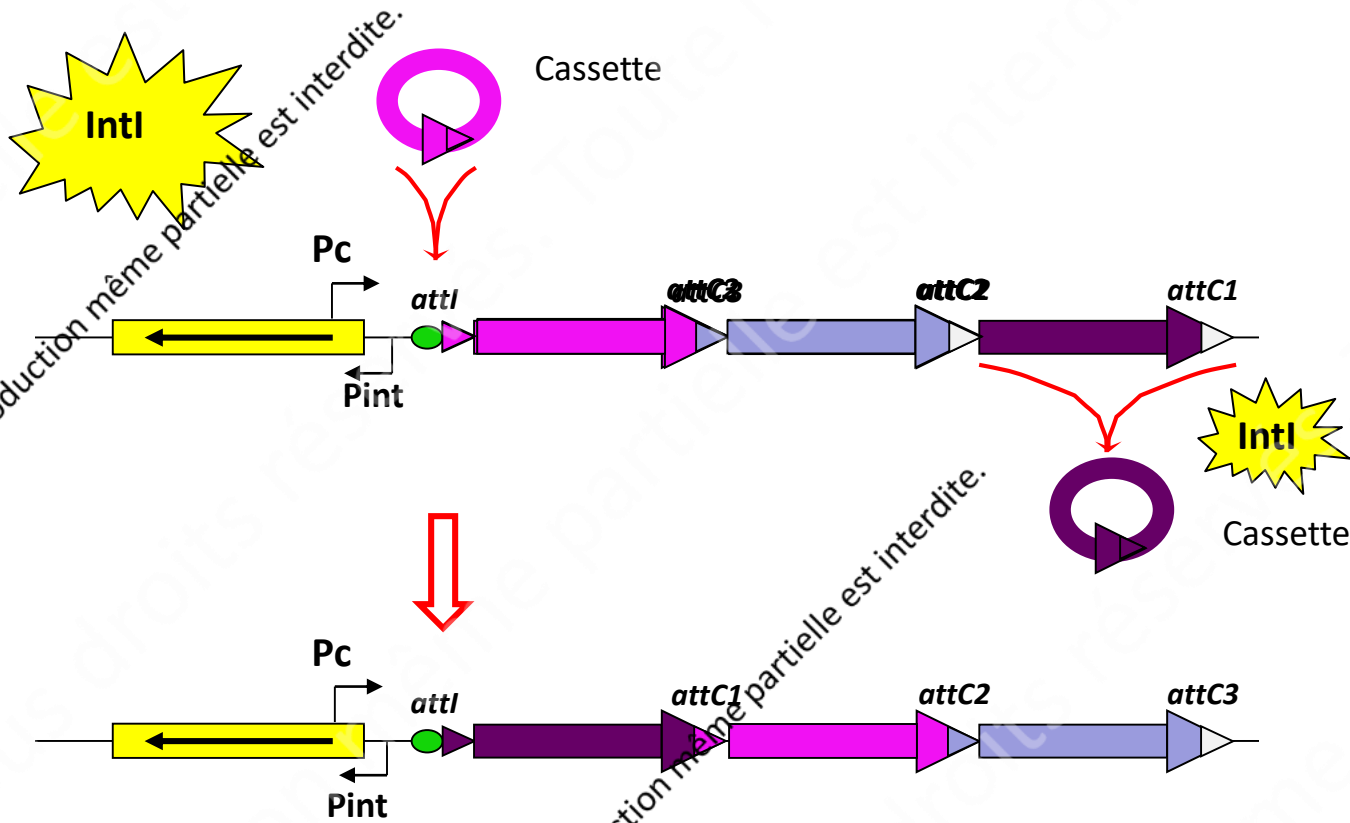
# Intégrons: definition

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.

© 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

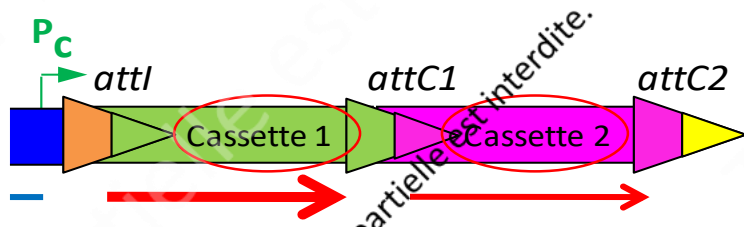
- Peu décrits (< 10 publications)
- Entérobactéries : cassettes de résistance aux antibiotiques
- *Delftia (gca)* : origine environnementale ?



*Barraud et al, 2013*

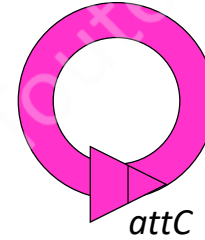
*Xu et al, 2009*





## 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
    - $\beta$ -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

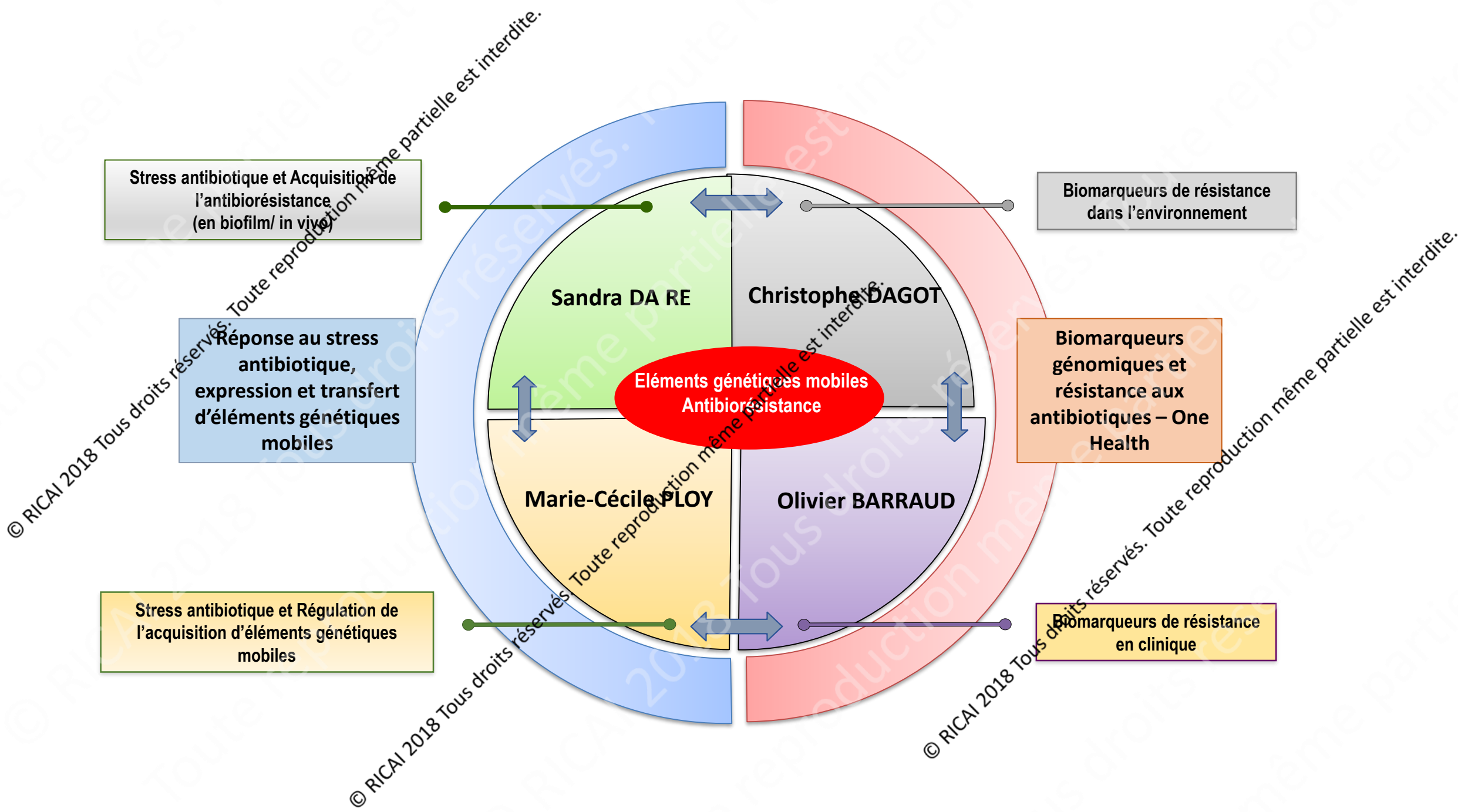
- *A. baumannii* Chang-tai, 2011

Martinez-Frejo et al, 1998

Leverstein-van Hall, 2003

- Problème : hétérogénéité des études

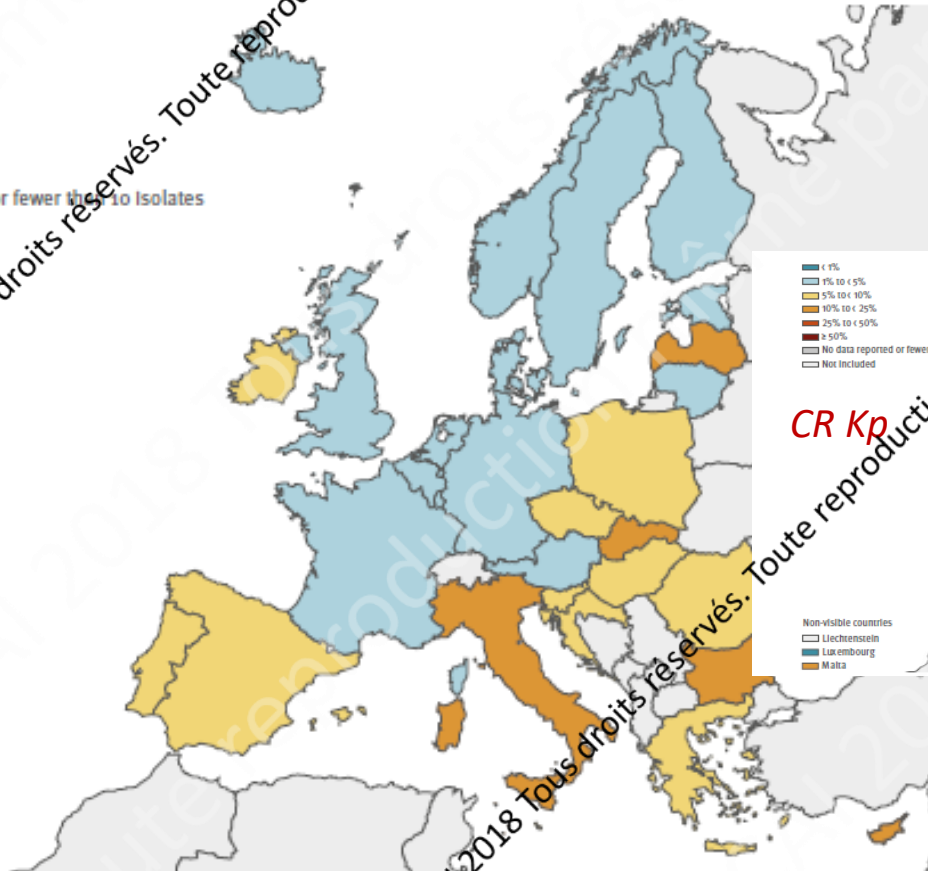
- Choix des antibiotiques, choix des bactéries, définition de la multirésistance, résistance naturelle / résistance acquise....



# Multi-résistance aux antibiotiques

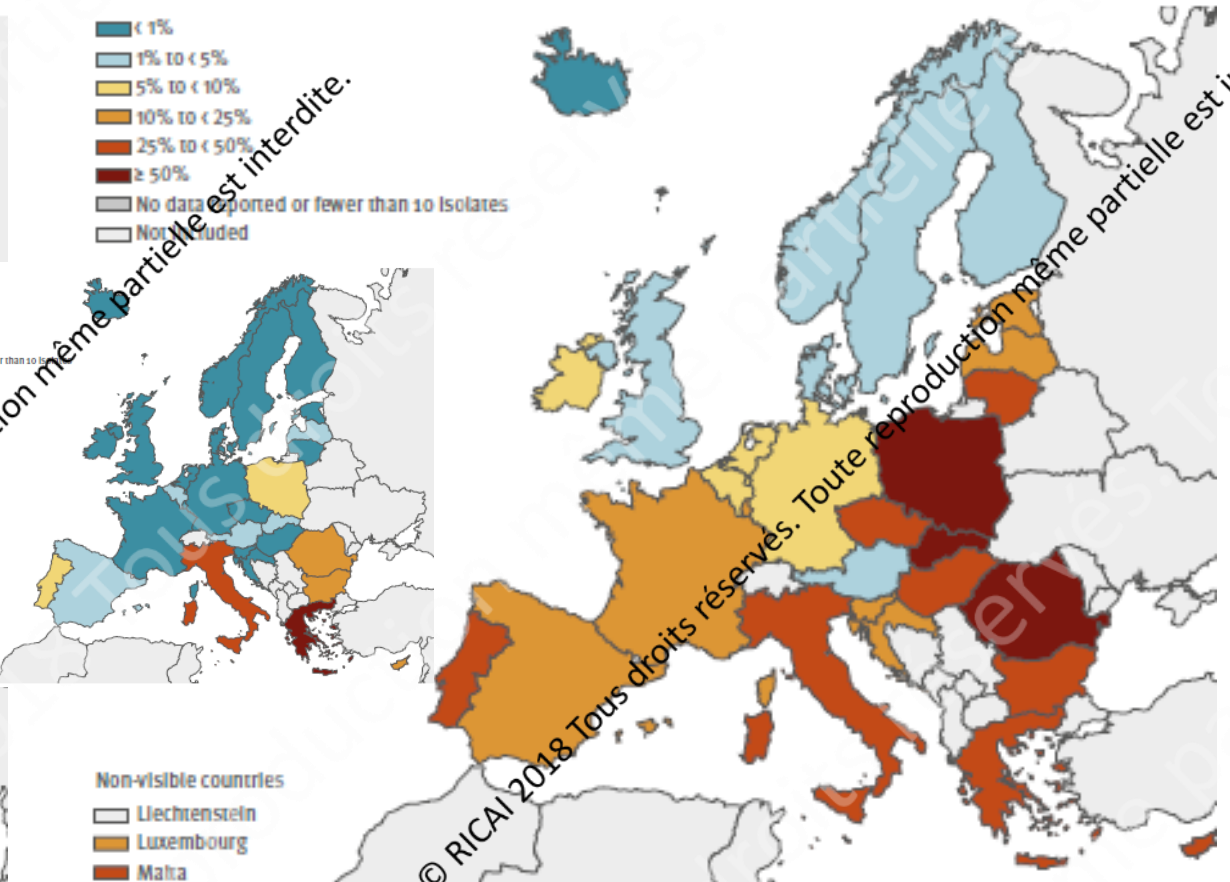
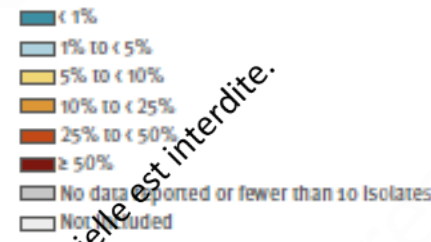
*E.coli*: Combined resistance to 3CG, FQ & AG,

EU/EAA, 2017



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

EU/EAA, 2017



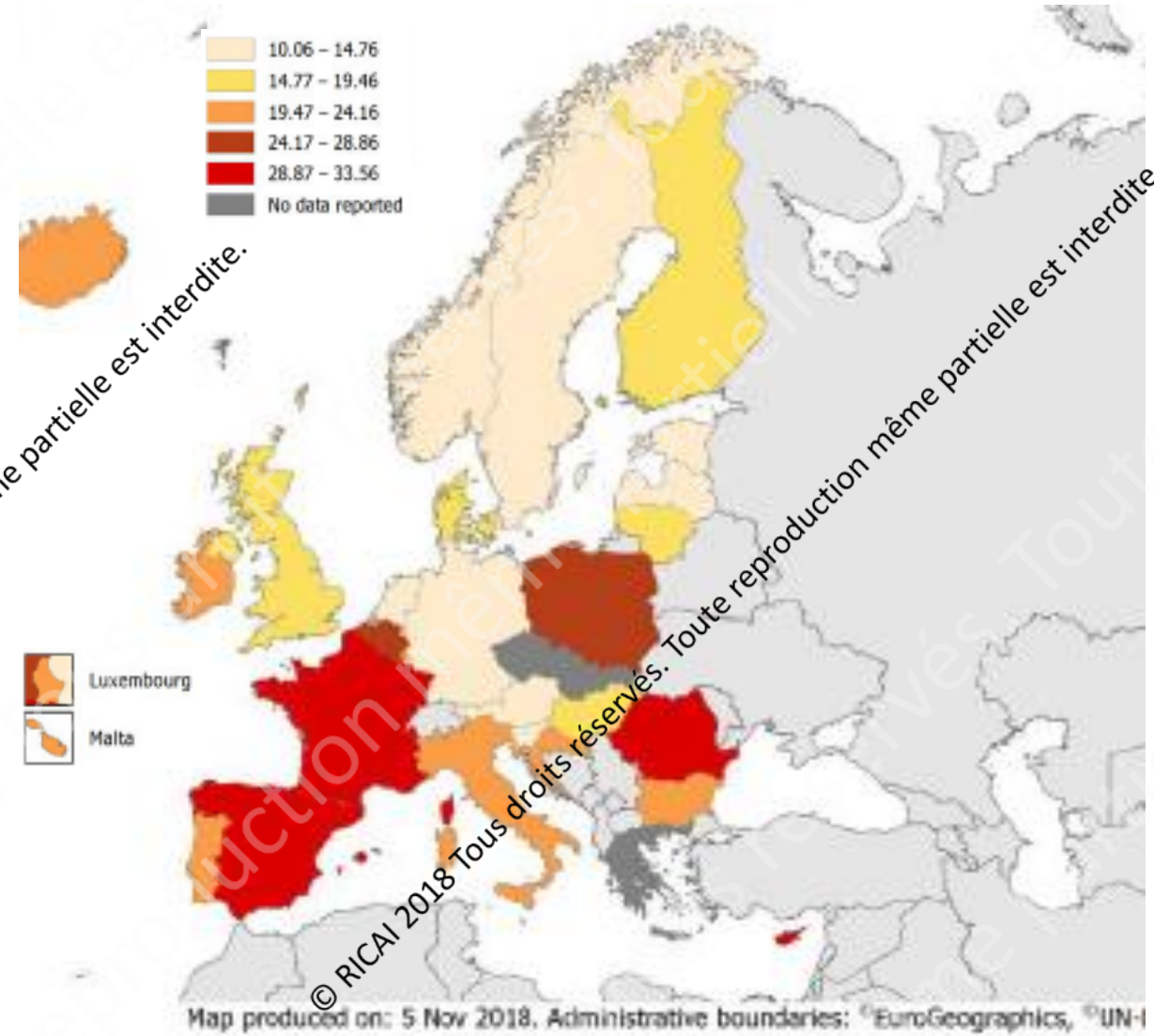
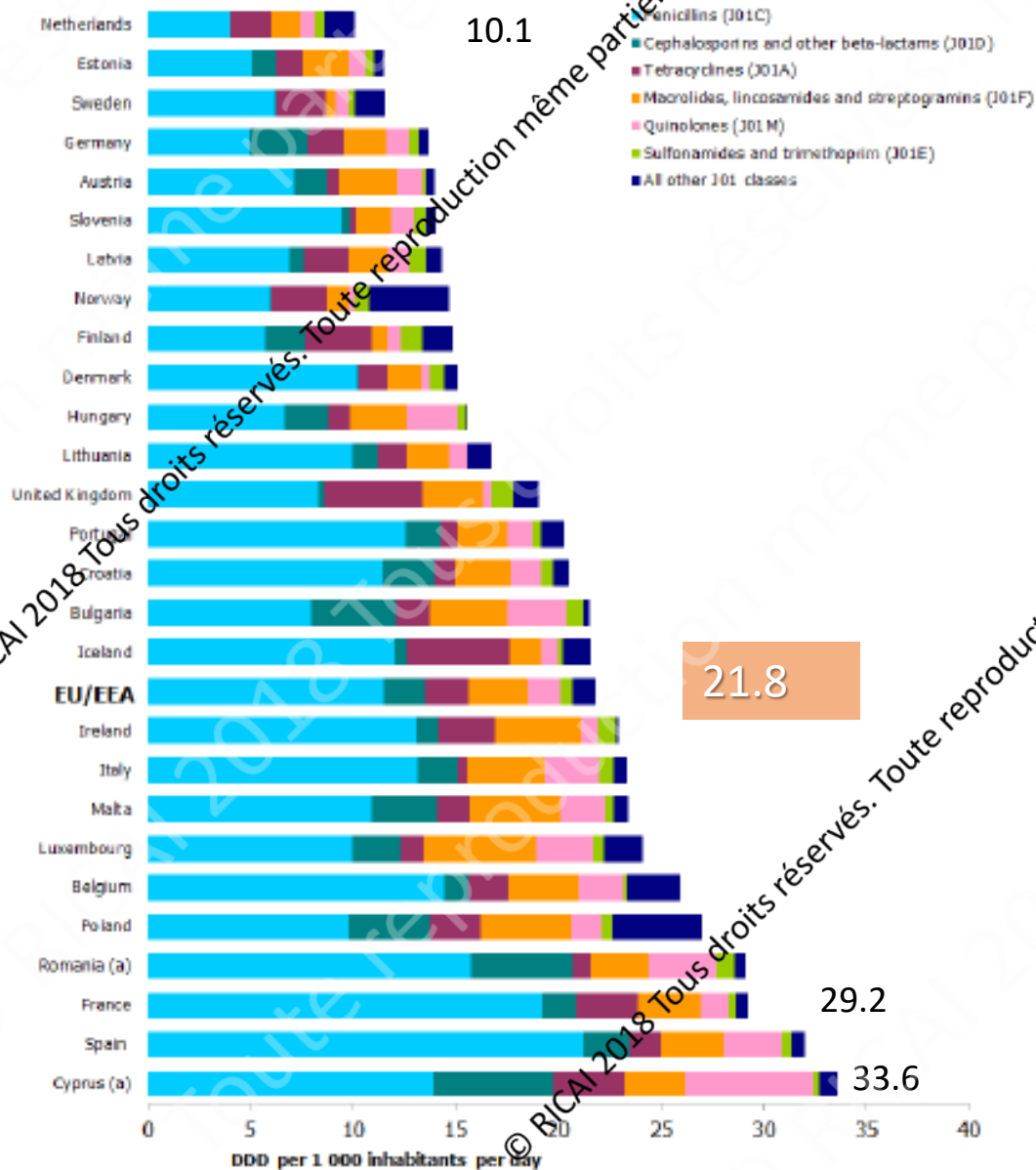
CR Kp

Non-visible countries  
 Liechtenstein  
 Luxembourg  
 Malta

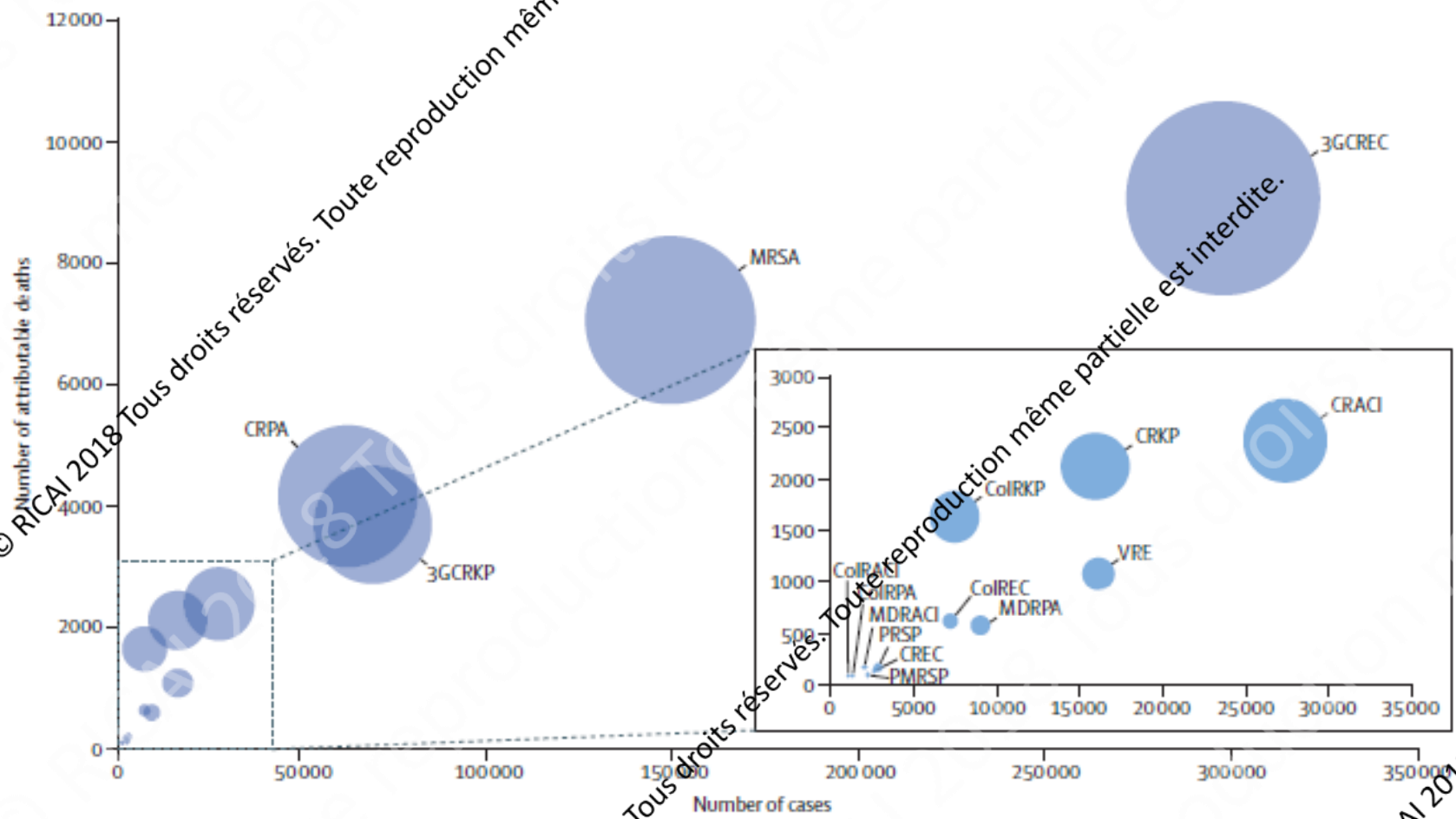
Non-visible countries  
 Liechtenstein  
 Luxembourg  
 Malta

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

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



# Mortalité attribuable



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

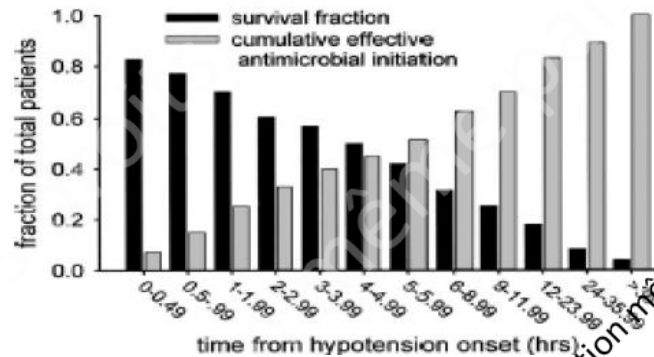
## **Nécessité de trouver de nouveaux biomarqueurs prédictifs de la résistance chez les BGN**

- 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**

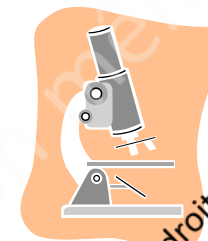


Chaque heure sans ATBthérapie adaptée =  $\searrow$  7,6 % de la probabilité de survie

*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<sup>e</sup>*

- 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

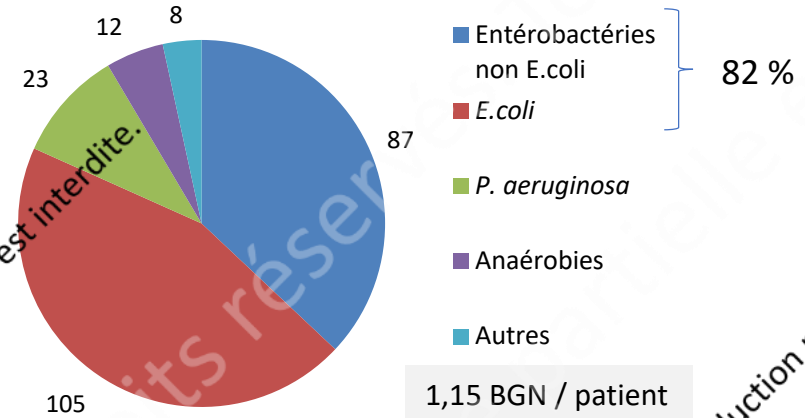


*Barraud et al, IJAA, 2014*

# 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 %**

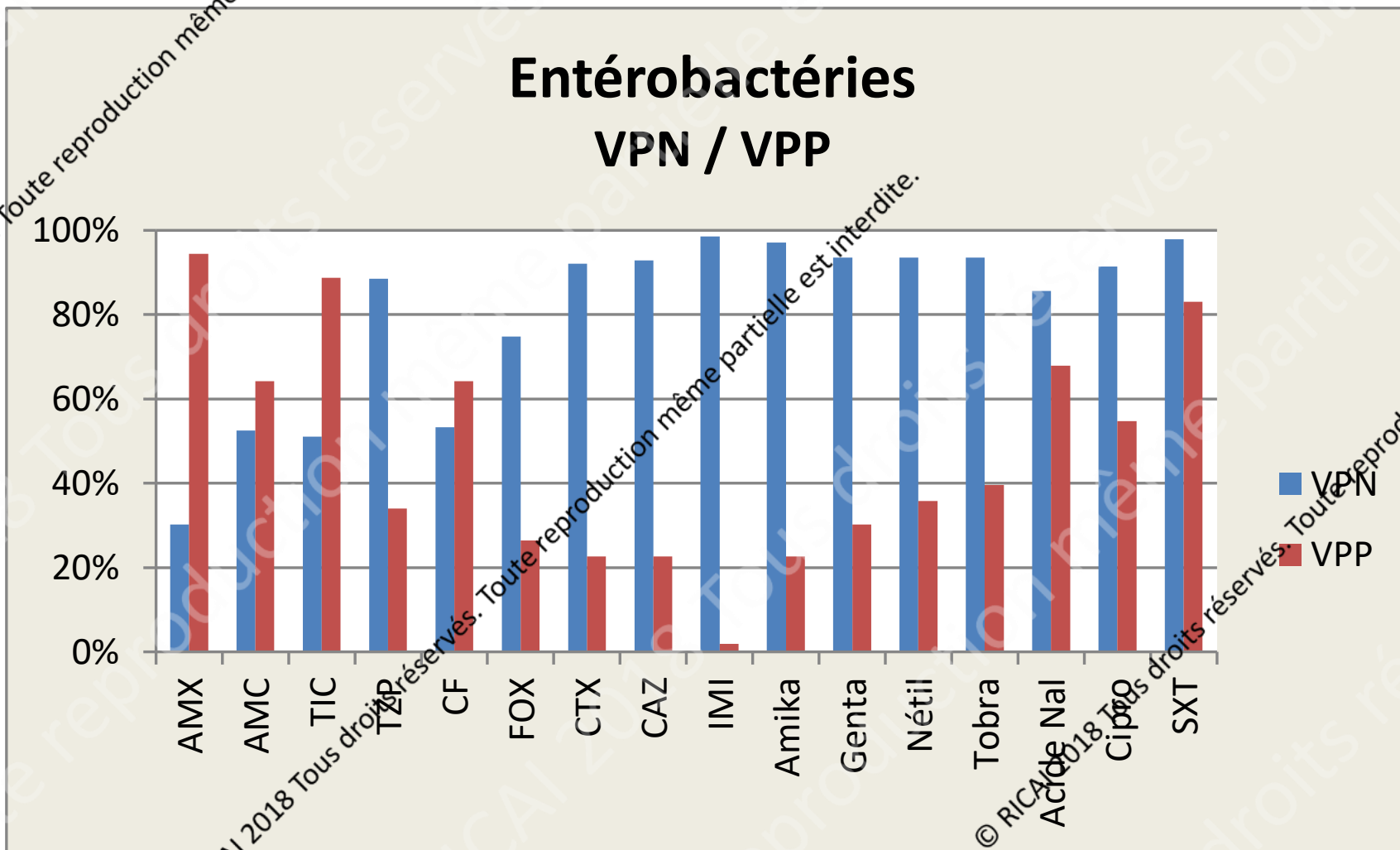
	BGN	Entérobactéries	Entérobactéries non <i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Anaérobies	Autres BGN
<i>int11+</i> seul	50	46	13	33	4	0	0
<i>int12+</i> seul	4	4	1	3	0	0	0
<i>int11+</i> , <i>int12+</i>	3	3	1	2	0	0	0
<i>int1+</i>	57	53	15	38	4	0	0
<b>% <i>int1+</i></b>	<b>24,3%</b>	<b>27,6%</b>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

# Résultats : concordance qPCR HC / BGN

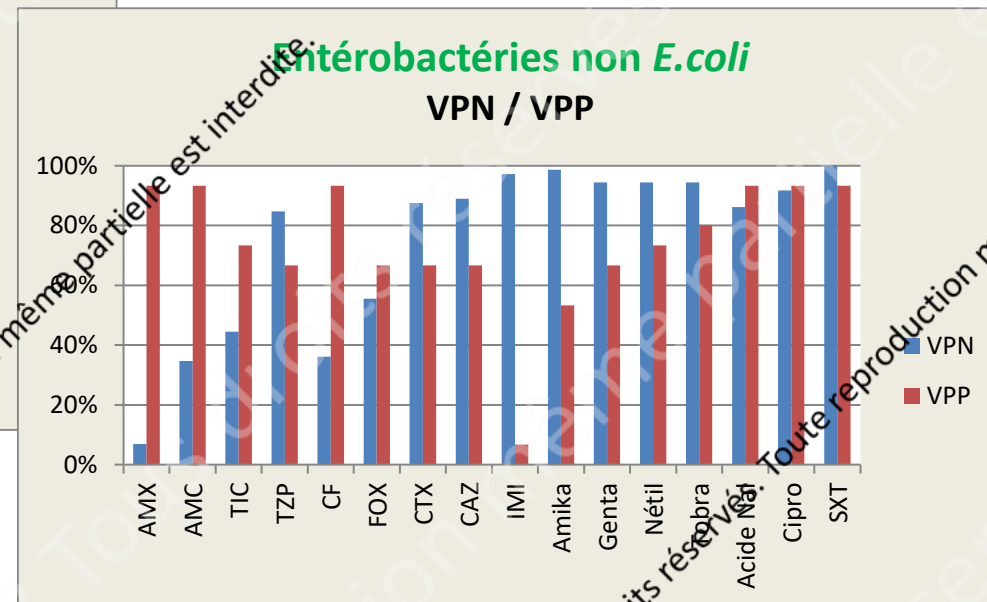
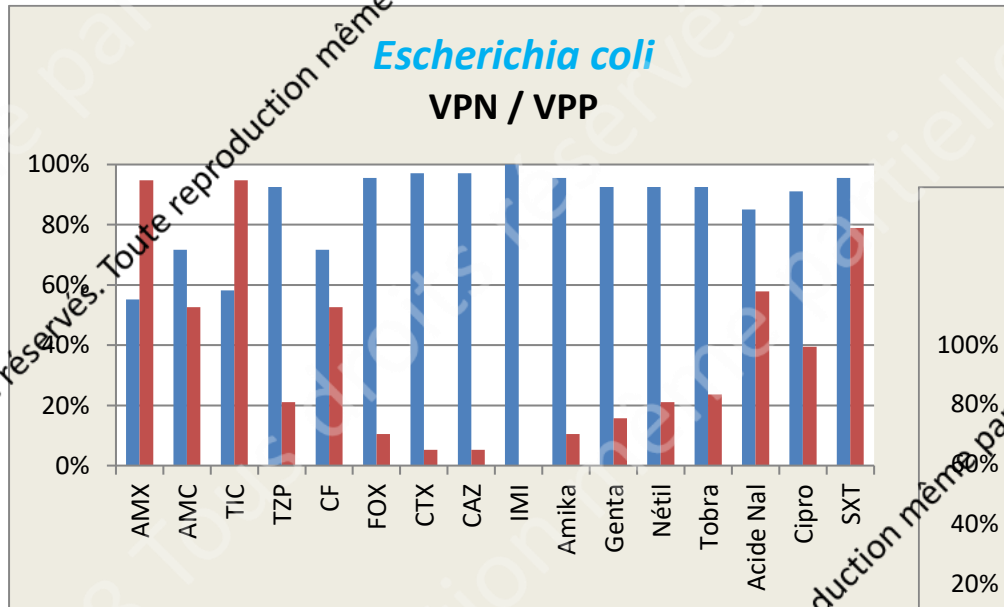
Triplex qPCR Hémocultures (HC) n =205				
	<i>int11</i> +	<i>int12</i> +	<i>int11</i> +, <i>int12</i> +	<i>int1</i> -
<b>Isolement d'1 BGN</b>				
<i>int11</i> +	<b>49</b>			<b>2</b>
<i>int12</i> +		<b>7</b>		
<i>int11</i> +, <i>int12</i> +			<b>3</b>	
<i>int1</i> -	<b>1</b>			<b>143</b>

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 :

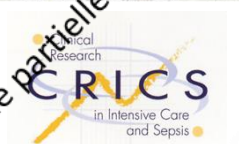
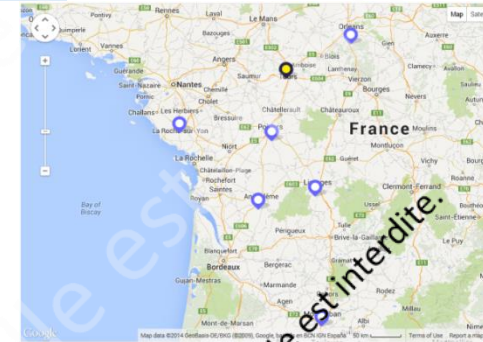
- 409 patients en Sepsis, Sepsis sévère ou choc septique
- à point de départ urinaire (83%) ou intra-abdominal (17%)
- 16% choc septique

- 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
<b>NPVs</b> (%)	<b>94.2</b> [90.7; 96.6]	<b>95.7</b> [93.6; 97.5]	<b>92.4</b> [89.2; 95.2]
<b>PPVs</b> (%)	<b>61.5</b> [52.7; 69.7]	<b>58.3</b> [49.4; 66.8]	<b>69.7</b> [59.7; 79.3]



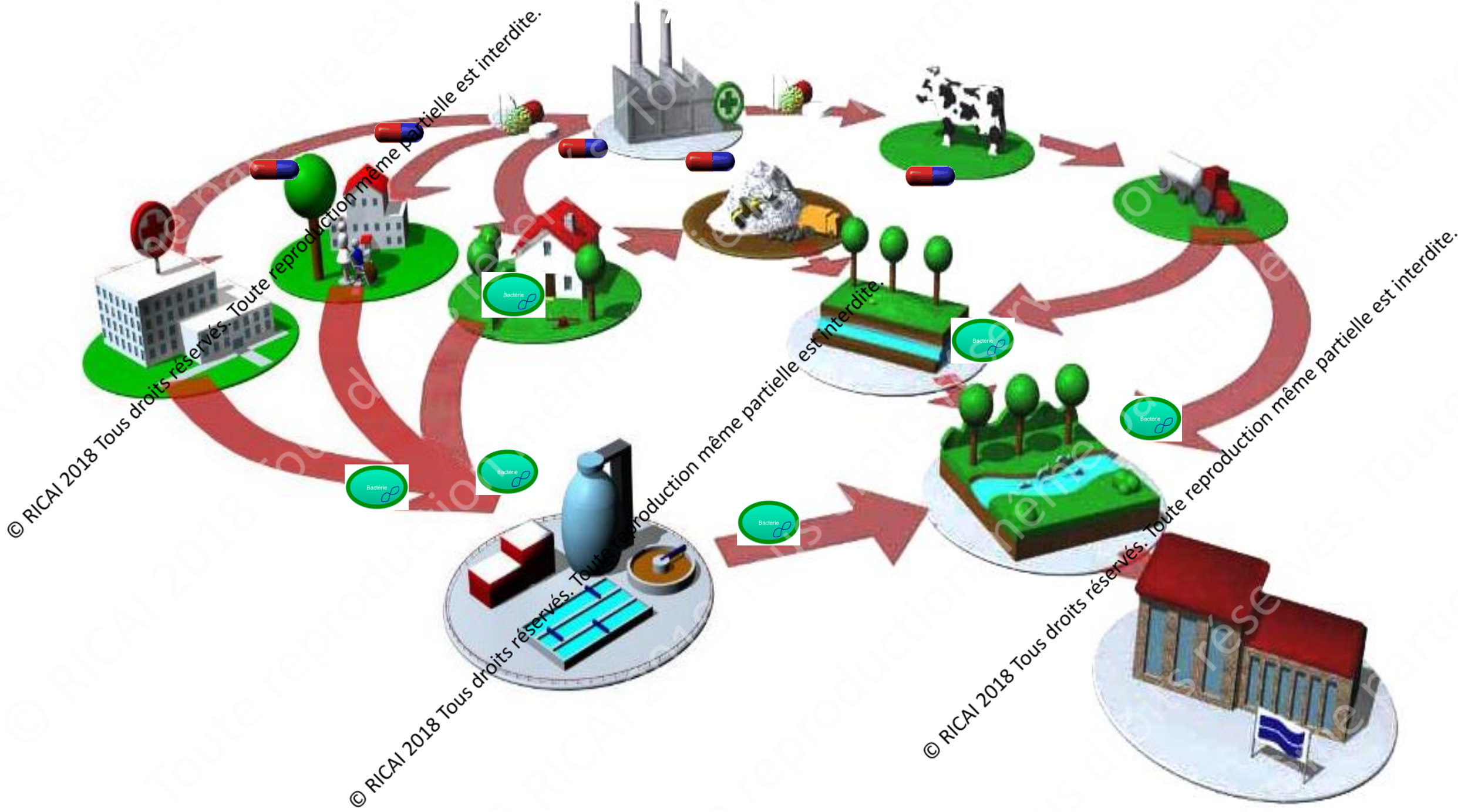
# Résultats : VPP / VPN

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.

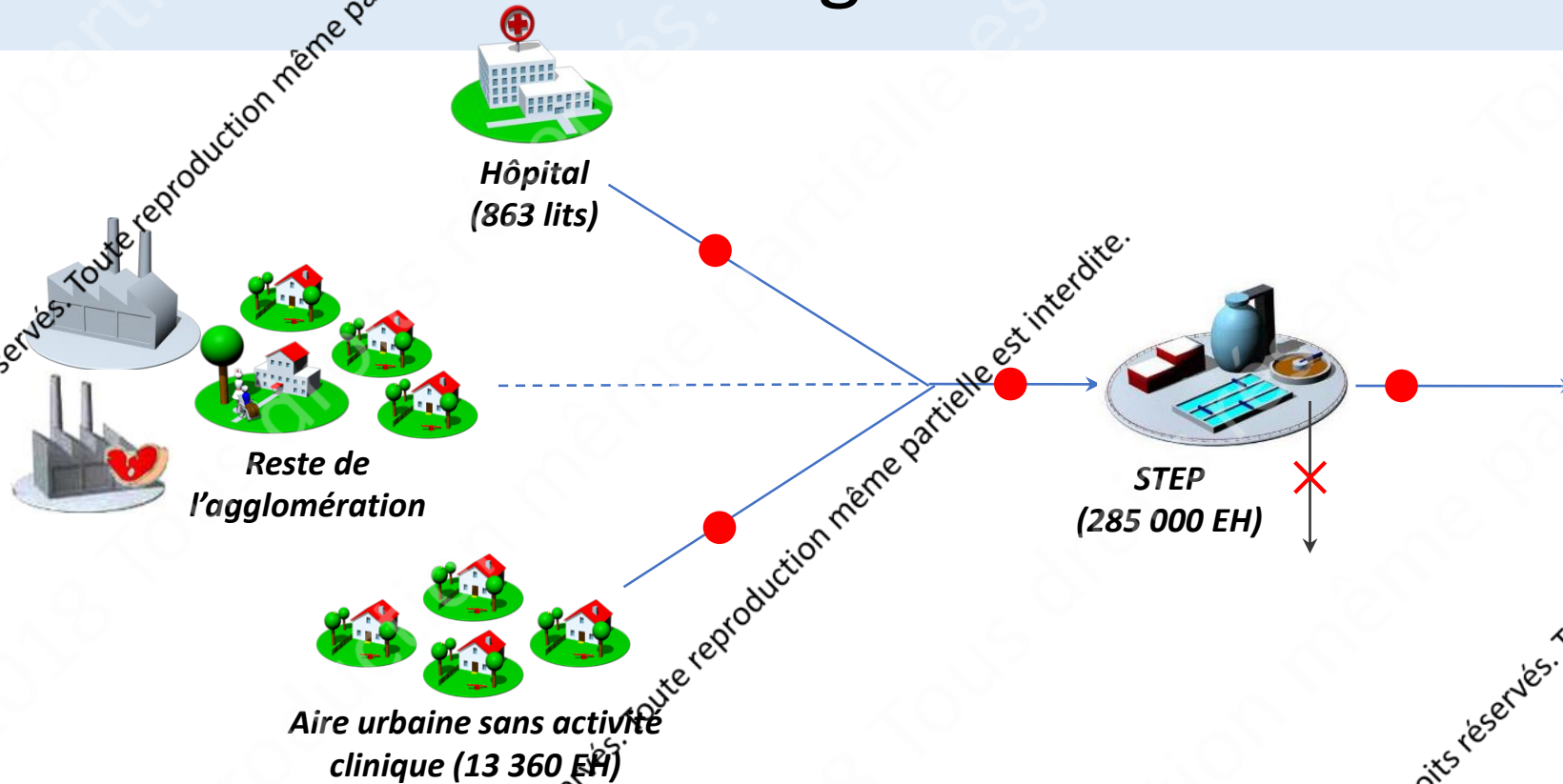


© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

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

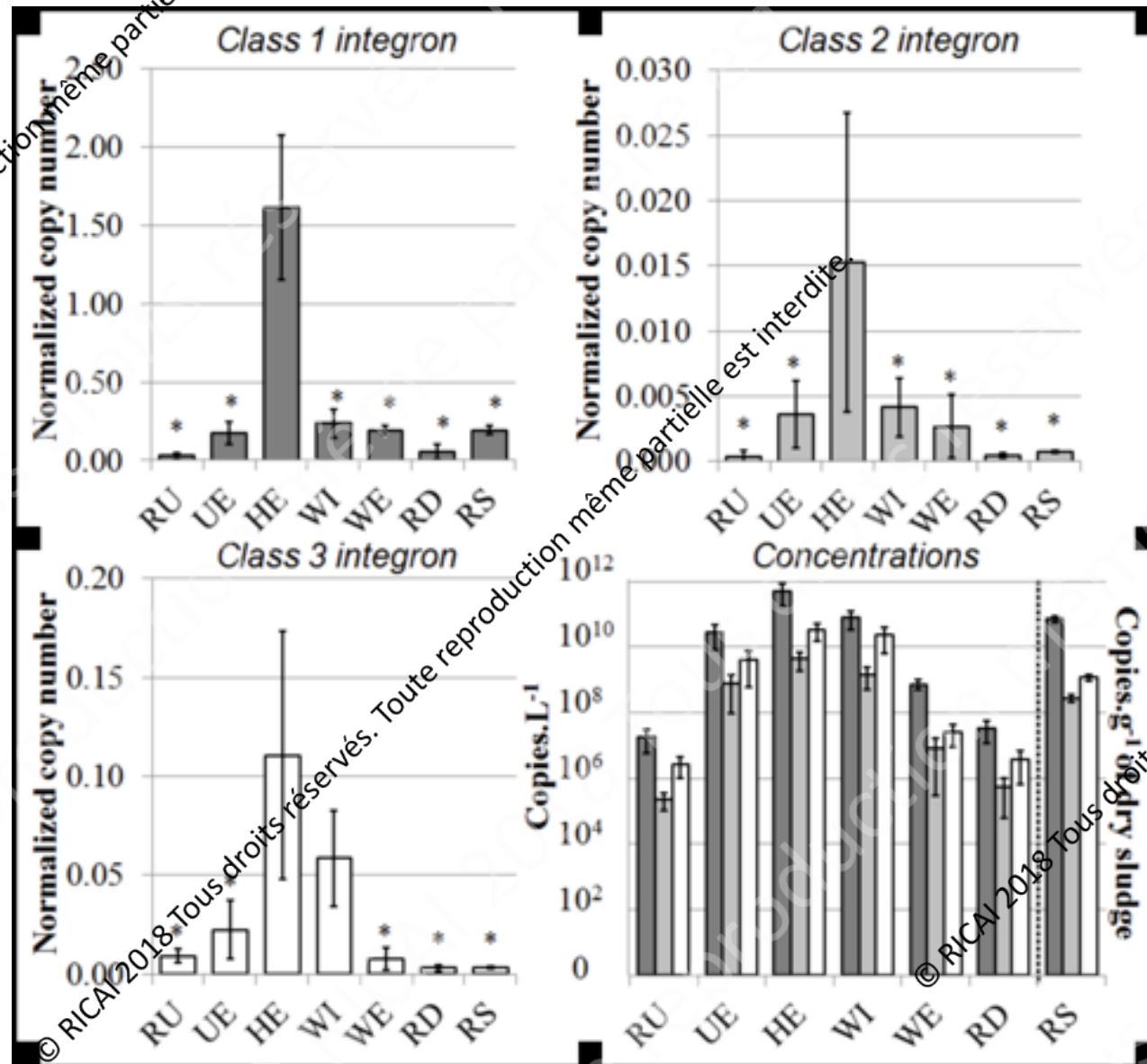
© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

# Influence d'un effluent hospitalier sur la dissémination des intégrons

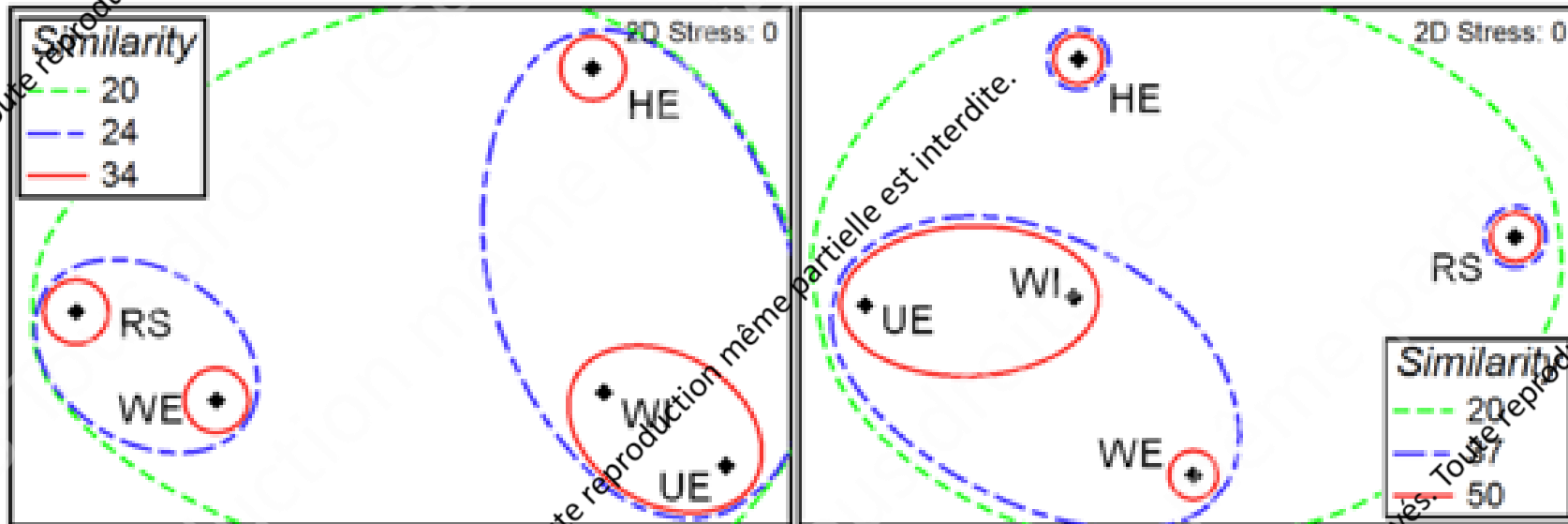


- Prélèvements moyens 24h asservis au débit
- Prélèvements ponctuels ✗
- Prélèvement 3x en semaine = activités cliniques normales
- Prélèvement 3x en week-end = activités cliniques réduites

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



# Diversité des cassettes

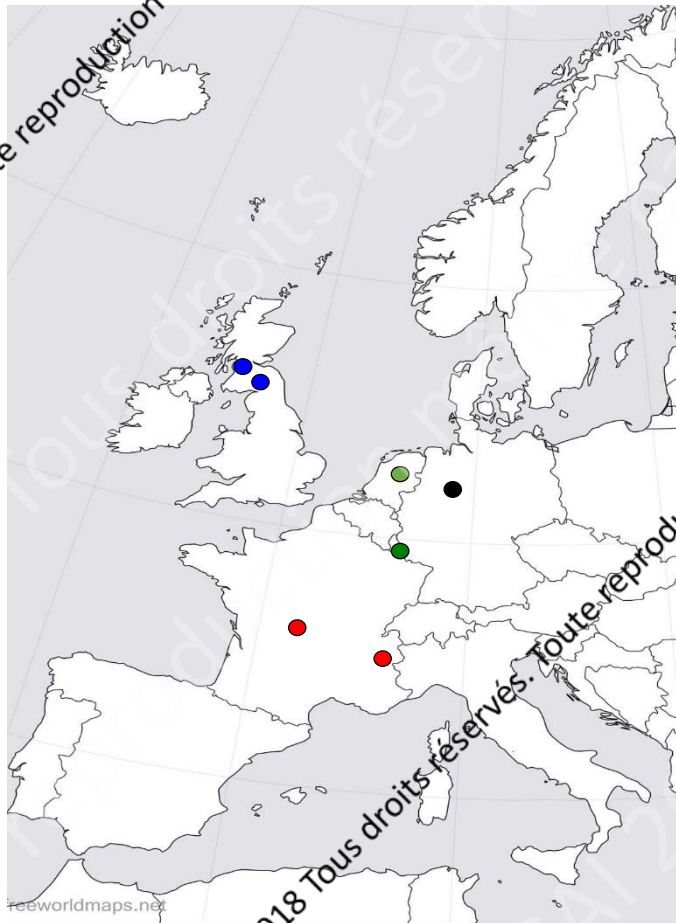


Réseaux de cassettes

Pools de cassettes

# Cassettome : signatures spécifiques ?

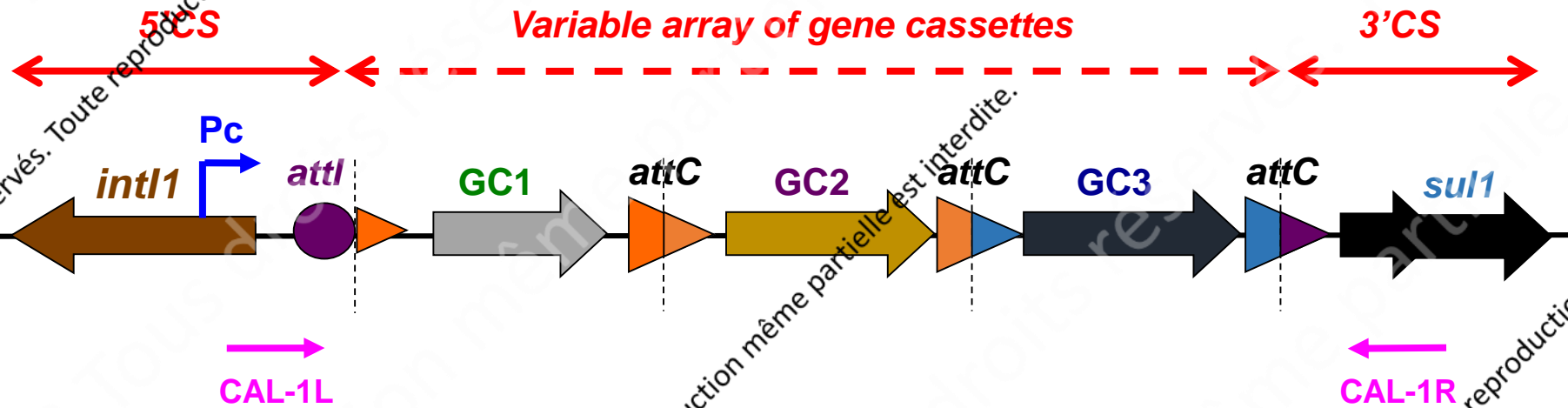
## 10 Hôpitaux européens



- 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



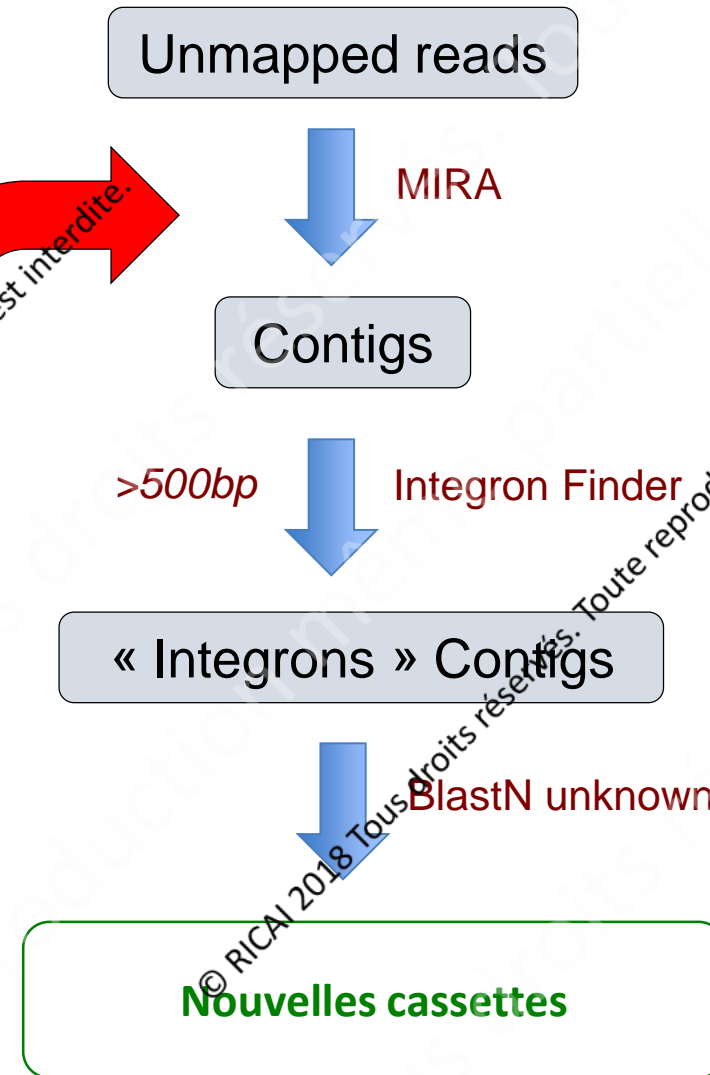
life  
technologies™



## 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



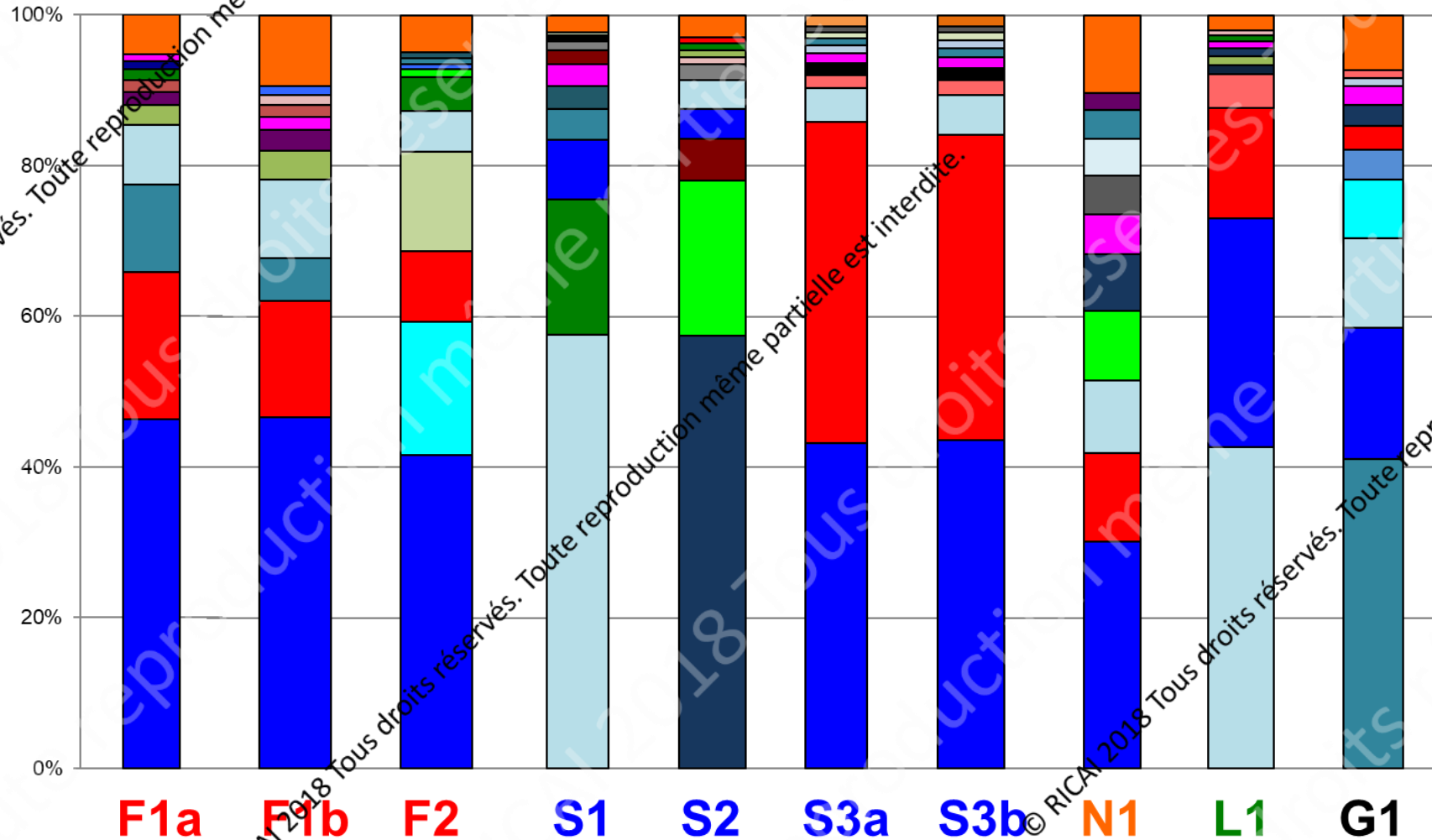
© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

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

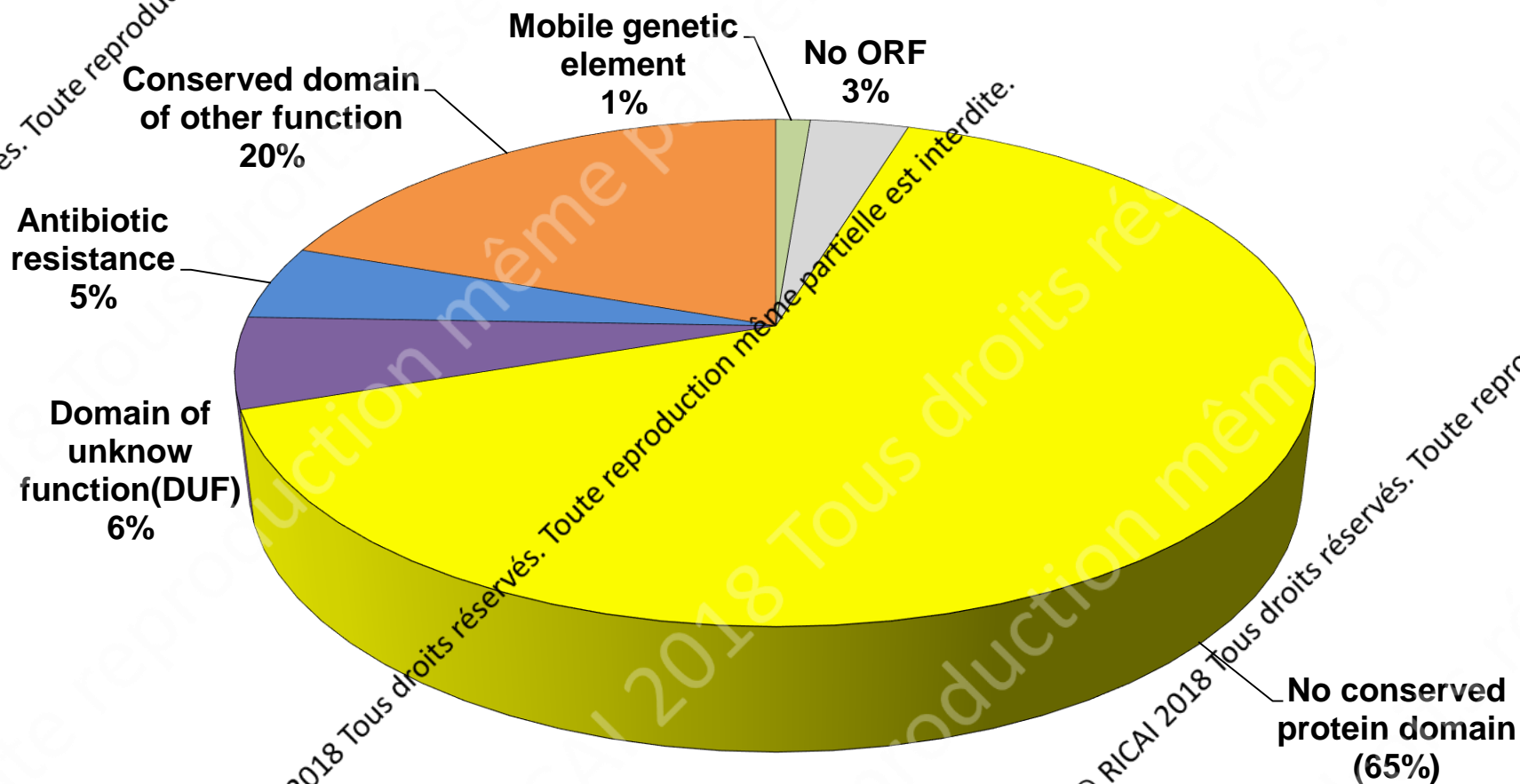
© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.



# Signature spécifique d'hôpital



# Nouvelles cassettes

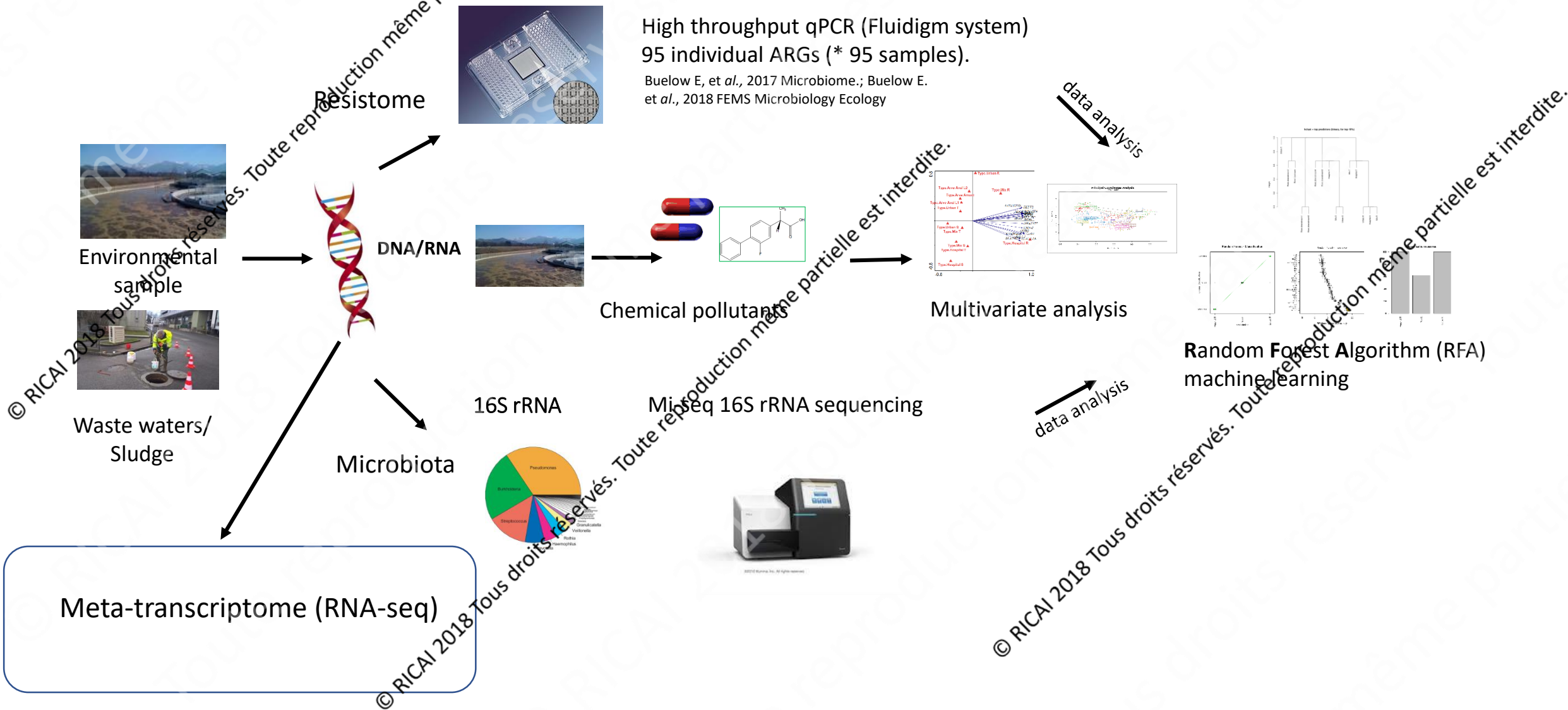


© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

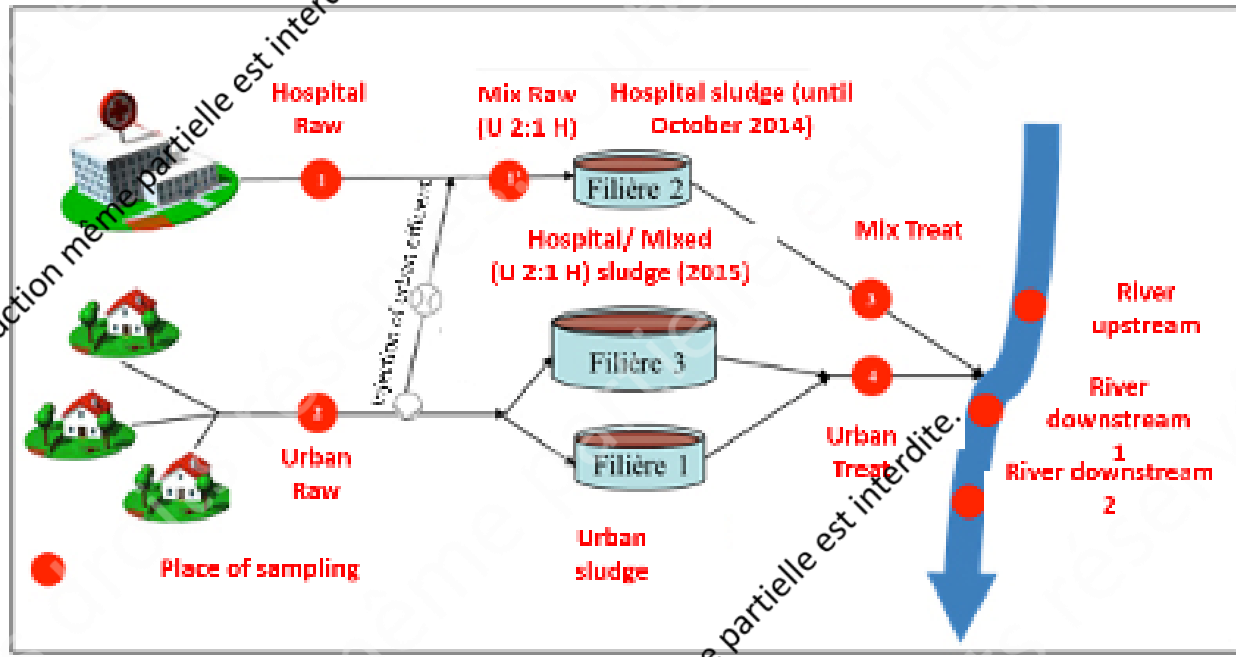
© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

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

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

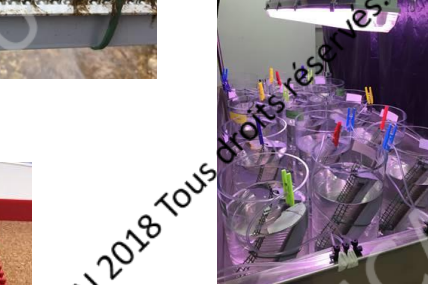
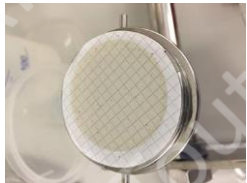


© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.



Toute reproduction même partielle est interdite.

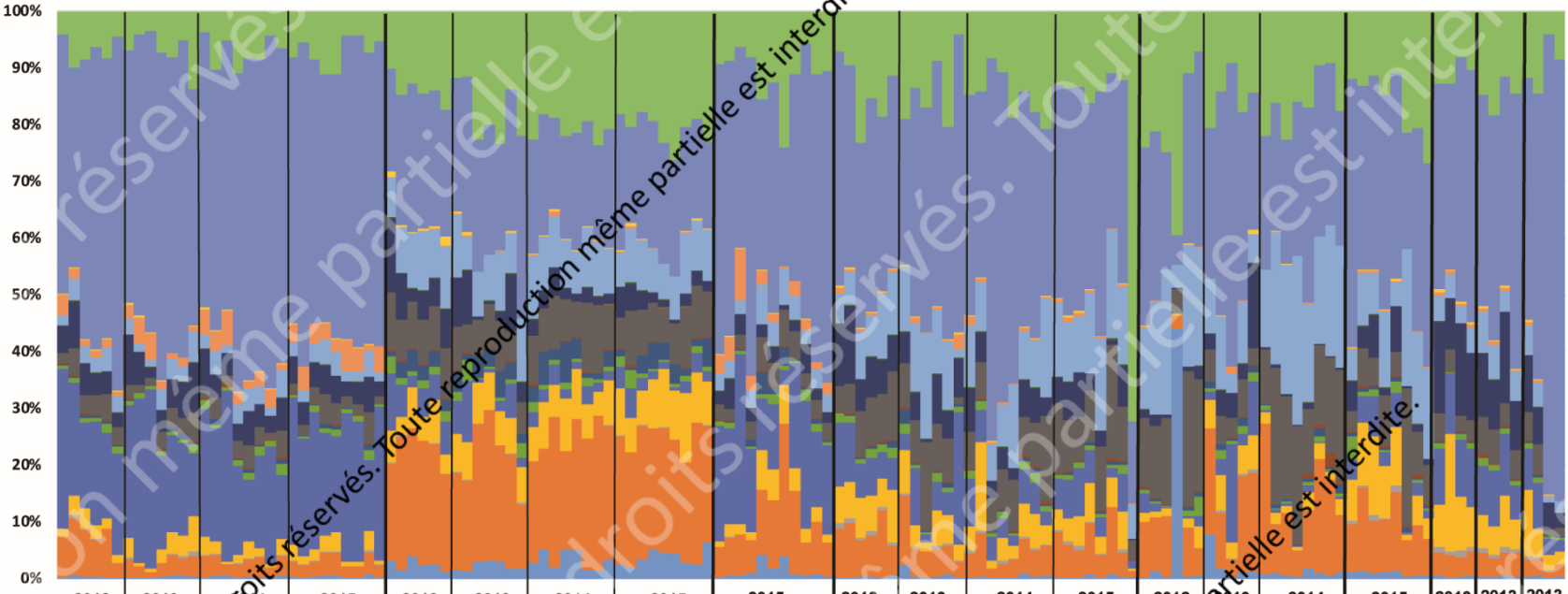
© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.



© RICAI 2018 Tous droits réservés.

# resistome

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

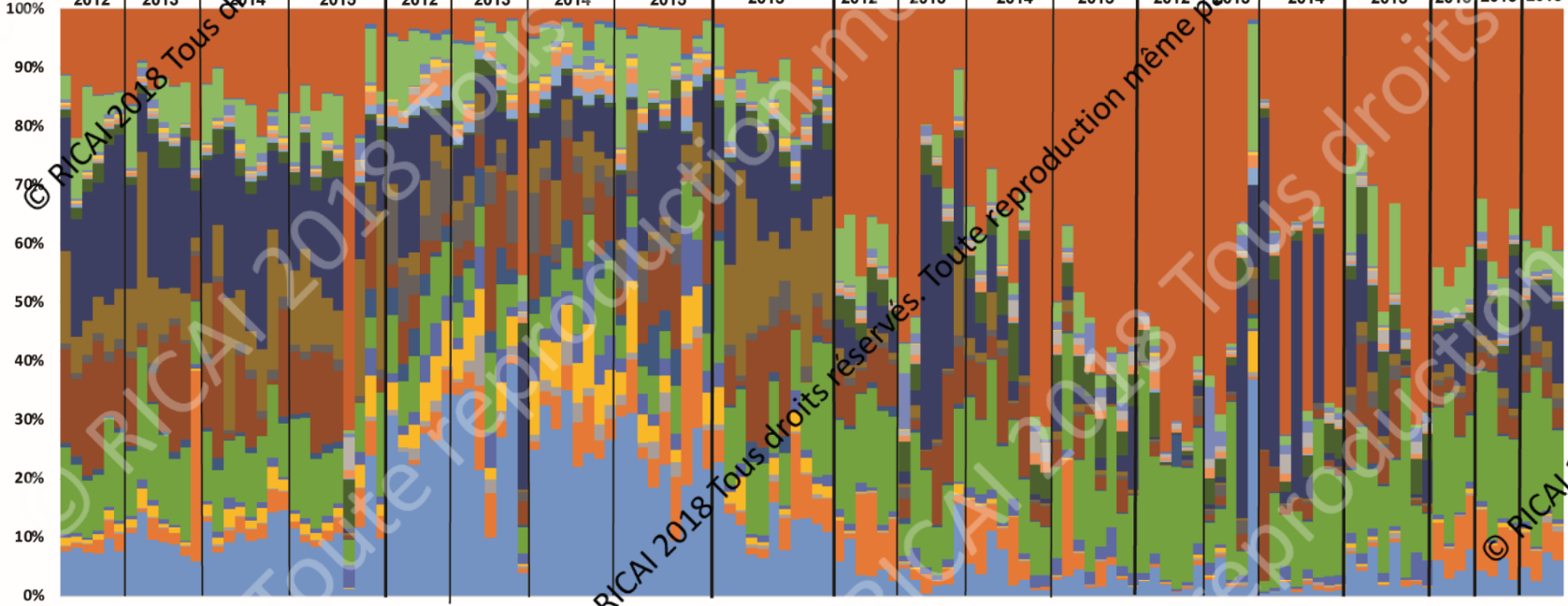


Per sample type :  
 R = untreated WW  
 T = treated WW  
 Ri = river samples

**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



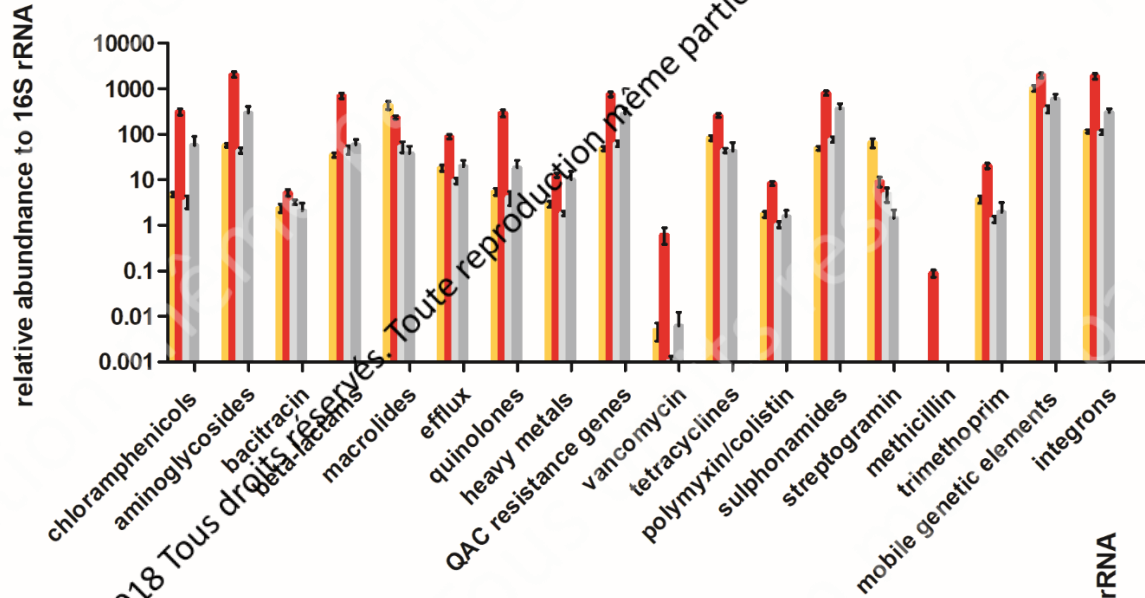
microbiome

© RICAI 2018 Tous droits réservés.

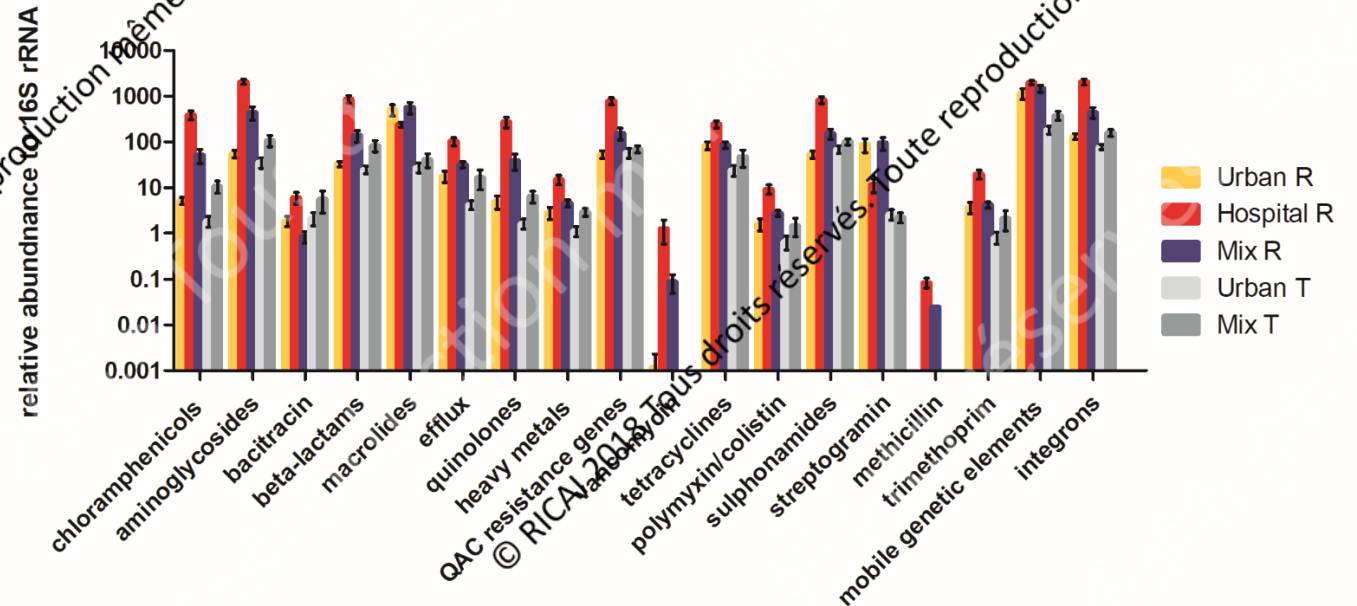
© RICAI 2018 Tous droits réservés.

Toute reproduction même partielle est interdite.

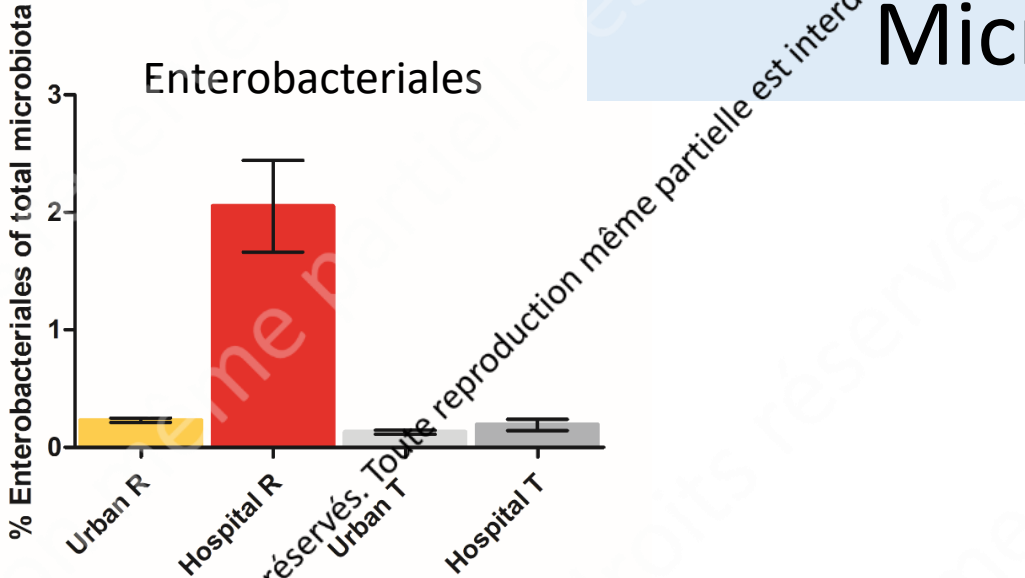
# Resistome quantitatif



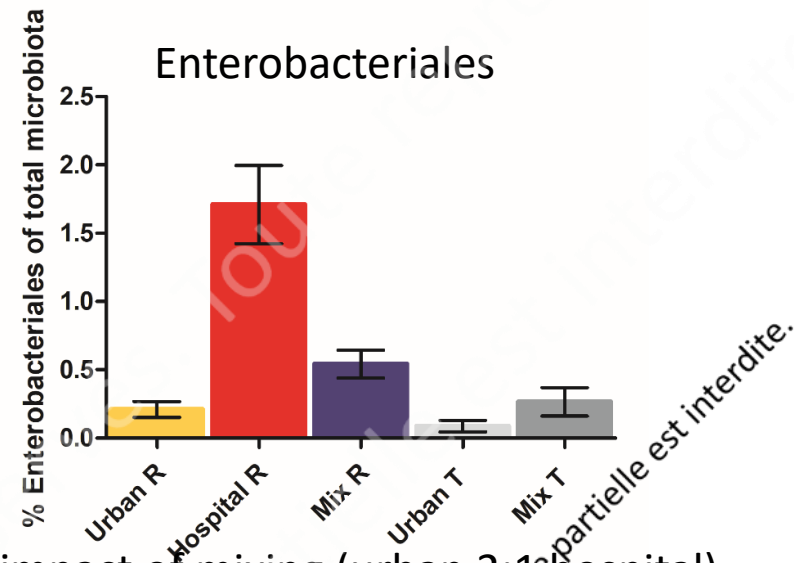
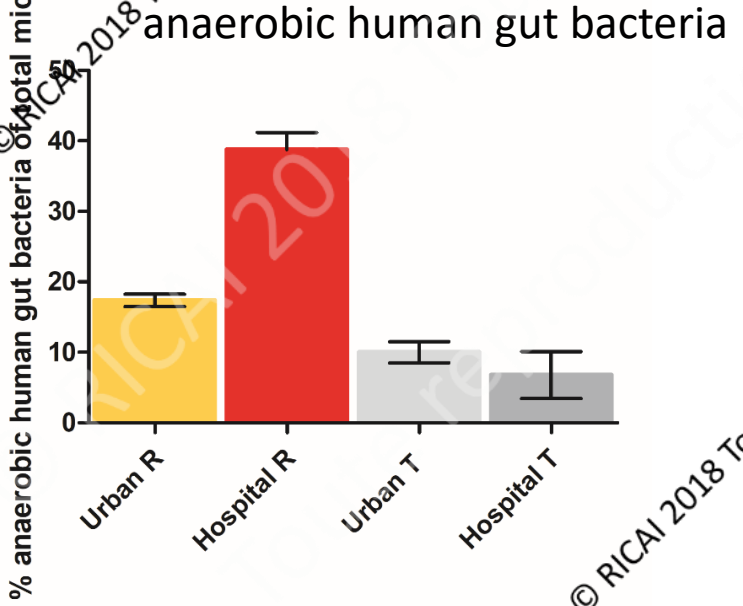
Sampling 2015 – impact of mixing (urban 2:1 hospital)



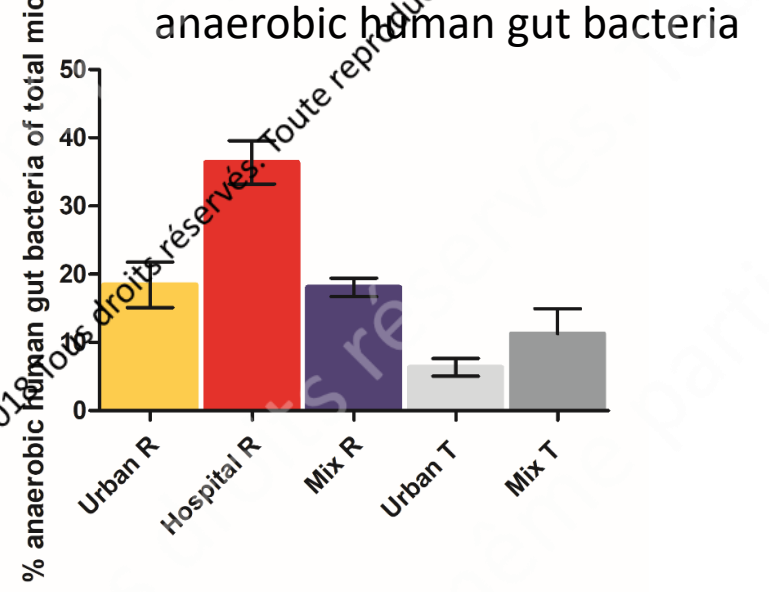
# Microbiome



Sampling period January 2012- December 2014

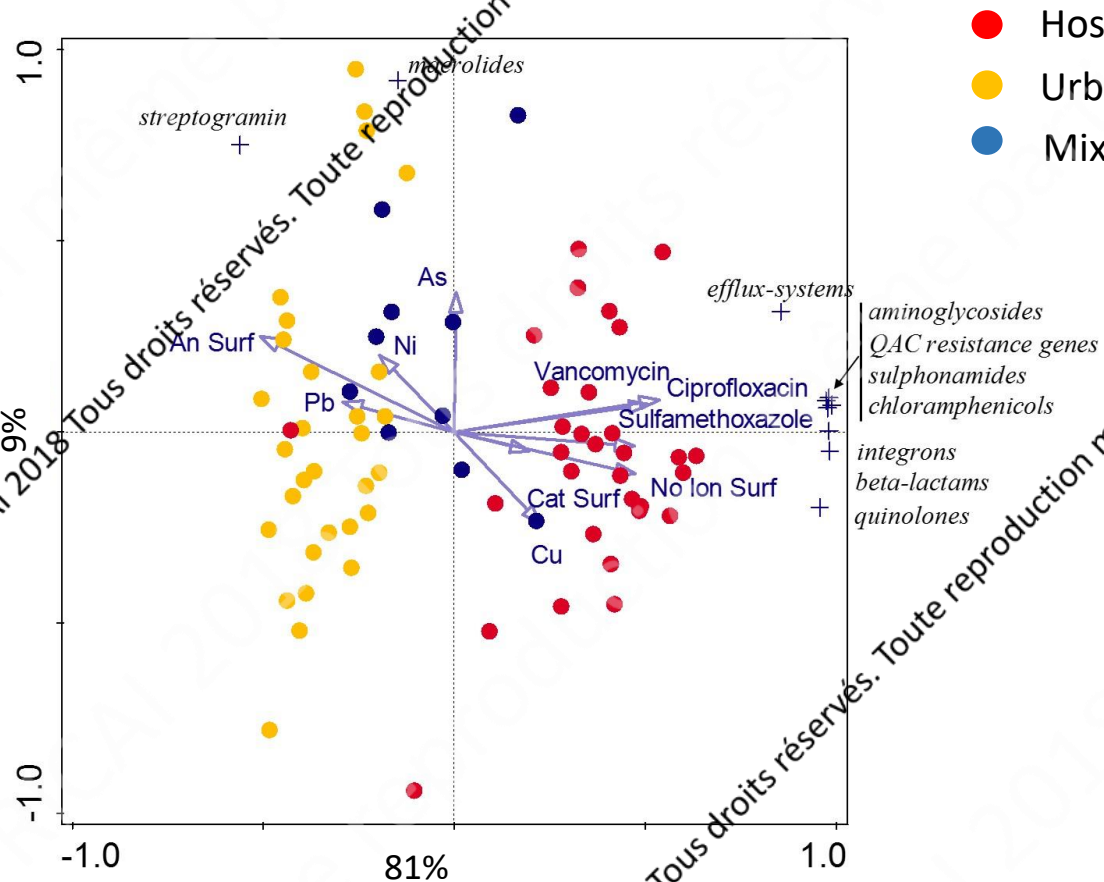


Sampling 2015 – impact of mixing (urban 2:1 hospital)

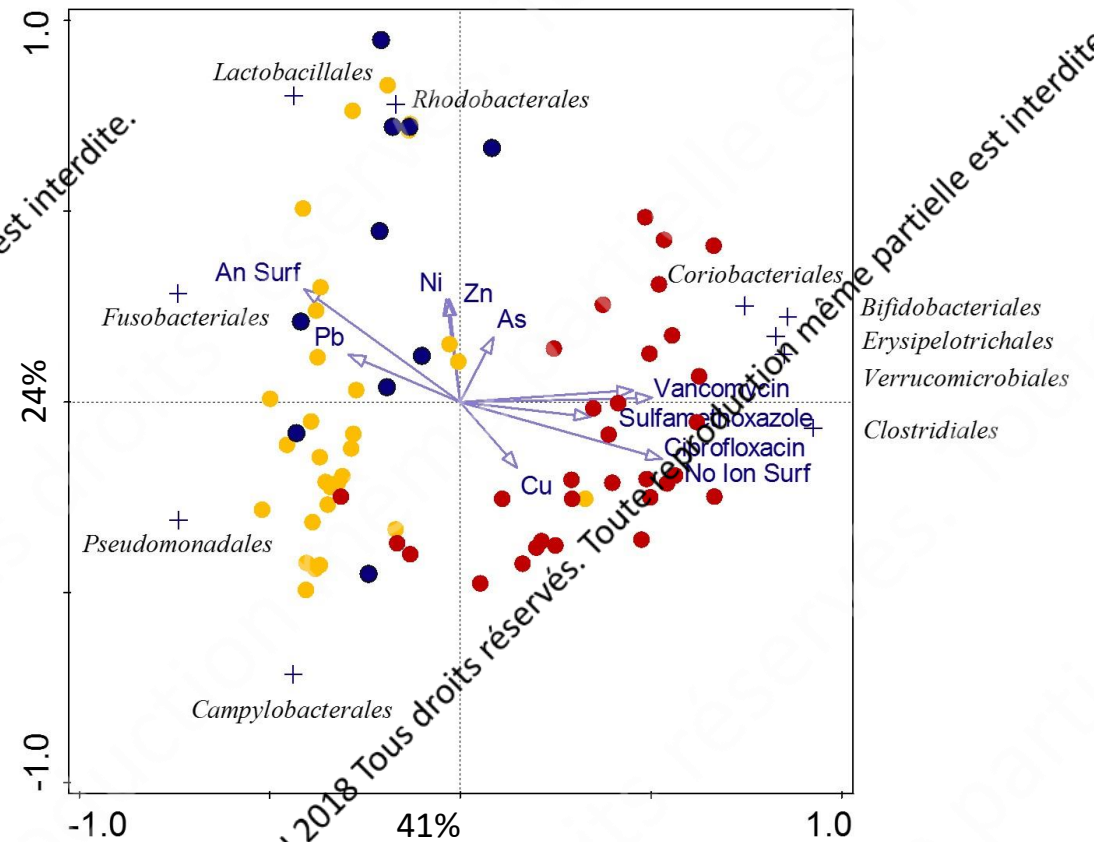


© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

# 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.

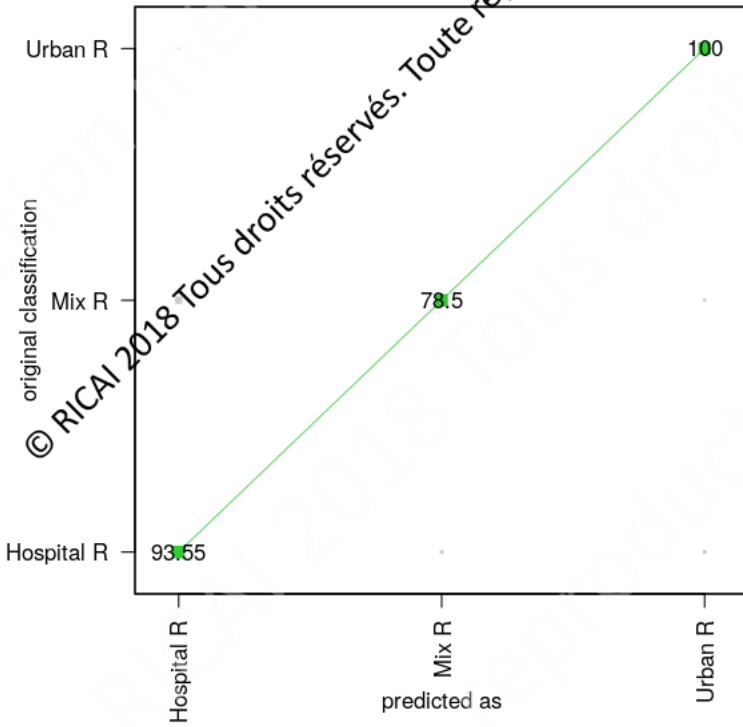


PCA showing the dispersal of the **urban (yellow), hospital (red) and mixed (blue) untreated wastewater** samples and their relationship to the **microbiome** and chemicals.

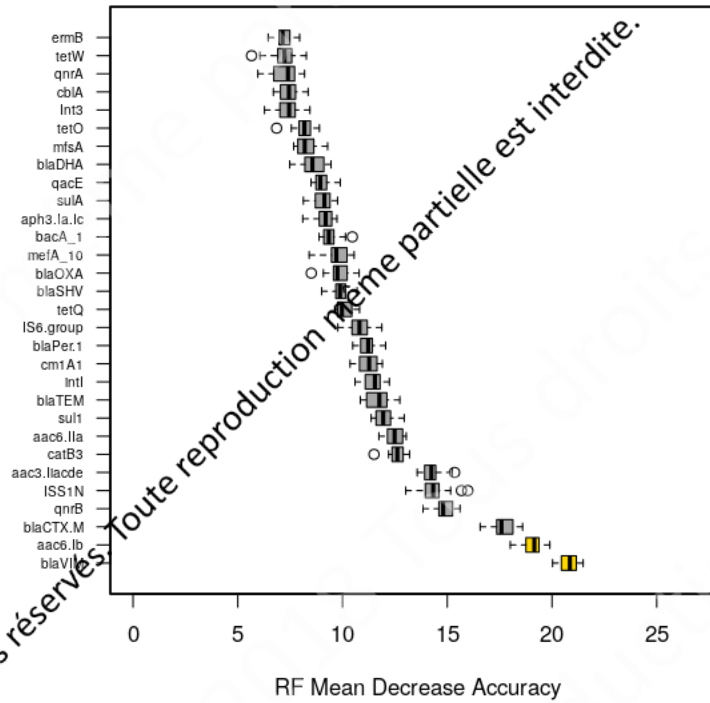


# Machine learning prediction Famille de gènes de résistance

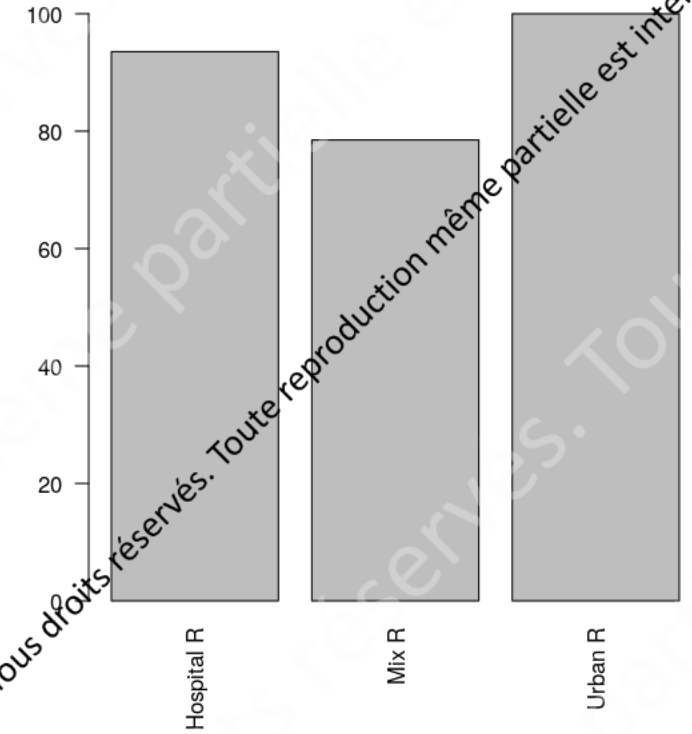
Random Forest - Classification



Random Forest - Importance

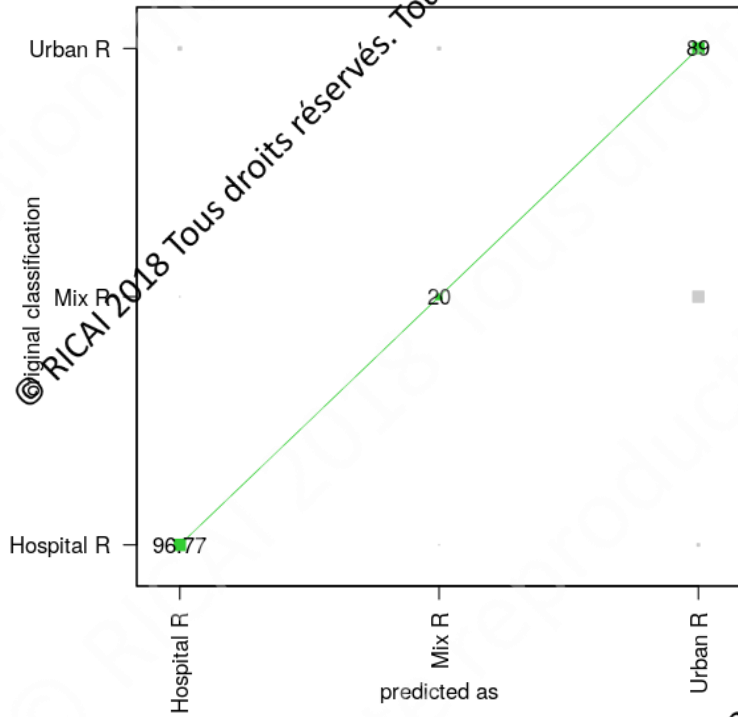


classification success

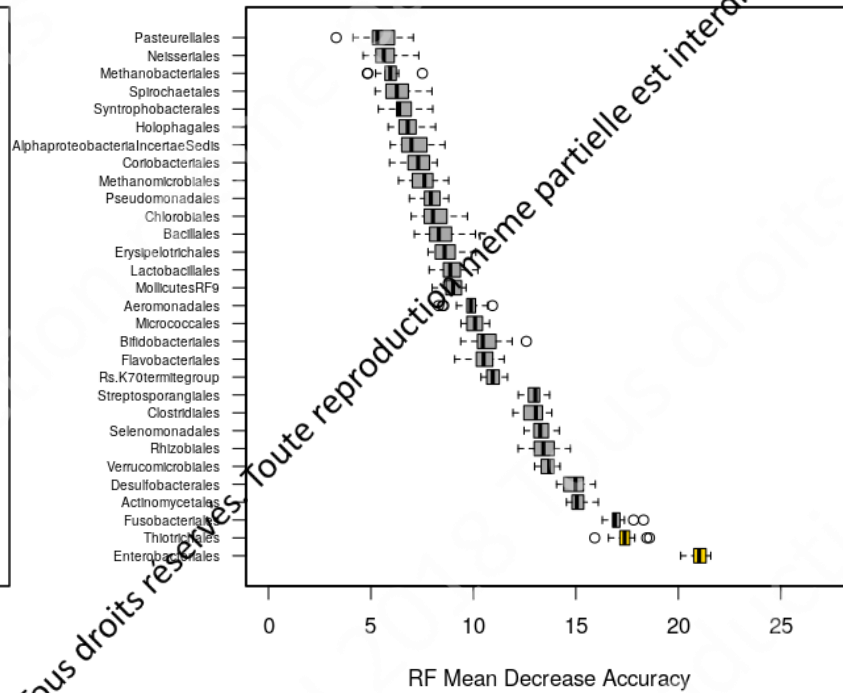


# Machine learning prediction Microbiome

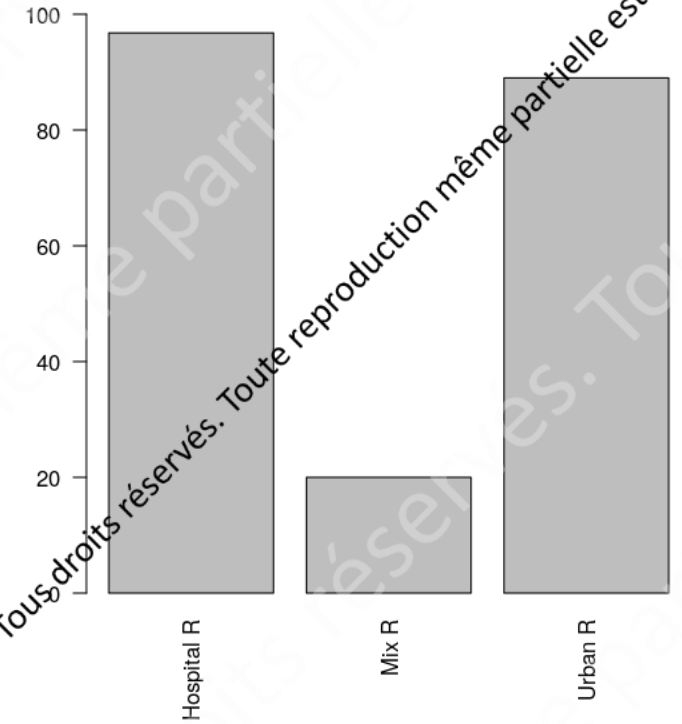
Random Forest - Classification



Random Forest - Importance



classification success



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



© Olivier Barraud

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

