

# « Investigation des épidémies à BHRe : places respectives de l'enquête épidémiologique et de la bactériologie »

Analyses bactériologiques : quelles analyses, apports et limites du séquençage

Pr. Laurent DORTET

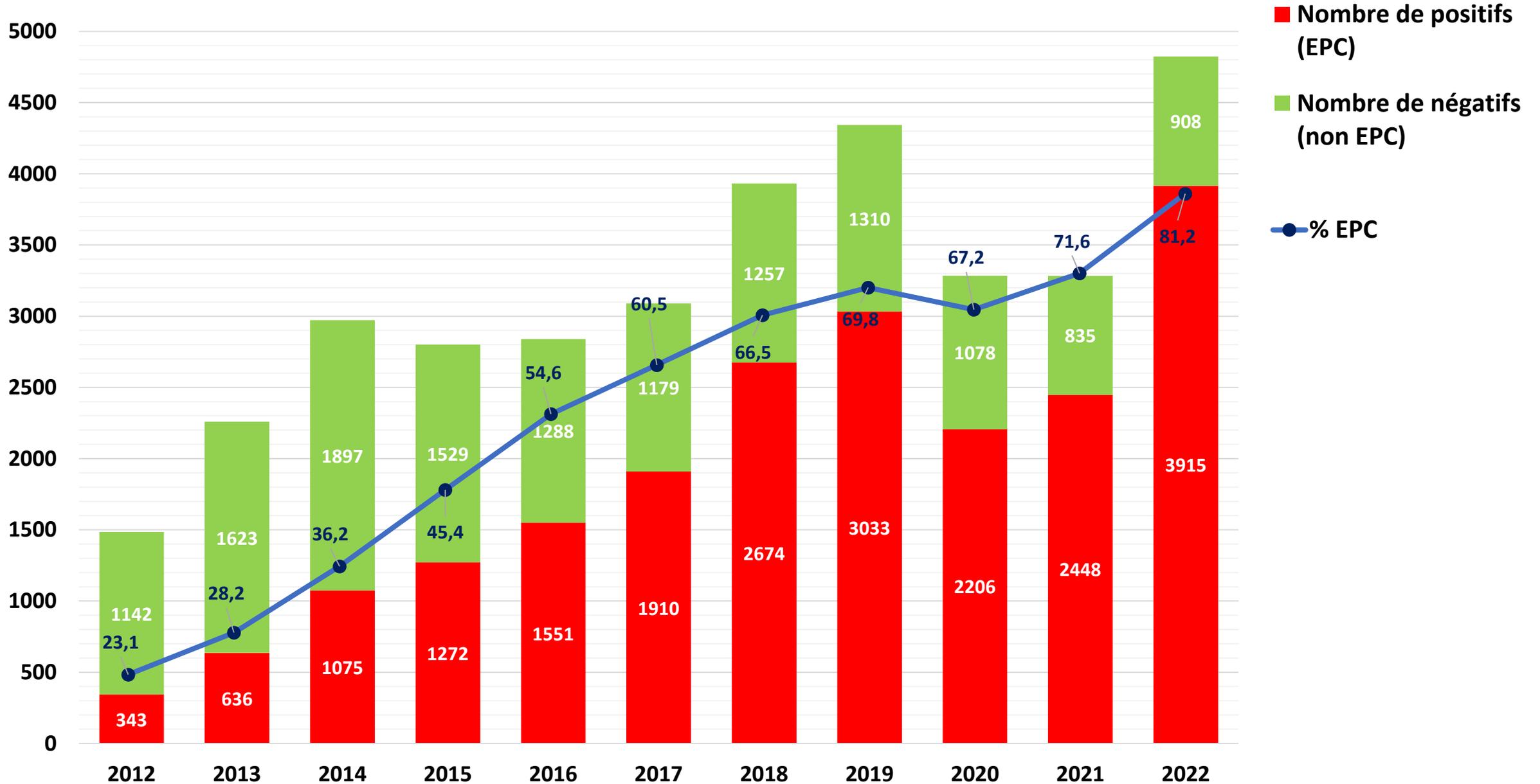
# SOMMAIRE

- ❑ **Epidémiologie des EPC en France en 2022 : Une histoire de clones à risques**
- ❑ **Mode de fonctionnement et expertise des souches au CNR**
- ❑ **Le séquençage haut débit : Lequel ? Limites ?**
- ❑ **Investigation d'une épidémies : Les bonnes questions**

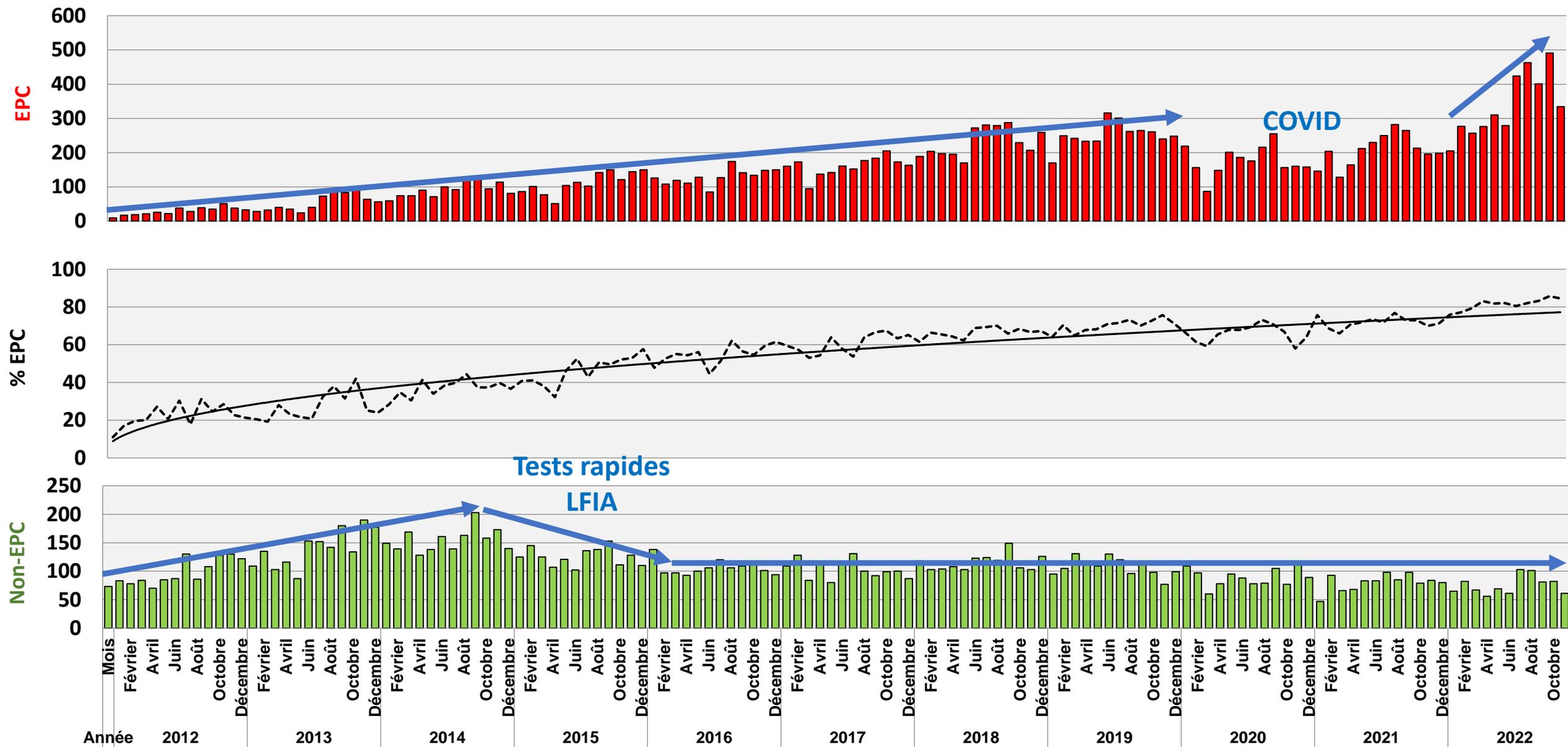
# SOMMAIRE

- Epidémiologie des EPC en France en 2022 : Une histoire de clones à risques**
- Mode de fonctionnement et expertise des souches au CNR
- Le séquençage haut débit : Lequel ? Limites ?
- Investigation d'une épidémies : Les bonnes questions

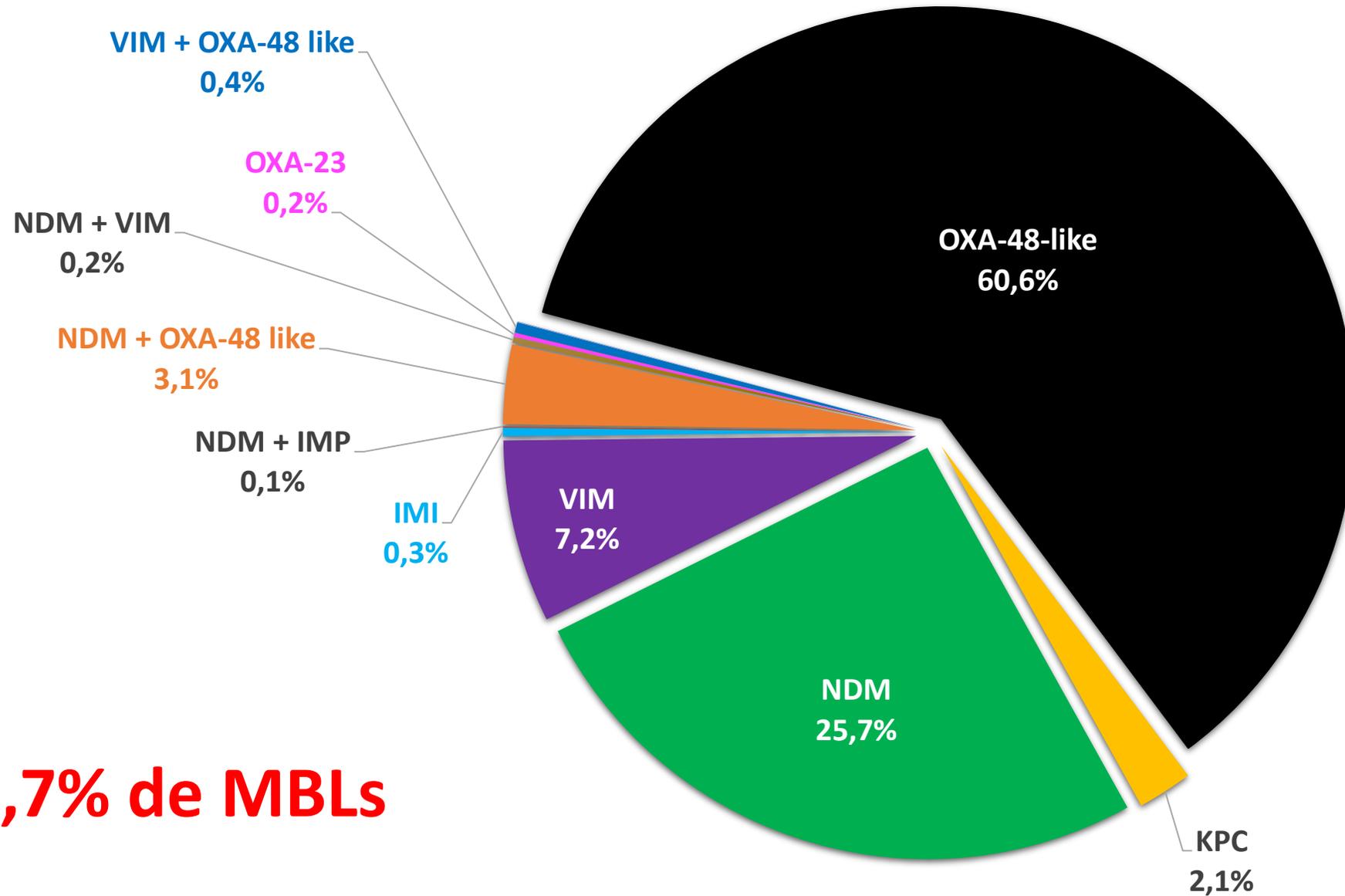
## Répartition des souches reçues au CNR entre 2012 et 2022



# Evolution du nombre de souches reçues au CNR par mois de 2017 à 2022



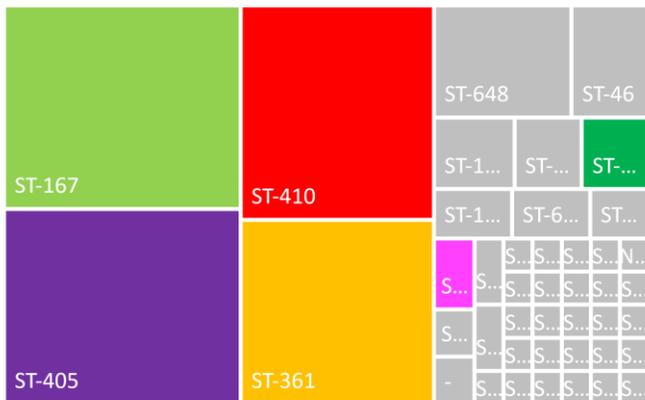
## Distribution des souches reçues en 2022 par mécanisme de résistance



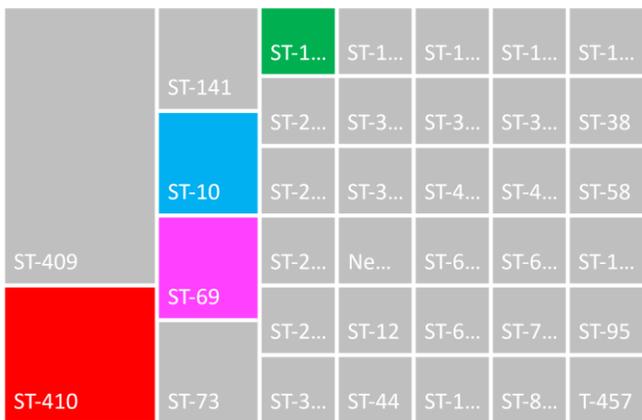
**36,7% de MBLs**

# *E. coli* carbapanemase

*E. coli* NDM-5

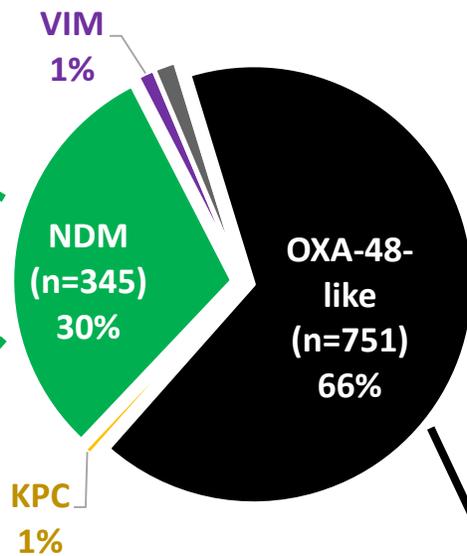


*E. coli* NDM-1



N=267  
(77,4%)

N=50  
(14,5%)

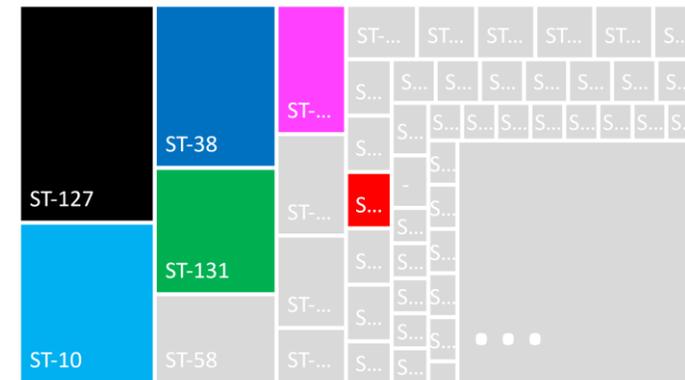


N=402  
(53,5%)

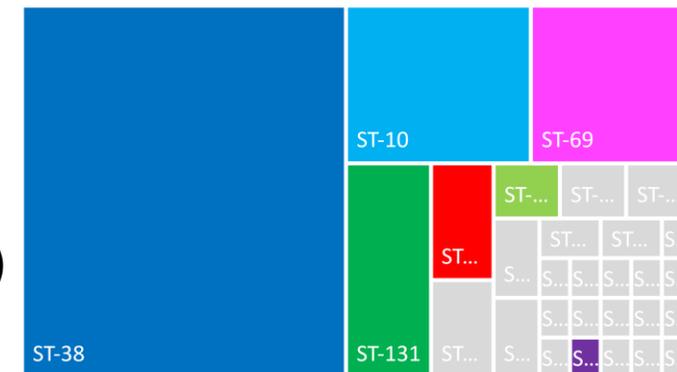
N=205  
(27,3%)

N=127  
(16,9%)

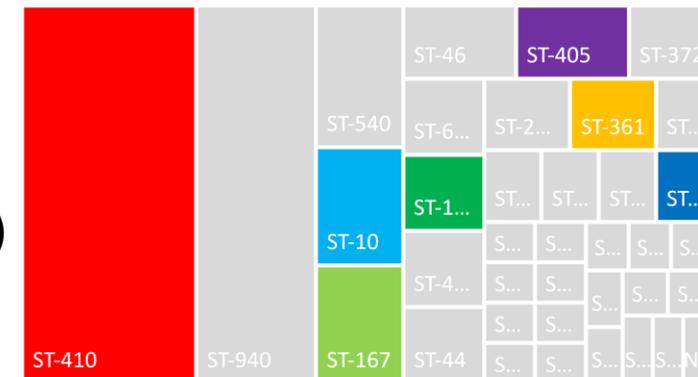
OXA-48



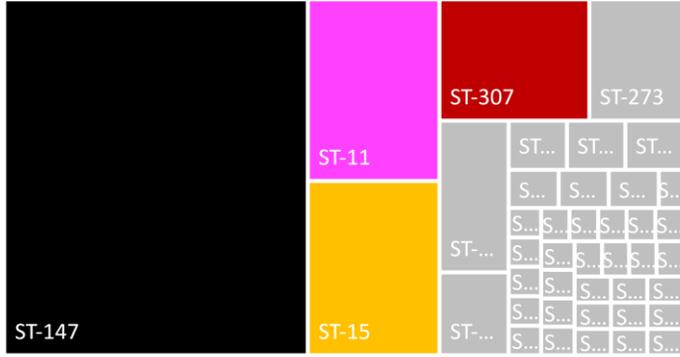
*E. coli* OXA-244



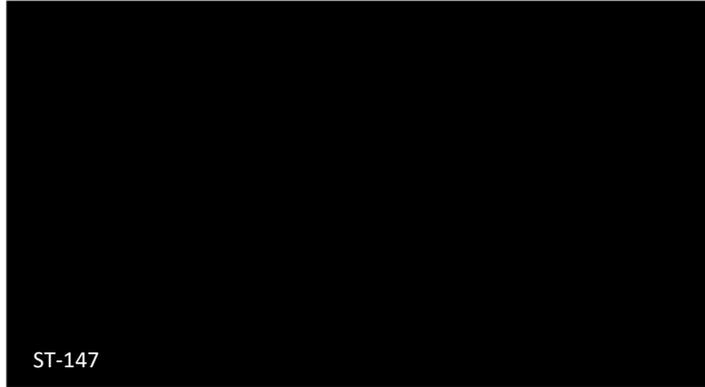
*E. coli* OXA-181



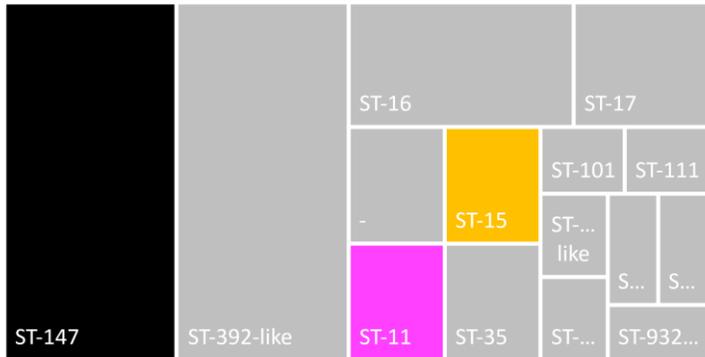
*K. pneumoniae* NDM-1



*K. pneumoniae* NDM-14



*K. pneumoniae* NDM-5



# *K. pneumoniae* carbapanemase

N=253  
(67,8%)

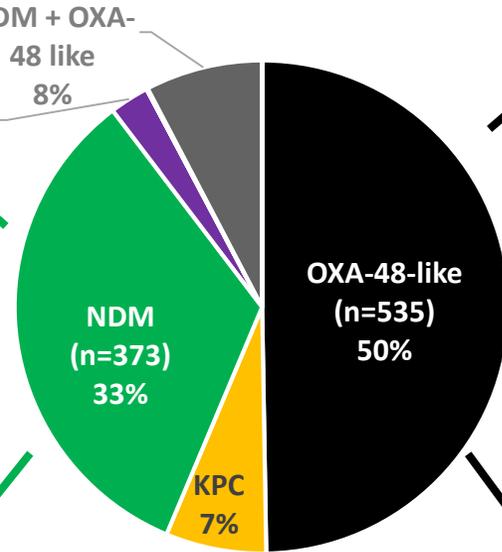
N=425  
(79,4%)

N=50  
(13,8%)

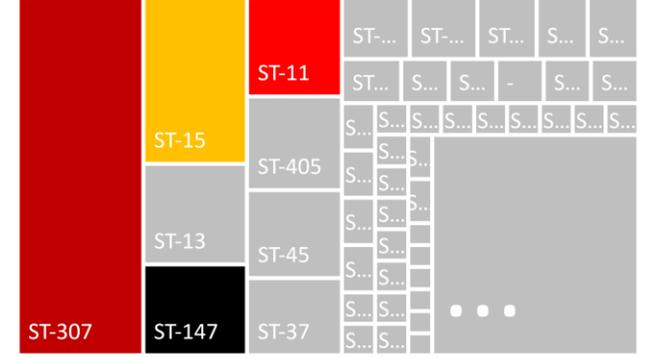
N=85  
(15,9%)

N=46  
(12,3%)

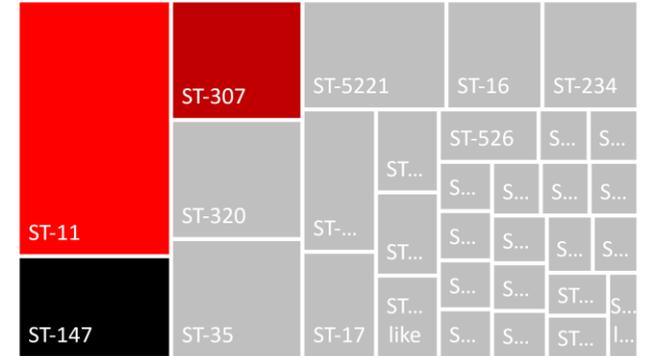
N=23  
(4,3%)



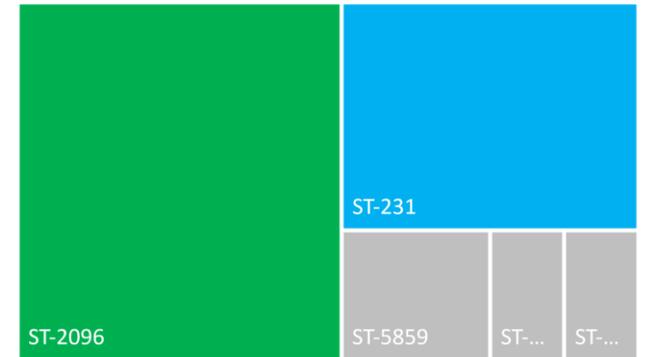
*K. pneumoniae* OXA-48



*K. pneumoniae* OXA-181



*K. pneumoniae* OXA-232



# SOMMAIRE

- ❑ Epidémiologie des EPC en France en 2022 : Une histoire de clones à risques
- ❑ **Mode de fonctionnement et expertise des souches au CNR**
- ❑ Le séquençage haut débit : Lequel ? Limites ?
- ❑ Investigation d'une épidémies : Les bonnes questions

**JO**

**Réception de la souche + Enregistrement informatique + Ré-isolément de la souche sur milieu chromogène**



**J0**

Réception de la souche + Enregistrement informatique + Ré-isolément de la souche sur milieu chromogène



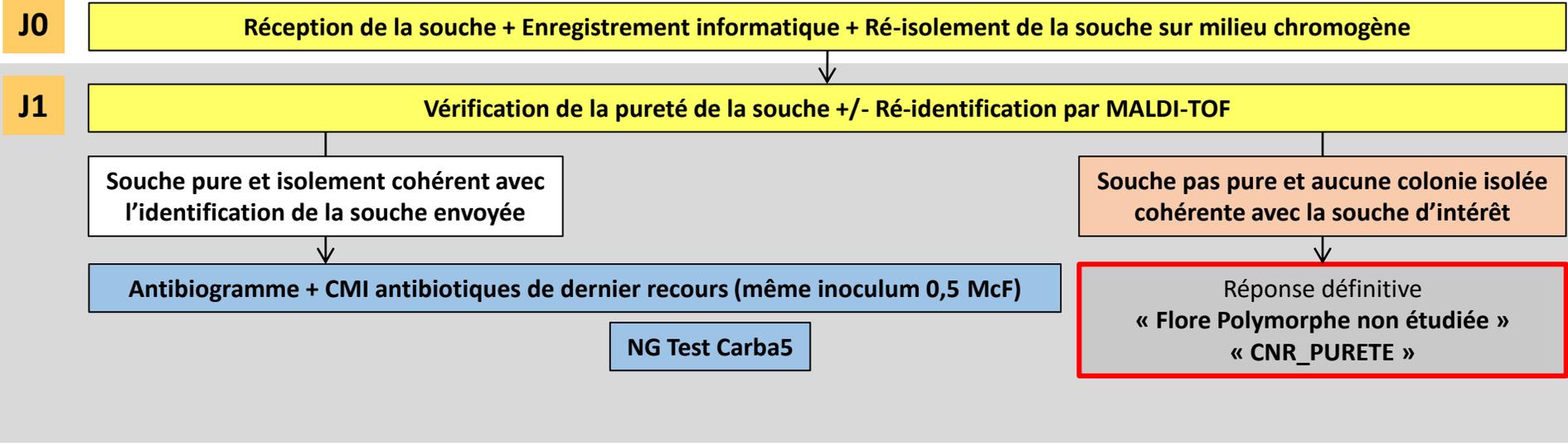
**J1**

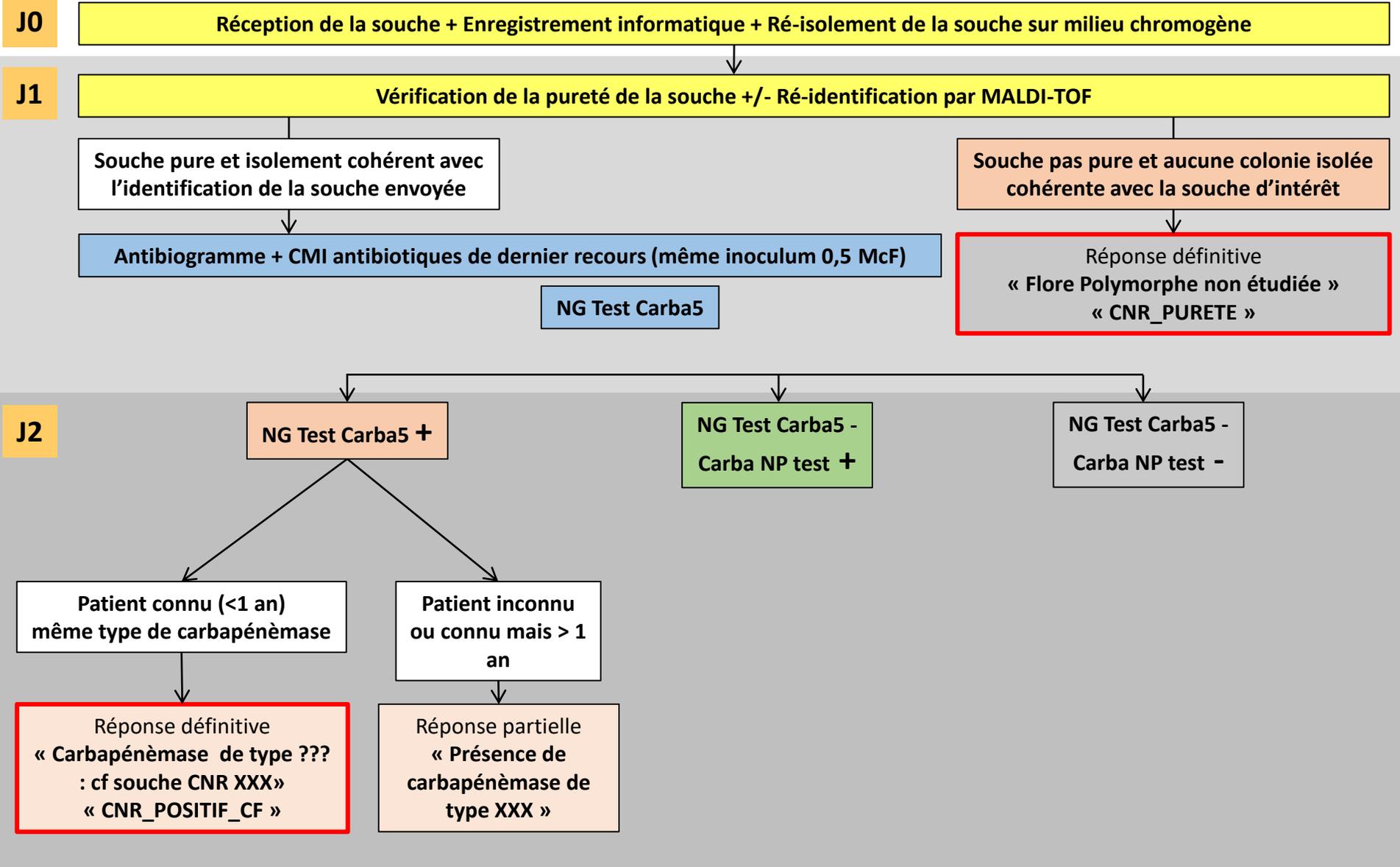
Vérification de la pureté de la souche +/- Ré-identification par MALDI-TOF

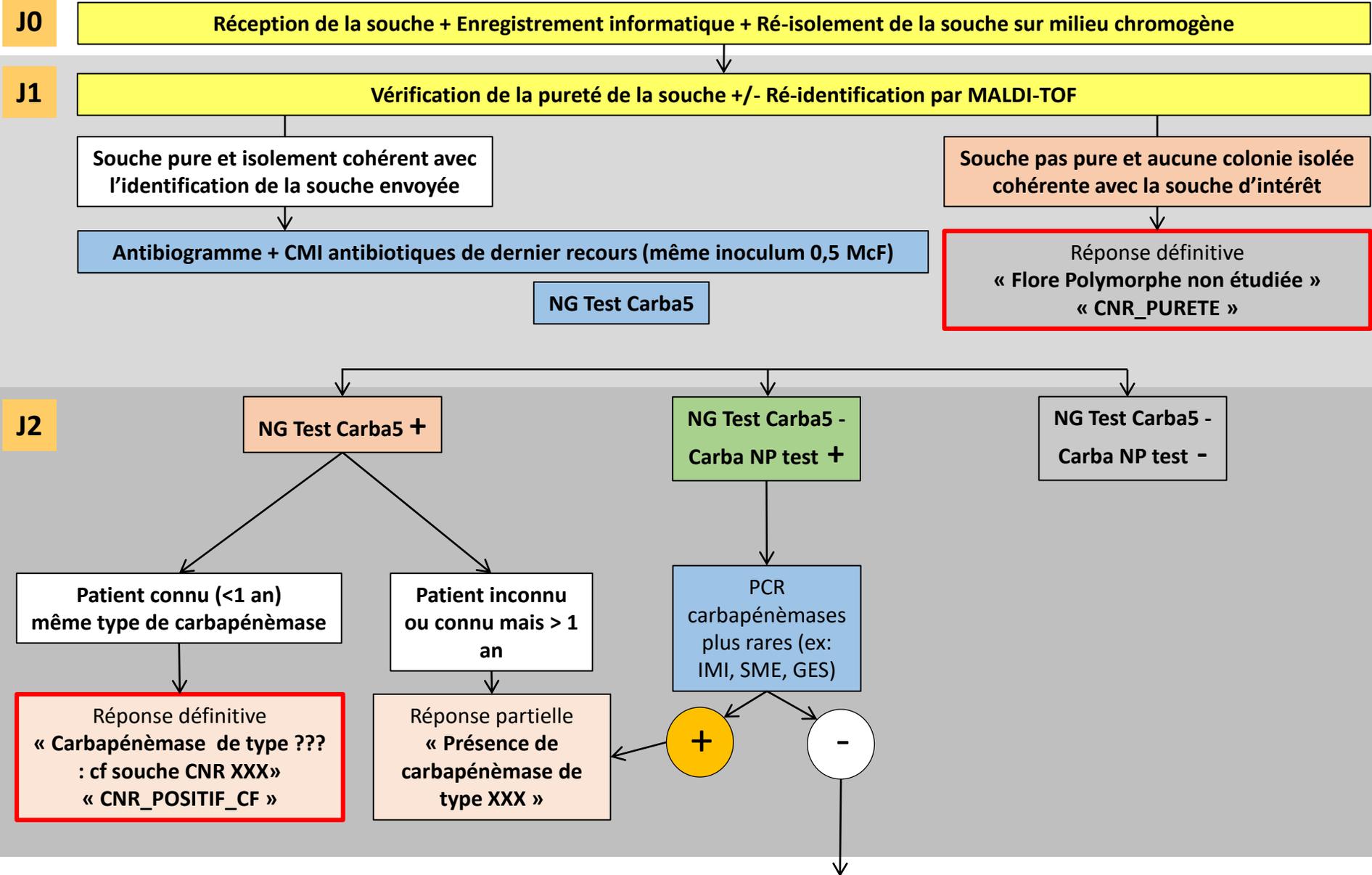
Souche pas pure et aucune colonie isolée  
cohérente avec la souche d'intérêt

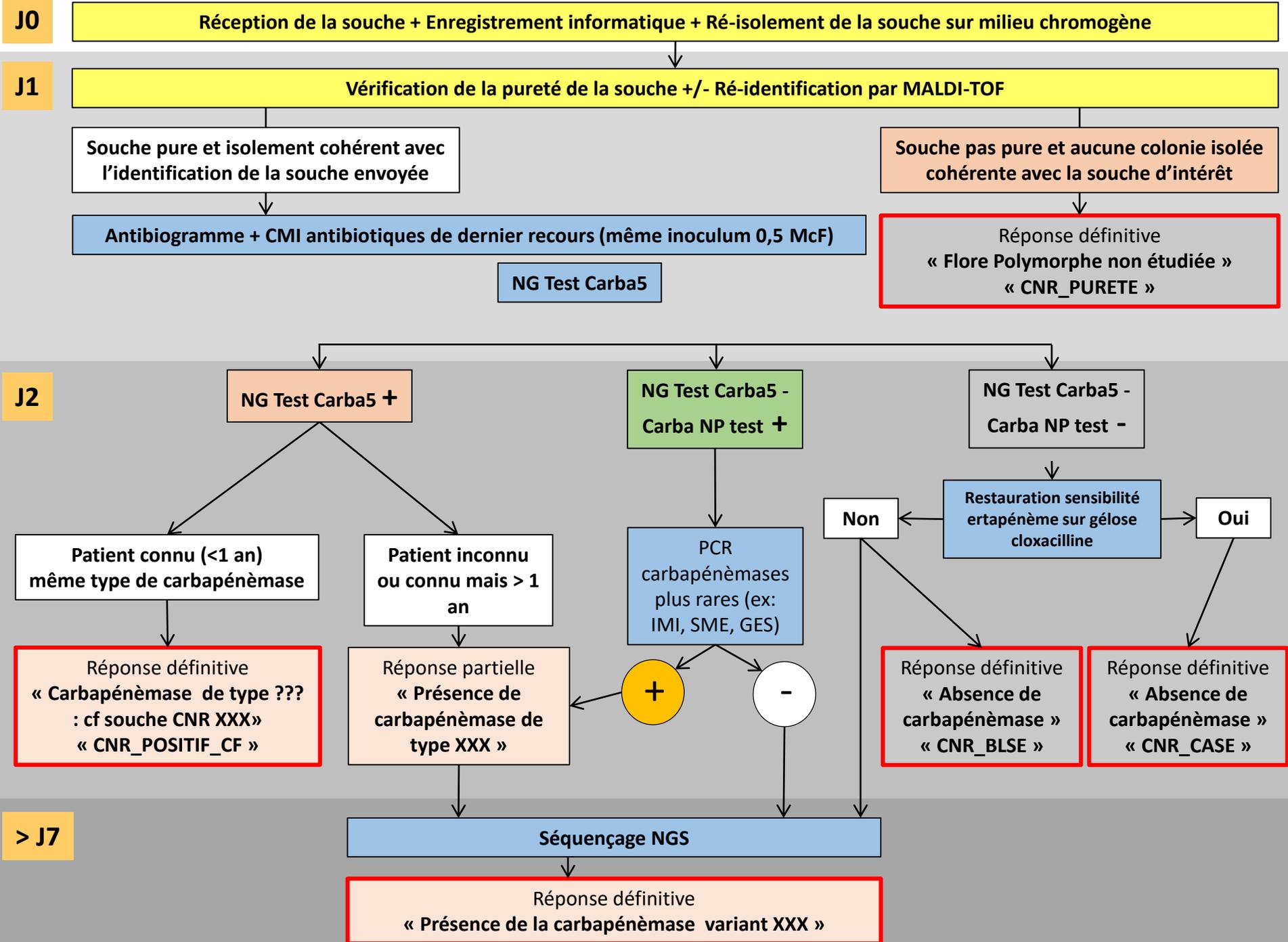


Réponse définitive  
« Flore Polymorphe non étudiée »  
« CNR\_PURETE »







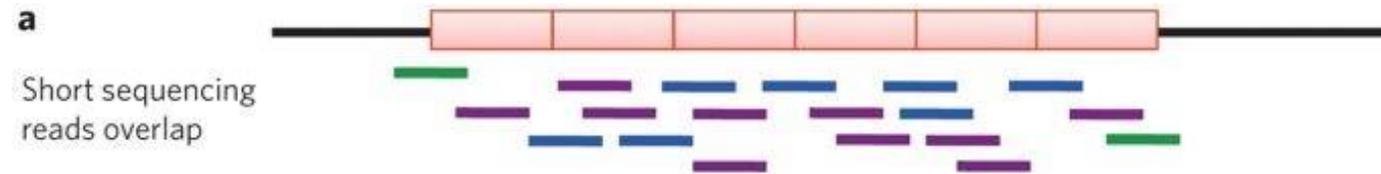


# SOMMAIRE

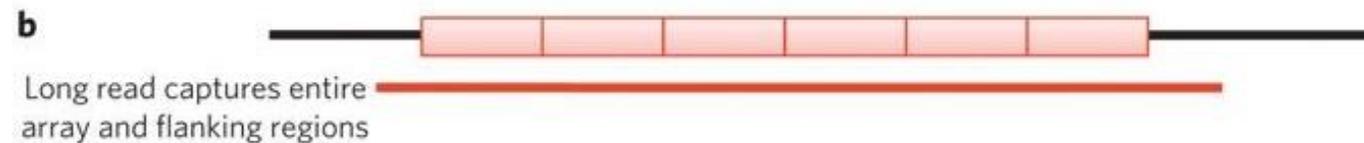
- ❑ Epidémiologie des EPC en France en 2022 : Une histoire de clones à risques
- ❑ Mode de fonctionnement et expertise des souches au CNR
- ❑ **Le séquençage haut débit : Lequel ? Limites ?**
- ❑ Investigation d'une épidémies : Les bonnes questions

## 2 techniques de séquençages utilisables en « routine »

### ❑ Séquençage « short read » : Technologie Illumina

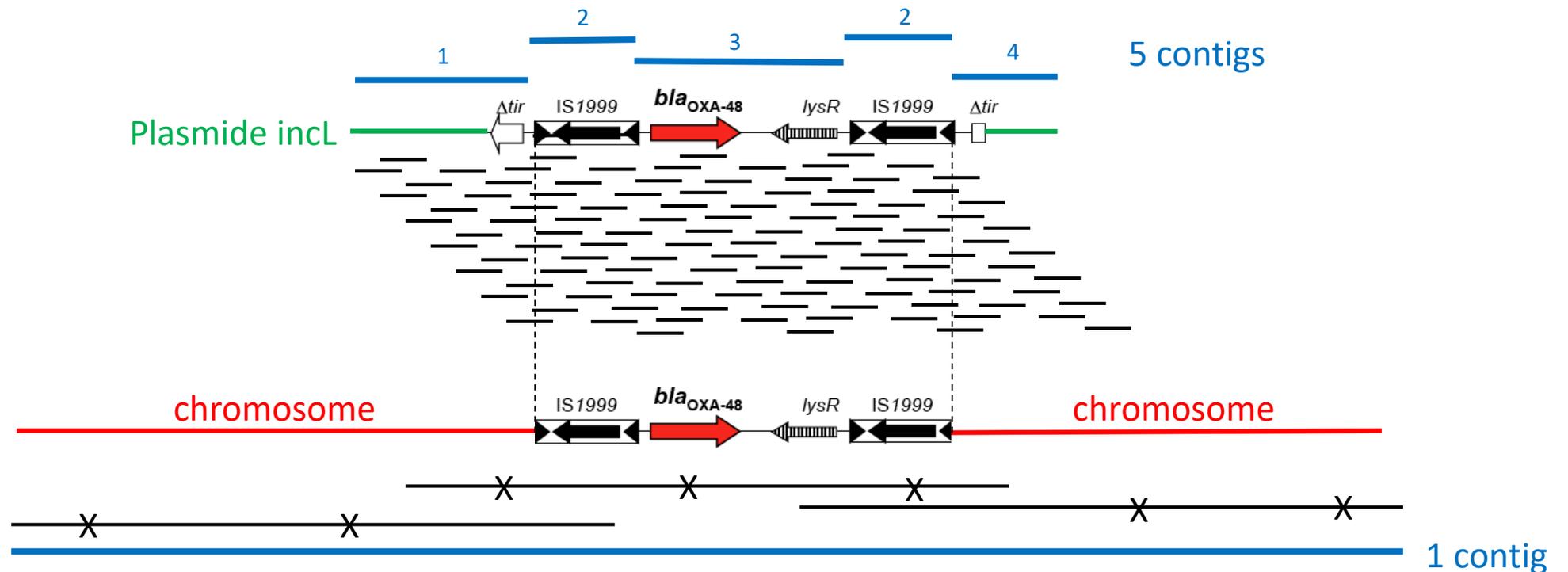


### ❑ Séquençage « long read » : Technologies PacBio ou Nanopore



# Avantages et inconvénients de chaque technique

Séquençage	Coût	Profondeur	Taux d'erreur	Reconstruction du génome	Reconstruction des plasmides
Short read	70-110€	30 X - 200 X	< 0,001%	Non	Non
Long read	700-900€	5 X - 10 X	10-15%	Oui	Oui



# SOMMAIRE

- ❑ Epidémiologie des EPC en France en 2022 : Une histoire de clones à risques
- ❑ Mode de fonctionnement et expertise des souches au CNR
- ❑ Le séquençage haut débit : Lequel ? Limites ?
- ❑ **Investigation d'une épidémies : Les bonnes questions**

## A chaque question sa technique la plus pertinente

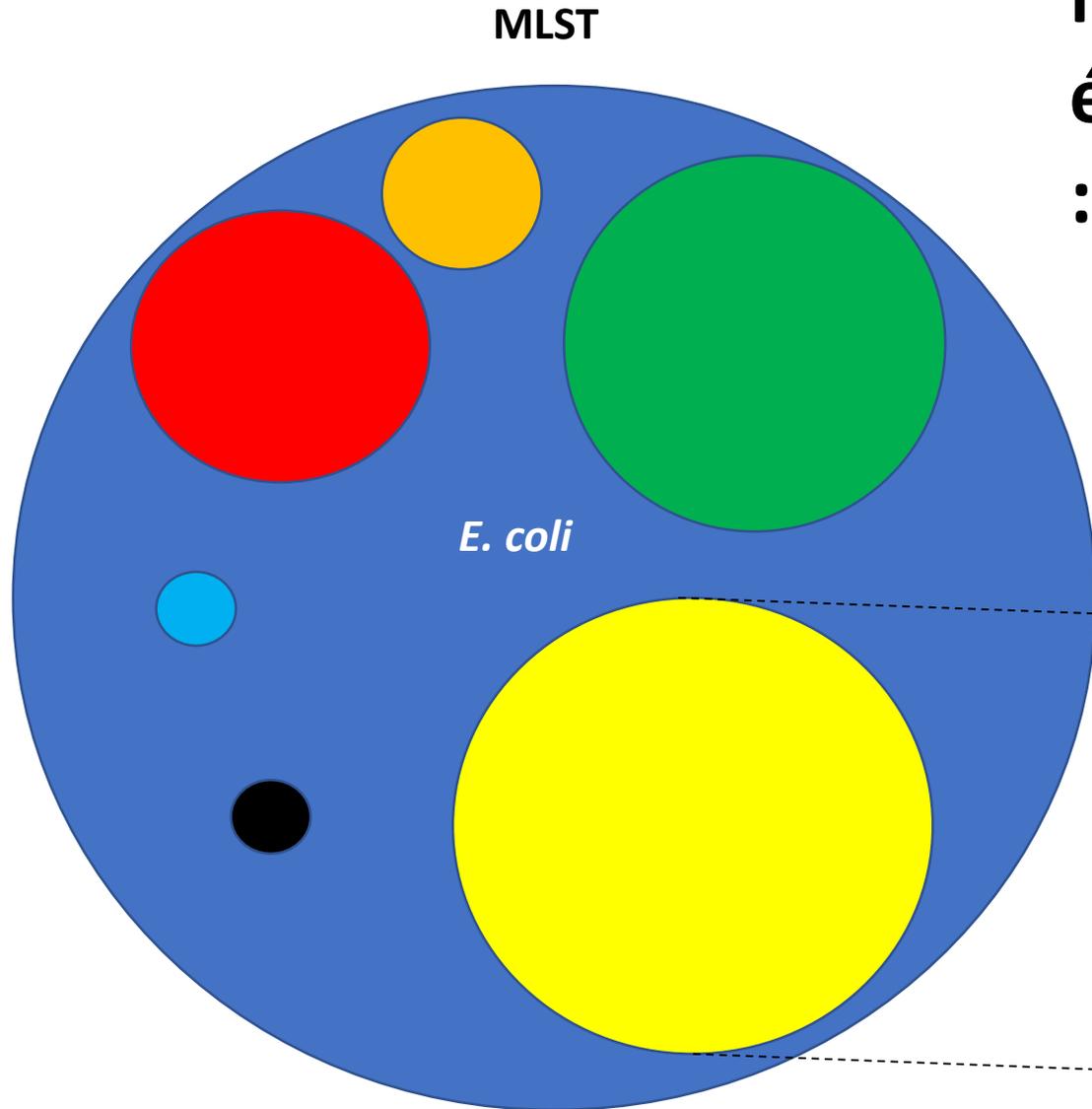
### □ Plusieurs souches sont-elles identiques ?

- Eviter les erreurs de séquençage
  - Comparer l'ensemble des génomes 2 à 2
- Alignement des séquences 2 à 2 sur > 90% du génome total
- } Illumina: short read

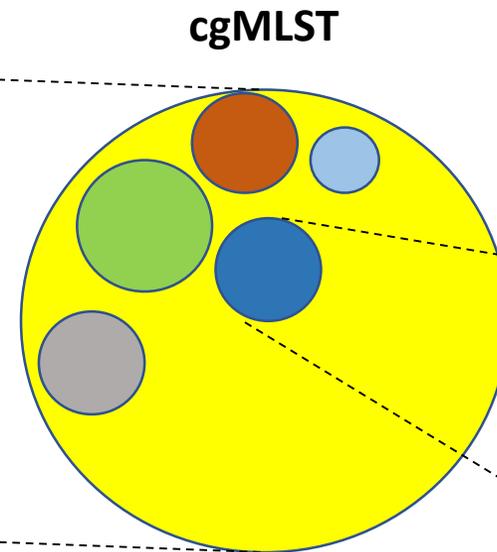
### **On ne compare que des souches :**

- **Appartenant à la même espèce**
- **Produisant le même variant de carbapénèmase**
- **Appartenant au même ST (schéma MLST)**

**Niveau de précision nécessaire pour établir que 2 souches sont identiques : généralement  $\leq 20$  SNPs**

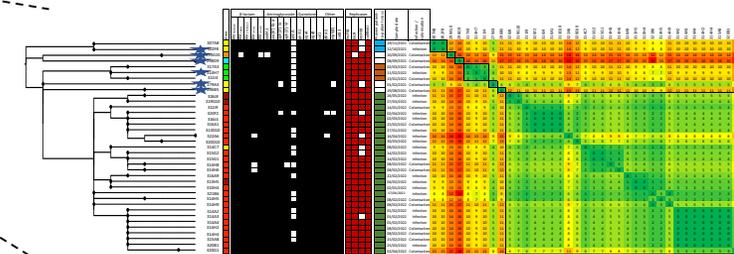


Séquençage de 7 gènes de ménages



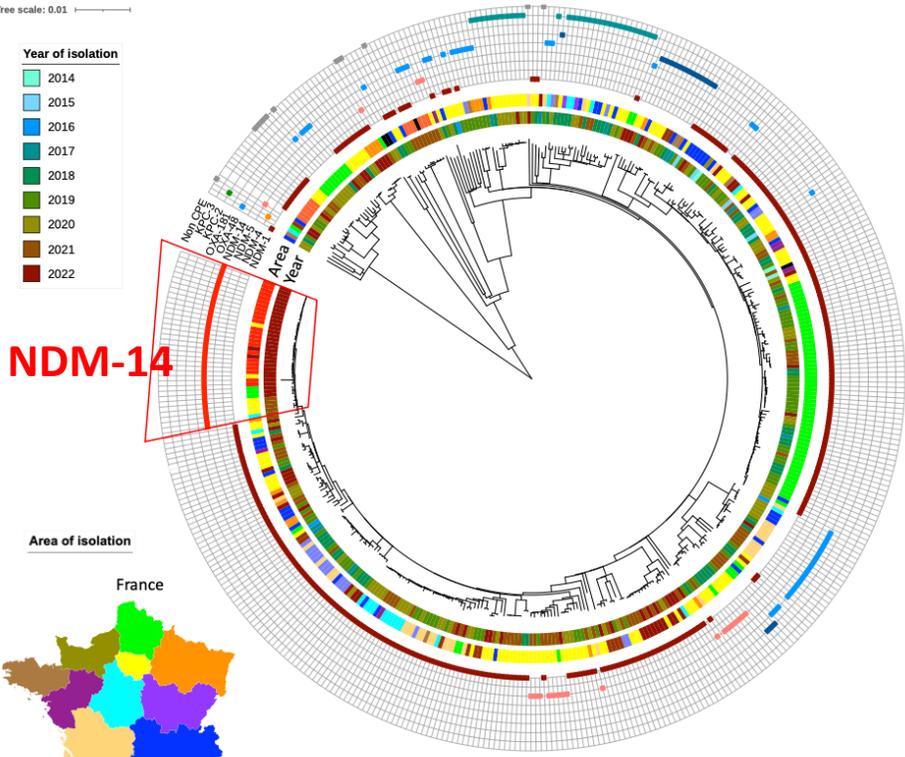
Séquençage de 500 gènes de ménages

Single nucleotide polymorphisms (SNPs)

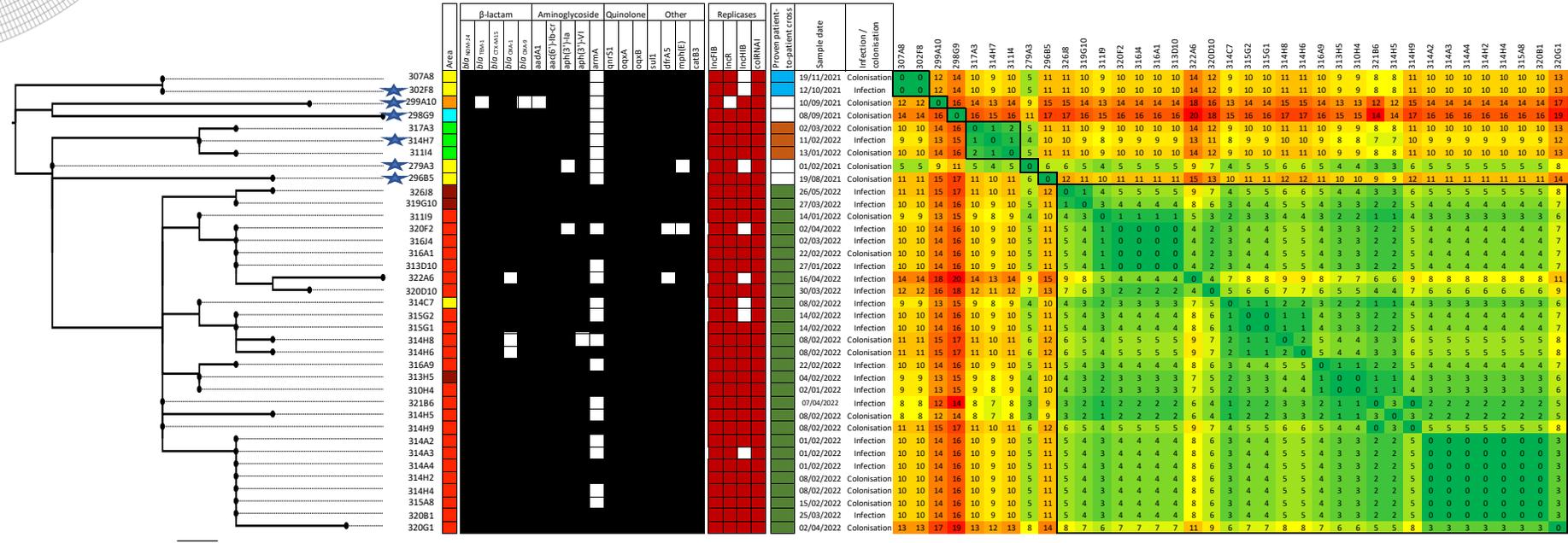


# K. pneumoniae ST-147

# Exemple de la diffusion de K. pneumoniae NDM-14



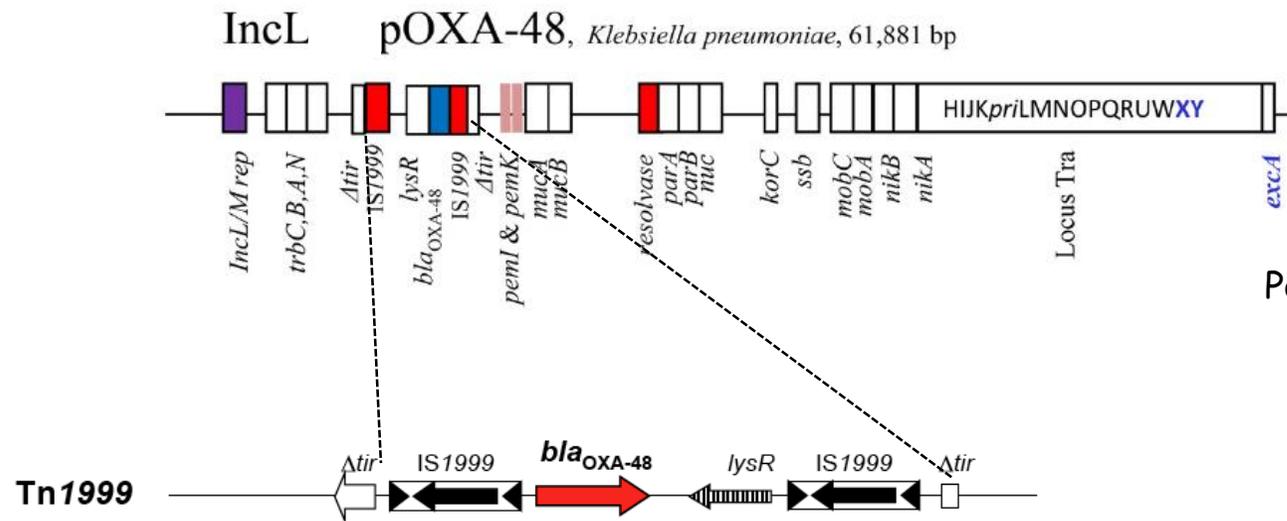
7 clones différents



## A chaque question sa technique la plus pertinente

### □ Mes souches ne sont pas identiques mais s'agit-il de la même épidémie ?

Le problème avec OXA-48 : plasmide unique IncL 62,5 kb hyper-conjugatif



Poirel et al. AAC 2012

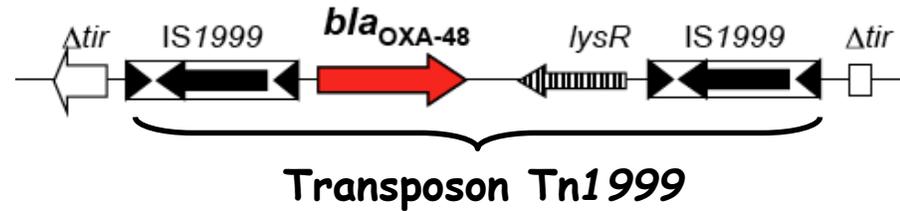


TABLE 2 Transfer frequencies in *E. coli* JM109 and *E. cloacae* SB<sup>a</sup>

Donor strain	Recipient strain	Mean transfer frequency $\pm$ SD	
<i>E. coli</i> TOP10(pOXA-48a)	<i>E. coli</i> JM109	$1.1 \times 10^{-1} \pm 0.02$	<b><math>\Delta tir</math> (Tn1999)</b>
<i>E. coli</i> TOP10(pNDM-OM)	<i>E. coli</i> JM109	$2.6 \times 10^{-3} \pm 0.016$	
<i>E. coli</i> TOP10(pOXA-48a, pTOPO-Nc)	<i>E. coli</i> JM109	$1.7 \times 10^{-1} \pm 0.03$	<b><math>\Delta tir</math> + control DNA</b>
<i>E. coli</i> TOP10(pOXA-48a, pTOPO-TIR)	<i>E. coli</i> JM109	$1.6 \times 10^{-3} \pm 0.0005$	<b><math>\Delta tir</math> + <i>tir</i></b>
<i>E. coli</i> TOP10(pOXA-48a, pTOPO-Nc)	<i>E. cloacae</i> SB	$4.9 \times 10^{-2} \pm 0.018$	
<i>E. coli</i> TOP10(pOXA-48a, pTOPO-TIR)	<i>E. cloacae</i> SB	$1.2 \times 10^{-3} \pm 0.00004$	

% 100

Hôpital	Ref CNR	Date	ST	Carba	Autre beta-lactamases
St Etienne	178 F8	30/04/18	8	OXA-48	CMY-79 like, SHV-12
St Etienne	178 F9	09/05/18	22	OXA-48	CMY-48, SHV-12

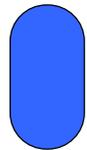
Transmission croisée ???

## Sénario 1 : Pas de transmission croisée

J0



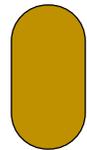
*C. freundii* ST8  
OXA-48



*Kp*  
ST-1



*C. freundii* ST22  
OXA-48

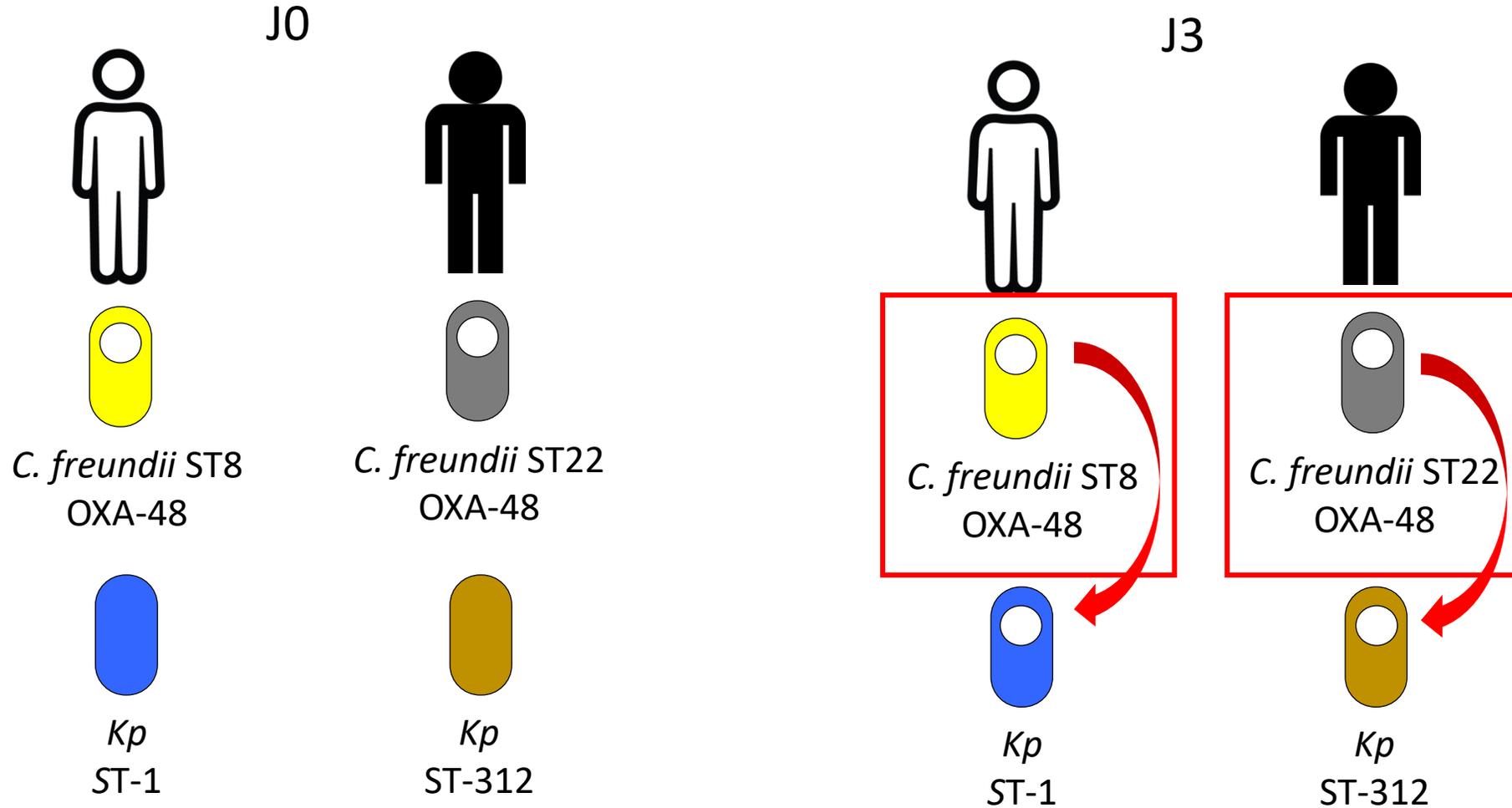


*Kp*  
ST-312

Hôpital	Ref CNR	Date	ST	Carba	Autre beta-lactamases
St Etienne	178 F8	30/04/18	8	OXA-48	CMY-79 like, SHV-12
St Etienne	178 F9	09/05/18	22	OXA-48	CMY-48, SHV-12

Transmission croisée ???

## Sénario 1 : Pas de transmission croisée



Hôpital	Ref CNR	Date	ST	Carba	Autre beta-lactamases
St Etienne	178 F8	30/04/18	8	OXA-48	CMY-79 like, SHV-12
St Etienne	178 F9	09/05/18	22	OXA-48	CMY-48, SHV-12

Transmission croisée ???

## Sénario 2 : Pas de transmission croisée

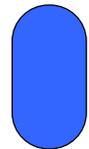
J0



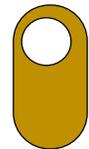
*C. freundii* ST8  
OXA-48



*C. freundii* ST22  
OXA-48



*Kp*  
ST-1

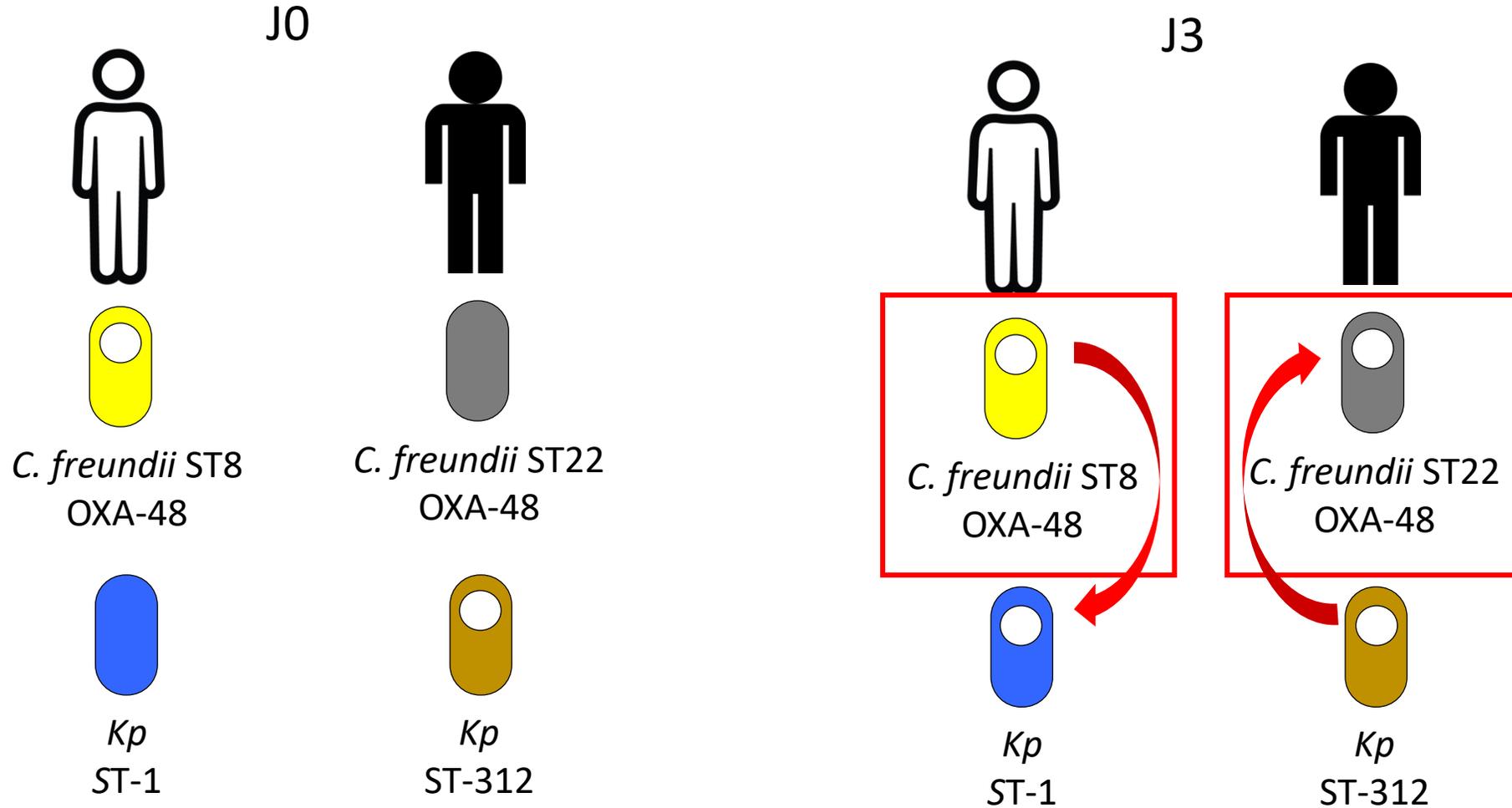


*Kp*  
ST-312

Hôpital	Ref CNR	Date	ST	Carba	Autre beta-lactamases
St Etienne	178 F8	30/04/18	8	OXA-48	CMY-79 like, SHV-12
St Etienne	178 F9	09/05/18	22	OXA-48	CMY-48, SHV-12

Transmission croisée ???

## Sénario 2 : Pas de transmission croisée



Hôpital	Ref CNR	Date	ST	Carba	Autre beta-lactamases
St Etienne	178 F8	30/04/18	8	OXA-48	CMY-79 like, SHV-12
St Etienne	178 F9	09/05/18	22	OXA-48	CMY-48, SHV-12

Transmission croisée ???

### Sénario 3 : Transmission croisée

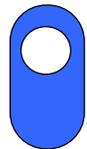
J0



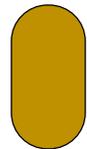
*C. freundii* ST8  
OXA-48



*C. freundii* ST22  
OXA-48



*Kp*  
ST-1

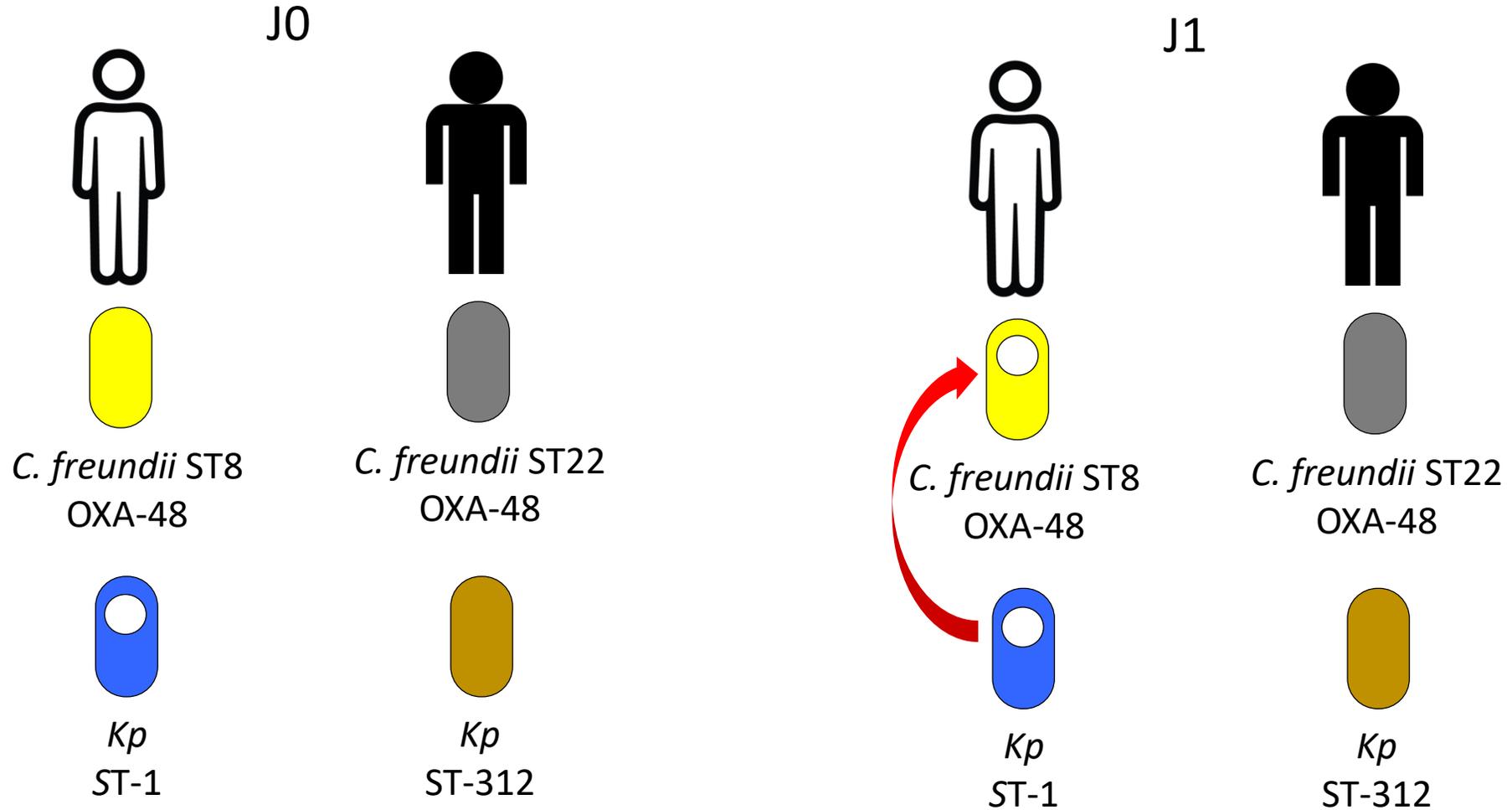


*Kp*  
ST-312

Hôpital	Ref CNR	Date	ST	Carba	Autre beta-lactamases
St Etienne	178 F8	30/04/18	8	OXA-48	CMY-79 like, SHV-12
St Etienne	178 F9	09/05/18	22	OXA-48	CMY-48, SHV-12

Transmission croisée ???

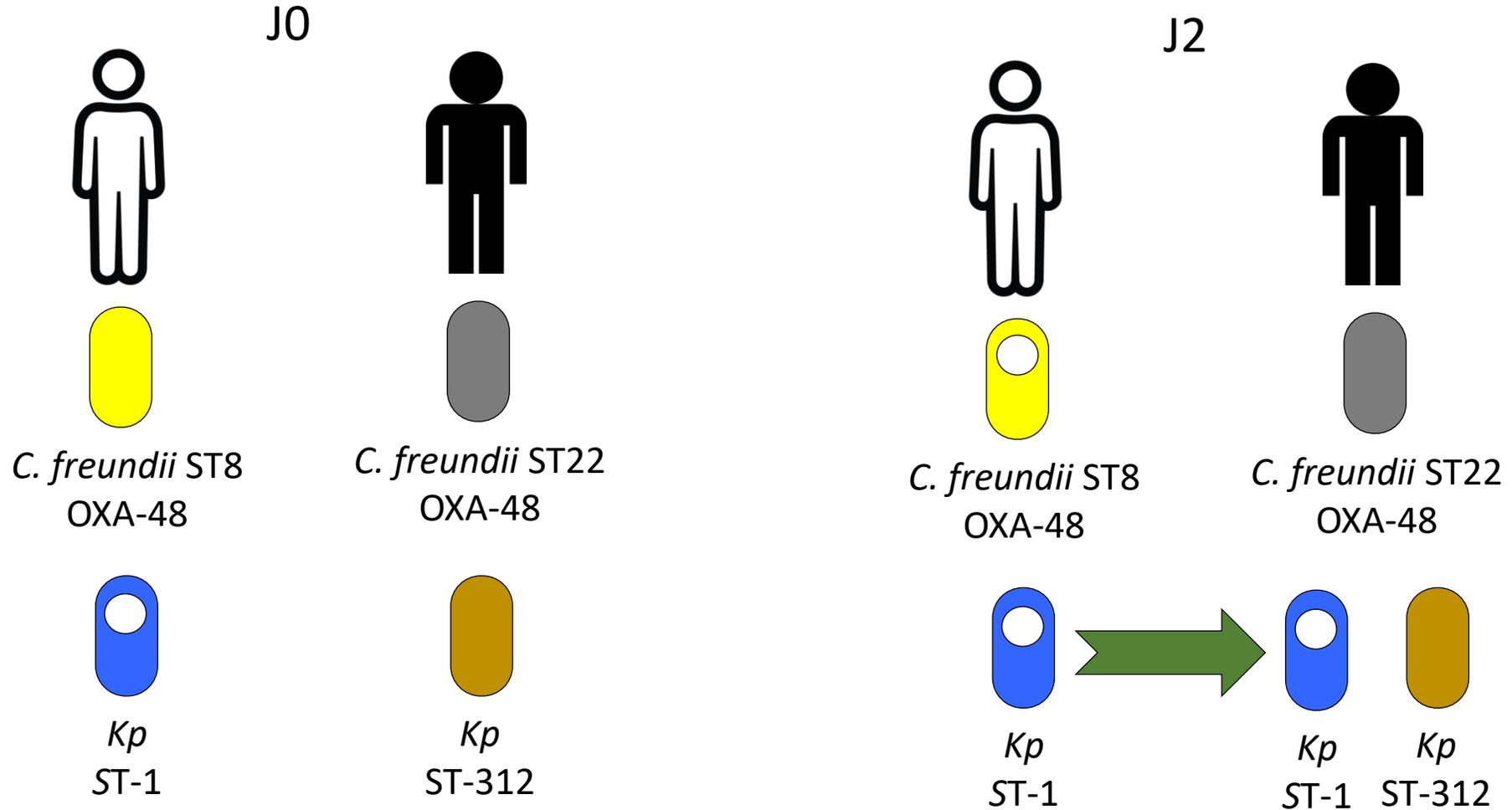
### Sénario 3 : Transmission croisée



Hôpital	Ref CNR	Date	ST	Carba	Autre beta-lactamases
St Etienne	178 F8	30/04/18	8	OXA-48	CMY-79 like, SHV-12
St Etienne	178 F9	09/05/18	22	OXA-48	CMY-48, SHV-12

Transmission croisée ???

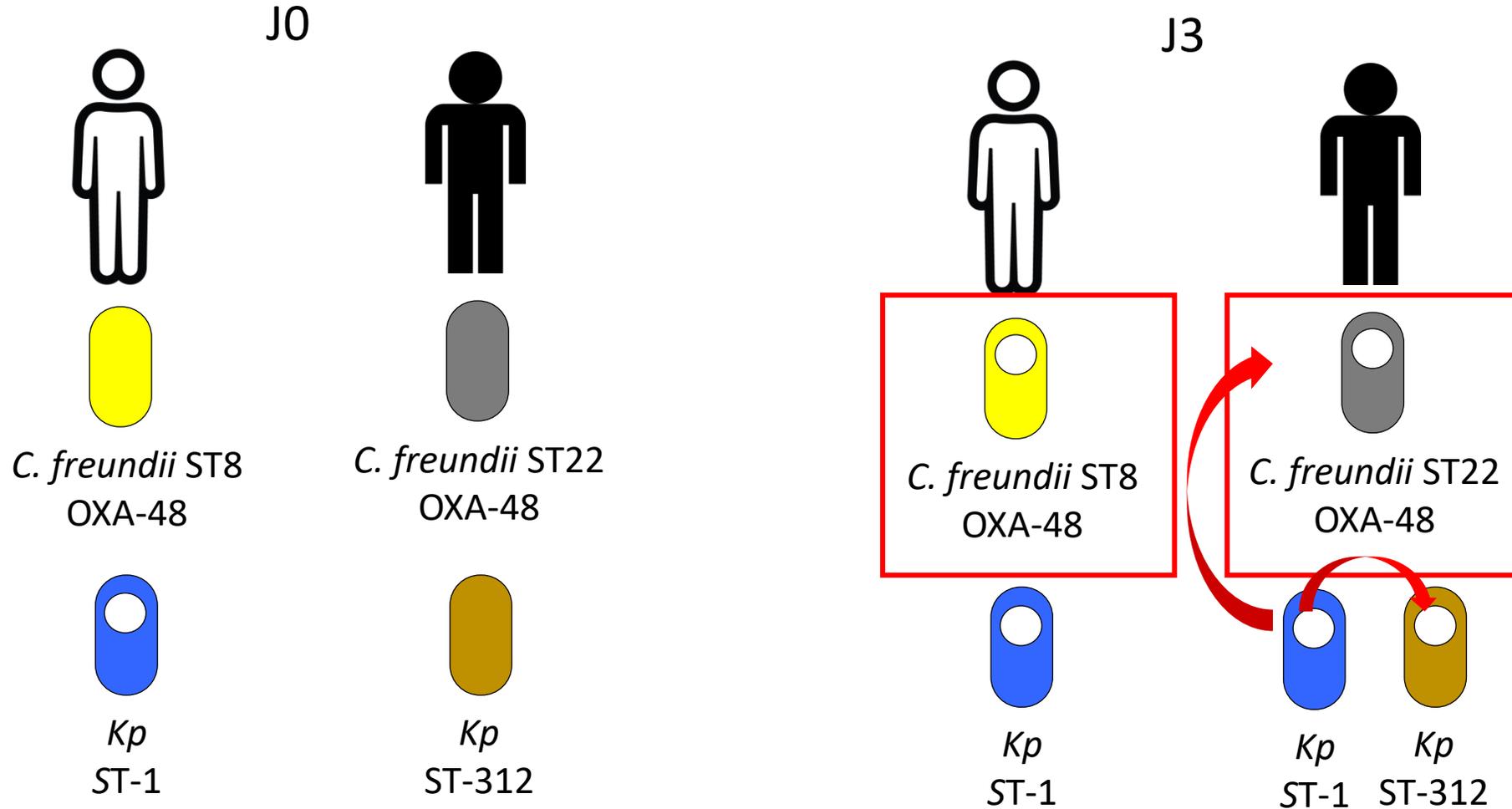
### Sénario 3 : Transmission croisée



Hôpital	Ref CNR	Date	ST	Carba	Autre beta-lactamases
St Etienne	178 F8	30/04/18	8	OXA-48	CMY-79 like, SHV-12
St Etienne	178 F9	09/05/18	22	OXA-48	CMY-48, SHV-12

Transmission croisée ???

### Sénario 3 : Transmission croisée



## A chaque question sa technique la plus pertinente

### □ Mais souches sont toutes différentes mais ne s'agit-il pas du même plasmide qui diffuse d'une bactérie à l'autre ?

- 1) Pour OXA-48 c'est toujours le même plasmide qui diffuse très rapidement d'une **entérobactérie** à une autre
- 2) Pour les autres carbapénèmases les plasmides sont variés mais certains ont tendance à prédominer

La comparaison de plasmide nécessite un double séquençage : « long read » pour obtenir la séquence totale du plasmide et « short read » pour corriger les erreurs de séquençage

# Exemple d'un résultat de comparaison d'un épidémie mixte souche/plasmide

## RESULTATS DE LA COMPARAISON

Méthode : Comparaison des séquences génomiques totales (séquençage haut-débit par technique Illumina)

Patient		Réf. CNR	Date isolement souche	Espèce	MLST	Clone	β-lactamases acquises	Autres gènes acquis codant pour la résistance aux antibiotiques
Nom	Prénom							
NH HYG HEH	Chambre 216	387 D7	22/02/23	Enterobacter hormaechei hoffmanii	233	A	VIM-4 + TEM-1	aac(6')-Ib3 + aac(6')-II + aadA2 + ant(2'')-Ia + dfrA1 + mcr-9.2 + qnrA1 + sul1 + tet(A)
NH HYG HEH	Chambre 217	387 D8	22/02/23	Enterobacter quasihormaechei	873	B1	VIM-4 + TEM-1	aac(6')-Ib3 + aac(6')-II + aadA2 + ant(2'')-Ia + aph(3'')-Ib + aph(6)-Id + dfrA1 + mcr-9.2 + qnrA1 + sul1 + tet(A)
NH HYG HEH	Chambre 212	387 D9	22/02/23	Enterobacter quasihormaechei	873	B2	VIM-4 + TEM-1	aac(6')-Ib3 + aac(6')-II + aadA2 + ant(2'')-Ia + aph(3'')-Ib + aph(6)-Id + dfrA1 + mcr-9.2 + qnrA1 + sul1 + tet(A)
NH HYG HEH	Chambre 214	387 D10	22/02/23	Enterobacter hormaechei hoffmanii	145	C	VIM-1	aac(6')-Ib4 + aac(6')-II + aadA1 + aph(3'')-XV + catB2 + dfrA1 + dfrA14 + mcr-9.2 + mph(A) + qnrS1 + sul1 + tet(A)
NH HYG HEH	Chambre 208	387 F1	22/02/23	Enterobacter hormaechei hoffmanii	233	A	VIM-4 + TEM-1	aac(6')-Ib3 + aac(6')-II + aadA2 + ant(2'')-Ia + dfrA1 + mcr-9.2 + qnrA1 + sul1 + tet(A)
NH HYG HEH	Chambre 204	387 F2	22/02/23	Enterobacter asburiae	53	D	VIM-4 + CTX-M-15 + OXA-1	aac(3)-Ile + aac(6')-Ib3 + aac(6')-II + aadA2 + dfrA1 + dfrA14 + mcr-9.2 + sul1 + tet(A)
NH HYG HEH	Chambre 219	387 F3	23/02/23	Enterobacter hormaechei hoffmanii	233	A	VIM-4 + TEM-1	aac(6')-Ib3 + aac(6')-II + aadA2 + ant(2'')-Ia + dfrA1 + mcr-9.2 + qnrA1 + sul1 + tet(A)
NH HYG HEH	Chambre 221	387 F4	23/02/23	Enterobacter hormaechei hoffmanii	233	A	VIM-4 + TEM-1	aac(6')-Ib3 + aac(6')-II + aadA2 + ant(2'')-Ia + dfrA1 + mcr-9.2 + qnrA1 + sul1 + tet(A)
NH HYG HEH	Chambre 222	387 F5	23/02/23	Enterobacter hormaechei hoffmanii	102	E	NDM-1 + CTX-M-15 + OXA-1 + OXA-10	aac(3)-Ile + aac(6')-Ib-cr + aadA1 + arr-3 + dfrA14 + qnrB1 + sul1

### Conclusion :

Le seuil classiquement retenu pour affirmer que 2 souches sont identiques est de ≤ 20 SNPs.

L'analyse par séquençage haut débit des différents isolats révèle que les 4 isolats de ST233 correspondent au même clone (moins de 15 SNPs entre chaque souches), ce qui est fortement évocateur d'une transmission croisée ou d'une transmission à partir d'une source commune.

Les 2 isolats de ST873 possèdent 24 SNPs (=mutations) sur l'intégralité de leur génome. Ces 2 souches sont donc proches mais pas tout à fait clonales.

Les autres souches comparées appartiennent à des STs différents et ne sont donc pas clonales.

# Exemple d'un résultat de comparaison d'un épidémie mixte souche/plasmide

## RESULTATS DE LA COMPARAISON

Méthode : Comparaison des séquences génomiques totales (séquençage haut-débit par technique Illumina)

Patient		Réf. CNR	Date isolement souche	Espèce	MLST	Clone	β-lactamases acquises	Autres gènes acquis codant pour la résistance aux antibiotiques
Nom	Prénom							
NH HYG HEH	Chambre 216	387 D7	22/02/23	Enterobacter hormaechei hoffmanii	233	A	VIM-4 + TEM-1	aac(6')-Ib3 + aac(6')-II + aadA2 + ant(2'')-Ia + dfrA1 + mcr-9.2 + qnrA1 + sul1 + tet(A)
NH HYG HEH	Chambre 217	387 D8	22/02/23	Enterobacter quasihormaechei	873	B1	VIM-4 + TEM-1	aac(6')-Ib3 + aac(6')-II + aadA2 + ant(2'')-Ia + aph(3'')-Ib + aph(6)-Id + dfrA1 + mcr-9.2 + qnrA1 + sul1 + tet(A)
NH HYG HEH	Chambre 212	387 D9	22/02/23	Enterobacter quasihormaechei	873	B2	VIM-4 + TEM-1	aac(6')-Ib3 + aac(6')-II + aadA2 + ant(2'')-Ia + aph(3'')-Ib + aph(6)-Id + dfrA1 + mcr-9.2 + qnrA1 + sul1 + tet(A)
NH HYG HEH	Chambre 214	387 D10	22/02/23	Enterobacter hormaechei hoffmanii	145	C	VIM-1	aac(6')-Ib4 + aac(6')-II + aadA1 + aph(3'')-XV + catB2 + dfrA1 + dfrA14 + mcr-9.2 + mph(A) + qnrS1 + sul1 + tet(A)
NH HYG HEH	Chambre 208	387 F1	22/02/23	Enterobacter hormaechei hoffmanii	233	A	VIM-4 + TEM-1	aac(6')-Ib3 + aac(6')-II + aadA2 + ant(2'')-Ia + dfrA1 + mcr-9.2 + qnrA1 + sul1 + tet(A)
NH HYG HEH	Chambre 204	387 F2	22/02/23	Enterobacter asburiae	53	D	VIM-4 + CTX-M-15 + OXA-1	aac(3)-Ile + aac(6')-Ib3 + aac(6')-II + aadA2 + dfrA1 + dfrA14 + mcr-9.2 + sul1 + tet(A)
NH HYG HEH	Chambre 219	387 F3	23/02/23	Enterobacter hormaechei hoffmanii	233	A	VIM-4 + TEM-1	aac(6')-Ib3 + aac(6')-II + aadA2 + ant(2'')-Ia + dfrA1 + mcr-9.2 + qnrA1 + sul1 + tet(A)
NH HYG HEH	Chambre 221	387 F4	23/02/23	Enterobacter hormaechei hoffmanii	233	A	VIM-4 + TEM-1	aac(6')-Ib3 + aac(6')-II + aadA2 + ant(2'')-Ia + dfrA1 + mcr-9.2 + qnrA1 + sul1 + tet(A)
NH HYG HEH	Chambre 222	387 F5	23/02/23	Enterobacter hormaechei hoffmanii	102	E	NDM-1 + CTX-M-15 + OXA-1 + OXA-10	aac(3)-Ile + aac(6')-Ib-cr + aadA1 + arr-3 + dfrA14 + qnrB1 + sul1

### Conclusion :

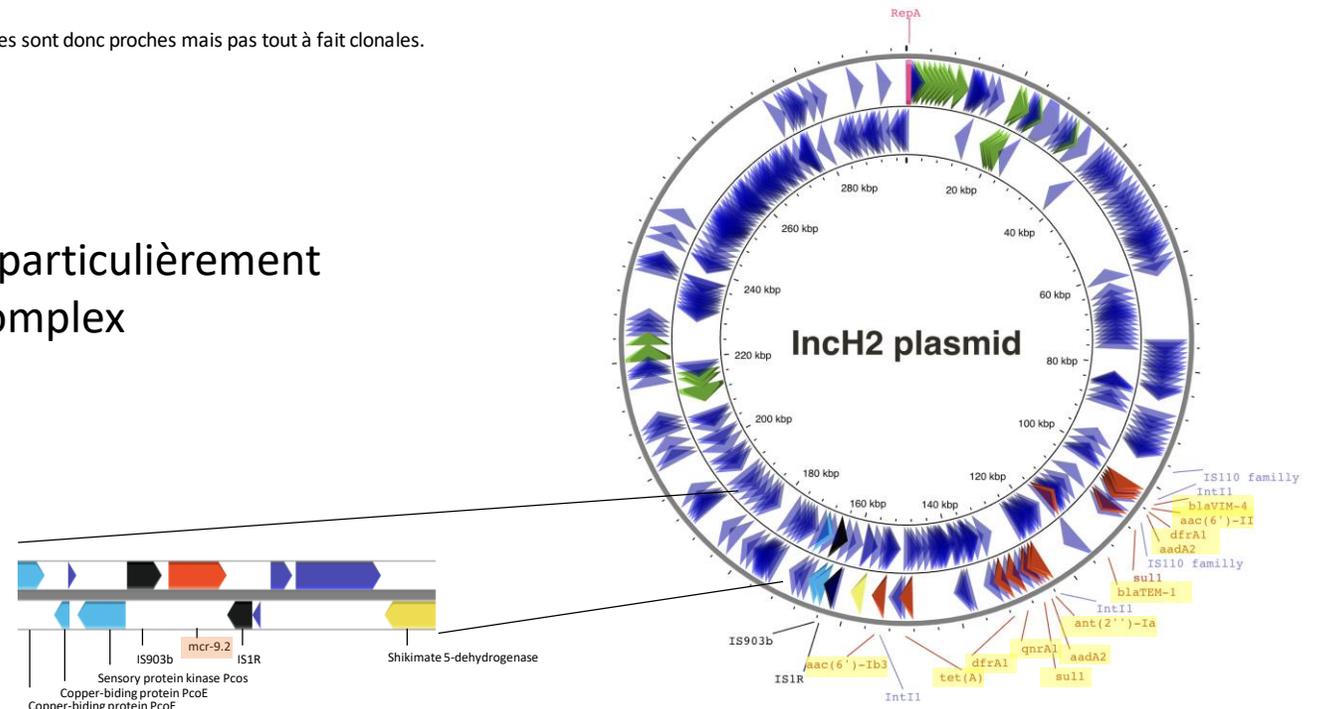
Le seuil classiquement retenu pour affirmer que 2 souches sont identiques est de  $\leq 20$  SNPs.

L'analyse par séquençage haut débit des différents isolats révèle que les 4 isolats de ST233 correspondent au même clone (moins de 15 SNPs entre chaque souches), ce qui est fortement évocateur d'une transmission croisée ou d'une transmission à partir d'une source commune.

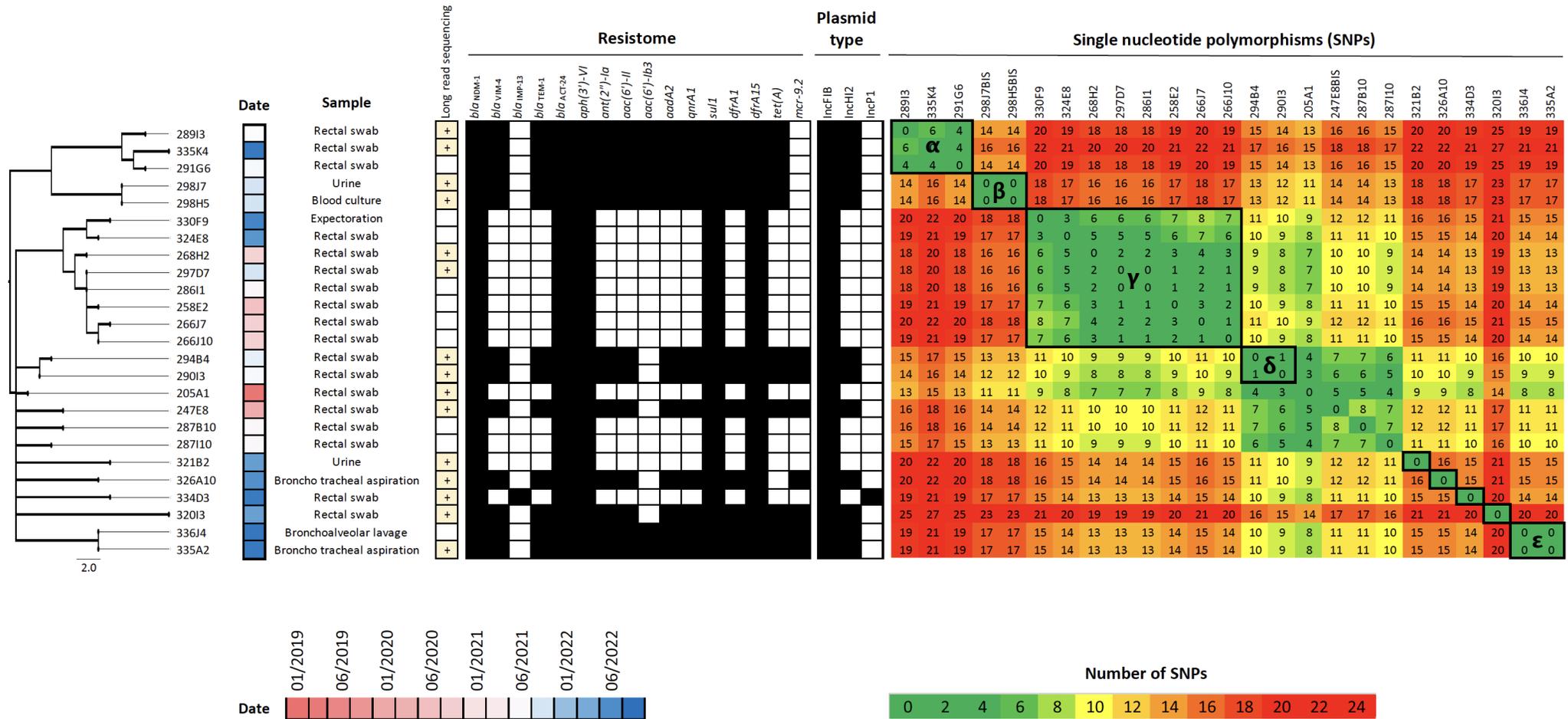
Les 2 isolats de ST873 possèdent 24 SNPs (=mutations) sur l'intégralité de leur génome. Ces 2 souches sont donc proches mais pas tout à fait clonales.

Les autres souches comparées appartiennent à des STs différents et ne sont donc pas clonales.

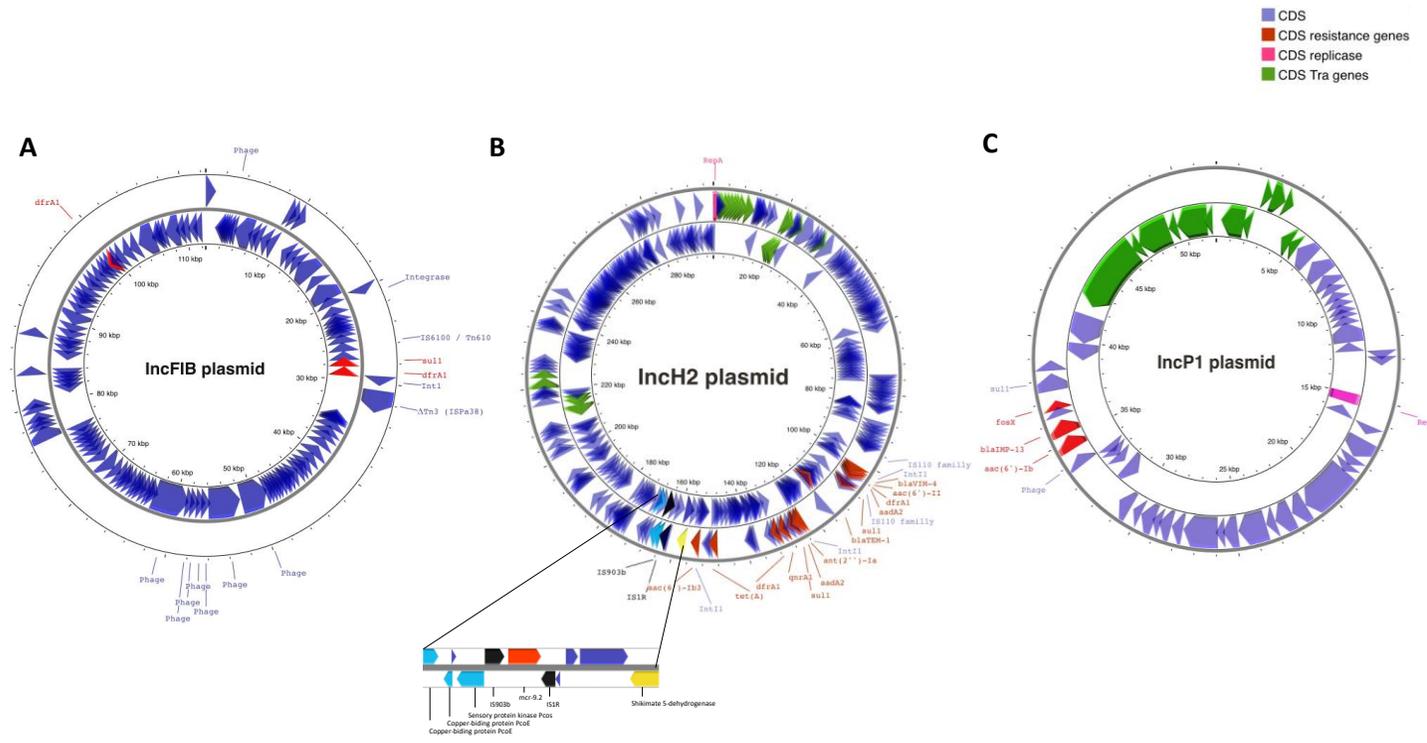
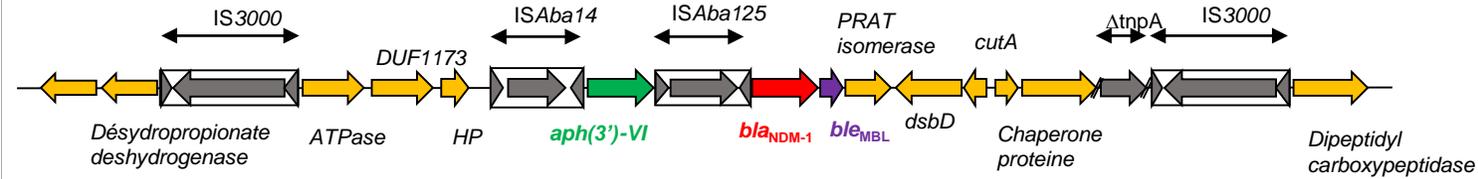
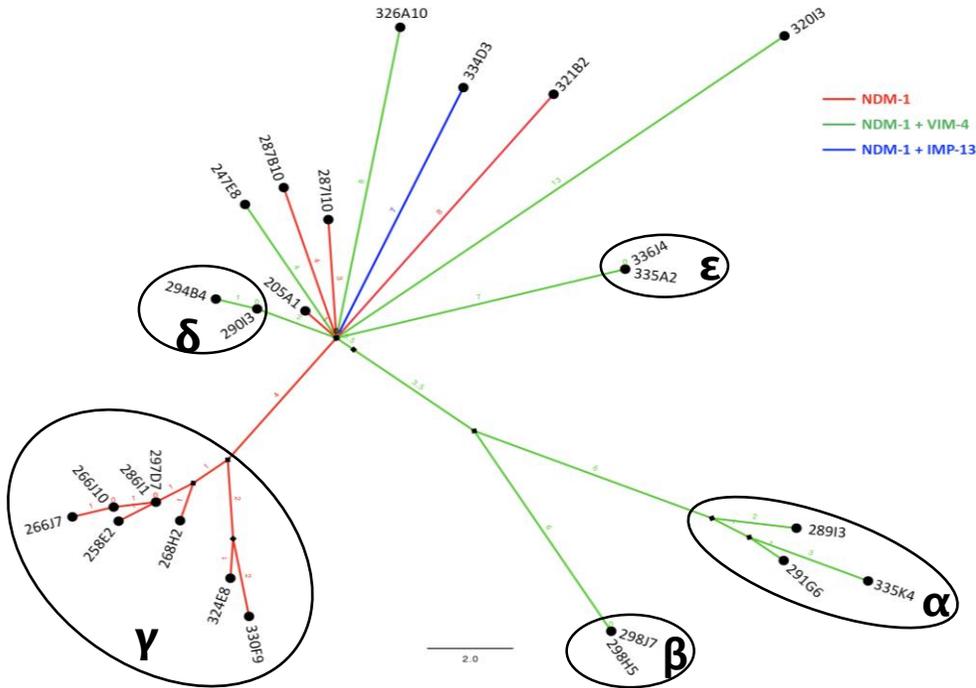
Plasmide IncHI2 endémique Lyonnais particulièrement retrouvé chez Enterobacter cloacae complex



# Exemple d'un résultat de comparaison d'un épidémie mixte souche/plasmides



# Exemple d'un résultat de comparaison d'un épidémie mixte souche/plasmides



# CONCLUSIONS

- ❑ Toutes les souches productrices de carbapénèmase sont séquencées en routine au CNR de la Résistance aux Antibiotiques
- ❑ Le séquençage « short read » est la technologie communément utilisée
- ❑ La comparaison des souches permet de confirmer que 2 souches sont identiques et donc de démontrer une transmission croisée en revanche il est impossible d'exclure une transmission croisée même si 2 souches ne sont pas identiques mais qu'elles produisent la même carbapénèmase (transmission du plasmide, OXA-48 +++)
- ❑ L'enquête autour des cas reste nécessaire (même essentielle) pour compléter les résultats de comparaison des souches