Evaluer le risque d'épidémies nosocomiales par la détection des sous-populations environnementales de *P. aeruginosa*

19ème Colloque sur le Contrôle Epidémiologique des Maladies Infectieuses

CEMI 2014

Fatima Abdouchakour[1], Fabien Aujoulat[1] , Alice Bourdier[1-2], Delphine Grau[1-2], Estelle Jumas-Bilak[1-2]

[1]UMR 5119, Équipe Pathogènes et Environnement, Université Montpellier 1, [2]Hygiène Hospitalière, CHRU de Montpellier

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa est un pathogène opportuniste fréquemment retrouvé dans l'environnement hydrique pouvant constituer un réservoir potentiel dans la transmission. Il est à la 3ème place (8.4%) des agents d'infections associées aux soins (IAS)[1]. Sa structure de population montre une importante diversité génétique[2], suggérant l'existence de sous-populations avec divers comportements infectieux. Certains clones définis par génétique multilocus sont associés à la mucoviscidose[3]. Une relation entre certains clones et les IAS est suggérée. Si ces relations étaient confirmées, l'identification au niveau de l'espèce ne serait pas suffisante pour évaluer le risque infectieux associé à la présence de *P. aeruginosa* dans l'environnement.

MATERIEL ET METHODES

Isolats bactériens

- 400 souches cliniques et environnementales isolées de 2005-2010 en période d'épidémie
- 178 souches de l'environnement hospitalier isolées hors épidémies (2012-2013)

Analyse multilocus des sous-populations : selon Curran et al[4]

Conditions de la PCR ST spécifique multiplex (amplification simultanée des allèles, *ppsA* et *trpE*)

- Milieu réactionnel : 200nM de chaque primer, 200µM de chaque desoxynucleotide triphosphate, 2.5U de Taq polymérase dans son tampon approprié, 50ng d'ADN génomique et 3.5mM de $MgCl_2$.
- 30 cycles : dénaturation 30s à 94° C, hybridation 30s à 68° C, élongation : 30s à 72° C, élongation finale de 10 min à 72° C.

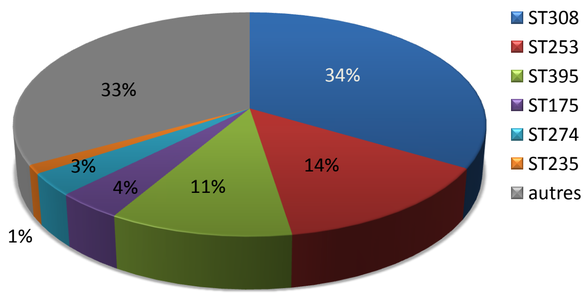
OBJECTIFS

- **Structurer les populations de *P. aeruginosa* vis à vis de leur potentiel épidémique et infectieux.**
- **Faciliter la détection des sous populations de *P. aeruginosa* à risque infectieux particulier.**

⟶ **Mise au point d'une technique rapide de détection.**

RESULTATS

Structure de population de *P. aeruginosa* au CHRU de Montpellier (2005-2010)



400 souches, 58 ST :

- **76% des ST présents dans la base de données Pubmlst**
- **24% des ST non décrits**
- **6 ST majoritaires , 67% des souches :**

ST 308, ST 253, ST 395, ST 175, ST 274, ST 235

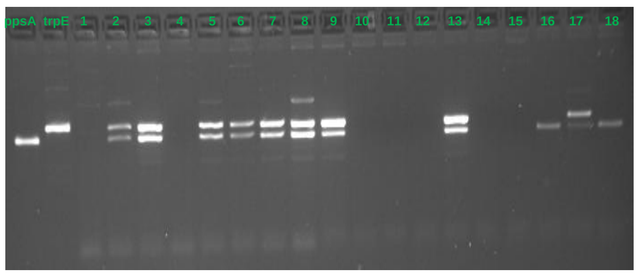
ST : séquence type défini par MLST.

Répartition des ST au CHRU de Montpellier

- **ST 308 : principal ST associé à 5 épidémies survenues entre 2005-2010**
- **ST 253 : non épidémique mais à risque infectieux.**

Le ST 308 et le ST 253 sont fortement implantés dans l'environnement du CHRU de Montpellier

Recherche prospective de clones ST 308 et ST 253 dans l'environnement du CHRU de Montpellier (2012-2013)

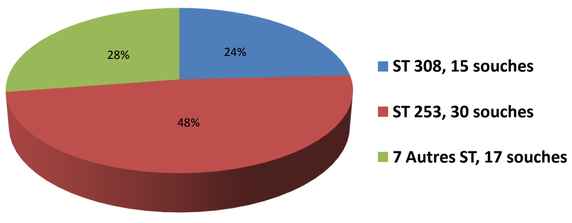


Migration électrophorétique des produits d'amplification après ST spécifique

Etude de 178 souches:

⟶ **62 souches, signal positif**

Confirmation de l'affiliation des souches par approche multilocus



Causes de l'amplification non spécifique de 7 autres ST:

- **Même allèle que ST 308 ou ST 253**
- **Même séquence que le ST 308 ou ST 253, dans la région de fixation de l'amorce**
- **Amplification malgré la présence de mésappariement**

Valeur prédictive positif : 72%

Présence de ST 308 et ST 253: persistance de clones à risque infectieux dans l'environnement hospitalier du CHRU de Montpellier

Mise au point d'une PCR spécifique des clones ST 308 et ST 253

Stratégie/Choix des amorces

- Utilisation de la base de donnée Pubmlst (http://pubmlst.org/paeruginosa)
- Distribution des allèles des ST 308 et ST 253 dans l'espèce de *P. aeruginosa*
- Sélection d'allèles peu représentés en dehors des ST 308 et ST 253
- Alignement des allèles (BioEdit) et recherche de régions spécifiques.

=> Définition d'amorces spécifiques d'allèles :

- ***ppsA*** (phosphoenolpyruvate synthase) : couple 87F/328R (amplicon de 261pb)
- ***trpE*** (anthranilate synthase component I) : 37F/329R (amplicon de 311pb)

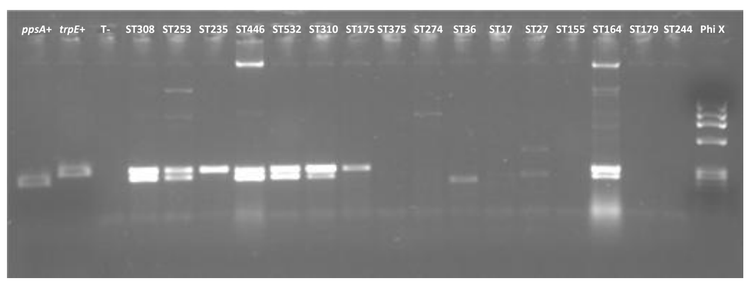
Sensibilité et spécificité de la PCR ST spécifique

Représentants des ST de 2005 à 2010

ST	Nombre de souches	Signal positif
ST 308	5	5
ST 253	5	5
53 autres ST	53	9

Autres ST détectés

ST 446, ST 532, ST 310, ST 164, ST 560, ST 1900 ST 1902, ST 1903 et ST 1906



Migration électrophorétique des produits d'amplification après ST spécifique

Signal positif
2 bandes (261pb et 311pb)

Caractéristiques de la PCR ST spécifique:

- **Sensibilité : 100%**
- **Spécificité : 83%**
- **Valeur prédictive positive : 52%**
- **Valeur prédictive Négative: 100%**

Bon outil de recherche de clones à risque infectieux et épidémiques

Valeur prédictive positive faible: échantillonnage non représentatif

(souches ST 308 et ST 253 < < < Souches d'autres ST)

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

- **L'implication des ST 308 et ST 253 dans des épidémies et des cas de bactériémie a déjà été confirmée dans une grande population de *P. aeruginosa* isolée entre 2005-2010.**
- **La PCR ST spécifique est une technique rapide permettant l'identification de ces sous populations à risques**
- **La détection de ces sous populations à risque infectieux de façon prospective en 2012 et 2013 au CHRU de Montpellier confirme leur persistance dans l'environnement hydrique hospitalier.**
- **Leur détection rapide par PCR ST spécifique permet:**
  - **d'évaluer le risque infectieux pour les patients**
  - **d'instaurer des moyens de prévention adéquats.**

Perspectives:

- **Instaurer une surveillance continue dans l'environnement hospitalier**
- **Tester la détection spécifique au sein des communautés bactériennes**
- **Détecter un répertoire d'allèles d'intérêt correspondant à d'autres sous-populations à risque infectieux par des PCR ST spécifique multiplex**

Références bibliographiques :

1. Enquête Nationale de Prévalence des Infections Nosocomiales en France, **2012**
2. Wiehlmann L et al. **2007**. Microbiology. 104(19): 8101-8106.
3. Van Mansfeld R et al**. 2010**. PLoS ONE 5(10): e13482.
4. Curran et al. **2004**. Journal of Clinical Microbiology. 42 (12): 5644–5649