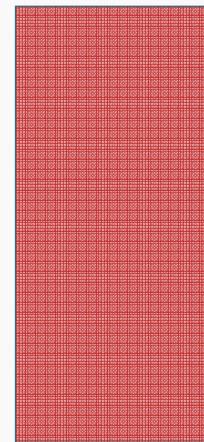




L'ÉTUDE MOLÉCULAIRE PEUT-ELLE PERMETTRE D'ÉLUCIDER DES INFECTIONS À *BACILLUS CEREUS* ?

CATHERINE MULLIÉ-DEMAILLY

PRATICIEN HOSPITALIER ATTACHÉ, LABORATOIRE HYGIÈNE RISQUE BIOLOGIQUE
& ENVIRONNEMENT
PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS, UFR DE PHARMACIE, AGIR EA4294



GENRE *BACILLUS*

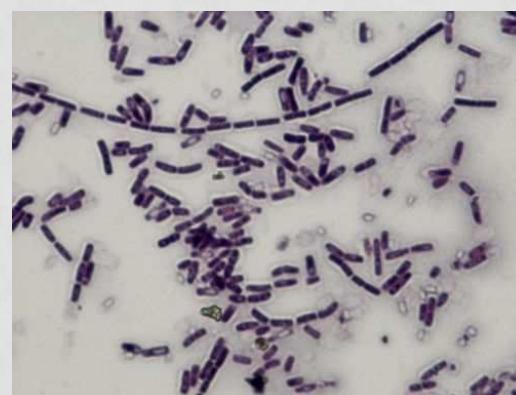
- Bacilles à Gram positif
 - Aéro-anaérobies
 - Sporulés
- => Résistance/survie dans l'environnement
- Habitats naturels
 - Sols/surfaces
 - Aliments
 - Tube digestif
 - > 200 espèces
 - 2 d'intérêt médical



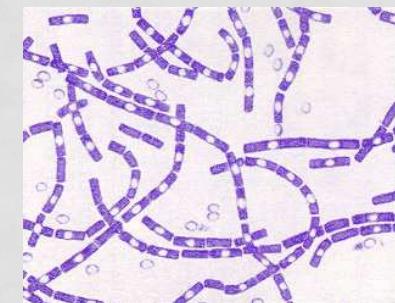
Bacillus megaterium



Bacillus subtilis



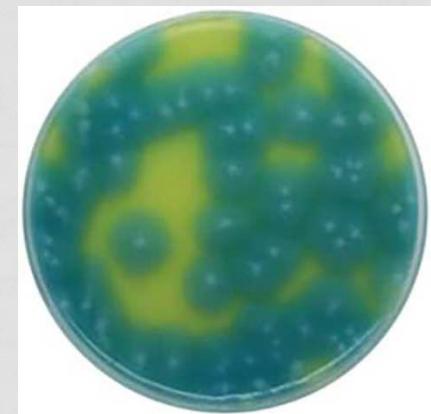
Bacillus cereus



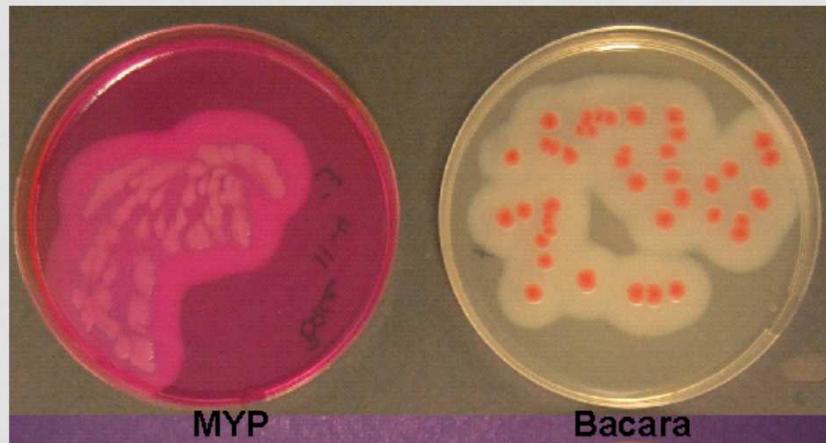
Bacillus anthracis

BACILLUS CEREUS

- Du latin *cereus* = cireux
 - Aspect des colonies sur GS
- Caractères discriminants
 - β -hémolytique
 - Lécithinase +
 - Mannitol –
- Pouvoir pathogène
 - Toxines
 - Toxi-infections alimentaires ++
 - Infections vraies
 - Sujets fragiles
(immunodépression)
 - Nouveau-nés/Prématurés



PEMBA



MYP

Bacara

INFECTIONS A *BACILLUS CEREUS* (1)

- Au CHU Amiens-Picardie (2016-2019)

- 61 patients avec culture + à *B. cereus*
 - Age : 2 jours à 92 ans
 - 32 prélèvements monomicrobiens :
 - 17 hémocultures
 - 3 Biopsies/pièces opératoires, 3 Lentilles ophthalmiques, 3 ORL
 - 2 plaies, 2 LBA/Aspiration-PTP
 - 1 Liquide d'ascite, 1 liquide de conservation de greffon
 - Principaux services concernés
 - Réa adulte ; Urgences
 - Ophtalmo
 - Traumato
 - Réa & soins intensifs pédiatriques, pédiatrie
- 13 dont 5 hémocultures avec cluster à l'été 2017

INFECTIONS A *BACILLUS CEREUS* (2)

- Dans la littérature

- 2005 : Unité de réanimation néonatale au Japon (Shimono et al., 2012)
- 2008-2012 : 39 patients en France sur 9 hôpitaux (Gasset et al., 2018)
 - 17 (5 †) nouveau-nés dont 3/4 de prématurés
 - Circulation des souches par biologie moléculaire
- 2013 : 2 † prématurés à Nice (Lotte et al., 2013)
- 2014 : 23 (3 †) nouveau-nés en Grande-Bretagne (Torjesen, 2014)
- 2014 & 2016 : 2 cas de nouveau-nés contaminés (Lewin et al., 2019)

SOURCES ENVIRONNEMENTALES DE CONTAMINATION ?

- **Surfaces/environnement**

- Ventilation (Turabelidze et al., 2013)
- Importance nettoyage (Shimono et al., 2012)

- **Matériel**

- Draps/linge (Hosein et al., 2013)

- **Personnel**

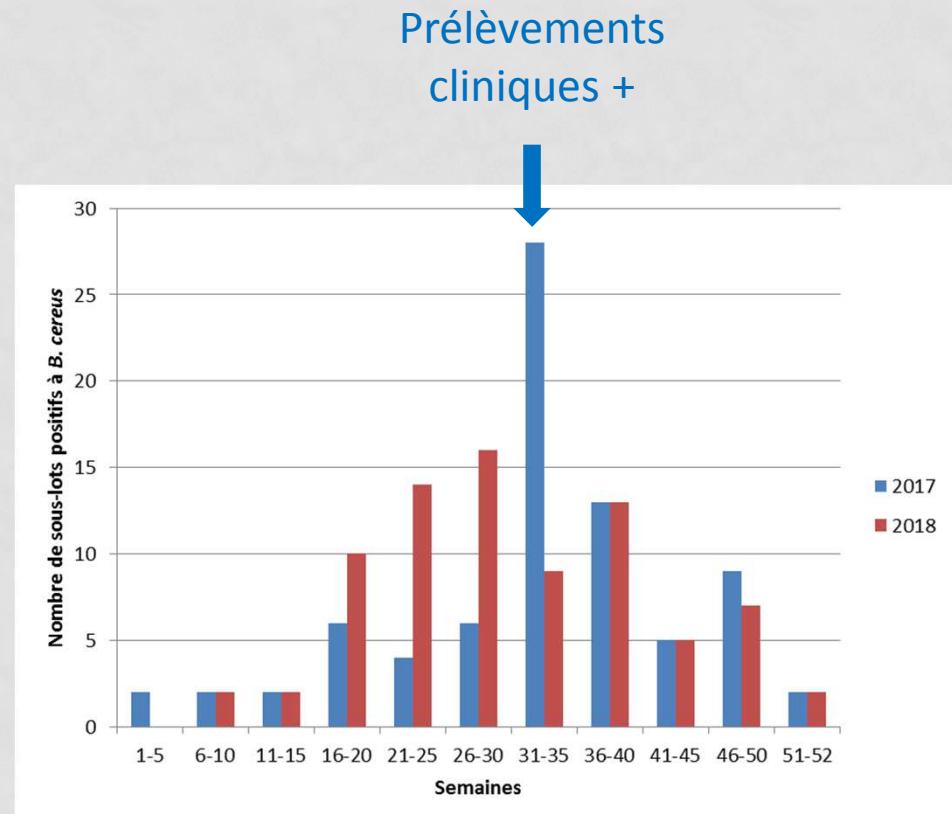
- Manuportage + résistance aux SHA

- **Alimentation**

- Nutrition parentérale (Torjesen, 2014)
- Formules infantiles (tests à la recherche de *B. cereus*)
- Lait maternel provenant des lactariums (contrôles bactériologiques en amont et aval de la pasteurisation) (Decousser et al., 2013; Lewin et al., 2019)

BACILLUS CEREUS AU LACTARIUM DU CHU AMIENS-PICARDIE

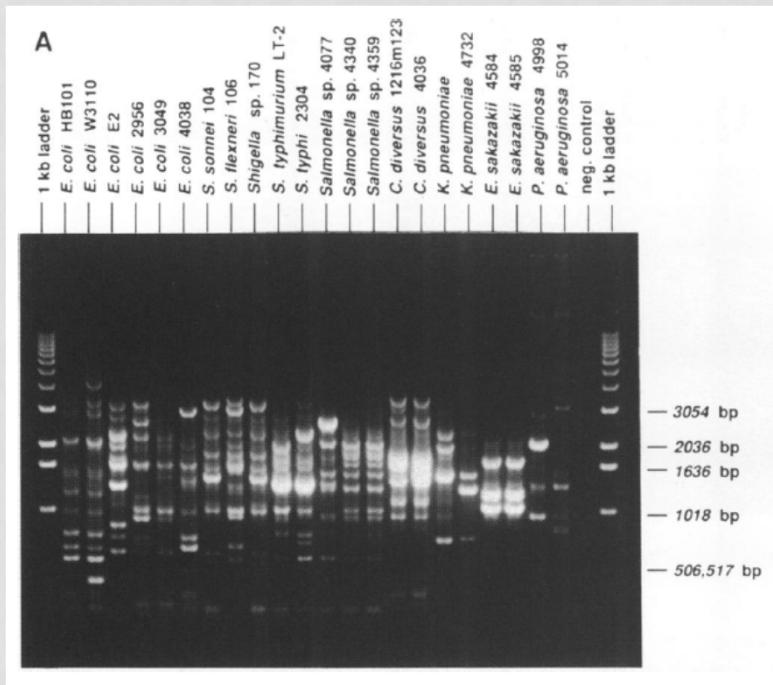
- 2017
 - 1797 sous-lots testés
 - 79 non conformités/dons laits maternels à *Bacillus cereus* (4,4%)
- 2018
 - 1585 sous-lots testés
 - 81 non conformités à *Bacillus cereus* (5,1%)
- Pic estival
- Source environnementale ou donneuses ?



TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE POUR LE TYPAGE DES SOUCHES (1)

• Fingerprinting

- ERIC-PCR (Versalovic et al., 1991)



- Rep-PCR (Reyes-Ramirez & Ibarra, 2005)

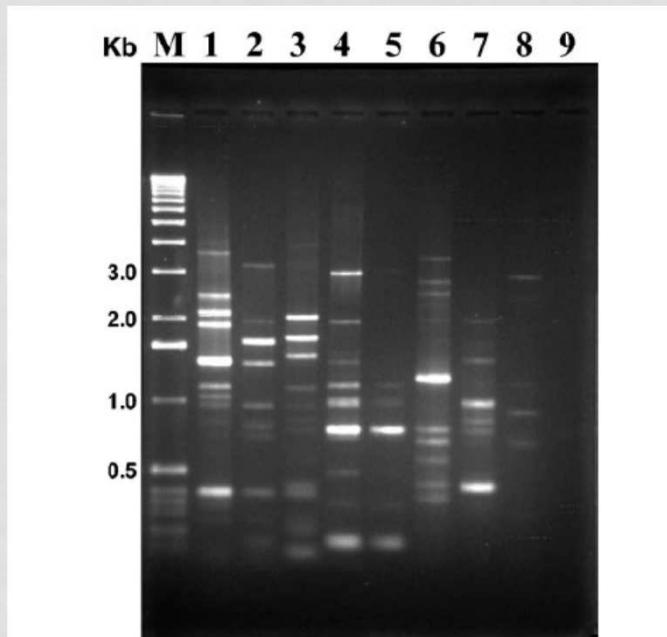


FIG. 1. Bc-Rep-PCR fingerprint patterns of the *B. cereus* group strains. Lane 1, *B. thuringiensis* serovar *israelensis*; lane 2, *B. thuringiensis* LBIT-13; lane 3, *B. cereus* DSM31; lane 4, *B. cereus* CER81; lane 5, *B. cereus* CER 183; lane 6, *B. mycoides* IP-M 001; lane 7, *B. anthracis* 7702; lane 8, *B. subtilis* IP-S 001; lane 9, negative control; lane M, molecular weight marker (1-kb DNA ladder; Invitrogen).

TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE POUR LE TYPAGE DES SOUCHES (2)

- **Restriction Fragment Length Polymorphism/Pulse Field Gel Electrophoresis** (Lewin et al., Infect Control Hosp Epidemiol 2019)

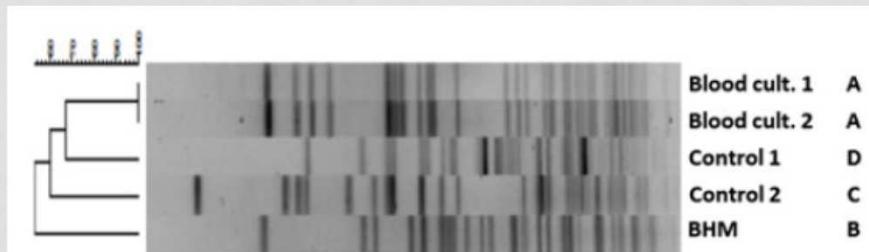
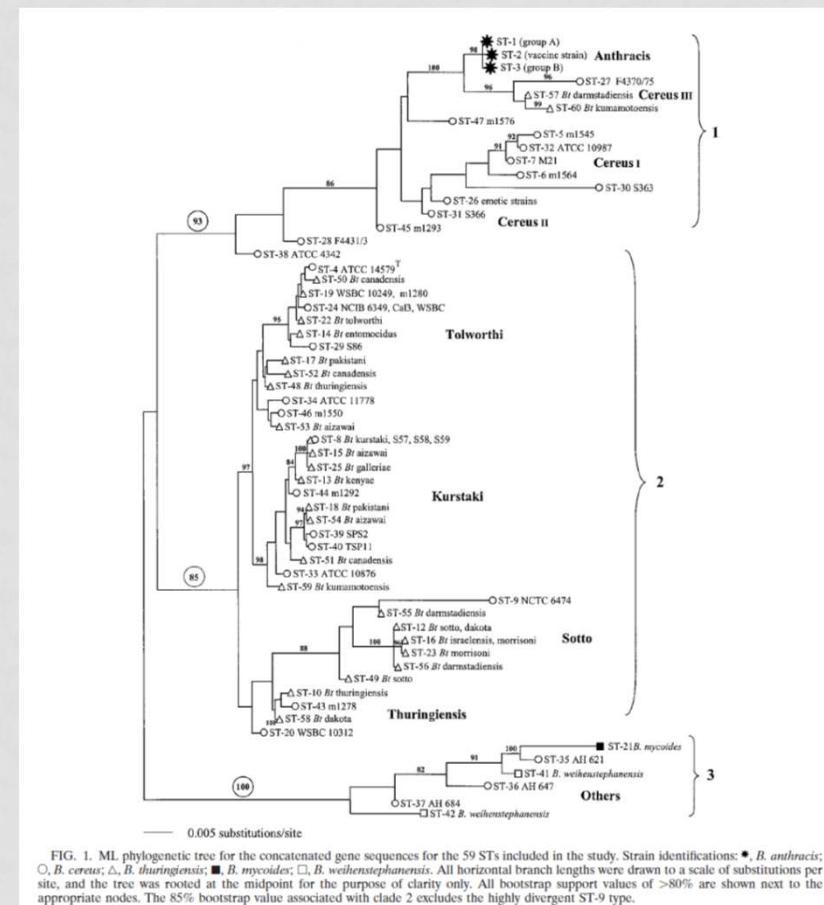


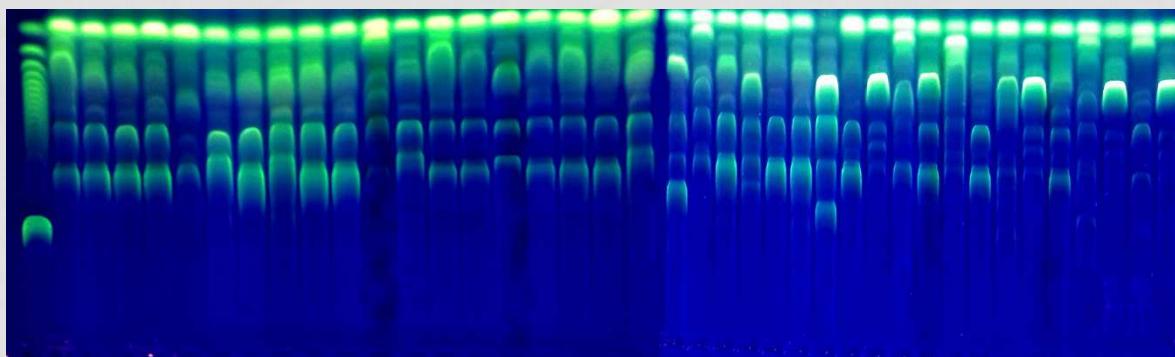
Fig. 1. Dendogram resulting from cluster analysis of PFGE fingerprints from *Sma*I digestion including blood cultures ($n = 2$) from case 1 and BHM *Bacillus cereus* isolates. Profile A:: clinical *B. cereus* involved in the sepsis (based on 2 blood cultures); profile B: *B. cereus* isolated from the BHM; profiles C and D:: *B. cereus* used as controls of the protocol.

- **MultiLocus Sequence Typing = MLST** (Barker et al., 2005)



RÉSULTATS OBTENUS (1)

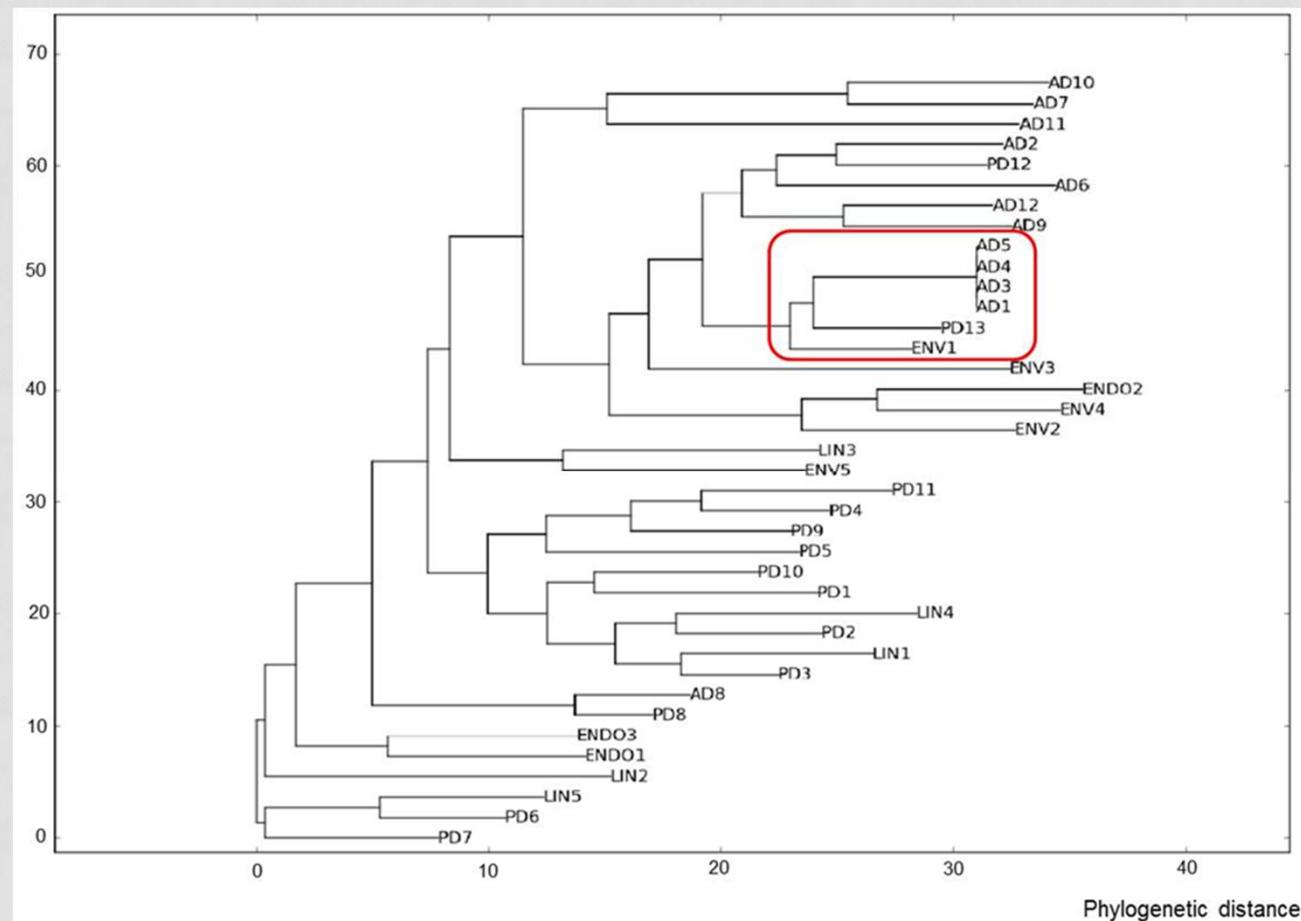
- 37 souches testées par ERIC-PCR
 - 25 souches issues de dons (13 personnalisés et 12 anonymes)
 - 4 souches issues de prélèvements environnementaux du lactarium
 - 5 souches issues de prélèvements de linge
 - 3 souches issues de prélèvements d'endoscopes
- Tests Rep-PCR non concluants
- Tests ERIC-PCR validés



RÉSULTATS OBTENUS (2)

Dendrogramme construit à partir des profils électrophoretiques (neighbour-joining method, PyElph 1.4)

- AD = Don anonyme
- PD = Don personnalisé
- ENV = Environnement lactarium/biberonnerie
 - ENV 5 = Pasteurisateur
- LIN = Linge
- LIN1 = Chariot réanimation pédiatrique
- ENDO = Endoscopes

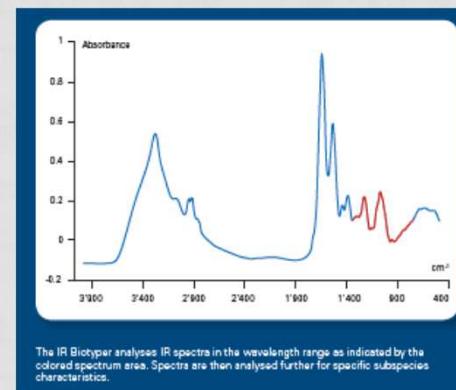


CONCLUSION/PERSPECTIVES

- **Conclusions**

- Méthode fonctionnelle mais chronophage
- Pas une unique souche de *B. cereus* en circulation
- Cluster dans anonymes lait maternel/souche environnementale avril 2018
 - Audit des pratiques et adaptations
 - Changement de pasteurisateur ?

- **Perspectives = FT-IR : IR Biotype (Brucker)**



- **Rapidité réponse**

- Culture/nuit + 3h
- Matrices de distance et dendrogrammes construits directement

Remerciements

Toute l'équipe du Laboratoire d'hygiène, risque microbiologique et environnement
Delphine DAVERSIN, Odile OBIN, Gaëtan OUTURQUIN, Anaïs PETIT, Roxane WEISS &
Crespin ADJIDÉ

Toute l'équipe du Lactarium d'Amiens
Delphine GHYSELEN, Séverine GROGNET, Christel CHAZAL & André LÉKÉ

Merci de votre attention



BIBLIOGRAPHIE

- Barker M, Thakker B, Priest FG. Multilocus sequence typing reveals that *Bacillus cereus* strains isolated from clinical infections have distinct phylogenetic origins. *FEMS Microbiol Lett.* 2005 Apr 1;245(1):179-84.
- Decousser JW, Ramarao N, Duport C, Dorval M, Bourgeois-Nicolaos N, Guinebretière MH, Razafimahefa H, Doucet-Populaire F. *Bacillus cereus* and severe intestinal infections in preterm neonates: Putative role of pooled breast milk. *Am J Infect Control.* 2013;41(10):918-21
- Glasset B, Herbin S, Granier SA, Cavalié L, Lafeuille E, Guérin C, Ruimy R, Casagrande-Magne F, Levast M, Chautemps N, Decousser JW, Belotti L, Pelloux I, Robert J, Brisabois A, Ramarao N. *Bacillus cereus*, a serious cause of nosocomial infections: Epidemiologic and genetic survey. *PLoS One.* 2018 May 23;13(5):e0194346.
- Hosein IK, Hoffman PN, Ellam S, Asseez TM, Fakokunde A, Silles J, Devereux E, Kaur D, Bosanquet J. Summertime *Bacillus cereus* colonization of hospital newborns traced to contaminated, laundered linen. *J Hosp Infect.* 2013 Oct;85(2):149-54.
- Lewin A, Quach C, Rigourd V, Picaud JC, Perreault T, Frange P, Domingo MC, Lalancette C, Delage G, Germain M. *Bacillus cereus* infection in neonates and the absence of evidence for the role of banked human milk: Case reports and literature review. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2019;40(7):787-793.
- Lotte R, Hérissé AL, Berrouane Y, Lotte L, Casagrande F, Landraud L, Herbin S, Ramarao N, Boyer L, Ruimy R. Virulence Analysis of *Bacillus cereus* Isolated after Death of Preterm Neonates, Nice, France, 2013. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(5):845-848.
- Ramarao N, Belotti L, Deboscker S, Ennahar-Vuillemin M, de Launay J, Lavigne T, Koebel C, Escande B, Guinebretière MH. Two unrelated episodes of *Bacillus cereus* bacteraemia in a neonatal intensive care unit. *Am J Infect Control.* 2014;42(6):694-5.
- Reyes-Ramirez A, Ibarra JE. Fingerprinting of *Bacillus thuringiensis* type strains and isolates by using *Bacillus cereus* group-specific repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR analysis. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(3):1346-55.
- Shimono N, Hayashi J, Matsumoto H, Miyake N, Uchida Y, Shimoda S, Furusyo N, Akashi K. Vigorous cleaning and adequate ventilation are necessary to control an outbreak in a neonatal intensive care unit. *J Infect Chemother.* 2012;18(3):303-7.
- Torjesen I. Parenteral nutrition product is suspected as cause of 18 cases of septicaemia in neonates. *BMJ.* 2014;348:g3763
- Turabelidze G, Gee JE, Hoffmaster AR, Manian F, Butler C, Byrd D, Schildknecht S, Hauser LC, Duncan M, Ferrett R, Evans D, Talley C. Contaminated ventilator air flow sensor linked to *Bacillus cereus* colonization of newborns. *Emerg Infect Dis.* 2013 May;19(5):781-3.
- Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(24):6823-31.