

P-038

Résistance aux biocides des souches *Pseudomonas* productrices de carbapénèmes de type VIM-2 : impact sur les détergents-désinfectants usuels

A. Géry¹, A. Mouet¹, A. Lemarié¹, C. Bazin¹, A. Bidon¹, F. Gravey^{1,2,3}, F. Guérin^{2,3}, M. Auzou², M. Fines-Guyon², F. Ethuin⁴, M. Pottier^{1,5}, A. Leon-Seck⁵, P. Plésiat⁶, S. Le Hello^{1,3}

¹ CHU de Caen, Service d'hygiène, Caen, France
² CHU de Caen, Service de Microbiologie, Caen, France
³ Groupe de Recherche sur l'Adaptation Microbienne GRAM 2.0 ; EA2656 UFR santé, Université de Caen Normandie, France
⁴ CHU de Caen, Service de réanimation chirurgicale, Caen, France
⁵ LABEO, Pôle d'analyse et de recherche, Saint Contest, France
⁶ CNR résistance aux antibiotiques, CHU Besançon, France

@ : lehello-s@chu-caen.fr

Introduction

Un nombre de 67 cas cliniques à *Pseudomonas aeruginosa* producteurs de carbapénèmes de type VIM-2 (pyoVIM-2) ont été notifiés dans notre établissement entre 2011 et 2018, et ce, malgré les précautions prises (dépistage des patients, isolement contact et procédure spécifique d'entretien des locaux, cf P-072). Cela nous a amené à évaluer l'activité bactéricide des détergents-désinfectants (DD) utilisés dans notre établissement sur des souches cliniques et environnementales *Pseudomonas* représentatives de notre écologie hospitalière et de comprendre leur mécanisme de résistance.

Méthode

L'activité bactéricide *in vitro* des sept détergents-désinfectants de surfaces utilisés au CHU de Caen (Aniosurf ND Premium®, Surfanios Premium®, Anios Oxy Floor®, Anioxy Spray WS®, Surfa Safe Premium®, Hyginet® et eau de javel) a été évaluée selon le protocole de filtration sur membrane en conditions de propreté (NF EN 13727 + A2). Cette détermination a été effectuée sur un panel de trois souches de *Pseudomonas aeruginosa* : une souche de référence (PAO1) et deux souches de pyoVIM-2 (clinique et environnementale) et six souches de *Pseudomonas* autres que *aeruginosa* et productrices de VIM-2 (*putida*, *oleovorans*, *nitroreducens*, *monteilli*, *plecoglossicida*) isolées en 2018 au CHU de Caen. Les concentrations minimales inhibitrices au chlorure de didécylméthylammonium (CDMA) ont été obtenues par méthode de micro-dilution sur plaque sur la PAO1 et quelques souches de *Pseudomonas* VIM-2. Le CDMA a été utilisé après une dilution sériée de raison 1/2, d'une concentration allant de 512 mg/L à 0,5 mg/L, sur microplaque où les souches bactériennes sont ensuite inoculées à partir d'une suspension à 0,5 Mcf et diluée au dixième. Les cinétiques de mortalité (Time-Kill curves) en conditions d'utilisation du Surfanios (ANIOS®) : Des suspensions bactériennes normalisées à 0,5 Mcf sont réalisées dans de l'eau physiologique stérile. Elles sont ensuite diluées au 1/20^e dans du bouillon TS (Biorad®) contenant 62,5 mg/L de CDMA, puis placés sous agitation à 37 °C. A T₀, T_{5min}, T_{15min}, T_{30min}, T_{1h}, T_{2h}, T_{4h}, T_{6h} et T_{24h}, 1 mL de solution a été prélevé et ajouté à 9 mL de neutralisant (neutralisant pour ammoniums quaternaires de la Norme NF EN 13727+A2) afin de stopper l'effet bactéricide du CDMA. Après 10 minutes de contact à température ambiante, le nombre de bactéries cultivables a ensuite été obtenu par dilution de l'échantillon neutralisé dans de l'eau physiologique stérile et dénombrement sur gélose TS.

Résultats

Étape 1

Objectif : Tester la sensibilité de souches des espèce de *Pseudomonas* environnementales et cliniques VIM-2 aux détergents-désinfectants utilisés dans l'établissement.

Souches testées :

- PAO1 (souche de référence)
- *Pseudomonas aeruginosa* VIM-2 environnemental
- *Pseudomonas aeruginosa* VIM-2 clinique
- *Pseudomonas* VIM-2 : *Pseudomonas plecoglossicida*, *monteilli*, *nitroreducens*, *oleovorans*

Résultat : Tous les détergents-désinfectants présentent une activité bactéricide sur le *Pseudomonas aeruginosa* VIM-2 hormis le Surfanios ND Premium. Le Surfanios ND Premium® conserve son activité bactéricide sur toutes les autres espèces environnementales VIM-2.

Tableau 1. Évaluation de l'activité bactéricide du Surfanios ND Premium® sur les différentes espèces de *Pseudomonas* VIM-2 environnementales et sur une souche de pyo VIM-2 clinique.

Solution d'essai	Souche	Dilution	Bactéries	Réduction logarithmique	Effet bactéricide
Surfanios ND Premium®	PAO1	0,25% (dilution d'usage recommandée)	1,40E+02	6,51	OUI
		0,5%	1,40E+02	6,51	OUI
	<i>Pseudomonas oleovorans</i> VIM-2	0,25% (dilution d'usage recommandée)	1,40E+02	6,15	OUI
		0,5%	1,40E+02	6,15	OUI
	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> VIM-2	0,25% (dilution d'usage recommandée)	1,40E+02	6,24	OUI
		0,5%	1,40E+02	6,24	OUI
	<i>Pseudomonas monteilli</i> VIM-2	0,25% (dilution d'usage recommandée)	6,60E+02	5,85	OUI
		0,5%	1,40E+02	6,53	OUI
	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> VIM-2	0,25% (dilution d'usage recommandée)	1,40E+02	6,53	OUI
		0,5%	1,40E+02	6,53	OUI
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> VIM-2 clinique	0,25% (dilution d'usage recommandée)	2,74E+05	2,95	NON
		0,5%	1,40E+02	6,24	OUI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> VIM-2 environnement	0,25% (dilution d'usage recommandée)	1,36E+05	3,24	NON	
	0,5%	1,40E+02	6,22	OUI	
Témoins	PAO1			4,55E+08	
	<i>Pseudomonas oleovorans</i> VIM-2			1,98E+08	
	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> VIM-2			2,45E+08	
	<i>Pseudomonas monteilli</i> VIM-2			4,72E+08	
	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> VIM-2			4,72E+08	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> VIM-2 clinique			2,45E+08	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> VIM-2 environnement			2,35E+08		

Étape 2

Objectif : Tester la sensibilité de souches résistantes au Surfanios ND Premium à un de ses composés ammonium quaternaire, le Chlorure de DidécylméthylAmmonium (CDMA) via la détermination de la concentration minimale inhibitrice en milieu liquide et les cinétiques de mortalité (Time-Kill curves) en conditions d'utilisation de ce composé dans le Surfanios

Souches testées :

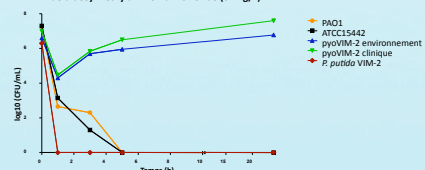
- PAO1 (souche de référence)
- *Pseudomonas aeruginosa* VIM-2 clinique
- *Pseudomonas putida* VIM-2

Résultat : Les souches pyoVIM-2 sont résistantes aux ammoniums quaternaires et survivent plus longtemps que les autres souches aux concentrations d'usage

Tableau 2. Concentrations minimales inhibitrices au CDMA obtenues par méthode de micro-dilution sur plaque

Souche	Concentration minimale inhibitrice du CDMA (mg/L)	Statut (Seuil de sensibilité = 62,5 mg/L)
PAO1	32	Sensible
pyoVIM-2 environnement	128	Résistante
pyoVIM-2 clinique ⁸	128	Résistante
<i>Pseudomonas putida</i> VIM-2	32	Sensible

Figure. Time kill curves de *Pseudomonas* sp. en présence de didécylmethylammonium chloride (62mg/L)



Conclusion

L'utilisation de ce protocole a permis de révéler une sensibilité diminuée au Surfanios ND Premium® à la concentration recommandée par le fabricant pour certaines souches de *Pseudomonas aeruginosa* productrices de carbapénème VIM-2. Ce constat nous a fait préconiser l'utilisation de ce détergent-désinfectant à double dose pour l'entretien des surfaces de l'environnement proche des patients colonisés et le traitement des points d'eau à l'eau de javel. Il s'agit d'une résistance aux composés ammoniums quaternaires. Un séquençage des souches est en cours afin de déterminer le support génétique de cette résistance.