

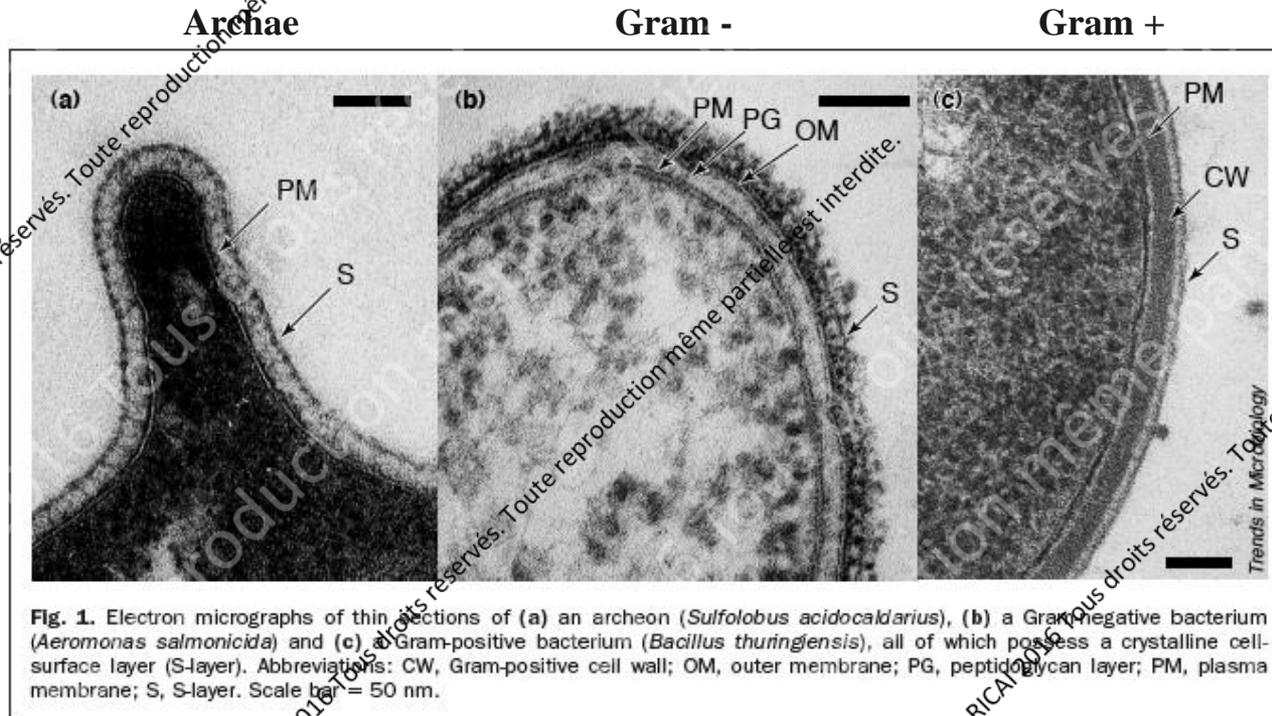
BMR-BHRe : ne pas les rater
**Bacilles à Gram négatif et résistance
à la colistine**

Patrick Plésiat, Katy Jeannot

CHRU de Besançon

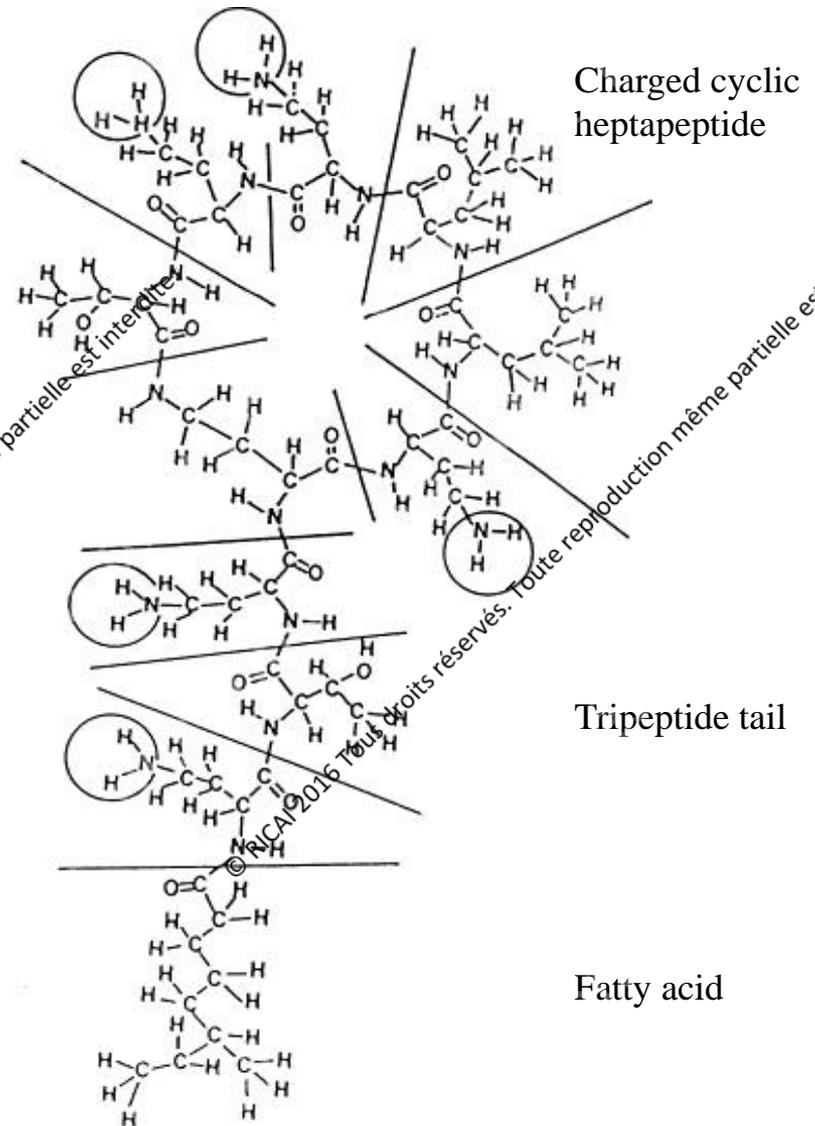
Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques

Paroi des Gram+ et des Gram-

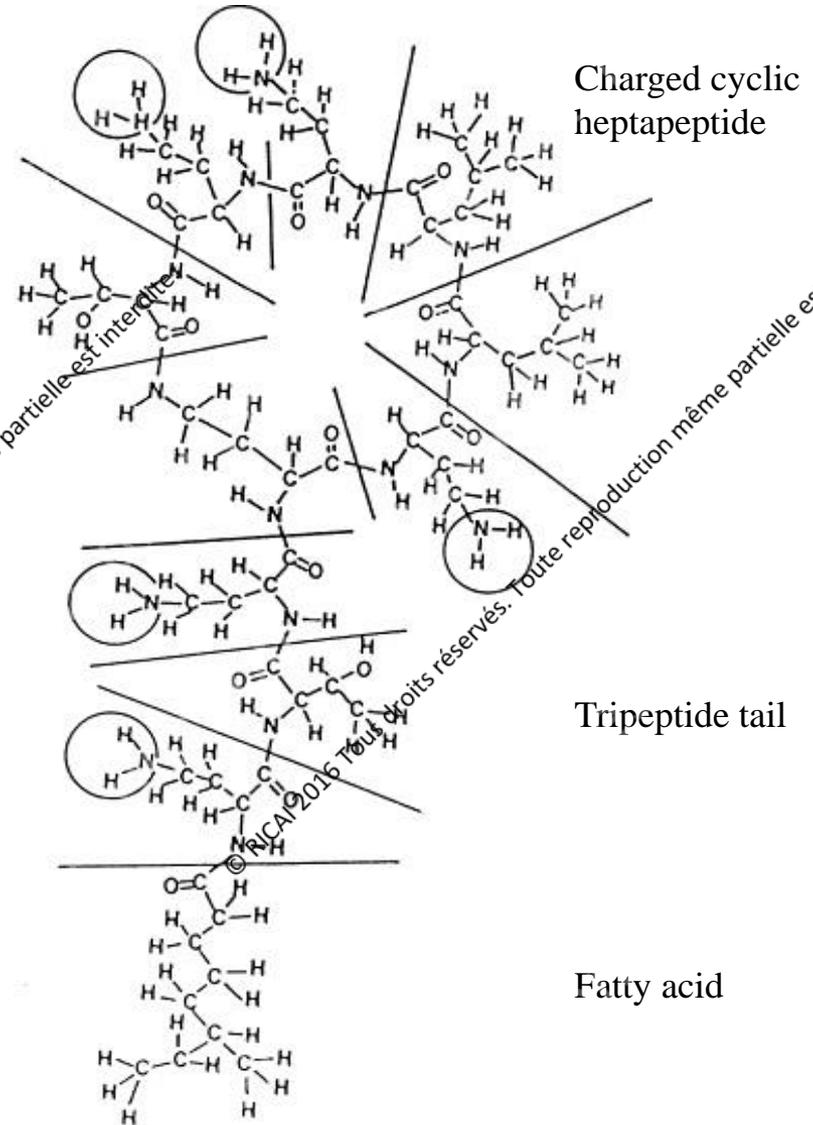
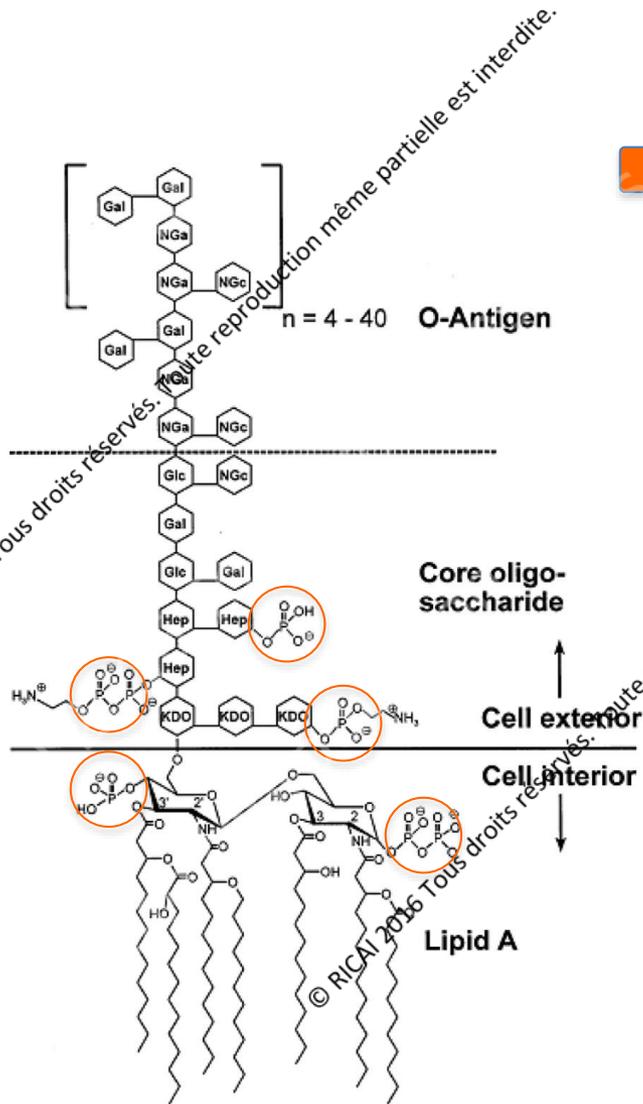


Polymyxines

- ★ Polymyxine B et polymyxine E (colistine) utilisées chez l'Homme et l'animal
- ★ Peptides antimicrobiens polycationiques
- ★ Amphipathiques
- ★ **Forte affinité pour le LPS**
- ★ Interaction électrostatique avec les **groupements phosphate** du core et du lipide A, et interactions hydrophobes avec les chaînes acyles du lipide A

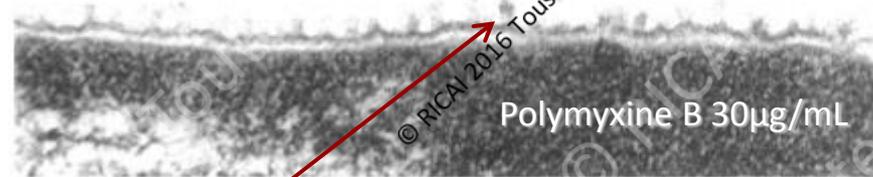
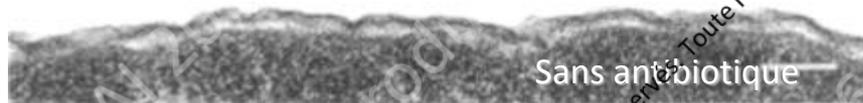


Polymyxines

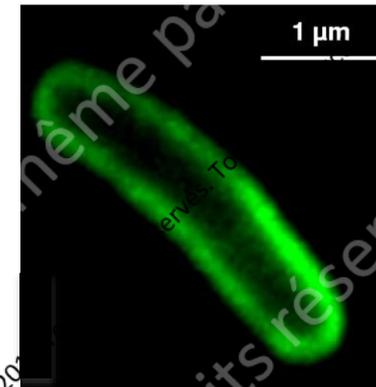


Mode d'action des polymyxines

- ★ **Action bactéricide** rapide *in vitro* sur les espèces à Gram-négatif sensibles
- ★ Rupture des ponts LPS-PO₄-Mg-PO₄-LPS
- ★ Désorganisation de la membrane externe avec formation de brèches et libération de micro-vésicules membranaires : **rupture de la barrière de perméabilité** (potentialisation des antibiotiques hydrophobes)
- ★ Action létale mal comprise
- ★ Cible ultime : membrane cytoplasmique ?



bleb



Benincasa et al. AAC 2009, 53

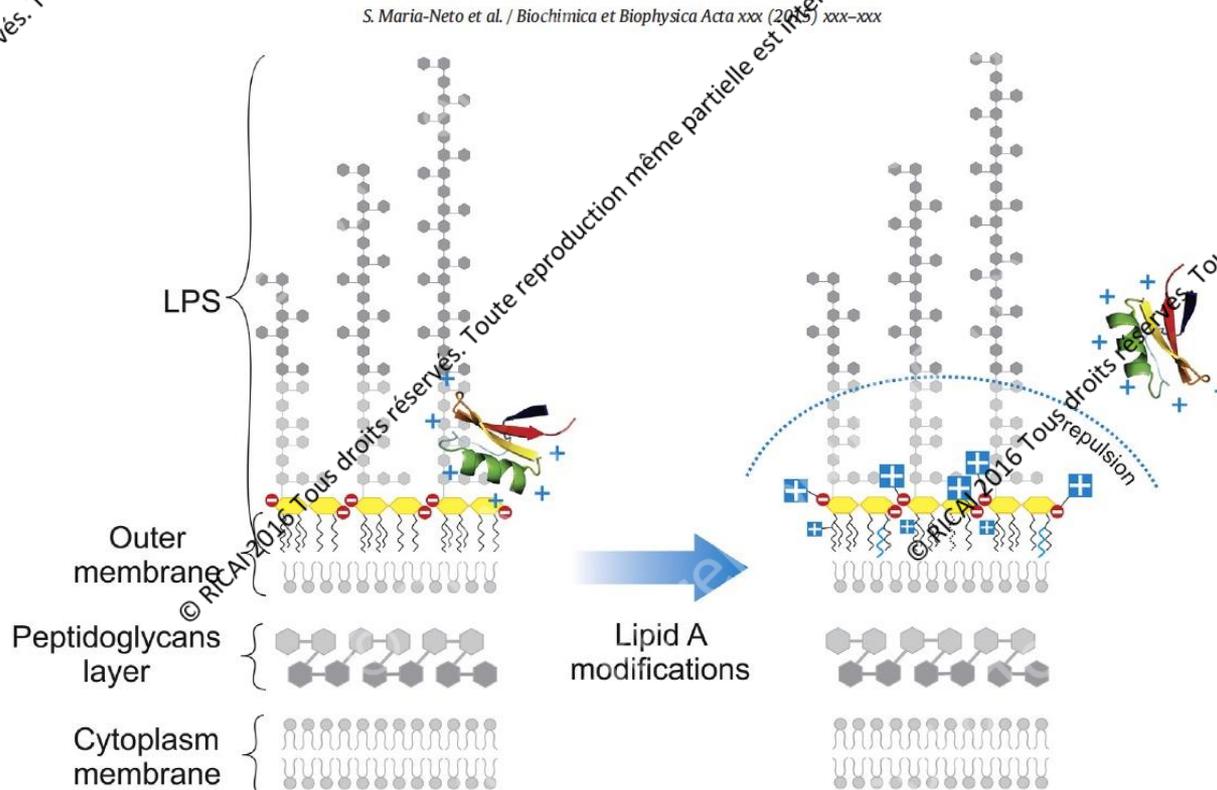
Mécanismes de résistance

★ Spécifiques

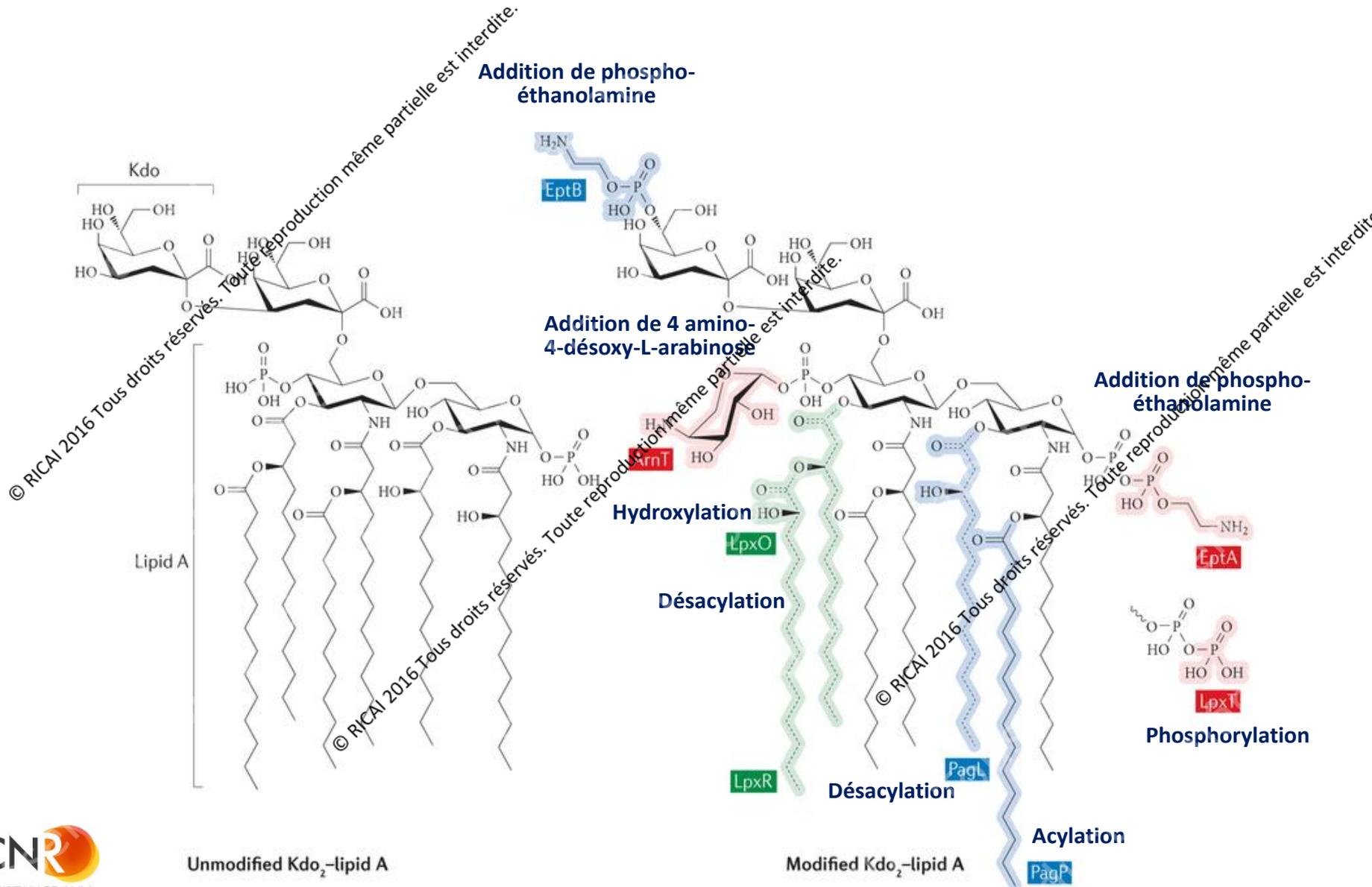
★ Résistance par **impermeabilité membranaire**

★ Diminution des charges électro-négatives du LPS et de la fluidité membranaire :

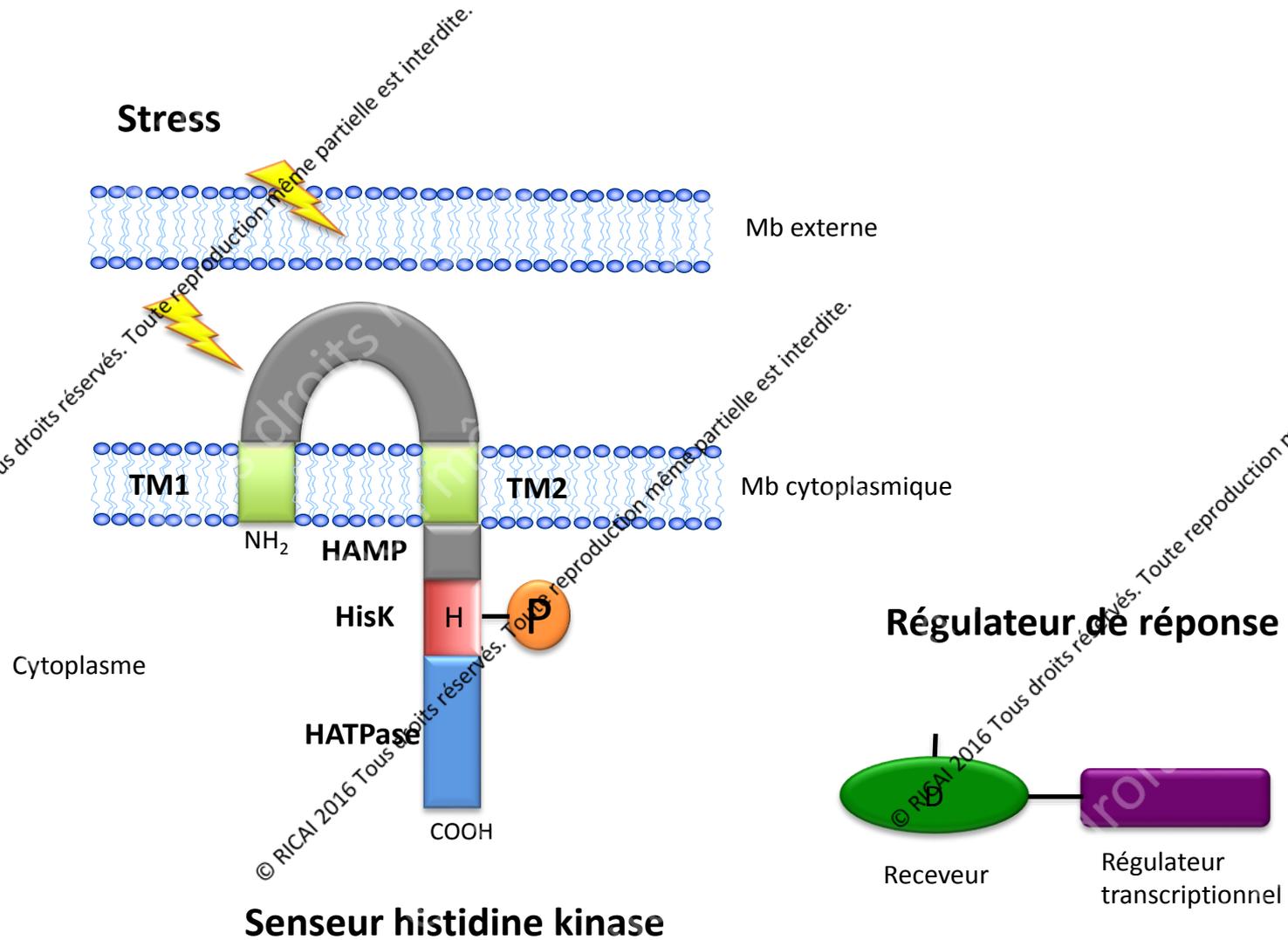
- Modifications enzymatiques du lipide A ou du core du LPS
- Perte partielle ou totale des molécules de LPS



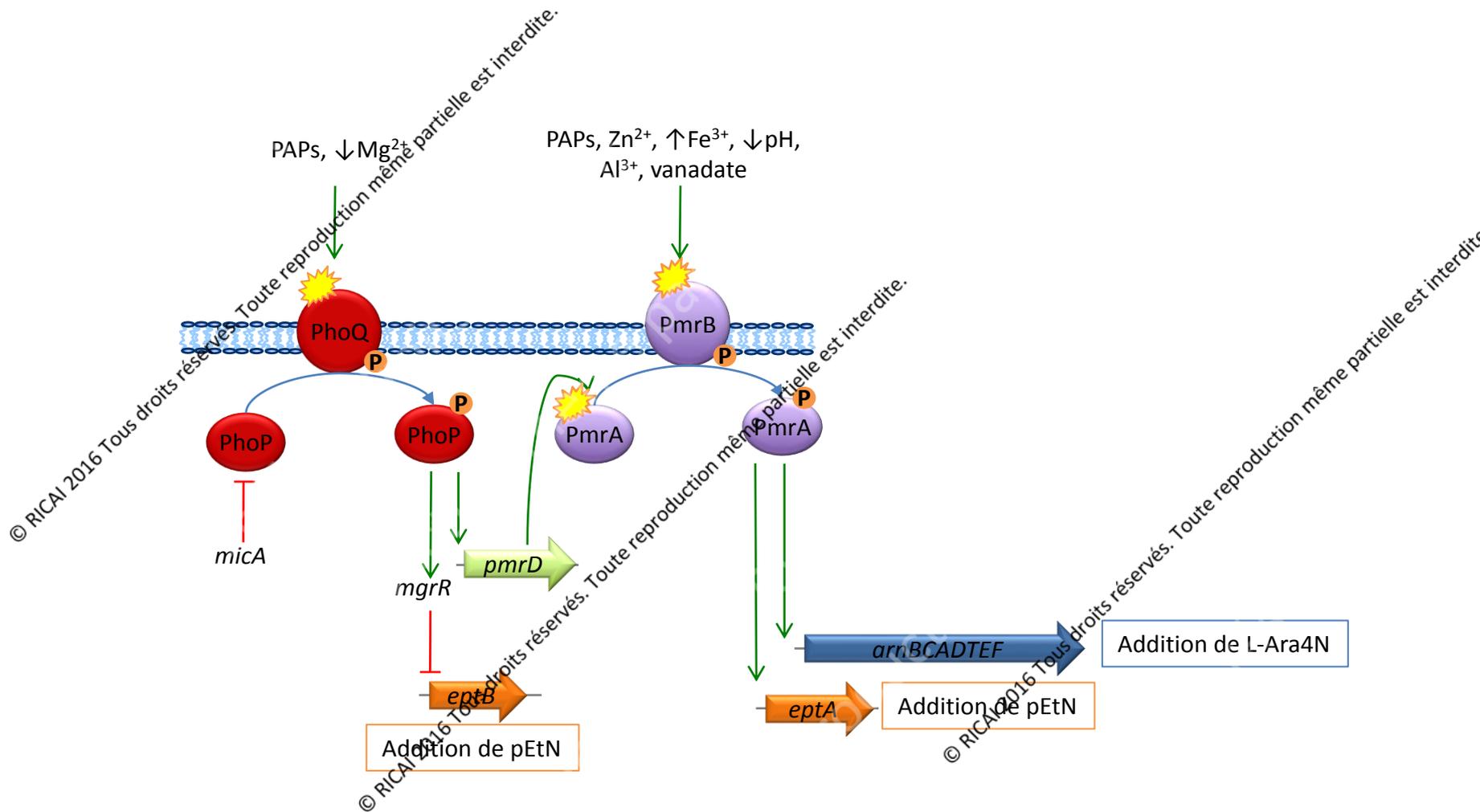
Modifications enzymatiques du LPS



Mécanismes intrinsèques d'adaptation du LPS

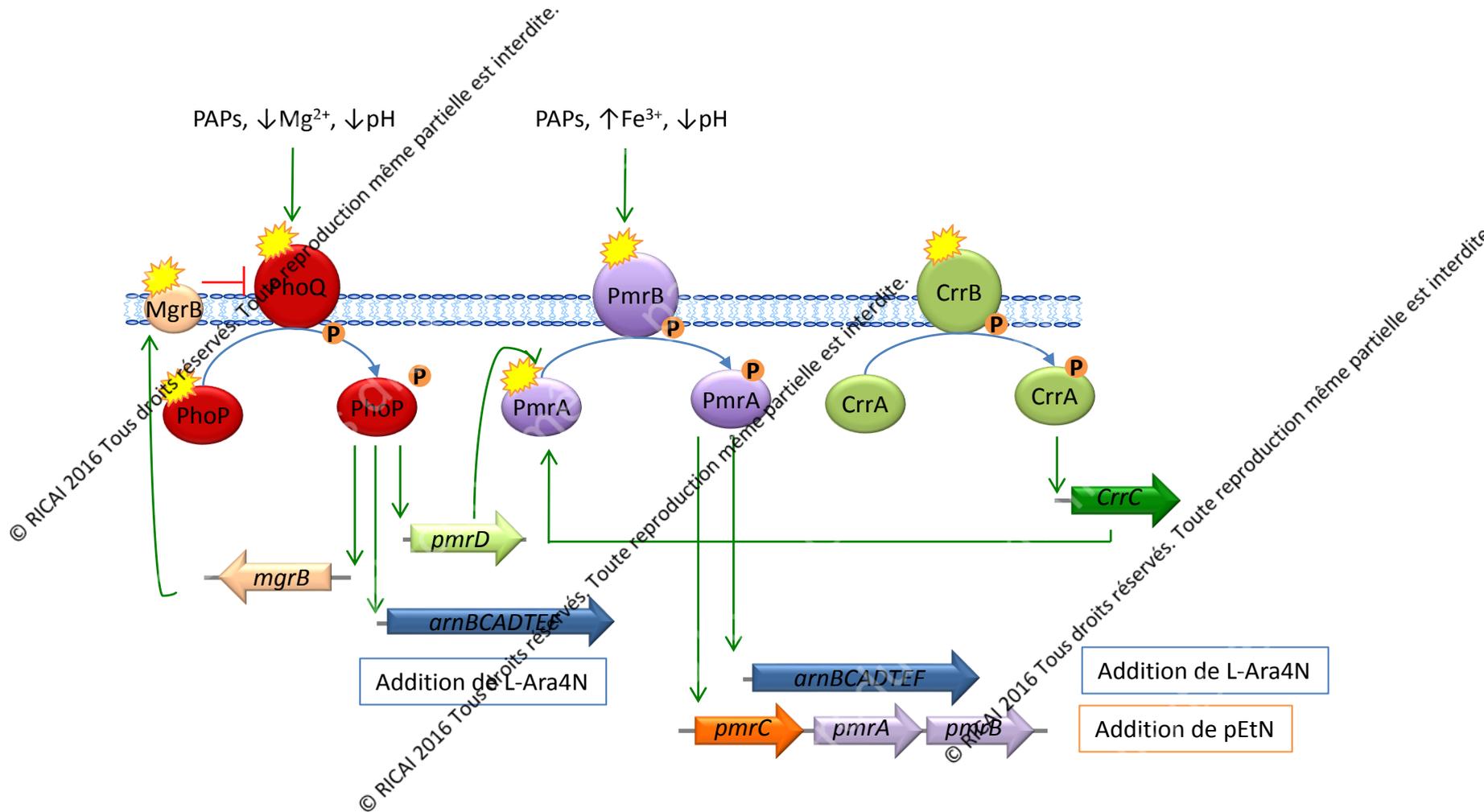


Résistance par mutations chez *E. coli*



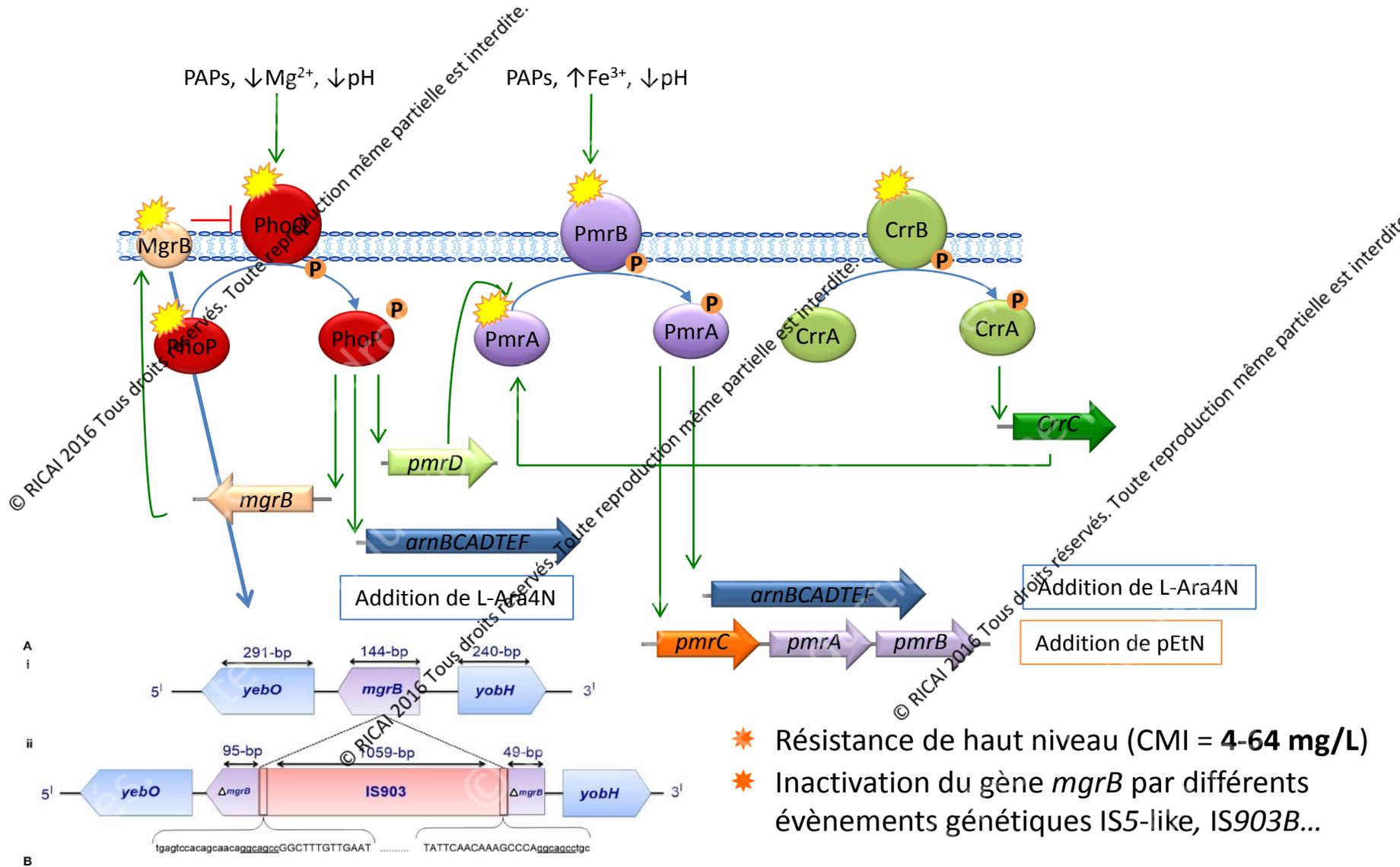
Concentrations critiques de la colistine ≤ 2 ; > 2 mg/L (CASFM/EUCAST 2016)

Résistance par mutations chez *K. pneumoniae*

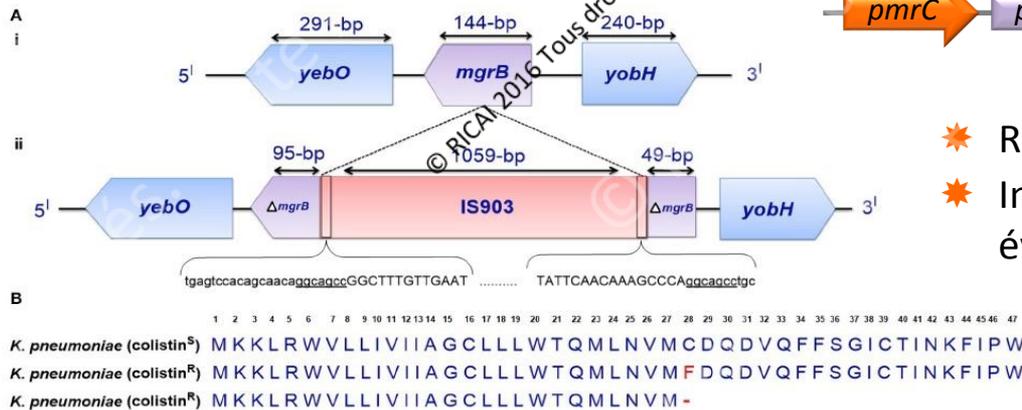


★ Mutants *pmrA*, *pmrB*, *phoP*, *phoQ* (CMI = 4-16 mg/L)

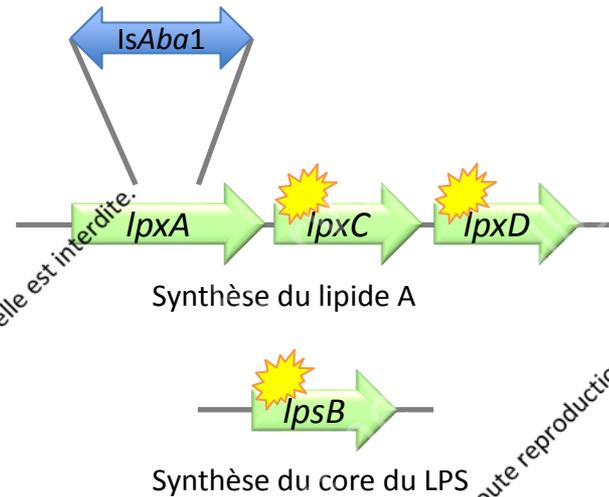
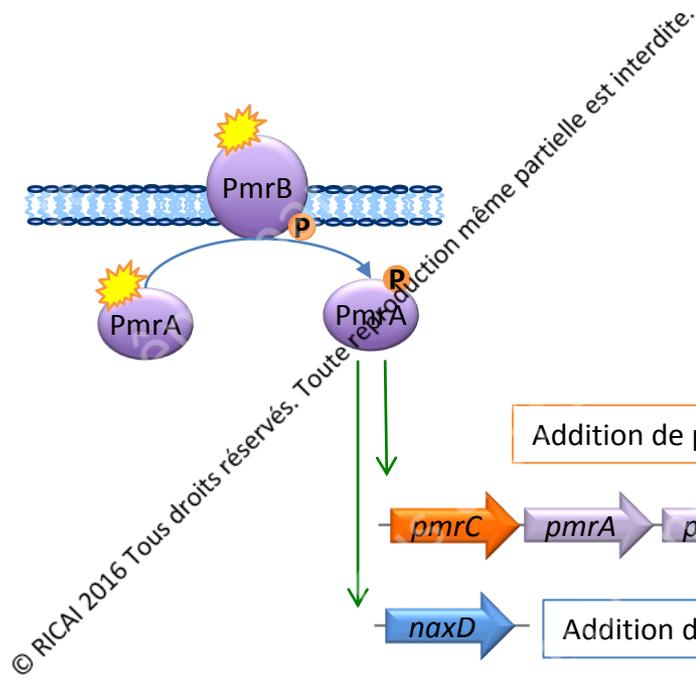
Résistance par mutations chez *K. pneumoniae*



- ★ Résistance de haut niveau (CMI = 4-64 mg/L)
- ★ Inactivation du gène *mgrB* par différents évènements génétiques IS5-like, IS903B...



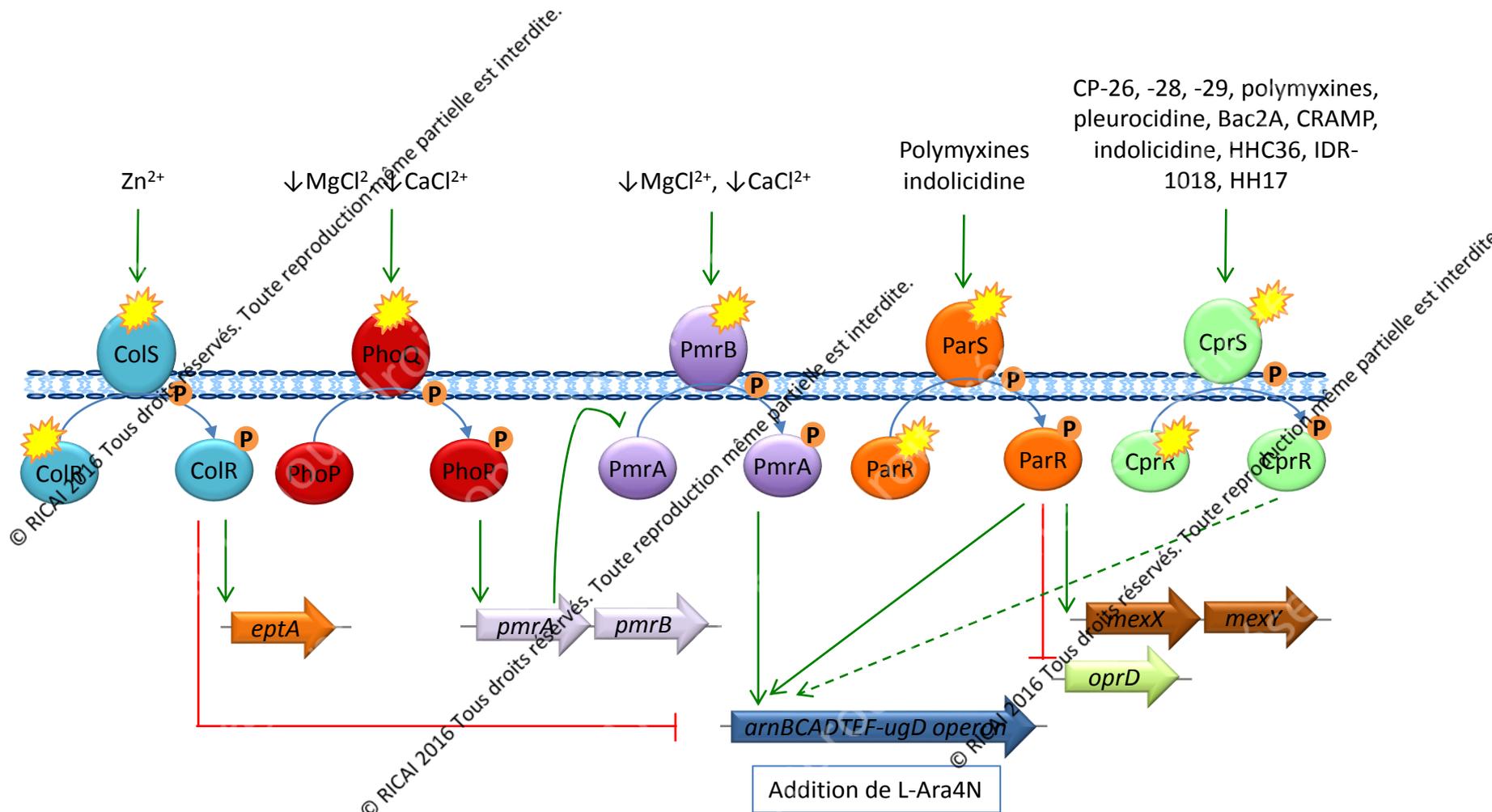
Résistance par mutations chez *A. baumannii*



- ★ Isolats cliniques CMI = **4-256 mg/L** (mutants *pmrB*)
- ★ Perte du LPS, CMI > **128 mg/L**
- ★ Coût de la résistance...

Concentrations critiques de la colistine ≤ 2 ; > 2 mg/L (CASFM/EUCAST 2016)

Résistance par mutations chez *P. aeruginosa*



★ Isolats cliniques CMI = 4-256 mg/L ($S \leq 4$; $R > 4$ mg/L)

Epidémiologie de la résistance à la colistine

- ★ Entérobactéries, *A. baumannii* et *P. aeruginosa*
- ★ Niveaux variables de résistance **4-512 mg/L**
- ★ Prévalence de la résistance encore faible en **France** chez les souches cliniques (<1%)
- ★ Rapport SENTRY 2009-2012 :

% résistance (CA-SEM/EUCAST)

Organisme	USA	Europe + Turquie + Israel
<i>P. aeruginosa</i>	1,1%	1%
<i>K. pneumoniae</i>	2,7%	3,6%
<i>K. pneumoniae</i> (ESBL)	11,5%	7,8%
<i>E. coli</i>	0,3%	0,1%
<i>A. baumannii</i>	4,8%	2,7%

Sader H. JAC 2014

Résistance acquise aux polymyxines en Europe

★ Sporadique parmi les souches de *K. pneumoniae* en France, mais...

Grèce

Italie

TABLE 1 - Resistance rates of clinical isolates to carbapenems, colistin, tigecycline and gentamicin for the two study periods.

Species	Resistance rates to	Isolated from	Period 2007-2010	Period 2010-2013	P
<i>K. pneumoniae</i>	Carbapenems	ICU patients	21/35 (60%)	92/157 (58.59%)	0.879
		Non-ICU patients	24/75 (32%)	60/189 (31.70%)	0.968
	Colistin (among CR isolates)	ICU patients	0/21 (0%)	20/92 (21.73%)	0.022
		Non-ICU patients	0/24 (0%)	5/60 (8.33%)	0.315
	Tigecycline (among CR isolates)	ICU patients	0/15 (0%)	30/92 (32.60%)	0.010
		Non-ICU patients	0/16 (0%)	18/60 (30%)	0.009
Gentamicin (among CR isolates)	ICU patients	4/21 (19.04%)	29/92 (31.52%)	0.257	
	Non-ICU patients	2/24 (8.33%)	10/60 (16.66%)	0.495	
<i>A. baumannii</i>	Carbapenems	ICU patients	90/100 (90%)	132/156 (84.61%)	0.216
		Non-ICU patients	50/66 (75.75%)	75/114 (65.78%)	0.162
	Colistin (among CR isolates)	ICU patients	0/90 (0%)	0/132 (0%)	NA
		Non-ICU patients	0/50 (0%)	0/75 (0%)	NA
	Gentamicin (among CR isolates)	ICU patients	56/90 (62.22%)	117/132 (88.64%)	0.001
		Non-ICU patients	34/50 (68%)	66/75 (88%)	0.001
<i>P. aeruginosa</i>	Carbapenems	ICU patients	18/47 (37.50%)	88/156 (56.41%)	0.001
		Non-ICU patients	22/123 (17.88%)	36/149 (23.49%)	0.001
	Colistin (among CR isolates)	ICU patients	1/18 (5.55%)	2/88 (2.27%)	0.360
		Non-ICU patients	1/22 (4.54%)	0/36 (0%)	0.360
	Gentamicin (among CR isolates)	ICU patients	11/18 (61.11%)	59/88 (67.05%)	0.001
		Non-ICU patients	16/22 (72.72%)	25/36 (69.44%)	0.001

CR: carbapenem-resistant; ICU: intensive care unit; NA: not applicable.

G. Meletis. New Microbiologica, 2015 38: 417-421

Main phenotypic and genetic characteristics of 94 carbapenem non susceptible KPC-Kp isolates, Palermo, Italy, 2014.

ST, sequence type; MICs, minimum inhibitory concentrations; IPM, imipenem; MEM, meropenem; AMK, amikacin; GEN, gentamicin; COL, colistin

ST	Nr. isolates	Hospital	Isotype/subtype	Resistance genetic determinants						MICs (µg/mL)				
				KPC	CTX-M-15	aac6-Ib-cr	qnrB	IPM	MEM	AMK	GEN	COL [‡]		
258	21	O	O	+	-	+	-	8-≥16	≥16	16-≥64	≤1-8	≤0.5- >256		
9	B	O	O	+	-	+	-	8-≥16	≥16	16-≥64	≤1-2	≤0.5- >256		
7	C	O	O	+	-	+	-	8-≥16	≥16	16-≥64	≤1-2	≤0.5- >256		
512	B	I	I	+	-	+	-	≥16	≥16	≥64	≤1	≤0.5		
8	C	D1	D1	+	+	+	+	≥16	≥16	≤2-8	2-≥16	≤0.5-48		
307	7	A	D1	+	+	+	+	8-≥16	8-≥16	≤2-8	2-≥16	48		
5	A	D1	D1	+	-	+	+	8-≥16	8-≥16	≥16	≥16	≤0.5		
3	A	D2	D2	+	+	+	+	≥16	≥16	4-≥64	2-≥16	3		
2	B	D1	D1	+	+	+	+	≥16	≥16	≤2	≥16	≤0.5		

SURVEILLANCE AND OUTBREAK REPORTS

Ongoing spread of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in different wards of an acute general hospital, Italy, June to December 2011

C Mamma (caterina.mamma@unipa.it)¹, C Bonura¹, F Di Bernardo², A Aleo¹, T Frasciana¹, C Sodano², M A Saporito², M S Verde², R Retamo³, D M Palma³

1. Department of Sciences for Health Promotion G D'Alessandro, University, Palermo, Italy
2. Laboratory of Clinical Microbiology, ARNAS General Hospital Civico, di Cristina e Benfratelli, Palermo, Italy
3. II Intensive Care Unit, ARNAS General Hospital Civico, di Cristina e Benfratelli, Palermo, Italy

15	1	A	F	+	+	+	-	≥16	≥16	≤2	≥16	≤0.5
147	1	A	B	+	-	-	-	≥16	≥16	≤2	≥16	≤0.5
323	1	B	H	+	+	+	+	≥16	≥16	≤2	≥16	1.5
491	1	B	E	+	-	-	-	≥16	≥16	≤2	≥16	≤0.5

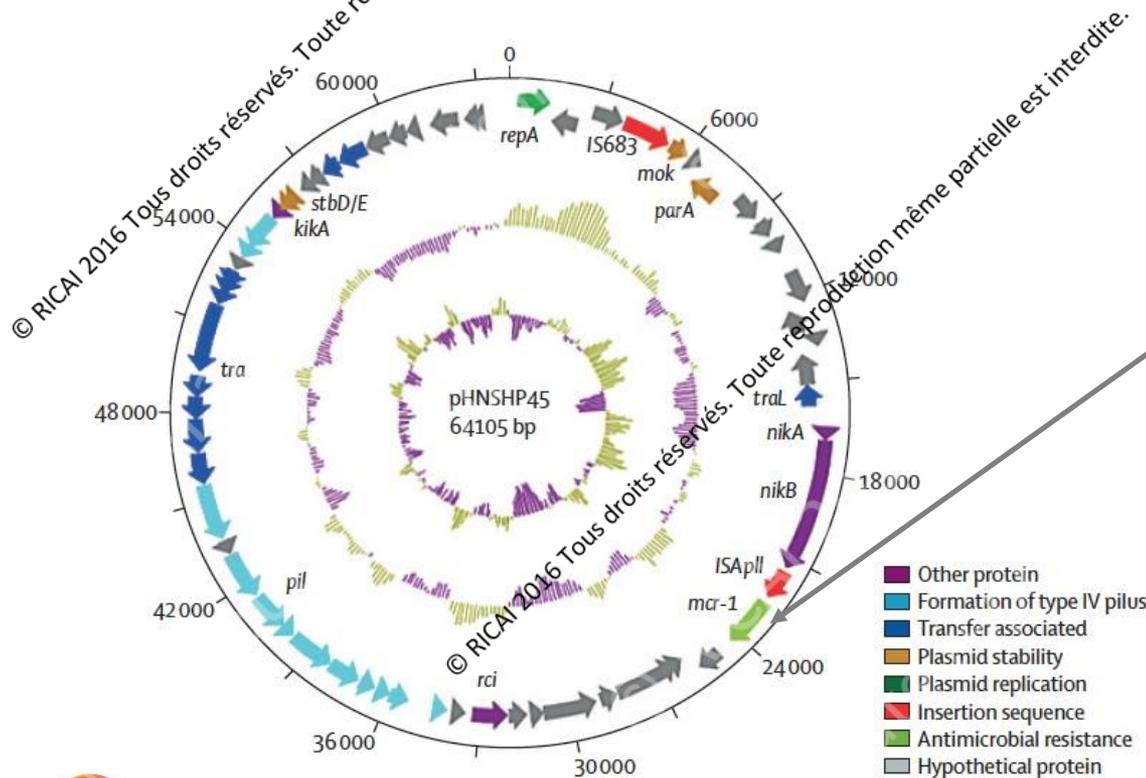
C. Bonura. Plos one, 2015; 10(7): e0132936.

On résume...

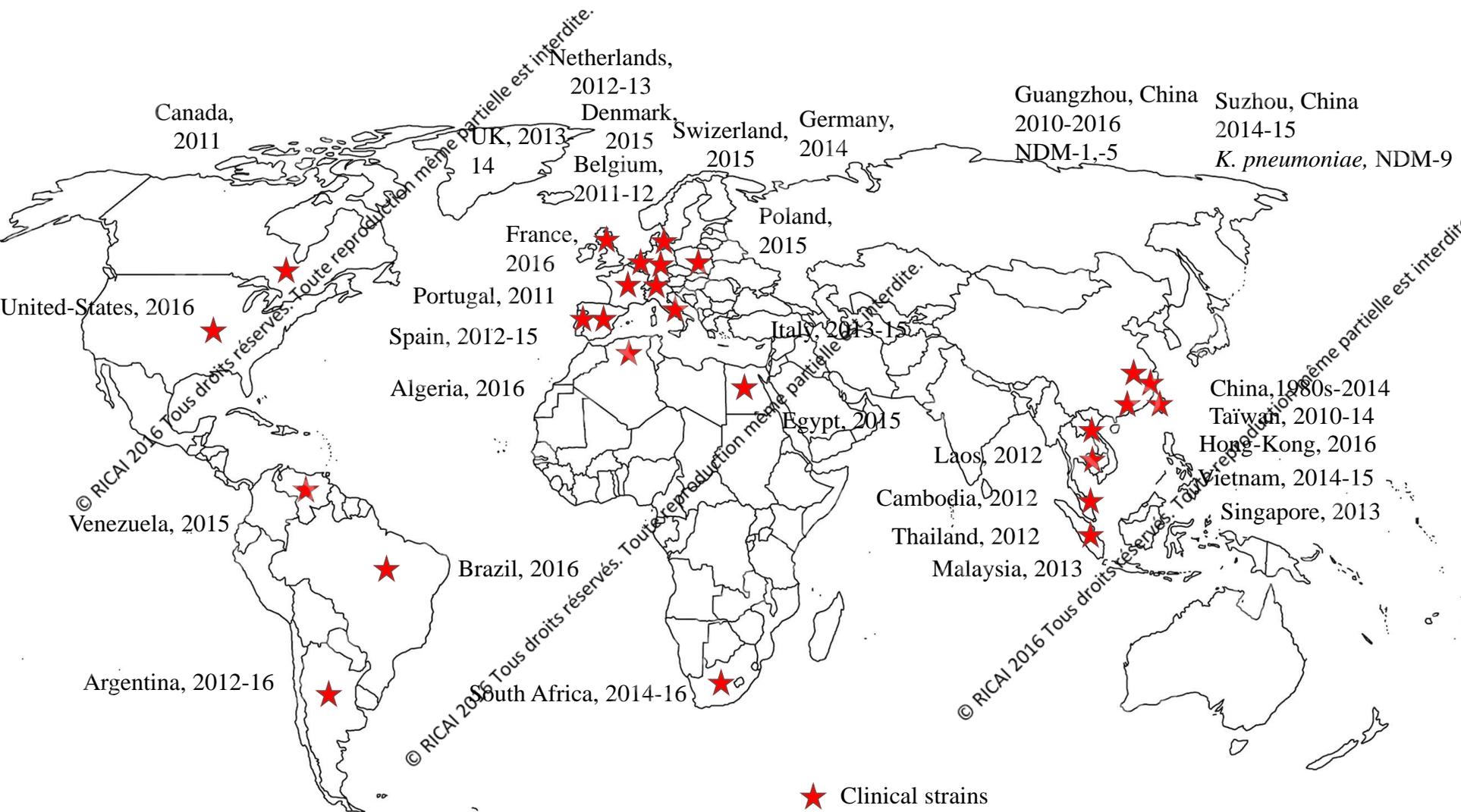
- ★ Des mutations multiples et difficiles à caractériser
- ★ Des niveaux de résistance variables, selon la nature et le nombre de mutations
- ★ Des prévalences de résistance à la colistine très différentes en fonction des espèces et des pays (ex. jusqu'à 25,8% chez *K. pneumoniae* en Roumanie)
- ★ Des prévalences plus élevées chez les entérobactéries BLSE ou carbapénémase positives (ex. jusqu'à 43% chez *K. pneumoniae* en Italie)...

Résistance plasmidique à la colistine (*mcr-1*)

- ★ Isolée d'une souche de *E. coli* chez un porc en **2013** (Shanghai, Chine)
- ★ CMI de la colistine = **8 mg/L**
- ★ Taux de transfert élevé *in vitro* chez *E. coli* par conjugaison (10^{-1} to 10^{-3})
- ★ Transférable à *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa* *in vitro*



Diffusion mondiale des gènes *mcr*



Ce qu'il faut retenir

- ✳ Trois gènes mobiles en circulation (***mcr-1***, *mcr-1.2*, *mcr-2*)
- ✳ Plusieurs espèces impliquées dans la dissémination (***E. coli* +++**, *K. pneumoniae*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enterica*...)
- ✳ Pas d'informations concernant *A. baumannii* et *P. aeruginosa*
- ✳ Des niveaux de résistance modérés (**2 à 16 mg/L**)
- ✳ Large **diffusion mondiale** chez des souches humaines, animales, environnementales
- ✳ Des **plasmides variés** portant le gène *mcr-1* (groupes IncI2, IncX4, mais aussi IncH2, F, N, P, Q), du groupe IncX4 pour *mcr-2*
- ✳ **CNR** (Richard Bonnet) :
 - 9 souches *mcr-1* depuis 2015 : 6 *E. coli*, 2 *K. pneumoniae*, 1 *S. Typhimurium*
 - 6 **BLSE** + 1 *K. pneumoniae* KPC/OXA-48 (origine Portugal)
 - 2 souches Nouméa 2014 (plasmide IncI2)
 - Pas de clonalité

Recommandations BHRé

- ★ **Avis du HCSP, 27 septembre 2016** : “Tester la résistance à la colistine et rechercher systématiquement la présence du gène *mcr-1* chez toute souche d’**EPC** isolée :
 - Soit lors d’un **dépistage systématique** à l’admission d’un patient aux antécédents d’hospitalisation hors territoire métropolitain dans l’année, avec ou sans rapatriement direct,
 - Soit dans un **prélèvement à visée diagnostique** en cours d’hospitalisation dans un contexte clinique et thérapeutique nécessitant le recours à la colistine.
- ★ **Avis du HCSP (en cours)** : “Déterminer la CMI de la colistine par la méthode de référence de **microdilution en milieu liquide**, selon les recommandations du CA-SFM/EUCAST.
 - Utiliser un milieu liquide Mueller-Hinton avec ajustement de la concentration en cations (MH2),
 - Utiliser des sels de sulfate de colistine (le méthanesulfonate utilisé en thérapeutique est une prodrogue de la colistine, inactive *in vitro*),
 - Utiliser des microplaques ou barrettes en polystyrène dépourvues de prétraitement
 - Ne pas utiliser d’additifs comme les polysorbates.”

Recommandations

- ★ **Suite** : “Pour attribuer une résistance (confirmée par la mesure des CMI) à l’expression d’un gène *mcr*, **détecter la présence de ce gène** à l’aide de techniques moléculaires, qui sont les seules permettant un diagnostic spécifique de certitude.

Dans tous les cas, les souches suspectes doivent être envoyées au CNR de la résistance aux antibiotiques (site de Clermont-Ferrand) pour confirmation et surveillance épidémiologique à l’échelon national...”

Criblage systématique des souches suspectes de carbapénémases adressées au CNR (site de Bicêtre).



Résistance naturelle aux polymyxines

★ *Proteus mirabilis*, *Morganella morgannii*, *Serratia marcescens*

– Présence sur le génome des gènes:

- *eptC* ou *eptB* impliqués dans la modification du LPS par addition de phospho-éthanolamine
- *arnBCADTEF* responsable de l'addition de 4 amino-4-désoxy-L-arabinose sur le lipide A et KDO
- *rppA/rppB* homologues de *pmrAB* et *PhoPQ*

– L'inactivation de *arnB* et *arnC* entraînent une augmentation de la sensibilité à la polymyxine B

★ *Burkholderia species*

- Présence de L-4 amino-4-désoxy-L-arabinose sur le lipide A et le KDO
- Produit constitutivement