



Hôpitaux
Universitaires
Est Parisien



Antibiorésistance hétérogène et de bas niveau : mythes et réalités

Pr Nicolas Veziris

CNR des Mycobactéries, Département de Bactériologie,
Hôpitaux Universitaires de l'Est Parisien, APHP
CIMI, INSERM, Sorbonne Université

Conflits d'intérêts

- Becton Dickinson
- Janssen
- Otsuka

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Infection par deux souches différentes

- Bernard, EID 2014

Concomitant Multidrug-Resistant Pulmonary Tuberculosis and Susceptible Tuberculous Meningitis

Table. Localization, drug-susceptibility results, and MIRU-VNTR genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* strains recovered from a man with both pulmonary tuberculosis and tuberculous meningitis, France, 2012*

Tissue	MIRU-VNTR genotype 1 222213222234225153333622	MIRU-VNTR genotype 2 224243122234225143335622
Lung	Isoniazid and rifampin resistant, fluoroquinolone susceptible, <i>rpoB</i> S531L, <i>katG</i> S315T, no mutations in <i>gyrA</i> and <i>gyrB</i>	Pan-susceptible except to fluoroquinolones, no mutations in <i>rpoB</i> , <i>katG</i> , and <i>gyrA</i> ; <i>gyrB</i> N538D
Cerebrospinal fluid		Pan-susceptible, no mutations in <i>rpoB</i> , <i>katG</i> , <i>gyrA</i> , and <i>gyrB</i>

*MIRU-VNTR, mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat.

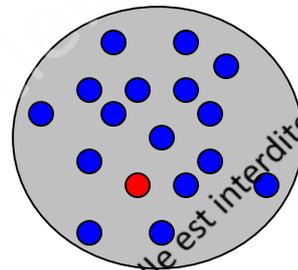
Infection par deux souches, l'une MDR, l'autre sensible

Bases microbiologiques : sélection de mutants résistants

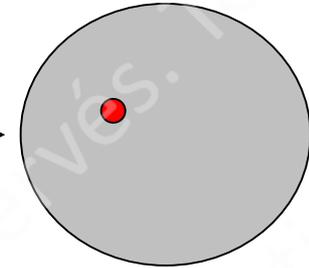
- Bacille sensible
- Bacille résistant à l'antibiotique

Antibiotique	Concentration	Fréquence de mutants
pyrazinamide	100mg/L	10-5
isoniazide	0,2mg/L	10-6
streptomycine	2mg/L	10-6
rifampicine	1mg/L	10-8
bedaquiline	0,5mg/L	10-8
linézolide	8mg/L	10-9

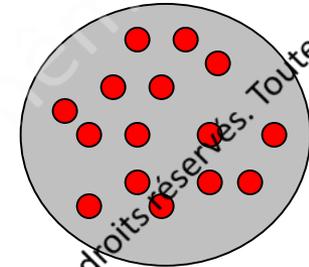
Caverne



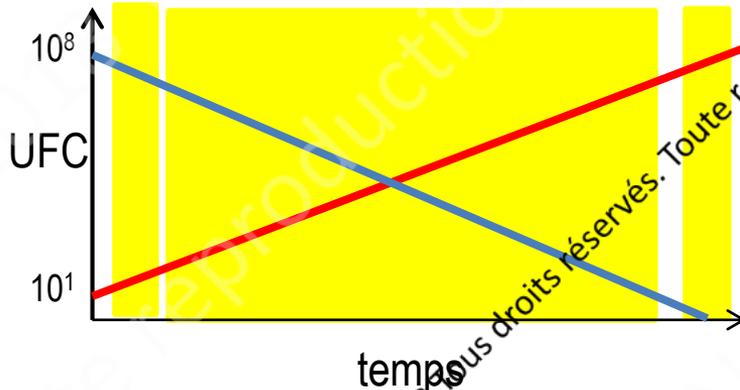
ATB



Population bacillaire normale



Population bacillaire devenue résistante



Population bacillaire hétérogène due à la lenteur du processus de sélection

Revue de Tuberculose et de Pneumologie, T. 27, 1963, n° 2-3 (pp. 217-272).

MESURE DE LA SENSIBILITÉ DU BACILLE TUBERCULEUX
AUX DROGUES ANTIBACILLAIRES
PAR LA MÉTHODE DES PROPORTIONS

MÉTHODOLOGIE, CRITÈRES DE RÉSISTANCE,
RÉSULTATS, INTERPRÉTATION

par

G. CANETTI, N. RIST et J. CROSSET
(Institut Pasteur, Paris).



Référence du diagnostic phénotypique de la résistance
Validée chez patients naïfs de traitement ou en échec

Critère du 1%

Adaptée aux milieux liquides dans les années 80



Policy guidance on drug-susceptibility testing (DST) of second-line antituberculosis drugs

TABLE 3.3 DST methods and critical concentrations for first- and second-line DST

DRUG GROUP ^a	DRUG	STANDARDIZED DST METHOD AVAILABLE	DST CRITICAL CONCENTRATIONS (µg/ml)			
			Löwenstein-Jensen ^b	Middlebrook 7H10 ^b	Middlebrook 7H11 ^b	MGIT960
Group 1 First-line oral anti-TB agents	Isoniazid	Solid, liquid	0.2	0.2	0.2	0.1
	Rifampicin ^c	Solid, liquid	40.0	1.0	1.0	1.0
	Ethambutol ^d	Solid, liquid	5.0	5.0	7.5	5.0
	Pyrazinamide	Liquid	-	-	-	100.0
Group 2 Injectable anti-TB agents	Streptomycin ^e	Solid, liquid	4.0	2.0	2.0	1.0
	Kanamycin	Solid, liquid	30.0	5.0	6.0	2.5
	Amikacin	Solid, liquid	30.0	4.0	-	1.0
	Capreomycin	Solid, liquid	40.0	4.0	-	2.5
Group 3 Fluoroquinolones	Ofloxacin ^f	Solid, liquid	4.0	2.0	2.0	2.0
	Levofloxacin	Solid, liquid	-	1.0	-	1.0
	Moxifloxacin ^g	Solid, liquid	-	0.5/2.0	-	0.5/2.0
	Gatifloxacin ^h	Solid	-	1.0	-	-
Group 4 ⁱ Oral bacteriostatic second-line anti-TB agents	Ethionamide	Solid, liquid	40.0	5.0	10.0	5.0
	Prothionamide	Solid, liquid	40.0	-	-	2.5
	Cycloserine	Solid	30.0	-	-	-
	Para-aminosalicylic acid	Solid, liquid	1.0	2.0	8.0	4.0

Recommandations internationales
1 concentration par antibiotique

Définition de la résistance 1969

Bull. Org. mond. Santé } 1969, 41, 21-43
Bull. Wld Hlth Org. }

Advances in Techniques of Testing Mycobacterial Drug Sensitivity, and the Use of Sensitivity Tests in Tuberculosis Control Programmes

G. CANETTI,¹ WALLACE FOX,² A. KHOMENKO,³ H. T. MAHLER,⁴
N. K. MENON,⁵ D. A. MITCHISON,⁶ N. RIST,¹ & N. A. ŠMELEV⁷

Drug resistance may be defined in bacteriological terms or in the light of the probable response of the patient to chemotherapy with the drug concerned. As it is difficult to establish a precise clinical definition of resistance, a definition in purely bacteriological terms has been adopted for the purposes of this paper. The following statement (Mitchison, 1962) is considered to be adequate:

“Resistance is defined as a decrease in sensitivity of sufficient degree to be reasonably certain that the strain concerned is different from a sample of wild strains of human type that have never come into contact with the drug.”

Such a definition assumes that the variation in sensitivity of sensitive strains to any one of the antibacterial drugs is small. (It does not apply to thioacetazone, since natural resistance to this drug occurs in a high proportion of strains obtained from certain regions of the world (Thomas et al., 1961; Rist, 1968; Mitchison & Allen, to be published).) For most of the anti-tuberculosis drugs, there is evidence that a diminished clinical response may occur when resistance in the above-mentioned bacteriological sense is demonstrated in the laboratory.

Une réduction d'efficacité clinique pourrait survenir

Evaluation quantitative

We consider that the best type of sensitivity test is a fully quantitative determination in which the proportion of organisms capable of growth on medium containing a wide range of drug concentrations is known. This type of test would provide full information both on the degree of the resistance and on the proportion of resistant organisms at each drug concentration. However, since such a test requires large amounts of medium and is time-consuming, it cannot be recommended as a routine procedure. It will be appreciated that each of the foregoing methods is a compromise in which one or other of the assessments of the results of a test is given the greatest prominence. A fully quantitative test should be employed whenever the circumstances permit.

Evaluation quantitative préférée mais difficile à mettre en place

1. Coexistence de populations sensibles et résistantes

2. Niveaux de résistance hétérogènes

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Hétérorésistance et fluoroquinolones : données CNR

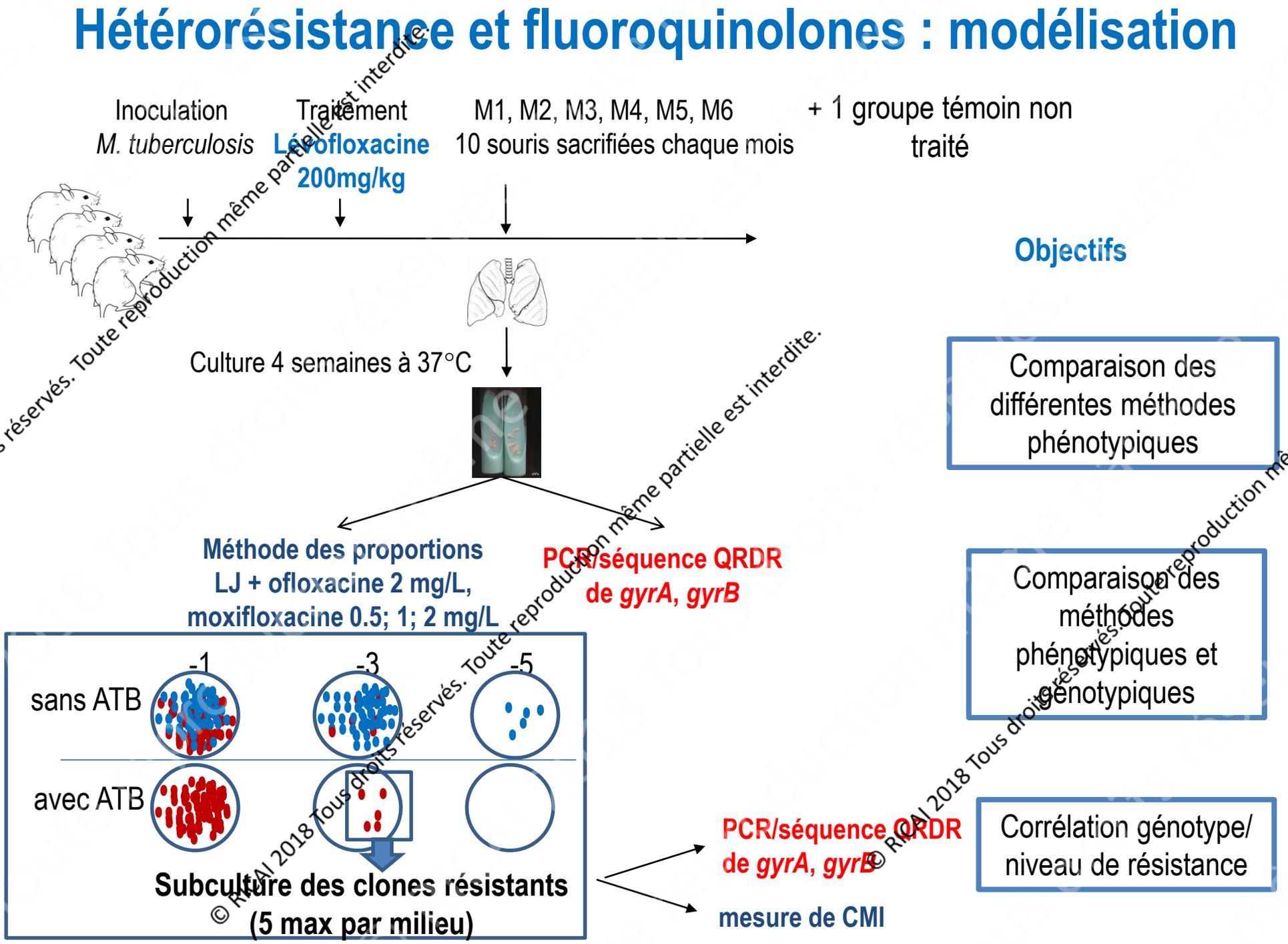
- Bernard, AAC 2015
 - 605 souches reçues au CNR entre 2007 et 2012
 - Séquençage *gyrA* et *gyrB*

	535 oflo S	70 oflo R
Substitutions GyrA	16	58
Substitutions GyrB	14	8
Pas de substitution	505	5

- 5 faux négatifs du séquençage
 - 5 souches avec pourcentage de mutants résistants < ou = à 25% :
 - 4 souches avec substitutions trouvées par séquençages des mutants R

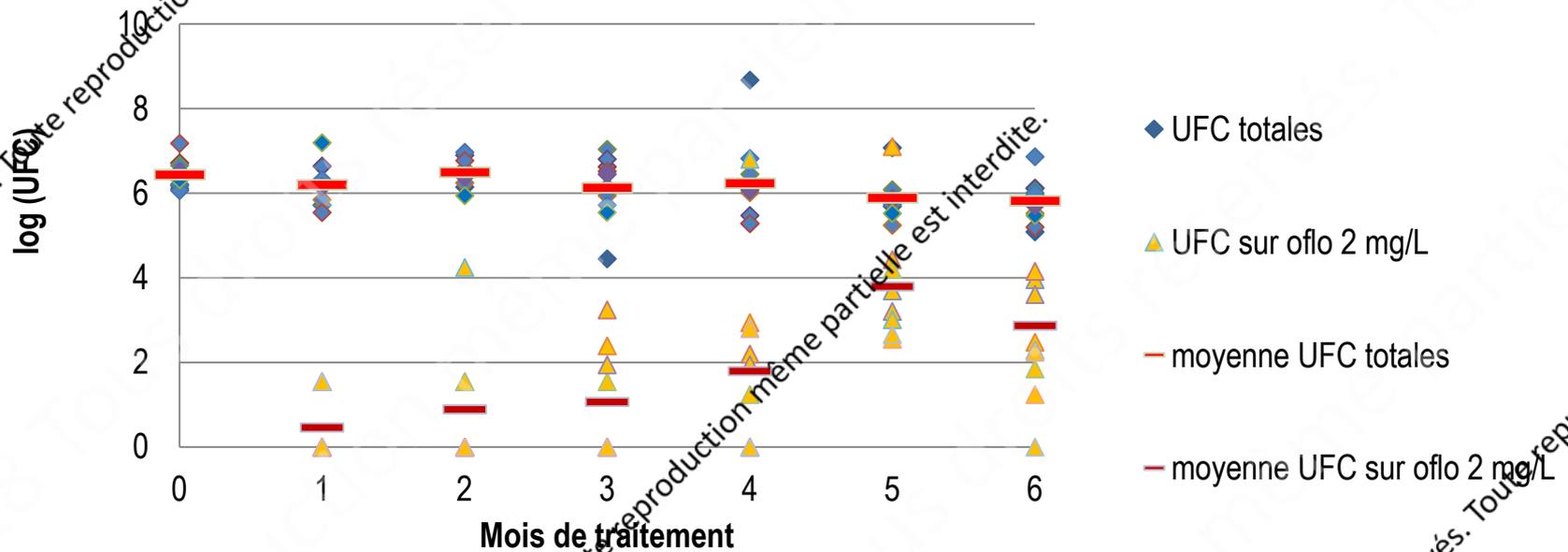
→ hétérorésistance

Hétérorésistance et fluoroquinolones : modélisation



Evolution de la population résistante dans le temps

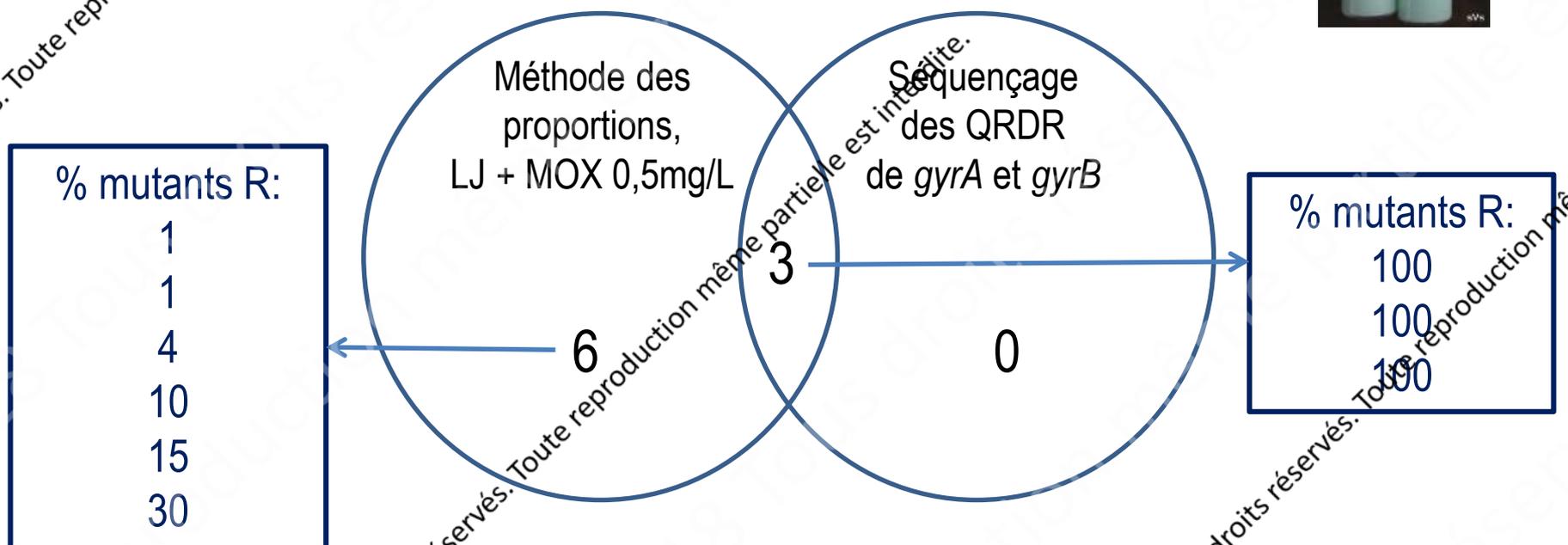
Nombre d'UFC poussant sur milieu avec et sans FQ en fonction des mois



Mélange de populations sensibles et résistantes sur l'ensemble de la durée de l'expérience = hétérorésistance

Diagnostic de l'hétérorésistance (méthodes génotypiques)

Souris avec une population résistante >1% (substitution dans GyrA/B obtenu par séquençage de la culture primaire)



→ Séquençage n'a pas permis de détecter les souches hétérorésistantes

Quelles performances des tests génotypiques en cas de population hétérogène?

- Zetola, JCM 2014
 - Xpert MTB/RIF détecte
 - **Toutes les souches** RIF-R si résistance homogène
 - **La moitié des souches** RIF-R si population résistante = 90 à 99% de la population totale
 - **Aucune souche** RIF-R si si population résistante <90% de la population totale
 - Hétérorésistance non détectée = facteur de mauvais pronostic
- Folkvardsen, JCM 2013
 - MTBDR_{plus} détecte **1/5 souches** R-INH si 1% de la population (mais mieux que séquençage)

Tests peu performants si population hétérogène

Hétérogénéité et NGS

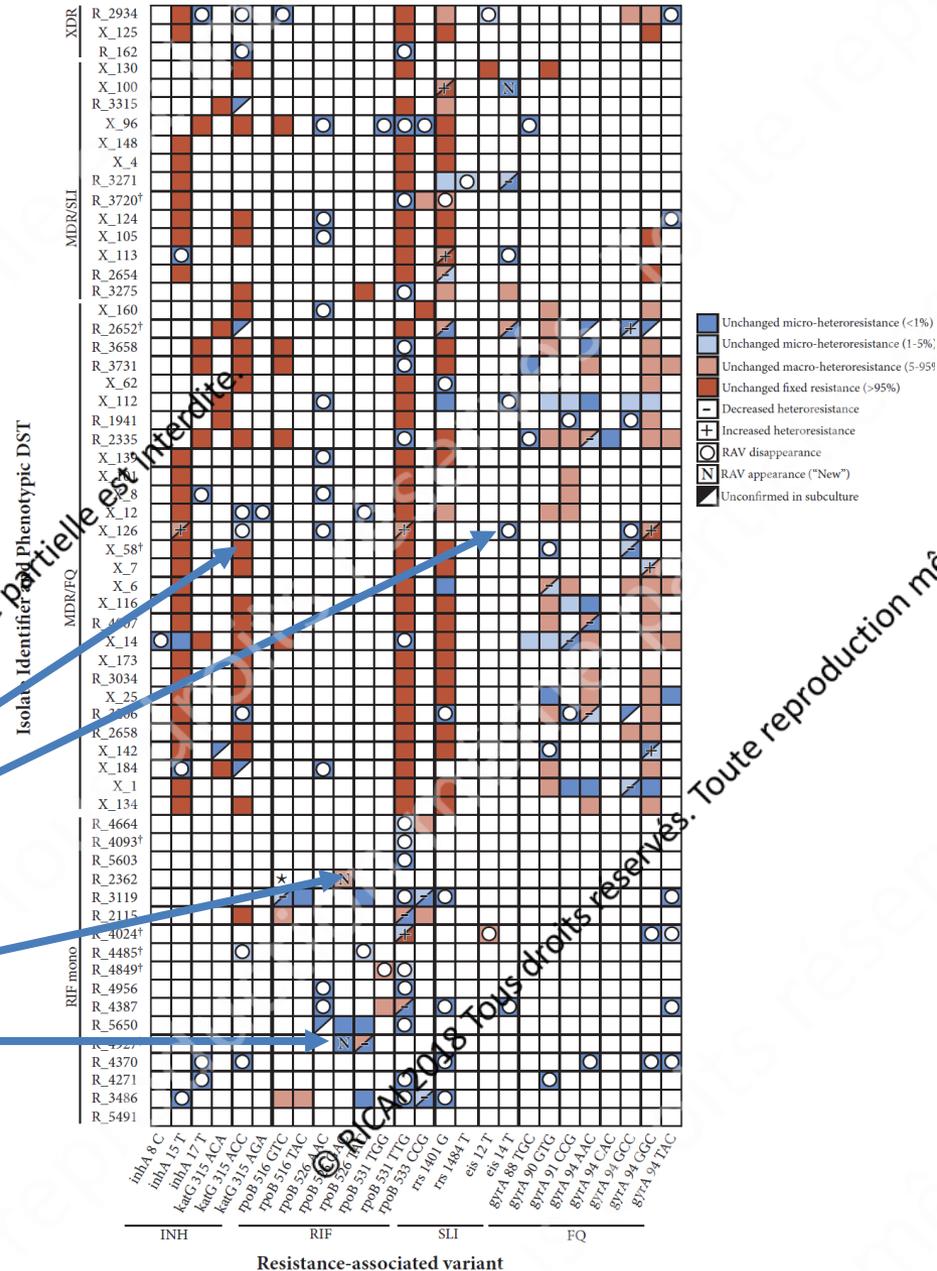
Metcalfe, AJRCCM 2017

- Technique NGS pour détecter variants minoritaires
 - Détectés chez 20/25 non détectés par Sanger
 - Concordance Sanger et NGS dépend d'hétérogénéité :
 - 77% (n = 53/69) si résistance 5-95% population totale
 - 5%(n = 3/66) si résistance <5% populations totale

Metcalfe, AAC 2017

- Repiquages *in vitro* modifient la diversité allélique
- Disparition de variants
- Apparition de variants

NGS éclaire une complexité à mettre en lumière de la clinique



Hétérogénéité : conclusion 1

- Lenteur de la sélection de mutants résistants → coexistence de bacilles sensibles et résistants
 - Intérêt de la méthode des proportions
 - Tests génotypiques actuels limités
 - Souches en culture = reflet déformé de la situation *in vivo*
 - Techniques NGS?
- ! A corrélérer avec la clinique

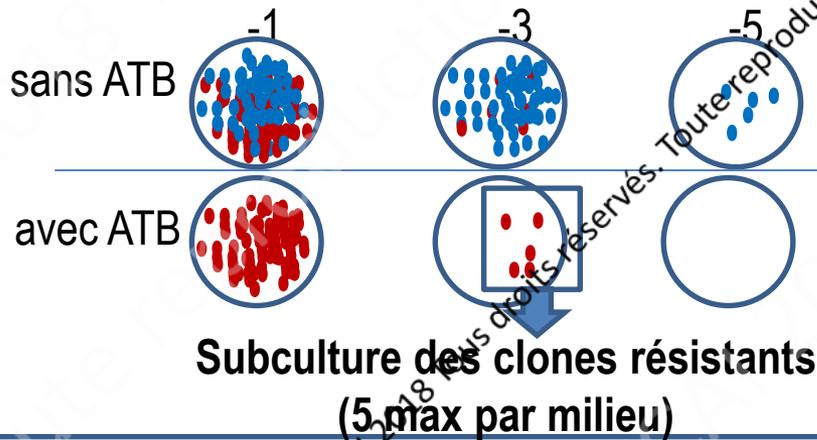
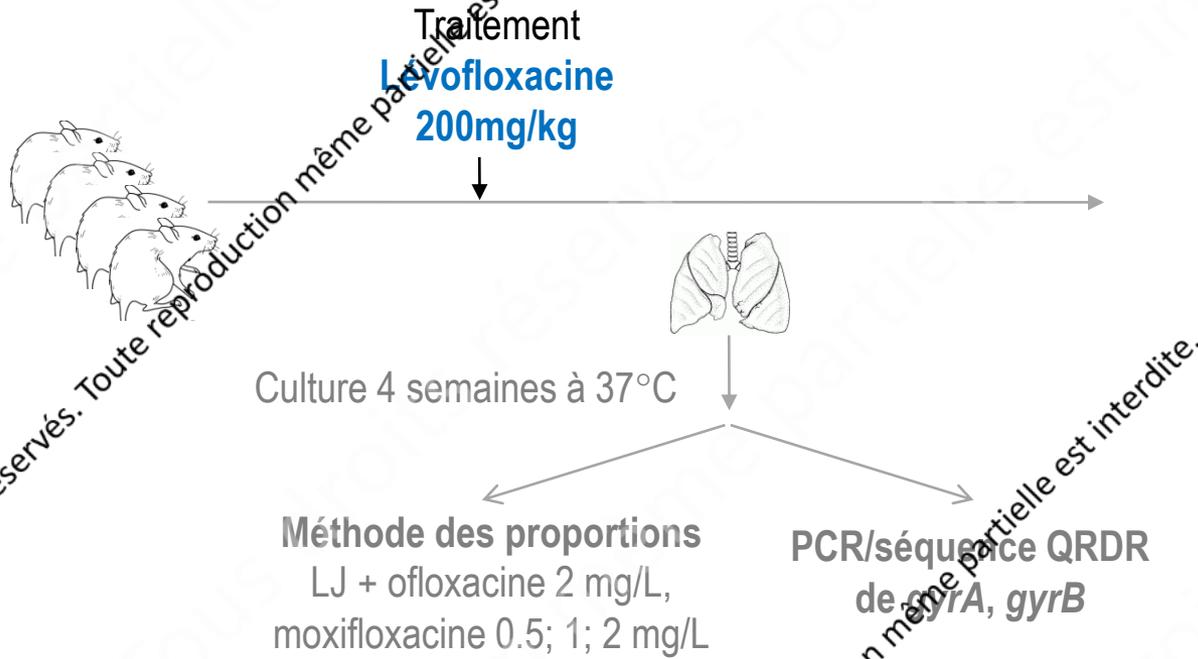
1. Coexistence de populations sensibles et résistantes

2. Niveaux de résistance hétérogènes

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Corrélation génotype / niveaux de résistance

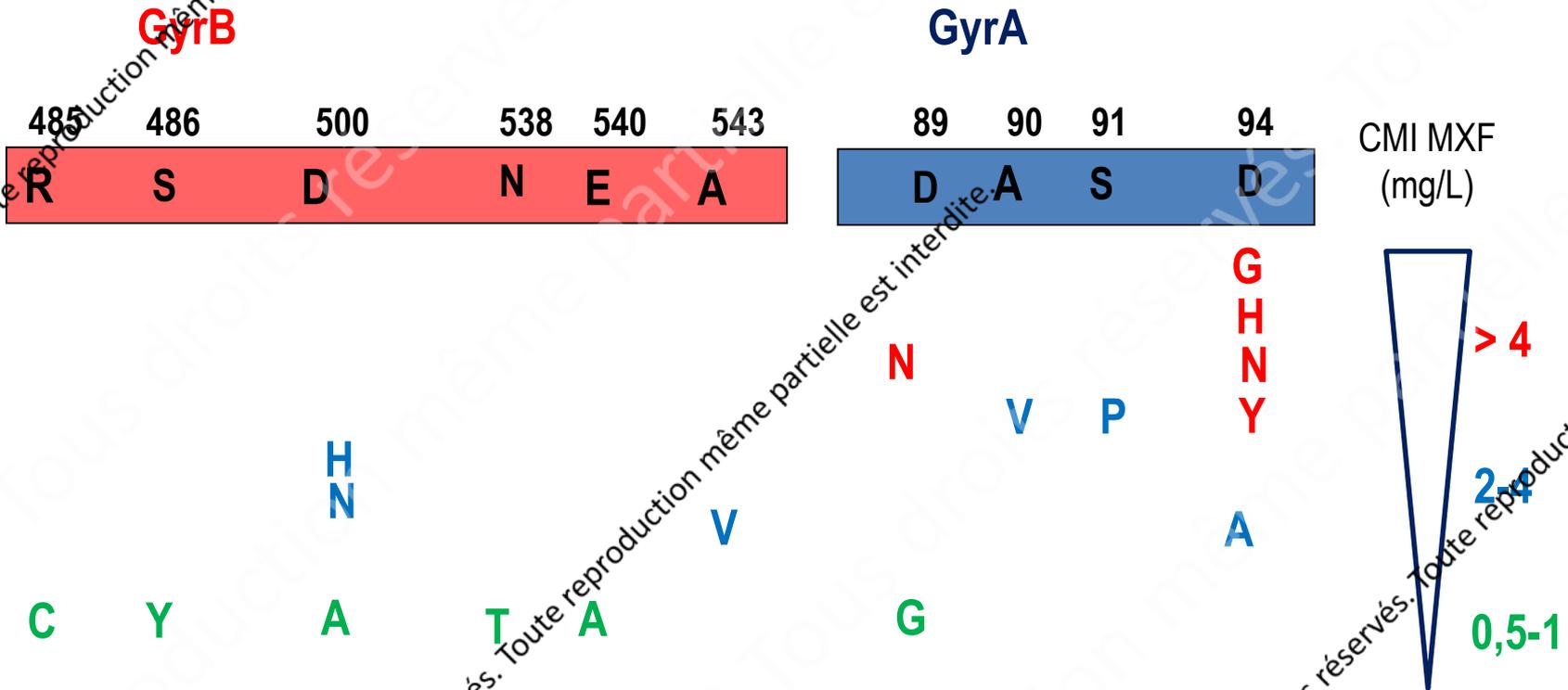


PCR/séquence QRDR
de *gyrA*, *gyrB*

mesure de CMI

Corrélation génotype/
niveau de résistance

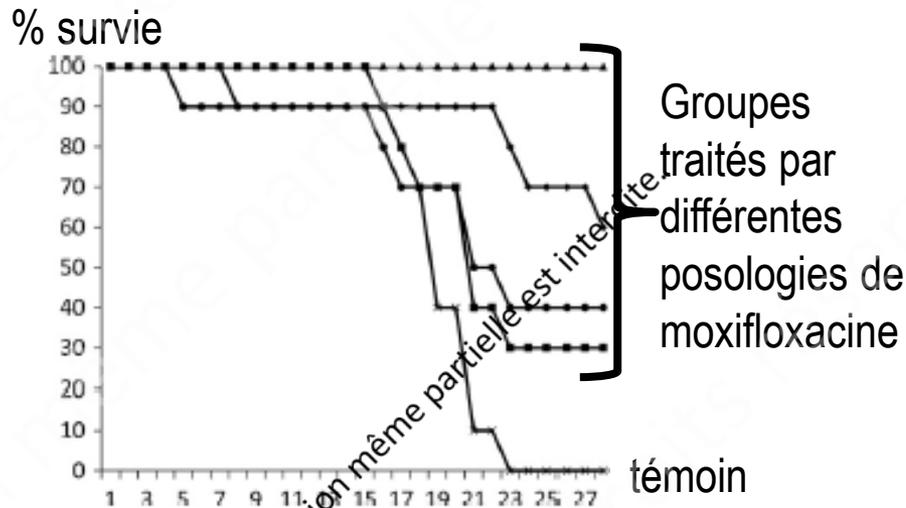
Corrélation génotype / niveaux de résistance



- les niveaux de résistance varient en fonction des substitutions
- Pour certaines substitutions : CMI < concentration sérique

Moxifloxacin et souches mutées *gyrA*

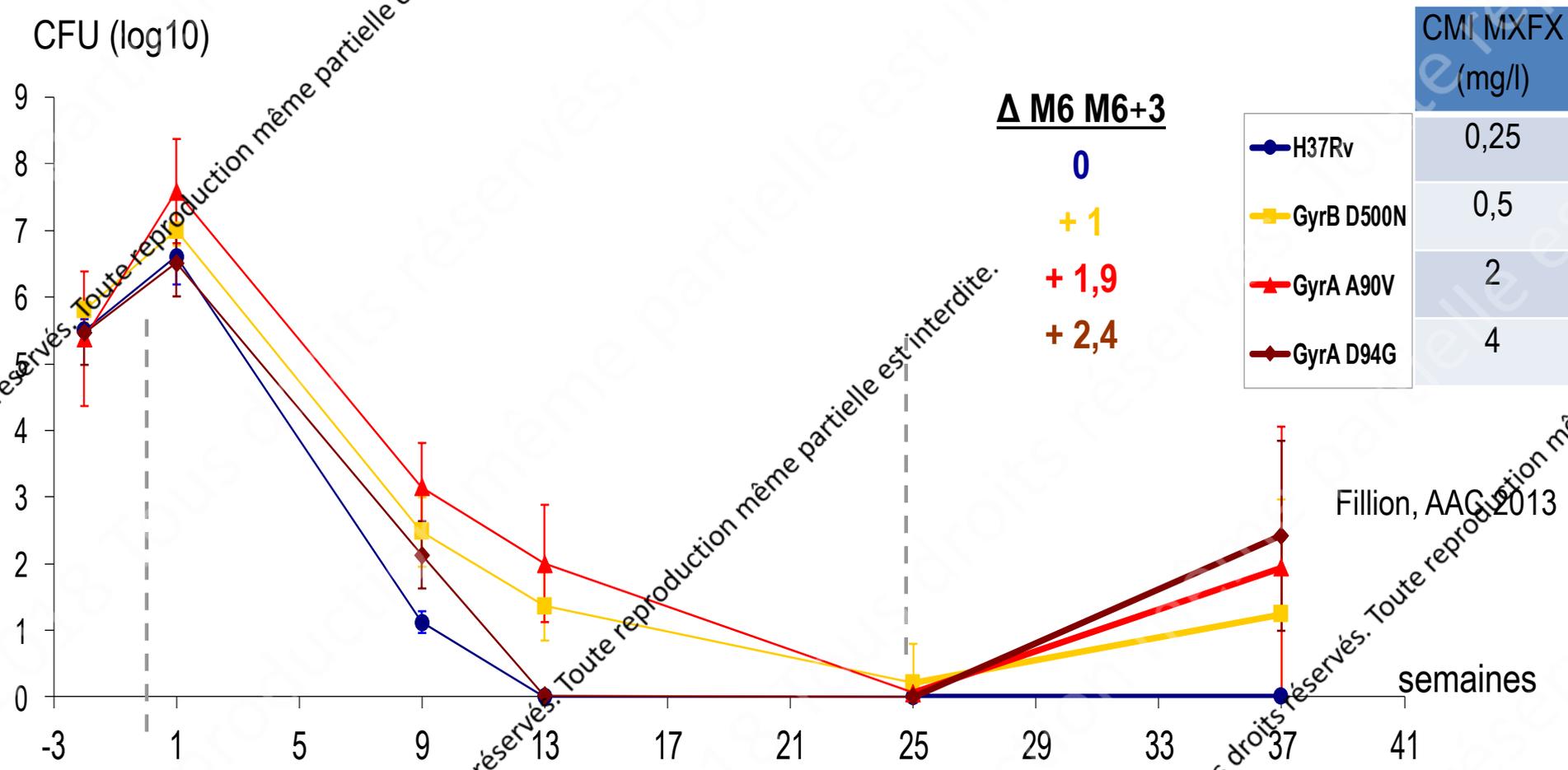
- Mutation GyrA A90V : CMI moxifloxacin = 2 mg/l < pic sérique 3 mg/l
 - Persistance activité *in vivo*?
- ⇒ Essai dans un modèle murin



Poissy, AAC 2010

Certaines mutations génèrent un niveau de résistance permettant une activité résiduelle *in vivo* dépendante de la posologie de l'antibiotique

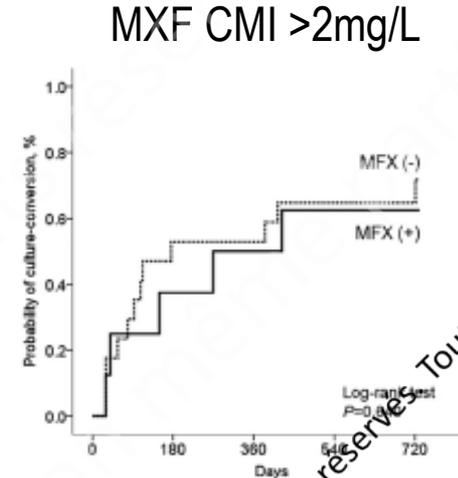
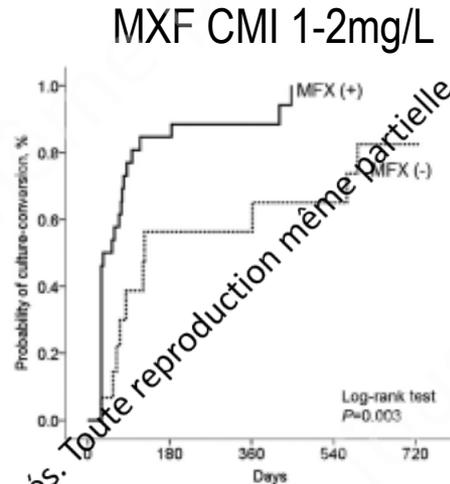
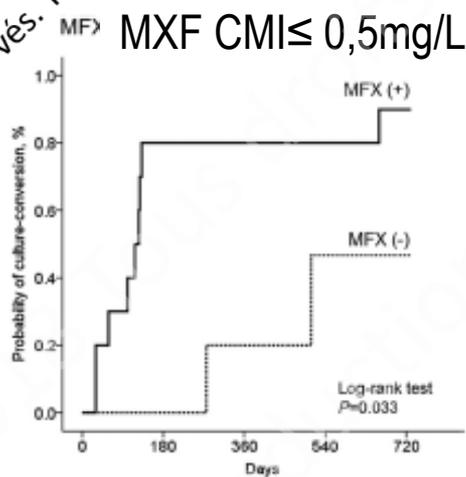
Traitement type MDR incluant moxifloxacin contre souches de niveaux de résistance variables aux quinolones : modèle murin



Activité corrélée au niveau de résistance
 → Pas un mais des niveaux de résistance

Variabilité des niveaux de résistance = variabilité de la réponse thérapeutique

- Chien, AAC, 2016
 - Traitement TB MDR
 - MXF X, dose non précisée
 - 81 patients



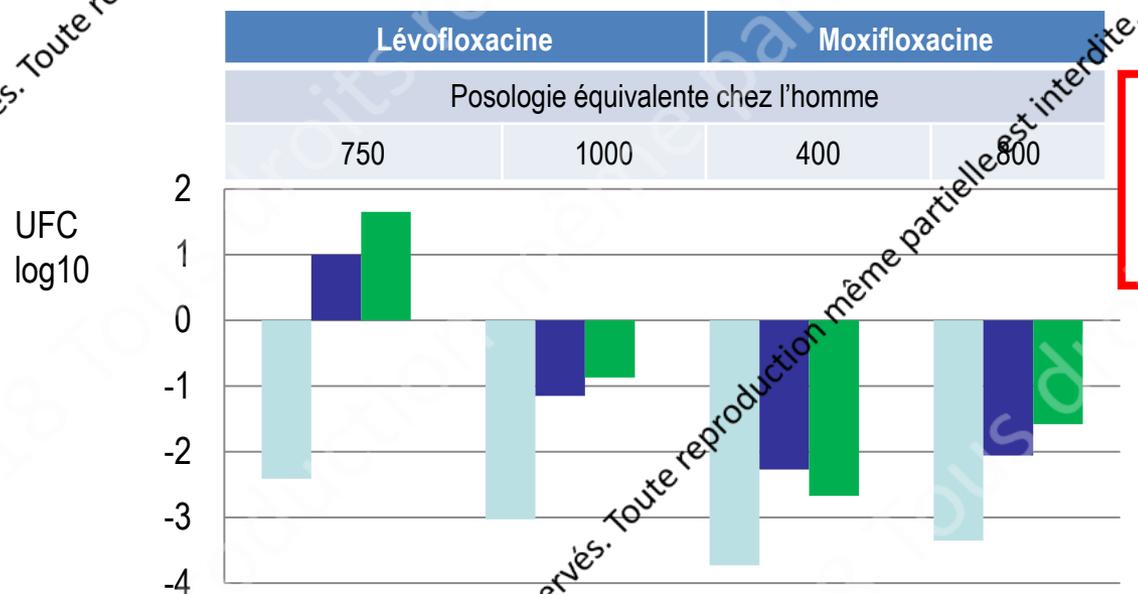
Réponse thérapeutique corrélée au niveau de résistance
à la moxifloxacine
OMS propose une seconde CC à 2 mg/L (= catégorie « I »)

Activité *in vivo* de fluoroquinolones contre mutants de bas niveaux de résistance

Génotype		Phénotype CMI (µg/ml)	
GyrA	GyrB	lévofloxacine	moxifloxacine
WT	WT	≤ 0,25	≤ 0,25
WT	E540A	0,5	0,5
WT	A543V	1	0,5

« Officiellement » sensibles

DRUG	STANDARDIZED DST METHOD AVAILABLE	DST CRITICAL CONCENTRATIONS (µg/ml)			
		Löwenstein-Jensen ^a	Middlebrook 7H10 ^a	Middlebrook 7H11 ^a	MGIT960
Ofloxacin ^f	Solid, liquid	4.0	2.0	2.0	2.0
Levofloxacin	Solid, liquid	-	1.0	-	1.5
Moxifloxacin ^g	Solid, liquid	-	0.5/2.0	-	0.5/2.0
Gatifloxacin ^h	Solid	-	1.0	-	-



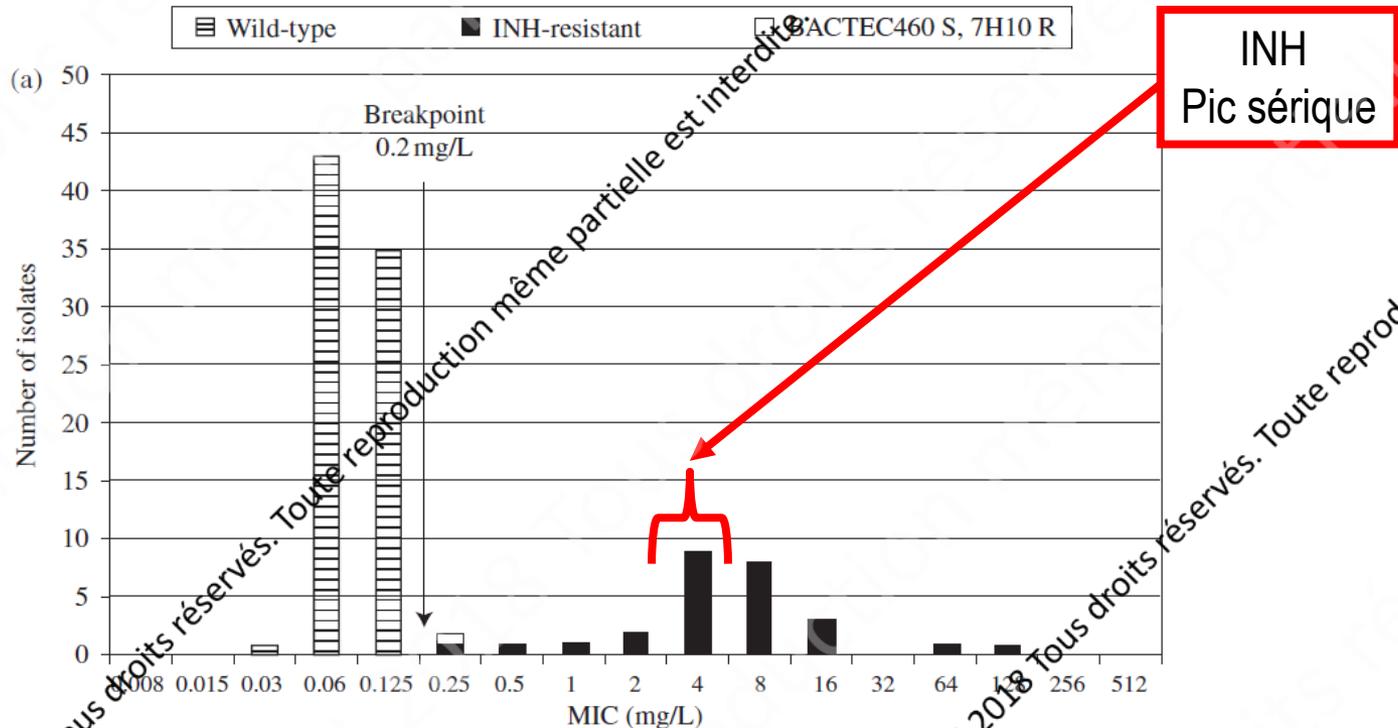
Des mutants GyrB avec CMI classées « S » réduisent l'activité des quinolones *in vivo*

Maitre, JAC 2016

Un exemple où le diagnostic génotypique est supérieure au diagnostic phénotypique

Isoniazide, bas niveaux de résistance

- Schön JAC 2009
- 7H10



Variabilité des niveaux de résistance

L'isoniazide pourrait être toujours actif contre certains mutants de bas niveau

Isoniazide : corrélation génotype/phénotype

- Brossier, IJTLD 2009
- LJ

Table 1 Sequencing data and drug resistance phenotypes for the 95 INH-resistant *M. tuberculosis* isolates analysed by the MTBDR *plus* assay

Sequencing data for <i>katG</i> (S315), <i>inhA</i> and the <i>fabG-inhA</i> regulatory region			Strains exhibiting INH resistance phenotype		
<i>katG</i> (S315)	<i>inhA</i>	<i>fabG-inhA</i> regulatory region	Low level	High level*	
			H1	H10	H10
S315T	wt	Wt	3	42	4
S315T	wt	-15 C→T		3	7
S315T	wt	-8 T→C		1	
S315T	wt	-102 G→A		1	
S315T	wt	-47 G→C		1	
S315N	wt	Wt	2		
wt	wt	-15 C→T	11	2	
wt	wt	-15 C→T ; -102 G→A		1	
wt	S94A	-15 C→T	4		
wt	S94A	Wt	3		
wt	wt	Wt	6 [†]	1 [‡]	3 [§]

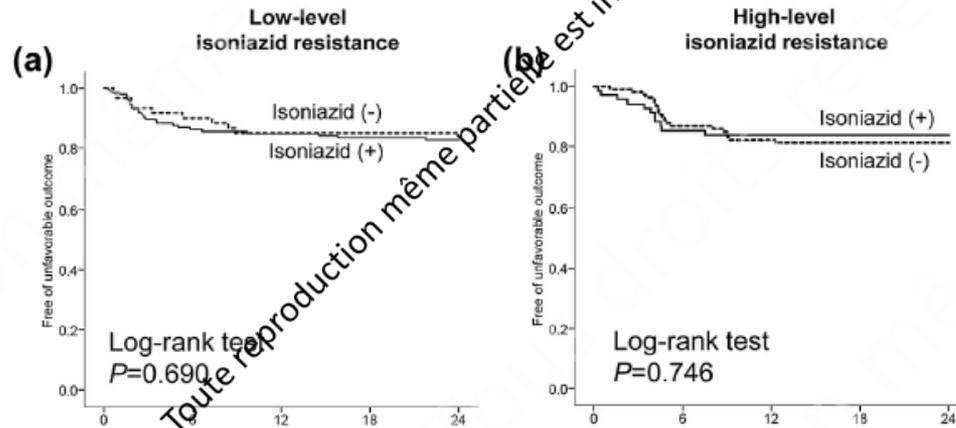
* H1, resistance to ≥ 1 but < 10 mg/l; H10, resistance to ≥ 10 mg/l.

	Isoniazide Concentrations critiques (mg/L)
MGIT	0,1 – 0,4
LJ	0,2 - 1 - 10

mutants *katG* = haut niveau mutants *inhA* = bas niveau
 définitions MGIT et LJ diffèrent

Combinaisons d'antibiotiques contre des souches résistantes à l'isoniazide

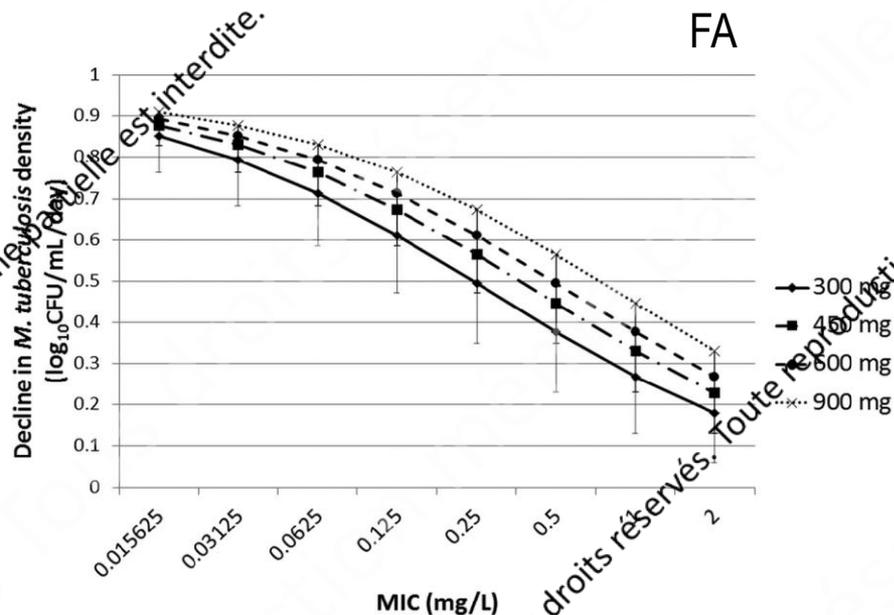
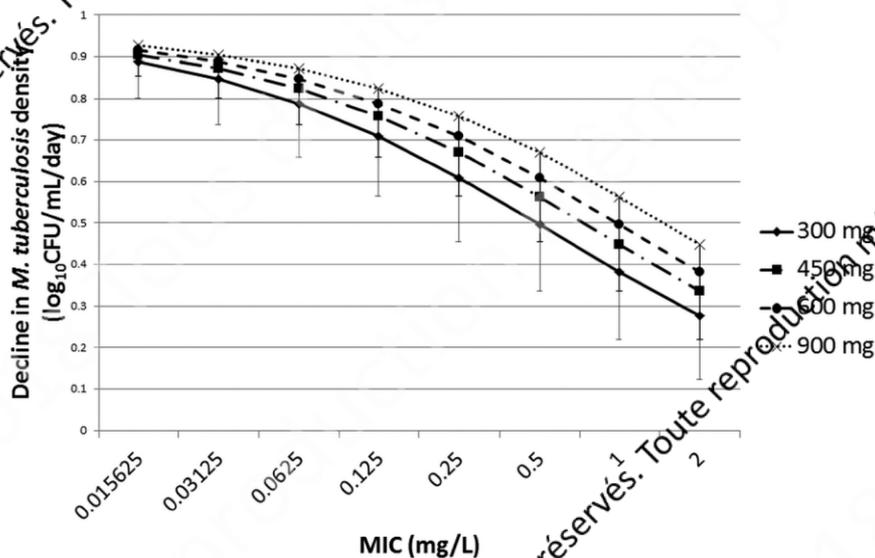
- Chien, CMI, 2015
- 395 cas, Taiwan
- MGIT et LJ, CC: 0,2 et 1 mg/L



Pas en faveur d'une activité contre des souches de bas niveau de résistance

Modélisation : CMI et Posologie

- Lalande, AAC, 2015
- Modélisation d'EBA SA



L'impact négatif d'une ↑ de CMI pourrait être compensé par une ↑ de posologie

Un essai randomisé

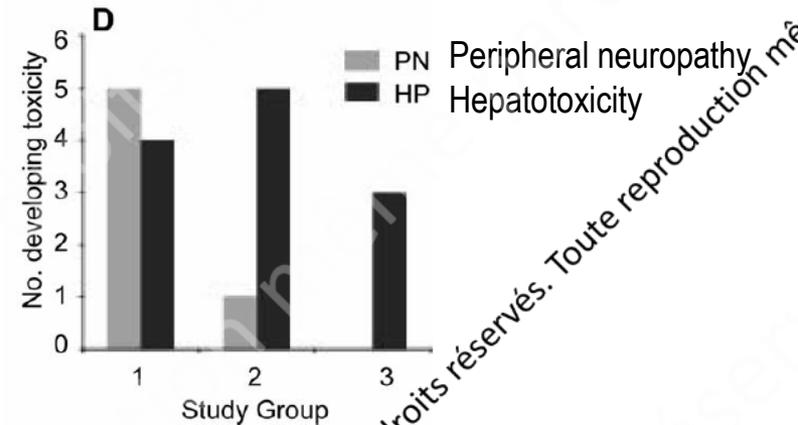
- Katiyar, IJTLD 2008
- Essai randomisé
- Inde, 123 patients
- Traitement TB MDR

INH MIC, mg/l, n (%)

- ≥0.1–<0.2
- ≥0.2–<5
- ≥5

Groupe		
1	2	3
8 (19.1)	7 (17.5)	7 (17.1)
25 (59.5)	24 (60.0)	26 (63.4)
9 (21.4)	9 (22.5)	8 (19.5)

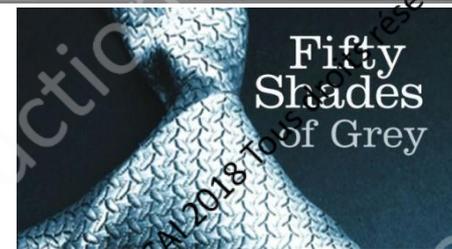
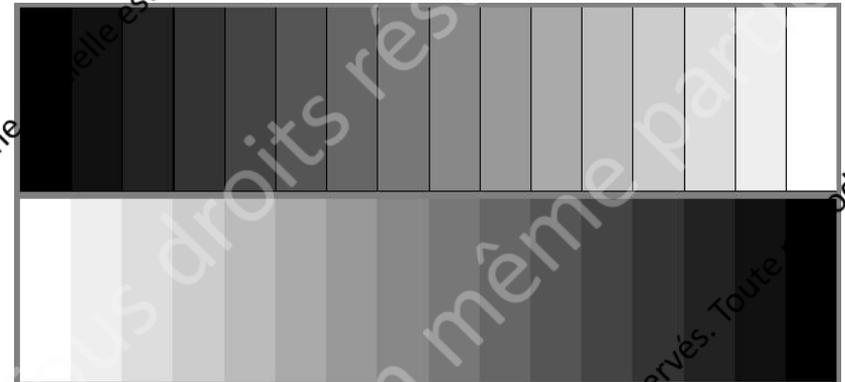
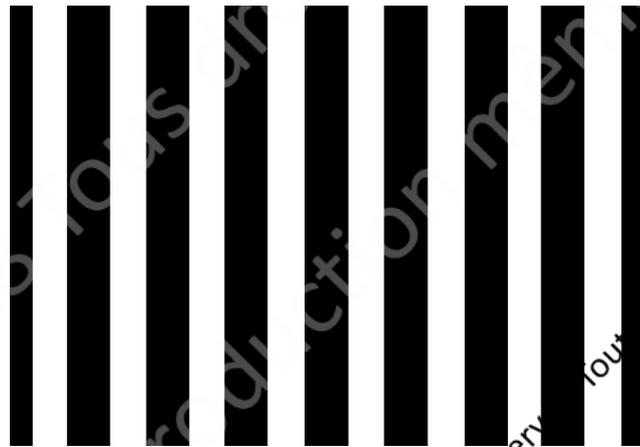
Groupe (N)	Posologie INH (mg/kg)	Délai médian d'obtention d'une culture négative (mois)
1 (42)	16-18	3,4
2 (40)	5	6,4
3 (41)	0	6,6



16-18 mg/kg d'INH réduit le délai de négativation des cultures chez TB MDR
 ! Augmentation fréquence neuropathie
 Pas de distinction entre bas et haut niveau de résistance

Hétérogénéité : conclusion 2

- Niveaux de résistance d'impact variable sur l'efficacité des antibiotiques
- Accepter de passer du noir et blanc aux nuances de gris

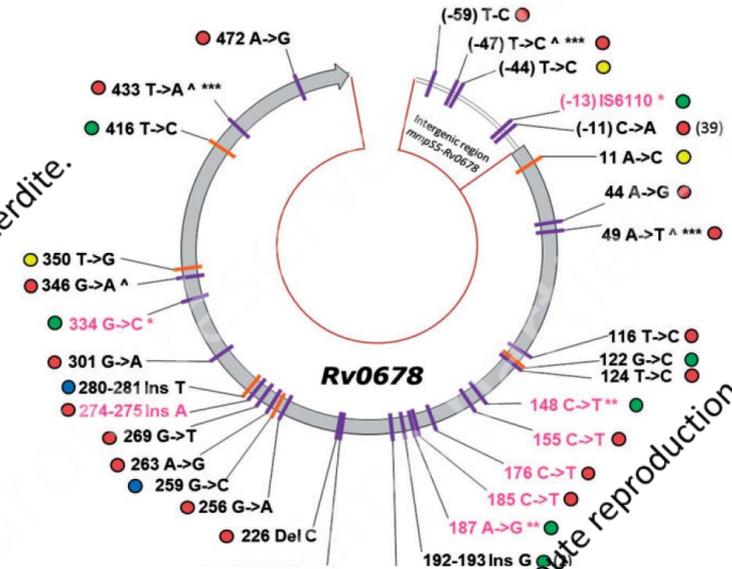


Relation génotype-phénotype : l'exemple de la bédaquiline

- 6% des souches MDR mutées Rv0678

- CMI bédaquiline MICs

- hautes (> 0.24 mg/L, $n = 8$)
- normales (0.03 - 0.24 mg/L, $n = 71$)
- Basses (< 0.03 mg/L, $n = 4$)



Villelas, JAC, 2017

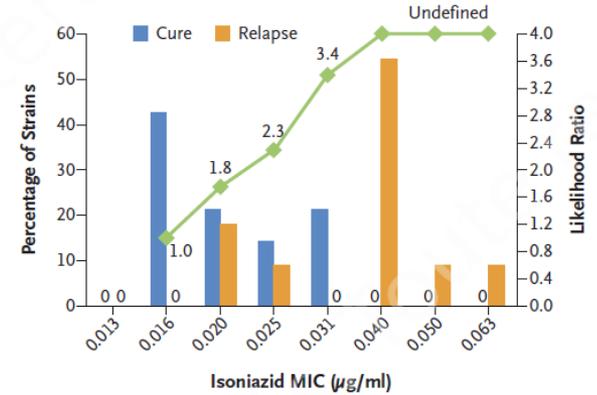
Mutation \neq Résistance

Y a-t-il de l'hétérogénéité parmi les souches sensibles?

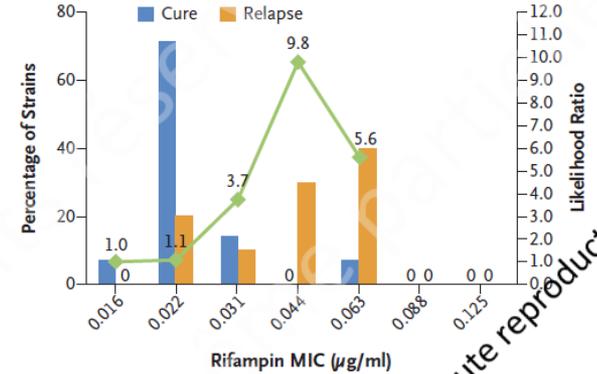
- Colangeli, NEJM 2018
- Impact des CMI de souches sensibles sur le risque de rechute

Corrélation entre risque de rechute et CMI isoniazide ou rifampicine de souches sensibles

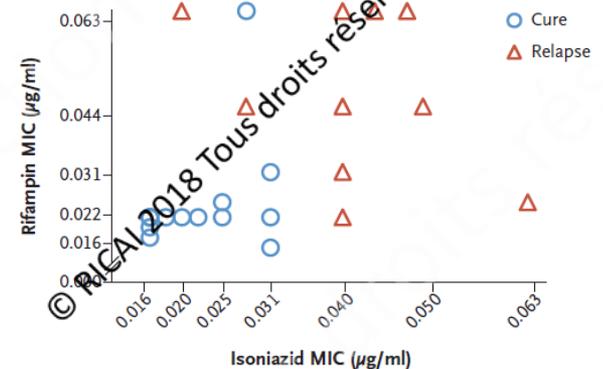
A Likelihood of Relapse in Isoniazid Group (Validation Cohort)



B Likelihood of Relapse in Rifampin Group (Validation Cohort)



C Correlation between Isoniazid and Rifampin MICs in Relapse or Cure (Validation Cohort)



© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Conclusion

- Hétérogénéité double
 - Mélange de bacilles de génotypes différents chez un même patient (sensibles et résistants)
 - Parmi les bacilles dits résistants ou sensibles : variabilité des CMI des souches
- Avec impact variable sur l'efficacité du traitement
- La place exacte des tests génotypiques et phénotypiques pour évaluer ces hétérogénéités reste à établir