



# 38<sup>ème</sup> Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse

Lundi 17 et mardi 18 décembre 2018  
Palais des Congrès de Paris

## Antibio-résistance hétérogène et de bas niveau : mythes et réalités

### Les Entérobactéries

**Dr. Laurent DORTET**

CHU de Bicêtre, Service de Bactériologie-Hygiène  
CNR associé de la résistance aux antibiotiques : Entérobactéries productrices de carbapénèmases  
EA7361, Université Paris-Saclay

## ☐ Résistances de bas niveau

- Définition
- Impact clinique
- Impact diagnostic

## ☐ Résistance hétérogène (ou hétérorésistance)

- Définition et méthodes de détection
- Mécanismes et impact cliniques
  - Mécanismes de résistance stables
  - Mécanismes de résistance instables

## ☐ A mi-chemin entre résistance de bas niveau et hétérorésistance

## ☐ Résistances de bas niveau

### ◆ Définition

- Impact clinique
- Impact diagnostic

## ☐ Résistance hétérogène (ou hétérorésistance)

- Définition et méthodes de détection
- Mécanismes et impact cliniques
  - Mécanismes de résistance stables
  - Mécanismes de résistance instables

## ☐ A mi-chemin entre résistance de bas niveau et hétérorésistance

Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

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

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

- ❑ Identification d'un **gène ou d'une protéine** connu(e) comme étant habituellement **responsable d'une résistance** à un ou plusieurs antibiotiques

**ET**

- ❑ **Absence de phénotype** associé :
  - **Apparente sensibilité** aux antibiotiques censés être la cible de la résistance
  - **Absence** de détection d'une **activité** hydrolytique (ex:  $\beta$ -lactamase)

## ☐ Résistances de bas niveau

### Définition

- Impact clinique
- Impact diagnostic

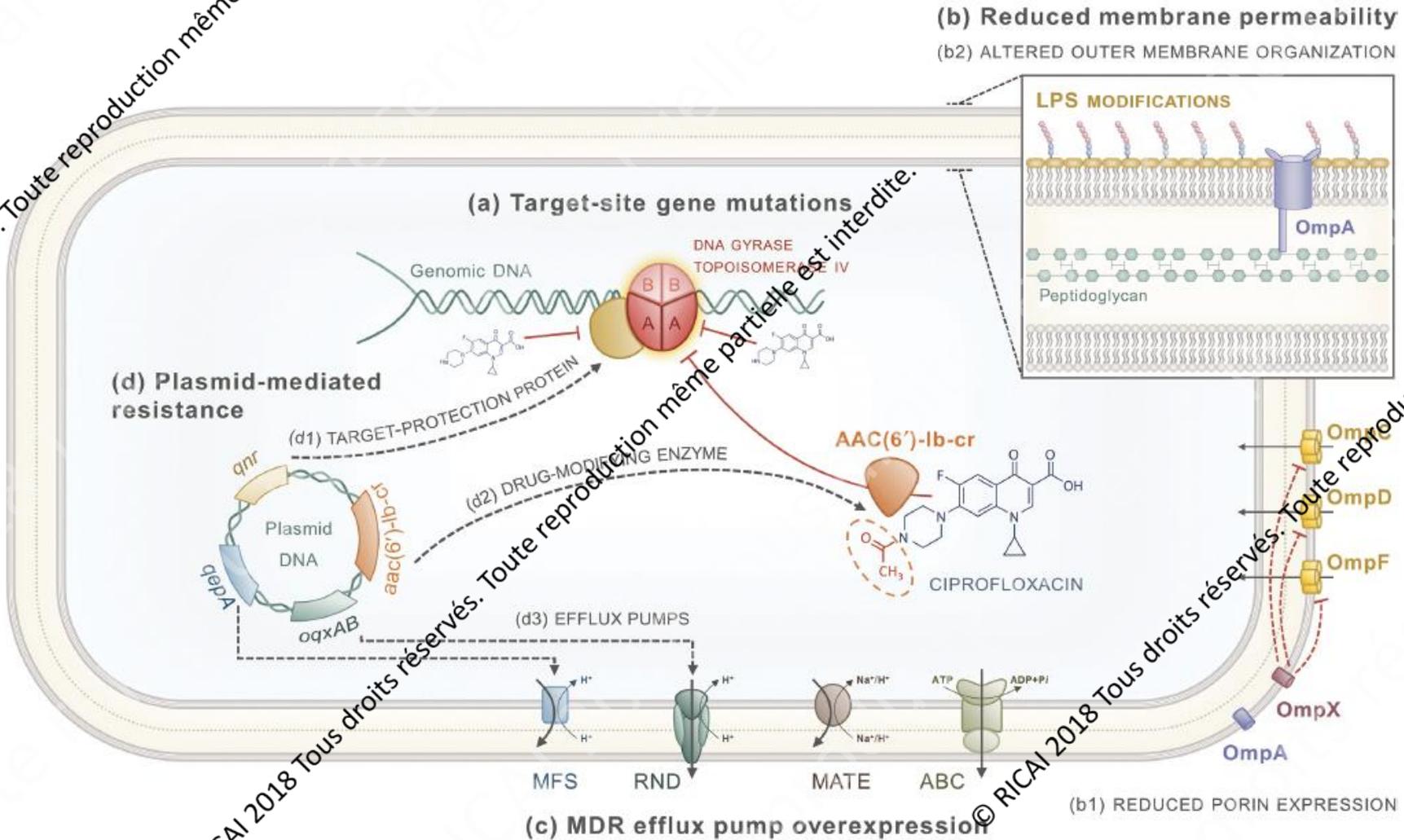
## ☐ Résistance hétérogène (ou hétérorésistance)

- Définition et méthodes de détection
- Mécanismes et impact cliniques
  - Mécanismes de résistance stables
  - Mécanismes de résistance instables

## ☐ A mi-chemin entre résistance de bas niveau et hétérorésistance

# Résistance aux quinolones

## Mécanisme de résistance



# Résistance aux quinolones

## Résistance chromosomique

- Chez les entérobactéries, les résistances chromosomiques sont **souvent** multiples → **résistance de haut niveau**.
- Augmentation graduelle du niveau de résistance en fonction du nombre de mutations dans *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE*



Sauvage



1 mutation dans GyrA



1 mutation dans GyrA + 1 dans ParC



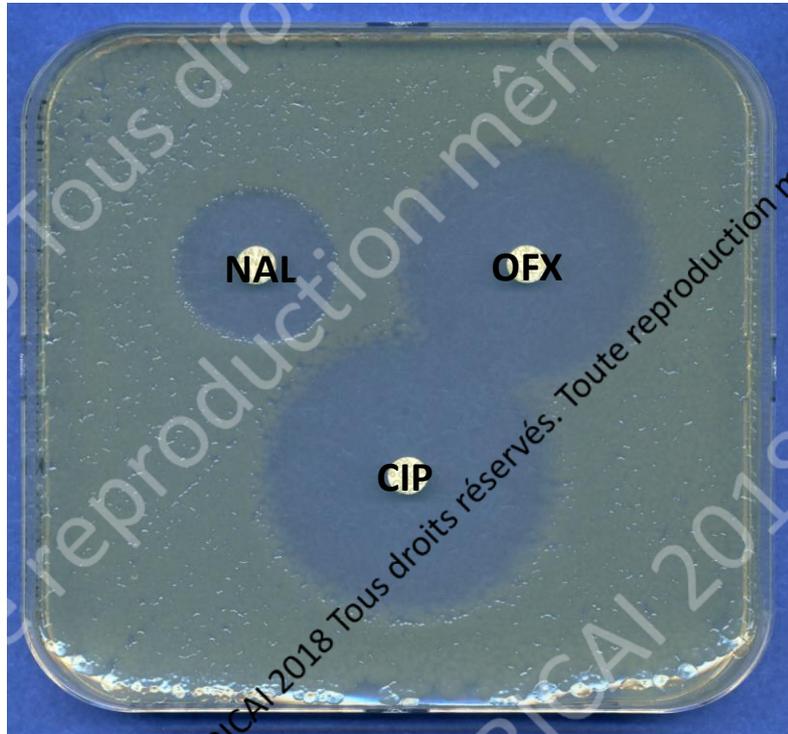
2 mutations dans GyrA + 1 dans ParC

# Résistance aux quinolones

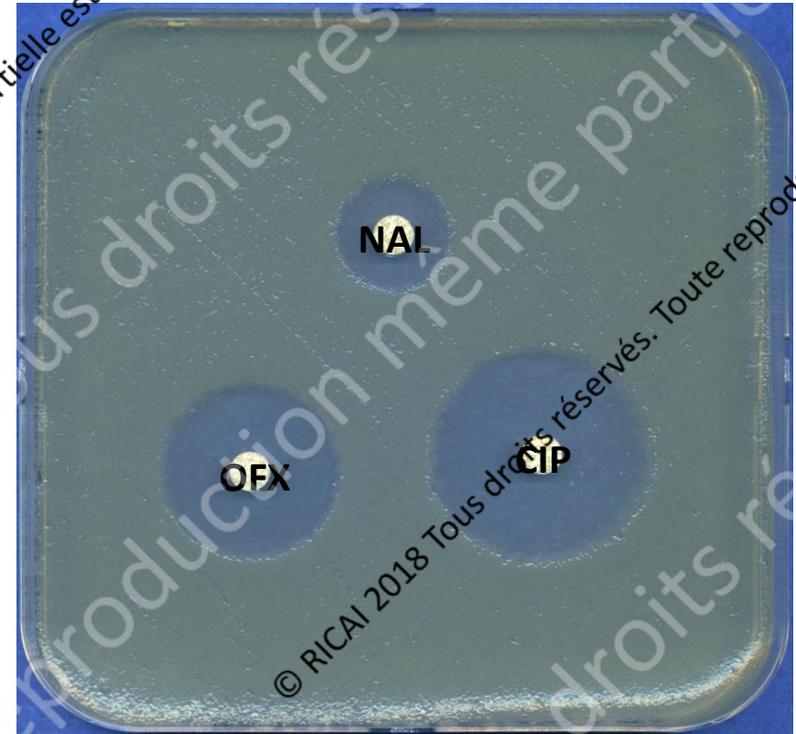
## Qnr : Résistance de bas niveau

- Les protéines Qnr sont responsables de :
- Résistance à l'acide nalidixique ( $\uparrow$  MICs  $\times 2-8$ )
  - **Sensibilité diminuée** aux fluoroquinolones ( $\uparrow$  MICs  $\times 4-128$ )

*E. coli* BM13



*E. coli* Tc *qnrA1*+



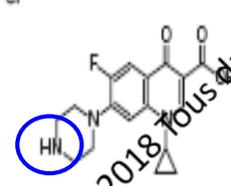
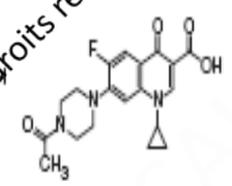
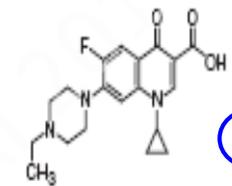
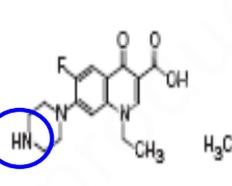
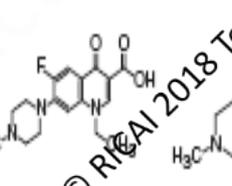
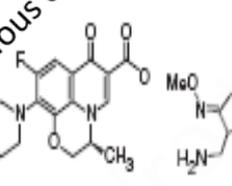
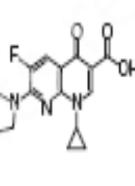
# Résistance aux quinolones

## Résistance plasmidique AAC-(6')-Ib-cr

AAC(6')-Ib avec 2 substitutions (Trp102Arg, Asp179Tyr) → AAC(6')-Ib-cr

Résistance de bas niveau pour les fluoroquinolones possédant un groupement piperazinyl non substitué (**Norfloxacine** et **Ciprofloxacine**)



Strain	Ciprofloxacine	N-acetyl ciprofloxacine	Enrofloxacine	Norfloxacine	Pefloxacine	Levofloxacine	Gatifloxacine
DH10B pBAD24	0.02	0.08	0.02	0.156	0.08	0.08	0.005
DH10B pBAD24-aac(6')-Ib-cr	0.04-0.08	0.08	0.02	0.625	0.08	0.08	0.005
Chemical structure							

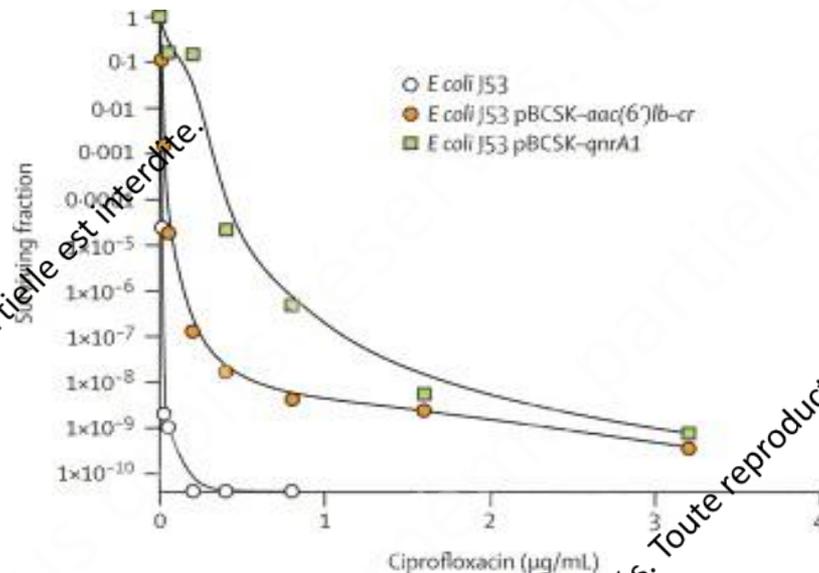
# Résistance aux quinolones

## Impact cliniques des résistances plasmidiques de bas niveau

### □ Qnr et AAC-(6')-Ib-cr

augmentation de la concentration prévenant le risque d'apparition de mutant d'un facteur 10 →

**Risque accru de sélection de mutants possédant de haut niveaux de résistance**



### □ 3 modèles expérimentaux de souris (souches Qnr +):

- Pneumonia: Différence de **survie** (100% vs. 53.3%)
- UTI: **Diminution de l'activité bactéricide** de la Ciprofloxacine (similaire à un mutant gyrA)

Robicsek *et al.*, Lancet Infect Dis 2006; 6:329-340

Rodriguez-Martinez *et al.*, Clin Microbiol Infect 2008; 14:691-697

Allou *et al.*, Antimicrob Agents Chemother 2009; 53:4292-4297

Jakobsen *et al.*, J Antimicrob Chemother 2012; 67:2438-2444

# Les carbapénèmes de type OXA-48

## Résistance de bas niveau (sensibilité) aux carbapénèmes



Les **CMI parfois très basses pour les carbapénèmes** (0,38 mg/L pour l'ertapénème et 0,25 mg /L pour l'imipénème, dans le cas présent)

# Les carbapénèmases de type OXA-48

## Impact clinique de cette résistance de bas niveau modèle murin d'infection péritonéale



Broad-Spectrum  $\beta$ -Lactam Antibiotics for Treating Experimental Peritonitis in Mice Due to *Klebsiella pneumoniae* Producing the Carbapenemase OXA-48

Olivier Mimoz,<sup>a</sup> Nicolas Grégoire,<sup>a</sup> Laurent Poirer,<sup>b</sup> Manuella Marliat,<sup>a</sup> William Couet,<sup>a</sup> and Patrice Nordmann<sup>b</sup>

doi:10.1128/AAC.06069-11

TABLE 1 Number of dead mice 72 h after antibiotic treatment and derived ED<sub>50</sub> estimate

Antibiotic	No. of mice dead after receiving a dose (mg/kg) <sup>a</sup> of:								ED <sub>50</sub> (mg/kg)
	0.1	1	10	20	40	60	80	100	
Ertapenem	6	6	6	6	5	6	4	3	100
Imipenem-cilastatin	6	6	6	6	5	5	5	4	>100
Ceftazidime	6	5	5		1	0	1	0	24
Cefotaxime	6	6	6	6	5	5	6	5	>100
Piperacillin-tazobactam	6	6	6	6	6	6	6	6	>100

<sup>a</sup> There were six mice per dose group.

**100 % de létalité avec un traitement par carbapénème malgré l'apparente sensibilité de la souche (CMI imipénème = 0,50 mg/L)**

# Les carbapénèmases de type OXA-48

## Impact clinique de cette résistance de bas niveau modèle murin d'infection péritonéale



Broad-Spectrum  $\beta$ -Lactam Antibiotics for Treating Experimental Peritonitis in Mice Due to *Klebsiella pneumoniae* Producing the Carbapenemase OXA-48

doi:10.1128/AAC.06069-11

Olivier Mimoz,<sup>a</sup> Nicolas Grégoire,<sup>a</sup> Laurent Poiriel,<sup>b</sup> Manuella Marliat,<sup>a</sup> William Couet,<sup>a</sup> and Patrice Nordmann<sup>b</sup>

TABLE 1 Number of dead mice 72 h after antibiotic treatment and derived ED<sub>50</sub> estimates

Antibiotic	No. of mice dead after receiving a dose (mg/kg) <sup>a</sup> of:								ED <sub>50</sub> (mg/kg)
	0.1	1	10	20	40	60	80	100	
Ertapenem	6	6	6	6	5	6	4	3	100
Imipenem-cilastatin	6	6	6	6	5	5	5	4	>100
Ceftazidime	6	5	5		1	0	1	0	24
Cefotaxime	6	6	6	6	5	5	6	5	>100
Piperacillin-tazobactam	6	6	6	6	6	6	6	6	>100

<sup>a</sup> There were six mice per dose group.



Efficacy of Humanized Carbapenem and Ceftazidime Regimens against *Enterobacteriaceae* Producing OXA-48 Carbapenemase in a Murine Infection Model

March 2014 Volume 58 Number 3

Dea E. Wiskirchen,<sup>a</sup> Patrice Nordmann,<sup>b,c</sup> Jared L. Crandon,<sup>d</sup> David P. Nicolau<sup>d,e</sup>

of  $\geq 1$  log CFU were observed with all agents for the wild-type strain. Consistent with low MICs, ceftazidime and levofloxacin exhibited efficacy against the isogenic OXA-48 strain, whereas doripenem did not, despite having a susceptible MIC; no activity was observed with ertapenem, consistent with a resistant MIC. Similar trends were observed for the clinical isolates evaluated.



# Les carbapénèmases de type OXA-48

## Impact clinique de cette résistance de bas niveau



Antimicrobial Agents  
and Chemotherapy®

### Treatment of Infections by OXA-48-Producing *Enterobacteriaceae*

November 2018 Volume 62 Issue 11 e01195-18

Adam Stewart,<sup>a</sup> Patrick Harris,<sup>a</sup> Andrew Henderson,<sup>a</sup> David Paterson<sup>a</sup>

- Carbapénème en monothérapie : Taux de succès variable de **0% à 66%**
- **Meropénème et imipénème** : seuls carbapénèmes utilisés en monothérapies

ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, May 2011, p. 2420-2423  
0066-4804/11/\$12.00 doi:10.1128/AAC.01452-10  
Copyright © 2011, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 55, No. 5

### Outbreak of OXA-48-Positive Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates in France<sup>▽</sup>

Gaëlle Cuzon,<sup>1</sup> Jocelyne Ouanich,<sup>2</sup> Remy Gondret,<sup>3</sup> Thierry Naas,<sup>1</sup> and Patrice Nordmann<sup>1\*</sup>

- 6 patients traités par un carbapénème (IMP, MEM ou DOR) +/- colistine
- **4 décès**

# Les carbapénèmases

## Impact clinique d'une résistance de bas niveau



### Effect of Resistance Mechanisms on the Inoculum Effect of Carbapenem in *Klebsiella pneumoniae* Isolates with Borderline Carbapenem Resistance

Amos Adler, Ma'ayan Ben-Dalak, Ina Chmelnitsky, Yehuda Carmeli

National Center for Infection Control, Ministry of Health, Tel Aviv, Israel, Section of Epidemiology, Tel-Aviv Sourasky Medical Center, Tel Aviv, Israel

August 2015 Volume 59 Number 8

Evaluation sur 32 *K. pneumoniae* (9 CTX-M, 9 KPC, 12 OXA-48, 2 VIM) possédant des **CMI borderline** aux carbapénèmes de :

- **Effet inoculum** (CMI méropénèm avec un inoculum à  $10^5$  ou  $10^6$  vs standard  $10^4$ )
- **CMB/CMI** Imipénème et méropénème

# Les carbapénèmases

Strain	Lactamase gene(s)	BOX-PCR type	MIC (µg/ml) of <sup>a</sup> :			Amino acid sequence of <sup>b</sup> :			Inoculum effect	Imipenem MIC/ MBC (µg/ml) <sup>c</sup>	Meropenem MIC/ MBC (µg/ml) <sup>c</sup>
			Imi	Mero	Ert	OmpK35	OmpK36	OmpK37			
IH9	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	A	0.5	0.5	4	I	NS	I	Negative	0.25/0.5	2/2
3794	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	B	0.25	2	≥32	I	T	I	Negative	0.5/0.5	2/4
8562	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	C	0.25	2	16	I	I	T	Positive	0.5/1	2/2
8486	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	D	1	2	8	I	I	I	Negative	0.5/2	2/4
4893	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	B	0.25	0.5	8	NS	I	I	Negative	0.5/1	1/1
7524	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	E	0.5	1	8	T	I	I	Positive	0.5/1	1/1
4703	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	F	0.25	0.5	8	T	I	I	Positive	0.25/0.5	0.5/0.5
4667	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	G	0.25	1	2	I	I	I	Negative	0.5/1	1/1
5466	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	H	2	0.5	16	T	I	I	Negative	0.5/1	0.5/2
10010	<i>bla</i> <sub>KPC-3</sub>	ST258	2	2	8	I	I	I	Positive	8/8	8/8
3728	<i>bla</i> <sub>KPC-3</sub>	J	2	4	4	I	I	I	Positive	8/8	32/32
3581	<i>bla</i> <sub>KPC-3</sub>	J	4	2	4	I	I	I	Positive	8/8	32/32
10001	<i>bla</i> <sub>KPC-3</sub>	ST258	0.5	0.25	2	I	I	NS	Positive	4/16	8/8
10009	<i>bla</i> <sub>KPC-3</sub>	ST258	0.5	1	8	I	I	I	Positive	8/8	1/2
10014	<i>bla</i> <sub>KPC-3</sub>	I	1	1	8	I	I	I	Positive	4/8	1/≥16
5643	<i>bla</i> <sub>KPC-3</sub>	K	4	2	8	I	I	I	Positive	2/8	8/16
7212	<i>bla</i> <sub>KPC-3</sub>	I	2	4	≥32	I	I	I	Positive	16/16	≥64/NA <sup>d</sup>
4234	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	L	4	1	8	I	T	I	Positive	4/8	16/32
8367	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	X	1	2	16	I	I	I	Negative	2/4	2/2
Y1308	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	M	1		16	T	I	I	Positive	2/2	1/8
Y1379	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	N	1	0.5	4	I	I	I	Positive	2/2	2/2
Y1554	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	O		0.5	4	I	I	I	Positive	2/4	0.5/2
Y1800	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	N	1	0.5	4	I	I	T	Positive	4/8	2/2
Y1966	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	P	1	0.5	4	I	I	I	Positive	2/2	0.5/0.5
Y1967	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	O	0.5	2	16	T	I	I	Positive	1/2	2/2
Y2015	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	O	1	0.5	4	I	I	I	Positive	1/1	0.5/2
Y2065	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	M	0.5	0.5	16	T	I	I	Positive	0.5/2	1/2
Y2153	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	R	1	1	16	I	I	I	Positive	1/1	2/2
Y2183	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	S	1	0.5	4	I	I	I	Positive	2/2	1/1
Y2185	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	T	0.5	1	8	I	I	I	Positive	0.5/1	2/2
Y2181	<i>bla</i> <sub>VIM-4</sub>	U	2	1	4	I	I	I	Positive	8/8	≥32/NA <sup>d</sup>
Y2279	<i>bla</i> <sub>VIM-4</sub>	V	4	1	4	I	I	I	Positive	4/8	≥32/NA <sup>d</sup>
Y2091	<i>bla</i> <sub>VIM-1</sub>	W	1	2	16	I	I	I	Positive	16/16	≥32/NA <sup>d</sup>

CTX-M

KPC

OXA-48

VIM

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

# Les carbapénèmases

## ➔ Effet inoculum

Strain	Lactamase gene(s)	BOX-PCR type	MIC (µg/ml) of <sup>a</sup> :			Amino acid sequence of <sup>b</sup> :			Inoculum effect	Imipenem MIC/ MBC (µg/ml) <sup>c</sup>	Meropenem MIC/ MBC (µg/ml) <sup>c</sup>
			Imi	Mero	Ert	OmpK35	OmpK36	OmpK37			
CTX-M	IH9 <i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	A	0.5	0.5	4	I	NS	I	Negative	0.25/0.5	2/2
	3794 <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	B	0.25	2	≥32	I	T	I	Negative	0.5/0.5	2/4
	8562 <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	C	0.25	2	16	I	I	T	Positive	0.5/1	2/2
	8486 <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	D	1	2	8	I	I	I	Negative	0.5/2	2/4
	4893 <i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	B	0.25	0.5	8	NS	I	I	Negative	0.5/1	1/1
	7524 <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	E	0.5	1	8	T	I	I	Positive	0.5/1	1/1
	4703 <i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	F	0.25	0.5	8	T	I	I	Positive	0.25/0.5	0.5/0.5
	4667 <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	G	0.25	1	2	I	I	I	Negative	0.5/1	1/1
	5466 <i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	H	2	0.5	16	T	I	I	Negative	0.5/1	0.5/2
KPC	10010 <i>bla</i> <sub>KPC-3</sub>	ST258	2	2	8	I	I	I	Positive	8/8	8/8
	3728 <i>bla</i> <sub>KPC-3</sub>	J	2	4	4	I	I	I	Positive	8/8	32/32
	3581 <i>bla</i> <sub>KPC-3</sub>	J	4	2	4	I	I	I	Positive	8/8	32/32
	10001 <i>bla</i> <sub>KPC-3</sub>	ST258	0.5	0.25	2	I	I	NS	Positive	4/16	8/8
	10009 <i>bla</i> <sub>KPC-3</sub>	ST258	0.5	1	8	I	I	I	Positive	8/8	1/2
	10014 <i>bla</i> <sub>KPC-3</sub>	I	1	1	8	I	I	I	Positive	4/8	1/≥16
	5643 <i>bla</i> <sub>KPC-3</sub>	K	4	2	8	I	I	I	Positive	2/8	8/16
	7212 <i>bla</i> <sub>KPC-3</sub>	I	2	4	≥32	I	I	I	Positive	16/16	≥64/NA <sup>d</sup>
	4234 <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	L	4	1	8	I	T	I	Positive	4/8	16/32
OXA-48	8367 <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	X	1	2	16	I	I	I	Negative	2/4	2/2
	Y1308 <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	M	1		16	T	I	I	Positive	2/2	1/8
	Y1379 <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	N	1	0.5	4	I	I	I	Positive	2/2	2/2
	Y1554 <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	O		0.5	4	I	I	I	Positive	2/4	0.5/2
	Y1800 <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	N	1	0.5	4	I	I	T	Positive	4/8	2/2
	Y1966 <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	P	1	0.5	4	I	I	I	Positive	2/2	0.5/0.5
	Y1967 <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	O	0.5	2	16	T	I	I	Positive	1/2	2/2
	Y2015 <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	O	1	0.5	4	I	I	I	Positive	1/1	0.5/2
	Y2065 <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	M	0.5	0.5	16	T	I	I	Positive	0.5/2	1/2
	Y2153 <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	R	1	1	16	I	I	I	Positive	1/1	2/2
	Y2183 <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	S	1	0.5	4	I	I	I	Positive	2/2	1/1
	Y2185 <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	T	0.5	1	8	I	I	I	Positive	0.5/1	2/2
	VIM	Y2181 <i>bla</i> <sub>VIM-4</sub>	U	2	1	4	I	I	I	Positive	8/8
Y2279 <i>bla</i> <sub>VIM-4</sub>		V	4	1	4	I	I	I	Positive	4/8	≥32/NA <sup>d</sup>
Y2091 <i>bla</i> <sub>VIM-1</sub>		W	1	2	16	I	I	I	Positive	16/16	≥32/NA <sup>d</sup>

CTX-M

KPC

OXA-48

VIM

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

# Les carbapénèmases

## Effet inoculum et CMB/CMi

Strain	Lactamase gene(s)	BOX-PCR type	MIC (µg/ml) of <sup>a</sup> :			Amino acid sequence of <sup>b</sup> :			Inoculum effect	Imipenem MIC/ MBC (µg/ml) <sup>c</sup>	Meropenem MIC/ MBC (µg/ml) <sup>c</sup>
			Imi	Mero	Ert	OmpK35	OmpK36	OmpK37			
IH9	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	A	0.5	0.5	4	I	NS	I	Negative	0.25/0.5	2/2
3794	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	B	0.25	2	≥32	I	T	I	Negative	0.5/0.5	2/4
8562	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	C	0.25	2	16	I	I	T	Positive	0.5/1	2/2
8486	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	D	1	2	8	I	I	I	Negative	0.5/2	2/4
4893	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	B	0.25	0.5	8	NS	I	I	Negative	0.5/1	1/1
7524	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	E	0.5	1	8	T	I	I	Positive	0.5/1	1/1
4703	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	F	0.25	0.5	8	T	I	I	Positive	0.25/0.5	0.5/0.5
4667	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	G	0.25	1	2	I	I	I	Negative	0.5/1	1/1
5466	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	H	2	0.5	16	T	I	I	Negative	0.5/1	0.5/2
10010	<i>bla</i> <sub>KPC-3</sub>	ST258	2	2	8	I	I	I	Positive	8/8	8/8
3728	<i>bla</i> <sub>KPC-3</sub>	J	2	4	4	I	I	I	Positive	8/8	32/32
3581	<i>bla</i> <sub>KPC-3</sub>	J	4	2	4	I	I	I	Positive	8/8	32/32
10001	<i>bla</i> <sub>KPC-3</sub>	ST258	0.5	0.25	2	I	I	NS	Positive	4/16	8/8
10009	<i>bla</i> <sub>KPC-3</sub>	ST258	0.5	1	8	I	I	I	Positive	8/8	1/2
10014	<i>bla</i> <sub>KPC-3</sub>	I	1	1	8	I	I	I	Positive	4/8	1/≥16
5643	<i>bla</i> <sub>KPC-3</sub>	K	4	2	8	I	I	I	Positive	2/8	8/16
7212	<i>bla</i> <sub>KPC-3</sub>	I	2	4	≥32	I	I	I	Positive	16/16	≥64/NA <sup>d</sup>
4234	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	L	4	1	8	I	T	I	Positive	4/8	16/32
8367	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	X	1	2	16	I	I	I	Negative	2/4	2/2
Y1308	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	M	1		16	T	I	I	Positive	2/2	1/8
Y1379	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	N	1	0.5	4	I	I	I	Positive	2/2	2/2
Y1554	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	O		0.5	4	I	I	I	Positive	2/4	0.5/2
Y1800	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	N	1	0.5	4	I	I	T	Positive	4/8	2/2
Y1966	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	P	1	0.5	4	I	I	I	Positive	2/2	0.5/0.5
Y1967	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	O	0.5	2	16	T	I	I	Positive	1/2	2/2
Y2015	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	O	1	0.5	4	I	I	I	Positive	1/1	0.5/2
Y2065	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	M	0.5	0.5	16	T	I	I	Positive	0.5/2	1/2
Y2153	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	R	1	1	16	I	I	I	Positive	1/1	2/2
Y2183	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	S	1	0.5	4	I	I	I	Positive	2/2	1/1
Y2185	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	T	0.5	1	8	I	I	I	Positive	0.5/1	2/2
Y2181	<i>bla</i> <sub>VIM-4</sub>	U	2	1	4	I	I	I	Positive	8/8	≥32/NA <sup>d</sup>
Y2279	<i>bla</i> <sub>VIM-4</sub>	V	4	1	4	I	I	I	Positive	4/8	≥32/NA <sup>d</sup>
Y2091	<i>bla</i> <sub>VIM-1</sub>	W	1	2	16	I	I	I	Positive	16/16	≥32/NA <sup>d</sup>

CMB/CMi ≥ 4

CTX-M

KPC

OXA-48

VIM

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

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

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

## ☐ Résistances de bas niveau

### Définition

- Impact clinique
- **Impact diagnostic**

## ☐ Résistance hétérogène (ou hétérorésistance)

- Définition et méthodes de détection
- Mécanismes et impact cliniques
  - Mécanismes de résistance stables
  - Mécanismes de résistance instables

## ☐ A mi-chemin entre résistance de bas niveau et hétérorésistance

❑ OXA-244 = mutant ponctuel de OXA-48 (Arg214Gln)

❑ **Activité hydrolytique : carbapénèmes et témocilline**  
**OXA-244 <<< OXA-48**

Potron et al. IJAA 2016

OXA-48



OXA-244



Isolates	Origin	Susceptibility					Carba NP test	RAPIDEC® Carba NP	MALDI-TOF MS hydrolysis assay
		IMP (mg/L)	MEM (mg/L)	ETC (mg/L)	TEM (mg/L)	MOX (mm)			
86J1	Egypt	0.5	0.5	2	>1024	7	+	+	+
62D3	unknown	0.38	0.38	1	128	21	+	+	+
69E6	unknown	0.25	0.38	3	128	20	+/-	+	+
78B5	unknown	0.38	0.5	3	256	21	+	+	+
35J9	France	0.5	0.75	2	96	21	-	+/-	-
73G4	Egypt	0.25	0.19	0.75	128	20	+	+	+
85H4	Egypt	0.38	0.25	2	384	20	+/-	+/-	-

❑ OXA-244 = mutant ponctuel de OXA-48 (Arg214Gln)

❑ **Activité hydrolytique : carbapénèmes et témocilline**  
**OXA-244 <<< OXA-48**

Potron et al. IJAA 2016

OXA-48



OXA-244



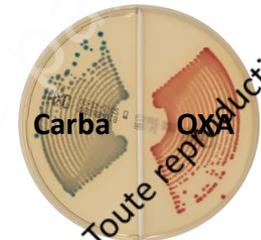
AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY  
**Antimicrobial Agents and Chemotherapy®**

### OXA-244-Producing *Escherichia coli* Isolates, a Challenge for Clinical Microbiology Laboratories

September 2017 Volume 61 Issue 9 e00818-17

Yannick Hoyos-Mallico, <sup>a</sup> Thierry Naas, <sup>a,b,c,d</sup> Rémy A. Bonnin, <sup>a,b,c,d</sup> Rafael Patino, <sup>d</sup> Philippe Glaser, <sup>d</sup> Nicolas Fortineau, <sup>a,b,c,d</sup> Laurent Dortet, <sup>a,b,c,d</sup>

ChromID® CARBA SMART



Isolates	Origin	Susceptibility					Carba NP test	RAPIDEC® Carba NP	MALDI-TOF MS hydrolysis assay	ChromID® ESBL	ChromID® CARBA SMART (ChromID® OXA-48   ChromID® CARBA)
		IMP (mg/L)	MEM (mg/L)	ETC (mg/L)	TEM (mg/L)	MOX (mm)					
86J1	Egypt	0.5	0.5	2	>1024	7	+	+	+	+	+   -
62D3	unknown	0.38	0.38	1	128	21	+	+	+	+	-   -
69E6	unknown	0.25	0.38	3	128	20	+/-	+	+	+	-   -
78B5	unknown	0.38	0.5	3	256	21	+	+	+	+	-   -
35J9	France	0.5	0.75	2	96	21	-	+/-	-	+	-   -
73G4	Egypt	0.25	0.19	0.75	128	20	+	+	+	+	-   -
85H4	Egypt	0.38	0.25	2	384	20	+/-	+/-	-	+	-   -

## ☐ Résistances de bas niveau

### Définition

- Impact clinique
- Impact diagnostic

## ☐ Résistance hétérogène (ou hétérorésistance)

- Définition et méthodes de détection
- Mécanismes et impact cliniques
  - Mécanismes de résistance stables
  - Mécanismes de résistance instables

## ☐ A mi-chemin entre résistance de bas niveau et hétérorésistance

# Hétérorésistance

## Définition

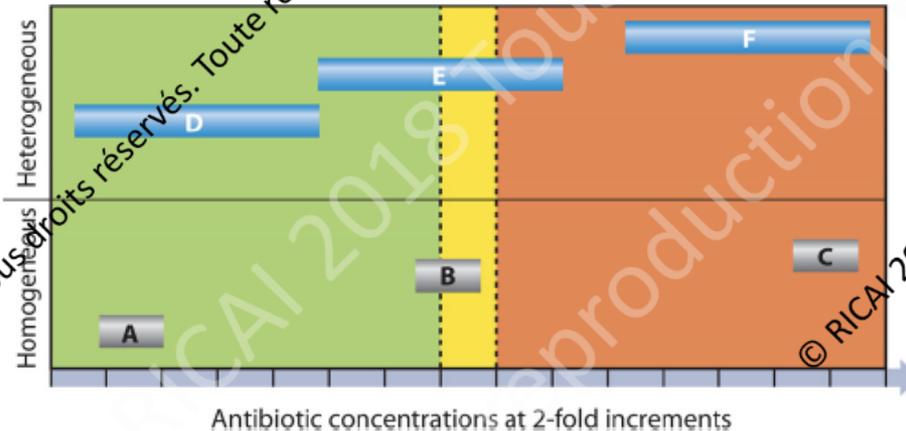
Au sein d'une **population bactérienne isogénique**, plusieurs **sous-populations** présentent une **sensibilité différente** à un antibiotique



Antimicrobial Heteroresistance: an Emerging Field in Need of Clarity

Omar M. El-Halfawy,<sup>a,b</sup> Miguel A. Valvano<sup>a,c</sup>

January 2015 Volume 28 Number 1



# Hétérorésistance

## Méthodes de détection

### ❑ Diffusion en milieu solide : E-test ou disque

= Méthode de **screening** à confirmer par Population Analysis Profiling (PAP)

**Présence de colonies dans la zone d'inhibition**

### ❑ CMI en milieu liquide (microdilution)

CMI non reproductibles

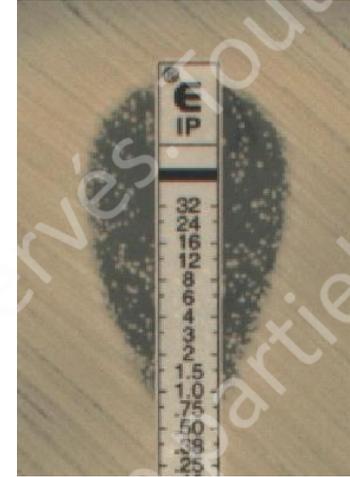
**Présence de saut (« skip wells »)**

### ❑ Population Analysis Profiling (PAP)

= Quantification de la culture bactérienne avec différentes concentrations d'antibiotique

Comptage des CFU

- Concentrations croissantes d'ATB (2x)



**Non applicable  
en routine**



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

**Step I**  
Preliminary detection of heteroresistance  
*Parallel to routine antibiotic sensitivity testing*

Disc Diffusion Assay or Etest Assay

Discrete colonies in the clear zone of inhibition?

Yes

Heteroresistance

No

Homogeneous population

**Step II**  
Confirmation of heteroresistance

Population Analysis Profiling (PAP)  
*by cfu count or turbidimetrically with 2-fold antibiotic increments*

Difference between the lowest concentration exhibiting maximum inhibition and the highest non-inhibitory concentration?

≤4-fold

Homogeneous population

*Unlikely if positive for heteroresistance in Step I.*

>8-fold

Heteroresistance

8-fold

Intermediate Heterogeneity

**Completely Susceptible**  
*(Fig. 1D)*

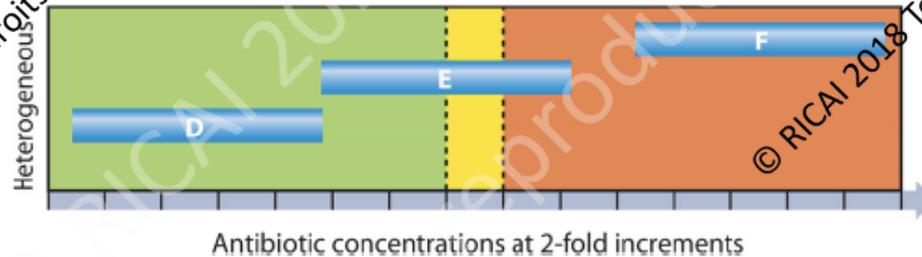
Monitor the least responsive subpopulations for development of resistance to the antibiotic.

**Classical Heteroresistance**  
*(Fig. 1E)*

Antibiotic therapy may select for resistant subpopulation. Adjust dose or use another antibiotic to which the entire population is sensitive.

**Entirely Resistant**  
*(Fig. 1F)*

Chemical communication of resistance is the major concern. Monitor protection of less resistant bacteria in mixed infection.



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

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

## ☐ Résistances de bas niveau

### Définition

- Impact clinique
- Impact diagnostic

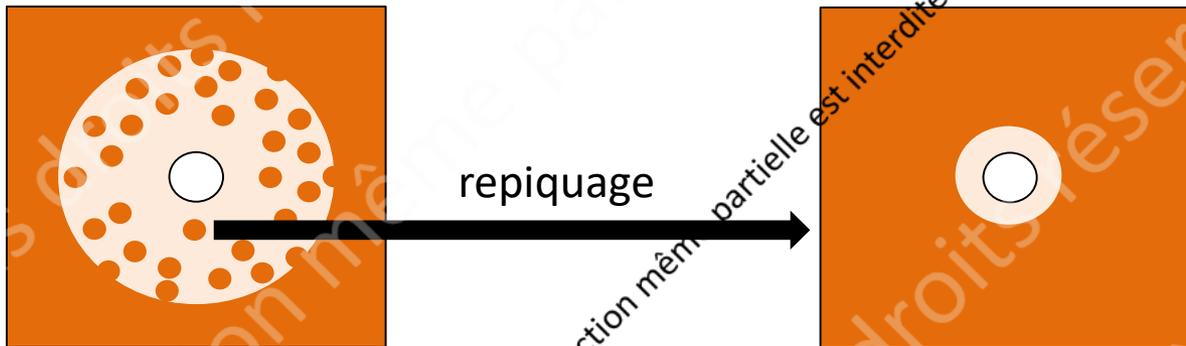
## ☐ **Résistance hétérogène (ou hétérorésistance)**

- Définition et méthodes de détection
- **Mécanismes et impact cliniques**
  - Mécanismes de résistance stables
  - Mécanismes de résistance instables

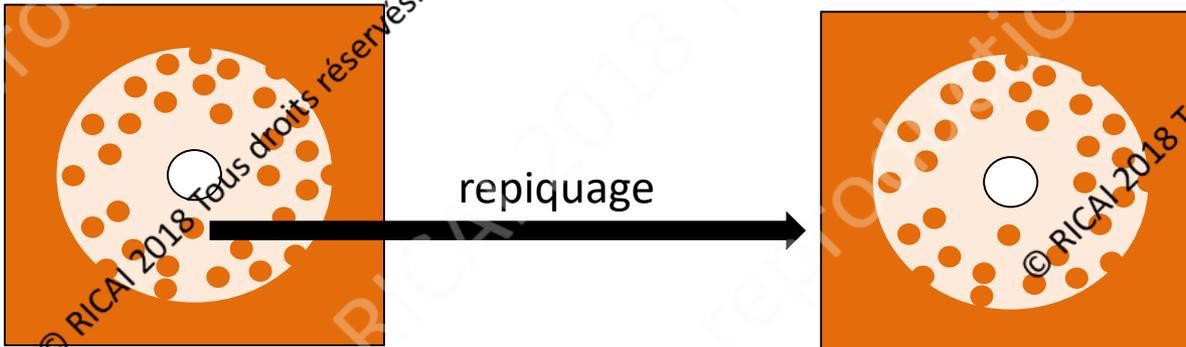
## ☐ A mi-chemin entre résistance de bas niveau et hétérorésistance

# Controverse sur les mécanismes à considérés comme responsables d'hétérorésistance

## ☐ Les mécanismes de résistance **stables**

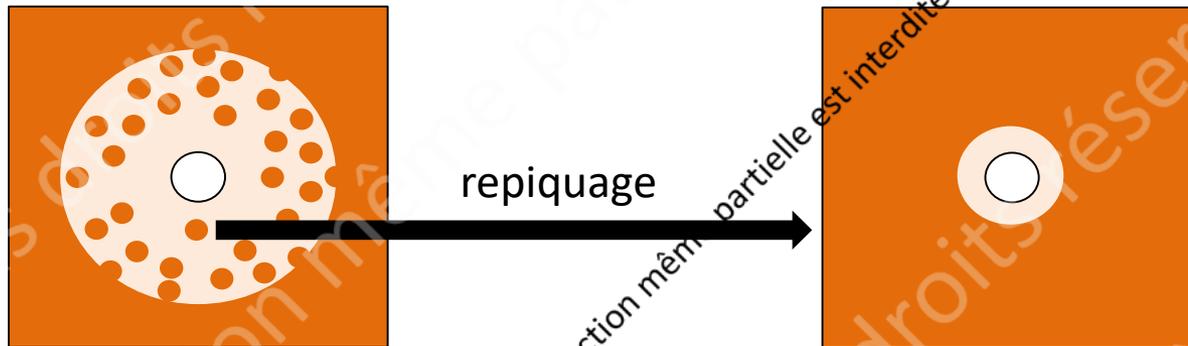


## ☐ Les mécanismes de résistance **instables**



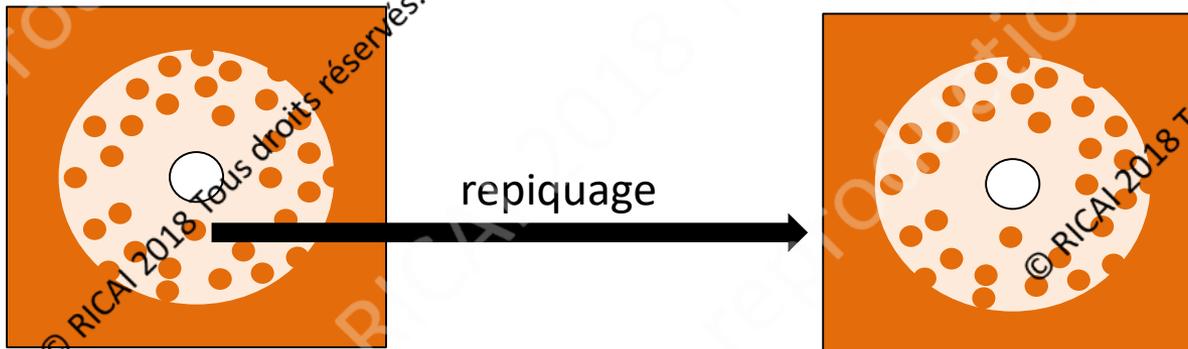
# Controverse sur les mécanismes à considérer comme responsables d'hétérorésistance

## ☐ Les mécanismes de résistance **stables**



**Mutants +++**  
**Hétérorésistance**  
**???**

## ☐ Les mécanismes de résistance **instables**



**Hétérorésistance**  
**+++**

## ☐ Résistances de bas niveau

### Définition

- Impact clinique
- Impact diagnostic

## ☐ Résistance hétérogène (ou hétérorésistance)

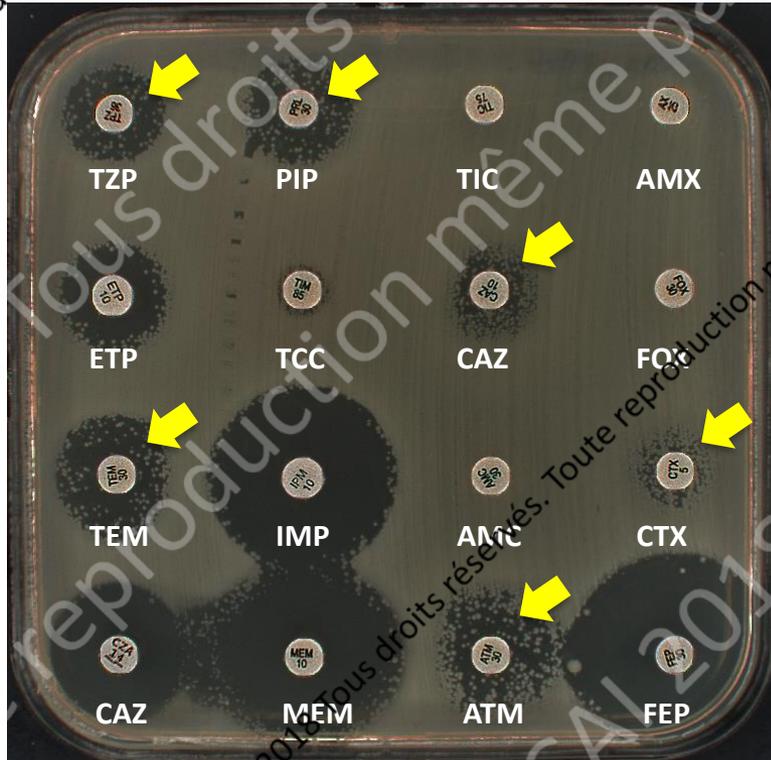
- Définition et méthodes de détection
- **Mécanismes et impact cliniques**
  - Mécanismes de résistance stables
  - Mécanismes de résistance instables

## ☐ A mi-chemin entre résistance de bas niveau et hétérorésistance

# « Hétérorésistance » stable

## Exemple 1

- ❑ Mutation *ampD* chez les entérobactérie du group III (fréquence  $10^{-4}$  à  $10^{-6}$ ) → « hétérorésistance » aux  **$\beta$ -lactamines**



*Enterobacter cloacae* complexe

# « Hétérorésistance » stable

## Exemple 2

### ☐ Mutants d'imperméabilité (porines) → « hétérorésistance » aux carbapénèmes

European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases (2018) 37:185–186  
<https://doi.org/10.1007/s10096-017-3138-x>

LETTER TO THE EDITOR

Carbapenem-heteroresistance among isolates of the *Enterobacter cloacae* complex: is it a real concern?

A. E. B. da Silva<sup>1,2</sup> • A. F. Martins<sup>1,2,3</sup> • C. S. Nodari<sup>1,2</sup> • C. M. Magagnin<sup>1,4</sup> • A. L. Barth<sup>1,5</sup>

CrossMark

- $CMI_{\text{initiale}} = 1 \text{ mg/L}$  ↪ X4 ???
- $CMI_{\text{max PAP}} = 4 \text{ mg/L}$  ↪ définition
- Fréquence mutation =  $1,25 \cdot 10^{-8}$   
 $7,0 \cdot 10^{-7}$



Contents lists available at ScienceDirect

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/diagmicrobio](http://www.elsevier.com/locate/diagmicrobio)



Meropenem heteroresistance in clinical isolates of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*

Elena López-Camacho<sup>a</sup>, José Ramón Paño-Pardo<sup>b,c</sup>, Alma Sotillo<sup>a</sup>, Cristina Elías-López<sup>d,e</sup>, Luis Martínez-Martínez<sup>d,e</sup>, Rosa Gómez-Gil<sup>a</sup>, Jesús Mingorance<sup>a,\*</sup>

- Hétérorésistance =  $\Delta ompK36$
- Fréquence mutation =  $5,5 \cdot 10^{-6}$

# «Hétérorésistance» stable

## Exemple 3

### ☐ Résistance à la **colistine** sous traitement

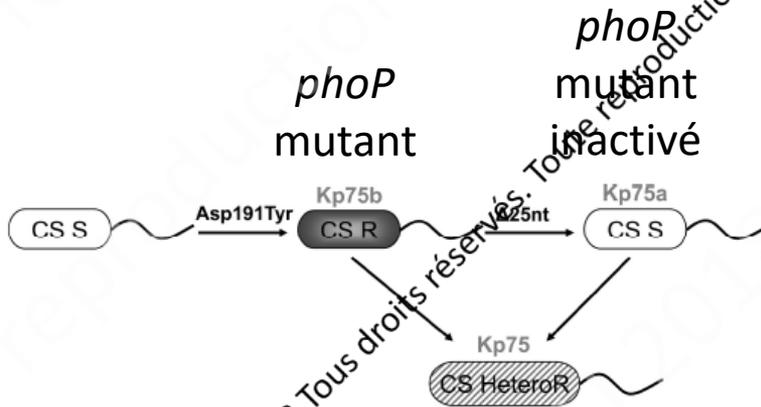
- Mutation des gènes *pmrA/pmrB* ou *phoP/phoQ*



Heteroresistance to Colistin in *Klebsiella pneumoniae* Associated with Alterations in the PhoPQ Regulatory System

Aurélie Jayol,<sup>a</sup> Patrice Nordmann,<sup>a,b</sup> Adrian Brink,<sup>c</sup> Laurent Poirel<sup>a</sup>

May 2015 Volume 59 Number 5



Kp75 (hétérorésistante) = Population mixte de deux mutants Kp75b et Kp75a



# «Hétérorésistance» stable

## Impact clinique



Risque de **sélectionner sous traitement** la population bactérienne la **plus résistante** (= le mutant)

Avant

Après  
21 jours  
de traitement  
imipénème



International Journal of Antimicrobial Agents 35 (2010) 265–268



International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijantimicag>



Short communication

In vivo selection of imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-15 and plasmid-encoded DHA-1 cephalosporinase<sup>a</sup>

Gaëlle Cuzon<sup>a</sup>, Thierry Naas<sup>a,\*</sup>, Michele Guibert<sup>b</sup>, Patrice Nordmann<sup>a</sup>

# Hétérorésistance au mécillinam

## Impact clinique nul

Mécillinam (cystites)	8	8	10	15°	15°
-----------------------	---	---	----	-----	-----

C. Ignorer les colonies situées dans la zone d'inhibition pour les isolats de l'espèce *E. coli*.



**Aminocillin (Mecillinam) Resistance Mutations in Clinical Isolates and Laboratory-Selected Mutants of *Escherichia coli***

Elisabeth Thulin,<sup>a</sup> Martin Sundqvist,<sup>b</sup> Dan I. Andersson<sup>a</sup>

March 2015 Volume 59 Number 3



Société Française de Microbiologie

**EUCAST**

Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

Recommandations 2015 V.2 (Septembre)

Coordonnateur: François DE Lencq, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Tél: 03 88 38 64 00, Fax: 03 88 38 37 84 (Fax), Courriel: delencq@unistra.fr, fenois.ph@chru-strasbourg.fr

Secrétaire: Gérard LINA, CHU de Luchon, Tél: 04 22 07 86 04 (PICO), Fax: 04 23 77 96 20 (PICO), E-mail: gerard.lina@univ-luchon.fr

Members: Richard BONNET, Jeanne BRU, François CARON, Christophe CHIFFOLEAU, Vincent CASTRO, Fabrice COLLIARD, Luc DUBREUIL, Vincent JARLER, Agnès LEFF, Audrey HEDRIG, Patrick RUSAT, Fabrice GUYOT, Claude-James SOUSSY, Emmanuel TROPEA

- ❑ Forte fréquence de mutants :  $10^{-8}$  à  $2.10^{-5}$
- ❑ Gènes impliqués dans :
  - Chaîne respi., ribosome, tRNA synthetase, métabo. phosphate → Fitness → Impact clinique
  - Voie de synthèse de la Cystéine (ex: *cysB*) → Résistance stable



Contents lists available at ScienceDirect

**EBioMedicine**

journal homepage: [www.elsevier.com](http://www.elsevier.com)

---

Research Paper

**Reversion of High-level Mecillinam Resistance to Susceptibility in *Escherichia coli* During Growth in Urine**

Elisabeth Thulin<sup>a</sup>, Måns Thulin<sup>b</sup>, Dan I. Andersson<sup>a,\*</sup>

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

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

## ☐ Résistances de bas niveau

### Définition

- Impact clinique
- Impact diagnostic

## ☐ Résistance hétérogène (ou hétérorésistance)

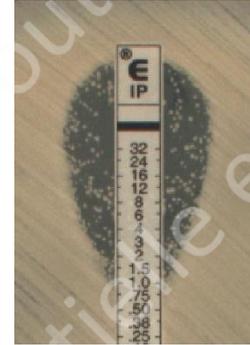
- Définition et méthodes de détection
- **Mécanismes et impact cliniques**
  - Mécanismes de résistance stables
  - **Mécanismes de résistance instables**

## ☐ A mi-chemin entre résistance de bas niveau et hétérorésistance

# « Vraie » Hétérorésistance instable

## Exemple 1 : *K. pneumoniae* KPC

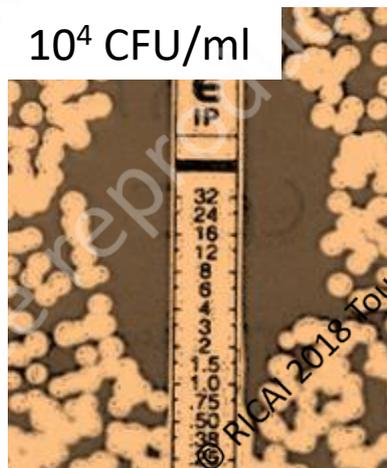
- ❑ Toutes les souche de *K. pneumoniae* KPC + possèdent un phénotype d'hétérorésistance aux  $\beta$ -lactamines
- ❑ Surtout visible pour les carbapénèmes



# « Vraie » Hétérorésistance instable

## Exemple 1 : *K. pneumoniae* KPC

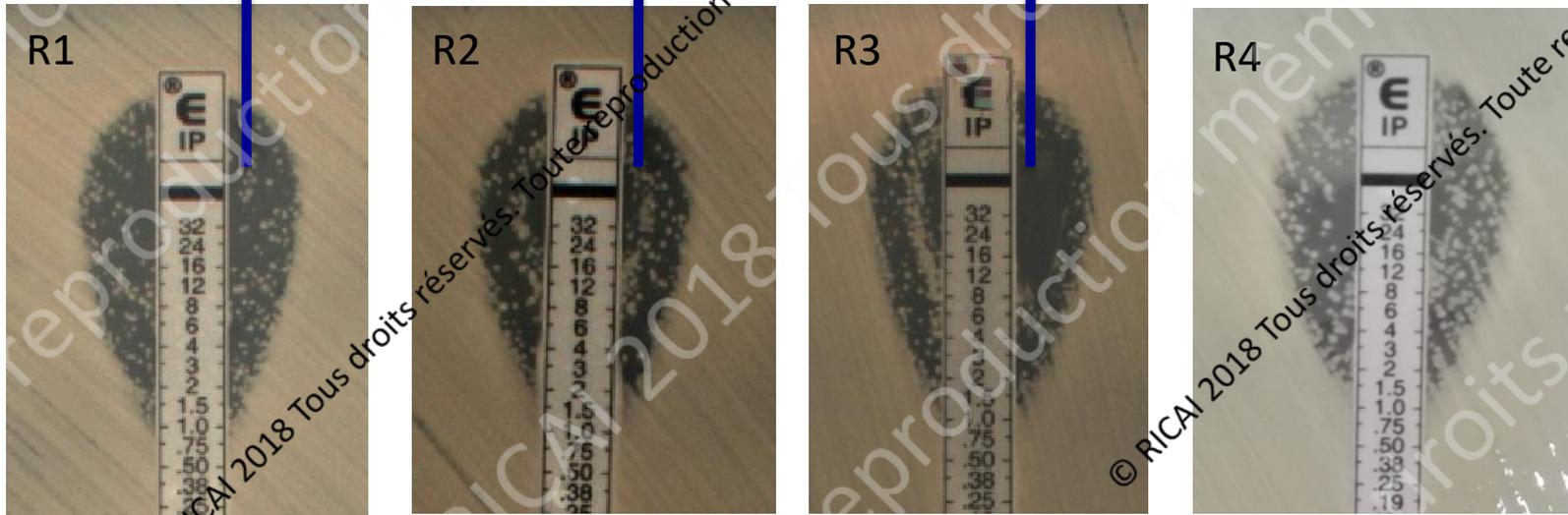
- ❑ Toutes les souche de *K. pneumoniae* KPC + possèdent un phénotype d'hétérorésistance aux  $\beta$ -lactamines
- ❑ Surtout visible pour les carbapénèmes
- ❑ Encore plus visible avec un inoculum augmenté



# « Vraie » Hétérorésistance instable

## Exemple 1 : *K. pneumoniae* KPC

- ❑ Phénotype reproductible
- ❑ Souches strictement isogéniques (pas de mutation additionnelle)
- ❑ Phénotype encore inexpliqué



# « Vraie » Hétérorésistance instable

## Exemple 2 : *Serratia marcescens* et colisitine

J Antimicrob Chemother 2018; 73: 1862-1871  
doi:10.1093/ac/dky134 Advance Access publication 26 April 2018

Journal of  
Antimicrobial  
Chemotherapy

Efflux pump inhibitor CCCP to rescue colistin susceptibility in *mcr-1* plasmid-mediated colistin-resistant strains and Gram-negative bacteria

Sophie A. Baron and Jean-Marc Rolain\*



*S. marcescens* 1036

*E. asburiae* LH74

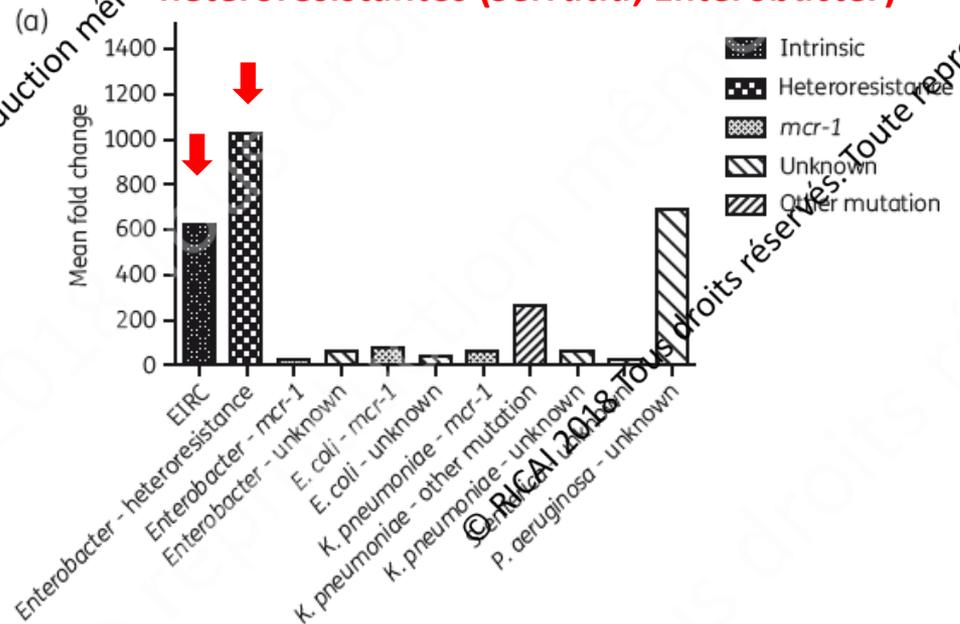
MH + DMSO



MH+ CCCP



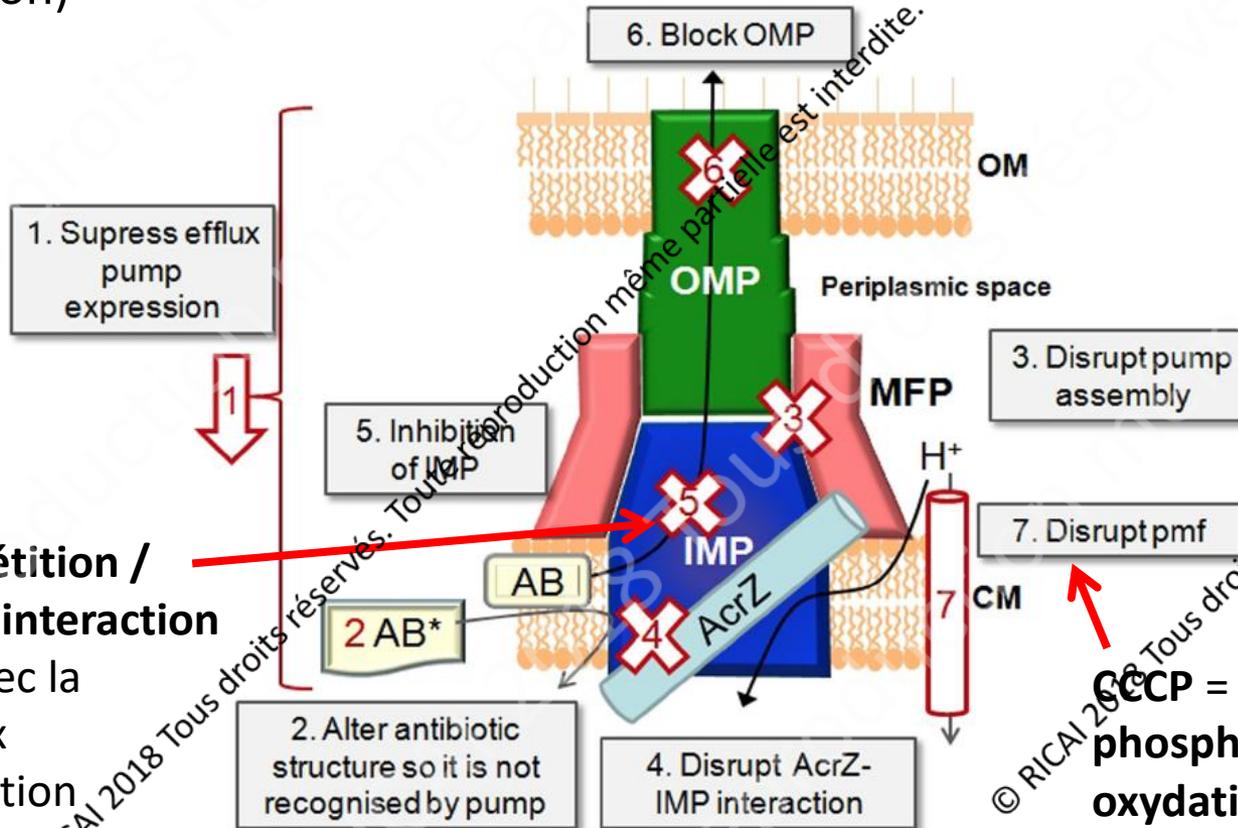
Effet particulièrement prononcé sur les souches hétérorésistantes (*Serratia*, *Enterobacter*)



# « Vraie » Hétérorésistance instable

## Exemple 2 : *Serratia marcescens* et colisitine

**CCCP** (cyanide 3-chlorophenylhydrazone) et **PABN** (phenyl-arginine- $\beta$ -naphthylamide) = **inhibiteurs pompe d'efflux** de type RND (Resistance Nodulation Cell Division)



**PABN = Compétition / inhibition de l'interaction du substrat avec la pompe à efflux + perméabilisation membrane externe**

**CCCP = découplant de la phosphorylation oxydative → inhibition gradient H<sup>+</sup>**

# « Vraie » Hétérorésistance instable

## Exemple 2 : *Serratia marcescens* et colistine

Type de germe	Restauration de la sensibilité à la colistine	
	CCCP	PABN
<i>Enterobacter</i> hétéroresistant	+++	++
<i>Serratia marcescens</i>	+++	-

Hypothèse pour les souches d'*Enterobacter cloacae* ou *Enterobacter aerogenes* hétérorésistantes à la colistine : AcrAB-TolC ↗↗↗ ?

Hypothèses pour *S. marcescens*:

- SdeAB-HasF (Homologue AcrAB-TolC chez *S. marcescens*) jouerait un rôle prépondérant dans l'hétérorésistance à la colistine et ne serait pas inhibé par PABN ?
- CCCP = découplant de la phosphorylation oxydative → inhib. gradient H<sup>+</sup> → Restauration charge négative membranaire → Resensibilisation de la colistine

## ☐ Résistances de bas niveau

### Définition

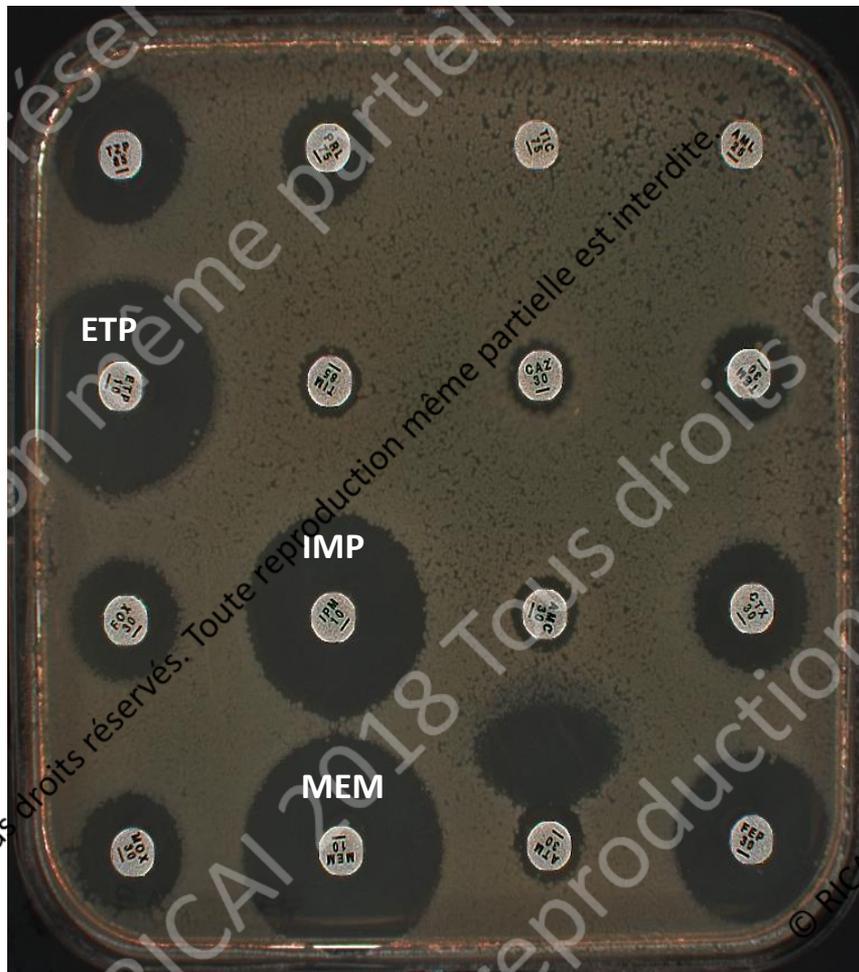
- Impact clinique
- Impact diagnostic

## ☐ Résistance hétérogène (ou hétérorésistance)

- Définition et méthodes de détection
- Mécanismes et impact cliniques
  - Mécanismes de résistance stables
  - Mécanismes de résistance instables

## ☐ A mi-chemin entre résistance de bas niveau et hétérorésistance

## « Résistance » de « très » bas niveau



Imipenem = 0.5 mg/L  
Ertapenem 0.19 mg/L  
Meropenem = 0.19 mg/L

Carba NP test négatif

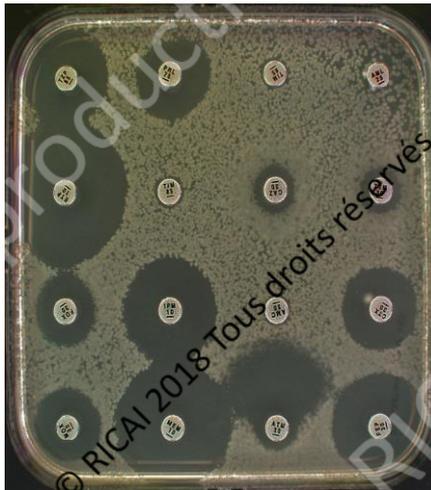


# Atlantibacter hermannii VIM-1

## Atlantibacter hermannii



## *E. coli*



Transformants du plasmide naturel  
incA/C bla<sub>VIM-1</sub> positif



## *Enterobacter cloacae*



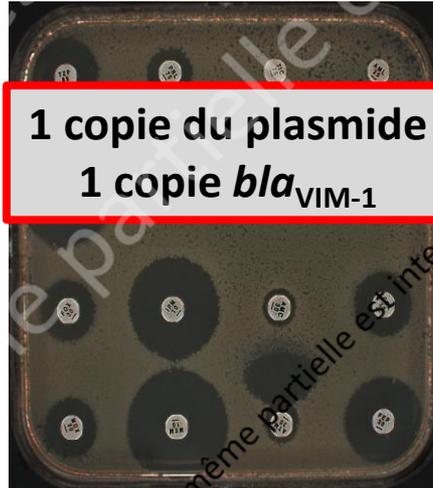
© RICA I 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

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

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

# Atlantibacter hermannii VIM-1

## Atlantibacter hermannii



## *E. coli*



Transformants du plasmide naturel  
incA/C *bla*<sub>VIM-1</sub> positif



## *Enterobacter cloacae*



Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

# Atlantibacter hermannii VIM-1

## Atlantibacter hermannii



repeated  
cultures with  
growing  
concentrations  
of imipenem  
from 0.5 mg/L  
to 10 mg/L



## Atlantibacter hermannii



Imipenem = 0.5 mg/L  
Ertapenem 0.19 mg/L  
Meropenem = 0.19 mg/L



Imipenem = 1.5 mg/L  
Ertapenem 0.5 mg/L  
Meropenem = 0.75 mg/L

# Atlantibacter hermannii VIM-1

## Atlantibacter hermannii



1 copie du plasmide  
1 copie *bla*<sub>VIM-1</sub>

repeated  
cultures with  
growing  
concentrations  
of imipenem  
from 0.5 mg/L  
to 10 mg/L



## Atlantibacter hermannii



Hétéroresistance

0.5 copie du plasmide  
10 copies *bla*<sub>VIM-1</sub>

Amplification  
chromosomique par  
duplication



Imipenem = 0.5 mg/L  
Ertapenem 0.19 mg/L  
Meropenem = 0.19 mg/L



Imipenem = 1.5 mg/L  
Ertapenem 0.5 mg/L  
Meropenem = 0.75 mg/L

# Atlantibacter hermannii VIM-1

## Atlantibacter hermannii



1 copie du plasmide  
1 copie *bla*<sub>VIM-1</sub>

repeated  
cultures with  
growing  
concentrations  
of imipenem  
from 0.5 mg/L  
to 10 mg/L



**Phénotype  
instable**

## Atlantibacter hermannii



**Hétéroresistance**

0.5 copie du plasmide  
10 copies *bla*<sub>VIM-1</sub>

**Amplification  
chromosomique par  
duplication**



Imipenem = 0.5 mg/L  
Ertapenem 0.19 mg/L  
Meropenem = 0.19 mg/L



Imipenem = 1.5 mg/L  
Ertapenem 0.5 mg/L  
Meropenem = 0.75 mg/L

- ❑ **Résistance de bas niveau et hétérorésistance ne sont pas des mythes**
- ❑ **Problème de définition de l'hétérorésistance**
- ❑ **Problème d'identification en routine**
- ❑ **Mécanisme de l'hétérorésistance « vraie » non élucidé**
- ❑ **Impact clinique et diagnostic :**
  - **R de bas niveau : ↗↗↗** Risque de **sélection de souches plus résistantes** par des mécanismes additionnels
  - **R de bas niveau** : Risque de **mauvaise détection**
  - **Hétérorésistance « vraie » ???**

**Rémy BONNIN**

**Delphine GIRLICH**

Lauraine GAUTHIER

Agnès JOUSSET

Saoussen OUESLATI

Yannick HOYOS

Thierry NAAS

**Elodie CRETON**

**Garance COTELLON**

**Aimie SAUVADET**

Nicolas FORTINEAU

Souad OUZANI