



RICAI 2018

38ème Réunion Interdisciplinaire
de Chimiothérapie Anti-Infectieuse

Stratégies 2018 de détection des bactéries multirésistantes à Gram négatif Résistances multiples aux aminoglycosides

Pr. Béatrice Berçot,
Hôpital St Louis, Université Paris Diderot
Equipe IAME EvREST, UMR1137

17 Décembre 2018





RICAI 2018

38ème Réunion Interdisciplinaire
de Chimiothérapie Anti-Infectieuse

Nom du conférencier : Pr Béatrice Bercof, Paris

Je n'ai pas de lien d'intérêt potentiel à déclarer

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

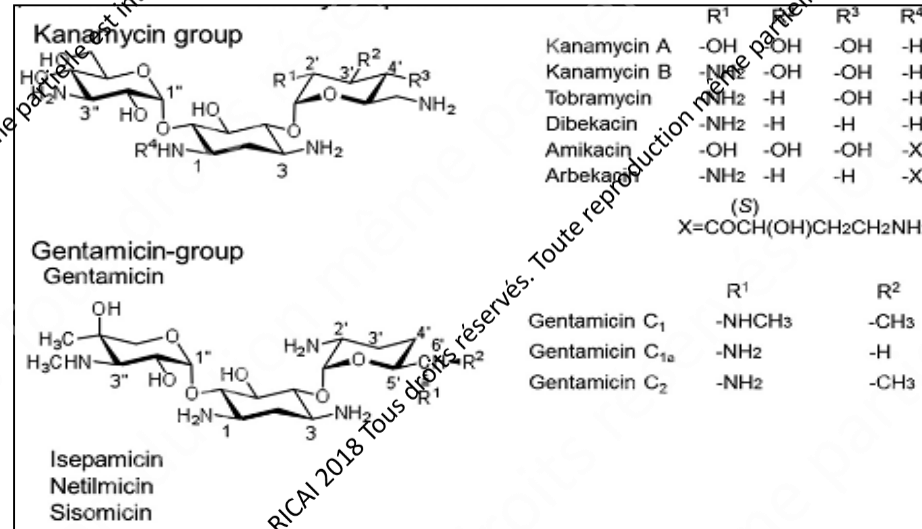
Aminoglycosides : structure, action

- Traitement des infections à Gram - en combinaison avec des β -lactamines
- Molécules disubstituées en position 4-6 ou 4-5 par des groupements glucosidiques

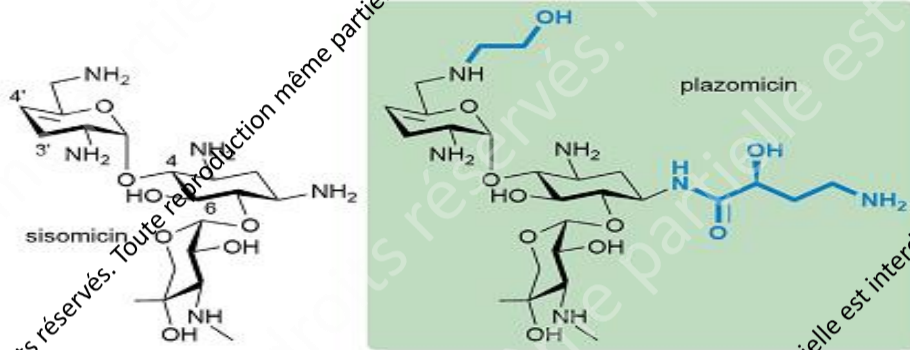
Utilisés en clinique humaine +++

4.6 – disubstituée 2-deoxystreptamines :
kanamycine, gentamicine, tobramycine,
amikacine, netilmicine

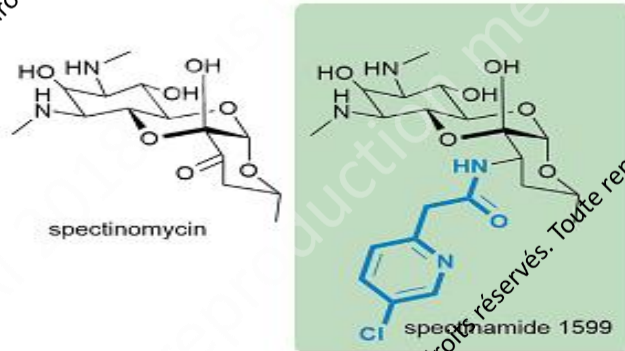
- Disubstituées en 4-5 : Néomycine
- Groupe streptidines : Streptomycine (1944)
- Monosubstituée 2-deoxystreptamines
Apramycine (vétérinaire ++)



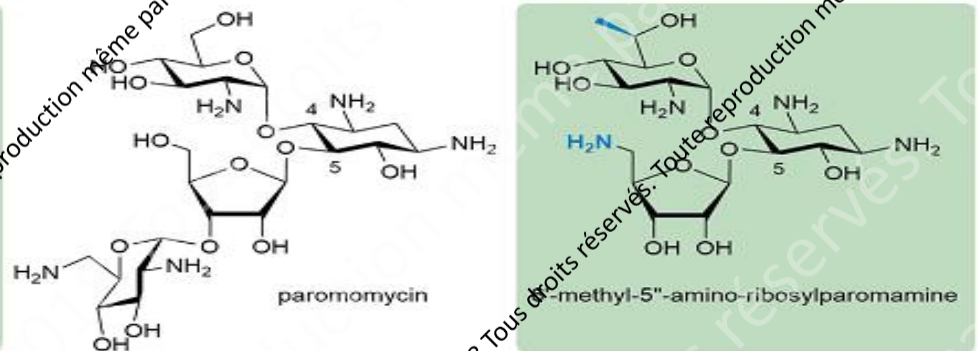
Nouvelles molécules de synthèse



Plazomicine : disubstituée en position 4.6 – 2-deoxystreptamines
Phase 3, active sur enzyme modifiant les aminosides sauf sur méthylase et *aac(2')-I (Providencia)*



Actif sur gonocoque hyperexprimant pompe efflux Rv1258C



4.5 – disubstituée 2-deoxystreptamines (analogue neomycine)

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

Mode d'action des aminoglycosides

Pénétration antibiotique : mécanisme de transport actif → traversée de la membrane cytoplasmique

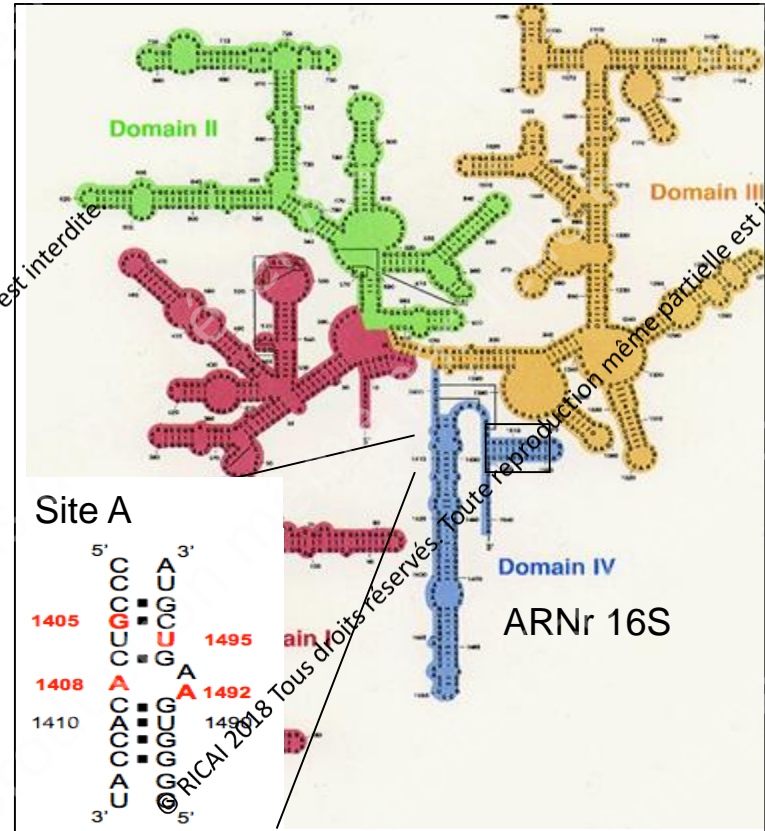
2 phases qui nécessitent de l'énergie (EPI et EPII).

EPII : requiert la présence d'oxygène ce qui explique la résistance naturelle des anaérobies aux aminoglycosides.

Cible principale : ribosome (site A) fixation sur l'ARNr 16S de la sous-unité ribosomale 30S

Action : Interfère sur l'élongation de la chaîne protéique (compétition avec les ARN de transfert) : blocage en phase d'initiation de la traduction

Streptomycine site fixation unique



Principaux mécanismes de résistance acquis chez les bacilles à Gram négatif

1. Inactivation enzymatique

- N-acétylation (AAC)
- O-Nucleotidylation (ANT)
- O-Phosphorylation (APH)

2. Diminution de l'accumulation intracellulaire

- Diminution de la perméabilité membranaire
- Diminution du transport membranaire
- Efflux actif

3. Modification de la cible

- Mutations dans les protéines ribosomales / ARNr 16S
- Méthylation post-transcriptionnelle de l'ARNr 16S
- Piégeage de l'antibiotique

Plus fréquent

Moins fréquent



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

Algorithme d'analyse phénotypique des isolats

Peu ou aucun diamètre d'inhibition observé à tous les aminosides (exceptées Sm and Spm) ou CMI \geq 256 mg/L

Dépistage des méthylases de l'ARNr 16S

Diminution variable des diamètres d'inhibition observée sur la sensibilité aux aminosides

Dépistage des enzymes communes AAC, AMK et APH

Aucune ou légère diminution des diamètres d'inhibition à tous les aminosides

Imperméabilité ou hyperexpression de pompe d'efflux

Str^R
Spcm^{R*}

Spcm^R
Sm^R

Gm^R

Km^R

Km^R
Neo^R
Amk^R#

Tob^R
Amk^R

Km^R
Gm^R
Tob^R

Gm^R
Tob^R
Neo^R

Km^R
Gm^R
Tob^R
Net^R

Km^R
Amk^R
Tob^R
Net^R

aph(3'')-Ia
aph(3'')-Ib

ant(3'')-Ia

aac(3)-Ia,
aac(3)-Ib,
aac(3)-Ic
aac(3)-Id

aph(3')-Ia

aph(3')-VIa

ant(4')-IIa
ant(4')-IIb Ψ

ant(2'')-Ia

aac(2')-Ia

aac(3)-IIa
aac(6')-IIa Ψ

aac(6')-Ib
aac(6')-Ia
aac(6')-Ic

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

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

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

Algorithme d'analyse phénotypique des isolats

Peu ou aucun diamètre d'inhibition observé à tous les aminosides (exceptées Sm and Spm) ou CMI \geq 256 mg/L

Dépistage des méthylases de l'ARNr 16S

Str^R
Spcm^{R*}

aph(3'')-Ia
aph(3'')-Ib

Spcm^R
Sm^R

ant(3'')-Ia

Gm^R

aac(3)-Ia,
aac(3)-Ib,
aac(3)-Ic
aac(3)-Id

Km^R

aph(3')-Ia

Diminution variable des diamètres d'inhibition observée sur la sensibilité aux aminosides

Dépistage des enzymes communes AIC, ANT et APH

Km^R
Neo^R
Amk^{R#}

aph(3')-VIa

Tob^R
Amk^R

ant(4')-IIa
ant(4')-IIb Ψ

Km^R
Gm^R
Tob^R

ant(2'')-Ia

Gm^R
Tob^R
Neo^R

aac(2')-Ia

Aucune ou légère diminution des diamètres d'inhibition à tous les aminosides

Imperméabilité ou hyperexpression de pompes d'efflux

Km^R
Gm^R
Tob^R
Net^R

aac(3)-IIa
aac(6')-IIa Ψ

Km^R
Amk^R
Tob^R
Net^R

aac(6')-Ib
aac(6')-Ia
aac(6')-Ic

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

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

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

1. Inactivation enzymatique

- Chaque enzyme reconnaît un substrat qu'elle modifie codée par un gène intrinsèque ou acquis et transférable par l'intermédiaire de plasmides ou gènes cassettes (intégron)
- très fréquent en clinique

APH : phosphotransférase



ANT : nucléotidyltransférase



AAC : acétyltransférase



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

Principaux gènes plasmidiques (BG-) et spectre observé

Phénotype	SPE	STR	KAN	TOB	NET	GEN	AMK	ISE	PLA	Mécanisme
STR	S	R	S	S	S	S	S	S	S	<i>aph(3'')-I, aph(6)-I</i>
STR+SPCM	R	R	S	S	S	S	S	S	S	<i>ant(3'') : aadA</i>
KAN	S	S	R	S	S	S	S	S	S	<i>aph(3')-I ; aph(3')-II</i>
GEN	S	S	S	S	S	R	S	S	S	<i>aac(3)-I</i>
KAN+TOB+GEN	S	S	R	R	S	R	S	S	S	<i>ant(2'') : aadB</i>
TOB+NET+GEN	S	S	S	R	R	R	S	S	S	<i>aac(2')</i>
KAN+AMK+ISE	S	S	R	S	S	S	R	R	S	<i>aph(3')-VI</i>
TOB+AMK+ISE	S	S	S	R	S	S	R	R	S	<i>ant(4')</i>
KAN+TOB+NET+GEN	S	S	R	R	R	R	S	S	S	<i>aac(6')-II, aac(3)-II, aac(3)-IV</i>
KAN+TOB+NET+AMK	S	S	R	R	R	S	R	S	S	<i>aac(6')-I</i>



Principaux gènes plasmidiques (BG-) et spectre observé

Phénotype	SPE	STR	KAN	TOB	NET	GEN	AMK	ISE	PLA	Mécanisme
STR	S	R	S	S	S	S	S	S	S	<i>aph(3'')-I, aph(6)-I</i>
STR+SPCM	R	R	S	S	S	S	S	S	S	<i>ant(3'') : aadA</i>
KAN	S	S	R	S	S	S	S	S	S	<i>aph(3')-I *</i> ; <i>aph(3')-II</i>
GEN	S	S	S	S	S	R	S	S	S	<i>aac(3)-I</i>
KAN+TOB+GEN	S	S	R	R	S	R	S	S	S	<i>ant(2'') : aadB</i>
TOB+NET+GEN	S	S	S	R	R	R	S	S	S	<i>aac(2') *</i>
KAN+AMK+ISE	S	S	R	S	S	S	R	R	S	<i>aph(3')-VI</i>
TOB+AMK+ISE	S	S	S	R	S	S	R	R	S	<i>ant(4')-II</i>
KAN+TOB+NET+GEN	S	S	R	R	R	R	S	S	S	<i>aac(6')-II, aac(3)-II, aac(3)-IV</i>
KAN+TOB+NET+AMK	S	S	R	R	R	S	R	S	S	<i>aac(6')-I *</i>

Rouge : fréquemment retrouvés sous forme de gènes cassettes / vert : gène chromosomique

Principaux gènes plasmidiques (BG-) et spectre observé

Association d'enzymes modificatrices dans une même bactérie
 → multirésistance
 Interprétation du phénotype observé difficile → génotype

Phenotype	SPE	STR	KAN	TOB	NET	GEN	AMK	ISE	ANT	GEN	Gene
STR	S	R	S	S	S						
STR+SPCM	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	<i>ant(3'') : aadA</i>
KAN	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	<i>aph(3')-I * ; aph(3')-II</i>
GEN	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	<i>aac(3)-I</i>
KAN+TOB+GEN	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	<i>ant(2'') : aadB</i>
TOB+NET+GEN	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	<i>aac(2') *</i>
KAN+AMK+ISE	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	<i>aph(3')-VI</i>
TOB+AMK+ISE	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	<i>ant(4')-II</i>
KAN+TOB+NET+GEN	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	<i>aac(6')-II, aac(3)-II, aac(3)-IV</i>
KAN+TOB+NET+AMK	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	<i>aac(6')-I *</i>
STR+SPCM+ GEN	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	<i>ant(3'')+aac(3)-I</i>
KAN+TOB+NET+AMK	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	<i>+aac(3)-II</i>

Résistances multiples aux aminosides

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

Algorithme d'analyse phénotypique des isolats

Peu ou aucun diamètre d'inhibition observé à tous les aminosides (exceptées Sm and Spm) ou CMI \geq 256 mg/L

Dépistage des méthylases de l'ARNr 16S

Diminution variable des diamètres d'inhibition observée sur la sensibilité aux aminosides

Dépistage des enzymes communes AAC, AMK et APH

Aucune ou légère diminution des diamètres d'inhibition à tous les aminosides

Imperméabilité ou hyperexpression de pompe d'efflux

Str^R
Spcm^{R*}

Spcm^R
Sm^R

Gm^R

Km^R

Km^R
Neo^R
Amk^R#

Tob^R
Amk^R

Km^R
Gm^R
Tob^R

Gm^R
Tob^R
Neo^R

Km^R
Gm^R
Tob^R
Net^R

Km^R
Amk^R
Tob^R
Net^R

aph(3'')-Ia
aph(3'')-Ib

ant(3'')-Ia

aac(3)-Ia,
aac(3)-Ib,
aac(3)-Ic
aac(3)-Id

aph(3')-Ia

aph(3')-VIa

ant(4')-IIa
ant(4')-IIb Ψ

ant(2'')-Ia

aac(2')-Ia

aac(3)-IIa
aac(6')-IIa Ψ

aac(6')-Ib
aac(6')-Ia
aac(6')-Ic

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

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

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

Algorithme d'analyse phénotypique des isolats

Peu ou aucun diamètre d'inhibition observé à tous les aminosides (exceptées Sm and Spm) ou CMI \geq 256 mg/L

Dépistage des méthylases de l'ARNr 16S

Diminution variable des diamètres d'inhibition observée sur la sensibilité aux aminosides

Dépistage des enzymes communes AAC, AMK et APH

Aucune ou légère diminution des diamètres d'inhibition à tous les aminosides

Imperméabilité ou hyperexpression de pompe d'efflux

Str^R
Spcm^{R*}

Spcm^R
Sm^R

Gm^R

Km^R

Km^R
Neo^R
Amk^R#

Tob^R
Amk^R

Km^R
Gm^R
Tob^R

Gm^R
Tob^R
Net^R

Km^R
Gm^R
Tob^R
Net^R

Km^R
Amk^R
Tob^R
Net^R

aph(3'')-Ia
aph(3'')-Ib

ant(3'')-Ia

aac(3)-Ia,
aac(3)-Ib,
aac(3)-Ic
aac(3)-Id

aph(3')-Ia

aph(3')-VIa

ant(4')-IIa
ant(4')-IIb Ψ

ant(2'')-Ia

aac(2')-Ia

aac(3)-IIa
aac(6')-IIa Ψ

aac(6')-Ib
aac(6')-Ia
aac(6')-Ic

2. Diminution de l'accumulation intracellulaire

Diminution de la perméabilité membranaire cytoplasmique

Tous les aminosides sont touchés

Mutation de la chaîne énergétique (*E. coli*)

Altération du transport actif des aminosides

Efflux actif

Principales pompes

Pompes AdeABC, IJK, FGH: *Acinetobacter baumannii*

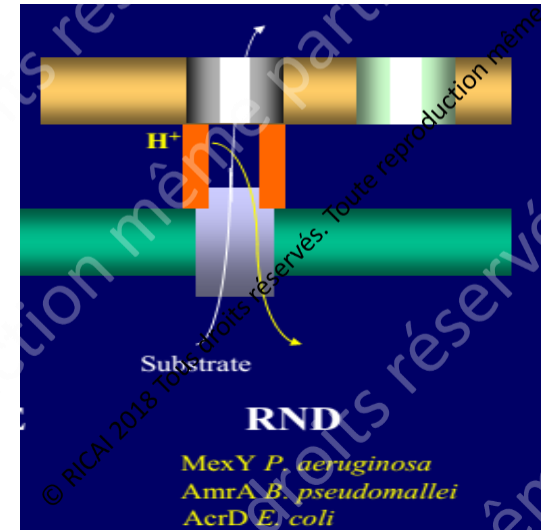
Pompe MexXY-OprM : *Pseudomonas aeruginosa*

Pompe AcrD : *Escherichia coli*

Pompe AmrAB-OprA : *Burkholderia pseudomallei*

Autres : YkkC/D; MdfA; YdhE : *E. coli*

Schématisation pompe efflux



Ex : Hyperexpression efflux pompe Ade

TABLE 1. Antibiotic susceptibility of MDR or non-MDR *A. baumannii* and derivatives deleted for or overexpressing an RND efflux pump

Antimicrobial agent	Isolat MDR 1					MIC (µg/ml) ^a for strain:			
	BM4454 ^b	BM4651 (ΔABC) ^c	BM4652 (ΔABC ΔIJK) ^d	BM4664 (ΔABC ΔIJK) <i>adeFGH</i> ^e	BM4679 (ΔABC ΔIJK ΔFGH) ^f	BM4587 ^g	BM4665 <i>adeABC</i> ^h	BM4666 <i>adeIJK</i> ⁱ	BM4684 <i>adeFGH</i> ^j
Ticarcillin	8	8	0.75	0.75	0.75	8	2	16	12
Ceftazidime		3	0.75	0.75	0.75	4	3	12	2
Cefepime	3	1.5	0.25	0.19	0.25	0.75	8	2	1
Aztreonam	16	16	1.5	1.5	1.5	12	6	32	16
Imipenem	0.25	0.25	0.125	0.25	0.25	0.19	0.5	0.19	0.38
Chloramphenicol	>256	128	16	>256	>256	96	>256	>256	>256
Erythromycin	16	8	1.5	1.5	1.5	6	48	32	6
Clindamycin	>256	32	2	>256	2	>256	>256	>256	>256
Tetracycline	32	8	0.75	2	0.75	1.5	3	8	3
Minocycline	0.75	0.75	0.064	0.1	0.064	0.064	0.125	0.19	0.25
Tigecycline	3	0.25	0.047	0.1	0.064	0.094	1.5	0.38	0.38
Rifampin	2	2	2	2	2	1.5	1.5	2	4
Norfloxacin	>256	64	12	>256	12	1.5	12	4	12
Ciprofloxacin	>32	24	1.5	>32	2	0.094	0.5	0.38	0.38
Amikacin	4	3	1.5	1.5	0.75	4	64	6	3
Gentamicin	16	NA ^k	NA	NA	NA	1	12	1.5	1
Tobramycin	6	NA	NA	NA	NA	0.75	6	1	1.5
Cotrimoxazole	0.064	0.064	0.047	0.5	0.047	0.094	0.125	0.25	0.75

Efflux



delABC delABC+IJK

delABC+IJK+FGH

Ex : Hyperexpression efflux pompe Ade

TABLE 1. Antibiotic susceptibility of MDR or non-MDR *A. baumannii* and derivatives deleted for or overexpressing an RND efflux pump

Antimicrobial agent	Isolat MDR 1					Isolat MDR 2			
	BM4454 ^b	BM4651 (ΔABC) ^c	BM4652 (ΔABC ΔIJK) ^d	BM4664 (ΔABC ΔIJK) ^e	BM4679 (ΔABC $\Delta IJK \Delta FGH$) ^f	BM4587 ^g	BM4665 <i>adeABC</i> ^h	BM4666 <i>adeIJK</i> ⁱ	BM4684 <i>adeFGH</i> ^j
Ticarcillin	8	8	0.75	0.75	0.75	8	2	16	12
Ceftazidime		3	0.75	0.75	0.75	4	3	12	2
Cefepime	3	1.5	0.25	0.19	0.25	0.75	8	2	1
Aztreonam	16	16	1.5	1.5	1.5	12	6	32	16
Imipenem	0.25	0.25	0.125	0.25	0.25	0.19	0.5	0.19	0.38
Chloramphenicol	>256	128	16	>256	>256	96	>256	>256	>256
Erythromycin	16	8	1.5	1.5	1.5	6	48	32	6
Clindamycin	>256	32	2	>256	2	>256	>256	>256	>256
Tetracycline	32	8	0.75	2	0.75	1.5	3	8	3
Minocycline	0.75	0.75	0.064	0.1	0.064	0.064	0.125	0.19	0.25
Tigecycline	3	0.25	0.047	0.1	0.064	0.094	1.5	0.38	0.38
Rifampin	2	2	2	2	2	1.5	1.5	2	4
Norfloxacin	>256	64	12	>256	12	1.5	12	4	12
Ciprofloxacin	>32	24	1.5	>32	2	0.094	0.5	0.38	0.38
Amikacin	4	3	1.5	1.5	0.75	4	64	6	3
Gentamicin	16	NA ^k	NA	NA	NA	1	12	1.5	1
Tobramycin	6	NA	NA	NA	NA	0.75	1	1	1.5
Cotrimoxazole	0.064	0.064	0.047	0.5	0.047	0.094	0.125	0.25	0.75

Efflux



delABC delABC+IJK

delABC+IJK+FGH



Algorithme d'analyse phénotypique des isolats

Peu ou aucun diamètre d'inhibition observé à tous les aminosides (exceptées Sm and Spm) ou CMI \geq 256 mg/L

Dépistage des méthylases de l'ARNr 16S

Diminution variable des diamètres d'inhibition observée sur la sensibilité aux aminosides

Dépistage des enzymes communes AAC, AMK et APH

Aucune ou légère diminution des diamètres d'inhibition à tous les aminosides

Imperméabilité ou hyperexpression de pompe d'efflux

Str^R
Spcm^{R*}

Spcm^R
Sm^R

Gm^R

Km^R

Km^R
Neo^R
Amk^R#

Tob^R
Amk^R

Km^R
Gm^R
Tob^R

Gm^R
Tob^R
Neo^R

Km^R
Gm^R
Tob^R
Net^R

Km^R
Amk^R
Tob^R
Net^R

aph(3'')-Ia
aph(3'')-Ib

ant(3'')-Ia

aac(3)-Ia,
aac(3)-Ib,
aac(3)-Ic
aac(3)-Id

aph(3')-Ia

aph(3')-VIa

ant(4')-IIa
ant(4')-IIb Ψ

ant(2)-Ia

aac(2')-Ia

aac(3)-IIa
aac(6')-IIa Ψ

aac(6')-Ib
aac(6')-Ia
aac(6')-Ic

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

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

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

Algorithme d'analyse phénotypique des isolats

Peu ou aucun diamètre d'inhibition observé à tous les aminosides (exceptées Sm and Spcm) ou CMI \geq 36 mg/L

↓

Dépistage des méthylases de l'ARNr 16S

Diminution variable des diamètres d'inhibition observée sur la sensibilité aux aminosides

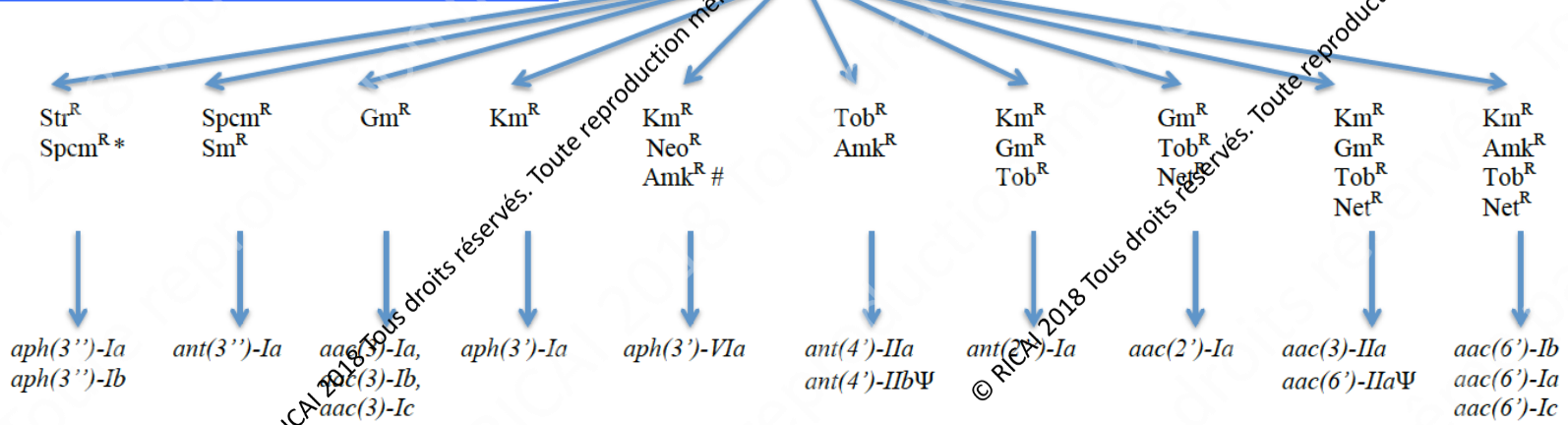
↓

Dépistage des enzymes communes AAC, AMK et APH

Aucune ou légère diminution des diamètres d'inhibition à tous les aminosides

↓

Imperméabilité ou hyperexpression de pompes d'efflux



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

3. Modification de la cible par méthylation post-transcriptionnelle de l'ARNr 16S

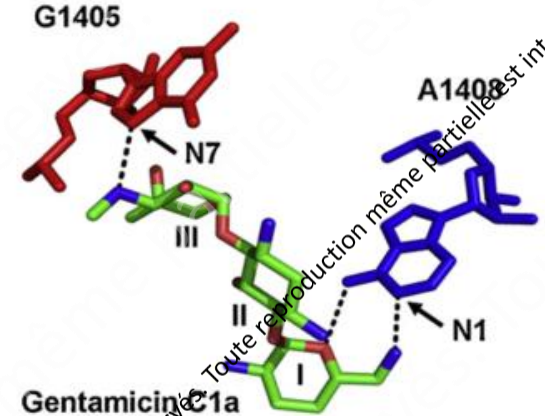
Méthylation de l'ARNr 16S au niveau du site de liaison des aminosides

Présent au niveau chromosomique chez les bactéries productrices d'aminosides « *Actinomycetes* »

1^{ère} description chez un BGN en 2003

16 gènes plasmidiques acquis :

armA, *rmtA*, *rmtB1-B4*, *rmtC*, *rmtD1-D3*, *rmtE*, *rmtF1-F2*, *rmtG*, *rmtH* et *npmA1-2*



A1408 : *Streptomyces*
 G1405 +++ : *Streptomyces*
 et *Micromonospora*

3. Modification de la cible par méthylation et spectre observé

	N7 G1405 méthylases	N1 A1408 méthylases
Spectre	4,6-2-DOS	4,6-2-DOS / 4,5-2-DOS, DOS monosubstitué
Phénotype	<p>Haut niveau de résistance Gentamicine, Tobramycine, Amikacine, Netilmicine, Kanamycine, Isépanicine, Plazomicine</p> <p>Sensible : Apramycine, Néomycine</p>	<p>Haut niveau de résistance Gentamicine, Tobramycine, Amikacine, Netilmicine, Kanamycine, Isépanicine, Plazomicine Apramycine Néomycine</p>



CMI > 256 mg/L

Expression du gène *armA* dans *S. coli* PT0PO
Streptomycine et spectinomycine non impactés

Les méthylases: un problème de Santé Publique

Résistances

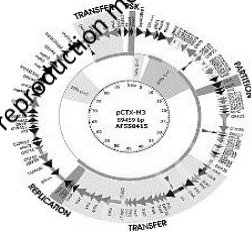
Résistance à haut niveau aux aminosides



Associées à d'autres déterminants de multi-résistance



Portées par des plasmides conjugatifs à large spectre d'hôte



Entourées d'éléments génétiques mobiles



Infections

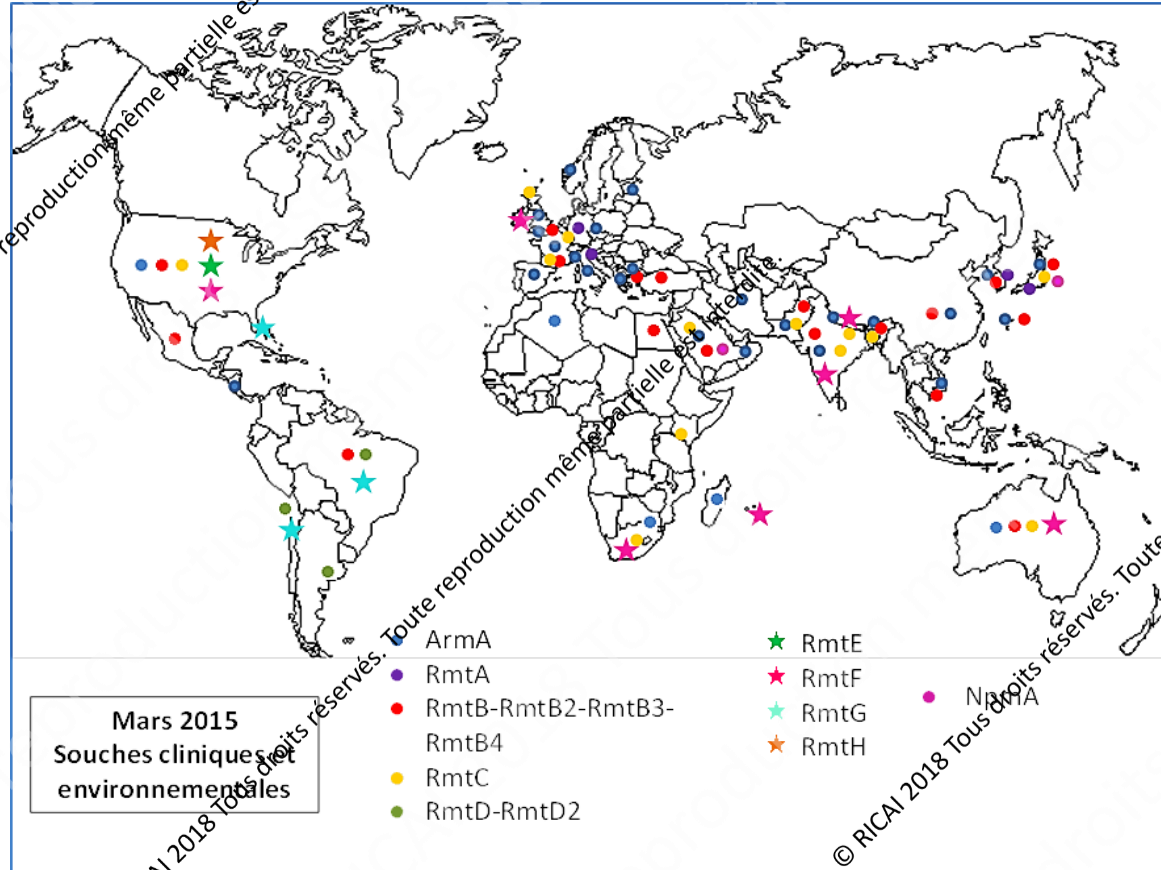
Bactéries d'importance majeure en Maladie Infectieuse

Entérobactéries
P. aeruginosa
A. baumannii

Dissémination mondiale parmi les bacilles à Gram négatifs multirésistants aux antibiotiques



Dissémination mondiale des clones panrésistants





Stratégie diagnostic de la résistance aux aminosides

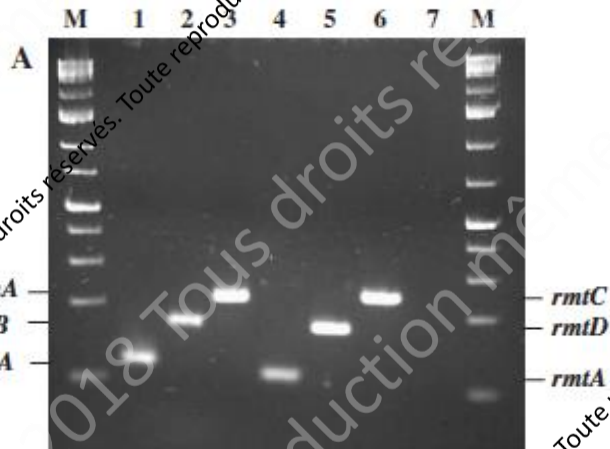
→ pistes phénotypiques et moléculaires

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

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

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

Détection des méthylases par PCR multiplexe



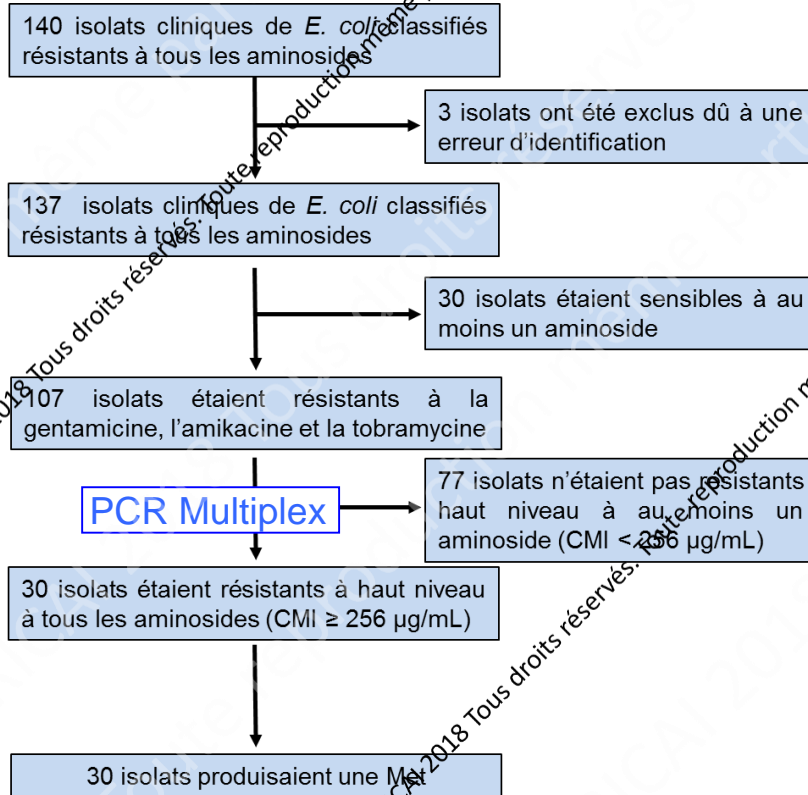
Détection des méthylases les plus fréquentes
armA, *rtmA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *npmA*

Rapide < 4h

Screening simple de collection d'intérêt :

- 75% association entre méthylase et la carbapénèmase NDM-1
- Prévalence méthylase en France (0,3%) en Turquie (0,7%) parmi les BGN BLSE (2010)

Détection des méthylases par PCR multiplex



140 souches *E. coli* panrésistantes aux aminosides (Hôpitaux Nord Paris)

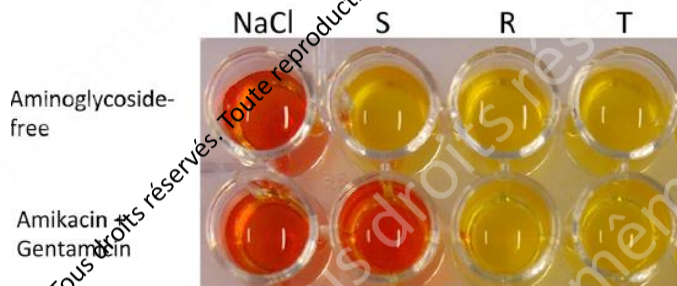
30 méthylases

18 RmtB / 11 ArmA / 1 RmtC

Screening méthylases : Intérêt associer détermination CMI et PCR

Détection de la résistance multiple aux aminosides : Rapid Aminoglycoside NP test

Rapid aminoglycoside NP test



Détection des méthylases de l'ARNr 16S

Basé sur la détection du métabolisme du glucose
Formation de métabolite : orange → jaune

Evaluation : - 18 BGN produisant méthylases ARNr 16S
- 20 BGN produisant AAC, AAD, APH
- 10 souches sensibles

Gold standart : CMI milieu liquide
Sensibilité 100%, Spécificité 97%
Rapide < 2h

→ Test positif dès que les CMI à l'amikacine et la gentamicine sont supérieures à 30 mg/L
Compatibilité à partir de tous milieux, interférence possible si colonie sur drigaslski, mac conkey
Non compatible pour les non fermentants : *Pseudomonas* et *Acetobacter*

Détection de la résistance multiple aux aminosides : SuperAminoglycosides medium

SuperAminoglycosides medium



Détection des *Pseudomonas*, *Acinetobacter*,
Entérobactéries résistantes aux aminosides

- 22 BGN produisant méthylases ARNr 16S
- 37 BGN produisant AAC, ANT (AAD), APH
- 12 souches sensibles

Gold standart : CMI milieu liquide
Sensibilité 95%, Spécificité 96%
18H

Détection des méthylases de l'ARNr 16S → Test positif dès que les CMI à l'amikacine et à la gentamicine sont supérieures à 30 mg/L
Intérêt humains et animaux

Détection de la résistance multiple aux aminosides : SuperAminoglycosides medium

Écouvillon rectal préenrichissement en LB
Inoculation 10 μ l



Application sur prélèvements cliniques

Screening : enfant hospitalisé en Angola

20 positifs

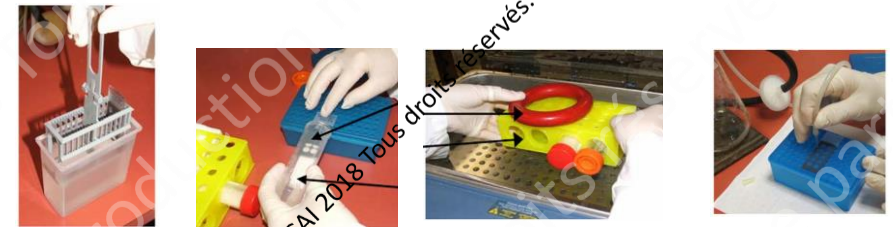
22 méthylases

16 RmB/5 ArmA/1 RmC

Détection de la résistance multiple aux aminosides : microarray

	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20	21-22
1			TetB	TetG	TEM1	aadA2	floR	qac	strA		
2		strB	bla carb-2	Sul1	TEM2	TetE	OtrB	TetH	TEtO	TetS	
3	TetW	TetM	Tet30	tetC	tetD	tetD	TetU	TetK	TetQ	TetX	TetT
4	TetU	TetV	Aph(3)-Ia	aph(3)-IIa	aph4	aphA-3	aphD	aphE	aphIII	bla-CMY-2	blaCTX-M-1
5	bla-CTX-M-12	bla-DHA-1	bla-FOX-2	bla-MMP-2	bla-KPC-3	bla-OXA-1	bla-OXA-2	bla-OXA-27	bla-OXA-2b	bla-OXA-6	bla-OXA-7
6	bla-OXA-9	bla-OXY-K1	bla-PSE-1	bla-PSE-1	bla-PSE-4	bla-ROB-1	bla-SHV-37	catI	catII	catIII	cblA
7	dhfrII	dhfrIII	dhfrIX	dhfrIV	dhfrVI	dhfrVIII	dhfrXII	dhfrXIII	dhfrXV	aidA	aafA
8	aap	aatA	aggA	pet	ehxA	stx1A	stx1B	tir-2	invX	ipaB	sopA
9	bfpA	espC	cif	eae	folA	leoA	stII	fl65(1)A	sfaA	sfaD	sfaD
10	sfaHII	saa	hlyA	papG12	usp	wzya(1-2)	rfbE(A_D)	abe(C2-C3)	wbaV(B)	wbaU(B_D)	wbaA
11	wbaU(D)	wbaO(E1_D2)	TetA	aadA1	bla-CTX-M-2	bla-CTX-M-8	catP	dfrA1	aac(3)-Ia	aac(3)-Ib	aac(3)-IIa
12	aac(3)-III	aac(3)-IVa	aac(3)-Vb	aac(6)-Ia	aac(6)-Ib	aacC1	aacC2	aadA7	aadB	aadE	dhf-ACC-01
13	bla-MIR	cat	cat4	cmIA	cmIB	Dfr1	dhfrI	dhfrVII	dhfrX	IntJ	IntI2
14	DT104	SSpp	sefA	164	sipC	IncP / trfA2	IncN / kika	IncW / trwAB	IncFII / Ori	Int1	stb
15	fliCH7	rfbE	estA	spvR	spvC	sipA	invA	fliC	pacC	mpha	ent
16	parAB	Iterons H12	RNAI I	Ori gamma X	pir X	repA L/M	repA M/L/M	repC L/M	repN	Iterons FIA	repA FIB
17	repA W	repA Y	Iterons P	repA2 FIC	repA FIC	repA T	RepA FHS	RNAI/repA	RNAI K/B	RNAI B/O	catB2
18		catB3	catB8	aadA5	aadA21	aacCA5	aac(6)-I30	aac(6)-IIa	aphA7	dfrA1	
19	Biotin	dfrA16	dfrA19	dfrA2	dfrA23	sul3	ETIIa	qnrA1			
20	Biotin	Biotin	qnrB	qnrS	Stx2A	Stx2B	Bla-CTX-M-14	TetQ			

203 sondes, 117 gènes de résistance
 29 gènes de résistance aux aminosides
 8 aph, 7 aad, 12 aac, 2 str
 5 amikacine^R, 10 gentamicine^R





Détection de la résistance multiple aux aminosides : microarray

81 *E. coli* bétail → non détection du gène 11/81 (13,5%) phénotypes inexpliqués car gènes non présents dans le panel → découverte d'une souche productrice RmtE

TABLE 2. Resistance gene microarray hybridization results for *E. coli* isolates having an aminoglycoside resistance phenotype not explained by any genes detected using the oligonucleotide microarray

Isolate	Unexplained resistance phenotype ^a	<i>aac(3)-III</i>	<i>aac(6')-IIIa</i>	<i>aac(3)-IVa</i>	<i>aac(3)-IVa</i>	<i>aacC2</i>	<i>aadA1</i>	<i>aadA2</i>	<i>aadA21</i>	<i>aadA5</i>	<i>aph(3')-Ia</i>	<i>aph4</i>	<i>aphA7</i>	<i>strA</i>	<i>strB</i>
1090	Gentamicin, amikacin							+	+		+		+	+	+
2517	Gentamicin, amikacin										+		+	+	+
2521	Gentamicin, amikacin								+						
2534	Amikacin				+		+	+					+	+	+
2535	Amikacin	+				+	+	+					+	+	+
2545	Amikacin			+			+	+					+	+	+
2550 ^b	Gentamicin, amikacin									+			+	+	+
2551 ^b	Amikacin	+	+				+	+	+				+	+	+
2577	Gentamicin, amikacin												+	+	+
2612	Amikacin	+	+			+				+			+	+	+
2614	Amikacin	+				+				+			+	+	+

^a Phenotypic resistance characteristic for which no explanatory gene was detected on the array. All isolates were resistant to the four aminoglycosides, amikacin, gentamicin, kanamycin, and streptomycin, as measured by a standard disk diffusion assay, and all isolates demonstrated a MIC of >32 µg/ml for amikacin and >8 µg/ml for gentamicin. All isolates were PCR positive for the *rmlA* methyltransferase gene (GenBank accession no. GU201947) described herein.

^b Isolates 2550 and 2551 were from the same calf fecal sample.

Très manuel, temps technicien +++ , panel incomplet (méthylases ?)



Détection de la résistance multiple aux aminosides : tandem-PCR

MT-PCR (AusDiagnostics, Sydney, Australia) : multiplex PCR puis RT-PCR (nichée)
sensibilité & spécificité > 90%

8-plex

5	<i>aac(6')</i> (including <i>Ib, Ic, Ig, Iy, Iq II, IIc</i>)	acetyltransferase [AAC(6')-I]	aminoglycoside (amikacin, tobramycin)
6	<i>aadA</i> (including <i>aadA1/A2/A3</i>)	adenyltransferase [ANT(3'')-I]	aminoglycoside (streptomycin)

16-plex

13	<i>aac(6')</i>	including <i>Ib, Ic, Ig, Iy, Iq II, IIc</i> and <i>aac(6')-Ib-cr</i>
14	<i>aadA</i>	including <i>A1, A2, A3</i>

35 isolats, 74 prélèvements

aadA1/A2/A3 Sensibilité 57,7% % spécificité 64,7%

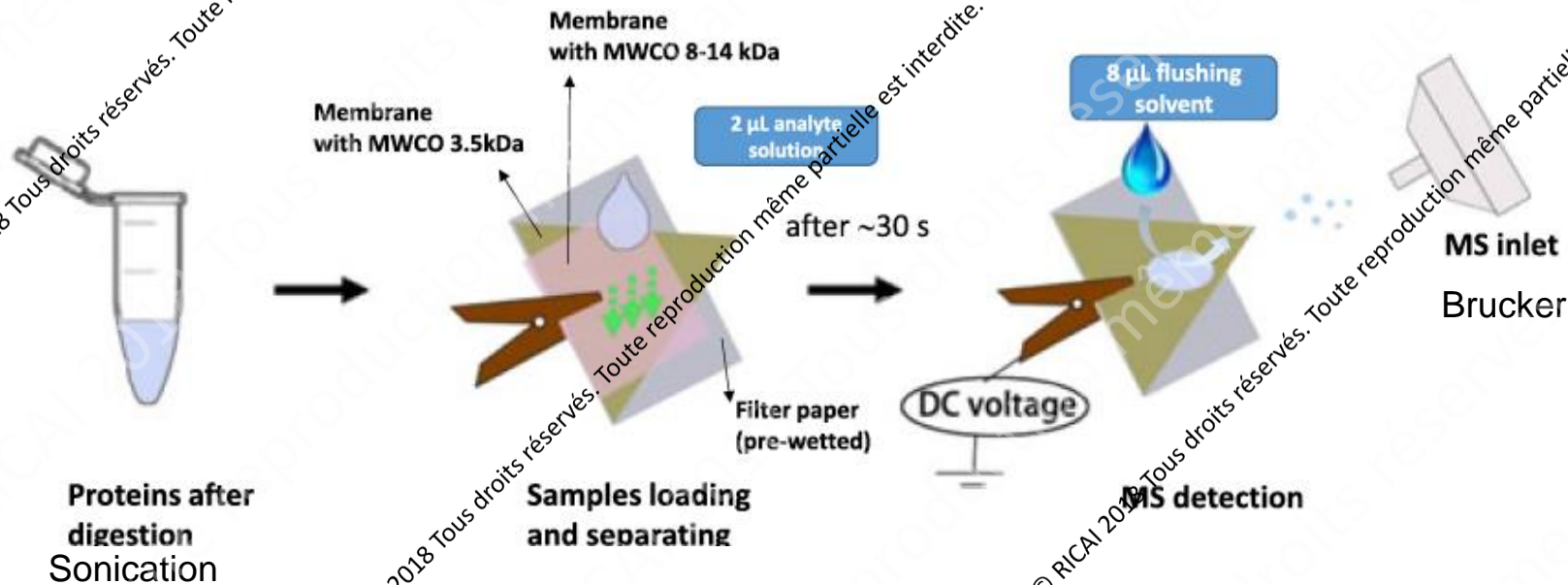
aac(6')-Ib Sensibilité 91,7% % spécificité 100%

Diminution performance sur prélèvements

→ Panel peu approprié pour le dépistage des résistances aux aminosides

Détection de la résistance multiple aux aminosides : MESI-MS

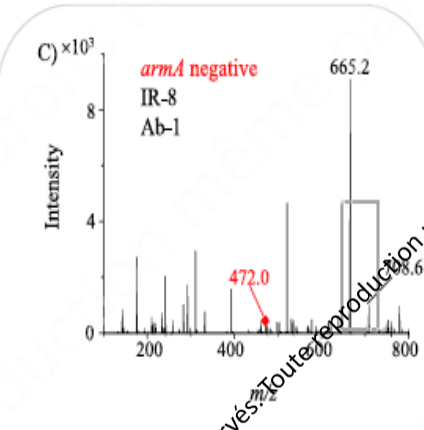
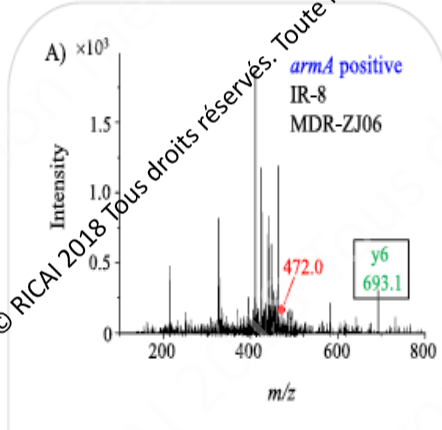
Membrane electrospray
ionisation mass spectrometry



Détection de la résistance multiple aux aminosides : MESI-MS

MESI-MS : Membrane Electrospray
Isonisation Mass Spectrometry

Dépiste le peptide IHSSTNER (IR-8) peptide
précurseur unique de la méthylase ArmA



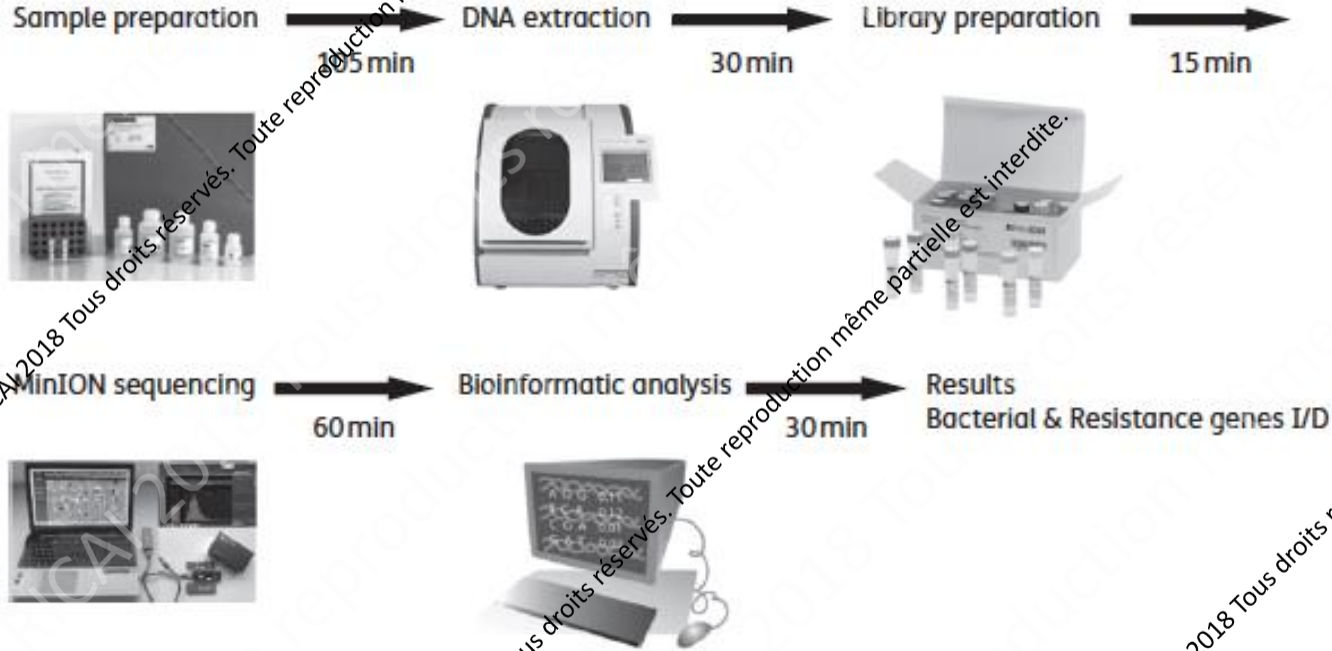
Détection : *Acinetobacter* & Entérobactéries
résistants aux aminosides

7 BGN produisant méthylases ArmA
7 souches sensibles

Dépistage peptide dans 100% des cas

Rapide : 2h

Détection de la résistance multiple aux aminosides : Minion





Détection de la résistance multiple aux aminosides : MinION

Table 3. Acquired resistance genes identified during four MinION runs for urine spiked with *E. coli* H141480453, compared with Illumina sequencing of the cultivated organism

Genes	Illumina	MinION run 1 (run time=30 h)	MinION run 2 (run time=48 h)	MinION run 3 ARMA (run time=1 h)	MinION run 4 (run time=1 h)
Aminoglycoside resistance genes					
<i>aacC</i>	<i>aacC2</i>	<i>aacC2</i>	<i>aacC2</i>	<i>aacC2</i>	<i>aacC2, aacC8</i>
<i>aadA2, aadA3, aadA5</i>	<i>aadA2, aadA3, aadA5</i>	<i>aadA2, aadA3</i>	<i>aadA5</i>	<i>aadA2, aadA3, aadA5, mv</i>	<i>mv not including aadA, aadA3, aadA5</i>
<i>rmtB</i>	<i>rmtB</i>	<i>rmtB</i>	<i>rmtB</i>	<i>rmtB</i>	<i>rmtA</i>
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib</i>
<i>strA/B</i>	<i>strA/B</i>	<i>strA/B</i>	<i>strA/B</i>	<i>strA/B</i>	<i>strA</i>

Résultats obtenus sur Illumina (bactérie en culture) et Minion (sur urines) très superposable

aadA2 et *aadA3* sont étroitement liés, *aadA5* diffère considérablement

Variant *aac(6')-Ib-cr* reconnu systématiquement signalée



Détection de la résistance multiple aux aminosides : MinION

Table 1: Percent agreement between three different sequencing and analysis approaches compared to phenotypic antimicrobial susceptibility testing results for the 40 *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates

Antibiotic	Phenotypic Antimicrobial Susceptibility Testing Results		Real-Time Approach (% agreement)	Assembly Approach (% agreement)	Hybrid Nanopore-Illumina Assembly (% agreement)
	% Susceptible	% Not Susceptible			
Piperacillin-tazobactam	25	75	80	85	85
Ceftriaxone	25	75	93	95	95
Cefepime	28	72	95	98	98
Ceftazidime-avibactam	93	7	100	100	100
Ertapenem	78	22	83	85	85
Meropenem	40	60	93	95	95
Amikacin	78	22	78	85	85
Gentamicin	60	40	45	93	95
Ciprofloxacin	33	67	30	98	98
Colistin	93	7	93	98	98
Doxycycline	50	50	63	80	80
Trimethoprim-sulfamethoxazole	35	65	68	93	93
Overall Agreement			77%	92%	92%

40 *K. pneumoniae* dont ½ productrice de carbapénémase

70% produisaient AME
 Comparaison résultats obtenus par 3 techniques de séquençage



Détection de la résistance multiple aux aminosides : MinION

Table 2: Percent agreement between antibiotic resistance determinants identified using a Pilon-correct Illumina/Nanopore assembly-based approach and antimicrobial susceptibility testing predictions

Antibiotic resistance determinants identified (number) ^a	Anticipated antibiotic resistance	Specific isolate numbers (some isolates have more than 1 gene/mutation in each category)	False positive	True positive	Percent agreement
Aminoglycoside modifying enzymes ¹⁰ aminoglycoside N-acetyltransferases [AACs], aminoglycoside O-nucleotidyltransferases [ANTs], aminoglycoside acylphosphotransferases [APHs]					
One aminoglycoside transferring enzyme mutation	Gentamicin	36, 37	1	1	100%
	Tobramycin		1	1	50%
Two aminoglycoside transferring enzyme mutations	Gentamicin	1, 31	2	0	0%
	Tobramycin		2	0	0%
Three aminoglycoside transferring enzyme mutations	Gentamicin	7, 11, 13, 19, 21, 32	5	1	17%
	Tobramycin		0	6	100%
Four aminoglycoside transferring enzyme mutations	Gentamicin	16, 17, 22, 26, 27, 28, 29	3	4	57%
	Tobramycin		0	7	100%
Five or more aminoglycoside transferring enzyme mutations	Gentamicin	2, 6, 8, 10, 12, 14, 20, 23, 24, 30	1	9	90%
	Tobramycin		0	10	100%
Ribosomal RNA methyltransferase mutations (3) ¹¹ <i>armA</i> ; <i>rmtA</i> ; <i>rmtB</i> ; <i>rmtC</i> ; <i>rmtD</i> ; <i>rmtE</i>	Amikacin	12, 24, 29	0	3	100%
	Gentamicin		0	3	100%
	Tobramycin		0	3	100%

Peu d'isolat (n=40) mais 100% agrément pour les souches productrices de méthylases ou ≥ 4 enzymes



Conclusions

- Les aminosides font parti de l'arsenal thérapeutique permettant la prise en charge des patients infectés avec des bactéries à Gram négatifs multirésistantes aux antibiotiques
- Dépistage de la parrésistance aux aminosides reste complexe du fait des associations d'enzyme modifiant les aminoglycosides (AME) aux sein des souches.
- Les tests phénotypiques et milieux spécifiques culturaux sont en 2018 un moyen simple, rapide et fiable pour dépister rapidement les souches productrices de méthylase de l'ARNr 16S.



Remerciements

Equipe IAME-LEA

Pr Erick Denamur

Collègues des hôpitaux participants surveillance methylase - Iame Resistant Groupe

Pr Patrice Nordmann, Laurent Poirel

Equipe St Louis

François Camélena (Poster méthylase P-007)

Bio-informaticienne : Manel Mérimèche

Plateforme de Séquençage St Louis : Severine Mercier-Delarue

Plateforme d'analyse Bioinformatique APHP : Alban Lermine



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