



جامعة محمد الخامس بالرباط
Université Mohammed V de Rabat

UNIVERSITE MOHAMMED V-RABAT
FACULTE DE MEDECINE ET DE
PHARMACIE RABAT



ANNEE : 2021

N° :062

Mémoire de fin d'études

*Pour L'obtention du Diplôme National de Spécialité
en ANALYSES BIOLOGIQUES MEDICALES*

Intitulé

**RESISTANCE A LA COLISTINE
CHEZ LES BACILLES A GRAM NEGATIF**

Présenté par :

Docteur El mrimar Nadia

Encadré par :

Professeur

Elouennass Mostafa

Session

Juillet 2021



Dédicaces



A notre Maître

Le Professeur M. ELOUENNASS

Professeur Agrégé de Microbiologie

Chef de service du Laboratoire de Bactériologie

Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V

*C'est pour moi un grand honneur et une grande
fierté que vous me faites en acceptant de diriger ce travail.*

*Vos compétences professionnelles et vos qualités
humaines sont connues de tous.*

*Nous vous exprimons nos sincères gratitudee et notre profond respect
pour la qualité de votre enseignement, vos conseils et l'intérêt
incontestable que vous portez à tous vos étudiants.*

A tous nos maîtres

*Qui nous ont guidés avec bienveillance, sollicitude et compréhension
pour l'acquisition du savoir nécessaire à l'exercice de notre profession.*

*Nous espérons être dignes de leur confiance
et à la hauteur de leurs attentes.*

*Veillez recevoir ici, l'expression de notre dévouement,
de notre reconnaissance, notre respect et de notre grande admiration.*

« Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leur père ».

[Hippocrate]



Liste des abréviations



LISTE DES ABREVIATIONS

ATCC	: American Type Culture Collection
BCP	: BromoCrésol Pourpre
BGN	: Bacille à Gram Négatif
BLSE	: Bêta-Lactamase à Spectre Etendu
BMR	: Bactérie Multi-Résistante
CA-SFM	: Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
CMS	: Colistine Méthane Sulfonate
CTX-M	: Céfotaximase
EARS-Net	: European Antimicrobial Resistance Surveillance Network
EBLSE	: Entérobactérie productrice de Bêta-Lactamase à Spectre Etendu
ECBU	: Examen Cyto-Bactériologique des Urines
ECDC	: European Centre for Disease prevention and Control
EPC	: Entérobactérie Productrice de Carbapénèmase
EUCAST	: EUropean Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
IV	: IntraVeineuse
KPC	: Klebsiella Pneumoniae Carbapénèmase
LPS	: LipoPolySaccharide
NDM	: New Delhi Metallo-bêta-lactamase
ONERBA	: Observation National de l'Epidémiologie et de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques
OXA	: Oxacillinase
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PK/PD	: Pharmacocinétique et Pharmacodynamique
PLP	: Protéines Liant les Pénicillines
UFC	: Unité Formant Colonie
VIM	: Verona Integron-encoded Metallo-bêta-lactamas



Liste des illustrations



LISTE DES TABLEAUX :

<i>Tableau 1 :Schéma de préparation des gammes de dilutions d'antibiotiques à utiliser pour la détermination de la sensibilité in vitro aux agents antimicrobiens en milieu liquide.....</i>	<i>29</i>
<i>Tableau 2: La distribution des germes BMR.....</i>	<i>37</i>
<i>Tableau 3: La distribution des germes BMR selon les services</i>	<i>38</i>
<i>Tableau 4: La distribution des germes BMR selon les types de prélèvement</i>	<i>40</i>
<i>Tableau 5: Le résultat du carba test des entérobactéries BMR</i>	<i>41</i>
<i>Tableau 6: tableau croisé des germes avec la CMI de la colistine</i>	<i>42</i>
<i>Tableau 7: Tests du Khi-deux pour la CMI de la colistine et les germes</i>	<i>43</i>
<i>Tableau 8: tableau croisé entre les germes BMR et leurs Profil de résistance</i>	<i>44</i>
<i>Tableau 9: Tests du Khi-deux du Tableau entre les germes BMR et leurs Profil de résistance.....</i>	<i>44</i>
<i>Tableau 10: tableau croisé entre la CMI de la colistine et les profils de résistance des BMR45</i>	
<i>Tableau 11: Tests du Khi-deux du tableau croisé entre la CMI de la colistine et les profils de résistance des BMR</i>	<i>45</i>
<i>Tableau 12: La distribution des Acinetobacter baumannii BMR selon les services</i>	<i>47</i>
<i>Tableau 13: La distribution des Acinetobacter baumannii BMR selon la nature du prélèvement</i>	<i>49</i>
<i>Tableau 14: Le résultat du carba test des Acinetobacter baumanniiBMR</i>	<i>50</i>
<i>Tableau 15: la distribution de la CMI de la colistine des Acinetobacter baumannii BMR.....</i>	<i>51</i>
<i>Tableau 16: tableau croisé de la CMI de la colistine avec le sexe du patient</i>	<i>53</i>
<i>Tableau 17: Tests du Khi-deux du tableau croisé de la CMI de la colistine avec le sexe du patient</i>	<i>53</i>
<i>Tableau 18: tableau croisé de la CMI de la colistine avec le carbatest.....</i>	<i>54</i>
<i>Tableau 19: Tests du Khi-deux du tableau croisé de la CMI de la colistine avec le carbatest.....</i>	<i>54</i>

Tableau 20: tableau croisé de la CMI de la colistine avec les services	55
Tableau 21: Tests du Khi-deux du tableau croisé de la CMI de la colistine avec les services	56
Tableau 22: tableau croisé du type de prélèvement et la CMI de la colistine	56
Tableau 23: Tests du Khi-deux.....	57

LISTE DES FIGURES :

Figure 1: incidence des <i>Escherichia coli</i> producteur de BLSE	6
Figure 2: incidence des entérobactéries producteur de BLSE	6
Figure 3: Pourcentage de souches invasives de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ayant une résistance aux carbapénèmes en 2016 par pays en Europe. EARS-Net 2016-2017.....	8
Figure 4	10
Figure 5 : Schéma des mécanismes de résistances acquises chromosomiques aux polymyxines.+ r.....	14
Figure 6: Répartition géographique du gène <i>mcr-1</i> (au 2 juin 2016). Les pays représentés en couleur ont signalé au moins un isolat avec le gène <i>mcr-1</i>	16
Figure 7: Exemple de l'inoculation des microplaques:	31
Figure 8: Exemple de lecture:	32
Figure 9: Tableau 2 : La distribution des germes BMR	37
Figure 10: La distribution des germes BMR selon les services	39
Figure 11: La distribution des germes BMR selon le type de prélèvement	40
Figure 12: le résultat du carba test des entérobactéries BMR.....	41
Figure 13: La distribution de la CMI de la colistine des entérobactéries BMR.....	42
Figure 14: La distribution de la CMI de la colistine des entérobactéries BMR selon les germes	43
Figure 15: La distribution de la CMI de la colistine des entérobactéries BMR et leurs profils de résistance	46
Figure 16: La distribution des <i>Acinetobacter baumannii</i> BMR selon les services	48
Figure 17: La distribution des <i>Acinetobacter baumannii</i> BMR selon la nature du prélèvement	49
Figure 18: Le résultat du carba test des <i>Acinetobacter baumannii</i> BMR	50

Figure 19: la distribution de la CMI de la colistine des <i>Acinetobacter baumannii</i> BMR.....	51
Figure 20: la distribution de la CMI de la colistine des <i>Acinetobacter baumannii</i> BMR.....	52
Figure 21: la distribution de la CMI de la colistine des <i>Acinetobacter baumannii</i> BMR selon la nature du prélèvement	57
Figure 22: la distribution de la CMI de la colistine des <i>Acinetobacter baumannii</i> BMR selon la nature du prélèvement et le résultat du carba test	58



Sommaire



SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
1-ENTEROBACTERIES ET RESISTANCE	4
2-GENERALITES SUR LA COLISTINE.....	9
3-RESISTANCE A LA COLISTINE	12
A) Résistances chromosomiques	13
B) 2015 : découverte d'une résistance plasmidique (mcr-1)	15
3-DETERMINATION DE LA SENSIBILITE A LA COLISTINE	19
A-Rappels sur les méthodes d'antibiogrammes	19
B- CMI déterminée par les bandelettes imprégnées d'un gradient de concentrations d'antibiotiques :	20
C- CMI par microdilution.....	20
D-Problèmes rencontrés pour la détermination de la sensibilité à la colistine au laboratoire :	21
E-Evaluation des différentes méthodes commercialisées :	22
4-OBJECTIFS DE LA THESE	24
MATERIEL ET METHODES	25
1-DONNEES	26
2-DETERMINATION DES CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES (CMIS)	28
A-Matériels :	28
B-Préparation de solutions de stock d'antibiotiques	29
C-Préparation de l'inoculum.....	30
D- La lecture	31
E-Critère d'interprétation :	32
3-CARBA TEST NP	33
RESULTATS :	35
DISCUSSION	59
CONCLUSION	66
RESUMES	68
REFERENCES	70



Introduction



Les entérobactéries (Enterobacteriaceae) sont des bacilles à Gram négatif, ce sont des commensaux résidant principalement au niveau du tube digestif de l'homme et des animaux. Elles peuvent être responsables d'infections, en effet, On estime qu'elles sont impliquées dans 50% des cas de septicémies, 60 à 70% des entérites et 70% des infections urinaires. L'antibiorésistance est un sujet de Santé Publique international majeur. Depuis de nombreuses années, on observe une émergence de bactéries multi-résistantes (BMR). L'émergence des BMR et leur diffusion sont le résultat de deux facteurs conjoints : la pression de sélection par les antibiotiques et la transmission des souches résistantes, transmission croisée, ou des supports génétiques de la résistance (plasmides). Les bactéries sont dites multi-résistantes aux antibiotiques lorsque, du fait de l'accumulation de résistances acquises à plusieurs familles d'antibiotiques, elles ne sont plus sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques utilisables en thérapeutique. La multirésistance est une étape vers l'impasse thérapeutique.

L'évolution et la diffusion des résistances aux antibiotiques, notamment pour des bactéries pathogènes a provoqué des difficultés thérapeutiques pour certaines infections chez l'Homme.

L'augmentation globale de la résistance s'accompagne en outre d'une diminution de la découverte de nouvelles molécules antibiotiques depuis deux décennies, pourtant nécessaires pour pallier ce problème. La crainte principale est l'arrivée d'une nouvelle ère dans laquelle l'arsenal thérapeutique contre les infections deviendrait très limité, voire inexistant. En l'absence de nouveau traitement disponible, une alternative réside dans l'utilisation de molécules antibiotiques anciennes dont l'usage avait été abandonné. La colistine figure

parmi ces molécules qui ont été réintroduites dans l'arsenal thérapeutique. Cet antibiotique polypeptidique de la famille des polymyxines a été découvert en 1950 par Y. Koyama à partir de cultures de *Bacillus colistinus* [1], mais a été délaissé en médecine humaine à partir des années 1970 en raison de problème de toxicité [2]. Depuis environ une décennie, la colistine redevient ainsi un traitement d'actualité pour lutter contre certaines bactéries multi-résistantes en milieu hospitalier et est maintenant considéré comme un antibiotique de dernier recours.

L'émergence de la résistance à la colistine apparaît depuis ces dernières années et semble être fortement liée à une utilisation excessive de la colistine et à des doses non optimales favorisant la pression de sélection. Les résistances observées ces cinq dernières années concernent principalement *K. pneumoniae*.

On observe, dans les pays où la prévalence des entérobactéries productrice de carbapénèmes est importante et qui ont ainsi une consommation de polymyxines élevée, l'émergence de bactéries résistantes à la colistine. En Grèce ou en Italie, par exemple, la résistance à la colistine atteint des proportions inquiétantes notamment chez *K. pneumoniae* producteurs de carbapénémases

L'émergence de la résistance plasmidique à la colistine est un enjeu majeur de santé publique. En l'absence de nouveaux traitements efficaces, il est essentiel de prendre des mesures pour contrôler la propagation de la résistance à la colistine. Pour cela, les laboratoires de microbiologie doivent détenir les meilleurs moyens diagnostiques afin de détecter ces résistances. Il est donc nécessaire d'avoir des techniques de détermination de la sensibilité à la colistine fiables et reproductibles.

1-ENTEROBACTERIES ET RESISTANCE

Les entérobactéries (Enterobacteriaceae) sont des bacilles à Gram négatif constituant l'une des plus importantes familles de bactéries. Les entérobactéries rassemblent de nombreux genres dont *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Shigella*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Proteus*. Pour la plupart, ce sont des commensaux résidant principalement au niveau du tube digestif de l'homme et des animaux. *Escherichia coli* représente l'espèce bactérienne aérobie dominante de l'intestin à raison de 10⁸ par gramme de fèces (flore totale : 10¹¹ à 10¹² bactéries par gramme). Pour certaines, ce sont des pathogènes stricts (ex : *Salmonella Typhi* ou *Shigella dysenteria*). Elles peuvent aussi être, à l'hôpital, responsables d'infections dites opportunistes chez des patients souvent fragilisés. On estime qu'elles sont impliquées dans 50% des cas de septicémies, 60 à 70% des entérites et 70% des infections urinaires. Elles sont généralement traitées par des bêtalactamines. Les bêtalactamines constituent la plus grande famille d'antibiotiques. Elle regroupe les pénicillines, les céphalosporines, les monobactames et les carbapénèmes. Toutes se fixent aux protéines de liaison des pénicillines (PLP) inhibant ainsi la synthèse du peptidoglycane, composant essentiel de la paroi bactérienne[3]. Cependant, depuis de nombreuses années, on observe une émergence de bactéries multi-résistantes (BMR). L'émergence des BMR et leur diffusion sont le résultat de deux facteurs conjoints : la pression de sélection par les antibiotiques et la transmission des souches résistantes, transmission croisée, ou des supports génétiques de la résistance (plasmides) [4]. Les bactéries sont dites multi-résistantes aux antibiotiques lorsque, du fait de l'accumulation de résistances acquises à plusieurs familles d'antibiotiques, elles

ne sont plus sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques utilisables en thérapeutique. La multirésistance est une étape vers l'impasse thérapeutique. La résistance des entérobactéries aux bêtalactamines est principalement due à des bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE), enzymes qui hydrolysent l'ensemble des pénicillines ou céphalosporines à l'exception des céphamycines et des 22 carbapénèmes[4]. Les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (EBLSE) ont émergé dans les années 1980 : elles étaient alors principalement représentées par *K. pneumoniae* et *E. aerogenes* et quasi exclusivement responsables d'infections nosocomiales. A la fin des années 1990, on observe l'émergence d'un nouveau type de BLSE (les céfotaximase-Munich (BLSE CTX-M)), retrouvées principalement chez *E. coli* et dans les infections communautaires.

Ce phénotype de BLSE touchant principalement *E. coli*, entérobactérie principale du tube digestif de l'homme, constitue un nouveau péril fécal et un réservoir de BLSE pour les autres espèces d'entérobactéries qui colonisent ou transitent par le tube digestif de l'homme [5, 6].

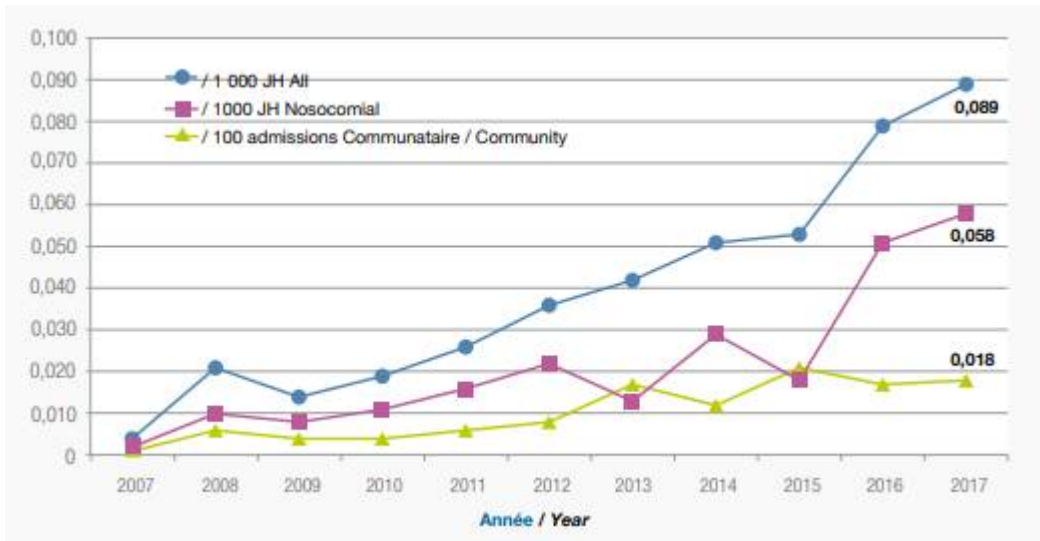


Figure 1: incidence des *Escherichia coli* producteur de BLSE

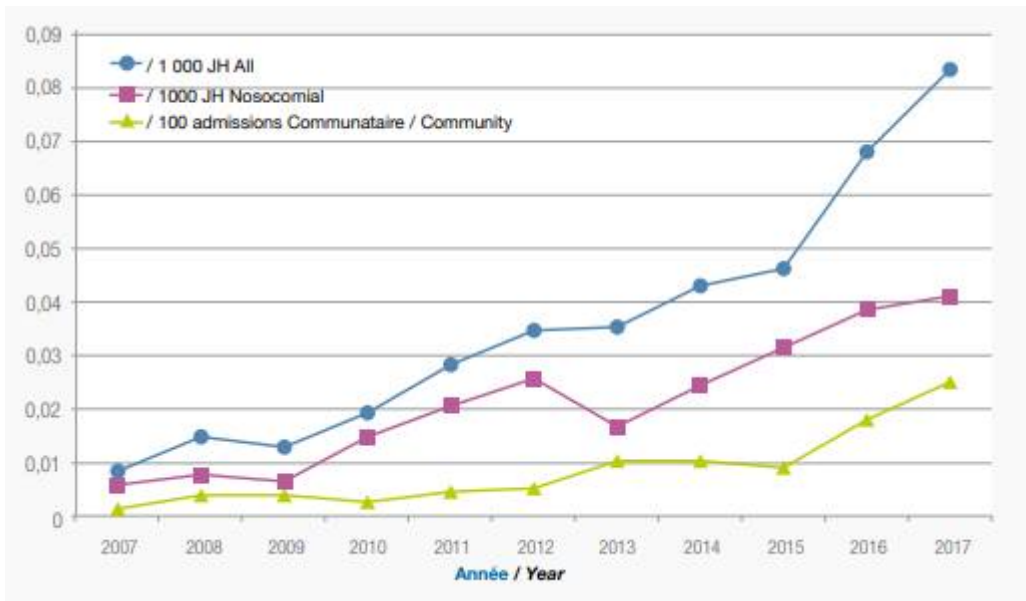


Figure 2: incidence des entérobactéries producteur de BLSE

Avec l'augmentation de l'incidence des entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération (EBLSE ou hyperproduction de la céphalosporinase), la consommation des carbapénèmes a augmenté ces dernières années [7].

Par conséquent, des souches résistantes aux carbapénèmes apparaissent. Cette résistance peut provenir de deux mécanismes différents : soit la présence d'une imperméabilité aux carbapénèmes, soit l'acquisition d'une carbapénémase[8]. Le nombre d'entérobactéries ayant une sensibilité diminuée aux carbapénèmes a augmenté selon une étude réalisée au service de bactériologie de l'hôpital militaire [9]

En Europe, la résistance aux carbapénèmes reste très limitée. Les données du réseau EARS-Net montrent que la proportion de souches résistantes aux carbapénèmes, en France en 2016, était de 0,4% dans l'espèce *K. pneumoniae*. En comparaison, cette dernière proportion était bien plus élevée dans les pays tel que la Grèce (66,9%), l'Italie (33,9%) et la Roumanie (31,4%) [10] (Figure 1). Mais le contrôle de la diffusion de ces carbapénémases reste difficile [11].

Les EPC conduisent à une inefficacité partielle ou totale des antibiotiques de la classe des carbapénèmes. L'émergence et la diffusion des EPC peuvent être à l'origine d'infections difficiles voire impossibles à traiter.

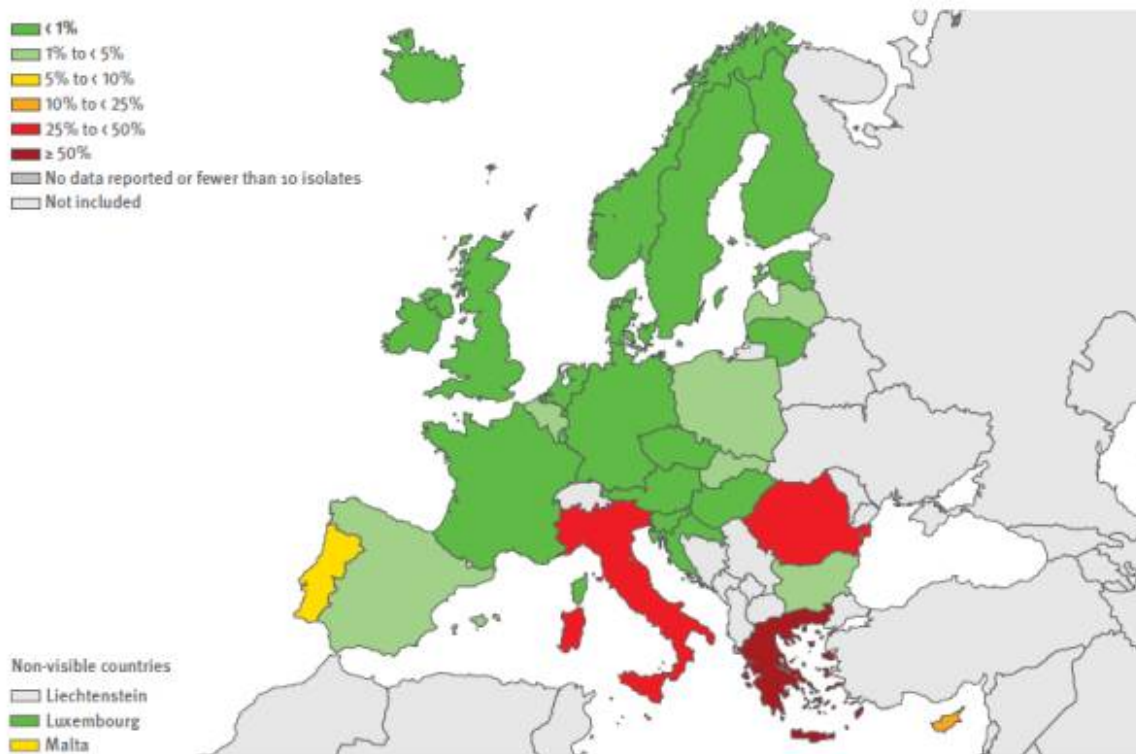


Figure 3: Pourcentage de souches invasives de *Klebsiella pneumoniae* ayant une résistance aux carbapénèmes en 2016 par pays en Europe. EARS-Net 2016-2017

2-GENERALITES SUR LA COLISTINE

Les polymyxines sont des antibiotiques naturellement produits par différentes espèces de Paenibacillus. Il existe cinq classes de polymyxines mais seulement deux sont utilisées en thérapeutique : la polymyxine B et la polymyxine E [12]. La colistine est un polypeptide de la famille des polymyxines du groupe E, produit par Bacillus polymyxasubspeciescolistinus. Elle a été découverte en 1950 par Y. Koyama[13], puis a été disponible dans les années 1950 pour le traitement des infections à bacilles Gram négatif [14]. Il s'agit d'un mélange complexe d'au moins 30 composés, dont les deux majeurs sont la colistine A (polymyxine E1) et la colistine B (polymyxine E2). La colistine A et la colistine B diffèrent par une chaîne d'acide gras en position terminale.

La colistine agit en se liant aux lipopolysaccharides (LPS), composant de la membrane externe, uniquement présente chez les bacilles à Gram négatif. Son mécanisme d'action, non totalement élucidé, peut être expliqué par trois modes distincts et concomitants : lyse des membranes bactériennes (mode principal), contact « vésicule-vésicule », et formation de radicaux libres. Ces trois mécanismes aboutissent à la mort de la bactérie [12]. Une activité anti-toxinique a aussi été découverte [15]. Son mécanisme d'action principalement décrit est le suivant : les polymyxines possèdent des charges positives et se lient alors aux LPS chargés négativement. Cette interaction provoque un déplacement des cations divalents (essentiellement Mg^{2+} et Ca^{2+}) responsable de la désorganisation de la structure membranaire permettant à la colistine de

s'insérer dans la membrane externe. La colistine va ensuite entraîner une altération de la perméabilité membranaire et la formation de pores entraînant ainsi une fuite du contenu intracellulaire, à l'origine de la mort de la bactérie (Figure 4) [14, 16, 17].

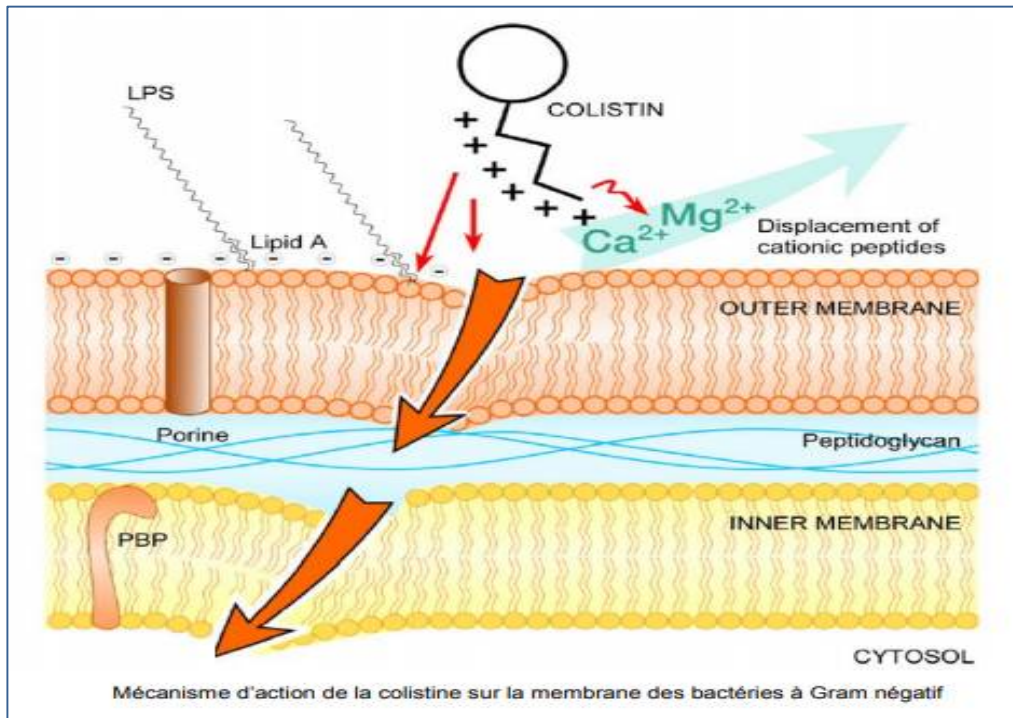


Figure 4

La colistine est caractérisée par une activité bactéricide dirigée contre une majorité de bactéries à Gram négatif, telles que les entérobactéries, à l'exception des genres *Proteus spp.*, *Morganellaspp.*, *Serratia spp.* et *Providenciaspp.*[14]. De récentes études ont démontré la résistance naturelle à la colistine du genre *Hafniaspp.*[18] et la résistance possible de certains « clusters » du complexe *Enterobacter cloacae* [19]. Des niveaux plus élevés de résistance à la colistine

ont été observés sur certains sérotypes de Salmonella dont *S. Enteritidis*. Ainsi, Yvonne Agersosuggère que les CMI de la colistine doivent être évaluées selon le sérovar [20]. La colistine a été utilisée jusqu'aux années 1980 et a ensuite été écartée des protocoles thérapeutiques du fait de l'apparition de nouvelles molécules telles que les céphalosporines de troisième génération mais surtout en raison de sa toxicité rénale [21]. Son utilisation est restée exceptionnelle chez les patients atteints de mucoviscidose pour contrôler les complications infectieuses [22]. Depuis l'émergence de bactéries multi-résistantes dont principalement *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* et *K. pneumoniae* et l'absence de nouveaux antibiotiques efficaces contre ces bactéries, un regain d'intérêt de l'utilisation de la colistine a été observé dès les années 1990[23]. Ainsi en 2012, elle est redevenue un antibiotique prescrit pour le traitement d'infections humaines sévères liées à des bactéries résistantes à toutes les autres options thérapeutiques. La colistine est majoritairement utilisée par voie intraveineuse (IV) mais une récente étude a souligné l'intérêt et l'efficacité de l'inhalation de la colistine pour traiter des infections respiratoires en plus d'une toxicité probablement moindre que par voie IV [24].

Entre 2010 et 2014, les données du réseau européen de surveillance de la consommation d'antibiotiques (ESAC-Net) ont montré que la consommation hospitalière totale de colistine en Europe a augmenté d'environ 50% [25].

3-RESISTANCE A LA COLISTINE

L'émergence de la résistance à la colistine apparaît depuis ces dernières années et semble être fortement liée à une utilisation excessive de la colistine et à des doses non optimales favorisant la pression de sélection [26]. Les résistances observées ces dernières années concernent principalement *K. pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*[12]. On observe, dans les pays où la prévalence des EPC est importante et qui ont ainsi une consommation de polymyxines élevée, l'émergence de bactéries résistantes à la colistine [27, 28]. En Grèce ou en Italie, par exemple, la résistance à la colistine atteint des proportions inquiétantes notamment chez *K. pneumoniae* producteurs de carbapénémases. En effet, chez cette espèce, dans un hôpital en Grèce entre 2007 et 2010, 18,6 % de souches productrices de carbapénémases de type KPC sont résistantes à la colistine [29]. Cette résistance est en constante augmentation. Lors d'une enquête réalisée en 2011 en Italie, 22,4 % des 31 souches productrices de carbapénémases sont résistantes à la colistine et 43% en 2013-2014 [30, 31].

Les études réalisées en Afrique sont rares. Seules trois études récentes réalisées au Nigeria, en Égypte et en Tunisie montrent des prévalences de résistance à la colistine chez les entérobactéries extrêmement faibles [26, 32, 33]. En effet, pour les études nigérienne et égyptienne réalisées respectivement sur 36 souches de *E. coli* isolées de poulets et sur 152 souches de bacilles à Gram négatif MDR (62 *K. pneumoniae* et 34 *E. coli*) isolées de prélèvements cliniques provenant de l'unité de soins intensif de l'hôpital universitaire du

Caire, aucune souche résistante à la colistine n'a été identifiée [32, 33]. L'étude tunisienne réalisée de façon rétrospective sur des souches isolées entre 2005 et 2010 dans le région de Sfax a permis d'identifier des prévalences de résistance à la colistine de 0 %, 1,2 % et 1,5 % pour *E. coli*, *K. pneumoniae* et *E. cloacae*, respectivement [26].

A) Résistances chromosomiques

Cette résistance est pour l'essentiel liée à des altérations chromosomiques dans divers gènes. Ces altérations ont pour principal objectif de conduire à des modifications de charges du LPS ou à une perte du LPS, ce qui va empêcher la fixation de la colistine. Chez les entérobactéries, les modifications du LPS sont régulées par deux systèmes appelés PhoP/PhoQ (lui-même régulé par la protéine transmembranaire MgrB) et PmrA/PmrB. Les principaux mécanismes de résistance à la colistine chez ces bactéries sont l'apparition de mutations, délétions ou insertions sur les gènes impliqués dans l'un ou l'autre de ces systèmes [12, 34]. Une altération sur l'un de ces gènes conduit à des modifications covalente du lipide A du LPS avec des groupes chargés positivement tel que le 4-amino-4-désoxy-L-arabinose ou le phosphoéthanolamine[35]. Une étude récente a permis de montrer l'implication du gène PhoP dans la résistance à la colistine et à déchiffrer les mécanismes conduisant à l'hétérorésistance de la colistine chez *K. pneumoniae* [36]. D'autres stratégies de résistance également utilisées par les bactéries sont la synthèse d'une capsule ou l'expression de pompes à efflux [37, 38]. Une étude a permis de souligner la rapidité de sélection de souches résistantes sous pression

antibiotique [39]. Toutefois, une autre étude a démontré la présence d'un coût biologique associé aux mutations chromosomiques à l'encontre de la colistine, principalement chez *A. baumannii* [40] (figure 5).

Cela signifie que la présence d'une mutation chromosomique peut être associée à une baisse de virulence, mais ceci dépend des souches et du mécanisme de résistance impliqué (chez *A. baumannii* [41] et chez *K. pneumoniae* [42]). Ainsi, avec la diminution du fitness évoquée chez certaines souches, la probabilité de retrouver un mécanisme de résistance plasmidique était très largement rejetée par la communauté scientifique

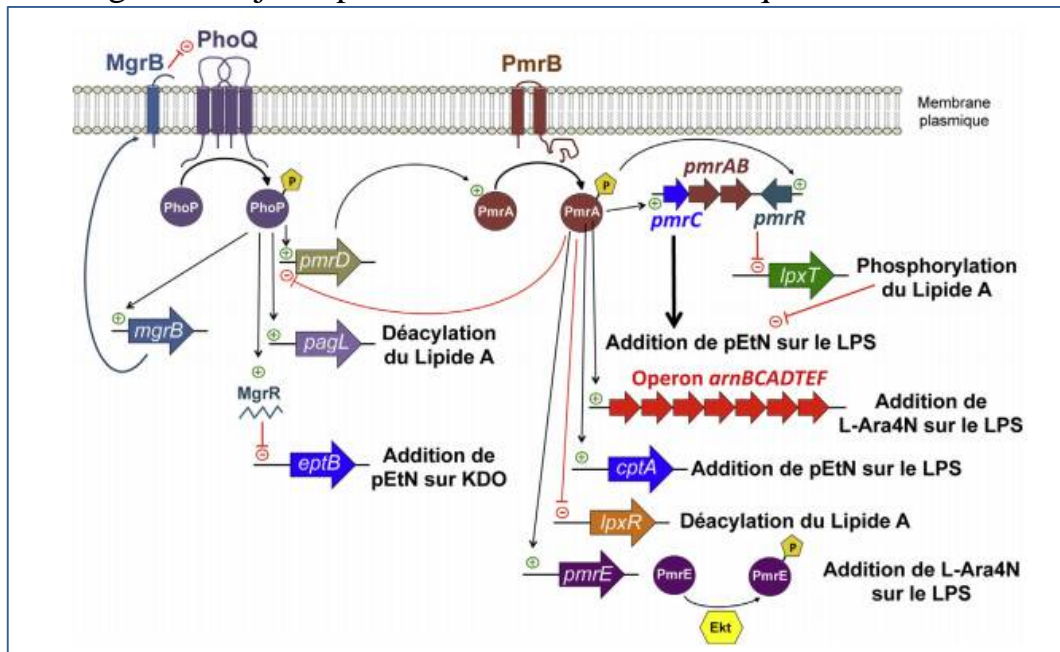


Figure 5 : Schéma des mécanismes de résistances acquises chromosomiques aux polymyxines. + : activation ; - : inhibition ; P : groupement phosphate ; KDO : 2-céto-3-désoxyoctonate ; pEtN : phosphoéthanolamine ; L-Ara4N : 4-amino-4-désoxy-L-arabinose ; LPS : lipopolysaccharide. Les flèches de couleur représentent des gènes. Les protéines cytoplasmiques PhoP, PmrA et PmrE sont représentées par des cercles de couleur.

B) 2015 : découverte d'une résistance plasmidique (mcr-1)

En 2015, le premier mécanisme de résistance plasmidique à la colistine a été décrit en Chine chez l'animal sur une souche d'*E.coli* (le porc). Ensuite ce gène a été décrit aussi chez l'homme et dans l'alimentation [43]. Puis, le même gène a été signalé au Danemark parmi des isolats de BLSE et d'*E.coli* productrices d'AmpC (hyperproduction de céphalosporinase) provenant de viande de poulet et chez l'homme, mais à une prévalence très faible [44]. Cette découverte implique un risque de diffusion par transfert horizontal et le taux de transfert des plasmides portant mcr-1 a une valeur élevée, de l'ordre de 10^{-1} à 10^{-3} [43]. Le gène correspondant, mcr-1, code pour une phosphoéthanolamine transférase plasmidique, qui catalyse l'addition de phosphoéthanolamine sur le lipide A conférant un bas niveau de résistance à la colistine (concentration minimale inhibitrice (CMI) comprises entre 4 mg/L et 8 mg/L [43]. L'origine du gène pourrait être *Paenibacillus spp.* [45]. Dans les six mois suivant sa découverte, le gène mcr-1 a été signalé sur la plupart des continents et présent de façon ubiquitaire puisqu'il a été trouvé dans des isolats provenant d'animaux, d'aliments, de l'environnement et d'humains : particulièrement en Chine (premier pays utilisateur de colistine en santé animale) [46] (figure 6).

On observe une diversité de plasmides véhiculant le gène *mcr-1*, et certains ont été retrouvés chez des souches de bactéries différentes permettant d'imaginer qu'il s'agit d'une diffusion ancienne. En effet, des enquêtes rétrospectives ont permis d'établir la présence du gène *mcr-1* sur des souches de poulets en Chine dès les années 1980 [47] et en France depuis au moins 2005 à partir d'une souche isolée d'un veau [48]. Ces différents plasmides sont principalement identifiés dans le monde animal mais possèdent toutes les caractéristiques pour une diffusion efficace chez l'Homme [12]. Liu et al. suggèrent que les plasmides *mcr-1* restent stables même en l'absence d'une pression de sélection par les polymyxines. Cela faciliterait ainsi la propagation du plasmide dans les populations d'entérobactéries au sein de la population humaine [43].

Le réservoir d'origine supposé du gène *mcr-1* est le monde animal [49] pour diverses raisons :

♣ L'usage important de polymyxines dans le traitement et la prévention des maladies du bétail pourrait être responsable d'une pression de sélection efficace pour l'évolution de la résistance [49, 50]. En effet, la colistine est utilisée dans l'agriculture depuis les années 1950. En 2010, c'était le cinquième antibiotique le plus vendu dans l'agriculture [51].

♣ La prévalence de *mcr-1* est plus faible chez l'homme comparativement à l'animal. La prévalence des souches animales productrices de *mcr-1* a largement augmenté ces dernières années (progression des taux de prévalence d'environ 3% par an entre 2008 et 2014)[47, 52]. Tandis que les résultats de l'étude SENTRY sur 183 hôpitaux à travers le monde en 2014-2015 montraient une prévalence globale chez l'homme inférieure à 0,1% parmi l'ensemble des souches d'*E. coli* et de *K. pneumoniae*[53].

♣ L'association génétique de *mcr-1* avec des résistances au florfénicol (antibiotique uniquement utilisé chez les animaux) [54].

Le gène *mcr-1* a aussi été isolé sur des souches d'entérobactéries comprenant déjà des résistances notamment sur des entérobactéries produisant une BLSE (principalement de type CTX-M) [11, 48, 55]. Plus rarement, le gène *mcr-1* a été isolé sur des souches productrices de carbapénémases [56, 57]. Dans 90% des cas, ces souches porteuses du gène *mcr-1* et également productrices d'une carbapénémase, étaient retrouvées sur des prélèvements d'origine humaine [12]. A titre indicatif, des variants de *mcr-1* ont été identifiés : *mcr-1.2*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* et *mcr-5* [58-62].

L'émergence et la dissémination de la résistance plasmidique sont extrêmement inquiétantes, compromettant le dernier rempart sur la route vers l'impasse thérapeutique, ce d'autant que les perspectives de nouvelles molécules thérapeutiques dans le traitement des infections à EPC sont assez limitées.

Le Haut Conseil de Santé Publique (HCSP), en mai 2017, a recommandé de tester la résistance à la colistine et de rechercher, en cas de résistance, la présence du gène *mcr-1* chez toute souche d'EPC isolée soit lors d'un dépistage ou soit dans un prélèvement à visée diagnostique [63]. Des précautions complémentaires d'hygiène devront être prises et dépendront du profil de résistance de la souche : s'il s'agit d'une EPC porteuse du gène *mcr-1*, il faudra mettre en œuvre les précautions spécifiques BHRé, en plus des précautions standard [64], et s'il ne s'agit pas d'une EPC, les recommandations de la SF2H 2009 «Transmission croisée: précautions complémentaires contact » s'appliqueront [65].

3-DETERMINATION DE LA SENSIBILITE A LA COLISTINE

A-Rappels sur les méthodes d'antibiogrammes

La concentration minimale inhibitrice (CMI) peut être un guide pour le clinicien et reflète l'activité du médicament dans des conditions précises, en tenant compte d'autres facteurs, tels que la pharmacologie du médicament, la pharmacocinétique ou les mécanismes de résistance bactérienne. Cela permet la catégorisation des bactéries comme «sensibles» (S), «intermédiaires» (I) ou «résistantes» (R). De plus, les distributions de CMI peuvent être utilisées pour définir des populations bactériennes de type sauvage ou non sauvage.

Les valeurs critiques sont établies sur la base de données pharmacocinétiques et pharmacodynamiques (PK/PD) par des comités d'experts (en France, le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie : CA-SFM). Pour réaliser l'antibiogramme, les laboratoires disposent d'une variété de méthodes dont la technique de référence est la CMI par microdilution. Il est nécessaire de comparer d'autres méthodes de test de sensibilité (par exemple, diffusion sur disque ou dispositifs de test de diagnostic) avec cette méthode de référence pour la validation, afin de garantir des résultats comparables et fiables.

B- CMI déterminée par les bandelettes imprégnées d'un gradient de concentrations d'antibiotiques :

E-test® ou autres dispositifs. Ces dispositifs permettent de déterminer la CMI grâce à l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel continu de l'antibiotique à tester. Les bandelettes (supports inertes, hydrophobes, de 5 mm de largeur et de 50 mm de longueur) sont appliquées sur la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec un inoculum de la souche à étudier. Après incubation, l'inhibition de la croissance se traduit par une ellipse d'inhibition dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI.

C- CMI par microdilution

Il existe plusieurs systèmes pour déterminer la sensibilité aux antibiotiques en milieu liquide par utilisation de différentes dilutions. L'un utilise une gamme de concentrations. Pour cela, des plaques de microdilution incluant plusieurs antibiotiques à différentes concentrations sont utilisées. Après distribution de l'inoculum dans chaque puits et incubation, les CMI sont définies comme la plus faible concentration d'antimicrobien qui inhibe la croissance visible. L'autre est basé sur des concentrations d'épreuves. Ce système est représenté par l'automate VITEK2® (bioMérieux). Les microplaques sont remplacées par de petites cartes en plastiques contenant des antibiotiques sous forme déshydratée. Avec ce système, la CMI n'est pas lue mais calculée grâce à un algorithme, par comparaison de la croissance en l'absence d'antibiotique (témoin) et en présence d'une concentration test de chaque antibiotique.

D-Problèmes rencontrés pour la détermination de la sensibilité à la colistine au laboratoire :

Les tests de sensibilité à la colistine sont techniquement difficiles en raison de plusieurs problèmes. Tout d'abord, la colistine diffuse très mal en gélose. Ensuite, les polymyxines se lient à une gamme de plastiques et de verre, y compris les plastiques les plus courants (polystyrène et polypropylène) utilisés dans les plateaux de microdilution des tests de sensibilité en laboratoire, ce qui augmente les problèmes de fiabilité et de reproductibilité [66]. Des tentatives pour éviter cette liaison ont été faites en utilisant un surfactant tel que le polysorbate[67]. Mais l'ajout de ce surfactant peut influencer les résultats de la CMI [68]. Actuellement, les techniques de détermination de la CMI (diffusion en milieu gélosé ou en gradient de concentrations) ne sont plus recommandées en raison de la mauvaise diffusion de la colistine dans la gélose [69]. La corrélation des CMI avec les diamètres des zones de diffusion des disques avait déjà été considérée comme problématique il y a plus de 30 ans. De plus, de nombreuses études ont montré une variabilité significative entre les résultats de la CMI lors de l'utilisation de différentes méthodes et la présence d'erreurs très importantes pour certaines [70, 71].

Ces problèmes ont été largement étudiés par le Comité européen sur les tests de sensibilité aux antimicrobiens (EUCAST) et le Clinical Laboratories Standards Institute (CLSI). Les deux recommandent, comme seule méthode de test de sensibilité fiable et reproductible, la détermination de la CMI par méthode de microdilution en bouillon selon le standard ISO 20776-1. Ils

précisent d'utiliser un milieu liquide Mueller-Hinton ajusté en cations, de réaliser le test avec la colistine sulfate (et non la colistine méthanesulfonate : CMS) et d'utiliser des plaques de titrage en polystyrène dépourvues de prétraitement. Aucun autre additif tel que les polysorbates ne doit être utilisé [72]. Le HCSP, en 2016, a donc pris des décisions pour détecter ces souches résistantes à la colistine associées au gène *mcr-1*. Il est ainsi recommandé de déterminer la CMI de la colistine par la méthode de référence de microdilution en milieu liquide selon les recommandations du CA-SFM/EUCAST [73]. La résistance s'exprime le plus souvent à bas niveau avec des valeurs de CMI rapportées comprises entre 2 et 16 mg/L et une CMI médiane à 4 mg/L. Pour pouvoir ensuite attribuer une résistance détectée par la mesure des CMI à l'expression d'un gène *mcr*, il faut détecter la présence de ce gène à l'aide de techniques moléculaires, qui sont les seules permettant un diagnostic spécifique de certitude [74].

E-Evaluation des différentes méthodes commercialisées :

L'EUCAST a publié un avertissement (mis à jour en février 2018) sur les différents tests de sensibilité à la colistine disponibles dans le commerce et sur les différents problèmes détectés. Cet avertissement confirme que la méthode de diffusion sur disque ne peut être utilisée car il n'y a pas de distinction entre les isolats sensibles et résistants en raison d'un problème de diffusion. L'EUCAST a voulu ainsi évaluer différents tests de sensibilité à la colistine commercialisés utilisant la méthode de microdilution en bouillon (Sensititre®, MICRONAUT-S®, MICRONAUT MIC-Strip®, SensiTest® et UMIC®). Deux tests utilisant

des gradients de diffusion (E-test® et CMI Test Strip®) ont aussi été comparés. La méthode de microdilution en bouillon selon la norme ISO 20776-1 a été choisie comme méthode de référence [75].

Soixante-quinze souches de bactéries à Gram négatif ayant des profils de sensibilités vis-à-vis de la colistine variables, ont été testées. Cette étude conclut que les tests en gradients de diffusion sous-estiment les valeurs de la CMI et doivent ainsi être évités même lorsque les résultats du contrôle de qualité se trouvent dans les valeurs limites. Les tests commerciaux ont bien fonctionné et avec des résultats reproductibles. On observe une meilleure corrélation pour Sensititre® et les deux tests MICRONAUT®. L'EUCAST souligne la nécessité d'un contrôle rigoureux de la qualité de toute méthode et recommande aussi d'inclure le contrôle de qualité E. coli NCTC 13846 résistant à la colistine (mcr-1 positif). Les méthodes semi-automatisées n'ont pas pu être évaluées mais des études ont révélé la survenue fréquente d'erreurs très importantes. Par exemple, une étude a comparé deux systèmes semi-automatisés (Phoenix100® et VITEK2®) sur des souches d'*A. baumannii* et conclut que la résistance à la colistine est grandement sous-estimée, ce qui pourrait entraîner une administration inappropriée de colistine. Ainsi, les résultats sensibles à la colistine doivent être vérifiés par une méthode de microdilution en milieu liquide [76]. Ainsi, l'EUCAST conseille aux utilisateurs de ces systèmes d'appliquer des contrôles de qualité rigoureux et de vérifier auprès du fabricant s'ils sont convaincus de la justesse des résultats.

4-OBJECTIFS DE LA THESE

L'objectif principal de notre étude est, à la suite des recommandations de l'EUCAST, de déterminer la distribution de la CMI de la colistine des bactéries à gram négatif multi résistante.



Matériel et méthodes



1-DONNEES

L'étude a été réalisée à partir d'un recueil prospectif issu des prélèvements adressés au laboratoire de bactériologie de l'hôpital militaire d'instruction mohamed V de rabat. Cette étude s'étale sur une période allant de février 2018 à avril 2019.

Ont donc été sélectionnées des souches de bactéries multi-résistantes présentant un haut phénotype de résistance (BLSE, carbapénèmase, hyperproduction de la céphalosporinase ou pénicillinase de haut niveau).

Les données récoltées sur ces souches comportent les caractéristiques des patients (sexe, âge, date de naissance), la date d'entrée et de sortie du séjour du patient, le service, la nature du prélèvement et la date du prélèvement. Les phénotypes de résistances, le résultat de Carbatest et la CMI à la colistine, obtenue par microdilution et/ ou sensistitre.

Recueil des souches : L'identification des souches a été vérifiée avant la réalisation de la CMI. Pour cela, chaque souche a été isolée sur des milieux non sélectifs permettant l'isolement des entérobactéries et des bactéries non fermentant (milieu au pourpre de bromocrésol, aussi dit BCP). Après 24h d'incubation à 37°C, les isolats ont pu être identifiés par l'API.

Enfin, la résistance des souches à la colistine a été vérifiée par microdilution. Pour cela, une suspension bactérienne à partir de souches pures était réalisée en prélevant plusieurs colonies misent ensuite en suspension en milieu liquide salé. Puis, cette suspension était ajustée à 0,5 Mc Farland selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de Société Française de Microbiologie 2019 (CA-SFM 2019). Après avoir placé la suspension bactérienne sur des plaques, celles-ci ont été incubées pendant 24h à 37°C.

Nous avons exclu de cette étude les isolats du même patient isolés dans la même semaine au niveau de même site et ayant un profil d'antibiogramme identique.

Souches de références

Escherichia coli ATCC 25922.

ATB	CMI (mg/L)	
	Cible	Limites acceptables
Colistine	0,5-1	0,25-2

2-DETERMINATION DES CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES (CMIS)

L'objectif est de déterminer la Concentrations Minimales Inhibitrices(CMI) de la colistine par la méthode de microdilution en milieu liquide.

La CMI : est la plus faible concentration d'antibiotiques capable d'inhiber toute culture visible de la souche à étudier. Elle exprimée en mg/L ou µg/ml.

Ce protocole a été réalisé en suivant étape par étape les recommandations de CLSI et d'EUCAST et la norme ISO 20776-1:2006.

A-Matériels :

- Milieu de culture : Bouillon Mueller-Hinton (MH) ajusté en cations divalents (OXOÏD, Basingstoke, Royaume-Uni ; pH : 7,4±0.2) (BMH)
- Microplaques
- Poudres d'antibiotiques stériles (Colistine)
- des diluants stériles (**Phosphate buffer 0.01 M, pH 7.2 et eau**)
- des tubes à essai
- tubes à hémolyse
- Parafilm
- Culture de 24 h des souches à tester
- Micropipettes
- Embouts (cônes) stériles
- Vortex

B-Préparation de solutions de stock d'antibiotiques

Concentration de la Solution de stock : 5120 μ g/ml (5,12mg/ml), soit 10fois plus concentré que la dilution la plus concentrée.

- Mettre 5.12 mg en 1 ml d'eau stérile
- Gamme de concentrations d'antibiotiques :
- Dilutions en série de 2 en 2
- Nombre de dilutions : 10 à 12 dilutions
- Gamme de concentrations d'antibiotiques : Colistine : de 0,125 mg/L à 8 mg/L

Tableau 1 :Schéma de préparation des gammes de dilutions d'antibiotiques à utiliser pour la détermination de la sensibilité in vitro aux agents antimicrobiens en milieu liquide.

Etape	Concentration de l'antibiotique dans la solution mère (mg/l)	Source	Le volume des solutions mères de l'antibiotique	Volume de bouillon stérile	Concentration de l'antibiotique après la dilution
1	5120	Stock	1	9	512
2	512	étape2	1	1	256
3	512	étape2	1	3	128
4	512	étape2	1	7	64
5	64	étape4	1	1	32
6	64	étape4	1	3	16
7	64	étape4	1	7	8
8	8	étape 7	1	1	4
9	8	étape 7	1	3	2
10	8	étape 7	1	7	1
11	1	étape 10	1	1	0,5
12	1	étape 10	1	3	0,25
13	1	étape 10	1	7	0,125

C-Préparation de l'inoculum

Inoculum : une suspension équivalente à un standard de 0,5McFarland sera préparée à partir de colonies de 24h.

Inoculation des plaques de microdilution

- Retirer une plaque à 96 puits de son emballage stérile.
- Etiqueter les plaques stériles de 96 puits en mentionnant les dilutions appropriées de l'antibiotique et le numéro de souches.
- Mettre 100 µl de bouillon dans le puits de contrôle de stérilité (colonne 12) et 50 ml dans le puits de contrôle de croissance (colonne 11).
- Distribuer 50 µl de chaque dilution d'antibiotique aux puits respectifs de la plaque (colonne 1 à 10).
- Ajouter 50µl de l'inoculum équivalent à un standard de 0,5McFarland dans chaque puits contenant la solution antibiotique et le contrôle de la croissance (Colonne 1 à 11).
- Chaque plaque est scellée à l'aide d'un ruban adhésif et placé 20 à 24 heures à 37 ° C.

e.g., $X = 32 \text{ mg l}^{-1}$

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A cX	cX	$c^{X/2}$	$c^{X/4}$	$c^{X/8}$	$c^{X/16}$	$c^{X/32}$	$c^{X/64}$	$c^{X/128}$	$c^{X/256}$	$c^{X/512}$	GC	SC
B cX	cX	$c^{X/2}$	$c^{X/4}$	$c^{X/8}$	$c^{X/16}$	$c^{X/32}$	$c^{X/64}$	$c^{X/128}$	$c^{X/256}$	$c^{X/512}$	GC	SC
C cX	cX	$c^{X/2}$	$c^{X/4}$	$c^{X/8}$	$c^{X/16}$	$c^{X/32}$	$c^{X/64}$	$c^{X/128}$	$c^{X/256}$	$c^{X/512}$	GC	SC
D cX	cX	$c^{X/2}$	$c^{X/4}$	$c^{X/8}$	$c^{X/16}$	$c^{X/32}$	$c^{X/64}$	$c^{X/128}$	$c^{X/256}$	$c^{X/512}$	GC	SC
E cY	cY	$c^{Y/2}$	$c^{Y/4}$	$c^{Y/8}$	$c^{Y/16}$	$c^{Y/32}$	$c^{Y/64}$	$c^{Y/128}$	$c^{Y/256}$	$c^{Y/512}$	GC	SC
F cY	cY	$c^{Y/2}$	$c^{Y/4}$	$c^{Y/8}$	$c^{Y/16}$	$c^{Y/32}$	$c^{Y/64}$	$c^{Y/128}$	$c^{Y/256}$	$c^{Y/512}$	GC	SC
G cY	cY	$c^{Y/2}$	$c^{Y/4}$	$c^{Y/8}$	$c^{Y/16}$	$c^{Y/32}$	$c^{Y/64}$	$c^{Y/128}$	$c^{Y/256}$	$c^{Y/512}$	GC	SC
H cY	cY	$c^{Y/2}$	$c^{Y/4}$	$c^{Y/8}$	$c^{Y/16}$	$c^{Y/32}$	$c^{Y/64}$	$c^{Y/128}$	$c^{Y/256}$	$c^{Y/512}$	GC	SC

e.g., $Y = 128 \text{ mg l}^{-1}$

Figure 7: Exemple de l'inoculation des microplaques:

CG : contrôle de croissance (bouillon avec inoculum bactérien sans antibiotique);

SC : contrôle de stérilité (bouillon seulement).

D- La lecture

La lecture est facilitée par l'emploi d'un miroir grossissant (loupe), La CMI de l'antibiotique correspond à la dernière cupule dépourvue de culture microbienne visible.

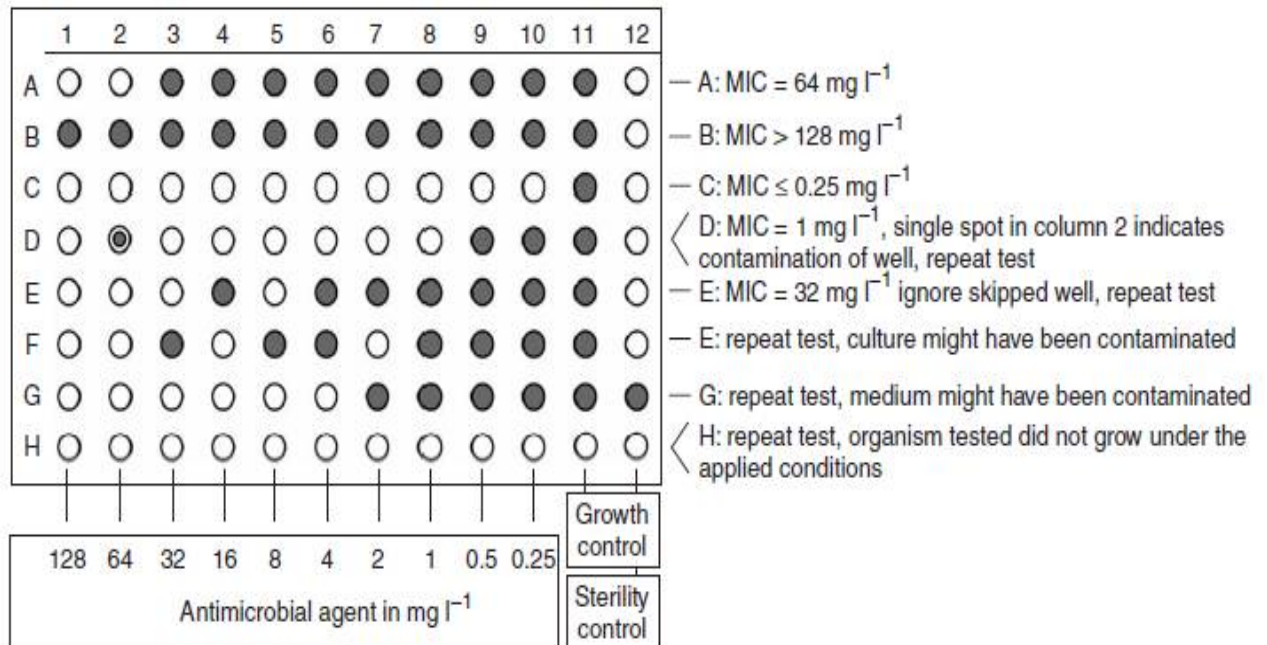


Figure 8: Exemple de lecture:

E-Critère d'interprétation :

La CMI est définie comme la plus faible concentration d'une gamme de dilutions d'antibiotique de demi en demi, qui entraîne une inhibition de toute croissance bactérienne visible.

3-CARBA TEST NP

Le principe de ce test repose sur la mise en évidence d'une acidification du milieu lors de l'hydrolyse de l'imipénème par une carbapénémase

A partir d'une culture bactérienne jeune (18-24 heures) sur gélose Trypticase Soja supplémentée au Sulfate de Zinc (70 mg/L), on prélève 1/2 d'une öse calibrée (10 µL) de bactéries et on les remet en suspension dans chacun des deux tubes contenant 100 µL de 20 mM Tris-HCl lysis buffer pour les *entérobactéries* ou de NaCl 5M dans le cas de l'*Acinetobacterbaumannii* (à noter qu'il faut utiliser un inoculum plus important pour l'*Acinetobacterbaumannii*).

La solution révélatrice de rouge de phénol est préparée comme suit :

- Préparer une solution concentrée de rouge phénol 0.5% poids/volume
- Mélanger 2 ml de la solution concentrée de rouge phénol (bien vortexer avant pipetage pour resuspendre correctement la solution concentrée de rouge phénol) dans 16.6 ml d'eau distillée
- Ajuster le pH à 7.8 en ajoutant, goutte à goutte d'une solution de NaOH
- Ajouter 180 µl d'une solution de ZnSO₄ (10 mM) pour obtenir une concentration finale de ZnSO₄ à 0.1 mM.

Après avoir vortexer un volume de 100 μ L d'une solution de rouge de phénol additionnée de ZnSO₂ à 0.1M à pH ajusté à 7.8. Cette solution doit être ajouté dans le tube « A », et 100 μ L de la même solution additionnée d'imipénème à 6mg/ml doit être ajouté dans le tube « B ».

En plus de l'isolat testé un témoin négatif et un témoin positif doivent également être testés. Tous les tubes doivent être vortexer puis incubé à 37°C pendant deux heures maximums. La production d'une carbapénémase se traduit par l'apparition d'une couleur jaune/ orange dans le tube « B » contenant de l'imipénème, tandis que la couleur du tube « A » reste inchangée.

La Solution A est stable à température ambiante pendant 1 semaine et peut être conservée pendant plusieurs mois à -20°C. Solution A + imipénème (6 mg/ml) doit impérativement être préparée extemporanément. Cependant, des aliquots de poudre d'imipénème peuvent être pesés à l'avance et conservés à 4°C pendant 2 semaines si la solution A n'a pas été ajoutée. Chaque est nécessite 600 μ l de solution A (solution A, solution A+ imipénème, souche à tester, contrôles négatif et positif). Si plusieurs souches doivent être testées en même temps, la technique est adaptable notamment avec des plaques de plastiques contenant 96 puits.

La solution de NaCl 5 M est préparée à partir d'une dilution de poudre de NaCl (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) dans de l'eau distillée.

	Tube « A »	Tube « B »
Pas de carbapénémase	Rouge	Rouge
Carbapénémase	Rouge	Orange/Jaune
Non interprétable	Jaune	Jaune



Résultats :



1. DESCRIPTION DE LA POPULATION

L'étude comprend 330 souches dont 246 entérobactéries et 84 *Acinetobacter baumannii*. Toutes les souches présentent un haut phénotype de résistance (BLSE, hyperproduction de la céphalosporinase, carbapénémase ou pénicillinase de haut niveau).

Des doublons, définis comme des souches avec la même combinaison espèce/antibiotype, appartenant aux mêmes patients ont été isolés. Ont donc été exclus.

Les souches sont considérées comme différentes si leurs antibiotypes diffèrent par au moins une différence majeure. Des souches comprenant un antibiotype avec des différences mineures sont redondantes.

Notre étude a retrouvé 12 souches résistantes à la colistine ; 10 souches d'entérobactéries dont 9 KP et 1 *E.coli* et 2 souches d'*Acinetobacter baumannii*.

a-Les entérobactéries :

❖ Données générales

L'âge moyen est de 56,96 ans +/- 20,383. Les hommes représentent 56,9% (n=140) et les femmes 43,1% (n=106).

❖ La distribution des germes BMR :

Klebsiella pneumoniae est le germe le plus fréquent parmi les BMR à 56,5% suivi d'*E.coli* à 39,8%

Tableau 2: La distribution des germes BMR

Germes	Effectifs	Pourcentage
KLPN	139	56,5%
ESCO	98	39,8%
ENCL	8	3,3%
Klebsiella terrigena	1	0,4%
Total	246	100,0%

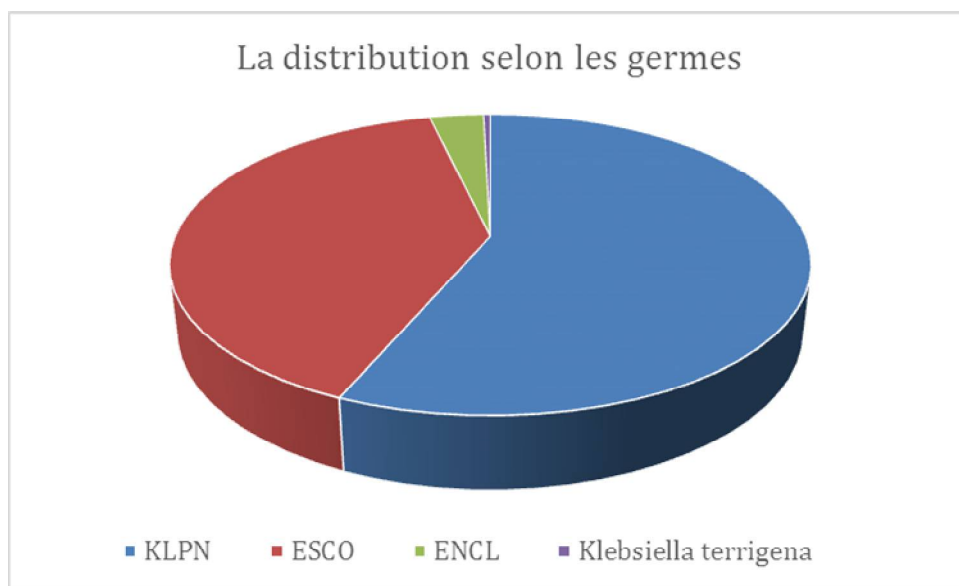


Figure 9: Tableau 2 : La distribution des germes BMR

- **La distribution des BMR selon les services :**

La provenance des BMR était principalement des services de chirurgies et des urgences, suivi des services de médecine, puis des services de réanimation.

Tableau 3: La distribution des germes BMR selon les services

Service	Effectifs	Pourcentage (%)
AUTRES (neuro, ORL, chirurgie cardiaque...)	54	21,95%
URGENCE	54	21,95%
MEDECINE INTERNE	38	15,45%
UROLOGIE	26	10,57%
CHIRURGIE VISCERAL	18	7,32%
REANIMATION	16	6,50%
GASTRO-ENTEROLOGIE	8	3,25%
NEUROCHIRURGIE	5	2,03%
RHUMATOLOGIE	5	2,03%
NEPHROLOGIE	5	2,03%
HEMATOLOGIE CLINIQUE	3	1,22%
ONCOLOGIE	3	1,22%
PEDIATRIE	3	1,22%
TRAU-ORTHO II	2	0,81%
CCV	1	0,41%
DERMATOLOGIE	1	0,41%
ENDOCRINOLOGIE	1	0,41%
CARDIOLOGIE CLINIQUE	1	0,41%
STOMATOLOGIE	1	0,41%
INFECTIOLOGIE	1	0,41%
Total	246	100,00%

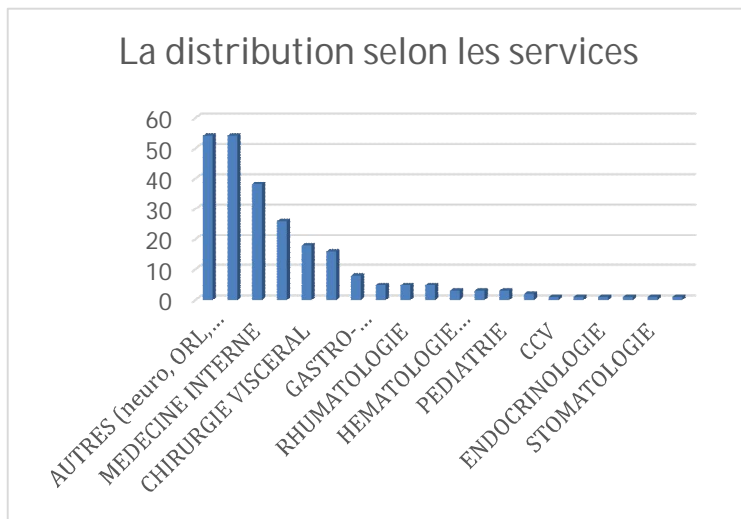


Figure 10: La distribution des germes BMR selon les services

- **La distribution des BMR selon les types de prélèvement**

Tableau 4: La distribution des germes BMR selon les types de prélèvement

Type de prélèvement	Effectifs	Pourcentage
Urine	187	76,02%
Pus	36	14,63%
HEMOCULTURE	11	4,47%
PDP	4	1,63%
Produit d'expectoration	3	1,22%
Cathéter veineux	2	0,81%
Autre	1	0,41%
Ecouvillonnage	1	0,41%
Selles	1	0,41%
Total	246	100,00%

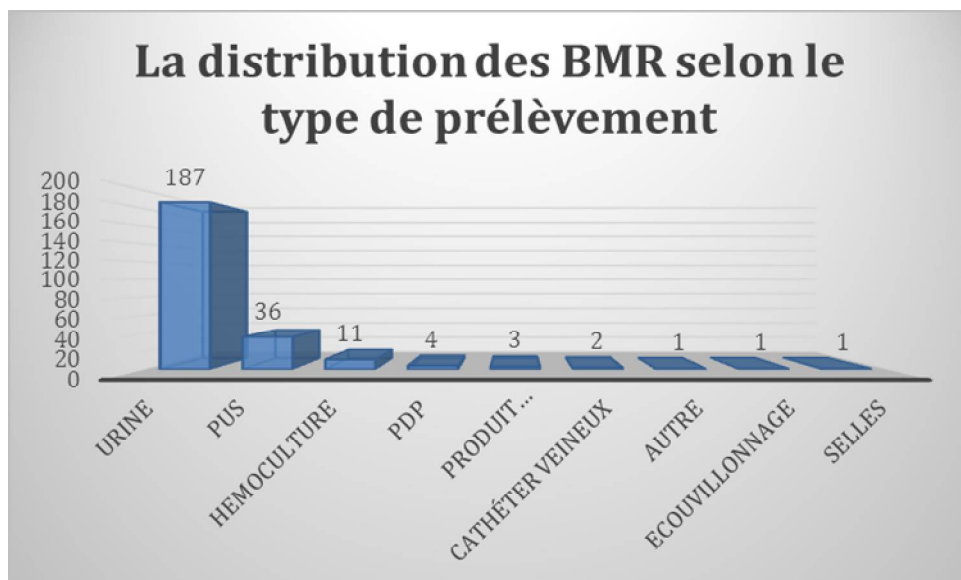


Figure 11: La distribution des germes BMR selon le type de prélèvement

- **Le résultat de la carbatest des germes BMR**

La majorité de nos BMR ont un carbatest négatif

Tableau 5: Le résultat du carba test des entérobactéries BMR

Carba test	Effectifs	Pourcentage
NEG	177	72%
POS	64	26%
DOUTEUX	5	2%
Total	246	100%

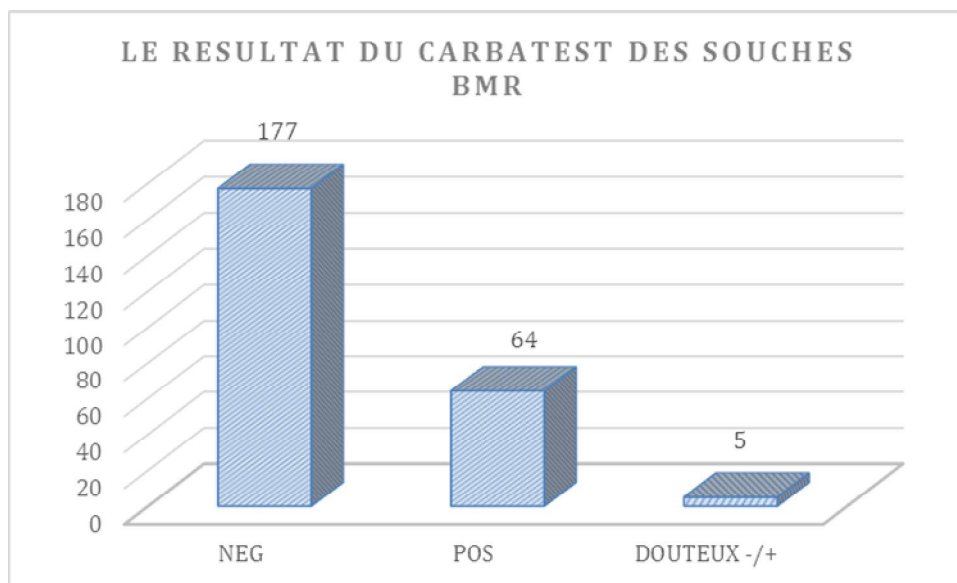


Figure 12: le résultat du carba test des entérobactéries BMR

La distribution de la CMI de la colistine :

La médiane de de CMI de la colistine est de 0,5 [0,25 ; 1], avec des valeurs allant de 0,125 à 8

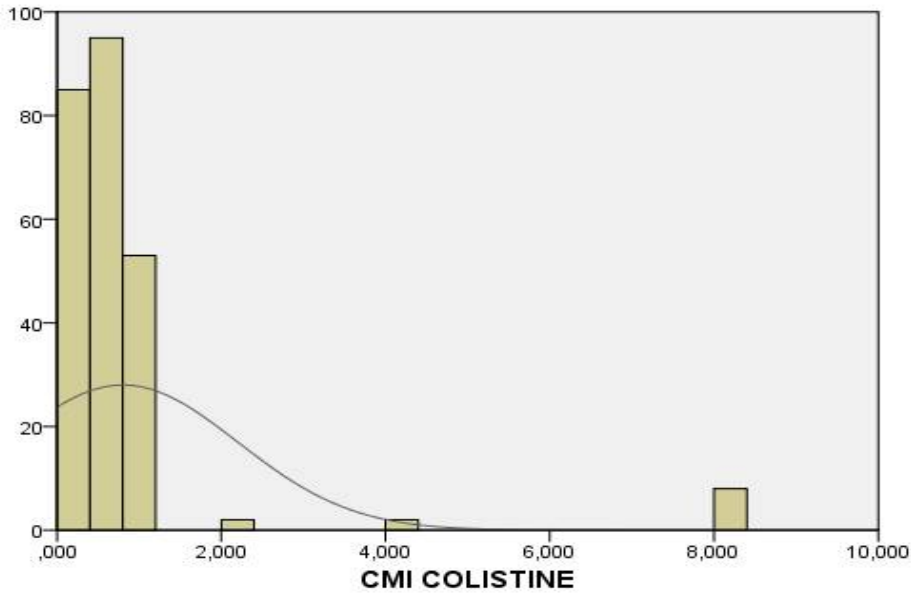


Figure 13: La distribution de la CMI de la colistine des entérobactéries BMR

La différence de la CMI de la colistine entre les germes est statistiquement significative ($p < 0,001$)

Tableau 6: tableau croisé des germes avec la CMI de la colistine

Effectif	CMI COLISTINE							Total
	0,120	0,250	0,500	1,000	2,000	4,000	8,000	
ENCL	0	4	3	1	0	0	0	8
ESCO	3	43	50	1	0	1	0	98
Klebsiella terrigena	0	0	1	0	0	0	0	1
KLPN	4	31	41	51	2	1	8	138
Total	7	78	95	53	2	2	8	245

Tableau 7: Tests du Khi-deux pour la CMI de la colistine et les germes

	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)
Khi-deux de Pearson	60,018 ^a	18	,000
Rapport de vraisemblance	76,516	18	,000
Nombre d'observations valides	245		

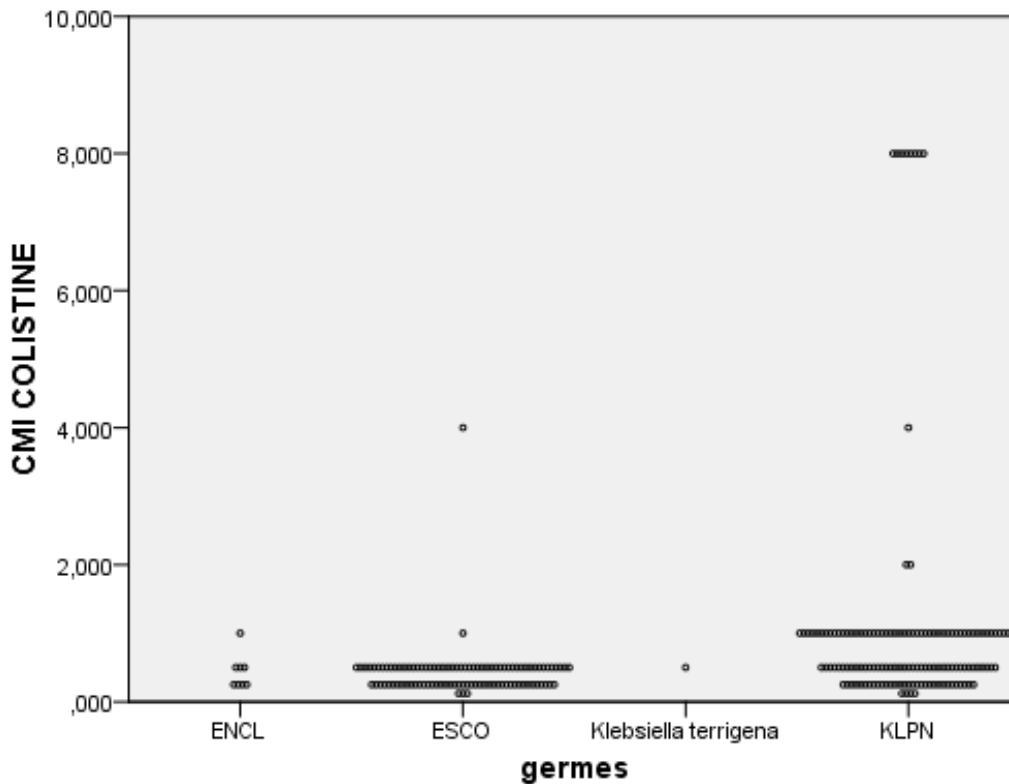


Figure 14: La distribution de la CMI de la colistine des entérobactéries BMR selon les germes

- La distribution des germes BMR selon leurs profils de résistance

La différence entre les germes et leurs profils de résistance est statistiquement significative ($p < 0,001$)

Tableau 8: tableau croisé entre les germes BMR et leurs Profil de résistance

		Profil			Total
		BLSE	Carbapenemase	Cephalosporina sede haut niveau	
germes	ENCL	0	8	0	8
	ESCO	83	0	5	98
	Klebsiella terrigena	0	0	1	1
	KLPN	66	56	13	139
Total		149	64	19	246

Tableau 9: Tests du Khi-deux du Tableau entre les germes BMR et leurs Profil de résistance

	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)
Khi-deux de Pearson	91,213 ^a	9	,000
Rapport de vraisemblance	106,217	9	,000
Nombre d'observations valides	246		

- La distribution de la CMI de la colistine selon les profils de résistance des BMR

La différence entre la CMI de la colistine et les profils de résistance est statistiquement non significative ($p > 0,01$)

Tableau 10: tableau croisé entre la CMI de la colistine et les profils de résistance des BMR

CMI COLISTINE		Profil			Total
		BLSE	carbapenemase	Cephalosporinase de haut niveau	
	0,120	7	0	0	7
	0,250	54	18	4	78
	0,500	58	18	10	95
	1,000	22	25	3	53
	2,000	2	0	0	2
	4,000	1	1	0	2
	8,000	5	2	1	8
Total		149	64	18	245

Tableau 11: Tests du Khi-deux du tableau croisé entre la CMI de la colistine et les profils de résistance des BMR

	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)
Khi-deux de Pearson	28,323 ^a	18	,057
Rapport de vraisemblance	30,772	18	,031
Nombre d'observations valides	245		

-

- La distribution de la CMI de la colistine selon les germes BMR et leurs profils de résistance

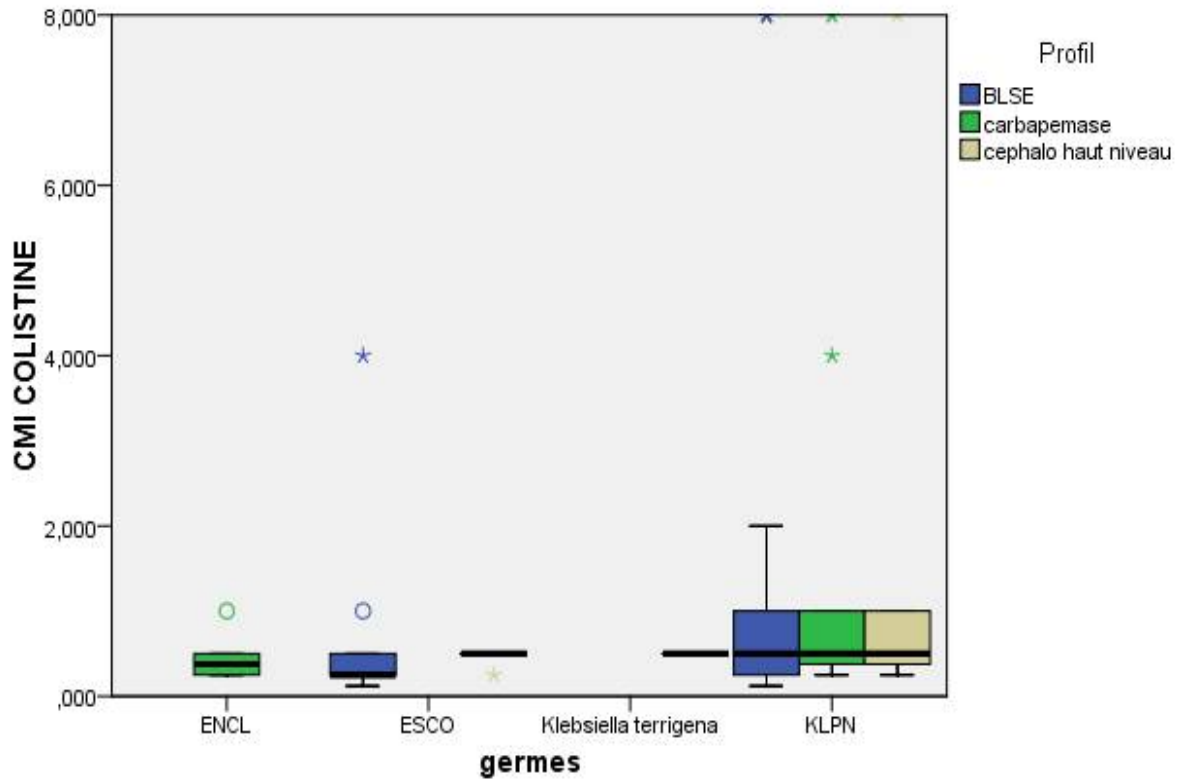


Figure 15: La distribution de la CMI de la colistine des entérobactéries BMR et leurs profils de résistance

b. *Acinetobacter baumannii*

❖ Données générales

L'âge moyen est de 55,32ans +/- 2,264. Les hommes représente 59,5% (n= 50) et les femmes 40,5% (n=34).

❖ La distribution des BMR selon les services :

La provenance des BMR d'*Acinetobacter baumannii* était principalement des services des urgences, suivi des services de réanimation.

Tableau 12: La distribution des *Acinetobacter baumannii* BMR selon les services

SERVICE	Effectifs	Pourcentage
URGENCE	29	34,5%
REANIMATION	18	21,4%
SERVICE LABORATOIRE	7	8,3%
	6	7,1%
NEUROCHIRURGIE	6	7,1%
CARDIOLOGIE	2	2,4%
CCV	2	2,4%
HEMATOLOGIE CLINIQUE	2	2,4%
NEPHROLOGIE	2	2,4%
ORL	2	2,4%
PEDIATRIE	2	2,4%
UROLOGIE	2	2,4%
CHIRURGIE VISCERALE	1	1,2%
GYNECOLOGIE	1	1,2%
MEDECINE	1	1,2%
PNEUMOLOGIE	1	1,2%
Total	84	100,0%

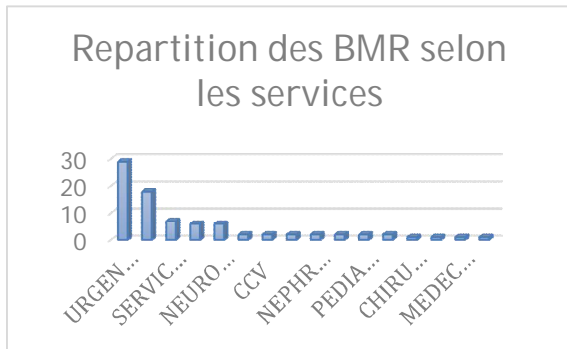


Figure 16: La distribution des Acinetobacter baumannii BMR selon les services

- La distribution des BMR selon les types de prélèvement

Les urines représentent 33,3% des types de prélèvement BMR d'*Acinetobacter baumannii*, suivi des prélèvements distaux protégés avec 27,4%.

Tableau 13: La distribution des Acinetobacter baumannii BMR selon la nature du prélèvement

Nature du prélèvement	Effectifs	Pourcentage
Urine	28	33,3%
PDP	23	27,4%
HEMOCULTURE	10	11,9%
Pus	10	11,9%
Non déterminé	8	9,5%
ECBC	3	3,6%
Fragment Tissu	1	1,2%
Selles	1	1,2%
Total	84	100,0%

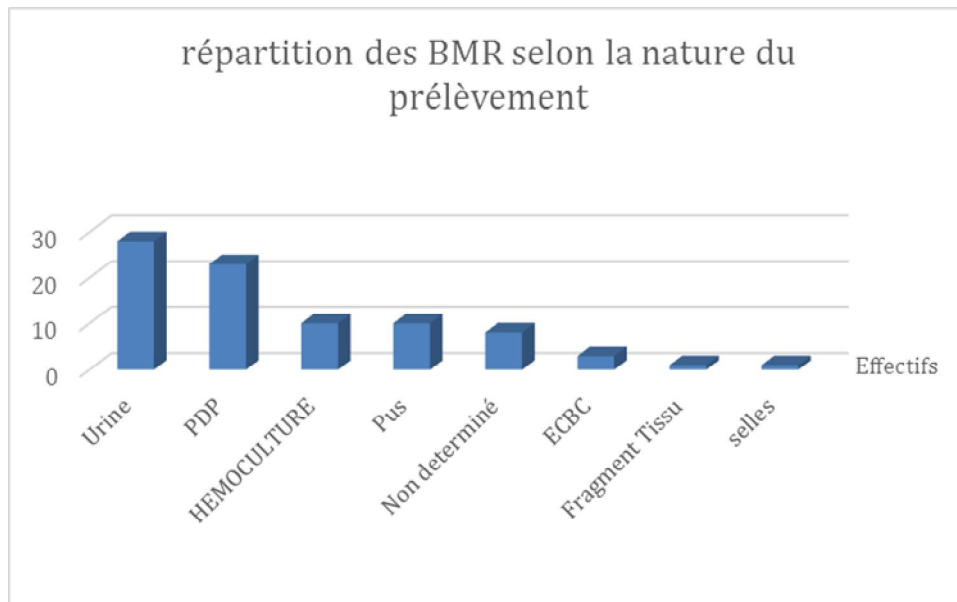


Figure 17: La distribution des Acinetobacter baumannii BMR selon la nature du prélèvement

- Le résultat de la carbatest des germes BMR

La majorité de nos BMR acinetobacterbaumanni ont un carbatest positif

Tableau 14: Le résultat du carba test des Acinetobacter baumanniiBMR

Carbatest	Effectifs	Pourcentage
	23	27,4%
NEG	27	32,1%
POS	34	40,5%
Total	84	100,0%

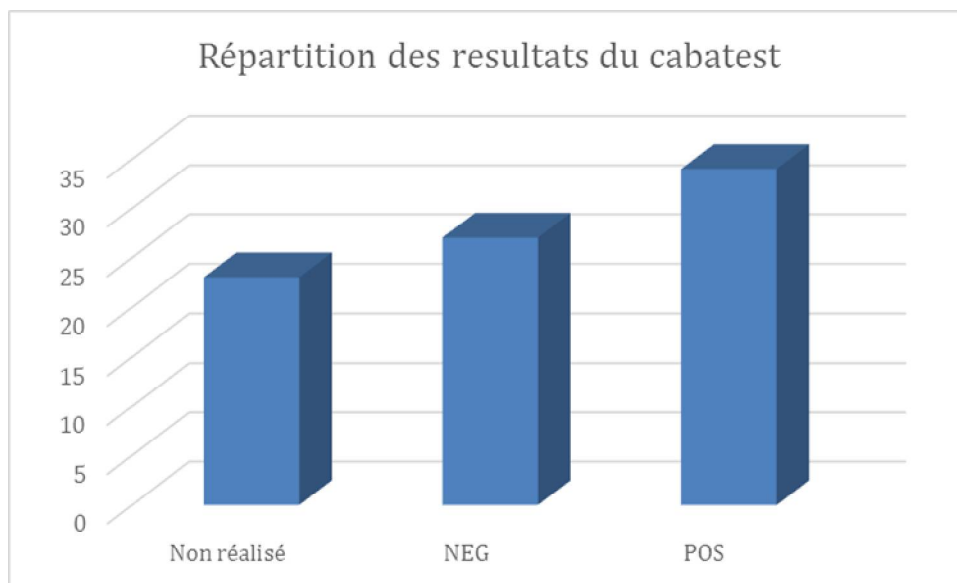


Figure 18:Le résultat du carba test des Acinetobacter baumanniiBMR

- La distribution de la CMI de la colistine :

La médiane de de CMI de la colistine est de 0,25 [0,25 ; 0,5], avec des valeurs allant de 0,125 à 8

Tableau 15: la distribution de la CMI de la colistine des Acinetobacter baumannii BMR

CMI Colistine	Effectifs	Pourcentage
0,125	2	2%
0,25	41	49%
0,5	38	45%
2,000	1	1%
8,000	2	2%
Total	84	100%

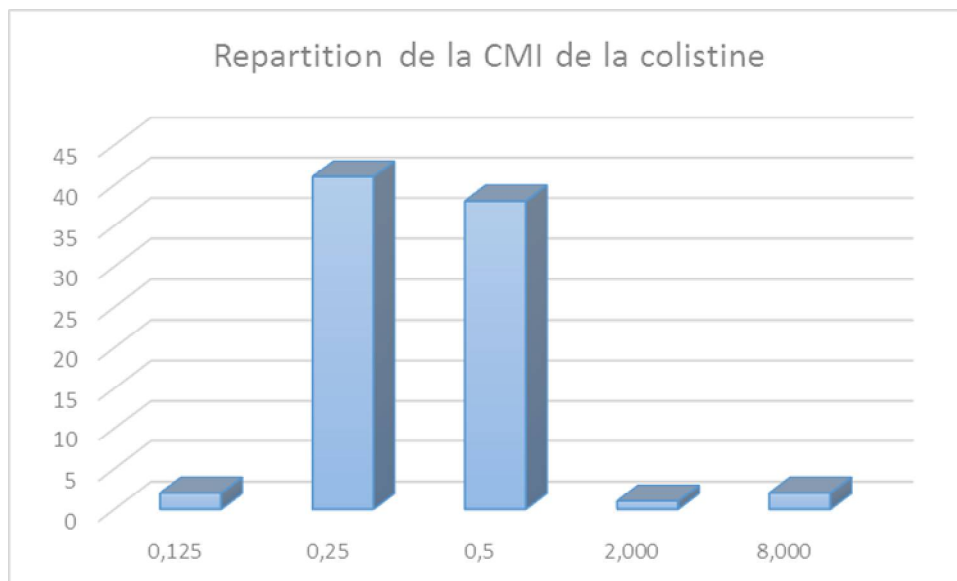


Figure 19: la distribution de la CMI de la colistine des Acinetobacter baumannii BMR

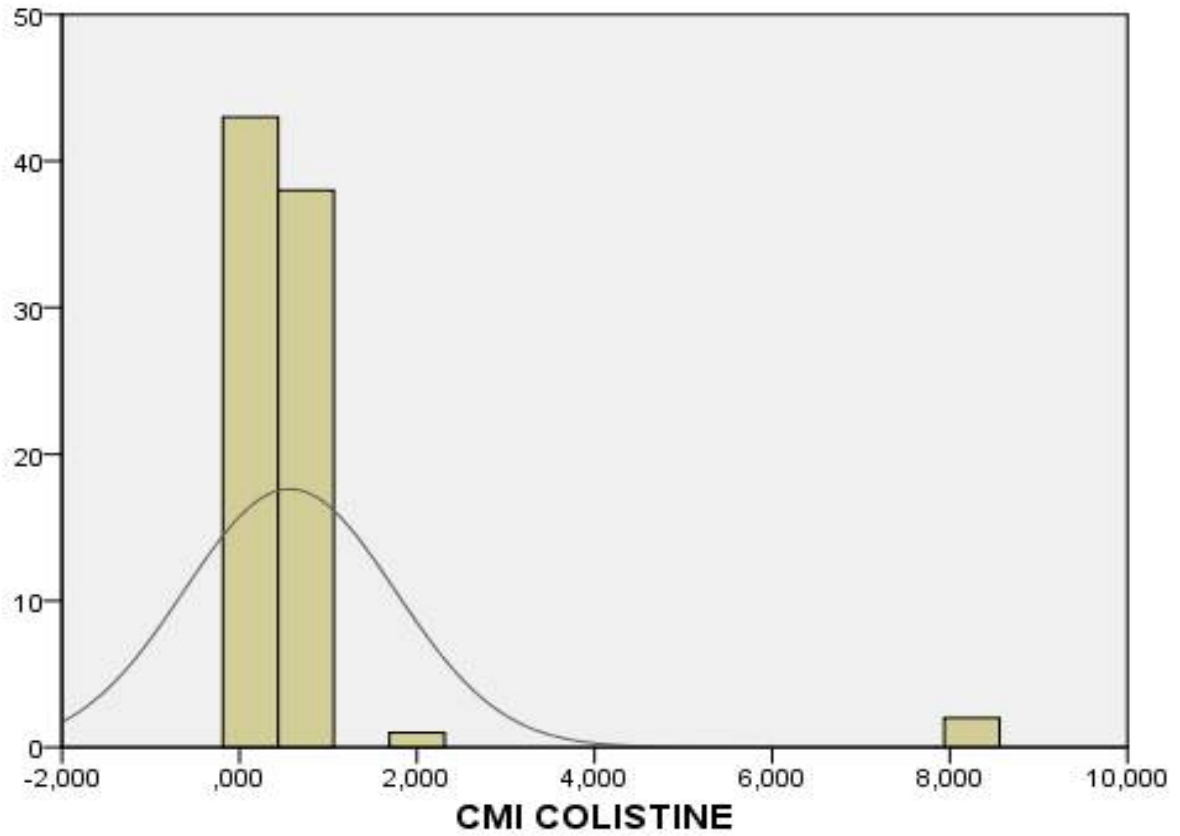


Figure 20: la distribution de la CMI de la colistine des *Acinetobacter baumannii* BMR

- La relation entre le sexe du patient et la CMI de la colistine

La différence entre le sexe du patient et la CMI de la colistine est statistiquement non significatif ($p > 0,05$)

Tableau 16: tableau croisé de la CMI de la colistine avec le sexe du patient

		CMI COLISTINE					Total
		0,125	0,250	0,500	2,000	8,000	
Sexe patient	Féminin	2	17	13	0	2	34
	Masculin	0	24	25	1	0	50
Total		2	41	38	1	2	84

Tableau 17: Tests du Khi-deux du tableau croisé de la CMI de la colistine avec le sexe du patient

	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)
Khi-deux de Pearson	7,198 ^a	4	,126
Rapport de vraisemblance	8,921	4	,063
Nombre d'observations valides	84		

- La relation entre la CMI de la colistine et le carbatest

La différence entre le carbatest et la CMI de la colistine est statistiquement non significatif ($p > 0,05$)

Tableau 18: tableau croisé de la CMI de la colistine avec le carbatest

			CMI COLISTINE					Total
			0,125	0,250	0,500	2,000	8,000	
CARBA TEST	NP		0	11	11	0	1	23
		NEG	2	7	16	1	1	27
		POS	0	23	11	0	0	34
Total			2	41	38	1	2	84

Tableau 19: Tests du Khi-deux du tableau croisé de la CMI de la colistine avec le carbatest

	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)
Khi-deux de Pearson	15,543 ^a	8	0,049
Rapport de vraisemblance	17,094	8	0,029
Nombre d'observations valides	84		

- La relation entre la CMI de la colistine de l'*Acinetobacter baumannii* et les services

La différence entre la CMI de la colistine et les services est statistiquement non significatif ($p > 0,001$)

Tableau 20: tableau croisé de la CMI de la colistine avec les services

		CMI COLISTINE					Total
		0,125	0,250	0,500	2,000	8,000	
Nom service		0	4	2	0	0	6
	CARDIOLOGIE	0	0	2	0	0	2
	CCV	0	2	0	0	0	2
	CHIRURGIE VISCERALE	0	1	0	0	0	1
	GYNECOLOGIE	1	0	0	0	0	1
	HEMATOLOGIE CLINIQUE	0	1	1	0	0	2
	MEDECINE	0	0	1	0	0	1
	NEPHROLOGIE	0	0	2	0	0	2
	NEUROCHIRURGIE	0	4	2	0	0	6
	ORL	0	0	1	0	1	2
	PEDIATRIE	0	0	2	0	0	2
	PNEUMOLOGIE	0	1	0	0	0	1
	REANIMATION	0	8	9	1	0	18
	SERVICE LABORATOIRE	0	4	2	0	1	7
	URGENCE	1	15	13	0	0	29
	UROLOGIE	0	1	1	0	0	2
Total		2	41	38	1	2	84

Tableau 21: Tests du Khi-deux du tableau croisé de la CMI de la colistine avec les services

	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)
Khi-deux de Pearson	85,978 ^a	60	,016
Rapport de vraisemblance	42,283	60	,960
Nombre d'observations valides	84		

- La relation entre CMI de la colistine et le type de prélèvement

La différence entre la CMI de la colistine et le type de prélèvement est non significatif ($p > 0,05$)

Tableau 22: tableau croisé du type de prélèvement et la CMI de la colistine

		CMI COLISTINE					Total
		0,125	0,250	0,500	2,000	8,000	
Nom du type		0	5	3	0	0	8
	ECBC	0	1	2	0	0	3
	Fragment Tissu	0	0	1	0	0	1
	HEMOCULTURE	1	6	3	0	0	10
	PDP	0	13	10	0	0	23
	Pus selles	1	3	4	1	1	10
	Urine	0	1	0	0	0	1
		0	12	15	0	1	28
Total		2	41	38	1	2	84

Tableau 23: Tests du Khi-deux

	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)
Khi-deux de Pearson	22,990 ^a	28	0,734
Rapport de vraisemblance	19,913	28	0,868
Nombre d'observations valides	84		

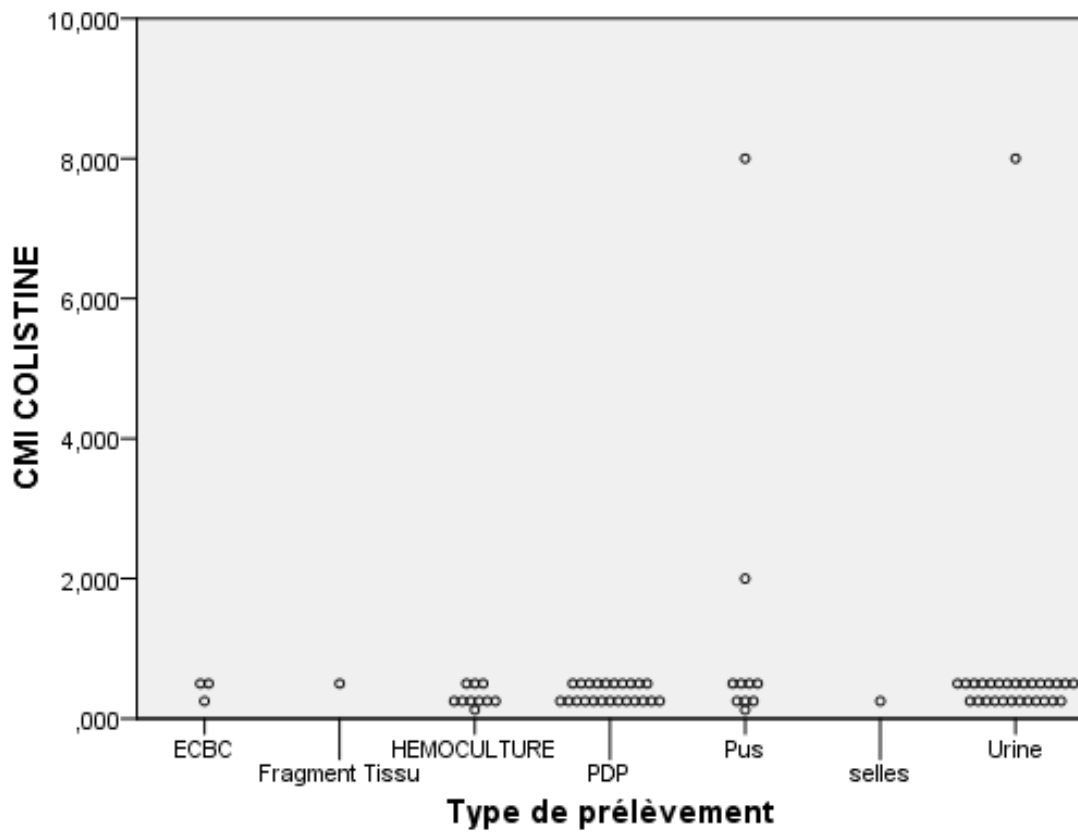


Figure 21: la distribution de la CMI de la colistine des *Acinetobacter baumannii* BMR selon la nature du prélèvement

- La relation entre la CMI de la colistine, le type de prélèvement et la carba test :

La différence entre la CMI de la colistine, la nature du prélèvement et le carbatest est non significative ($p > 0,01$)

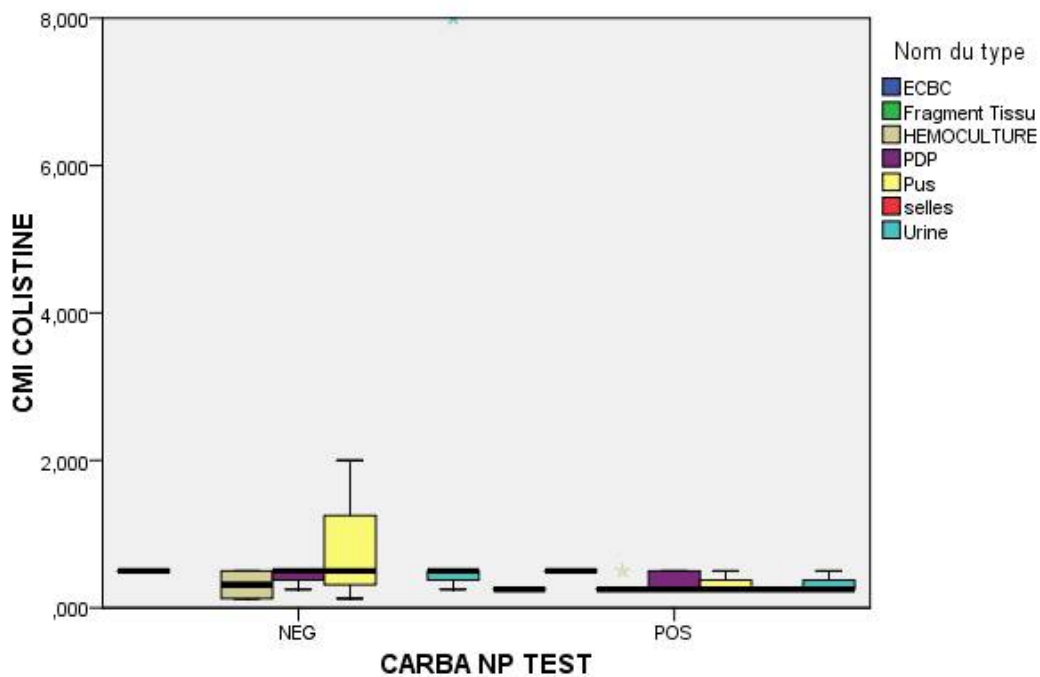


Figure 22: la distribution de la CMI de la colistine des Acinetobacter baumannii BMR selon la nature du prélèvement et le résultat du carba test



Discussion



:

La colistine est l'un des rares antibiotiques encore actif sur les souches d'EPC. Sa résistance est complexe et très variée, d'une part par la présence de diverses mutations chromosomiques et d'autre part par l'apparition récente d'une résistance plasmidique *mcr*. Les altérations chromosomiques conduisent à l'apparition de résistances non transférables horizontalement et donnent un « coût énergétique » à la bactérie. Concernant la résistance plasmidique, bien qu'elle soit plus prévalente dans le monde animal, le plasmide a toutes les caractéristiques pour diffuser chez l'homme. La résistance à la colistine chez les entérobactéries productrices de BLSE ou d'EPC est un problème majeur de santé publique et conduit à une impasse thérapeutique et à un risque accru de mortalité. C'est pourquoi, il est primordial pour les laboratoires de détenir des techniques fiables et reproductibles afin de bien détecter cette résistance pour limiter sa diffusion et préserver la colistine comme antibiotique de dernier recours.

Dans ce travail, nous avons évalué la prévalence de la résistance à la colistine des souches des bactéries à gram négatif au sein des BMR par technique de CMI en milieu liquide (Sensititre®, microdilution), tel que recommandé par l'EUCAST en 2019, sur un échantillonnage de 330 souches.

Les CMI du contrôle de qualité effectuée sur chaque plaque étaient strictement de 0,25 mg/L ou de 0,5 mg/L permettant ainsi de valider les résultats des plaques et de conclure à une bonne répétabilité des résultats obtenus par les 2 méthodes.

Avec l'augmentation de la résistance à la colistine, l'émergence d'une résistance plasmidique et l'absence de nouveaux traitements efficaces, il est nécessaire de mettre en place des actions visant à empêcher la propagation de la résistance à la colistine et préserver l'efficacité de cet antibiotique. Les principales actions sont l'augmentation de la vigilance, l'amélioration de la surveillance au niveau local et national, la réalisation de mesures d'hygiène adaptées et l'optimisation de l'usage de la colistine. L'utilisation massive de polymyxines chez les animaux est considérée comme étant l'origine de l'apparition de ces résistances. La colistine, dans l'Union Européenne (UE), est essentiellement à destination des animaux de production [77]. En France, on estime qu'environ un tiers de l'exposition totale des antibiotiques chez les porcs est due à la famille des polymyxines dont principalement la colistine, et que ce taux serait encore plus élevé chez les volailles [78]. Ainsi, une utilisation restreinte doit être encouragée et un effort coordonné international doit être mis en place. L'agence européenne des médicaments (EMA), dans un projet d'avis en 2016, a conclu à la préconisation d'une baisse globale de l'utilisation de la colistine chez les animaux ; la mise en place de stratégies pour un meilleur usage de celui-ci et enfin la recommandation de classer la colistine comme antibiotique d'importance critique. Toutefois, ce dernier point n'a pas été adopté par plusieurs pays [79]. L'utilisation de la colistine comme facteur de croissance chez les animaux par voie orale est interdite en Europe depuis 2006. Mais par exemple, l'Asie, a encore recours à cet usage à des doses sub-optimales entraînant un risque de sélection de résistance à cet antibiotique. Une progression importante de la proportion de souches d'*E.coli* résistantes à la colistine d'origine porcine a été rapportée en Chine : 7% en 2007 et 46% en

2015 [80]. Ces forts taux de prévalence peuvent être associés à l'usage de la colistine comme promoteur de croissance. Ainsi, la Chine, consciente du danger, a très récemment décidé d'interdire cet usage [81].

De même, les pratiques de l'utilisation de la colistine pour la décontamination sélective digestive (SDD) chez l'homme doit être révisées. La SDD a pour objectif de prévenir les infections endogènes des voies respiratoires et du sang et ainsi de diminuer la mortalité des patients en soins intensifs [82]. Pour cela, une combinaison d'antibiotiques, dont la colistine, est administrée par voie orale. Cette pratique remonte au début des années 1980 mais est aujourd'hui controversée car suspecte de sélectionner des souches résistantes à la colistine. Une minorité de soins intensifs en Europe utiliseraient encore cette pratique [83]. Fernandes et al, en 2016, considèrent que l'émergence du gène *mcr-1* est liée à l'utilisation de polymyxines dans le monde animal [84]. Ainsi, on pourrait penser qu'en l'absence d'une pression de sélection par les polymyxines, les souches *mcr-1* seraient rapidement éliminées de la flore digestive. Cependant, une étude a montré que le taux de prévalence *mcr-1* chez l'animal a augmenté d'environ 1% par an depuis 2006 malgré une diminution de la consommation de la colistine chez les animaux [85]. Ces résultats soulignent que l'usage de colistine chez les animaux n'est probablement pas le seul déterminant de la diffusion de *mcr-1* et que de nombreuses autres voies de contamination existent. La probabilité de diffusion des souches résistantes à la colistine porteuses du gène *mcr-1* dans l'environnement, les denrées alimentaires, chez les animaux et les hommes est alarmante. De nombreuses études supportent cette hypothèse.

En effet, des cas de transmission entre l'animal et l'homme ont été suspectés [86, 87]. De même, des études avancent que l'alimentation pourrait être une source potentielle de *mcr-1* [88, 89]. La présence du gène *mcr-1* au niveau alimentaire représente un danger par une éventuelle incorporation dans le microbiome intestinal humain. La durée du portage rectal de *mcr-1* n'est pas encore bien définie. Ce portage est potentiellement un réservoir de dissémination et un risque de transfert du gène *mcr-1* sur des souches multi-résistantes transitant par l'intestin. Saly et al. ont réalisé une enquête prospective pour évaluer la prévalence du portage rectal des bacilles Gram négatif (BGN) ayant une résistance acquise à la colistine dans un hôpital en France. La prévalence de ce portage était faible (1,4%) et aucune souche ne portait le gène *mcr-1* [90].

Des souches *mcr-1* ont été retrouvées au niveau digestif chez des enfants âgés de deux à 10 mois. Ceci est intéressant puisque ces enfants n'ont pas été en contact avec des animaux et n'ont pas encore été exposés à de l'alimentation suggérant ainsi que *mcr-1* est déjà très répandu dans l'environnement et est transmissible par diverses voies [91]. Cette hypothèse est fortement renforcée par la découverte en 2016, au Brésil, d'une souche d'*E. coli* hébergeant le gène *mcr-1* chez des volailles n'ayant pas été exposées aux polymyxines [92]. Le gène *mcr-1* a été retrouvé chez des souches présentes dans des eaux usées, des légumes et dans des rivières [93, 94]. C'est pourquoi, la gestion du risque lié à l'utilisation de colistine doit être appréhendée de façon globale, sous le concept « One Health » : un monde, une santé. Ce concept permet d'optimiser l'usage de la colistine et de prévenir le développement de résistance à son encontre.

Certains auteurs supposent que l'utilisation préalable d'antibiotiques serait un facteur de risque d'apparition de résistance à la colistine dont *mcr-1* [85, 95]. En conséquence, l'usage d'autres antibiotiques à la fois en médecine humaine et vétérinaire pourrait agir en co-sélection et maintenir la résistance à la colistine. Ceci conclut à la nécessité de programmes d'intervention globaux sur l'utilisation prudente de tous les antibiotiques dans le secteur agroalimentaire et en médecine humaine dans le monde.

De nouvelles molécules dérivées de la polymyxine (NAB739 et NAB815) ont présenté une meilleure efficacité par rapport à la polymyxine B sur des souches d'*E. coli* et avec une toxicité rénale moindre [96]. Des études supplémentaires sont nécessaires et devraient inclure des souches résistantes à la colistine. Il a été montré chez des souches d'*A. baumannii*, une synergie entre la colistine et la vancomycine. Ils émettent l'hypothèse que la colistine perturberait la membrane externe et permettrait l'entrée de grosses molécules initialement résistantes [97]. Des synergies ont aussi été décrites avec d'autres antibiotiques tels que la rifampicine [98]. Ces synergies pourraient permettre de prévenir l'apparition de souches résistantes et d'utiliser de plus faibles doses de colistine, diminuant sa toxicité. Des études sur les effets cliniques de ces associations sont nécessaires. Récemment, il a été démontré que la colistine en association avec des antibiotiques (en particulier ceux agissant sur la synthèse des protéines et de l'ARN) présente une synergie même contre les souches résistantes à la colistine [99].

Une étude en 2016, a étudié les effets de l'association de la colistine à d'autres agents antibactériens tels que les bactériocines (entérocoques, nisines) sur des souches d'*E.coli* d'origine porcine. Cette association a permis d'éradiquer ces souches dont certaines hébergeaient le gène *mcr-1* [100]. Un composé naturel, pterostilbène, récemment découvert, serait le premier inhibiteur de *mcr-1* efficace. Ce composé a montré un effet synergique *in vitro* et *in vivo* en association avec la colistine contre des isolats humains de *K. pneumoniae mcr-1* positives [101].



Conclusion



:

L'émergence de la résistance plasmidique à la colistine *mcr-1*, découverte pour la première fois en Chine fin 2015, est inquiétante puisque cet antibiotique est un des derniers encore actif sur les EPC et augmente ainsi le risque de mortalité. Bien que sa prévalence chez l'homme semble faible, il est recommandé d'appliquer les précautions complémentaires contact quel que soit le profil de résistance chez un patient prouvé porteur d'une bactérie résistante à la colistine. La nécessité d'évaluer la sensibilité de la colistine est donc devenue primordiale. La méthode de microdilution en milieu liquide est la seule méthode recommandée par l'EUCAST depuis 2016. Bien que la détection de la sensibilité à la colistine soit complexe (liaisons non spécifiques, existence de souches hétérorésistantes, résistance plasmidique de bas niveau...), cette étude a permis de mettre en évidence la prévalence de la résistance à la colistine au sein des souches BMR.



Résumés



Abstract :

La lutte contre les bactéries à Gram négatif multi-résistantes aux antibiotiques (BMR) représente un enjeu majeur de santé publique, particulièrement illustrée par la dissémination des entérobactéries productrices de carbapénèmases. La colistine, un antibiotique dit d'ancienne génération mais dont l'intérêt thérapeutique a été redémontré, est l'un des rares antibiotiques encore actif sur ces bactérie. La résistance à la colistine est pour l'essentiel liée à des mutations chromosomiques conduisant à des modifications de charge du LPS, ce qui va empêcher la fixation de la colistine. En 2015, la résistance plasmidique *mcr-1* a été découverte. Son émergence et sa diffusion sont extrêmement inquiétantes. Les tests de sensibilité sont techniquement difficiles et seule la méthode de microdilution en milieu liquide est recommandée. L'objectif de cette étude est de déterminer la distribution de la CMI de la colistine des bactéries à gram négatif multi résistante sur une durée de 1 an.

Nous avons colligé 330 souches de bactéries multi résistantes dont 246 entérobactéries et 84 *Acinetobacter baumannii*. Notre étude a retrouvé 12 souches résistante à la colistine ; 10 souches d'entérobactéries et 2 souches d'*Acinetobacter baumannii*. Concernant nos entérobactéries la médiane de la CMI était de 0,5 mg/l [0,25 ; 1] et leur carbatest était majoritairement négatif. Tandis que pour l'*Acinetobacter baumannii* la médiane de la CMI était de 0,25 mg/l [0,25 ; 0,5] et le carba test majoritairement positif.

La résistance à la colistine justifie la nécessité de savoir la détecter afin de limiter sa diffusion car elle représente le dernier rempart sur la route vers la toto-résistance aux antibiotiques, ce d'autant que les perspectives de nouvelles molécules thérapeutiques dans le traitement des infections à EPC sont assez limités.



Références



1. SUZUKI, T., et al., *Contribution to the Elucidation of the Structure of Polymyxin B1*. The Journal of Biochemistry, 1963. **54**(6): p. 555-556.
2. Bergen, P.J., et al., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 'old' polymyxins: what is new?* Diagn Microbiol Infect Dis, 2012. **74**(3): p. 213-23.
3. Cavallo J-D, F.R., Jehl F, Rapp C, Garrabé E., *Bêtalactamines*. Mal Infect., 2004.
4. 2018, Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN). Protocole BMR-RAISIN 2018 [Internet]. Disponible sur: invs.santepubliquefrance.fr.
5. Nicolas-Chanoine, M.H., *Les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi : où sont les dangers ?* Réanimation, 2012. **21**(3): p. 260-267.
6. Woerther, P.-L., et al., *Characterization of fecal extended-spectrum- β -lactamase-producing Escherichia coli in a remote community during a long time period*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2013. **57**(10): p. 5060-5066.
7. Réseau d'Alerte, d.I.e.d.S.d.I., et al., 2016.
8. Nordmann, P., L. Dortet, and L. Poirel, *Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm!* Trends Mol Med, 2012. **18**(5): p. 263-72.

9. Uwingabiye, J., et al., *Intensive care unit-acquired Acinetobacter baumannii infections in a Moroccan teaching hospital: epidemiology, risk factors and outcome*. *Germs*, 2017. **7**(4): p. 193-205.
10. *European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Surveillance of antimicrobial resistance in Europe annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2016. 2017. [Internet].*
11. Nordmann, P. and L. Poirel, *The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide*. *Clin Microbiol Infect*, 2014. **20**(9): p. 821-30.
12. Dortet, L., et al., *Émergence de la résistance à la colistine chez les entérobactéries : une brèche dans le dernier rempart contre la pan-résistance* !*Journal des Anti-infectieux*, 2016. **18**(4): p. 139-159.
13. Suzuki, T., et al., *Studies on the chemical structure of colistin. i. fractionation, molecular weight determination, amino acid and fatty acid composition*. *J biochem*, 1963. **54**: p. 25-33.
14. Li, J., et al., *Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria*. *Int J Antimicrob Agents*, 2005. **25**(1): p. 11-25.
15. Falagas, M.E. and S.K. Kasiakou, *Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections*. *Clin Infect Dis*, 2005. **40**(9): p. 1333-41.

16. Martis, N., S. Leroy, and V. Blanc, *Colistin in multi-drug resistant Pseudomonas aeruginosa blood-stream infections: a narrative review for the clinician*. J Infect, 2014. **69**(1): p. 1-12.
17. Velkov, T., et al., *Structure--activity relationships of polymyxin antibiotics*. J Med Chem, 2010. **53**(5): p. 1898-916.
18. Jayol, A., et al., *Hafnia, an enterobacterial genus naturally resistant to colistin revealed by three susceptibility testing methods*. J Antimicrob Chemother, 2017. **72**(9): p. 2507-2511.
19. Guérin, F., et al., *Cluster-dependent colistin hetero-resistance in Enterobacter cloacae complex*. J Antimicrob Chemother, 2016. **71**(11): p. 3058-3061.
20. Agersø, Y., et al., *Tentative colistin epidemiological cut-off value for Salmonella spp*. Foodborne Pathog Dis, 2012. **9**(4): p. 367-9.
21. Stein, A. and D. Raoult, *Colistin: an antimicrobial for the 21st century?* Clin Infect Dis, 2002. **35**(7): p. 901-2.
22. Beringer, P., *The clinical use of colistin in patients with cystic fibrosis*. Curr Opin Pulm Med, 2001. **7**(6): p. 434-40.
23. Li, J., et al., *Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections*. Lancet Infect Dis, 2006. **6**(9): p. 589-601.

24. Vardakas, K.Z., et al., *Inhaled colistin monotherapy for respiratory tract infections in adults without cystic fibrosis: a systematic review and meta-analysis*. Int J Antimicrob Agents, 2018. **51**(1): p. 1-9.
25. *European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Summary of the latest data on antibiotic consumption in the European Union. 2015 nov. [Internet]. 2015.*
26. Mezghani Maalej, S., et al., *Epidemiological study of Enterobacteriaceae resistance to colistin in Sfax (Tunisia)*. Med Mal Infect, 2012. **42**(6): p. 256-63.
27. Mammina, C., et al., *Ongoing spread of colistin-resistant Klebsiella pneumoniae in different wards of an acute general hospital, Italy, June to December 2011*. Euro Surveill, 2012. **17**(33).
28. Arduino, S.M., et al., *Transposons and integrons in colistin-resistant clones of Klebsiella pneumoniae and Acinetobacter baumannii with epidemic or sporadic behaviour*. J Med Microbiol, 2012. **61**(Pt 10): p. 1417-1420.
29. Zagorianou, A., et al., *Microbiological and molecular characteristics of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae endemic in a tertiary Greek hospital during 2004-2010*. Euro Surveill, 2012. **17**(7).
30. Giani, T., et al., *Large Nosocomial Outbreak of Colistin-Resistant, Carbapenemase-Producing Klebsiella pneumoniae Traced to Clonal Expansion of an mgrB Deletion Mutant*. Journal of clinical microbiology, 2015. **53**(10): p. 3341-3344.

31. Monaco, M., et al., *Colistin resistance superimposed to endemic carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae: a rapidly evolving problem in Italy, November 2013 to April 2014*. Euro Surveill, 2014. **19**(42).
32. Adelowo, O.O., O.E. Fagade, and Y. Agersø, *Antibiotic resistance and resistance genes in Escherichia coli from poultry farms, southwest Nigeria*. J Infect Dev Ctries, 2014. **8**(9): p. 1103-12.
33. Hasanin, A., et al., *Prevalence of extensively drug-resistant gram negative bacilli in surgical intensive care in Egypt*. The Pan African medical journal, 2014. **19**: p. 177-177.
34. Olaitan, A.O., S. Morand, and J.M. Rolain, *Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria*. Front Microbiol, 2014. **5**: p. 643.
35. Velkov, T., et al., *Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics*. Future Microbiol, 2013. **8**(6): p. 711-24.
36. Jayol, A., et al., *Heteroresistance to colistin in Klebsiella pneumoniae associated with alterations in the PhoPQ regulatory system*. Antimicrob Agents Chemother, 2015. **59**(5): p. 2780-4.
37. Campos, M.A., et al., *Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides*. Infect Immun, 2004. **72**(12): p. 7107-14.

38. Padilla, E., et al., *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010. **54**(1): p. 177-83.
39. Lee, J.-Y., et al., *Preservation of Acquired Colistin Resistance in Gram-Negative Bacteria*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2015. **60**(1): p. 609-612.
40. Beceiro, A., et al., *Biological cost of different mechanisms of colistin resistance and their impact on virulence in Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014. **58**(1): p. 518-26.
41. Pournaras, S., et al., *Growth retardation, reduced invasiveness, and impaired colistin-mediated cell death associated with colistin resistance development in Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014. **58**(2): p. 828-32.
42. Choi, M.J. and K.S. Ko, *Loss of hypermucoviscosity and increased fitness cost in colistin-resistant Klebsiella pneumoniae sequence type 23 strains*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015. **59**(11): p. 6763-73.
43. Liu, Y.Y., et al., *Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study*. *Lancet Infect Dis*, 2016. **16**(2): p. 161-8.

44. Hasman, H., et al., *Detection of mcr-1 encoding plasmid-mediated colistin-resistant Escherichia coli isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark 2015*. Euro Surveill, 2015. **20**(49).
45. *Haut conseil de la Santé Publique (HCSP). Avis le 27 septembre 2016 relatif aux mesures à prendre par les établissements de santé en lien avec l'émergence d'une résistance plasmidique à la colistine (mcr-1) chez les entérobactéries. [Internet]. Disponible sur : <https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=576>. 2016.*
46. Skov, R.L. and D.L. Monnet, *Plasmid-mediated colistin resistance (mcr-1 gene): three months later, the story unfolds*. Euro Surveill, 2016. **21**(9): p. 30155.
47. Shen, Z., et al., *Early emergence of mcr-1 in Escherichia coli from food-producing animals*. Lancet Infect Dis, 2016. **16**(3): p. 293.
48. Haenni, M., et al., *Co-occurrence of extended spectrum β lactamase and MCR-1 encoding genes on plasmids*. Lancet Infect Dis, 2016. **16**(3): p. 281-2.
49. Nordmann, P. and L. Poirel, *Plasmid-mediated colistin resistance: an additional antibiotic resistance menace*. Clin Microbiol Infect, 2016. **22**(5): p. 398-400.
50. Piffaretti, J.C., *Antibiotic resistance: the emergence of plasmid-mediated colistin resistance enhances the need of a proactive one-health approach*. FEMS Microbiol Lett, 2016. **363**(5): p. fnw034.

51. Paterson, D.L. and P.N. Harris, *Colistin resistance: a major breach in our last line of defence*. *Lancet Infect Dis*, 2016. **16**(2): p. 132-3.
52. Kusumoto, M., et al., *Colistin-Resistant mcr-1-Positive Pathogenic Escherichia coli in Swine, Japan, 2007-2014*. *Emerging infectious diseases*, 2016. **22**(7): p. 1315-1317.
53. Castanheira, M., et al., *Detection of mcr-1 among Escherichia coli Clinical Isolates Collected Worldwide as Part of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in 2014 and 2015*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016. **60**(9): p. 5623-4.
54. Newton-Foot, M., et al., *Plasmid-mediated mcr-1 colistin resistance in Escherichia coli and Klebsiella spp. clinical isolates from the Western Cape region of South Africa*. *Antimicrobial resistance and infection control*, 2017. **6**: p. 78-78.
55. Falgenhauer, L., et al., *Chromosomal Locations of mcr-1 and bla CTX-M-15 in Fluoroquinolone-Resistant Escherichia coli ST410*. *Emerging infectious diseases*, 2016. **22**(9): p. 1689-1691.
56. Poirel, L., et al., *Plasmid-mediated carbapenem and colistin resistance in a clinical isolate of Escherichia coli*. *Lancet Infect Dis*, 2016. **16**(3): p. 281.
57. Du, H., et al., *Emergence of the mcr-1 colistin resistance gene in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae*. *Lancet Infect Dis*, 2016. **16**(3): p. 287-8.

58. Di Pilato, V., et al., *mcr-1.2, a New mcr Variant Carried on a Transferable Plasmid from a Colistin-Resistant KPC Carbapenemase-Producing Klebsiella pneumoniae Strain of Sequence Type 512*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2016. **60**(9): p. 5612-5615.
59. Xavier, B.B., et al., *Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in Escherichia coli, Belgium, June 2016*. Euro Surveill, 2016. **21**(27).
60. Yin, W., et al., *Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene mcr-3 in Escherichia coli*. mBio, 2017. **8**(3).
61. Carattoli, A., et al., *Novel plasmid-mediated colistin resistance mcr-4 gene in Salmonella and Escherichia coli, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016*. Euro Surveill, 2017. **22**(31).
62. Borowiak, M., et al., *Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, mcr-5, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi B*. J Antimicrob Chemother, 2017. **72**(12): p. 3317-3324.
63. *Haut Conseil de la Santé Publique (HCSP). Avis le 23 mai 2017 en complément d'information aux mesures de maîtrise de la diffusion recommandées dans l'avis du HCSP du 27 septembre 2016 au regard de l'émergence d'une résistance plasmidique à la colistine (mcr-1) chez les entérobactéries. [Internet]. 2017.*

64. *Haut Conseil de la santé publique (HCSP). Avis du 10 juillet 2013 relatif à la prévention de la transmission croisée des bactéries hautement résistantes aux antibiotiques émergentes (BHRe). [Internet]. 2013.*
65. *Société française d'hygiène hospitalière (SF2H). Recommandations 2009 « Prévention de la transmission croisée : Précautions complémentaires contact ». [Internet]. . 2009.*
66. Humphries, R.M., *Susceptibility testing of the polymyxins: where are we now? Pharmacotherapy, 2015. 35(1): p. 22-7.*
67. Sader, H.S., et al., *Use of a surfactant (polysorbate 80) to improve MIC susceptibility testing results for polymyxin B and colistin. Diagn Microbiol Infect Dis, 2012. 74(4): p. 412-4.*
68. Albur, M., et al., *Colistin susceptibility testing: time for a review. J Antimicrob Chemother, 2014. 69(5): p. 1432-4.*
69. Gales, A.C., A.O. Reis, and R.N. Jones, *Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. J Clin Microbiol, 2001. 39(1): p. 183-90.*
70. Hindler, J.A. and R.M. Humphries, *Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli. Journal of clinical microbiology, 2013. 51(6): p. 1678-1684.*

71. Dafopoulou, K., et al., *Comparative Evaluation of Colistin Susceptibility Testing Methods among Carbapenem-Nonsusceptible Klebsiella pneumoniae and Acinetobacter baumannii Clinical Isolates*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015. **59**(8): p. 4625-30.
72. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. Mars 2016 [Internet]. Disponible sur : <http://www.eucast.org>. 2016.*
73. *Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2017. V1.0 Mars. [Internet]. 2017.*
74. *Haut Conseil de la Santé Publique (HCSP). Avis le 06 décembre 2016 relatif au diagnostic microbiologique des entérobactéries productrices de carbapénémases ou résistantes à la colistine renfermant le gène mcr-1. [Internet]. 2016.*
75. Matuschek, E., et al., *Antimicrobial susceptibility testing of colistin - evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, and Acinetobacter spp.* *Clin Microbiol Infect*, 2018. **24**(8): p. 865-870.
76. Vourli, S., et al., *Evaluation of two automated systems for colistin susceptibility testing of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii clinical isolates*. *J Antimicrob Chemother*, 2017. **72**(9): p. 2528-2530.

77. *European Medicines Agency (EMA). Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union : development of resistance and possible impact on human and animal health. Mai 2016. [Internet]. 2016.*
78. Kempf, I., et al., *What do we know about resistance to colistin in Enterobacteriaceae in avian and pig production in Europe?* Int J Antimicrob Agents, 2013. **42**(5): p. 379-83.
79. *Avis de l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la saisine n°2016-SA-0160 concernant l'utilisation de la colistine en médecine vétérinaire (Anses). Octobre 2016. [Internet]. 2016.*
80. Zhang, P., et al., *Surveillance of antimicrobial resistance among Escherichia coli from chicken and swine, China, 2008-2015.* Vet Microbiol, 2017. **203**: p. 49-55.
81. Walsh, T.R. and Y. Wu, *China bans colistin as a feed additive for animals.* Lancet Infect Dis, 2016. **16**(10): p. 1102-1103.
82. Silvestri, L., M.A. de la Cal, and H.K. van Saene, *Selective decontamination of the digestive tract: the mechanism of action is control of gut overgrowth.* Intensive Care Med, 2012. **38**(11): p. 1738-50.
83. Kesecioglu, J. and P. Eggimann, *What is new in selective decontamination of the digestive tract?* Intensive care medicine, 2016. **42**(8): p. 1270-1275.

84. Fernandes, M.R., et al., *Silent dissemination of colistin-resistant Escherichia coli in South America could contribute to the global spread of the mcr-1 gene*. Euro Surveill, 2016. **21**(17).
85. Haenni, M., et al., *Increasing Trends in mcr-1 Prevalence among Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing Escherichia coli Isolates from French Calves despite Decreasing Exposure to Colistin*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2016. **60**(10): p. 6433-6434.
86. Lei, L., et al., *mcr-1 in Enterobacteriaceae from Companion Animals, Beijing, China, 2012-2016*. Emerging infectious diseases, 2017. **23**(4): p. 710-711.
87. Olaitan, A.O., et al., *Clonal transmission of a colistin-resistant Escherichia coli from a domesticated pig to a human in Laos*. J Antimicrob Chemother, 2015. **70**(12): p. 3402-4.
88. Hu, Y., et al., *Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene*. Lancet Infect Dis, 2016. **16**(2): p. 146-7.
89. Zhi, C., et al., *Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene*. Lancet Infect Dis, 2016. **16**(3): p. 292-3.
90. Saly, M., et al., *Prevalence of faecal carriage of colistin-resistant Gram-negative rods in a university hospital in western France, 2016*. J Med Microbiol, 2017. **66**(6): p. 842-843.
91. Zhang, R., et al., *Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene*. Lancet Infect Dis, 2016. **16**(3): p. 291-2.

92. Lentz, S.A., et al., *Letter to the editor: Escherichia coli harbouring mcr-1 gene isolated from poultry not exposed to polymyxins in Brazil*. Euro Surveill, 2016. **21**(26).
93. Ovejero, C.M., et al., *Spread of mcr-1-carrying Enterobacteriaceae in sewage water from Spain*. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 2017. **72**(4): p. 1050-1053.
94. Zurfeh, K., et al., *Occurrence of the Plasmid-Borne mcr-1 Colistin Resistance Gene in Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in River Water and Imported Vegetable Samples in Switzerland*. Antimicrob Agents Chemother, 2016. **60**(4): p. 2594-5.
95. Jayol, A., et al., *Acquisition of Broad-Spectrum Cephalosporin Resistance Leading to Colistin Resistance in Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2016. **60**(5): p. 3199-3201.
96. Vaara, M., T. Vaara, and C. Vingsbo Lundberg, *Polymyxin derivatives NAB739 and NAB815 are more effective than polymyxin B in murine Escherichia coli pyelonephritis*. J Antimicrob Chemother, 2018. **73**(2): p. 452-455.
97. Gordon, N.C., K. Png, and D.W. Wareham, *Potent synergy and sustained bactericidal activity of a vancomycin-colistin combination versus multidrug-resistant strains of Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(12): p. 5316-22.

98. Petrosillo, N., E. Ioannidou, and M.E. Falagas, *Colistin monotherapy vs. combination therapy: evidence from microbiological, animal and clinical studies*. Clin Microbiol Infect, 2008. **14**(9): p. 816-27.
99. Brennan-Krohn, T., A. Pironti, and J.E. Kirby, *Synergistic Activity of Colistin-Containing Combinations against Colistin-Resistant Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Chemother, 2018. **62**(10).
100. Al Atya, A.K., et al., *Effects of Colistin and Bacteriocins Combinations on the In Vitro Growth of Escherichia coli Strains from Swine Origin*. Probiotics and antimicrobial proteins, 2016. **8**(4): p. 183-190.
101. Zhou, Y., et al., *In Vitro/Vivo Activity of Potential MCR-1 Inhibitor in Combination With Colistin Againsts mcr-1-Positive Klebsiella pneumonia*. Frontiers in microbiology, 2018. **9**: p. 1615-1615.