

Quoi de neuf sur les carbapénémases ?

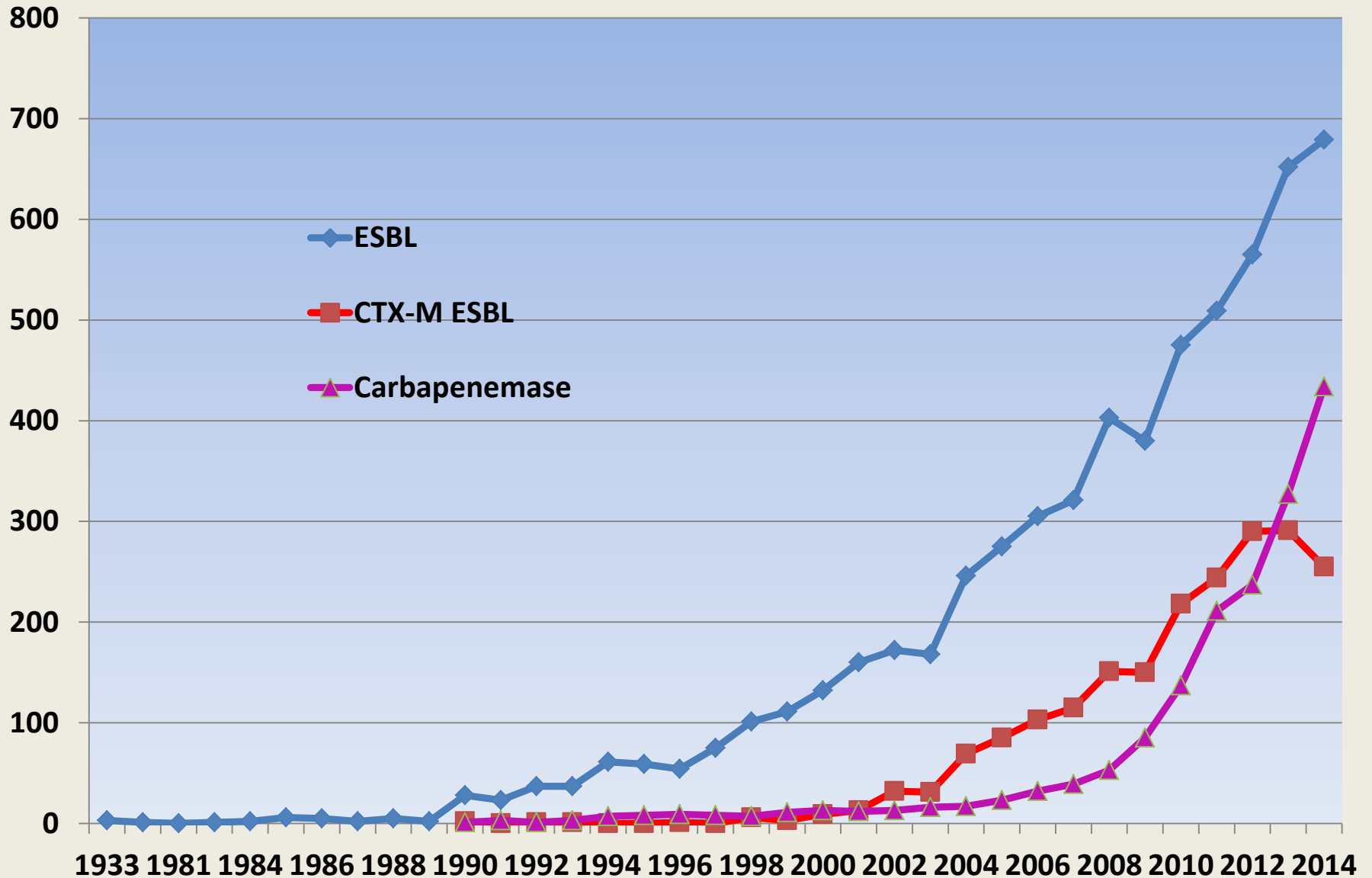
Pr Guillaume Arlet

CIMI

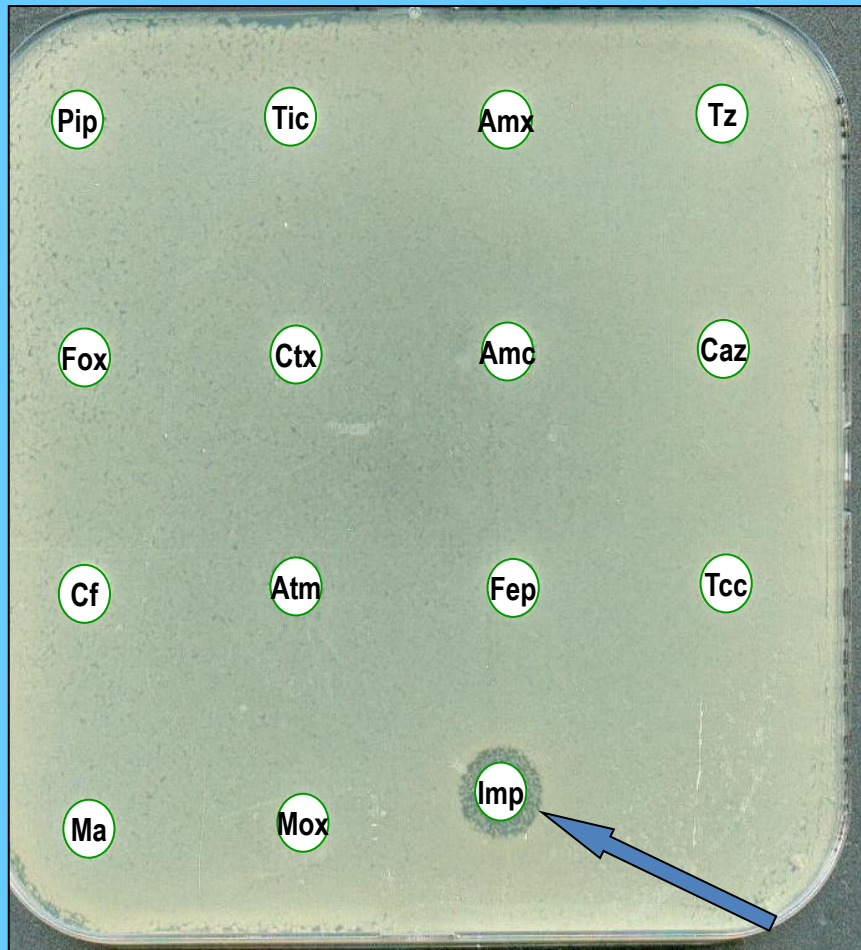
UPMC UMRS CR7 - INSERM U1135

Equipe 13 Emergence and Diffusion of Multiple Drug Resistance in Bacteria

Pubmed



Carbapénémases



Classe A : KPC

- New-York, Grèce, Israël
- *K. pneumoniae* (50%), *E. cloacae*, *E. coli*

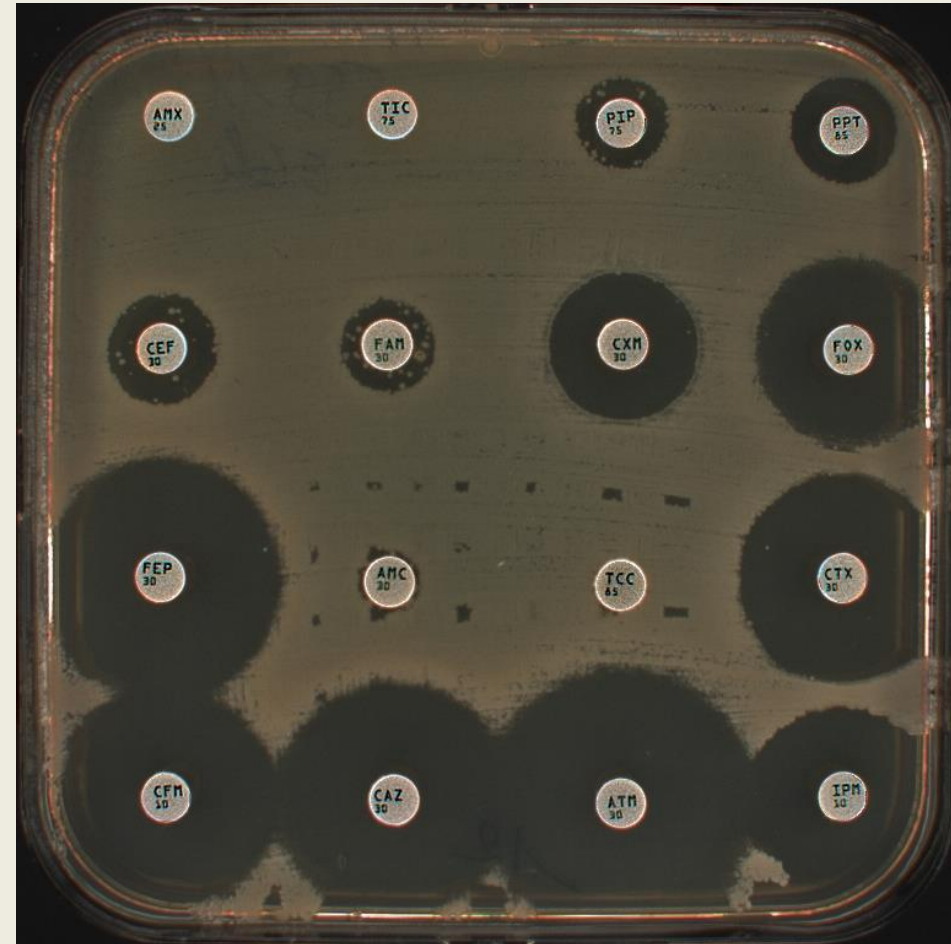
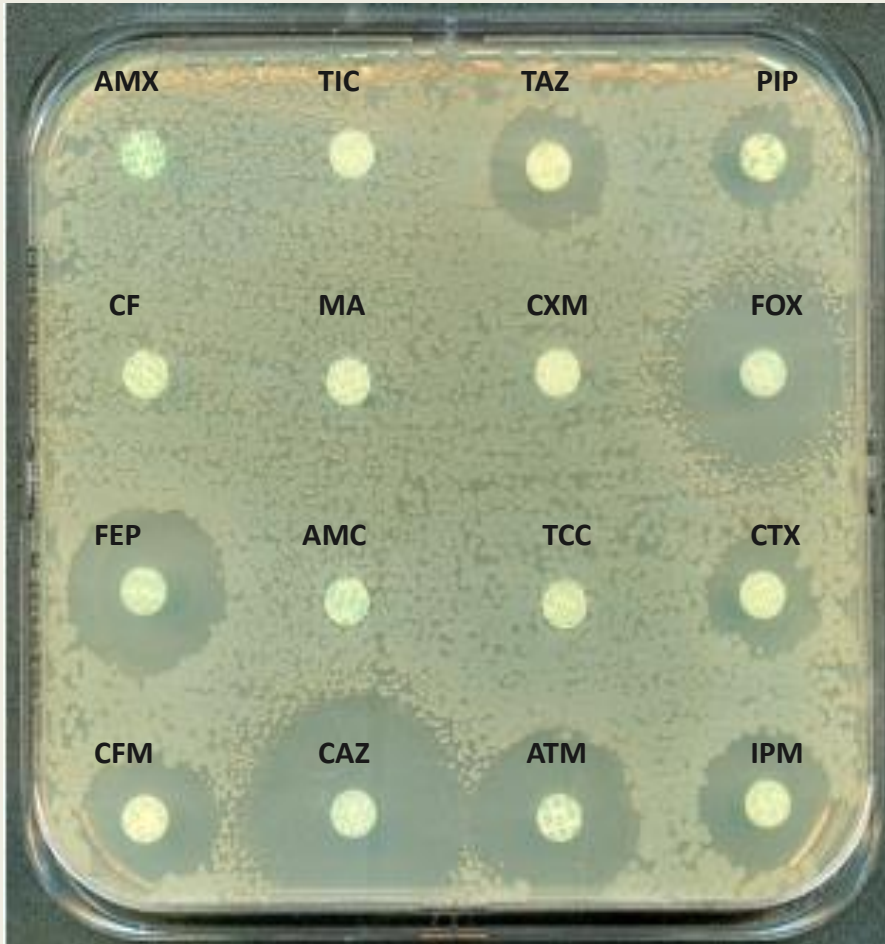
Classe B (MBL) : VIM, (IMP), (NDM)

- Italie, Grèce, Tunisie
- *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*
- Inde-Pakistan, *E. coli*, *K. pneumoniae*

Classe D : OXA-48 Turquie; OXA-23/-58/-40

E. coli OXA-48 + CTX-M-9

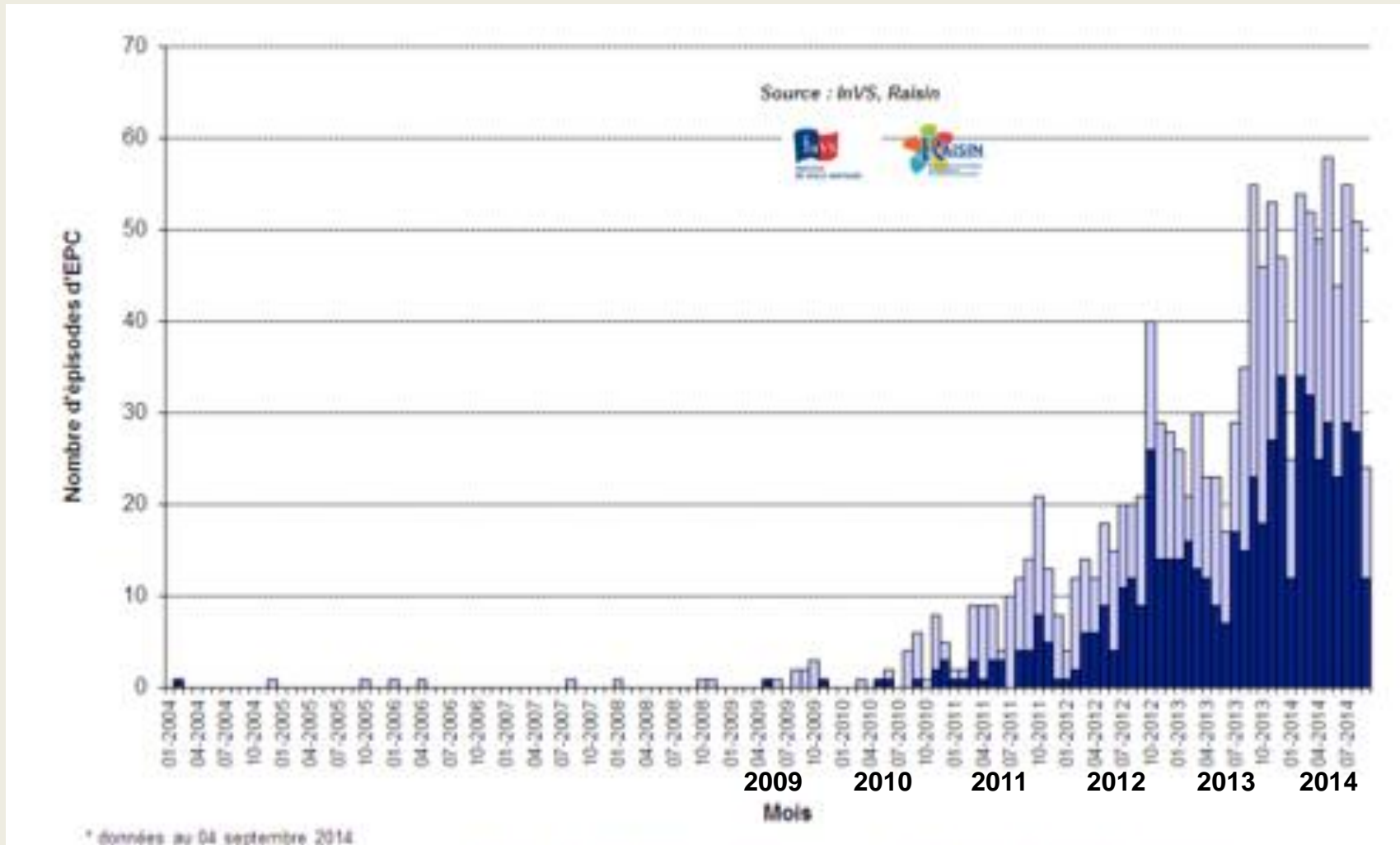
E. coli OXA-48 seule



AMX, AMC, TIC, TCC >512
 PIP, TAZ = 128
 CF, CXM = 8
 CTX, FEP = 0,25; CAZ = 0,12

IPM = 2

Evolution du nombre d'épisodes impliquant une EPC janvier 2004 – septembre 2014



1210 épisodes au total

2009 : 10 , 2010 : 28 , 2011 : 113 , 2012 : 233 , 2013 : 405 , 2014 : 412

EPC en France 2004-2014

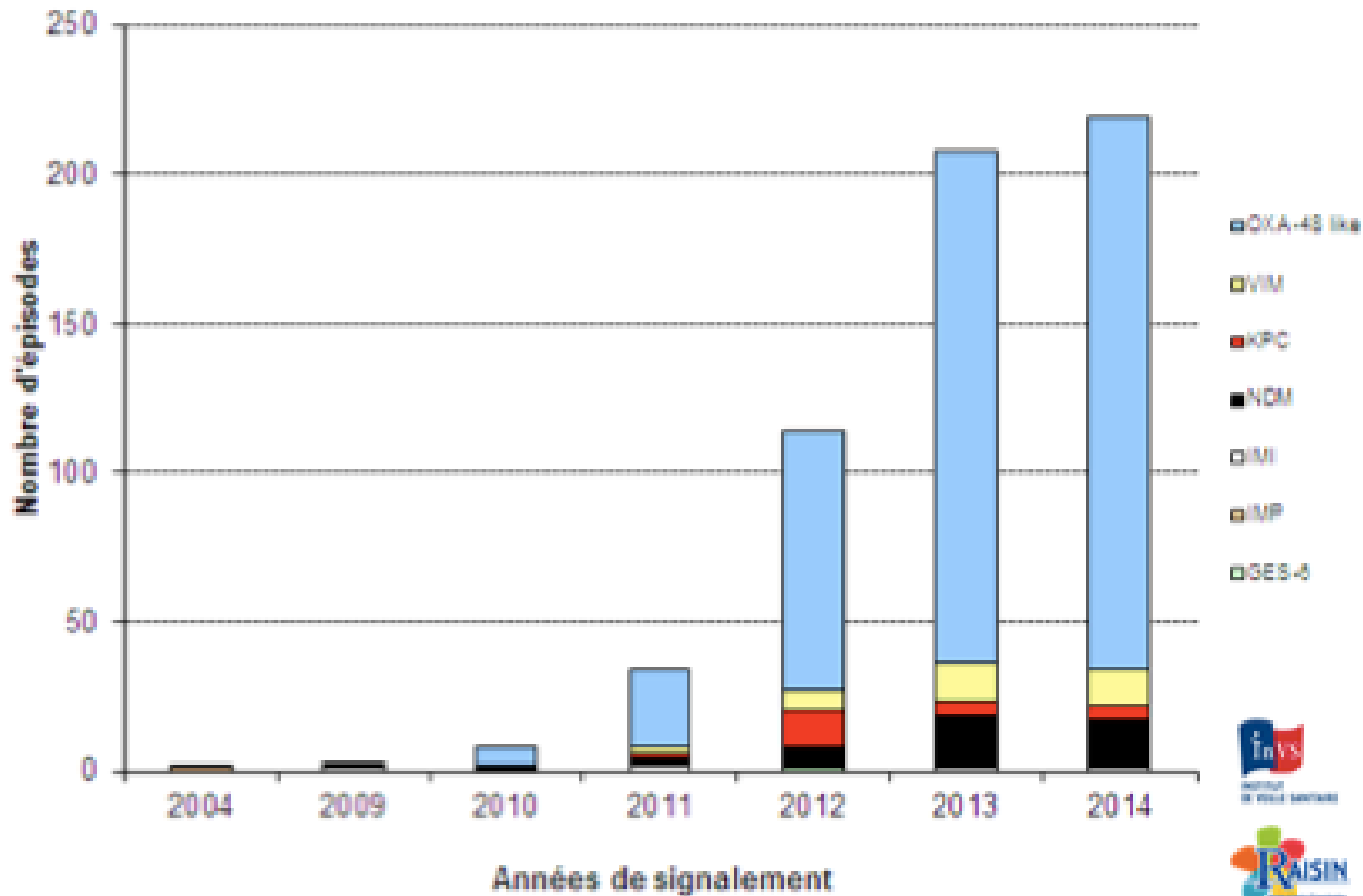
1210 épisodes

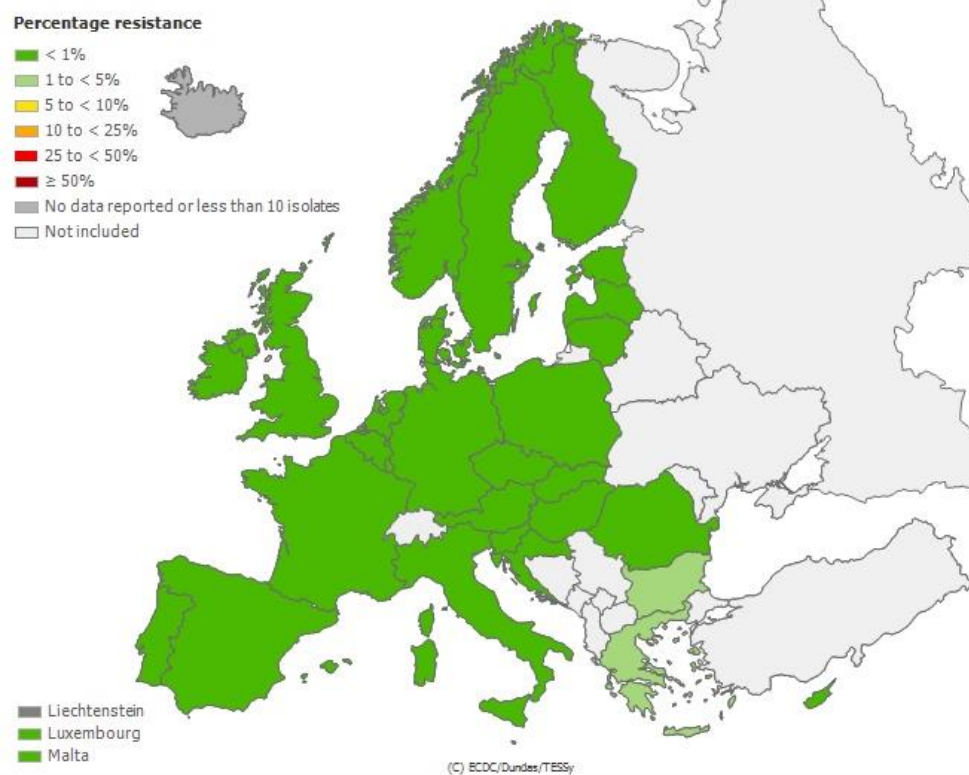
	N	%
K. pneumoniae	772	64
E. coli	338	28
Enterobacter sp	172	14
C. freundii	49	4
Autres	80	7

	N	%
Paris Nord	694	57
Sud Est	313	26
Ouest	73	6
Est	69	6
Sud Ouest	60	5

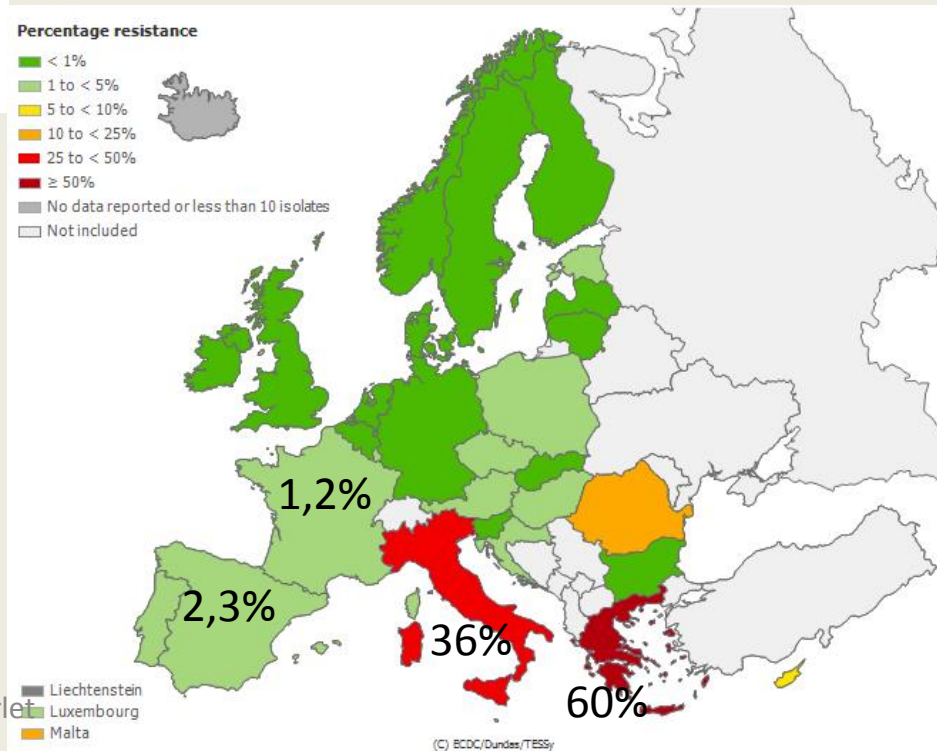
	N	%
OXA-48 type	925	76
KPC	94	8
NDM	156	13
VIM	61	5
autres	10	1

EPC sans lien avec l'étranger





Escherichia coli 2013 R+I Carbapénème

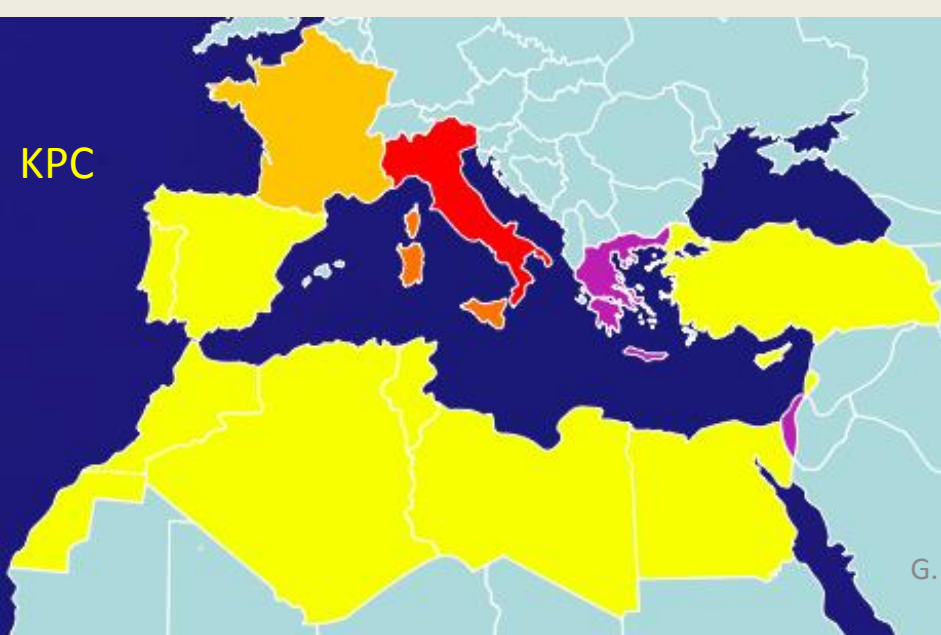


Klebsiella pneumoniae 2013 R+I Carbapénème

Antimicrobial resistance interactive database: EARS-Net

Salmonella et carbapénémase

- S et NDM-1, USA, Chine, Réunion
- S. typhimurium OXA-48 (UK) : Afrique
- S. et KPC-2 (Argentine, Colombie)



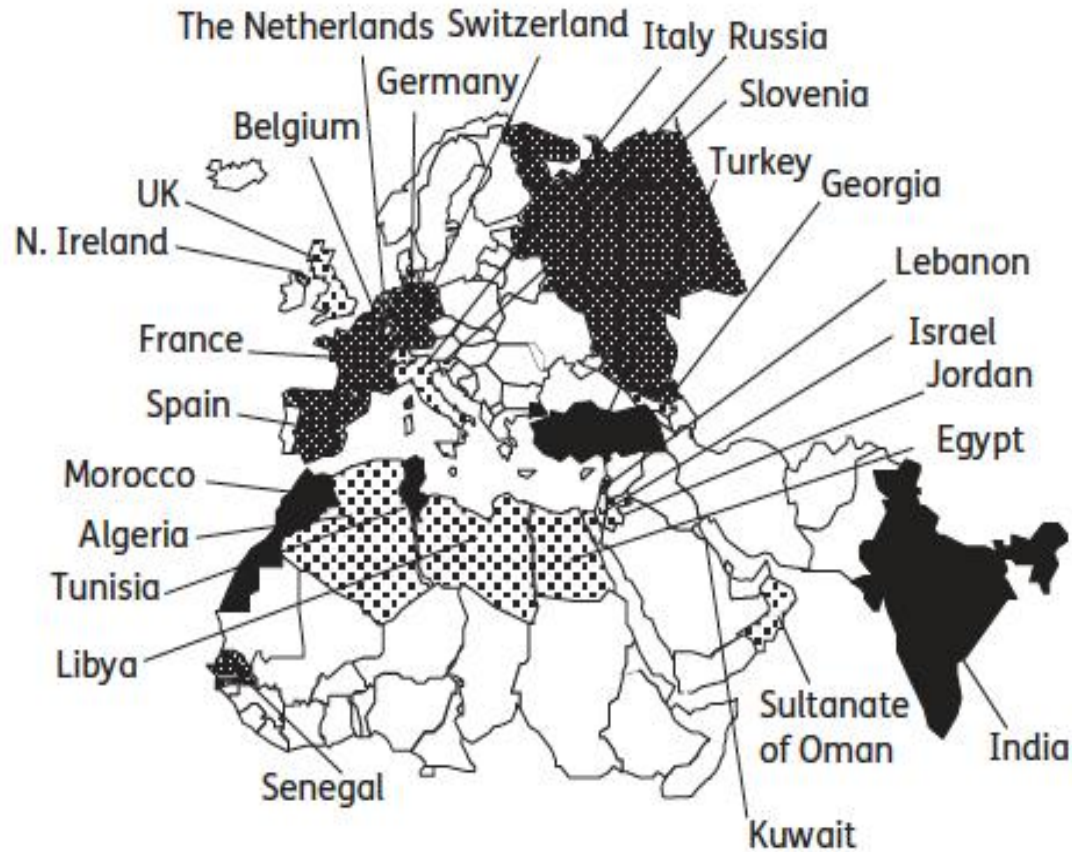
Génétique des Carbapénémases

la prédiction du succès !

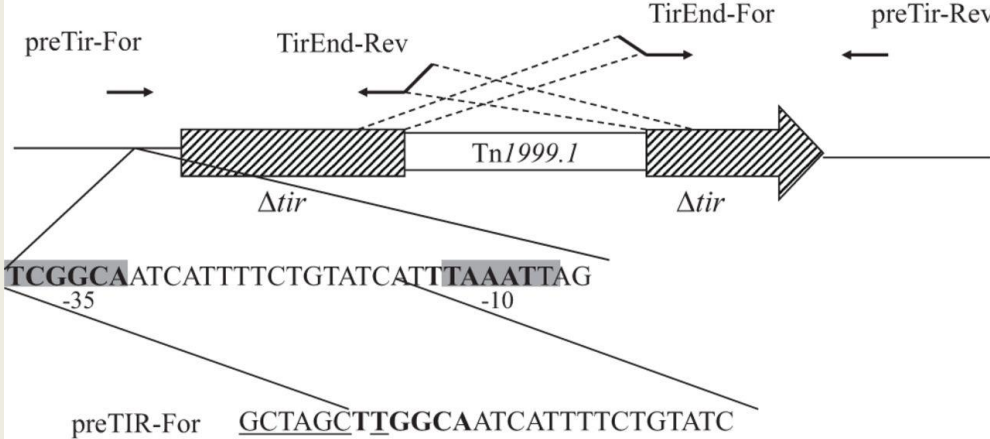
	Mob	plasmide	
NDM	ISAba1	A/C, L/M, N, F, X	E. coli ST101 (inde), ST131, KP (ST11), ENB , A. baumannii, P. aeruginosa
KPC	ISKpn6, ISKpn7	A/C, L/M, F, N, X	KP (ST258, ST11), Pseudomonas sp.
OXA-48	Tn1999 (2 IS)	L/M (A/C)	KP (ST395), E. coli, ENB
VIM	intégron	A/C	Pyo, AB, ENB, Sal.
CTX-M	ISEcp1	FII, FIIk, FIIS	E. coli, KP, Sal, ENB

Dissémination OXA-48

Poirel L et al. J. Antimicrob. Chemother. 2012;67:1597-1606



- Single OXA-48-like-producing isolates
- Outbreaks of OXA-48-like-producing isolates
- Nationwide distribution of OXA-48-like-producing isolates

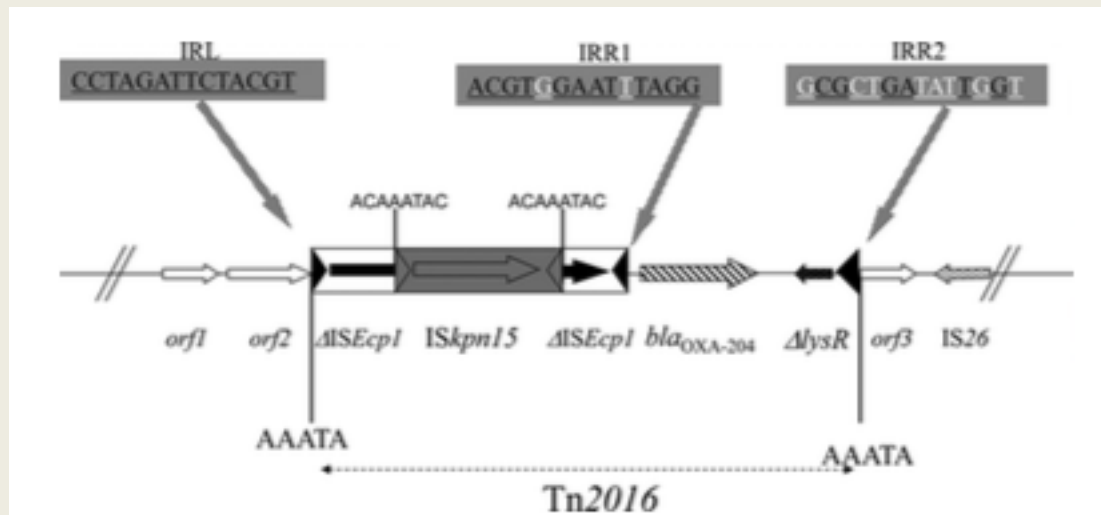


pOXA-48 IncL/M

Donor strain	Recipient strain	Mean transfer frequency \pm SD
<i>E. coli</i> TOP10(pOXA-48a)	<i>E. coli</i> JM109	$1.1 \times 10^{-1} \pm 0.02$
<i>E. coli</i> TOP10(pNDM-OM)	<i>E. coli</i> JM109	$2.6 \times 10^{-3} \pm 0.016$
<i>E. coli</i> TOP10(pOXA-48a, pTOPO-Nc)	<i>E. coli</i> JM109	$1.7 \times 10^{-1} \pm 0.03$
<i>E. coli</i> TOP10(pOXA-48a, pTOPO-TIR)	<i>E. coli</i> JM109	$1.6 \times 10^{-3} \pm 0.0005$
<i>E. coli</i> TOP10(pOXA-48a, pTOPO-Nc)	<i>E. cloacae</i> SB	$4.9 \times 10^{-2} \pm 0.018$
<i>E. coli</i> TOP10(pOXA-48a, pTOPO-TIR)	<i>E. cloacae</i> SB	$1.2 \times 10^{-3} \pm 0.00004$

Support génétique OXA-48

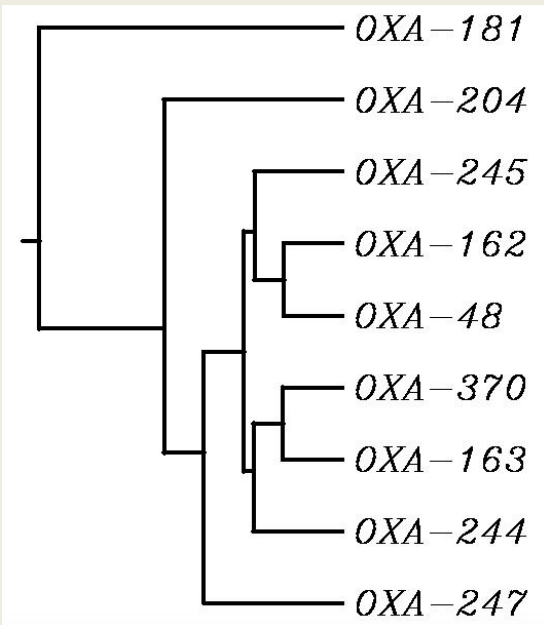
- Inc L/M à haute capacité de transfert in vivo.
 - OXA-48 seul
- OXA-204, plasmide IncA/C à large spectre d'hôte (*A. baumannii*, *P. aeruginosa*)
 - association à d'autres gènes (CMY-4)



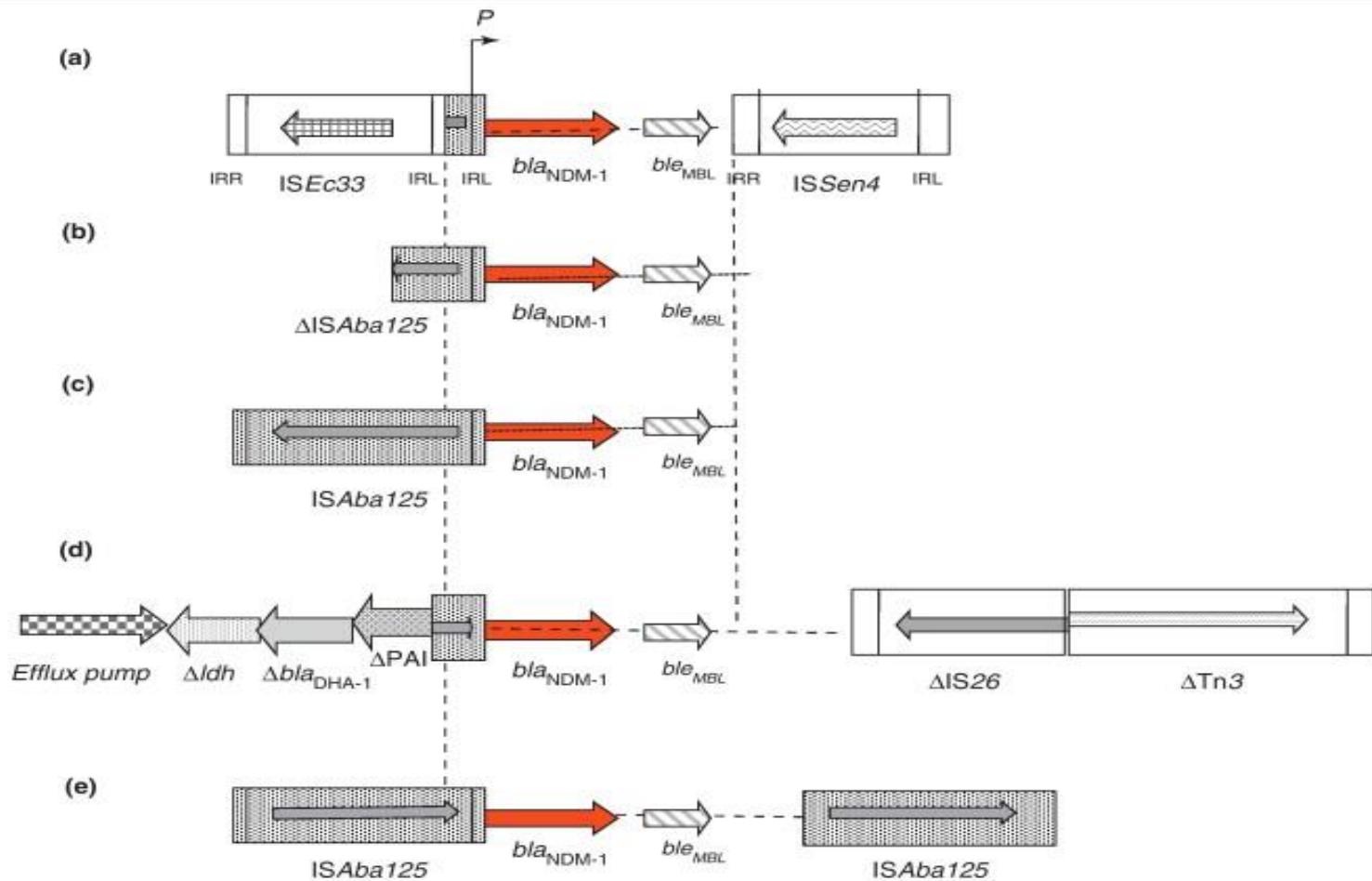
Capacité évolutive d'OXA-48

```

OXA-181  LHSVRSQRIVKQAMLTEANGDYIIRAKTGYSTRIEPKIGWWVGVVELDDNVWFFAMNMD
OXA-204  LHSVRSQRIVKQAMLTEANGDYIIRAKTGYSTRIEPKIGWWVGVVELDDNVWFFAMNMD
OXA-245  LHSVRSQRIVKQAMLTEANGDYIIRAKTGYSTRIEPKIGWWVGVVELDDNVWFFAMNMD
OXA-162  LHSVRSQRIVKQAMLTEANGDYIIRAKTGYSAIEPKIGWWVGVVELDDNVWFFAMNMD
OXA-48   LHSVRSQRIVKQAMLTEANGDYIIRAKTGYSTRIEPKIGWWVGVVELDDNVWFFAMNMD
OXA-370  LHSVRSQRIVKQAMLTEANGDYIIRAKTGYETRIEPKIGWWVGVVELDDNVWFFAMNMD
OXA-244  LHSVRSQRIVKQAMLTEANGDYIIRAKTGYSTGIEPKIGWWVGVVELDDNVWFFAMNMD
OXA-163  LHSVRSQRIVKQAMLTEANGDYIIRAKTGYDT----KIGWWVGVVELDDNVWFFAMNMD
OXA-247  LHSVRSQRIVKQAMLTEANGDYIIRAKTGSNT----KIGWWVGVVELDDNVWFFAMNMD
***** .: *****
    
```



β -Lactam(s) ^a	<i>E. coli</i> TOP10(pOXA-163)	<i>E. coli</i> TOP10(pOXA-48)
Amoxicillin	>256	>256
Amoxicillin + CLA	>256	>256
Ticarcillin	>256	>256
Ticarcillin + CLA	>256	>256
Piperacillin	>256	64
Piperacillin + TZB	>256	64
Cephalothin	>256	8
Cefoxitin	4	4
Cefotaxime	3	0.25
Ceftazidime	16	0.12
Cefepime	1	0.25
Aztreonam	2	0.06
Imipenem	0.25	0.5
Ertapenem	0.02	0.25
Meropenem	0.02	0.1



TRENDS in Microbiology

Schematic map of bla NDM-1-associated genetic structures identified among Gram-negative clinical isolates

The emerging NDM carbapenemases

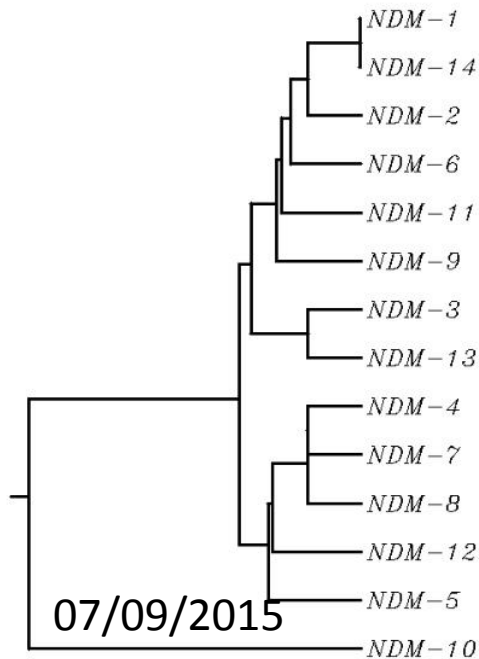
Patrice Nordmann, Laurent Poirel, Timothy R. Walsh, David M. Livermore

Trends in Microbiology Volume 19, Issue 12 2011 588 - 595

Evolution NDM-type

NDM-1	AHQDKMGGMDALHAAGIATYANALSNQLAPQEGMVAAQHSLTFAANGWVEPATAPNFGPL	180
NDM-2	AHQDKMGGMDALHAAGIATYANALSNQLAPQEGMVAAQHSLTFAANGWVEPATAPNFGPL	
NDM-3	AHQDKMGGMDALHAAGIATYANALSNQLAPQEGMVAAQHSLTFAANGWVEPATAPNFGPL	
NDM-13	AHQDKMGGMDALHAAGIATYANALSNQLAPQEGLVAAQHSLTFAANGWVEPATAPNFGPL	
NDM-4	AHQDKMGGMDALHAAGIATYANALSNQLAPQEGLVAAQHSLTFAANGWVEPATAPNFGPL	
NDM-5	AHQDKMGGMDALHAAGIATYANALSNQLAPQEGLVAAQHSLTFAANGWVEPATAPNFGPL	
NDM-7	AHQDKMGGM ^N ALHAAGIATYANALSNQLAPQEGLVAAQHSLTFAANGWVEPATAPNFGPL	
NDM-8	AHQDKMGGM ^G ALHAAGIATYANALSNQLAPQEGLVAAQHSLTFAANGWVEPATAPNFGPL	
NDM-12	AHQDKMGGMDALHAAGIATYANALSNQLAPQEGLVAAQHSLTFAANGWVEPATAPNFGPL	
NDM-11	AHQDKMGGMDALHAAGIATYANALSNQLAPQEGVVAQHSLTFAANGWVEPATAPNFGPL	
NDM-9	AHQDKMGGMDALHAAGIATYANALSNQLAPQKGMVAAQHSLTFAANGWVEPATAPNFGPL	
NDM-6	AHQDKMGGMDALHAAGIATYANALSNQLAPQEGMVAAQHSLTFAANGWVEPATAPNFGPL	
NDM-14	AHQDKMGGMDALHAAGIATYANALSNQLAPQEGMVAAQHSLTFAANGWVEPATAPNFGPL	
NDM-10	AHQDKMGGMDALHAAGIATYANALSNQLAPQEGMVAAQHSLTFAANGWVEPATAPNFGPL	

*****.*****:*****



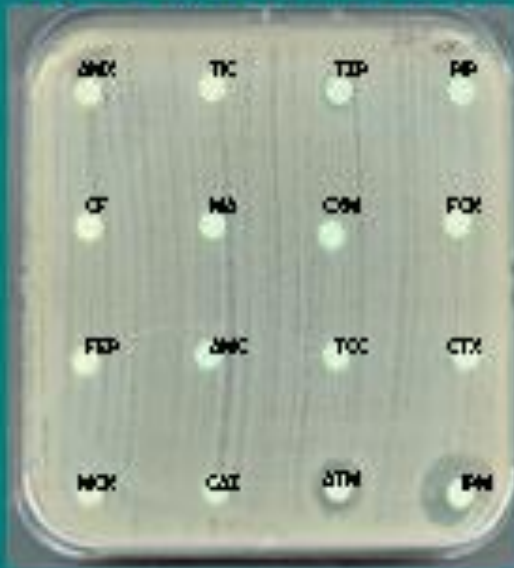
Met154Leu

Meilleure hydrolyse des carbapénèmes et des Céphalosporines de troisième génération (à l'exception du céfépime)

Et KPC dans l'histoire...

- Pas encore en Tunisie
- Présente en Algérie
- Présente en Grèce, Italie, Espagne & Portugal.

KPC-2, SHV-12, TEM-1



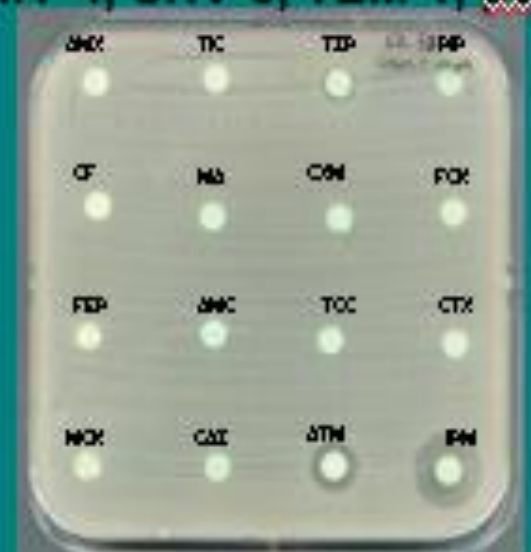
VIM-1, SHV-5, TEM-1



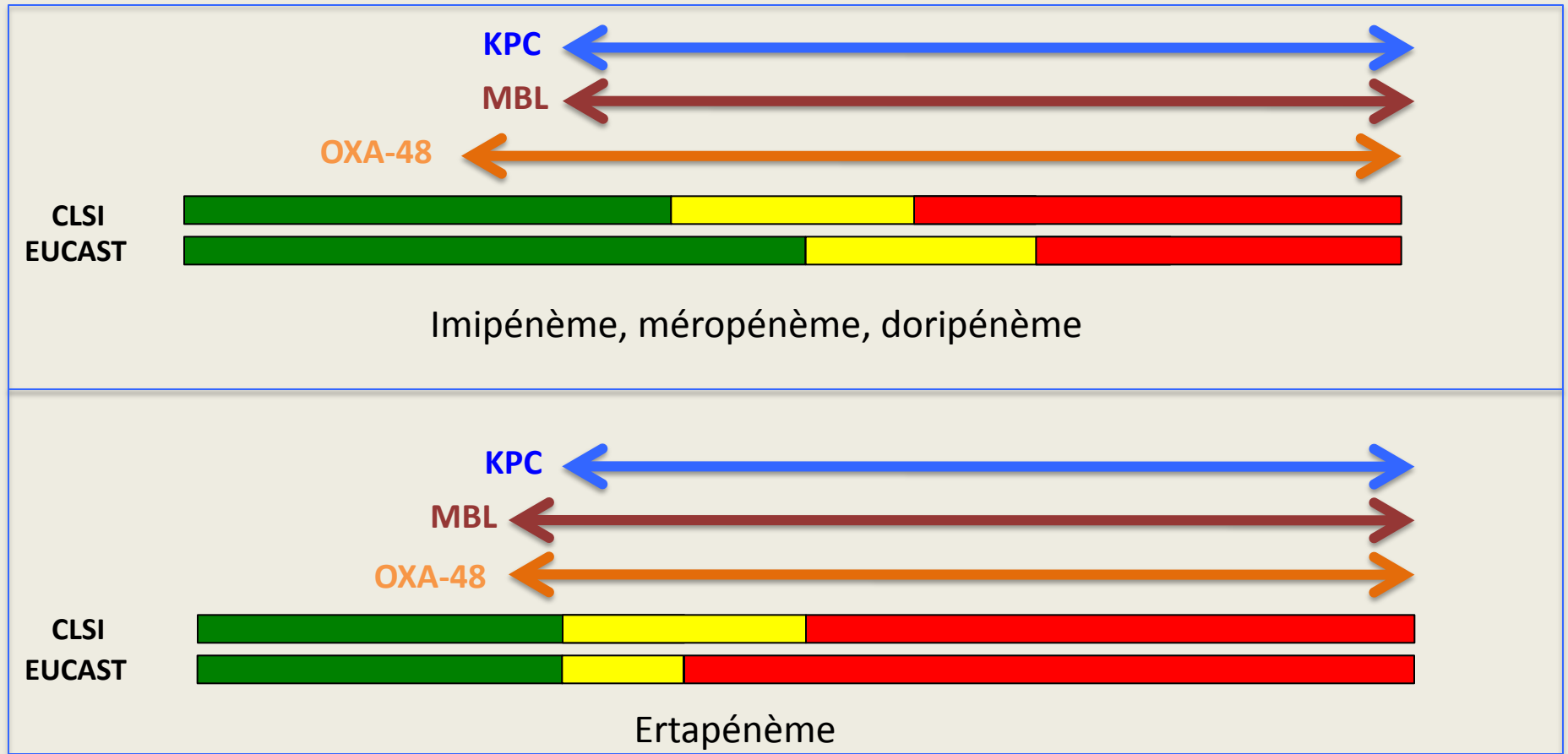
OXA-48, OXA-47, SHV-2a, TEM-1, porine CMY-4, SHV-5, TEM-1, porine



G. Arlet



Activité des carbapénèmes sur les producteurs de carbapénémases



0,06

0,12

0,25

0,5

1

2

4

8

16

32

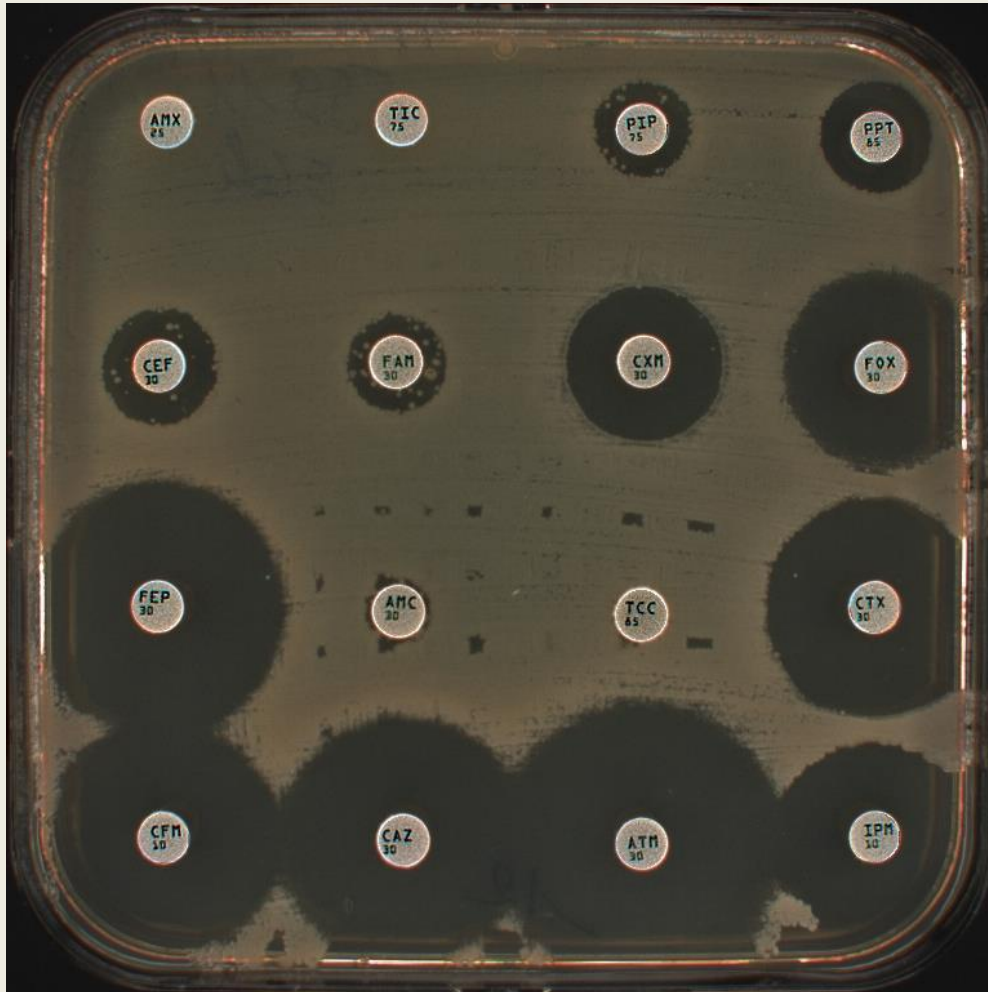
64

G. Arlet

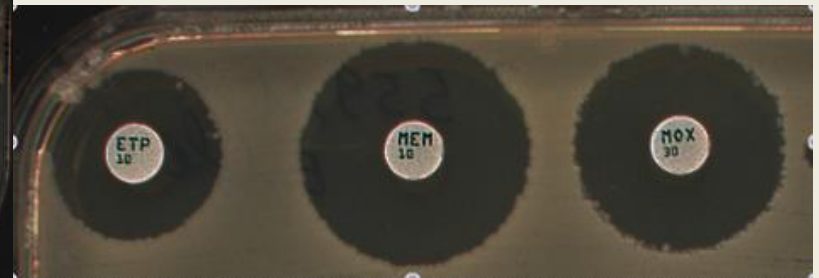
Activité des carbapénèmes et inhibiteurs

	TMC	C3G	ATM	MOX	EDT A	PBA	CLOXA	Ac Clav
KPC	I/R	I/R	I/R	I/R	-	+	-	+/-
MBL	R	R	S	R++	+	-	-	-
OXA	R++	S	S	S	-	-	-	+/-
BLSE + imp	I	I/R	I/R	S	-	-	-	+
AmpC + imp	I	I/R	I/R	I/R	-	+	+	-

E. coli OXA-48 seule



Interêt de
la témocilline

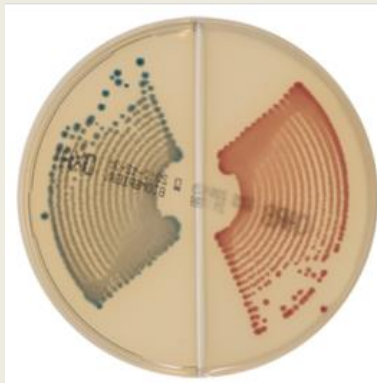


Les milieux sélectifs

	Sensibilité %	Spécificité %	Commentaires
ChromID ESBL	88-96	20-85	ESBL or not OXA-48 bof
ChromID Carba	91-92,4	89-97	++ OXA-48 sf si bas niveau
ChromAgar KPC	85	40 - 89	OXA-48 bof
Colorex KPC	56	47	
Brillance CRE	78	66	OXA-48 bof
SuperCarba	95,5	82,2	

ChromID OXA-48 et

ChromID CARBA Smart



Les systèmes automatisés en milieu liquide

Woodford et al. JCM, 2010, 48:2999-3002

Panel Testé : 55 EB R carbapénèmes

39 carbapénémases

8 KPC (7 KP, 1 E. cloacae)
11 OXA-48 (10 KP, 1 E. coli)
10 IMP (7 KP, 2 E. cloacae, 1 E. coli)
3 VIM (3 KP)
7 NDM-1 (3 E. coli, 2 CF, 1 E. cloacae, 1 KP)

16 non carbapénémases

9 KP BLSE + imperméabilité
6 E. cloacae ampC et imperméabilité
1 E. coli CTX-M-15 et imperméabilité

	39 Carbase +	16 non carbase	Sensibilité %	Spécificité %
Phoenix NMIC/id76	39	16	100	0
Microscan NM36	33	15	85	6
Microscan NBC39	32	13	82	19
Vitek2 AST-N054	29*	10	74	38

KPC et MBL : OK - OXA-48 : moyen

* 4IMP

Détection phénotypique des carbapénémases

le test de Hodge modifié



1. Détection spécifique
 - +++ KPC & OXA-48
 - + MBL

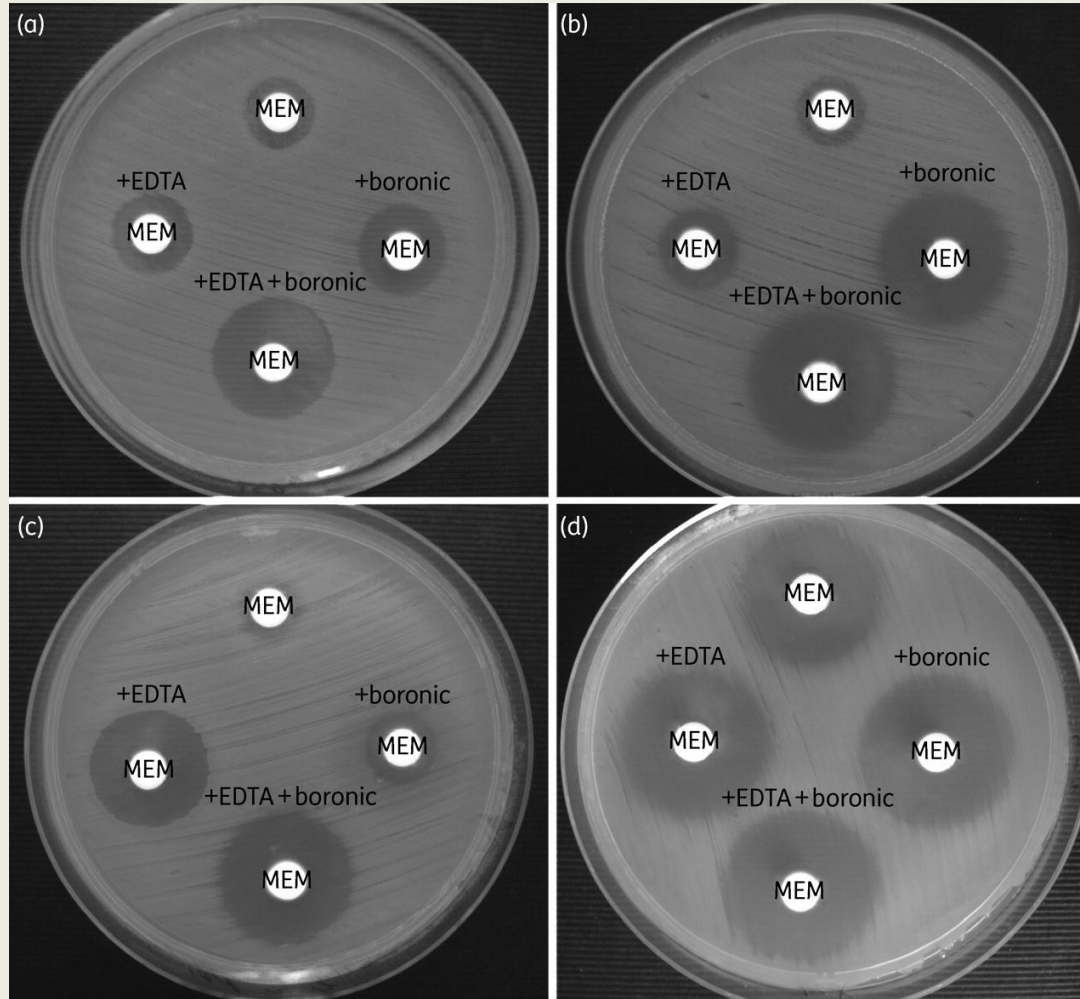
1. Faux positifs et douteux
 - ampC producteurs (X et plasmidiques)
 - CTX-M-15 imp avec erta

1. Faux négatifs et douteux
 - E. coli MBL (NDM-1 et VIM-4)
 - Sulfate de zinc +



Détection phénotypique disques combinés

KPC + VIM + BLSE



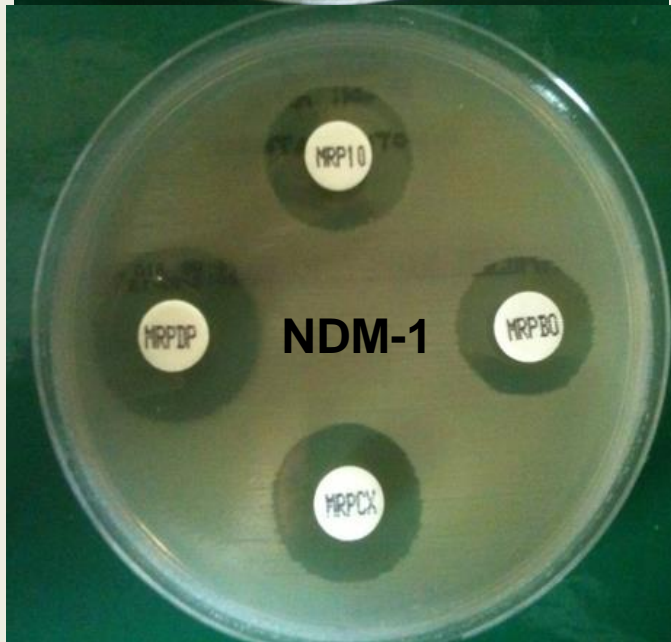
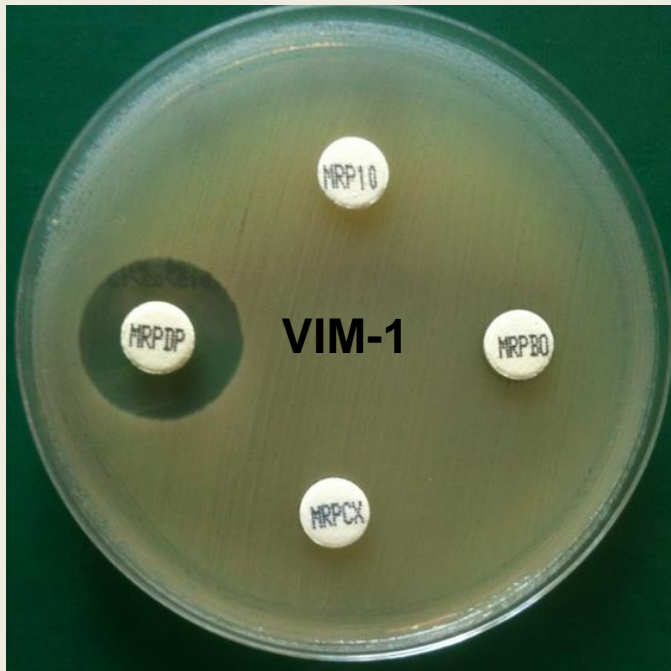
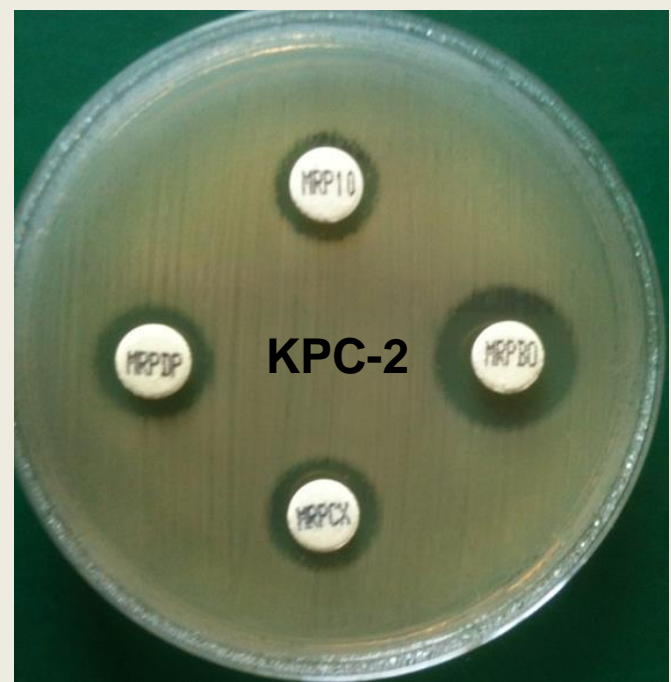
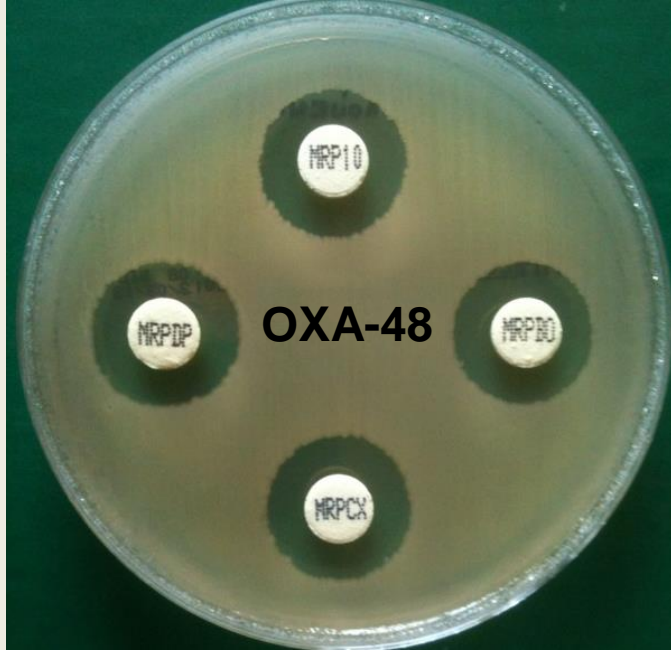
KPC + BLSE

VIM

AmpC + BLSE

Tsakris A et al. J. Antimicrob. Chemother. 2010;jac.dkq210


Journal of
Antimicrobial Chemotherapy




Détection phénotypique disques combinés

IPM 

TEM 

 + EDTA

MOX 

 + EDTA

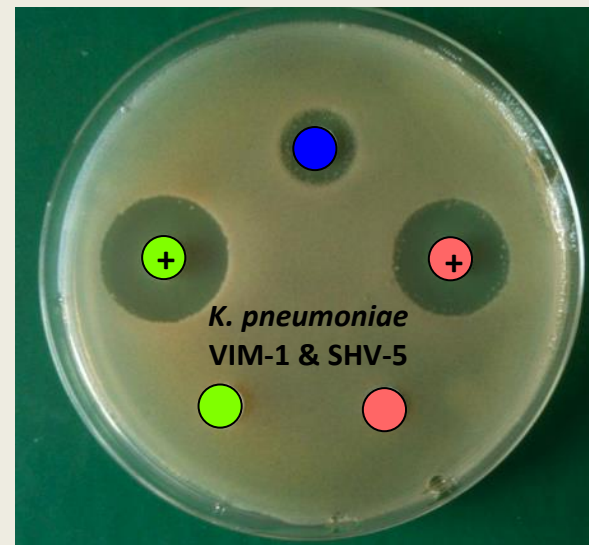
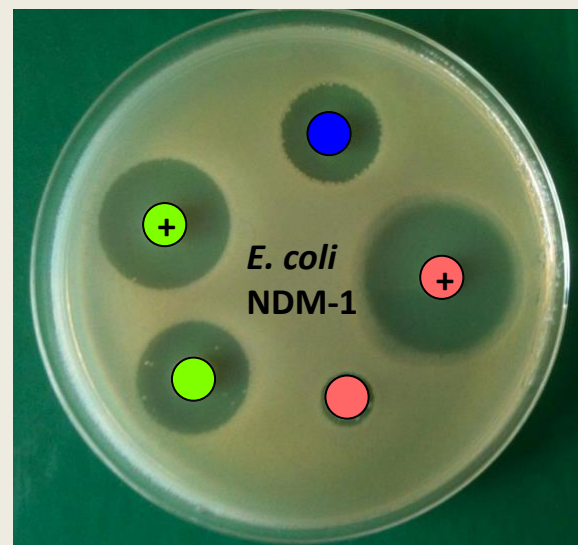
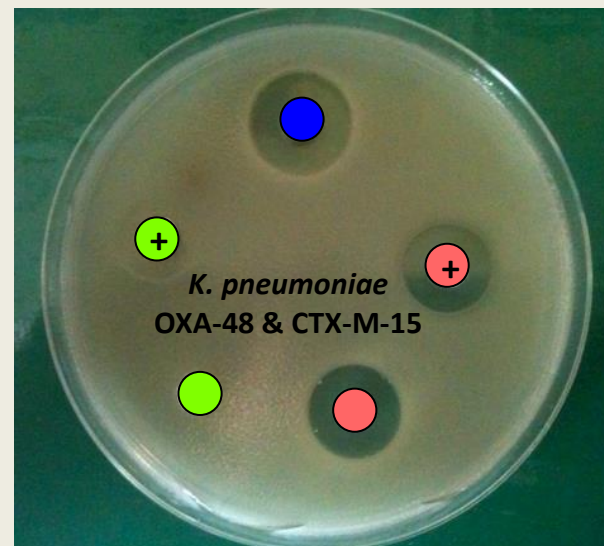
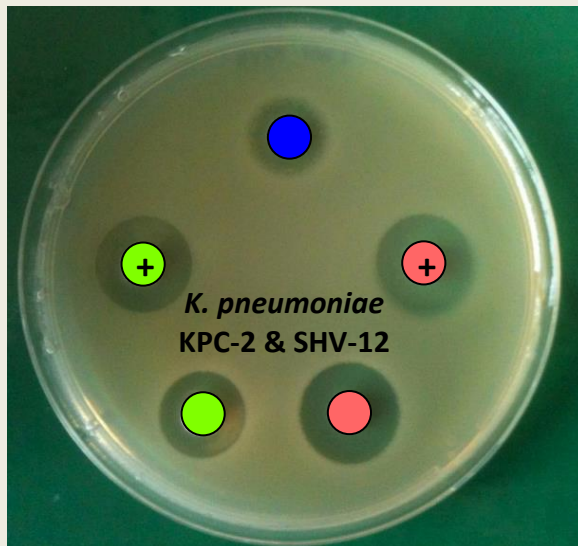
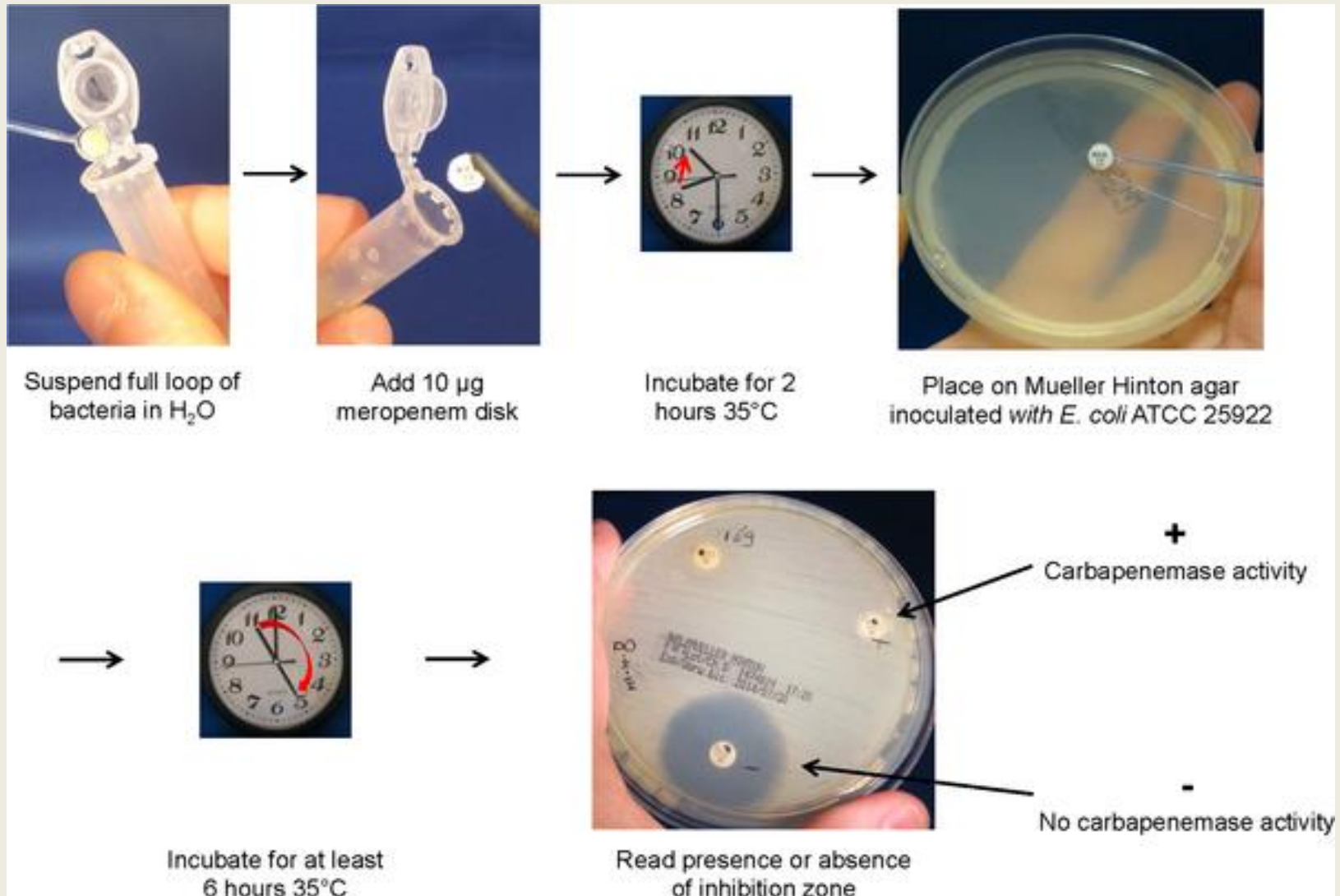
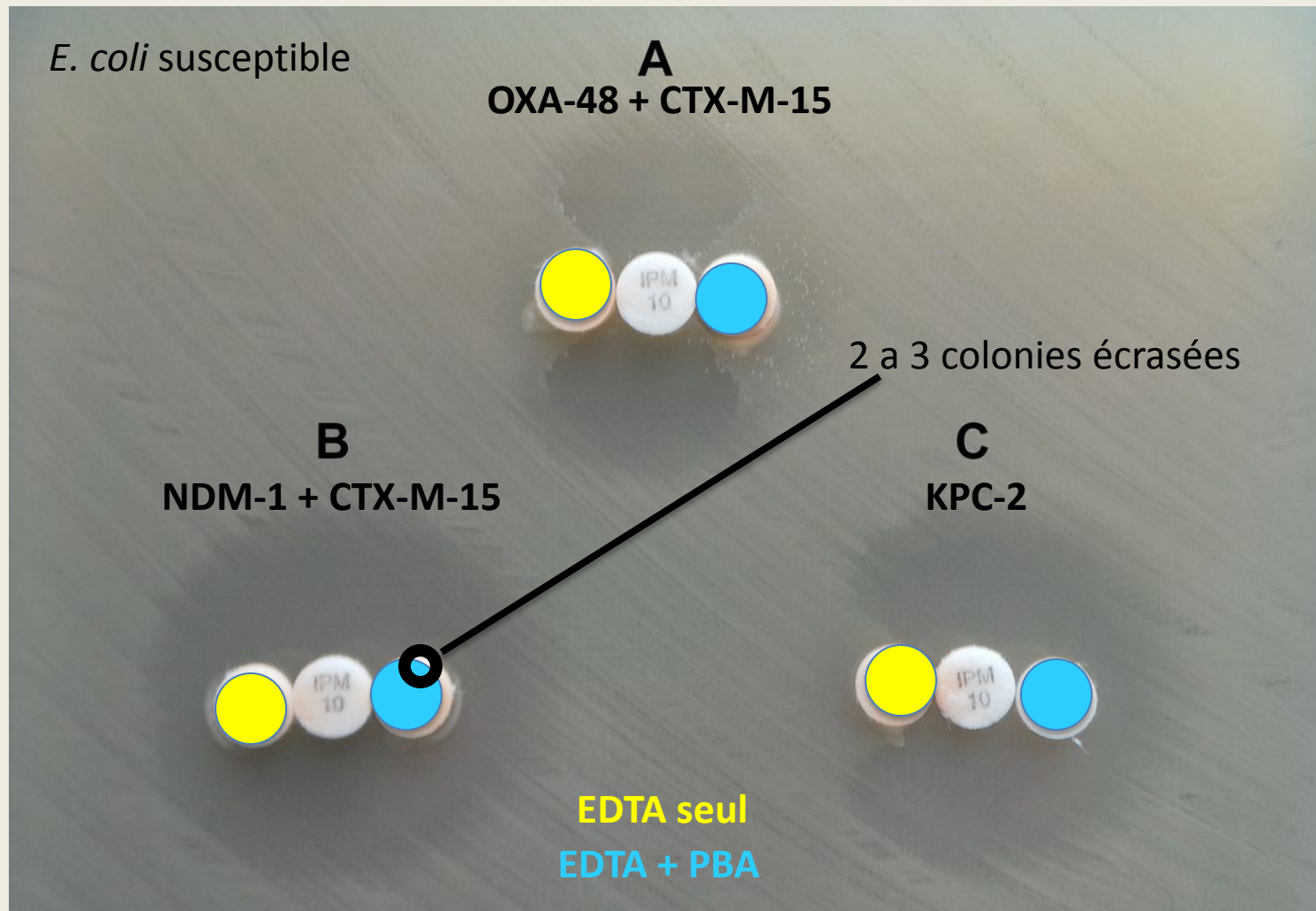


Fig 1. Schematic of the CIM.



van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, et al. (2015) The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a Simple and Low-Cost Alternative for the Carba NP Test to Assess Phenotypic Carbapenemase Activity in Gram-Negative Rods. PLoS ONE 10(3): e0123690. doi

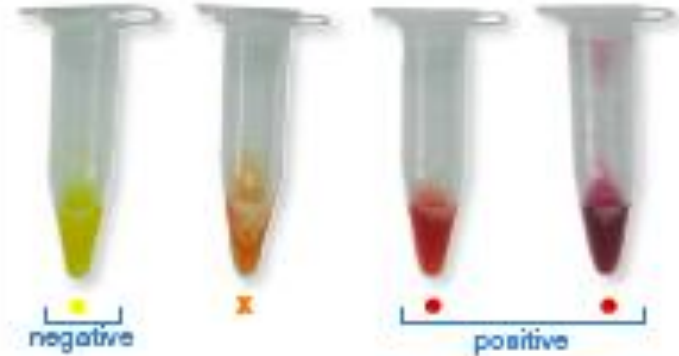
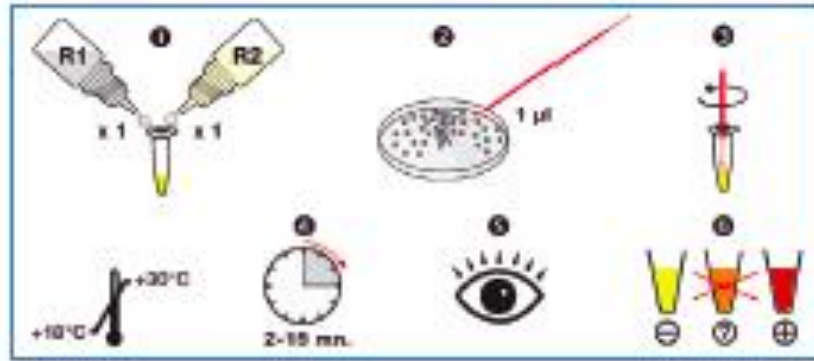
Results of the OXA-48 disk test using two blank disks adjacent to an imipenem disk containing EDTA (left blank disk) and EDTA plus PBA (right blank disk), respectively.



Athanassios Tsakris et al. J. Clin. Microbiol. 2015;53:1245-1251

Les méthodes chromogéniques

Le test beta-lacta[®] (Bio-Rad)



- No change in color → negative (●) - Change to red or purple → positive (●) - Change to orange → non-interpretable (x)

Test développé pour détecter la résistance aux C3G sur colonies
L'évaluation a montré que ce test fonctionne aussi avec les KPC et MBL.
Pour les OXA-48 isolées, les résultats sont positifs lent ou douteux.

Test très bon sur la détection directe des BLSE à partir des urines.

Les méthodes enzymatiques

Acidimétrie :

A partir de colonies dans un tampon de lyse (30') puis centrifugation.
30 μ l du surnageant testé avec le substrat avec ou sans inhibiteur
et un indicateur de pH.

Lecture en 2 heures à 37°C

Sensibilité 100% et spécificité 100%

Dortet L. et al. AAC 2012 doi:10.1128/01395-12

Spectrophotométrie :

Culot de 1,5 ml de TCS O/N repris dans 0,5 ml PBS, soniqué et centrifugé.

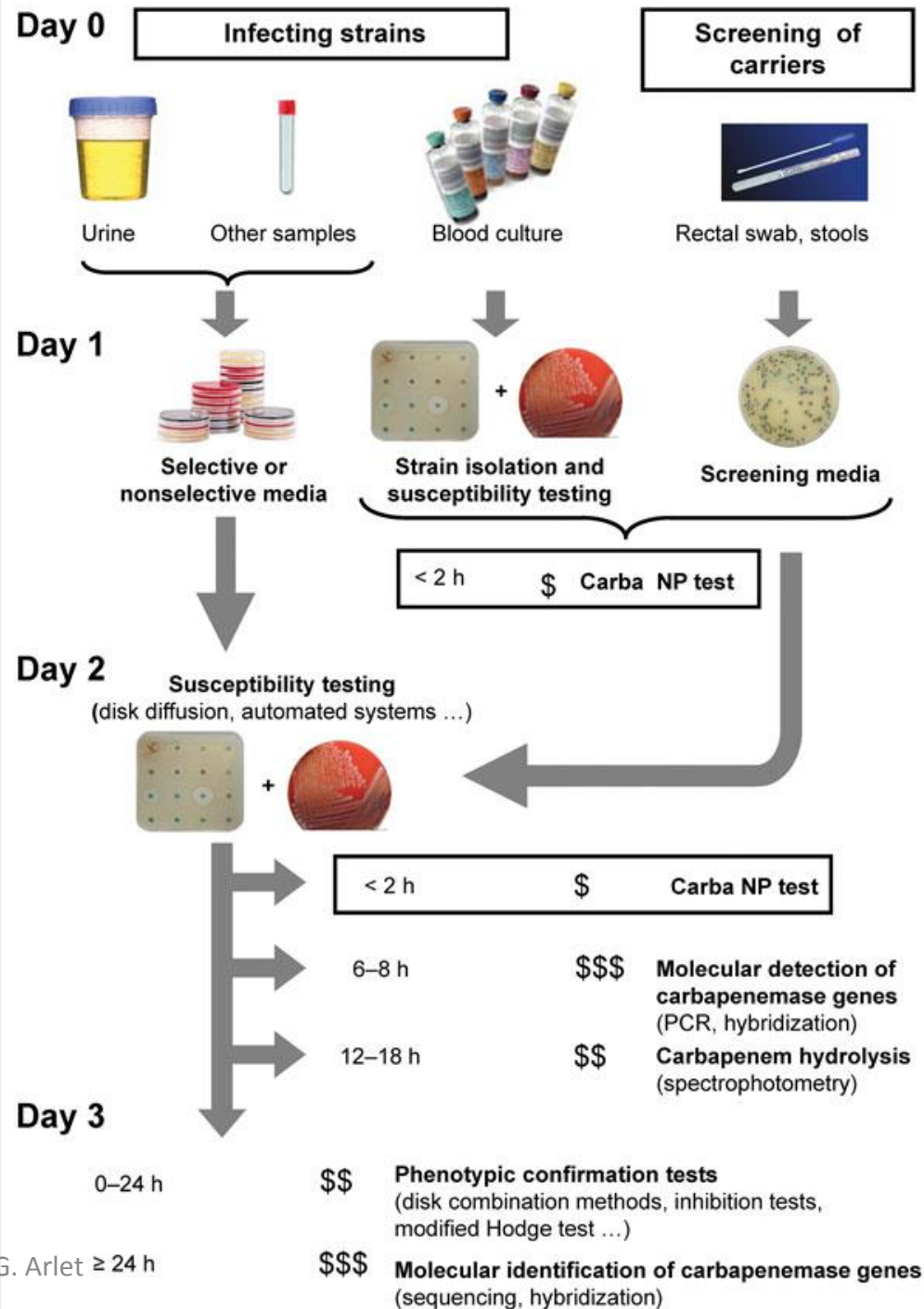
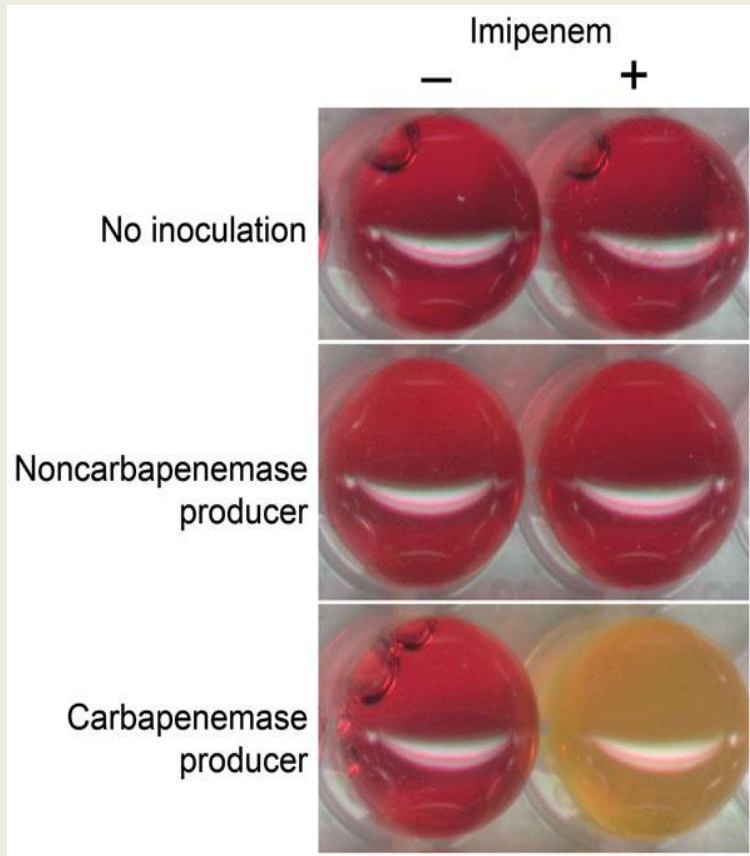
Le surnageant est testé avec imipénème avec un spectrophotomètre.

Lecture en 10 minutes

Sensibilité 100% et spécificité 95% (E. cloacae hyperproducteur)

Bernabeu S. et al. DMID 2012, 74:88-90

Carba NP Test

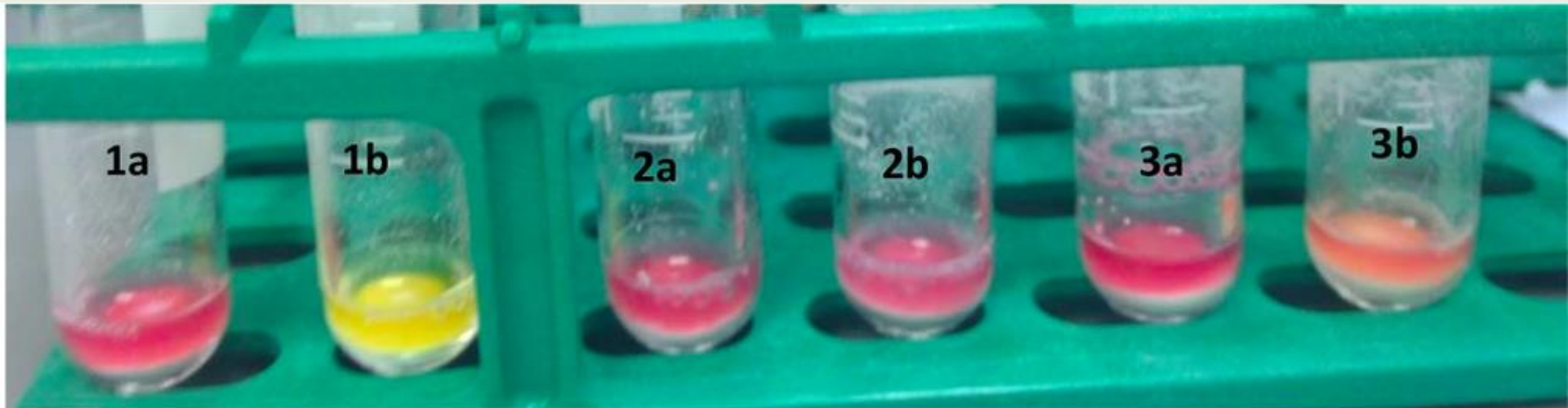


G. Arlet ≥ 24 h

Rapid CARB Screen 98021

Rosco Diagnostica

1. Suspension McFarland 4 dans 100 μ l de lysis Buffer (B-PER II; Bacterial Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific)
2. Mélanger et incuber 30 minutes à T ambiante
3. Prendre 50 μ l et ajouter à 100 μ l d'une solution saline et ajouter une tablette imipenem plus indicateur
4. réincuber à 35°C entre 30 minutes et 2 heures



Carba NP Test VS Rapid Carba Sreen Test

TABLE 3 Carba NP test and Rapid CARB screen kit results for *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates referred to the Belgian national reference center ($n = 356$)

Group	Test ^a	Test result	No. of isolates with indicated carbapenemase:							Total no. of isolates
			OXA-48	NDM	KPC	VIM	IMP	OXA-198	Negative	
<i>Enterobacteriaceae</i>	CNP	Positive	56 (6) ^b	5 (3)	4	4				69
		Negative	3						63	66
	RCS	Uninterpretable	6	2		1			7	16
		Positive	51 (11)	3 (1)	4	3			14 (11)	75
		Negative	2						42	44
Total <i>Enterobacteriaceae</i>		59 ^c	5 ^d	4 ^e	4 ^f			63 ^g	135	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CNP	Positive				51 (1)	1 (1)			52
		Negative						3	166	169
	RCS	Uninterpretable				8			9	17
		Positive				43 (1)	1		69 (67)	113
		Negative						3	88	91
Total <i>P. aeruginosa</i>					51	1	3	166	221	

^a CNP, Carba NP test; RCS, Rapid CARB screen kit.

^b The number of weak-positive results is in parentheses for all positive results.

^c Includes 42 *K. pneumoniae*, 10 *E. coli*, 3 *K. oxytoca*, 2 *E. cloacae*, 1 *Enterobacter asburiae*, and 1 *E. kobei* isolates.

^d Includes 2 *E. cloacae*, 1 *K. pneumoniae*, 1 *E. coli*, and 1 *C. freundii* isolates.

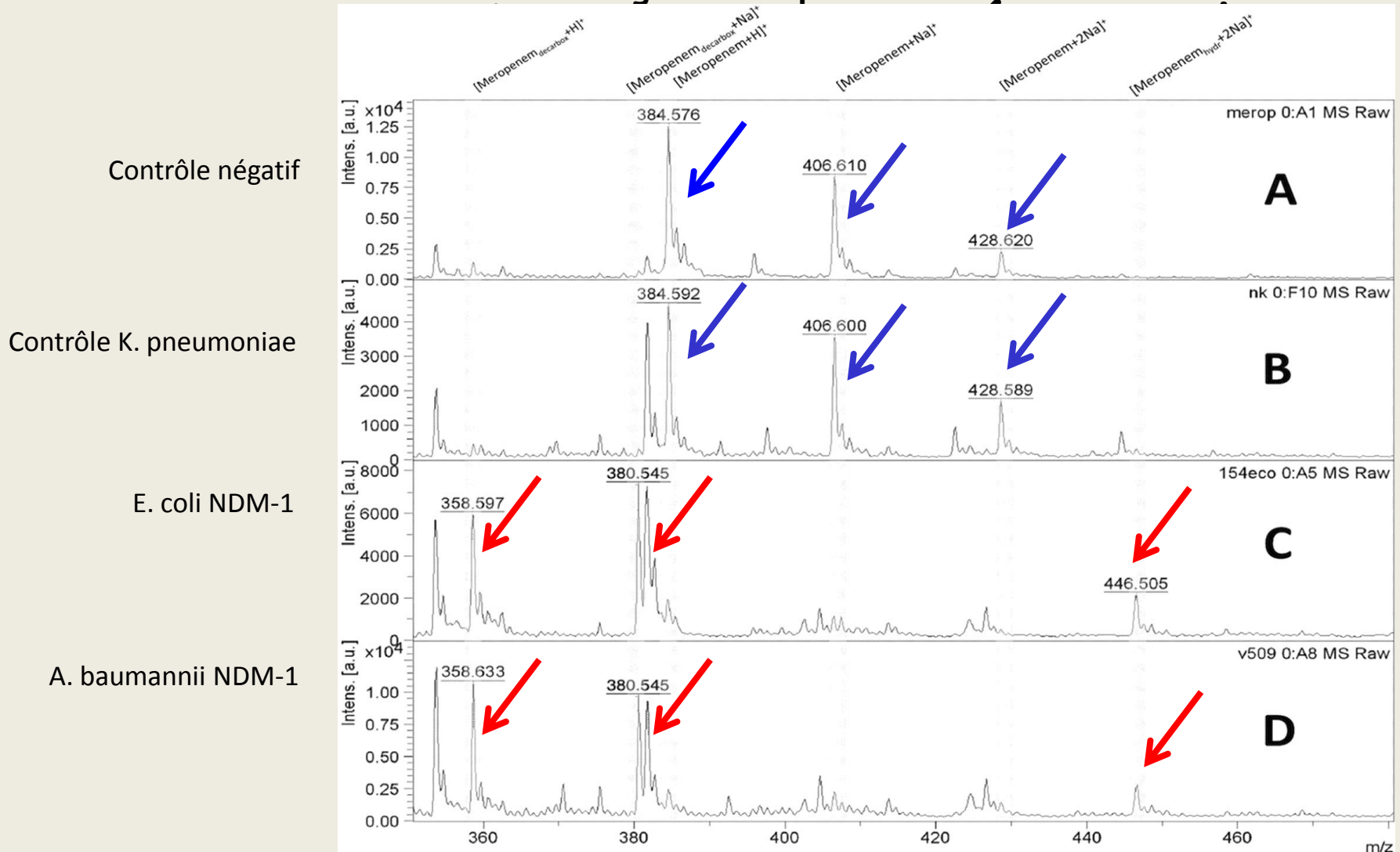
^e Includes 3 *K. pneumoniae* and 1 *E. cloacae* isolates.

^f Includes 2 *E. cloacae*, 1 *K. pneumoniae*, and 1 *C. freundii* isolates.

^g Includes 24 *K. pneumoniae*, 10 *E. coli*, 10 *E. cloacae*, 8 *E. aerogenes*, 4 *K. oxytoca*, 2 *E. asburiae*, 2 *E. kobei*, 1 *C. freundii*, 1 *S. marcescens*, and 1 *P. mirabilis* isolates.

1. Meilleure spécificité pour Carba NP test
2. Problèmes de lecture ininterprétable avec le RCS

MALDI-TOF MS spectrum showing meropenem, sodium salts of meropenem, and degradation products.



Culot 1ml Mc Farland 3 incubé 2h 35°C

Hrabák J et al. J. Clin. Microbiol. 2012;50:2441-2443

Journal of Clinical Microbiology

Les techniques moléculaires

1. PCR maisons, multiplex ou non
1. PCR temps réel maisons
Taqman, Light Cycler
3. PCR temps réel commerciales
 - ✓ MBL : hyplex[®]-MBL ID Multiplex PCR-Elisa (VIM, IMP)
échantillons cliniques sensibilité 98%, spécificité 98,6%
Long et fastidieux
 - ✓ New NucliSENS EasyQ KPC test : Sensibilité 100% sur isolats
4. PCR temps réel sur selles inoculées : 4 heures
Naas T sur NDM-1 et OXA-48
NDM : détection de 10 à 30 CFU pour 100 mg de selles
OXA-48 : détection de 10 à 50 CFU pour 100 mg de selles

GeneXpert® système « clé en main »

- Manipulation 2 minutes
- Extraction, purification et amplification
- Détection en temps réel 48 minutes à partir d'un écouvillon rectal
- Fonctionne aussi sur les colonies

-Xpert Carba-R

- VIM
- IMP
- KPC
- NDM
- OXA-48



Verigene[®] système « clé en main »

5 minutes

2h à 2h30 (Gram +)



Bloodstream Infection Tests

Gram-Positive Blood Culture

Gram-Negative Blood Culture

Yeast Blood Culture

Gastrointestinal Infection Tests

Clostridium difficile

Enteric Pathogens

Respiratory Infection Tests

Respiratory Virus Plus

Respiratory Pathogens Flex

S. aureus
S. epidermidis
S. lugdunensis
S. pneumoniae
Strepto A
Strepto B
S. anginosus
E. faecalis
E. faecium

Meti R
VanA
VanB

E. coli
K. pneumoniae
K. oxytoca
S. marcescens
P. aeruginosa
Acinetobacter ssp
Citrobacter ssp
Enterobacter ssp
Proteus ssp

CTX-M
VIM
OXA-48
KPC
NDM
IMP

Campylobacter group
Shigella ssp
Salmonella ssp
Yersinia ssp
Vibrio group

Shiga toxin 1
Shiga toxin 2

Norovirus
rotavirus

C. difficile

Quand et comment utiliser ces tests

	Tests enzymatiques	Tests moléculaires	MS-Tof	Milieux selectifs	Hodge Test	Tests phénotypiques
prélèvements	+/-	+	ND	+	-	-
selles	-	++	-	++	-	-
Colonies	++	++	++		++	+
ATB	++	++	++		++	+
délai	≤ 3 h	≤ 2 h	≤ 4 h	24 h	24-48 h	24-48h

Remerciements

Société Tunisienne de Pathologie Infectieuse



Adnene Hammami
Rim Abdelmalek