



FÉDÉRATION ALGÉRIENNE DE PHARMACIE

Disponible en ligne sur

ASJP
 Algerian Scientific Journal Platform

<https://www.asjp.cerist.dz/en/PresentationRevue/436>


ARTICLE ORIGINAL

Étude de la sensibilité à la colistine chez *Klebsiella pneumoniae* à l'EHS Salim Zemirli

Study of colistin sensitivity in *Klebsiella pneumoniae* at Salim Zemirli hospital

B Atmani^{a,*}, M Hamidi^a.

^a Laboratoire de microbiologie établissement hospitalier spécialisé Salim zemirli El Harrach, Alger.

MOTS CLÉS

Klebsiella pneumoniae,
Résistance aux
antibiotiques,
Colistine,
Prévalence.

Résumé

Introduction : *Klebsiella pneumoniae* est une souche bactérienne responsable d'infections communautaires et nosocomiales. Elle présente un taux élevé de résistance aux antibiotiques, ce qui en fait un agent pathogène cliniquement pertinent et potentiellement problématique pour la santé publique.

Méthodes : Dans cette étude, nous avons étudié la sensibilité de *Klebsiella pneumoniae* à la colistine, un antibiotique appartenant à la famille des polymyxines, en utilisant deux techniques de screening : la Colistine Agar Spot Screening Test (CAST) et la Colistine Microbroth Disk Elution (CMBDE). Une confirmation de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la colistine a été réalisée par la technique de microdilution avec du milieu Mueller-Hinton liquide ajusté en cations.

Résultats : Notre étude a permis de calculer une prévalence de la résistance à la colistine chez *Klebsiella pneumoniae* à partir d'une collection constituée au cours des dernières années (2014-2021). Nous avons obtenu une prévalence de 1,5% (2 souches sur 132) de *Klebsiella pneumoniae* résistantes à la colistine, confirmées par la technique de microdilution.

Conclusion : La colistine est un antibiotique important pour le traitement des infections causées par les souches de *Klebsiella pneumoniae* multirésistantes. Il est donc crucial d'avoir des tests fiables, rapides et reproductibles pour évaluer la sensibilité de *Klebsiella pneumoniae* à cet antibiotique.

© 2023 Fédération Algérienne de Pharmacie. Tous droits réservés.

KEYWORDS

Klebsiella pneumoniae,
Antibiotic resistance,
Colistin,
Prevalence.

Abstract

Introduction : *Klebsiella pneumoniae* is a bacterial strain responsible for community-acquired and nosocomial infections. It has a high rate of antibiotic resistance, making it a clinically relevant and potentially problematic pathogen for public health.

Methods : In this study, we investigated the sensitivity of *Klebsiella pneumoniae* to colistin, an antibiotic belonging to the polymyxin family, using two screening techniques: the Colistin Agar Spot Screening Test (CAST) and the Colistin Microbroth Disk Elution (CMBDE). Confirmation of the minimum inhibitory concentration (MIC) of colistin was performed

using the microdilution technique with Mueller-Hinton liquid medium adjusted for cations.

Results : Our study allowed us to calculate the prevalence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from a collection gathered in recent years (2014-2021). We obtained a prevalence of 1.5% (2 strains out of 132) of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae*, confirmed by the microdilution technique.

Conclusion : Colistin is an important antibiotic for treating infections caused by multi-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae*. Therefore, it is crucial to have reliable, fast, and reproducible tests to evaluate the sensitivity of *Klebsiella pneumoniae* to this antibiotic.

© 2023 Fédération Algérienne de Pharmacie. All rights reserved.

* Auteur correspondant :

Adresse e-mail : atm.billel@gmail.com (B. A)

Introduction :

La résistance croissante aux antibiotiques est une urgence mondiale au point que l'OMS a publié une liste de bactéries pour lesquelles il est urgent de développer de nouveaux traitements, notamment *Klebsiella pneumoniae* (K.p)[1].

La K.p est une espèce de bactérie opportuniste responsable d'infections nosocomiales et communautaires, et est la cause la plus fréquente de pneumonie nosocomiale aux États-Unis [2]. Selon le 19^{ème} Rapport d'évaluation de l'AARN (Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance aux Antibiotiques) publié en 2018, *K. pneumoniae* est classée première parmi les souches résistantes aux bêta-lactamines [3]. Les souches résistantes aux antibiotiques ont conduit les cliniciens à réintroduire les polymyxines, une ancienne classe d'antibiotiques abandonnée en raison de leur toxicité [4]. La colistine est actuellement l'alternative principale pour le traitement des infections à *K. pneumoniae* multirésistante, nécessitant des tests fiables et rapides pour déterminer la sensibilité des bactéries à cette dernière. Le test de diffusion sur disque de colistine (technique de routine) est peu fiable en raison de ses interactions électrostatiques avec les groupes acides ou sulfates du milieu Muller Hinton, entraînant des zones d'inhibition plus petites [5]. Les recommandations de l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) sont l'utilisation de la méthode de dilution en milieu liquide pour la détermination des CMI, mais cette méthode est longue et fastidieuse pour la microbiologie clinique. Les bandelettes Etest® et le système automatisé Vitek® 2 sont également considérés comme peu fiables pour la détermination de la CMI de la colistine [6-10].

Notre objectif est d'étudier la sensibilité des souches de *K. pneumoniae* à la colistine en utilisant deux techniques de screening, la CAST (Colistin agar spot screening test) et la CMBDE (Colistin

microbroth disk elution), ainsi qu'une technique de confirmation, la microdilution en plaque.

Matériel et méthodes

L'étude est rétrospective et monocentrique, basée sur une collection de *K. pneumoniae* conservées entre 2014 et 2021, ainsi que sur quelques souches de l'année en cours, ce qui la rend partiellement prospective. Elle a été menée à l'unité de microbiologie du laboratoire central de l'EHS Salim Zemirli sur une période allant de novembre 2021 jusqu'à mai 2022.

Les critères d'inclusion de l'étude étaient la présence d'une culture positive à *Klebsiella pneumoniae* dans tout type de prélèvement biologique conservé, indépendamment du profil de résistance aux antibiotiques. Les critères de non-inclusion comprenaient les souches redondantes chez un même patient, les souches isolées de prélèvements biologiques adressés à d'autres hôpitaux d'Alger et les souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées à partir d'enquêtes d'investigations épidémiologiques. Seule la première souche isolée à partir du prélèvement le plus invasif était considérée pour l'étude.

nous avons utilisé deux souches de contrôle de qualité : *Escherichia Coli* NCTC 13846 résistante à la colistine (mcr-1 positif) et *Escherichia Coli* ATCC 25922 sensible à la colistine [11].

1. Détermination de la CMI en milieu solide par dilution en gélose (Colistin Agar-Spot Screening Test = CAST) :

On a utilisé une modification de la méthode CAST proposée par l'INEI (Service de Bactériologie de l'Institut National des Maladies Infectieuses) en Argentine, avec une boîte de pétri à concentration unique en colistine. Une concentration de 3,0 µg/ml a été choisie pour distinguer les sous-populations de type sauvage et non-sauvage [12]. Une solution mère de colistine à 60µg/ml a été préparée à partir de la colistine sulfate en poudre. Ensuite, 1ml de la solution mère a été ajouté à 19ml

de gélose Müller Hinton liquéfiée dans une boîte de pétri pour avoir une concentration finale de 3 µg/ml. L'inoculum bactérien a été préparé à 0.5 McFarland dans de l'eau physiologique sans le diluer. Des spots de 5 µl ont été déposés dans les 15 minutes suivant la préparation de l'inoculum et les boîtes ont été laissées à température ambiante, couvercle vers le haut jusqu'au séchage des spots puis incubées à 35°C pendant 18-20 heures [13-17]. La souche était considérée comme sensible (S) si ≤ 1 colonie et résistante (R) si > 1 colonie.

2. Détermination de la CMI en milieu liquide par la technique de microdilution en tube (Colistin Micro Broth Disk Elution test = CMBDE) :

Une adaptation de la méthode CMBDE de l'INEI aussi a été utilisée. La gamme de dilution de l'antibiotique a été préparée en mettant des disques de colistine à 10 µg dans 4 tubes contenant chacun 10 ml du bouillon Mueller-Hinton liquide. Les concentrations croissantes de colistine obtenues étaient de 0, 1, 2 et 4 µg/ml. Après agitation et une attente de 30 à 60 minutes, les disques ont été retirés et chaque dilution a été répartie sur 10 tubes en verre avec bouchon, avec 1 ml de chaque dilution par tube. Les tubes ont ensuite été stockés à -20°C ou utilisés immédiatement. L'inoculum bactérien a été préparé à 0.5 McFarland dans de l'eau physiologique. Les contrôles et les 3 tubes à 1, 2, 4 µg/ml ont été ensemencés avec une micropipette à 5 µl et incubés à 35°C pendant 18-20 h. La CMI correspondait à la concentration du premier tube clair et la souche était considérée comme sensible à la colistine si la concentration était inférieure ou égale à 2 µg/ml et résistante si elle était supérieure ou égale à 4 µg/ml [14, 18-20]

3. Détermination de la CMI en milieu liquide par la technique de Microdilution en plaque :

La méthode de référence recommandée par les sociétés savantes (EUCAST et CLSI (The Clinical & Laboratory Standards Institute)) pour évaluer la sensibilité des bactéries aux polymyxines était la méthode de dilution en milieu liquide (macro- ou microdilution) [21]. Une série de cupules sur une microplaque en polystyrène à fond rond a été ensemencée avec 10^5 UFC/ml de la bactérie à étudier en bouillon Mueller-Hinton ajusté en cations (MHLAC). Ensuite, des quantités décroissantes d'antibiotiques ont été ajoutées pour réaliser une gamme de concentration. Une cupule de croissance témoin (sans antibiotique) a été conservée pour chaque souche à tester. Des souches bactériennes pures fraîchement isolées et des souches de référence (*E. coli* ATCC 25922 et *E. coli* NCTC 13846 (mcr-1)) ont été utilisées comme échantillons. La poudre de colistine sulfate a été utilisée en tant que réactif pour préparer la gamme

de dilution de l'antibiotique en utilisant de l'eau distillée stérile comme solvant. L'inoculum a été préparé en réalisant une suspension bactérienne à 0,5 MF.

La CMI de chaque souche testée était donnée par la plus faible concentration de colistine inhibant toute culture visible de la croissance bactérienne. Avant d'interpréter les résultats, un contrôle visuel des cupules de croissance témoin (sans antibiotiques) et des CMI des souches de références a été effectué. Si l'une des deux conditions n'était pas respectée, la manipulation ne serait pas validée et devrait être refaite.

Résultats

Lors de l'initiation de ce travail, une collection de souches de *Klebsiella pneumoniae* conservées à partir des différents prélèvements biologiques adressés au laboratoire de microbiologie médicale de l'EHS Salim Zemirli a été régénérées, et après exclusion de certaines souches qui ne répondaient pas aux critères d'inclusion, l'effectif final retenu est de 132 souches éligibles. **Les caractéristiques clinico-épidémiologiques** des patients infectés par *K. pneumoniae* ont été étudiées, montrant une moyenne d'âge de 41,79 ans avec des extrêmes allant de 6 jours à 93 ans et une prédominance masculine (sex-ratio = 1.16).

La répartition des prélèvements selon les services d'hospitalisation montre que certains services, tels que la neurochirurgie, la réanimation et le service des externes, présentent un plus grand nombre d'effectif que d'autres services (Figure 1).

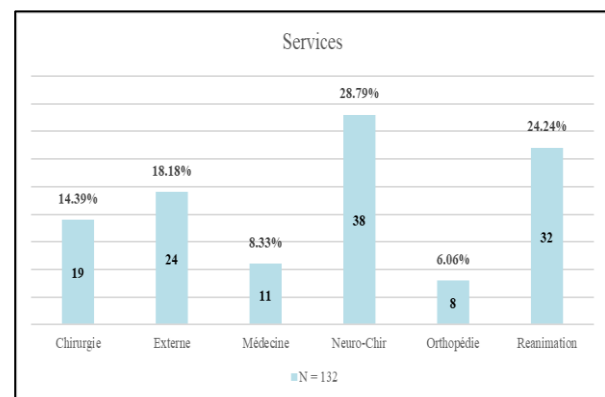


Figure 1. Distribution des prélèvements selon leur service d'hospitalisation.

La répartition des souches de *Klebsiella pneumoniae* selon le type de prélèvement montre une grande variabilité. Les prélèvements les plus fréquents étaient l'urine, l'hémoculture et le liquide céphalorachidien (Figure 2).

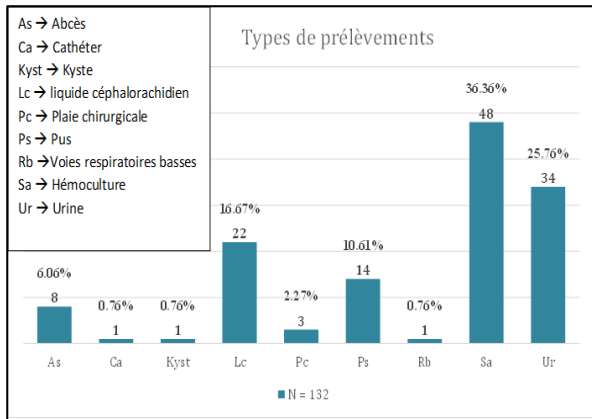


Figure 2. Répartition des souches isolées selon le type de prélèvement.

Une autre partie de l'étude concerne la répartition des prélèvements selon le profil de résistance. Les souches analysées ont montré différents profils de résistance, présentés dans la figure 3 (Figure 3).

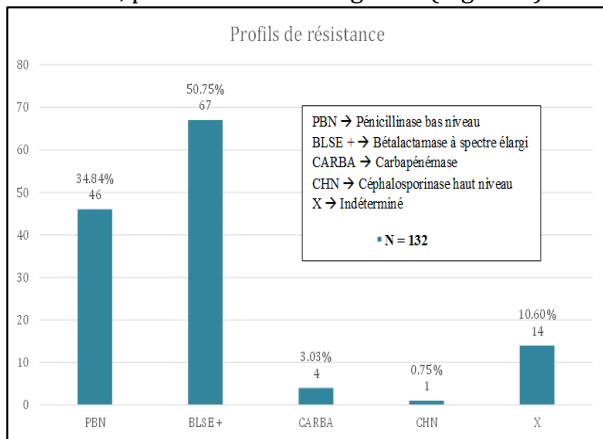


Figure 3. Distribution des profils de résistances de notre collection.

Pour les résultats de chaque méthode :

1. Dilution en gélose (Colistin Agar Spot Screening Test = CAST) « Technique de screening » : Sur les 132 souches dépistées par cette méthode, 50% étaient sensibles à la Cs et 50% résistantes.

Les effectifs et les pourcentages des résultats obtenus avec cette technique sont illustrés dans la figure suivante (Figure 4) :

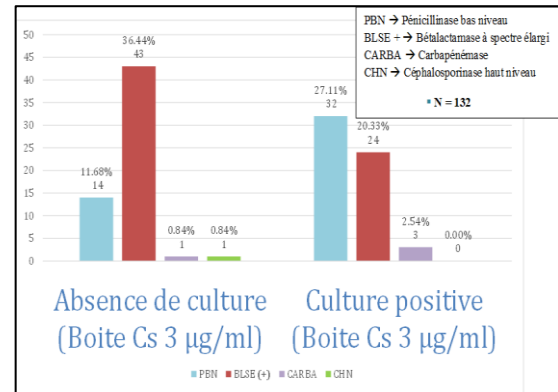


Figure 4. Comparaison des profils de résistance des résultats obtenus pour la technique « CAST ».

2. Microdilution en tube (Colistin Microbroth Disk Elution = CMBDE) « Technique de screening » : Sur 66 souches testées R par la CAST, seulement 02 ont donné un résultat positif (Résistant) avec cette technique (Figure 5)

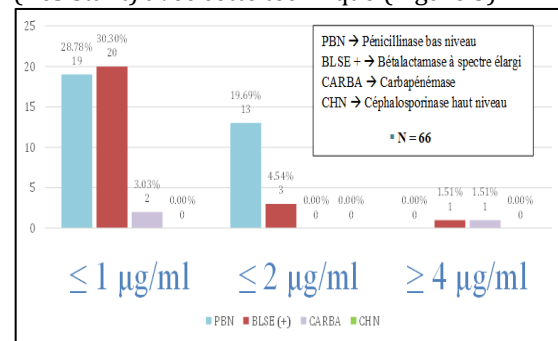


Figure 5. Comparaison des profils de résistance des résultats obtenus pour la technique CMBDE.

3. Microdilution en plaque « Méthode de confirmation » : 02 souches ont été testées à 2 reprises. Les résultats obtenus par cette technique de référence sont exposés dans le tableau suivant (Tableau 1) :

Tableau 1. Résultats de la microdilution en plaque et calcul de la prévalence

Microdilution en plaque	Prévalence
8µg/ml	1 (0.75%)
64µg/ml	1 (0.75%)
Total	2 (1.5%)

$\frac{2}{132} \cdot 100 = 1.5\%$

Des exemples des résultats sont présentés dans les figures suivantes (Figure 6-8) visant à fournir une visualisation des techniques utilisées :

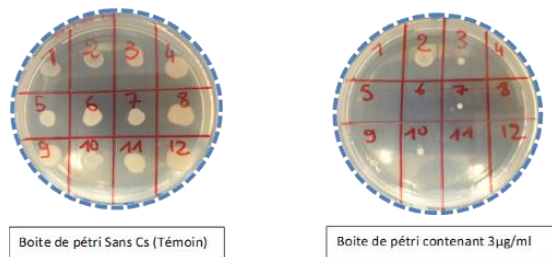


Figure 6. Exemples de souches résistantes à la colistine (2) et sensibles à la colistine (3,4,5,6,7,8,9,10,11,12) par le CAST sur gélose avec une concentration de 3µg/L de colistine.

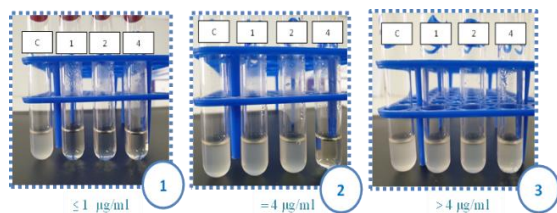


Figure 7. Exemples de souches sensibles à la colistine (1) et résistantes à la colistine (2,3) par le CMBDE

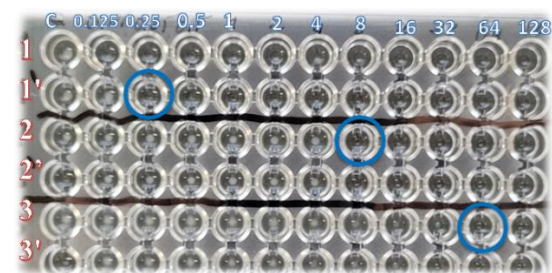


Figure 8. Exemple du résultat de la microdilution en plaque

Le diagramme ci-dessous synthétise les différentes techniques utilisées pour mener cette recherche, ainsi que les résultats obtenus à chaque étape (Figure 9) :

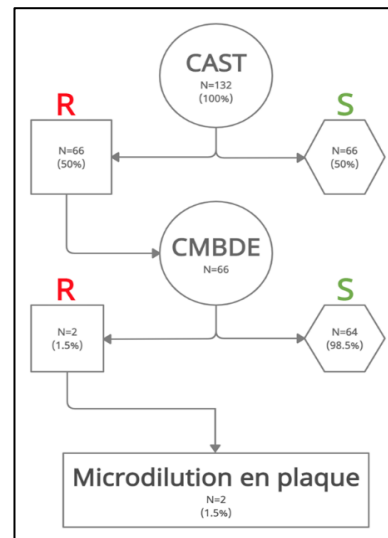


Figure 9. Schéma représentant les résultats obtenus afin déterminer le profil de résistance à la Colistine

Discussion

Cette étude vise à améliorer les connaissances sur la résistance à la colistine chez *Klebsiella pneumoniae*. L'EHS Salim Zemirli a été un bon choix pour mener cette étude car cette bactérie y a été souvent isolée, ce qui a permis de constituer une collection de souches de *K. pneumoniae*.

-Cette étude a permis de calculer la prévalence de la résistance à la colistine chez *K. pneumoniae*, 1,5% des isolats sont résistants, Ce taux est très faible comparé à une étude menée en Italie où la prévalence était à 73% [22]. Ceci peut s'expliquer par les résultats d'une étude rétrospective (de janvier 2010 à juin 2014) qui a rapporté une multiplication par trois du taux de résistance à la colistine chez les *K. pneumoniae* dans des isolats sanguins en Italie [23].

-Des études de surveillance et des rapports de cas cliniques ont signalé la présence de cette résistance à travers le monde : en Tunisie, sur 220 isolats de *K. pneumoniae*, 29 étaient résistants aux carbapénèmes et parmi eux, 7 (soit 24,1%) étaient également résistants à la colistine [24]. En Inde, sur 533 souches de *K. pneumoniae*, 30 (soit 5,6%) étaient résistants à la colistine. En Taïwan, un taux de résistance de 17% à la colistine a été signalé parmi les *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes [25]. En Europe, la résistance moyenne à la colistine pour *K. pneumoniae* était d'environ 8-9% en 2015, mais cet antibiotique n'était testé de manière systématique que dans un nombre limité de pays [26]. En Turquie, les taux de résistance à la colistine étaient faibles en 2013 (entre 0 et 6%), mais ont considérablement augmenté en 2016 pour atteindre 27,5% [27].

-Cela dit, les taux de résistance à la colistine peuvent varier selon les méthodes de test et les normes établies par les comités et les sociétés

savantes. Les résultats des études précédentes suggèrent que la résistance à la colistine est liée à la résistance aux carbapénèmes, dans notre étude, parmi les quatre souches productrices de carbapénèmases analysées, une seule était résistante à la colistine. Bien que notre échantillon soit petit pour calculer un pourcentage, nous pouvons nous baser sur les études menées en Tunisie et à Taiwan, qui ont montré des taux de résistance de 24,1 % et 17 % respectivement.

- La technique de dilution en gélose (CAST) est considérée comme simple et peu coûteuse, adaptée aux pays à revenu faible ou intermédiaire. Elle permet d'obtenir cinq boîtes de pétris avec 1 ml d'un tube de 10 ml à 60 µg/ml de colistine et peut stocker les boîtes entre 2-8°C jusqu'à 3 mois. Cependant, elle présente des inconvénients tels que le coût et la disponibilité de la poudre de colistine sulfate. Les résultats de cette méthode sont moins fiables que la technique de Microdilution en tube (CMBDE), seulement 0,75% étaient vraiment résistantes. La CAT manque donc de sensibilité par rapport à la CMBDE, probablement en raison de la diffusion difficile de la colistine en MH solide.

-Pour ce qui est de la CMBDE qui est très pratique pour les laboratoires cliniques, car elle utilise des outils facilement disponibles et abordables, ses avantages incluent la possibilité de tester jusqu'à 10 souches avec 10 ml de chaque concentration, la disponibilité des disques de Colistine (10 µg) et la possibilité de stocker les tubes à -20°C jusqu'à 6 mois. Cependant, la CMBDE présente des inconvénients tels que le coût et la disponibilité du milieu MH liquide ajusté en cations et la contamination possible du milieu liquide.

-La technique de microdilution en plaque reste la méthode de référence validée par l'EUCAST, Cependant, la nature amphiphilique de la colistine peut rendre les résultats moins fiables en adhérant à une large gamme de matériaux en laboratoire. Néanmoins elle reste le GOLD STANDARD actuellement vis-à-vis des autres techniques, bien que des tests rapides de détection de la résistance à la colistine soient nécessaires pour permettre aux cliniciens d'adapter rapidement le traitement.

Conclusion

Dans cette étude, il a été constaté que la prévalence de *Klebsiella pneumoniae* résistante à la colistine était de 1,5%. Cela souligne le risque d'augmentation et de dissémination de cette bactérie résistante à l'antibiotique et la nécessité de prendre des mesures pour empêcher sa propagation et préserver l'efficacité de l'antibiotique. Les résultats de l'étude ont également mis en évidence les inconvénients des méthodes de dépistage employées, notamment la méthode de référence, ce qui nécessite la recherche

d'une méthode de test de sensibilité fiable, facile à reproduire et peu coûteuse, surtout pour les pays à ressources limitées. Il est recommandé que chaque laboratoire collecte les données de résistance et conserve les isolats suspects pour les acheminer à des laboratoires de référence, afin d'améliorer la connaissance des résistances et de limiter la diffusion des bactéries multirésistantes dans les établissements hospitaliers et dans la communauté.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêt.

Références bibliographiques

1. L'OMS publie une liste de bactéries contre lesquelles il est urgent d'avoir de nouveaux antibiotiques [Internet]. [cited 2022 Jun 29]. Available from: <https://www.who.int/fr/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
2. Jondle CN, Gupta K, Mishra BB, Sharma J. *Klebsiella pneumoniae* infection of murine neutrophils impairs their efferocytic clearance by modulating cell death machinery. *PLoS pathogens*. 2018;14(10):e1007338.
3. Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques 19^{ème} Rapport d'évaluation 2018 [Internet]. Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques (AARN); 2018. Available from: www.sante.dz/aarn
4. Koch-Weser JAN, SIDEL VW, FEDERMAN EB, KANAREK P, FINER DC, EATON AE. Adverse effects of sodium colistimethate: manifestations and specific reaction rates during 317 courses of therapy. *Annals of internal medicine*. 1970;72(6):857-68.
5. Dafopoulou K, Zarkotou O, Dimitroulia E, Hadjichristodoulou C, Gennimata V, Pournaras S, et al. Comparative Evaluation of Colistin Susceptibility Testing Methods among Carbapenem-Nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Aug;59(8):4625-30.
6. Monaco M, Giani T, Raffone M, Arena F, Garcia-Fernandez A, Pollini S, et al. Colistin resistance superimposed to endemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a rapidly evolving problem in Italy, November 2013 to April 2014. *Eurosurveillance*. 2014 Oct 23;19(42):20939.
7. Balaji V, Jeremiah SS, Baliga PR. Polymyxins: Antimicrobial susceptibility concerns and therapeutic options. *Indian J Med Microbiol*. 2011 Sep;29(3):230-42.

8. Galani I, Kontopidou F, Souli M, Rekatsina PD, Koratzanis E, Deliolanis J, et al. Colistin susceptibility testing by Etest and disk diffusion methods. *Int J Antimicrob Agents*. 2008 May;31(5):434–9.
9. Simar S, Sibley D, Ashcraft D, Pankey G. Colistin and Polymyxin B Minimal Inhibitory Concentrations Determined by Etest Found Unreliable for Gram-Negative Bacilli. *Ochsner J*. 2017;17(3):239–42.
10. Tan TY, Ng SY. Comparison of Etest, Vitek and agar dilution for susceptibility testing of colistin. *Clin Microbiol Infect*. 2007 May;13(5):541–4.
11. EUCAST_RefStaemme_Sollwerte.pdf [Internet]. [cited 2022 Jun 4]. Available from: https://aurosan.de/images/mediathek/service/ematerial/EUCAST_RefStaemme_Sollwerte.pdf
12. Gonzales Escalante E, Yauri Condor K, Di Conza JA, Gutkind GO. Phenotypic Detection of Plasmid-Mediated Colistin Resistance in Enterobacteriaceae. Ledeboer NA, editor. *J Clin Microbiol*. 2020 Feb 24;58(3):e01555-19.
13. Gonzales Escalante E, Yauri Condor K, Di Conza JA, Gutkind GO. Phenotypic Detection of Plasmid-Mediated Colistin Resistance in Enterobacteriaceae. Ledeboer NA, editor. *J Clin Microbiol*. 2020 Feb 24;58(3):e01555-19.
14. Standardisation des Tests de Sensibilité aux Antibiotiques à l'Échelle Nationale, [Internet]. 8ème Édition Avril 2020. Available from: www.santé.dz/aarn/
15. Pasteran F, Danze D, Cabrera C, Lucero C, Menocal A, Albornoz E, et al. Development and validation of simple tests (agar spot, colistin drop, 1ml-broth disk elution MIC and tablet pre-diffusion) as an alternative to improve accuracy in screening chromosomal and plasmid-mediated colistin resistance in Gram-negative bacilli. In: *European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)*. 2018.
16. Patel JB, Cockerill FR, Bradford PA, Eliopoulos GM, Hindler JA, Jenkins SG, et al. M07-A10 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—. *Clinical Laboratory Standards Institute*. 2015;35(2).
17. Testing EC on AS. Media preparation for EUCAST disk diffusion testing and for determination of MIC values by the broth microdilution method. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2014;
18. Wayne PA. *Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test*. Approved standard M2–A9, *Clinical and laboratory standards institute*. 2006;
19. COLISTIN-DISK-ELUTION-TEST-ARGv2020.pdf [Internet]. [cited 2022 Jun 20]. Available from: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2020/05/COLISTIN-DISK-ELUTION-TEST-ARGv2020.pdf>
20. Pasteran F, Danze D, Cabrera C, Lucero C, Menocal A, Albornoz E, et al. Development and validation of simple tests (agar spot, colistin drop, 1ml-broth disk elution MIC and tablet pre-diffusion) as an alternative to improve accuracy in screening chromosomal and plasmid-mediated colistin resistance in Gram-negative bacilli. In: *European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)*. 2018.
21. Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf [Internet]. [cited 2022 Jul 10]. Available from: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf
22. Tella DD, Tamburro M, Guerrizio G, Fanelli I, Sammarco ML, Ripabelli G. <p>Molecular Epidemiological Insights into Colistin-Resistant and Carbapenemases-Producing Clinical Klebsiella pneumoniae Isolates</p>. *IDR*. 2019 Dec 3;12:3783–95.
23. Giacobbe DR, Del Bono V, Treçarichi EM, De Rosa FG, Giannella M, Bassetti M, et al. Risk factors for bloodstream infections due to colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: results from a multicenter case-control study. *Clinical Microbiology and Infection*. 2015;21(12):1106-e1.
24. Mansour W, Haenni M, Saras E, Grami R, Mani Y, Ben Haj Khalifa A, et al. Outbreak of colistin-resistant carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Tunisia. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2017 Sep 1;10:88–94.
25. Chiu SK, Wu TL, Chuang YC, Lin JC, Fung CP, Lu PL, et al. National Surveillance Study on Carbapenem Non-Susceptible *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan: The Emergence and Rapid Dissemination of KPC-2 Carbapenemase. *PLOS ONE*. 2013 Jul 24;8(7):e69428.
26. Résistance à la colistine chez les bactéries à gram-négatif - NOSO INFO [Internet]. 2017 [cited 2022 Jul 11]. Available from: <http://www.nosoinfo.be/nosoinfos/resistance-a-la-colistine-chez-les-bacteries-a-gram-negatif/>
27. Aris P, Robotjazi S, Nikkhahi F, Amin Marashi SM. Molecular mechanisms and prevalence of

colistin resistance of *Klebsiella pneumoniae* in the Middle East region: A review over the last 5 years. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2020 Sep 1;22:625–30.