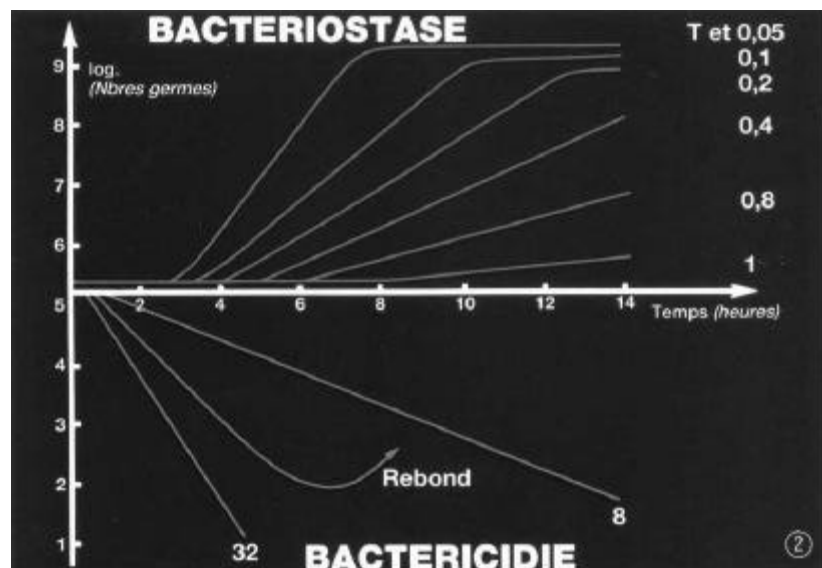


Comment je lis un antibiogramme: la lecture interprétative

Micheline Roussel-Delvallez
CHRU - Lille



Courbe de croissance bactérienne en présence de quantités croissantes d'un antibiotique

Concentration minimale inhibitrice (CMI)

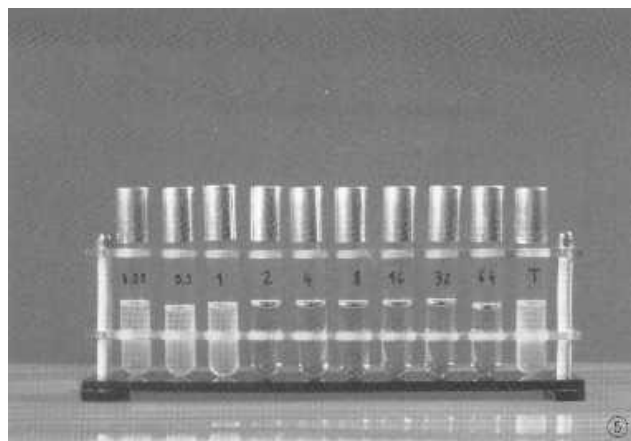
C'est la plus faible concentration d'antibiotiques capable d'inhiber toute culture visible de la souche étudiée.

Elle s'exprime en mg/L ou $\mu\text{g/ml}$.

③

I/. Méthode de référence de détermination de la CMI :

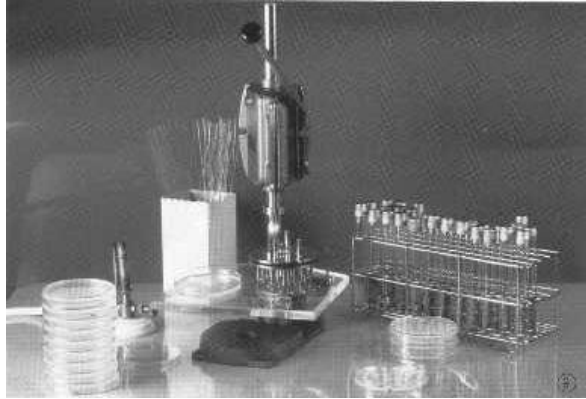
a/. Dilution en milieu liquide : macrométhode



Croissance visible dans les tubes témoins (sans antibiotique) et concentrations 0,25, 0,5 et 1 mg/L.

I/. Méthode de référence de détermination de la CMI :

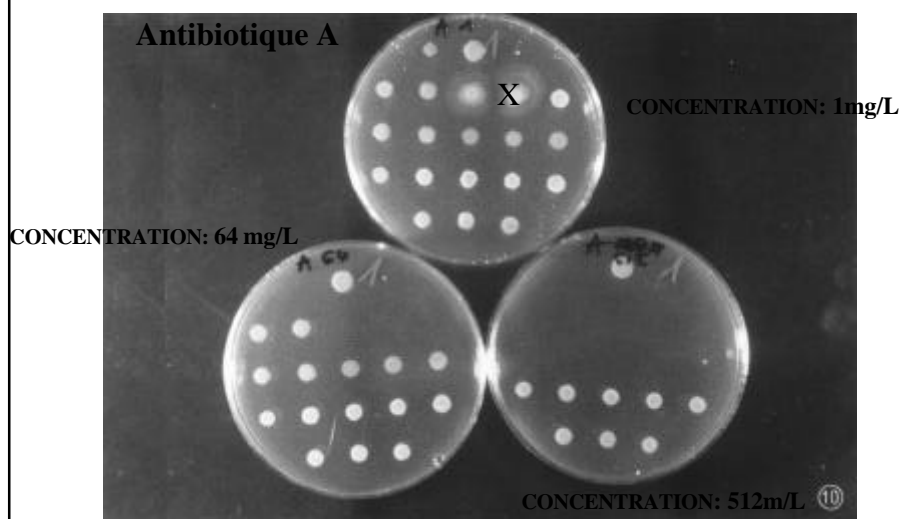
b/. Dilution en milieu solide gélosé



Ensemencement à l'aide d'un ensemenceur multiple (appareil de Steers)

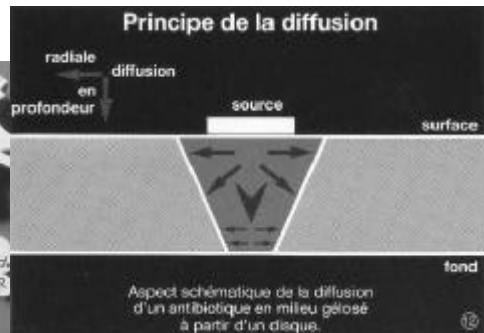
I/. Méthode de référence de détermination de la CMI :

b/. Dilution en milieu solide gélosé

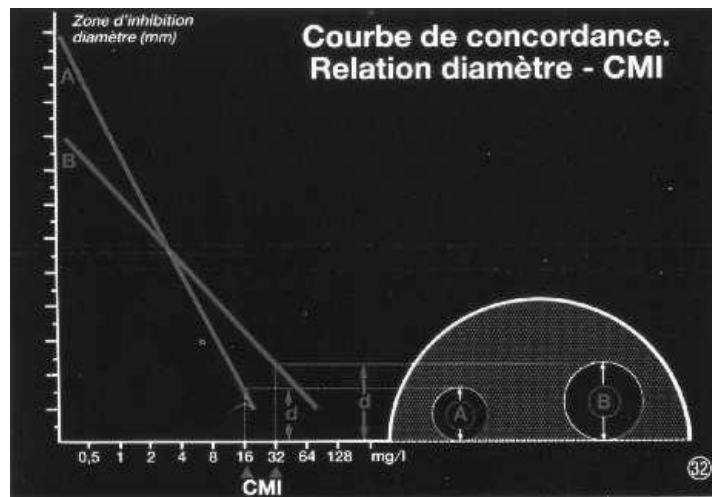


II/. Méthode de Diffusion

= Méthode des disques



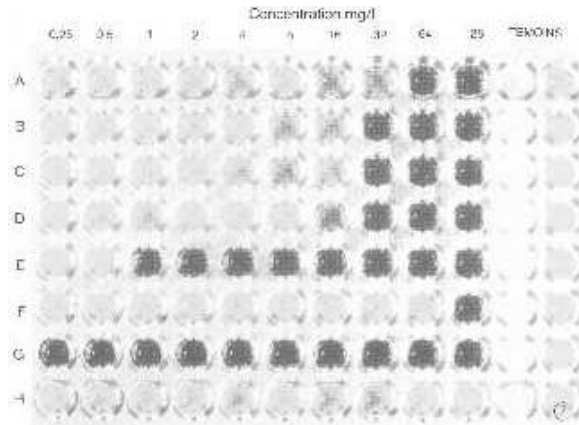
Diffusion de l'antibiotique à partir du disque, posé sur la gélose, préalablementensemencée par la souche à tester



L'expérimentateur mesure le diamètre de la zone d'inhibition, qui, reportée sur la courbe de concordance donne la valeur de la CMI

I/. Méthode de référence de détermination de la CMI :

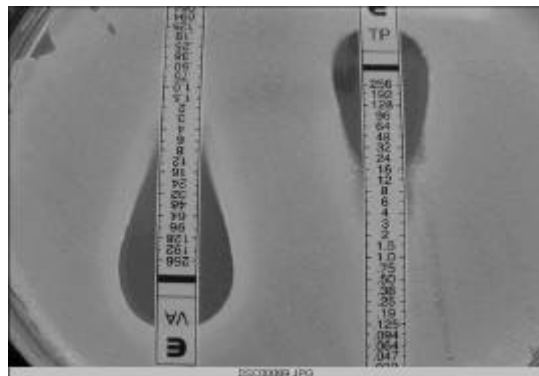
a/.Dilution en milieu liquide : microméthode



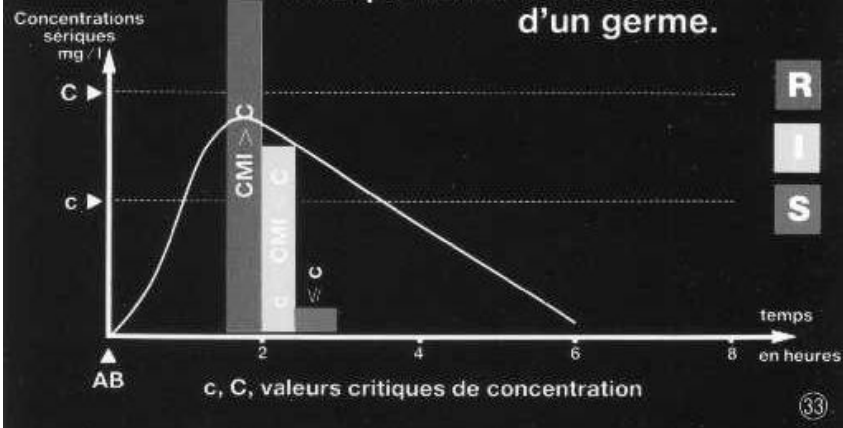
Lecture basée sur une réaction d'acidification (virage au jaune de l'indicateur de pH, rouge de phénol)

Méthode Etest®

Bandelette imprégnée d'un gradient préformé d'antibiotique



Evolution des concentrations d'un antibiotique dans le sang en fonction du temps.
 Comparaison avec la CMI d'un germe.



Concentrations critiques déduites à partir des données pharmacocinétiques

Catégories thérapeutiques définies par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

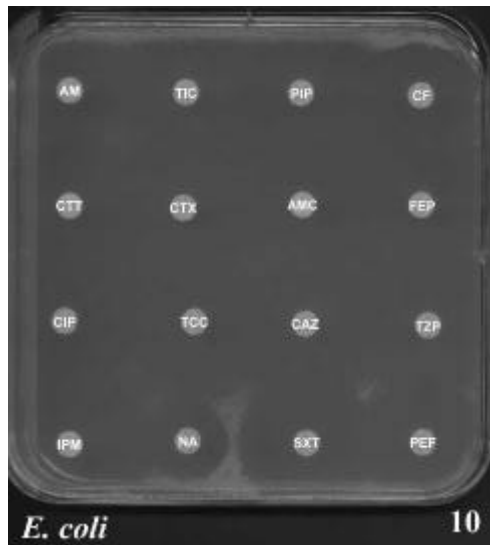
- **SENSIBLE** : $CMI \leq c$ = concentration critique inférieure (c)
 Bonne probabilité de succès thérapeutique
 Traitement à dose habituelle par voie générale
- **INTERMEDIAIRE** : $c < CMI < C$ = Concentration critique supérieure
 Issue thérapeutique imprévisible
- **RESISTANT**
 Probabilité de succès thérapeutique très faible ou nulle

Enterobacteriaceae and **β**-lactams (1)

E. coli, *P. mirabilis*, *Salmonella*, *Shigella*

	Wild type	Low level Pase	High level Pase	Case ¹	Pase+Case (<i>E. coli</i>)	IRT (<i>E. coli</i>)
Amino-P	S	R	R	R	R	R
AminoP + BLI	S	S	S/R	R	R	R
Carboxy-P	S	R	R	S	R	R
Ureido-P	S	S	S/R	S	S/R	R
IGC	S	S	S/R	R	R	S
IIGC	S	S	S/R ²	S ³	R	S
IIIGC	S	S	S	S	S	S

1 : just *E. coli*; 2 : cefoxitin S; 3 : cefoxitin R



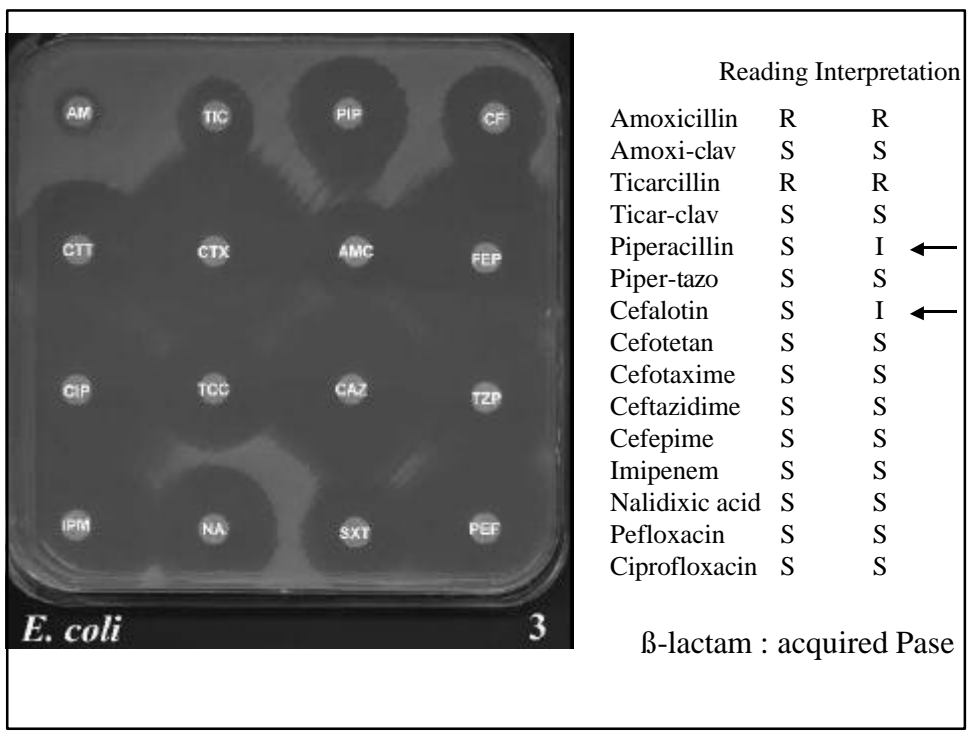
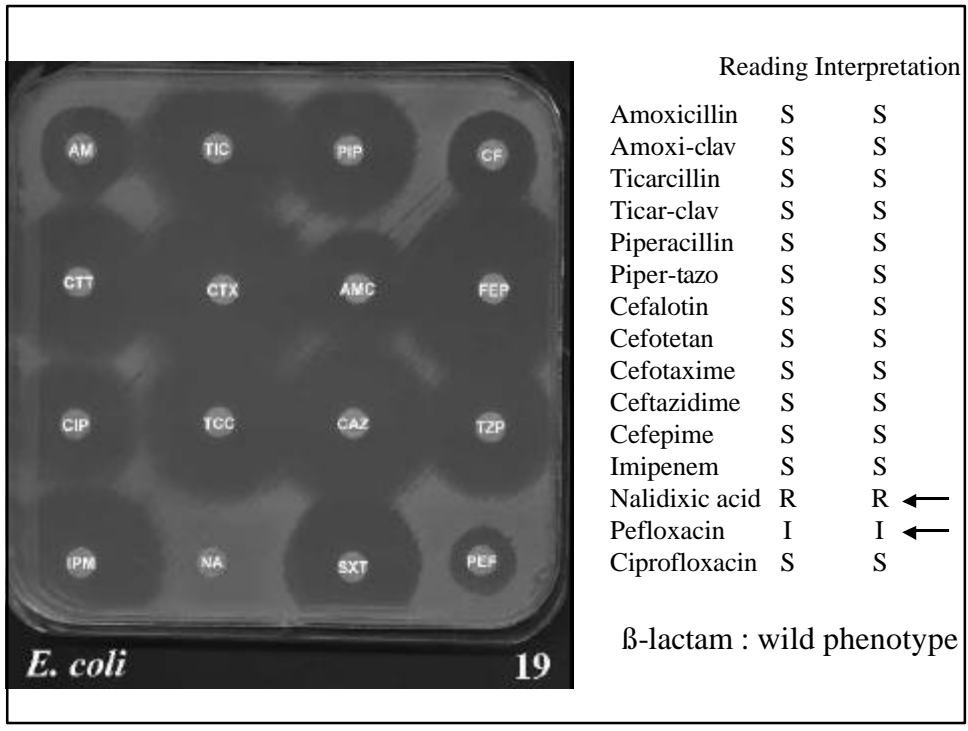
E. coli

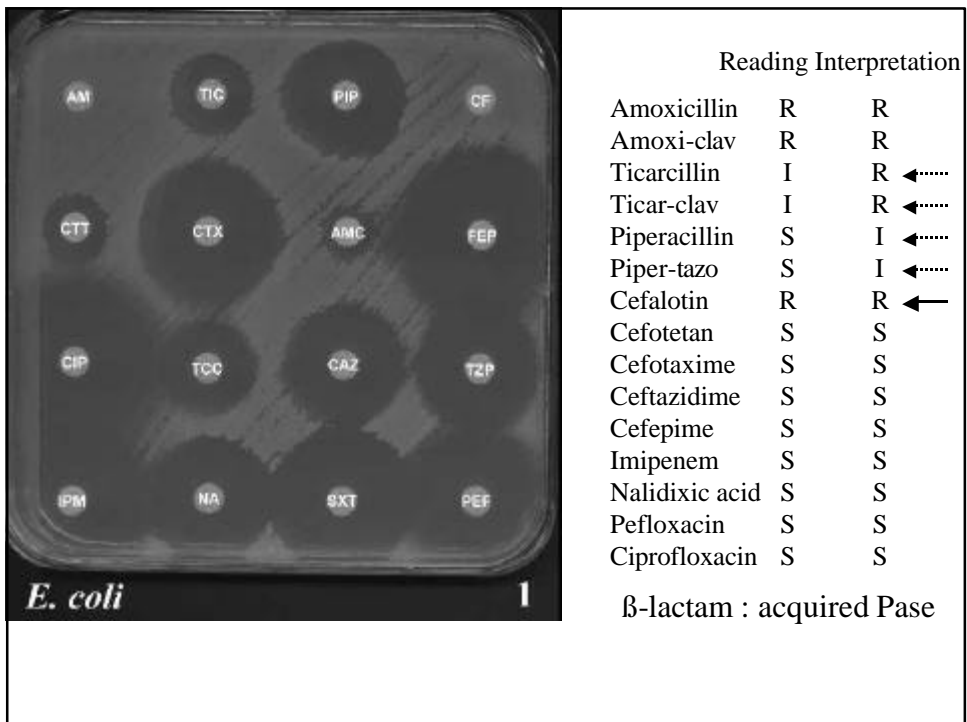
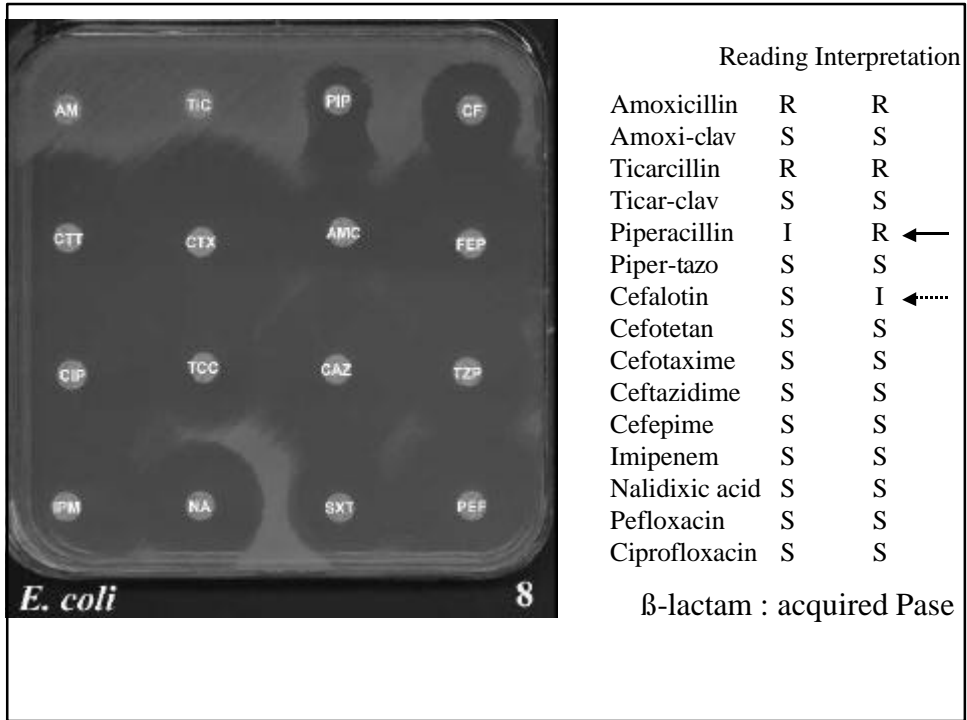
10

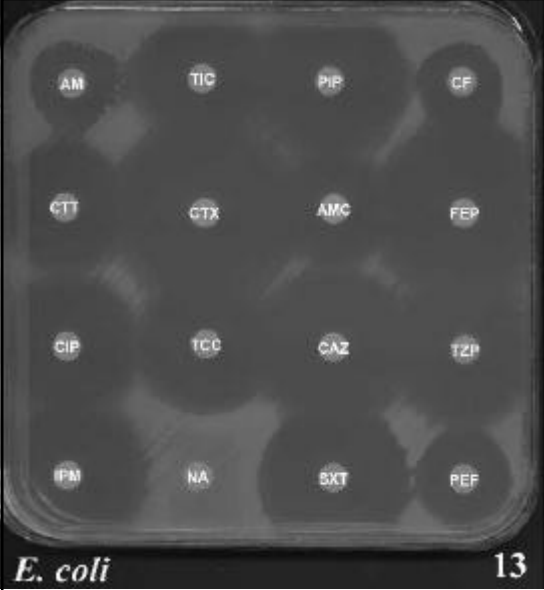
Reading Interpretation

Amoxicillin	S	S
Amoxi-clav	S	S
Ticarcillin	S	S
Ticar-clav	S	S
Piperacillin	S	S
Piper-tazo	S	S
Cefalotin	S	S
Cefotetan	S	S
Cefotaxime	S	S
Ceftazidime	S	S
Cefepime	S	S
Imipenem	S	S
Nalidixic acid	I	R ←
Pefloxacin	S	S
Ciprofloxacin	S	S

β-lactam : wild phenotype







Reading Interpretation		
Amoxicillin	S	I ←.....
Amoxi-clav	S	I ←.....
Ticarcillin	S	S
Ticar-clav	S	S
Piperacillin	S	S
Piper-tazo	S	S
Cefalotin	R	R ←
Cefotetan	S	S
Cefotaxime	S	S
Ceftazidime	S	S
Cefepime	S	S
Imipenem	S	S
Nalidixic acid	R	R
Pefloxacin	I	I
Ciprofloxacin	S	S

E. coli 13

β-lactam : Low Level Case

Resistance to the combination of **β**-lactam + **β**-lactamase inhibitor (TRI)

- Hyperproduction of unmodified **β**-lactamase (multicopy plasmids) : the most frequent
- Modification of the outer membrane proteins, limiting the uptake of the antibiotic combination (deficiency in the OmpF and OmpC porins)
- Both
- Alteration in the sequence of the wild TEM type **β**-lactamase = TEM Resistant to **β**-lactamase Inhibitors = TRI / IRT

E. coli 31

Reading Interpretation		
Amoxicillin	R	R
Amoxi-clav	R	R
Ticarcillin	R	R
Ticar-clav	R	R
Piperacillin	R	R
Piper-tazo	S	I
Cefalotin	I	I
Cefotetan	S	S
Cefotaxime	S	S
Ceftazidime	S	S
Cefepime	S	S
Imipenem	S	S
Nalidixic acid	R	R
Pefloxacin	I	I
Ciprofloxacin	S	S

β-lactam : TRI

Enterobacteriaceae and **β**-lactams (2)

K. pneumoniae, *K. oxytoca*, *L. malonatica*

	Wild type low level Pase	Wild type high level Pase	ESBL
Amino-P	R	R	R
AminoP + BLI	S	S/R	I
Carboxy-P	R	R	R
Ureido-P	I	R	R
IGC	S	R	R
IIGC	S	R	S
IIIGC	S	S	R

1) When production of a low level of a penicillinase, the strains may appear "S", the answer must be I

2) For *K. oxytoca* synergism between AMC and AZT /CTX
 no synergism between AMC and CAZ
AE CAZ > **AE** CTX = overproduction of the chromosomal enzyme

Plasmid-mediated extended-spectrum

β-lactamases = ESBL

- Resistance to broad-spectrum cephalosporins
- Not to **β**-lactams with **a**-methoxy in C7
- Not to carbapenems

BUT > Chromosomally **β**-lactams produced or over-produced by group III *Enterobacteriaceae* hydrolyze cephamycins

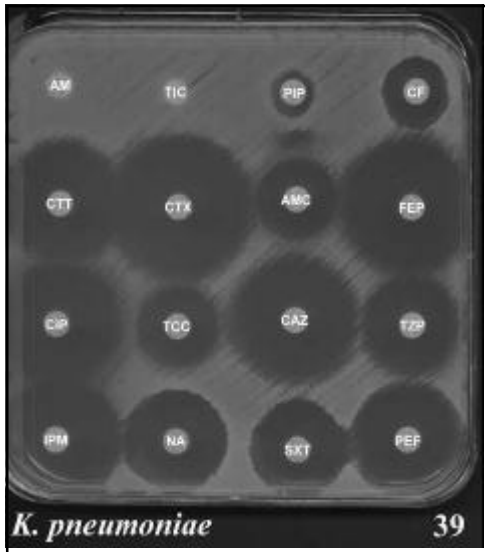
> Plasmid-mediated **β**-lactamases (CMY-1, MIR-1) produced by *K. pneumoniae* confer resistance to ceftazidime

- Only antibiotics active
 - Cefepime
 - Cefpirome
 - Meropenem
 - Imipenem

Detection of extended broad- spectrum **β**-lactamase (ESBL)

CA -SFM : "For all *Enterobacteriaceae*, when a strain falls in the susceptible category for 3GC, if a synergism between a 3GC (ceftazidime the best or / and azthreonam) and a BLI (clavulanic acid) is observed, then the answer must be intermediate".

The distance between the disks of augmentin and any 3GC is 30 mm (center to center).



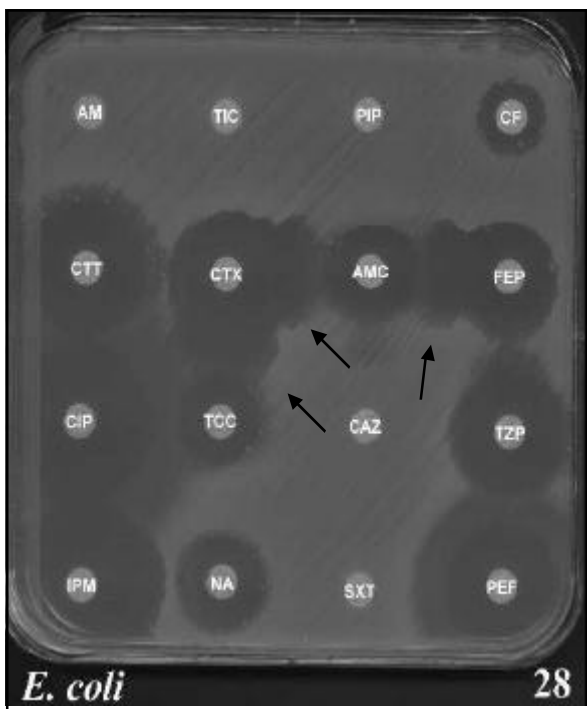
K. pneumoniae

39

Reading Interpretation

Amoxicillin	R	R
Amoxi-clav	I	I
Ticarcillin	R	R
Ticar-clav	I	I
Piperacillin	R	R
Piper-tazo	S	S
Cefalotin	I	I
Cefotetan	S	S
Cefotaxime	S	S
Ceftazidime	S	S
Cefepime	S	S
Imipenem	S	S
Nalidixic acid	S	S
Pefloxacin	S	S
Ciprofloxacin	S	S

β -lactam : acquired Pase



E. coli

28

Reading Interpretation

Amoxicillin	R	R
Amoxi-clav	I	I
Ticarcillin	R	R
Ticar-clav	R	R
Piperacillin	R	R
Piper-tazo	S	I ←
Cefalotin	I	R ←
Cefotetan	S	S
Cefotaxime	S	I ←
Ceftazidime	R	R
Cefepime	S	I ←
Imipenem	S	S
Nalidixic acid	I	R
Pefloxacin	S	S
Ciprofloxacin	S	S

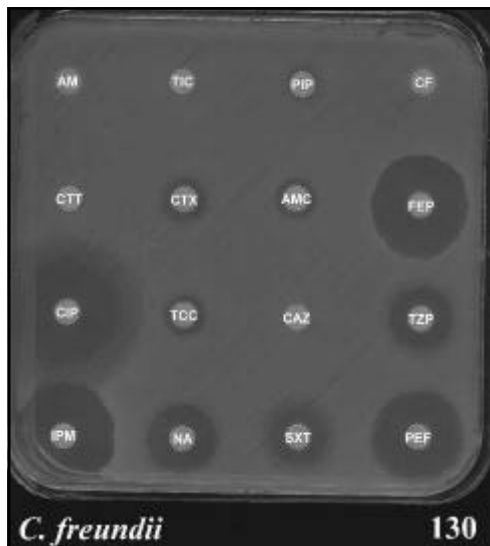
β -lactam : ESBL

Enterobacteriaceae and β -lactams (3)

*Enterobacter, Serratia, Providencia stuartii,
Citrobacter freundii, Proteus indole +*

	Wild type low level Case	High level Pase	High level Case	ESBL*
Amino-P	R	R	R	R
AminoP + BLI	R	R	R	R
Carboxy-P	S	R	R	R
Ureido-P	S	R	R	R
IGC	R	R	R	R
IIGC	S/R	S/R	R	R
IIIGC	S	S	R	R
Latamoxef				S
Carbapenem				S
Cefepime				I
Cefpirome				I

* If a strain of this group is S to CTX, CRO, CAZ, AZT; then I or R to one of the tested antibiotic, then the answer is I for all.



Reading Interpretation

Amoxicillin	R	R
Amoxi-clav	R	R
Ticarcillin	R	R
Ticar-clav	R	R
Piperacillin	R	R
Piper-tazo	R	R
Cefalotin	R	R
Cefotetan	R	R
Cefotaxime	R	R
Ceftazidime	R	R
Cefepime	S	I? ←
Imipenem	S	S
Nalidixic acid	I	R
Pefloxacin	S	S
Ciprofloxacin	S	S

β -lactam : ESBL and/or
hyper Case



Media + 250 mg/L cloxacilline

Staphylococcus and β -lactams

Three resistance mechanisms

1/ Plasmid penicillinase : R = MIC > 16 mg/L

- Cross-resistance with all penicillins (amino, carboxy, acylureidopenicillins)
= Pense susceptible to BLI (clavulanic acid)

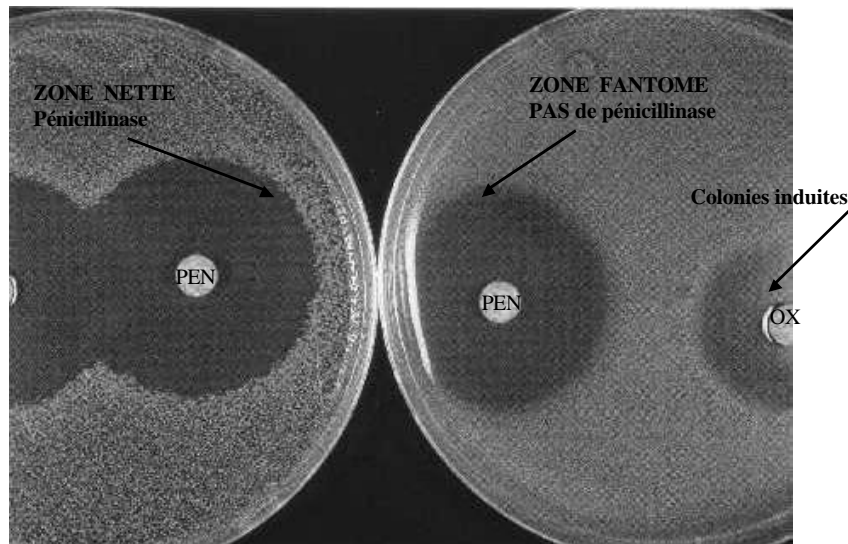
2/ Production of a novel PBP2a, encoded by gene *mecA* :

R = MIC > 2 mg/l

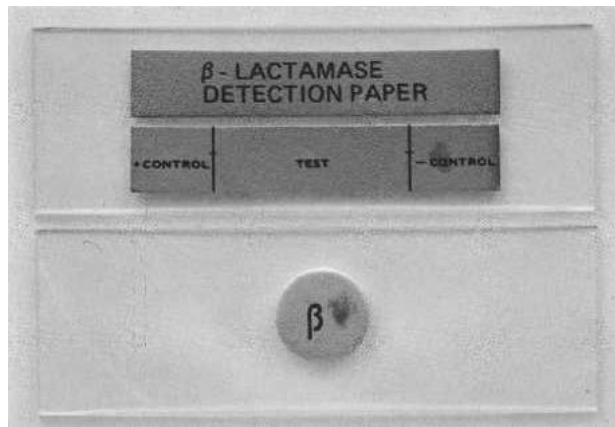
- Cross-resistance with all β -lactams

3/ Hyperproduction of β -lactamase = BORSA

- Strains are resistant to methicillin but MIC decrease with BLI (clavulanic-acid)
- Cross-resistance with all penicillins including methicillin



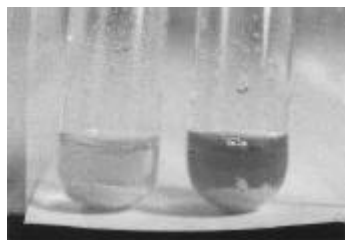
La détection de la bêta-lactamase chez *S. aureus* n'est pas toujours facile et nécessite une culture préalable induite en prélevant des colonies autour du disque d'oxacilline



Détection de la bêta-lactamase par méthode acidimétrique:

Les bandelettes de papier sont imprégnées de pénicilline et d'un indicateur de pH (pourpre de bromocrésol)

→ si acidification: virage du violet au jaune



**Méthode chromogénique de détection de la bêta-lactamase:
Réactif céfinase (céfalosporine colorée)**

→ virage du jaune au rouge

Detection of methicillin-resistance

➤ Homogeneous resistance

- all clones possess *mec A* gene

→ detection on media containing oxacillin 6 mg/L
or methicillin 10 mg/L

➤ Heterogeneous resistance

- 10^{-4} to 10^{-7} possess *mec A* gene

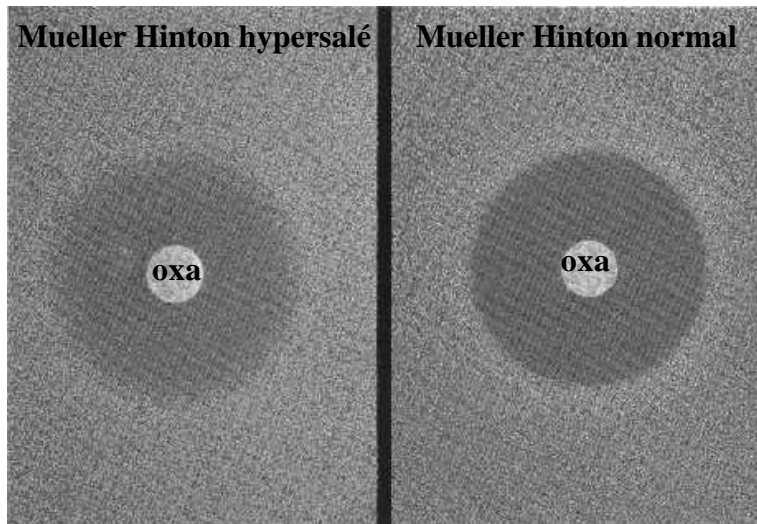
→ use higher inocula (log9 instead of log5)

→ use 2-5% NaCl - Mueller Hinton at 37°C
or incubate the culture at 30°C

NB : Some coagulase negative *Staphylococci* may not grow in such conditions :

incubate for 48 h if necessary

→ use amplification of *mecA* gene



Détection de la résistance hétérogène à la méticilline:

Un disque d'oxacilline et incubation à 30°C ou utilisation d'un Milieu hypersalé (50g/L)

Staphylococcus and aminoglycosides

Phenotypes	Mechanisms	Reading				Interpretation	
		K	T	G	Nm	Akn	Net
KNm	APH(3')-III	<u>R</u>	S	S	<u>R</u>	R	S
KTG	APH (2'') + AAC (6')	<u>R</u>	R	<u>R</u>	S	R	R
KT	ANT (4')	R	<u>R(I)</u>	S	R	R	S

K : Kanamycin T : Tobramycin G : Gentamicin Nm : Neomycin
 Akn : Amikacin Net : Netilmicin

R : Resistance always detected
R : may appear S but answer must be R

Staphylococcus and macrolides

	Wild type	MLS _B induct.	MLS _B constit.	MLS _B + S _A	LS _A
Erythromycin	S	R	R	R	S
Lincomycin*	S	(S)**	R	R	R
Virginiamycin	S	S	S	R	I

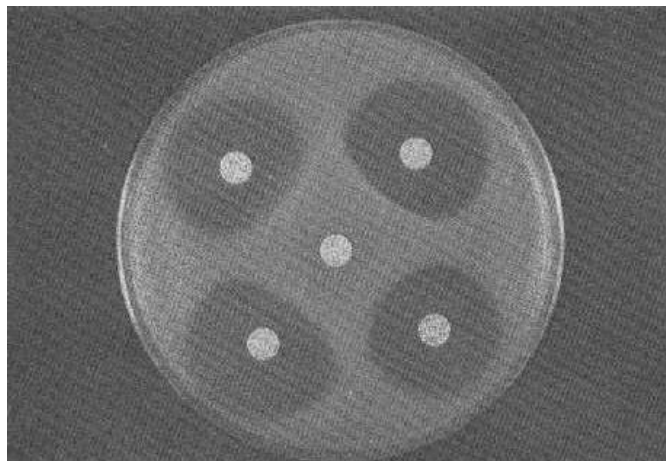
MLS_B : Plasmid (*ermC*) or chromosomal location (transposon with *ermA*) methylation ARNr 23S (= Target modification)

MLS_B + S_A : Plasmidic - Acetyltransferase (S_A) (gene *vat*) and hydrolyse (S_B) (gene *vga*) associated with phenotype KT

LS_A : Chromosomal locations ; gene *vga*

* Lincomycin = clindamycin (easier to detection)

** (S) : if the 2 discs are near → R



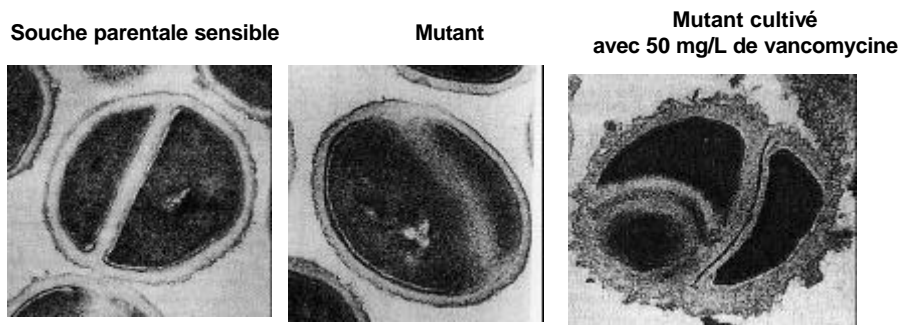
Souche de *S. aureus* présentant une résistance inductible à l'érythromycine: souche uniquement érythromycine R

Staphylocoques de sensibilité diminuée aux glycopeptides

- GISA: population homogène
 - La majorité de la population est de sensibilité diminuée
 - CMI Vancomycine \geq 8 mg/L
 - CMI Téricoplanine \geq ou 16 mg/L
- hGISA: populations hétérogènes
 - Cellules majoritairement sensibles
 - Une fraction de la population (10^{-6} à 10^{-9}) exprime la résistance
 - CMI inférieure aux concentrations critiques
 - Polymorphisme fréquent des colonies

Anomalies morphologiques du peptidoglycane

- Epaissement du PG : biosynthèse et renouvellement accru
- Séquestration des glycopeptides
- Pas de gènes *van* comme pour les entérocoques

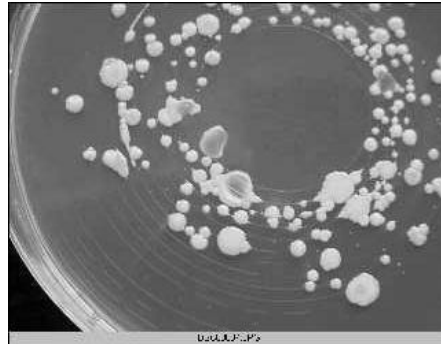


Sieradzki K and Tomasz A. J Bacteriol 1997.

Types de résistance acquise aux glycopeptides chez les entérocoques

	VanA	VanB	VanD	VanE
CMI vancomycine	> 64	4-1000	64	16
CMI teicoplanine	> 16	0,5-2	4-16	0,5
Expression	ind	ind	const	ind
Support génétique	Tn1546	Tn1547 Tn1549 Tn5382	Chrom	Chrom
Extrêmité cible	D-Ala - D-Lac	D-Ala - D-Lac	D-Ala - D-Lac	D-Ala - D-Ser
Espèce	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. casseliflavus</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>

Souche hGISA : aspect polymorphe des colonies



Méthodes d'étude conventionnelles

Ne détectent pas les souches de sensibilité diminuée
en particulier hGISA

surtout si la population est hétérogène

inoculum trop faible, durée d'incubation insuffisante

milieu Mueller Hinton inadéquat

Signes d'appel:

Diffusion en gélose:

diamètre Tétracycline < 17mm

différence de + 3 mm des diamètres des 2 glycopeptides

interaction glycopeptides-béta-lactamines

colonies dans la zone d'inhibition

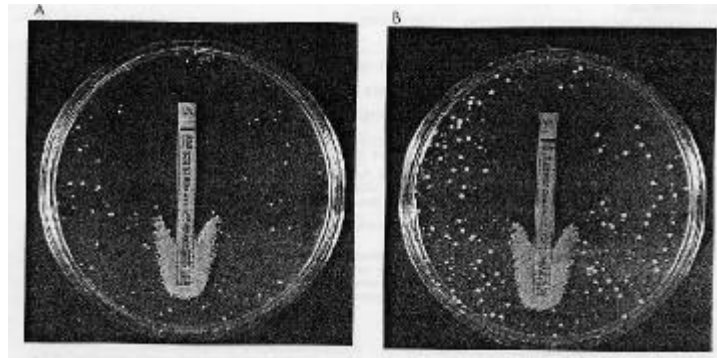
Méthodes automatisées:

souches catégorisées I ou R à l'un des 2 glycopeptides

L'antagonisme vancomycine- β -lactamines est rarement observé avec les souches françaises

Mu 50 =GISA

Mu 3 + hGISA



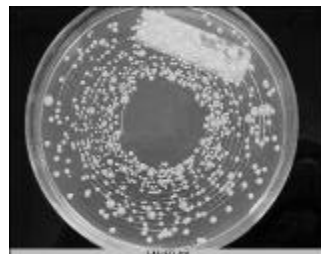
Howe RA. J Clin Microbiol 1999.

Méthodes d'étude conseillées

Milieu cœur cerveau (BHI), inoculum lourd (2McFarland),
incubation prolongée 48 h

1) Screening :

Milieu BHI + 4 ou 6 mg/L de
vancomycine ou de téicoplanine



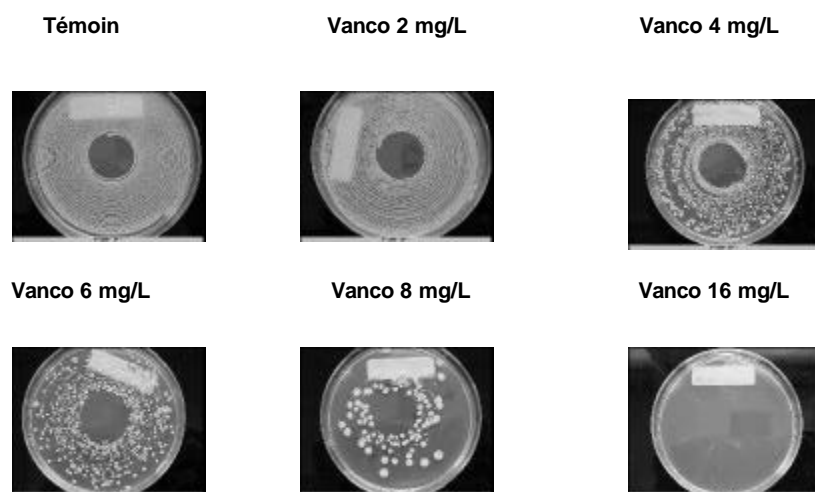
Hiramatsu K. Drug resistance updates
1998.
Tenover FC. Clin Microbiol Newslett
2000.
El Solh N. Antibiotiques 2000.
Walsh TR. J Clin Microbiol 2001.

Méthodes d'étude conseillées

2) Confirmation de la perte de sensibilité par :

- Analyse de population: PAP = « Gold Standard » réalisée avec une souche GISA (Mu 50) et hGISA (Mu 3) témoin
Le ratio PAP-AUC h GISA / GISA > 0,90
 - gélose BHI avec des concentrations croissantes de vancomycine
- CMI Etest® : sur BHI Mc Farland 2; recommandations fabricant
- CMI par microdilution en bouillon NCCLS
 - bon pour FC Tenover
 - peu sensible pour TR Walsh

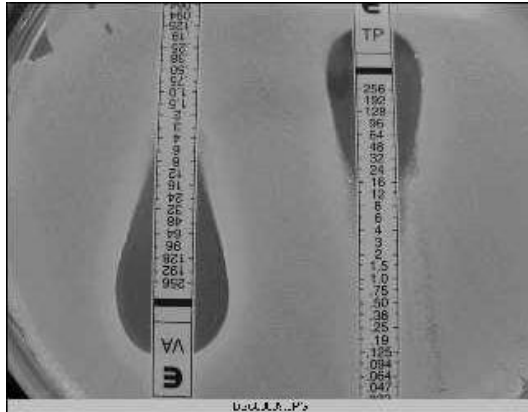
Analyse de population : inoculum 2 McF, 50 µl, BHI



CMI Etest®

Suivre les recommandations
du fabricant +++

Lecture parfois difficile
si hGISA



Au laboratoire du CHRU - Lille

MRSA
Genta R

CMI Vancomycine
Vitek ≥ 1 mcg:mL

SCREENING

Sur milieu Mueller Hinton
Téicoplanine 5 mcg/mL
Mc Farland 2

Si culture
 ≥ 5 colonies à 24-48 h

Lecture à 24 et 48h

A partir de la culture initiale
« CMI » Etest sur milieu BHI
(Brain Heart Infusion)

Mc Farland 2

INTERPRETATION

	GISA	hGISA
Vancomycine mcg/ml	8	4-6
Téicoplanine mcg/ml	24	≥ 12

REPOSE

Présence de *S.aureus* de sensibilité diminuée aux Glycopeptides
Si infection, utiliser la vancomycine à dose thérapeutique
permettant d'obtenir un taux résiduel > 20 mcg/mL
Ne pas rendre de valeur de CMI

Pneumocoque et résistance

RESISTANCE et résistance

- Macrolides:

- ▶▶ Résistance à haut niveau: l'antibiotique est inefficace; acquisition d'une méthylase d'origine plasmidique ou transposable qui en déméthylant le ribosome diminue l'affinité de celui-ci pour l'antibiotique (*ermB*)

- Mécanisme de type MLS_B qui inactivera donc Erythromycine et macrolides apparentés, lincomycine, streptogramine B, mais préserve la synergie streptogramine A et B

- ⇒ Les pneumocoques sont Erythromycine R (CMI>128 mg/L),
Pristinamycine S

- ▶▶ Résistance à bas niveau: Mécanisme par efflux (*mefE*)

- (CMI = 4-16 mg/L)

RESISTANCE et résistance

- β -LACTAMINES

- ▶▶ Résistance de haut niveau (R)

- aucune β - lactamine ne peut être conseillée

- ▶▶ Résistance de bas niveau (I) :
PSDP

- seules certaines β -lactamines peuvent être utilisées

β -lactamines: notion de sensibilité diminuée

►► Modification des Protéines de Liaison à la Pénicilline G (PLP)

Aucune	1 ou plusieurs PLP
Pneumocoque sensible aux β -lactamines	Pneumocoque de sensibilité diminuée aux β -lactamines

Rôle des différentes PLPs dans la résistance aux β -lactamines

- Les PLPs sont codées par des “gènes mosaïques”
- Résistance à la pénicilline G et aux pénèmes:
Altération de PLP-1a et PLP-2b: PSDP
 - Résistance aux céphalosporines:
Altération de PLP-2x: résistance intermédiaire
Altération de PLP- 2x + 1a: haut niveau
 - Résistance de haut niveau à la pénicilline G:
⇒ Altération de PLP-1a et PLP-2b + PLP- 2x

Les β -lactamines sont affectées à des niveaux variables

Activité comparée des β -lactamines sur *S. pneumoniae*

+ actives	Pénicilline G	- actives
Imipénème	Ampicilline	Pipéracilline
Amoxicilline	Cefpodoxime	Céfotetan
Céfotaxime		Céfopérazone
Ceftriaxone		Céfixime
Céfuroxime*		Céfaclor

* ICAAC Toronto 2000, Perez-Trallero :céfuroxime: 59% S; 8,7 I; 31,4 R

Med et Hyg. 1995, 53, 2111-8; Geslin et al

Rôle du laboratoire Recommandations du CA SFM

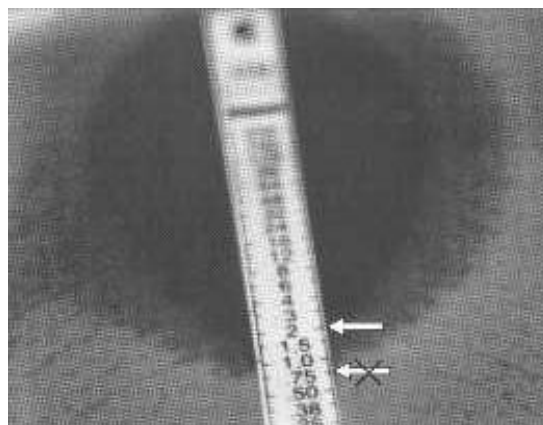
- ▶▶ Evaluer la sensibilité des antibiotiques
- ▶▶ ▶▶ En cas d'infection sévère, d'échec clinique ou de PSDP, déterminer :
 - ▶▶ CMI de la Pénicilline G
 - ▶▶ CMI des autres β -lactamines dont les propriétés pharmacologiques sont compatibles avec une efficacité clinique
 - ★ amoxicilline, céfuroxime, céfotaxime, ceftriaxone, céfépime, cefpirome et imipénème

Categorization of *S. pneumoniae*
(MIC : mg/L)

	S	I low level resistance	R high level resistance
Benzyl penicilline	≤ 0.06	0.125-1	> 1
Other β-lactams	≤ 0.5	1-2	> 2

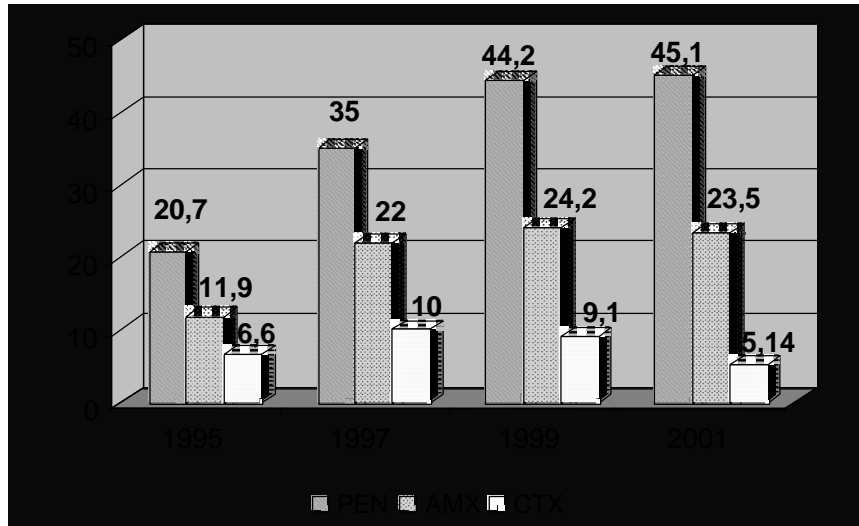
* If meningitis → I = R

PEN

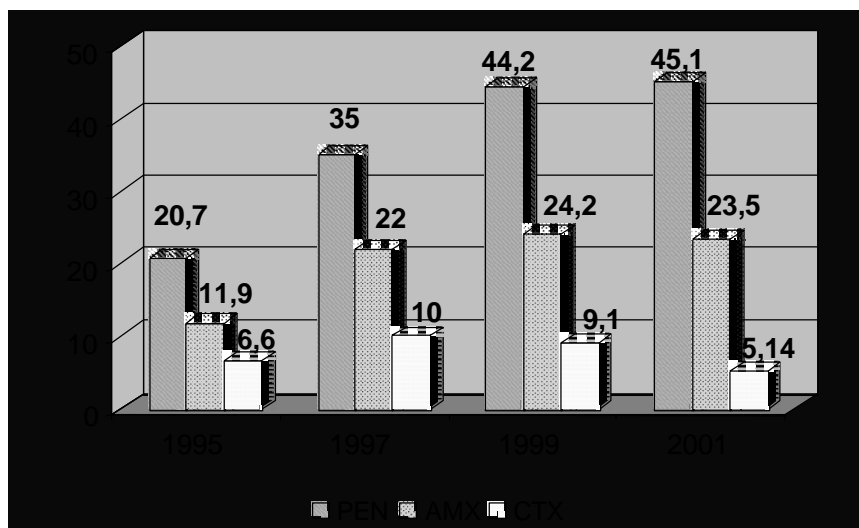


Détermination de la CMI de *S. pneumoniae* par la technique du Etest

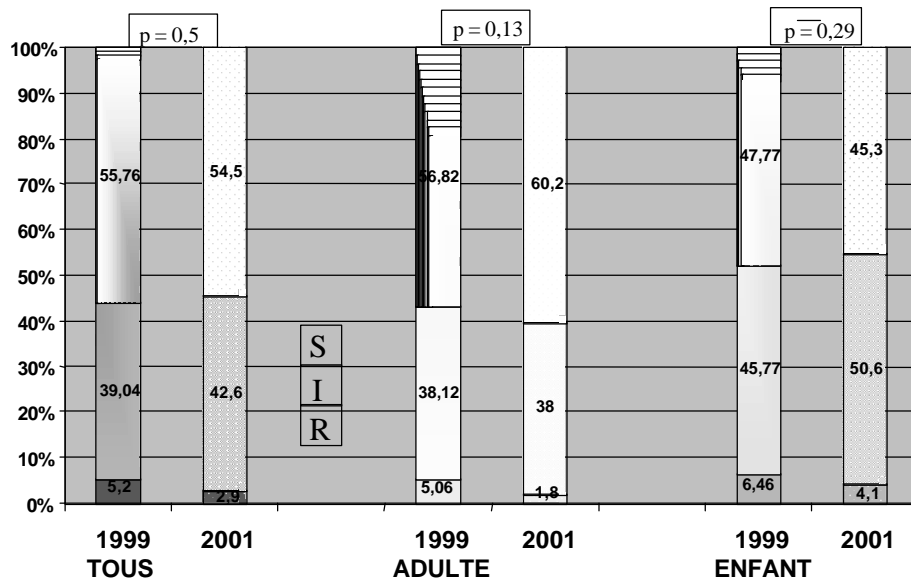
Evolution de *S. pneumoniae* de sensibilité diminuée (I+R)
à la pénicilline G (PEN), à l'amoxicilline (AMX) et
au céfotaxime (CTX) entre 1995 et 2001
tout âge et tout prélèvement confondus dans le Nord - Pas de Calais



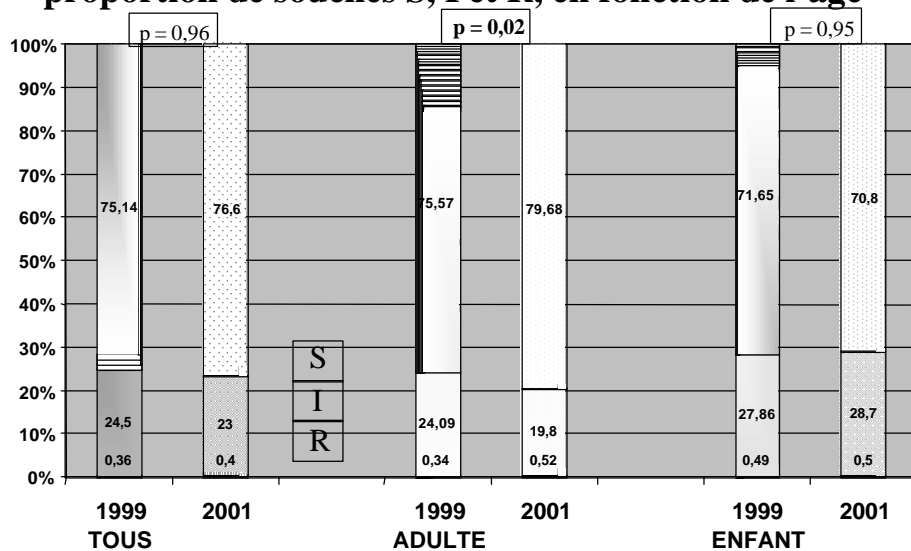
Evolution de *S. pneumoniae* de sensibilité diminuée (I+R)
à la pénicilline G (PEN), à l'amoxicilline (AMX) et
au céfotaxime (CTX) entre 1995 et 2001
tout âge et tout prélèvement confondus dans le Nord - Pas de Calais



S. pneumoniae et Pénicilline G : proportion de souches S, I et R en fonction de l'âge

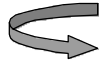


S. pneumoniae et Amoxicilline : proportion de souches S, I et R, en fonction de l'âge



ADULTE : 4 souches ; CMI = 4 mg/L (3 PNP, 1 HEM)
ENFANT : 2 souches ; CMI = 4mg/L (1 PNP, 1 OMA)

***S. pneumoniae* et Céfotaxime : proportion de souches S, I et R en fonction de l'âge**



Pas de souches résistantes = CMI > 0,5 mg/L

