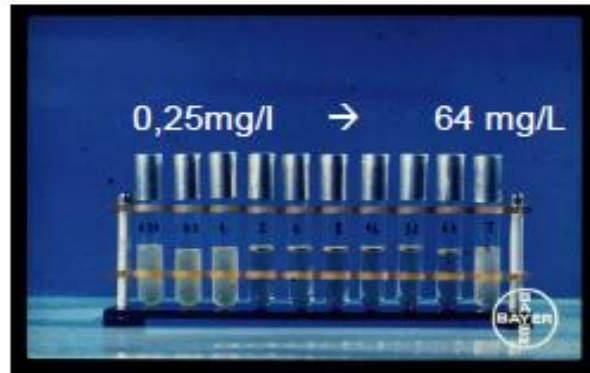


# Lecture interprétative de l'antibiogramme

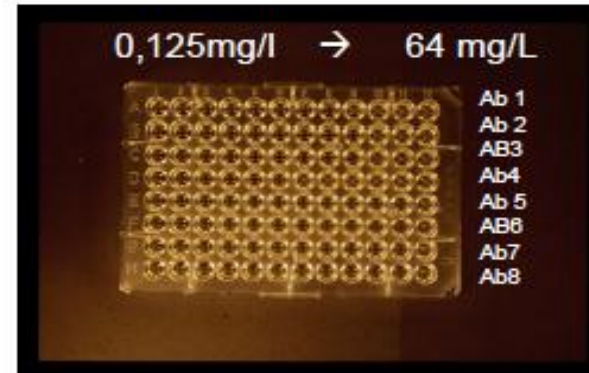
1<sup>er</sup> workshop Franco-Tunisien  
Tunis 11 et 12 novembre 2016  
Dr Y. Péan ONERBA

# Méthode de référence pour mesurer in vitro l'activité d'un antibiotique sur une souche bactérienne : La CMI

## *CMI par dilution en milieu liquide*

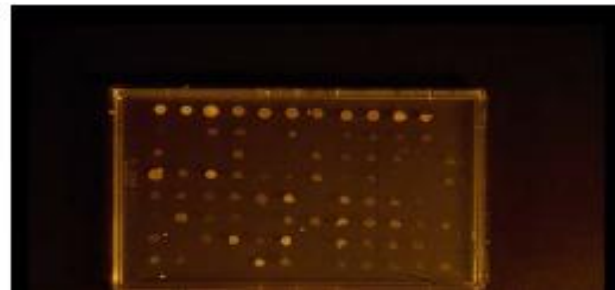


Macrodilution



Microdilution

## *CMI par dilution en milieu solide*



Boîtes avec dilutions antibiotiques  
0,007 → 512 mg/L

Exemple

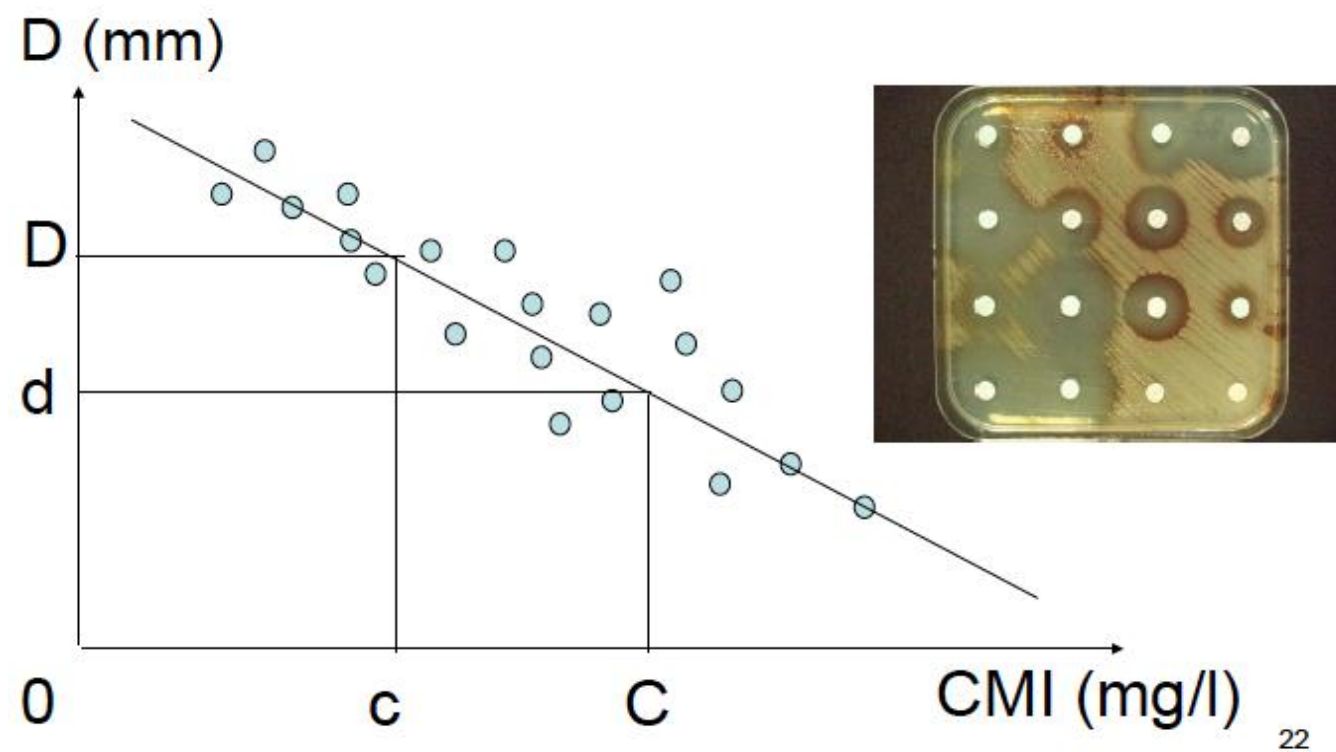
*Neisseria meningitidis*  
boîte pénicilline 0,03 mg/l

# Les valeurs critiques sont définies au niveau européen (EUCAST), en fonction de :

- Formule disponible (oral, IV, IM, ...)
- Dose standard et maximale
- Indications cliniques et espèces bactériennes ciblées
- Distribution des CMI de chaque espèce (et en fonction des mécanismes de résistance à cette famille)
- Pharmacocinétique chez l'homme
- Données pharmacodynamiques
- Informations données par la modélisation (ex :Monte Carlo)
- Données cliniques : relation évolution clinique et CMI
- Connaissance des mécanismes de résistance et des CMI des souches hébergeant ces mécanismes

# Méthode de routine : l'antibiogramme

*Antibiogramme par diffusion*  
*Courbes de concordance CMI - diamètres*



# Pourquoi une lecture interprétative ? (1)

- Quand la résistance acquise est très marquée, l'utilisation des valeurs critiques et la catégorisation des souches en S, I ou R permet de détecter la résistance acquise
- Exemples :
  - Entérobactéries du groupe 1 (*E.coli*, *P. mirabilis*, Salmonelle, Shigelle) et aminopenicillines, carboxypénicillines, quinolones, chloramphénicol, sulfamides, triméthoprim
  - *P.aeruginosa* et ticarcilline, ceftazidime, imipénème, Fquinolones
  - *S.aureus* et macrolides, gentamicine, tobramycine

# Pourquoi une lecture interprétative ? (2)

Si l'expression phénotypique est peu marquée

ou si la sensibilité naturelle de l'espèce à l'antibiotique en question est grande

Alors les souches de sensibilité diminuée ne sont pas classées dans la catégorie I ou R

## Exemples

- Entérobactéries du groupe 1 de sensibilité diminuée aux C1G et à amoxy-clav liée à la production de pénicillinase
- *E.coli* de sensibilité diminuée aux C3G mais non producteur de BLSE (souches hyperproductrices de céphalosporinase)
- Entérobactéries de sensibilité diminuée aux fluoroquinolones

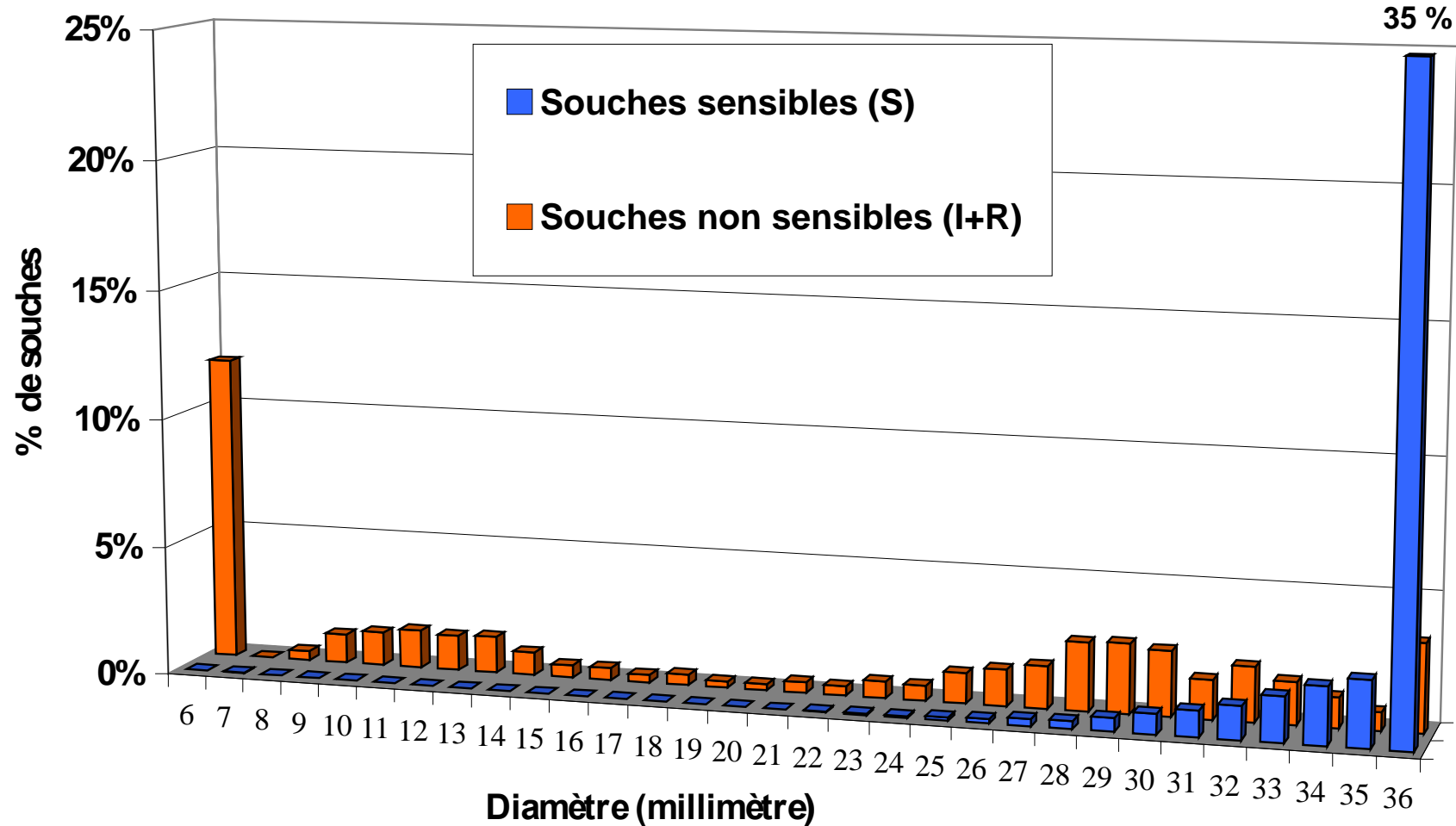
# Pourquoi une lecture interprétative ? (3)

Le caractère anormale de ces souches peut être détecté en utilisant des antibiotiques marqueurs (de la même famille).

Exemples :

- *E.coli* et C3G grâce à la résistance aux C1G qui permet de détecter les souches hyperproductrices de céphalosporinases
- Entérobactéries et Fquinolones, grâce à la résistance aux quinolones classiques (NAL) qui permet de détecter les souches ayant un bas niveau de résistance aux Fquinolones

# *E.coli* : Distribution des diamètres d'inhibition de la ciprofloxacine pour des souches Nal S et Nal R





# Pourquoi une lecture interprétative ? (4)

Le caractère anormale de ces souches peut être détecté par des tests qualitatifs signalant un mécanisme de résistance

Exemples :

- *S.aureus* et bêtalactamines par la détection de microcolonies dans la zone d'inhibition de l'oxacilline en milieu hypersalé ou incubé à 30°, de la PLP2a par méthode immunoenzymatiques ou génétique
- Entérobactéries et C3G par la détection de BLSE à l'aide du test de synergie entre les C3G et l'acide clavulanique et le sulbactam

# Méthodes de détection des mécanismes de résistance

- **Méthodes indirectes**

- évoquent la présence d'un mécanisme de résistance
  - antibiotiques marqueurs
  - synergie entre deux antibiotiques

- **Méthodes directes**

- mécanismes biochimiques
  - ex: production de  $\beta$ -lactamase chez *N. gonorrhoeae*, *H. influenzae*
- support génétique de la résistance
  - ex: mise en évidence des gènes *mecA* (staphylocoques), *vanA*, *vanB* (entérocoques), *rpoB* (*M. tuberculosis*)

# La lecture interprétative commence par les choix des antibiotiques à tester

## Recommandations CA-SFM

- **Par espèce ou groupe bactérien**
- **Antibiogramme standard (liste 1)**
  - antibiotiques nécessaires à l'orientation thérapeutique, en fonction des indications cliniques (type d'infection) et de la prévalence de la résistance acquise
- **Tests complémentaires (liste 2)**
  - Intérêt épidémiologique, aptitude à détecter un mécanisme de résistance ou antibiotique de recours



# La lecture interprétative est une démarche

L'identification précise de la souche est un prérequis

- **Phénotype de résistance observé *in vitro***

- lecture des CMI, diamètres ou galeries
- cohérence avec l'identification (R naturelles)
- connaissance des mécanismes R acquises
- tests complémentaires éventuels
  - Mécanismes R peu exprimés



- **Déduction du mécanisme de résistance probable**

- validation/ corrections résultats



**Rendu de l'antibiogramme en S, I, R**  
**Commentaires (équivalence, conseils)**

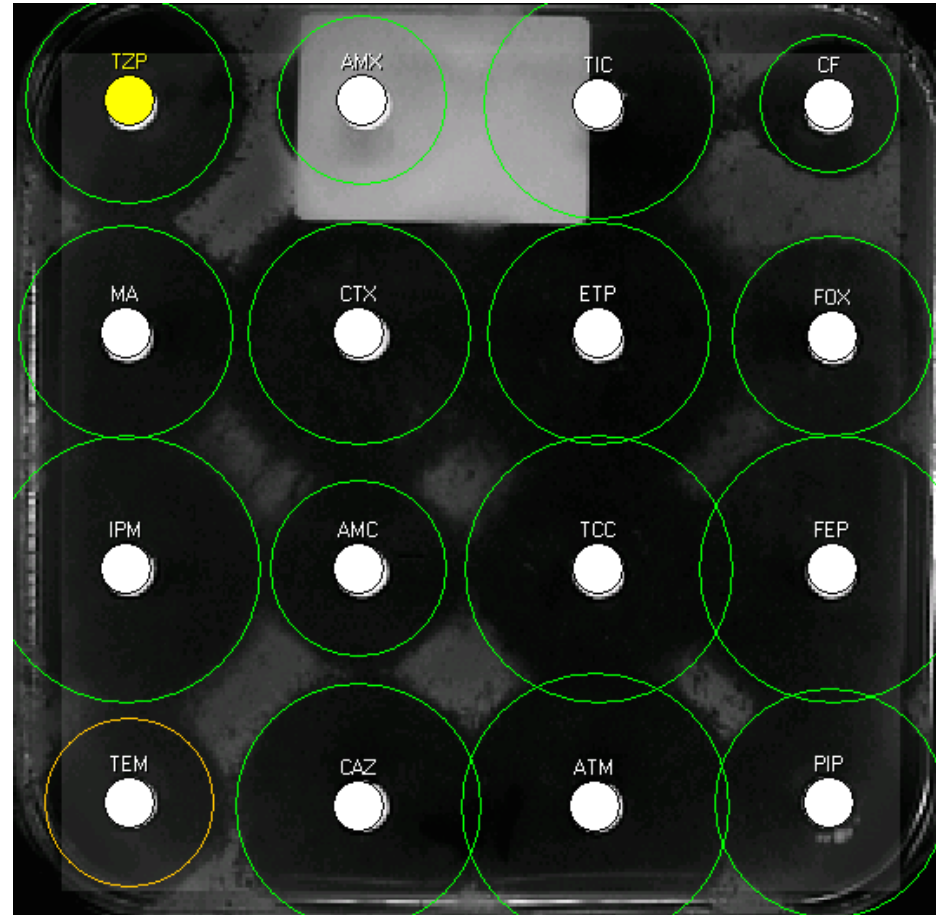
# Atelier Antibiogramme Entérobactéries

# Liste des antibiotiques à tester sur les entérobactéries pour dépister les résistances

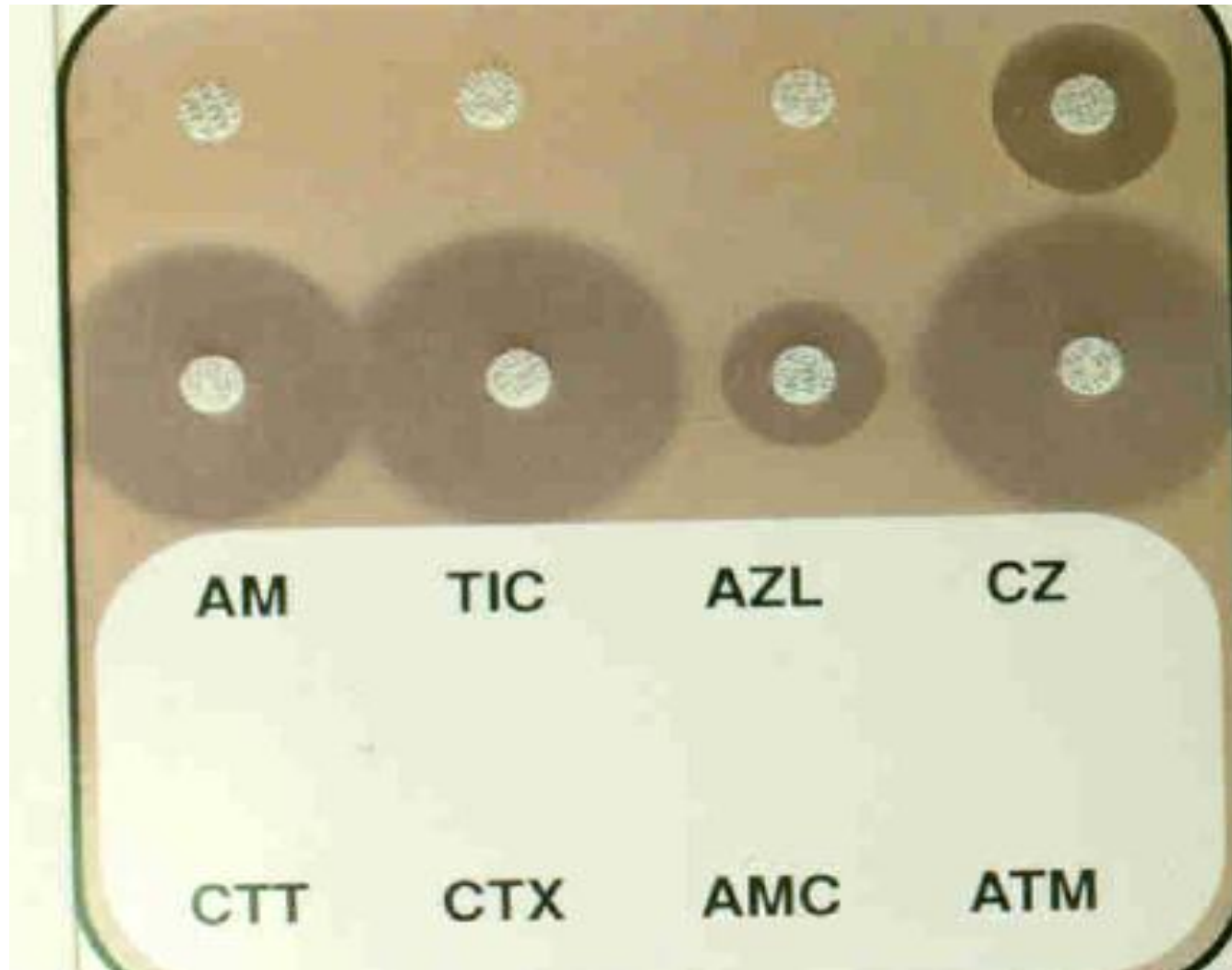
Liste standard	Liste complémentaire
Ampicilline ou Amoxicilline	Céfuroxime
Amoxicilline/acide clavulanique	Aztéonam
Ticarcilline	Netilmicine
Ticarcilline/acide clavulanique <sup>1</sup>	Tobramycine
Mécillinam	Lévofloxacine
Témocilline <sup>1</sup>	Chloramphénicol
Pipéracilline	Tigécycline
Pipéracilline/tazobactam	Triméthoprime
Cefadroxil ou céfalexine	Colistine
Céfoxitine	Azithromycine
Céfotaxime ou ceftriaxone	
Ceftazidime	
Céfépime	
Céfixime	
Imipénème ou méropénème ou doripénème	
Ertapénème	
Amikacine	
Gentamicine	
Acide nalidixique	
Ofloxacine ou norfloxacine	
Ciprofloxacine	
Cotrimoxazole	
Nitrofuranes	
Fosfomycine	

<sup>1</sup> Utile pour l'algorithme de détection des carbapénémases

# *E.coli* Phénotype sauvage



*E.coli* pénicillinase +





# Entérobactéries et céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération

- Les concentrations critiques des céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération ont été définies en sorte que la très grande majorité des isolats cliniques producteurs de mécanismes de résistance importants sur le plan clinique tels que les BLSE et les céphaloporinases hyperproduites chez les Enterobacteriaceae seront catégorisées «intermédiaires» ou «résistantes» à ces molécules **ce qui dispense de tout recours à l'interprétation des résultats pour des raisons thérapeutiques.**
- Certains isolats bactériens qui produisent des BLSE sont catégorisés «sensibles» aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> génération et doivent être rapportés comme tels.

La détection des BLSE reste indispensable pour des objectifs autres que thérapeutiques (épidémiologie, mesure d'hygiène et d'isolement, par exemple).

Les méthodes quantitatives peuvent consister en :

-- la mesure d'une augmentation de 5 mm du diamètre de la zone d'inhibition d'un disque de céfotaxime, ceftazidime et céfépime combiné(s) à l'acide clavulanique comparativement à la zone d'inhibition autour de ce(s) même(s) disque(s) utilisé(s) sans acide clavulanique.

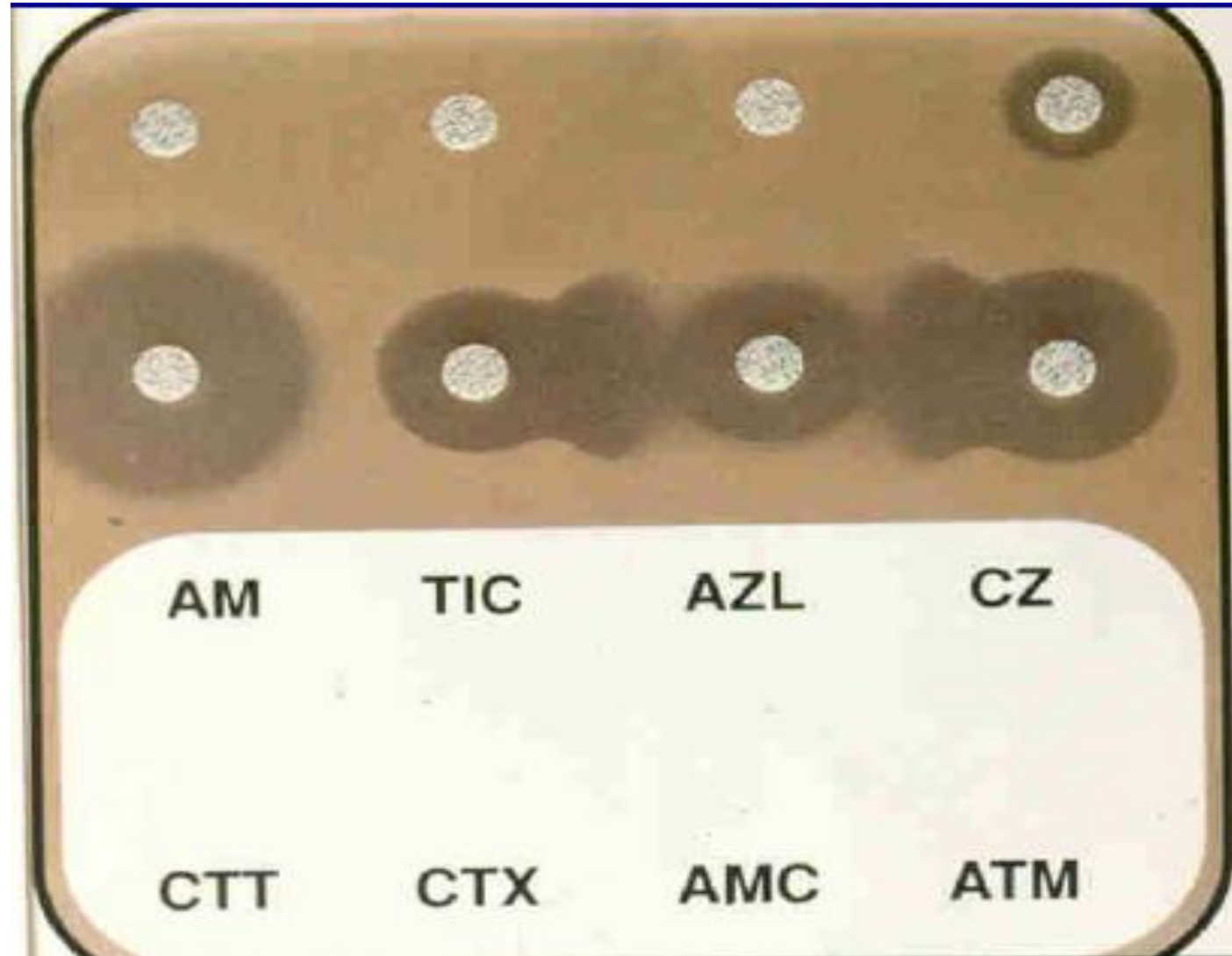
-- la diminution d'au moins 3 dilutions de la CMI de ces céphalosporines mesurée en présence d'acide clavulanique. Toute synergie significative témoigne de la présence d'une BLSE et permet de distinguer ces enzymes de certaines  $\beta$ -lactamases plasmidiques non BLSE hyperproduites (OXA-1/30, SHV-1)

La détection des BLSE reste indispensable pour des objectifs autres que thérapeutiques (épidémiologie, mesure d'hygiène et d'isolement, par exemple).

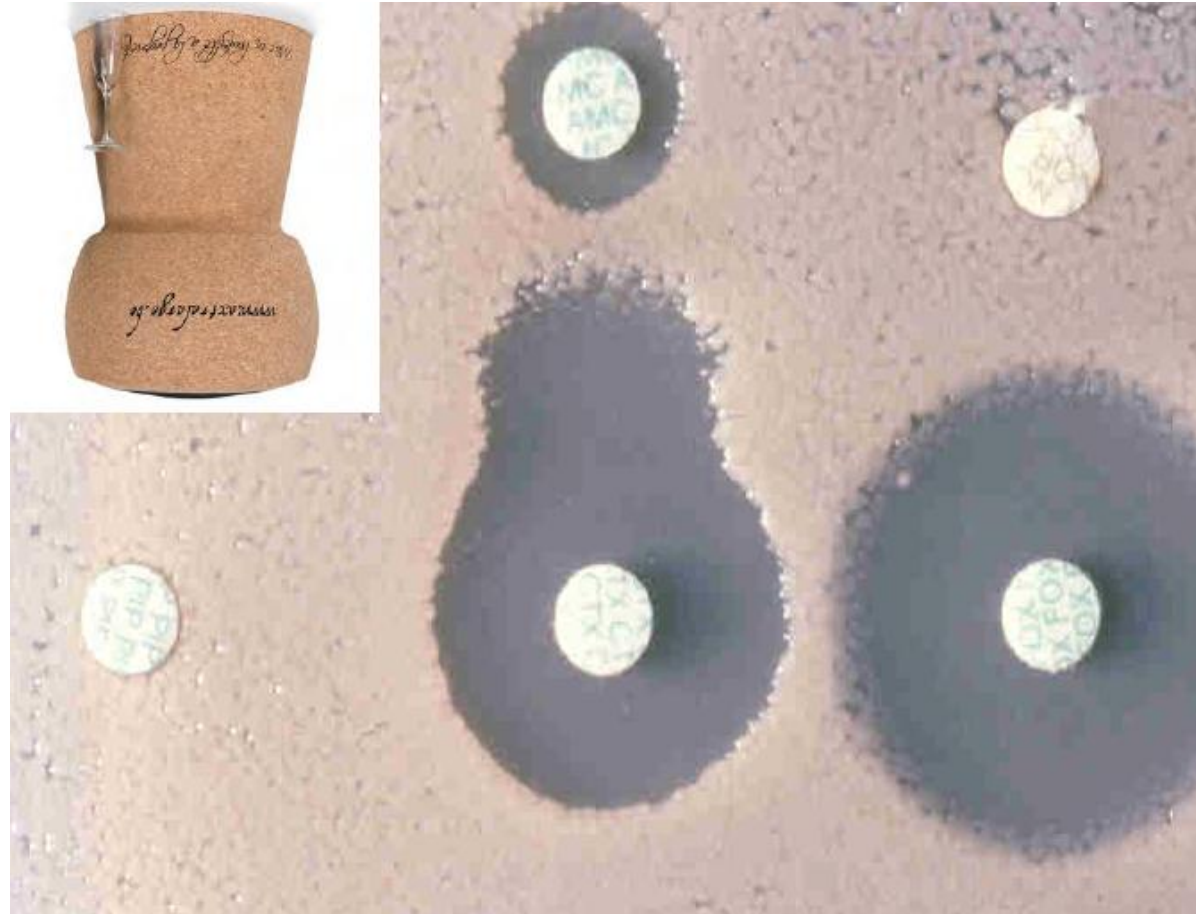
Synergie en « bouchon de champagne » : placer un disque de céfotaxime, ceftazidime et céfépime à 30mm d'un disque d'acide clavulanique

Toutefois, si les isolats cliniques producteurs de BLSE ont aussi d'autres mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines comme l'hyperproduction de céphalosporinase, la détection de l'image de synergie peut être facilitée par le rapprochement des disques de céphalosporine de celui du disque contenant de l'acide clavulanique ou en pratiquant un antibiogramme standard sur gélose Mueller-Hinton additionnée de 250mg/L de cloxacilline (inhibiteur de céphalosporinase)

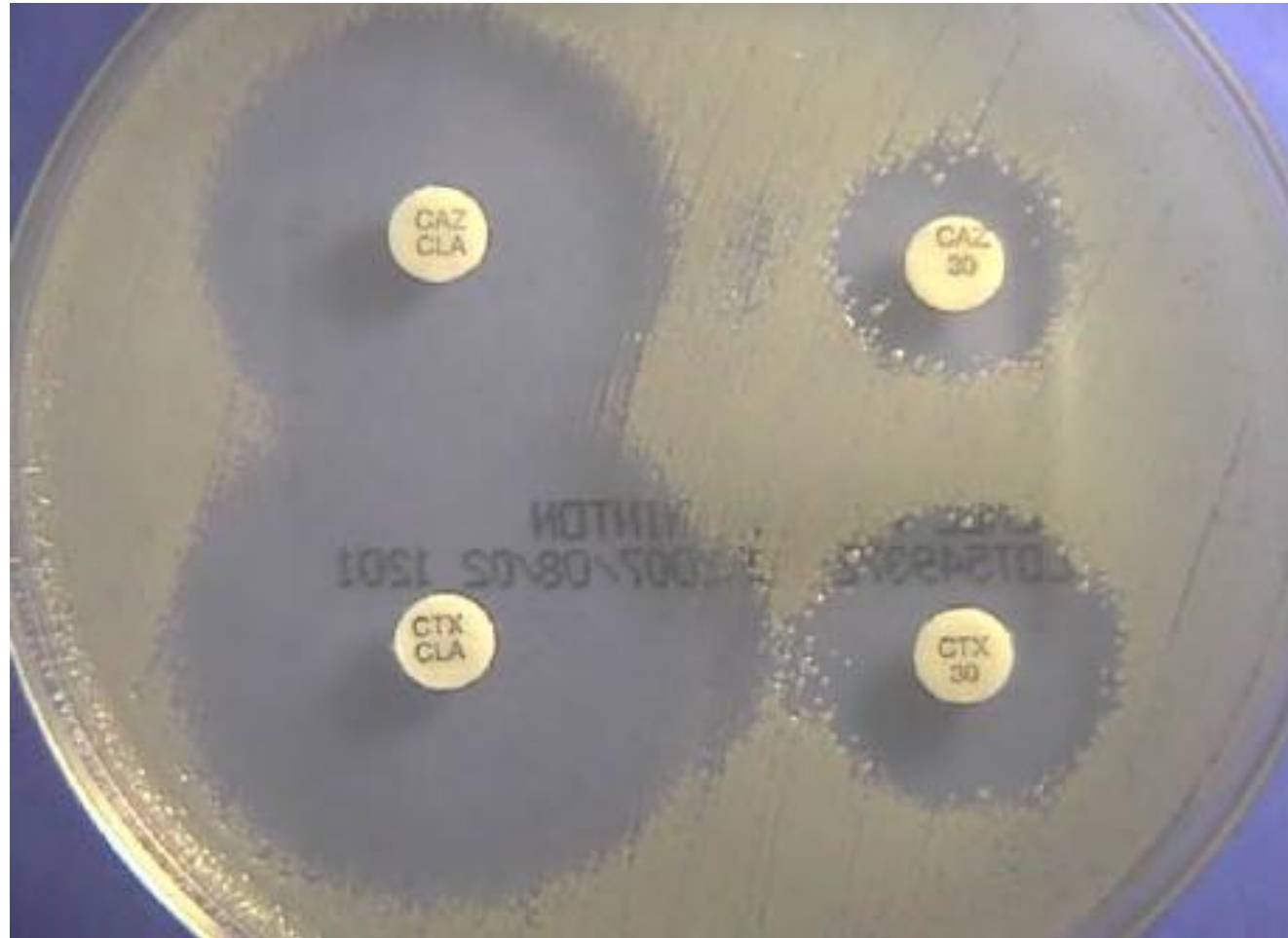
*E.coli* BLSE +



# Bouchon de champagne



# C3G + clavulanate versus C3G



*E.coli* BLSE +



# La détection de BLSE : pièges

- Chez *K. oxytoca* , *P. vulgaris* et *P. penneri* , la présence d'une synergie significative entre une céphalosporine de 3ème génération et un disque contenant de l'acide clavulanique peut résulter de l'hyperproduction de la  $\beta$ -lactamase naturelle chromosomique et beaucoup plus rarement d'une BLSE, surtout en l'absence de résistance acquise aux autres familles d'antibiotiques.



# La détection de BLSE : pièges

Chez certaines espèces intrinsèquement très sensibles aux  $\beta$ -lactamines (*P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. penneri*, *P. stuartii* et *P. rettgeri*), les BLSE s'expriment à bas niveau.

Leur détection est facilitée par la recherche d'une synergie significative entre un disque d'une céphalosporine de 3ème génération et un disque contenant de l'acide clavulanique placés à une distance de 40-45 mm ou par la mesure des CMI des céphalosporines en absence et en présence d'acide clavulanique.

# La détection de BLSE : pièges

Une souche catégorisée «intermédiaire» ou «résistante» au céfotaxime et/ou ceftriaxone et/ou ceftazidime et/ou aztréonam en l'absence de synergie entre ces molécules et l'acide clavulanique est évocatrice d'une souche hyperproductrice de céphalosporinase chromosomique (Enterobacteriaceae du groupe III et *E. coli*) ou d'une céphalosporinase plasmidique (toutes espèces d'Enterobacteriaceae).

La réalisation d'un antibiogramme standard sur gélose Mueller-Hinton additionnée de 250 mg/L de cloxacilline permet de vérifier :

que la résistance observée est bien liée à ce type de mécanisme (restauration de la sensibilité aux molécules précitées lorsqu'il n'y a pas d'autre mécanisme de résistance aux  $\beta$ -lactamines) et

de détecter une éventuelle  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE) associée qui serait masquée par l'hyperproduction d'une céphalosporinase.

Question du clinicien :« êtes-vous sûr qu'un traitement par la C3G en question va être efficace chez le patient infecté par la souche catégorisée S à la C3G hydrolysée par la BLSE ? ».

Question du clinicien : « êtes-vous sûr qu'un traitement par la C3G en question va être efficace chez le patient infecté par la souche catégorisée S à la C3G hydrolysée par la BLSE ? ».

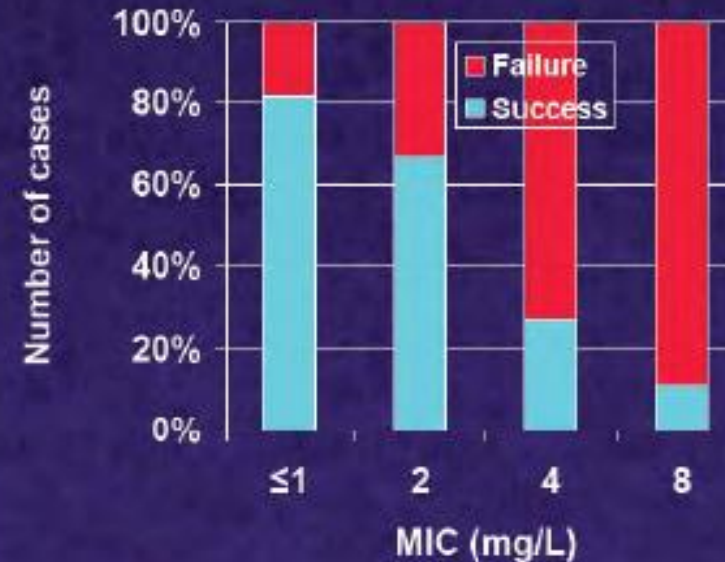
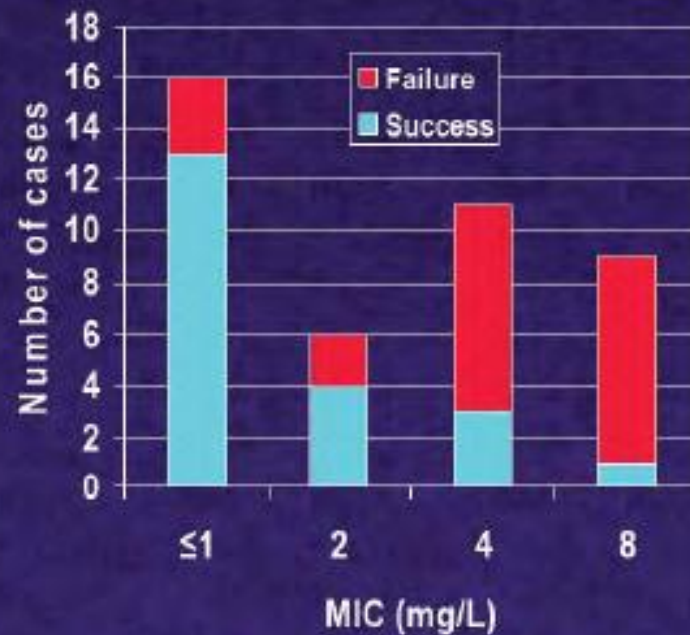
Réponse :

déterminer la CMI exacte de la C3G en question et confronter cette valeur à la valeur résiduelle normalement attendue à la posologie utilisée,  
puis suivre l'efficacité du traitement par cette C3G si elle est retenue pour le traitement.

« êtes-vous sûr qu'un traitement par la C3G en question va être efficace chez le patient infecté par la souche catégorisée S à la C3G hydrolysée par la BLSE ? ».

## Outcome versus 3GC MIC

Septicaemia from *Klebsiella* spp and *E. coli* with ESBLs



Data from Paterson et al JCM 2001; 39:2206; Kim et al AAC 2002; 46:1481;  
Wong-Beringer et al CID 2002; 34:135; Kang et al AAC 2004; 48:4574;  
Bhavnani et al DMID 2006; 54:231

# Entérobactéries et carbapénèmes

Les concentrations critiques des carbapénèmes ont été définies de sorte que les isolats cliniques producteurs de mécanismes de résistance importants sur le plan clinique incluant la majorité des carbapénémases chez les Enterobacteriaceae sont catégorisés «intermédiaires» ou «résistants» à ces molécules.

Toutefois, certains isolats d'entérobactéries producteurs de carbapénémases (EPC) sont catégorisés «sensibles» aux carbapénèmes et doivent être rapportés comme tels ; la présence d'une carbapénémase n'interfère pas sur la catégorisation de ces EPC

# La sensibilité aux carbapénèmes des entérobactéries

- Toutes les espèces sont naturellement sensibles
- Hormis les *Protae* (*P. mirabilis*; *M. morgani*) qui sont de sensibilité diminuée en raison de PLP peu affines
- Deux types de mécanisme de résistance acquise ont été identifiés :
  - Défaut d'accumulation de l'antibiotique (expression modifiée des porines et/ou pompes d'efflux) associé à la production de céphalosporinase et/ ou de BLSE
  - Production de carbapénémase
    - classe A : KPC
    - classe B : métallo-enzymes (VIM, IMP, NDM)
    - classe D : OXA-48 et ses variants

La détection des carbapénémases est cependant recommandée sur le plan épidémiologique pour surveiller et contrôler leur diffusion.

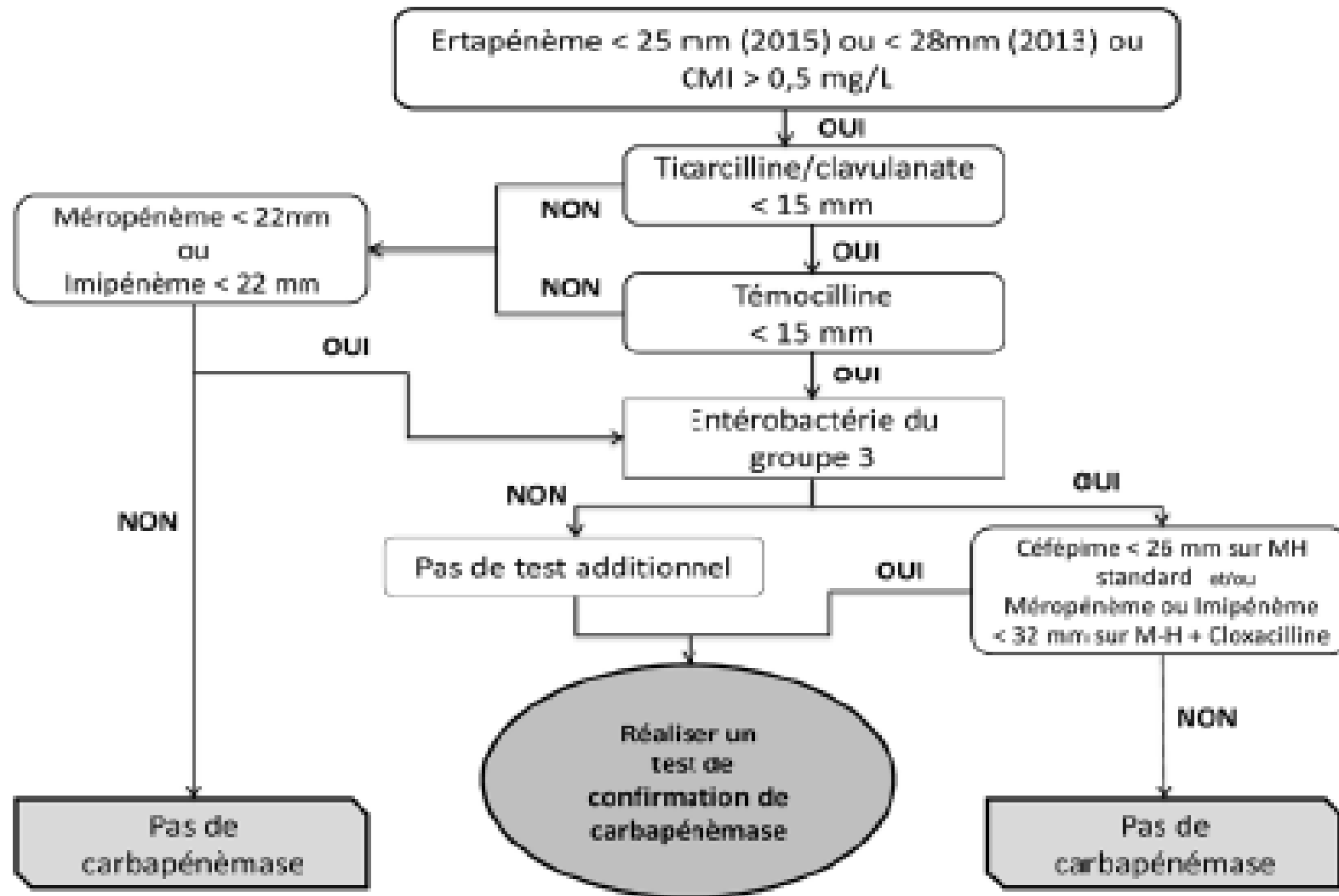
Il faut donc considérer comme SUSPECTE d'EPC toute souche de SENSIBILITE DIMINUEE (I/R) à au moins l'une des carbapénèmes

La détection des EPC par de simples tests phénotypiques n'est pas aisée car le niveau de résistance aux carbapénèmes est variable et peut parfois être à la limite du seuil de sensibilité.

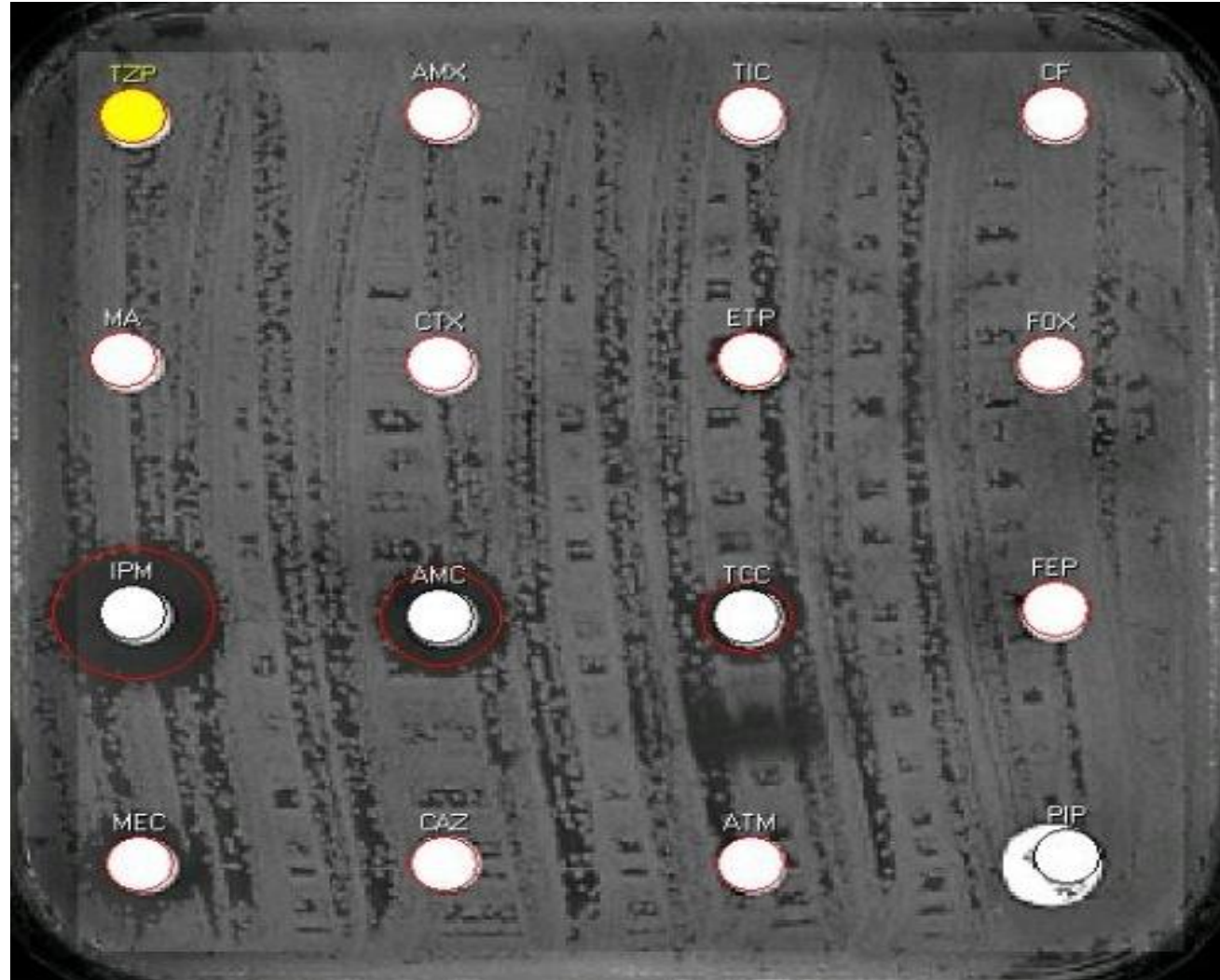
L'ertapénème est le carbapénème qui possède la meilleure sensibilité pour la détection des EPC. Ainsi, toute souche possédant une diminution de sensibilité à l'ertapénème [CMI > 0,5 mg/L ou un diamètre d'inhibition (disque 10 µg/ml) < 25 mm par le test de diffusion en gélose peut être soumise à l'algorithme de screening des souches productrices de carbapénémase.



# Algorithme de screening des souches productrices de carbapénémases

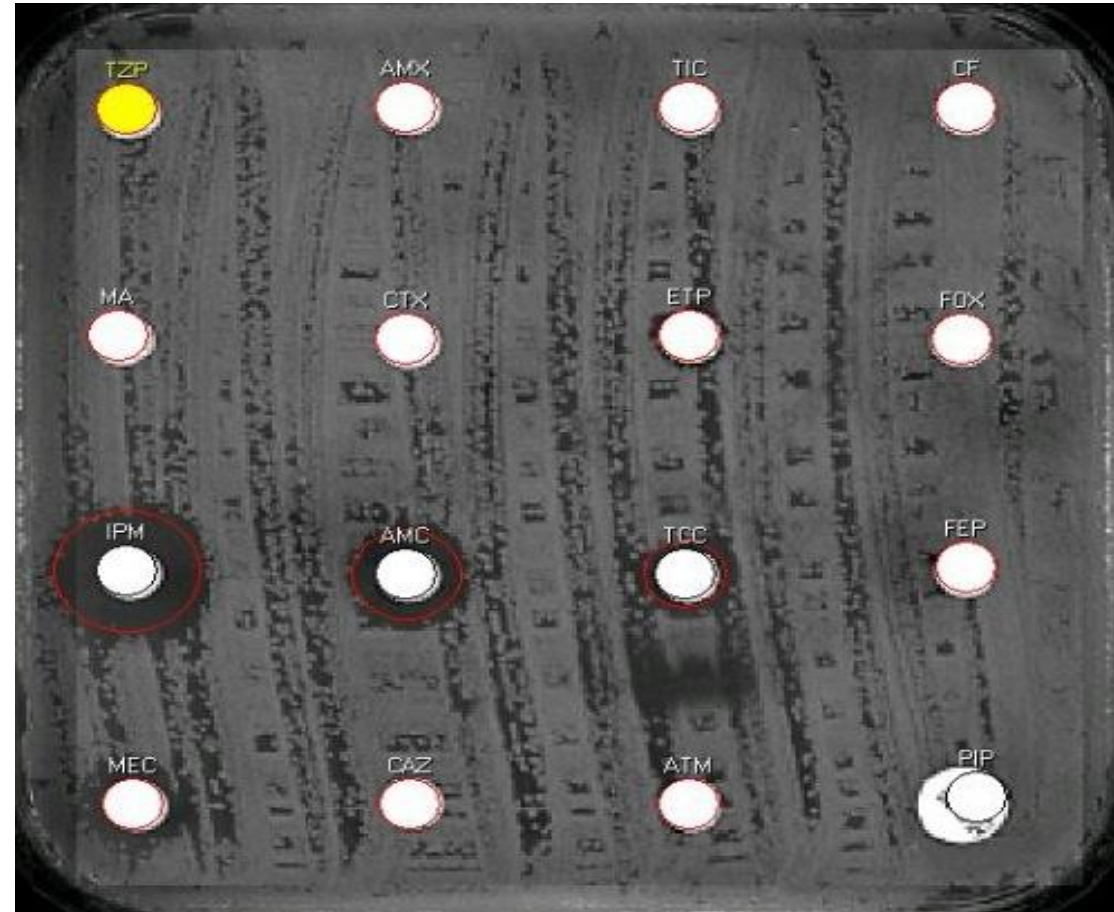


*E.coli*



Témocilline 08

*Escherichia coli* producteur de 2 enzymes  
(NDM1 et BLSE) menant à la multirésistance



**IMPASSE THERAPEUTIQUE**

# Qualité du dépistage

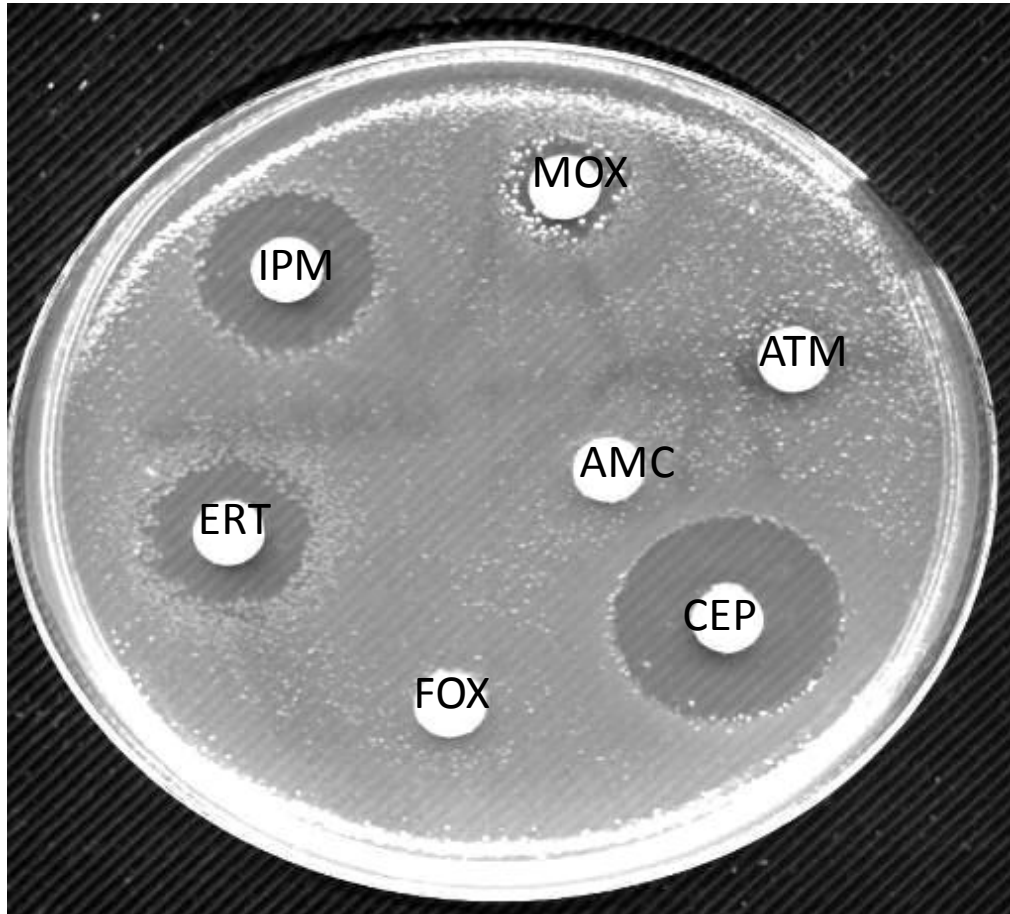
- Sensibilité 100%
- Spécificité variable de 79 à 69% selon l'utilisation ou non en complément de la gélose MH + cloxacilline pour les entérobactéries du groupe 3

# Test phénotypiques pour la détection des carbapénémases

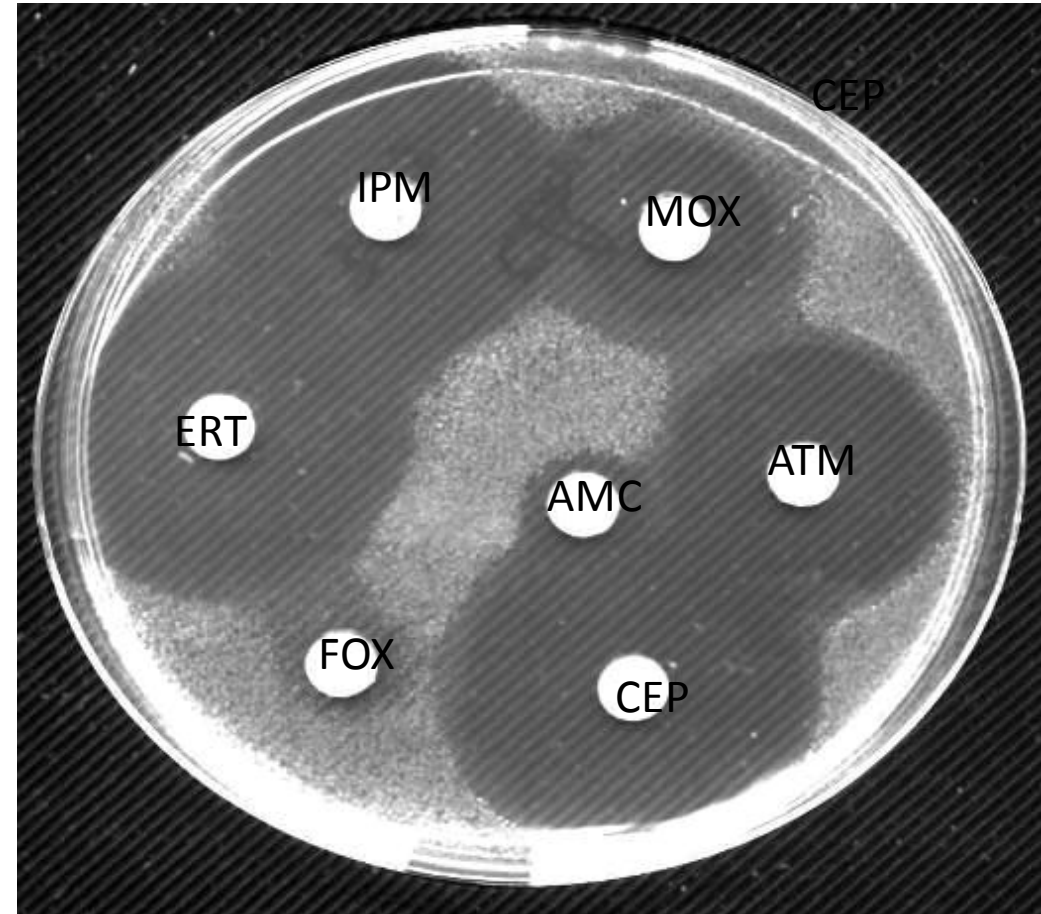
- Antibiogramme standard
- Le test Rosco diagnostica Néo Sensitabs KPV et MLB confirm test (Eurobio)
- Et le kit métallobêtalactamase test strips (bioMérieux)
- Et pour les entérobactéries du groupe 3, antibiogramme sur gélose Mueller Hinton contenant 250 mg/L de cloxacilline (inhibiteur des céphalosporinases) pour déterminer les diamètres d'inhibition vis-à-vis des souches d'entérobactéries du groupe 3 productrices d'une céphalosporinase d'origine chromosomique.

# Carbapénémase?

Sans cloxa

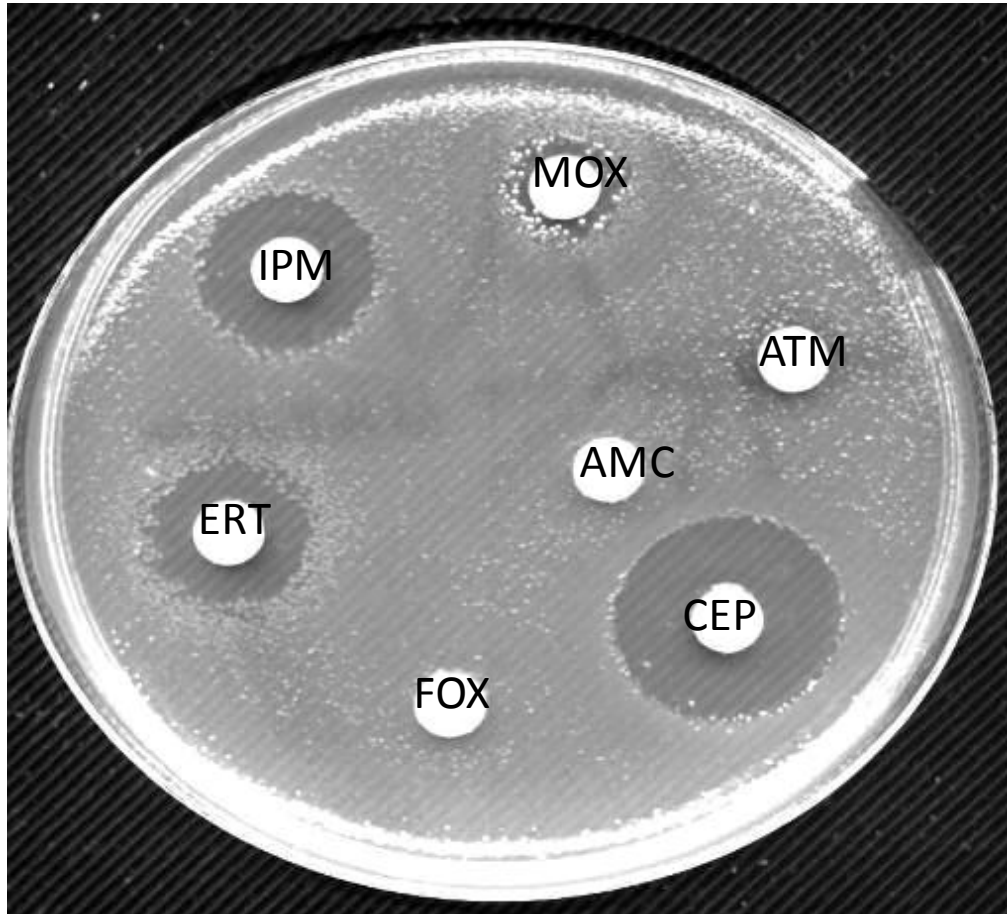


Avec cloxa 250 mg/L : inhibition des céphalosporinases

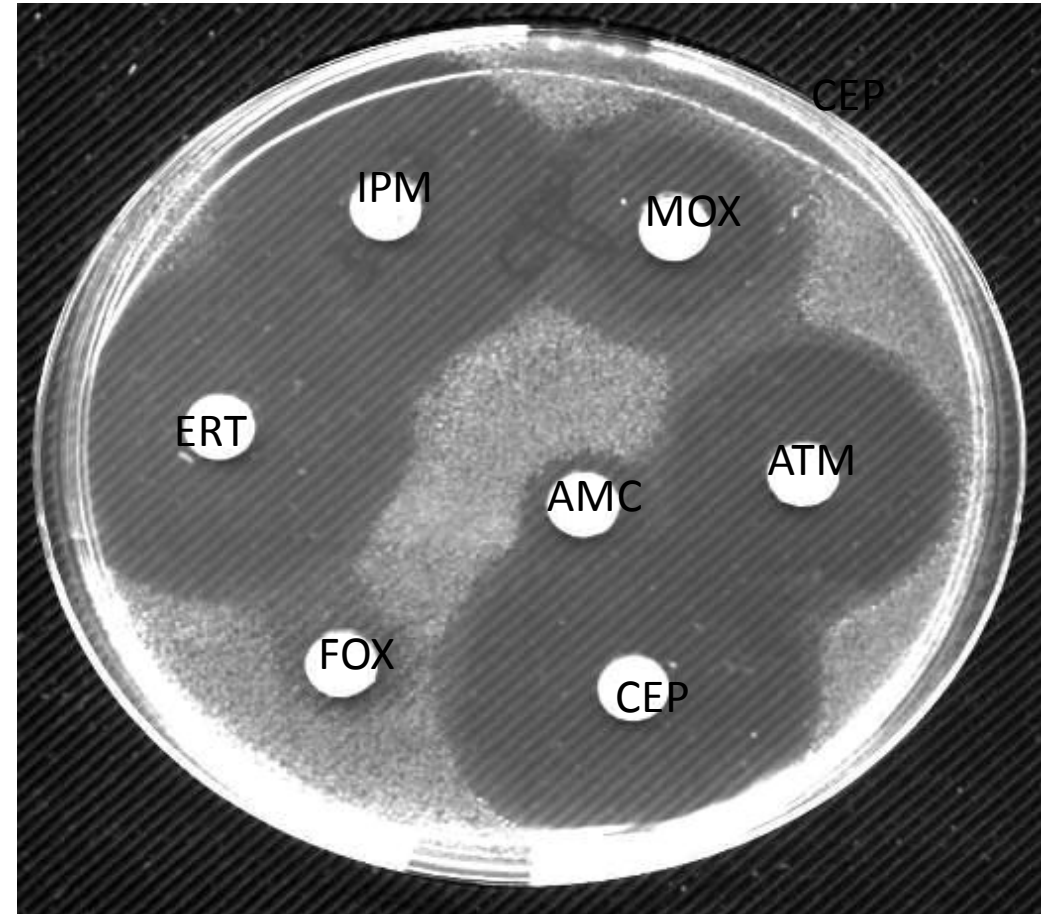


# Imperméabilité et Céphalosporinase hyperproduite

Sans cloxa

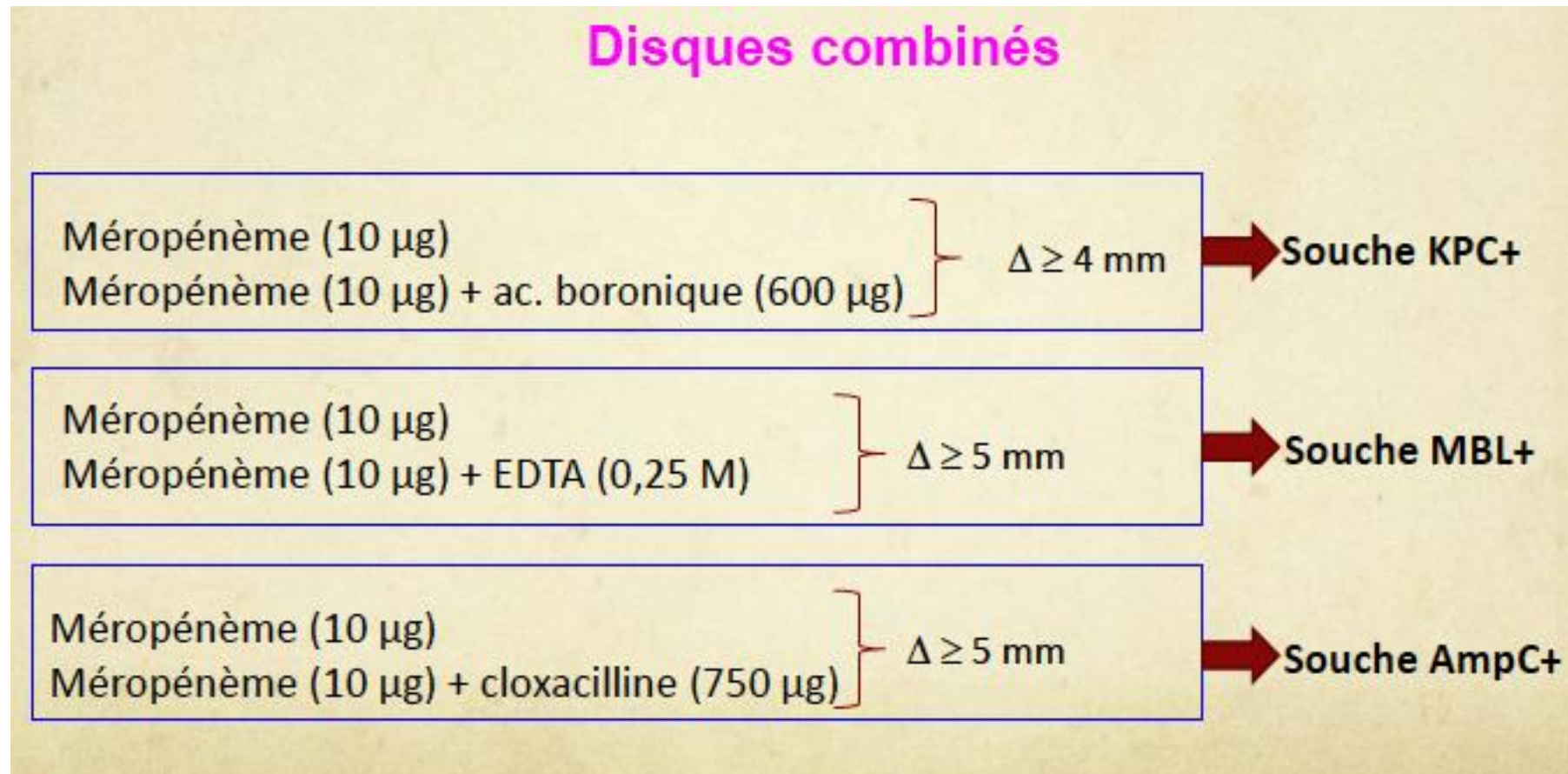


Avec cloxa 250 mg/L : inhibition de la céphalosporinase





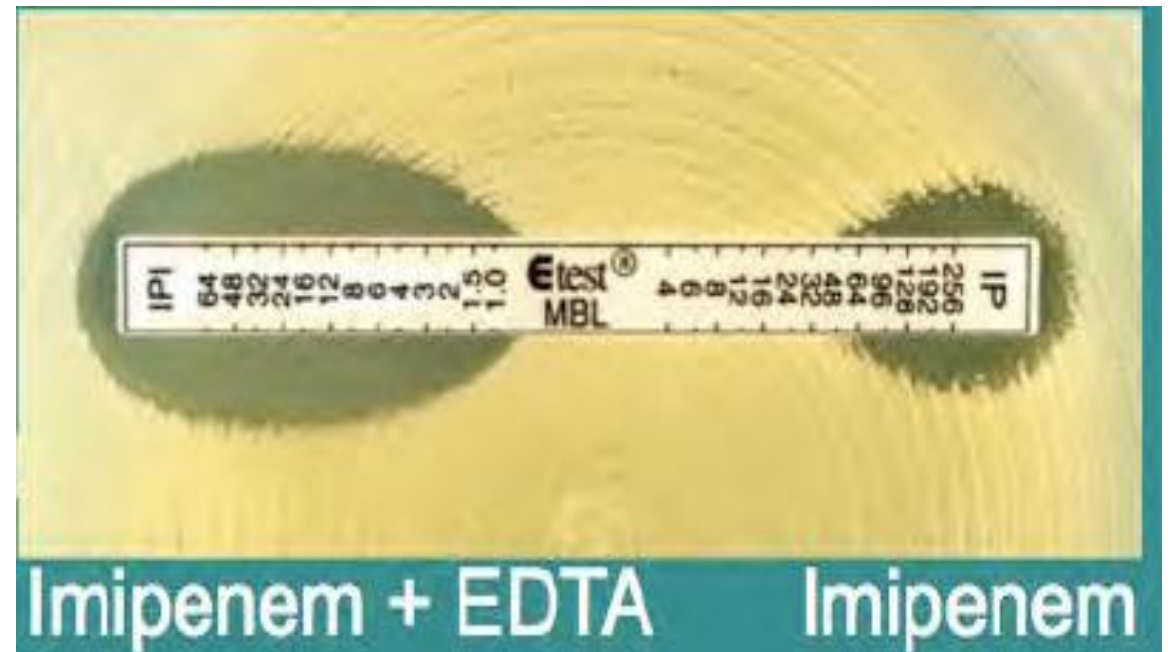
# Autres recommandations d'experts pour la détection des carbapénémases de classe A et B



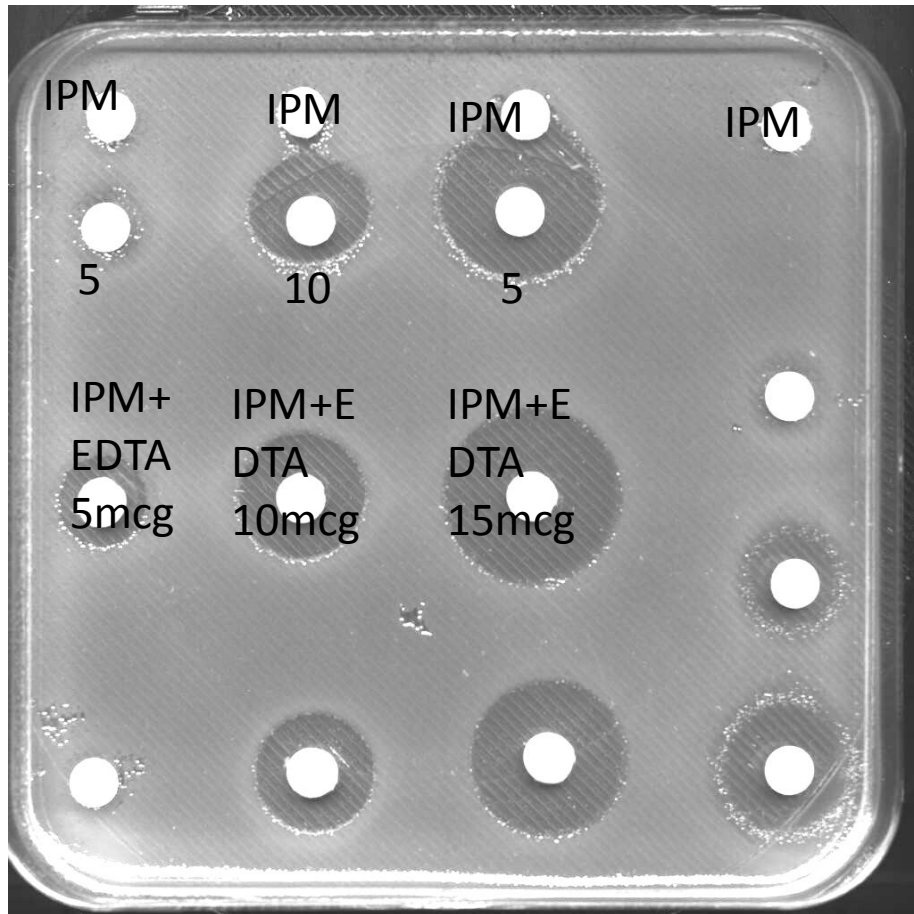


# Métallo bêtalactamase

Une réduction de 3 dilutions de la CMI d'imipénème en présence d'EDTA est interprétée comme positive

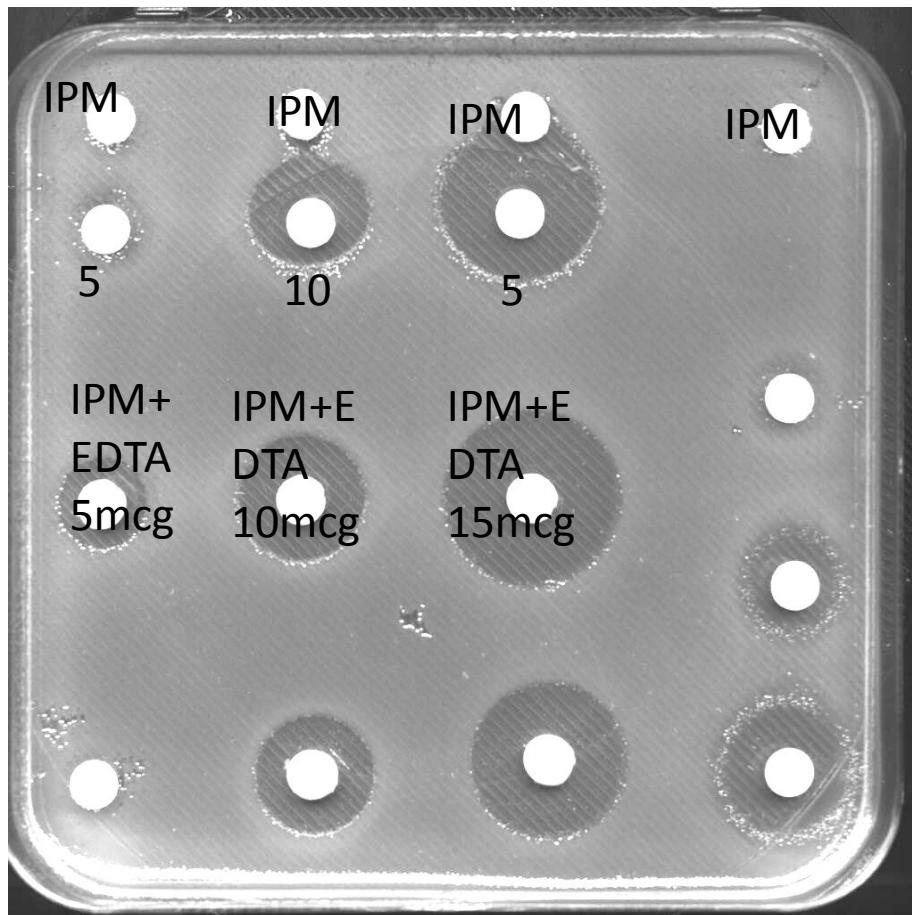


# Carbapénémase ?



# Carbapénémase classe B : MBL

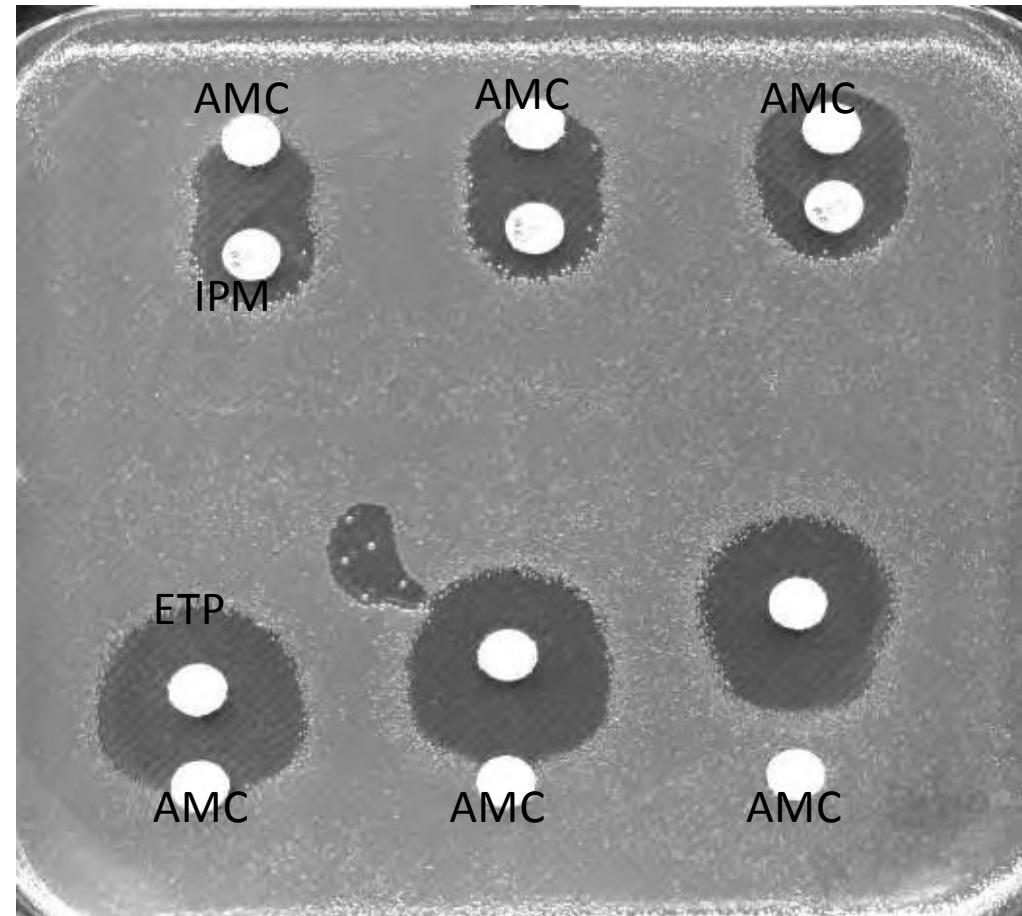
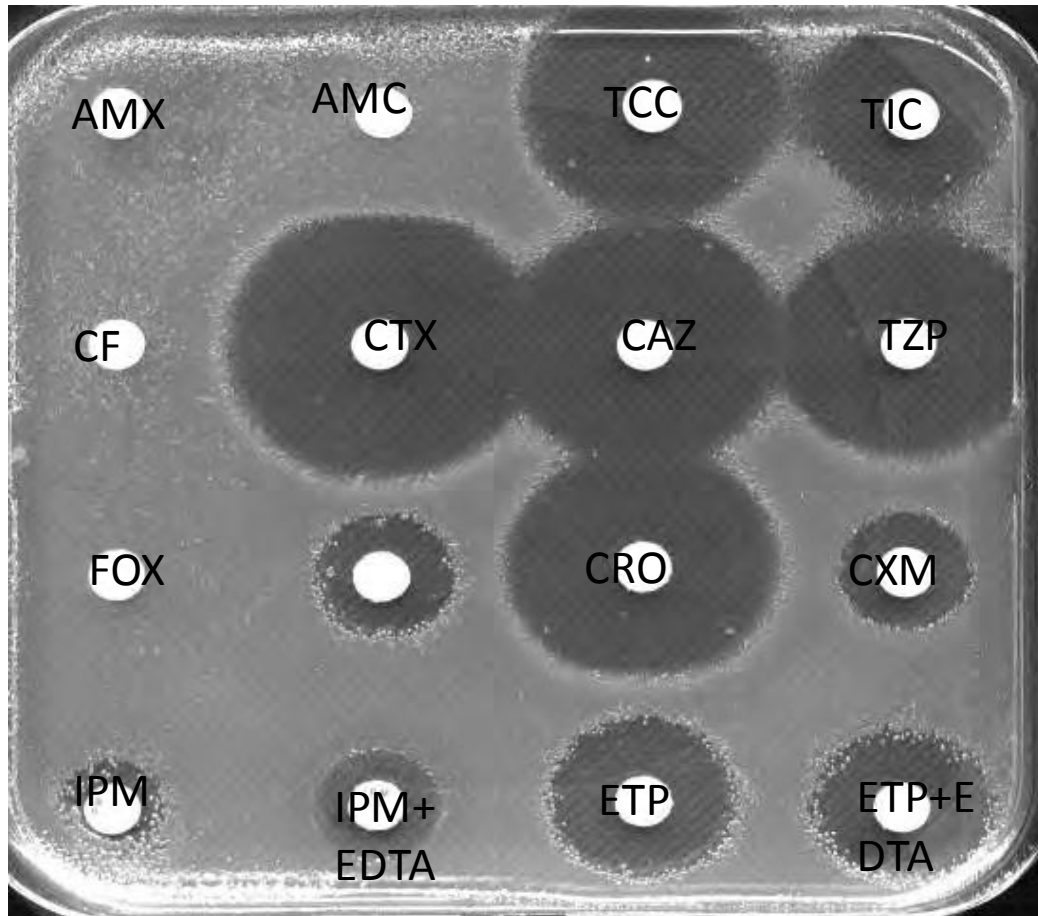
Hydrolyse de l'imipénème inhibé par l'EDTA



IPM 128mg/L  
IPM + EDTA 16 mg/L

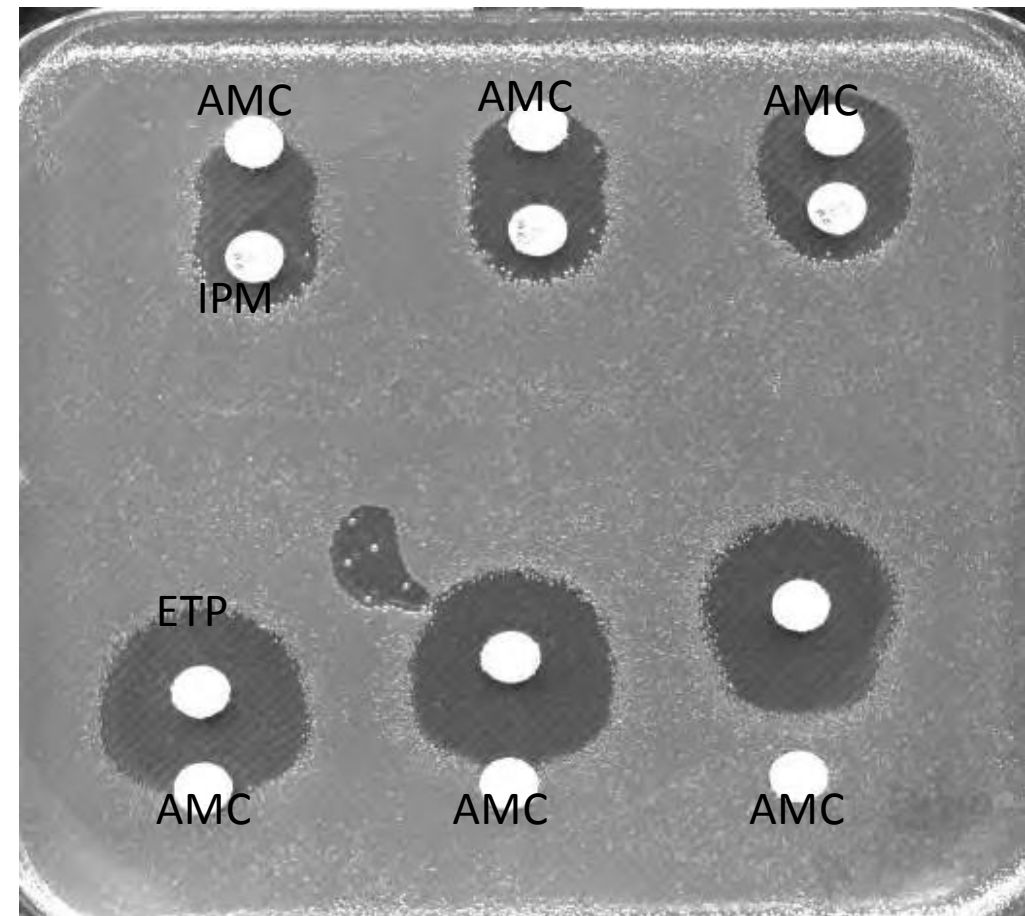
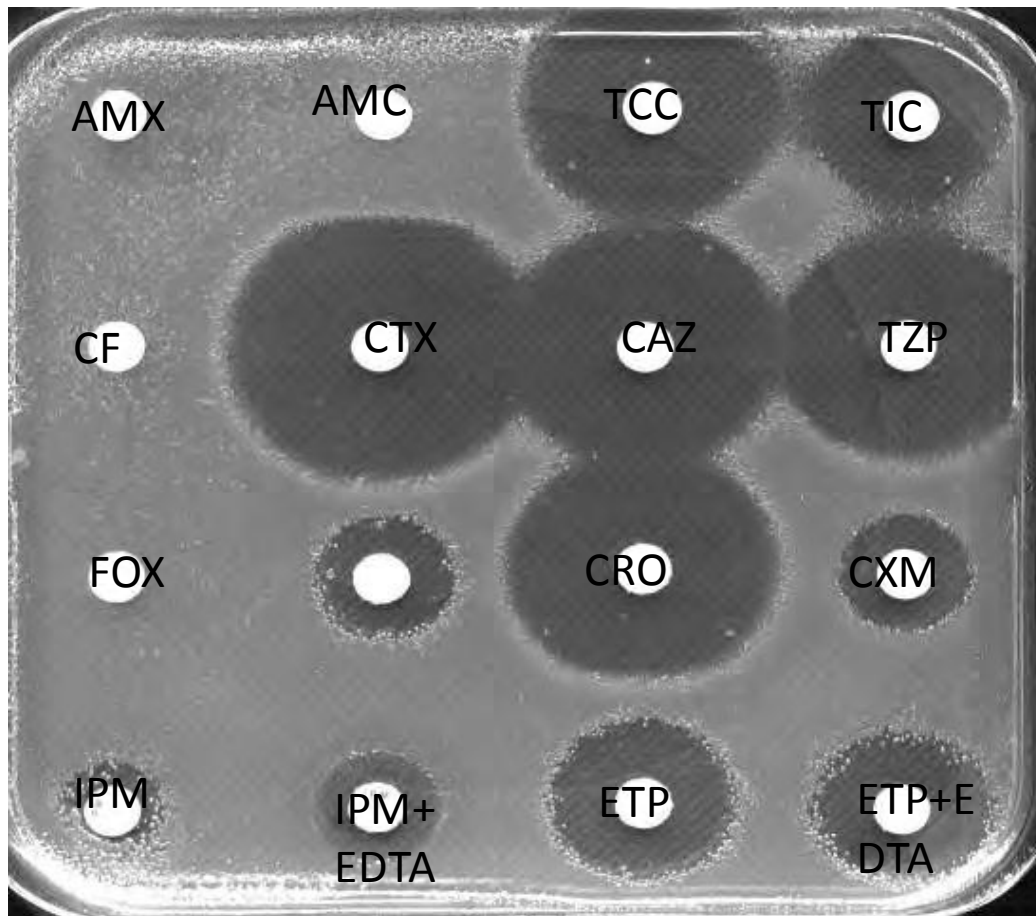


# Carbapénémase ?





# Carbapénémase de classe A



# Nombre d'épisodes impliquant des entérobactéries productrices de carbapénémases en France (01/2004 – 4/03/2015) selon les bactéries

Bactérie	Episodes dans lesquels la bactérie est impliquée	
	Nb d'épisodes	% des épisodes
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 205	59
<i>Escherichia coli</i>	683	34
<i>Enterobacter cloacae</i>	251	12
<i>Citrobacter freundii</i>	103	5
<i>Klebsiella oxytoca</i>	56	3
<i>Citrobacter (autre que freundii)</i>	38	2
<i>Enterobacter aerogenes</i>	34	2
<i>Serratia</i>	15	<1
<i>Proteus</i>	10	<1
<i>Morganella morganii</i>	8	<1
<i>Enterobacter autres</i>	7	<1
<i>Providencia</i>	5	<1
<i>Raoultella</i>	4	<1
<i>Salmonella</i>	4	<1
Autres espèces	2	<1
<b>Total des épisodes</b>	<b>2 026*</b>	<b>**</b>

78% OXA-48 et variants



\* Deux bactéries ou plus avec le même mécanisme de résistance associées dans 331 épisodes.

\*\* Total supérieur à 100% car plusieurs bactéries associées dans 331 épisodes

## Taux d'incidence (/100 admis) des entérobactéries productrices de carbapénémases

Type d'établissement	BLSE	NS aux Carba	Carbase+
CHU	0,76	0,10	0,003
CH	0,52	0,06	0,002
<b>Tous</b>	<b>0,73</b>	<b>0,08</b>	<b>0,003</b>

**250 fois moins que les E-BLSE**

# Atelier Antibiogramme Entérobactéries

## les fluoro-quinolones

La résistance aux fluoroquinolones est croisée entre les différentes molécules mais son niveau d'expression peut varier pour chaque molécule.

Les isolats d'Enterobacteriaceae catégorisés «sensibles» à la norfloxacin sont catégorisés «sensibles» aux autres fluoroquinolones.

Pour les isolats cliniques catégorisés «intermédiaires» ou «résistants» à la norfloxacin, des différences d'activité intrinsèque des autres fluoroquinolones impliquent un test et une réponse indépendante pour les autres fluoroquinolones

Si une souche d'entérobactéries est catégorisée résistante à la ciprofloxacine, il doit l'être vis-à-vis de toutes les fluoroquinolones (2 mutations dans les gènes *gyrA* ou *gyrA* + *parC*)



# *E.coli* et quinolones



Quelle est la réponse ?

Réponse	Ac. nalidixique	Ofloxacine	Ciprofloxacine
1	R	I	S
2	R	I	I
3	R	R	R

# Colistine

CA SFM :

Concentrations critiques :  $S \leq 2\text{mg/L}$  \_  $R > 2\text{mg/L}$

Interprétation valable pour la polymyxine B.

« Les diamètres d'inhibition ne permettent pas de détecter toutes les résistances acquises ce qui impose de déterminer la CMI en cas d'utilisation thérapeutique.

Déterminer la CMI par dilution en milieu liquide (la micro-dilution est la méthode de référence). Les autres méthodes ne sont pas performantes pour cet antibiotique. »

# Emergence de la résistance à la colistine

Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J. 2016. 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* 16: 161–168. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7).

Schwarz S, Johnson AP. 2016. Transferable resistance to colistin: a new but old threat. *J Antimicrob Chemother* 71:2066–2070. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkw274>.

# Recommandations actuelles en France

Tester la résistance à la colistine et rechercher la présence du gène *mcr-1* chez toute souche d'EPC isolée :

- soit lors d'un dépistage systématique à l'admission d'un patient aux antécédents d'hospitalisation hors territoire métropolitain dans l'année, avec ou sans rapatriement direct,
- soit dans un prélèvement à visée diagnostique en cours d'hospitalisation dans un contexte clinique et thérapeutique nécessitant le recours à la colistine.

# Recommandations actuelles en France

Mettre en œuvre des précautions complémentaires d'hygiène, en plus des précautions standard pour la prise en charge d'un patient porteur d'une entérobactérie présentant le gène *mcr-1*, à l'instar de ce qui est recommandé pour les BHRe (15).

Procéder au signalement dans le cadre du dispositif des infections nosocomiales et adresser la souche au Centre National de Référence de la résistance aux antibiotiques.

**Mettre en œuvre des études épidémiologiques nationales de prévalence de la résistance à la colistine et de la présence du gène de résistance *mcr-1* chez les entérobactéries (quel que soient leurs profils de sensibilité aux antibiotiques) à partir des données de laboratoire de biologie médicale de ville et hospitaliers.**

# Remerciements à mes Collègues

- De l'ONERBA : Jérôme Robert, Jean Didier Cavallo, Vincent Jarlier
- Et à Luc Dubreuil

