

Adoption par les laboratoires de microbiologie en Suisse de la norme EUCAST pour tester la sensibilité des bactéries aux antibiotiques : implications microbiologiques et cliniques

Jacques Bille – Président Swiss Antibioqram Committee

Dans le numéro 2 (avril 2011) de la revue Pipette nous avons expliqué au nom du Comité Suisse de l'Antibiogramme pourquoi la Société Suisse de Microbiologie recommande l'adoption, à partir de 2011, des recommandations de l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) pour l'exécution et l'interprétation des antibiogrammes. Ce texte plus complet traite des implications microbiologiques et cliniques.

Organisation et objectifs d'EUCAST

EUCAST comprend un comité élargi (General Committee) regroupant un représentant officiellement désigné pour chaque pays et un "Steering Committee", organisme réduit comprenant un représentant de chaque comité national existant (6) et deux délégués du comité général. EUCAST a des liens étroits avec EMEA (European Medicines Agency) et ECDC (European Center for Disease Prevention and Control), et comprend en plus un groupe d'experts ad-hoc et des sous-comités pour les antifongiques, les anaérobies et les systèmes experts.

Les deux objectifs principaux d'EUCAST sont :

- établir les valeurs critiques (clinical breakpoints) pour les agents antimicrobiens existants et futurs, en collaboration avec l'ESCMID, EMEA et ECDC
- développer des méthodes standardisées pour tester la sensibilité aux agents antimicrobiens, ainsi que des procédures de contrôle de qualité internes.

D'autres objectifs ont visé à :

- définir la distribution des CMI des souches sauvages (**Wild Type MIC**) pour chaque espèce bactérienne ou fongique
- interagir avec des organismes/organisations tels que EMEA, ECDC, EFSA et EARSS, ainsi qu'avec les comités nationaux impliqués dans la détermination des tests de sensibilité et de résistance.

Pour la Suisse, le partenaire de l'EUCAST est le SAC (**S**wiss **A**ntibiogram **C**ommittee) créé en juin 2010 à partir d'un groupe de travail de la Société suisse de microbiologie (voir site web SGM/SSM : www.swissmicrobiology.ch/). Ce Comité comprend des représentants désignés de la Société suisse de maladies infectieuses, d'hygiène hospitalière, de Swiss Noso et d'Anresis.

Le rôle principal du SAC est d'aider les laboratoires à implémenter la méthode EUCAST et d'examiner les implications de cette implémentation, non seulement au niveau du laboratoire, mais aussi de la thérapie antimicrobienne et des mesures épidémiologiques et de contrôle de l'infection.

Par rapport à la norme CLSI, la norme EUCAST offre un certain nombre d'avantages :

- elle se base sur les indications d'antibiothérapie approuvées par EMEA, ainsi que sur les dosages utilisés en Europe
- elle est indépendante de tout intérêt commercial, transparente et compréhensible
- elle est accessible au domaine public gratuitement
- elle est révisée régulièrement à la simple initiative de nombreux partenaires (EMEA, EUCAST, compagnies pharmaceutiques).

Méthodologie de l'EUCAST

Le processus suivi par EUCAST permettant la détermination des valeurs critiques (clinical breakpoints) est une démarche complexe qui se base sur de nombreux paramètres :

- la ou les posologie(s)
- le microorganisme cible
- la distribution des CMI pour les organismes cibles sans mécanisme de résistance qui définit la "population sauvage" ou wild type distribution, un concept fondamental et original à EUCAST
- le second concept fondamental d'EUCAST est de considérer que cette population dite sauvage ne peut pas être artificiellement séparée en deux par des concentrations critiques. Cette distribution définit une valeur de CMI maximale pour les souches d'une espèce donnée qui n'ont pas de mécanisme de résistance (cette valeur de CMI est dénommée ECOFF pour **E**pidemiological **C**ut**OFF**) .
- les mécanismes de résistance et les CMIs correspondants
- les indications cliniques
- les valeurs de pharmacocinétique (Cmax, Auc, T1/2, liaison aux protéines, Vd) et de pharmacodynamique (Cmax/CMI, Auc/CMI, Monte Carlo simulation)

- la réponse clinique par rapport à une valeur de CMI donnée.

EUCAST a standardisé essentiellement des méthodes phénotypiques comme la détermination de la CMI en agar ou bouillon, ainsi que les diamètres critiques de la méthode de diffusion à partir de disques et les adaptations aux automates (Vitek, Phoenix, Microscan). Ces méthodes sont reproductibles, quantifiables, et prédisent la sensibilité et la résistance.

EUCAST produit des tables pour chaque antibiotique et organisme(s) cible. Par rapport aux tables CLSI, il faut noter que EUCAST ne publie pas de zone intermédiaire et utilise pour les valeurs critiques (breakpoints) $\leq X \mu\text{g/ml}$ pour S (sensible) et $> Y \mu\text{g/ml}$ pour R (résistant) pour les CMI, et réciproquement $\geq X \text{ mm}$ pour S (sensible) et $< Y \text{ mm}$ pour R (résistant) pour les diamètres d'inhibition.

Ces tables sont accessibles sur le site Internet de l'EUCAST (www.eucast.org) et un simple clic sur le nom de l'antibiotique permet de consulter le document complet amenant à définir les valeurs critiques. Le site Internet fournit tous les documents nécessaires à la réalisation des tests et leur interprétation.

Impacts au niveau du laboratoire

L'implémentation de la norme EUCAST va entraîner des modifications importantes par rapport à la norme (CLSI) précédemment utilisée par la majorité des laboratoires suisses. Ces modifications concernent avant tout deux aspects :

1. Les principales modifications au niveau des laboratoires entre EUCAST et CLSI concernent les modifications sur le plan technique (milieux de cultures, concentration des disques d'antibiotiques, conditions d'incubation) à prendre en compte par les laboratoires de microbiologie.

En ce qui concerne la méthode de diffusion en agar (disk diffusion), plusieurs modifications ont été introduites par la méthode EUCAST:

- utilisation de 2 milieux de culture solides (agar):
Mueller-Hinton (MH) pour les bactéries non fastidieuses
et
MH supplémentée avec 5% de sérum de cheval et 20 mg/L de β -NAD (MHF) pour les streptocoques, y compris *Streptococcus pneumoniae*, les *Haemophilus* spp., ainsi que d'autres microorganismes fastidieux
- les plaques sont incubées à $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ pour $18 \pm 2\text{h}$. à l'air atmosphérique (plaques MH) ou dans 5% CO_2 (plaques MH-F)

- le contenu des disques en antibiotique est souvent différent par rapport à la méthodologie CLSI.
2. Les modifications sur le plan de l'interprétation de l'antibiogramme due aux changements de concentrations critiques (breakpoints) – généralement plus basses – entraînant un nombre plus élevé de souches reportées comme non sensibles (ou résistantes) à un antibiotique. Ceci va toucher essentiellement :
- les glycopeptides pour les staphylocoques et les entérocoques
 - les bêtalactames pour les entérobactéries
 - les aminoglycosides pour les staphylocoques et la résistance de haut niveau pour les entérocoques
 - la pénicilline pour les streptocoques viridans.

En revanche, dans de nombreuses situations il n'y a pas de changement, comme par exemple :

- la détermination de la résistance à la méticilline chez les staphylocoques dorés et à coagulase négative
- le screening pour la sensibilité des pneumocoques à la pénicilline
- les règles concernant la clindamycine en cas de résistance MLS inducible.

A noter que la norme CLSI a récemment modifié, elle aussi, un certain nombre de concentrations critiques (et en particulier celles des bêtalactamines vis-à-vis des bacilles Gram négatif), de telle sorte que les différences parfois importantes entre anciennes valeurs CLSI et valeurs EUCAST se sont amenuisées pour la plupart d'entre elles. Par exemple, EUCAST et CLSI indiquent que la recherche de BLSE peut être utile sur un plan épidémiologique et de contrôle de l'infection. Il s'agit là d'une modification de pratique importante dont les implications sur le plan clinique ou épidémiologique ne sont pas nécessairement bien établies. Considérant cette incertitude, le SAC a émis à l'intention des laboratoires suisses la recommandation de poursuivre pour 2 ans au moins la recherche systématique de BLSE. Les deux prochaines années devraient permettre d'accumuler des informations supplémentaires sur la nécessité ou non de poursuivre ce screening et de mettre sur pied un réseau de laboratoires de référence pour déterminer les mécanismes de résistance des souches non sensibles.

Einführung der EUCAST Antibiotikarichtlinien durch die schweizerischen Laboratorien: mikrobiologische und klinische Implikationen

Jacques Bille – Präsident Swiss Antibigram Committee

In der Nr. 2 der Pipette (April 2011) haben wir im Namen des Schweizerischen Komitees für das Antibigramm (SAC) erklärt, warum die Schweizerische Gesellschaft für Mikrobiologie empfiehlt, für die Durchführung und Interpretation der Antibigramme ab dem Jahre 2011 die Richtlinien nach EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) zu übernehmen. Der folgende umfassendere Text weist auf die daraus entstehenden mikrobiologischen und klinischen Implikationen hin.

Organisation und Ziele von EUCAST

EUCAST hat einen grossen erweiterten Vorstand (General Committee) mit einem offiziellen Vertreter jeden Landes und ein kleineres "Steering Committee", welchem je ein Vertreter der sechs früheren Nationalen Antibiotika-Komitees und zwei Delegierte des Vorstandes zugehören. EUCAST pflegt enge Beziehungen mit der EMEA (European Medicines Agency) und dem ECDC (European Center for Disease Prevention and Control), und beruft ad-hoc Expertengruppen wie auch Untergruppen (subcommittee) für Antimykotika, Anaerobier und Expertensysteme.

Die zwei Hauptziele von EUCAST sind:

- die Erstellung der kritischen Werte (clinical breakpoints) für die bestehenden und zukünftigen antimikrobiellen Stoffe in Zusammenarbeit mit ESCMID, EMEA und ECDC
- die Entwicklung von standardisierten Methoden zur Testung antimikrobieller Stoffe wie auch von Verfahren für die interne Qualitätskontrolle.

Weitere Ziele betreffen

- die Erfassung der Verteilung der minimalen Hemmkonzentrationen der Wildtypstämme (**Wild Type** MIC) jeder Bakterien- und Pilzart
- die Interaktion mit Organisationen wie EMEA, ECDC, EFSA (European Food Safety Authority) und EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System) und mit den nationalen Komitees, welche bei der Bestimmung der Resistenzprüfungsverfahren zuständig sind.

Der Ansprechspartner von EUCAST für die Schweiz ist das SAC (**S**wiss **A**ntibiogram **C**ommittee), welches im Juni 2010 aus einer Arbeitsgruppe der Schweizerischen Gesellschaft für Mikrobiologie entstanden ist (siehe Website der SGM: www.swissmicrobiology.ch). In diesem Komitee sind die Schweizerische Gesellschaft für Infektiologie, die Spitalhygiene, Swiss Noso und Anresis vertreten.

Die Hauptrolle des SAC ist die Unterstützung der Laboratorien bei der Einführung von EUCAST und die Überprüfung der Auswirkungen im Labor, aber auch der Konsequenzen für die Antibiotikatherapie, die epidemiologischen Massnahmen und die Infektionskontrolle.

Die Richtlinien von EUCAST bieten gegenüber denjenigen von CLSI einige Vorteile:

- sie basieren auf den von der EMEA zugelassenen Indikationen der Antibiotikatherapie und auf den in Europa üblichen Dosierungen
- EUCAST ist unabhängig von jeglichen kommerziellen Interessen, transparent und nachvollziehbar
- sie sind gratis auf einer öffentlichen Website zugänglich
- sie können regelmässig aufgrund einfacher Vorstösse von mehreren Partnern (EMA, EUCAST, pharmazeutische Firmen) verändert werden.

Methodik von EUCAST

EUCAST verfolgt einen komplexen Weg, um die kritischen Grenzwerte (clinical breakpoints) zu bestimmen; es werden mehrere Parameter berücksichtigt:

- die Dosierung oder die Dosierungen
- der Zielorganismus
- die Verteilung der minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) bei den Zielmikroorganismen ohne einen Resistenzmechanismus, d.h. die Verteilung der MHK bei den Wildtypstämmen oder wild type distribution; dieses Konzept ist grundlegend und einzigartig für EUCAST
- das zweite grundlegende Konzept von EUCAST ist, dass diese sogenannte Wildtyppopulation nicht künstlich durch die kritischen Grenzwerte in 2 Gruppen geteilt werden darf. Diese Verteilung der MHK der Wildtypstämmen definiert die maximale MHK, welche bei Stämmen einer gegebenen Spezies ohne

Resistenzmechanismus vorkommen kann; dieser MHK – Wert wird ECOFF für **Epidemiological CutOFF** genannt

- die Resistenzmechanismen mit den entsprechenden MHK
- die klinischen Indikationen
- die pharmakokinetischen (C_{max} , AUC, $T_{1/2}$, Proteinbindung, Verteilungsvolumen) und pharmakodynamischen Werte (C_{max}/C_{MI} , AUC/C_{MI}, Monte Carlo Simulation)
- das klinische Ansprechen in Abhängigkeit der gegebenen MHK.

EUCAST hat im Wesentlichen die phänotypischen Methoden wie die Bestimmung der MHK im Agar oder in der Bouillon und die kritischen Hemmhöfe im Blättchen-diffusionstest standardisiert, aber auch die Anpassung für die Automaten (Vitek, Phoenix, Microscan) vorgenommen. Diese Methoden sind reproduzierbar, quantifizierbar und sagen eine Empfindlichkeit oder Resistenz voraus.

EUCAST erstellt für jedes Antibiotikum und jeden Zielorganismus Tabellen. Im Gegensatz zu den CLSI Tabellen, publiziert EUCAST keine intermediären Zonen; für die kritischen MHK-Werte (breakpoints) wird $\leq X \mu\text{g/ml}$ für sensibel und $> Y \mu\text{g/ml}$ für resistent und sinngemäss für die Hemmhöfe $\geq X \text{ mm}$ für sensibel und $< Y \text{ mm}$ für resistent angegeben.

Diese Tabellen sind auf der Internetseite von EUCAST (www.eucast.org) zugänglich und mit einem einfachen Klick auf den Antibiotikannamen kann das komplette Dokument, welches zu der Definition der kritischen Werte geführt hat, angeschaut werden. Alle Dokumente, welche für die Durchführung und Interpretation der Teste notwendig sind, sind auf dieser Internetseite.

Auswirkungen für das Labor

Die Anwendung der EUCAST Richtlinien zieht im Vergleich zu den vorher von den meisten schweizerischen Laboratorien benützten CLSI Richtlinien wichtige Veränderungen nach sich. Diese betreffen vor allem zwei Aspekte:

1. Die hauptsächlichen Unterschiede zwischen EUCAST und CLSI betreffen die technischen Veränderungen im Labor (Kulturmedien, Konzentration der Antibiotika-Blättchen, Inkubationsbedingungen welche vom Labor berücksichtigt werden müssen).

Für die Agardiffusionsmethode (disk diffusion) hat EUCAST mehrere Veränderungen eingeführt:

- Anwendung zweier Festmedien für die Resistenztestung
 - Mueller-Hinton (MH) Agar für anspruchslose Bakterien und
 - MH mit 5% Pferdeblut und 20 mg/L β -NAD (MHF) für die Streptokokken inklusive *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus* spp. und andere anspruchsvolle Mikroorganismen
 - die Platten werden bei 35°C $\pm$ 1°C für 18 $\pm$ 2h im normalen Brutschrank (für die MH-Platten) oder im 5% CO₂ Brutschrank (MH-F Platten) inkubiert
 - die Blättchenbeschichtung mit Antibiotika ist häufig unterschiedlich zu derjenigen von CLSI.
2. Die Veränderungen in der Interpretation des Antibiotogramms, welche durch die angepassten – in der Regel tieferen - kritischen Konzentrationen (breakpoints) zustande gekommen sind, ziehen eine erhöhte Anzahl von nicht empfindlich oder resistent berichteten Stämmen nach sich; betroffen sind insbesondere:
- Glykopeptide bei Staphylokokken und Enterokokken
 - Betalaktame bei Enterobakterien
 - Aminoglykoside bei den Staphylokokken und die hohe Aminoglykosidresistenz der Enterokokken
 - Penicillin bei den vergrünenden Streptokokken.

In vielen Situationen ergeben sich aber keine Veränderungen, z.B.

- Methicillinresistenz bei *S. aureus* und Koagulase-negativen Staphylokokken
- Screening der Penicillinempfindlichkeit bei Pneumokokken
- Regeln für Clindamycin bei der induzierbaren MLS-Resistenz.

Es muss betont werden, dass CLSI kürzlich selber einige kritische Konzentrationen (insbesondere bei Beta-Laktamen für Gram-negative Stäbchen) angepasst hat, so dass sich oft die neuen CLSI Werte den EUCAST Werten angeglichen haben. Zum Beispiel erwähnen die EUCAST- und die CLSI Richtlinien, dass die Suche nach ESBL nur noch für epidemiologische Fragen und für die Infektionskontrolle nützlich sein kann. Es handelt sich hier um wichtige praktische Veränderungen, deren klinische und epidemiologische Anpassungen noch nicht ganz klar sind. Deshalb hat SAC zu Händen der schweizerischen Laboratorien die Empfehlung ausgesprochen, in den nächsten zwei Jahren die systematische ESBL Suche fortzusetzen. In den nächsten zwei Jahren sollten weitere Zusatzinformationen für die mögliche Notwendigkeit eines solchen Screenings erhalten und ein Labornetz für die Bestimmung der Resistenzmechanismen von nicht empfindlichen Stämmen erstellt werden.