

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 (Lausanne) – Président Swiss Antibigram Committee (SAC)

Reinhard Zbinden (Zürich) – Secrétaire SAC, Président Société Suisse de Microbiologie (SSM)

INTRODUCTION

La détermination in vitro de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques est indispensable pour guider l'antibiothérapie. Directement, pour un patient donné, elle permet d'adapter au mieux la prescription de l'antibiotique. Indirectement, par connaissance des sensibilités locales, elle aide à la prescription dite empirique de l'antibiotique. D'un point de vue épidémiologique, elle permet de suivre l'évolution de la résistance aux antibiotiques sur le plan local (hôpital) ou national (comme le fait le programme Anresis: www.anresis.ch). Plusieurs méthodes ont été développées et standardisées pour exécuter ces antibiogrammes, les unes utilisant des tests de diffusion (méthode des disques ou méthode E-test), les autres des tests de dilution en bouillon (microdilution) tels que ceux utilisés dans certains automates (Vitek 2, Phoenix, Microscan), souvent avec système expert.

En Suisse, depuis de nombreuses années, l'interprétation de ces tests (S pour sensible, R pour résistant, I pour intermédiaire ou indéterminé) se basait sur des concentrations critiques (breakpoints) établies par un comité américain (NCCLS, devenu aujourd'hui CLSI).

En Europe, plusieurs pays avaient développé leurs propres méthodes et critères d'interprétation (BSAC en Grande Bretagne, CA-SFM en France, CRG aux Pays-Bas, DIN en Allemagne, NWGA en Norvège et SRGA en Suède). Depuis quelques années, sous l'égide de la Société européenne de microbiologie clinique et maladies infectieuses (ESCMID), un comité d'experts a développé et travaillé à l'harmonisation d'une méthodologie unique pour tester la sensibilité des microorganismes aux antibiotiques. Ce comité (EUCAST pour European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) propose une méthodologie unifiée pour l'ensemble des pays européens.

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 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 concentrations minimales inhibitrices (CMI) des souches sauvages (Wild Type MIC, cf. plus bas) pour chaque espèce bactérienne ou fongique
- interagir avec des organismes/organisations tels que EMEA, ECDC, EFSA (European Food Safety Authority) et EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System), 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 (Swiss Antibigram Committee) 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 aussi des représentants désignés de la Société suisse de maladies infectieuses, de la Société suisse d'hygiène hospitalière, de Swissnoso 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).

EUCAST en Suisse

Dans le cadre de l'effort d'harmonisation en Europe, la Société Suisse de Microbiologie a décidé – comme une grande partie des pays européens – de proposer aux laboratoires de microbiologie suisses l'adoption de la norme EUCAST en 2011. Pour ce faire, elle a organisé des réunions d'informations (assemblée annuelle 2009 de la SSM à Lausanne, réunion du diagnostic en microbiologie médicale, juin 2010 à Berne) et a fondé le SAC en juillet 2010 avec l'objectif de préparer les documents principaux

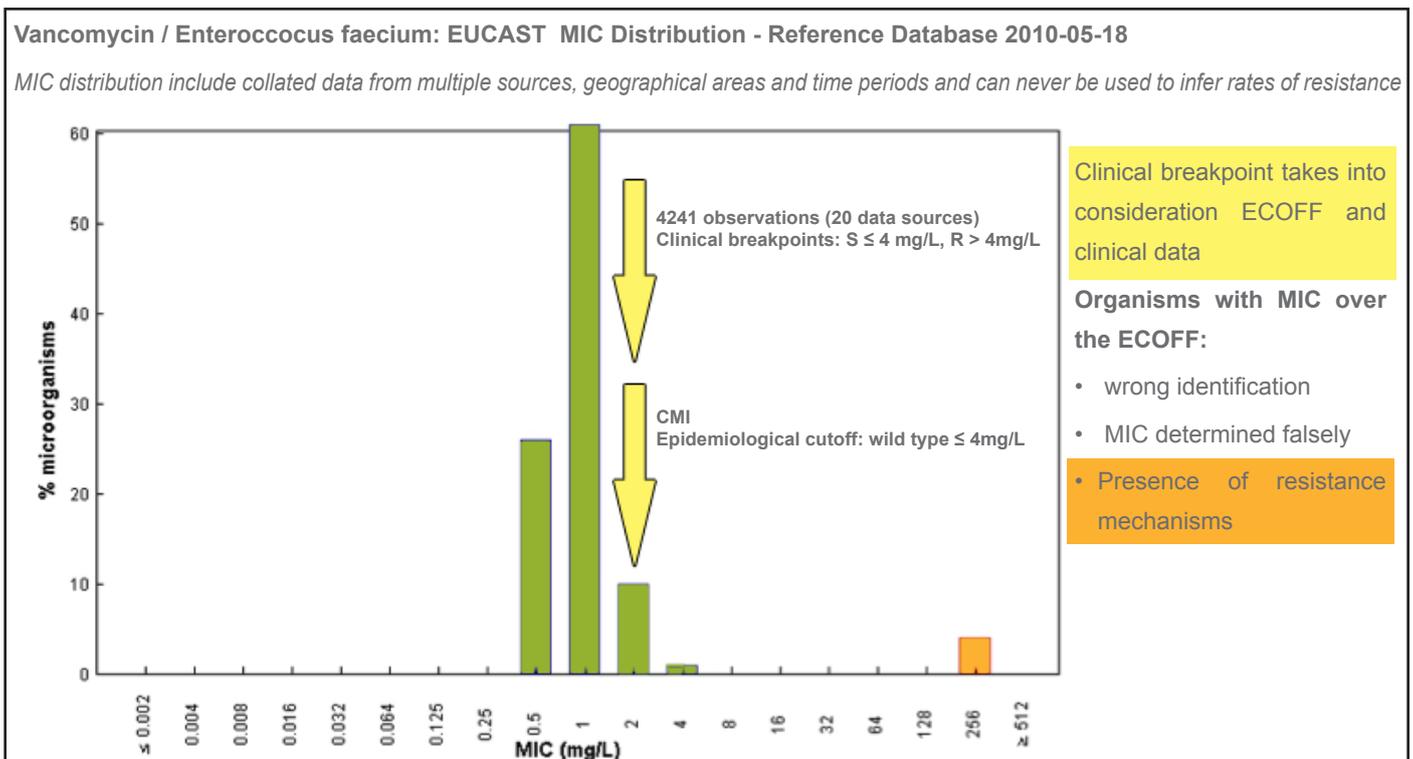
pour les laboratoires (voir <http://www.swissmicrobiology.ch/>) et de discuter avec les principaux partenaires (Société suisse des maladies infectieuses, Société suisse d'hygiène hospitalière, Swissnoso, Anresis) des répercussions sur le plan clinique et épidémiologique de l'adoption des nouvelles recommandations (club de pathologie infectieuse en janvier 2011 et 2012; présentations accessibles sur le site de la SSM).

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) de l'antibiotique considéré
- le microorganisme cible
- la distribution des CMI pour les organismes cibles dépourvus de 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

Figure 1: Principe de l'ECOFF avec l'exemple de la vancomycin MIC pour *Enterococcus faecium*



EUCAST Workshop Annual Meeting St. Gallen, R. Zbinden, 22.06.2012

donnée qui n'ont pas de mécanisme de résistance acquise (cette valeur de CMI est dénommée ECOFF pour Epidemiological CutOFF): Figure 1).

- les mécanismes de résistance et les CMI correspondants
- les indications cliniques
- les valeurs de pharmacocinétique (C_{max}, AUC, T_{1/2}, liaison aux protéines, volume de distribution) et de pharmacodynamique (C_{max}/CMI, AUC/CMI, Monte Carlo simulation)
- la réponse clinique par rapport à une valeur de CMI donnée.

METHODES

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 microorganisme cible. Par rapport aux tables CLSI, il faut noter que EUCAST 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 supplémenté avec 5% de sérum de cheval et 20 mg/L de β -NAD (MH-F) 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% CO₂ (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 dues 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 inductible.

A noter que la norme CLSI a modifié en 2010, 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 (cf. plus bas).

Staphylocoques et glycopeptides

Avec l'augmentation graduelle de la proportion de *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (et à tous les agents bêta-lactames), le recours aux glycopeptides (et surtout à la vancomycine) est fréquent et la détermination in vitro de son activité sur les staphylocoques systématique.

Tant EUCAST que CLSI ont abaissé la valeur critique de sensibilité des *S.aureus* vis-à-vis de la vancomycine à $\leq 2 \mu\text{g/ml}$, dans le but de ne pas rendre un résultat comme sensible pour une souche qui pourrait présenter une résistance partielle comme les souches dites hétéro VISA (hVISA) ou VISA (Vancomycin Intermediate *S. Aureus*).

La philosophie d'EUCAST est en effet de détecter, en première intention, toutes les souches non complètement sensibles et de proposer, en deuxième intention et selon les besoins, des tests complémentaires pour les souches cliniquement significatives non complètement sensibles (soit avec une CMI supérieure à $2 \mu\text{g/ml}$).

A noter que CLSI propose la même valeur critique pour une souche sensible (CMI à $\leq 2 \mu\text{g/ml}$), mais distingue des valeurs intermédiaires (CMI entre 4 et $8 \mu\text{g/ml}$). L'impact de ces nouvelles valeurs critiques sur l'utilisation des antibiotiques autres que les glycopeptides (linézolide, daptomycine) et sur des mesures d'hygiène devra être soigneusement monitoré.

EUCAST recommande aussi de ne pas utiliser la méthode de diffusion par disque pour tester la sensibilité des staphylocoques à la vancomycine, cette méthode ne permettant pas de différencier les isolats avec sensibilité diminuée (hVISA ou VISA) à la vancomycine de ceux complètement sensibles.

Plusieurs méthodes ont été proposées pour détecter les souches (hétéro)intermédiaires à la vancomycine. Aucune de ces méthodes n'est à la fois très sensible et très spécifique, compte tenu du type de résistance à détecter qui nécessite un inoculum très élevé. La stratégie actuelle consiste à réduire le nombre de souches candidates à être (h)VISA par une méthode de screening appliquée à des souches avec CMI supérieures à $2 \mu\text{g/ml}$, ou en cas d'échec clinique même avec des souches sensibles en terme de CMI, et donc de réserver la méthode de confirmation (PAP : population analysis profile) à un

nombre très limité de souches.

Concernant la teicoplanine, EUCAST ne recommande pas non plus l'emploi de la méthode des disques, alors que CLSI la considère comme valable.

Staphylocoques et autres antibiotiques

EUCAST a établi une valeur critique de $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ pour le seuil de sensibilité à la gentamicine, comparée à une valeur de $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ pour CLSI. De plus, pour la méthode des disques, EUCAST définit des diamètres critiques de gentamicine différents pour *S.aureus* et pour les staphylocoques à coagulase négative.

Entérocoques et glycopeptides

La résistance aux glycopeptides chez les entérocoques, découverte en 1986, a actuellement une répartition mondiale, mais très variable. Jusqu'à récemment, elle était très basse en Suisse, de l'ordre de 0 à 5% selon les collectifs examinés. Le mécanisme de résistance acquise de type Van est le plus souvent lié au gène vanA (haut niveau de résistance à la vancomycine et à la teicoplanine, transmission plasmidique par un transposon, inductible) et au gène vanB (résistance variable à la vancomycine, teicoplanine sensible, aussi transmise par un transposon, inductible).

La résistance de type VanA est aisée à détecter dans le laboratoire, vu les valeurs élevées de CMI aux glycopeptides (vancomycine: $\geq 64 \mu\text{g/ml}$; teicoplanine: $\geq 16 \mu\text{g/ml}$). Celle de type VanB est plus difficile à détecter (CMI pour la vancomycine: $\geq 4 \mu\text{g/ml}$, pour la teicoplanine: $0.5-1.0 \mu\text{g/ml}$).

Pour la vancomycine, les valeurs critiques de sensibilité pour EUCAST et CLSI sont identiques en dilution (CMI $\leq 4 \mu\text{g/ml}$), mais différent par la méthode des disques:

$> 12 \text{ mm}$ pour EUCAST, $> 17 \text{ mm}$ pour CLSI, en raison de différences dans l'exécution des tests, en particulier dans la concentration de vancomycine des disques:

$5 \mu\text{g}$ versus $30 \mu\text{g}$. EUCAST considère comme résistante à la vancomycine une souche d'entérocoque avec une CMI $> 4 \mu\text{g/ml}$ (ou avec un diamètre d'inhibition $< 12 \text{ mm}$), alors que CLSI considère des valeurs intermédiaires (CMI de 8 ou $16 \mu\text{g/ml}$ et diamètre d'inhibition entre 15 et 16 mm), la valeur critique de résistance étant fixée à $> 32 \mu\text{g/ml}$ (ou $< 14 \text{ mm}$).

En conséquence, l'apparition de la norme EUCAST risque

d'engendrer une augmentation de souches d'entérocoques considérées comme résistantes à la vancomycine par rapport à la norme CLSI.

La méthode de diffusion avec disques n'est pas performante pour détecter la résistance de type VanB, la méthode de E-test lui étant supérieure. Les automates ont une bonne sensibilité (> 95%) pour la détection du mécanisme VanB. Enfin, des méthodes de screening ont été développées tant pour des isolats cliniques d'entérocoques que pour la détection du portage d'entérocoques résistants à la vancomycine dans les frottis périanaux.

Entérocoques et autres antibiotiques

EUCAST définit la valeur critique pour un haut niveau de résistance à la gentamicine à > 128 µg /ml versus 500 µg /ml pour CLSI.

Bacilles à Gram négatif et antibiotiques bêta-lactames

Des changements majeurs sont proposés, tant par EUCAST que par la version 2010 de CLSI, en ce qui concerne l'interprétation des tests de sensibilité pour les antibiotiques bêta-lactames chez les bacilles à Gram négatif. Jusqu'ici, on testait initialement une série de céphalosporines, soit par la méthode des disques soit par dilution en bouillon, et en cas de sensibilité réduite, la présence d'une bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE) pouvait être recherchée directement ou par un test de

confirmation phénotypique au moyen d'acide clavulanique. En cas de test positif, c'est-à-dire de présence de BLSE, la règle était de reporter la bactérie comme résistante à tous les antibiotiques bêta-lactames (pénicillines, céphalosporines, aztreonam). Cette approche entraînait un délai dans le rendu des résultats.

Tant CLSI (versions 2010-2012) que EUCAST proposent des valeurs critiques de sensibilité plus basses (cf. tableau 1) permettant une meilleure détection primaire non seulement de la présence d'une BLSE, mais aussi d'autres types de résistance potentiellement plus problématiques sur le plan clinique ou épidémiologique. Ce faisant, sur le plan strict du laboratoire il n'est plus indispensable de rechercher systématiquement par des tests supplémentaires la présence de BLSE, comme il n'est plus nécessaire de considérer l'ensemble des bêta-lactames comme inactifs ("report what you measure").

Tant EUCAST que CLSI indiquent cependant 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

Tableau 1: Valeurs critiques pour ceftriaxone (mm, CMI), céfépime (mm, CMI), céfotaxime (CMI) et ceftazidime (CMI)

<i>Enterobacteriaceae</i>	CLSI 2009			CLSI 2010-2012			EUCAST 2012		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Ceftriaxone 30µg	≥ 21	14-20	≤ 13	≥ 23	20-22	≤ 19	≥ 23	20-22	< 20
Ceftriaxone MIC	≤ 8	16-32	≥ 64	≤ 1	2	≥ 4	≤ 1	2	> 2
Céfépime 30µg	≥ 18	15-17	≤ 14	≥ 18	15-17	< 14	≥ 24	21-23	< 21
Céfépime MIC	≤ 8	16	≥ 32	≤ 8	16	≥ 32	≤ 1	2-4	> 4
Céfotaxime MIC	≤ 8	16-32	≥ 64	≤ 1	2	≥ 4	≤ 1	2	> 2
Ceftazidime MIC	≤ 8	16	≥ 32	≤ 4	8	≥ 16	≤ 1	2-4	> 4

■ Valeurs critiques d'EUCAST 2012 égales à celles de CLSI 2010/12.
 ■ Valeurs critiques d'EUCAST 2012 plus sévères que celles de CLSI 2010/12.

poursuivre ce screening et de mettre sur pied un réseau de laboratoires experts pour déterminer les résistances inhabituelles ou difficiles à détecter.

De manière analogue pour les carbapénèmes, la réduction des valeurs critiques de sensibilité, tant par CLSI que par EUCAST (cf. tableau 2), implique que des tests de screening pour la détection de carbapénémases (comme le test de Hodge modifié) ne sont plus strictement nécessaires, la grande majorité des souches avec carbapénémases ou autres types de résistance aux carbapénèmes étant d'emblée reconnues comme non sensibles par les tests faits en première intention.

Dans cette situation aussi, EUCAST et CLSI reconnaissent que la détection de carbapénémases peut être justifiée par des considérations épidémiologiques et/ou de mesure de contrôle des infections.

Le SAC recommande de continuer de rechercher la présence d'une carbapénémase lors de valeur de CMI

supérieure à la valeur critique de sensibilité, au moins durant une période de 2 ans depuis l'adoption de la norme EUCAST.

CONCLUSIONS

Les recommandations de CLSI avant 2010 ont constitué un standard international utile aux laboratoires suisses avant le développement des recommandations EUCAST. L'adoption des recommandations EUCAST en Suisse et la création d'un comité antibiogramme permettent d'unifier les techniques et l'interprétation des tests de sensibilité en Suisse et de comparer les données suisses aux données européennes. De plus le SAC, représenté à l'EUCAST, peut participer au développement et à l'amélioration des recommandations. Les premiers résultats sont encourageants car durant l'année 2011 et les 6 premiers mois de 2012 deux tiers des laboratoires de microbiologie en Suisse ont adopté les recommandations EUCAST.

Tableau 2: Valeurs critiques pour ertapénème (mm, CMI), imipénème (mm, CMI) et méropénème (mm, CMI)

<i>Enterobacteriaceae</i>	CLSI 2009			CLSI 2012			EUCAST 2012		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Ertapénème 10µg	≥ 19	16-18	≤ 15	≥ 22	19-21	< 18	≥ 25	22-24	< 22
Ertapénème MIC	≤ 2	4	≥ 8	≤ 0.5	1	≥ 2	≤ 0.5	1	> 1
Imipénème 10µg	≥ 16	14-15	≤ 13	≥ 23	20-22	≤ 19	≥ 22	16-21	< 16
Imipénème MIC	≤ 4	8	≥ 16	≤ 1	2	≥ 4	≤ 2	4 – 8	> 8
Méropénème 10µg	≥ 16	14-15	≤ 13	≥ 23	20-22	≤ 19	≥ 22	16-21	< 16
Méropénème MIC	≤ 4	8	≥ 16	≤ 1	2	≥ 4	≤ 2	4 – 8	> 8

Valeurs critiques d'EUCAST 2012 égales à celles de CLSI 2012.

Valeurs critiques de CLSI 2012 plus sévères que celles d'EUCAST 2012.

Membres du SAC : Jacques Bille, Thomas Bodmer, Marisa Dolina, Olivier Dubuis, Reno Frei, Katja Jatton-Ogay, Laurent Kaiser, Nora Krull, Nadia Liassine, Hanspeter Marti, Kathrin Mühlemann, Vincent Perreten, Jacques Schrenzel, Hans H. Siegrist, Andreas Widmer, Giorgio Zanetti et Reinhard Zbinden

Swissnoso	est publié avec le soutien de l'Office Fédéral de la Santé Publique (OFSP), de la Société Suisse d'Hygiène Hospitalière (SSHH), et de la Société Suisse d'Infectiologie (SSI).
Rédaction	Carlo Balmelli (Lugano), Virginie Masserey (BAG), Patrick Francioli (Lausanne), Kathrin Mühlemann (Berne), Didier Pittet (Genève), Christian Ruef (Zürich), Hugo Sax (Genève), Nicolas Troillet (Sion), Andreas F. Widmer (Bâle), Giorgio Zanetti (Lausanne)
Mise en page	Laurent Francioli (Lausanne)
Correspondance	Prof. Dr. Giorgio Zanetti, CHUV, 1011 Lausanne VD - bulletin@swissnoso.ch
Internet	http://www.swissnoso.ch

Swissnoso contrôle rigoureusement le contenu du Bulletin afin d'assurer que le choix et le dosage des médicaments et des autres produits cités soient en accord avec les recommandations et la pratique en vigueur à l'heure de la publication. Cependant, en raison des progrès continus de la recherche et de l'état de la science, ainsi que des changements éventuels des réglementations, Swissnoso décline toute responsabilité vis-à-vis d'éventuelles conséquences liées à des erreurs de dosage, d'application ou d'usage de médicaments ou autres produits.