

Quand déterminer une CMI et comment ?

Roland Leclercq

Microbiologie CHU de Caen

Actualités en microbiologie, 27 janvier 2012

Concentration Minima Inhibitrice (CMI)

- Standard contre lequel toutes les techniques d'étude de sensibilité aux antibiotiques des bactéries aérobies non exigeantes doivent se comparer.

La microdilution en bouillon de Mueller-Hinton est le standard de référence

- C'est le standard de référence internationale (ISO) pour les bactéries aérobies non exigeantes (ISO 20776-1)
- Technique adoptée par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) et le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM)

Bactéries exigeantes: pas de technique de référence (CLSI?)

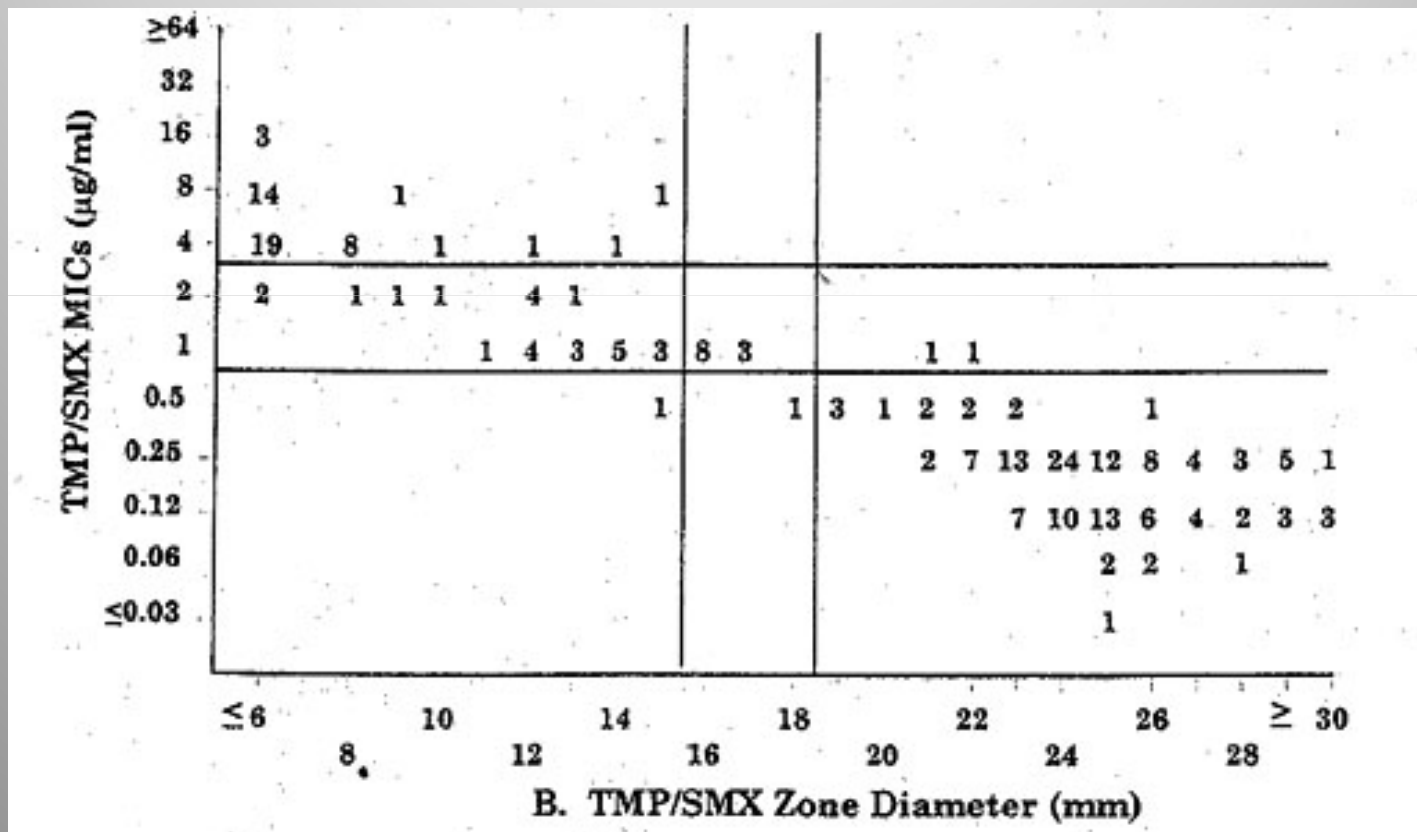
Méthodes de routine

- Automates: résultats en CMI mais non déterminés selon la norme ISO
 - Phoenix[®] et Microscan[®] effectuent une CMI au sens propre : mais non ISO et avec une étendue de gamme de concentrations limitée à une ou deux dilutions au-dessus/au-dessous des concentrations critiques (CMI bornées \leq ou \geq)
 - VITEK2[®]: utilise des algorithmes de croissance calibrés sur des CMI connues de souches. Les concentrations testées sont plus étendues mais les gammes restent tronquées

Méthode de diffusion en gélose (méthode des disques)

- Qualité de la droite de régression est variable selon l'espèce bactérienne et des espèces différentes peuvent présenter des droites de régression différentes.
- Certains antibiotiques diffusent médiocrement en gélose (vancomycine, colistine) : méthode de diffusion souvent inadéquate.

L'extrapolation de CMI à partir de diamètres d'inhibition est souvent hasardeuse



Résultats en catégorisation clinique S, I, R

Méthode de routine et CMI

- Les méthodes de routine sont validées lorsqu'elles donnent des résultats équivalents à la méthode de référence (CMI microdilution)
- Pour obtenir l'aval de la FDA, la méthode doit montrer une concordance en termes de catégorie >90% avec moins de 1,5% d'erreurs très majeures (faux S) et moins de 3% d'erreurs majeures (faux R) (pour calculer les erreurs majeures et très majeures, les dénominateurs sont respectivement le nombre de souches R et S).
- Méthode alternative (CLSI M23-A3) quand beaucoup de souches ont des CMI près des concentrations critiques: <10% d'erreurs très majeures et <10% d'erreurs majeures sont acceptables.

→ **Validation globale de la méthode**

Quelle méthode?

- En pratique le gradient en gélose (E-test[®])
 - Mais le E-test n'est pas une méthode de référence

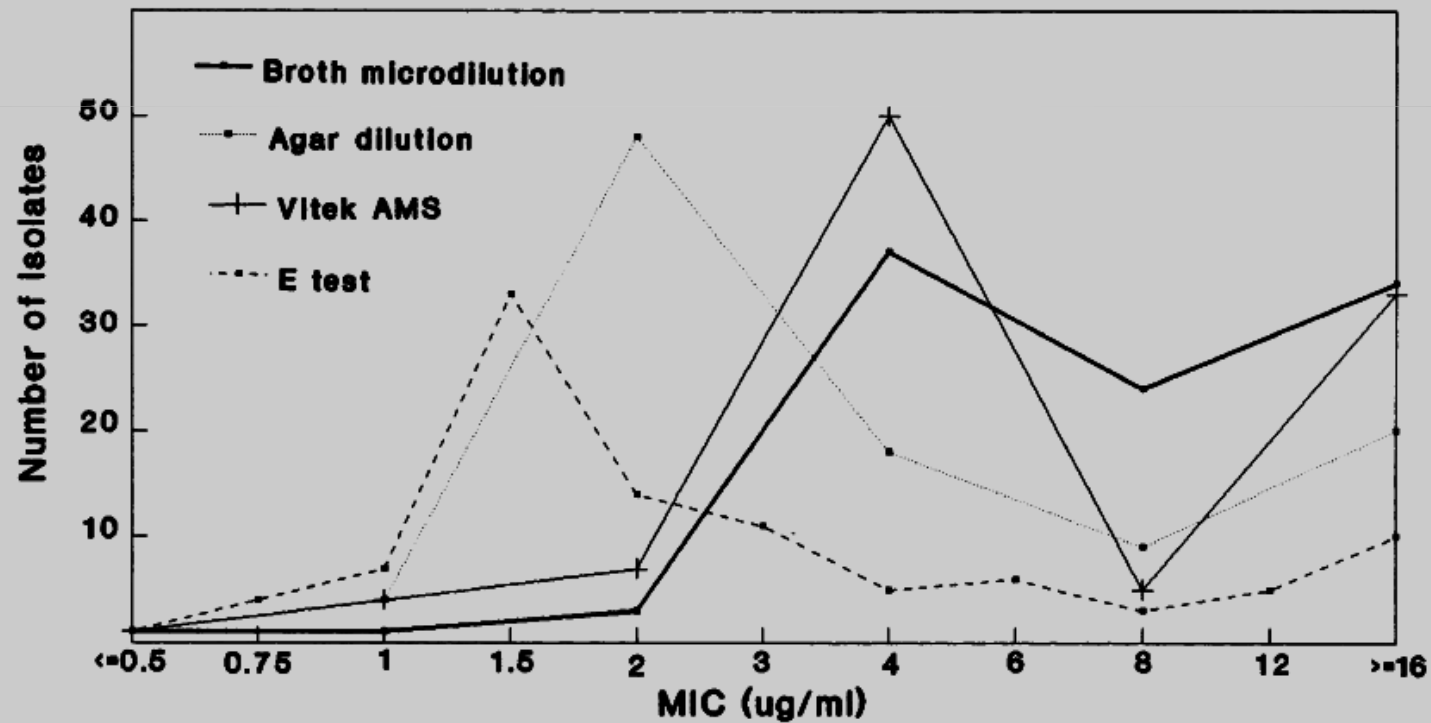
Vérifier un résultat de routine par E-test revient à vérifier un résultat obtenu par une méthode corrélée à une méthode de référence par une autre méthode (E-test) corrélée à une méthode de référence

- Le E-test paraît facile à utiliser

mais requiert un savoir-faire de l'utilisateur, un respect des instructions du fabricant (milieux, inocula et lecture).

Corrélations milieu solide/milieu liquide

- Exemple de la gentamicine



Joyce et al. J Clin Microbiol, 1992

Dans quels cas déterminer une CMI?

- Quand elle est recommandée
- Dans les infections sévères avec une marge de sécurité PK/PD étroite pour l'antibiotique
- Pour vérifier un résultat de routine aberrant

CMI: ce qui est prévu à la Nomenclature des Actes de Biologie

- *Pour Streptococcus pneumoniae* (sécrétions broncho-pul., hémocultures), indépendamment de l'antibiogramme, mesure de la CMI cotée en sus (acte 5290).
- Liquide céphalo-rachidien, d'articulation, plèvre, péritoine, péricarde, kystes, produit de paracentèse: L'isolement d'une espèce bactérienne entraîne la mesure de la CMI pour la molécule retenue pour le traitement qui sera cotée en sus (5278, 5279, 5280, 5290).

Qui le fait pour les péritonites?

Que dit la Nomenclature des Actes de biologie

Détermination de la CMI d'un micro-organisme

Cas général

- En utilisant une gamme comportant au minimum une série de 10 concentrations. Cette cotation s'applique aux espèces responsables d'infections systémiques, après étude de leur sensibilité en bactériostase (antibiogramme). Elle comprend l'étude au minimum de deux antibiotiques

Cas de *Streptococcus pneumoniae* :

- En utilisant une gamme de concentration adaptée à la mise en évidence d'une diminution de sensibilité aux bêta lactamines.

Recommendations CA-SFM

Antibiotiques ne pouvant être testés par diffusion: daptomycine

- Exemple d'*Enterococcus*

M-H agar ^a	E-test format (n) ^b	No. with result ^f :						% EA ^c
		-2	-1	Same	+1	+2	+3	
BD ^d	Dapto only (40)			20	20			100
BD ^d	Dapto + Ca (40)	10	28	2				75.6
Remel ^e	Dapto only (40)			0	0	17	23	0
Remel ^e	Dapto + Ca (40)	2	21	17				95.1

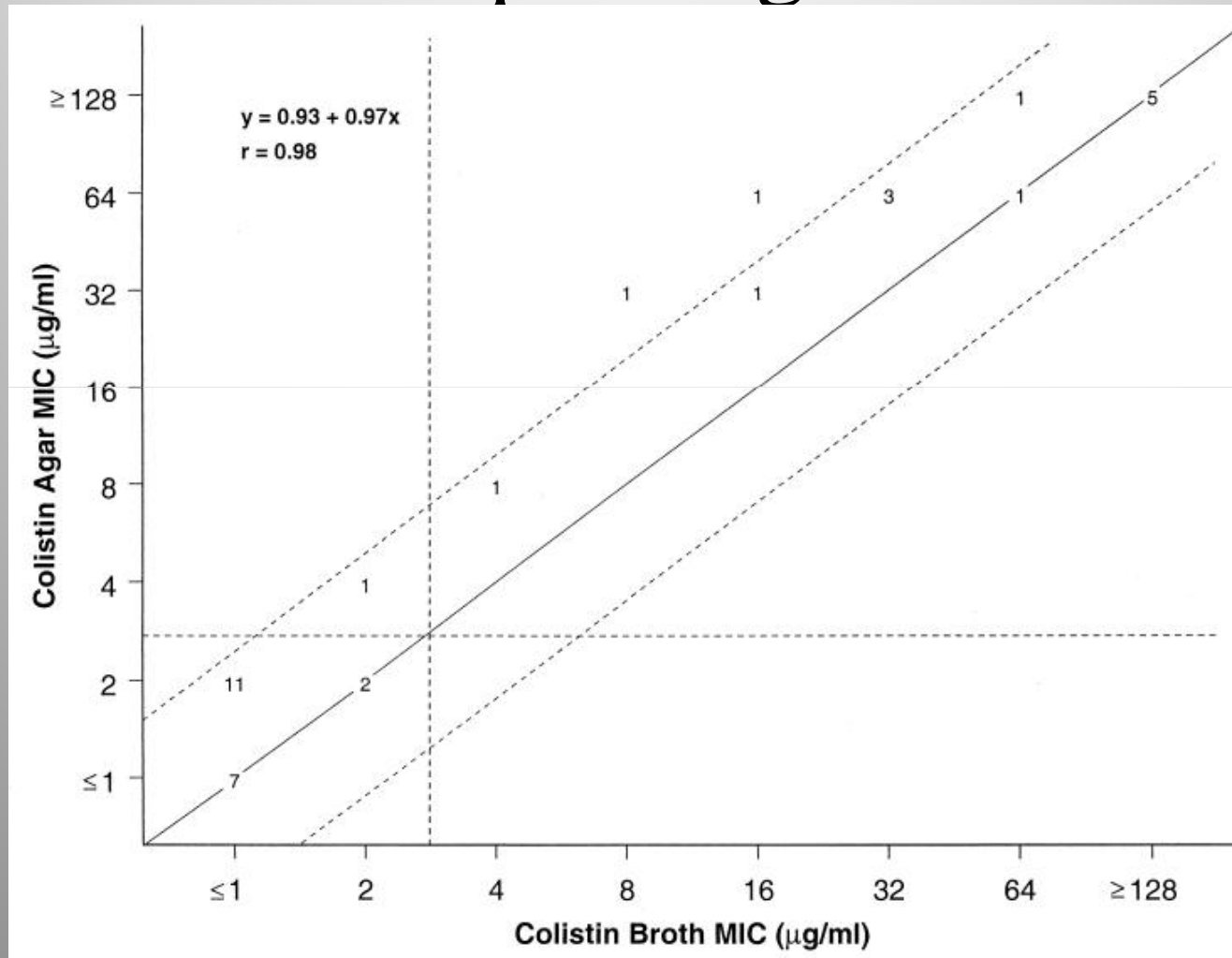
^a M-H, Mueller-Hinton.
^b n, no. tested. Dapto, daptomycin.
^c EA, essential agreement or percentage of MICs \pm one log₂ dilution of the reference MIC.
^d Calcium content was 24 μ g/ml. BD, Becton Dickinson.
^e Calcium content was 8 or 9 μ g/ml, depending upon the agar lot used.
^f E-test MIC compared to reference MIC.

Antibiotiques ne pouvant être testés par diffusion: colistine

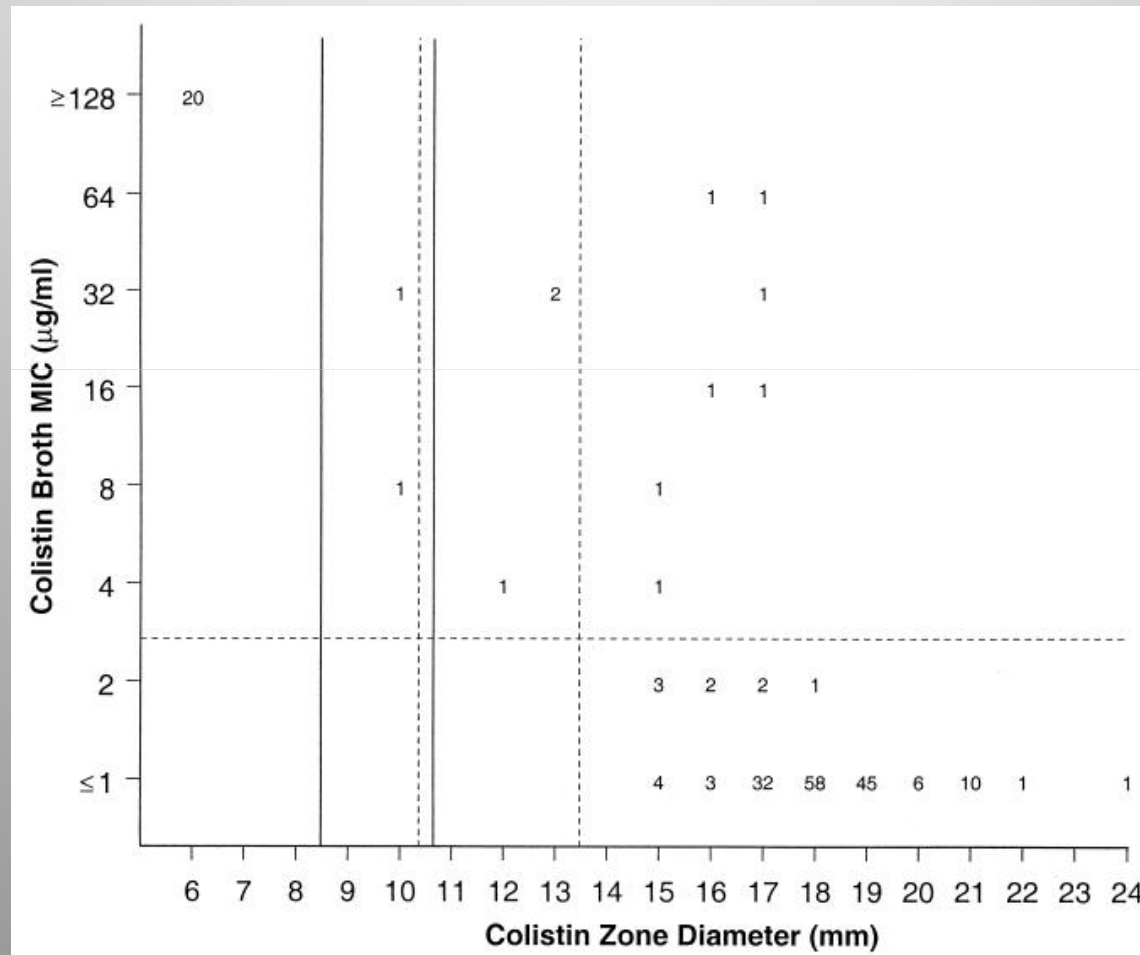
- **CA-SFM:**

Colistine: Les diamètres ont pour but de vérifier la résistance naturelle de certaines espèces, mais ne permettent pas de détecter toutes les résistances acquises ce qui impose de déterminer la CMI en cas d'utilisation thérapeutique.

Corrélation CMI colistine milieu liquide/agar

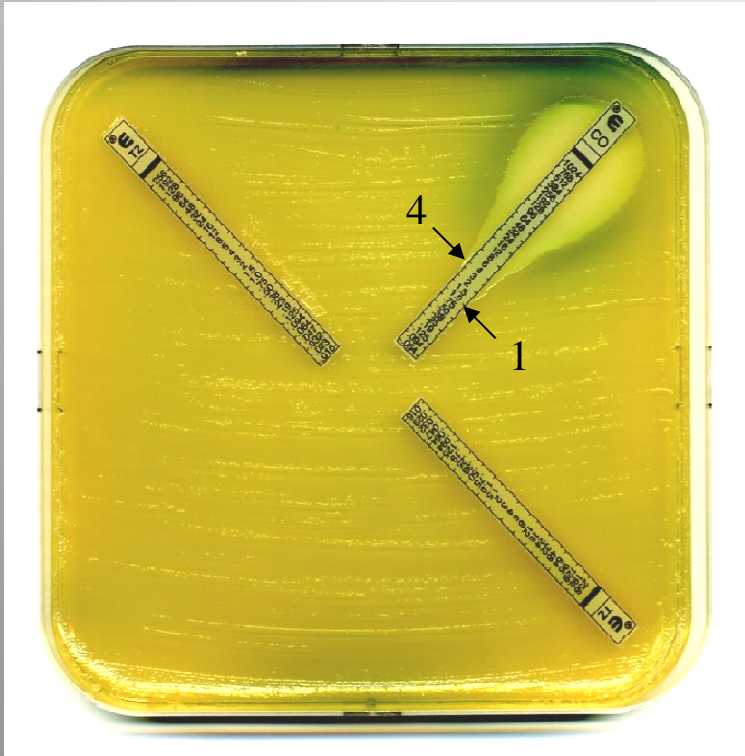


Corrélation CMI-diamètres colistine (entérobactéries)



Gales AC, Reis AO, Jones RN. J Clin Microbiol, 2001; 39: 183–190

P. aeruginosa et colistine



Méthode de référence : dilution en milieu liquide (colistine)
CMI: 2 mg/L et 2 mg/L

Patrick PLESIAT

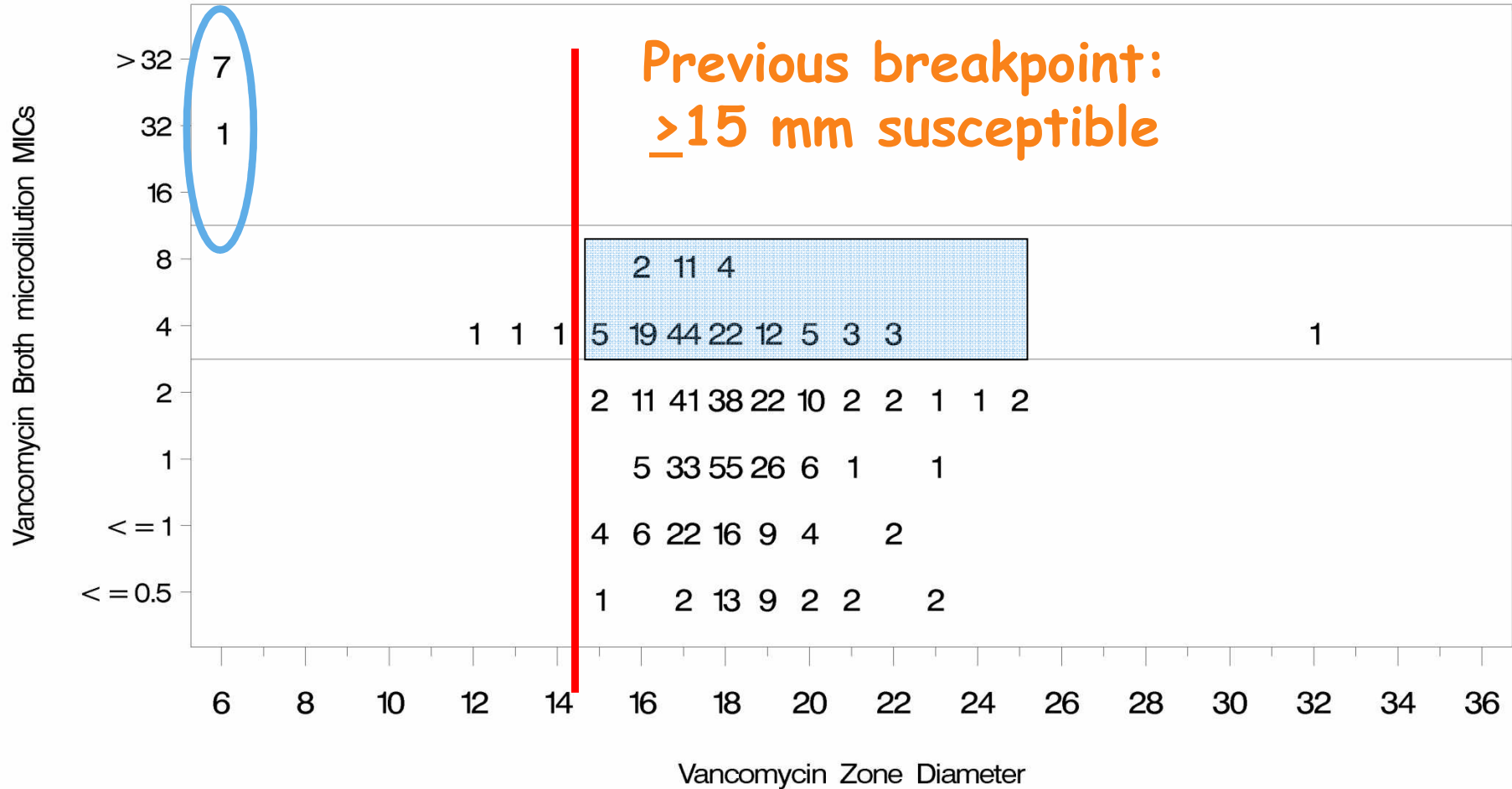
Staphylocoques

- CMI de la **tigécycline** pour toute souche dont le diamètre de la zone d'inhibition est inférieur à 22 mm
 - **CMI glycopeptides: Si critères de suspicion de la sensibilité diminuée aux glycopeptides**
 - En routine, par la méthode par diffusion en milieu gélosé lorsque,
 - diamètre de la zone d'inhibition est < 17 mm (vanco ou teico)
 - diamètre de la zone d'inhibition teicoplanine < au moins 3 mm à vancomycine,
 - colonies dans la zone d'inhibition de l'un des deux glycopeptides,
- En routine, par les méthodes automatisées lorsque les souches sont catégorisées I ou R à au moins l'un des glycopeptides.

Scattergram of *S. aureus* and Vancomycin

CDC Diag
S. aureus

vanA-VRSA



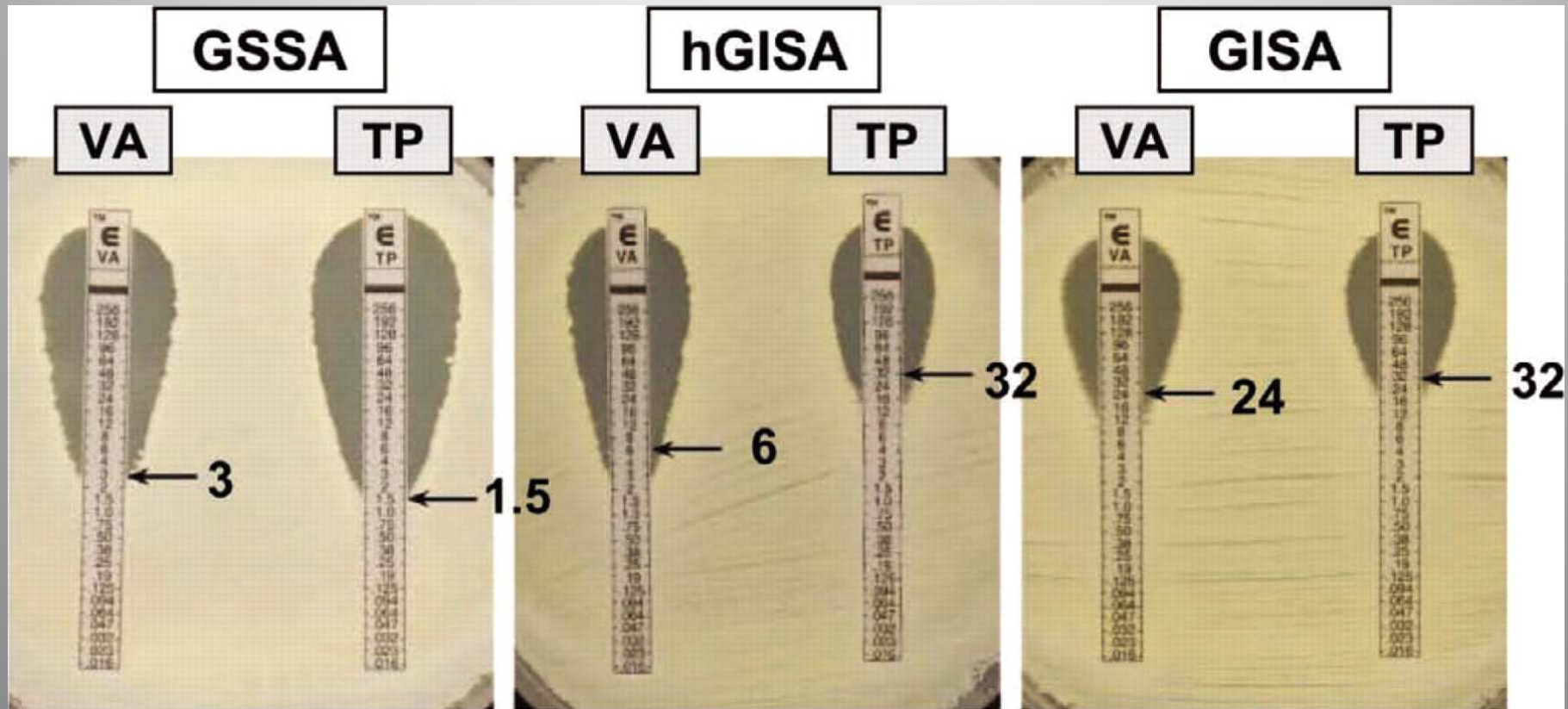
Critères CA-SFM

	Concentrations critiques (mg/L)	
	S	R
<i>S. aureus</i>		
vancomycine	≤ 2	> 2
teicoplanine	≤ 2	> 2
S. à coagulase négative		
vancomycine	≤ 2	> 2
teicoplanine	≤ 4	> 4

EUCAST

EUCAST: "impaired response may be seen already at MIC 2 mg/L"

Le Macro E-test n'est pas une CMI, c'est un test de détection des H-VISA

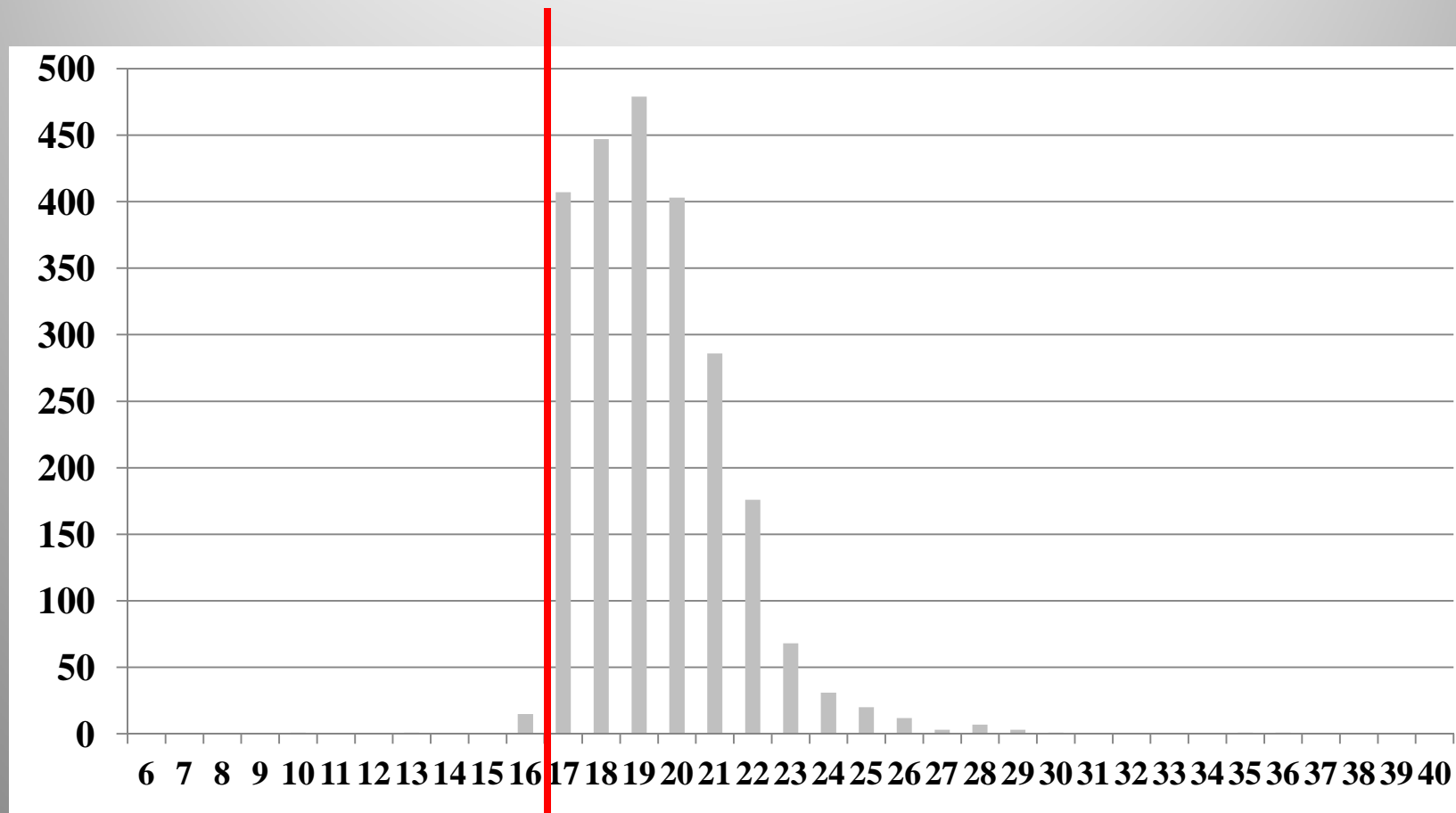


S. aureus ATCC 43300
(MRSA)

S. aureus ATCC 700698
(Mu 3 - hGISA)

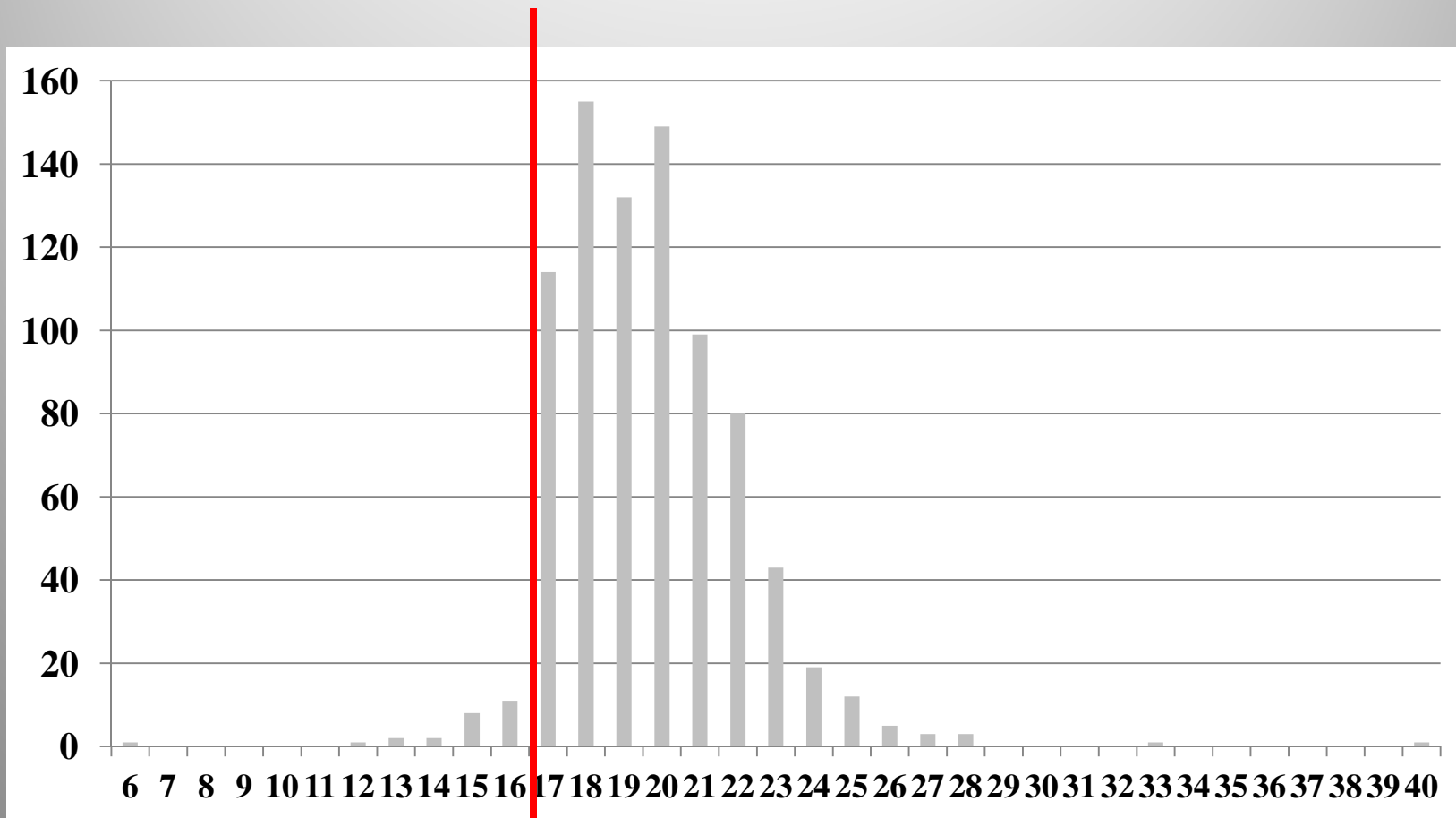
S. aureus ATCC 700699
(Mu 50 - GISA)

S. aureus : diamètres teicoplanine



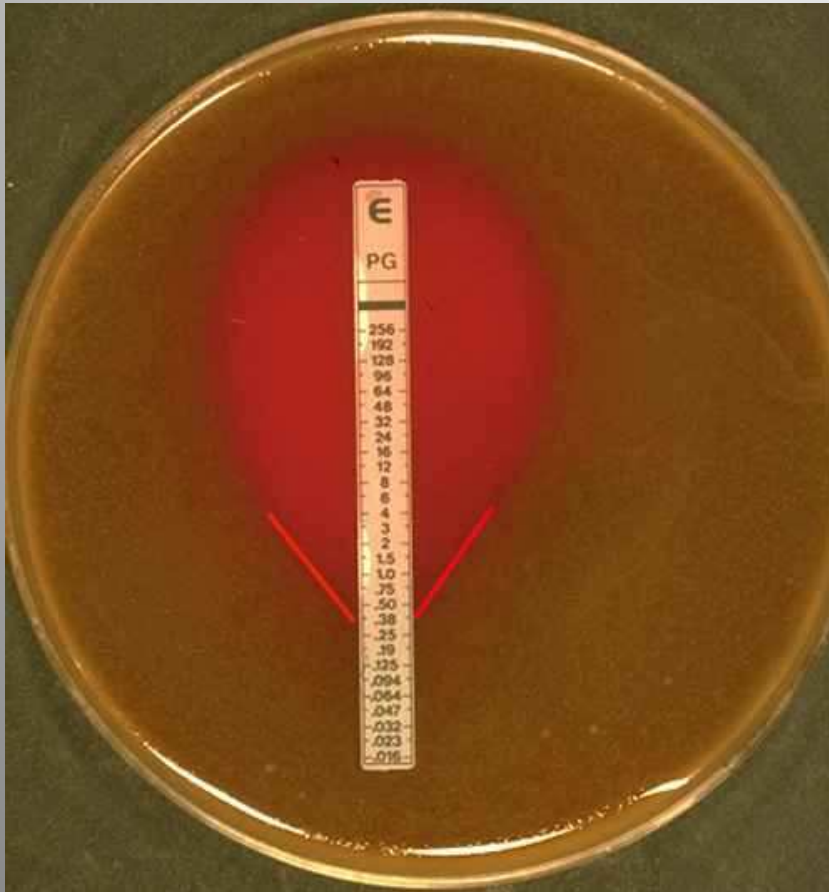
H. Chardon, N. Brieu, E. Lagier, L. Maulin, RICAI 2011

S. epidermidis : diamètres teicoplanine



H. Chardon, N. Brieu, E. Lagier, L. Maulin, RICAI 2011

Pneumocoques



- CMI pour catégoriser Pénicilline G, ampicilline, ceftriaxone (céfotaxime)
- Ne jamais déduire ceftriaxone/céfotaxime de l'ampicilline (souches Ampicilline S et Ceftriaxone I)

Pneumocoques

TABLE 1. Results of penicillin susceptibility testing by the E test and broth microdilution^a

Broth microdilution result (no. of isolates tested)	No. of isolates categorized as follows by the E test:		
	Resistant	Intermediately resistant	Susceptible
Resistant (26)	23	3	0
Intermediately resistant (33)	5	28	0
Susceptible (49)	0	11	38

TABLE 2. Results of cefotaxime susceptibility testing by the E test and broth microdilution^a

Broth microdilution result (no. of isolates tested)	No. of isolates categorized as follows by the E test:		
	Resistant	Intermediate	Susceptible
Resistant (8)	8	0	0
Intermediate (23)	4	18	1
Susceptible (77)	0	11	66

^a See the text for MIC definitions.

Macias EA, Mason EO Jr, Ocera HY, LaRocco MT. Comparison of E test with standard broth microdilution for determining antibiotic susceptibilities of penicillin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. J Clin Microbiol. 1994 Feb;32(2):430-2.

Entérocoques

- CMI vancomycine si signes d'alerte par la méthode de routine

	Erreur					
	Très majeure		Majeure		Mineure	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
<i>vanA/vanB</i>	1/43	0/43			0/43	0/43
<i>vanC</i>	7/20	3/20			14/20	17/20
Pas de gène <i>van</i>			0/35	0/35	2/35	2/35

CA-SFM: Entérobactéries

- **Ertapénème:** Déterminer la CMI en cas de résistance par diffusion à l'ertapénème avec sensibilité à l'imipénème.
- **BLSE:** « on rend comme on lit » mais vérifier la réponse S pour la céphalosporine utilisée pour le traitement par une CMI

Corrélations E-test/ CMI dilution en agar

- 101 souches d'entérobactéries multirésistantes aux antibiotiques

Antimicrobial agent	No. of strains	No. of E test results (%) that are the same as or different from those of agar MICs							% Agreement ^a	<i>p</i> ^b	CC ^c
		<-2	-2	-1	Same	+1	+2	>+2			
Ampicillin	101	0	0	3 (3.0)	83 (82.1)	10 (9.9)	3 (3.0)	2 (2.0)	95.1 ± 2.2	0.01	0.97
Piperacillin	101	0	1 (1.0)	4 (4.0)	60 (59.4)	30 (29.7)	6 (5.9)	0	93.1 ± 2.5	0.03	0.98
Imipenem	101	0	2 (2.0)	11 (10.9)	52 (51.5)	34 (33.6)	2 (2.0)	0	96.0 ± 2.0	0.50	0.93
Ciprofloxacin	101	0	1 (1.0)	38 (37.6)	54 (53.5)	7 (6.9)	1 (1.0)	0	98.0 ± 1.4	0.50	0.97
Cephalothin	101	0	0	6 (5.9)	74 (73.3)	18 (17.8)	3 (3.0)	0	97.0 ± 1.7	0.04	0.97
Cefaclor	101	0	1 (1.0)	20 (19.8)	70 (69.3)	10 (9.9)	0	0	99.0 ± 1.0	0.16	0.99
Cefuroxime	101	0	1 (1.0)	16 (15.8)	67 (66.3)	12 (11.9)	5 (5.0)	0	94.1 ± 2.4	0.05	0.98
Cefotaxime	101	0	6 (5.9)	15 (14.9)	55 (54.5)	18 (17.8)	6 (5.9)	1 (1.0)	87.1 ± 3.3	0.38	0.98
Gentamicin	101	0	1 (1.0)	11 (10.9)	66 (65.3)	19 (18.8)	4 (4.0)	0	95.1 ± 2.2	0.09	0.97
Cefoxitin	101	0	0	9 (8.9)	71 (70.3)	12 (11.9)	9 (8.9)	0	91.1 ± 2.8	<0.01	0.97
All agents	1,010	0	13 (1.3)	133 (13.2)	652 (64.5)	170 (16.8)	39 (3.9)	3 (0.3)	94.6 ± 0.7	<0.01	

^a Percentage of strains within acceptable test limits ($\pm 1 \log_2$ dilution) \pm standard error.

^b Probability obtained from the Wilcoxon signed-rank test.

^c Pearson correlation coefficient.

Méningocoques

Détection sensibilité diminuée aux pénicilines par un disque d'oxacilline (5 µg): si oxa <18mm, CMI péni G et amoxi.

Antimicrobial agent	% Isolates with the following differences in MIC:							% Agreement
	≤-3	-2	-1	0	+1	+2	≥+3	
Penicillin	5.6	3.7	31.5	38.8	11.1	9.23	0	81.4
Cefotaxime	0	1.8	0	94.5	3.7	0	0	98.2
Ceftriaxone	0	0	3.7	94.5	1.8	0	0	100
Cefepime	5.6	13.0	18.5	55.5	7.4	0	0	81.4
Imipenem	11.1	9.3	40.8	25.9	11.1	1.8	0	77.8
Ciprofloxacin	1.8	1.8	1.8	90.9	3.7	0	0	96.5
Chloramphenicol	3.7	0	7.4	46.3	29.6	13.0	0	83.3
Rifampin	0	0	5.6	88.9	1.8	3.7	0	96.3

E-test sur HTM; CMI microdilution

Pascual A, Joyanes P, Martinez-Martinez L, Suarez AI, Perea EJ. Comparison of broth microdilution and E-test for susceptibility testing of *Neisseria meningitidis*. J Clin Microbiol. 1996 Mar;34(3):588-91.

Campylobacter

selon les antibiotiques, la corrélation entre CMI et diamètres est parfois difficile à établir. En cas de doute sur les résultats obtenus par diffusion en milieu gélosé, il y a lieu de déterminer les CMI par une méthode de référence ou toute méthode ayant montré, pour les antibiotiques concernés, son équivalence avec la méthode de référence.

TABLE 6. Comparison of E test MIC results with agar dilution results for eight antimicrobial agents against *C. jejuni* strains

Antimicrobial agent	No. of strains	No. of E test results (%) that are the same as or different from those of agar MICs							% Agreement ^a	P ^b	CC ^c
		<-2	-2	-1	Same	+1	+2	>+2			
Erythromycin ^d	84	1 (1.2)	1 (1.2)	17 (20.2)	49 (58.3)	13 (15.5)	2 (2.4)	1 (1.2)	94.1 ± 2.6	0.33	0.84
Clindamycin ^c	31	6 (19.3)	8 (25.8)	5 (16.1)	3 (9.7)	4 (12.9)	2 (6.5)	3 (9.7)	38.7 ± 8.8	0.04	0.51
Tetracycline ^d	80	0	2 (2.5)	12 (15.0)	35 (43.7)	15 (18.8)	10 (12.5)	6 (7.5)	77.5 ± 4.7	<0.01	0.95
Ciprofloxacin ^d	83	1 (1.2)	6 (7.2)	40 (48.2)	32 (38.6)	3 (3.6)	0 (0)	1 (1.2)	90.4 ± 3.2	0.02	0.74
Trimethoprim-sulfa- methoxazole ^e	30	7 (23.3)	0	1 (3.3)	16 (53.4)	5 (16.7)	1 (3.3)	0	73.3 ± 8.1	0.01	0.89
Gentamicin ^f	53	0	2 (3.8)	1 (1.9)	24 (45.3)	19 (35.8)	6 (11.3)	1 (1.9)	83.0 ± 5.2	0.05	0.38
Chloramphenicol ^f	49	0	3 (6.1)	28 (57.2)	17 (34.7)	1 (2.0)	0	0	93.9 ± 3.4	0.04	0.69
All agents	410	15 (3.7)	22 (5.4)	104 (25.4)	176 (42.9)	60 (14.6)	21 (5.1)	11 (2.9)	82.9 ± 1.9	0.31	

^a Percentage of strains within acceptable test limits ($\pm 1 \log_2$ dilution) \pm standard error.

^b Probability obtained from the Wilcoxon signed-rank test.

^c Pearson correlation coefficient.

^d Strains tested on MHA with 5% lysed horse blood ($n = 31$) or on MHA with 5% sheep blood ($n = 53$).

^e Strains tested on MHA with 5% lysed horse blood only.

^f Strains tested on MHA with 5% sheep blood only.

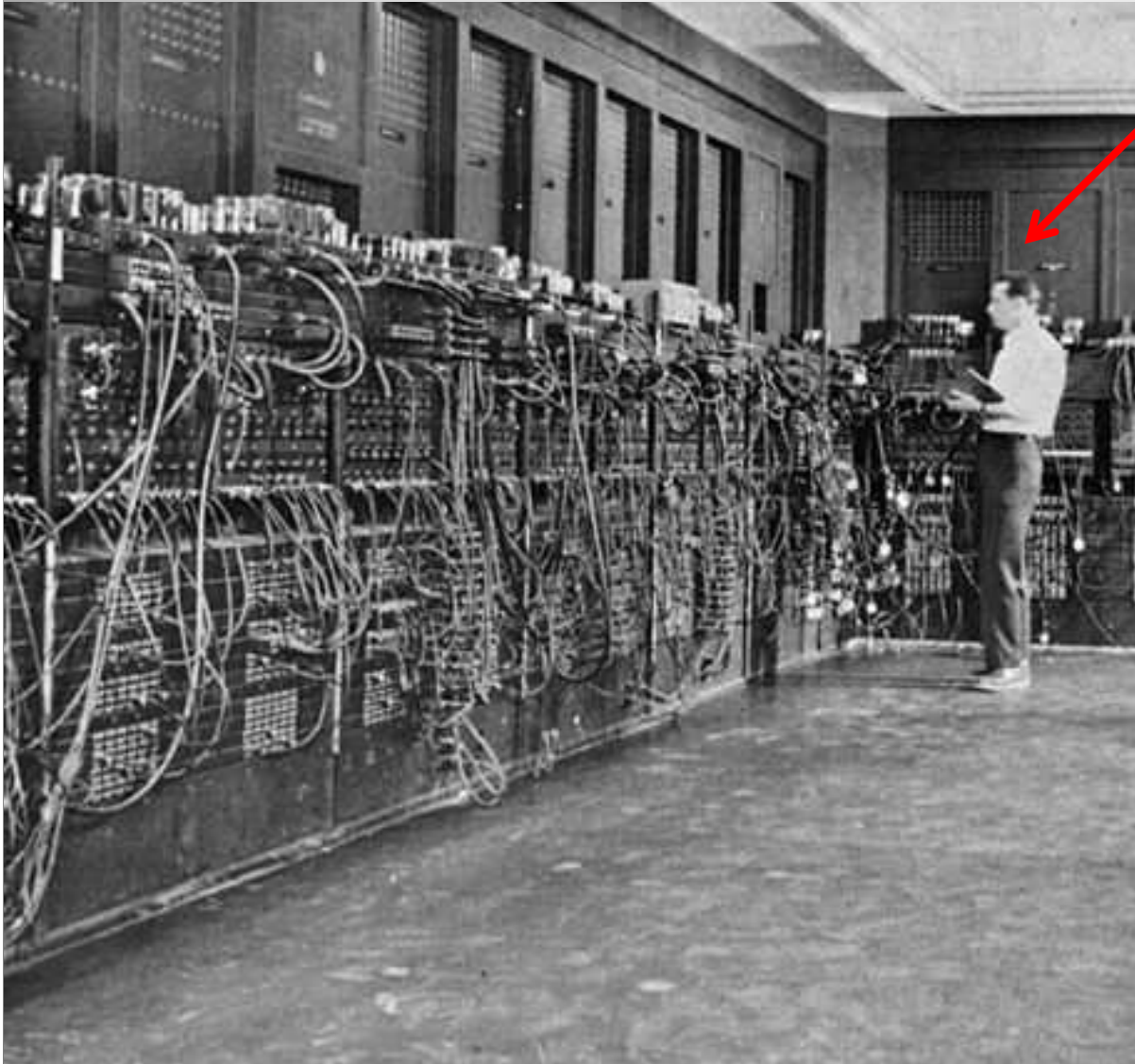
Helicobacter pylori

TABLE 2 Correlation between E-Test and Broth Microdilution Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Results for 122 Isolates of *Helicobacter pylori*

Drug	No. of Isolates for Which E-Test MIC Results Differed by Indicated No. of log ₂ Dilutions in Reference to Broth Microdilution							No. of False-Resistant Isolates by E-Test
	≥2	-2	-1	0	+1	+2	≥2	
Clarithromycin	1	1	5	56	47	9	3	0
Ampicillin	2	4	35	57	19	5	0	0
Metronidazole	0	3	4	36	46	12	6	15

La diffusion en milieu gélosé n'est pas recommandée pour tester la sensibilité à l'amoxicilline de *Helicobacter pylori* car pour l'instant, quelques souches de sensibilité diminuée (CMI > 0,1 mg/L) ont été décrites, mais il ne paraît pas utile de conditionner l'utilisation de l'amoxicilline aux résultats d'un test *in vitro*.

Les cas difficiles



Biologiste
et son manuel qualité
tentant de qualifier sa
méthode

Stenotrophomonas maltophilia

Ticarcilline-ac clavulanique

Method	No. of strains with log ₂ ratio (with reference to test MIC) of:							% ± 1 log ₂ dilution	No. of categorical discrepancies ^a	
	≥+3	+2	+1	0	-1	-2	-3		Major	Very major
Agar dilution (48 h)	0	1	5	70	40	6	1	93.5	2	2
Microdilution (24 h)	13	11	27	34	25	10	3	69.9	7	12
Microdilution (48 h)	6	7	15	29	31	20	15	61.0	23	8
E test	3	11	20	15	20	30	24	44.7	16	3

^a Major errors, reference method susceptible, comparison method resistant; very major errors, reference method resistant, comparison method susceptible.

Référence= dilution en agar 24h

Pankuch et al. Antimicrob Agents Chemother, 1994

Pseudomonas mucoviscidose

TABLE 1. Frequency of E-Test results at variance from agar dilution results

Antibiotic	No. of E-Test results with the following log ₂ concn variances from agar dilution results:							% Agreement (±1 log ₂ dilution)
	>-2	-2	-1	Same	+1	+2	>+2	
Ceftazidime	4	7	13	64	3	3	6	80
Ciprofloxacin	0	1	25	72	0	2	0	97
Piperacillin	5	16	12	59	2	5	1	73
Tobramycin	0	1	15	74	0	10	0	89
Total	9	25	65	269	5	20	7	

TABLE 2. E-Test results with qualitative variance from agar dilution results

Antibiotic	% Agreement	No. of E-Test results with the following variance from agar dilution results		
		Minor discrepancies	Major discrepancies	Very major discrepancies
Ceftazidime	84	15	0	1
Ciprofloxacin	96	4	0	0
Piperacillin	88	10	0	2
Tobramycin	93	7	0	0
Total	90	36	0	3

Marley EF, Mohla C, Campos JM. Evaluation of E-Test for determination of antimicrobial MICs for *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol. 1995 Dec;33(12):3191-3.

Conclusion

- La pratique de CMI est devenue incontournable dans certaines indications
- La technique du gradient en gélose montre des corrélations satisfaisantes avec la technique de CMI en gélose ou milieu liquide pour les bactéries non exigeantes à croissance rapide
- Pour les autres bactéries, les corrélations sont difficiles à établir tant qu'une technique de référence consensuelle n'a pas été établie.