

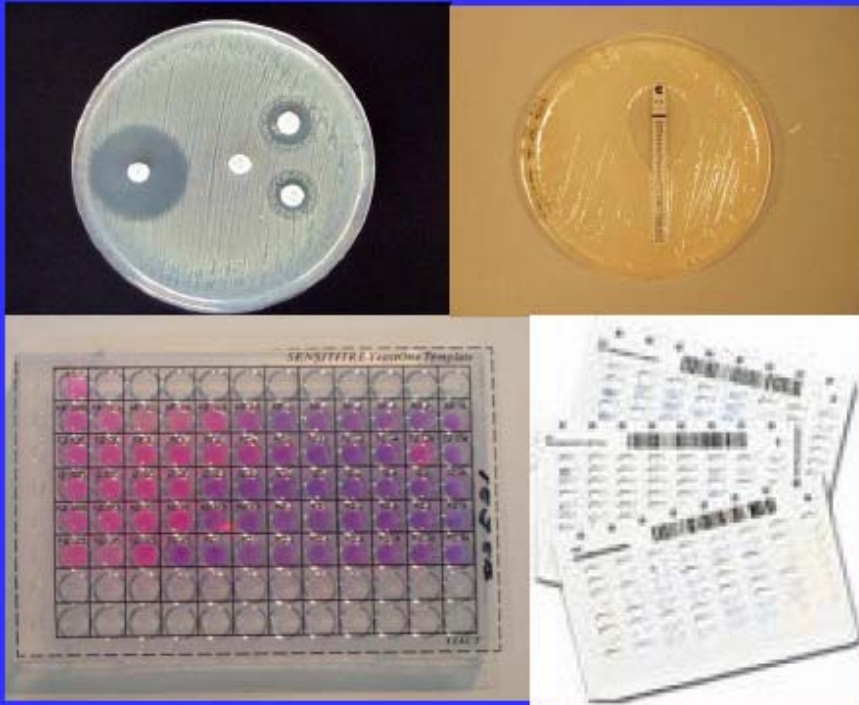
MIC bepalingen: fenotype of genotype?

W.H.F. Goessens

Erasmus Universitair Medisch Centrum Rotterdam

Afd. Medische Microbiologie en Infectieziekten

Antibiogram Reading



Ø Inh. zone (mm)

MIC (mg/L)



S-I-R



Susceptible (S)

A micro-organism is defined as susceptible by a level of antimicrobial activity associated with a high likelihood of therapeutic success. A micro-organism is categorized as susceptible by applying the appropriate breakpoint in a defined phenotypic test system.

Note: This breakpoint may be altered with legitimate changes in circumstances

Intermediate (I)

A micro-organism is defined as intermediate by a level of antimicrobial activity associated with intermediate therapeutic effect. A micro-organism is categorized as intermediate by applying the appropriate breakpoints in a defined phenotypic test system.

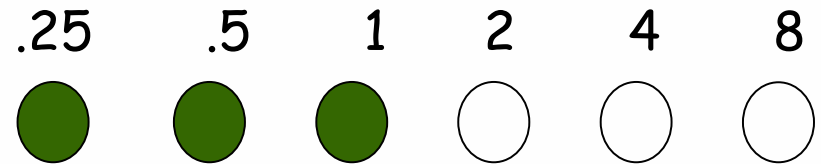
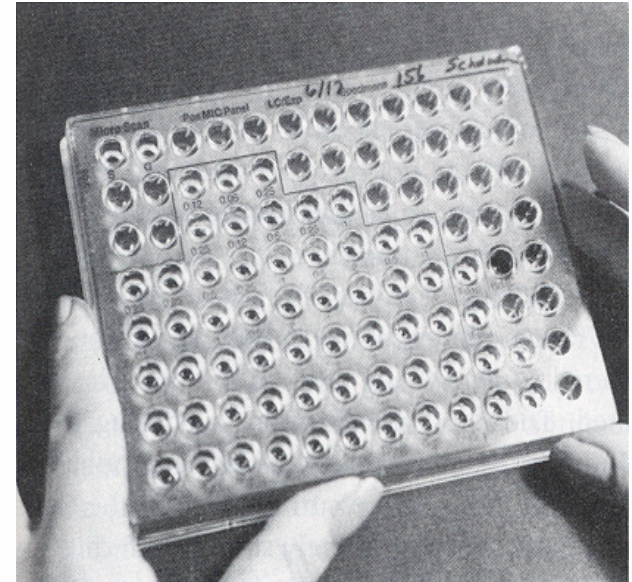
Note: This breakpoint may be altered with legitimate changes in circumstances.

Resistant (R)

bacteria are defined as resistant by a level of antimicrobial activity associated with a high likelihood of therapeutic failure. A micro-organism is categorized as resistant by applying the appropriate breakpoint in a defined phenotypic test system.

Note: This breakpoint may be altered with legitimate changes in circumstances

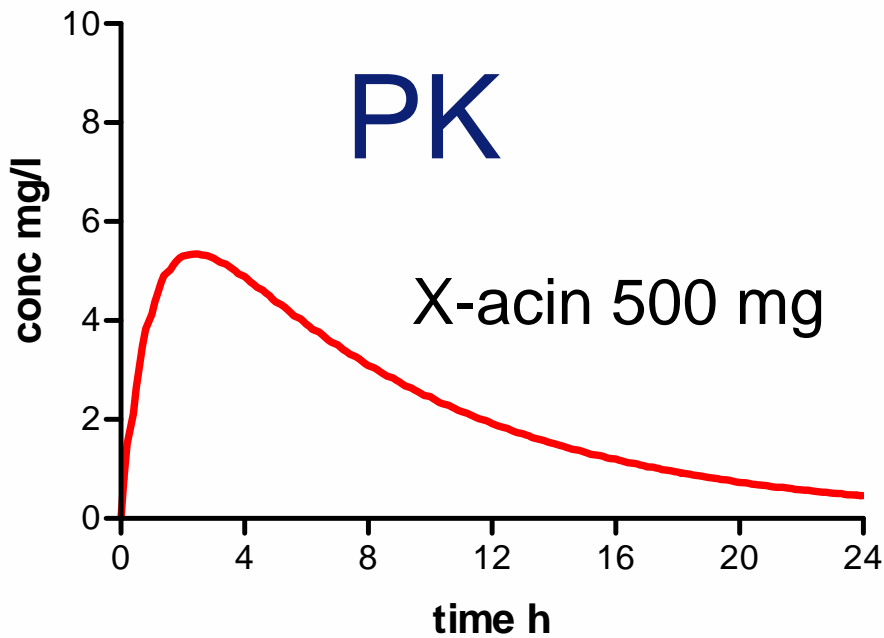
MIC Lowest concentration with no visible growth after 18 hour incubation



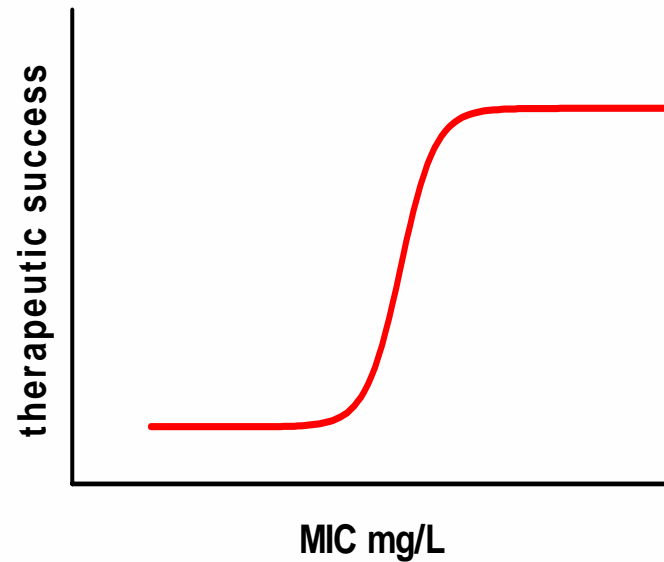
MIC = 2 mg/L

PK

X-acin 500 mg



Is susceptibility (MICs) related to
(clinical) outcome?



If yes, which values (breakpoints)
make the difference?

Dose / Breakpoint Finding - The Past

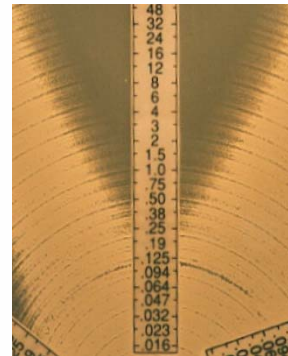
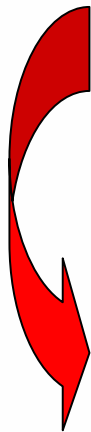
Erasmus MC



Pharmacokinetic

parameter

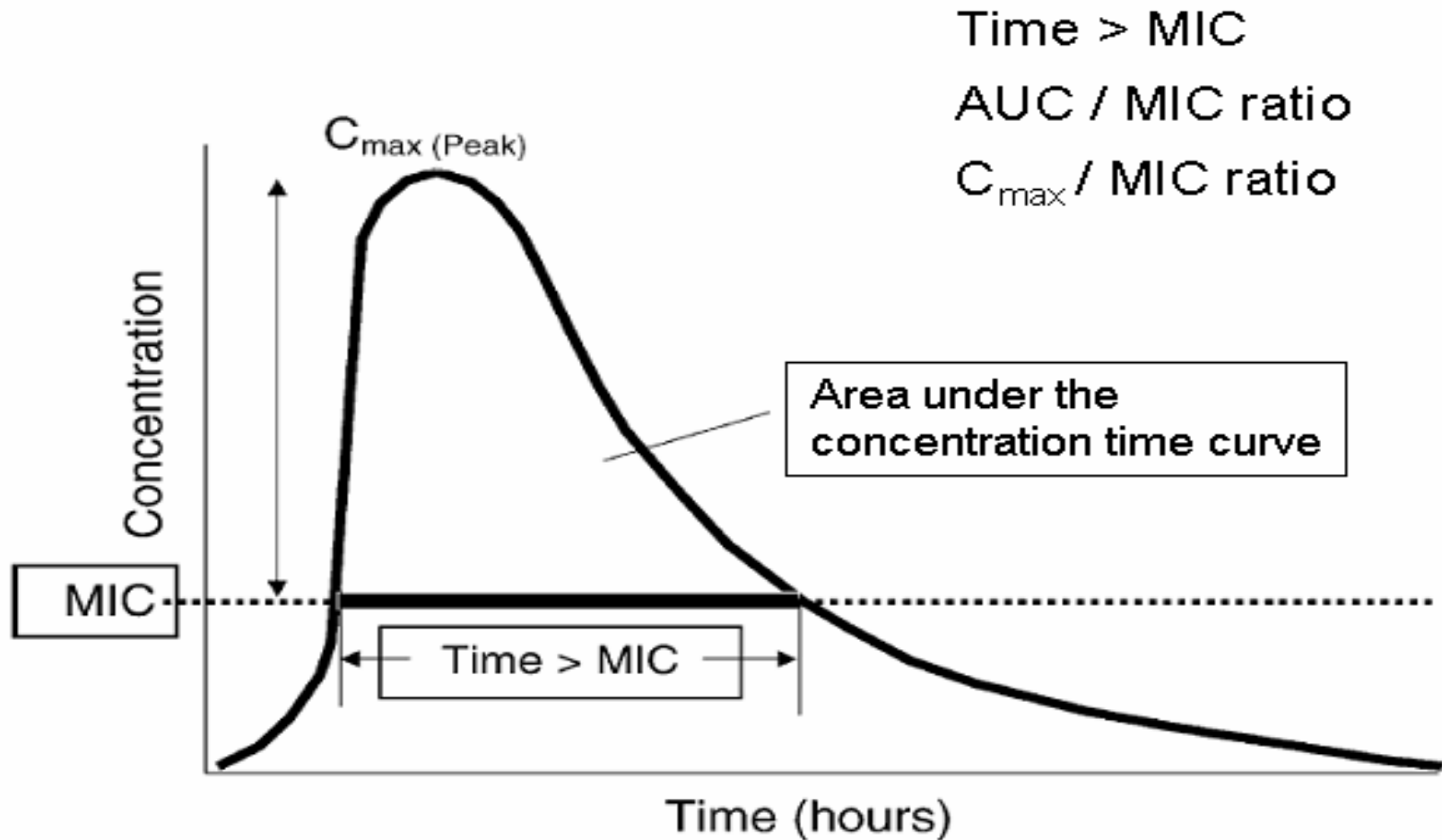
MIC



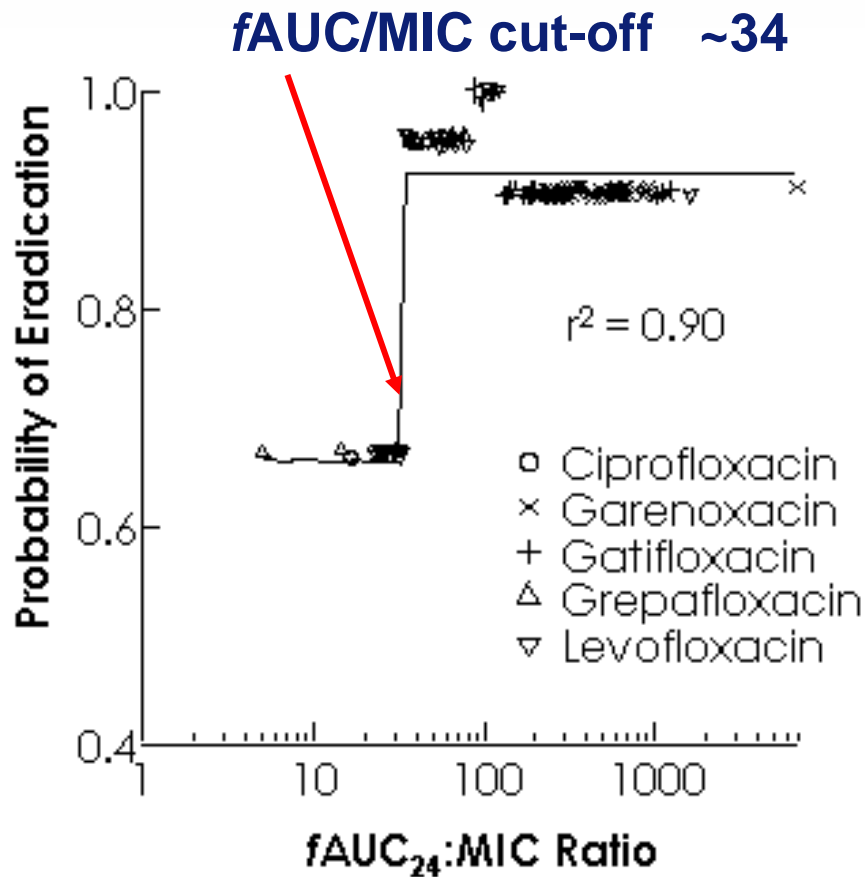
Pharmacodynamic index

(AUC/MIC, Peak/MIC, T>MIC)

PK/PD parameters related to therapeutic efficacy

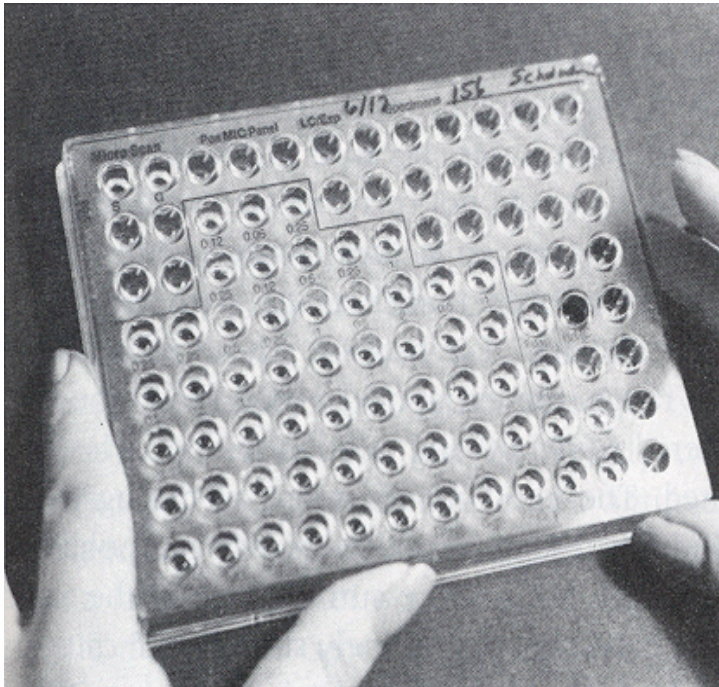


Relationship between $fAUC/MIC$ and Effect



- a total 121 patients with respiratory tract infection involving *S. pneumoniae*.
- $fAUC:MIC > 34$ had 92.6% response rate.
- $fAUC:MIC < 34$ had 66.7% response rate.

Microdilution



- Microdilution, 0.1 ml
- Mueller Hinton (1941, Corn starch)
- Inoculum $5 \cdot 10^5$ cfu/ml
- 36 ± 1 °C
- 18 ± 2 h incubation

MIC +
phenotypic resistance detection

MIC determinations

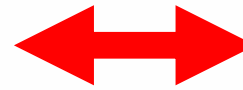
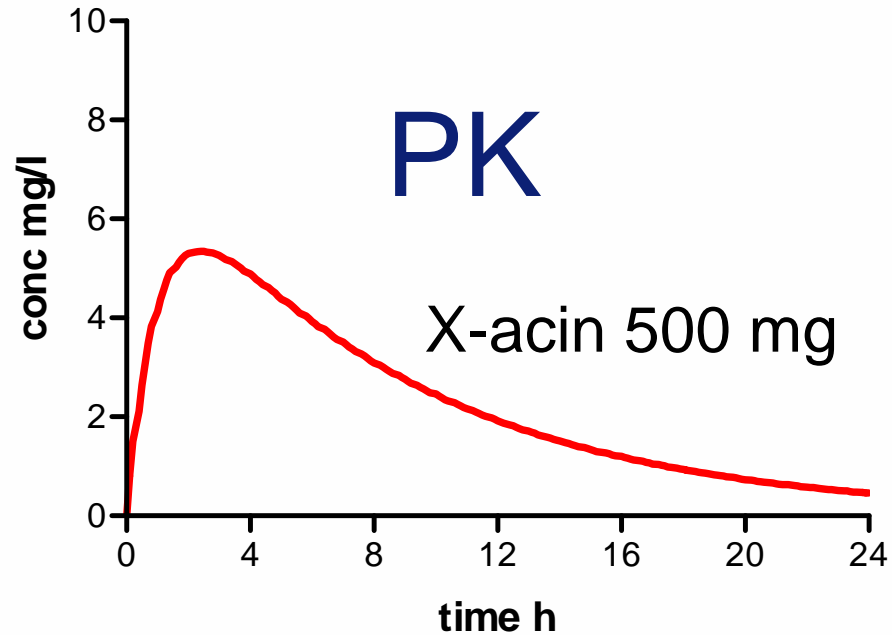
- β -lactamase of *H.influenzae*
- β -lactamase of Enterococci
- β -lactamase of staphylococci
- PBP 2a for MRSA detection

Genotypic “susceptibility” testing

MIC + resistance mechanism detection

MIC determinations

techniek	organisme	genotype	gen
PCR	<i>S. aureus</i>	MRSA	mecA
PCR	Enterococcus spec.	VREF	VanA,B,C
hybridisatie	Enterobacteriaceae	ESBL	TEM/SHV/CTX-M
PCR	<i>P. aeruginosa</i>	MBL	VIM/IMP



Specific
resistance
gene or
specific
mutation

Rule no.	Organisms	Agent	Rule	Exceptions	Scientific basis	Evidence grade	References
8.1	<i>Staphylococcus</i> spp.	Isoxazoly-penicillins	If resistant to isoxazoly-penicillins (as determined with oxacillin, cefoxitin, or by detection of <i>mecA</i> -gene or of PBP2a) report as resistant to all β -lactams.	Developmental anti-MRSA cephalosporins, e.g. ceftobiprole and ceftaroline.	Production of PBP2a (encoded by <i>mecA</i>) leads to cross resistance to β -lactams except ceftobiprole and ceftaroline.	A	Chambers HF <i>et al.</i> , 1990 Page MG <i>et al.</i> , 2006
8.2	<i>Staphylococcus</i> spp.	Penicillins	If penicillinase is detected, report as resistant to all penicillins, regardless of MIC, except the isoxazoly-penicillins and combinations with β -lactamase inhibitors.	Testing of penicillinase production may be discouraged in certain countries due to high prevalence of penicillinase producers (>90%) and technical problems. In this case it may be considered appropriate to report all isolates resistant to benzylpenicillin, ampicillin and amoxicillin.	Production of penicillinase leads to resistance to all penicillins except the isoxazoly-analogues.	C	Nathwani D <i>et al.</i> Drugs. 1993
8.3	β -Haemolytic streptococci (Group A, B, C, G)	Benzylpenicillin	If susceptible to penicillin report susceptible to aminopenicillins, cephalosporins and carbapenems. If resistant to penicillin check identification and susceptibility.	Rare isolates of group B streptococci may have diminished susceptibility to penicillins.	Susceptibility to penicillins is currently the rule. No resistance to β -lactams reported so far except in Group B streptococci (MIC of benzylpenicillin up to 0.6 mg/L).	C	Karlowsky JA <i>et al.</i> , 2002 Casey JR <i>et al.</i> , Clin Infect Dis 2004
8.4	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	β -lactams	If resistant by the oxacillin disk screening test, perform MIC for benzylpenicillin, ampicillin (or		Production of mosaic PBP's leads to various patterns of	B	Nagai K <i>et al.</i> 2002 File TM Jr. 2006

Staphylococcus spp.						EUCAST Clinical Breakpoint Table v. 1.3 2011-01-05					
Penicillins ¹	MIC breakpoint (mg/L)		Disk content (µg)	Zone diameter breakpoint (mm)		Notes					
	S ≤	R >		S ≥	R <						
						<p>1/A. Most staphylococci are penicillinase-producers. The benzylpenicillin breakpoint will mostly, but not unequivocally, separate beta-lactamase producers from non-producers. Isolates positive for beta-lactamase are resistant to benzylpenicillin, phenoxymethylpenicillin, amino-, carboxy- and ureidopenicillins. Isolates negative for beta-lactamase and susceptible to cefoxitin (cefoxitin is used to screen for "methicillin resistance") can be reported susceptible to these drugs.</p> <p>Isolates positive for beta-lactamase and susceptible to cefoxitin are susceptible to penicillin-beta-lactamase inhibitor combinations and penicillinase-resistant penicillins (oxacillin, cloxacillin, dicloxacillin and flucloxacillin). Isolates resistant to cefoxitin are methicillin resistant and resistant to beta-lactam agents, including beta-lactamase inhibitor combinations, except for cephalosporins with approved anti-MRSA activity and clinical breakpoints.</p>					
Benzylpenicillin	0.125 ¹	0.125 ^{1,2}	1 unit	26 ^{A,B}	26 ^{A,B}	B. Isolates with inhibition zones above the breakpoint and a fuzzy zone edges can be reported susceptible to benzylpenicillin.					
Ampicillin	Note ¹	Note ¹	2	15 ^{A,C}	15 ^{A,C}	C. Breakpoints relate to <i>S. saprophyticus</i> only.					
Ampicillin-sulbactam	Note ¹	Note ¹		Note ^A	Note ^A						
Amoxicillin	Note ¹	Note ¹		Note ^A	Note ^A						
Amoxicillin-clavulanate	Note ¹	Note ¹		Note ^A	Note ^A						
Piperacillin	Note ¹	Note ¹		Note ^A	Note ^A						
Piperacillin-tazobactam	Note ¹	Note ¹		Note ^A	Note ^A						
Ticarcillin	Note ¹	Note ¹		Note ^A	Note ^A						
Ticarcillin-clavulanate	Note ¹	Note ¹		Note ^A	Note ^A						
Phenoxymethylpenicillin	Note ¹	Note ¹		Note ^A	Note ^A						
Oxacillin²	Note ^{1,2}	Note ^{1,2}		Note ^A	Note ^A	2. <i>S. aureus</i> and <i>S. lugdunensis</i> with oxacillin MIC values >2 mg/L are mostly methicillin resistant due to the presence of the <i>mecA</i> gene. The corresponding oxacillin MIC for coagulase-negative staphylococci is >0.25 mg/L.					
Cloxacillin	Note ¹	Note ¹		Note ^A	Note ^A						
Dicloxacillin	Note ¹	Note ¹		Note ^A	Note ^A						
Flucloxacillin	Note ¹	Note ¹		Note ^A	Note ^A						

Glycopeptides	MIC breakpoint (mg/L)		Disk content (µg)	Zone diameter breakpoint (mm)		Notes Numbers for comments on MIC breakpoints Letters for comments on disk diffusion
	S ≤	R >		S ≥	R <	
Teicoplanin	2 ¹	2	30	16 [^]	16 [^]	<p>1. The susceptible breakpoint for vancomycin has been raised to 4 mg/L to avoid dividing the wild type MIC distributions of some species. The resistant breakpoint for teicoplanin has been reduced to 2 mg/L to avoid erroneous reporting of isolates with <i>vanA</i>-mediated resistance.</p> <p>A. Glycopeptide susceptible enterococci exhibit sharp zone edges. Suspect resistance when the zone edge is fuzzy or colonies grow within the inhibition zone. Some <i>vanB</i> isolates (vancomycin resistant, teicoplanin susceptible) are particularly difficult to detect with disk diffusion.</p>
Vancomycin	4 ¹	4	5	12 [^]	12 [^]	

VanA MICs voor vancomycin ≥ 32 µg/ml

VanB MICs voor vancomycin ≥ 32 µg/ml

Rule no.	Organisms	Fusidic acid	Ceftazidime	Cephalosporins (except ceftazidime)	Aminoglycosides	Lincosamides	Quinupristin-dalfopristin	Vancomycin	Teicoplanin	Fosfomycin	Novobiocin	Nitrofurantoin	Trimethoprim-sulphamethoxazole
4.1	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>		R							R	R		
4.2	<i>Staphylococcus cohnii, xylosus</i>		R								R		
4.3	<i>Staphylococcus capitis</i>		R							R			
4.4	Other coagulase-negative staphylococci and <i>Staphylococcus aureus</i>		R										
4.5	<i>Streptococcus</i> spp.	R			LLR								
4.6	<i>Enterococcus faecalis</i>	R	R	R	LLR	R	R						(R) ¹
4.7	<i>Enterococcus gallinarum, casseliflavus</i>	R	R	R	LLR	R	R	R					(R) ¹
4.8	<i>Enterococcus faecium</i>	R	R	R	LLR ⁺								(R) ¹
4.9	<i>Corynebacterium</i> spp.									R			
4.10	<i>Listeria monocytogenes</i>		R	R									
4.11	<i>Leuconostoc, pediococcus</i>							R	R				
4.12	<i>Lactobacillus</i> spp. (some species)							R	R				

Glycopeptides	MIC breakpoint (mg/L)		Disk content (µg)	Zone diameter breakpoint (mm)		Notes Numbers for comments on MIC breakpoints Letters for comments on disk diffusion
	S ≤	R >		S ≥	R <	
Teicoplanin	2 ¹	2	30	16 ^A	16 ^A	<p>1. The susceptible breakpoint for vancomycin has been raised to 4 mg/L to avoid dividing the wild type MIC distributions of some species. The resistant breakpoint for teicoplanin has been reduced to 2 mg/L to avoid erroneous reporting of isolates with <i>vanA</i>-mediated resistance.</p> <p>A. Glycopeptide susceptible enterococci exhibit sharp zone edges. Suspect resistance when the zone edge is fuzzy or colonies grow within the inhibition zone. Some <i>vanB</i> isolates (vancomycin resistant, teicoplanin susceptible) are particularly difficult to detect with disk diffusion.</p>
Vancomycin	4 ¹	4	5	12 ^A	12 ^A	

VanA MICs voor vancomycin >256 µg/ml

VanB MICs voor vancomycin >32 µg/ml

VanC MICs voor vancomycin 4-8 µg/ml

ESBLs

Cephalosporins ¹	MIC breakpoint (mg/L)		Disk content (µg)	Zone diameter breakpoint (mm)		Notes Numbers for comments on MIC breakpoints Letters for comments on disk diffusion
	S ≤	R >		S ≥	R <	
						1. The cephalosporin breakpoints for Enterobacteriaceae will detect all clinically important resistance mechanisms (including ESBL and plasmid mediated AmpC). Some strains that produce beta-lactamases are susceptible or intermediate to 3rd or 4th generation cephalosporins with these breakpoints and should be reported as found, i.e. the presence or absence of an ESBL does not in itself influence the categorization of susceptibility. In many areas, ESBL detection and characterization is recommended or mandatory for infection control purposes.
Cefaclor	-	-		-	-	
Cefadroxil (uncomplicated UTI only)	16	16	30	12	12	
Cefalexin (uncomplicated UTI only)	16	16	30	12	12	
Cefazolin	-	-		-	-	
Cefepime	1	4	30	24	21	
Cefixime (uncomplicated UTI only)	1	1	5	17	17	
Cefotaxime	1	2	5	21	18	
Cefoxitin (screen) ²	NA	NA		19	19	2. The cefoxitin ECOFF (8 mg/L) has a high sensitivity, but poor specificity for identification of AmpC-producing Enterobacteriaceae as this antibiotic is also affected by permeability alterations and some carbapenemases. Classical non-AmpC producers are wild type, whereas plasmid AmpC producers or chromosomal AmpC hyperproducers are non-wild type.
Cefpodoxime (uncomplicated UTI only)	1	1	10	21	21	
Ceftazidime	1	4	10	22	19	
Ceftibuten (uncomplicated UTI only)	1	1	30	21	21	
Ceftriaxone	1	2	30	23	20	
Cefuroxime	8 ³	8	30	18	18	3. The breakpoint relates to a dosage of 1.5 g x 3 and to <i>E. coli</i> , <i>P. mirabilis</i> and <i>Klebsiella</i> spp. only.
Cefuroxime axetil (uncomplicated UTI only)	8	8	30	18	18	

CTX-M positive isolates

Cefotaxim > 8 µg/ml

Ceftazidime > 0.5 - 16 µg/ml

Carbapenems ¹	MIC breakpoint (mg/L)		Disk content (µg)	Zone diameter breakpoint (mm)		Notes Numbers for comments on MIC breakpoints Letters for comments on disk diffusion
	S ≤	R >		S ≥	R <	
						1. The carbapenem breakpoints for Enterobacteriaceae will detect all clinically important resistance mechanisms (including the majority of carbapenemases). Some strains that produce carbapenemase are categorized as susceptible with these breakpoints and should be reported as tested, i.e. the presence or absence of a carbapenemase does not in itself influence the categorization of susceptibility. In many areas, carbapenemase detection and characterization is recommended or mandatory for infection control purposes.
Doripenem	1	4	10	24	18	
Ertapenem	0.5	1	10	25	22	
Imipenem ²	2	8	10	21	15	2. <i>Proteus</i> and <i>Morganella</i> species are considered poor targets for imipenem.
Meropenem	2	8	10	22	16	

OXA-48 positive *K. pneumoniae* isolate

Imipenem 0.5 µg/ml

Meropenem 0.5 µg/ml

Ertapenem 2 µg/ml

Mycobacterium tuberculosis

Er is een mutatie aanwezig in de hotspot regio van het *rpoB* gen. De kans dat dit isolaat resistent is voor rifampicine is daarmee ongeveer 99%.

Er is géén mutatie gevonden in de hotspot regio van het *rpoB* gen. De kans dat dit isolaat gevoelig is voor rifampicine is daarmee ongeveer 90%.

Er is een onbekende mutatie gevonden in de hotspot regio van het *rpoB* gen. We weten niet of deze mutatie tot resistentie leidt.

Genotypic “susceptibility” testing

MIC + resistance mechanism detection

MIC determinations

Genotypic resistance
mechanism detection

MIC + resistance mechanism detection

MIC determinations



Gevoeligheidsbepaling

lange TAT

klinische correlatie

Resistentiedetectie

korte TAT

klinische correlatie??

“infection control”

Erasmus MC



IN genotypic kun je geen gebruik maken van chromosomaal gecodeerde genen immers deze komen altijd voor in organismen dus aantonen van gen is geen knunst en zegt ook niks.

Met adneree woorden je moet al naar RNA kijken voor expressie of naar acquired mechanisms of resistance zoals MRSA en VREF

Ik kan hier ook al de TB data laten zien van RIVM

Maar ik kan ook laten zien dat als je het genotype hebt nog steeds geen voorspelling kunt doen over de gevoeligheid als voorbeeld kan ik hier AMpC laten zien met en zonder permeabiliteit!! Voor de gevoeligheid van de carbapenems!!

Dus het is maar zeer de vraag of genotype gaat werken omdat mechanismen een interactie met elkaar ondergaan en je bent afhankelijk van expressie niveaus dat kan ik misschien ook laten zien bij MBL pseudmonassen en sowieso ook weer bij AmpC in de collectie van 2010 uit de data van Sophia daar zitten isolaten tussen met een MIC van 4. Dus waarschijnlijk is een methodiek waarbij je naar sec enzymactiviteit zou kunnen meten wel een betere benadering voor het determineren van resistentie. Voor gevoeligheid is dit ook bruikbaar omdat je de hydrolyse laat zien voor heel veel antibiotica

Ik kan het voorbeeld laten zien van b-lactamases in gram negatieven. Immers alle gram-negatieven het b-lactamase maar de mate van expressie bepaald uiteindelijk de gevoeligheid

Ook wijzen op discrepantie tussen ESBL en gevoeligheid voor ceftazidime bij CTX-M en omgekeerd voor cefotaxim bij klassieke ESBL

In feite draaft moleculaire biologie door ook een mooi voorbeeld omdat organismen bepaald gen hebben zoals VanC zullen en moeten ze resistent zijn. Nou voor *E. casseliflavus* en *gallinarum* kom je niet boven een MIC van 4 of 8 en dat is nog steeds S.

Dus of de moleculairen doen het niet goed of de breekpunten zijn niet goed!!.

Er is een groot verschil tussen breekpunten vast stellen en detectie van resistentie. Immers dit zijn 2 verschillende zaken.

Er zitten natuurlijk ook voordelen aan genotypische bepaling maar dan is het nog steeds een confirmatie veelal. Maar de laatste ontwikkelingen bij MRSA daar wordt de techniek gebruikt voor directe detectie van resistentie in primaire materialen. Dit is natuurlijk een gunstige ontwikkeling net als de directe detectie van bepaalde mechanismen van resistentie bij MTB!!. Echter de betrouwbaarheid is nog niet optimaal. Voor Gram-negatieven bestaan dit soort methoden eigenlijk nog niet. Niet voor ESBL en niet voor MBL omdat er natuurlijk heel veel variatie is in de verschillende genen en soms kan het zo zijn dat er intrinsiek al bepaalde genen voorkomen bij non-pathogenen zoals *Kluyvera* dan ga je de mist in met de detectie van je gen. Dit is ook de reden om altijd bij MRSA de koppeling te maken tussen de resistentiecassette en identificatie immers bij coagulase negatieven komt deze resistentie cassette ook voor.

Gevecht tussen gevoeligheidsbepaling en resistentiedetectie

Zijn in feite twee verschillende zaken

Dit is ook het probleem waar CLSI mee worstelde en in feite heeft EUCAST dit deels los gelaten in de vorm van ESBL!!

Echter ze blijven wel nog Expert rules adviseren om een en ander te corrigeren.

Het probleem doet zich in feite voor bij Acinetobacter. Immers voor een aantal middelen zijn geen breekpunten gedefinieerd! Omdat acinetobacters heel snel resistent kunnen worden tegen bep. Antibiotica omdat de resistentiegenen immers intrinsiek aanwezig zijn zoals AmpC en OXA-53?? Echter deze komen niet altijd meteen tot expressie!!. Dus ga je het gen opsporen dan toon je dat bij alle calcoaceticus isolaten aan!!. Echter in vitro blijken ze toch gevoelig.