



LGL

**Resistenztestung von *Corynebacterium diphtheriae* und anderen
Vertretern des *C. diphtheriae* Komplexes nach EUCAST**

BARDa-Netzwerktreffen 2023

Anja Berger, GI2.2 Humanbakteriologie, Mykologie, Konsiliarlabor für Diphtherie

C. diphtheriae und der *C. diphtheriae* Komplex

	Toxin	Human	Animal
<i>C. diphtheriae</i> (<i>phitis, gravis, intermedius</i>)	+/-/NTTB	+++	sporadic (n=13)
<i>C. beltantii</i>	-	+	?
<i>C. rouxii</i>	-	n=6 (skin)	n=6 (skin, otitis; dogs, cats)
<i>C. ulcerans</i>	+/-/NTTB	++	++ (19 species)
<i>C. ramonii</i> (<i>C. ulcerans</i> , lineage 2)	+/-/NTTB	n=19	n=1 (dog)
<i>C. silvaticum</i> (ehemals „NTTB wildlife cluster“)	NTTB	n=2 (unpublished)	n=34 (wild boar, deer)
<i>C. pseudotuberculosis</i>	+/-	sporadic	+++

zoonotische Übertragung

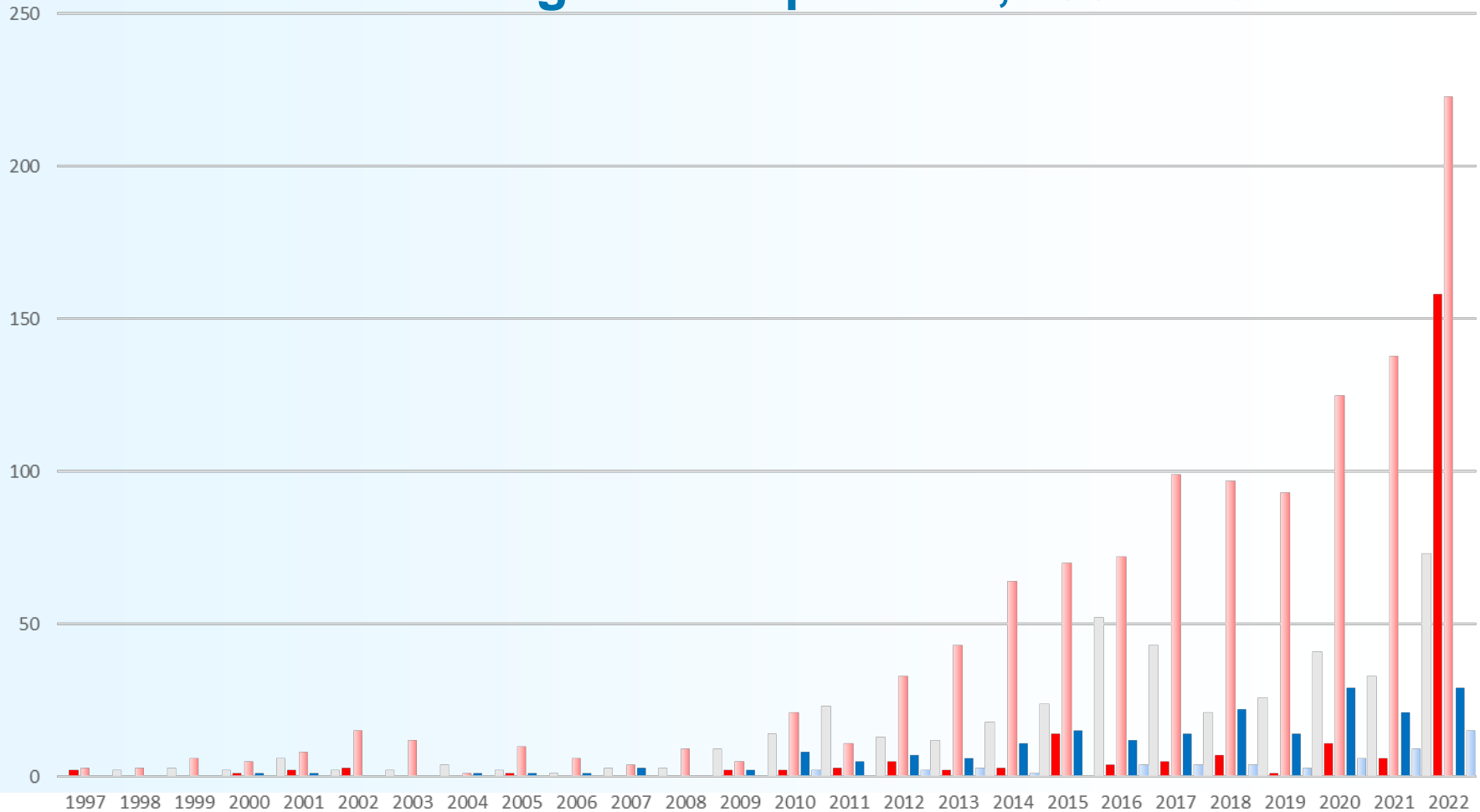
NTTB: nontoxicogenic, *tox* gene bearing= PCR positiv, Elek-Test negativ

Warum eigene Grenzwerte für *Corynebacterium diphtheriae* Komplex?

1. Diphtherie ist selten (Meldezahlen), Antibiotikatherapie (unterstützend zu Antitoxingabe) und Postexpositionsprophylaxe (Kontaktpersonen)
2. *tox- C. diphtheriae* (keine Meldezahlen vorhanden) invasive Infektionen (Sepsis, Endokarditis, Gelenkinfektionen) möglich
3. Zoonotische Diphtherieerreger *Corynebacterium ulcerans* im Vormarsch (Wundinfektionen, selten Diphtherie der oberen Atemwege)

→ sichere Therapieempfehlungen nötig

Probeneinsendungen KL Diphtherie, 1997 - 2022



C. diphtheriae

■ tox positiv ■
■ tox negativ ■

C. ulcerans

... Weitere Gründe für eigene Grenzwerte?

Diphtherietherapie

- Penicillin und Erythromycin: Mittel der ersten Wahl
- Postexpositionsprophylaxe: Penicillin, Erythromycin

Beobachtung im KL Diphtherie:

- EUCAST Grenzwerte passen nicht für *C. diphtheriae* und *C. ulcerans* (Bsp. Penicillin, Clindamycin)
- **Vermutung:** bisherige EUCAST MHK/HHD-Daten basieren auf Analysen von Corynebakterien mit anderen Resistenzraten/Wildtypverteilungen
- Keine Grenzwerte für Erythromycin nach EUCAST
- Labore weichen aus auf CLSI- Grenzwerte oder Auswertung von Agardiffusionstest/E-Etest nach anderen Kriterien

Diphtherie: Empfindlichkeitsprüfung

CLSI

- seit 2006 standardisiertes Test-Verfahren für *Corynebacterium species* einschließlich *C. diphtheriae*) (Mikrobouillondilutionsverfahren, MHKs)
→ Wegen unterschiedlicher Dosierungsempfehlungen/Zusammensetzung der Präparate nicht 1:1 übertragbar auf den europäischen Raum → EUCAST

EUCAST

- seit Version v.4, 2014 breakpoints für *Corynebacterium sp.* (außer *C. diphtheriae*) und ohne Makrolide (MHKs, HHDs)
- Version v. 6, 2016 *Corynebacterium sp.* einschließlich *C. diphtheriae*
- Seit v. 9.0, 2019 keine Bewertungskriterien für *C. diphtheriae* (bzw. partiell ausgeschlossen: Penicillin und Rifampicin)

Begriffe

ECOFF (Epidemiological Cut-Off Value):

MHK-Wert, der eine gegenüber einem Antibiotikum sensible Population gegen eine resistente Population abgrenzt; minimaler klinischer Grenzwert, der phänotypisch bestimmt wird. Er sagt aus unterhalb welchen Wertes es zu Problemen zwischen Korrelation von MHK- und Therapieerfolg kommen kann.

→ Standardisiertes Verfahren (techn. und biologische Variation muss abgebildet sein, d.h. verschiedene Labore, Anzahl der Stämme, Referenzverfahren etc.)

TECOFF (Tentative= vorläufiger ECOFF)

Wenn Daten nicht vollständig erhoben werden können (z.B. seltener Erreger, nur ein Studienzentrum o.Ä.)

Klinischer Grenzwert S/I (sensibel/intermediär)

Hohe Wahrscheinlichkeit des Therapieerfolgs bei richtiger Dosierung

Daten aus dem KL Diphtherie 2011-2017



Marosevic et al.
ESCAIDE 2017, JAC 2020

Antimicrobial susceptibility of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* in Germany 2011–17

Durdica V. Marosevic^{1,2,†}, Anja Berger^{1,3,†}, Gunnar Kahlmeter⁴, Sarah Katharina Payer¹, Stefan Hörmandorfer¹ and Andreas Sing^{1,3}

¹Public Health Microbiology, Bavarian Health and Food Safety Authority, Oberschleißheim, Germany; ²European Programme for Public Health Microbiology Training (EUPHEM), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Stockholm, Sweden; ³Consultant Laboratory for Diphtheria, Bavarian Health and Food Safety Authority, Oberschleißheim, Germany; ⁴Clinical Microbiology and the EUCAST Development Laboratory, Central Hospital, Växjö, Sweden

*Corresponding author. E-mail: Durdjica.marosevic@gmail.com or Durdica.marosevic@lgl.bayern.de
†These authors contributed equally.

Received 16 January 2020; accepted 26 May 2020

Background: Diphtheria is mainly caused by diphtheria-toxin-producing strains of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans*. The recommended first-line antibiotic is penicillin or erythromycin, but reliable susceptibility data are scarce.

Objectives: To define WT MIC distributions of 12 antimicrobial agents and provide data for the determination of tentative epidemiological cut-off values (TECOFFs) for potentially toxigenic corynebacteria and to evaluate the potential usefulness of a gradient test (Etest) for susceptibility testing of penicillin, erythromycin and clindamycin.

Methods: For the 421 human or veterinary isolates from the period 2011–17, MICs of 12 antimicrobial agents were determined. Etest performance was evaluated for penicillin, erythromycin and clindamycin.

Results: MIC distributions were characterized and TECOFFs could be set for 11 out of 24 antibiotic/species combinations. The current EUCAST clinical breakpoints, predominantly determined for *Corynebacterium* species other than *C. diphtheriae* and *C. ulcerans*, divide the WT MIC distributions of penicillin and clindamycin, thereby making reproducible susceptibility testing of *C. diphtheriae* and *C. ulcerans* difficult. For erythromycin, 4% of *C. diphtheriae* and 2% of *C. ulcerans* had MICs higher than those for WT isolates. Phenotypically detectable resistance to other antibiotics was rare. Etest underestimated MICs of penicillin and lower concentrations needed to be included for erythromycin, while for clindamycin the Etest was not a good surrogate method.

Conclusions: MIC distributions based on reference broth microdilution for potentially toxigenic *Corynebacterium* spp. were developed. For five and six agents, TECOFFs were suggested for *C. diphtheriae* and *C. ulcerans*, respectively, but for *Corynebacterium pseudotuberculosis* the number of isolates was too low.

→ 421 Isolate von Menschen und Tieren (*C. diphtheriae*, *C. ulcerans*)

→ MHK-Daten (Mikrobuillondilution, Etestverfahren) für 24 Antibiotika/Kombinationen

Ziel:

Bestimmung der Wildtyp-MHK-Verteilung und TECOFFs

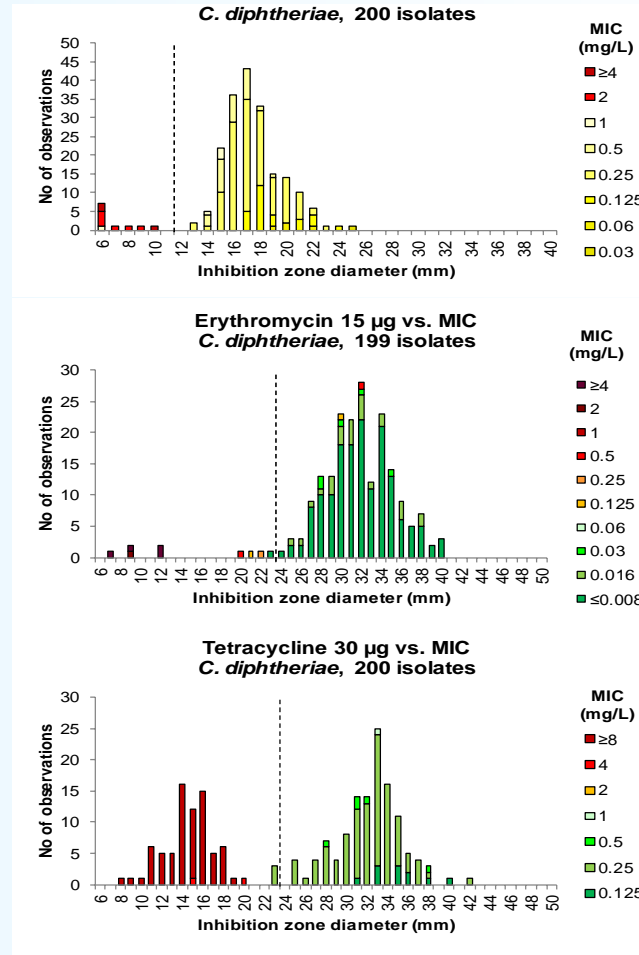
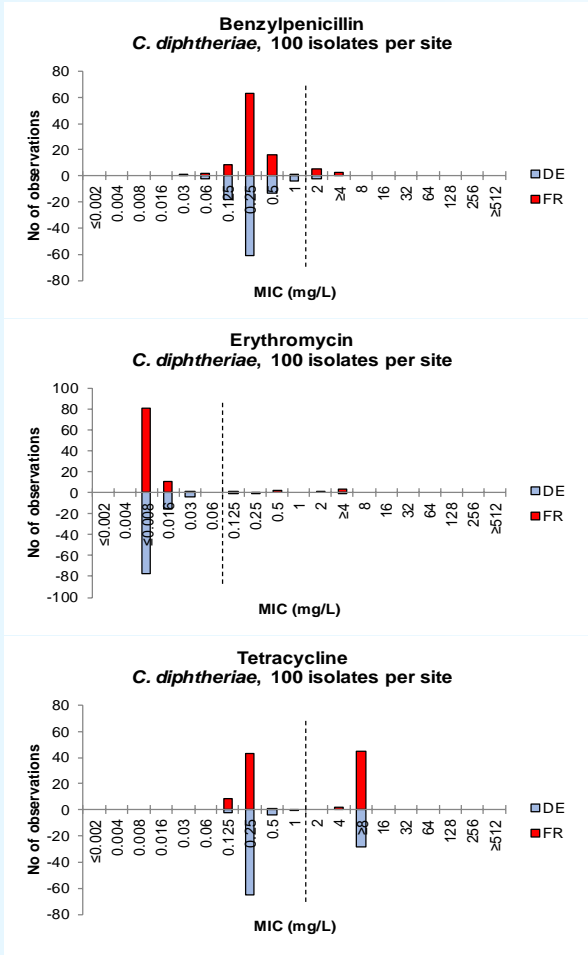
Ergebnisse:

- Eigene speziesspezifische Grenzwerte für Penicillin und Clindamycin erforderlich
- breakpoints für Erythromycin definierbar
- niedrigere MHK Stufen für zahlreiche ABs in Panels nötig
- Etest-Verfahren problematisch bei hohen Penicillin-MHKs und bei Clindamycin

Der Weg zu spezifischen EUCAST breakpoints für *C. diphtheriae* und *C. ulcerans*

- 2 Verfahren Agardiffusionstest und Mikrobouillondilution parallel
 - Bestimmung spezies-spezifischer Hemmhofdurchmesser (HHDs) und minimaler Hemmkonzentrationen (MHKs)
 - 2 Studienzentren (Pasteur Institut, NRZ für Diphtherie; LGL OSH, KL für Diphtherie)
 - 100 *C. diphtheriae* und 100 *C. ulcerans* Stämme (*tox+* und *tox-* Klinikisolate von Mensch und Tier) je Zentrum (Gesamt n= 400 Stämme)
 - 13 Antibiotika: Benzylpenicillin, Ampicillin, Amoxicillin, Cefotaxim, Meropenem, Ciprofloxacin, Erythromycin, Clindamycin, Tetrazyklin, Doxyzyklin, Linezolid, Rifampicin, Trimethoprim-Sulfamethoxazol
 - Ziel: Festsetzung klinischer breakpoints für *C. ulcerans* und *C. diphtheriae*
 - Vorversuche und Beginn der Harmonisierung im April 2021
- fertige breakpoints Sept 2022 (noch Fragen der Darstellung etc);
- vorzeitig veröffentlicht Okt 2022, offiziell **implementiert in EUCAST v. 13.0, Jan 2023**

EUCAST breakpoints für *C. diphtheriae* und *C. ulcerans*



Ähnliche Wildtypverteilungen in beiden Studienzentren

Hervorragende Korrelation zwischen Agardiffusion und MHK Testung.

Gestrichelte Linie: breakpoint

MHK Verteilungen waren ähnlich für *C. diphtheriae* und *C. ulcerans* (Ausnahme Clindamycin)

Statistische („ECOFFinder“) und visuelle ECOFF Bestimmung durch EUCAST

A. Berger, E. Badell, J. Ahmann, E. Matuschek, N. Zidane, G. Kahlmeter, A. Sing, S. Brisse (2023, in submission)

EUCAST (C. diph/C. ulc v.13, 2023) versus EUCAST (alle C. species v.13, 2023) versus CLSI (M45-ED3:2016)

Antibiotikum	EUCAST (C. diph / C. ulc) S ≤ / R >	EUCAST (andere C. sp.) S ≤ / R >	CLSI (alle C. sp.) S ≤ / R >
Benzylpenicillin	0.001 / 1	0.125 / 0.125	0.12 / 2
Cefotaxim	0.001 / 2	-	1 / 2
Ciprofloxacin	0.001 / 0.5	0.001 / 1	1 / 2
Clindamycin	0.5 / 0.5 (ohne <i>C. ulcerans</i>)	0.5 / 0.5	0.5 / 2
Erythromycin	0.06 / 0.06	IP	0.5 / 1
Rifampicin	0.06 / 0.06	0.06 / 0.5	1 / 2
Tetrazyklin	1 / 1	2 / 2	4 / 8
Trimethoprim- Sulfamethoxazol	0.5 / 0.5	.	2 / 4

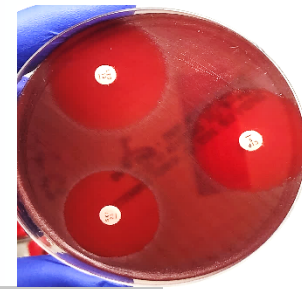
Zusammenfassung

- Etablierte EUCAST Methoden (MHK, HHD-Bestimmung) für *Corynebacterium* spp. können für *C. diphtheriae* und *C. ulcerans* verwendet werden
- Hervorragende Korrelation zwischen MHK- und HHD-Daten bei allen getesteten Substanzen
- Korrelation von Benzylpenicillin-HHD und anderen getesteten β -Laktamantibiotika: HHD < 12mm erkennt alle Resistenzen gegen β -Laktame (Amoxicillin, Cefotaxim, Meropenem)
- Konsistente MHK- und HHD-Verteilungen beider Studienzentren
- MHK-Verteilungen für *C. diphtheriae* und *C. ulcerans* ähnlich für alle Substanzen außer Clindamycin

- Generierung eigener Grenzwerte für *C. diphtheriae* und *C. ulcerans* waren notwendig, v.a. für Penicillin und Erythromycin

- Basierend auf diesen Studienergebnissen konnte EUCAST klinische MHK und HHD-breakpoints für *C. diphtheria* und *C. ulcerans* festlegen

Diphtherie: Empfindlichkeitsprüfung



→ ↻ 🏠 🔒 https://www.eucast.org/clinical_breakpoints

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters

Version 13.0, valid from 2023-01-01

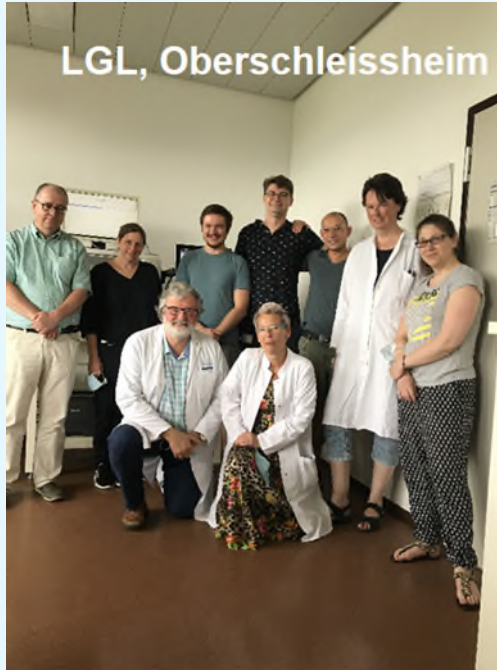
This document should be cited as "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0, 2023. <http://www.eucast.org>."

Content	Page	Additional information
Changes	1	
Notes	6	
Guidance on reading EUCAST Breakpoint Tables	8	
Dosages used to define breakpoints	9	
Information on technical uncertainty	13	
<i>Enterobacterales</i>	15	
<i>Pseudomonas</i> spp.	22	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	27	Link to Guidance Document on <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Acinetobacter</i> spp.	29	
<i>Staphylococcus</i> spp.	34	
<i>Enterococcus</i> spp.	41	
Streptococcus groups A, B, C and G	46	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	51	
Viridans group streptococci	57	
<i>Haemophilus influenzae</i>	62	
<i>Moraxella catarrhalis</i>	68	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	72	
<i>Neisseria meningitidis</i>	76	
Anaerobic bacteria	80	
<i>Helicobacter pylori</i>	83	
<i>Listeria monocytogenes</i>	84	
<i>Pasteurella</i> spp.	86	
<i>Campylobacter jejuni</i> and <i>C. coli</i>	88	
<i>Corynebacterium</i> spp. other than <i>C. diphtheriae</i> and <i>C. ulcerans</i>	89	
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> and <i>C. ulcerans</i>	91	
<i>Aerococcus sanguinicola</i> and <i>A. urinae</i>	93	
<i>Kingella kingae</i>	95	
<i>Aeromonas</i> spp.	97	
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	99	

ICE

methods from

Vielen Dank



LGL OSH Humanbakteriologie und NGS Core Unit

Andreas Sing

Alexandra Dangel

DJ Marosevic

Regina Konrad

Cengiz Dedeoglu

Annika Sprenger

Wolfgang Schmidt

Sabine Lohrer

Katja Bengs

Gabriele Margos

Helga Kocak

Jasmin Fräßdorf

Andrea Seifarth

Vyacheslav Melnikov

Bernhard Hobmaier

Stefan Hörmansdorfer

EUCAST

Gunnar Kahlmeter, Jenny Ahmann, Erika Matuschek

Grants



StMGP

Institut Pasteur (NRZ für Diphtherie, Paris)

Silvain Brisse, Edgar Bardell, Nora Zidane

**... an alle Einsender, Gesundheitsämter, Veterinärämter
und Kooperationspartner!**