

## **Návody EUCAST pro detekci mechanismů rezistence a specifické rezistence s klinickým a/nebo epidemiologickým významem**

**Verze 2.0<sup>1</sup>**  
**Červen 2017**

<sup>1</sup> Aktualizovaná a přepracovaná verze 1.0 z prosince 2013 autorů Christian G. Giske (Sweden, EUCAST and EARS-Net Coordination Group; chairman), Luis Martinez-Martinez (Spain), Rafael Canton (Spain, EUCAST), Stefania Stefani (Italy), Robert Skov (Germany), Youri Glupczynski (Belgium), Patrice Nordmann (France), Mandy Wootton (UK), Vivi Miriagou (Greece), Gunnar Skov Simonsen (Norway, EARS-Net Coordination Group), Helena Zemlickova (Czech Republic, EARS-Net Coordination Group), JamesCohen-Stuart (The Netherlands), and Marek Gniadkowski (Poland).

# Obsah

Kapitola	strana
1. Úvod	3
2. Enterobacteriaceae produkující karbapenemázu	4
3. Enterobacteriaceae produkující širokospektrou $\beta$ -laktamázu	12
4. Enterobacteriaceae produkující získanou $\beta$ -laktamázu AmpC	19
5. Rezistence gramnegativních tyčků k polymyxinu	23
6. Rezistence <i>P. aeruginosa</i> a <i>Acinetobacter</i> ke karbapenemům	25
7. <i>Staphylococcus aureus</i> rezistentní k methicilinu	27
8. <i>Staphylococcus aureus</i> necitlivý k vankomycinu	30
9. <i>Enterococcus faecium</i> a <i>Enterococcus faecalis</i> rezistentní k vankomycinu	34
10. <i>Streptococcus pneumoniae</i> necitlivý k penicilinu	38

## 1. Úvod

Tento dokument je aktualizovaná verze návodů vypracovaných Subkomisí EUCAST pro detekci mechanismů rezistence, kterou předkládá řídicí výbor EUCAST. Tento dokument je určen především pro rutinní použití v klinických laboratořích a nezahrnuje technické postupy pro identifikaci mechanismů rezistence na molekulární úrovni. Značná část obsahu je použitelná také pro národní referenční laboratoře. Dále je důležité poznamenat, že tento dokument nezahrnuje screening asymptomatického nosičství (kolonizaci) multirezistentních mikroorganismů nebo jejich přímou detekci v klinických vzorcích.

Všechny kapitoly v tomto dokumentu obsahují definici mechanismu specifické rezistence pro klinické účely a/nebo pro veřejné zdraví, stručný popis doporučených metod detekce a odkazy na podrobný popis metody. Potřeba identifikace mechanismu rezistence pro účely kontroly v oblasti veřejného zdraví nebo infekce se může lišit v místě i v čase v závislosti na prevalenci a různorodosti různých mechanismů rezistence. Návodů byly vyvinuty na základě rešerší PubMed a výsledná doporučení vycházejí z multicentrických studií a studií z jednotlivých center. Několik metod, které jsou v současné době ve fázi vývoje, budou po jejich dokončení případně zahrnuty do další verze návodů. Návrhy těchto návodů jsou předmětem rozsáhlých konzultací EUCAST prostřednictvím konzultačních kontaktů, webových stránek EUCAST a kontaktů ECDC Focal Point.

V tomto dokumentu jsou použité přípravky v co nejvyšší míře označovány generickými výrazy s výjimkou situací, kdy by vyloučení konkrétních názvů produktů mělo za následek nejasnosti. Je třeba poznamenat, že některé mechanismy rezistence vždy neudělují rezistenci také fenotypu. Zatímco detekce těchto mechanismů může být relevantní pro kontrolu infekce a veřejného zdraví, nemusí být nezbytná pro klinické účely. Proto u některých mechanismů, zejména u širokospektrých  $\beta$ -laktamáz a karbapenemáz gramnegativních tyčků, nevede detekce mechanismů rezistence sama o sobě k označení **klinické** rezistence.

Christian G. Giske

Předseda EUCAST, bývalý předseda Subkomise pro detekci mechanismů rezistence EUCAST

## 2. Enterobacteriaceae produkující karbapenemázy

Význam detekce mechanismu rezistence	
Potřeba pro kategorizaci <b>klinické</b> antimikrobní citlivosti	Ne
Pro <b>účely</b> kontroly infekce	Ano
Pro <b>účely</b> veřejného zdraví	Ano

### 2.1 Definice

Karbapenemázy jsou  $\beta$ -laktamázy, které hydrolyzují peniciliny, většinu cefalosporinů, a v různé míře karbapenemy a monobaktamy (monobaktamy nejsou hydrolyzovány metalo- $\beta$ -laktamázi).

### 2.2 Klinický a/nebo epidemiologický význam

V Evropě se karbapenemázy šíří od druhé poloviny roku 1990, kdy byly pozorovány v několika zemích Středomoří, především u *P. aeruginosa* (1). Po roce 2000 proběhly v Řecku epidemie způsobené kmeny *Klebsiella pneumoniae* s  $\beta$ -laktamázu VIM (2), a následně *K. pneumoniae* s karbapenemázou KPC *K. pneumoniae* (1). V současné době v Evropě nejrychleji roste frekvence výskytu karbapenemáz OXA-48 (3). Nyní je necitlivých ke karbapenemům 62 % invazivních kmenů *K. pneumoniae* v Řecku a 33 % v Itálii (4). V roce 2015 se endemicky nebo meziregionálně šířily **enterobakterie produkující karbapenemázu (CPE)** ve 13 z 38 sledovaných zemí, zatímco v roce 2013 jen v 6 z 38 zemí. Pouze ve třech zemích nebyl zjištěn žádný případ CPE (3). Jiné zvlášť problematické jsou metalo- $\beta$ -laktamázy New Delhi (NDM), rozšířené na indickém subkontinentu a na Středním východě a importované do některých zemí Evropy (4), v jejichž oblastech se rozšířily (5). V **některých částech světa jsou běžné také IMP-karbapenemázy (6)**.

Karbapenemázy vzbuzují obavy, neboť mohou způsobit rezistenci prakticky ke všem  $\beta$ -laktamovým antibiotikům, producenti karbapenemáz často disponují mechanismy rezistence vůči široké škále antimikrobních léčiv a infekce způsobené Enterobacteriaceae produkujícími karbapenemázy jsou spojeny s vysokou mírou úmrtnosti (7-9).

### 2.3 Mechanismus rezistence

Drtivá většina karbapenemáz jsou enzymy získané, kódované geny na transpozovatelných elementech lokalizovaných na plazmidech. Jejich exprese je různá a výrazně se liší v biochemických vlastnostech a v aktivitě proti specifickým  $\beta$ -laktamovým antibiotikům. Úroveň exprese a vlastností  $\beta$ -laktamázy a časté spojení s jinými mechanismy rezistence (jinými  $\beta$ -laktamázi, efluxem a/nebo změnou permeability) vedou u izolátů produkujících karbapenemázy k široké škále fenotypů rezistence (10, 11). Snížená citlivost ke karbapenemům u Enterobacteriaceae může být způsobena rovněž produkcí širokospektrých  $\beta$ -laktamáz (ESBL) nebo enzymů AmpC kombinovanou se sníženou permeabilitou v důsledku alterace porinů (12), a pravděpodobně také proteinů vážících peniciliny (13).

Enterobaktérie produkující karbapenemázy (CPE) mají obvykle sníženou citlivost ke karbapenemům a jsou většinou rezistentní k širokospektrým (oxyimino-) cefalosporinům (k cefotaximu, ceftriaxonu, ceftazidimu a nebo k cefepimu) (14). Nicméně kmeny s některými enzymy (např. OXA-48-like) se mohou jevit zcela citlivé k cefalosporinům. Většina izolátů CPE však spoluexprimuje enzymy hydrolyzující cefalosporiny, jako jsou širokospektré  $\beta$ -laktamázy CTX-M a proto jsou také rezistentní k cefalosporinům. Karbapenemázy lze pokládat za vysoce epidemiologicky závažné, zejména udělují-li sníženou citlivost ke kterémukoli karbapenemu (imipenemu, meropenemu, ertapenemu a

doripenemu), kdy MIC jsou vyšší než hodnoty příslušného epidemiologického předělu (ECOFF, epidemiological cut-off) definované EUCAST (15).

## 2.4 Doporučené metody pro detekci karbapenemáz u Enterobacteriaceae

### 2.4.1 Screening na produkci karbapenemáz

U Enterobacteriaceae produkujících karbapenemázy může být MIC karbapenemů nižší než jsou jejich klinické breakpointy (14-16). K detekci producentů karbapenemáz však lze použít hodnoty epidemiologických předělů (ECOFF). Nejlepší kompromis mezi senzitivitou a specificitou průkazu produkce karbapenemázy nabízí test s meropenemem (14,17). Ertapenem má vynikající citlivost, ale nízkou specificitu, zejména u *Enterobacter* spp. pro relativní nestabilitu širokospektrých  $\beta$ -laktamáz (ESBL) a  $\beta$ -laktamáz AmpC v kombinaci se ztrátou porinů (14). Příslušné mezní hodnoty pro detekci předpokládaných producentů karbapenemáz uvádí tabulka 1. Je třeba poznamenat, že v zájmu zvýšení specifičnosti jsou hodnoty screeningových předělů pro imipenem a ertapenem o jedno řadění vyšší než jsou aktuálně definované příslušné hodnoty ECOFF.

Tabulka 1. Klinické breakpointy a screeningové předěly pro Enterobacteriaceae produkující karbapenemázy (podle metodiky EUCAST).

Karbapenemáza	MIC (mg/l)		Průměr inhibiční zóny (mm) kolem 10 $\mu$ g disku	
	C/I breakpoint	Screeningový předěl	C/I breakpoint	Screeningový předěl
Meropenem <sup>1</sup>	$\leq 2$	$>0,125$	$\geq 22$	$<28^2$
Ertapenem <sup>3</sup>	$\leq 0,5$	$>0,125$	$\geq 25$	$<25$

<sup>1</sup>Nejlepší rovnováha mezi senzitivitou a specificitou.

<sup>2</sup> Izoláty s průměrem inhibiční zóny meropenemu 25 - 27 mm, které jsou současně rezistentní k piperacilin/tazobaktamu a/nebo k temocilinu (ten má větší specificitu) se dále vyšetřují na produkci karbapenemázy. Vyšetření na produkci karbapenemáz se provádí vždy u izolátů s průměrem zóny meropenemu  $<25$  mm.

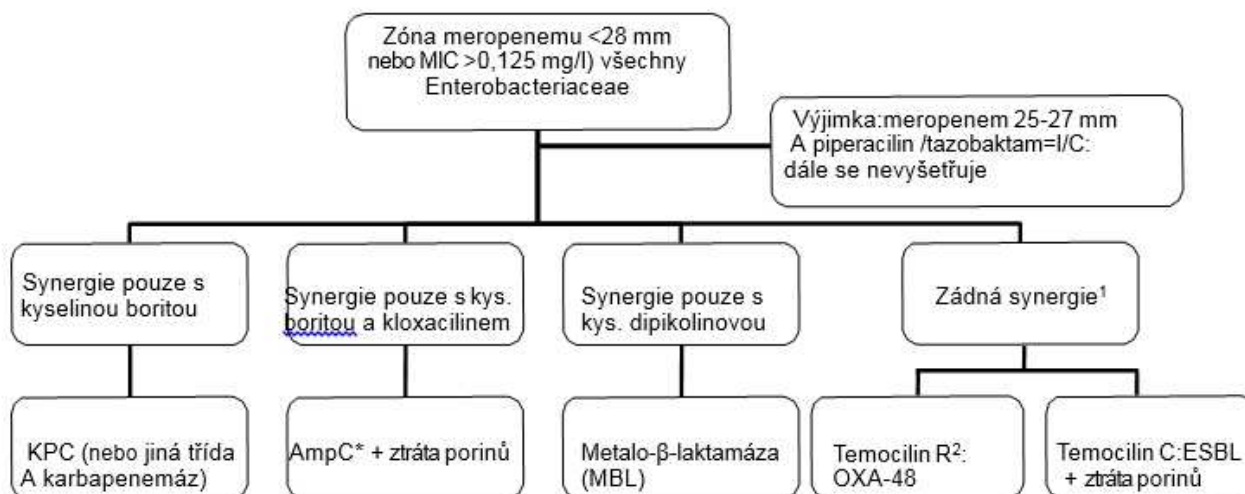
<sup>3</sup>Vysoká senzitivita ale nízká specificita. Může být použit jako alternativna pro screening, avšak producenti ESBL a AmpC mohou být rezistentní bez produkce karbapenemáz.

Kmeny, u nichž byla rutinními testy vyšetření citlivosti prokázána snížená citlivost ke karbapenemům, by měly být vyšetřeny na průkaz karbapenemáz fenotypovými metodami. Mezi hlavní metody patří kombinované metody, kolorimetrické testy založené na hydrolýze karbapenemů, a lateral flow assay. Tyto testy jsou popsány dále.

### 2.4.2 Testování kombinace disků

Kombinace disků pro tento účel byla dobře ověřena ve studiích a je komerčně dostupná (MAST, Velká Británie; Rosco, Dánsko) (18-20). Disky nebo tablety obsahují meropenem +/- různé inhibitory. Stručně řečeno, kyselina boritá inhibuje karbapenemázy třídy A (ačkoli údaje o jiných karbapenemázách než je KPC jsou vzácné) a dipikolinová kyselina a kyselina ethylenediaminotetraoctová inhibují karbapenemázy třídy B. Avibaktam, který dosud není zařazen do panelů, inhibuje produkci OXA-48. K testům byl přidán kloxacilin, který inhibuje  $\beta$ -laktamázy AmpC k rozlišení mezi hyperprodukcí AmpC a ztrátou porinu a produkcí karbapenemázy. Algoritmus pro interpretaci těchto inhibitorových testů je uveden na obrázku 1 a v tabulce 2. Hlavní nevýhodou těchto metod je čas - trvají 18 hodin (v praxi to znamená inkubaci přes noc), což je důvod, proč byly zavedeny nové rychlé metody.

Obrázek 1. Algoritmus pro detekci karbapenemáz



<sup>1</sup>Žádná synergie se nemusí projevit při produkci několika karbapenemáz např. MBL a KPC. V těchto případech se používají molekulární metody

<sup>2</sup>Fenotypovým markerem pro OXA-48 je vysoká rezistence k temocilinu (MIC > 128 mg/l, průměr zóny <11 mm)

\* chromozomální nebo plazmidová

Algoritmus v tabulce 2 diferencuje mezi metallo-β-laktamázami, karbapenemázami třídy A, karbapenemázami třídy D a ne-karbapenemázami (ESBL a/nebo AmpC plus ztráta porinů). Testy lze provést diskovou difúzní metodou pro nenáročné bakterie, nebo komerčními testy podle návodů výrobce.

V současnosti neexistují žádné inhibitory pro enzymy OXA-48-like. Jako fenotypový marker u předpokládaných producentů karbapenemáz OXA-48-like byla navržena vysoká hodnota rezistence k temocilinu (MIC > 128 mg/l) (23, 24). Tento marker však není specifický pro karbapenemázy typu OXA-48, neboť tento fenotyp mohou vytvářet další mechanismy rezistence. Přítomnost enzymů OXA-48-like proto musí být potvrzena jinými metodami.

Použití modifikovaného testu (Hodge) se v současné době nedoporučuje, protože výsledky lze obtížně interpretovat, specifita je nízká a v některých případech je také senzitivita nedostatečná (12). Nové modifikace této techniky jsou pro použití v rutinních klinických laboratořích těžkopádné a neřeší všechny problémy senzitivity a specifity.

Tabulka 2. Interpretace fenotypových testů (karbapenemázy jsou **označeny tučně**) vyšetřených diskovými difúzními metodami pomocí disků nebo tablet. Pro různé komerční produkty je synergie přesně definována v návodech na použití.

β-laktamáza	Synergie vyjádřená jako zvětšení průměru zóny (mm) u disku/tablety s 10 μg meropenemu				Temocilin MIC >128 mg/l ebo průměr zóny <11 mm
	DPA/EDTA	APBA/PBA	DPA+APBA	CLX	
<b>MBL</b>	+	-	-	-	variabilní <sup>1</sup>
<b>KPC</b>	-	+	-	-	variabilní <sup>1</sup>
<b>MBL + KPC<sup>2</sup></b>	variabilní	variabilní	+	-	variabilní <sup>1</sup>
<b>OXA-48-like</b>	-	-	-	-	ano
AmpC + ztráta porinů	-	+	-	+	variabilní <sup>1</sup>
ESBL + ztráta porinů	-	-	-	-	ne

Zkratky: MBL=metalo-β-laktamáza, KPC= karbapenemáza *Klebsiella pneumoniae*,

DPA= dipikolinová kyselina, EDTA=ethylendiaminotetraoctová kyselina, APBA=kyselina aminofenylboritá, PBA=kyselina fenylboritá, CLX= kloxacilin.

<sup>1</sup> Test citlivosti k temocilinu se doporučuje použít pouze tehdy, není-li prokázána synergie s cílem rozlišit mezi ESBL + ztráta porinů a enzymy OXA-48-like (23,24). Jsou-li přítomny jiné enzymy, je citlivost variabilní a nelze provést jakoukoli identifikaci na přítomnost β-laktamázy.

<sup>2</sup> Jedna zpráva podporuje použití komerčních tablet obsahujících dva inhibitory (DPA nebo EDTA plus APBA nebo PBA) (25), chybí však důkazy z dalších studií. Tyto kombinace prokazují vysoký stupeň rezistence ke karbapenemům, který je mimo Řecko vzácný.

### 2.4.3 Biochemické (kolorimetrické) testy

Test CarbaNP je rychlý (<2 h) test pro detekci hydrolýzy karbapenemu, která vyvolá změnu pH, a barva roztoku fenolové červeně se změní z červené na žlutou (26, 27). Test Carba NP byl validován s koloniemi bakterií kultivovanými na plotnách s Mueller-Hinton agarem, krevním agarem, tryptikázovým sójovým agarem a na nejselektivnějších půdách používaných pro screening producentů karbapenemáz. Test Carba NP by neměl být prováděn s bakteriálními koloniemi, které byly kultivovány na agarových plotnách Drigalski nebo McConkey. K dosažení reprodukovatelných výsledků je třeba pečlivě dodržovat postup metod. Několik publikací naznačuje vysokou senzitivitu a specifitu metody (28), zatímco v jedné publikaci byly pozorovány problémy se senzitivitou u izolátů s mukoidním fenotypem a u některých Enterobacteriaceae produkujících OXA-48 (29). Bylo prokázáno, že jedna komerční varianta metody je vhodná pro detekci karbapenemáz Enterobacteriaceae (30, 31). U určitých komerčních testů, včetně komerční verze testu CarbaNP, existují některé problémy s interpretací založené na vizuálním čtení barevného posunu s pochybnými výsledky a určitým podílem (3-5%) neinterpretovatelných výsledků.

Od testu CarbaNP je odvozen test Blue-Carba (BCT), biochemický test pro rychlou (<2 hod.) detekci produkce karbapenemázy (32, 33). Je založen na hydrolýze imipenemu *in vitro* bakteriálními koloniemi (přímá inokulace bez předchozí lýzy), která je detekována změnami hodnot pH bromotymolové modři (modrá až zelená / žlutá nebo zelená až žlutá). Rozsáhlé vyhodnocení

provedené Pasteranem a spol. (34), ale provedené pouze v jediné laboratoři prokázalo, že test vykazuje vynikající senzitivitu pro enzymy třídy A a B, ale suboptimální senzitivitu pro detekci enzymů OXA-48.

Třetím biochemickým testem je  $\beta$  CARBA test™, s výsledky získanými rovněž za < 2h. Test se provádí smícháním 1 až 3 kolonií s činidly. Odečtení by mělo být provedeno nejvýše po 30 minutách inkubace. Pozitivní reakci indikuje změnu barvy ze žluté na oranžovou, červenou nebo fialovou. Jedna studie zjistila, že 0,5 hodinová doba inkubace doporučená výrobcem je příliš krátká pro kmeny produkující OXA-48. Vyhodnocovaný soubor byl poměrně omezený, a proto byl navržen rozsáhlejší pokus k zjištění srovnatelnosti testu s jinými biochemickými testy (35). V jiném vyhodnocení vykazoval  $\beta$  Carba test™ výbornou schopnost detekce CPE a zejména OXA-48. Nicméně schopnost detekovat další karbapenemázy třídy A by měla být dále ověřena a objevily se některé falešně pozitivní výsledky u jiných  $\beta$ -laktamáz, jako např. při hyperprodukci  $\beta$ -laktamázy K1 u *Klebsiella oxytoca* (33).

#### 2.4.4 Metoda inaktivace karbapenem (CIM)

Principem této metody je detekce enzymatické hydrolyzy pomocí inkubace bakteriální suspenze s karbapenemem. Test CIM využívá pro testování jako substrátové alikvoty disky. Plná klička vyšetřovaných bakterií se po 2 hodiny inkubuje spolu s diskem meropenemu a pak se disk umístí na agarovou plotnu naočkovanou kmenem *Escherichia coli* ATCC 25922. Při enzymatické inaktivaci karbapenemázou se kolem disku nevytvoří žádná zóna, zatímco vytvoření zóny znamená, že meropenem nebyl hydrolyzován a testovaný kmen karbapenemázu nevytváří. CIM-test má v různých studiích proměnlivou výtěžnost (36-38), ale zůstává možnou alternativou, i když negativní prediktivní hodnota testu stále není jasná. Hlavní nevýhoda této techniky spočívá v tom, že získání výsledků obvykle vyžaduje alespoň 18 hodin.

#### 2.4.5 Detekce hydrolyzy karbapenemu pomocí MALDI-TOF

Principem je pomocí hmotnostní spektrometrie (MALDI TOF) detekovat pokles nebo vymizení určitých specifických píků karbapenemu po předchozí inkubaci bakteriální suspenze s karbapenemem (39, 40). Spektra se měří po sušení mezi m/z 160 a 600 za použití hmotnostního spektrometru Microflex LT (39). Několik studií potvrdilo dobrou senzitivitu a specificitu této metody, s výjimkou enzymů skupiny OXA-48. K úpravě tohoto problému může být k reakci přidán  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ; tato modifikace podle jedné studie zlepšila detekci OXA-48 (41). Nová metoda však dosud nebyla hodnocena v multicentrických studiích ani ve vícečetných studiích s jedním centrem. Dalším poněkud nepraktickým rysem je, že nastavení MALDI-TOF, používané pro identifikaci druhů je třeba pro detekci karbapenemáz změnit (41).

#### Lateral flow assay

Nedávno byla popsána nová imunochromatografická analýza, lateral flow assay. Test je založen na imunologickém zachycení epitopů OXA-48 za použití nanočástic koloidního zlata, vázaných na nitrocelulóзовou membránu v zařízení pro příčné proudění. Princip testu spočívá v tom, že jako specifické zachycovací reagentie pro přímou identifikaci enzymů OXA-48-like slouží monoklonální protilátky anti-OXA-48 (42). Test trvá přibližně čtyři minuty a vyhodnocuje se z kolonií i z hemokultur (43-46). Nedávno byl vyvinut podobný test pro KPC, ale jeho validita nebyla hodnocena vícečetnými studiemi jednoho centra nebo jednou multicentrickou studií (46).

#### 2.4.6 Kontrolní kmeny

Níže je uvedeno několik možných kontrolních kmenů pro fenotypové a genotypové metody. U



těchto kmenů nejsou k dispozici limitní rozmezí pro kontrolu kvality. Uživatelé komerčních metod by měli používat kontrolní kmeny uvedené v příbalové informaci.

Tabulka 3. Příklady kontrolních kmenů pro testování karbapenemáz.

Kmen	Mechanismus
<i>Enterobacter cloacae</i> CCUG 59627	AmpC kombinovaná se sníženou expresí porinů
<i>K. pneumoniae</i> CCUG 58547 nebo <i>K. pneumoniae</i> NCTC 13440	metalo- $\beta$ -laktamáza (VIM)
<i>K. pneumoniae</i> NCTC 13443	metalo- $\beta$ -laktamáza (NDM-1)
<i>E. coli</i> NCTC 13476	metalo- $\beta$ -laktamáza (IMP)
<i>K. pneumoniae</i> CCUG 56233 nebo <i>K. pneumoniae</i> NCTC 13438	<i>Klebsiella pneumoniae</i> karbapenemáza (KPC)
<i>K. pneumoniae</i> NCTC 13442	OXA-48 karbapenemáza
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 25955	negativní kontrola

## 2.5 Literatura

- Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:413-31
- Vatopoulos A. High rates of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece – a review of the current evidence. *Euro Surveill.* 2008;13(4). doi:pil: 8023
- Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann H, Monnet DL. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. *Euro Surveill.* 2015;20(45).
- European Centres for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)
- Baraniak A, Izdebski R, Fiett J, Gawryszewska I, Bojarska K, et al. NDM-producing Enterobacteriaceae in Poland, 2012-2014: interregional outbreak of *Klebsiella pneumoniae* ST11 and sporadic cases. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71:85-91
- Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(10):1791-8.
- Souli M, Galani I, Antoniadou A, Papadomichelakis E, Poulakou G et al. An outbreak of infection due to  $\beta$ -lactamase *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* in a Greek University Hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Clin Infect Dis* 2010;50:364–73.
- Bratu S, Landman D, Haag R, Recco R, Eramo A, Alam M, Quale J. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *Arch Intern Med.* 2005; 165:1430-5.
- Marchaim D, Navon-Venezia S, Schwaber MJ, Carmeli Y. Isolation of imipenem-resistant *Enterobacter* species: emergence of KPC-2 carbapenemase, molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:1413-8
- Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:440–58
- Falcone M, Mezzatesta ML, Perilli M, Forcella C, Giordano A et al. Infections with VIM-1 metallo  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* and their correlation with clinical outcome. *J Clin Microbiol* 2009;47: 3514–9.
- Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63:659-67.

13. Yamachika S, Sugihara C, Kamai Y, Yamashita M. Correlation between penicillin-binding protein 2 mutations and carbapenem resistance in *Escherichia coli*. J Med Microbiol. 2013;62:429-36.
14. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Clin Microbiol Infect. 2012;18:432-8.
15. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Website with MIC-distributions. (<http://mic.eucast.org/>, accessed on 23 December 2012)
16. Glupczynski Y, Huang TD, Bouchahrouf W, Rezende de Castro R, Bauraing C et al. Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates in Belgian hospitals. Int J Antimicrob Agents. 2012;39:168-72
17. Tato M, Coque TM, Ruíz-Garbajosa P, Pintado V, Cobo J et al. Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of Enterobacteriaceae infection involving VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase in Spain: toward endemicity? Clin Infect Dis. 2007;45(9):1171-8.
18. Vading M, Samuelsen Ø, Haldorsen B, Sundsfjord AS, Giske CG. Comparison of disk diffusion, Etest® and VITEK2 for detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* with the EUCAST and CLSI breakpoint systems. Clin Microbiol Infect. 2011;17:668-74.
19. Giske CG, Gezelius L, Samuelsen Ø, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- $\beta$ -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. Clin Microbiol Infect. 2011;17:552-6.
20. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JD. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. J Clin Microbiol. 2012;50:3877-80.
21. Porres-Osante N, de Champs C, Dupont H, Torres C, Mammeri H. Use of avibactam to detect Ambler class A carbapenemases and OXA-48  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014; 79:399-400.
22. Huang TD, Berhin C, Bogaerts P, Glupczynski Y. Evaluation of avibactam-supplemented combination disk tests for the detection of OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014;79:252-4.
23. van Dijk K, Voets G, Scharringa J, Voskuil S, Fluit A, Rottier W, Leverstein-Van Hall M, Cohen Stuart J. A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in Enterobacteriaceae using phenyl boronic acid, dipicolinic acid, and temocillin. Clin Microbiol Infect 2013. In press
24. Hartl R, Widhalm S, Kerschner H, Apfalter P. Temocillin and meropenem to discriminate resistance mechanisms leading to decreased carbapenem susceptibility with focus on OXA-48 in Enterobacteriaceae. Clin Microbiol Infect. 2013;19:E230-2.
25. Miriagou V, Tzelepi E, Kotsakis SD, Daikos GL, Bou Casals J, Tzouveleakis LS. Combined disc methods for the detection of KPC- and/or VIM-positive *Klebsiella pneumoniae*: improving reliability for the double carbapenemase producers. Clin Microbiol Infect. 2013;19:E412-5
26. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis. 2012;18:1503-7.
27. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid Identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56:6437-40.
28. Vasoo S, Cunningham SA, Kohner PC, Simner PJ, Mandrekar JN, Lolans K, Hayden MK, Patel R. Comparison of a novel, rapid chromogenic biochemical assay, the Carba NP test, with the modified Hodge test for detection of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. J Clin Microbiol. 2013;51:3097-101.
29. Tijet N, Boyd D, Patel SN, Mulvey MR, Melano RG. Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57:4578-80.
30. Dortet L, Agathine A, Naas T, Cuzon G, Poirel L, Nordmann P. Evaluation of the RAPIDEC® CARBA NP, the Rapid CARB Screen® and the Carba NP test for biochemical detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother. 2015 ; 70):3014-22.
31. Kabir MH, Meunier D, Hopkins KL, Giske CG, Woodford N. A two-centre evaluation of RAPIDEC® CARBA NP for carbapenemase detection in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. J Antimicrob Chemother. 2016;71:1213-6.
32. Huang TD, Berhin C, Bogaerts P, Glupczynski Y. Comparative evaluation of two chromogenic tests for rapid detection of carbapenemase in Enterobacteriaceae and in *Pseudomonas aeruginosa* isolates. J Clin Microbiol. 2014;52(8):3060-3.
33. Noël A, Huang TD, Berhin C, Hoebeke M, et al. Comparative Evaluation of Four Phenotypic Tests for Detection of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria. J Clin Microbiol. 2017 Feb;55(2):510-518
34. Pasteran F, Veliz O, Ceriana P, Lucero C, Rapoport M, et al. Evaluation of the Blue-Carba test for rapid detection of carbapenemases in gram-negative bacilli. J Clin Microbiol. 2015 ;53(6):1996-8.

35. Compain F, Gallah S, Eckert C, Arlet G, Ramahefasolo A, et al. Assessment of Carbapenem Resistance in Enterobacteriaceae with the Rapid and Easy-to-Use Chromogenic  $\beta$ -Carba Test. *J Clin Microbiol.* 2016;54(12):3065-3068
36. van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, et al. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PLoS One.* 2015;10(3):e0123690
37. Yamada K, Kashiwa M, Arai K, Nagano N, Saito R. Comparison of the Modified-Hodge test, Carba NP test, and carbapenem inactivation method as screening methods for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Microbiol Methods.* 2016;128:48-51.
38. Tijet N, Patel SN, Melano RG. Detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae: comparison of the carbapenem inactivation method versus the Carba NP test *J Antimicrob Chemother.* 2016 ;71(1):274-6.
39. Hrabák J, Studentová V, Walková R, Zemlicková H, Jakubu V et al. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2441-3
40. Lasserre C, De Saint Martin L, Cuzon G, Bogaerts P, Lamar E, et al. Efficient Detection of Carbapenemase Activity in Enterobacteriaceae by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Less Than 30 Minutes. *J Clin Microbiol.* 2015; 53:2163-71.
41. Papagiannitsis CC, Študentová V, Izdebski R, Oikonomou O, Pfeifer Y, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry meropenem hydrolysis assay with  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , a reliable tool for direct detection of carbapenemase activity. *J Clin Microbiol.* 2015;53(5):1731
42. Pasteran F, Denorme L, Ote I, Gomez S, De Belder D, Glupczynski Y, Bogaerts P, Ghiglione B, Power P, Mertens P, Corso A. Rapid identification of OXA-48 and OXA-163 Subfamilies in carbapenem-resistant gram-negative bacilli with a novel immunochromatographic lateral flow assay. *J Clin Microbiol.* 2016;54(11):2832-2836
43. Dortet L, Jousset A, Sainte-Rose V, Cuzon G, Naas T. Prospective evaluation of the OXA-48 K-SeT assay, an immunochromatographic test for the rapid detection of OXA-48-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(7):1834-40.
44. Wareham DW, Shah R, Betts JW, Phee LM, Momin MH. Evaluation of an Immunochromatographic Lateral Flow Assay (OXA-48 K-SeT) for Rapid Detection of OXA-48-Like Carbapenemases in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2016;54(2):471-3
45. Meunier D, Vickers A, Pike R, Hill RL, Woodford N, Hopkins KL. Evaluation of the K-SeT R.E.S.I.S.T. immunochromatographic assay for the rapid detection of KPC and OXA-48-like carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(8):2357-9.
46. Glupczynski Y, Evrard S, Ote I, Mertens P, Huang TD, et al. Evaluation of two new commercial immunochromatographic assays for the rapid detection of OXA-48 and KPC carbapenemases from cultured bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(5):1217-22.

### 3. Enterobacteriaceae produkující širokospektré $\beta$ -laktamázy (ESBL)

Význam detekce mechanismu rezistence	
Potřeba pro kategorizaci klinické antimikrobní citlivosti	Ne
Pro účely kontroly infekcí	Ano
Pro účely veřejného zdraví	Ano

#### 3.1 Definice

ESBL jsou enzymy, které hydrolyzují peniciliny a cefalosporiny, včetně oxyimino- $\beta$ -laktamových sloučenin (cefuroxim, cefalosporiny třetí a čtvrté generace a aztreonam), nikoli však cefamyciny nebo karbapenemy. Většina ESBL patří do  $\beta$ -laktamáz třídy A Amblerovy klasifikace a je inhibována inhibitory  $\beta$ -laktamázy (kyselina klavulanová, sulbaktam a tazobaktam) a diazabicyclooctanony (avibaktam) (1).

#### 3.2 Klinický a/nebo epidemiologický význam

První kmeny produkující ESBL byly identifikovány v roce 1983, a od té doby se nacházejí všude ve světě. Toto rozšíření je výsledkem klonální expanze kmenů produkujících ESBL, horizontálního transferu ESBL genů na plazmidech a méně často vzniku *de novo*. Klinicky nejvýznamnější skupina ESBL jsou CTX-M enzymy, následovaná ESBL odvozenými od enzymů SHV a TEM (2-5).

Produkce ESBL byla pozorována především u Enterobacteriaceae, nejprve v nemocničním prostředí, později v domech s pečovatelskou službou, a zhruba od roku 2000 u kmenů v komunitě (od ambulantních pacientů, zdravých nosičů, nemocných a zdravých zvířat, z potravinářských výrobků). K nejčastějším producentům ESBL patří *Escherichia coli* a *K. pneumoniae*. Produkce ESBL je nicméně běžná i u všech ostatních klinicky relevantních druhů Enterobacteriaceae. Prevalence izolátů produkujících ESBL závisí na řadě faktorů zahrnujících druh, zeměpisnou lokalitu, nemocnici/oddělení, skupiny pacientů a typy infekce, a v různých studiích byly zaznamenány velké rozdíly (2,3,6,7). Údaje EARS-Net v roce 2015 ukázaly, že ve většině evropských zemí počet invazivních izolátů *K. pneumoniae* necitlivých k cefalosporinům třetí generace přesáhl 25 % a v některých zemích byl vyšší než 50 %. Většina těchto izolátů byla označena jako producenti ESBL na základě lokálního testování (8). S výjimkou Řecka a Itálie s vysokým podílem izolátů produkujících karbapenemázu typu KPC se na základě místních výsledků testů ESBL většina těchto izolátů považuje za producenty ESBL (8).

#### 3.3 Mechanismus rezistence

Převážná většina ESBL jsou enzymy získané, kódované geny na plazmidech. Exprese získaných ESBL se vyjadřuje s různou intenzitou a výrazně se liší v biochemických vlastnostech, jako je aktivita proti specifickým  $\beta$ -laktamovým antibiotikům (například cefotaximu, ceftazidimu, aztreonamu). Úroveň exprese, vlastnosti enzymu a současná přítomnost jiných mechanismů rezistence (ostatní  $\beta$ -laktamázy, eflux, změny permeability) u izolátů produkujících ESBL má za následek širokou škálu fenotypů rezistence (1-4,9-11).

#### 3.4 Doporučené metody pro detekci ESBL u Enterobacteriaceae

V mnoha oblastech se doporučuje nebo je povinné detekovat a charakterizovat ESBL pro kontrolu infekcí. Doporučená strategie pro detekci ESBL u enterobakterií je založena na necitlivosti k indikátorovým oxyimino-cefalosporinům s následnou konfirmací fenotypovými (a v některých případech genotypovými) testy (tabulka 1, obrázek 1).

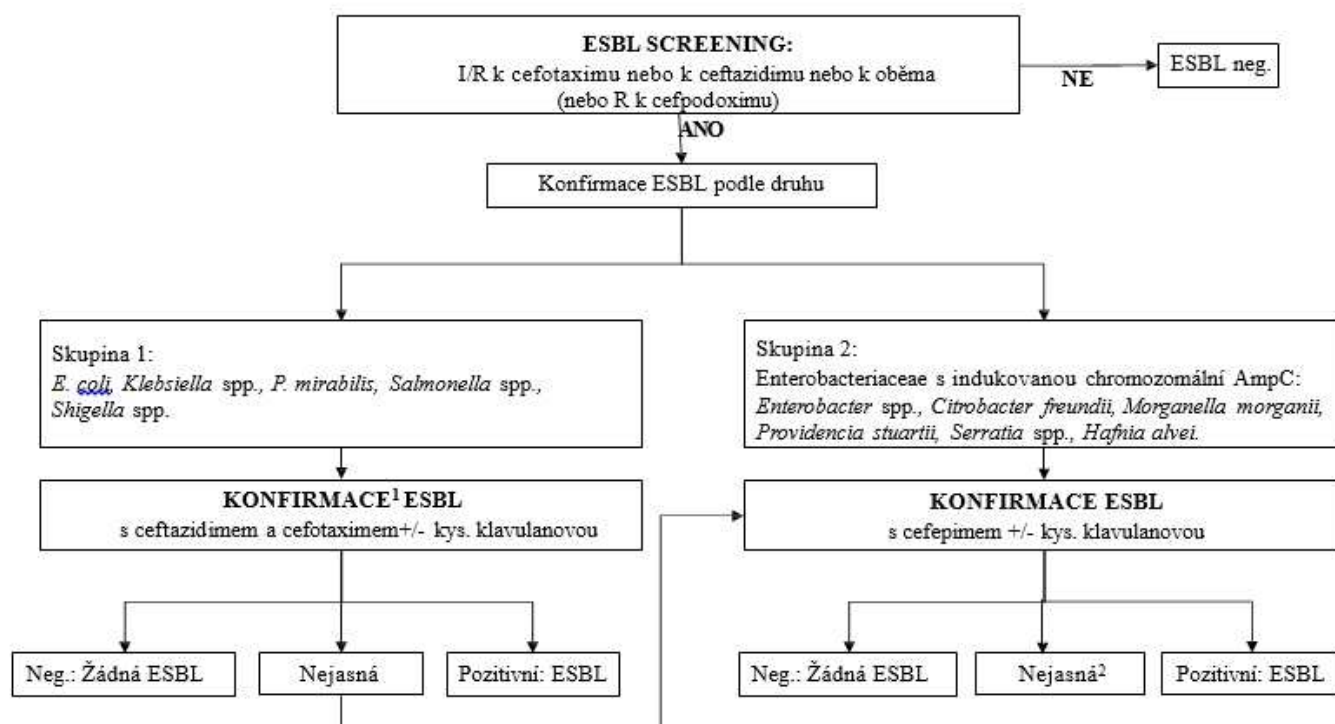
V souladu s návody vydanými EUCAST a CLSI se pro screening cefotaximu, ceftriaxonu, ceftazidimu a cefpodoximu doporučuje breakpoint >1 mg/l (tabulka 1) (12,13). Klinické hraniční hodnoty EUCAST pro citlivé Enterobacteriaceae jsou také 1 mg/l (12). Pro screening lze použít cefpodoxim, který je nejcitlivějším individuálním indikátorovým cefalosporinem pro detekci produkce ESBL. Tento test je však méně specifický než test s kombinací cefotaximu (nebo ceftriaxonu) a ceftazidimu (14,15), který se používá pro confirmaci produkce ESBL. Příslušné průměry zón pro indikátorové cefalosporiny jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1. Metody screeningu ESBL u Enterobacteriaceae (13-19).

Metoda	Antibiotikum	Vyšetřit ESBL, pokud je
Bujónová nebo agarová diluce <sup>1</sup>	cefotaxim/ceftriaxon A ceftazidim	MIC >1 mg/l pro kterékoli antibiotikum
	cefpodoxim	MIC >1 mg/l
Disková difúze <sup>1</sup>	cefotaxim (5 µg) nebo ceftriaxon (30 µg) A ceftazidim (10 µg)	inhibiční zóna <21 mm inhibiční zóna <23 mm inhibiční zóna <22 mm
	cefpodoxim (10 µg)	inhibiční zóna <21 mm

<sup>1</sup> U všech metod se vždy testuje cefotaxim (i) nebo ceftriaxon **A** ceftazidim **NEBO** (ii) cefpodoxim.

Obrázek 1. Algoritmus pro fenotypovou detekci ESBL



<sup>1</sup>Byl-li testován cefoxitin a výsledná MIC je MIC >8 mg/l, vyšetří se konfirmační test s cefepimem +/- kyselinou klavulanovou

<sup>2</sup>Výsledek nelze označit jako pozitivní nebo negativní (např. pokud nelze odečíst výsledek neboť růst kmene je mimo rozmezí MIC, nebo když je nejasná synergie v testu s kombinací disků nebo v testu double disk synergy). Pokud je výsledek konfirmačního testu s cefepimem +/- kyselinou klavulanovou stále nejasný, je nutno vyšetřit genotyp.

### 3.4.1 Screening ESBL u Enterobacteriaceae

#### A. Screening u skupiny 1 Enterobacteriaceae (*E. coli*, *Klebsiella* spp., *Raoultella* spp., *P. mirabilis*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp.)

Doporučené metody pro screening ESBL ve skupině 1 Enterobacteriaceae jsou bujónová diluce, agarová diluce, disková difúze nebo může být použit některý z automatizovaných systémů (13,20,21). Jako indikátorové cefalosporiny je nutno užít vždy cefotaxim (nebo ceftriaxon) a ceftazidim, neboť MIC těchto antibiotik se může u různých producentů ESBL výrazně lišit (14,22,23).

Algoritmus pro screening ESBL a fenotypové konfirmační metody pro skupinu 1 Enterobacteriaceae, které jsou pozitivní v screeningových testech, jsou na obrázku 1 a v tabulce 2.

#### B. Screening u skupiny 2 Enterobacteriaceae (*Enterobacter* spp, *Serratia* spp., *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Providencia* spp, *Hafnia alvei*)

Screening pro skupinu 2 Enterobacteriaceae se provádí podle metod popsaných výše pro skupinu 1 Enterobacteriaceae (obrázek 1 a tabulka 3) (19). U těchto druhů je však velmi častým mechanismem rezistence k cefalosporinům dereprese chromozomální AmpC  $\beta$ -laktamázy. Při testování fenotypu lze proto v kombinaci s kyselinou klavulanovou použít cefepim pro jeho stabilitu vůči hydrolýze AmpC.

### 3.4.2 Fenotypové konfirmační metody

Pro konfirmaci ESBL jsou doporučeny čtyři z několika dalších metod, založených na inhibici aktivity ESBL kyselinou klavulanovou *in vitro*: kombinovaný diskový test (CDT), double disk synergy test (DDST), ESBL gradient test a bujónový mikrodiluční test (tabulky 2 a 3) (20, 21, 24). Podle jedné multicentrické studie byla prokázána vyšší specifita CDT než u ESBL gradient testu při srovnatelné citlivosti (25). Výrobci automatických systémů pro vyšetřování citlivosti zavedli detekční testy založené na inhibici enzymů ESBL kyselinou klavulanovou. V různých studiích se výtěžnost konfirmačních metod liší v závislosti na souboru testovaných kmenů a použitém zařízení (17-19).

#### A. Kombinovaný diskový test (CDT)

Vždy se použijí disky nebo tablety obsahující cefalosporin samotný (cefotaxim, ceftazidim, cefepim) a v kombinaci s kyselinou klavulanovou. Srovnávají se inhibiční zóny kolem disků nebo tablet cefalosporinů v kombinaci s kyselinou klavulanovou se zónami kolem disků nebo tablet samotnými cefalosporiny. Test je pozitivní, pokud rozdíl v průměru inhibiční zóny disku s kyselinou klavulanovou a bez ní je větší než 5 mm (tabulka 3) (26, 27).

#### B. Double-disk synergy test (DDST)

Disky cefalosporinů (cefotaxim, ceftazidim, cefepim) jsou aplikovány na plotny vedle disků s kyselinou klavulanovou (amoxicilin-klavulanová kyselina). Pozitivní výsledek indikuje rozšíření inhibiční zóny kolem některého z cefalosporinových disků směrem k disku, který obsahuje kyselinu klavulanovou. Rozhodujícím faktorem je vzdálenost 20 mm od středu disků, která je optimální pro disky s 30 g cefalosporinu; nicméně u kmenů s velmi vysokým nebo nízkým stupněm rezistence může být snížena (15 mm), respektive zvýšena (30 mm) (20). Pro disky s nižším obsahem cefalosporinů používané v diskové difúzní metodě EUCAST musí být doporučení přehodnoceno.

#### C. Gradientní test

Gradientní testy se provádí, hodnotí a interpretují podle návodů výrobce. Test je pozitivní, pokud MIC v cefalosporinu v kombinaci s kyselinou klavulanovou je 8 násobně nižší ve srovnání s MIC samotného cefalosporinu, nebo pokud je přítomna fantómová zóna, nebo deformovaná elipsa (viz návody výrobce) (tabulka 3). Výsledek testu je neurčitý, pokud je MIC mimo rozmezí proužku a test nelze hodnotit. Ve všech ostatních případech je výsledek testu negativní. ESBL gradientní testy by měly být použity pouze pro potvrzení produkce ESBL a nejsou spolehlivé pro stanovení MIC.

#### D. Bujónová mikrodiluce

Bujónová mikrodiluce se provádí v Mueller-Hinton bujónu obsahujícím samostatný cefotaxim, ceftazidim a cefepim v ředění dvojnásobnou řadou při koncentracích v rozmezí 0,25 až 512 mg/l a tatáž ředění v kombinaci s kyselinou klavulanovou ve fixní koncentraci 4 mg/l. Test je pozitivní, pokud je MIC cefalosporinu v kombinaci s kyselinou klavulanovou 8 násobně snížena ve srovnání s MIC samotného cefalosporinu. Ve všech ostatních případech je výsledek testu negativní (24).

#### D. Biochemické (kolorimetrické) testy

Test ESBL NDP byl poprvé popsán v roce 2012 a používá jako indikátor cefotaxim a tazobaktam jako inhibitor (28). Provádí se v destičkách s 96 jamkami nebo ve zkumavkách. Změna barvy z červené na žlutou se považuje za pozitivní. Test byl také použit přímo na vzorcích pacientů (29). Byla popsána vynikající senzitivita a specifita, ale test nebyl hodnocen v žádné multicentrické studii.

Test  $\beta$ -LACTA je kolorimetrický test s použitím chromogenního cefalosporinového substrátu (HMRZ-86) na izolátech a také přímo na klinických vzorcích (30). V prospektivní multicentrické studii v Belgii a Francii bylo zjištěno, že vykazuje výbornou senzitivitu a specifitu u *E. coli* a *K. pneumoniae* (96 % a

100 %), zatímco u druhů produkujících indukovatelné  $\beta$ -laktamázy AmpC vykazuje nižší senzitivitu (67 %). Vysoká negativní prediktivní hodnota pro *E. coli* a *K. pneumoniae* (99 % v oblastech s prevalencí rezistence na cefalosporiny 3 generace v rozmezí 10 až 30 %) činí tento jednoduchý test velmi účinným při predikci rezistence na cefalosporiny třetí generace, zejména u kmenů produkujících  $\beta$ -laktamázu s rozšířeným spektrem.

#### E. Speciální zřetel při interpretaci

Konfirmace ESBL testů, které používají jako indikátor cefalosporinů cefotaxim, může být falešně pozitivní u kmenů *Klebsiella oxytoca* s hyperprodukcí chromozomálních  $\beta$ -laktamáz K1 (OXY-like) (31). Podobný fenotyp se může vyskytnout u *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri*, *Citrobacter koseri* a *Kluyvera* spp. a u některých druhů podobných *C. koseri*, jako je *C. sedlakii*, *C. farmeri* a *C. amalonaticus*, které mají chromozomální  $\beta$ -laktamázy inhibované kyselinou klavulanovou (32, 33). Další možnou příčinou falešně pozitivních výsledků je hyperprodukce  $\beta$ -laktamázy SHV-1, TEM-1, nebo OXA-1-like v kombinaci se změněnou permeabilitou (18). Podobné problémy s falešně pozitivními výsledky u *K. oxytoca* produkující K1 mohou také nastat, použije-li se ke konfirmaci ESBL pouze samotný cefepim (34).

Tabulka 2. Metody pro konfirmaci ESBL u Enterobacteriaceae s pozitivním ESBL screeningovým testem (viz tabulka 1). Skupina 1 Enterobacteriaceae (viz obrázek 1).

Metoda	Antibiotikum (obsah disku nebo MIC)	Pozitivní konfirmace ESBL
ESBL gradientní test	cefotaxim +/- klavulanová kys.	poměr MIC $\geq 8$ nebo vytvoření deformované elipsy
	ceftazidim +/- klavulanová kys.	poměr MIC $\geq 8$ nebo vytvoření deformované elipsy
Kombinovaný diskový difúzní test (CDT)	cefotaxim (30 $\mu$ g) +/- klavulanová kys. (10 $\mu$ g)	zvětšení inhibiční zóny $\geq 5$ mm
	ceftazidim (30 $\mu$ g) +/- klavulanová kys. (10 $\mu$ g)	zvětšení inhibiční zóny $\geq 5$ mm
Bujónová mikrodiluce	cefotaxim +/- klavulanová kys. (4 mg/l)	poměr MIC $\geq 8$
	ceftazidim +/- klavulanová kys. (4 mg/l)	poměr MIC $\geq 8$
	cefepim +/- klavulanová kys. (4 mg/l)	poměr MIC $\geq 8$
Double disk synergy test (DDST)	cefotaxim, ceftazidim a cefepim	rozšíření inhibiční zóny indikátorového cefalosporinu ve směru k disku amoxicilinu s klavulanovou kyselinou



Tabulka 3. Metody pro konfirmaci ESBL u Enterobacteriaceae s pozitivním ESBL screeningovým testem (viz tabulka 1). Skupina 2 Enterobacteriaceae (viz obrázek 1).

Metoda	Antibiotikum	Pozitivní konfirmace ESBL
ESBL gradientní test EtestESBL	cefepim +/- klavulanová kys.	poměr MIC $\geq 8$ nebo vytvoření deformované elipsy
Kombinovaný diskový difúzní test	cefepim (30 $\mu\text{g}$ ) +/- klavulanová kys. (10 $\mu\text{g}$ )	zvětšení inhibiční zóny $\geq 5$ mm
Bujónová mikrodiluce	cefepim +/- klavulanová kys. (fixní koncentrace 4 mg/l)	poměr MIC $\geq 8$
Double disk synergy test (DDST)	cefotaxim, ceftazidim, cefepim	rozšíření inhibiční zóny indikátorového cefalosporinu ve směru k disku amoxicilinu s klavulanovou kyselinou

**3.4.3 Fenotypová detekce ESBL v přítomnosti jiných  $\beta$ -laktamáz, které maskují synergii**  
 Neurčité výsledky (u Etestu®) a falešně negativní výsledky testů (u CDT, DDST, Etestu a bujónové mikrodiluce) mohou být způsobeny expresí  $\beta$ -laktamáz AmpC ve vysokém stupni, které maskují přítomnost ESBL (20,34,35). Izoláty s vysokou úrovní exprese  $\beta$ -laktamázy AmpC jsou obvykle jednoznačně rezistentní k cefalosporinům třetí generace. O vysoké úrovni exprese  $\beta$ -laktamáz AmpC svědčí také rezistence k cefamycinům (MIC cefoxitinu  $>8$  mg/l (31), s vzácnou výjimkou  $\beta$ -laktamáz ACC, které rezistenci k cefoxitinu neudělují (36).

Ke konfirmaci produkce ESBL u izolátů s vysokou úrovní exprese  $\beta$ -laktamáz AmpC se doporučuje dodatečné potvrzení ESBL s indikátorovým cefalosporinem cefepimem, který  $\beta$ -laktamázy AmpC nehydrolyzují. Cefepim lze použít u všech metod (CDT, DDST, gradientních a mikrodilučních) (27,34-36). Alternativně lze použít kloxacilin, který je dobrým inhibitorem enzymů AmpC. Test je uspořádán jako CDT s disky obsahujícími dva indikátorové cefalosporiny (cefotaxim a ceftazidim) spolu s kyselinou klavulanovou a kloxacilinem; a standardní CDT nebo DDST na agarových plotnách obsahujících 200-250 mg/l kloxacilinu (19). K dispozici jsou i komerční disky nebo tablety, které obsahují kyselinu klavulanovou i kloxacilin, chybí však multicentrické studie hodnotící tyto přípravky.

Přítomnost ESBL mohou maskovat rovněž karbapenamázy jako jsou MBL nebo KPC (nikoli však enzymy OXA-48-like) a/nebo závažné poruchy permeability (40, 41). Pokud je detekce ESBL v těchto případech nadále relevantní, lze použít molekulární metody.

#### 3.4.4 Konfirmace genotypu

Pro genotypové potvrzení přítomnosti ESBL genů existuje řada možností od PCR a sekvenování po celogenomové sekvenování, včetně mapování genů rezistence. K dispozici jsou také různé mikročipy. Existují komerční i in-house metody, ale nebyly systematicky ověřeny, a proto nebudou v tomto dokumentu zařazeny. **Metody sekvenování celého genomu byly popsány v jiné publikaci EUCAST (42).**

### 3.4.5 Kontrola kvality

Níže je uvedeno několik možných kontrolních kmenů pro fenotypové a genotypové metody. U těchto kmenů nejsou k dispozici limitní rozmezí pro kontrolu kvality. Uživatelé komerčních metod by měli používat kontrolní kmeny uvedené v příbalové informaci.

Tabulka 4. Příklady kontrolních kmenů pro testování ESBL.

Kmen	Mechanismus
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	SHV-18 ESBL
<i>E. coli</i> CCUG 62975	ESBL skupiny CTX-M-1 a získaná CMY AmpC
<i>E. coli</i> ATCC 25922	ESBL-negativní

### 3.5 Literatura

1. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:211-1233
2. Livermore DM.  $\beta$ -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8:557-584
3. Bradford PA. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14:933-951
4. Naas T, Poirel L, Nordmann P. 2008. Minor extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(Suppl1):42-52
5. Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(Suppl1):144-153
6. Livermore DM, Cantón R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, Ayala J, Coque TM, Kern-Zdanowicz I, Luzzaro F, Poirel L, Woodford N. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59:165-174
7. Carattoli A. Animal reservoirs for extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producers. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(Suppl1):117-123
8. European Centres for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)
9. Gniadkowski M. 2008. Evolution of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases by mutation. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(Suppl1):11-32
10. Livermore DM. Defining an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(Suppl1):3-10
11. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. EUCAST; 2013. Version 3.0 [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/) (last accessed 23 December 2012).
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-first Informational Supplement M 100-S21. Wayne, PA, USA: CLSI; 2011.
13. Hope R, Potz NA, Warner M, Fagan EJ, Arnold E, Livermore DM. Efficacy of practised screening methods for detection of cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59(1):110-3.
14. Oliver A, Weigel LM, Rasheed JK, McGowan Jr JE Jr, Raney P, Tenover FC. Mechanisms of decreased susceptibility to cefpodoxime in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46:3829-36.
15. Garrec H, Drieux-Rouzet L, Golmard JL, Jarlier V, Robert J. Comparison of nine phenotypic methods for detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production by Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2011;49:1048-57.
16. Leverstein-van Hall MA, Fluit AC, Paauw A, Box AT, Brisse S, Verhoef J. Evaluation of the Etest® ESBL and the BD Phoenix, VITEK 1, and VITEK 2 automated instruments for detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol.* 2002;40:3703-11.
17. Spanu T, Sanguinetti M, Tumbarello M, D'Inzeo T, Fiori B, Posteraro B, Santangelo R, Cauda R, Fadda G. Evaluation of the new VITEK 2 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) test for rapid detection of ESBL production in Enterobacteriaceae isolates. *J Clin Microbiol.* 2006;44:3257-62.
18. Thomson KS, Cornish NE, Hong SG, Hemrick K, Herdt C, Moland ES. Comparison of Phoenix and VITEK 2 extended-spectrum- $\beta$ -lactamase detection tests for analysis of *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates with well-characterized  $\beta$ -lactamases. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2380-4.
19. Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in

- Enterobacteriaceae: review and bench guide. Clin Microbiol Infect. 2008; 14 (Suppl 1):90-103.
20. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev. 2005;18:657-86
  21. Biedenbach DJ, Toleman M, Walsh TR, Jones RN. Analysis of *Salmonella* spp. with resistance to extended-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones isolated in North America and Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2004). Diagn Microbiol Infect Dis. 2006;54:13-21.
  22. Hirakata Y, Matsuda J, Miyazaki Y, Kamihira S, Kawakami S et al. Regional variation in the prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region (SENTRY 1998-2002). Diagn Microbiol Infect Dis. 2005;52:323-9.
  23. Jeong SH, Song W, Kim JS, Kim HS, Lee KM. Broth microdilution method to detect extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and AmpC  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae isolates by use of clavulanic acid and boronic acid as inhibitors. J Clin Microbiol. 2009;47:3409-12.
  24. Platteel TN, Cohen Stuart JW, de Neeling AJ, Voets GM, Scharringa J et al. Multi-centre evaluation of a phenotypic extended spectrum  $\beta$ -lactamase detection guideline in the routine setting. Clin Microbiol Infect. 2013;19:70-6.
  25. M'Zali FH, Chanawong A, Kerr KG, Birkenhead D, Hawkey PM. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the MAST DD test, the double disc and the Etest<sup>®</sup> ESBL. J Antimicrob Chemother. 2000;45:881-5.
  26. Towne TG, Lewis JS 2nd, Herrera M, Wickes B, Jorgensen JH. Detection of SHV-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in *Enterobacter* isolates. J Clin Microbiol. 2010;48:298-9.
  27. Stürenburg E, Sobottka I, Noor D, Laufs R, Mack D. Evaluation of a new cefepime-clavulanate ESBL Etest<sup>®</sup> to detect extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in an Enterobacteriaceae strain collection. J Antimicrob Chemother. 2004;54:134-8.
  28. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Rapid detection of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2012;50(9):3016-22.
  29. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of ESBL-producing Enterobacteriaceae in blood cultures. Emerg Infect Dis. 2015;21(3):504-7
  30. Renvoisé A, Decré D, Amarsy-Guerle R, Huang TD, Jost C, et al. Evaluation of the  $\beta$ -Lacta test, a rapid test detecting resistance to third-generation cephalosporins in clinical strains of Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2013;51(12):4012-7
  31. Nukaga M, Mayama K, Crichlow GV, Knox JR. Structure of an extended-spectrum class A  $\beta$ -lactamase from *Proteus vulgaris* K1. J Mol Biol. 2002;317:109-17.
  32. Petrella S, Renard M, Ziental-Gelus N, Clermont D, Jarlier V, Sougakoff W. Characterization of the chromosomal class A  $\beta$ -lactamase CKO from *Citrobacter koseri*. FEMS Microbiol Lett. 2006;254:285-92.
  33. Stürenburg E, Sobottka I, Noor D, Laufs R, Mack D. Evaluation of a new cefepime-clavulanate ESBL Etest<sup>®</sup> to detect extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in an Enterobacteriaceae strain collection. J Antimicrob Chemother. 2004;54:134-8.
  34. Jacoby GA. AmpC  $\beta$ -lactamases. Clin Microbiol Rev. 2009;22:161-82
  35. Munier GK, Johnson CL, Snyder JW, Moland ES, et al. Positive extended-spectrum- $\beta$ -lactamase (ESBL) screening results may be due to AmpC  $\beta$ -lactamases more often than to ESBLs. J Clin Microbiol. 2010;48:673-4.
  36. Bauernfeind A, Schneider I, Jungwirth R, Sahly H, Ullmann U. A novel type of AmpC  $\beta$ -lactamase, ACC-1, produced by a *Klebsiella pneumoniae* strain causing nosocomial pneumonia. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43:1924-31.
  37. Polsfuss S, Bloemberg GV, Giger J, Meyer V, Böttger EC, Hombach M. Evaluation of a diagnostic flow chart for detection and confirmation of extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) in Enterobacteriaceae. Clin Microbiol Infect. 2012;18:1194-204.
  38. Yang JL, Wang JT, Lauderdale TL, Chang SC. Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Enterobacter cloacae* in Taiwan and comparison of 3 phenotypic confirmatory methods for detecting extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production. J Microbiol Immunol Infect. 2009;42:310-6.
  39. Jeong SH, Song W, Kim JS, Kim HS, Lee KM. Broth microdilution method to detect extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and AmpC  $\beta$ -lactamases in enterobacteriaceae isolates by use of clavulanic acid and boronic acid as inhibitors. J Clin Microbiol. 2009;47:3409-12.
  40. Tsakris A, Poulou A, Themeli-Digalaki K, Voulgari E, Pittaras T, Sofianou D, Pournaras S, Petropoulou D. Use of boronic acid disk tests to detect extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of KPC carbapenemase-possessing Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2009;47:3420-6.
  41. March A, Aschbacher R, Dhanji H, Livermore DM, Böttcher A et al. Colonization of residents and staff of a long-term-care facility and adjacent acute-care hospital geriatric unit by multiresistant bacteria. Clin Microbiol Infect. 2010;16:934-44.
  42. Ellington MJ, Ekelund O, Aarestrup FM, et al. The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee. Clin Microbiol Infect. 2017;23(1):2-22.

## 4. Enterobacteriaceae produkující získanou $\beta$ -laktamázu AmpC

Význam detekce mechanismu rezistence	
Potřeba pro kategorizaci <b>klinické</b> antimikrobní citlivosti	Ne
<b>Pro účely</b> kontroly infekcí	Ano
<b>Pro účely</b> veřejné zdraví	Ano

### 4.1 Definice

Cefalosporinázy typu AmpC jsou  $\beta$ -laktamázy třídy C dle Amblerovy klasifikace. Hydrolyzují peniciliny, cefalosporiny (včetně třetí, nikoli však čtvrté generace) a monobaktamy. Obecně platí, že enzymy typu AmpC jsou špatně inhibovány klasickými inhibitory ESBL a zvláště kyselinou klavulanovou (1).

### 4.2 Klinický a/nebo epidemiologický význam

První izoláty produkující získané enzymy AmpC byly identifikovány na konci osmdesátých let minulého století a poté byly pozorovány všude ve světě jako důsledek klonálního šíření a horizontálního přenosu genů AmpC (často označovaného jako plazmidem zprostředkovaná AmpC). Existuje několik linií mobilních genů AmpC, které pocházejí od přirozených producentů, zejména ze skupiny *Enterobacter* (MIR, ACT), skupiny *C. freundii* (CMY-like, LAT, CFE), skupiny *M. morgani* (DHA), skupiny *Hafnia alvei* (ACC), skupiny *Aeromonas* (CMY-1-like, FOX, MOX) a skupiny *Acinetobacter baumannii* (ABA). Nejčtenější a nejvíce rozšířeny jsou enzymy CMY-2-like, a značně jsou rozšířeny také indukované  $\beta$ -laktamázy DHA-like a některé další (1).

Hlavními producenty získaných AmpCs jsou *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella enterica* a *P. mirabilis*. Izoláty těchto enzymů byly získány jak od hospitalizovaných pacientů, tak od pacientů z řad komunit, a byly rozpoznány dříve než klasické enzymy ESBL u hospodářských zvířat v potravinách (*E. coli* a *S. enterica*). Ačkoli masivní rozšíření získané AmpC bylo zaznamenáno v multicentrických studiích týkajících se rezistence enterobakterií k cefalosporinům třetí generace, jejich celková frekvence výskytu zůstává mnohem nižší než výskyt ESBL, **přínejmenším v Evropě**. Nicméně význam bakterií produkujících tyto enzymy se může významně zvýšit v některých specifických místních a epidemiologických podmínkách (1-5).

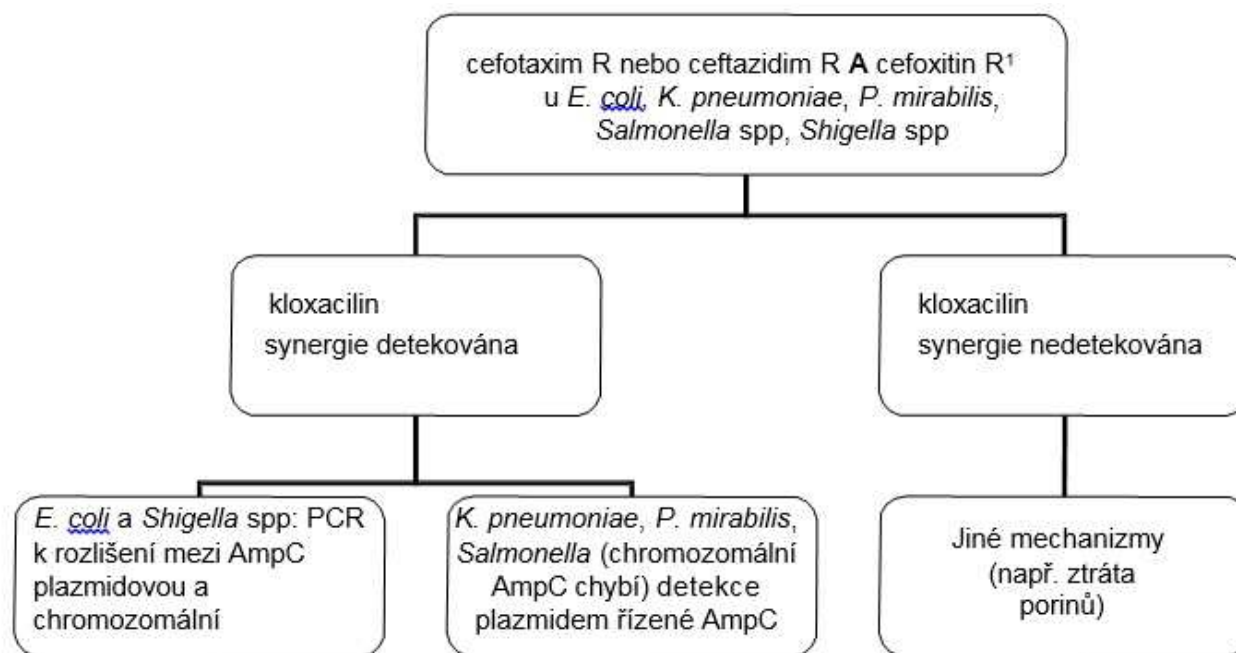
### 4.3 Mechanismus rezistence

Četné další Enterobacteriaceae a některé jiné gramnegativní tyčky produkují přirozené enzymy AmpC konstitutivně ve stopovém množství (například *E. coli*, *Shigella* spp.) nebo indukované (například *Enterobacter* spp., *C. freundii*, *M. morgani*, *P. aeruginosa*). Dereprese nebo hyperprodukce přirozených AmpC je způsobena různými genetickými změnami a uděluje vysoký stupeň rezistence k cefalosporinům a ke kombinacím penicilinů s inhibitory  $\beta$ -laktamázy. Cefalosporinázy třídy C se také mohou vyskytovat jako získané enzymy, hlavně u enterobakterií. S výjimkou indukovaného enzymu DHA jsou získané AmpC exprimovány konstitutivně, a jejich rezistence k cefalosporinům je podobná jako u hyperprodukcí nebo derepresovaných mutantů přirozených producentů AmpC. Stupeň rezistence závisí na množství vytvořených enzymů, jakož i na přítomnosti jiných mechanismů rezistence. Podobně jako ESBL, získané AmpC jsou obvykle kódovány na genech zprostředkovaných plazmidy (1-3).

#### 4.4 Doporučené metody pro detekci získané AmpC u Enterobacteriaceae

Jako fenotypová kritéria pro zkoumání produkce AmpC v Enterobacteriaceae skupiny 1 lze použít cefoxitin (MIC > 8 mg/l nebo průměr zóny <19 mm) v kombinaci s fenotypovou rezistencí vůči ceftazidimu a/nebo cefotaximu (podle breakpointů), nelze však tímto způsobem detekovat ACC-1, plazmidem zprostředkovanou AmpC, která cefoxitin nehydrolyzuje (6). Je třeba poznamenat, že rezistence k cefoxitinu může být také způsobena ztrátou porinů (1).

Obrázek 1. Algoritmus pro detekci AmpC.



<sup>1</sup>R u cefoxitinu je definována jako ne-divokého typu (MIC >8 mg/L nebo průměr zóny <19 mm).

Výsledek "R" pro cefotaxim a ceftazidim se odvozuje podle breakpointů EUCAST. Vyšetřování izolátů, které nejsou citlivé na cefotaxim a ceftazidim. Postup, při němž se používá jako kritérium pro výběr izolátů jejich necitlivost k cefotaximu a ceftazidimu, má pro průkaz AmpC vyšší senzitivitu ale nižší specifitu, než použije-li se jako kritérium rezistence k cefoxitinu (7). Enzym AmpC může být také přítomen u izolátů, které mají pozitivní test na ESBL (synergie s klavulanovou kyselinou). Bez ohledu na výsledek testu na průkaz ESBL může být někdy potřebné vyšetřit také AmpC. Laboratoře, které nevyšetřují cefoxitin, mohou použít jako další, méně specifický fenotypový indikátor citlivost k cefepimu společně s rezistencí k cefotaximu nebo ceftazidimu.

Fenotypové testy pro confirmaci AmpC jsou obecně založeny na inhibici AmpC kloxacilinem nebo deriváty kyseliny borité. Deriváty kyseliny borité nicméně inhibují také karbapenemázy třídy A. Několik publikací svědčí o dostatečné přesnosti metod pro průkaz AmpC připravovaných "in-house" (8-10), stejně jako komerčních metod jako je "AmpC Detection Disc Set Mast" (senzitivita 96-100 %, specifita 98-100 %) (11,12), AmpC gradientní test, který je v současné době k dispozici pouze od bioMérieux (senzitivita 84-93 %, specifita 70 až 100 %) (12,13) a metod používajících Rosco tablety s cefotaximem-kloxacilinem a ceftazidimem-kloxacilinem (senzitivita 96 %, specifita 92 %) (7,14). Získanou AmpC však nelze odlišit od konstitutivně hyperprodukované chromozomální AmpC u *E.coli*.

Přítomnost získaných enzymů AmpC mohou confirmovat metody založené na PCR (15, 16), nebo DNA microarray (17).

Tabulka 1. uvádí několik možných kontrolních kmenů pro fenotypové a genotypové metody. U těchto kmenů nejsou k dispozici limitní rozmezí pro kontrolu kvality. Uživatelé komerčních metod by měli používat kontrolní kmeny uvedené v příbalové informaci.

Tabulka 1. Příklady kontrolních kmenů vyšetření AmpC.

Kmen	Mechanismus
<i>E. coli</i> CCUG 58543	získaná AmpC CMY-2
<i>E. coli</i> CCUG 62975	získaná AmpC CMY a ESBL skupiny CTX-M-1
<i>K. pneumoniae</i> CCUG 58545	získaná DHA
<i>E. coli</i> ATCC 25922	AmpC a ESBL negativní

## 4.5 Literatura

- Jacoby GA. AmpC  $\beta$ -lactamases. Clin Microbiol Rev. 2009;22:161-82
- Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type  $\beta$ -lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46:1-11
- Beceiro A, Bou G. Class C  $\beta$ -lactamases: an increasing problem worldwide. Rev Med Microbiol. 2004;15:141-152
- Empel J, Hrabák J, Kozińska A, Bergerová T, Urbášková P, Kern-Zdanowicz I, Gniadkowski M. DHA-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a teaching hospital in the Czech Republic. Microb Drug Resist. 2010;16:291-295
- D'Andrea MM, Literacka E, Zioga A, Giani T, Baraniak A, Fiett J, Sadowy E, Tassios PT, Rossolini GM, Gniadkowski M, Miriagou V. Evolution of a multi-drug-resistant *Proteus mirabilis* clone with chromosomal AmpC-type cephalosporinases spreading in Europe. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55:2735-2742
- Bauernfeind A, Schneider I, Jungwirth R, Sahly H, Ullmann U. A novel type of AmpC  $\beta$ -lactamase, ACC-1, produced by a *Klebsiella pneumoniae* strain causing nosocomial pneumonia. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43:1924-31.
- Edquist P, Ringman M, Liljequist BO, Wisell KT, Giske CG. Phenotypic detection of plasmid-acquired AmpC in *Escherichia coli* - evaluation of screening criteria and performance of two commercial methods for the phenotypic confirmation of AmpC production. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2013; 32:1205-10
- Yagi T, Wachino J, Kurokawa H, Suzuki S, Yamane K et al. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 2005;43:2551-8.
- Tenover FC, Emery SL, Spiegel CA, Bradford PA, Eells S et al. Identification of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., and *Proteus* spp. can potentially improve reporting of cephalosporin susceptibility testing results. J Clin Microbiol. 2009;47:294-9.
- Tan TY, Ng LS, He J, Koh TH, Hsu LY. Evaluation of screening methods to detect plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis*. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53:146-9
- Martínez-Martínez L. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and the permeability barrier. Clin Microbiol Infect. 2008;14 Suppl 1:82-9.
- Halstead FD, Vanstone GL, Balakrishnan I. An evaluation of the Mast D69C AmpC Detection Disc Set for the detection of inducible and derepressed AmpC  $\beta$ -lactamases. J Antimicrob Chemother. 2012;67:2303-4.
- Ingram PR, Inglis TJ, Vanzetti TR, Henderson BA, Harnett GB, Murray RJ. Comparison of methods for AmpC  $\beta$ -lactamase detection in Enterobacteriaceae. J Med Microbiol. 2011; 60(Pt 6):715-21.
- Peter-Getzlaff S, Polsfuss S, Poledica M, Hombach M, Giger J et al. Detection of AmpC  $\beta$ -lactamase in *Escherichia coli*: comparison of three phenotypic confirmation assays and genetic analysis. J Clin Microbiol. 2011;49:2924-32.
- Hansen F, Hammerum AM, Skov RL, Giske CG, Sundsfjord A, Samuelsen O. Evaluation of ROSCO Neo-Sensitabs for phenotypic detection and subgrouping of ESBL-, AmpC- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. APMIS. 2012;120:724-32.
- Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2002;40:2153-62.
- Brolund A, Wisell KT, Edquist PJ, Elfström L, Walder M, Giske CG. Development of a real-time SYBRGreen PCR assay for rapid detection of acquired AmpC in Enterobacteriaceae. J Microbiol Methods. 2010; 82:229-33.
- Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM). J Antimicrob Chemother. 2012;67:1865-9.



## 5. Rezistence gramnegativních tyčků k polymyxinu

Význam detekce mechanismu rezistence	
Potřeba pro kategorizaci klinické antimikrobní citlivosti	Ano
Pro účely kontroly infekcí	Ano
Pro účely veřejné zdraví	Ano

Získaná rezistence k polymyxinu u Enterobacteriaceae se v posledních letech vyskytuje celosvětově. Zvláště znepokojující je výskyt rezistence zprostředkované plazmidem u zvířat, potravin a lidí, která má velkou tendenci šířit se horizontálně.

Dříve byla polymyxinová rezistence hlášena vždy jako chromozomálně zprostředkovaná, a obvykle souvisela s mutacemi v několika genech obsažených v dvoukomponentním regulačním systému pro biosyntézu lipidu A a regulaci náboje lipopolysacharidu (LPS) (1,2). V roce 2015 se objevily první zprávy o rezistenci na kolistin zprostředkované plazmidem a souvisely s plazmidem kódovanou fosfoetanolamin transferázou, která přidává fosfoethanolaminovou skupinu k lipidu A. Výsledným účinkem je snížení negativního náboje v LPS a tudíž snížení interakce s kladně nabitými polymyxiny. Nová determinanta rezistence byla pojmenována MCR-1 (3). Od té doby byla přítomnost tohoto mechanismu rezistence prokázána na všech kontinentech. Jeden izolát se datuje do osmdesátých let, ale zdá se, že celosvětový vzestup se uskutečnil v posledních přibližně 5 letech (4). Během roku 2016 byly popsány dvě nové varianty MCR-1 - MCR-1.2 a MCR-2 (5, 6).

U evropských invazivních kmenů *K. pneumoniae* je prevalence rezistence na kolistin 8,6 % a u izolátů rezistentních na karbapenem může činit až 29 % (7). Je nutno zdůraznit, že značné rozdíly ve frekvenci výskytu této rezistence mezi zeměmi mohou být způsobeny metodickými problémy. Předpokládá se, že většina rezistence je způsobena chromozomálními mechanismy, ale bylo zaznamenáno několik hlášení o enterobakteriích produkujících karbapenemázu spolu s MCR-1 (4).

V současné době neexistují spolehlivě ověřené metody pro fenotypovou charakterizaci různých mechanismů rezistence na polymyxin než samotné stanovení MIC mikrodiluční metodou (gradientní testy a disková difúze jsou u polymyxinů nespolehlivé). Nedávno bylo zjištěno, že hydrolýza enzymy MCR závisí na zinku a cheláty zinku tudíž mohou jejich aktivitu inhibovat (8). Z tohoto důvodu se očekává přínos inhibičních testů založených na EDTA nebo dipikolinové kyselině. Současné zaměření je však na zjištění rezistence polymyxinu bez ohledu na mechanismus. Laboratořím se doporučuje, aby vyšetřovaly MIC kolistinu výlučně mikrodiluční metodou se sulfátem kolistinu (9). Diskové difúzní a gradientní testy by se neměly používat, protože jsou spojeny s vysokým rizikem velmi závažných a závažných chyb (10). V poslední době byla také zavedena kolorimetrická metoda, ale její spolehlivost byla zatím ověřena jen na jednom pracovišti (11). Pro další studie mechanismu rezistence jsou nezbytné molekulární metody. Současným doporučením je provést takové další testování pouze na izolátech rezistentních ke kolistinu.

Pro kontrolu kvality musí být použit jak citlivý kmen (*E. coli* ATCC 25922 nebo *P. aeruginosa* ATCC 27853), tak rezistentní kmen ke kolistinu *E. coli* NCTC 13846 (pozitivní *mcr-1*). Cílová hodnota MIC kolistinu u *E. coli* NCTC 13846 je 4 mg/l a jen výjimečně 2 mg/l nebo 8 mg/l.

### 5.1 Literatura

1. Giske CG. Contemporary resistance trends and mechanisms for the old antibiotics colistin, temocillin, fosfomycin, mecillinam and nitrofurantoin. Clin Microbiol Infect. 2015;21(10):899-905
2. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in

- bacteria. *Front Microbiol.* 2014; 5:643.
3. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(2):161-8.
  4. Skov RL, Monnet DL. Plasmid-mediated colistin resistance (mcr-1 gene): three months later, the story unfolds. *Euro Surveill.* 2016;21(9).
  5. Di Pilato V, Arena F, Tascini C, Cannatelli A, Henrici De Angelis L, et al. mcr-1.2, a New mcr Variant Carried on a Transferable Plasmid from a Colistin-Resistant KPC Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strain of Sequence Type 512. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60:5612-5.
  6. Xavier BB, Lammens C, Ruhel R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, Malhotra-Kumar S. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill.* 2016; 21(27).
  7. European Centres for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)
  8. Hinchliffe P, Yang QE, Portal E, Young T, Li H, et al. Insights into the Mechanistic Basis of Plasmid-Mediated Colistin Resistance from Crystal Structures of the Catalytic Domain of MCR-1. *Sci Rep.* 2017;7:39392.
  9. Bergen PJ, Li J, Rayner CR, Nation RL. Colistin methanesulfonate is an inactive prodrug of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(6):1953-8.
  10. Dafopoulou K, Zarkotou O, Dimitroulia E, Hadjichristodoulou C, Gennimata V, Pournaras S, Tsakris A. Comparative Evaluation of Colistin Susceptibility Testing Methods among Carbapenem-Nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Aug;59(8):4625-30.
  11. Nordmann P, Jayol A, Poirel L. Rapid Detection of Polymyxin Resistance in Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(6):1038-43.



## 6. *P. aeruginosa* a *Acinetobacter* produkující karbapenemázu

Význam detekce mechanismu rezistence	
Potřeba pro kategorizaci <b>klinické</b> antimikrobní citlivosti	Ne
<b>Pro účely</b> kontroly infekcí	Ano
<b>Pro účely</b> veřejné zdraví	Ano

*P. aeruginosa* a skupina *Acinetobacter baumannii* produkující karbapenemázu se běžně nachází na většině území Evropy (1). V Evropě u *P. aeruginosa* dominují enzymy VIM, zejména VIM-2, producenti KPC jsou zaznamenáni také v zemích Latinské Ameriky (2). U skupiny *Acinetobacter* se často vyskytují karbapenemázy OXA, zejména OXA-23-, OXA 24/40-, OXA-58-, OXA-143-, OXA-235-like (3).

V současné době neexistují žádné specifické inhibitory karbapenemáz OXA třídy D a žádná z existujících fenotypových metod neposkytuje uspokojivé výsledky pro detekci/identifikaci těchto karbapenemáz u skupiny *Acinetobacter*. Kolorimetrické zkoušky byly testovány, ale celkově se u tohoto rodu neprokázala přesnost (4). *Acinetobacter* může produkovat karbapenemázy typu MBL a je možné, že vyšetření těchto enzymů může být snadnější.

Po několik desetiletí používané testy pro průkaz MBL pomocí Etestu nebo nebo disků mají špatnou specifitu (5-7). Nedávno několik autorů také navrhlo různé modifikace kombinovaných diskových testů (buď imipenem nebo meropenem v kombinaci s různými inhibičními látkami třídy B (EDTA nebo DPA), ale tyto byly validovány ve studiích s jedním centrem a jejich spolehlivost je nejasná (8, 9). Kolorimetrické testy fungovaly lépe u *P. aeruginosa* než u *Acinetobacter* (10) a v současné době mají tyto testy pravděpodobně nejlépe prokázanou specifitu. Stále však není k dispozici žádný dostatečně specifický test bez molekulární konfirmace.

Pro vyšetření vlastností karbapenemáz produkovaných *P. aeruginosa* a *Acinetobacter* by měly být použity genotypové metody, ale zejména u *P. aeruginosa* jsou pro počáteční vyšetření vhodné některé z výše uvedených fenotypových metod.

Je třeba poznamenat, že testování karbapenemáz je klinicky nejvýznamnější u *P. aeruginosa*, protože tento druh může být rezistentní na karbapenemy prostřednictvím několika chromozomálních mechanismů (aktivní eflux, alterace nebo ztráta porinů). Naopak rezistence na karbapenem u *Acinetobacter* je téměř konstantně způsobena produkcí karbapenemáz OXA.

Některé práce doporučují kontrolní kmeny *P. aeruginosa* NCTC 13437 (producent VIM-10) a *A. baumannii* NCTC 13301 (producent OXA-23). Pro tyto kmeny není k dispozici limitní rozmezí.

### 6.1 Literatura

1. Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. Int J Antimicrob Agents. 2010;36 Suppl 3:S8-14.
2. Labarca JA, Salles MJ, Seas C, Guzmán-Blanco M. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. Crit Rev Microbiol. 2016; 42:276-92.
3. Higgins PG, Pérez-Llarena FJ, Zander E, Fernández A, Bou G, Seifert H. OXA-235, a novel class D  $\beta$ -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(5):2121-6
4. Noël A, Huang TD, Berhin C, Hoebeker M, Bouchahrouf W, Yunus S, Bogaerts P, Glupczynski Y. Comparative Evaluation of Four Phenotypic Tests for Detection of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria. J Clin

Microbiol. 2017;55(2):510-518.

5. Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- $\beta$ -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol 2003; 41, 4623-4629
6. Hansen F, Hammerum AM, Skov R, Haldorsen B, Sundsfjord A, Samuelsen O. Evaluation of the total MBL confirm kit (ROSCO) for detection of metallo- $\beta$ -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014;79(4):486-8
7. Samuelsen O, Buarø L, Giske CG, Simonsen GS, Aasnaes B, Sundsfjord A. Evaluation of phenotypic tests for the detection of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a low prevalence country. J Antimicrob Chemother. 2008;61(4):827-30
8. Fournier D, Garnier P, Jeannot K, Mille A, Gomez AS, Plésiat P. A convenient method to screen for carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol. 2013;51(11):3846-8.
9. Heinrichs A, Huang TD, Berhin C, Bogaerts P, Glupczynski Y. Evaluation of several phenotypic methods for the detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015;34(7):1467-74.
10. Kabir MH, Meunier D, Hopkins KL, Giske CG, Woodford N. A two-centre evaluation of RAPIDEC® CARBA NP for carbapenemase detection in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. J Antimicrob Chemother. 2016;71(5):1213-6.

## 7. *Staphylococcus aureus* rezistentní k meticilinu (MRSA)

Význam detekce mechanismu rezistence	
Potřeba pro kategorizaci klinické antimikrobní citlivosti	Ano
Pro účely kontroly infekcí	Ano
Pro účely veřejné zdraví	Ano

### 7.1 Definice

Izoláty *S. aureus* s pomocným proteinem vážícím penicilin (penicillin-binding protein) (PBP2a/PBP2c, kódovanými geny *mecA* resp. *mecC*), charakterizuje nízká afinita pro  $\beta$ -laktamová antibiotika, s výjimkou nové třídy cefalosporinů s aktivitou proti MRSA (ceftarolin, ceftobiprol).

### 7.2 Klinický a/nebo epidemiologický význam

*S. aureus* rezistentní k meticilinu je celosvětově hlavní příčinou morbidity a mortality (1,2). Mortalita u infekcí krevního řečiště způsobená MRSA je dvakrát vyšší, než je tomu u podobných infekcí způsobených kmeny citlivými k meticilinu v důsledku zpoždění vhodné léčby a jejího nižšího účinku (3). Infekce způsobené MRSA jsou endemické v komunitě i v nemocnicích všech částí světa.

### 7.3 Mechanismus rezistence

Hlavním mechanismem rezistence je produkce PBP2a/PB2c, pomocného proteinu vážícího penicilin (penicillin-binding protein), který izolátům uděluje rezistenci ke všem  $\beta$ -laktamovým antibiotikům s výjimkou nové třídy specifických "anti-MRSA" cefalosporinů. Tyto látky mají dostatečně vysokou afinitu k PBP2a, a pravděpodobně i k PBP kódovaným genem *mecC* a jsou tudíž účinné proti MRSA (4). Pomocné PBP jsou kódovány genem *mecA*, respektive nedávno popsáným genem *mecC* (5). Geny *mec* jsou pro *S. aureus* cizí a u kmenů citlivých k meticilinu nejsou přítomny. Přesnost výsledků vyšetření citlivosti je negativně ovlivněna u kmenů s výraznou heterogenní expresí genu *mecA* a s obvykle nízkou MIC oxacilinu (5). Některé izoláty jsou sice rezistentní k oxacilinu v nízkém stupni, ale jsou *mecA* a *mecC* negativní a nevytvářejí alternativní PBP [hraničně citlivý *S. aureus* (BORSA, borderline susceptible *S. aureus*)]. Tyto kmeny jsou poměrně vzácné a jejich mechanismus rezistence je nedostatečně prozkoumán, může však zahrnovat hyperprodukcí  $\beta$ -laktamázu nebo změnu původně přítomných PBP (6).

V různých částech světa byly popsány *mecA* pozitivní izoláty *S. aureus*, které jsou díky inaktivaci *mecA* citlivé k cefoxitinu i k oxacilinu (OS-MRSA). Tyto kmeny se liší od heterogenně rezistentních MRSA, které jsou také citlivé na oxacilin, ale rezistentní k cefoxitinu (7, 8). Četnost těchto izolátů se podle kombinovaných výsledků (získaných konvenčním vyšetřením fenotypu nebo pozitivním průkazem *mecA* pomocí PCR) odhaduje přibližně na 3 %. V jednom případě (9) byla během prodloužené antibiotické léčby plně dokumentována reverze z citlivosti na meticilin k rezistenci na meticilin, a předpokládá se, že se tak děje i v jiných případech, nicméně rychlost takové reverzibilní rezistence je v současné době neznámá. Takové izoláty mohou být podle definice detekovány pouze molekulární analýzou. To neznamena, že molekulární analýzu je třeba provádět u všech kmenů, ale je významná jen v případech selhání léčby. Pokud je gen *mecA* detekován náhodně nebo při screeningu kvůli terapeutickému selhání, měl by být izolát vždy hlášen jako rezistentní.

## 7.4 Doporučené metody pro detekci meticilinové rezistence u *S. aureus*

Meticilinová/oxacilinová rezistence stafylokoků může být detekována fenotypově pomocí stanovení MIC nebo diskovým difúzním testem. Aglutinaci lze použít k průkazu PBP2a, není však spolehlivá k detekci PBP2c. Pro genotypovou detekci je vhodná PCR.

### 7.4.1 Detekce vyšetřením MIC nebo diskovou difúzní metodou MIC

Heterogenní exprese rezistence ovlivňuje zejména MIC oxacilinu, ke kterému se kmen jeví jako citlivý. Cefoxitin je velmi citlivý a specifický marker pro detekci meticilinové rezistence zprostředkované geny *mecA/mecC* a je antibiotikem volby pro diskový difúzní test. Difúzní diskový test s oxacilinem je již obsoletní a tabulka klinických breakpointů EUCAST nezahrnuje interpretační kritéria průměrů inhibičních zón oxacilinu pro špatnou korelaci s přítomností genu *mecA*.

#### A. Bujónová mikrodiluce:

Použije se standardní metoda (ISO 20776-1) a kmeny s MIC >4 mg/l cefoxitinu by se měly hlásit jako rezistentní k meticilinu.

**B. Disková difúze:** Použije se disková difúzní metoda EUCAST. Kmeny s průměrem inhibiční zóny <22 mm kolem disku s cefoxitinem (30 µg disk) by se měly hlásit jako rezistentní k meticilinu.

### 7.4.2 Detekce genotypovými a latexovými aglutinačními metodami.

Genotypová detekce genů *mecA* a *mecC* pomocí PCR a detekce proteinu PBP2a soupravou pro latexovou aglutinaci se provádí komerčními testy nebo testy připravenými "in-house". PBP2c nelze většinou komerčních testů detekovat.

### 7.4.3 Kontrolní kmeny

Níže je uvedeno několik možných kontrolních kmenů pro fenotypové a genotypové metody. U těchto kmenů nejsou k dispozici limitní rozmezí pro kontrolu kvality. Uživatelé komerčních metod by měli používat kontrolní kmeny uvedené v příbalové informaci.

Tabulka 1. Příklady kontrolních kmenů pro testování MRSA.

Kmen	Mechanismus
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	citlivý k meticilinu
<i>S. aureus</i> NCTC 12493	rezistentní k meticilinu ( <i>mecA</i> )
<i>S. aureus</i> NCTC 13552	rezistentní k meticilinu ( <i>mecC</i> )

## 7.5 Literatura

1. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. Clin Infect Dis. 2003; 36:53-9.
2. de Kraker ME, Wolkewitz M, Davey PG, Koller W, Berger J, et al. Clinical impact of antimicrobial resistance in European hospitals: excess mortality and length of hospital stay related to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55:1598-605.
3. de Kraker ME, Davey PG, Grundmann H; BURDEN study group. Mortality and hospital stay associated with resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteremia: estimating the burden of antibiotic resistance in Europe. PLoS Med. 2011;8(10):e1001104.

4. Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7:629-41.
5. García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis.* 2011;11:595-603
6. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10:781-91.
7. Hososaka Y, Hanaki H, Endo H, et al. Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. *J Infect Chemother* 2007; 13:79–86.
8. Andrade-Figueiredo M, Leal-Balbino TC. Clonal diversity and epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: high prevalence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical isolates in Brazil. *BMC Microbiol.* 2016; 16:115
9. Proulx MK, Palace SG, Gandra S, Torres B, Weir S, Stiles T, Ellison RT 3rd, Goguen JD. Reversion From Methicillin Susceptibility to Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* During Treatment of Bacteremia. *J Infect Dis.* 2016;213:1041-8.
10. Stegger M, Andersen PS, Kearns A, Pichon B, Holmes MA, Edwards G, Laurent F, Teale C, Skov R, Larsen AR. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecA<sub>LGA251</sub>*. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 4:395-400.
11. Pichon B, Hill R, Laurent F, Larsen AR, Skov RL, Holmes M, Edwards GF, Teale C, Kearns AM. Development of a real-time quadruplex PCR assay for simultaneous detection of *nuc*, Panton-Valentine leucocidin (PVL), *mecA* and homologue *mecA<sub>LGA251</sub>*. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67:2338-41.

## 8. *Staphylococcus aureus* necitlivý k vankomycinu

Význam detekce mechanismu rezistence	
Potřeba pro kategorizaci <b>klinické</b> antimikrobní citlivosti	Ano
<b>Pro účely</b> kontroly infekcí	Ano
<b>Pro účely</b> veřejné zdraví	Ano

### 8.1 Definice

Klinický breakpoint EUCAST pro rezistenci k vankomycinu je MIC >2 mg/l. Nedávné snížení breakpointů vankomycinu vedlo k odstranění dříve používané intermediární kategorie. Existují však významné rozdíly mezi mechanismem rezistence u *S. aureus* s rezistencí k **vankomycinu** ve vysokém stupni zprostředkovanou VanA (**VRSA** - vankomycin resistant *S. aureus*) a izoláty non-VanA s nízkým stupněm rezistence. Proto izoláty s **nízkým** stupněm rezistence nezprostředkované VanA (non-VanA) jsou označeny jako VISA pro **vankomycin** intermediární *S. aureus* a jako **hVISA** pro heterorezistentní vankomycin intermediární *S. aureus*. Při léčbě vankomycinem u pacientů se závažnou infekcí způsobenou *S. aureus* by měla být vždy vyšetřena MIC. Ve vybraných případech, např. při podezření na selhání léčby, se doporučuje vyšetřit hVISA. Test na průkaz hVISA je komplikovaný, a proto se antibiotická surveillance zaměřuje na detekci **VISA** a **VRSA**.

**VRSA: Vankomycin** rezistentní *S. aureus*:

Izoláty *S. aureus* s vysokým stupněm rezistence k vankomycinu (MIC >8 mg/l).

**VISA: Vankomycin** intermediární *S. aureus*

Izoláty *S. aureus* s nízkým stupněm rezistence k vankomycinu (MIC 4 - 8 mg/l).

**hVISA: Heterogeneous vankomycin** intermediární *S. aureus*.

Izoláty *S. aureus* citlivé k vankomycinu (MIC ≤2mg/l), ale jak bylo zjištěno populační analýzou, menšinovou populaci (1 na 10<sup>6</sup> buněk) inhibuje MIC vankomycinu >2 mg/l.

Je nutno zdůraznit, že přes rozdílná označení jsou všechny výše uvedené kategorie klinicky rezistentní.

### 8.2 Klinický a/nebo epidemiologický význam

O prevalenci izolátů se sníženou citlivostí ke glykopeptidům nejsou v Evropě žádné recentní informace. Ze zpráv jednotlivých institucí lze odhadnout, že mezi MRSA v Evropě je prevalence **hVISA** ≤2 % a **VISA** je méně než 0,1 % (1). Výskyt **VRSA** v Evropě doposud nebyl hlášen a v současnosti je extrémně vzácný i jinde ve světě (2). Lokální prevalence hVISA může být podstatně vyšší (1) v důsledku šíření specifických klonálních linií (2). **Téměř všechny izoláty** se zvýšenou MIC (**VISA**) nebo obsahující rezistentní subpopulaci (hVISA) jsou současně MRSA.

Je obtížné posoudit klinický význam **hVISA**, neboť nebyly provedeny žádné dobře kontrolované prospektivní studie. Předpokládá se však, že přítomnost fenotypu hVISA provází horší průběh, přinejmenším u závažných infekcí (2,3). Je proto prozíravé vyšetřovat přítomnost **hVISA** u infekcí krevního řečiště nereagujících na léčbu. V poslední době přibývá důkazů, že izoláty s MIC v horní části citlivého rozmezí (MIC >1 mg/l) jsou spojovány s horším průběhem a zvýšenou mortalitou,

alespoň u infekcí krevního řečiště (3-8). Možná příčina tohoto pozorování není objasněna, může se jednat i o poddávkování vankomycinu (9,10). Navíc interpretace výsledků MIC v těchto studiích může být ovlivněna různými použitými metodami (8, 9).

Detekce hVISA je složitá a spočívá v populační analýze (11), která je pracná, vyžaduje speciální vybavení a potřebuje vysokou úroveň technických znalostí. Metoda pro detekci hVISA je uvedena, ale pro účely surveillance se hlášení omezuje na VISA a VRSA, shodně definované MIC >2mg/l.

### 8.3 Mechanismus rezistence

Rezistence VRSA je řízena genem *vanA*, exogenně získaným od enterokoků. U izolátů VISA i hVISA je původ rezistence endogenní (tzn. chromozomální mutace) a na velmi složitém mechanismu se podílí více genů. Fenotyp VISA/hVISA je spojen s hyperprodukcí cílových míst glykopeptidů a se zesílením buněčné stěny. Fenotyp hVISA je v laboratoři nestabilní, *in vivo* však má schopnost vyvinout se ve VISA (2).

### 8.4 Doporučené metody pro detekci *S. aureus* necitlivého k vankomycinu

Diskovou difuzi NELZE použít pro detekci hVISA nebo VISA, a možnost použití pro VRSA připouští jen několik studií (12).

#### 8.4.1 Stanovení MIC

Zlatým standardem je bujónová mikrodiluční metoda doporučená EUCAST (ISO 20776-1). Je nutno poznamenat, že MIC stanovená gradientní proužkovou metodou může být o 0,5-1 stupeň dvojnásobné diluce vyšší, než jsou výsledky získané bujónovou mikrodilucí (8,9). Breakpoint EUCAST pro rezistenci *S. aureus* je MIC vankomycinu >2 mg/l. Izoláty s ověřenou MIC vankomycinu >2 mg/l (podle bujónové mikrodiluce) by měly být vyšetřeny v referenční laboratoři. Stanovením MIC nelze hVISA detekovat.

#### 8.4.2 Testy pro detekci VRSA, VISA a hVISA

Detekovat hVISA je obtížné, a proto je detekce rozdělena na screening a confirmaci. Pro screening byly vyvinuty četné speciální metody. Confirmace spočívá v analýze populačního profilu izolátu na agarových plotnách, obsahujících řadu koncentrací vankomycinu (PAP-AUC) (11). Bez rozsáhlých zkušeností je tato metoda technicky náročná, a proto ji většinou provádí referenční laboratoře. Metoda založená na kaseinovém screeningovém agaru s vankomycinem (13) má sice vysokou senzitivitu a specificitu, byla však ověřena jen v jediné studii, a proto zde není zahrnuta. Všechny dále uvedené metody jsou schopny detekovat VRSA a VISA a byly hodnoceny v multicentrických studiích (14,15).

#### A. Makrogradientní test:

Tento test indikuje sníženou citlivost k vankomycinu, nejedná se však o stanovení MIC. Navíc tento test nerozlišuje mezi hVISA, VISA a VRSA. Test se provádí podle návodu výrobce. Je třeba poznamenat, že inokulum je vyšší (2,0 McFarland) než u standardních gradientních testů a test se provádí na agaru BHI (Brain Heart Infusion), nikoli na Mueller Hinton agaru. Výsledek je definitivně odečten po 48 hodinách. Pozitivní výsledek indikuje odečet  $\geq 8$ mg/l pro vankomycin i teikoplanin, NEBO  $\geq 12$ mg/l pro samotný teikoplanin.

Protože obě kritéria zahrnují teikoplanin, závisí testování vankomycinu na výsledku testu s teikoplaninem. Algoritmus je následující:

- Odečet teikoplaninu  $\geq 12$  mg/l: VRSA, VISA nebo hVISA

- Odečet teikoplaninu 8 mg/l: Testuje se vankomycin. Pokud je odečet vankomycinu  $\geq 8$  mg/l, jedná se o VRSA, VISA nebo hVISA
- Odečet teikoplaninu  $< 8$  mg/l: Nejedná se o VRSA, VISA nebo hVISA

#### B. Gradientní test k detekci glykopeptidové rezistence (GRD):

Test se provádí podle návodů výrobce. Výsledek je pozitivní pokud je výsledek GRD  $\geq 8$  mg/l pro vankomycin nebo teikoplanin.

#### C. Screeningový agar s teikoplaninem:

Používá se Mueller-Hinton agar s obsahem 5 mg/l teikoplaninu (14). Inokulum v zákalu 2,0 dle standardu McFarlanda se připraví rozetřením několika kolonií v 0,9 % fyziologickém roztoku. Na povrch agaru se aplikuje 10  $\mu$ l inokula a plotna se inkubuje při 35° C na vzduchu po 24 a 48 h. Růst více než dvou kolonií po 48 h indikuje sníženou citlivost ke glykopeptidům.

#### D. Testy na confirmaci hVISA/VISA:

Jakýkoli izolát se sníženou citlivostí podle výsledku screeningu a neidentifikovaný jako VRSA nebo VISA vyšetřením MIC může být hVISA a měl být podroben vyšetření profilu pod křivkou pomocí populační analýzy (PAP-AUC) (9), obvykle v příslušné referenční laboratoři.

### 8.4.3 Kontrolní kmeny

Níže je uvedeno několik možných kontrolních kmenů pro fenotypové a genotypové metody. U těchto kmenů nejsou k dispozici limitní rozmezí pro kontrolu kvality. Uživatelé komerčních metod by měli používat kontrolní kmeny uvedené v příbalové informaci.

Tabulka 1. Příklady kontrolních kmenů pro testování rezistence *S. aureus* k vankomycinu.

Kmen	Mechanismus
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	citlivý ke glykopeptidům
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	hVISA (Mu3)
<i>S. aureus</i> ATCC 700699	VISA (Mu50)

## 8.5 Literatura

1. Melo-Cristino J, Resina C, Manuel V, Lito L, Ramirez M. First case of infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. Lancet. 2013;382(9888):205
2. Howden BP, Davies JK, Johnson PDR, Stinear TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection and clinical implications. Clin Microbiol Rev 2010;1: 99-139
3. Van Hal SJ, Lodise TP, Paterson DL. The clinical significance of vancomycin minimum inhibitory concentration in *Staphylococcus aureus* infections: a systematic review and meta-analysis. Clinical Infectious Diseases 2012; 54: 755-771.
4. Chang HJ, Hsu PC, Yang CC, Siu LK, Kuo AJ, et al. Influence of teicoplanin MICs on treatment outcomes among patients with teicoplanin-treated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a hospital based retrospective study. J. Antimicrob Chemother 2012, 67:736-41.
5. Honda H, Doern CD, Michael-Dunne W Jr, Warren DK. The impact of vancomycin susceptibility on treatment outcomes among patients with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. BMC Infect Dis. 2011; 5:11:335.
6. Lodise TP, Graves J, Evans A, Graffunder E, Helmecke M, et al. Relationship between vancomycin MIC and failure among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia treated with vancomycin. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 3315-20



7. Rojas L, Bunsow E, Munoz P, Cercenado E, Rodrigueuz-Creixems, Bouza E. Vancomycin MICs do not predict the outcome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections in correctly treated patients. *J. Antimicrob Chemother* 2012; 7: 1760-8.
8. Sader HS, Jones RN, Rossi KL, Rybak MJ. Occurrence of vancomycin tolerant and heterogeneous vancomycin resistant strains (hVISA) among *Staphylococcus aureus* causing bloodstream infections in nine USA hospitals. *Antimicrob Chemother*. 2009; 64: 1024-8.
9. Holmes NE, Turnidge JD, Munckhof WJ, Robinson JO, Korman TM, O'Sullivan MV, Anderson TL, Roberts SA, Warren SJ, Gao W, Howden BP, Johnson PD. Vancomycin AUC/MIC ratio and 30-day mortality in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Apr;57(4):1654-63.
10. Holmes NE, Turnidge JD, Munckhof WJ, Robinson JO, Korman TM, O'Sullivan MV, Anderson TL, Roberts SA, Warren SJ, Gao W, Johnson PD, Howden BP. Vancomycin minimum inhibitory concentration, host comorbidities and mortality in *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Clin Microbiol Infect*. 2013 Dec;19(12):1163-8.
11. Wootton M, Howe RA, Hillman R, Walsh TR, Bennett PM, MacGowan AP. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. *J Antimicrob Chemother*. 2001; 47: 399-403
12. Tenover FC, Weigel LM, Appelbaum PC, McDougal LK, Chaitram J, McAllister S, Clark N, Killgore G, O'Hara CM, Jevitt L, Patel JB, Bozdogan B. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48:275-80
13. Satola SW, Farley MM, Anderson KF, Patel JB. Comparison of Detection Methods for Heteroresistant Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*, with the Population Analysis Profile Method as the Reference Method. *J Clin Microbiol*. 2011; 49: 177–183.
14. Wootton M, MacGowan AP, Walsh TR, Howe RA. A multicenter study evaluating the current strategies for isolating *Staphylococcus aureus* strains with reduced susceptibility to glycopeptides. *J Clin Microbiol*. 2007;45:329- 32.
15. Voss A, Mouton JW, van Elzaker EP, Hendrix RG, Goessens W, et al. A multi-center blinded study on the efficiency of phenotypic screening methods to detect glycopeptide intermediately susceptible *Staphylococcus aureus* (GISA) and heterogeneous GISA (hGISA). *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2007;6:9.

## 9. *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* rezistentní k vankomycinu

Význam detekce mechanismu rezistence	
Potřeba pro kategorizaci klinické antimikrobní citlivosti	Ano
Pro účely kontroly infekcí	Ano
Pro účely veřejné zdraví	Ano

### 9.1 Definice

*Enterococcus faecium* nebo *Enterococcus faecalis* rezistentní k vankomycinu (VRE) (MIC vankomycinu >4 mg/l).

### 9.2 Klinický a/nebo epidemiologický význam

Enterokoky, zvláště *E. faecium*, jsou obecně rezistentní k většině klinicky dostupných antimikrobních léčiv. Léčba infekcí způsobených enterokoky rezistentními k vankomycinu (VRE, vancomycin resistant enterococci) je proto obtížná, s malým počtem léčebných alternativ. Je známo, že v nemocničním prostředí se VRE mohou úspěšně šířit, přetrvávat a kolonizovat mnoho osob, z nichž pouze u některých se mohou vyvinout enterokokové infekce (1,2). Fenotyp izolátů nesoucích VanB je obvykle citlivý k teikoplaninu. Selekcí rezistence k teikoplaninu během léčby u enterokoků nesoucích VanB popisují dvě kasuistiky (3,4), a nedávno byly posány čtyři případy terapeutického selhání (5) indikující, že teikoplanin by měl být používán u enterokoků VanB s opatrností.

Typické hodnoty MIC pro klinicky nejvýznamnější enzymy Van jsou v tabulce 1.

Tabulka 1. Typické MIC glykopeptidů u enterokoků s expresí VanA nebo VanB.

Glykopeptid	MIC (mg/l)	
	VanA	VanB
vankomycin	64-1024	4-1024
teikoplanin	8-512	0,06-1

### 9.3 Mechanismus rezistence

Klinicky významná rezistence je nejčastěji zprostředkována ligázami VanA a VanB, kódovanými na plazmidu, které v peptidoglykanu nahradí koncový D-Ala za D-Lac. Tato substituce snižuje vazbu glykopeptidu na cílové místo. Kmeny VanA vykazují rezistenci k vankomycinu i k teikoplaninu, zatímco kmeny VanB obvykle zůstávají k teikoplaninu citlivé, neboť nejsou schopny indukovat operon pro rezistenci. Mezi další enzymy s nízkou prevalencí patří VanD, VanE, VanG, VanL, VanM a VanN (6-9), ačkoli podle nedávného pozorování se zvyšuje frekvence výskytu *vanM* v Číně (10).

Další druhy enterokoků (např. *E. raffinosus*, *E. gallinarum* a *E. casseliflavus*), mohou obsahovat výše uvedené enzymy kódované geny *vanA*, *vanB* nebo jinými geny, takové kmeny jsou však poměrně vzácné. Všechny izoláty *E. gallinarum* a *E. casseliflavus* obsahují chromozomálně kódované enzymy VanC. Enzymy VanC zprostředkovávají rezistenci k vankomycinu v nízkém stupni (MIC 4-16 mg/l), z hlediska kontroly infekcí by však neměly být pokládány za významné (11).

Enteroky variabilní k vankomycinu je termín používaný pro VRE, u nichž exprese *van* genů není

fenotypově vyjádřená v důsledku genetického přeuspořádání, které může být revertováno selekčním tlakem glykopeptidů (12,13). Kromě toho se používá termín low-MIC pro izoláty *vanB*, které vzhledem ke špatné schopnosti být indukovány vankomycinem mají nízkou expresi genů *vanB* a MIC mají nižší než klinický breakpoint vankomycinu. U low-MIC VRE se po delší expozici vankomycinu může zvýšit MIC vankomycinu nad limitní koncentraci (14). Kmeny VRE i low-MIC VRE lze často detekovat pouze molekulární analýzou. Jejich současné rozšíření v různých zeměpisných oblastech není známo.

## 9.4 Doporučené metody pro detekci glykopeptidové rezistence u *E. faecium* a *E. faecalis*

Rezistenci k vankomycinu lze detekovat stanovením MIC, diskovou difuzí a agarovou breakpointovou metodou. K odhalení indukované rezistence je nezbytné u všech tří metod inkubovat plotny po plných 24 h.

Všemi třemi metodami lze snadno detekovat rezistenci zprostředkovanou geny *vanA*. Náročnější je detekce rezistence zprostředkované *vanB*. Stanovení MIC agarovou nebo bujónovou dilucí není vždy úspěšné pro detekci VanB (15-17). Podle starších zpráv je problematické detekovat rezistenci zprostředkovanou *vanB* automatickými metodami (18). Od té doby byly automatické metody aktualizovány, stále však chybí novější studie o zlepšení detekce rezistence zprostředkované *vanB*. Použití disku s 5 µg vankomycinu může poskytnout dobré výsledky jen při pečlivém dodržení návodu pro odečítání, který uvádí EUCAST (19).

Při interpretaci výsledků MIC nebo diskové difuze je nutno mít jistotu, že izolát není *E. gallinarum* nebo *E. casseliflavus*, který může být podle pozitivní arabinózy zaměněn za *E. faecium*. V tomto kontextu je pro identifikaci enterokoků velmi užitečná metoda MALDI-TOF (20). Není-li MALDI-TOF k dispozici, lze k odlišení *E. gallinarum*/*E. casseliflavus* od *E. faecium* použít testy MGP (metyl-alfa-D-glucopyranosid) (*E. faecium* je nepohyblivý a test MGP je negativní).

### 9.4.1 Stanovení MIC

MIC lze stanovit agarovou dilucí, bujónovou mikrometodou nebo gradientními metodami. Bujónová mikrodiluce se provádí podle standardu ISO 20776-1, jak doporučuje EUCAST.

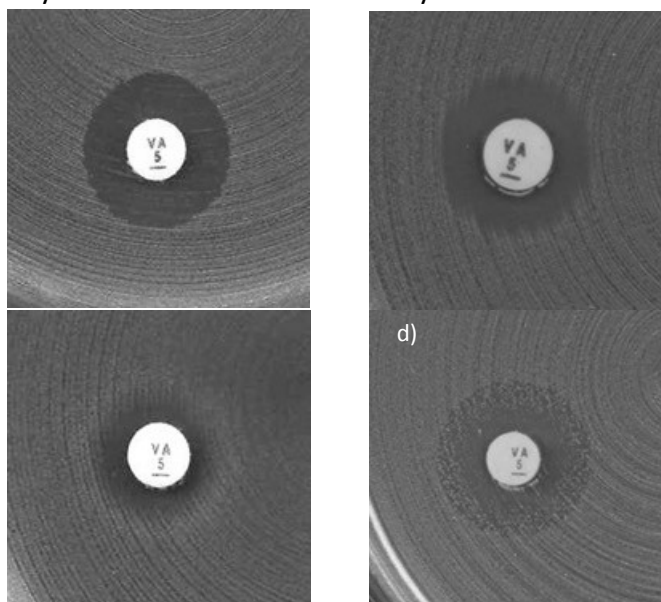
### 9.4.2 Disková difuze

Disková difuzní metoda musí být pečlivě provedena podle postupu EUCAST. Zóny se prohlíží v procházejícím světle a pátrá se po roztřepených okrajích zón a/nebo mikrokoloniích uvnitř zón. Ostré okraje zón ukazují na citlivý izolát, a pokud má izolát ostrou zónu s příslušným průměrem, může být hlášen jako citlivý k vankomycinu.

Izoláty s neostrými okraji nebo koloniemi uvnitř zóny (obrázek 1) mohou být bez ohledu na průměr zóny rezistentní a nemohou být hlášeny jako citlivé bez confirmace stanovením MIC.

V nedávné multicentrické studii se disková difuze pro detekci enterokoků produkujících *vanB* osvědčila lépe než VITEK2, zvláště v laboratořích se zkušenostmi s roztřepenými okraji zón (19). Disková difuze se provádí podle metody EUCAST pro nenáročné bakterie. Pro detekci indukované rezistence je nutno plotny inkubovat po 24 h.

Obrázek 1. Odečítání diskových difuzních testů s vankomycinem u *Enterococcus* spp.



a) Ostré okraje zóny a průměr zóny  $\geq 12$  mm. Hlásí se jako citlivý.

b-d) Neostré okraje zón a/nebo kolonie uvnitř zóny. Hlásí se jako rezistentní bez ohledu na průměr zóny.

#### 9.4.3 Agarová breakpointová metoda

K detekci izolátů pozitivních na *vanA* a *vanB* jsou vhodné agarové breakpointové testy na Brain Heart Infusion (BHI) agaru s 6 mg/l vankomycinu (19). Breakpointové plotny lze získat od komerčních výrobců nebo připravit v laboratoři. Na plotnu s BHI agarem a 6 mg/l vankomycinu se aplikuje 10  $\mu$ l inokula v koncentraci  $1 \times 10^5$  -  $1 \times 10^6$  cfu (zákal 0,5 dle McFarlanda). Inkubace po 24 h při  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  na vzduchu umožní detekovat rezistenci i u izolátů s indukovanou rezistencí. Růst více než jedné kolonie se hodnotí jako pozitivní výsledek testu.

#### 9.4.4 Genotypové metody

Detekce rezistence k vankomycinu pomocí PCR cílené na *vanA* a *vanB* lze provést metodami připravenými v laboratoři nebo získanými od komerčních výrobců (20-22).

#### 9.4.5 Kontrola kvality

Níže je uvedeno několik možných kontrolních kmenů pro fenotypové a genotypové metody. U těchto kmenů nejsou k dispozici limitní rozmezí pro kontrolu kvality. Uživatelé komerčních metod by měli používat kontrolní kmeny uvedené v příbalové informaci.

Tabulka 2. Vhodné kmeny pro kontrolu kvality vyšetření citlivosti ke glykopeptidům.

Kmen	Mechanismus
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	citlivý k vankomycinu
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	rezistentní k vankomycinu ( <i>vanB</i> )
<i>E. faecium</i> NCTC 12202	rezistentní k vankomycinu ( <i>vanA</i> )

## 9.5 Literatura

- Mazuski JE. Vancomycin-resistant enterococcus: risk factors, surveillance, infections, and treatment. *Surg Infect.* 2008;9:567-71.
- Tenover FC, McDonald LC. Vancomycin-resistant staphylococci and enterococci: epidemiology and control. *Curr Opin Infect Dis.* 2005;18:300-5.

3. Hayden MK, Trenholme GM, Schultz JE, Sahm DF. In vivo development of teicoplanin resistance in a VanB *Enterococcus faecium* isolate. *J Infect Dis.* 1993;167:1224-7.
4. Kawalec M, Gniadkowski M, Kedzierska J, Skotnicki A, Fielt J, Hryniewicz W. Selection of a teicoplanin-resistant *Enterococcus faecium* mutant during an outbreak caused by vancomycin-resistant enterococci with the *vanB* phenotype. *J Clin Microbiol.* 2001;39:4274-82.
5. Holmes NE, Ballard SA, Lam MM, Johnson PD, Grayson ML, Stinear TP, Howden BP. Genomic analysis of teicoplanin resistance emerging during treatment of vanB vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infections in solid organ transplant recipients including donor-derived cases, *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(9):2134-9.
6. Depardieu F, Perichon B, Courvalin P. Detection of the *van* alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2004;42:5857-60.
7. Boyd DA, Willey BM, Fawcett D, Gillani N, Mulvey MR. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, *vanL*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:2667-72.
8. Xu X, Lin D, Yan G, Ye X, Wu S, Guo Y, Zhu D, Hu F, Zhang Y, Wang F, Jacoby GA, Wang M. *vanM*, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:4643-7.
9. Lebreton F, Depardieu F, Bourdon N, et al. D- Ala-d-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(10):4606-12.
10. Chen C, Sun J, Guo Y, Lin D, Guo Q, et al. High Prevalence of *vanM* in Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolates from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(12):7795-8.
11. Ramotar K, Woods W, Larocque L, Toye B. Comparison of phenotypic methods to identify enterococci intrinsically resistant to vancomycin (VanCVRE). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2000;36:119-24.
12. Sivertsen A, Pedersen T, Larssen KW, Bergh K, Rønning TG, et al. A Silenced *vanA* Gene Cluster on a Transferable Plasmid Caused an Outbreak of Vancomycin-Variable Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(7):4119-27.
13. Thaker MN, Kalan L, Waglechner N, Eshaghi A, Patel SN, et al. Vancomycin-variable enterococci can give rise to constitutive resistance during antibiotic therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(3):1405-10.
14. Grabsch EA, Chua K, Xie S, Byrne J, Ballard SA, Ward PB, Grayson ML. Improved Detection of *vanB2*-Containing *Enterococcus faecium* with Vancomycin Susceptibility by Etest Using Oxgall Supplementation. *J. Clin. Microbiol* 2008; 46; 1961-4
15. Swenson JM, Clark NC, Sahm DF, Ferraro MJ, Doern G, Hindler J, Jorgensen JH, Pfaller MA, Reller LB, Weinstein MP, et al. Molecular characterization and multilaboratory evaluation of *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 for quality control of screening tests for vancomycin and high-level aminoglycoside resistance in enterococci. *J Clin Microbiol.* 1995;33:3019-21.
16. Klare I, Fleige C, Geringer U, Witte W, Werner G. Performance of three chromogenic VRE screening agars, two Etest® vancomycin protocols, and different microdilution methods in detecting *vanB* genotype *Enterococcus faecium* with varying vancomycin MICs. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;74:171-6.
17. Wijesuriya TM, Perry P, Pryce T, Boehm J, Kay I, Flexman J, Coombs GW, Ingram PR. Low vancomycin MICs and fecal densities reduce the sensitivity of screening methods for vancomycin resistance in Enterococci. *J Clin Microbiol.* 2014 Aug;52(8):2829-33
18. Endtz HP, Van Den Braak N, Van Belkum A, Goessens WH, Kreft D, Stroebel AB, Verbrugh HA. Comparison of eight methods to detect vancomycin resistance in enterococci. *J Clin Microbiol.* 1998;36:592-4.
19. Hegstad K, Giske CG, Haldorsen B, Matuschek E, Schønning K, et al. Performance of the EUCAST disk diffusion method, the CLSI agar screen method, and the Vitek 2 automated antimicrobial susceptibility testing system for detection of clinical isolates of Enterococci with low- and medium-level VanB-type vancomycin resistance: a multicenter study. *J Clin Microbiol.* 2014;52(5):1582-9
20. Fang H, Ohlsson AK, Ullberg M, Özenci V. Evaluation of species-specific PCR, Bruker MS, VITEK MS and the VITEK2 system for the identification of clinical *Enterococcus* isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012; 31: 3073-7
21. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol.* 1995;33:1434.
22. Dahl KH, Simonsen GS, Olsvik O, Sundsfjord A. Heterogeneity in the *vanB* gene cluster of genomically diverse clinical strains of vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:1105-10.
23. Gazin M, Lammens C, Goossens H, Malhotra-Kumar S; MOSAR WP2 Study Team. Evaluation of GeneOhm VanR and Xpert *vanA/vanB* molecular assays for the rapid detection of vancomycin-resistant enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31:273-6.

## 10. *Streptococcus pneumoniae* necitlivý k penicilinu (non-wild type)

Význam detekce mechanismu rezistence	
Potřeba pro kategorizaci <b>klinické</b> antimikrobní citlivosti	Ano
<b>Pro účely</b> kontroly infekcí	Ne
<b>Pro účely</b> veřejné zdraví	Ano

### 10.1 Definice

Izoláty *S. pneumoniae* se sníženou citlivostí k penicilinu (MIC >0,06 mg/l, tzn. vyšší než u divokého typu), způsobenou přítomností modifikovaných PBP (penicillin-binding proteins) s nízkou afinitou k  $\beta$ -laktamům

### 10.2 Klinický a/nebo epidemiologický význam

*S. pneumoniae* je celosvětově nejčastější příčinou pneumonie. Nemocnost a úmrtnost je vysoká a podle odhadu každoročně umírají asi tři miliony lidí na infekce způsobené pneumokoky. U meningitidy léčené benzylpenicilinem může být snížení citlivosti pneumokoka k penicilinu spojeno se zvýšením mortality (1). U ostatních typů infekcí způsobených pneumokoky se sníženou citlivostí k penicilinu není pozorováno zvýšení mortality, jsou-li podávány vyšší dávky penicilinu. Mnoho zemí zavedlo očkovací programy proti několika pneumokokovým sérotypům, a to také mohlo ovlivnit stupeň rezistence invazivních izolátů (2). *S. pneumoniae* necitlivý k penicilinu zůstává hlavním klinickým problémem z hlediska veřejného zdraví, i když se tento mikrob ve zdravotnických zařízeních nešíří, na rozdíl od mnoha jiných patogenů popsaných v tomto dokumentu.

### 10.3 Mechanismus rezistence

*S. pneumoniae* obsahuje šest PBP, z nichž PBP 2x je primárním cílem účinku penicilinu (3). Přítomnost "mozaikových genů" kódujících PBP s nízkou afinitou je výsledkem horizontálního přenosu genů z komenzálních viridujících streptokoků (3). Úroveň rezistence k  $\beta$ -laktamům závisí nejen na přítomnosti mozaikových PBP s nízkou afinitou v izolátu, ale i na změně konkrétních PBP, které jsou pro *S. pneumoniae* nezbytné (4). Kmeny s MIC benzylpenicilinu v rozmezí 0,125 až 2 mg/l jsou u infekcí jiných než meningitida považovány za citlivé při použití vyšších dávek penicilinu, zatímco u meningitidy musí být takové kmeny vždy označeny jako rezistentní (5).

### 10.4 Doporučené metody pro detekci necitlivosti *S. pneumoniae* k penicilinu

Necitlivost k penicilinu lze detekovat fenotypově, vyšetřením MIC nebo diskovou difúzní metodou.

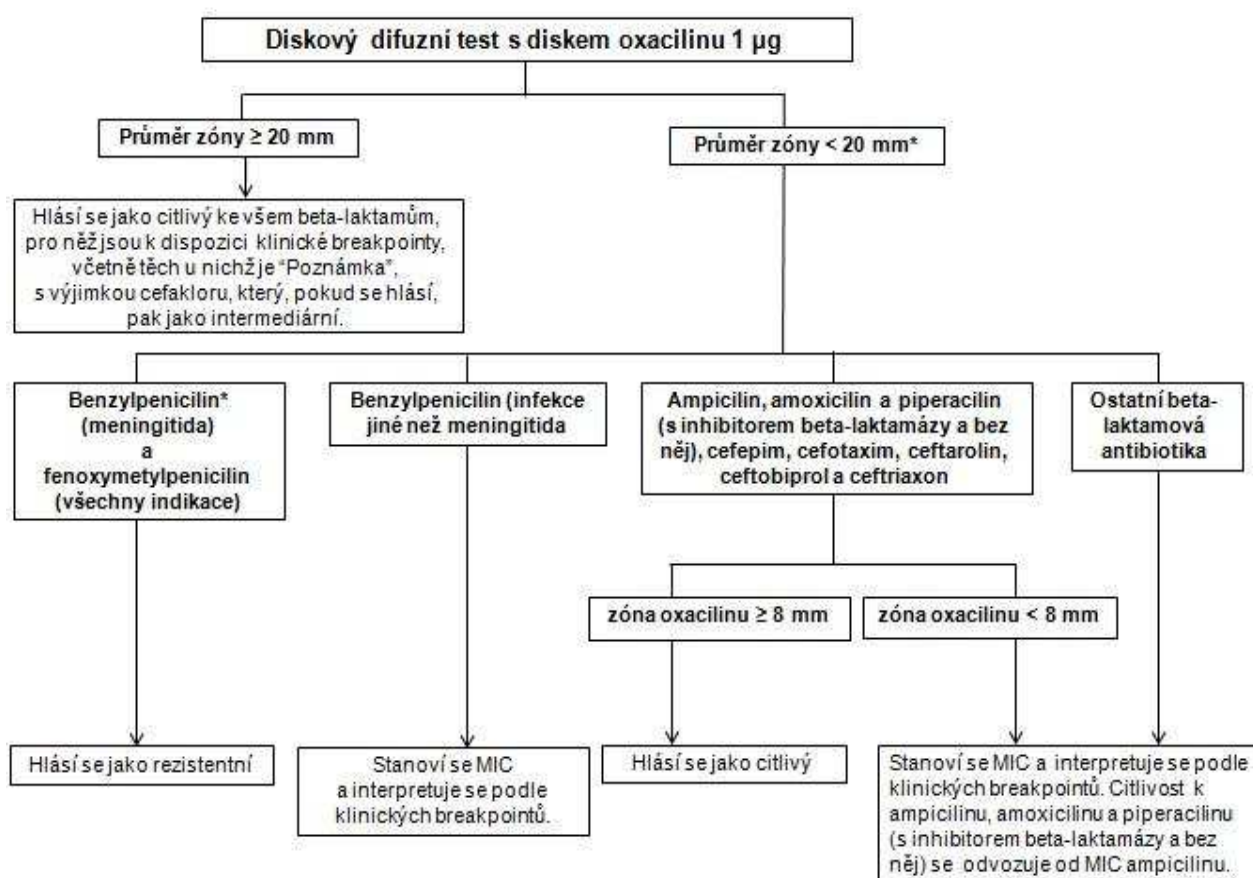
#### 11.4.1 Disková difúzní metoda

Disková difúzní metoda s 1  $\mu$ g diskem oxacilinu je efektivní screening pro detekci pneumokoků necitlivých k penicilinu (6-8). Tato metoda je velmi citlivá, ale není příliš specifická, neboť kmeny, které vytvářejí zóny o průměru  $\leq 19$  mm, mohou mít různou citlivost k benzylpenicilinu a MIC benzylpenicilinu by měla být vyšetřena u všech kmenů non-wild typu zjištěných screeningem (8).

Citlivost k jiným  $\beta$ -laktamům než k benzylpenicilinu lze odvodit podle průměru zóny kolem oxacilinu, viz Obrázek 1.



Obrázek 1. Screening rezistence k  $\beta$ -laktamům u *S. pneumoniae*



\*Oxacillin 1 µg <20 mm: Vždy se vyšetří MIC penicilinu, ale neodkládá se hlášení jiných  $\beta$ -laktamů uvedených výše a neotáčí se s hlášením výsledku vyšetření benzylnicilinu u meningitidy.

#### 10.4.2 Klinické breakpointy

Původně byly breakpointy penicilinu koncipovány tak, aby byl zajištěn úspěch léčby meningitidy. Nicméně klinické studie ukázaly, že výsledky léčby pneumokokové pneumonie, vyvolané většinou kmenů se zvýšenou MIC penicilinu a léčených parenterálním penicilinem, se neliší od výsledků léčby u pacientů léčených jinými antimikrobními léčivy. Po přezkoumání mikrobiologických, farmakokinetických a farmakodynamických údajů byly revidovány klinické breakpointy benzylnicilinu pro izoláty z jiných infekcí než z meningitid (4) a aktuální breakpointy EUCAST jsou v tabulce 1.

Tabulka 1. Interpretace citlivosti k benzylpenicilinu u meningitidy a infekcí jiných než meningitida.

Indications	MIC/breakpoint (mg/L)		Poznámka
	C ≤	R >	
Benzylpenicillin (non-meningitis)	0,06	2	<p><b>U pneumonie lze považovat izoláty s MIC ≤ 0,5 mg/l za citlivé k benzylpenicilinu při aplikaci 1,2 g 4 krát denně.</b></p> <p><b>U pneumonie lze považovat izoláty s MIC ≤ 1 mg/l za citlivé k benzylpenicilinu při aplikaci 2,4 g 4 krát denně, nebo 1,2 g 6 krát denně.</b></p> <p><b>U pneumonie lze považovat izoláty s MIC ≤ 2 mg/l za citlivé k benzylpenicilinu při aplikaci 2,4 g 6 krát denně.</b></p>
Benzylpenicillin (meningitis)	0,06	0,06	

### 10.4.3 Kontrola kvality

Níže je uveden vhodný kontrolní kmen strain pro vyšetření fenotypu.

Tabulka 2. Příklad kontrolního kmene pro vyšetření benzylpenicilinu.

Kmen	Mechanismus
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	mozaikové PBP, MIC benzylpenicilinu 0,5 mg/l

## 10.5 Literatura

- Kaplan SL, Mason EO Jr. Management of infections due to antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Clin Microbiol Rev. 1998;11(4):628-44.
- Dagan R. Impact of pneumococcal conjugate vaccine on infections caused by antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Clin Microbiol Infect. 2009;15 (Suppl 3):16-20.
- Hakenbeck R, Kaminski K, König A, van der Linden M, Paik J, Reichmann P, Zähler D. Penicillin-binding proteins in beta-lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Microb Drug Resist 1999; 5: 91-99.
- Grebe T, Hakenbeck R. Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of  $\beta$ -lactam antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 829-834.
- Weinstein MP, Klugman KP, Jones RN. Rationale for revised penicillin susceptibility breakpoints versus *Streptococcus pneumoniae*: Coping with antimicrobial susceptibility in an era of resistance. Clin Infect Dis 2009; 48: 1596 – 1600.
- Dixon JMS, Lipinski AE, Graham MEP. Detection and prevalence of pneumococci with increased resistance to penicillin. Can Med Assoc J 1977; 117: 1159-61.
- Swenson JM, Hill BC, Thornsberry C. Screening pneumococci for penicillin resistance. J Clin Microbiol 1986; 24: 749-52.
- Jetté LP and C Sinave. Use of an oxacillin disk screening test for detection of penicillin- and ceftriaxone-resistant pneumococci. J Clin Microbiol 1999; 37: 1178-81.