

# Testování citlivosti/rezistence k antimikrobikům *in vitro*

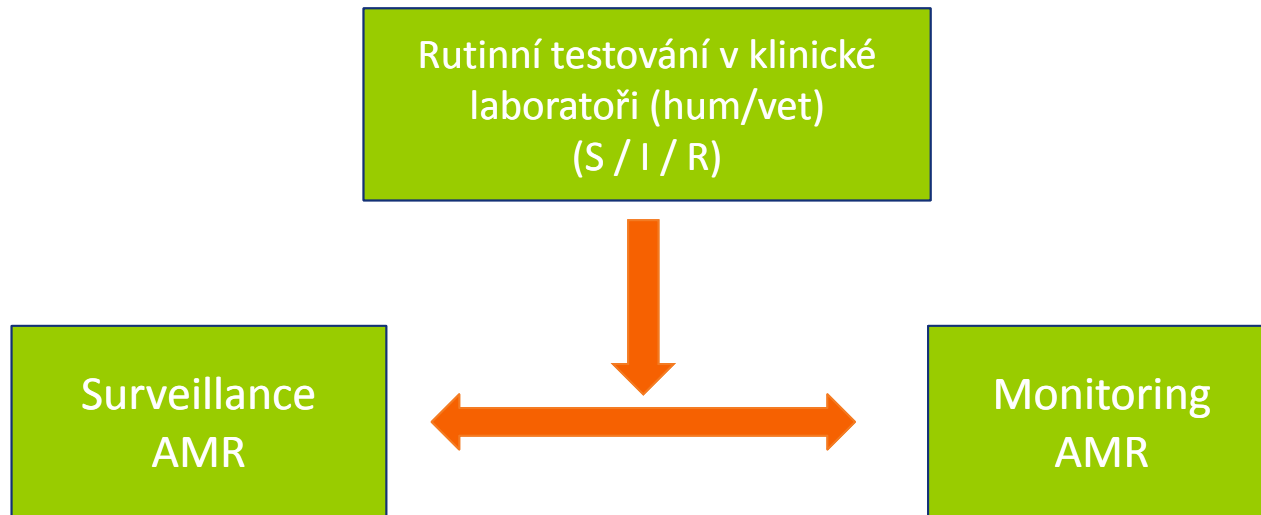
## Rozvahy a vysvětlení k hraničním hodnotám

- epidemiologickým (ECOFF)
- klinickým (CBP)

Lucie Pokludová, III/2023,

*pro účely přednášky MU čerpáno z citovaných zdrojů:  
EUCAST, CLSI, SZÚ a publikací viz citace*

# Záleží i na účelu testování



## Rutinní testy:

primární požadavek získat, co nejrychleji výsledky podporující správné podání ATM, nebo poskytující informaci, která další ATM lze použít při selhání léčby, využívají CBP

## Surveillance:

Testování, zaznamenávání a analýza dat získaných z *in vitro* testů citlivosti/rezistence. Analýzy a komentáře výsledků, na jejichž základě lze vydat doporučení/nařízení pro opatření. Mohou využívat ECOFF i CBP (záleží na přesném účelu a interpretaci)

## Monitoring:

Testování, zaznamenávání, shromažďování dat, reportování dat. Z vytvořených přehledů je patrná situace v daném čase a regionu. Mohou sloužit jako informace pro empirickou terapii (v případě, že obsahují adekvátně popsána data relevantní pro daný účel a jsou geograficky (lokality) a časově (aktuálnost) odpovídající. Často využívají CBP.

# S jakými daty/kategoriemi pracujeme:

## Rutinní testování:

- Naprostá většina výsledků *in vitro* v současnosti je reportována jako C/I/R,
- výsledky většinou pocházejí z testování **diskovou difúzní metodou (DDM)**, kde je měřen průměr zóny inhibice
- *Výsledek C/I/R je kvalitativní*
- **Život ohrožující infekce: požadavek na MIC !**

# S jakými daty/kategoriemi pracujeme:

## Surveillance/monitoring:

- V současnosti nejčastěji využívání stanovení **MIC** (Minimální Inhibiční Koncentrace)
- Výsledky nejčastěji pocházejí ze stanovení **diluční mikrometodou** (mikrodestičky 8 x 12 jamek)
- Výsledek C/I/R je odvozen od odečtu poslední **čiré jamky** (=inhibice růstu mikroorganismu) v rámci po sobě jdoucích dvojnásobných ředění a znamená tedy konkrétní koncentraci = číslo (MIC)
- Výsledek této metody je *kvantitativní* a měl by takto být i zaznamenán, spolu s interpretací (C/I/R)

# Nové kategorie C/I/R (EUCAST 2019)

- **C – Citlivý, standardní dávkovací režim**: Mikroorganismus je definován jako citlivý při standardním dávkovacím režimu, je-li úroveň aktivity antimikrobního přípravku podávaného ve standardním dávkování spojená s vysokou pravděpodobností léčebného úspěchu.
- **I – Citlivý, zvýšená\* expozice\*\***: Mikroorganismus je definován jako citlivý při zvýšené expozici\*\*, je-li úroveň aktivity antimikrobního přípravku spojená s vysokou pravděpodobností léčebného úspěchu pouze při zvýšené expozici přípravku úpravou dávkovacího režimu nebo při koncentrování tohoto přípravku v místě infekce.
- **R – Rezistentní**: Mikroorganismus je definován jako rezistentní, je-li úroveň aktivity antimikrobního přípravku spojená s vysokou pravděpodobností selhání léčby i při zvýšené expozici\*\*.

\* v originále „Susceptible, Increased exposure“ zachovává zkratku „I“ pro tuto kategorii;

\*\* expozice mikroorganismu v místě infekce závisí na způsobu podávání, dávce, dávkovacím intervalu a době infúze antimikrobního přípravku, a rovněž na farmakokinetických parametrech antimikrobika jako distribuce – metabolismus – exkrece (vyloučení).

Video, které vysvětluje **ATU (Area of Technical Uncertainty)** a související otázky ad „I“ kategorie:

<https://www.youtube.com/watch?v=GXIpwj5f11k&t=1s>

# Area of Technical Uncertainty

- ATU is not a fourth susceptibility category – it is to warn laboratory staff about an area where interpretation is difficult.
- The ATU is not to compensate for poor methodological skills – on the contrary, AST today require more skills than ever before.
- ATU is defined by a single MIC-value or a short range of zone diameter values.
- The ATU is handled in different ways depending on the urgency and the situation (the sample, the agent, the infecting organism).

Gunnar Kahlmeter, EUCAST 2019

## Some important ATUs

- Enterobacterales amoxicillinclavulanic acid (systemic)  
piperacillintazobactam  
ciprofloxacin
- Pseudomonas piperacillintazobactam  
ceftazidimavibactam
- S.aureus ceftaroline, ceftobiprole
- S. epidermidis ceftoxitin-screen test
- Haemophilus influenzae with PBP3-mutationer (betalactams)

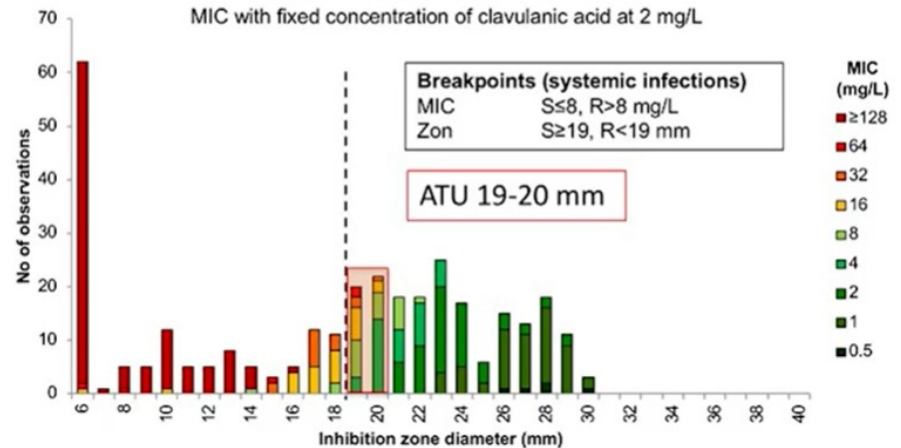
## ATU – proposed alternative actions?

- Repeat the test – only if there is reason to believe the test failed technically.
- Confirm using an alternative test (MIC, PCR, PBP-agglutination...)
- Report the result but add a comment stating the uncertainty (uncertain interpretation)
- Down-size the interpretation: S to I, I to R
- Discuss the result with the clinical colleague.

## Amoxicillin-clavulanic acid vs. Enterobacterales with breakpoints for systemic infections

### Amoxicillin-clavulanic acid 20-10 µg vs MIC Enterobacterales, 325 isolates

MIC with fixed concentration of clavulanic acid at 2 mg/L



Gunnar Kahlmeter, EUCAST 2019

# Grafické srovnání staré a nové definice C/I/R

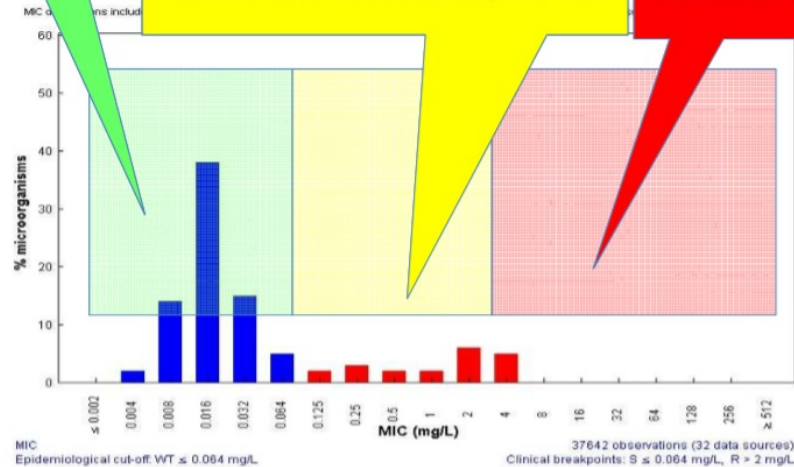
## CIR – staré definice

Citlivý

Intermediární

Nejistý účinek.  
Ochranná zóna pro technické odchylky.  
Pro vysoké dávky.  
Při koncentrování z farmakokinetických důvodů.

Rezistentní

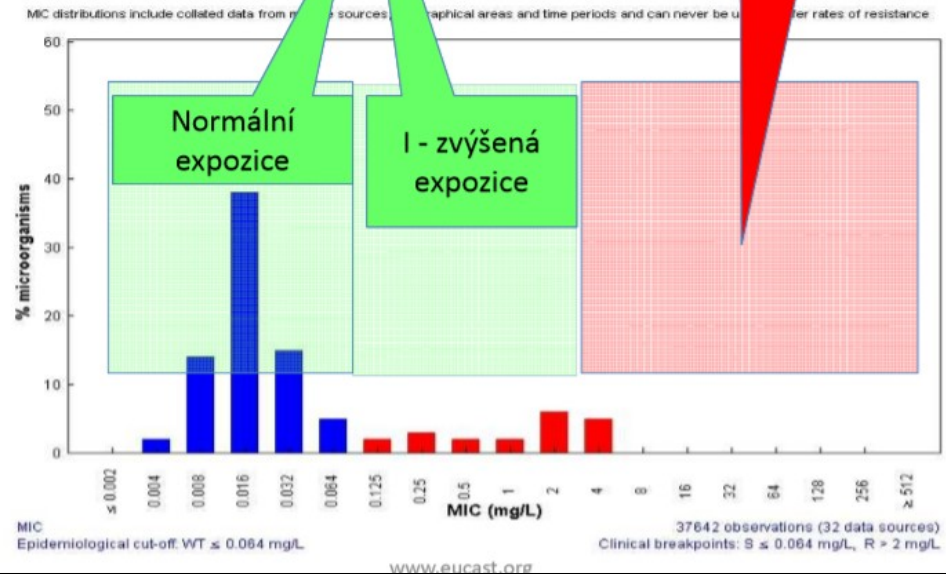


## CIR – nové definice 2019

Citlivý

Rezistentní

Benzylpenicilin / Streptococcus pneumoniae  
EUCAST MIC Distribution - Reference Database



Podrobné vysvětlení zde:

[http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NR/Ls/atb/EUCAST/Nove\\_C\\_I\\_R/Redefinice\\_CIR.pdf](http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NR/Ls/atb/EUCAST/Nove_C_I_R/Redefinice_CIR.pdf)

Originál plné EN znění prezentace na webu  
EUCAST

... : upraveno několik breakpointů, aby odpovídaly novým definicím C, I a R

Bakterie	Antibiotikum	Breakpoint 2018 mg/l	Breakpoint 2019 mg/l
<i>Pseudomonas</i>	Aztreonam	1 / 16	16 / 16
<i>Enterococcus</i>	Trimetoprim	WT I-kategorie	Poznámka+ECOFF
<i>Enterococcus</i>	Trimetoprim- sulfametoxazol	WT I-kategorie	WT I-kategorie
<i>N. meningitidis</i>	Chloramfenikol	2 / 4	2 / 2
<i>H. influenzae</i>	Cefpodoxime	0,25 / 0,5	0,25 / 0,25
<i>Proteus, Morganella Providencia</i>	Imipenem	2 / 4	0,125 / 4
<i>Acinetobacter</i>	Ciprofloxacin	1 / 1	0,06 / 1



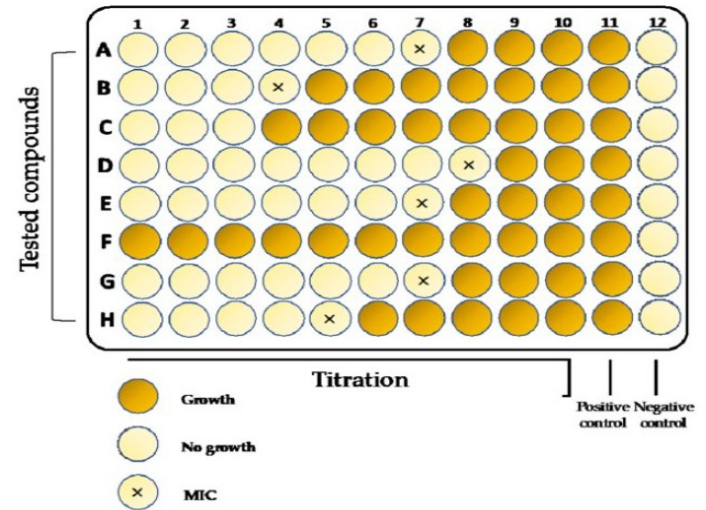
INTERNATIONAL  
STANDARD

ISO  
20776-1

First edition  
2006-11-15

Clinical laboratory testing and *in vitro* diagnostic test systems — Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices —

Part 1:  
Reference method for testing the *in vitro* activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases



- Mikrobiologická data (PD) data založená na hodnotách **MIC**

- PK/PD analýzy využívají přímo hodnoty **MIC**

*(tyto analýzy lze využít např. k simulaci účinnosti antibiotika:*

*PK = farmakokinetická data, např. výše hladiny (koncentrace C) dosažené ve tkáni, kde je infekce za*

*určitý čas ( $C_{max}$  plasma,  $C_{max}$  plicní alveoly ... dosažené za  $T_{max}$ )*

- Korelace klinické odezvy s hodnotami **MIC**

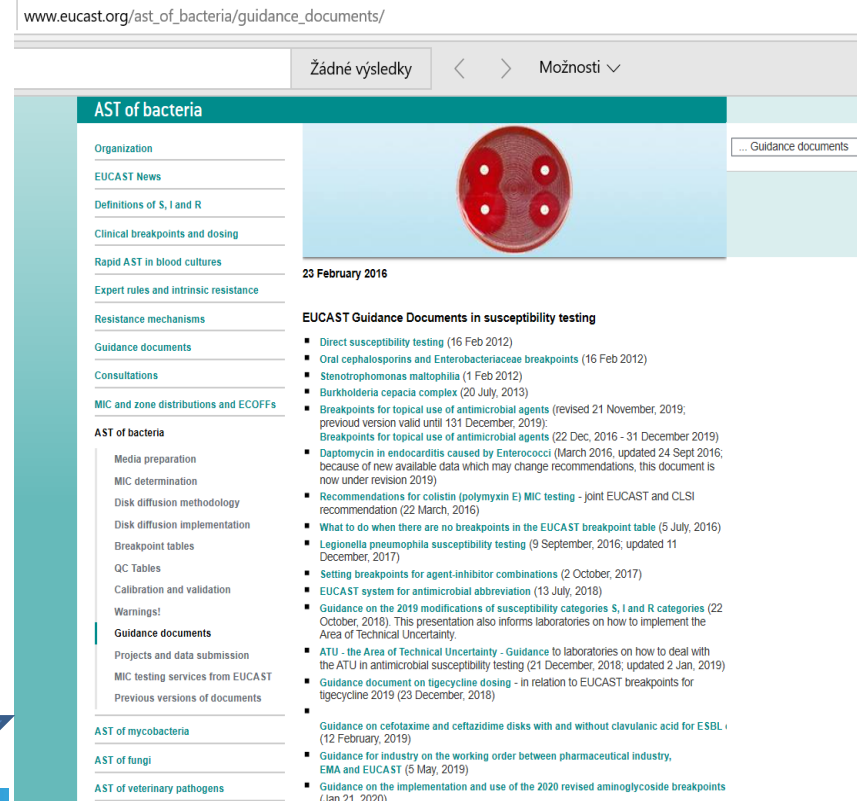
# Jak tedy vypadají klíče a příručky pro interpretaci dat :

## EUCAST

(prozatím pouze humánní; →  
viz podrobně další snímek č. 7)

## CLSI

(veterinární/humánní ; ↘  
viz další snímek č. 8 a 9 - vet)



www.eucast.org/ast\_of\_bacteria/guidance\_documents/

Žádné výsledky < > Možnosti ▾

### AST of bacteria

Organization

EUCAST News

Definitions of S, I and R

Clinical breakpoints and dosing

Rapid AST in blood cultures

Expert rules and intrinsic resistance

Resistance mechanisms

Guidance documents

Consultations

MIC and zone distributions and ECOFFs

AST of bacteria

- Media preparation
- MIC determination
- Disk diffusion methodology
- Disk diffusion implementation
- Breakpoint tables
- QC Tables
- Calibration and validation
- Warnings!
- Guidance documents
  - Projects and data submission
  - MIC testing services from EUCAST
  - Previous versions of documents

AST of mycobacteria

AST of fungi

AST of veterinary pathogens

23 February 2016

#### EUCAST Guidance Documents in susceptibility testing

- Direct susceptibility testing (16 Feb 2012)
- Oral cephalosporins and Enterobacteriaceae breakpoints (16 Feb 2012)
- Stenotrophomonas maltophilia (1 Feb 2012)
- Burkholderia cepacia complex (20 July, 2013)
- Breakpoints for topical use of antimicrobial agents (revised 21 November, 2019; previous version valid until 131 December, 2019); Breakpoints for topical use of antimicrobial agents (22 Dec, 2016 - 31 December 2019)
- Daptomycin in endocarditis caused by Enterococci (March 2016, updated 24 Sept 2016 because of new available data which may change recommendations, this document is now under revision 2019)
- Recommendations for colistin (polymyxin E) MIC testing - joint EUCAST and CLSI recommendation (22 March, 2016)
- What to do when there are no breakpoints in the EUCAST breakpoint table (5 July, 2016)
- Legionella pneumophila susceptibility testing (9 September, 2016; updated 11 December, 2017)
- Setting breakpoints for agent-inhibitor combinations (2 October, 2017)
- EUCAST system for antimicrobial abbreviation (13 July, 2018)
- Guidance on the 2019 modifications of susceptibility categories S, I and R categories (22 October, 2018). This presentation also informs laboratories on how to implement the Area of Technical Uncertainty.
- ATU - the Area of Technical Uncertainty - Guidance to laboratories on how to deal with the ATU in antimicrobial susceptibility testing (21 December, 2018; updated 2 Jan, 2019)
- Guidance document on tigecycline dosing - in relation to EUCAST breakpoints for tigecycline 2019 (23 December, 2018)
- Guidance on ceftaxime and ceftazidime disks with and without clavulanic acid for ESBL (12 February, 2019)
- Guidance for industry on the working order between pharmaceutical industry, EMA and EUCAST (5 May, 2019)
- Guidance on the implementation and use of the 2020 revised aminoglycoside breakpoints (Jan 21, 2020)



# Guidance on reading EUCAST Breakpoint Tables

EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 13.0, valid from 2023-01-01

**MIC determination (broth microdilution according to ISO standard 20776-1)**  
 Medium:  
 Inoculum:  
 Incubation:  
 Reading:  
 Quality control:

EUCAST methodology and quality control for MIC determination

**Disk diffusion (EUCAST standardised disk diffusion method)**  
 Medium:  
 Inoculum:  
 Incubation:  
 Reading:  
 Quality control:

EUCAST methodology and quality control for disk diffusion

An arbitrary "off scale" breakpoint which categorises wild-type organisms as "Susceptible, increased exposure (I)".

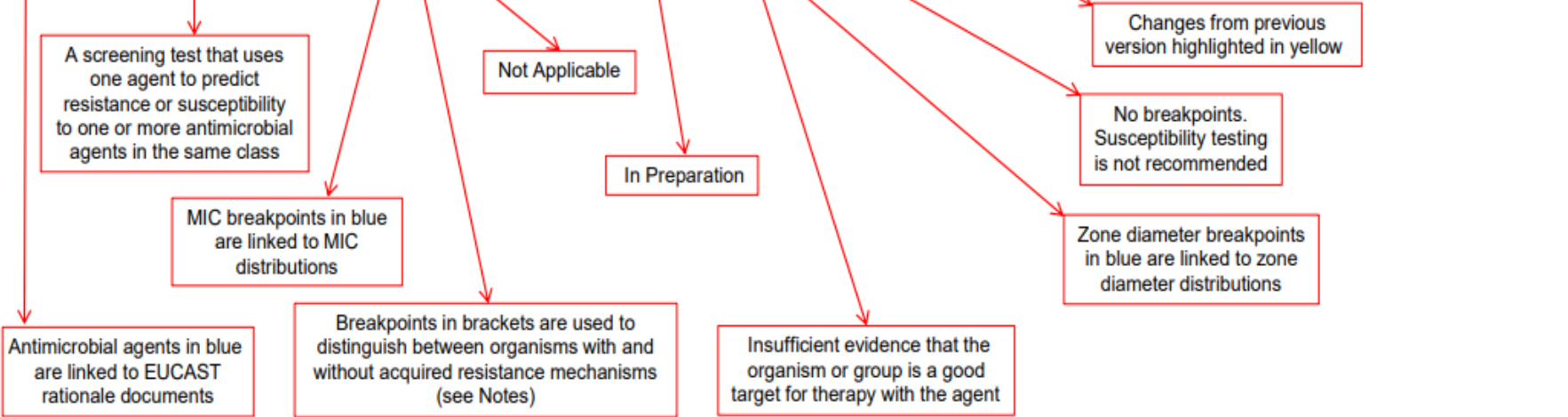
Breakpoints with a species name apply only to that particular species (in this example *S. aureus*)

The I category is not listed but is interpreted as the values between the S and the R breakpoints. If the S and R breakpoints are the same value there is no I category.

Agent A: No I category  
 Agent B: I category: 4 mg/L, 23-25 mm  
 Agent H: I category: 1-2 mg/L, 24-29 mm

**Area of Technical Uncertainty**  
 See specific information on how to handle technical uncertainty in antimicrobial susceptibility testing.

Antimicrobial agent	MIC breakpoint (mg/L)			Disk content (µg)	Zone diameter breakpoint (mm)			Notes
	S ≤	R >	ATU		S ≥	R <	ATU	
Antimicrobial agent A	1 <sup>1</sup>	1 <sup>1</sup>		X	20 <sup>A</sup>	20 <sup>A</sup>		Numbered notes relate to general comments and/or MIC breakpoints. Lettered notes relate to the disk diffusion method. 1. Notes that are general comments and/or relating to MIC breakpoints. 2. New comment Removed comment A. Comment on disk diffusion
Antimicrobial agent B	2 <sup>2</sup>	4		Y	26	23		
Antimicrobial agent C	0.001	8		X	50	18		
Antimicrobial agent D, <i>S. aureus</i>	IE	IE			IE	IE		
Antimicrobial agent E	-	-			-	-		
Antimicrobial agent F	IP	IP			IP	IP		
Antimicrobial agent G (screen only)	NA	NA		Y	25	25		
Antimicrobial agent H	0.5	2		Z	30	24		
Antimicrobial agent I	(8) <sup>1</sup>	(8) <sup>1</sup>		30	(18) <sup>A</sup>	(18) <sup>A</sup>		



# CLSI – vet ukázka: Tab 1 vet specifická kritéria pro příslušné druhy ATM a cílové druhy zvířat

Some drugs listed in Table 1 may not be approved in all countries and some animal-drug combinations may be considered prohibited or illegal uses in certain jurisdictions. The laboratory client is obligated to consult regulatory agencies in the reporting country to determine if these agents can be legally administered to the species listed for these uses (see NOTE 5).

Group A — Veterinary-Specific Breakpoints Primary Test and Report	Swine	Cattle <sup>a</sup>	Bovine Mastitis <sup>b</sup>	Poultry <sup>c</sup>	Horses	Dogs and Cats
	Ceftiofur <sup>d</sup>	Spectinomycin	Ceftiofur <sup>d</sup>	Enrofloxacin <sup>d</sup>	Amikacin Gentamicin <sup>m</sup>	Amikacin (dogs only) Gentamicin (dogs only) <sup>m</sup>
		Ceftiofur <sup>d</sup>				
	Tildipirosin Tilmicosin Tulathromycin	Gamithromycin Tildipirosin Tilmicosin Tulathromycin	Pirlimycin	Enrofloxacin <sup>d</sup>	Amikacin Gentamicin <sup>m</sup>	Amikacin (dogs only) Gentamicin (dogs only) <sup>m</sup>
		Ampicillin <sup>f</sup>	Penicillin-novobiocin			
		Ampicillin <sup>f,m</sup>	Penicillin G <sup>m</sup>			
	Penicillin G <sup>m</sup>	Florfenicol	Enrofloxacin <sup>d</sup>	Enrofloxacin <sup>d</sup>	Amikacin <sup>f,m</sup> Penicillin G <sup>m</sup>	Amoxicillin-clavulanate (dogs only) <b>Piperacillin-tazobactam (dogs only)</b>
	Florfenicol	Danofloxacin <sup>d</sup> Enrofloxacin <sup>d</sup>				Cefovecin Cefpodoxime (dogs only) <b>Cephalexin (dogs only)<sup>m</sup></b> Cephalothin (dogs only) <sup>m</sup> Cefazolin (dogs only) <sup>m</sup> Clindamycin (dogs only)
	Tiamulin	Enrofloxacin <sup>d</sup>				Cefovecin Cefpodoxime (dogs only) <b>Cephalexin (dogs only)<sup>m</sup></b> Cephalothin (dogs only) <sup>m</sup> Cefazolin (dogs only) <sup>m</sup> Clindamycin (dogs only)
	Enrofloxacin <sup>d</sup>	Danofloxacin <sup>d</sup> Enrofloxacin <sup>d</sup>	Enrofloxacin <sup>d</sup>	Enrofloxacin <sup>d</sup>	Amikacin <sup>f,m</sup> Penicillin G <sup>m</sup>	<b>Ampicillin (cats only)<sup>f</sup></b> Ampicillin (dogs only) <sup>f,m</sup> Difloxacin (dogs only)
Tetracycline <sup>i</sup>	Tetracycline <sup>i</sup>	<b>Enrofloxacin<sup>m</sup></b> Enrofloxacin Marbofloxacin Orbifloxacin Pradofloxacin				
				<b>Doxycycline<sup>m</sup></b> <b>Minocycline<sup>m</sup></b>	Doxycycline (dogs only) <b>Minocycline (dogs only)</b> Tetracycline (dogs only) <sup>i</sup>	

# CLSI: příklad tabulky s CBP- vet

Table 2A  
Enterobacteriaceae

Table 2A. Enterobacteriaceae (Continued)

Test/ Report Group	Body Site	Antimicrobial Agent	Organism	Disk Content	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm			Interpretive Categories and MIC Breakpoints, µg/mL			Comments
					S	I	R	S	I	R	
<b>β-Lactam Combination Agents</b>											
<b>Dogs</b>											
A	Skin, soft tissue	Amoxicillin-clavulanate	<i>E. coli</i>	–	–	–	–	≤0.25/0.12	0.5/0.25	≥1/0.5	(19) Amoxicillin-clavulanate breakpoints were determined from an examination of MIC distribution data, efficacy data, and PK-PD analysis of amoxicillin in dogs. The dosage regimen used for PK-PD analysis of amoxicillin was 11 mg/kg administered every 12 hours orally.  (20) With the exception of isolates from UTIs, <i>E. coli</i> and other <i>Enterobacteriaceae</i> should be reported as resistant to ampicillin, amoxicillin, and amoxicillin-clavulanate because the drug concentrations achieved according to the labeled dosing regimen are not high enough to reach the therapeutic target. For uncomplicated UTIs, see comment (21).
A	UTI	Amoxicillin-clavulanate		–	≥18	–	–	≤8/4	–	–	(21) This breakpoint was derived from published literature in which orally administered ampicillin 25.6 mg/kg and amoxicillin 11 mg/kg were administered to healthy dogs at 8-hour intervals for 5 consecutive doses and produced urine concentrations in dogs > 300 µg/mL.
A	Skin, soft tissue, UTI	Piperacillin-tazobactam	<i>Enterobacteriaceae</i>	–	–	–	–	≤8/4	16/4	≥32/4	See comment (20). (22) Piperacillin-tazobactam breakpoints were derived from published PK studies in dogs, an examination of MIC distribution data, and PK-PD analysis of piperacillin in dogs at a dosage of 350

24

© Clinical and Laboratory Standards Institute. All rights reserved.

VE108, 4th ed.

For Use With

# Co znamená ECOFF

**ECOFF:** nejvyšší MIC mikroorganismu postrádající fenotypově detekovatelné mechanismy získané rezistence

Definuje horní hranici (koncentraci, která ji vymezuje) tzv. „wild type“ distribuce MIC pro konkrétní species bakterií a konkrétní antimikrobikum

Umožňuje srovnat míru získané rezistence a to zejména:

**pokud se nastavené klinické hraniční koncentrace (= CBP)**

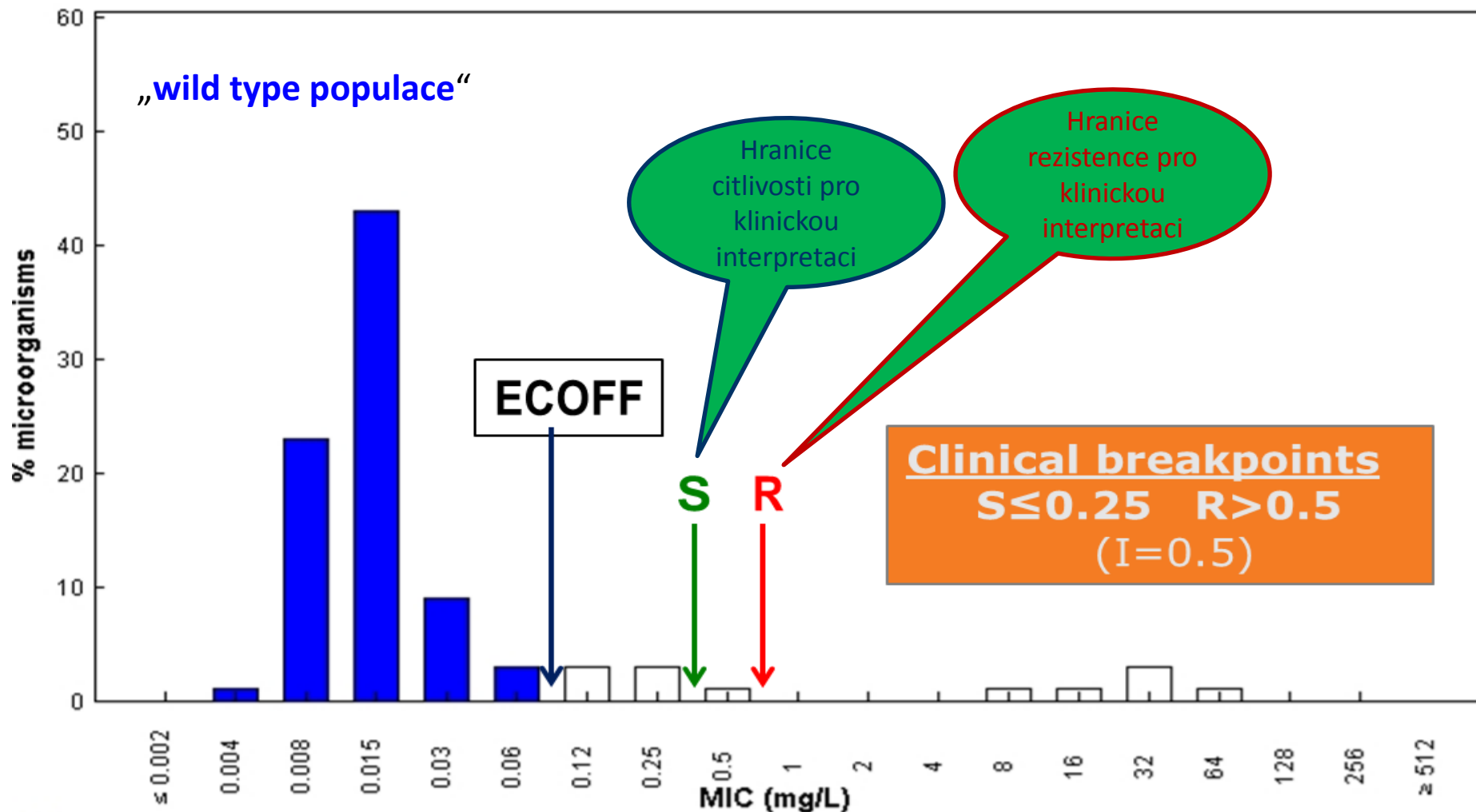
- **liší ...** např. tedy izoláty hum a vet
- **mění v čase**
- **nebyly doposud nastaveny**
- Viz příklad rozložení **MIC pro ciprofloxacin a *E.coli*** a definování **ECOFF a CBP**

**A co znamená TECOFF ? => Tentative ECOFF (prozatímní, pro nové látky)**

## Ciprofloxacin / Escherichia coli

### International MIC Distribution - Reference Database 2018-02-17

MIC distributions include collated data from multiple sources, geographical areas and time periods and can never be used to infer rates of resistance

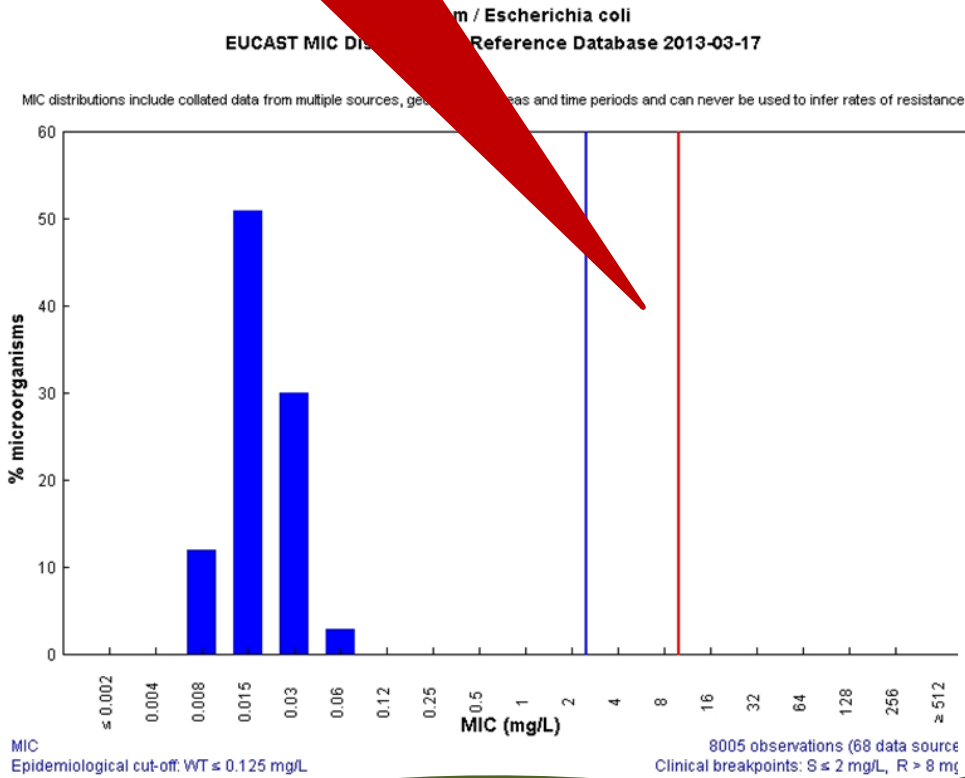


MIC  
 Epidemiological cut-off (ECOFF): 0.064 mg/L  
 Wildtype (WT) organisms: ≤ 0.064 mg/L

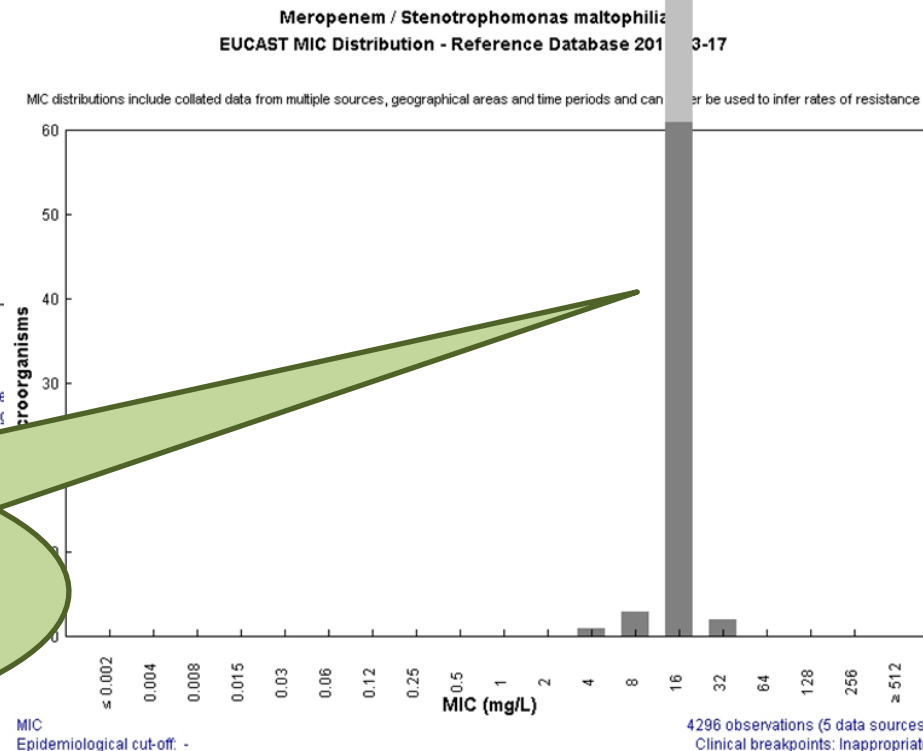
16702 observations (55 data sources)



# EUCAST – získaná (= acquired) vs přirozená (= intrinsic) rezistence



*Stenotrophomonas maltophilia* je přirozeně rezistentní k meropenemu

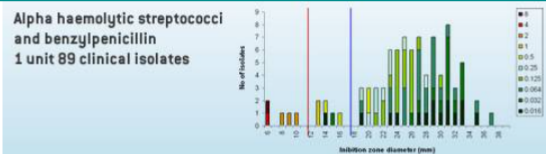


Mikroorganismy jsou uváděny jako „intrinsically resistant“ k dané léčivé látce (nebo skupině LP – zde karabapenemy) pokud naprostá většina „ wild type „ izolátů vykazuje MIC hodnoty, které jsou tak vysoké, že daná látka (zde meropenem) nemůže být považována za použitelnou pro účely léčby a tudíž nelze hovořit o klinické citlivosti (EUCAST, 2020)



## MIC and zone distributions and ECOFFs

- Organization
- Consultations
- EUCAST News
- New definitions of S, I and R
- Clinical breakpoints and dosing
- Rapid AST in blood cultures
- Expert rules and expected phenotypes
- Resistance mechanisms
- Guidance documents
- SOP
- MIC and zone distributions and ECOFFs**
  - New and revised ECOFFs
- AST of bacteria
- AST of mycobacteria
- AST of fungi
- AST of veterinary pathogens
- Frequently Asked Questions (FAQ)
- Meetings
- Publications and documents
- Presentations and statistics



### MIC and zone diameter distributions and ECOFFs

#### 1. Distributions and ECOFFs

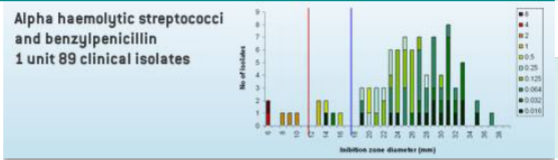
#### 2. MIC and zone diameter correlations

The EUCAST software, originally created in 2003, for displaying distributions of MIC-value (generated with methods calibrated to broth microdilution or agar dilution) and inhibition zone diameters (generated with EUCAST disk diffusion methodology) was re-programmed during 2020 and re-launched on 24 November, 2020. Each graph is shown in two versions where one is constructed by adding all approved distributions and the other by adding weighted distributions. The later is generated through converting numbers to per cent before adding individual distributions. This prevents large distributions from dominating or even "obliterating" smaller distributions and allows all distributions equal weight. During 2021-2022 distributions are curated in accordance with EUCAST SOP10.1 and all values gradually reviewed.

The distributions are based on collated data from a total of more than 30 000 MIC distributions containing more than several million MICs from worldwide sources. The distributions include MICs from national and international studies such as resistance surveillance programs and MIC distributions from published articles, the pharmaceutical industry drug development programmes, veterinary programmes and from individual laboratories. Histograms display wild type organisms, together with EUCAST epidemiological cut-off values (ECOFFs) and tentative ECOFFs (TECOFF).

## MIC and zone distributions and ECOFFs

- Organization
- Consultations
- EUCAST News
- New definitions of S, I and R
- Clinical breakpoints and dosing
- Rapid AST in blood cultures
- Expert rules and expected phenotypes
- Resistance mechanisms
- Guidance documents
- SOP
- MIC and zone distributions and ECOFFs**
  - New and revised ECOFFs**
  - AST of bacteria
  - AST of mycobacteria
  - AST of fungi
  - AST of veterinary pathogens
  - Frequently Asked Questions (FAQ)
  - Meetings
  - Publications and documents
  - Presentations and statistics
  - Videos and online seminars




New and revised ECOFFs

### ECOFF review and revision

ECOFFs are based on available MIC (and zone diameter) distributions. As more data is generated there is a need to

- (1) add new ECOFFs and TECOFFs
- (2) revise existing ECOFFs and TECOFFs
- (3) remove ECOFFs/TECOFFs where data do not match criteria in SOP 10.1

Currently all MIC distributions are reviewed in accordance with criteria in SOP 10.1. Mostly this is by agent, but on occasion, by species. The table below lists reviewed and revised agents and species.

### Ecoff Table

Agents	Species	MIC ECOFF from - to	MIC TECOFF from - to	Zone ECOFF from - to
Fosfomicin	All			

Příklady viz následující snímky

Změny v ECOFF ( v rámci detekce MIC nebo průměru zón)

# Veterinární příklad: tilmikosin

## Antimicrobial wild type distributions of microorganisms

### Search

Method:  MIC  Disk diffusion

Antimicrobial:  Species:  Disk content:

Antimicrobial: **Tilmicosin** (Method: **MIC**)

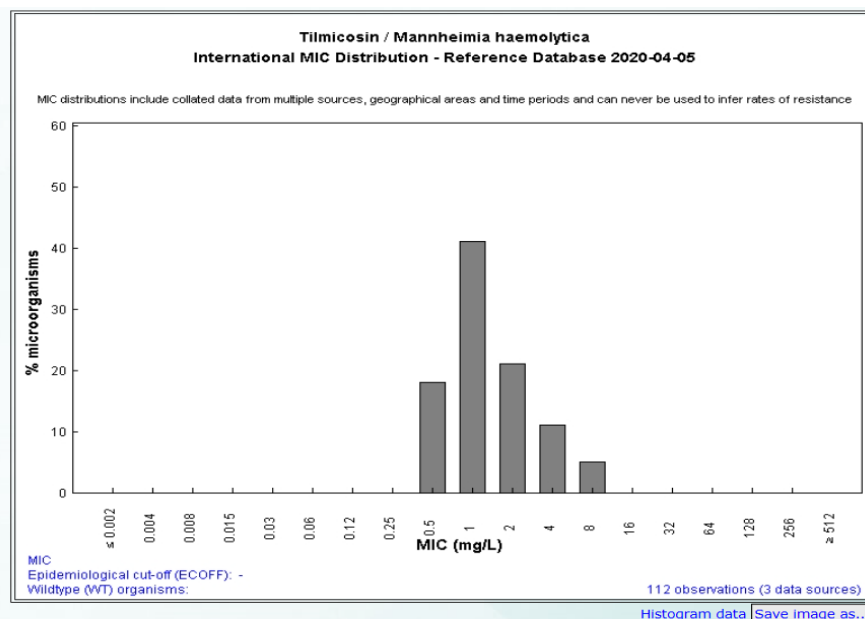
MIC distributions include collated data from multiple sources, geographical areas and time periods and can never be used to infer rates of resistance

	0.002	0.004	0.008	0.016	0.032	0.064	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	ECOFF	Distributions	Observations
<a href="#">Mannheimia haemolytica</a>	0	0	0	0	0	0	0	0	21	46	24	13	6	1	1	0	0	0	0	ND	3	112
<a href="#">Pasteurella multocida</a>	0	0	0	0	0	0	4	22	28	53	135	120	77	25	24	17	15	9	4	ND	6	533

Ma-

Data byla dostupná jen pro dvě species bakterií vyskytující se nejčastěji v indikaci respiračních infekcí; rozkliknutím na webu EUCAST lze získat histogram – př. zde vpravo

2023 - srovnej s dalším snímkem !



## Search database

### Method

MIC  Disk diffusion

### Antimicrobial

Tilmicosin

### Species

Species...

Elements per page 50

## MIC distributions for Tilmicosin, 2023-03-08

### Antimicrobial: Tilmicosin (Method: MIC)

	0.002	0.004	0.008	0.016	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	Distributions	Observations	(T)ECOFF	Confidence interval
<i>Pasteurella multocida</i>	0	0	0	0	0	0	2	3	17	66	156	171	135	51	4	5	3	0	0	13	613	32	16 - 64
<i>Staphylococcus hyicus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	18	34	13	3	2	0	0	5	0	0	0	3	75	(4)	1.000 - 8.000
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	71	50	3	1	4	1	3	176	0	0	0	7	309	2	0.500 - 2.000
<i>Streptococcus suis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	5	40	0	0	15	0	0	0	2	64	-	
<i>Streptococcus uberis</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	16	101	3	0	0	0	14	0	2	136	-	

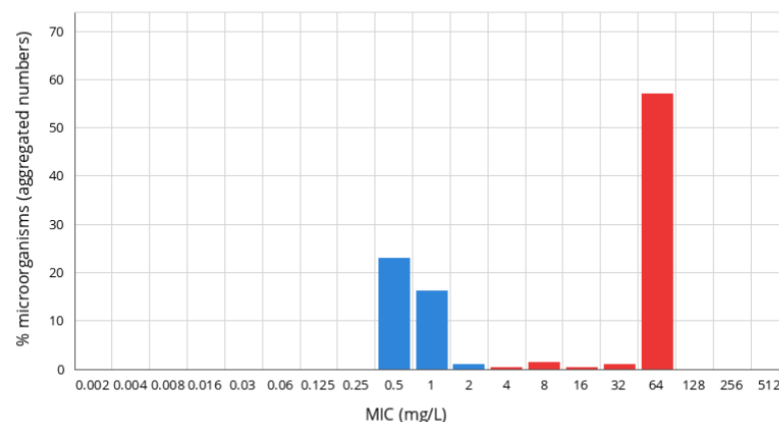
© MIC EUCAST 2023

Data 2023  
dostupná již pro 5  
veterinárně  
významných  
patogenů

Pro *S. pseudintermedius* už  
máme jak ECOFF, tak CBP

### Tilmicosin / *Staphylococcus pseudintermedius* International MIC distribution - Reference database 2023-03-08 Based on aggregated distributions

MIC distributions include collated data from multiple sources, geographical areas and time periods and can never be used to infer rates of resistance



MIC  
Epidemiological cut-off (ECOFF): 2 mg/L  
Wildtype (WT) organisms: ≤ 2 mg/L

Confidence interval: 0.500 - 2.000  
309 observations (7 data sources)

© MIC EUCAST 2023.

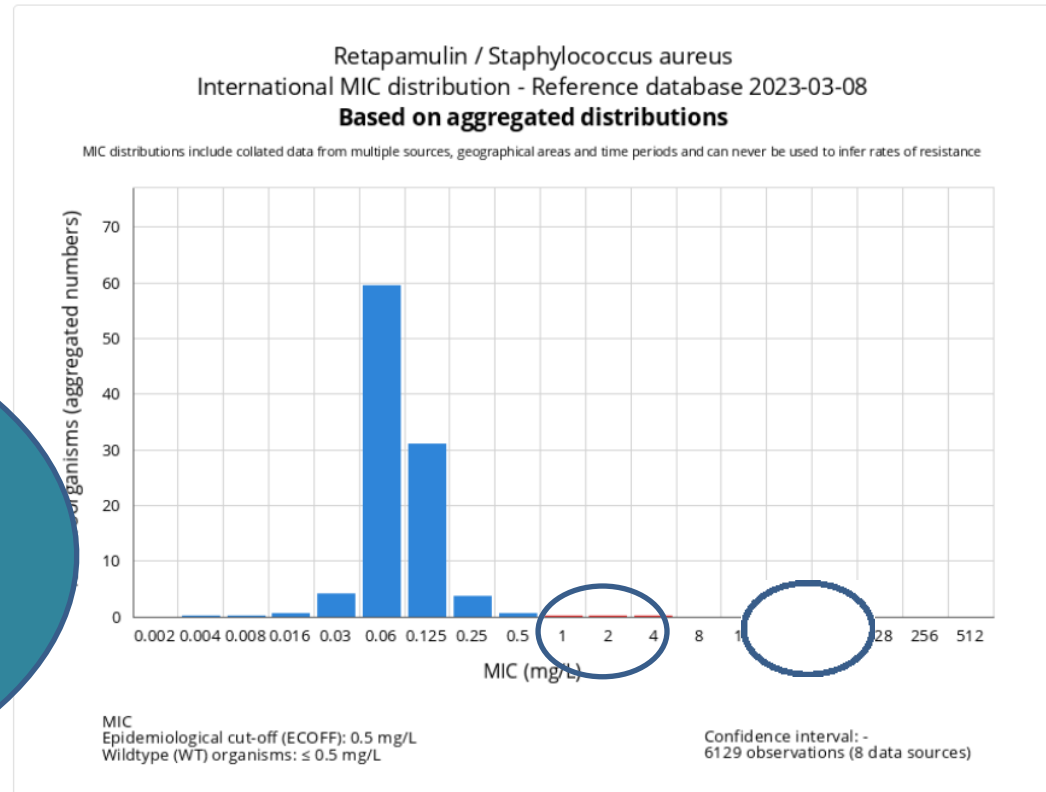
# Humánní příklad: retapamulin

(nové anti MRSA pleuromutilinové antibiotikum)

MIC distributions for Retapamulin, 2023-03-08

Antimicrobial: Retapamulin (Method: MIC)

	0.002	0.004	0.008	0.016	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	Distributions	Observations	(T)ECOFF
Haemophilus influenzae	0	0	0	1	0	0	3	8	33	37	14	2	0	1	0	0	0	0	0	1	99	-
Moraxella catarrhalis	0	0	1	4	61	31	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	101	-
Staphylococcus aureus	0	1	10	34	251	3643	1896	225	35	2	7	6	0	0	2	17	0	0	0	8	6129	0.5
Staphylococcus aureus MRSA	0	0	0	0	10	160	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	200	-
Staphylococcus aureus MSSA	0	0	0	0	5	127	66	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	200	-
Staphylococcus capitis	0	0	0	0	2	11	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	18	-
Staphylococcus dermidis	0	0	1	0	1	10	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	10	-
Staphylococcus epidermidis	0	0	0	0	1	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	10	-
Staphylococcus epidermidis	0	0	0	0	2	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	10	-
Staphylococcus epidermidis	0	0	4	38	146	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	10	-
Staphylococcus epidermidis	0	0	0	1	4	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	10	-
Streptococcus agalactiae	0	0	5	86	807	174	18	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	10	-
Streptococcus group C	0	0	0	4	19	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	10	-
Streptococcus group G	0	0	0	2	18	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	10	-
Streptococcus mitis	0	0	0	1	4	9	6	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	10	-



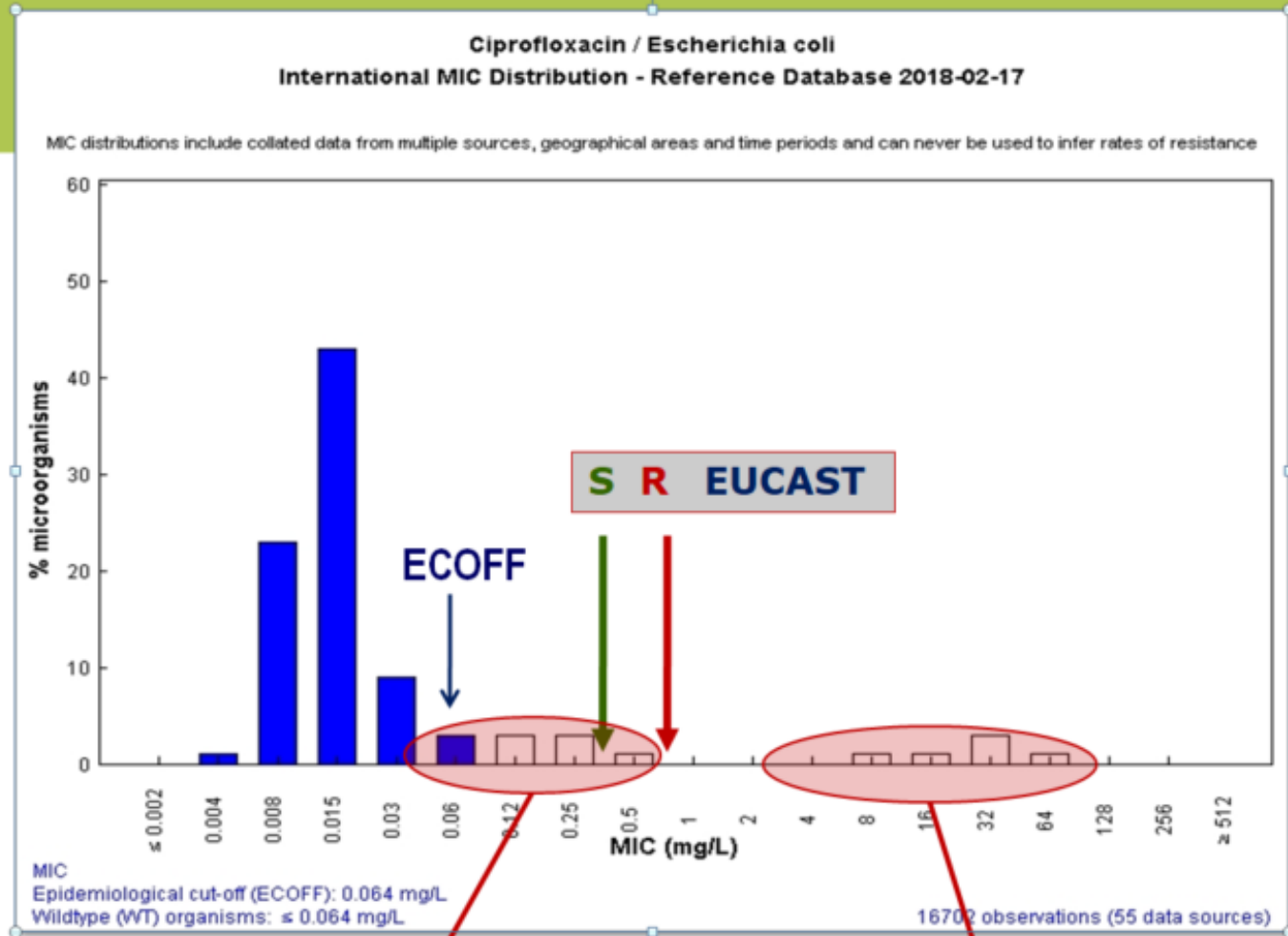
Výsledky v histogramu vpravo  
pro *S. aureus*

Výsledky v tabulce pro  
mikroorganismy s relevancí  
případného použití  
retapamulinu

# Potřebujeme MIC hodnoty např. pro programy surveillance z pohledu zdraví lidí ?

1. Více informací získáme právě z MIC distribuce, než kdybychom použili pouze C/I/R a klinické CBP
2. MIC distribuce nám historicky „zůstanou“ – tj. můžeme vidět trendy v posunu distribucí a soudobou optikou definovat např. posun v rezistenci, a nevádí, pokud se v čase změní interpretační kritéria (pokud bychom měli pouze C/I/R vadilo by) ... nebo pokud C/I/R definují jinak různé komise (CLSI vs EUCAST)
3. MIC hodnoty vysvětlí rozdíly i mezi jednotlivými breakpointy
4. CBP (tedy klinické hraniční hodnoty mohou být neefektivní při detekci mechanismů rezistence ... ale MIC hodnoty jsou pro tento účel detekce „nových“ mechanismů rezistence užitečné
5. MIC hodnoty přinášejí určitou míru „zjednodušení“ ... vidíme několik koncentrací „vyšších“ MIC => získané rezistence, ale nevíme (dokud neuděláme genetickou analýzu) jak přesně jsou dané rezistence determinovány (kde jsou umístěny geny R apod.)
6. MIC hodnoty nás tedy nutí se podívat blíže i na mechanismy rezistence a jejich molekulárně biologickou podstatu

# Ad 1: více info z MIC distribuce:



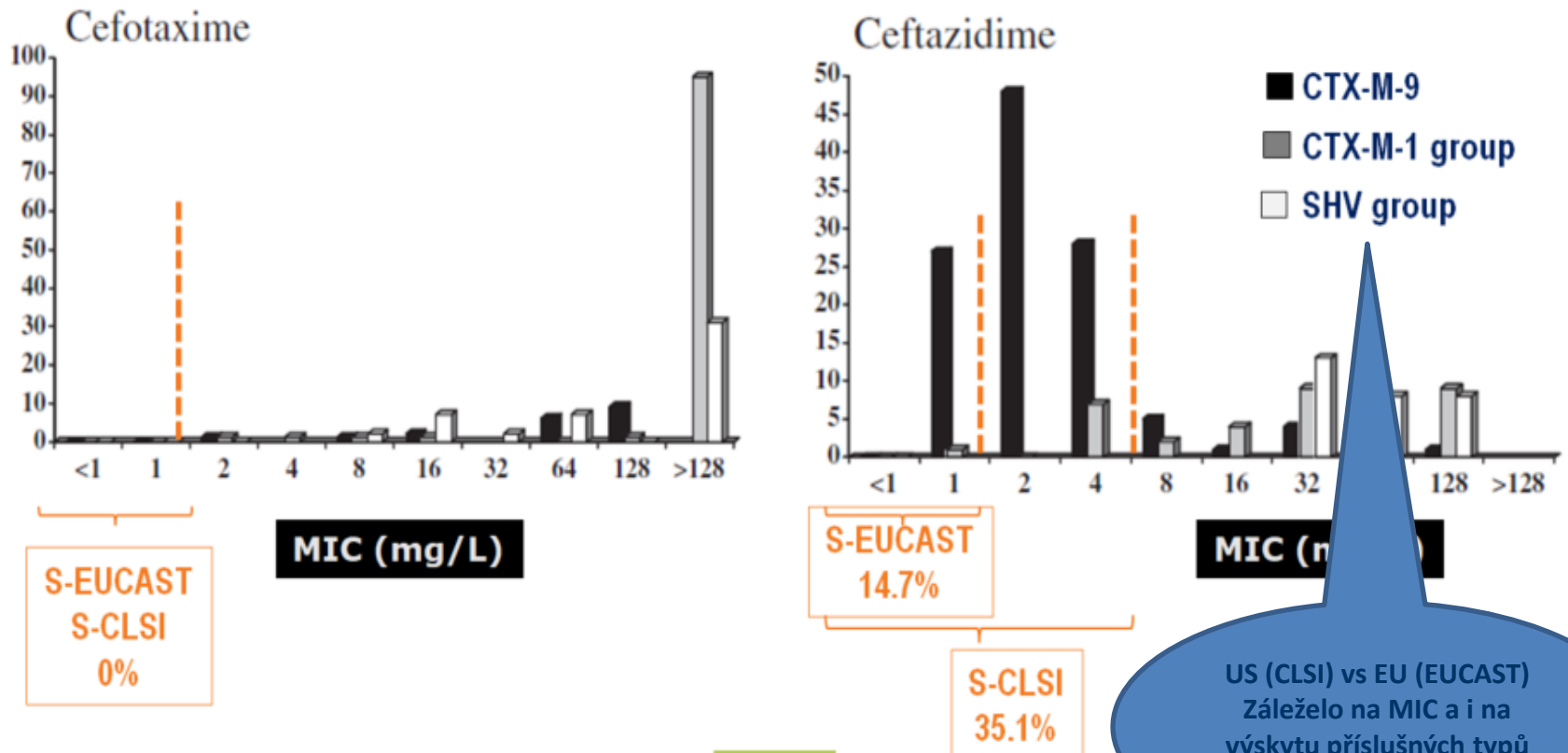
**Low level R mechanism**  
(*qnr*, *qyrA* single mutants)

**High level R mechanism**  
(*qyrA*, *parC* double mutants)

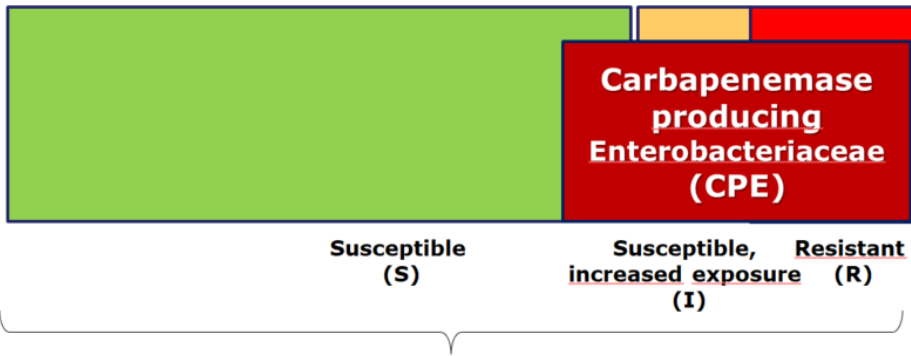
# Ad 2: příklad definování různých breakpointů (zde CBP) různými komisemi

## Cephalosporin breakpoints and Enterobacteriaceae

- Impact of CLSI & EUCAST breakpoints in ESBL-*E. coli* blood isolates

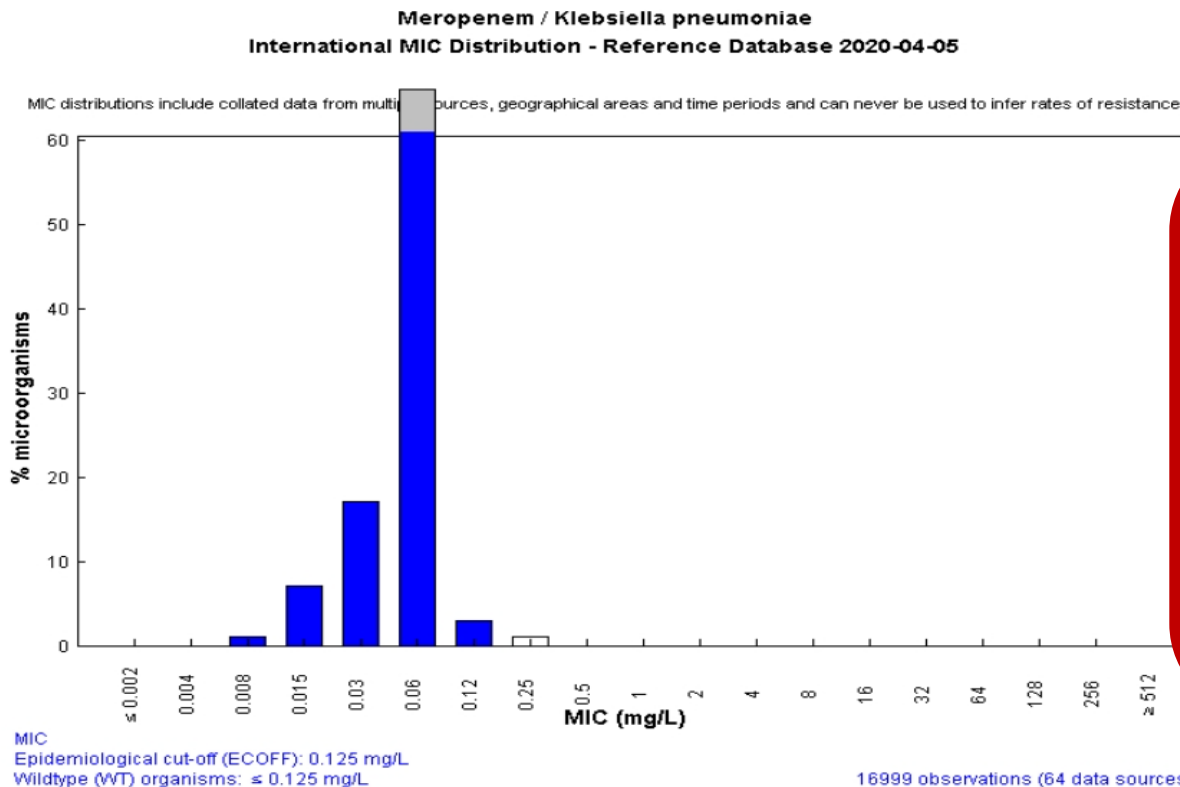


# Ad 4: CBP hodnoty a detekce rezistence

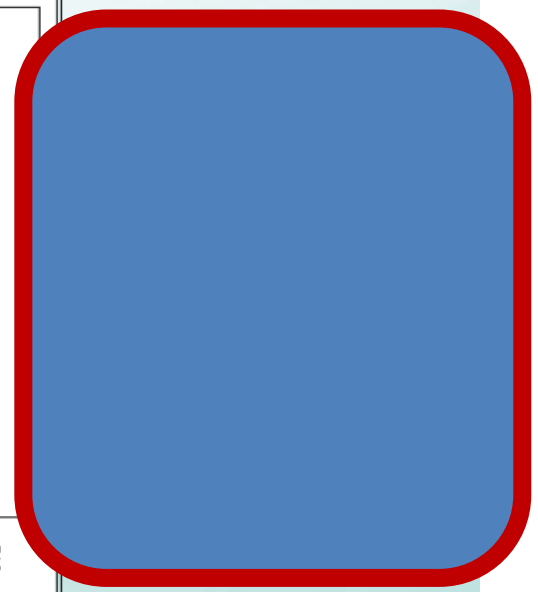


Klinická odezva na karbapenem

Většina *Enterobacteriaceae* je rezistentní, ale mohou být i citlivé či intermediální kmeny, pokud bychom brali jen dle S/I/R tak nezjistíme, pokud vezmeme i MIC a znalost produkce karbapenemázy pak ...



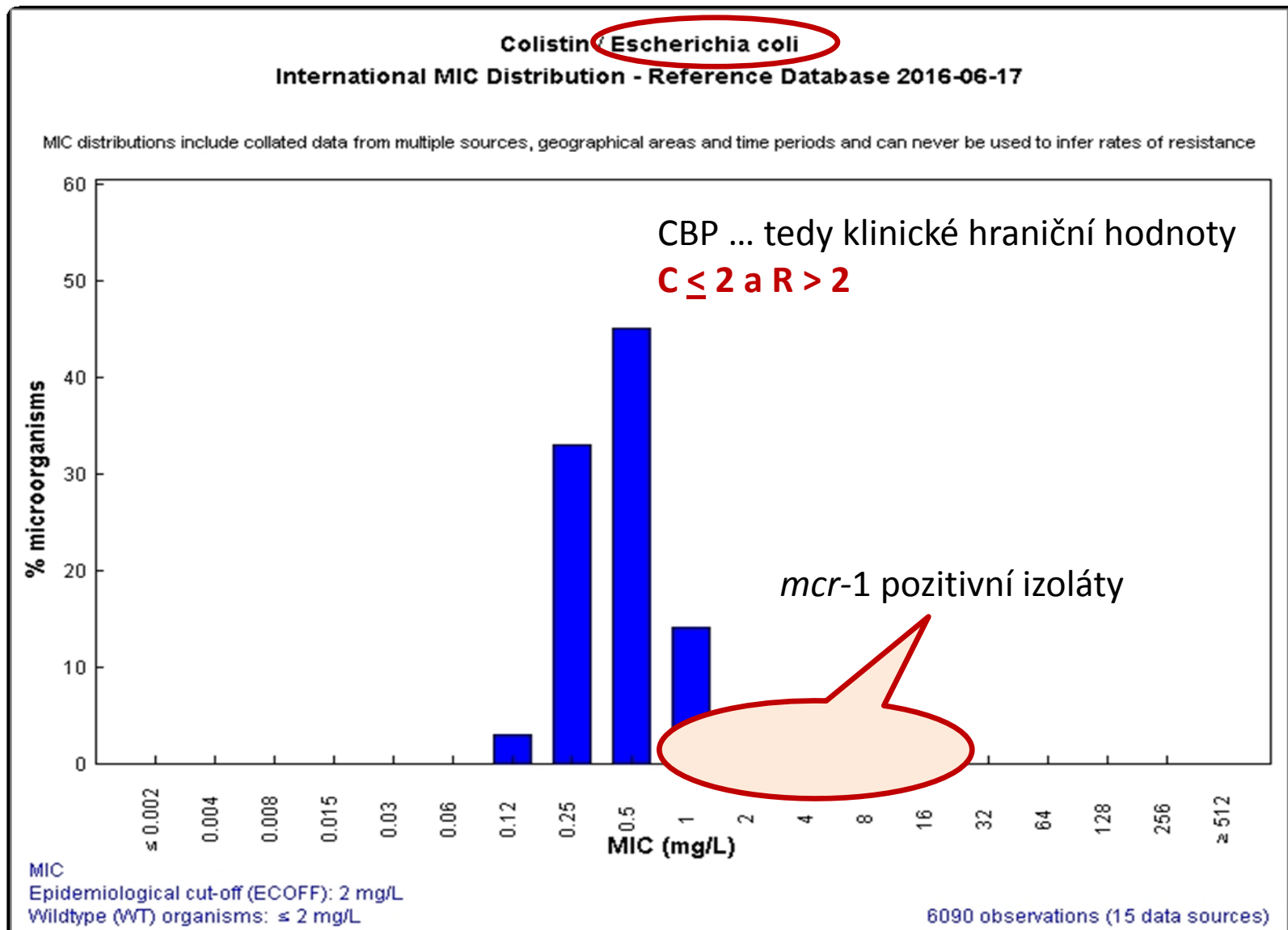
**Důležité !!!**





# A co tolik diskutovaná AMR ke kolistinu

Dlouho se nevědělo (do 2015), že existuje plasmidově přenosná AMR ... Ale byly objeveny kmeny nesoucí geny *mcr* (2020 již známy *mcr-1* až *mcr-10*)



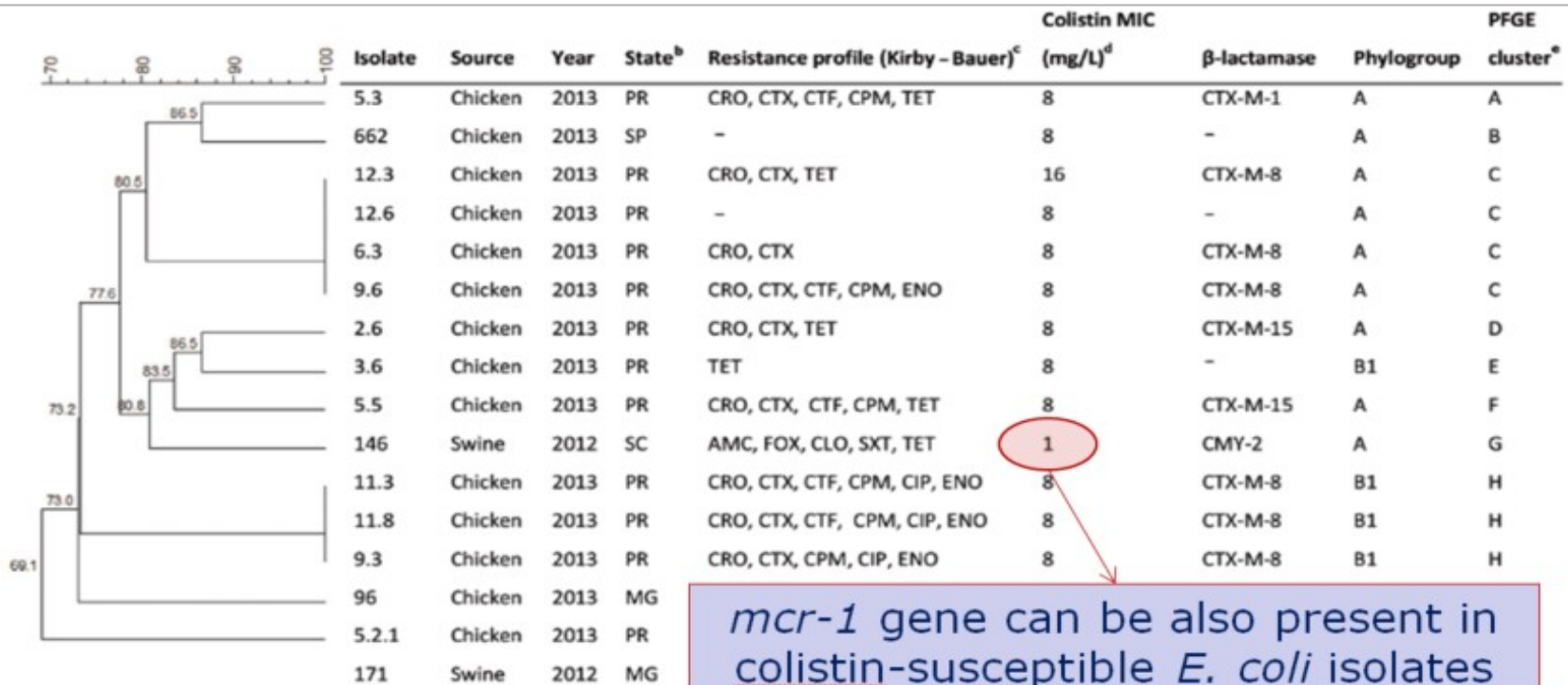
# Jako vždy existují výjimky potvrzující pravidlo

## RAPID COMMUNICATIONS

### Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene

Eurosurveillance; 28 April 2016

MR Fernandes<sup>1</sup>, Q Moura<sup>2</sup>, L Sartori<sup>1</sup>, KC Silva<sup>3</sup>, MP Cunha<sup>3</sup>, F Esposito<sup>1</sup>, R Lopes<sup>2</sup>, LK Otutumi<sup>4</sup>, DD Gonçalves<sup>4</sup>, M Dropa<sup>5</sup>, MH Matté<sup>5</sup>, DF Monte<sup>6</sup>, M Landgraf<sup>6</sup>, GR Francisco<sup>7</sup>, MF Bueno<sup>7</sup>, D de Oliveira Garcia<sup>7</sup>, T Knöbl<sup>3</sup>, AM Moreno<sup>3</sup>, N Lincopan<sup>1</sup>



*mcr-1* gene can be also present in colistin-susceptible *E. coli* isolates

MIC: minimum inhibitory concentration; nt: non typeable by PFGE.

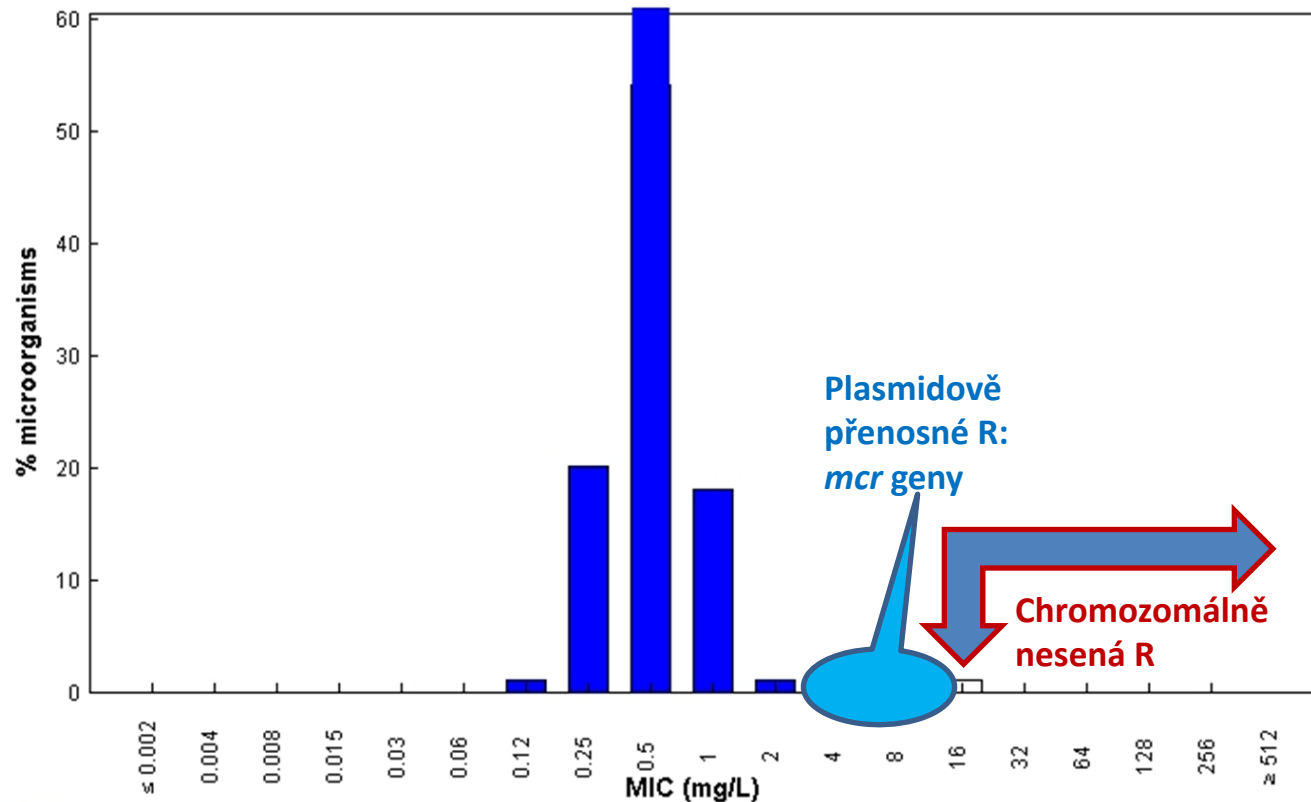
GenBank accession number for *mcr-1* genes identified in this study: KU750813, KU928239-42, KU935441-9, KX01152-1.

# Není enterobakterie jako enterobakterie

Colistin / *Klebsiella pneumoniae*

International MIC Distribution - Reference Database 2017-12-10

MIC distributions include collated data from multiple sources, geographical areas and time periods and can never be used to infer rates of resistance



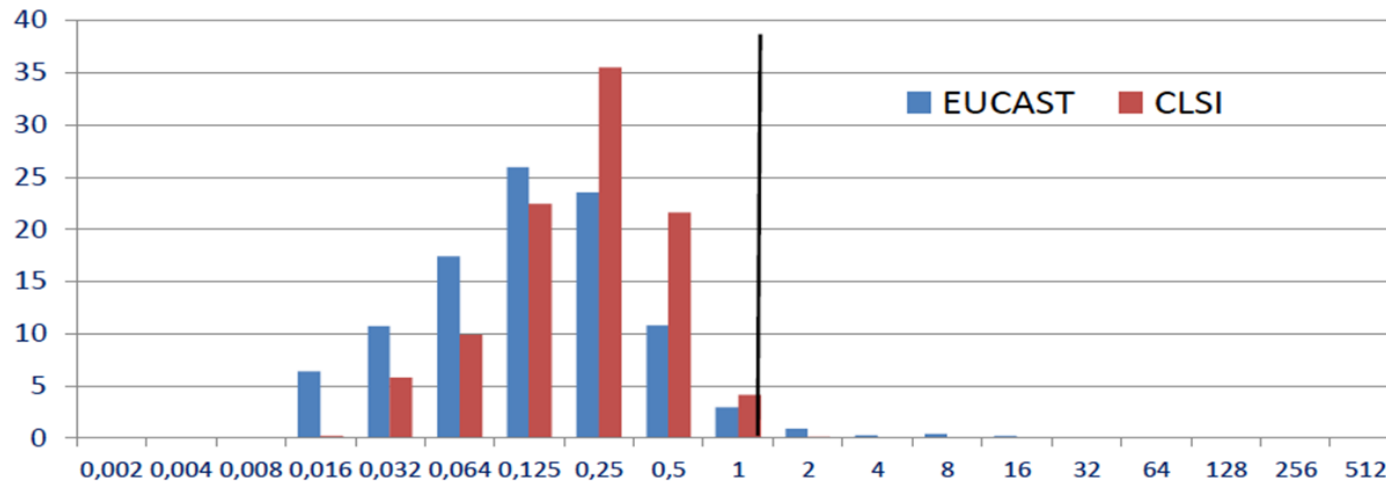
MIC  
Epidemiological cut-off (ECOFF): 2 mg/L  
Wildtype (WT) organisms:  $\leq 2$  mg/L

2237 observations (10 data sources)

# Ad 5 : MIC mohou „zjednodužit“ komplexitu rezistence

## *Neisseria gonorrhoeae* and azithromycin

CLSI and EUCAST data base



Criteria	Breakpoint		ECV - ECOFF	
	CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST
S	-	≤ 0.25	≤1	≤1
I	-	0.5		
R	-*	> 0.5		

\* NWT: 2 mg/L

Ad 5: předchozí snímek:

# *Neisseria gonorrhoeae* a azithromycin

- Od určité hladiny MIC víme, že je mikroorganismus rezistentní
- Různé hladiny MIC odpovídají různým mechanismům rezistence

**VYSOKÁ REZISTENCE** (MIC hladiny  $\geq 256\text{mg/L}$ )

**23S rRNA genová mutace** (A2059G) u 3-4 z celkem 4 alel

**NÍZKÁ až STŘEDNÍ REZISTENCE** (MIC hladiny  $2 - 32\text{ mg/L}$ )

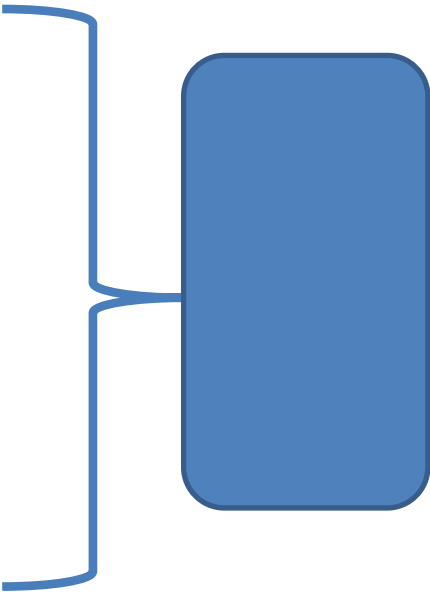
**23S rRNA genová mutace** (C2611T) u 3-4 z celkem 4 alel

**23S rRNA metylázy** (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *erm F*)

**Efluxní pumpy:**

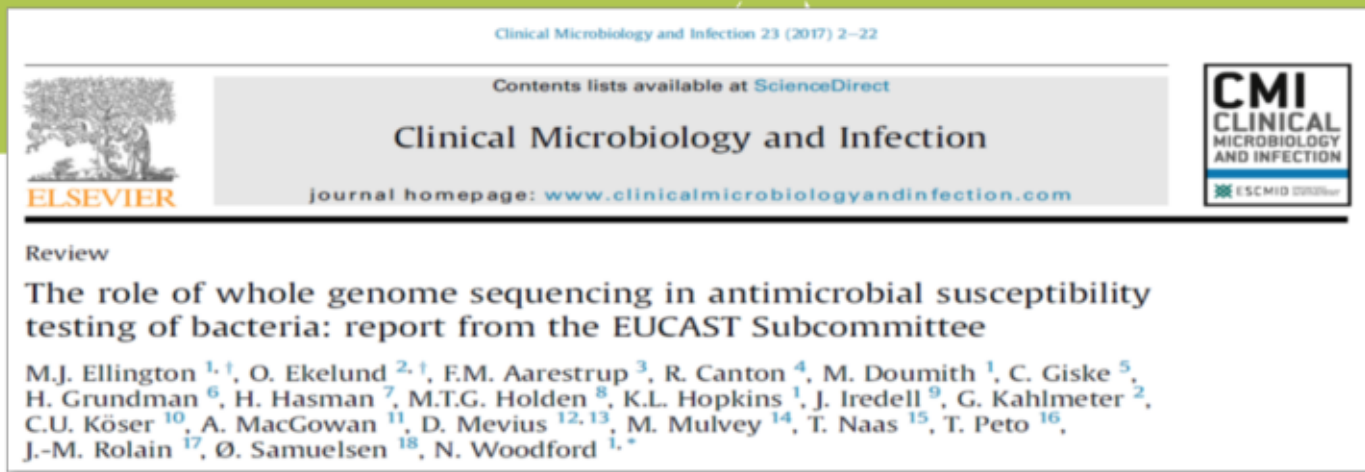
- MtrR A39T a G45D mutace
- MtrCDE overexprese (35A delece v promoteru mtrR represoru)
- MacAB
- *Mef*

**Mutace ribozomálních genů** *rplD*, *rplV*



Chisholm *et al.* AAC. 2010; 54: 3812–6  
Demczuk *et al.* JCM. 2016; 54: 1304-13  
Kirkcaldy *et al.* AAC 2015; 59: 998-1003

# Ad 6: MIC jsou relevantní a nutí nás se podívat genetickými metodami na mechanismy rezistence



...**the MIC**... reflects more than gene presence / absence; ... multiple and complex interplays between different systems including cellular permeability, influx/efflux, target availability and binding as well as enzymatic expression levels and activities.

... the primary AST comparator for WGS-based prediction should be the **ECOFF**, wherever possible, in order to assess WGS-inferred 'antibiograms' (based on gene positivity) against phenotypically-defined categories of wild-type or non-wild-type



**Tyhle pojmy již nyní znáte 😊**

Děkuji za pozornost

[pokludova@uskvbl.cz](mailto:pokludova@uskvbl.cz)