

SPECIÁLNÍ METODY

Seznam speciálních metod

- Screeningový test - HLAR
- Cefoxitin (oxacilin) – MRSA
- Makro E-test GISA a GRSA
- Betalaktamázy (standardní testy, inducibilní BLA)
- ESBL testy (screen + konfirmace)
- Screen karbapenemázy
- D – zóny (inducibilní rezistence ke klindamycinu)
- Kolistin – vícenásobná rezistence *Klebsiella* spp. a *Pseudomonas aeruginosa*

HLAR

High-Level Aminoglycoside Resistance

- Při "jednolékové" terapii systémových onemocnění způsobených kmeny enterokoků (např. endokarditis) nejsou **efektivně baktericidní** ani antimikrobiální látky působící na buněčnou stěnu bakterií (jako betalaktámová antibiotika nebo vankomycin) ani aminoglykosidy.
- **EFEKTIVNÍ SYNERGIE** (a zabití bakterií) lze dosáhnout kombinací:

látky působící proti buněčné stěně bakterií	+	aminoglykosidu
penicillinu		gentamicinu
ampicillinu	+	streptomycinu
vankomycinu		
- je-li prokázána vysoká rezistence k aminoglykosidům (HLAR = High-Level Aminoglycoside resistance), **nemohou tyto látky synergisticky působit** spolu s látkou zasahující buněčnou stěnu.
- S ohledem na vysoký nárůst klinických případů **plasmidově nesené HLAR** enterokoků => laboratoře by měly vyšetřit vzorky krve a cerebrospinální tekutiny (CSF = Cerebrospinal Fluid = mozkomíšní mok)

Detekce HLAR

I. Princip

- HLAR je všeobecně detekována zkoumáním růstu při vysokých koncentracích **gentamicinu (500 mg / ml)** a někdy **streptomycinu (1000 mg / ml v tekuté půdě nebo 2000 mg / ml v agaru)**.
- U kmenů, které **vykazují HLAR ke gentamicinu**
 - nebude synergistický účinek v kombinaci gentamicinu s antibiotiky působícími na buněčnou stěnu (stejně jako pro **gentamicin to většinou platí pro tobramycin, netilmicin nebo amikacin**)
- **HLAR ke streptomycinu**
 - odpovídá rezistenci v kombinaci s antibiotiky působícími na buněčnou stěnu bakterií **jen pro streptomycin**.

Detekce HLAR

II. Vzorky

- Čistá kultura ze čtyřech nebo pěti morfologicky identických izolovaných kolonií vykultivovaných přes noc (za 18 - 24 hod) na krevním agaru nebo jiném neselektivním médiu.

III. Kontrola kvality

Kmeny pro kontrolu kvality

- 1. *Enterococcus faecalis* ATCC 29 212 , citlivý kmen
- 2. *Enterococcus faecalis* ATCC 51 299 , gentamicin a streptomycin rezistentní kmen

Detekce HLAR

Metodiky používané pro detekci :

■ Agarová diluční metoda

- metoda „čtvrtinových misek“
- gentamicin 500 a streptomycin 2000 mcg/ml

■ Bujónová mikrometoda

- v bujónu (Brain Heart Infusion)
- gentamicin 500 a streptomycin 1000 mcg/ml

■ Disková difúzní metoda

- disky gentamicin 120 mcg a !!!
 streptomycin 300 mcg !!!

■ E-test

- Proužky gentamicin 0,064 – 1024 mcg/ml !!!
 streptomycin 0,064 – 1024 mcg/ml !!!

HLAR

INTERPRETACE u agarové diluční metody

- Žádný růst v přítomnosti gentamicinu a / nebo streptomycinu
= není přítomna "high level resistance"
- Růst v přítomnosti gentamicinu
= přítomna "high level resistance" ke gentamicinu
- Růst v přítomnosti streptomycinu
= přítomna "high level resistance" ke streptomycinu

HLAR

INTERPRETACE u E-testu

- Vysoká rezistence ke gentamicinu
 - MIC > 512 mcg/m
- Vysoká rezistence ke streptomycinu
 - MIC > 1024 mcg/ml

HLAR amikacin

- Chcete -li testovat **HLAR k amikacinu**, použijte **kanamycin** - 120 mg disk pro diskový difúzní test nebo 2000 mcg kanamycinu na ml pro agarovou metodu. Interpretace je stejná jako pro gentamicin a streptomycin (amikacin je totiž *in vitro* považován za „slabý“ substrát).

HLAR

- Většina izolátů kmenů *Enterococcus faecium* produkuje aminoglykosidy modifikující enzym (6 acetyltransferázu), která je činí přirozeně rezistentní k amikacinu, kanamycinu, netilmicinu a tobramycinu.
- Tato rezistence **může i nemusí** být vyjádřena jako HLAR . Proto gentamicin určuje pouze rezistenci ke gentamicinu a streptomycin určuje jen rezistenci ke streptomycinu **u *E. faecium***.

HLAR interpretace obecně

a. Nemají-li izoláty vysokou rezistenci ani ke gentamicinu ani ke streptomycinu:

- "Pravděpodobně **synergismus** mezi gentamicinem , streptomycinem, tobramycinem, netilmicinem, nebo amikacinem a ATB působícími na buněčnou stěnu /jako penicillin, vankomycin, ampicillin)".

b. Má-li izolát vysokou rezistenci ke gentamicinu:

- " Není pravděpodobně **žádný synergismus** mezi **gentamicinem, streptomycinem, tobramycinem, netilmicinem, nebo amikacinem** a ATB působícími na buněčnou stěnu /jako penicillin, vankomycin, ampicillin)".

c. Mají-li vysokou rezistenci ke streptomycinu:

- " Není pravděpodobný **žádný synergismus** mezi **streptomycinem** a ATB působícími na buněčnou stěnu /jako penicillin, vankomycin, ampicillin)".

d. Má -li izolát vysokou rezistenci ke gentamicinu a streptomycinu:

- " Není pravděpodobný **žádný synergismus** mezi **jakýmkoliv aminoglykosidem** a ATB působícími na buněčnou stěnu /jako penicillin, vankomycin, ampicillin)".

PCR potvrzení HLAR a rezistence k aminoglykosidům

- Potvrzení HLAR a detekce genů AMEg – (Aminoglycosidy modifikující enzymy)...

Article

A high throughput multiplex PCR assay for simultaneous detection of seven aminoglycoside-resistance genes in Enterobacteriaceae.

Xiumei Hu, Banglao Xu, Yinmei Yang, Dayu Liu, Mengjie Yang, Ji Wang, Hongwei Shen, Xiaomian Zhou, Xuejun Ma

BMC Microbiology (Impact Factor: 3.1). 03/2013; 13(1):58. DOI:10.1186/1471-2180-13-58
Source: PubMed

ABSTRACT BACKGROUND: The aminoglycoside-resistance genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and 16S rRNA methyltransferases are main factors contributing to increasing resistance to aminoglycosides. Characterization and distribution of antimicrobial resistance gene profiles provide important information on the potential difficulty of treatment of bacteria. Several molecular methods have been developed to investigate the prevalence of aminoglycoside-resistance genes. These existing methods are time-consuming, labor-intensive, expensive or limited sensitivity in the epidemiological investigation. Therefore, it is necessary to develop a rapid, less-costly and high throughput and sensitive method to investigate the distribution of antimicrobial resistance gene in clinical isolates. **RESULTS:** In this study, we developed a GeXP analyzer-based multiplex PCR assay to simultaneously detect seven aminoglycoside-resistance genes, including aac(3)-II, aac(6[prime])-Ib, aac(6[prime])-II, ant(3[prime][prime])-I, aph(3[prime])-VI, armA and

Detekce MRSA

meticilin **rezistentní** *Staphylococcus aureus*

Meticilin rezistentní

tradiční název pro kmeny *S. aureus* rezistentní k oxacilinu

- geneticky podložené,
 - gen *mecA*, kóduje **transpeptidázu PBP2a**
- typicky rezistentní ke:
 - všem betalaktamům,
 - kombinaci betalaktamu s inhibítozem betalaktamáz,
 - karbapenemům

MRSA a sdružené rezistence

- samostatná rezistence na betalaktamy je však velmi výjimečná, většinou sdruženě s rezistencí na atb z jiných farmakologických skupin (makrolidy, aminoglykosidy, tetracyklin, rifampicin, fluorochinolony, chloramfenikol aj.)
- zcela vzácně sdružení rezistence s glykopeptidy, linezolidem a kombinaci dalfopristin/quinupristin)

Populace MRSA

- **Homorezistentní populace MRSA** ≥ 1 buňka vysoce rezistentní / 100 buněk populace
- **Heterorezistentní populace MRSA** < 1 buňka vysoce rezistentní / 100 buněk populace
- není zcela jasné jaký je interakční mechanismus způsobující heterorezistenci, tj. menší počet vysoce rezistentních buněk v populaci (zřejmě interakce PBP2a a produkty genu *fem* (factor essential for meticilin resistance)).

LABORATORNÍ PRŮKAZ MRSA

RUTINNÍ LABORATOŘ – použití kombinace metod

- kombinovat např. metody (diskové, screeningové, MIC detekující) s oxacilinem (1 mcg) a cefoxitinem (30 mcg)
- podezřelé kmeny zasílat ke confirmaci genu *mec A* prostřednictvím PCR.
- MRSA kmeny lze detekovat i běžnými (tzv. fenotypovými) metodami
 - diskovou difúzní a stanovením MIC (např. E-testem)
 - pokud jsou přesně dodrženy standardní postupy i tyto výsledky korespondují a odpovídají stanovením PCR a latexovým aglutinacím.

VYSOCE SPOLEHLIVÁ se jeví metoda s **CEFOXITINEM** (30 mcg/ml) za standardních podmínek vytvářejí kmeny MRSA kolem **disku s cefoxitinem** inhibiční zóny :

< 20 mm (u kmenů St.aureus) a

< 25 mm (u koaguláza-negativních stafylokoků)

(+ oxacilin (1 mcg) inhibiční zóny

< 13 mm (u kmenů St.aureus) a

< 18 mm (u koaguláza-negativních stafylokoků)

LABORATORNÍ PRŮKAZ MRSA

problém v případě extrémně nízkého počtu vysoce rezistentních buněk => špatné výsledky :

- s diskou OXA (1 μ g) – veliké zóny, jeví se jako citlivá populace,
- není patrný nárůst jednotlivých kolonií
- u mikrodetekce - MIC většinou menší než 4 μ g/ml OXA
- u vyhledávací pŕdy se 6 μ g/ml OXA nerostou
- ... tudíř se celkově populace jeví jako citlivá, ale není !!!

LABORATORNÍ PRŮKAZ MRSA

- Průkaz genu *mec A* - tzv. zlatý standard je metoda PCR (amplifikace genu)
- Průkaz produktu genu *mec A* - proteinu PBP 2a - latexová aglutinace
- Výsledky obou metod + detekce pomocí cefoxitinu dobře korespondují, navíc jsou obě metody rychlé (několik hodin) a spolehlivé, nevýhoda je asi jediná – nákladnost – zejména v případě PCR.

LABORATORNÍ PRŮKAZ MRSA

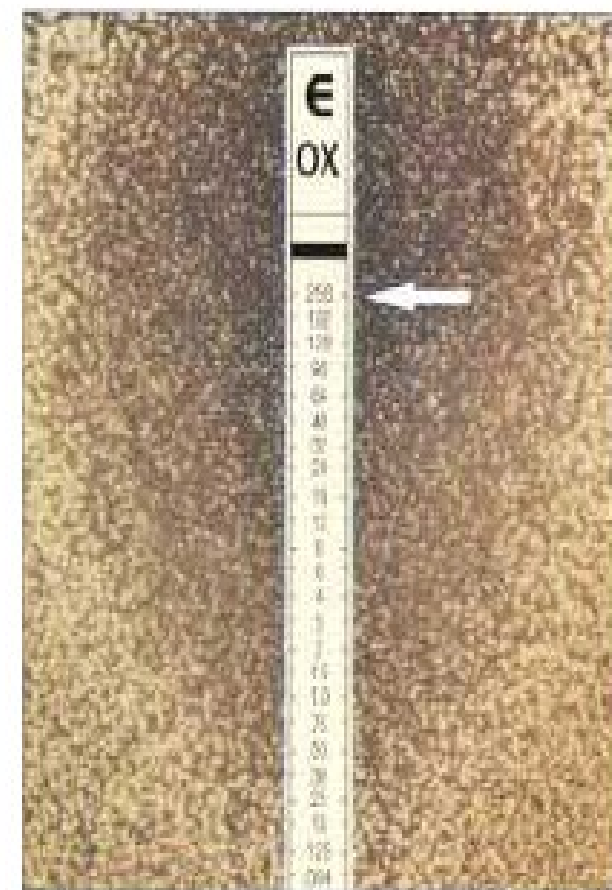
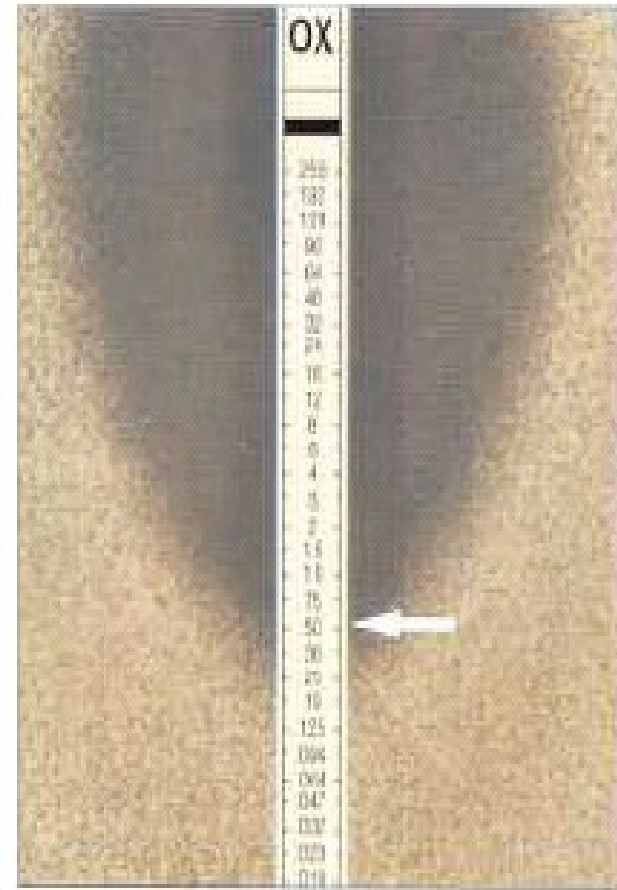


Figure 1. Susceptible strain.
MIC 0.5 µg/ml.

Figure 2. Homogeneously resistant
strain. MIC ≥ 256 µg/ml.

Figure 3. Heterogeneous resistance.
MIC ≥ 256 µg/ml.

LABORATORNÍ PRŮKAZ MRSA

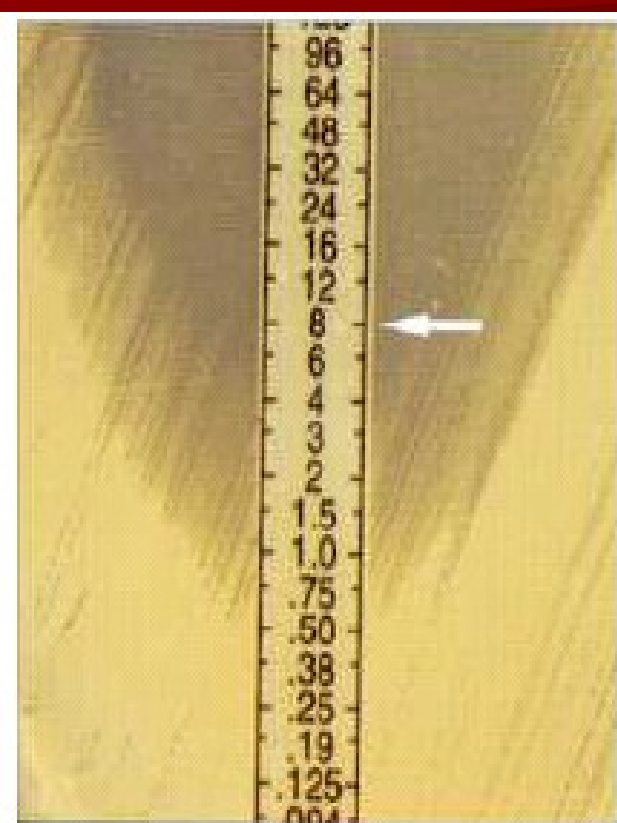


Figure 4. Diffuse zone edge.
MIC 8 µg/ml.

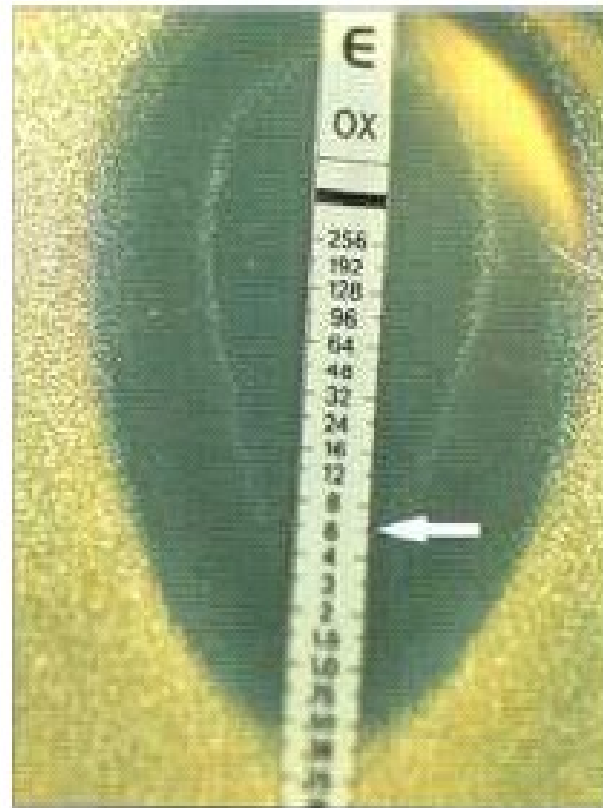


Figure 5. Translucent film. Tilt the plate to read. MIC 6 µg/ml.

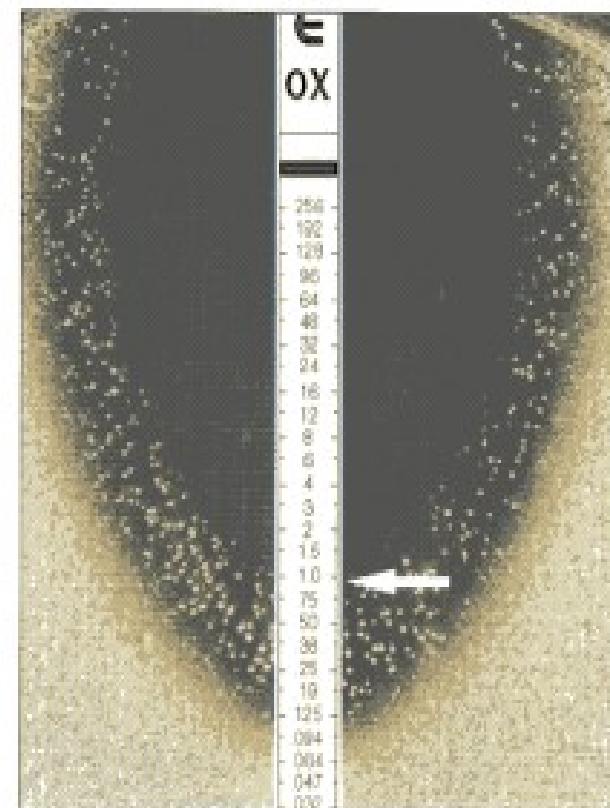


Figure 6. Subpopulation of macrocolonies. MIC 1 µg/ml.

LABORATORNÍ PRŮKAZ MRSA

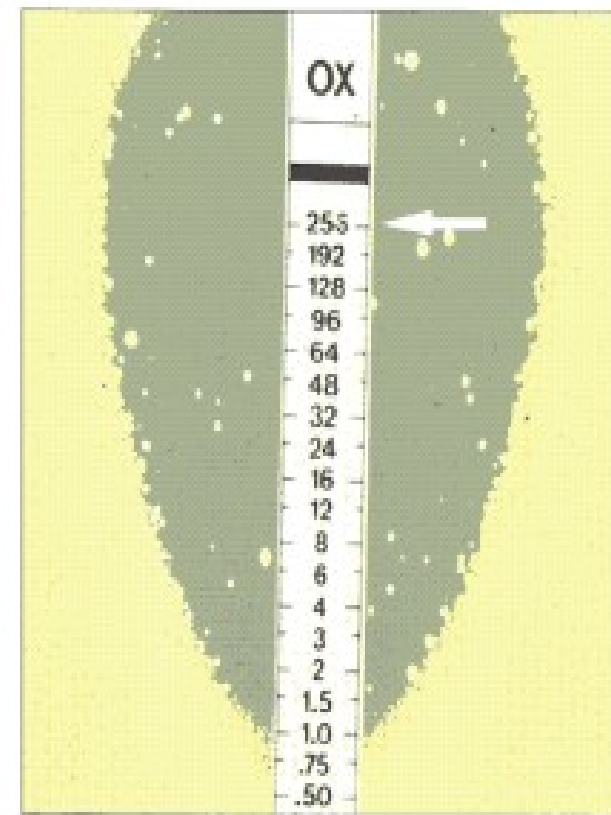
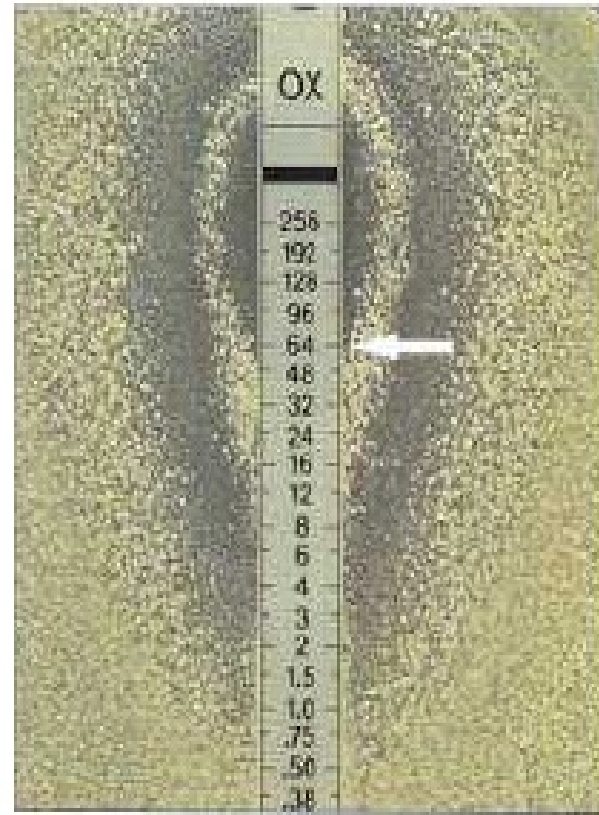
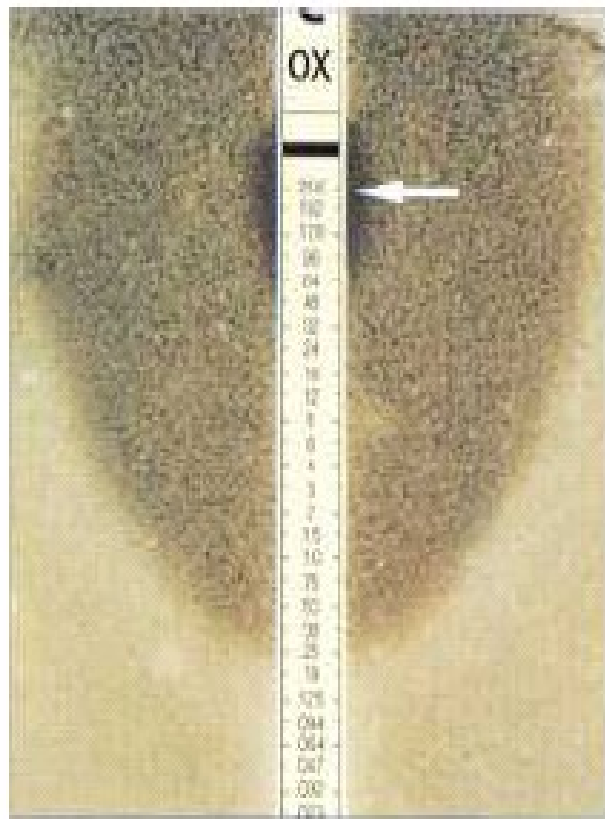


Figure 7. Resistant subpopulation.
MIC 256 µg/ml.

Figure 8. Induction of resistance at
8-64 µg/ml. MIC 64 µg/ml.

Figure 9. Isolated colonies in ellipse.
MIC ≥256 µg/ml.

Detekce GISA a GRSA

GISA glykopeptid **intermediárně** rezistentní *St.aureus*

- izoláty MRSA necitlivé k vankomycinu resp. také k teikoplaninu, ale s pouze intermediárním stupněm rezistence
- populace se navíc jeví jako heterorezistentní
- charakteristické pro tyto kmeny je nezvykle silná vrstva peptidoglykanu (zřejmě jako reakce na prostředí s glykopeptidy)

GRSA glykopeptid **rezistentní** *Staphylococcus aureus*

- nově až od II. poloviny roku 2002
- vysoká rezistence k vankomycinu
- obsahují gen *van A* , zřejmě získaný od enterokoků konjugací

GISA a GRSA

- **GISA** resp. heterorezistentní GISA
 - upozorní na ně až selhání léčby vankomycinem nebo teikoplaninem u pacienta s MRSA kmenem.
 - Potřeba naočkovat na běžné laboratorní půdy, event. na půdu s nízkým obsahem vankomycinu, inokulum musí být husté.
- **GRSA** pro vyhledání postačí půda s obsahem vankomycinu 6 mg/l

Detekce GISA a GRSA

Rutinní vyšetření MRSA, GISA, GRSA :

- vyhledání těchto kmenů
- sestavení antibiogramu (s kompletní sadou atb)
- sestavení kvantitativních výsledků (MIC, E-test, nebo alespoň velikosti inhibičních zón)

Analýza základních dat + nadstandard PFGE :

- porovnání hodnot a antibiogramů jednotlivých kmenů + epidemiologická data => zjištění příslušnosti kmene k určitému klonu
- potvrzení předchozích dat PFGE (pulsed field gel electrophoresis) => zjištění dynamiky šíření klonů

Metody vyhledávání **GISA** a **GRSA**

- Vyhledávací metoda **pro GISA a GRSA s 5 mg/l teikoplaninu**
- Vyhledávací metoda **pro GISA a GRSA s 6 mg/l vankomycinu**
- **E test s vankomycinem a teikoplaninem**
 - Negativní :
 - MIC vankomycinu < 8 mg/l, MIC teikoplaninu < 12 mg/l
 - Pozitivní :
 - MIC vankomycinu a teikoplaninu \geq 8 mg/l, nebo
 - MIC teikoplaninu \geq 12 mg/l (bez ohledu na MIC van)

To select the correct end point, it is important to differentiate narrow ellipses from the so-called "dip effect" seen with macrolides and clindamycin. Do not read the end point for vancomycin and teicoplanin as a dip effect. Read the MIC where the ellipse actually cuts the strip (Figures 1 and 2). Scrutinise the end points for hazes or microcolonies and read at complete inhibition (Figure 3).

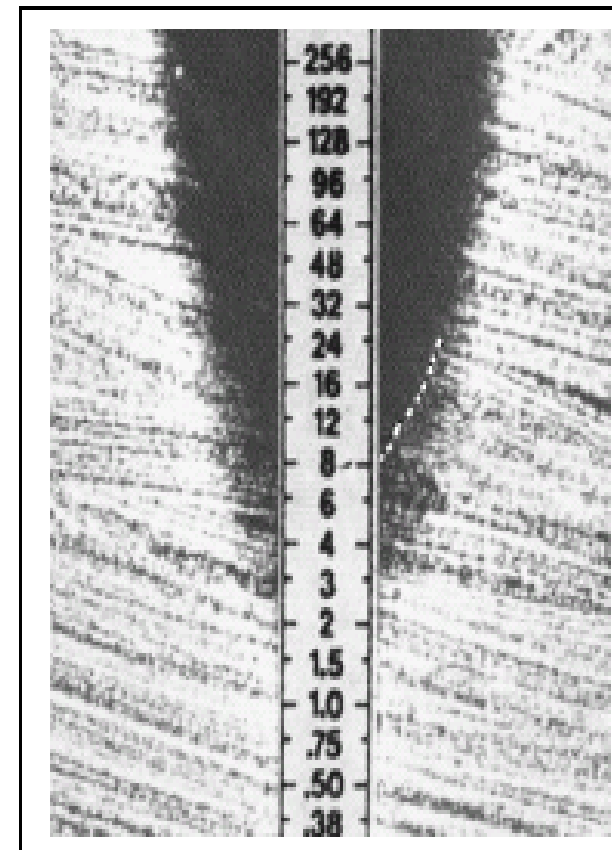
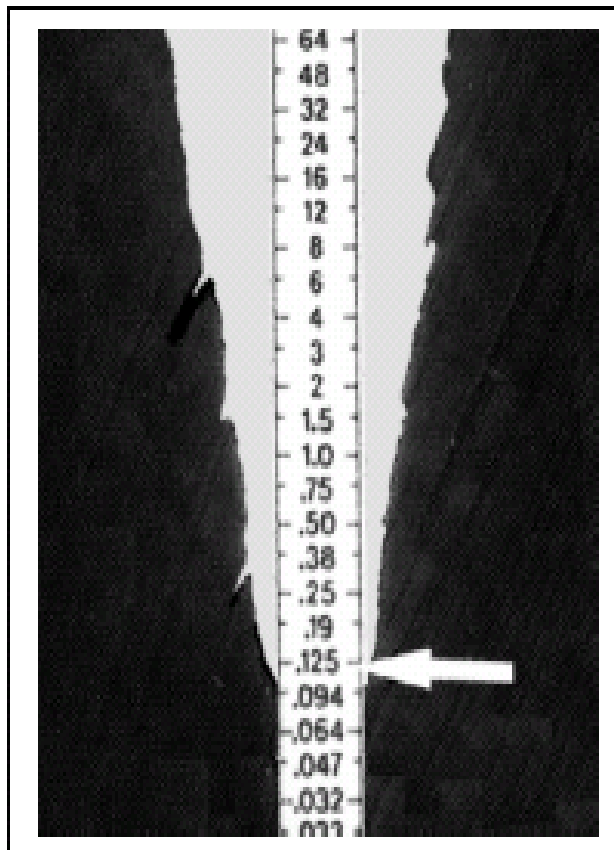
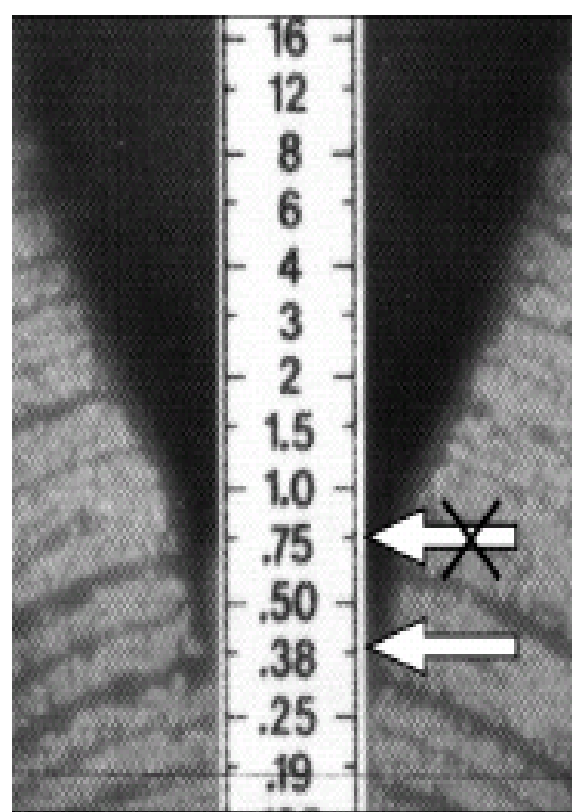


Figure 1. Slim ellipse. MIC 0.38 $\mu\text{g}/\text{ml}$

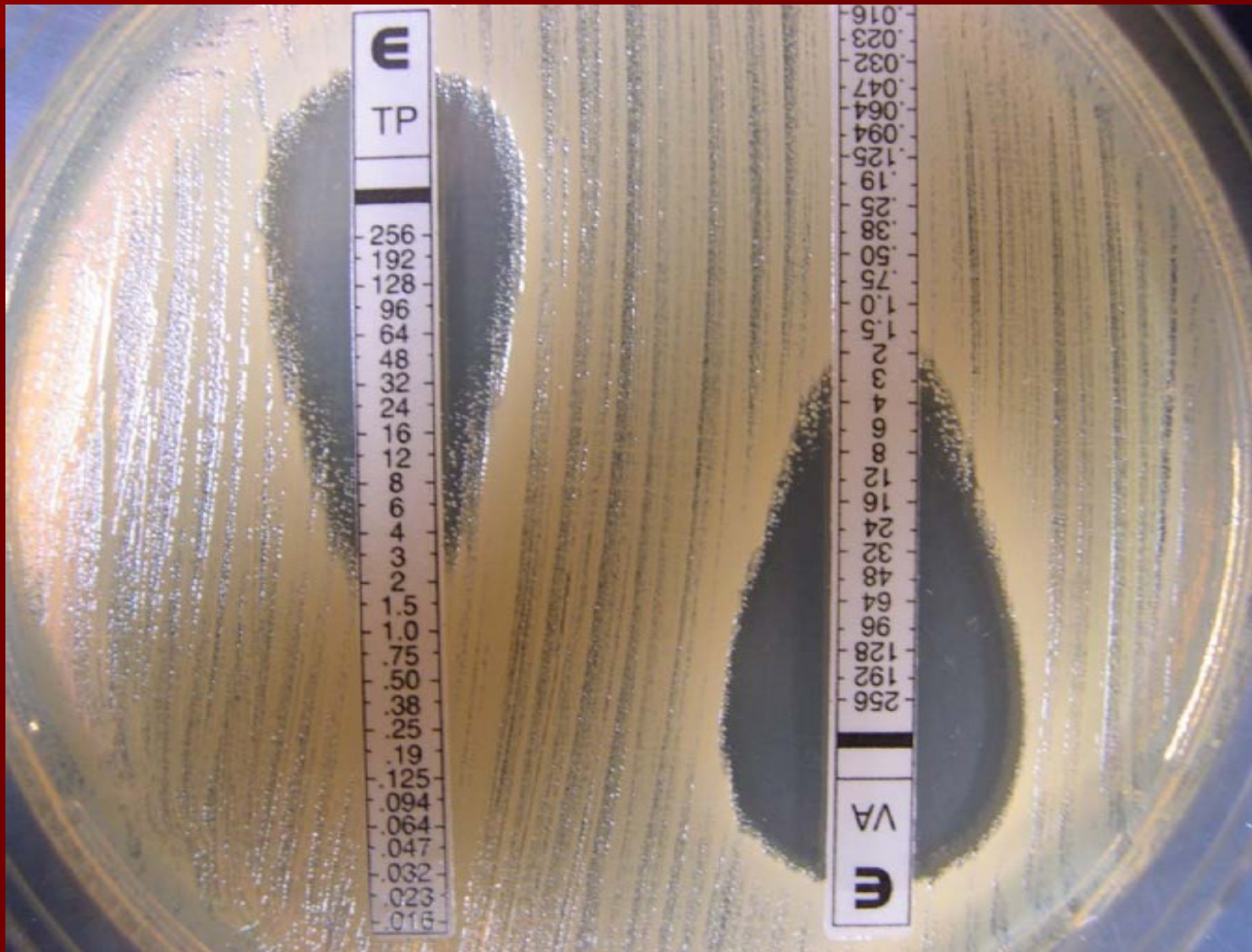
Figure 2. Slim ellipse. MIC 0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Figure 3. Colonies at end point. MIC 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Makro E-test Vankomycin rezistentní *St. aureus*

Kriteria: vanko + teiko >8 ug/ml

nebo teiko samostatně >12 ug/ml



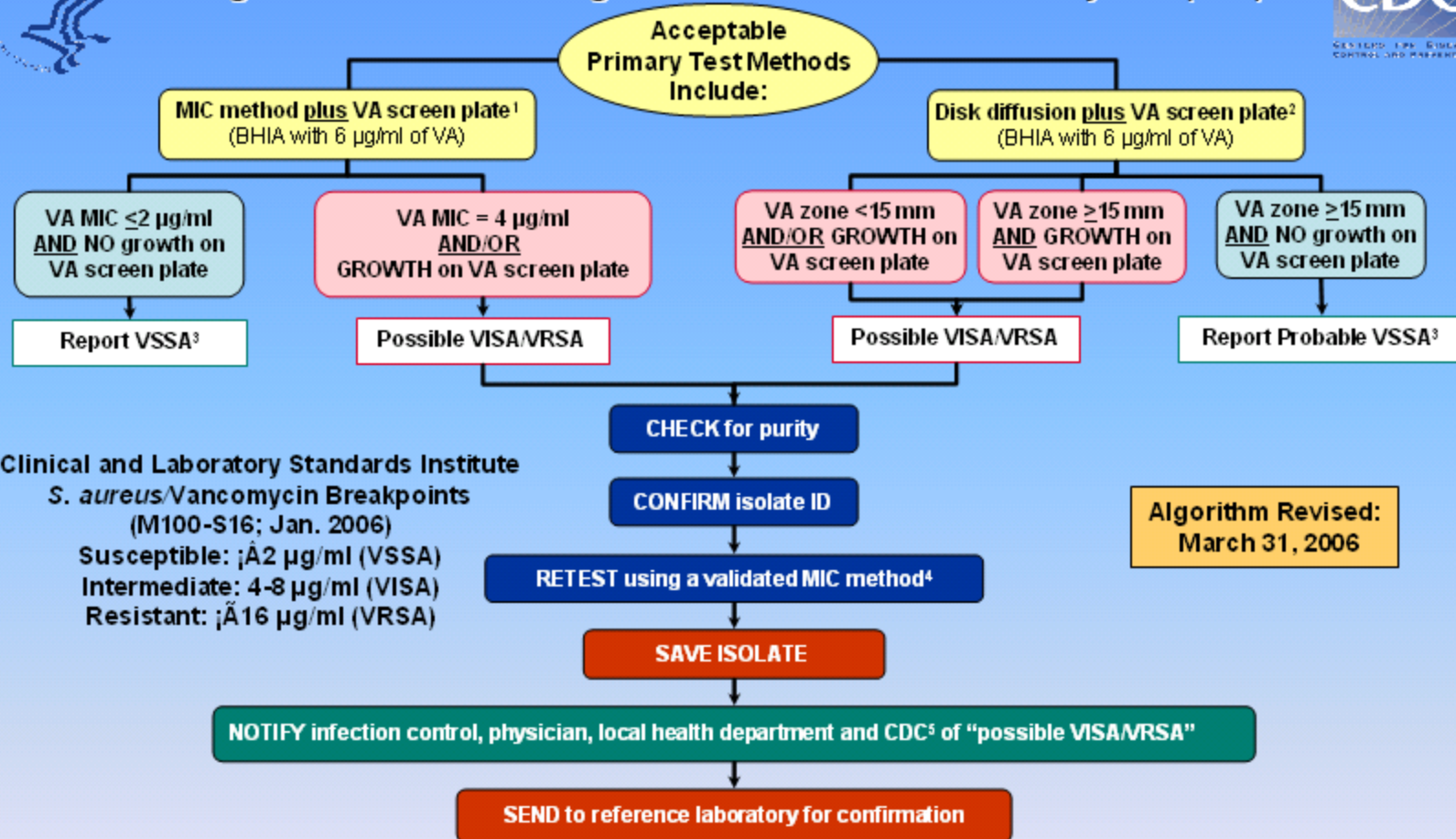
2 McFarland

BHI agar

inkubace
48 hodin



Algorithm for Testing *S. aureus* with Vancomycin (VA)



Clinical and Laboratory Standards Institute
S. aureus/Vancomycin Breakpoints
 (M100-S16; Jan. 2006)
 Susceptible: ≤ 2 µg/ml (VSSA)
 Intermediate: 4-8 µg/ml (VISA)
 Resistant: ≥ 16 µg/ml (VRSA)

Algorithm Revised:
 March 31, 2006

Important Footnotes

- Laboratories using automated MIC methods that have not been validated for VRSA detection should add a commercial VA agar screen plate (6 µg/ml).
- Disk diffusion will not differentiate VISA (MICs 4-8) from susceptible strains (MICs 0.5-2). VA screen plate will not reliably detect strains for which MIC=4.
- If concerned about a result based on a patient's history, send to a reference lab for MIC testing.
- Validated methods: reference broth microdilution, agar dilution, Etest[®] (0.5 McFarland inoculum, Mueller-Hinton agar), MicroScan[®] overnight and Synergies plus™, BD Phoenix™ system. For other automated methods, check with the manufacturer about FDA-clearance to detect MICs = 4 (i.e., VISA/VRSA).
- Report to CDC by email: SEARCH@cdc.gov

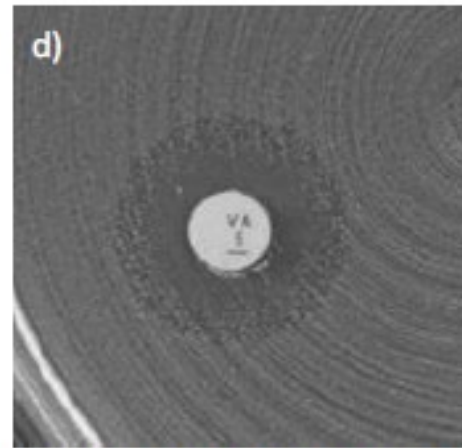
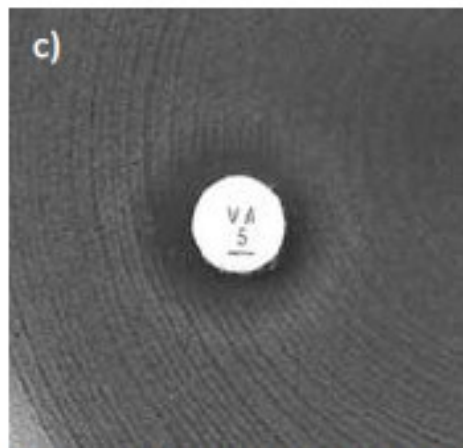
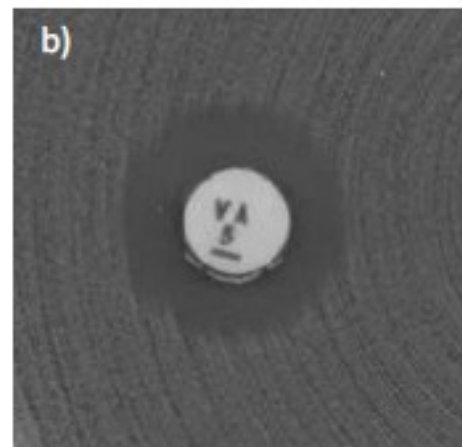
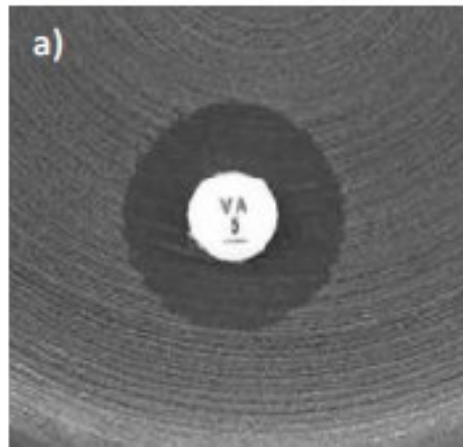
VRE – vankomycin rezistentní enterokoky

- *E. faecium* nebo *E. faecalis*
- MIC >4 mg/L
- Geny Van A, Van B nejčastěji... dále pak VanD, VanE, VanG, VanL, VanM and VanN
- *E. raffinosus*, *E. gallinarum* a *E. casseliflavus* také detekovány *vanA*, *vanB* nebo jiné *van* geny raritní ...
- Chromosomálně kódované VanC *E. gallinarum* a *E. casseliflavus*
 - VanC low-level vancomycin resistance (MIC 4-16 mg/L)

Metody detekce VRE

- MIC
- disk difúze či
- breakpoint agar metoda
- NUTNÉ : kultivace plných 24 hod (izoláty s inducibilní VRE)

Figure 1. Reading of vancomycin disk diffusion tests on *Enterococcus* spp.



- a) Sharp zone edges and zone diameter ≥ 12 mm. Report as susceptible.
- b-d) Fuzzy zone edges and/or colonies within the zone. Report as resistant regardless of zone diameter.

Testování produkce betalaktamázy

- Je používáno několik odlišných technik pro určování produkce betalaktamázy .
- Metody nejvíce používané v klinických laboratořích:
 - chromogenní cefalosporinovou metodu
 - acidimetrickou metodu
 - jodometrickou metodu
- Všechny tyto testy jsou založeny na:
 - vizuální detekci konečného produktu hydrolýzy betalaktamu, který je zvýrazněn barevnou reakcí.
- Ne všechny metody jsou však uspokojivé pro detekci betalaktamázy pro všechny bakteriální druhy, u kterých je detekce betalaktamázy nutná.

Detekce betalaktamázy

Chromogenní cefalosporinová metoda

- Nejčastěji je využíváno papírových disků napuštěných **nitrocefinem**, chromogenním cefalosporinem.
- Betalaktamázy některých mikroorganismů hydrolyzují amidovou skupinu vázanou v betalaktamovém kruhu a způsobují barevnou změnu ve vznikající látce .
- Pozitivní reakce je charakterizována barevnou změnou disku ze **žluté** na **červenou** v oblasti rozmístění bakterií.
- Tato metoda je upřednostňována v klinické praxi pro svou jednoduchou proveditelnost a proto, že pomocí ní lze detekovat většinu známých betalaktamáz, včetně nejnověji popsaných betalaktamáz enterokoků.

Detekce betalaktamázy

Acidimetrická metoda

- Tato metoda může být uskutečňována pomocí disků, proužků nebo zkumavek.
- Roztok nebo disky obsahující benzylpenicillin a pH indikátor(obvykle bromkresolovou nebo fenolovou červen).
- betalaktamázy hydrolyzují penicillin na kyselinu penicilánovou, která způsobí pokles pH a následuje barevná změna.
- Tento test je také velmi jednoduše proveditelný, ale jeho nevýhodou je, že jím nelze stanovit všechny známé betalaktamázy.
- Pozitivní reakce **fialová** se mění na **žlutou**

Detekce betalaktamázy

Jodometrická metoda

- Je založena na reakci kyseliny penicilánové nebo cefalosporinové se škrobem a jodem.
- betalaktamázy štěpí penicilliny na kyselinu penicilánovou, která redukuje jod a brání tvorbě komplexu jod a škrob.
- Není-li betalaktamáza přítomna, není produkována žádná kyselina a jod vytváří komplex se škrobem za vzniku modrého zbarvení.
- Tento test není tak citlivý a specifický a je používán méně často v klinických laboratořích. Tato metoda bývá někdy zahrnuta do komerčních panelů s testy.
- Pozitivní reakce **modrá až fialová se odbarví**

Detekce indukční betalaktamázy

U gramnegativních tyčků

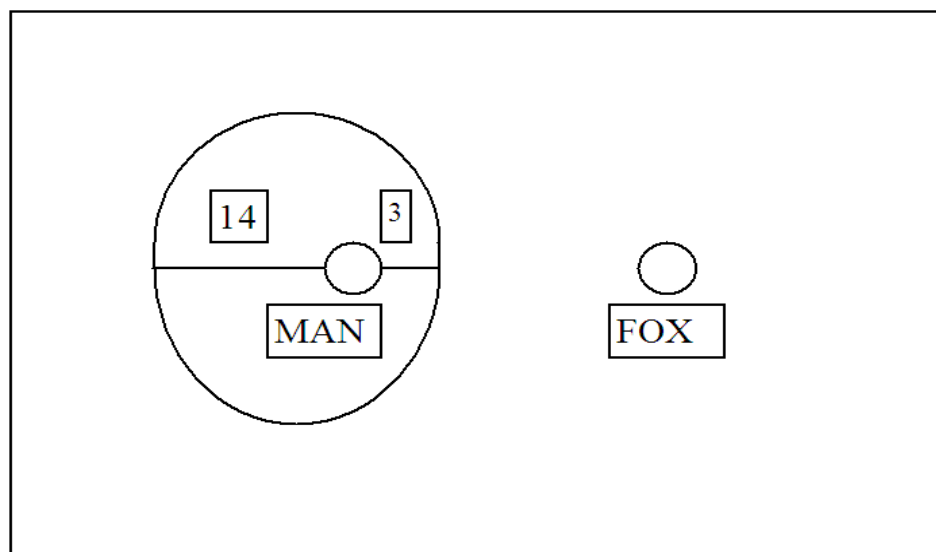
- Metoda je vhodná zejména pro testování kmenů, u nichž je předpoklad produkce chromozomálně řízené indukční betalaktamázy (např. na základě rutinního testování kmene diskovou difúzní metodou s betalaktamovými antibiotiky).
- Test pro průkaz indukční betalaktamázy má omezený význam a jeho využití je možné jen v souladu s klinickými a epidemiologickými údaji.

Detekce induktivní betalaktamázy

- *Citrobacter freundii*, *Enterobacter ssp.*, *Proteus vulgaris*, *Providentia ssp.*, *Pseudomonas aeruginosa* nebo *Serratia ssp.* mohou produkovat b-laktamázy, které jsou chromozomálně řízené (nejsou zakotveny v plazmidech).
- Jednoduchý diskový test k určení produkce induktivní betalaktamázy založený na indukci betalaktamázy v přítomnosti nízkých koncentrací betalaktamového antibiotika jako je např. cefoxitin.
- Testování zahrnuje přípravu kultur bakterií a aplikaci antibiotických disků. Induktor difunduje do agaru a překrývá se se substrátovým antibiotikem.
- V důsledku indukce betalaktamázy vzniká deformovaná zóna inhibice v místě, kde jsou bakterie vystaveny účinkům induktoru. Jako reprezentativní **substrátové antibiotikum se používá cefamandol** popř. se využívá i jiné betalaktamové antibiotikum vyžadované lékařem.

Způsob odečtu induktivní betalaktamázy:

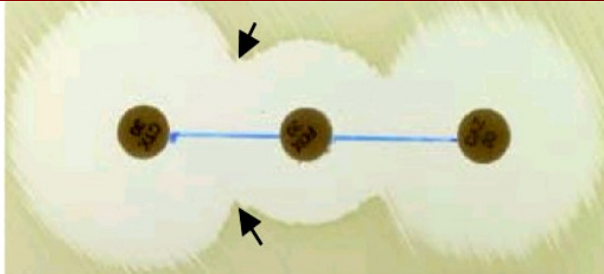
- jako substrát cefamandol
- indukce nízkou koncentrací cefoxitinu



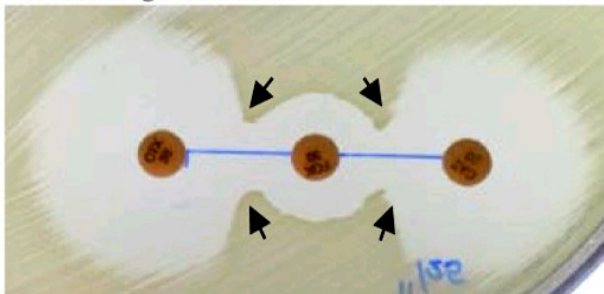
$$14\text{mm} - 3\text{mm} = \mathbf{11\text{ mm}}$$

Pokud je rozdíl větší nebo roven 4 mm → produkce induktivní β -laktamázy.

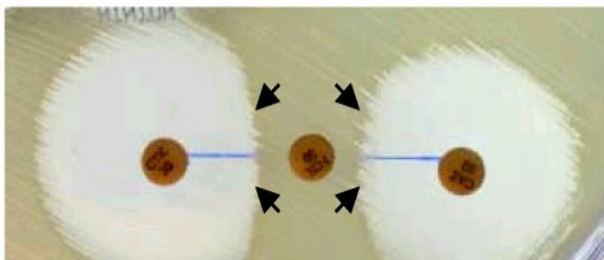
Pokud je rozdíl větší nebo roven 4 mm => produkce induktivní betalaktamázy.



d. *M. morganii* 02325



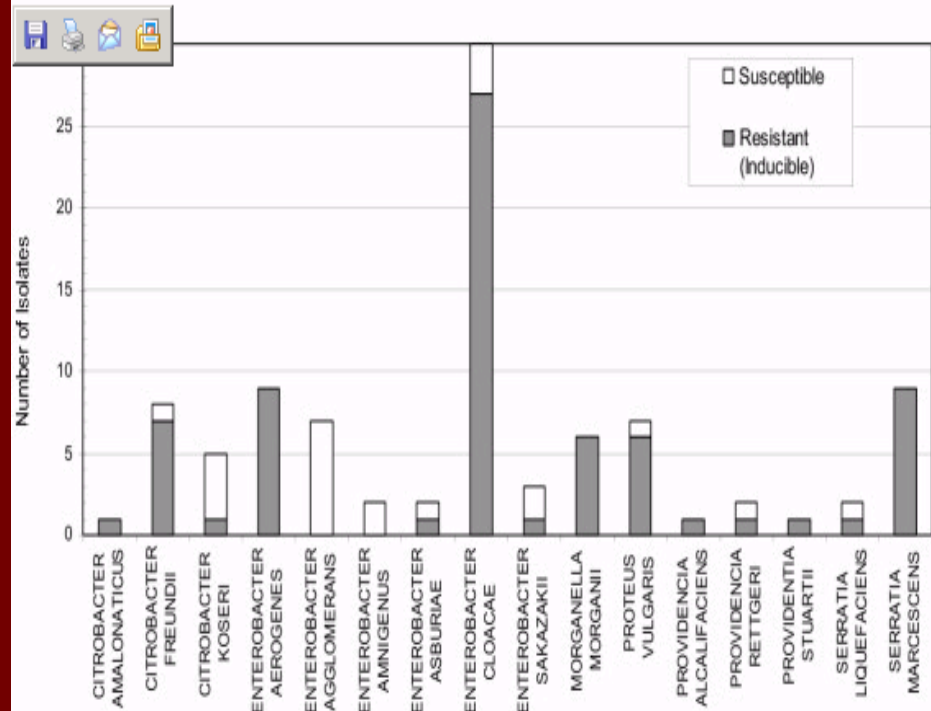
e. *E. aerogenes* 02324



<http://bmc.ub.uni-potsdam.de> - Figure 2 - Microsoft Internet Explorer

Figure 2

Resolution: standard / high



distribution of inducible resistance detected by KBDA among bacterial genera and species.

Detekce indukční betalaktamázy

- Pokud je rozdíl větší nebo roven 4 mm => produkce indukční betalaktamázy.
- Podávání výsledků by mělo být s určitým komentářem - např.: V testu se izolát prokázal jako producent indukční betalaktamázy, což může *in vivo* způsobit rezistenci k betalaktamovým antibiotikům.

Detekce ESBL

Průkaz betalaktamáz se širokým spektrem účinku (ESBL=Extended Spectrum Beta-Lactamases u gramnegativních tyčec

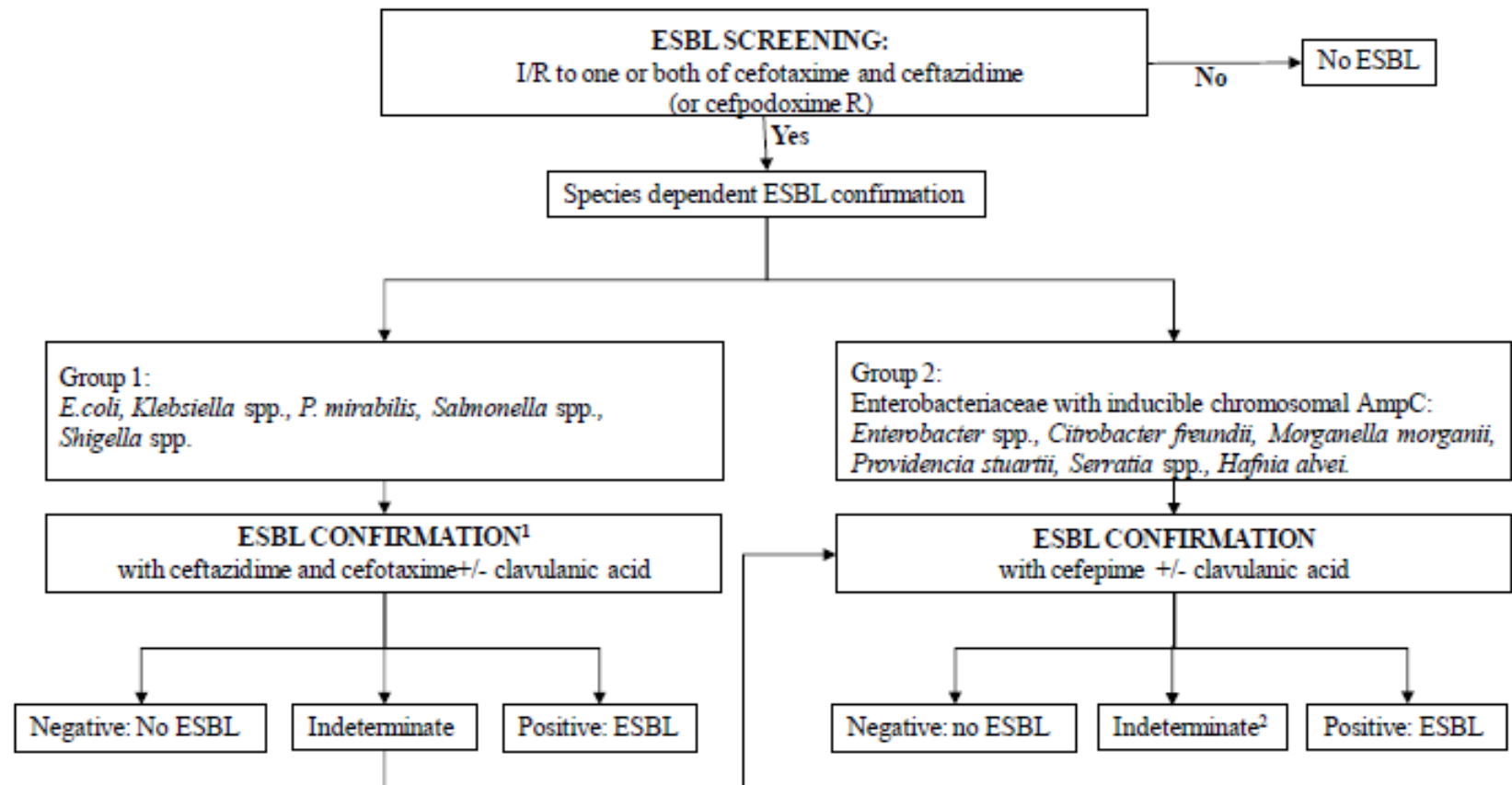
- Metoda je vhodná zejména pro testování kmenů, u nichž je předpoklad produkce širokospektré betalaktamázy (např. na základě rutinního testování kmene diskovou difúzní metodou s betalaktamovými antibiotiky).
- Test pro průkaz širokospektré betalaktamázy má omezený význam a jeho využití je možné jen v souladu s klinickými a epidemiologickými údaji.

Princip detekce ESBL

- Širokospektré betalaktamázy jsou schopné rozkládat cefalosporiny 3. generace, aztreonam a další betalaktamová antibiotika.
- Vyskytují se zejména u druhů *Klebsiella pneumoniae* a *Escherichia coli*.
- Kmeny produkující širokospektré betalaktamázy jsou obvykle rezistentní i k dalším antibiotikům.
- Při rutinním testování citlivosti diskovým difúzním testem se tyto kmeny mohou jevit jako citlivé k betalaktamovým antibiotikům.
- Na rozdíl od induktivní betalaktamáz je většina širokospektrých betalaktamáz inhibována kyselinou klavulanovou.
- Synergie účinku mezi kyselinou klavulanovou a určitým betalaktamovým antibiotikem je využívána při laboratorním průkazu širokospektré betalaktamázy.

- **Odečítání a hodnocení**
- Synergie mezi inhibitorem betalaktamázy a substrátem se projeví zvětšením inhibiční zóny v oblasti společné difúze a zesiluje podezření na produkci širokospektrých betalaktamáz.
- **zvětšení inhibiční zóny** v oblasti společné difúze - **kmen je producentem ESBL**
- inhibiční zóna **není zvětšena** v oblasti společné difúze - **kmen není producentem ESBL**

Figure 1. Algorithm for phenotypic detection of ESBLs



¹If cefoxitin has been tested and has an MIC >8 mg/L, perform cefepime +/- clavulanic acid confirmation test

²Cannot be determined as either positive or negative (e.g. if the strip cannot be read due to growth beyond the MIC range of the strip or no clear synergy in combination-disk and double-disk synergy tests). In case confirmation with cefepime +/- clavulanic acid is still indeterminate genotypic testing is required

ESBL – enterobakterie - EUCAST-XII/2013

Table 1. ESBL screening methods for Enterobacteriaceae (12-18).

Method	Antibiotic	Conduct ESBL-testing if
Broth or agar dilution ¹	Cefotaxime/ceftriaxone AND Ceftazidime	MIC >1 mg/L for either agent
	Cefpodoxime	MIC >1 mg/L
Disk diffusion ¹	Cefotaxime (5 µg) or Ceftriaxone (30 µg) AND Ceftazidime (10 µg)	Inhibition zone < 21 mm Inhibition zone < 23 mm Inhibition zone < 22 mm
	Cefpodoxime (10 µg)	Inhibition zone < 21 mm

¹ With all methods either test cefotaxime or ceftriaxone AND ceftazidime OR cefpodoxime can be tested alone.

Table 2. ESBL confirmation methods for Enterobacteriaceae that are positive in the ESBL screening test (see Table 1). Group 1 Enterobacteriaceae (see Figure 1).

Method	Antimicrobial agent (disk content)	ESBL confirmation is positive if
ESBL gradient test	Cefotaxime +/- clavulanic acid	MIC ratio ≥ 8 or deformed ellipse present
	Ceftazidime +/- clavulanic acid	MIC ratio ≥ 8 or deformed ellipse present
Combination disk diffusion test (CDT)	Cefotaxime (30 μg) +/- clavulanic acid (10 μg)	≥ 5 mm increase in inhibition zone
	Ceftazidime (30 μg) +/- clavulanic acid (10 μg)	≥ 5 mm increase in inhibition zone
Broth microdilution	Cefotaxime +/- clavulanic acid (4 mg/L)	MIC ratio ≥ 8
	Ceftazidime +/- clavulanic acid (4 mg/L)	MIC ratio ≥ 8
	Cefepime +/- clavulanic acid (4 mg/L)	MIC ratio ≥ 8
Double disk synergy test (DDST)	Cefotaxime, ceftazidime and cefepime	Expansion of indicator cephalosporin inhibition zone towards amoxicillin-clavulanic acid disk

Table 3. ESBL confirmation methods for Enterobacteriaceae that are positive in the ESBL screening (see Table 1). Group 2 Enterobacteriaceae (see Figure 1).

Method	Antibiotic	Confirmation is positive if
ESBL gradient test Etest ESBL	Cefepime +/- clavulanic acid	MIC ratio ≥ 8 or deformed ellipse present
Combination disk diffusion test	Cefepime (30 μg) +/- clavulanic acid (10 μg)	≥ 5 mm increase in inhibition zone
Broth microdilution	Cefepime +/- clavulanic acid (fixed concentration 4 mg/L)	MIC ratio ≥ 8
Double disk synergy test (DDST)	Cefotaxime, ceftazidime, Cefepime	Expansion of indicator cephalosporin inhibition zone towards amoxicillin-clavulanic acid disk

3.4.3 Phenotypic detection of ESBL in the presence of other β -lactamases that mask synergy

ESBL a E-test

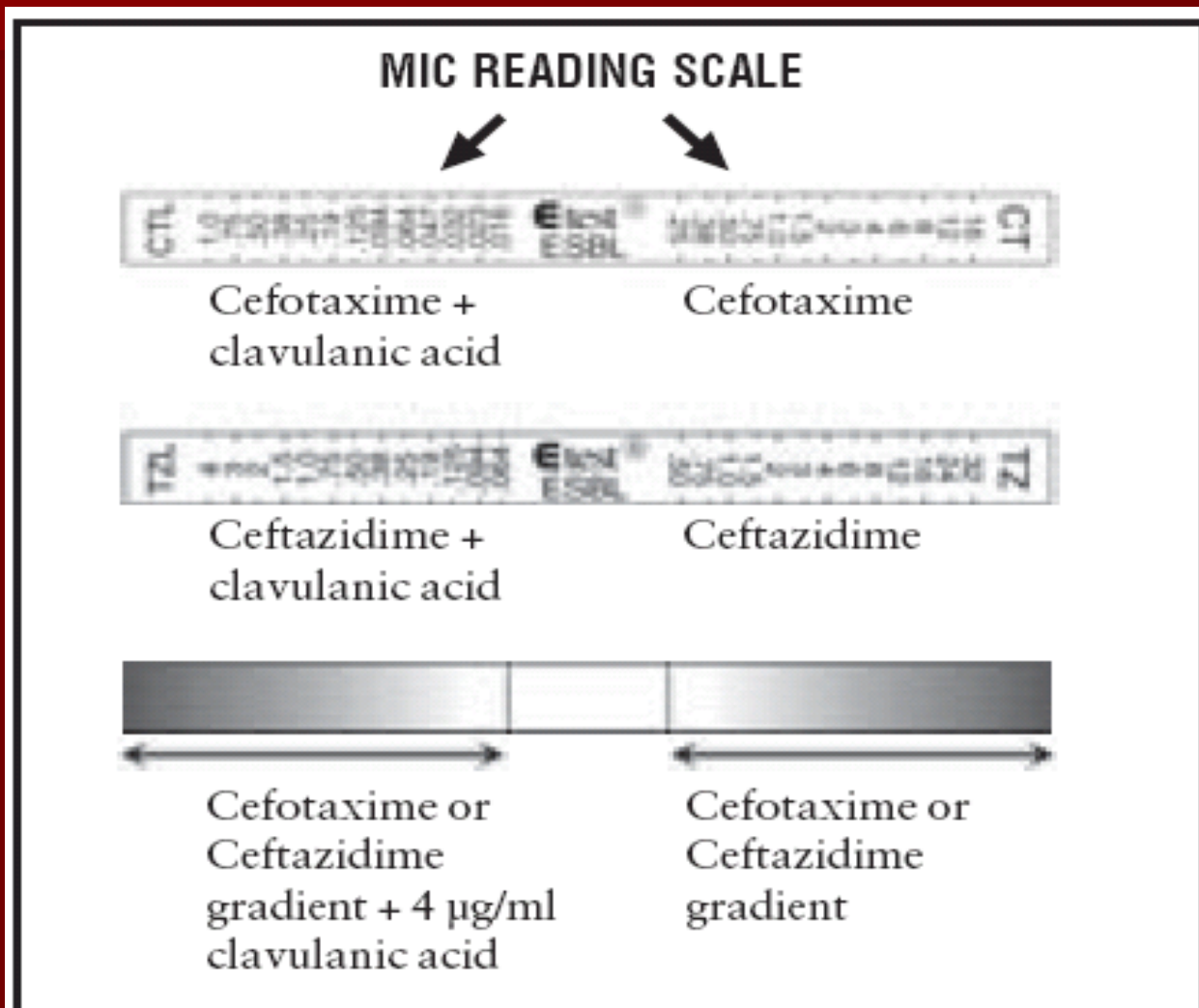


Figure 1. Configuration of Etest ESBL strips

Pozitivní ESBL



Figure 4. Clear cut ESBL positive:
MIC CT/CTL = 1.5/0.047 = 32



Figure 5. A "rounded" phantom inhibition zone below CT indicative of ESBL.



Figure 6. Deformation of the TZ inhibition ellipse indicative of ESBL.

ESBL	MIC $\mu\text{g/ml}$ Ratio	Reporting
Positive	$CT \geq 0.5$ and $CT/CTL \geq 8$ OR $TZ \geq 1$ and $TZ/TZL \geq 8$ OR "Phantom" zone or deformation of the CT or TZ ellipse.	ESBL producer and resistant to all penicillins, cephalosporins and aztreonam (NCCLS M100-S series).
Negative	$CT < 0.5$ or $CT/CTL < 8$ AND $TZ < 1$ or $TZ/TZL < 8$	ESBL non-producer and report actual MIC of all relevant drugs as determined by an MIC method.
Non determinable (ND)	$CT > 16$ and $CTL > 1$ AND $TZ > 32$ and $TZL > 4$ OR When one strip is ESBL negative and the other ND.	ESBL non determinable and report actual MIC of all relevant drugs as determined by an MIC method. If ESBL is suspected, confirm results with an NCCLS method and/or genotyping.

Examples of how to interpret MIC ratios:

CT/CTL	$8/0.125 = 64$	= ESBL +
TZ/TZL	$>32/<0.064 = >500$	= ESBL +
CT/CTL	$1/<0.016 = >62$	= ESBL +
CT/CTL	$4/>1 = <4$	= ESBL -
TZ/TZL	$0.5^{1)}/0.25$	= ESBL -
CT/CTL	$0.25^{1)}/0.19$	= ESBL -
TZ/TZL	$1/4^{2)}$	= ESBL -
TZ/TZL	$>32/>4$	= ND ³⁾
CT/CTL ESBL negative and TZ/TZL ND		= ND ⁴⁾

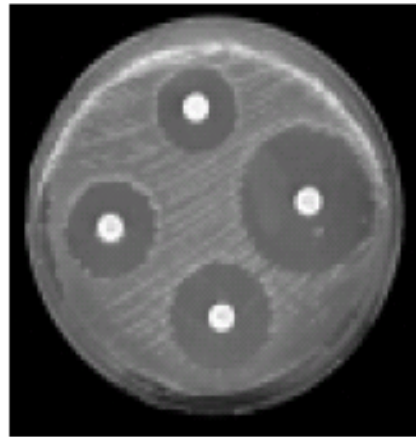
CT = cefotaxim

CTL = cefotaxim + kyselina klavulanová

TZ = ceftazidim

TZL = ceftazidim + kyselina klavulanová

Figure 1. ESBL-producing *Proteus mirabilis*. Susceptibility by agar diffusion method



Inhibition zone diameters

- Aztreonam 36 mm
- Ceftriaxone 26 mm
- Cefotaxime 24 mm
- Ceftazidime 28 mm

Figure 2. ESBL-producing *Proteus mirabilis*. Detection by double-disk synergy test

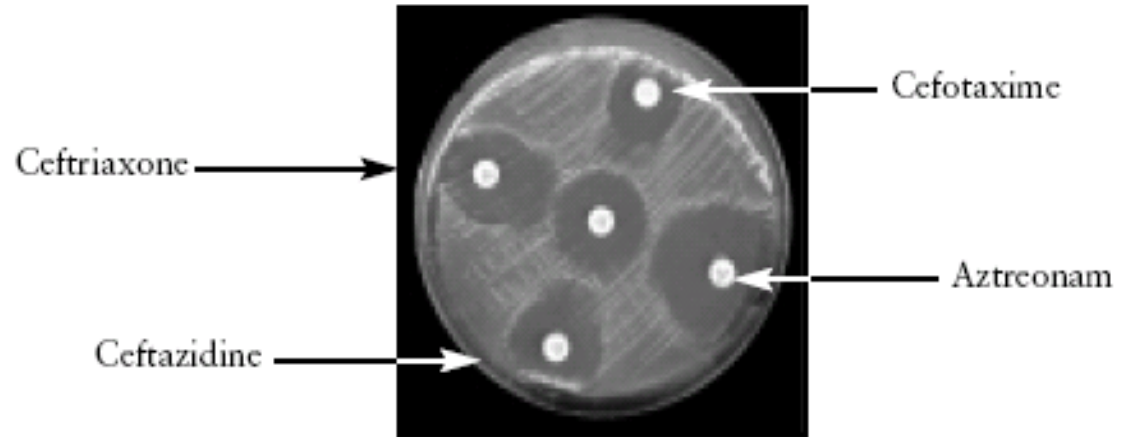


Figure 3. ESBL-producing *Proteus mirabilis*. Synergy between ceftazidime and clavulanic acid (Etest)

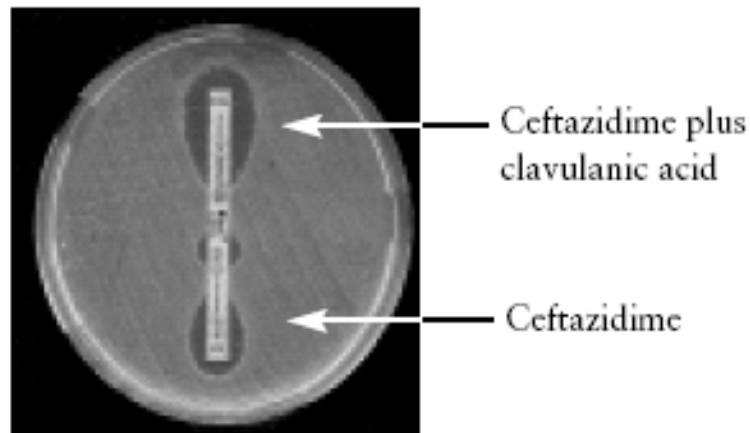
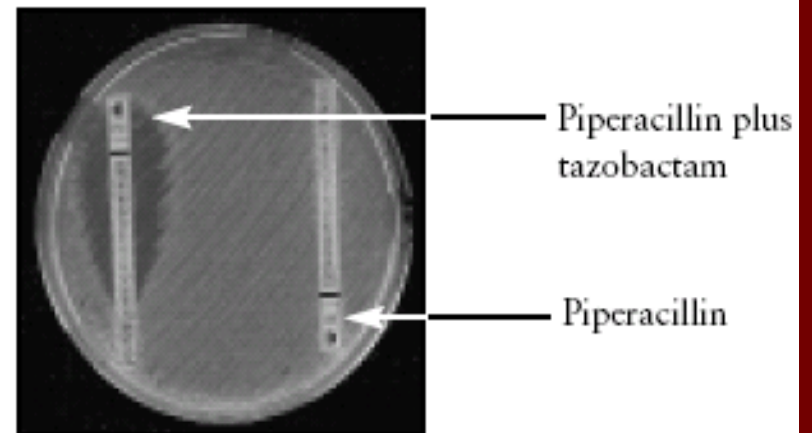
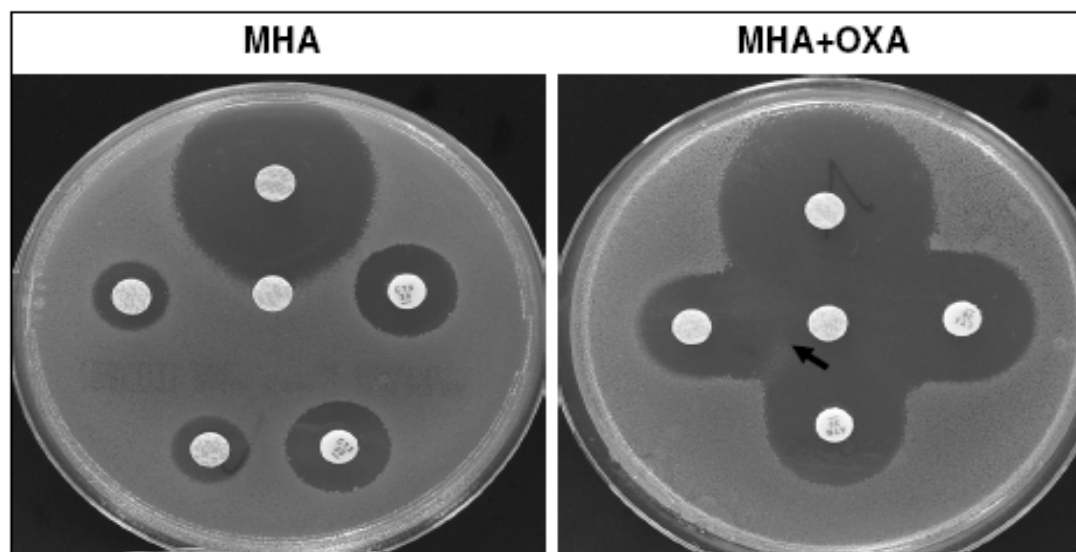


Figure 4. ESBL-producing *Proteus mirabilis*. Restored activity of piperacillin by tazobactam



Tabulka 3: Konstitutivní produkce AmpC a ESBL.
Kmen *Morganella morganii* dobře citlivý
ke karbapenemům ($MIC_{MER} \leq 0,125 \mu\text{g/ml}$).
Referenční kmen CNCTC 7375



Interpretace:

- Kmen je producentem ESBL: Na MHA+OXA je zřejmá deformace IZ směrem k disku s AMC (šipka označuje náznak hranice IZ).
- Kmen je konstitutivním producentem AmpC: Na MHA+OXA je zřejmé zvětšení IZ u cefalosporinů třetí generace, v porovnání s MHA.

Poznámky:

- Na MHA nejsou patrné žádné synergie mezi cefalosporiny a k. klavulanovou.
- ESBL není na MHA detekovatelná, ani mezi FEP a AMC, který pravděpodobně není přítomnou AmpC hydrolyzován.

Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly?

David M. Livermore^{1,2*}, Jenny M. Andrews³, Peter M. Hawkey⁴, Pak-Leung Ho⁵, Yoram Keness⁶, Yohei Doi⁷, David Paterson⁸ and Neil Woodford²

¹Norwich Medical School, University of East Anglia, Norwich, UK; ²Antibiotic Resistance Monitoring & Reference Laboratory, Health Protection Agency—Colindale, London, UK; ³Department of Microbiology, Sandwell and West Birmingham NHS Trust, City Hospital, Birmingham, UK; ⁴School of Immunity and Infection, The Medical School, University of Birmingham, Edgbaston, Birmingham, UK; ⁵Department of Microbiology and Carol Yu Centre for Infection, The University of Hong Kong, Queen Mary Hospital, Hong Kong SAR, China; ⁶Clinical Microbiology Laboratory, Emek Medical Center, Afula, Israel; ⁷Division of Infectious Diseases, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA, USA; ⁸University of Queensland Centre for Clinical Research, Royal Brisbane and Women's Hospital Campus, Brisbane, Australia

*Corresponding author. Norwich Medical School, University of East Anglia, Norwich NR4 7TJ, UK. Tel: +44-(0)1603-597568; Fax: +44-(0)20-83276264; E-mail: d.livermore@uea.ac.uk

Recent EUCAST advice asserts that, with low breakpoints, susceptibility results for cephalosporins and carbapenems can be reported 'as found', even for strains with extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and carbapenemases. The CLSI has similar advice, but with higher ceftazidime and cefepime breakpoints than those of EUCAST. Pharmacodynamic and animal data are used to support these views, along with some analysis of clinical case series. We contend that such advice is misguided on three counts. **First**, whilst there are cases on record where cephalosporins and carbapenems have proved effective against infections due to low-MIC ESBL producers and low-MIC carbapenemase producers, respectively, there are similar numbers of cases where such therapy has failed. **Second**, routine susceptibility testing is less precise than in research analyses, meaning that ESBL and carbapenemase producers with 'real' MICs of 1–8 mg/L will oscillate between susceptibility categories according to who tests them and how. **Third**, although EUCAST continues to advocate ESBL and carbapenemase detection for epidemiological purposes, the likely consequence of not seeking these enzymes for treatment purposes is that some laboratories will not seek them at all, leading to a loss of critical infection control information. In short, it is prudent to continue to seek ESBLs and carbapenemases directly

Konfirmace ESBL genetickými metodami

- **PCR a ESBL gene sequencing**
- DNA microarray-based method:
- Recent evaluations of the **Check-KPC ESBL microarray** (Check-Points, Wageningen, The Netherlands) with different collections of organisms covering the majority of known ESBL genes showed good performance
- Test results are usually obtained within 24 hours.
- It should be noted that sporadically occurring ESBL genes and new ESBL genes are not detected by this microarray.

ESBL ... a další širokospektré betalaktamázy vs citlivost ke kombinaci s inhibitorem betalaktamázy (I)

■ **ESBL (CTX-M, TEM, SHV) :**

- hydrolyzují většinu pnc a cefalosporinů, včetně oxyimino-beta-laktamy (cefuroxim, 3. A 4. generace cefalosp a aztreonam) ... nikoliv však cefamyciny a karabapenemy ...

■ **Dle klasifikace podle Amblera patří do A skupiny (např. CTX-M ... jsou (většinou?) inhibovány klavulanovou (či jinými inhibitory beta-laktamáz jako sulbaktamem a tazobaktamem...)) a tudíž by měly být amox/clav dle fenotypového rozlišování (a klinických breakpointů) považovány většinou za citlivé ? či nelze takto generalizovat a jiný mechanismus rezistence, který může být současně přítomen může způsobit ve finále amox/clav rezistenci (ted' nemáme na mysli faktory organismu pacienta (např. biologickou dostupnost léčiva do místa infekce či PK parametry) :**

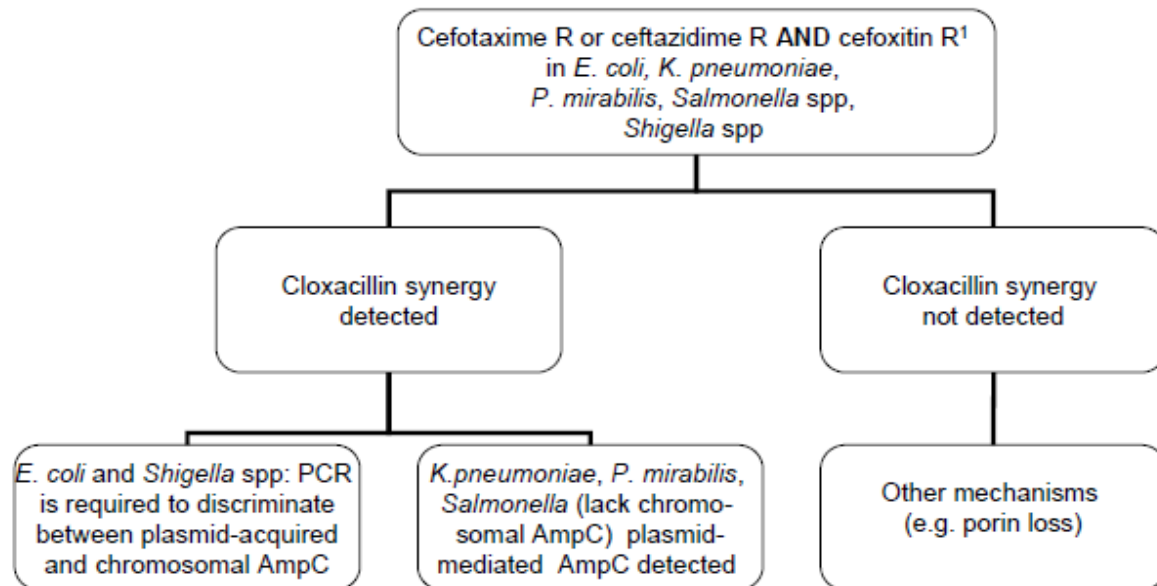
- u těchto izolátů se projevuje efekt inokula.
- Hrabák a kol. dělal jednu studii na toto téma, kde změna MIC v případě různé koncentrace bakterií byla opravdu velká. Jde o to, že se k. klavulanová kovalentně naváže na beta-laktamázu. V případě vyšší exprese není koncentrace k. klavulanová dostatečná.

ESBL ... a další širokospektré betalaktamázy vs citlivost ke kombinaci s inhibitorem betalaktamázy (I)

- **AmpC**, které hydrolyzují pnc, cefalosporiny (většinu) i cefamyciny, monobakt ... nejsou inhibovány klavulanovou (či jinými inhibitory beta-laktamáz ...) a tudíž by měly být amox/clav rezistentní =>
 - u producentů AmpC jsou kombinace beta-laktamu s inhibitorem neefektivní vždy (snad pouze při nízké expresi mohou být MIC nižší).
- **MBL(=metalobetalaktamázy)** : nejsou inhibovány klavulanovou (či jinými inhibitory beta-laktamáz ...) a tudíž by měly být amox/clav rezistentní
 - u producentů MBL je kombinace rezistentní vždy.
- **KPN**: inhibovány velmi slabě klavulanovou (či jinými inhibitory beta-laktamáz ...) a tudíž by měly být amox/clav (klinicky) rezistentní.
 - Inhibice k. klavulanovou se většinou významně fenotypově neprojevuje. Lze jí prokázat pouze na základě kinetických měření, ale ne fenotypově.
- **OXA**: nejsou inhibovány klavulanovou (či jinými inhibitory beta-laktamáz ...) a tudíž by měly být amox/clav rezistentní VIM, NDM a další .
 - Rezistence se i tady projevuje poměrně jednoznačně.

AmpC detekce ...

Figure 1. Algorithm for AmpC detection.

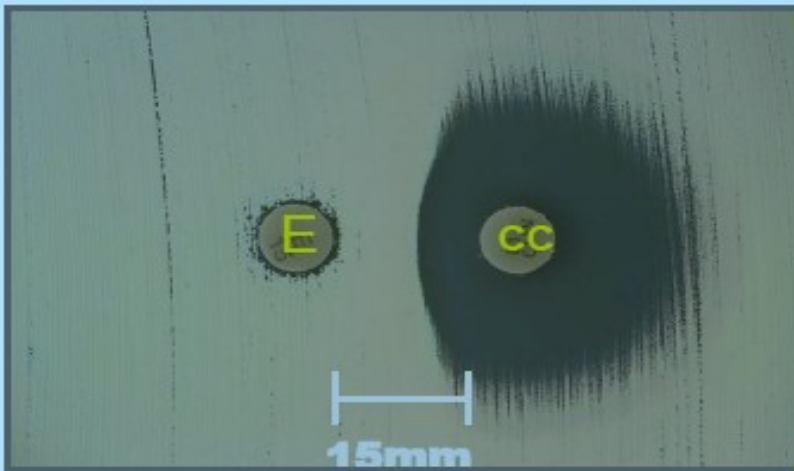


¹Cefoxitin R is here defined as non-wild type (MIC >8 mg/L or zone diameter <19 mm). Investigation of isolates with non-susceptibility to cefotaxime and ceftazidime is an approach with higher sensitivity but lower specificity compared with focusing on cefoxitin resistant isolates (7). AmpC can also be present in isolates with a positive ESBL-test (clavulanic acid synergy). It could therefore be relevant to carry out testing regardless of the result of the ESBL test. For laboratories not testing cefoxitin, susceptible to cefepime together with resistant to cefotaxime and/or ceftazidime is another phenotypic indicator of AmpC, although less specific.

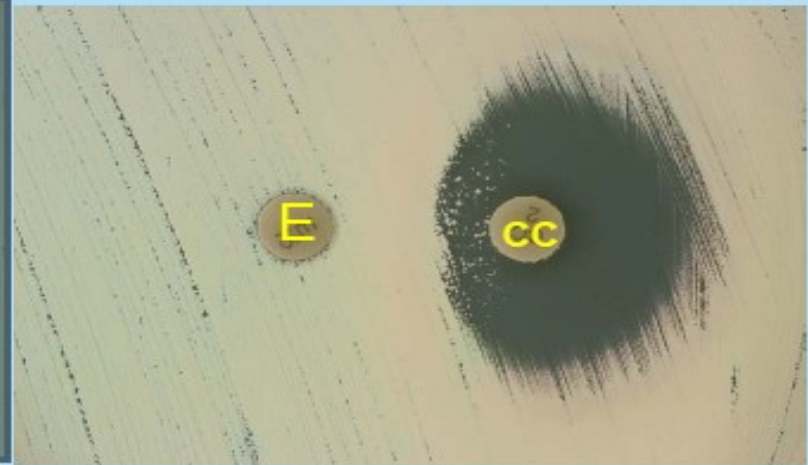
Detekce inducibilní rezistence ke klindamycinu u stafylokoků

- Klindamycin je perorální antimikrobikum začalo se více používat pro komunitní MRSA
- Problém: Mnoho erythromycin rezistentních a klindamycin citlivých má:
 - inducibilní rezistenci ke klindamycinu
 - *ermA ermA/B/C /C*
- Jiné zůstávají citlivé ke klindamycinu *msrA*
- Potřeba otestovat, které kmeny lze ještě léčit klindamycinem
- Řešení: "D-zone" test = umístit ERY a KLI disky 15-26 mm od sebe => snadné a levné, odečíst po 24 hodinách

Examples of Clindamycin Resistance Induction: “D-Zone Test”



ErmA

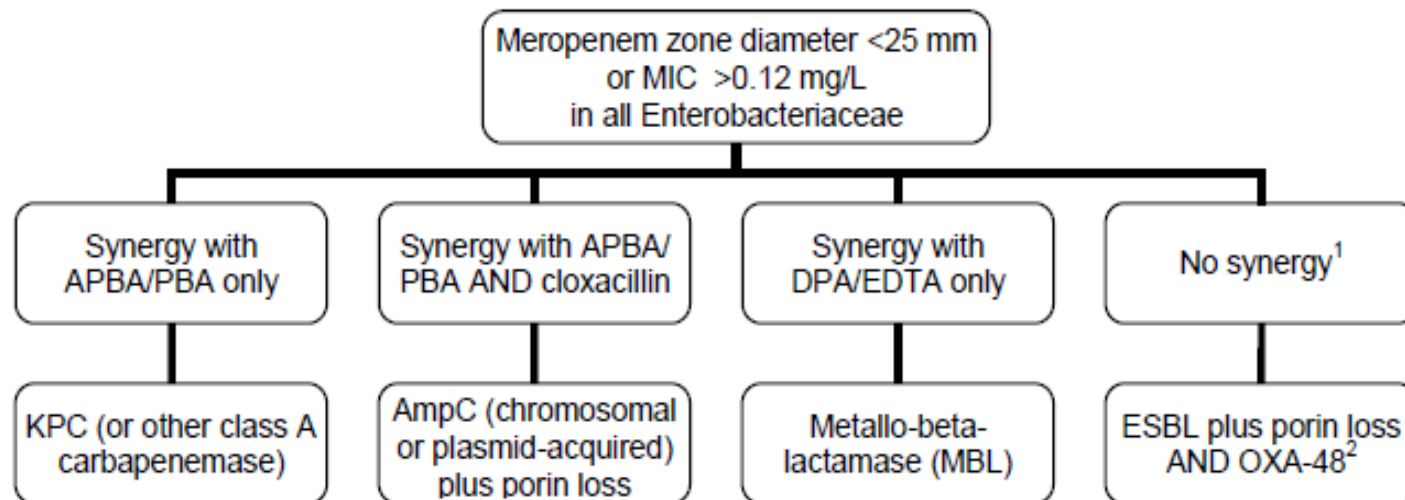


ErmC

Disks can be placed in inner ring of disk dispenser

Algoritmus detekce karbapenemáz

Figure 1. Algorithm for carbapenemase detection.



Abbreviations: APBA=aminophenyl boronic acid, PBA=phenyl boronic acid, DPA=dipicolinic acid, EDTA=ethylenediaminetetraacetic acid (all of them β -lactamase inhibitors added to disks or tablets containing meropenem in combination disk testing assays)

¹ Combination of KPC and MBL may not show synergy but isolates are normally highly resistant to carbapenems. They are easiest to detect with molecular methods.

² High-level temocillin resistance [MIC >32 mg/L (12, 18), tentative zone diameter <11 mm with temocillin 30 μ g disk (17)] are phenotypic indicators of OXA-48 production, which should be considered in the absence of synergy with inhibitors of class A and B carbapenemases.

Karabapenemázy EUCAST 2013

Table 1. Clinical breakpoints and screening cut-off values for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (according to EUCAST methodology).

Carbapenem	MIC (mg/L)		Disk diffusion zone diameter (mm) with 10 µg disks	
	S/I breakpoint	Screening cut-off	S/I breakpoint	Screening cut-off
Meropenem ¹	≤2	>0.12	≥22	<25 ²
Imipenem ³	≤2	>1	≥22	<23
Ertapenem ⁴	≤0.5	>0.12	≥25	<25

¹Best balance of sensitivity and specificity

²In some cases zone diameters for OXA-48-producers are up to 26 mm, so <27 mm may be used as a screening cut-off in countries where OXA-48 is endemic, but at the expense of lower specificity.

CLSI screen pro producenty karbapenemáz

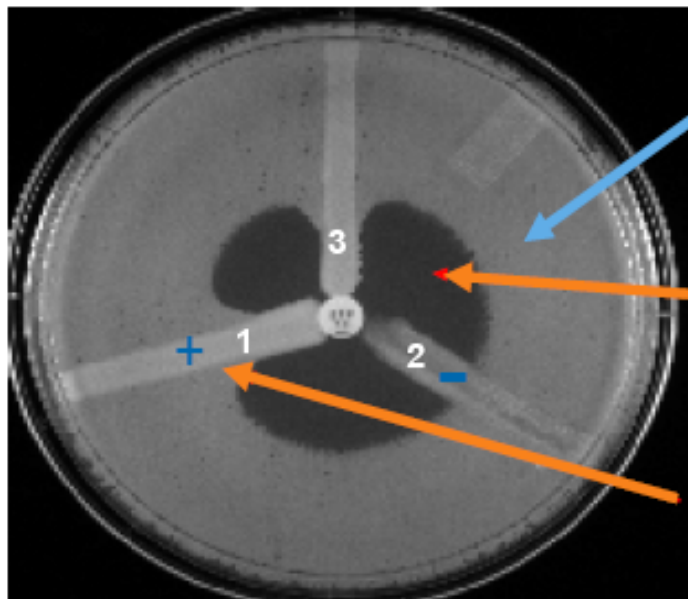
CLSI Screening Criteria for Identifying Carbapenemase Producers (including KPCs)

	Standard CLSI susceptible breakpoints		Values suggesting carbapenemase activity*	
	MIC (µg/mL)	Disk (mm)	MIC (µg/mL)	Disk (mm)
Ertapenem	≤2	≥19	2	19-21
Imipenem	≤4	≥16	2-4	N/A†
Meropenem	≤4	≥16	2-4	16-21

Perform a Modified Hodge Test

† N/A, not applicable (poor test performance)

Carbapenem Inactivation Assay (Modified Hodge Test)



E. coli ATCC® 25922

Inhibition of *E. coli* ATCC® 25922 by ertapenem

Enhanced growth of *E. coli* ATCC® 25922. Carbapenemase produced by *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1705 inactivated ertapenem that diffused into the media. Thus, there is no longer sufficient ertapenem here to inhibit *E. coli* ATCC® 25922 and an indentation of the zone is noted.

Figure 1. The MHT performed on a small MHA plate

(1) *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1705, positive result;
(2) *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1706, negative result;
and (3) a clinical isolate, positive result

New QC strains

Polymyxin test ... nefunguje u všech druhů mikroorganismů !

Polymyxin Testing of *P. aeruginosa*

Examples of Etest Colistin and Polymyxin results

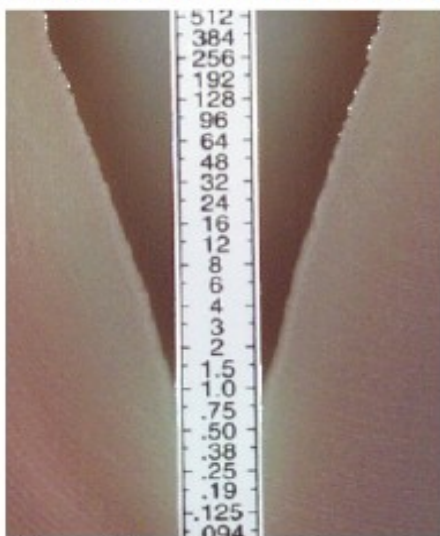


Figure 1. Sharp endpoint.
P. aeruginosa, MIC 1.0 µg/mL

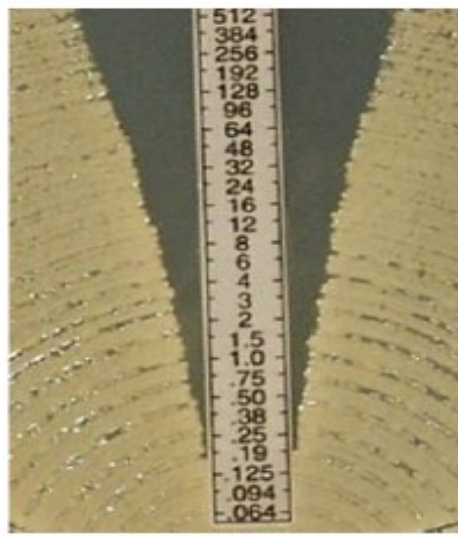


Figure 2. Slim ellipse.
P. aeruginosa, MIC 0.19 µg/mL

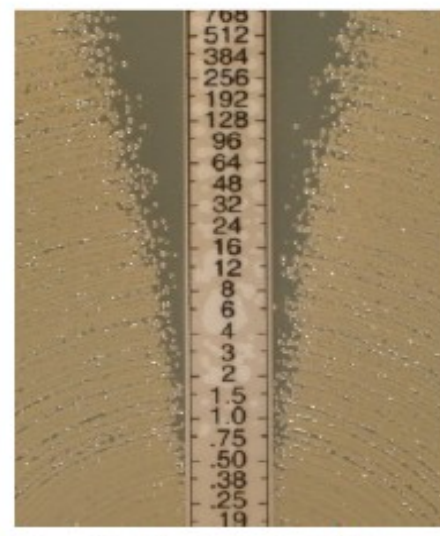


Figure 3. Colonies in the "dip".
S. maltophilia, MIC 16 µg/mL

CLSI breakpoints:

MIC ≤ 2 , S; 4, I; ≥ 8 R

Disk ≤ 11 R; ≥ 12 S

EUCAST breakpoints:

MIC < 2 S; > 2 R

Penicilin necitlivé kmeny

Streptococcus pneumoniae

- *S. pneumoniae* – snižená C k PNC (MICs větší než u divoký(wild type) kmenů tj. >0.06 mg/L
- Přítomnost modifikovaných penicillin-binding proteins (PBPs) s nižší afinitou k betalaktamům

Table 1. Screening for β -lactam resistance in *S. pneumoniae*

Zone diameter (mm) with oxacillin (1 μ g)	Antimicrobial agents	Further testing and/or interpretation
≥ 20 mm	All β -lactam agents for which clinical breakpoints are listed (including those with "Note")	Report susceptible irrespective of clinical indication, except for cefaclor, which if reported, should be reported intermediate
< 20 mm*	Benzylpenicillin (meningitis) and phenoxymethylpenicillin (all indications)	Report resistant.
	Ampicillin, amoxicillin and piperacillin (with and without β -lactamase inhibitor), cefotaxime, ceftriaxone, ceftaroline and cefepime.	Oxacillin zone diameter ≥ 8 mm: Report susceptible. In meningitis: confirm by determining the MIC of the agent considered for clinical use
		Oxacillin zone diameter < 8 mm: determine the MIC of the β -lactam agent intended for clinical use but for ampicillin, amoxicillin and piperacillin (without and with β -lactamase inhibitor) infer susceptibility from the MIC of ampicillin.
Other β -lactam agents (including benzylpenicillin for infections other than meningitis)	Test by an MIC method for the agent considered for clinical use and interpret according to the clinical breakpoints	

*Oxacillin 1 μ g <20 mm: Always determine the MIC of benzylpenicillin but do not delay reporting of other β -lactams as recommended above.

Interpretace a reportování !

Table 2. Reporting of benzylpenicillin susceptibility in meningitis and non-meningitis.

Indications	MIC breakpoint (mg/L)		Notes
	S ≤	R >	
Benzylpenicillin (non-meningitis)	0.06	2	<p>In pneumonia, when a dose of 1.2 g x 4 is used, isolates with MIC ≤0.5 mg/L should be regarded as susceptible to benzylpenicillin.</p> <p>In pneumonia, when a dose of 2.4 g x 4 or 1.2 g x 6 is used, isolates with MIC ≤1 mg/L should be regarded as susceptible to benzylpenicillin.</p> <p>In pneumonia, when a dose of 2.4 g x 6 is used, isolates with MIC ≤2 mg/L should be regarded as susceptible.</p>
Benzylpenicillin (meningitis)	0.06	0.06	

Note: 1.2 g of benzylpenicillin is equal to 2 MU (million units) of benzylpenicillin

http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/Casto_kladené_otázky_eucast.pdf

EUCAST Často kladené otázky

26. února 2014

Často kladené otázky k dokumentům EUCAST

Máte další dotazy? Kontaktujte prosím
erika.matuschek@ltkronoberg.se

EUCAST diskový difuzní test – Půda

1. [Kterého výrobce Mueller-Hinton agaru doporučuje EUCAST?](#)
2. [Jaký je rozdíl mezi Mueller-Hinton agarem a Mueller-Hinton agarem II?](#)
3. [Je zapotřebí kontrolovat kvalitu každé nové šarže Mueller-Hinton agaru?](#)
4. [Lze použít ovčí krev místo koňské pro přípravu půdy MH-F?](#)
5. [Jaký \$\beta\$ -NAD lze použít?](#)
6. [Lze MH-F půdy použít pro gradientové testy?](#)

EUCAST news 2019

EUCAST News

Here you can find the latest news and updates from EUCAST.

15 May 2019

Reference method for the determination of MICs in Mycobacteria - Consultation

The EUCAST Subcommittee on Anti-Mycobacterial susceptibility testing

09 May 2019

General consultation on changing categorisation of some wild type distributions

EUCAST proposes that agents and species currently categorised as



European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

Routine and extended internal quality control
for MIC determination and agar dilution
for yeasts and moulds as recommended by EUCAST

Version 3.0, valid from 2019-04-04

This document should be cited as

"The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and agar dilution for yeasts and moulds as recommended by EUCAST. Version 3.0. 2019. <http://www.eucast.org>."



EUCAST Wide Consultation on the Revision of the Expert Rules – v3.2

Background

The development of new drugs, the emergence and dissemination of resistance mechanisms, the evolution of testing methods for bacterial resistance, and the increased availability of more accurate bacterial identification by methods such as mass spectrometry, have prompted EUCAST to prepare a new version of the expert rules document. A revised version of the first part, intrinsic resistances and exceptional phenotypes (v3.1), was published in September 2016 (http://www.eucast.org/expert_rules_and_intrinsic_resistance/).

The revision of the second part, the expert rules, has required longer discussion and is presented below.

Changes proposed

The main goal of the revision was the generation of rules that would have clinical consequences, i.e., those that would influence the therapeutic decision. This might be to (i) avoid the clinical use of a certain drug, (ii) to use it at a higher dose, (iii) to advocate for an alternative mode of administration, or (iv) to exercise caution with a specific drug. EUCAST thus sought clinical data that would allow such recommendations.

Many rules in the previous version (V2.0, Leclercq et al. 2013), notably those for aminoglycosides, lack such clinical data even though they are supported by laboratory observations. In addition, a recent re-analysis of the PK/PD data for aminoglycosides (Pheouani et al. 2019) has suggested

EUCAST News 2020

30 Apr 2020

Daptomycin guidance document updated

The EUCAST guidance document on the use of daptomycin in bloodstream

30 Apr 2020

Aminoglycoside rationale documents updated

Aminoglycoside rationale documents updated with new breakpoints and

30 Apr 2020

Cefiderocol breakpoints and AST methods now available.

Addendum: Cefiderocol breakpoints and AST methods (30 April,

29 Apr 2020

Newsletter from EUCAST VetCAST

A Newsletter (April 2020) from the EUCAST veterinary subcommittee

28 Apr 2020

Daptomycin in Enterococcus infections - EUCAST position paper in CMI

Daptomycin in the treatment of enterococcal bloodstream infections and

24 Apr 2020

Aminoglycoside guidance document updated

The guidance document on aminoglycoside dosing, first published 21 January

Expert rules and intrinsic resistance

EUCAST expert rules are a tabulated collection of expert knowledge on intrinsic resistances, exceptional resistance phenotypes and interpretive rules that may be applied to antimicrobial susceptibility testing in order to reduce errors and make appropriate recommendations for reporting particular resistances.

[EUCAST advice on intrinsic resistance and exceptional phenotypes v 3.2](#) (February, 2020).

The [previous version](#) (3.1 from September, 2016) is savailable for comparison.

Video k novým definicím S,I,R a ATU (Area of technical Uncertainty):

<https://www.youtube.com/watch?v=QX5jtbpsbgI&feature=youtu.be>

Intrinsic Resistance and Unusual Phenotypes version 3.2

February 2020

Table 4 Intrinsic resistance in gram-positive bacteria. Gram-positive bacteria are also intrinsically resistant to aztreonam, temocillin, polymyxin B/colistin and nalidixic acid

Rule	Organisms	Fusidic acid	Ceftazidime	Cephalosporins (except ceftazidime)	Aminoglycosides	Macrolides	Clindamycin	Quinupristin- dalbavancin	Vancomycin	Teicoplanin	Fosfomycin	Novobiocin	Sulfonamides
4.1	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	R	R								R	R	
4.2	<i>Staphylococcus cohnii</i>		R									R	
4.3	<i>Staphylococcus xylosus</i>		R									R	
4.4	<i>Staphylococcus capitis</i>		R								R		
4.5	Other coagulase-negative staphylococci and <i>S. aureus</i>		R										
4.6	<i>Streptococcus</i> spp.	R	R		R ¹								
4.7	<i>Enterococcus faecalis</i>	R	R	R	R ¹	R	R	R					R
4.8	<i>Enterococcus gallinarum</i> , <i>Enterococcus casseliflavus</i>	R	R	R	R ¹	R	R	R	R				R
4.9	<i>Enterococcus faecium</i>	R	R	R	R ^{1,2}	R							R
4.10	<i>Corynebacterium</i> spp.										R		
4.11	<i>Listeria monocytogenes</i>		R	R									
4.12	<i>Leuconostoc</i> spp., <i>Pediococcus</i> spp.								R	R			
4.13	<i>Lactobacillus</i> spp. (<i>L. casei</i> , <i>L. casei</i> var. <i>rhamnosus</i>)								R	R			

¹ Low-level resistance (LLR) to aminoglycosides. Combinations of aminoglycosides with cell wall inhibitors (penicillins and glycopeptides) are synergistic and bactericidal against isolates that are susceptible to cell wall inhibitors and do not display high-level resistance to aminoglycosides

² In addition to LLR to aminoglycosides, *Enterococcus faecium* produces a chromosomal AAC(6')-I enzyme that is responsible for the loss of synergism between aminoglycosides (except gentamicin, amikacin and streptomycin) and penicillins or glycopeptides

Rychlé AST z krevních kultur (2019)

- Přímo z lahviček s krevní kulturou, kde je zjištěn nárůst
- EUCAST metodika – krátká inkubace (4, 6 a 8 hod)
- Inoculace přímo na PM pro diskovou difuzní metodu (MH, MH-F)
- Inokulační objem 100 - 150 μ L z pozitivní kultivace krve – ze systémů: BD, bioMerieux and Thermo Fisher.
- Bez centrifugace nebo ředění inokula - naočkování misek metodicky shodně jako bujónem/fyz roztokem standardně jako u jiných EUCAST disk diffuzí
- **Zkrácená inkubace 4, 6 a 8 hod – adaptovaná klinická interpretační kritéria pro každý čas inkubace a každou bakteriální species !!!**
- Identifikace tedy nutná, abychom mohli správně odečíst výsledky pro jednotlivé species bakterií
- Průměry zón odečítat po sejmutí víčka z lícové strany

Rychlé AST z krevních kultur (II)

- Metodika v současnosti validována pro:
 - *Escherichia coli*
 - *Klebsiella pneumoniae*
 - *Pseudomonas aeruginosa*
 - *Staphylococcus aureus*
 - *Streptococcus pneumoniae*
 - *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*
 - *Acinetobacter baumannii* (**added 2 May, 2019**)
- Pozitivní krevní kulturu zpracovat do 0 - 18 hod po rozpoznání positivity.
- Každá species má sekce v interpretační tabulce (4, 6 a 8 hod)
- Ne všechny odečty zón lze provádět již po 4 hod ! Znovu odečet po 6 a 8 hod! **Odečet pouze mohou-li být identifikovány jasné okraje inhibičních zón.** Nelze prodloužit jednoduše inkubaci – pokud je pro nejednoznačnost výsledků nutné udělat standardní kultivaci.
- Specifické interpretace dle EUCAST Rapid AST- nesmí se používat interpretace AST pro standardní přípravu inokula z pevných médií - kolonií

EUCAST latest changes: – rychlý proklik

- [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](#)
- [AST of bacteria](#)
- [AST of mycobacteria](#)
- [AST of fungi](#)
- [AST of veterinary pathogens](#)
- [Frequently Asked Questions \(FAQ\)](#)
- [Meetings](#)
- [Rationale documents and publications](#)
- [Presentations and statistics](#)
- [Videos and online seminars](#)
- [Warnings!](#)
- [Translations](#)
- [Information for industry](#)
- [Links and Contacts](#)
- [Website changes](#)

QUICK NAVIGATION ▾

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST

Latest Changes

Title	Description	Major	Minor	Date
Additional agents in EUCAST RAST	Breakpoints for several agents have been added to the RAST tables. Breakpoint and QC tables, methodology documents and calibration files have all been updated.	✓		2023/04/25
Zone diameter distributions re-calibrated	A new algorithm and software has been created through which wild type inhibition zone diameter distributions can be calculated and ECOFFs allocated.	✓		2023/04/25
General committee meetings 2022 and 2023	The EUCAST annual General Committee meeting is open to anyone attending ECCMID. Minutes will eventually be posted. Minutes from the 2022 committee meeting in Lisbon 2022 are available. EUCAST Annual General Committee Meeting, during ECCMID 2023 Monday 17 April, 9.30 – 10.30 am, Meeting Room: Room 173, Bella Sky Hotel.		✓	2023/04/08
QC-tables updated 13 March, 2023	The EUCAST QC tables have been updated and now contain new MIC ranges for <i>S. aureus</i> ATCC 29213 and <i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619 (ampicillin, amoxicillin, amoxicillin-clavulanic acid, chlortetracycline and oxytetracycline).	✓		2023/03/13
EUCAST uptake and maps of NACs updated for 2023			✓	2023/03/08
Vibrio spp. calibration file (MIC vs. disk diffusion) made available		✓		2023/02/24
Files demonstrating correlation between MIC and zone diameters updated.		✓		2023/02/20
EUCAST and the IVDR	EUCAST has prepared a statement in response to questions related to how the IVDR will affect users of EUCAST methods and guidance. The statement and a link to the directive are available at the EUCAST webpage. Translations to French and German are underway.	✓		2023/02/17
Consultation: added agents for anaerobic bacteria		✓		2023/02/10

Upozornění

Prezentace je určena výslovně pro účely výuky, použité fotografické materiály pocházejí z citovaných zdrojů:

- Web stránky EUCAST
- Web stránky ABBIODISC a
- E-test reading guide (vybrané slidy s fotografiemi E-testů)
- Prezentace není určena k dalšímu šíření.