



2018. XVIII. évfolyam 3. szám

Tartalom:

Az EUCAST ajánlásai a klinikai és/vagy epidemiológiai jelentőségű rezisztencia mechanizmusok és rezisztenciák detektálására

(Eredeti cím: EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance)

2.0 Verzió (2017. Július)

(Kiemelések: változások a legutóbbi dokumentumhoz képest)

A dokumentum 1.0 verzióját fordította:

Berta Brigitta¹ (7. fejezet), Jánvári Laura¹ (2. fejezet), Pongrácz Júlia² (6. és 8. fejezet), Tóth Ákos¹ (3. és 4. fejezet), Ungvári Erika¹ (5. fejezet)

¹Nemzeti Népegészségügyi Központ, ²Semmelweis Egyetem

A dokumentumot 2.0 verzióra frissítette: Tóth Ákos

Kiadja: Nemzeti Népegészségügyi Központ

A kiadó és a szerkesztőség székhelye: 1097 Budapest, Albert Flórián út 2-6.

Felelős kiadó: Dr. Szabó Enikő

Alapító szerkesztő:

Dr. Füzi Miklós (Ph.D.)

Dr. Gacs Mária

Felelős szerkesztő:

Pásztai Judit

Laboratóriumi Főosztály

Szerkesztő:

Áy Éva

Dr. Csire Márta (Ph.D.)

Erdősi Tímea

Dr. Tirczka Tamás

Dr. Tóth Ákos (Ph.D.)

Technikai szerkesztő:

Várkonyi Andrea

Olvasó szerkesztő:

Dr. Dencs Ágnes (Ph.D.)

Dr. Füzi Miklós (Ph.D.)

Készült a Nemzeti Népegészségügyi Központ nyomdájában
120 példányban

Nyomdavezető: Novák Anikó

ISSN 2063-9805 (Nyomtatott)

ISSN 2063-9813 (Online)

**A Mikrobiológiai Körlevelek az OEK honlapján
www.oek.hu elérhetőek**

Az EUCAST ajánlásai a klinikai és/vagy epidemiológiai jelentőségű rezisztencia mechanizmusok és rezisztenciák detektálására

(Eredeti cím: EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance)

2.0 verzió (2017. július)

A dokumentum 1.0 verzióját összeállító „Detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance” EUCAST albizottság tagjai:

Christian G. Giske (Svédország, EUCAST Irányító Bizottság és EARS-Net Koordinációs Csoport; elnök), Luis Martinez-Martinez (Spanyolország, EUCAST Irányító Bizottság), Rafael Cantón (Spanyolország, EUCAST elnöke), Stefania Stefani (Olaszország), Robert Skov (Dánia, EUCAST Irányító Bizottság), Youri Glupczynski (Belgium), Patrice Nordmann (Franciaország), Mandy Wootton (Egyesült Királyság), Vivi Miriagou (Görögország), Gunnar Skov Simonsen (Norvégia, EARS-Net Koordinációs Csoport), Helena Zemlickova (Cseh Köztársaság, EARS-Net Koordinációs Csoport), James Cohen-Stuart (Hollandia) és Marek Gniadkowski (Lengyelország)

1. Bevezetés

A „Detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance” albizottságot az EUCAST azzal a céllal hozta létre, hogy a klinikai és/vagy epidemiológiai jelentőségű rezisztencia mechanizmusok és rezisztenciák detektálására egy gyakorlati útmutatót állítson össze. Ez a dokumentum elsősorban a klinikai mikrobiológiai laboratóriumok számára készült, hogy segítse a jelentősebb rezisztenciák (és mechanizmusok) kimutatását a rutin diagnosztikában. Nem terjed ki az elsősorban referencia laboratóriumokban végzett molekuláris szintű rezisztencia mechanizmus vizsgálatok technikai leírásaira. Továbbá fontos kiemelni, hogy a dokumentum a multirezisztens kórokozók tünetmentes hordozásának szűrésével, valamint a multirezisztens mikroorganizmusok klinikai mintából történő direkt kimutatásával sem foglalkozik.

(Az eredeti dokumentum bevezetésének -helyhiány miatt- csak egy része, további fejezetei azonban teljes terjedelemben kerültek fordításra. A dokumentum fejezeteiben több helyen találhatóak zárójelek közt, dőlt betűvel írt megjegyzések, melyek nem az eredeti dokumentum részei, hanem a hazai Nemzeti Referencia Laboratóriumok kiegészítései.)

A dokumentum 1.0 verzióját fordította:

Berta Brigitta¹ (7. fejezet), **Jánvári Laura¹** (2. fejezet), **Pongrácz Júlia²** (6. és 8. fejezet), **Tóth Ákos¹** (3. és 4. fejezet), **Ungvári Erika¹** (5. fejezet)

¹Nemzeti Népegészségügyi Központ, ²Semmelweis Egyetem

A dokumentumot 2.0 verzióra frissítette: Tóth Ákos

2. Karbapenémáz-termelő *Enterobacteriaceae*

A rezisztencia mechanizmus detektálásának jelentősége	
Az antibiotikum érzékenység interpretálásához szükséges	Nem
Infekciókontroll tekintetében	Igen
Közegészségügy tekintetében	Igen

2.1 Definíció

A karbapenémázok olyan β -laktamázok, melyek képesek hidrolizálni a penicillineket és a legtöbb esetben a cefalosporinokat is. Emellett - különböző mértékben - képesek bontani a karbapenemeket és a monobaktámokat (ez utóbbit a metallo- β -laktamázok nem képesek hidrolizálni).

2.2 Klinikai és/vagy epidemiológiai jelentőség

Európában a karbapenémázok egyre jelentősebb terjedését a 1990-es évek második felétől figyelték meg néhány mediterrán országban, főleg *P. aeruginosa* törzsekben [1]. A 2000-es évek elején Görögországban először a VIM (Verona integron-encoded metallo- β -lactamase)-termelő [2], majd a KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase)-termelő *K. pneumoniae* vált epidémiássá. Jelenleg az OXA-48-típusú karbapenémázok alkotják a karbapenémázok leggyorsabban növekvő csoportját Európában [3]. Görögországban és Olaszországban az invazív mintákból származó *K. pneumoniae* izolátumok kb. 62%-a ill. 33%-a nem érzékeny karbapenemekre [4]. 2015-ben 38 európai országból 13 jelentette, hogy a karbapenémáz-termelő *Enterobacteriaceae* (CPE) epidemiológiai helyzete elérte a legsúlyosabb fokozatokat (régiók közötti terjedés, ill. endémiás helyzet) - 2013-ban ez az arány 6/38 volt. A résztvevő országok közül csak háromban nem detektáltak egyetlen CPE-t sem a 2015. évi felmérés szerint [3].

A New Delhi metallo- β -laktamáz (NDM) szintén jelentős karbapenémáz: bár az indiai szubkontinensen és a Közel-Keleten terjedt el leginkább, számos esetben importálták már Európába [3], sőt regionális terjedésről is beszámolt néhány ország [5]. Az IMP-típusú karbapenémázok szintén elterjedtek a világ néhány országában [6].

A karbapenémázok terjedése azért is ad okot az aggodalomra, mert amellett, hogy szinte valamennyi β -laktám antibiotikummal szemben rezisztenciát biztosítanak, könnyen terjednek horizontális átvitel útján. A karbapenémáz-termelő izolátumok gyakran számos más antibiotikum csoporttal szemben is rezisztensek, és az általuk okozott megbetegedések esetén magas a halálozási arány [7-9].

2.3 Rezisztencia mechanizmus

A legtöbb karbapenemáz szerzett enzim, terjedésük mobilis genetikai elemekhez (transzpozonok, plazmidok) köthető. A karbapenemázok különböző szinten expresszálódhatnak, biokémiai tulajdonságaikban és a különböző β -laktámokkal szembeni aktivitásukban is eltérhetnek. Az expresszió szintje, az enzim tulajdonságai és más rezisztencia mechanizmusokkal való kapcsolata (más β -laktamázok termelése, effluxpumpák működtetése és/vagy megváltozott permeabilitás) mind hozzájárul a karbapenemáz-termelő izolátumok körében tapasztalható változatos fenotípusok kialakulásához [10, 11].

A karbapenemekkel szembeni csökkent érzékenység az *Enterobacteriaceae* család tagjainál azonban nemcsak karbapenemáz-termelés következtében alakulhat ki. Karbapenemek iránti csökkent érzékenység kialakulhat még, pl. ha kiterjedt spektrumú β -laktamáz (ESBL)-termelés és/vagy AmpC enzim termelés kombinálódik porin módosulás miatti csökkent permeabilitással [12], vagy egyes penicillin-kötő fehérjéket érintő változások következtében [13].

A legtöbb karbapenemáz-termelő izolátum rezisztens a kiterjedt spektrumú (oxyimino) cefalosporinokkal szemben, és csökkent érzékenységet mutathatnak karbapenemekkel szemben is [14]. Egyes karbapenemázok (pl. az OXA-48-típusúak) nem teszik a törzset cefalosporinokkal szemben rezisztenssé. Azonban ezek az izolátumok gyakran cefalosporinázokat (pl. CTX-M-típusú ESBL-t) is termelnek, és akkor már rezisztenssé válnak cefalosporinokkal szemben is.

A karbapenemáz-termelő izolátumok járványügyi jelentősége nagy, különösen, ha valamennyi karbapenemmel (imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem) szemben csökkent érzékenységet mutatnak, azaz minimális gátlókoncentráció (MIC) értékük az EUCAST által meghatározott epidemiológiai cut-off (ECOFF) értékek felett van [15].

2.4 Javasolt módszerek a karbapenemázok kimutatására *Enterobacteriaceae* izolátumoknál

2.4.1 Karbapenemáz-termelés szűrése

A karbapenemáz-termelő *Enterobacteriaceae*-knél a karbapenem MIC értékek a klinikai breakpoint alatt lehetnek [14-16]. Azonban az EUCAST által meghatározott ECOFF értékek használhatók a karbapenemáz-termelő baktériumok szűrésére. A meropenem rendelkezik a legjobb szenzitivitással és specificitással a karbapenemáz-termelők szűrésére [14, 17]. Az ertapenem kiváló szenzitivitással rendelkezik, azonban a specificitása alacsony, különösen pl. az *Enterobacter* spp. esetén, ahol a kiterjedt spektrumú β -laktamázok és AmpC-típusú β -laktamázok termelődése porinvesztéssel kombinálódhat [14]. A karbapenemáz-termelők szűrésére ajánlott cut-off értékeket az 1. táblázat foglalja össze. Meg kell jegyezni, hogy a specificitás növelése érdekében az

imipenem és ertapenem screening cut-off értékek egy hígítási fokkal magasabbak, mint a jelenlegi ECOFF értékek.

1. táblázat. Klinikai breakpointok és screening cut-off értékek a karbapenemáz-termelő *Enterobacteriaceae* szűréséhez (az EUCAST ajánlása alapján)

Karbapenem	MIC (mg/L)		Korongdiffúziós gátlási zóna átmérő (mm) 10 µg-os korongok esetén	
	É/M breakpoint	Screening cut- off	É/M breakpoint	Screening cut- off
Meropenem ¹	≤2	>0,125	≥22	<28 ²
Ertapenem ³	≤0,5	>0,125	≥25	<25

¹A legjobb egyensúly szenzitivitás és specificitás között

²A 25-27 mm közötti meropenem gátlási zónával rendelkező izolátumokat akkor javasolt tovább vizsgálni, ha piperacillin/tazobactammal és/vagy temocillinnel (temocillin használata javítja a specificitást) szemben rezisztens az izolátum. Ha a meropenem gátlási zóna átmérője <25 mm, akkor minden esetben javasolt a karbapenemáz termelés vizsgálata.

³Magas szenzitivitás, de alacsony specificitás. Alternatívaként lehet használni a szűréshez, azonban az ESBL és/vagy AmpC-termelők karbapenemáz-termelés nélkül is lehetnek ertapenemmel szemben rezisztensek.

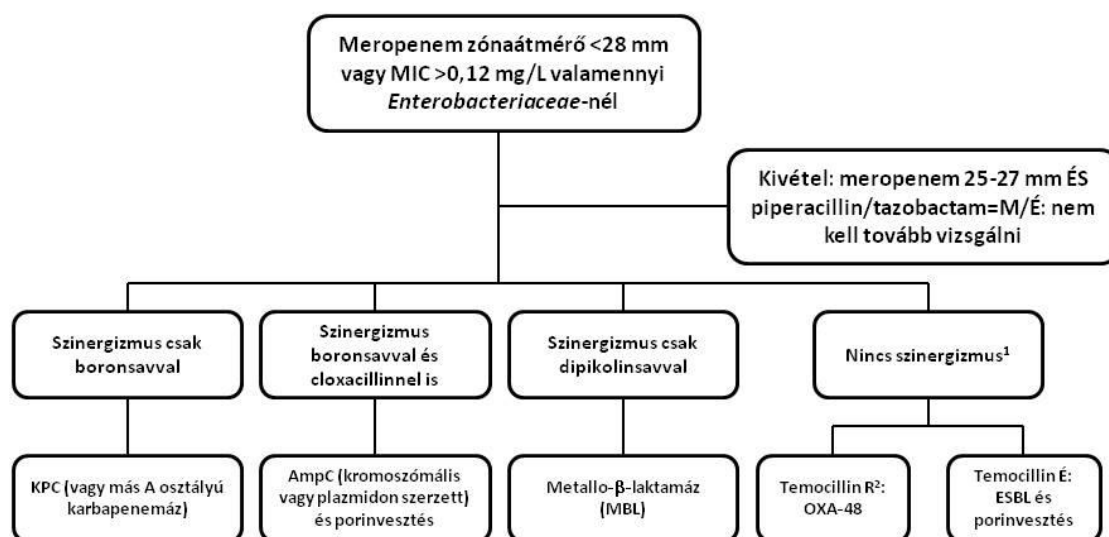
[A Nemzeti Referencia Laboratóriumban több mint 900 hazai *Enterobacteriaceae* izolátum (ebből 287 karbapenemáz-termelő) meropenem és ertapenem korongdiffúziós érzékenységi vizsgálatának eredményét hasonlították össze. A szűrési módszereknél fontos a magas érzékenység és elfogadható specificitás, ezért az *Enterobacteriaceae* család 1. csoportjában (lásd 3.4.1 rész) az ertapenem ajánlott a karbapenemáz-termelés szűrésére (ertapenem: érz.: 100%, spec.: 38,5% vs. meropenem: érz.: 85,5% spec.: 82,8%), míg az *Enterobacteriaceae* család 2. csoportjában a meropenem ajánlott a karbapenemáz-termelés szűrésére (ertapenem: érz.: 95,7%, spec.: 11,3% vs. meropenem: érz.: 93,3%, spec.: 73,5%).]

A rutin érzékenységi vizsgálatok során tapasztalt csökkent karbapenem érzékenységet karbapenemáz-termelést kimutató fenotípusos tesztek valamelyikével ajánlott tovább vizsgálni. A következő alfejezetekben ezek főbb csoportjai (kombinált korongdiffúziós módszerek, karbapenem hidrolízisen alapuló tesztek, immunkromatográfiás tesztek) kerülnek bemutatásra.

2.4.2 Kombinált korong teszt

A kombinált korong tesztek előnye, hogy jól validáltak, és kereskedelmi forgalomban is kaphatóak (MAST, UK; Rosco, Dánia) [18-20]. A tesztekben megtalálhatók a meropenemet önmagában és különböző inhibitorokkal kombinálva tartalmazó korongok vagy tabletták. Röviden összefoglalva: a

boronsav az A molekuláris osztályba tartozó karbapenemázokat (bár a KPC-n kívül az adatok még hiányosak) gátolja, a dipikolinsav és az etiléndiamintetraecetsav (EDTA) pedig a B molekuláris osztályba tartozó karbapenemázokat (pl. VIM, NDM). Az OXA-48-típusú karbapenemázokat avibactammal lehet gátolni, bár ezt eddig még egyik fenotípusos tesztben sem alkalmazták [21, 22]. Az AmpC β -laktamázokat gátló cloxacillin azért van a tesztekben, hogy különbséget lehessen tenni az AmpC túltermelés + porinvesztés és a karbapenemáz-termelés között. (A boronsav mind az A osztályú karbapenemázokat, mind az AmpC β -laktamázokat gátolja, ezért cloxacillinre is szükség van, mivel ez utóbbi csak az AmpC β -laktamázokat gátolja.) A gátlószeres tesztek értelmezését segítő algoritmus az 1. ábrán szerepel. A kombinált korong tesztek fő hátránya, hogy időigényesek (egész éjszakán át tartó inkubáció), ezért új, gyorsabb módszereket fejlesztettek ki.



1. ábra. A karbapenemázok azonosításának algoritmusai

¹KPC és MBL egyidejű termelése során nem tapasztalunk szinergizmust egyik gátlószer esetén sem, de az izolátumok magas szintű karbapenem rezisztenciát mutatnak. Ilyen esetben molekuláris módszerekkel lehet azonosítani a különböző karbapenemázokat.

²Magas szintű temocillin rezisztencia (MIC>32 mg/L, vagy 30 μ g-os temocillin korong esetén a gátlási zóna átmérő <11 mm) fenotípusos indikátora az OXA-48 termelésnek.

A 2. táblázat algoritmusai alapján elkülöníthetők egymástól az egyes karbapenemáz típusok (metalloblaktamázok, az A és D osztályba tartozó karbapenemázok), valamint a nem-karbapenemáz-termelésen (ESBL és/vagy AmpC + porinvesztés) alapuló karbapenem rezisztenciák. A tesztek az EUCAST által a nem-igényes mikroorganizmusokra ajánlott korongdiffúziós módszerrel kell elvégezni. A kereskedelmi tesztek a gyártók ajánlásai alapján kell kivitelezni.

Az OXA-48-szerű enzimeknek jelenleg nincs elérhető gátlószere. A magas szintű temocillin rezisztencia (MIC>32 mg/L) tekinthető az OXA-48-szerű karbapenemáz-termelés fenotípusos markerének [23, 24]. Azonban ez nem csak az OXA-48-típusú karbapenemázokra jellemző, más rezisztencia mechanizmusok is kialakíthatnak ilyen fenotípust. Ezért az OXA-48-szerű enzimek jelenlétét más módszerekkel kell megerősíteni.

A módosított Hodge-teszt alkalmazása nem ajánlott, mivel az eredmény nehezen értelmezhető, a specificitása alacsony, és néhány esetben a szenzitivitása sem optimális [12]. Leírtak néhány új módosítást a teszttel kapcsolatban, de ezek nehezen alkalmazhatók a rutin klinikai laboratóriumok számára, és nem oldják meg a szenzitivitással és specificitással kapcsolatos problémákat.

2. táblázat. A korong/tabletta diffúziós módszerekkel végzett fenotípusos tesztek interpretálása (a karbapenemázok félkövér betűtípussal vannak feltüntetve)

β-laktamáz	Szinergizmus (gátlási zóna átmérőjének növekedése) 10 µg meropenem koronggal/tablettával				Temocillin MIC >32 mg/L vagy zónaátmérő <11 mm
	DPA/EDTA	APBA/PBA	DPA+APBA	CLX	
MBL	+	-	-	-	Változó ¹
KPC	-	+	-	-	Változó ¹
MBL+KPC²	Változó	Változó	+	-	Változó ¹
OXA-48-szerű	-	-	-	-	Igen
AmpC+porinvesztés	-	+	-	+	Változó ¹
ESBL+porinvesztés	-	-	-	-	Nem

Rövidítések: **MBL**=metallo-β-laktamáz, **KPC**=*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, **DPA**=dipikolinsav, **EDTA**=etiléndiamintetraecetsav, **APBA**=aminofenil boronsav, **PBA**=fenil boronsav, **CLX**=cloxacillin

¹A temocillin érzékenységi vizsgálat elvégzése csak azokban az esetekben javasolt, amikor nem látszik szinergizmus egyik gátlószerezrel sem, hogy különbséget tudjunk tenni az ESBL+porinvesztés esete és az OXA-48-szerűenzim termelése között [23, 24]. Ha más enzimek is jelen vannak, az érzékenység változó lehet, és nem utal a továbbiakban a β-laktamáz típusára.

²Egy közlemény javasolja a kétféle inhibitort (DPA vagy EDTA + APBA vagy PBA) tartalmazó kereskedelmi tabletták használatát [25], de átfogóbb tanulmányok hiányoznak ezzel kapcsolatban. A kétféle enzim kombinálódása magas szintű karbapenem rezisztenciát biztosít, és ez Görögországon kívül ritkán fordul elő.

2.4.3 Biokémiai (kolorimetriás) tesztek

A CarbaNP teszt működése azon alapul, hogy a karbapenem hidrolízis pH változással jár, ami a fenolvörös oldat színét pirosról sárgára változtatja [26, 27]. A CarbaNP teszt elvégezhető Mueller-Hinton agaron, véres agaron, tripton-szója agaron és a legtöbb karbapenemáz-termelők szűrésére használt szelektív lemezen nőtt baktérium tenyészetekkel. Drigalski, McConkey vagy Eozin - metilénkék agaron nőtt telepek esetén azonban nem alkalmazható a módszer. A

reprodukálhatóság érdekében fontos, hogy a módszer egyes lépéseit pontosan betartsuk. Egyes publikációk a módszer magas érzékenységéről és specificitásáról számolnak be [28], míg egy tanulmányban megfigyelték, hogy egyes izolátumok mukoid fenotípusa esetén, valamint bizonyos OXA-48-szerű karbapenemáz-termelő *Enterobacteriaceae* izolátumoknál nem működik megfelelően a módszer [29]. A módszer egy kereskedelmi változata jól alkalmazható karbapenemáz-termelő *Enterobacteriaceae* izolátumok kimutatására [30, 31]. Bizonyos kereskedelmi tesztek esetében, beleértve a CarbaNP kereskedelmi változatát is, a színváltozás vizuális leolvasása interpretációs problémákat okozhat és az esetek 3-5%-ában nem értékelhető az eredmény.

(A referencia laboratórium CarbaNP teszttel szerzett tapasztalatai a Mikrobiológiai Körlevél XIV. évfolyam 1. számában megjelent „CarbaNP teszt-a karbapenemáz-termelés gyors fenotípusos kimutatása” című anyagban olvashatóak.)

A CarbaNP teszt egy változata, a Blue-Carba teszt (BCT) a karbapenemázok kimutatására szolgáló biokémiai gyors teszt (<2 óra) [32, 33]. Működése azon alapul, hogy karbapenemáz-termelő baktérium telepek direkt, előzetes lízist nem igénylő inokulálását követően az imipenem hidrolízise pH változást okoz, ami a brómtimolkék indikátort kékről zöldre/sárgára vagy zöldről sárgára változtatja. Pasternak és mtsai. által publikált tanulmányban értékelték a módszert, és az A és B osztályú karbapenemázok esetében kitűnő, míg OXA-48-típusok esetében szuboptimális érzékenységet találtak, igaz csak egyetlen laboratórium vizsgálati eredményei alapján [34].

A harmadik biokémiai teszt a β CARBA teszt, mely az előzőhöz hasonlóan gyorsan kivitelezhető (<2 óra): egy-három baktérium telep reagenssel való összekeverése után max. 30 percig kell inkubálni a tesztet. A pozitív reakciót a teszt színváltozása jelzi: sárgáról/narancsról pirosra/lilára vált. Egy tanulmány szerint a gyártó által javasolt 30 perces inkubációs idő nem elegendő az OXA-48-termelő izolátumok kimutatására. A vizsgált törzskollekció korlátozott összetétele miatt azonban javasolható egy szélesebb körű vizsgálat, hogy az eredményeket össze lehessen hasonlítani más biokémiai tesztekkel [35]. Egy másik értékelésben a β CARBA teszt kitűnő eredményt adott a CPE-k, és különösen az OXA-48-termelők detektálásánál. Azonban, az A osztályú karbapenemázok detektálására való alkalmasságát még tovább kell vizsgálni, és megfigyeltek fals pozitív eredményeket is nem-karbapenemáz-termelők esetében (pl. K1 β -laktamáz túltermelő *Klebsiella oxytoca*) [33].

2.4.4 Karbapenem Inaktivációs Módszer (CIM-teszt)

A módszer alapja, hogy a vizsgált baktérium szuszpenzióját együtt inkubálva karbapenemmel detektáljuk a karbapenemázok hidrolitikus aktivitását. A CIM-teszthez hatóanyagként antibiotikum-tartalmú korongot használnak. A 10 µg meropenem tartalmú korongot egy 10 µl-nyi baktériumot tartalmazó szuszpenzióval való 2 órás inkubáció után *E. coli* ATCC 25922 kontroll törzsből készült pázsitra helyezik. Karbapenemáz aktivitás esetén inkubáció után nem látszik gátlási zóna a meropenem korong körül, míg enzim aktivitás hiányában a korong körül gátlási zóna látható, ami azt jelzi, hogy a meropenem nem inaktiválódott a korongban. Különböző tanulmányok a CIM-teszt eltérő alkalmazhatóságáról számoltak be [36-38]. Ennek ellenére egy lehetséges alternatíva a karbapenemáz-termelés kimutatására, bár a teszt negatív prediktív értéke nem tisztázott. A módszer egyik fő hátránya, hogy általában legalább 18 óra inkubáció szükséges az eredményig.

(A referencia laboratórium CIM-teszttel szerzett tapasztalatai a Mikrobiológiai Körlevél XVI. évfolyam 1. számában megjelent „Karbapenemáz-termelés kimutatása karbapenem inaktivációs módszerrel” című anyagban olvashatóak)

2.4.5 Karbapenem hidrolízis kimutatása MALDI-TOF technikával

A MALDI-TOF módszerrel végzett vizsgálat elve, hogy a karbapenemáz-termelő baktérium törzs karbapenemmel együtt inkubált szuszpenziójában a karbapenemre jellemző tömegspektrum csúcs intenzitása csökken vagy eltűnik [39, 40]. A tömegspektrumot m/z 160 és 600 érték között méri Microflex LT tömegspektrométerrel [39]. Sok vizsgálat találta jónak a módszert a karbapenemázok kimutatására – az OXA-48 csoport kivételével. Egy vizsgálatban úgy találták, hogy NH_4HCO_3 hozzáadásával az OXA-48 kimutathatósága javul [41], azonban az új módszer használhatóságát még nem értékelték multicentrikus vizsgálatokban. A másik kisebb gyakorlati probléma, hogy az ehhez a vizsgálathoz használt MALDI-TOF beállítások eltérnek a species identifikálásnál használtaktól [41].

Laterális tesztsíkok

Az újfajta immunkromatográfiás laterális tesztsíkot nemrégiben vezették be. A teszt alapelve az OXA-48 epitópjainak immunológiai befogása a laterális tesztsík nitrocellulóz membránján lévő arany nanopartikulumokhoz kötve. Az alkalmazott monoklonális anti-OXA-48 ellenanyagok alkalmazásával az OXA-48-típusú enzimeket lehet beazonosítani [42]. A teszt kivetelezése kb. 4 percet vesz igénybe, és akár tenyészetből, akár hemokultúrából is elvégezhető [43-46]. Hasonló tesztet fejlesztettek KPC enzimek kimutatására is, de annak megbízhatóságát még nem vizsgálták multicentrikus vizsgálatokban [46].

2.4.6 Kontroll törzsek

Az alábbi táblázatban kerültek felsorolásra a fenotípusos és genotípusos vizsgálatokhoz is használható kontroll törzsek. Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok minőségellenőrzéséhez nem állnak rendelkezésre ajánlások ezen törzsek esetében. Kereskedelmi tesztek használatakor a tesztekben található leírás ad felvilágosítást a használandó kontroll törzsekről.

3. táblázat. A karbapenemáz-termelést megerősítő vizsgálatok minőségellenőrzésére alkalmas kontroll törzsek.

Törzs	Mechanizmus
<i>Enterobacter cloacae</i> CCUG 59627	AmpC+csökkent porin expresszió
<i>K. pneumoniae</i> CCUG 58547 vagy <i>K. pneumoniae</i> NCTC 13440	Metallo- β -laktamáz (VIM)
<i>K. pneumoniae</i> NCTC 13443	Metallo- β -laktamáz (NDM-1)
<i>E. coli</i> NCTC 13476	Metallo- β -laktamáz (IMP)
<i>K. pneumoniae</i> CCUG 56233 vagy <i>K. pneumoniae</i> NCTC 13438	<i>Klebsiella pneumoniae</i> karbapenemáz (KPC)
<i>K. pneumoniae</i> NCTC 13442	OXA-48 karbapenemáz
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 25955	Negatív kontroll

2.5 Irodalomjegyzék

1. 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.
2. Vatopoulos A. High rates of metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece – a review of the current evidence. *Euro Surveill.* 2008;13(4). doi:pii: 8023
3. 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).
4. 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) .
5. 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.
6. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(10):1791-8.
7. Souli M, Galani I, Antoniadou A, Papadomichelakis E, Poulakou G et al. An outbreak of infection due to β 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.
8. 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.

9. 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.
10. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:440–58.
11. Falcone M, Mezzatesta ML, Perilli M, Forcella C, Giordano A et al. Infections with VIM-1 metallo β -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* and their correlation with clinical outcome. *J Clin Microbiol* 2009;47: 3514–9.
12. 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 Page 10 of 43.
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- β -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- β -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 β -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.
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, Tzouvelekis 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. Page 11 of 43.
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 β -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 NH_4HCO_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. Kiterjedt-spektrumú β -laktamáz (ESBL)-termelő *Enterobacteriaceae*

A rezisztencia mechanizmus detektálásának jelentősége	
Az antibiotikum érzékenység interpretálásához szükséges	Nem
Infekciókontroll tekintetében	Igen
Közegészségügy tekintetében	Igen

3.1 Definíció

Az ESBL enzimek hidrolizálják a legtöbb penicillint és cefalosporint, beleértve az oxyimino- β -laktám vegyületeket (cefuroxim, 3. és 4. generációs cefalosporinok és aztreonam), azonban a cephamycineket és a karbapenemeket nem. A legtöbb ESBL a β -laktamázok Ambler-féle A osztályába tartozik, működésüket gátolják a β -laktamáz inhibitorok (klavulánsav, sulbactam és tazobactam) és a diazabicyclooctanonok (avibactam) [1].

3.2 Klinikai és/vagy epidemiológiai jelentőség

Az első ESBL-termelő törzset 1983-ban izolálták, azóta világszerte elterjedtek. Ennek háttérében az ESBL-termelő törzsek klonális terjedése, az ESBL-géneket hordozó plazmidok horizontális átvitele, és kisebb mértékben a *de novo* megjelenés áll. Klinikai szempontból messze a legjelentősebb ESBL csoportot a CTX-M-típusú enzimek alkotják, ezután következnek az SHV- és TEM-típusú ESBL-ek [2-5].

Az ESBL-termelést elsősorban *Enterobacteriaceae* családban írták le: először kórházi környezetben, majd ápolási otthonokban, és a 2000-es évek óta területről is (járóbetegek, egészséges hordozók, beteg és egészséges állatok, élelmiszerek). A leggyakrabban leírt ESBL-termelő fajok az *Escherichia coli* és a *Klebsiella pneumoniae*. Azonban a többi, klinikailag releváns *Enterobacteriaceae* faj is gyakran lehet ESBL-termelő. Az ESBL-termelő izolátumok prevalenciája számos tényezőtől függ: faj, földrajzi hely, kórház/osztály, a betegcsoport és a fertőzés típusa. A prevalencia értéke a különböző tanulmányokban széles határok között mozog [2, 3, 6, 7]. A 2015-ös EARS-Net adatok azt mutatták, hogy a 3. generációs cefalosporin nem-érzékeny, invazív *K. pneumoniae* aránya meghaladta a 25%-ot a legtöbb európai országban, sőt néhány országban ez az arány magasabb, mint 50%. Görögország és Olaszország kivételével, ahol a KPC-termelők aránya jelentős, a legtöbb izolátum feltételezhetően ESBL-termelő volt a helyi ESBL-vizsgálatok eredményei alapján [8].

3.3 Rezisztencia mechanizmus

A legtöbb ESBL szerzett enzim terjedése mobilis genetikai elemekhez (plazmidok) köthető. Az ESBL-ek különböző szinten expresszálódhatnak, biokémiai tulajdonságaikban és a különböző β -laktámokkal szembeni aktivitásukban (pl. cefotaxim, ceftazidim, aztreonam) is eltérhetnek. Az expresszió szintje, az enzim tulajdonságai és más rezisztencia mechanizmusokkal való együttes megjelenés (más β -laktamázok termelése, effluxpumpák működtetése és/vagy megváltozott permeabilitás) mind hozzájárul az ESBL-termelő izolátumok körében tapasztalható változatos fenotípusok kialakulásához [1-4, 9-11].

3.4 Javasolt módszerek az ESBL-ek kimutatására *Enterobacteriaceae* izolátumoknál

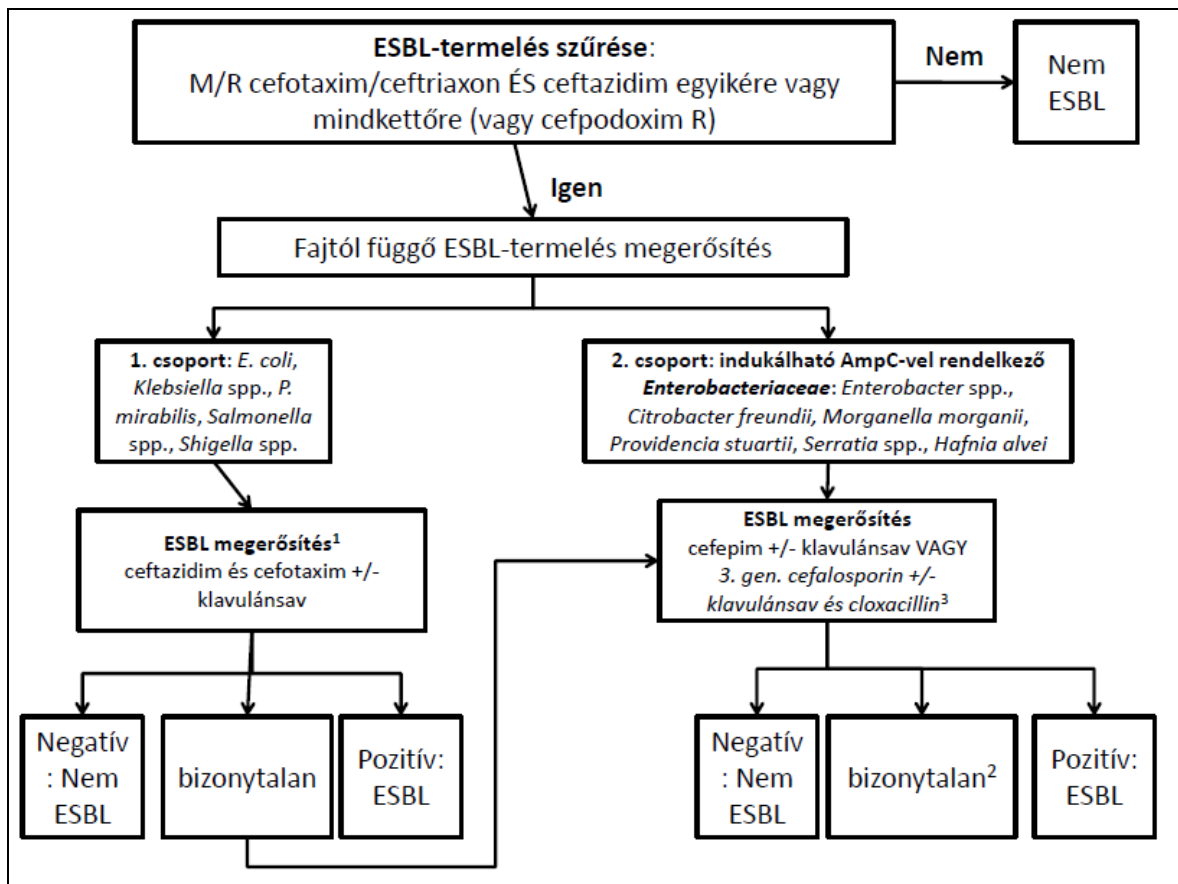
Sok országban infekciókontroll céljából ajánlott vagy kötelező az ESBL-termelés kimutatása és az enzimek jellemzése. Az *Enterobacteriaceae* csoportban az ESBL-ek kimutatására ajánlott stratégia a következő: az indikátor oxyimino-cefalosporinok nem-érzékenysége alapján szűrni a gyanús izolátumokat, majd ezt követően fenotípusos (és bizonyos esetekben genotípusos) megerősítő tesztek elvégzése (1. táblázat, 1. ábra).

Az EUCAST és a CLSI ajánlásai alapján cefotaxim, ceftriaxon, ceftazidim és cefpodoxim esetében a szűrésre ajánlott határérték: >1 mg/L MIC érték (1. táblázat) [12, 13]. Az *Enterobacteriaceae* csoportnál az EUCAST ajánlásában a cefalosporin érzékenység klinikai határértéke szintén ≤ 1 mg/L [12]. A cefpodoxim a legérzékenyebb indikátor cefalosporin az ESBL-termelés kimutatására, ezért önmagában is ajánlható a szűrésre. Azonban kevésbé specifikus, mint a cefotaxim (vagy ceftriaxon) és ceftazidim kombinált alkalmazása, és csak ez utóbbi vegyületeket használják a megerősítő tesztekhez [14, 15]. Az indikátor cefalosporinok ide vonatkozó gátlási zóna átmérői az 1. táblázatban láthatóak.

1. táblázat. Módszerek az ESBL-termelés szűrésére *Enterobacteriaceae* családban [13-19]

Módszer	Antibiotikum	ESBL-termelés vizsgálata szükséges, ha
Leves- vagy agar-hígítás ¹	Cefotaxim/ceftriaxon ÉS ceftazidim	MIC >1 mg/L bármelyik szerre
	Cefpodoxim	MIC >1 mg/L
Korongdiffúzió ¹	Cefotaxim (5 μ g) vagy ceftriaxon (30 μ g) ÉS ceftazidim (10 μ g)	Gátlási zóna <21 mm Gátlási zóna <23 mm Gátlási zóna <22 mm
	Cefpodoxim (10 μ g)	Gátlási zóna < 21 mm

¹ Az összes módszernél vagy cefotaxim/ceftriaxon ÉS ceftazidim együtt VAGY cefpodoxim magában vizsgálendő



1. ábra. Algoritmus ESBL-termelés fenotípusos kimutatásához

¹Ha cefoxitint vizsgáltak és a MIC értéke >8 mg/L vagy a gátlási zóna átmérője <19 mm, akkor cefepim +/- klavulánsav VAGY 3. gen. cefalosporin +/- klavulánsav és cloxacillin megerősítő teszt elvégzése ajánlott.

²Nem lehet sem pozitívnak, sem negatívnak értékelni (pl. ha a gradiens MIC tesztesík mellett teljes benövés látható mindkét oldalon, vagy nincs egyértelmű szinergizmus a kombinált korong vagy a kétkorong szinergizmus tesztekénél). Ha a cefepim +/- klavulánsav megerősítő teszt is bizonytalan eredményt ad, akkor genotípusos vizsgálat szükséges.

³(Nemzeti referencia laboratórium kiegészítése: Az *Enterobacteriaceae* család 2. csoportjához tartozó specioseknél fenotípusos vizsgálatok alapján csak az ESBL-termelés eredményét ajánlott kiadni ("Az izolátum ESBL-termelő" vagy "Az izolátum nem ESBL-termelő"). Az AmpC-termelést nem kell külön kiemelni, mivel ez utóbbinak nincs járványügyi jelentősége.)

3.4.1 ESBL-termelés szűrése *Enterobacteriaceae* családban

A. Szűrő kritériumok az *Enterobacteriaceae* család 1. csoportjában (*E. coli*, *Klebsiella* spp., *Raoultella* spp., *P. mirabilis*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp.)

Az 1. csoportban az ESBL szűrésére ajánlott módszerek: leves-, agarhígításos módszer, korongdiffúziós módszer vagy automata rendszerek [13, 20, 21]. A szűrés során a cefotaximot (vagy ceftriaxont) és a ceftazidimet együtt kell alkalmazni, mivel a különböző ESBL-termelő izolátumok cefotaxim (vagy

ceftriaxon) és ceftazidim MIC értékei nagyon különbözőek lehetnek [14, 22, 23].

Az ESBL-szűrésre pozitív és az 1. csoportba tartozó fajok ESBL megerősítésének algoritmusai az 1. ábrán és a 2. táblázatban látható.

B. Szűrő kritériumok az *Enterobacteriaceae* család 2. csoportjában (*Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Providencia* spp., *Hafnia alvei*)

Az ebbe a csoportba tartozó fajoknál az ESBL-termelés szűrésére ugyanaz a módszer ajánlott, mint az 1. csoportnál (1. ábra és 3. táblázat) [19]. Azonban ebben a csoportban a 3. generációs cefalosporinokkal szembeni rezisztencia hátterében lévő leggyakoribb mechanizmus a kromoszómális AmpC-típusú β -laktamázok derepresszált termelése/túltermelése. Az AmpC-típusú β -laktamázok túlnyomó többsége nem hidrolizálja jól a cefepimet, ezért ez a hatóanyag használható fenotípusos tesztekben klavulánsavval kiegészítve.

3.4.2 Fenotípusos megerősítő módszerek

A klavulánsavat alkalmazó számos fenotípusos módszer közül négy ajánlott az ESBL-termelés megerősítésére: a kombinált korong teszt (CDT), a kétkorong szinergizmus teszt (DDST), az ESBL gradiens teszt és a mikro leveshígítási teszt (2. és 3. táblázat) [20, 21, 24]. Egy multicentrikus vizsgálatban a CDT jobb specificitást mutatott az ESBL gradiens tesztnél, míg érzékenységük hasonló volt [25]. A kereskedelmi forgalomban kapható, antibiotikum érzékenységet vizsgáló automatizált rendszerekben is megtalálhatók a klavulánsav gátláson alapuló ESBL-termelést kimutató tesztek. Különböző tanulmányokban ezek a megerősítő módszerek eltérő teljesítményt mutattak függően a vizsgált törzskollekciótól és a használt rendszertől [17-19].

A. Kombinált korong módszer (CDT)

Minden ilyen tesztnél olyan korongokat vagy tablettákat alkalmaznak, melyek cefalosporinokat (cefotaxim, ceftazidim, cefepim) magában, illetve klavulánsavval kombinációban tartalmazzak. A teszt értékelésekor a klavulánsavval kiegészített cefalosporin korong vagy tabletta körüli gátlási zóna átmérőjét hasonlítjuk össze a csak cefalosporint tartalmazó korong vagy tabletta körüli gátlási zóna átmérőjével. A teszt pozitív, ha a klavulánsavval kiegészített és a mentes korong körüli gátlási zóna átmérők különbsége ≥ 5 mm (3. táblázat) [25, 26].

B. Kétkorong szinergizmus teszt (DDST)

A vizsgálat során a baktériumpázsitot tartalmazó táptalajra cefalosporin tartalmú korongokat (cefotaxim, ceftazidim, cefepim) helyeznek a klavulánsav tartalmú korong (amoxicillin/klavulánsav) közelébe. Pozitív eredmény esetén valamelyik vagy az összes cefalosporin tartalmú korong körüli gátlási zóna kiszélesedik a klavulánsav tartalmú korong felé. A korongok közötti távolság kritikus pont, 30 μ g cefalosporin tartalmú korongok esetében az optimális távolság 20 mm a korongok középpontja között. Azonban ez csökkenthető 15 mm-re, ha magas szintű a rezisztencia, vagy növelhető 30 mm-re, ha alacsony szintű [20]. Az EUCAST alacsonyabb cefalosporin tartalmú korongokat ajánl a rutin vizsgálatok során, ezért az ilyen hatóanyag tartalmú korongokkal történő kivitelezéshez a módszer átdolgozására és újraértékelésére van szükség.

C. Gradiens teszt módszer

A gradiens tesztek kivitelezése, leolvasása és az eredmény interpretálása a gyártók előírása szerint történik. A teszt pozitív, ha a csak cefalosporint tartalmazó MIC értéknél a klavulánsavval kombinált cefalosporin MIC érték ≥ 8 -szoros hígításbeli csökkenést mutat, vagy ha „fantom-zóna”, illetve deformált ellipszis látható (3. táblázat). A teszt eredménye bizonytalan, ha a tesztesík mellett teljes benövés tapasztalható. Minden más esetben a teszt eredménye negatív. Az ESBL gradiens tesztek csak az ESBL-termelés kimutatására szolgálnak, a MIC érték meghatározására nem alkalmasak.

D. Mikro leveshígítási módszer

A mikro leveshígítási módszernél cefalosporinok (cefotaxim, ceftazidim és cefepim) Mueller-Hinton levesben, 0,25-512 mg/L koncentrációtartományban elkészített, kétszeres léptékű hígítási sorát alkalmazzák magukban és 4 mg/L állandó koncentrációjú klavulánsavval kiegészítve. A teszt pozitív, ha a csak cefalosporint tartalmazó MIC értéknél a klavulánsavval kombinált cefalosporin MIC érték ≥ 8 -szoros hígításbeli csökkenést mutat. Minden más esetben a teszt eredménye negatív [24].

E. Biokémiai (kolorimetriás) tesztek

A 2012-ben leírt ESBL NDP tesztben indikátor antibiotikumként cefotaximot, inhibitorként tazobaktámot használnak [28]. A teszt kivitelezhető 96-lyukú mikroplate lemezen vagy külön csövekben is. Pirosról sárgára történő színátcsapás jelzi a pozitív eredményt. A teszt közvetlenül betegmintából is elvégezhető [29], és kitűnő érzékenységgel és specificitással rendelkezik, azonban multicentrikus vizsgálatokat nem folytattak még ilyen irányban.

A β -LACTA tesztben szubsztrátként kromogén cefalosporint (HMRZ-86) használnak. A vizsgálat elvégezhető akár tenyészetből, akár klinikai mintából is

[30]. Egy Belgiumban és Franciaországban végzett, prospektív multicentrikus vizsgálatban kitűnő érzékenységet és specificitást találtak *E. coli* és *K. pneumoniae* esetében (96% és 100%), azonban a teszt érzékenysége alacsonyabb volt indukálható AmpC-termelőknél (67%). Az *E. coli* és *K. pneumoniae* esetében megállapított magas negatív prediktív érték (99% olyan területen, ahol a 3. generációs cefalosporin rezisztencia aránya 10-30% között mozog) alapján ez az egyszerű teszt igen megbízhatóan jelzi a 3. generációs cefalosporin rezisztenciát, főleg az ESBL-termelő törzseknél.

F. Speciális szempontok az interpretáció során

A kromozómális K1 (OXY-like) β -laktamáz túltermelő *Klebsiella oxytoca* törzsek adhatnak álpozitív eredményt cefotaximot használó ESBL-termelést megerősítő teszteknel [31]. Hasonló fenotípusra lehet számítani *Proteus vulgaris*, *P. penneri*, *Citrobacter koseri* és *Kluyvera* spp., valamint *C. koseri*-szerű fajoknál (mint *C. sedlakii*, *C. farmeri*, *C. amalonaticus*), melyek klavulánsavval gátolható kromozómális β -laktamázzal rendelkeznek [32, 33]. További lehetséges okok, amelyek álpozitív eredményre vezethetnek: SHV-1, TEM-1 vagy OXA-1-like széles-spektrumú β -laktamáz termelése sejtfal permeabilitás változással kombinálódva [18]. Hasonló probléma merülhet fel K1-termelő *K. oxytoca* esetében, ha csak cefepim alapú megerősítő teszt kerül alkalmazásra [34].

2. táblázat. ESBL termelésre gyanús (lásd 1. táblázat) *Enterobacteriaceae* izolátumok ESBL-megerősítő módszerei. *Enterobacteriaceae* család 1. csoport (lásd 1. ábra)

Módszer	Hatóanyag (korong tartalom)	ESBL megerősítés pozitív, ha
ESBL gradiens teszt	Cefotaxim +/- klavulánsav	MIC érték arány ≥ 8 vagy deformált gátlási zóna jelenléte
	Ceftazidim +/- klavulánsav	MIC érték arány ≥ 8 vagy deformált gátlási zóna jelenléte
Kombinált korong módszer (CDT)	Cefotaxim (30 μ g) +/- klavulánsav (10 μ g)	≥ 5 mm gátlási zóna növekedés
	Ceftazidim (30 μ g) +/- klavulánsav (10 μ g)	≥ 5 mm gátlási zóna növekedés
Mikro leveshígítás	Cefotaxim +/- klavulánsav (4 mg/L)	MIC érték arány ≥ 8
	Ceftazidim +/- klavulánsav (4 mg/L)	MIC érték arány ≥ 8
	Cefepim +/- klavulánsav (4 mg/L)	MIC érték arány ≥ 8
Kétkorong szinergizmus teszt (DDST)	Cefotaxim, ceftazidim, cefepim és (aztreonam)	Az adott cefalosporin vagy az aztreonam körüli gátlási zóna kiszélesedése az amoxicillin/klavulánsav korong felé

3. táblázat. ESBL szűrő teszttel (lásd 1. táblázat) pozitív *Enterobacteriaceae* izolátumok ESBL-termelésének megerősítő módszerei. *Enterobacteriaceae* család 2. csoport (lásd 1. ábra)

Módszer	Hatóanyag (korong tartalom)	ESBL megerősítés pozitív, ha
ESBL gradiens teszt Etest® ESBL	Cefepim +/- klavulánsav	MIC érték arány ≥ 8 vagy deformált gátlási zóna jelenléte
Kombinált korong módszer (CDT)	Cefepim (30 μg) +/- klavulánsav (10 μg)	≥ 5 mm gátlási zóna növekedés
Mikro levesthígítás	Cefepim +/- klavulánsav (4 mg/L)	MIC érték arány ≥ 8
Kétkorong szinergizmus teszt (DDST)	Cefotaxim, ceftazidim, cefepim és (<i>aztreonam</i>)	Az adott cefalosporin vagy az aztreonam körüli gátlási zóna kiszélesedése az amoxicillin/klavulánsav korong felé

3.4.3 ESBL-termelés fenotípusos kimutatása, ha más β -laktamázok jelenléte gátolja a szinergizmus megjelenését

Bizonytalan teszt eredményt (gradiens teszt) és álnegatív teszt eredményeket (CDT, DDST, gradiens teszt és mikro levesthígítás) eredményezhet az AmpC-típusú β -laktamázok túltermelése, ami elrejteti az ESBL-ek jelenlétét [20, 34, 35]. Általában az AmpC-típusú β -laktamázokat túltermelő izolátumok rezisztenciát mutatnak a 3. generációs cefalosporinokkal szemben. Továbbá a cephamycinekkal szembeni rezisztencia (pl. cefoxitin MIC érték >8 mg/L vagy gátlási zóna átmérő <19 mm) jelezheti az AmpC-típusú β -laktamázok túltermelését [34]. Ritka kivételek az ACC β -laktamázok, melyek nem okoznak cefoxitin rezisztenciát [36].

Az AmpC-típusú β -laktamáz-túltermelő izolátumok ESBL-termelésének kimutatására ajánlott a cefepim alapú ESBL megerősítő tesztek elvégzése is, mivel az AmpC- β -laktamázok általában nem képesek a cefepimet hidrolizálni. A cefepim az összes megerősítő teszt típusban (CDT, DDST, gradiens teszt, mikro levesthígítás) használható [27, 37-39]. Alternatív megoldásként használható a cloxacillin is, ami jó gátlószere az AmpC-enzimeknek. CDT teszt alkalmazható úgy, hogy a cefalosporin (ceftazidim vagy cefotaxim) tartalmú korongok mind klavulánsavat, mind cloxacillint tartalmaznak; illetve használható 200-250 mg/L cloxacillin tartalmú Mueller-Hinton agaron, standard módon kivitelezett CDT vagy DDST is [19]. Kereskedelmi forgalomban is elérhetőek olyan korongtesztek, amelyek klavulánsavat és cloxacillint is tartalmaznak, azonban nem állnak rendelkezésre megbízható értékelések ezekre a termékekre.

Az ESBL jelenlétét a karbapenemázok, mint a metallo- β -laktamázok vagy a KPC-k (de az OXA-48-like enzimek nem) és/vagy a súlyos permeabilitási defektusok szintén elrejtethetik [40, 41]. Ha az ESBL kimutatása még így is szükséges, akkor molekuláris módszerek alkalmazása ajánlott.

3.4.4 Genotípusos megerősítés

Az ESBL gének jelenlétének megerősítésére a PCR és az ESBL gének szekvenálása vagy teljes-genom szekvenáláson alapuló módszerek ajánlottak. Különböző microarray tesztek is elérhetőek. Léteznek kereskedelmi és in-house módszerek is, azonban ezek nem kerülnek részletes tárgyalásra ebben a dokumentumban. A teljes-genom szekvenáláson alapuló megközelítés egy másik EUCAST dokumentumban került részletesebben megtárgyalásra [42].

3.4.5 Kontroll törzsek

Az alábbi táblázatban kerültek felsorolásra a fenotípusos és genotípusos vizsgálatokhoz is használható kontroll törzsek. Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok minőségellenőrzéséhez nem állnak rendelkezésre ajánlások ezen törzsek esetében. Kereskedelmi tesztek használatakor a tesztekben található leírás ad felvilágosítást az ott használandó kontroll törzsekre.

4. táblázat. ESBL-termelést megerősítő vizsgálatok minőségellenőrzésére alkalmas kontroll törzsek.

Törzs	Mechanizmus
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	SHV-18 ESBL
<i>Escherichia coli</i> CCUG62975	CTX-M-1 csoportba tartozó ESBL és CMY-típusú szerzett AmpC
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	ESBL-negatív

3.5 Irodalomjegyzék

1. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:211-1233.
2. Livermore DM. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8:557-584
3. Bradford PA. Extended-spectrum β -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 β -lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(Suppl1):42-52.
5. Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM. Prevalence and spread of extended-spectrum β -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 β -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 β -lactamases by mutation. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(Suppl1):11-32.
10. Livermore DM. Defining an extended-spectrum β -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/ (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 β -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 β -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 β -lactamase (ESBL) test for rapid detection of ESBL production in *Enterobacteriaceae* isolates. *J Clin Microbiol.* 2006;44:3257-62. Page 19 of 43.
18. Thomson KS, Cornish NE, Hong SG, Hemrick K, Herdt C, Moland ES. Comparison of Phoenix and VITEK 2 extended-spectrum- β -lactamase detection tests for analysis of *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates with well-characterized β -lactamases. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2380-4.
19. Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14 (Suppl 1):90-103.
20. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β -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 β -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 β -lactamases and AmpC β -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 β -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 β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the MAST DD test, the double disc and the Etest® 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 β -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® to detect extended-spectrum β -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- β -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 β -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 β -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 β -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® to detect extended-spectrum β -lactamases in an *Enterobacteriaceae* strain collection. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 54:134-8.
34. Jacoby GA. AmpC β -lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22:161-82
35. Munier GK, Johnson CL, Snyder JW, Moland ES, et al. Positive extended-spectrum- β -lactamase (ESBL) screening results may be due to AmpC β -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 β -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 β -lactamases (ESBL) in *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18:1194-204.
38. Yang JL, Wang JT, Lauderdale TL, Chang SC. Prevalence of extended-spectrum β -lactamases in *Enterobacter cloacae* in Taiwan and comparison of 3 phenotypic confirmatory methods for detecting extended-spectrum β -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 β -lactamases and AmpC β -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 β -lactamases in clinical isolates of KPC carbapenemasepossessing *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*. 2009;47:3420-6. Page 20 of 43.
41. March A, Aschbacher R, Dhanji H, Livermore DM, Böttcher A et al. Colonization of residents and staff of a longterm-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. Szerzett AmpC-típusú β -laktamázt termelő *Enterobacteriaceae*

A rezisztencia mechanizmus detektálásának jelentősége	
Az antibiotikum érzékenység interpretálásához szükséges	Nem
Infekciókontroll tekintetében	Igen
Közegészségügy tekintetében	Igen

4.1 Definíció

AmpC-típusú cefalosporinázok a β -laktamázok Ambler-féle C osztályába tartoznak. Hidrolizálják a penicillineket, cefalosporinokat (beleértve a 3. generációs cefalosporinokat, de a 4. generációsokat általában nem) és a monobaktámokat. Általánosságban az AmpC-típusú enzimek működését gyengén gátolják a klasszikus ESBL inhibitorok, különösen a klavulánsav [1].

4.2 Klinikai és/vagy epidemiológiai jelentőség

Az első szerzett AmpC-termelő izolátumot az 1980-as évek végén azonosították, és azóta világszerte elterjedt, ami az AmpC gének (gyakran úgy említik ezeket mint plazmid-közvetített AmpC) klonális terjedésének és horizontális átvitelének eredménye. A mobilis AmpC géneknek több csoportját is megkülönböztetik a kromoszómálisan termelt változatok hordozóinak alapján: *Enterobacter* csoport (MIR, ACT), *C. freundii* csoport (CMY-2-like, LAT, CFE), *M. morgani* csoport (DHA), *Hafnia alvei* csoport (ACC), *Aeromonas* csoport (CMY-1-like, FOX, MOX) és *Acinetobacter baumannii* csoport (ADC). A leggyakoribb és legelterjedtebb enzimek a CMY-2-like csoportba tartoznak, azonban az indukálható DHA-típusú β -laktamázok és néhány másik típus szintén jelentősen elterjedtek [1].

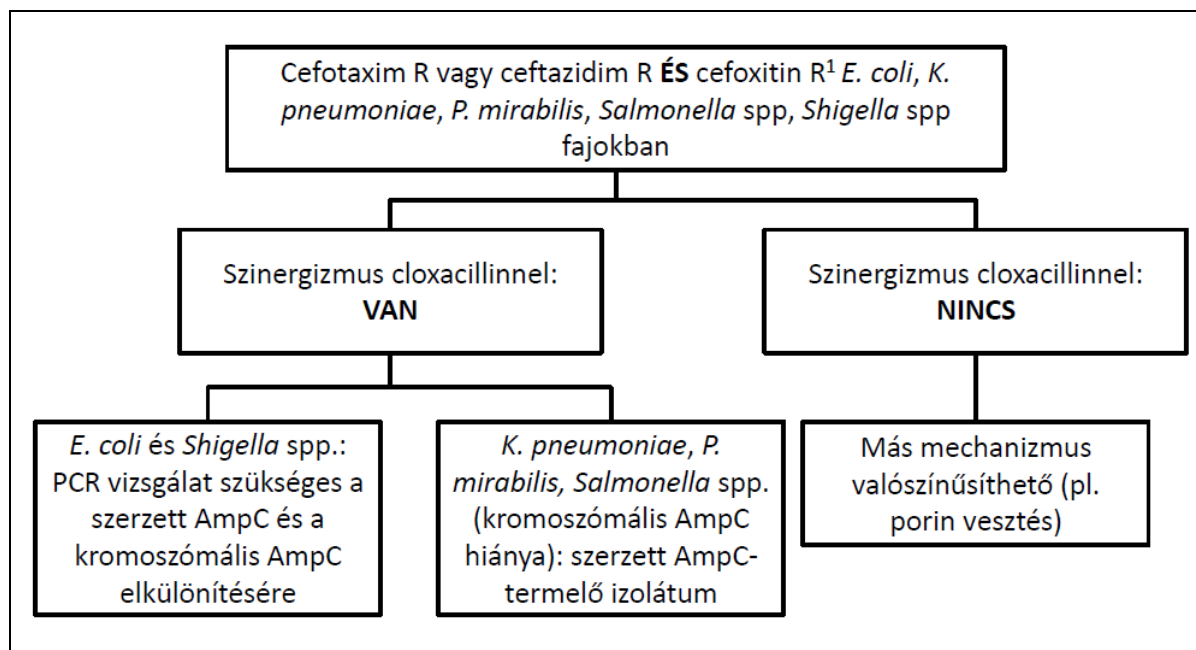
A szerzett AmpC-kat termelő főbb fajok: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella enterica* és *P. mirabilis*. Ilyen enzimeket termelő izolátumokat mind kórházban ápolt, mind járóbetegek mintáiból kitenyésztettek, és a klasszikus ESBL-enzimeknél korábban kimutatták már haszonállatokból és élelmiszerekből is (*E. coli* és *S. enterica* izolátumokban). Habár a szerzett AmpC-k széles körben elterjedtek, és számos tanulmányban írták le bélbaktériumok 3. generációs rezisztenciájának háttérében, összességében gyakoriságuk messze elmarad az ESBL-ekétől, legalábbis Európában. Néhány helyi és különleges epidemiológiai szituációban azonban az ilyen enzimeket termelő organizmusok jelentősége megnövekedhet [1-5].

4.3 Rezisztencia mechanizmusok

Az *Enterobacteriaceae* családba tartozó számos species, illetve más Gram-negatív organizmusok természetes módon termelnek AmpC-típusú β -laktamázokat. Az enzim kifejeződése lehet állandó, de minimális szintű (pl. *E. coli*, *Shigella* spp.) vagy indukálható (pl. *Enterobacter* spp., *C. freundii*, *M. morganii*, *P. aeruginosa*). Különböző genetikai változások következtében a természetes AmpC-k derepresszáltan vagy túltermelődve is kifejeződhetnek, ami cefalosporinokkal és penicillin/ β -laktamáz gátlószer kombinációkkal szembeni magas szintű rezisztenciához vezet. A C osztályú cefalosporinázok szerzetté is válhatnak, elsősorban az *Enterobacteriaceae* családban. Néhány típus kivételével (pl. DHA), amelyek indukálhatóak maradtak, a szerzett AmpC-k expressziója állandó szintű, és a derepresszált vagy túltermelő mutánsokhoz hasonló rezisztenciát okoznak. A rezisztencia szintje függ a kifejeződő enzim mennyiségétől, illetve más rezisztencia mechanizmusok jelenlététől. Hasonlóan az ESBL-ekhez, a szerzett AmpC-k is általában plazmidon kódoltak [1-3].

4.4 Szerzett AmpC-típusú β -laktamázok kimutatására ajánlott módszerek *Enterobacteriaceae* családban

Az *Enterobacteriaceae* család 1. csoportjában az AmpC-termelés szűrésére alkalmazható fenotípusos kritériumok: cefoxitin MIC érték >8 mg/L (vagy a gátlási zóna <19 mm) ÉS ceftazidim és/vagy cefotaxim rezisztencia (az érzékenységi határértékek szerint). Azonban ezekkel a szűrőfeltételekkel az ACC-1-típusú szerzett AmpC-termelő izolátumokat nem lehet detektálni, mivel ez a típus nem hidrolizálja a cefoxitint [6]. Meg kell jegyezni, hogy cefoxitin rezisztencia porinvesztés miatt is kialakulhat [1].



1. ábra. AmpC detektálás algoritmus

¹ A "cefoxitin R" ebben az esetben a nem-vad típust jelenti (MIC érték >8 mg/L vagy gátlási zóna átmérő <19 mm). Cefotaxim és ceftazidim rezisztencia értékelése az érvényben lévő EUCAST határértékek alapján. A cefotaxim és ceftazidim nem-érzékenység vizsgálatán alapuló megközelítés magasabb érzékenységet, de alacsonyabb specificitást mutat a cefoxitin rezisztens izolátumok vizsgálatával összehasonlítva [7]. AmpC-típusú β-laktamázok ESBL-teszttel pozitív (klavulánsavval szinergizmust mutató) izolátumokban is jelen lehetnek. Ezért lényeges lehet az AmpC-termelés vizsgálata az ESBL-teszt eredményétől függetlenül. Ha a laboratórium nem vizsgál cefoxitin érzékenységet, akkor a cefepim érzékenység ÉS cefotaxim és/vagy ceftazidim rezisztencia együttes megjelenése szintén utalhat az AmpC-termelésre, bár ennek a specificitása alacsonyabb.

Az AmpC megerősítő fenotípusos tesztek alapvetően az AmpC-működésének cloxacillinnel vagy boronsav származékokkal történő gátlásán alapulnak. Azonban, a boronsav származékok az A osztályú karbapenemázok, illetve néhány A-osztályú penicillináz (pl. K1 *K. oxytoca*-ban) működését is gátolják. Habár ezeknek a megerősítő módszereknek a használhatóságáról kevés az adat, meglehetősen jól alkalmazhatók a házi módszerek [8-10], valamint a kereskedelmi forgalomban kapható tesztek is, mint pl. a MAST "AmpC Detection Disc Set" (érzékenység 96-100%, specificitás 98-100%) [11, 12], az AmpC gradiens teszt, amelyet jelenleg csak a bioMérieux gyárt (érzékenység 84-93%, specificitás 70-100%) [12, 13], és a cefotaxim-cloxacillin és ceftazidim-cloxacillin Rosco tabletták (érzékenység 96%, specificitás 92%) [7, 14]. (A MAST "ESBL & AmpC Detection Disc Set" alkalmas az ESBL- és az AmpC-termelés egyidejű vizsgálatára is, ami megkönnyíti és gyorsítja a laboratóriumi vizsgálatokat. Fenotípusos vizsgálatok alapján az AmpC-

termelést csak az "AmpC detektálás algoritmus" ábrán szereplő specioseknél ajánlott kiadni.)

Ezek az AmpC megerősítő tesztek azonban nem alkalmasak *E. coli* esetében a szerzett AmpC és a konstitutívan túltermelő kromozómális AmpC megkülönböztetésére.

A szerzett AmpC-típusú β -laktamáz gének jelenléte igazolható PCR alapú módszerekkel [15, 16], vagy DNS microarray alapú módszerrel [17].

Az alábbi táblázatban kerültek felsorolásra a fenotípusos és genotípusos vizsgálatokhoz is használható kontroll törzsek. Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok minőségellenőrzéséhez nem állnak rendelkezésre ajánlások ezen törzsek esetében. Kereskedelmi tesztek használatakor a tesztekben található leírás ad felvilágosítást az ott használandó kontroll törzsekre.

1. táblázat. Az AmpC-termelést megerősítő vizsgálatok minőségellenőrzésére alkalmas kontroll törzsek.

Törzs	Mechanizmus
<i>Escherichia coli</i> CCUG 58543	Szerzett CMY-2 AmpC
<i>Escherichia coli</i> CCUG62975	CTX-M-1 csoportba tartozó ESBL és CMY-típusú szerzett AmpC
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CCUG58545	Szerzett DHA
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	Szerzett AmpC és ESBL negatív

4.5 Referenciák

- Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. Clin Microbiol Rev. 2009;22:161-82.
- Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46:1-11.
- Beceiro A, Bou G. Class C β -lactamases: an increasing problem worldwide. Rev Med Microbiol. 2004;15:141-152.
- Empel J, Hrabák J, Kozioska 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 β -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.



8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Martinez-Martinez L. Extended-spectrum beta-lactamases and the permeability barrier. Clin Microbiol Infect. 2008;14 Suppl 1:82-9.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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. Polymyxin rezisztencia Gram-negatív pálcákban

A rezisztencia mechanizmus detektálásának jelentősége	
Az antibiotikum érzékenység interpretálásához szükséges	Igen
Infekciókontroll tekintetében	Igen
Közegészségügy tekintetében	Igen

A szerzett polymyxin rezisztencia az utóbbi években jelent meg világszerte az *Enterobacteriaceae* család tagjaiban. Különösen a plazmidon-kódolt colistin rezisztencia állatokban, élelmiszerekben és emberben való megjelenése ad aggodalomra okot, mivel nagy a horizontális terjedés valószínűsége.

Korábban a polymyxin rezisztenciát kizárólag kromoszómális mutációk következményeként írták le, és általában néhány gén változásával volt összefüggésben, mint pl. a lipid A bioszintézishez kapcsolódó kétkomponensű regulációs rendszer mutációi, amik a lipopoliszacharid (LPS) réteg töltésének szabályozásában játszanak szerepet [1, 2]. 2015-ben írták le először a plazmidon-kódolt colistin rezisztenciát, és ezzel együtt a plazmidon-kódolt foszfoetanolamin transzferáz megjelenését, ami egy foszfoetanolamin csoportot kapcsol a lipid A-hoz. Ennek hatására csökken az LPS össznegatív töltése, és így kevésbé tudnak az LPS-hez kötődni a pozitívan töltött polymyxinek. Az új rezisztencia gént MCR-1-nek (mobile colistin resistance) nevezték el [3]. Azóta a rezisztencia mechanizmus jelenlétét már az összes kontinensen dokumentálták. Habár már egy 1980-as években izolált törzsből is kimutatták a gént, világszintű elterjedése az utóbbi 5 évre tehető [4]. 2016-ban az MCR-1 két új variánsát is leírták – MCR-1.2 és MCR-2 [5, 6]. *(Jelenleg már MCR-8-t is leírtak.)*

Az európai adatok alapján az invazív *K. pneumoniae* izolátumok 8,6%-a rezisztens colistinnel szemben, azonban a karbapenem rezisztens izolátumok között ez az arány 29% [7]. Meg kell jegyezni azonban, hogy a jelentő országok között jelentős különbségek vannak a rezisztencia arányokban, illetve a colistin érzékenységi vizsgálatoknál tapasztalható metodikai problémák torzíthatják a valós számokat. Valószínűleg a rezisztencia nagy része kromoszómális mutációk révén alakul ki, de vannak tanulmányok amelyekben MCR-1-t és karbapenemázt is termelő *Enterobacteriaceae* törzsekről számolnak be [4].

A mikro leveshígítási módszerrel való MIC meghatározáson kívül nincs elfogadott, széles körben bevizsgált módszer a különböző polymyxin rezisztencia mechanizmusok fenotípusos vizsgálatára. A közelmúltban azt találták, hogy az MCR enzimeknek cinkre van szükségük a hidrolízishez, ezért a cink-keletorok gátolhatják működésüket [8]. EDTA vagy dipikolinsav gátló hatásán alapuló tesztek fejlesztésére elméletileg tehát van lehetőség, azonban

jelenleg a polymyxin rezisztencia megbízható kimutatására fektetik a hangsúlyt – függetlenül annak mechanizmusától.

A colistin érzékenységi vizsgálatokhoz csak a colistin-szulfáttal végzett mikroleveshígítás ajánlott [9]. A korongdiffúziós és a gradiens tesztek használata egyáltalán nem ajánlott, mivel a „major error” és a „very major error” valószínűsége igen magas [10]. A közelmúltban kolorimetriás tesztek is kifejlesztettek, azonban eddig nem végeztek átfogó multicentrikus vizsgálatokat a módszer megbízhatóságának megállapítására [11]. Ha további vizsgálatokra is szükség van, akkor azt molekuláris módszerekkel ajánlott elvégezni. A jelenlegi ajánlás szerint csak colistin rezisztens izolátumokat ajánlott tovább vizsgálni.

Az antibiotikum érzékenységi minőségellenőrzési vizsgálatokat valamelyik érzékeny kontroll törzzsel (*E. coli* ATCC 25922 vagy *P. aeruginosa* ATCC 27853) és a colistin rezisztens *E. coli* NCTC 13846 (mcr-1 pozitív) törzzsel is el kell végezni. Az *E. coli* NCTC 13846 esetében a colistin MIC célérték 4 mg/L (2-8 mg/L MIC érték nagyon ritkán előfordulhat).

5.1 Referenciák

1. Giske CG. Contemporary resistance trends and mechanisms for the old antibiotics colistin, temocillin, fosfomicin, 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. Karbapenemáz-termelő *P. aeruginosa* és *Acinetobacter*

A rezisztencia mechanizmus detektálásának jelentősége	
Az antibiotikum érzékenység interpretálásához szükséges	Nem
Infekciókontroll tekintetében	Igen
Közegészségügy tekintetében	Igen

Karbapenemáz-termelő *P. aeruginosa* és *Acinetobacter baumannii*-csoport Európa számos országában jelen van [1]. *P. aeruginosa* esetében a VIM, elsősorban a VIM-2 a domináns enzimtípus Európában, de a dél-amerikai országokban KPC-termelőket is leírtak [2]. *Acinetobacter* esetében az OXA-típusú karbapenemázokat, főleg OXA-23-, OXA-24/40-, OXA-58-, OXA-143-, OXA-235-csoportba tartozó enzimeket írták le leggyakrabban [3].

Jelenleg nem ismert a D-osztályba tartozó OXA-karbapenemázokat specifikusan gátló vegyület, és nincs olyan fenotípusos módszer, mellyel megbízhatóan lehetne kimutatni és meghatározni ezeket a karbapenemázokat *Acinetobacter*ben. Kolorimetriás tesztet is kipróbáltak már, de összességében nem bizonyult pontosnak a genusnál [4]. *Acinetobacter*ek metallo- β -laktamázokat is termelhetnek, és elképzelhető, hogy ilyen esetekben jobban működik ez a teszt.

P. aeruginosa esetében már néhány évtizede rendelkezésre áll az MBL Etest, illetve korong alapú tesztek, azonban alacsony specificitásuk miatt nem jól használhatóak [5-7]. A közelmúltban több szerző is javasolt különböző módosításokat a kombinált korong teszteknel (imipenem vagy meropenem különböző kelátorokkal (EDTA vagy DPA) kombinálva), azonban ezeket csak egy-egy laboratóriumban validálták, ezért megbízhatóságukról nehéz meggyőzősíteni [8, 9]. A kolorimetriás tesztek jobban működnek *P. aeruginosa* esetében, mint *acinetobacter*eknél [10], és valószínűleg jelenleg ezek a legjobb specificitással bíró tesztek. Egyetlen teszt sem tűnik eléggé specifikusnak ahhoz, hogy molekuláris megerősítés nélkül önmagában lehessen alkalmazni.

A feltehetően karbapenemáz-termelő *P. aeruginosa* és *Acinetobacter* izolátumok megerősítő vizsgálatára általában genotípusos megközelítést alkalmaznak, de elsősorban *P. aeruginosa* esetében a fent említett fenotípusos tesztek is hasznosak lehetnek kiindulásként.

Meg kell jegyezni, hogy a karbapenemáz-termelés vizsgálata leginkább *P. aeruginosa* esetében releváns, mivel itt a karbapenem rezisztencia hátterében sokféle kromozómáisan kódolt mechanizmus is állhat (aktív efflux, porin

változások vagy deficiencia). Ezzel ellentétben *Acinetobacter*nél a karbapenem rezisztencia hátterében szinte kizárólag OXA-típusú karbapenemázok termelése áll.

Két ajánlott kontroll törzs: *P. aeruginosa* NCTC 13437 (VIM-10-termelő) és *A. baumannii* NCTC 13301 (OXA-23-termelő). Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok minőségellenőrzéséhez nem állnak rendelkezésre ajánlások ezen törzsek esetében.

6.1 Referenciák

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. Page 28 of 43.
3. Higgins PG, Pérez-Llarena FJ, Zander E, Fernández A, Bou G, Seifert H. OXA-235, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(5):2121-6.
4. Noël A, Huang TD, Berhin C, Hoebeke 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- β -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- β -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- β -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. Methicillin rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA)

A rezisztencia detektálásának jelentősége	
Az antibiotikum érzékenység interpretálásához szükséges	Igen
Infekciókontroll tekintetében	Igen
Közegészségügy tekintetében	Igen

7.1 Definíció

Azok az *S. aureus* izolátumok tartoznak ide, amelyek rendelkeznek egy járulékos penicillin-kötő fehérjével (penicillin binding protein, PBP), ami lehet *mecA* kódolta PBP2a vagy *mecC* kódolta PBP2c. Ezeknek a PBP-knek alacsony az affinitása β -laktámokkal szemben, kivéve a cefalosporinok új, MRSA ellenes aktivitással rendelkező osztályát (ceftarolin és ceftobiprol).

7.2 Klinikai és/vagy epidemiológiai jelentőség

Világszerte a methicillin rezisztens *S. aureus* a morbiditás és a mortalitás egyik fő oka [1, 2]. Az MRSA okozta véráramfertőzések mortalitása kétszerese a methicillin érzékeny törzsek által okozott hasonló infekcióknak, ami a kései adekvát terápia és a rosszul megválasztott terápiás protokoll következménye [3]. Az MRSA fertőzések endemiásak mind a kórházakban, mind a területen a világ legtöbb részén.

7.3 Rezisztencia mechanizmusok

A legfőbb rezisztencia mechanizmus valamely járulékos penicillin-kötő fehérje termelése. A PBP2a és a PBP2c rezisztenssé teszik az izolátumot minden β -laktámmal szemben, kivéve az „anti-MRSA” cefalosporinokat, amelyeknek elég magas az affinitása a PBP2a-hoz és valószínűleg a *mecC* által kódolt módosult PBP-hez is, így hatásosak az MRSA ellen [4]. A járulékos PBP-eket a *mecA* gén és a mostanában leírt *mecC* gének kódolják [5]. A *S. aureus* törzsekben a *mec* szerzett elem, és nincs jelen a methicillin érzékeny *S. aureus* törzsekben. Azoknál a törzseknél, ahol a *mecA* gén expressziója heterogén és amelyek gyakran alacsony oxacillin MIC értékkel rendelkeznek, nehézségekbe ütközik az érzékenység pontos meghatározása [5]. Továbbá vannak alacsony szintű oxacillin rezisztenciájú izolátumok, melyek *mecA* és *mecC* negatívak és nem termelnek szerzett PBP-eket [„borderline” rezisztens *S. aureus* (BORSA)] sem. Ezek a törzsek viszonylag ritkán fordulnak elő és a rezisztencia mechanizmusa kevésbé ismert, de szerepet játszhat benne a β -laktamázok túltermelése vagy a *S. aureus* genomjában már eleve létező PBP-k módosulása [6].

A *mecA* inaktivációja miatt cefoxitin és oxacillin érzékeny, de *mecA*-pozitív *S. aureus* izolátumokat (OS-MRSA) a világ számos részén leírtak már. Ezek a törzsek eltérnek a heterogén rezisztens MRSA-któl, mivel azok oxacillin érzékenyek, de cefoxitin rezisztensek [7, 8]. Az OS-MRSA izolátumok becsült gyakorisága kb. 3% a kombinált fenotípusos és molekuláris eredményeket is tartalmazó tanulmányok alapján. A methicillin rezisztencia újbóli megjelenését – hosszú antibiotikum terápia során – csak egyetlen esetben dokumentálták [9], de várható, hogy ilyen esetek előfordulhatnak. A rezisztencia visszaállításának aránya azonban jelenleg nem ismert. Az OS-MRSA-kat definíció szerint csak molekuláris módszerekkel lehet azonosítani. Ez nem jelenti azt, hogy minden *S. aureus* izolátumot meg kellene vizsgálni molekuláris tesztekkel, azonban terápiás sikertelenség esetén fontos lehet ez a jelenség. Amennyiben *mecA* gént lehet kimutatni véletlenszerűen, vagy a terápiás sikertelenség miatt végzett szűrésnél, akkor az izolátumot mindig rezisztensnek kell interpretálni.

7.4 Ajánlott módszerek a methicillin rezisztencia kimutatására *S. aureus* esetén

A methicillin/oxacillin rezisztencia kimutatható mind fenotípusosan MIC érték meghatározással, mind korongdiffúzióval. A PBP2a kimutatható agglutinációs teszttel, de a PBP2c esetében ez a módszer nem megbízható. A genotípusos megerősítés megbízható PCR módszerrel.

7.4.1 Kimutatás MIC érték meghatározással vagy korongdiffúzióval

A rezisztencia heterogén expresszója különösen befolyásolja az oxacillin MIC értéket, ami akár érzékeny is lehet. A cefoxitin igen érzékeny és specifikus markere a *mecA/mecC* által közvetített methicillin rezisztenciának, és a választandó hatóanyag a korongdiffúzió során. Az oxacillin korongdiffúziós vizsgálata nem javasolt, és az EUCAST breakpoint táblázata nem tartalmaz interpretációs zóna átmérőket, mert az gyengén korrelál a *mecA* gén jelenlétével.

A. Mikro leveshígítási módszer: A standard módszer (ISO 20776-1) alapján végzett vizsgálat. A >4 mg/L cefoxitin MIC érték esetén a törzseket methicillin rezisztensnek kell tekinteni.

B. Korongdiffúziós módszer: Az EUCAST korongdiffúziós módszere alapján végzett vizsgálat. A törzseket a cefoxitin (30µg) <22 mm gátlási zóna átmérő esetén methicillin rezisztensnek kell tekinteni.

7.4.2 Kimutatás genotípusos vagy latex agglutinációs módszerekkel

A *mecA* és *mecC* gének genotípusos detektálására PCR alapú módszerek [10, 11], illetve a PBP2a fehérje kimutatására latex agglutinációs tesztek használhatóak, melyek lehetnek kereskedelmi vagy házi fejlesztésű tesztek. Azonban a *mecC*-t és az általa kódolt PBP-t jelenleg nem lehet kimutatni a kereskedelmi forgalomban lévő legtöbb genotípusos módszerrel.

7.4.3 Kontroll törzsek

Az alábbi táblázatban kerültek felsorolásra a fenotípusos és genotípusos vizsgálatokhoz is használható kontroll törzsek. Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok minőségellenőrzéséhez nem állnak rendelkezésre ajánlások ezen törzsek esetében. Kereskedelmi tesztek használatakor a tesztekben található leírás ad felvilágosítást az ott használandó kontroll törzsekre.

1. táblázat. A methicillin érzékenységi vizsgálatok minőségellenőrzésére alkalmas kontroll törzsek.

Törzs	Mechanizmus
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Methicillin érzékeny
<i>S. aureus</i> NCTC 12493	Methicillin rezisztens (<i>mecA</i>)
<i>S. aureus</i> NCTC 13552	Methicillin rezisztens (<i>mecC</i>)

7.5 Irodalomjegyzék

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 metaanalysis. 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. Page 31 of 43.
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_{LGA251}*. *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_{LGA251}*. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67:2338-41.

8. Vancomycin rezisztens *Staphylococcus aureus*

A rezisztencia detektálásának jelentősége	
Az antibiotikum érzékenység interpretálásához szükséges	Igen
Infekciókontroll tekintetében	Igen
Közegészségügy tekintetében	Igen

8.1 Definíció

Az EUCAST klinikai breakpoint meghatározása szerint vancomycin rezisztens *S. aureus* törzsről beszélünk, ha a MIC érték >2 mg/L. Az elmúlt években csökkentették a vancomycin breakpointokat, amivel megszűnt a korábbi mérsékelt érzékeny kategória. Azonban fontos különbség van a rezisztencia mechanizmust illetően a VanA mediálta magas szintű vancomycin rezisztenciával bíró *S. aureus* (VRSA), illetve a *vanA*-t nem hordozó, alacsony szintű rezisztenciával rendelkező izolátumok között. Ennek következtében a vancomycinnel szemben nem VanA-alapú, alacsony szintű rezisztenciával rendelkező izolátumok megjelölésére továbbra is használatosak a vancomycinre mérsékelt érzékeny *S. aureus* (VISA), illetve a vancomycinre mérsékelt szintű heterorezisztenciát mutató *S. aureus* (hVISA) elnevezések. A MIC értéket minden esetben meg kell határozni, ha súlyos *S. aureus* fertőzésben szenvedő beteget vancomycinnel kezelnek. Bizonyos esetekben, például amikor terápiás kudarc gyanúja merül fel, hVISA irányában végzett vizsgálat is indokolt lehet. A hVISA megerősítését célzó vizsgálatok komplexitása miatt az antibiotikum surveillance fókuszában a VISA és VRSA törzsek detektálása áll.

VRSA: Vancomycin rezisztens *S. aureus*:

Magas szintű vancomycin rezisztenciával (MIC érték >8 mg/L) rendelkező *S. aureus* izolátumok.

VISA: Vancomycinre mérsékelt érzékeny *S. aureus*:

Alacsony szintű vancomycin rezisztenciával (MIC érték 4 - 8 mg/L) rendelkező *S. aureus* izolátumok.

hVISA: Vancomycinre mérsékelt szintű heterorezisztenciát mutató *S. aureus*:

Vancomycinre érzékeny (MIC érték ≤ 2 mg/L) *S. aureus* törzsek, amelyeknél populáció analízis profil vizsgálattal >2 mg/L vancomycin MIC értékkel rendelkező szubpopuláció (10^6 -ból egy) detektálható.

Fontos megjegyezni, hogy bár ezek a meghatározások továbbra is használatosak, mindegyik fent említett kategóriát klinikai szempontból vancomycin rezisztensnek kell tekinteni.

8.2 Klinikai és/vagy epidemiológiai jelentőség

Nem rendelkezünk naprakész adatokkal a csökkent glikopeptid érzékenység előfordulásáról Európában. Egy-egy intézetben készített vizsgálat alapján a hVISA prevalencia $\leq 2\%$ -ra becsülhető az MRSA törzsek között Európában, VISA előfordulása 0,1%-ra tehető [1]. VRSA-t nem jelentettek még Európában, és jelenleg extrém ritka világszerte [2]. A hVISA prevalencia jelentősen megemelkedhet helyileg [1], gyakran egy-egy meghatározott klón terjedésével összefüggésben [2]. Majdnem valamennyi emelkedett MIC értékkel (VISA), vagy rezisztens szubpopulációval (hVISA) rendelkező izolátum MRSA törzs.

A hVISA klinikai jelentőségét nehéz meghatározni, mivel nem végeztek ezidáig megfelelő kontroll mellett prospektív vizsgálatokat. Mindazonáltal a hVISA fenotípus jelenléte gyakrabban hozható összefüggésbe a terápia sikertelenségével, legalábbis súlyos fertőzésben [2, 3]. Ezért érdemes hVISA irányában vizsgálatokat végezni, ha a véráramfertőzés nem reagál a kezelésre. Egyre több adat utal arra, hogy az érzékeny MIC tartomány magasabb értékei (MIC >1 mg/L) esetén gyakoribb a sikertelen terápia, illetve nő a mortalitás, legalábbis véráramfertőzés esetén [3-8]. Ennek okai még nem tisztázottak, de lehetséges, hogy a vancomycin nem megfelelő dozírozása áll a háttérben [9, 10]. Mindazonáltal a kapcsolódó tanulmányok eredményeinek értelmezését nehezítik a különböző módszerekkel kapott MIC adatok eltérései [8, 9].

A hVISA mechanizmusa összetett, detektálásának alapja a populációanalízis [11], ami nehézkes, speciális felszerelést és magas fokú technikai hozzáértést igényel. A hVISA detektálásának módszere röviden bemutatásra kerül, azonban surveillance céljából csak a VISA és a VRSA törzseket kell bejelenteni, amelyek közös definíció szerint a >2 mg/L MIC értékkel rendelkező izolátumok.

8.3 Rezisztencia mechanizmusok

VRSA esetében a rezisztenciát az enterococcusoktól exogén úton szerzett *vanA* operon kódolja. VISA és hVISA törzsek esetében a rezisztencia endogén (azaz kromoszómális mutációk által okozott), mechanizmusa rendkívül összetett, nem egyetlen gén okozza. VISA/hVISA fenotípus esetén a baktérium sejtfala megvastagszik, a glikopeptid kötőhelyek túltermelődnek. A hVISA fenotípus gyakran instabil a laboratóriumban, azonban *in vivo* a hVISA törzsek hajlamosak VISA-vá alakulni [2].

8.4 A glikopeptid nem-érzékeny *S. aureus* detektálására ajánlott módszerek

A korongdiffúziós vizsgálat nem alkalmas sem a hVISA sem a VISA kimutatására, de valószínűleg a VRSA detektálására alkalmas lehet, habár korlátozott számú tanulmány áll rendelkezésre, mely ezt a megfigyelést alátámasztja [12].

8.4.1 MIC érték meghatározás

A gold standard az EUCAST által javasolt mikrodilúciós módszer (a 20776-1 számú ISO szabványnak megfelelően végezve), de a MIC meghatározható gradiens csík módszerrel, agardilúcióval, vagy automata rendszerek segítségével is. Meg kell jegyezni, hogy a gradiens tesztsíkkal 0,5-1 felező hígítással magasabb MIC értékeket lehet kapni, mint mikro leveshígításos módszerrel [8, 9]. *S. aureus* esetén a vancomycin rezisztencia breakpoint-ja az EUCAST szerint MIC >2 mg/L. A megerősítetten >2 mg/L MIC értékkel (mikro leveshígítás alapján) rendelkező izolátumokat referencia laboratóriumba kell küldeni. hVISA törzs nem detektálható MIC meghatározással.

8.4.2 VRSA, VISA és hVISA detektálási módszer

A hVISA törzsek detektálása nehézkesnek bizonyult, ezért a detektálás két lépésben történik: egy szűrő vizsgálat után alkalmaznak egy megerősítő módszert. Szűrésre több specializált módszer áll rendelkezésre. Megerősítésre az izolátum többféle vancomycin koncentrációt tartalmazó agar lemez sorozaton végzett populációs profil analízise alkalmas (PAP-AUC) [11]. Ez a módszer technikailag kihívást jelenthet a nem kellő tapasztalattal rendelkező vizsgáló számára, ezért leginkább referencia laboratórium feladata. Egy vancomycint és kazeint tartalmazó szűrő agaron alapuló módszer [13] magas szenzitivitással és specificitással rendelkezik, azonban még csupán egyetlen vizsgálatban végezték el értékelését, ezért jelen dokumentumban nem szerepel. A következő módszerek mindegyike alkalmas VRSA és VISA törzsek detektálására, ezek több centrumot érintő vizsgálatban kerültek értékelésre [14, 15].

A. Makro gradiens teszt:

A teszt kimutatja a csökkent vancomycin érzékenységet, azonban az eredmények nem azonosak a MIC értékekkel. Továbbá a teszt nem különbözteti meg a hVISA, VISA, illetve VRSA törzseket. A tesztet a gyártó utasításai szerint kell végezni. Az inokulum magasabb (2,0 McFarland), mint a standard gradiens tesztek esetében, és Mueller-Hinton leves helyett BHI (agy- és szívkivonat) levest kell alkalmazni. Továbbá, a szokásostól eltérően 48 óra inkubáció után is értékelni kell. A teszt pozitív, ha mind a vancomycinre, mind a teicoplaninra kapott érték ≥ 8 mg/L, VAGY ha a teicoplaninra kapott érték ≥ 12 mg/L.

Mivel mindkét kritérium tartalmazza a teicoplanint, a vancomycin vizsgálata függhet a teicoplanin teszt eredményétől. Az algoritmus ezek alapján:

- Teicoplanin eredmény ≥ 12 mg/L: VRSA, VISA, vagy hVISA
- Teicoplanin eredmény 8 mg/L: vancomycin teszt elvégzése. Ha a vancomycin teszt eredménye ≥ 8 mg/L, a törzs VRSA, VISA, vagy hVISA
- Teicoplanin eredmény < 8 mg/L: Nem VRSA, VISA, vagy hVISA

B. Glikopeptid rezisztencia detektálása (GRD) grádiens teszttel:

A tesztet a gyártó utasításainak megfelelően kell végezni. A teszt pozitív, ha a GRD csík eredménye ≥ 8 mg/L akár vancomycinre, akár teicoplaninra.

C. Teicoplanin screen agar:

5 mg/L teicoplanint tartalmazó Mueller-Hinton agarlemezt kell használni [10]. Több teleppel 0,9% fiziológiás sóoldatban 2,0 McFarland turbiditású szuszpenziót készítünk. Tíz mikroliter inokulumot viszünk fel az agar egy pontjára, majd a lemezt 35°C-on, normál légkörben inkubáljuk 24-48 órán keresztül. Több mint két telep megjelenése 48 óra után csökkent glikopeptid érzékenységre utal. (Ez a szűrőlemez a Nemzeti Népegészségügyi Központ Táptalajkészítő Egységétől rendelhető.)

D. Megerősítő vizsgálat hVISA/VISA esetén:

Az az izolátum, amely csökkent érzékenységet mutat, és nem lehet VRSA-ként vagy VISA-ként azonosítani MIC meghatározással, lehetséges hVISA törzs, és populáció analízis profil – görbe alatti terület (PAP-AUC) [8] vizsgálattal lehet tovább vizsgálni, gyakran referencia laboratóriumba való továbbítással.

(A Mikrobiológiai Körlevél IX. évfolyam 1. számában olvasható "A methicillin rezisztens Staphylococcus aureus glikopeptid érzékenységének vizsgálata" ajánlásban megfogalmazottak azon részei, amivel az EUCAST ajánlása külön nem foglalkozik, továbbra is érvényben maradnak.)

8.4.3 Kontroll törzsek

Az alábbi táblázatban kerültek felsorolásra a fenotípusos és genotípusos vizsgálatokhoz is használható kontroll törzsek. Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok minőségellenőrzéséhez nem állnak rendelkezésre ajánlások ezen törzsek esetében. Kereskedelmi tesztek használatakor a tesztekben található leírás ad felvilágosítást az ott használandó kontroll törzsekre.

2. táblázat. A glikopeptid érzékenységi vizsgálatok minőségellenőrzésére alkalmas kontroll törzsek.

Törzs	Mechanizmus
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Glikopeptid érzékeny
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	hVISA (Mu3)
<i>S. aureus</i> ATCC 700699	VISA (Mu50)

8.5 Irodalomjegyzék

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Rojas L, Bunsow E, Munoz P, Cercenado E, Rodriguez-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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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. Vancomycin-rezisztens *Enterococcus faecium* és *Enterococcus faecalis*

A rezisztencia detektálásának jelentősége	
Az antibiotikum érzékenység interpretálásához szükséges	Igen
Infekciókontroll tekintetében	Igen
Közegészségügy tekintetében	Igen

9.1 Definíció

VRE minden olyan *Enterococcus faecium* és *Enterococcus faecalis* izolátum, amely rezisztens vancomycinnel szemben (vancomycin MIC >4 mg/L).

9.2 Klinikai és/vagy epidemiológiai jelentősége

Az enterococcusok, különösen az *E. faecium*, rezisztensek a klinikai gyakorlatban alkalmazott antibiotikumok többségére. A vancomycin rezisztens enterococcusok (VRE) által okozott fertőzések kezelése pedig különösen nehéz a kevés kezelési lehetőség miatt. A VRE-ről jól ismert, hogy kórházi környezetben könnyen terjed, és sokáig fennmarad, sok beteget kolonizálhat, azonban csak kevés esetben okoz megbetegedést [1, 2]. A *vanB* gént hordozó izolátumok általában fenotípusosan érzékenyek teicoplaninra. Két esetleírásban számolnak be teicoplanin rezisztencia kialakulásáról *vanB*-t hordozó enterococcus okozta fertőzés kezelése közben [3, 4]. Kezelési sikertelenségről eddig négy esetben számoltak be [5], ami felhívja a figyelmet arra, hogy a teicoplanint csak óvatosan lehet alkalmazni VanB-típusú enterococcusok okozta fertőzések kezelésénél. A klinikai gyakorlatban legfontosabb Van-típusokhoz tartozó MIC értékek az 1. táblázatban láthatóak.

1. táblázat. Tipikus glikopeptid MIC értékek VanA-, illetve VanB-típusú rezisztenciát mutató enterococcusok esetén.

Glikopeptid	MIC érték (mg/L)	
	VanA	VanB
Vancomycin	64 - 1024	4 - 1024
Teicoplanin	8 - 512	0,06 - 1

9.3 Rezisztencia mechanizmusok

A klinikailag releváns rezisztenciáért a leggyakrabban plazmidon kódolt VanA- és VanB-típusú operonok felelősek, amelyek a peptidoglikán felépítése során a pentapeptid oldalláncok terminális D-alanin helyére D-laktátot építenek be. Ez a változás csökkenti a glikopeptidek kötődési képességét a célmolekulához. A

VanA-típusú törzsek vancomycinnel és teicoplaninnal szemben is rezisztensek, míg a VanB-típusú törzsek általában érzékenyek maradnak teicoplanin iránt, mert a rezisztenciáért felelős operonon kódolt enzimek kifejeződését ez az antibiotikum nem indukálja. Léteznek más, ritka Van-típusok is, mint a VanD, VanE, VanG, VanL, VanM és VanN [6-9], bár *vanM* esetében leírták, hogy Kínában az arányuk jelentősen megnőtt *E. faecium* körében [10].

Más enterococcus fajok (pl.: *E. raffinosus*, *E. gallinarum* és *E. casseliflavus*), hordozhatnak *vanA*, *vanB* vagy más, korábban említett *van* géneket, de ezek viszonylag ritkán fordulnak elő. Kromoszómán kódolt VanC enzimek megtalálhatóak minden *E. gallinarum* és *E. casseliflavus* izolátumban. A *vanC* jelenléte alacsony szintű vancomycin rezisztenciát (MIC 4-16 mg/L) okoz, de ennek járványügyi jelentősége csekély [11].

Vancomycinre változó érzékenységgű enterococcus (VVE-vancomycin variable enterococci) megnevezés olyan VRE-t jelöl, ahol a genetikai átrendeződések miatt a *van* gének kifejeződése nem megfelelő, azonban glikopeptid szelekciós nyomás hatására helyreállhat a rezisztencia [12, 13]. Ezen kívül, az alacsony MIC értékű VRE (low-MIC VRE) megnevezést használják olyan *vanB*-pozitív izolátumokra, ahol a vancomycin indukáló hatására kevésbé fogékony izolátumok alacsony *vanB* expressziója miatt a vancomycin MIC érték az érzékenységi határérték alatt lehet. Ezeknél a low-MIC VRE izolátumoknál a vancomycin MIC érték a rezisztencia határérték fölé emelkedhet hosszabb ideig való vancomycin kitétség hatására [14]. Mind a VVE, mind a low-MIC VRE törzsek gyakran csak molekuláris módszerekkel azonosíthatóak. Valós előfordulási arányuk a különböző földrajzi régiókban nem ismert.

9.4 A glikopeptid rezisztencia detektálására ajánlott módszerek *E. faecium* és *E. faecalis* esetén

A vancomycin rezisztencia detektálható MIC érték meghatározással, korongdiffúzióval és szűrőlemez módszerrel. Mindhárom módszer esetében fontos, hogy az inkubáció hossza teljes 24 óra legyen az indukálható rezisztencia biztos kimutatása érdekében.

Mindhárom módszerrel könnyedén kimutatható a VanA-típusú rezisztencia, azonban a VanB-típusú rezisztencia kimutatása nagyobb kihívást jelent. Az agarhígítós vagy leveshígítós MIC meghatározás sem mindig megbízható módszer a VanB fenotípusú izolátumok kimutatására [15-17].

Régebbi vizsgálatok alapján a VanB-típusú rezisztencia detektálása gondot jelent automata módszerek esetén is [18]. Azóta továbbfejlesztették ezeket az automatizált érzékenységi vizsgálatokat, azonban nincsenek újabb adatok arra vonatkozóan, hogy javult-e a módszerek VanB-típusú rezisztenciára vonatkozó

detektálási képessége. A korongdiffúziós vizsgálat (5 µg-os vancomycin korong) értékelése nehézkes lehet, de az EUCAST irányelveinek precíz követésével ezek a tesztek jó eredményt adnak [19].

A MIC vagy korongdiffúziós vizsgálat eredményeinek értékelésekor fontos megbizonyosodni arról, hogy az izolátum nem *E. gallinarum* vagy *E. casseliflavus*, amelyeket tévesen *E. faecium*-nak vélhetünk pozitív arabinóz teszt alapján. A MALDI-TOF tömegspektrométerrel végzett species meghatározás nagyon sokat segít enterococcusok esetében [20]. Olyan helyeken, ahol a MALDI-TOF nem elérhető, az MGP (metil-alfa-D-glukopiranozid) teszt vagy a mozgásképesség vizsgálat alkalmas az *E. gallinarum*/*E. casseliflavus* *E. faecium*-tól való elkülönítésére (MGP negatív és nem mozog).

9.4.1 MIC érték meghatározás

MIC érték meghatározás történhet agardilúcióval, mikro leveshígítással vagy gradiens MIC módszerrel.

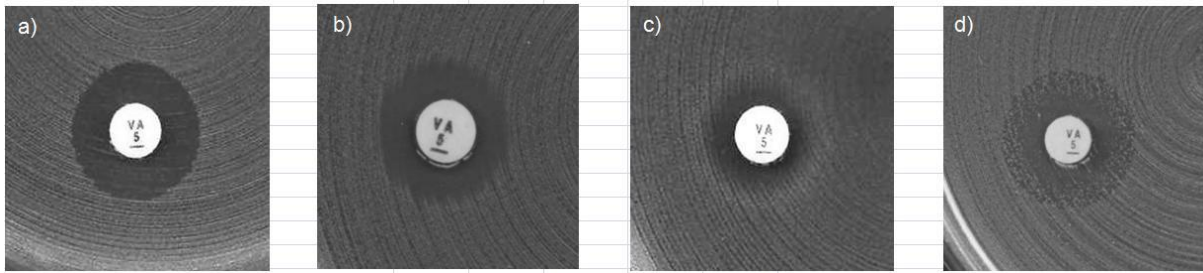
Az EUCAST ajánlása alapján a mikro leveshígítást az ISO 20766-1 standard szerint kell kivitelezni.

9.4.2 Korongdiffúziós vizsgálat

Korongdiffúziós vizsgálat esetén szigorúan be kell tartani az EUCAST által meghatározott módszert. Fontos, hogy áteső fényben vizsgáljuk meg a zónahatár élességét és/vagy mikrokolóniák meglétét. Éles zónahatár az izolátum érzékenységét jelzi. Ha a zónahatár éles, valamint a gátlási zóna átmérője nagyobb, mint a megadott határérték, akkor az izolátum vancomycin érzékenynek interpretálható. Ha a gátlási zóna határa elmosódott, vagy benövés látható (1. ábra), az izolátum a zónaátmérőtől függetlenül rezisztens lehet, és nem szabad érzékenyként kiadni MIC érték meghatározás nélkül. Egy nemrégiben végzett multicentrikus vizsgálatban a korongdiffúziós módszert jobbnak találták a VITEK2-nél a VanB-termelő enterococcusok kimutatására, különösen olyan laboratóriumok esetében, ahol már volt tapasztalatuk az elmosódott gátlási zónahatárok értékelésében [19].

- A korongdiffúziós vizsgálatnál az EUCAST nem-igényes baktériumokra kidolgozott korongdiffúziós módszerét kell alkalmazni. Teljes 24 órás inkubáció szükséges ahhoz, hogy az indukálható rezisztencia is kimutatható legyen.

1. ábra. A vancomycin korongdiffúziós teszt értékelése *Enterococcus* spp. esetében.



- a) A gátlási zóna átmérője ≥ 12 mm és éles a határa: az izolátum érzékeny vancomycinnel szemben.
b-d) Elmosódott zóna, és/vagy benövések a gátlási zónában. Zónaátmérőtől függetlenül rezisztensnek értékelendő.

9.4.3 Szűrőlemezek

Szűrőlemezként 6 mg/L vancomycin tartalmú Brain Heart Infusion agar megbízhatóan használható a *vanA*- és a *vanB*-pozitív izolátumok kimutatására [19]. A szűrőlemezek beszerezhetőek kereskedelmi forgalomban, vagy házilag is készíthetőek.

(Ez a szűrőlemez a Nemzeti Népegészségügyi Központ Táptalajkészítő Egységétől rendelhető.)

A vizsgálat kivételezéséhez 1×10^5 - 1×10^6 CFU (10 μ l 0,5 McFarland-es szuszpenzió) baktériumot vigyünk fel 6 mg/L vancomycin tartalmú Brain Heart Infusion agarlemezre. $35 \pm 1^\circ\text{C}$ hőmérsékleten normál légtérben történő 24 órányi inkubáció szükséges ahhoz, hogy az indukálható rezisztencia is kimutatható legyen. Több mint egy telep növekedése esetén a teszt pozitív.

9.4.4 Genotipizálás

A *vanA* és *vanB* gének kimutatása történhet kereskedelmi forgalomban kapható illetve házi készítésű PCR tesztekkel is [20-22].

9.4.5 Kontroll törzsek

Az alábbi táblázatban kerültek felsorolásra a fenotípusos és genotípusos vizsgálatokhoz is használható kontroll törzsek. Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok minőségellenőrzéséhez nem állnak rendelkezésre ajánlások ezen törzsek esetében. Kereskedelmi tesztek használatakor a tesztekben található leírás ad felvilágosítást az ott használandó kontroll törzsekre.



2. táblázat. A glikopeptid érzékenységi vizsgálatok minőségellenőrzésére alkalmas kontroll törzsek.

Törzs	Mechanizmus
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	Vancomycin érzékeny
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	Vancomycin rezisztens (<i>vanB</i>)
<i>E. faecium</i> NCTC 12202	Vancomycin rezisztens (<i>vanA</i>)

9.5 Irodalomjegyzék

1. Mazuski JE. Vancomycin-resistant enterococcus: risk factors, surveillance, infections, and treatment. *Surg Infect.* 2008;9:567-71.
2. 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, Fiett 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, Fines-Guyon M, Berger P, Camiade S, Leclercq R, Courvalin P, Cattoir V. 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 vanMin 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 (VanC VRE). *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-Variation 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, Schönning 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. Penicillinre nem érzékeny *Streptococcus pneumoniae*

A rezisztencia detektálásának jelentősége	
Az antibiotikum érzékenység interpretálásához szükséges	Igen
Infekciókontroll tekintetében	Nem
Közegészségügy tekintetében	Igen

10.1 Definíció

A β -laktámok iránt csökkent affinitással rendelkező módosult penicillin-kötő fehérjék (PBP-k) jelenléte következtében csökkent penicillin érzékenységgel (a MIC értéke meghaladja a vad típusnál mértet, azaz $>0,06$ mg/L) rendelkező *S. pneumoniae* izolátumok.

10.2 Klinikai és/vagy epidemiológiai jelentősége

A *S. pneumoniae* a tüdőgyulladás leggyakoribb kórokozója világszerte. Morbiditása, mortalitása magas, becslések szerint évente három millió ember halálát okozza pneumococcus fertőzés. Az alacsony szintű penicillin rezisztencia megnövekedett mortalitással hozható összefüggésbe penicillinnel kezelt meningitis esetén [1]. Más típusú fertőzésekben nem figyelhető meg magasabb mortalitás alacsony szintű rezisztencia esetén, amennyiben magasabb dózisban adagolják a szert. Sok országban folytatnak vakcinációs programot számos pneumococcus szerotípus ellen, ami szintén befolyásolhatja az invazív izolátumok rezisztenciáját [2]. Mindazonáltal, a penicillinre nem érzékeny *S. pneumoniae* törzsek jelentős klinikai problémát jelentenek közegészségügyi szempontból, habár ezek a mikroorganizmusok nem terjednek egészségügyi intézményekben, sok más, ebben a dokumentumban leírt patogénnel szemben.

10.3 Rezisztencia mechanizmusok

A *S. pneumoniae* hat PBP-t tartalmaz, amelyek közül a PBP2x a penicillin elsődleges célmolekulája [3]. Az alacsony affinitású PBP-eket kódoló „mozaik gének” kommenzális viridans streptococcusoktól származnak horizontális géntranszfer útján [3]. A β -laktám rezisztencia szintje nem csak az izolátumban jelenlévő alacsony affinitású mozaik PBP-ktől függ, hanem a *S. pneumoniae* számára nélkülözhetetlen specifikus PBP-k módosulásától is [4]. Nem meningitises infekcióban, ha az izolátum benzylpenicillin MIC értéke 0,12 és 2 mg/L közötti, a törzs érzékenynek tekinthető nagyobb dózisban adagolt penicillin esetén, míg meningitisben ezeket az izolátumokat minden esetben rezisztensként kell interpretálni [5].

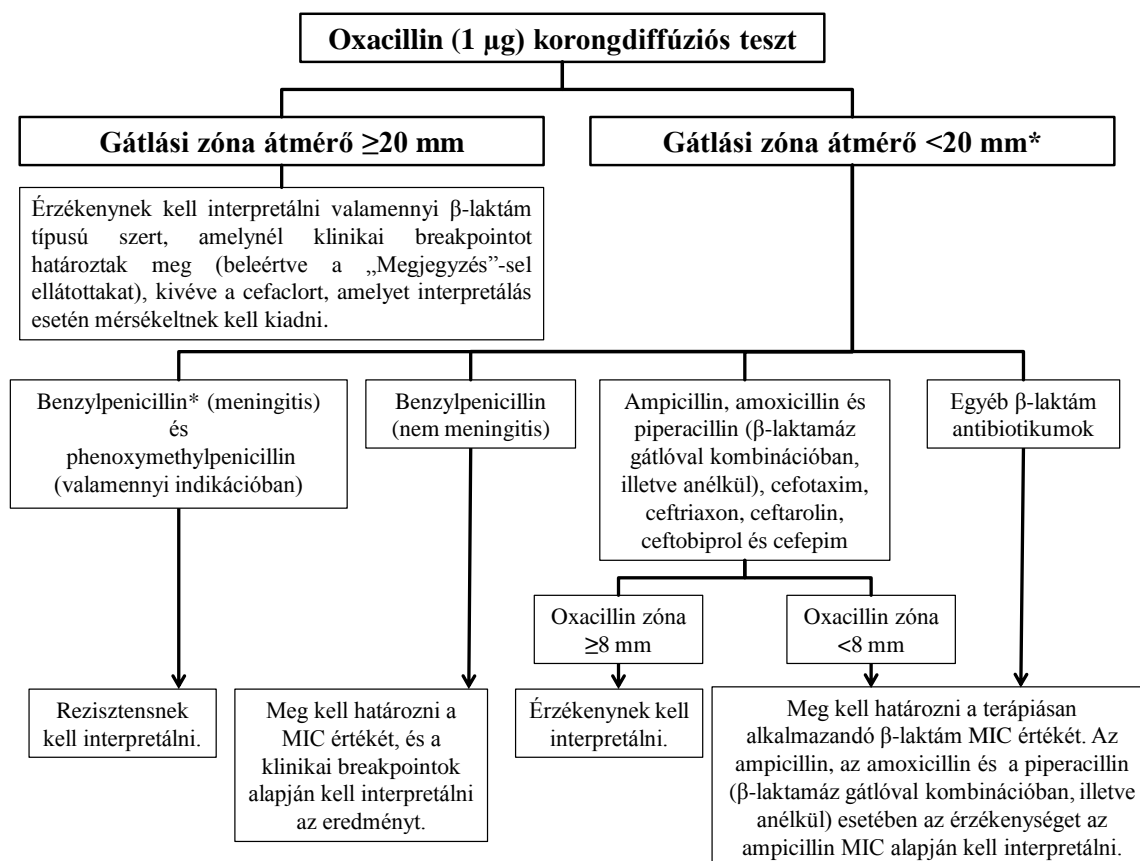
10.4 A penicillinre nem érzékeny *S. pneumoniae* izolátumok detektálására ajánlott módszerek

A penicillinre nem érzékeny törzsek fenotípusosan detektálhatók MIC érték meghatározással vagy korongdiffúzióval.

10.4.1 Korongdiffúzió

Az 1 µg-os oxacillin koronggal végzett korongdiffúziós vizsgálat hatékony szűrő módszer a penicillinre nem érzékeny pneumococcusok detektálására [6-8]. A módszer érzékenysége magas, de nem kellően specifikus, mivel a ≤19 mm zónával rendelkező törzsek benzylpenicillin iránti érzékenysége variábilis lehet. Ezért a szűrő módszerrel penicillinre nem érzékeny izolátum esetén meg kell határozni a benzylpenicillin MIC értékét [8].

Egyéb, benzylpenicillintől eltérő β-laktám antibiotikumok esetén az érzékenységet az oxacillin zóna alapján interpretálható az 1. ábrán leírtak szerint.



1. ábra. β-laktám rezisztencia szűrése *S. pneumoniae* izolátum esetén

*Oxacillin (1 µg) <20 mm: Mindig meg kell határozni a benzylpenicillin MIC értékét, de haladéktalanul ki kell adni a többi β-laktám érzékenységi eredményét a fenti szabályok szerint.

10.4.2 Klinikai breakpointok

A penicillin breakpointokat alapvetően a pneumococcus meningitis sikeres kezelésének biztosítására állapították meg. Azonban klinikai vizsgálatok bebizonyították, hogy a mérsékelt penicillin érzékenyséű törzsek okozta pneumococcus pneumóniák esetén a kimenetel nem különbözött a parenterális penicillinnel kezelt, illetve más szerekkel kezelt betegek esetében. Mikrobiológiai, farmakokinetikai és farmakodinamikai adatokat figyelembe véve, felülvizsgálták a benzylpenicillin breakpointokat nem-meningitisből származó izolátumok esetében [4] és a jelenlegi EUCAST breakpointokat az 1. táblázatban foglalták össze.

1. táblázat. Benzylpenicillin érzékenység interpretálása meningitis, illetve nem meningitis esetén.

Indikáció	MIC breakpoint (mg/L)		Megjegyzés
	E ≤	R ≥	
Benzylpenicillin (nem meningitis)	0,06	2	<p>Pneumóniában, 1,2 g x 4 dózis esetén, ha az izolátum MIC ≤0,5 mg/L, benzylpenicillinre érzékenynek kell interpretálni.</p> <p>Pneumóniában, 2,4g x 4, illetve 1,2 g x 6 dózis esetén, ha az izolátum MIC ≤1 mg/L, benzylpenicillinre érzékenynek kell interpretálni.</p> <p>Pneumóniában, 2,4 g x 6 dózis esetén, ha az izolátum MIC ≤2 mg/L, benzylpenicillinre érzékenynek kell interpretálni.</p>
Benzylpenicillin (meningitis)	0,06	0,06	

(Megjegyzés: 1,2 g benzylpenicillin 2 ME (millió egység) benzylpenicillinnek felel meg)

10.4.3 Kontroll törzsek

2. táblázat. A benzylpenicillin érzékenységi vizsgálatok minőségellenőrzésére alkalmas kontroll törzs.

Törzs	Mechanizmus
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	Mozaik PBP, benzylpenicillin MIC 0,5 mg/L

10.5 Irodalomjegyzék

- 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.



3. 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.
4. Grebe T, Hakenbeck R. Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of β -lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 829-834.
5. 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.
6. Dixon JMS, Lipinski AE, Graham MEP. Detection and prevalence of pneumococci with increased resistance to penicillin. *Can Med Assoc J* 1977; 117: 1159-61.
7. Swenson JM, Hill BC, Thornsberry C. Screening pneumococci for penicillin resistance. *J Clin Microbiol* 1986; 24: 749-52.
8. 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.