

Karlovarská krajská nemocnice a.s.	
IČ: 26365804	(L)
SEKRETARIÁT PŘEDSTAVENSTVA	(D/O)
Číslo jednací	R12A23-157
Datum dor.	
pracovate	24.07.2015

Kupní smlouva

uzavřená v souladu s § 2079 a násl. zákona č. 89/2012 Sb., občanského zákoníku

I. Smluvní strany

Kupující **Karlovarská krajská nemocnice a.s.**
zapsaná v OR, vedeném Krajským soudem v Plzni, oddíl B, vložka 1205
Sídlem Bezručova 1190/19, 360 01, Karlovy Vary
IČO 26365804
DIČ CZ26365804
Zastoupený MUDr. Josefem Märzem, generálním ředitelem a předsedou představenstva a MUDr. Jiřím Hofmannem, místopředsedou představenstva
Bankovní spojení Komerční banka a.s., číslo účtu: 35-227 290 217/0100

(dále jen jako „kupující“) na straně jedné

a

Prodávající **BioVendor – Laboratorní medicína a.s.**
zapsaná v OR vedeném u Krajského soudu v Brně, oddíl B, vložka 3917
se sídlem Karásek 1767/1, 621 00, Brno - Řečkovice
IČO 63471507
DIČ CZ63471507
Zastoupený MUDr. Viktorcem Růžickou, předsedou představenstva
Bankovní spojení Sberbank CZ, a.s.
č. účtu 4200152576/6800
(dále jen jako „prodávající“) na straně druhé

kupující a prodávající, dále též společně označováni jako „smluvní strany“, níže uvedeného dne, měsíce a roku v souladu se zněním a smyslem zákona č. 89/2012 Sb., občanského zákoníku (dále jen „OZ“) a dále na základě výběru nejvhodnější nabídky v rámci předchozího níže uvedeného zadávacího řízení, uzavírají tuto:

kupní smlouvu (dále jen „smlouvu“)

II. Účel smlouvy

1. Základním účelem této smlouvy je úprava práv a povinností smluvních stran při zajištění dodávky níže uvedených přístrojů (dále jen „zboží“), jak vyplývá ze zadávacích podmínek zadávacího řízení veřejné zakázky na dodávky s názvem „Zdravotnické přístroje - část 10 - Mikrobiologie“, ev. číslo ve Věstníku veřejných zakázek 507838 (dále jen „**Veřejná zakázka**“), vše realizované dle zákona č. 137/2006 Sb., o veřejných zakázkách, ve znění pozdějších předpisů (dále také jen „**ZVZ**“), na základě které bylo mezi kupujícím jako zadavatelem této veřejné zakázky a prodávajícím jako vybraným uchazečem Veřejné zakázky uzavřena tato smlouva.

2. Kupní smlouva je zadávána v rámci projektu, který je podporován z Evropského fondu pro regionální rozvoj v rámci operačního programu ROP NUTS II Severozápad, Prioritní osa 1 - Regenerace a rozvoj měst, oblast podpory 1.3 - Infrastruktura v oblasti rozvoje lidských zdrojů, 68. Výzva, název projektu: „**Zdravotnické přístroje KKN**“.

3. Kupující prohlašuje, že po nabytí vlastnického práva způsobem upraveným v této smlouvě bude vlastníkem a provozovatelem předmětu plnění na adrese **Karlovarská krajská nemocnice a.s.**, Bezručova 1190/19, 360 01, Karlovy Vary.

III. Předmět smlouvy

Předmětem této smlouvy je závazek prodávajícího odevzdat kupujícímu v této smlouvě definované zboží, odpovídající Technické specifikaci zboží uvedeného v nabídce prodávajícího, která je nedílnou součástí této smlouvy jako její **Příloha č. 1** a prodávající se zavazuje, že zboží, které je předmětem koupě, odevzdá kupujícímu a umožní mu nabýt ke zboží vlastnické právo.

Kupující se zavazuje, že za zboží zaplatí prodávajícímu kupní cenu, sjednanou smluvními stranami ve výši dle **Přílohy č. 2** této smlouvy.

IV. Dodací podmínky

1. Prodávající se zavazuje předat zboží kupujícímu formou písemného předávacího protokolu podepsaného oběma smluvními stranami, to vše v prvotřídní jakosti a provedení a ve sjednaném množství, ve stavu odpovídajícím této smlouvě, zadávacím podmínkám Veřejné zakázky, právním předpisům a technickým normám, a to do **10 týdnů ode dne podpisu této smlouvy**.

1.1. Za podstatné porušení této smlouvy ve vztahu k předmětu plnění se považuje:

- a) nedodržení doby dodání zboží ze strany prodávajícího, a to i v případě, pokud kupující poskytne prodávajícímu prodloužení lhůty plnění a prodávající v této náhradní lhůtě plnění svůj závazek znovu nesplní,
- b) dodání zboží s technickými parametry, které neodpovídají požadavkům stanoveným kupujícím v zadávacích podmínkách a nebo zadávací dokumentaci k veřejné zakázce a parametrům uvedeným v nabídce podané uchazečem jako prodávacím v rámci veřejné zakázky,
- c) které není nové nebo je použité, zastavené, zapůjčené, zatížené leasingem, popř. úvěrem nebo jinými právními vadami nebo porušuje práva třetích osob k patentu nebo k jiné formě duševního vlastnictví, nebo bylo vyrobeno před rokem 2014.

2. Pokud se při převzetí zboží vyskytnou vady **nebránící užívání**, je kupující oprávněn v předávacím protokolu písemně určit lhůtu k odstranění takto vytknutých vad, při následném převzetí zboží bez jakýchkoli vad bude zboží předáno kupujícímu opět na základě závěrečného písemného předávacího protokolu podepsaného oběma smluvními stranami.

3. Smluvní strany se dále dohodly, že budou-li při předání a převzetí zboží zjištěny vady **bránící užívání** zboží, je prodávající povinen vady bez zbytečného odkladu odstranit a vyzvat kupujícího k novému předání a převzetí zboží. Kupující není povinen prodávajícímu uhradit kupní cenu, dokud nebudou vady bránící užívání odstraněny. V případě, že i nadále bude zboží obsahovat vady bránící užívání zboží, je kupující oprávněn od této smlouvy odstoupit.

4. Součástí předávacího protokolu bude uvedení charakteristiky zboží, soupis dokladů předávaných se zbožím a soupis vad zboží. Protokol o předání a převzetí zboží smlouvy bude vyhotoven ve dvou stejnopisech, z nichž každá smluvní strana obdrží po jednom stejnopise. Dodací list a protokol o předání a instalaci přístroje je oprávněn podepsat za kupujícího pouze zástupce ve věcech technických. Protokoly podepsané pouze zdravotnickým personálem nebudou akceptovány.

5. Prodávající tímto prohlašuje, že je/jsou jménem prodávajícího zastupováním ve věcech technických pověřen(y) tyto osoby: Mgr. Helena Husáková, e-mail: husakova@biovendor.cz, tel: 733 161 616;

Ing. Václav Kněz, e-mail: knez@biovendor.cz, tel. 602 457 764; Ing. Lenka Linková, e-mail: linkova@biovendor.cz; tel. 724 971 923.

Kupující tímto prohlašuje, že je jedním z věcí technických pověřen

Ing. Andrea Benácková, andrea.benackova@kkn.cz; 602 540 053, ved. BMI uživatele – pověřená osoba uživatele a provozovatele předmětu plnění

6. Za doklady nutné k převzetí a užívání zboží se považují:

- Faktura / dodací list
- Záruční list/předávací protokol (zde uvést výrobní číslo (a) popř. verze užitého programového vybavení dle zák. č. 123/2000 Sb. v platném znění)
- Protokol o zaškolení obsluhy
- Prohlášení o shodě (CE)
- Uvést zařazení dle § 7 zák. č. 336/2004 Sb. v platném znění)

Návod na obsluhu v českém jazyce 1x v písemné podobě, 1x na CD

- Zákonem stanovenou dokumentaci dle zákona č. 123/2000 Sb., o zdravotnických prostředcích a změně některých zákonů v platném znění
- Seznam příslušenství a spotřebního materiálu k přístroji včetně katalogových čísel

7. Smluvní strany se dohodly, že vlastnické právo a nebezpečí vzniku škody na zboží přechází na kupujícího dnem protokolárního převzetí Předmětu Smlouvy prostého jakýchkoli vad a/nebo nedodělků, tj. v ujednaném množství, jakosti a provedení odpovídající této smlouvě.

8. Smluvní strany se dohodly, že místem plnění dle této smlouvy jsou pracoviště kupujícího, tj. nemocnice v Karlových Varech, pavilon „D“.

9. Prodávající prohlašuje, že se s místem plnění dostatečně seznámil na místě samém a nemá žádné výhrady či připomínky, které by bránily řádnému dodání zboží a jeho instalaci v místě plnění. Pokud by prodávající taková situaci zjistil až po podpisu této smlouvy, je prodávající povinen bez zbytečného odkladu na tuto skutečnost upozornit kupujícího a uvést opatření vedoucí k nápravě zjištěného stavu. Kupující pak na základě takového oznámení prodávajícího zváží, jaká opatření na své náklady provede za účelem odstranění zjištěného stavu prodávajícím.

10. Kupující je povinen zajistit podmínky a poskytnout součinnost pro instalaci zboží. Pokud tak kupující neučiní, není prodávající v prodlení s dodávkou zboží.

V. Kupní cena, platební podmínky

1. Kupní cena zboží dle této smlouvy byla stanovena na základě nabídky prodávajícího podané v rámci Veřejné zakázky a činí:

Celková cena bez DPH: 7 332 000,- Kč
DPH 21 %: 1 539 720,- Kč
Celková cena včetně DPH: 8 871 720,- Kč

2. Kupní cena je stanovena jako nejvýše přípustná, nepřekročitelná a platná po celou dobu trvání této smlouvy v souladu s podmínkami uvedenými v zadávacích podmínkách Veřejné zakázky a zahrnuje veškeré náklady včetně všech rizik a vlivů (především kurzových a inflačních) souvisejících se splněním předmětu veřejné zakázky. Kupní cena je uvedena včetně dopravy do místa plnění, instalace, montáž, uvedení do provozu s předvedením funkčnosti, provedení výchozí elektrické revize a funkční zkoušky dodaného zboží, komplexní instruktáže obsluhy, dodání návodu na obsluhu v českém jazyce, prohlášení o shodě, poskytování bezplatného záručního servisu, poskytování hot line hot-line podpory pro střední laboratoře, update knihovny vzorků, preventivní prohlídky, údržba, validace, kalibrace, dodání veškerých software

potřebných pro provoz přístrojů, provedení prvotní validace s vystavením validačního protokolu, prodloužená záruční doba na položky přístroje ROP VIII_18 „Hmotnostní spektrofotometr pro identifikaci mikroorganismů“, a to: a) dusíkový laser b) detektor, po dobu 60 měsíců; dodávka sady destiček, spotřebního a pomocného materiálu pro zajištění provozu laboratoře - startovací balíček na 1 měsíc pro přístroj ROP VIII_18 „Hmotnostní spektrofotometr pro identifikaci mikroorganismů“ a likvidace obalů a odpadů a veškerých dalších nákladů souvisejících s realizací dodávky zboží. Kupní cena může být měněna pouze v souvislosti se změnou DPH. Případné vícenáklady či ménenáklady způsobené kupujícím nebo prodávajícím, budou řešeny v souladu se ZVZ. Po dodání zboží bude vystaven řádný daňový doklad.

3. Veškeré platby, které mají být dle této smlouvy učiněny, budou provedeny v české měně, na základě prodávajícím vystaveného řádného daňového dokladu se splatností **30** kalendářních dnů ode dne jeho prokazatelného doručení. Smluvní strany se dohodly, že uvedená **30-ti** denní lhůta počíná běžet dnem doručení řádného daňového dokladu na adresu kupujícího uvedenou v záhlaví této smlouvy. Daňový doklad musí obsahovat náležitosti daňového dokladu stanovené zákonem č. 235/2004 Sb., o dani z přidané hodnoty, ve znění pozdějších předpisů, a zákonem č. 563/1991 Sb., o účetnictví, ve znění pozdějších předpisů, a jeho nedílnou součástí bude kopie řádně vyplněného a podepsaného protokolu o předání zboží, ze kterého bude zřejmé, že zboží bylo řádně předáno prodávajícím kupujícímu.

4. V případě, že daňový doklad nebude obsahovat správné údaje či bude neúplný, je kupující oprávněn daňový doklad vrátit do data jeho splatnosti prodávajícímu s vyznačením chyb obsažených v daňovém dokladu. Proávající je povinen takový daňový doklad opravit, aby splňoval zákonem dané a nebo touto smlouvou ujednané podmínky. V případě opravy daňového dokladu počíná běžet nová lhůta splatnosti od data řádného doručení opraveného daňového dokladu kupujícímu.

5. Daň z přidané hodnoty (DPH) bude k faktuované částce připočteno v zákonné výši platné v době vystavení daňového dokladu. V případě, že dojde v průběhu plnění této smlouvy ke změně sazby DPH, pak závazné ceny pro fakturaci jsou ceny včetně DPH uvedené v této smlouvě. Náklady spojené se změnou sazby DPH nese prodávající.

6. Smluvní strany se dále dohodly, že změna kupní ceny stanovené dle této smlouvy je možná pouze z důvodu změny rozsahu dodání zboží. Smluvní strany se dohodly, že dojde-li ke změně kupní ceny z důvodu změny dodání zboží, bude postupováno podle ZVZ.

7. Platby dle tohoto článku se kupující zavazuje poskytnout prodávajícímu bezhotovostně na účet prodávajícího uvedený v záhlaví této smlouvy nebo na faktuře zaslané prodávajícím. Dnem zaplacení se rozumí den odepsání příslušné částky z účtu kupujícího ve prospěch účtu prodávajícího. Kupující není v prodlení s platbou kupní ceny, pokud prodlení proveditelné platby ve prospěch prodávajícího zavinil peněžní ústav kupujícího nebo prodávajícího.

8. Kupující neposkytuje prodávajícímu žádné zálohy, popř., jakákoliv jiná dílčí peněžitá či nepeněžitá plnění na úhradu kupní ceny za účelem dodání zboží.

9. Smluvní strany této smlouvy se dohodly, že je prodávající, coby poskytovatel zdanitelného plnění, povinen bez zbytečného prodlení písemně informovat kupujícího o tom, že se stal nespolehlivým plátcem ve smyslu ustanovení § 106a zákona č. 235/2004 Sb., o dani z přidané hodnoty, v platném znění (dále jen „zákon o DPH“). Smluvní strany si dále společně ujednaly, že pokud kupující v průběhu platnosti tohoto smluvního vztahu na základě informace od prodávajícího, nebo jiného právního subjektu či na základě vlastního šetření zjistí, že se prodávající stal nespolehlivým plátcem ve smyslu § 106a zákona o DPH, pak obě smluvní strany souhlasí s tím, že kupující uhradí za prodávajícího daň z přidané hodnoty z takového zdanitelného plnění, dobrovolně přímo správci daně dle § 109a citovaného právního předpisu.

Zaplacení částky ve výši daně kupujícím správcí daně pak bude cena dle této smlouvy smluvními stranami považována za splnění závazku uhradit sjednanou cenu, resp. její část. Smluvní strany si v této souvislosti poskytnou veškerou nezbytnou součinnost při vzájemném poskytování informací požadovaných zákonem o DPH. Prodávající současně souhlasí s tím, že je povinen kupujícímu nahradit veškerou škodu vzniklou v důsledku aplikace institutu ručení ze strany správce daně. Smluvní strany se dohodly, že kupující bude hradit sjednanou cenu pouze na účet zaregistrovaný a zveřejněný ve smyslu § 96 odst. 1 zákona o DPH.

VI. Povinnosti prodávajícího, záruka za jakost a odpovědnost za vady

1. Prodávající je povinen dodat zboží v ujednaném množství, kvalitě, jakosti a s vlastnostmi požadovanými kupujícím a uvedenými v zadávacích podmínkách v rámci Veřejné zakázky.
2. Prodávající je povinen předložit kupujícímu veškeré doklady, které se ke zboží vztahují, tzn. zejména prohlášení o shodě, atesty a další dokumenty prokazující, že veškeré prodávajícím dodávané zboží splňuje zákonné požadavky, zejména požadavky zákona č. 123/2000 Sb., o zdravotnických prostředcích a o změně některých souvisejících předpisů, v platném znění, dále požadavky dle NV 336/2004 Sb., nebo NV 453/2004 Sb. nebo NV 154/2004 Sb., či zákona č. 268/2014 Sb., o zdravotnických prostředcích, v platném znění event. dle obdobných směrnic EU, a to ke dni podpisu této smlouvy. Prodávající je dle této smlouvy dále povinen řádně vyhotovit či provést zkoušky či revize, je-li jejich provedení třeba, a protokoly o provedených zkouškách či revizích předat kupujícímu prostřednictvím uživatele spolu s předávacím protokolem.
3. Předání a převzetí zboží smluvními stranami se uskuteční protokolárně, po úspěšně absolvovaném funkčním předvedení zařízení. Pro účely předvedení všech funkcí se prodávající zavazuje s dodávkou zboží dodat i potřebný spotřební materiál. Kupující má právo zboží nepřevzít, pokud se projeví pochybnosti o splnění některého z požadavků uvedených zadávacích podmínkách.
4. Prodávající je povinen předat kupujícímu originální zákaznickou dokumentaci výrobce dodaného zboží, která bude rovněž obsahovat návod pro obsluhu v českém jazyce v tištěné i elektronické podobě na CD. Pokud není v návodu pro obsluhu uveden vhodný způsob čištění, desinfekce a sterilizace dodaných zařízení, zavazuje se prodávající předat kupujícímu zvláštní přílohu k návodu k obsluze, ve které budou tyto informace uvedeny.
5. U zboží, u kterého jsou předepsány pravidelné bezpečnostně technické kontroly (BTK), se prodávající zavazuje předat kupujícímu prostřednictvím uživatele Protokol o výstupní bezpečnostně technické kontrole (BTK) s datem příští BTK.
6. Prodávající je povinen nahradit kupujícímu veškeré škody, které by svojí činností či činností jiných právnických či fyzických osob užitých ke své činnosti na základě kteréhokoli právního titulu způsobil kupujícímu či třetím subjektům, ať již úmyslně či z nedbalosti.
7. Prodávající prohlašuje, že na plnění dle této smlouvy (tj. na veškeré dodané zboží včetně jeho instalace) poskytuje kupujícímu záruku v trvání **24 měsíců**. Záruka dle tohoto článku počíná běžet ode dne podpisu předání zboží prostého jakýchkoli vad, tj. v množství, jakosti a provedení ujednaném touto smlouvou. Tuto skutečnost, tj. předání zboží v množství, jakosti a provedení ujednaném touto smlouvou a počátek běhu záruční doby, bude osvědčovat předávací protokol podepsaný oběma Smluvními stranami, popř. jejich oprávněnými zástupci. Dále prodávající prohlašuje, že na položky přístroje ROP VIII_18 „Hmotnostní spektrofotometr pro identifikaci mikroorganismů“, a to: a) dusíkový laser b) detektor poskytuje kupujícímu záruku v trvání **60 měsíců**.

8. Pokud se na zboží vyskytne v záruční době jakákoliv vada, zavazuje se prodávající tuto vadu bezúplatně odstranit, nebude-li kupující požadovat náhradní zboží za zboží vadné. Prodávající je povinen o jakékoli reklamaci zboží sepsat záznam, jehož obsahem bude zejména uvedení data reklamace, charakter reklamované vady, způsob vyřízení reklamace, lhůta vyřízení reklamace, podpisy smluvních stran či jejich oprávněných zástupců.

9. Smluvní strany se dohodly, že po dobu, po kterou kupující prostřednictvím uživatele nebude moci zboží či jakoukoli jeho část z důvodu vad užívat, záruční doba stanovená neběží.

10. Prodávající prohlašuje, že je schopen poskytnout kupujícímu pozáruční servis a náhradní díly na dodané přístroje po dobu min. 10-ti let od ukončení jejich výroby v případě, že bude k tomuto pozáručnímu servisu kupujícím vyzván. Podmínky pozáručního servisu budou v takovém případě dohodnuty samostatnou Servisní smlouvou, která je nedílnou součástí této smlouvy.

11. Prodávající dále prohlašuje, že v souladu s nabídkou v rámci veřejné zakázky (viz **Příloha č. 5**) nebude pro přístroj ROP VIII_18 „Hmotnostní spektrofotometr pro identifikaci mikroorganismů“ překračovat maximální cenu pro spotřební a pomocný materiál na 1 identifikaci a nebude překračovat prodávajícím uvedené množství spotřebního a pomocného materiálu sloužící k provedení odhadovaného počtu identifikací za rok - 20.000 identifikací/rok, vše v souladu se zadávací dokumentací veřejné zakázky dle čl. II. V případě, že prodávající bude překračovat cenu pro spotřební a pomocný materiál na 1 identifikaci, tzn. bude překračovat jednotlivé množství spotřebního a pomocného materiálu, bude tento rozdíl hrazen prodávajícím.

VII. Záruční servis

1. Prodávající, případně třetí strana, jako např. výrobce nebo servisní organizace, jako subdodavatel prodávajícího, na základě dohody a smlouvy s prodávajícím (dále v tomto článku jen jako „prodávající“), se zavazuje po celou dobu trvání záruky zajišťovat bezplatný servis je dodaného zboží. Záruční servis zajišťovaný prodávajícím zahrnuje zejména pravidelné prohlídky určené výrobcem, údržbu a seřizování dodaného zboží, a dále odstraňování zjištěných vad, včetně zajištění dodání náhradních dílů k dodanému zboží, popř. dodání spotřebního materiálu, je-li takový materiál nedílnou součástí dodaného zboží za účelem zajištění jeho provozu. Záruční servis dále zahrnuje pro přístroj ROP VIII_18 „Hmotnostní spektrofotometr pro identifikaci mikroorganismů“ hot-line podporu pro střední laboratoře, update knihovny vzorků, validace, kalibrace, dodání veškerých software potřebných pro provoz přístroje,

2. U zboží, u kterého je dle zákona č. 123/2000 Sb. o zdravotnických prostředcích a o změně některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů, či od 1. 4. 2015 dle zákona č. 268/2014 Sb., o zdravotnických prostředcích předepsáno provádět bezpečnostně technické kontroly (BTK), se prodávající se zavazuje tyto BTK provádět bezplatně, v rámci záručního servisu, a to v intervalech určených výrobcem.

3. Prodávající se zavazuje zajišťovat servis osobami k tomu odborně způsobilými (dále jen „servisní technici“), a to za podmínek stanovených níže v tomto článku:

3.1. Opravy zdravotnické techniky se prodávající zavazuje provést v pracovní dny nejpozději do **24** hodin od výzvy kupujícího k nástupu na opravu; ve dnech pracovního volna, pracovního klidu a ve státem uznaných státních svátcích je prodávající povinen nastoupit na opravu do **48** hodin od výzvy kupujícího. Opravy se budou provádět na místě instalace zařízení u uživatele;

3.2. Prodávající se zavazuje v případě neopravitelnosti zboží v místě jeho instalace, nebo pokud bude zboží mimo provoz déle než 5 dní, k poskytnutí náhradního zboží;

3.3. Smluvní strany se dohodly, že za prokazatelné oznámení závady se považuje zejména oznámení kupujícího o závadě adresované na adresu prodávajícího, popř. emailová zpráva oznamující závadu zaslaná na emailovou adresu prodávajícího, či datová zpráva, zaslaná do datové schránky kupujícího;

3.4. Servis bude vykonáván servisními techniky ze servisního střediska prodávajícího, přičemž veškerá písemná, telefonická či osobní komunikace bude vedena v českém jazyce;

3.5. Nedílnou součástí této smlouvy je **Příloha č. 3**, ve které jsou uvedeny adresy servisních středisek prodávajícího pro jednotlivé dodávky, které jsou předmětem této smlouvy, včetně dalších kontaktních údajů (jméno kontaktní osoby, telefon, emailová adresa). Změnu servisního střediska či kontaktních údajů se prodávající zavazuje oznámit kupujícímu bez zbytečného odkladu;

3.6. Veškeré cestovní náklady, náklad na materiál a veškeré další náklady, které prodávajícímu vzniknou v souvislosti s prováděním záručních oprav, hradí v plné výši prodávající;

3.7. Proávající je při zajišťování servisních prací povinen dodržovat veškeré platné právní předpisy o bezpečnosti práce, ochraně zdraví, požární prevenci a protipožární ochraně a hygienické předpisy;

3.8. Proávající se zavazuje při své činnosti dodržovat platné ČSN normy;

3.9. Proávající je oprávněn pověřit prováděním servisních prací odborně způsobilou třetí osobu, odpovídá však kupujícímu za tuto činnost jako by servisní práce a s tím související činnosti provedl sám;

3.10. Proávající plně odpovídá za škody, které způsobí svou činností kupujícímu /nebo činností svých pracovníků a/nebo činností třetí osoby, kterou pověřil prováděním servisních prací.

4. Kupující prostřednictvím uživatele se zavazuje za účelem provedení servisní prohlídky a/nebo opravy umožnit servisním technikům přístup do předmětných prostor.

5. Po skončení záruční doby bude na servisní práci poskytována záruka **6 měsíců a na náhradní díly 24 měsíců**.

VIII. Prohlášení prodávajícího

1. Proávající prohlašuje, že zboží bude mít smluvené vlastnosti, a to zejména vlastnosti uvedené v technické specifikaci dodávky zboží, jež tvoří *Přílohu č. 1* této smlouvy, a dále bude splňovat podmínky dané příslušnými právními předpisy, což dokládá dokumentem označeným jako „Prohlášení o shodě (CE)“, které jako *Příloha č. 4* tvoří nedílnou součást této smlouvy.

2. Proávající prohlašuje, že veškeré dodané přístroje, zařízení a vybavení je nové, nikdy předtím nepoužité, prvotřídní kvality, zabalené v originálních obalech.

3. Proávající prohlašuje, že je výrobcem dodaného zboží nebo je výrobcem dodaného zboží pověřen k jeho distribuci a servisu, a zavazuje se, že zboží je schváleno k užívání na území České republiky, a to jako zdravotnický prostředek, a za tímto účelem při předání dle této smlouvy předá kupujícímu doklady o možnosti takového užívání.

4. Proávající prohlašuje, že má uzavřenu pojistnou smlouvu č. 0015140296 u České podnikatelské pojišťovny, a.s., jejímž předmětem je pojištění odpovědnosti za škodu způsobenou prodávajícím třetí osobě, a že tato smlouva kryje škody způsobené prodávajícím min. ve výši 50 000 000,- Kč za každý jednotlivý případ. Proávající je povinen, není-li dále v této smlouvě stanoveno jinak, být po celou dobu spolupráce

s kupujícím řádně pojištěn a zavazuje se bez zbytečného odkladu pojistnou smlouvu osvědčující pojištění odpovědnosti za škodu způsobenou prodávajícím třetí osobě kupujícimu na jeho vyzvání kdykoliv předložit.

5. Prodávající dále prohlašuje, že není ke dni podpisu této smlouvy subjektem insolvenčního, vyrovnávacího nebo podobného, zejména exekučního řízení ani mu nejsou známy žádné skutečnosti o tom, že by takovéto řízení mohlo být zahájeno ze strany třetí osoby vůči prodávajícímu.

6. Prodávající prohlašuje, že je (nebo se nejpozději ke dni předání zboží stane) výlučným vlastníkem zboží a že na tomto zboží nevážnou jakákoli práva třetích osob a že těmito právy třetích osob nebude zboží zatíženo ke dni předání.

7. Prodávající předloží kupujícimu podle § 147a odst. 1 písm. c) ZVZ, seznam subdodavatelů, ve kterém uvede subdodavatele, jímž za plnění subdodávky uhradil více než 10 % z části ceny dodávky v příslušném kalendářním roce. Tento seznam prodávající předloží kupujícimu v termínu do 60 dnů od splnění smlouvy. Má-li subdodavatel formu akciové společnosti, je přílohou seznamu i seznam vlastníků akcií, jejichž souhrnná jmenovitá hodnota přesahuje 10 % základního kapitálu. Tento seznam vlastníků akcií bude vyhotoven ve lhůtě 90 dnů před dnem předložení seznamu subdodavatelů. Nedošlo-li k plnění subdodavateli z více než 10 % z části ceny díla v příslušném kalendářním roce, předkládá o této skutečnosti prodávající čestné prohlášení. V případě prodlení prodávajícího při plnění povinnosti vyplývající z tohoto ustanovení, se zavazuje prodávající uhradit kupujícimu smluvní pokutu ve výši 50.000,- Kč za každý započatý den prodlení.

8. Prodávající se zavazuje poskytnout v souladu s § 2 písm.e) zákona č. 320/2001 Sb., o finanční kontrole, subjektům provádějícím audit a kontrolu všechny nezbytné informace týkající se dodavatelských činností spojených s předmětem smlouvy.

9. Prodávající, popř. jeho subdodavatelé jsou povinni po celou dobu trvání smlouvy splňovat všechny požadavky a splňovat kvalifikační předpoklady, popř. výši pojištění, související s realizací této smlouvy, které byly prokázány v předchozím výběrovém řízení a na základě něhož byla s prodávajícím, jakožto vybraným uchazečem uzavřena tato smlouva na předmět plnění veřejné zakázky. Prodávající je současně povinen po celou dobu poskytování dodávek dle této smlouvy oznámit kupujícimu jakoukoliv změnu v rámci splnění kvalifikačních předpokladů, popř. výše pojištění, bylo-li vyžadováno, jak u sebe, tak i popř. u subdodavatele, které prokázal v rámci předchozího zadávacího řízení. Pokud po uzavření této smlouvy dojde ke změně v rozsahu splnění kvalifikačních předpokladů, popř. výše pojištění bylo-li vyžadováno, na straně prodávajícího, popř. jeho subdodavatele, je prodávající povinen takovou změnu oznámit kupujícimu do 7 pracovních dnů, ode dne kdy tato změna nastala, nebo kdy ji prodávající zjistil a do 10 pracovních dnů předložit kupujícimu příslušný doklad o splnění kvalifikačních předpokladů, popř. výše pojištění, bylo-li vyžadováno. Prodávající je povinen také na výzvu kupujícího mimo výše uvedenou povinnost uvedenou v tomto bodě předložit doklady prokazující splnění výše uvedených kvalifikačních předpokladů, popř. pojištění, bylo-li vyžadováno, a to do 15 kalendářních dnů ode dne doručení písemné výzvy ze strany kupujícího.

10. Prodávající není oprávněn postoupit pohledávku plynoucí z této smlouvy třetí osobě bez předchozího písemného souhlasu kupujícího.

11. Prodávající je oprávněn provést změnu subdodavatele oproti subdodavatelům uvedených v nabídce prodávajícího pouze se souhlasem kupujícího. Prodávající je povinen jakoukoliv změnu na pozici subdodavatele předem písemně oznámit kupujícimu s tím, že kupující je povinen se ve lhůtě 7 pracovních dnů ode dne doručení písemného oznámení vyjádřit, zda změnu subdodavatele povoluje či nikoliv. Nový subdodavatel nahrazující subdodavatele uvedeného v nabídce prodávajícího musí splňovat všechny kvalifikační předpoklady, popř. i výši pojištění, bylo-li vyžadováno, a to v takovém rozsahu, ve kterém byly kupujícím požadovány v zadávacích podmínkách a které splňoval subdodavatel uvedený v původní nabídce prodávajícího. O těchto skutečnostech prodávající za nového subdodavatele doloží doklady o splnění jeho kvalifikačních předpokladů, popř. pojištění. Pokud prodávající předloží kupujícimu v rámci změny

subdodavatele doklady požadované v tomto bodě a kupující se nevyjádří ve stanovené lhůtě ke změně subdodavatele, má se za to, že kupující se změnou na pozici subdodavatele souhlasí.

12. Prodávající, popř. jeho subdodavatele jsou povinni v zákonných lhůtách splnit podmínky dle zákona č. 268/2014 Sb., o zdravotnických prostředcích, v platném znění a informovat o této skutečnosti neprodleně kupujícího.

IX. Odstoupení od smlouvy

1. Smluvní strany se dohodly, že prodávající je oprávněn od této smlouvy odstoupit v případech, kdy tak stanoví obecně závazné právní předpisy, a dále v případě, že nebude kupujícím uhrazena v souladu touto smlouvou uhrazena kupní cena zboží.

2. Smluvní strany se dohodly, že kupující je oprávněn odstoupit od této smlouvy v případech, kdy tak stanoví obecně závazné právní předpisy, a dále v případě, že:

(a) prodávající poruší některou ze svých povinností stanovených v článku IV. odst. 1; a/nebo

(b) prodávající poruší některou ze svých povinností stanovených v článku VI. této smlouvy; a/nebo

(c) prodávající poruší některou ze svých povinností stanovených v článku VII.; a/nebo

(d) prodávající poruší některou ze svých povinností stanovených v článku VIII. a/nebo se ukáže nepravdivým některé z prohlášení dle článku VIII. této smlouvy.

3. Kupující je oprávněn od této smlouvy písemně odstoupit, bude-li zboží trpět vadami, které brání užívání zboží, popř. budou-li se na zboží opakovaně vyskytovat vady, popř. nebudou-li řádně a včas odstraněny vady nebránící užívání zboží. Opakovaným výskytem vady se rozumí nejméně tři stejné závady.

4. Odstoupení se děje písemně a je účinné dnem jeho doručení druhé smluvní straně. Odstoupením od smlouvy se smlouva ruší a smluvní strany jsou povinny vrátit si plnění na základě této smlouvy poskytnutá. Prodávající je v tomto případě povinen bez zbytečného odkladu po doručení odstoupení od této smlouvy, nejpozději však do 3 pracovních dnů ode dne doručení odstoupení od této smlouvy, nastoupit na místo plnění a demontovat dodané zboží.

X. Smluvní pokuty

1. Pokud se prodávající dostane do prodlení s plněním dle **čl. IV. odst. 1** této smlouvy, a to nedodáním zboží ve sjednaném řádném, popř. náhradním termínu, zavazuje se zaplatit kupujícímu smluvní pokutu ve výši **0,2 %** z ceny zboží za každý den prodlení s jeho předáním až do dne řádného předání zboží nebo do dne účinnosti odstoupení od smlouvy učiněného na základě této smlouvy.

2. Pokud se prodávající dostane do prodlení s plněním dle **čl. IV. odst. 2** této smlouvy, nedodáním zboží bez vad nebránících řádnému užívání, zavazuje se zaplatit kupujícímu smluvní pokutu ve výši **0,05 %** z ceny zboží za každý den prodlení s jeho předáním až do dne řádného předání zboží nebo do dne účinnosti odstoupení od smlouvy učiněného na základě této smlouvy.

3. Smluvní strany se dohodly, že pro případ, kdy se na zboží vyskytne jakákoli vada a servisní pracovníci prodávajícího v rozporu s **čl. VII** této smlouvy nenastoupí na opravu nebo opravu neprovedou ve stanovené lhůtě, zavazuje se prodávající zaplatit kupujícímu smluvní pokutu ve výši **5.000,-Kč** za každý den prodlení s nástupem nebo provedením záruční opravy zboží.

4. Smluvní strany se dohodly, že pro případ nesplnění povinností prodávajícího vyplývajících z **čl. VIII. odst. 9. až 11** této smlouvy, je prodávající povinen uhradit kupujícímu smluvní pokutu za každý jednotlivý případ porušení této smlouvy smluvní pokutu ve výši **10.000,- Kč**.

5. Smluvní strany se dohodly, že kupující je povinen uhradit prodávajícímu smluvní úrok z prodlení ve výši 0,01 % z dlužné částky za každý den prodlení s úhradou kupní ceny.

6. Zaplacením smluvní pokuty není dotčeno právo na náhradu kupujícího zvlášť a v plné výši - smluvní strany tak výslovně vylučují použití ustanovení **§ 2050 OZ**.

XI. Doručování

1. Veškerá podání a jiná oznámení, která se doručují smluvním stranám je třeba doručit osobně nebo doporučenou listovní zásilkou s dodejkou nebo elektronickou poštou s řádným elektronickým podpisem osoby jednající za odesílatele nebo doručením prostřednictvím datových schránek.

2. Aniž by tím byly dotčeny další prostředky, kterými lze prokázat doručení, má se za to, že oznámení bylo řádně doručeno:

(i) při doručování osobně:

- dnem faktického přijetí oznámení příjemcem; nebo
- dnem, v němž bylo doručeno osobě příjemcově adrese, která je oprávněna k přebírání listovních zásilek; nebo
- dnem, kdy bylo doručováno osobě na příjemcově adrese určené k přebírání listovních zásilek a tato osoba odmítla listovní zásilku převzít; nebo
- dnem, kdy příjemce při prvním pokusu o doručení zásilku z jakýchkoli důvodů nepřevzal či odmítl zásilku převzít, a to i přesto, že se v místě doručení nezdržuje, pokud byla na zásilce uvedena adresa pro doručování dle tohoto článku.

(ii) při doručování prostřednictvím poskytovatele poštovních služeb:

- dnem předání listovní zásilky příjemci; nebo
- dnem, kdy příjemce při prvním pokusu o doručení zásilku z jakýchkoli důvodů nepřevzal či odmítl zásilku převzít, a to i přesto, že se v místě doručení nezdržuje, pokud byla na zásilce uvedena adresa pro doručování dle tohoto článku.

(iii) při doručování prostřednictvím elektronické pošty:

- dnem, kdy byla elektronická zásilka opatřená řádným elektronickým podpisem oprávněného zástupce odesílatele odeslána na e-mailovou adresu pro doručování adresátovi dle tohoto článku.

(iv) při doručování prostřednictvím zaslání zpráv do datových schránek:

- dnem, kdy se do datové schránky příjemce dle tohoto článku této smlouvy příjemcem přihlásila osoba, která má s ohledem na rozsah svého oprávnění přístup k tomuto dokumentu, pokud datum přihlášení je nejpozději třetí den po dni dodání zprávy do datové schránky příjemce; nebo
- čtvrtý dnem ode dne dodání dokumentu do datové schránky příjemce dle tohoto článku v případě, pokud není postupováno dle předchozího ustanovení o doručování prostřednictvím zaslání zpráv do datových schránek.

3. Ke dni podpisu této smlouvy je:

a) adresou pro doručování kupujícímu: Karlovarská krajská nemocnice, Karlovy Vary,
Bezručova 1190/19, 360 01, ID datové schránky: jfvepy2

b) adresou pro doručování prodávajícímu: BioVendor – Laboratorní medicína a.s.
Karásek 1767/1, 621 00 Brno - Řečkovice
e-mailová adresa: husakova@biovendor.cz
ID datové schránky: 9dec52h

4. Smluvní strany se dohodly, že v případě změny sídla, a tím i adresy pro doručování, budou písemně informovat o této skutečnosti bez zbytečného odkladu druhou smluvní stranu. Změna adresy pro doručování jsou pro účely doručování pro druhou smluvní stranu účinné k okamžiku doručení informace druhé smluvní strany o změně sídla.

XII. Závěrečná ustanovení

1. Smluvní strany se zavazují vzájemně se a řádně informovat o všech podstatných skutečnostech, které mohou mít vliv na plnění dle této smlouvy a současně vyvinout potřebnou součinnost k plnění této smlouvy.

2. Případné spory vzniklé z této smlouvy budou řešeny podle platné právní úpravy věcně a místně příslušnými soudními orgány České republiky.

3. Tato smlouva je vyhotovena ve **čtyřech stejnopisech** s platností originálu, přičemž prodávající obdrží dva výtisky a kupující obdrží dva výtisky.

4. Smluvní strany sjednávají, že tuto smlouvu nelze postoupit třetí straně bez souhlasu druhé smluvní strany.

5. Obsah této smlouvy je možné měnit jen písemnými, postupně a vzestupně na sebe číselně navazujícími číslovanými dodatky, podepsanými statutárními zástupci smluvních stran. Nedílnou součástí této smlouvy jsou veškeré přílohy uvedené v textu této smlouvy či v textu případných Dodatků k této smlouvě.

6. Prodávající byl seznámen se skutečností, že tato kupní smlouva bude v souladu s **§ 147a ZVZ** zveřejněna na profilu zadavatele včetně všech jejích dodatků a změn a skutečně uhrazené ceny zakázky.

7. Tato smlouva se řídí právem České republiky a byla uzavřena v souladu s ustanovením **§ 2079 a násl. OZ**.

8. Prodávající se zavazuje, že splní pravidla a podmínky stanovené řídicím orgánem v rozhodnutí o poskytnutí dotace, resp. dohodnuté ve smlouvě mezi řídicím orgánem (poskytovatelem dotace) a příjemcem dotace a dále že umožní zaměstnancům nebo zmocněncům poskytovatele dotace, Ministerstvu pro místní rozvoj ČR, Ministerstvu financí ČR, auditnímu orgánu, Evropské komisi, Evropskému účetnímu dvoru, Nejvyššímu kontrolnímu úřadu a dalším oprávněným orgánům státní správy vstup do objektů a na pozemky dotčené projektem a jeho realizací a kontrolu dokladů souvisejících s projektem.

9. Je-li některé z ustanovení této smlouvy neplatné, odporovatelné nebo nevynutitelné či stane-li se takovým v budoucnu, nedotýká se to platnosti případně vynutitelnosti ustanovení ostatních, pokud z povahy ustanovení nevyplývá, že tuto část nelze od ostatního obsahu této smlouvy oddělit. Smluvní strany se pro tento případ zavazují vadné ustanovení bezodkladně nahradit bezvadným, které bude v nejvyšší možné míře odpovídat obsahu a účelu vadného ustanovení.

10. Smluvní strany prohlašují, že tuto smlouvu uzavřely na základě vážné a svobodné vůle, nikoliv v tísní za nápadně nevýhodných podmínek, ani nebyla jiným způsobem vynucena, dále prohlašují, že tuto smlouvu pečlivě pročetly, jejímu obsahu zcela porozuměly a bezvýhradně s ním souhlasí a na důkaz toho připojují své vlastnoruční podpisy.

11. Tato smlouva nabývá platnosti v den jejího podpisu oprávněnými zástupci smluvních stran.

12. Smluvní strany se ve smyslu ustanovení § 548 zákona č. 89/2012 Sb., občanského zákoníku dohodly, že tato smlouva nabude účinnosti až k datu splnění obou níže uvedených podmínek, a to kdy bude kupujícímu písemně ze strany poskytovatele dotace sděleno, že kupujícímu byla poskytnuta dotace z Regionálního operačního programu NUTS II Severozápad, prioritní osa 1 – Regenerace a rozvoj měst, oblast podpory 1.3 – Infrastruktura v oblasti rozvoje lidských zdrojů, v rámci 68. Výzvy, ve výši minimálně 79.806.000 vč. DPH, na realizaci projektu „Zdravotnické přístroje KKN“ a dále kdy bude kupujícímu písemně ze strany Ministerstva zdravotnictví ČR sděleno souhlasné stanoviska „Komise pro posuzování rozmístění přístrojových zdravotnických prostředků“ pro uvedený předmět plnění.

Přílohy, které jsou nedílnou součástí této smlouvy:

Příloha č. 1 – Technická specifikace dodávky v rozsahu a podobě dle X písm. G. zadávací dokumentace (ZD)

Příloha č. 2 – Nabídková cena v rozsahu a podobě dle X písm. H. ZD

Příloha č. 3 – Adresy servisních středisek prodávajícího pro jednotlivé dodávky dle X písm. I. ZD

Příloha č. 4 – Prohlášení o shodě (CE) dle požadavku čl. VIII odst. 1

Příloha č. 5 – Cenová nabídka spotřebního a pomocného materiálu

V Karlových Varech dne 28. 7. 2015.

MUDr. Josef März
Generální ředitel
a předseda představenstva
Karlovarská krajská nemocnice a.s.

MUDr. Jiří Hofmann
místopředseda představenstva
Karlovarská krajská nemocnice a.s.

Kupující
Karlovarská krajská nemocnice a.s.

Karlovarská krajská nemocnice a.s.
nemocnice v Karlových Varech, IČ: 263 65 804
Bezručova 1190/19, 360 01 Karlovy Vary
Tel.: 354 225 111, fax: 353 115 178
(2)

V Brně dne 23. 7. 2015.

BioVendor – Laboratorní medicína a.s.
sídlo: Karásek 1767/1, 621 00 Brno
IČ: 63471507, DIČ: CZ63471507
zaps. v OR vedeném KS v Brně
Odd. B., vložka 3917

Prodávající
BioVendor – Laboratorní medicína a.s.

Formulář technických specifikací dodávky pro: ROP VIII_18 - Hmotnostní spektrofotometr pro identifikaci mikroorganismů

Název zadavatele: Karlovarská krajská nemocnice a.s.
Sídlo: Bezručova 1190/19, 360 01 Karlovy Vary
IČ: 26365804

Specifikace dodávky	Požadovaná hodnota	Nabízená hodnota* Splněno ANO/NE
ROP VIII_18 - Hmotnostní spektrofotometr pro identifikaci mikroorganismů	1ks	ANO
Obchodní název a typové označení přístroje		IVD MALDI Biotyper System (MALDI-TOF)
Výrobce přístroje		Bruker Daltonik GmbH
Požadované parametry:		
Systém pro rychlou identifikaci mikrobiálních agens pomocí Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight (MALDI-TOF) hmotnostní spektrofotometr	ano	ANO nabízený systém hmotnostní spektrometrie umožňuje rychlou identifikaci mikrobiálních agens metodou MALDI-TOF.
Systém pro jednoduchou a rychlou instalaci v klinické laboratoři	ano	ANO stolní provedení umožňuje jednoduchou a rychlou instalaci
Identifikace mikroorganismů z bakteriální kultury, ale i přímo z klinického primárního vzorku jako je pozitivní hemokultura, pozitivní vzorek moče atd.	ano	ANO identifikaci je možné provádět z bakteriální kultury, ale také přímo z klinického primárního vzorku jako jsou hemokultury, pozitivní moče atd.
Identifikace přímo ze směsi kultur pomocí speciálního modulu, který je součástí dodaného systému	ano	ANO součástí dodávky bude Blood culture modul umožňující identifikaci přímo ze směsi kultur
Identifikace vysoce patogenních mikroorganismů zahrnutých platnou legislativou ČR do skupiny „Biosafety level 3“	ano	ANO součástí dodávky bude knihovna MALDI Security Relevant Library 1.0 zahrnující požadované typy mikroorganismů
Identifikace v oblasti bakteriologie, mykologie, mykobakteriologie	ano	ANO standardně dodávané Databáze-CD Btyp 3.0-Library a IVD MALDI Biotyper 2.3 CZ umožňují provádění identifikace v uvedených oblastech
Samostatná knihovna/databáze a postupy pro mykologickou a mykobakteriologickou laboratoř	ano	ANO součástí dodávky budou knihovny MALDI Mycobacterium Library 1.0 a MALDI Fungi Library 1.0, zahrnující požadované typy mikroorganismů, součástí dodání databází je zaškolení speciálních způsobů přípravy vzorku
Ionizační zdroj MALDI se zabudovaným laserem	ano	ANO nabízený systém obsahuje uvedený typ ionizačního zdroje
Systém generování vakua ve spektrometru pomocí vývěvy s nízkou hlučností a bez produkce zplodin, které by mohly kontaminovat prostředí laboratoře	ano	ANO systém pracuje s vývěvou splňující požadované parametry

Formulář technických specifikací dodávky pro: ROP VIII_18 - Hmotnostní spektrofotometr pro identifikaci mikroorganismů

Název zadavatele: Karlovarská krajská nemocnice a.s.
Sídlo: Bezručova 1190/19, 360 01 Karlovy Vary
IČ: 26365804

Destičky pro opakované použití	ano	ANO systém nabízí možnost využít destičky pro jednorázové i opakované použití
Dodávka sady destiček, spotřebního a pomocného materiálu pro zajištění provozu laboratoře na min. 3000 identifikací. V případě, že uchazeč nabízí více typů destiček, bude dodána cenově nejvýhodnější varianta pro uživatele.	ano	ANO součástí dodávky bude dodávky 5 ks destiček pro opakované použití a tzv. startovací balíček spotřebního materiálu obsahující vše potřebné pro provedení 3000 identifikací
Požadavky na identifikační SW a potřebné příslušenství:		
Kompletní ovládací stanice, čtečka čárových kódů a laserová tiskárna	ano	ANO součástí dodávky bude počítačová jednotka HP 7400 včetně klávesnice a myši, laserová čtečka čárových kódů a laserová tiskárna HP Laser Printer P3015D
Záložní zdroj systému (UPS) pro zajištění bezpečného dokončení právě probíhající identifikace a uložení výsledků	ano	ANO součástí dodávky bude záložní zdroj APC Smart-UPS, 2200VA LCD
Kompletní SW pro ovládání celého nabízeného systému, získání dat a jejich následnou analýzu v databázi referenčních spekter a hodnocení měření	ano	ANO součástí dodávky bude softwarový balík MALDI Biotyper 3.1 SR1 a software flexControl zajišťující požadované funkce
Připojení do LIS (Open LIMS) a zajištění přenosu výsledků analyzovaných mikrobiálních kmenů do LIS	ano	ANO součástí dodávky bude připojení přístroje do LIS
Automatická rodová a druhová identifikace	ano	ANO vlastní rodová i druhová identifikace probíhá automaticky pomocí instalovaných SW a databází
Statistické hodnocení míry shody měřených spekter se spektry referenční databáze	ano	ANO SW umožňuje statistické vyhodnocení naměřených dat
Pravidelná bezplatná aktualizace všech databází, které jsou součástí systému	ano	ANO po dobu trvání záruky případně
Možnost vkládat vlastní naměřená spektra do databáze a tím vytvoření databáze v rámci stávajícího SW	ano	ANO SW umožňuje vkládání naměřených spekter a vytváření vlastních databází
Možnost vytvoření exportu a následného elektronického sdílení vlastních vytvořených referenčních spekter s jinými pracovišti	ano	ANO SW umožňuje export měřených spekter a následné sdílení mezi uživateli např. prostřednictvím emailu
Možnost využití MALDI-TOF technologie k pokročilým statistickým analýzám (typizace kmenů, epidemiologické studie, atd.)	ano	ANO SW umožňuje provádění pokročilých statistických analýz
Možnost využít MALDI-TOF k detekci mechanismů rezistence – požadujeme prokazatelně doložit	ano	ANO systém umožňuje využít přístroj

Formulář technických specifikací dodávky pro: ROP VIII_18 - Hmotnostní spektrofotometr pro identifikaci mikroorganismů

Název zadavatele: Karlovarská krajská nemocnice a.s.
Sídlo: Bezručova 1190/19, 360 01 Karlovy Vary
IČ: 26365804

		k detekci mechanismů rezistence viz. studie v příloze technické specifikace
SW pro uživatelskou správu systému (kalibrace, validace)	ano	ANO SW umožňují uživatelskou správu systému
Vzdálená servisní správa pro rychlou diagnostiku závad a problémů	ano	ANO systém podporuje, po připojení k internetu, funkci Webex, tedy vzdálenou diagnostiku závad
Veškeré příslušenství nutné k zahájení provozu a plné funkci zařízení	ano	ANO nabízený systém je plně funkční a využitelný k výše uvedeným účelům

**Uchazeč uvede údaje prokazující splnění požadovaných technických parametrů (u číselně vyjádřitelných hodnot uvede přímo nabízenou hodnotu parametru), případně uvede odkaz na přílohu nabídky, kde jsou tyto údaje uvedeny.*

V Brně dne 23.7.2015

Za uchazeče:

BioVendor - Laboratorní medicína a.s.
sídlo: Karásek 1707/1, 621 00 Brno
IČ: 63471507, DIČ: C263471507
zaps. v OR vedeném KS v Brně
Odd. B., vložka 3917

MUDr. Viktor Růžička
předseda představenstva
BioVendor – Laboratorní medicína a.s.

Technická specifikace nabízených dodávek

Hmotnostní spektrometr pro identifikaci mikroorganismů

Název nabízeného předmětu plnění

Kompletní systém hmotnostní spektrometrie IVD MALDI Biotyper (MALDI-TOF), výrobce: Bruker Daltonik GmbH

Nabízeným předmětem plnění je dodávka stolního MALDI-TOF hmotnostního spektrometru microflex™ LT výrobce Bruker Daltonik s kompletním příslušenstvím a programovým vybavením, určeného pro rychlou identifikaci patogenních mikroorganismů z klinických izolátů a pozitivních hemokultivačních vzorků (a jiných pozitivních klinických tekutých vzorků jako například pozitivní vzorek moče), jehož technická specifikace je uvedena níže.

Dodávka předmětu poptávky zahrnuje:

- zajištění dopravy do místa určení, instalace do určených prostor, uvedení systému do provozu s předvedením funkčnosti včetně zaškolení obsluhy, provedení prvotní validace s vystavením validačního protokolu,
- dodávku dalšího potřebného příslušenství a spotřebního materiálu pro řádné uvedení systému do provozu,
- poskytování bezplatného záručního servisu včetně dodávky potřebných náhradních dílů po celou dobu záruční lhůty - 24 měsíců na celý systém (kromě dusíkového laseru a detektoru), včetně provádění BTK (bezpečnostní technické kontroly) dle platné legislativy
- poskytování služby Bruker hot-line podpora pro střední laboratoře, update knihovny vzorků, preventivní prohlídky, údržbu, validaci a kalibraci, v rámci záruky (24 měsíců) zdarma
- dodání veškerých softwarů potřebných pro provoz přístrojů
- prodloužení záruční doby na dusíkový laser a detektor, záruka je u těchto položek prodloužena na 60 měsíců,
- dodávku sady destiček, spotřebního a pomocného materiálu pro zajištění provozu laboratoře – startovací balíček - na dobu 1 měsíce
- likvidaci obalů a odpadu
- návod na obsluhu v českém jazyce 1x v písemné podobě, 1x na CD, prohlášení o shodě, příslušná dokumentace dle zákona 123/2000 Sb., o zdravotnických prostředcích a změně některých zákonů v platném znění, nebo dle zákona č. 268/2014 Sb., o zdravotnických prostředcích, v platném znění a protokol o zaškolení obsluhy

Veškerá písemná, telefonická či osobní komunikace v rámci záručního servisu bude vedena v českém jazyce.

Specifikace předmětu plnění:

Nabízený předmět plnění, hmotnostní spektrometr „IVD MALDI Biotyper“ je systém, který je schopen provádět rychlou automatickou identifikaci bakterií, kvasinek a plísní a je založen na principu hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight). Právě díky tomuto principu systém rychle identifikuje patogenní mikroorganismy přímo z bakteriálních kultur na kultivačních mikrobiologických médiích nebo z pozitivní hemokultivační nádoby (hemokultury), nebo z pozitivních močových vzorků, kde byla pozitivita stanovena mikrobiologickým kultivačním systémem na principu nefelometrie nebo z jiného mikrobiologicky pozitivního klinického vzorku (např. vzorky dalších sterilních i nesterilních tělních tekutin).

Nabízený hmotnostní spektrometr s příslušenstvím je stolního typu, je umístitelný na standardní laboratorní stůl se standardní nosností, jeho instalace, uvedení do provozu a zaškolení personálu zahrnuje maximálně 2-3 pracovní dny.

Technická specifikace hmotnostního spektrometru/přístroje microflex LT:

a) Ionizační zdroj MALDI - Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization

- Iontový zdroj microSCOUT™ s vylepšenou patentovanou technologií pro zpožděnou pulzní extrakci desorbovaných a ionizovaných molekul pulzní iontové extrakce iontů – PAN Scan™.
- „Bezmřížková“ iontová optika zdroje pro nejvyšší ionizační a akcelerační výkon.
- Hardwarový modul pro pravidelné, automatizované čištění MALDI ionizačního zdroje bez nutnosti fyzického zásahu operátora / pracovníka laboratoře.

b) Dusíkový laser s vlnovou délkou 337 nm

- Pracuje s variabilní frekvencí v rozsahu 1 až 60 Hz.
- Obecná životnost laseru v rámci nabízeného zařízení je cca 60.000.000 nástřelů neboli „shotů“, kdy pro 1 provedenou identifikaci laser provede cca 600 nástřelů vzorku.
- Tato technologie umožňuje využití MALDI matrice α -cyano-4-hydroxyskořicové kyseliny.
- Vysoce rozlišená pozorovací optika (kamera) zobrazující zvětšený obraz vybrané pozice terčiku přímo na displeji PC v ovládacím programu flexControl.
- Intuitivní grafický interface programu flexControl pro jednoduché určení přesné X/Y pozice laserového pulzu pomocí kliknutí ukazatele myši na dané místo na reálném obraze z kamery.

c) Hmotnostní analyzátor „Time-of-Flight“ (TOF) v lineárním módu

- Lineární TOF analyzátor se 105 cm dlouhou letovou trubicí.
- Ultracitlivý systém duálního-MCP detektoru iontů s možností ovlivnit jejich propustnost pro potlačení matrice.
- Možnost detekce iontů jak v pozitivním, tak v negativním módu.
- Ultra-stabilní zdroj napětí pro analyzátor a detektor TOF.
- Rozlišení přístroje (FWHM) v lineárním MALDI módu pro peptidy: > 2 000 pro $m/z = 1\ 619,8$ (bombesin).
- Rozlišení přístroje (FWHM) v lineárním MALDI módu pro proteiny: > 450 pro $m/z = 44\ 613$ (Protein A).

- Rozlišení přístroje v širším rozsahu hmot (díky PAN Scan):
 - > 400 pro $m/z = 5\,734$ (Insulin) společně s
 - > 600 pro $m/z = 8\,476$ (Myoglobin)
 - > 700 pro $m/z = 12\,361$ (Cytochrom C)
 - > 800 pro $m/z = 16\,952$ (Myoglobin)
- Měřené zároveň pomocí PAN Scan technologie.
- Hmotnostní rozsah v lineárním MALDI módu 100 Da – 132 kDa
- Přesnost měřené hmoty v lineárním MALDI módu měřená na Substanci P (1 347,7 Da) při kalibraci Angiotensinem II (1 046, 5 Da) a Bombesinem (1 619,8): chyba při interní kalibraci £ 155 ppm, chyba při externí kalibraci £ 200 ppm.
- Citlivost v lineárním MALDI módu: poměr signál/šum ³ 50:1 pro 500 fmol pro $m/z = 66\,000$ (BSA) po 500 laserových pulzech.

d) Systém generování vakua ve spektrometru

- Extrémně tichý provoz díky nejnovější vakuové technologii.
- Membránová bezolejová nízko-vakuová pumpa před následnou turbo-molekulární pumpou pro MALDI zdroj a TOF analyzátor.
- Jednotka pro měření vakua a kontrolu pump.
- Ovládání všech parametrů přímo se softwarem.

e) Destičky pro provádění identifikace mikroorganismů

- Základní MALDI destička s terčíky typu microSCOUT o velikosti ¼ standardní mikrotitrační destičky, 96 pozic (terčíků) pro vzorek, OPAKOVATELNĚ POUŽITELNÁ, plně kompatibilní s robotizací pro automatickou přípravu vzorků na terčík
- Tento systém také umožňuje použití MALDI destiček BioTarget, destiček na 1 použití; 1 takováto destička obsahuje 48 pozic (terčíků) pro vzorek a je vhodná pro použití při identifikaci vzorků z laboratoře vyšší třídy nebezpečnosti (např. mykobakteriologické laboratoře), protože eliminuje nutnost mytí a čištění destičky po jejím použití.

Počet vzorků při provedení identifikace v jednom čase není pevně stanoven, je možno identifikovat 1 vzorek samostatně aniž by došlo k znehodnocení zbylého počtu pozic na právě používané destičce (obou typech), MALDI destičky je možno opakovaně používat až do vyčerpání pozic destičky sloužících pro nanesení vzorku.

Nabízené zařízení obsahuje v rámci dodávky sadu **5 kusů MALDI destiček z leštěné oceli určených pro opakované použití.**

f) Vzdálená diagnostika zařízení přes internet

- Možnost vzdálené diagnostiky přístroje přes síťové rozhraní (WebEx session) přímo techniky společnosti Bruker s.r.o. včetně možnosti vzdálené validace a kalibrace systému servisním technikem. K této operaci dochází vždy až se souhlasem zákazníka a po jeho explicitní žádosti o její provedení. Tímto způsobem, dojde k okamžité lokalizaci závady technikem, v případě jednoduchosti jejího odstranění také k doporučení jak závadu opravit vlastními silami. V případě nutnosti většího zásahu se pak již technik domlouvá se zákazníkem na konkrétním řešení.

- Vzdálená diagnostika je službou volitelnou, je součástí balíčku servisních služeb „Bruker Hotline podpora“, podrobná specifikace servisních služeb je uvedena ve specifikaci servisního zabezpečení.

g) Digitální datový systém pro přístroj microflex LT

- Digitizér s 500 MHz vzorkovací frekvencí.

Položková specifikace dodávky předmětu plnění:

1) Dodávka základního přístroje microflex LT

2) Dodávka příslušenství přístroje microflex LT:

- Počítačová jednotka HP Z400 včetně klávesnice a myši
- LCD displej HP Compaq LA2205wg
- Laserová tiskárna HP Laser Printer P3015D
- Laserová čtečka čárových kódů
- Záložní zdroj APC Smart-UPS, 2200VA LCD
- MSP96 destička s terčíky z leštěné oceli, celkem v dodávce 5 kusů destiček
- Reference Physiocare Pack Eppendorf, který obsahuje:
3 kusy manuálních jednokanálových pipet s variabilním objemem, typ Eppendorf Reference® PhysioCare Concept (0,5-10 ul, 10-100 ul a 100-1000 ul) a 3 kusy zásobních krabiček na pipetovací špičky (formát 96 ks), max.kapacita max. 20, 200 a 1000 ul

3) Dodávka softwarového vybavení přístroje microflex LT:

a. Softwarový balík MALDI Biotyper 3.1 SR1

- Kompletní SW balík pro identifikaci mikroorganismů pomocí měření MS spekter a srovnání jejich proteinových fingerprintů s referenčními spektry v databázích.
- SW pracuje se spektry změřenými uživatelem a srovnává je se spektry z referenčních knihoven.
- SW umožňuje tvorbu vlastních knihoven referenčních spekter, přidávání vlastních spekter do stávajících knihoven a další úpravy těchto knihoven.
- SW pracuje se získanými spektry a databázemi a provádí on-line analýzy a identifikace mikroorganismů velice efektivně a rychle - v řádech desítek sekund, max. minut.
- Metoda vyhodnocování a ID pomocí MALDI Biotyper je univerzální a dostatečně robustní a není závislá na typu mikroorganismu (gram-pozitivní vs. gram-negativní organismus).
- SW dovoluje také provádění pokročilejších vyhodnocovacích postupů, jako jsou například tvorby taxonomických stromů pro identifikované mikroorganismy, epidemiologické studie a podobně.
- Možnost detekce mechanismů rezistence k antibiotikům – doloženo kopií publikace z Clinical Microbiology Reviews (American Society for Microbiology), název publikace: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry for Detection of Antibiotic Resistance Mechanisms: from Research to

Routine Diagnosis; Jaroslav Hrabák, Eva Chudáčková and Radka Walková – viz příloha této specifikace

- Bezplatný upgrade softwarového balíku ve chvíli dostupnosti nové softwarové verze po dobu trvání záruky.
- b. Software flexControl
- Kompletní software pro IVD rychlou a automatizovanou identifikaci mikroorganismů (bakterií, kvasinek a plísní) z klinických izolátů a pozitivních klinických vzorků jako např. hemokultivačních vzorků.
 - Uživatelské rozhraní softwaru v českém jazyce.
 - Bezplatný upgrade softwarového balíku ve chvíli dostupnosti nové softwarové verze po dobu trvání záruky.
- c. IVD MALDI Biotyper 2.3 CZ
- Software flexControl je SW, který řídí činnost hmotnostního spektrometru a usnadňuje akvizici dat.
 - Validace a kalibrace se provádí pomocí validačních a kalibračních terčů s naneseným standardem, které se analyzují jako běžné vzorky – vyhodnocení kalibrace a validace se následně provádí pomocí SW flexControl.
 - Softwarový modul pro automatické kalibrace MALDI-TOF zařízení.
 - Bezplatný upgrade softwarového balíku ve chvíli dostupnosti nové softwarové verze po dobu trvání záruky.
- d. Databáze-CD Btyp3.0-Library pro MALDI Biotyper
- Referenční knihovna spekter pro MALDI Biotyper obsahuje referenční spektra mikroorganismů obsahující všechny podstatné klinicky, environmentálně a hygienou monitorované a relevantní druhy.
 - V současné době Knihovna 3.0 obsahuje 5 627 různých referenčních druhů.
 - Referenční spektra jsou generována pro dobře známé druhy a jsou doplněna spektry získanými z průmyslových, veterinárních a klinických izolátů.
 - Bezplatný upgrade softwarového balíku ve chvíli dostupnosti nové softwarové verze po dobu trvání záruky.
- e. Knihovna Security Relevant Library 1.0
- Referenční knihovna spekter pro MALDI Biotyper obsahuje referenční spektra vysoce patogenních mikroorganismů, které jsou legislativou ČR/EU zahrnuty do skupiny Biosafety Level 3“ (dále jen „BSL-3“) a nejsou součástí standardní MALDI knihovny.
 - Vzhledem k tomu, že referenční spektra této knihovny patří v rámci klinické mikrobiologie do skupiny „detekce bojových biologických látek“, vztahuje se na koupi této knihovny povinnost vyřízení vývozně-dovozní licence na dovoz vojenského materiálu a její koupě je tedy podmíněna podpisem dalších závazných dokumentů v průběhu vlastní realizace.

f. Knihovna MALDI Mycobacterium Library 1.0

- Tato samostatně dodávaná knihovna obsahuje další referenční spektra, konkrétně spektra pro využití v mykobakteriologické laboratoři při stanovení acidorezistentních tyčků. První verze této databáze obsahuje více jak 90 druhů mykobakterií.
- Při instalaci tohoto softwaru je uživatel zaškolen v režimu tzv. pokročilého uživatelského školení na zpracování zmíněných izolátů. Postup se mírně liší od standardního zpracování, kdy odlišná preanalytická fáze těchto izolátů zvyšuje úspěšnost identifikace pomocí MALDI systému; pokročilé zaškolení uživatelů je součástí nabídkové ceny softwaru.
- Upgrade softwarového balíku ve chvíli dostupnosti nové verze je po dobu záruky zdarma.

g. Knihovna MALDI Fungi Library 1.0

- Tato samostatně dodávaná knihovna obsahuje další referenční spektra, konkrétně spektra pro využití v mykologické laboratoři při identifikaci kvasinek a plísní. První verze této knihovny vláknitých hub obsahuje více než 110 druhů a přibližně 40 různých rodů.
- Při instalaci tohoto softwaru je uživatel zaškolen v režimu tzv. pokročilého uživatelského školení na zpracování zmíněných izolátů. Postup se mírně liší od standardního zpracování, kdy odlišná preanalytická fáze těchto izolátů zvyšuje úspěšnost identifikace pomocí MALDI systému; pokročilé zaškolení uživatelů je součástí nabídkové ceny softwaru.
- Upgrade softwarového balíku ve chvíli dostupnosti nové verze je po dobu záruky zdarma.

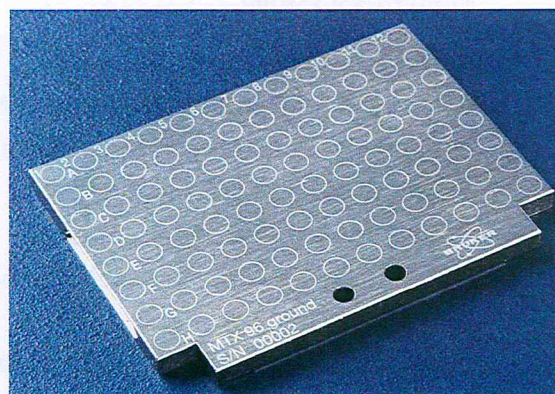
4) Dodávka startovací balíčku spotřebního materiálu (chemikálie a spotřební materiál) pro zajištění chodu laboratoře na 1 měsíc.

Obrázková příloha:

Přístroj microflex LT s příslušenstvím



MSP96 Maldi ocelový terčik



Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry for Detection of Antibiotic Resistance Mechanisms: from Research to Routine Diagnosis

Jaroslav Hrabák, Eva Chudáková and Radka Walková
Clin. Microbiol. Rev. 2013, 26(1):103. DOI:
10.1128/CMR.00058-12.

Updated information and services can be found at:
<http://cmr.asm.org/content/26/1/103>

These include:

This article cites 76 articles, 23 of which can be accessed free
at: <http://cmr.asm.org/content/26/1/103#ref-list-1>

Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new
articles cite this article), [more»](#)

REFERENCES

CONTENT ALERTS

Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>
To subscribe to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

Journals.ASM.org



Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry for Detection of Antibiotic Resistance Mechanisms: from Research to Routine Diagnosis

Jaroslav Hrabák, Eva Chudáková, Radka Walková
Department of Microbiology, Faculty of Medicine and University Hospital in Pilsen, Charles University in Prague, Pilsen, Czech Republic

SUMMARY	103
INTRODUCTION	103
REQUIREMENTS FOR RESISTANCE MECHANISM DETECTION	103
DETECTION OF ENZYMIC ACTIVITY BY MALDI-TOF MS	104
Direct Detection of β -lactamase Activity	104
Detection of rRNA Methyltransferase Activity	106
DIRECT MALDI-TOF MS ANALYSIS OF BACTERIAL EXTRACTS	106
MRSA Detection	107
β -lactamase Detection	107
Detection of Vancomycin-Resistant <i>Enterococcus</i> spp.	107
PROTEOMIC APPROACHES	107
Applications of Proteomic Analysis	108
Composition	108
ANALYSIS OF CELL WALL COMPONENTS	108
MINISEQUENCING	109
FUTURE PERSPECTIVES	109
CONCLUSION	111
ACKNOWLEDGMENTS	112
REFERENCES	112
AUTHOR BIOS	114

SUMMARY

Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) has been successfully applied as an identification procedure in clinical microbiology and has been widely used in routine laboratory practice because of its economical and diagnostic benefits. The range of applications of MALDI-TOF MS has been growing constantly, from rapid species identification to labor-intensive proteomic studies of bacterial physiology. The purpose of this review is to summarize the contribution of the studies already performed with MALDI-TOF MS concerning antibiotic resistance and to analyze future perspectives in this field. We believe that current research should continue in four main directions, including the detection of antibiotic modifications by degrading enzymes, the detection of resistance mechanism determinants through proteomic studies of multiresistant bacteria, and the analysis of modifications of target sites, such as ribosomal methylation. The quantification of antibiotics is suggested as a new approach to study influx and efflux in bacterial cells. The results of the presented studies demonstrate that MALDI-TOF MS is a relevant tool for the detection of antibiotic resistance and opens new avenues for both clinical and experimental microbiology.

INTRODUCTION

Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) has recently been introduced into many microbiological laboratories for the routine identification of bacteria and fungi. Although the initial costs of a

mass spectrometer are relatively high, the cost of identifying one species remains low compared with the cost of standard biochemical or molecular genetic techniques. This use of MALDI-TOF MS is making the diagnostic process approximately 24 h shorter (1, 2).

Recently, other applications focusing on the detection of antibiotic resistance mechanisms have been described. These methodologies may also play an important role in the application of mass spectrometry in diagnostic microbiological laboratories. The aim of this review is to summarize information that has already been published and to analyze future perspectives on MALDI-TOF MS for the detection of antibiotic resistance mechanisms.

REQUIREMENTS FOR RESISTANCE MECHANISM DETECTION

The resistance of bacteria to antibiotics has increased in recent years. Resistant bacteria can significantly complicate the treatment of infections in critically ill patients, especially in surgery, hemato-oncology, and intensive care in general (3, 4). Bacterial isolates that are resistant to all available antibiotics have also been described (5, 6).

Bacteria can resist antibiotic actions by the following mechanisms: the production of enzymes that inactivate antibiotic molecules (e.g., β -lactamases and aminoglycoside-modifying enzymes) (7–9), the hyperproduction or production of novel efflux

Address correspondence to Jaroslav Hrabák, Jaroslav.Hrabak@p.cuni.cz.
Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.
doi:10.1128/CMR.00058-12

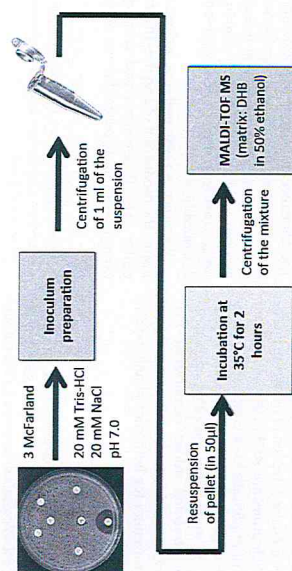


FIG 2 Hydrolysis assay for detection of carbapenemases. The assay is based on a method reported by Hrabák et al. (28). DHB, dihydroxybenzoic acid.

(*m/z*) of 384.5. The dimer of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), a common matrix used for bacterial and fungal identification, is observed at *m/z* 380. The peak of the matrix is usually of a higher intensity than that of meropenem, and thus, the peaks of meropenem and the sodium salt of the meropenem decarboxylated degradation product are not clearly visible in a spectrum. Therefore, another matrix must be chosen.

The detection of β -lactamase activity is performed by using almost the same methodology in all published works. A fresh bacterial culture, usually grown overnight, is suspended in a buffer and centrifuged. The pellet is then resuspended in a reaction buffer containing the β -lactam molecule. After incubation at 35°C for 1 to 3 h, the reaction mixture is centrifuged, and the supernatant is mixed with a proper matrix measured by MALDI-TOF MS (Fig. 2). The spectra containing peaks representing the β -lactam molecule, its salts (usually sodium salts), and/or its degradation products are then analyzed.

In a study by our group (26), we used the meropenem molecule as an indicator and demonstrated that MALDI-TOF MS is able to detect meropenem and the two types of meropenem sodium salts as well as the relevant degradation products (Fig. 3). The assay was validated using 124 strains, including 30 carbapenemase-producing bacteria representing IMP-7- and VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains and NDM-1-, KPC-2-, and NDM-1-producing enterobacteria. The sensitivity and specificity of the assay were both higher than 95%. The specificity of this assay was improved later by a modification of the reaction buffer supplemented with 0.01% sodium dodecyl sulfate. This change allows the concentration of bacteria used to be decreased (28). Comparing these results with those from a previously reported assay (26), the degradation products of meropenem (decarboxylated product at *m/z* 338.5 and its sodium salt at *m/z* 380.5) can be observed. For validation, 110 carbapenemase-producing isolates including NDM-1-, KPC-2-, VIM-1-, OXA-48-, and OXA-162-producing enterobacteria (e.g., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, and *Serratia marcescens*) and 35 carbapenemase-nonproducing isolates were used. This method was able to detect NDM-1 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* isolates as well (28). In our experience, OXA-type carbapenemases can also be easily detected in this species (f. Hrabák, unpublished data), similar to findings described by Kempf et al. (29) (see below).

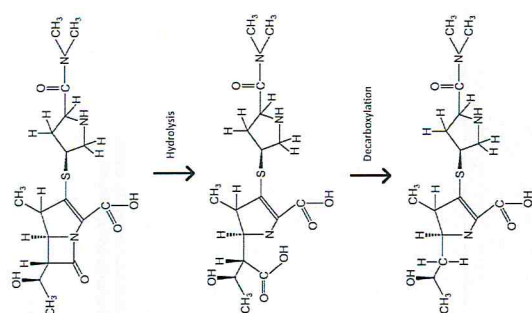


FIG 1 Meropenem and its degradation by β -lactamases.

β -lactamases to be inhibited by specific inhibitors (e.g., clavulanic acid for extended-spectrum β -lactamases, amino-phenylboronic acid for KPC-type carbapenemases, and ethylenediamine tetraacetic acid for metallo- β -lactamases). The inhibition of β -lactamases can be observed synergistically by using the disk diffusion method, the broth dilution method, or a special E-test containing the antibiotic to be tested in combination with an inhibitor (6). Molecular genetics techniques (e.g., PCR and microarrays) are common for the fast detection of some β -lactamases and can detect β -lactamase genes directly from a clinical sample. At this time, many different β -lactamases have been described. Therefore, it is very difficult to propose universal primers for the detection of at least one β -lactamase group. Additionally, a negative result should not be interpreted as the absence of β -lactamase. The direct method used in reference laboratories is based on the spectrophotometric detection of β -lactam hydrolysis using cell extracts containing β -lactamases. This method is labor-intensive and cannot be used routinely in most diagnostic laboratories (22, 23). Another method for the direct detection of carbapenemases in particular is a Hodge test, which can be used routinely. Its interpretation, sensitivity, and specificity, however, may be difficult (24).

In September 2011, the first two studies on direct carbapenemase detection by MALDI-TOF MS were reported (25, 26).

An analysis of antibiotics and their degradation products that are smaller than 1,000 Da by MALDI-TOF MS is possible using a specific sample preparation (27). Because the matrix is also visible in mass spectra, the detected molecule should be of a significantly different mass. For example, the peak representing an intact meropenem molecule can be observed at mass-to-charge ratio

pumps and other changes in the cell wall (e.g., porin alterations) (10), mutations in target genes (e.g., in ribosomal protein genes or in genes coding for penicillin-binding proteins [PBP2a]) (8, 9, 11), the bypass of a metabolic pathway (e.g., the expression of acquired PBPs with a low affinity for antibiotic molecules) (11), and the production of proteins that protect the target site (e.g., quinolone resistance mediated by *Qnr*) or of target site-modifying enzymes (12).

In some cases, the detection of the resistance mechanism is complementary to standard susceptibility testing procedures, with an emphasis on the categorization of the isolate as resistant, intermediate, or susceptible (13). A quick determination of the resistance mechanism may also play a key role in the initial choice of antimicrobial therapy (14, 15). The detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains or carbapenemase-producing enterobacteria (CPE) is necessary for the effective prevention of the transmission of these bacteria (16, 17).

Therefore, routine microbiological laboratories need fast and reliable methods to detect resistance mechanisms in some bacteria that can provide important information for the choice of proper initial infection therapy and data for the experts working in infection control in health care settings.

MALDI-TOF MS analysis can most likely be applied for the analysis of all possible resistance mechanisms. The approaches that have already been reported are based on the following: the analysis of antibiotic molecules and their modified products, the analysis of bacterial cell components, the analysis of ribosomal DNA methylation, and the detection of mutations with minisequencing.

For some of these applications, MALDI-TOF MS provides results that can be used for diagnosis, whereas some of the methods are useful only in reference centers and research laboratories.

DETECTION OF ENZYMATIC ACTIVITY BY MALDI-TOF MS

Direct Detection of β -Lactamase Activity

The most common mechanism of resistance to β -lactams is the hydrolysis of the amide bond of the β -lactam ring (Fig. 1). The hydrolysis degradation product shows a different molecular mass from that of a native molecule. Some β -lactams are decarboxylated after hydrolysis, resulting in another change in molecular weight. According to the active-site structure, β -lactamases are divided to two groups: serine enzymes (molecular classes A, C, and D) and metalloenzymes (class B) (7, 18, 19). For a long time, class A β -lactamases were the most important group (e.g., TEM, SHV, and CTX-M). Recently, class B β -lactamases (metallo- β -lactamases) have become important due to their ability to hydrolyze carbapenems. The genes encoding metallo- β -lactamases were first spread among *Pseudomonas* spp., but recently, they have spread among members of the *Enterobacteriaceae* throughout the world. This spread was followed by *Enterobacteriaceae* producing class A carbapenemases (e.g., KPC and GES) in the present time (20).

The rapid detection of clinically important β -lactamases (e.g., extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases) in routine diagnostic laboratories may be crucial for initial antibiotic therapy for specific patients as well as for the prevention of the spread of β -lactamase-producing bacteria in health care settings (21). Three main approaches have been introduced into routine laboratories. The most common techniques are based on the ability of some

Burckhardt and Zimmermann (25) validated a similar method with KPC-2-, NDM-1-, IMP-, and VIM-producing enterobacteria using eropenem. That group observed the eropenem molecule (476 Da), its two sodium salt variants (498 and 521 Da), and the decarboxylated degradation product without sodium (450 Da). They also found excellent sensitivity and specificity for the assay.

A study of the detection of different β -lactam molecules was reported by Sparber et al. (30). That group developed a method for the detection of ampicillin, piperacillin, cefotaxime, ceftazidime, eropenem, imipenem, and meropenem and analyzed the different degradation products and sodium and/or potassium salt variants. No degradation products of imipenem and meropenem were observed. Some of the molecules (e.g., ampicillin and piperacillin) degraded spontaneously during the incubation time. For the identification of the β -lactamase type, clavulanic acid, azobactam, and aminophenylboronic acid were introduced as inhibitors in the reaction. This study seems to be of the highest importance for the detection of different β -lactams by MALDI-TOF MS.

Recently, two other studies that validated MALDI-TOF MS for the detection of carbapenemases were reported (29, 31). Kempf et al. (29) used imipenem as an indicator. They tested 3 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates (KPC and NDM-1), 4 *Pseudomonas aeruginosa* isolates (VIM and IMP), and 63 OXA-23- and/or OXA-24-producing *Acinetobacter baumannii* isolates. Imipenem (*m/z* 300) and its degradation product (*m/z* 254) were detected by using a CHCA matrix and an AnchorChip target (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). After 2 h of incubation, 67 of 70 carbapenemase-producing isolates were correctly detected, and no false-positive results were found. An extension of the incubation time to 4 h allowed the correct identification of all the carbapenemase producers. The work of that group is of great interest because OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* cannot be easily detected by spectrophotometric assays (32).

Another sample preparation for the detection of β -lactamase activity was reported by Hooff et al. (31). That group used a cell-free lysate and a MALDI-TOF and MALDI-triple quadrupole (QqQ) instrument. The data presented in that report clearly demonstrated the ability of the method to detect different β -lactam molecules (penicillin G, ampicillin, cefoxitin, and imipenem) and

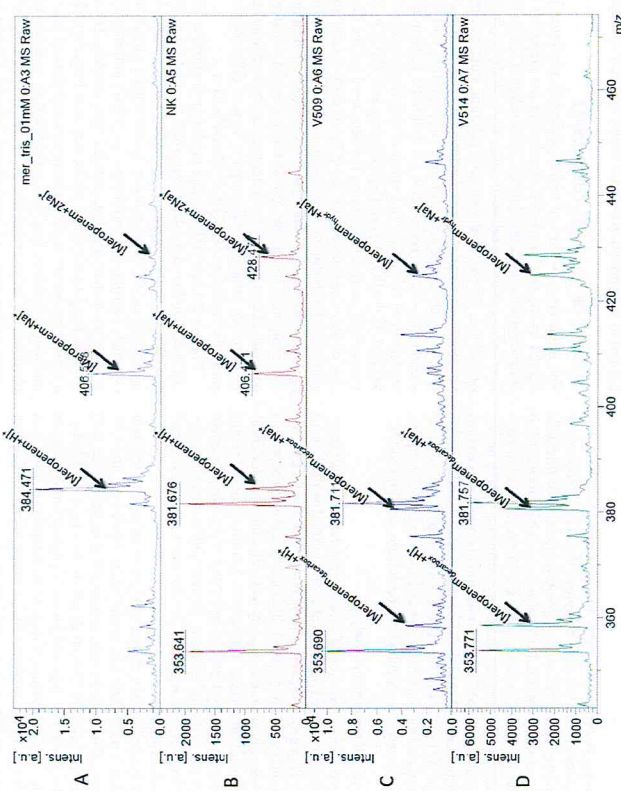


FIG 3 MALDI-TOF MS spectra of meropenem and its degradation products. The reaction was performed according to methods reported previously by Hrabák et al. (28). (A) Spectrum of the meropenem solution; (B) spectrum of the negative control (non-carbapenemase-producing isolate of *Klebsiella pneumoniae*); (C) spectrum of an NDH-1-producing *Acinetobacter baumannii* isolate; (D) spectrum of a KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate. [Meropenem]_{acid} + [H]⁺, decarboxylated degradation product of meropenem after carbapenemase hydrolysis (*m/z* 384.5); [Meropenem]_{acid} + [H]⁺, decarboxylated sodium salt of the degradation product of meropenem after carbapenemase hydrolysis (*m/z* 380.5); [Meropenem]_{acid} + [H]⁺, meropenem molecule (*m/z* 384.5); [Meropenem]_{acid} + [Na]⁺, meropenem sodium salt (*m/z* 406.5); [Meropenem]_{acid} + [Na]⁺, sodium salt of the meropenem degradation product (*m/z* 424.5); [Meropenem]_{acid} + [2Na]⁺, meropenem disodium salt (*m/z* 428.5); [Meropenem]_{acid} + [2Na]⁺, disodium of the meropenem degradation product (*m/z* 446.5); a.u., arbitrary units.

possible inhibition by clavulanic acid in addition to the reproducibility of the assay.

All of the reported studies describing the direct detection of β -lactamase activity independently presented similar results and allow us to conclude that this methodological approach has great potential to become a routine method for the detection of these enzymes which is comparable to the reference spectrophotometric assay (26). Manual measurements and analysis of raw spectra, however, can be difficult for microbiologists who are not experienced in mass spectrometry. Therefore, special software for the automatic acquisition and interpretation of results should be available to diagnostic laboratories. Another disadvantage of the method is the need for a fresh culture that is used for the analysis. The detection of carbapenemase activity directly from clinical samples without enrichment in specific cultivation media may be difficult and perhaps impossible.

Detection of rRNA Methyltransferase Activity

The methylation of rRNA confers resistance to protein synthesis inhibitors such as aminoglycosides, chloramphenicol, and clinda-

cation of microbes by MALDI-TOF MS. Until now, however, only a few articles focusing on the development of such techniques have been published. Some researchers used a sample preparation similar to that used for bacterial identification, but most were not successful. We believe that specific sample preparations or measurement conditions must be used (e.g., selective protein extraction) for the detection of resistance markers. In the following sections, previously reported data on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), β -lactamases, and vancomycin-resistant enterococci are reviewed.

MRSA Detection

The first study on the discrimination between methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) and MRSA strains was reported by Edwards-Jones et al. in 2000 (36). The strains were analyzed by MALDI-TOF MS using intact bacterial cells and 5-chloro-2-mercapto-benzothiazole as the matrix. Those authors were able to detect a total of 14 MRSA-specific peaks (e.g., *m/z* 511, 563, 640, 1,165, 1,229, and 2,127) and 2 MSSA-specific peaks (*m/z* 2,548 and 2,647) in the *m/z* ranges of 511 to 2,127 and 2,548 to 2,647, respectively. Seven other *S. aureus*-specific peaks (e.g., *m/z* 525, 617, 798, and 826) were also detected. Similar results were reported by Du et al., who were also able to successfully discriminate between MRSA and MSSA (37). In 2002, Bernardo et al. (38) did not find any correlation between MRSA and MSSA profiles, but they demonstrated the reproducibility of the obtained spectra, which allowed this method to be used for the tracking of nosocomial outbreaks. Unlike Edwards-Jones et al. (36), Bernardo et al. (38) used bacterial lysates for analysis.

The selective binding of a protein to a target in MALDI-TOF MS using the ProteinChip array is referred to as surface-enhanced laser desorption/ionization–time of flight (SELDI-TOF) MS (39, 40). Shah et al. (40) used this method for the detection of MRSA and successfully identified seven ions that allowed discrimination between MRSA (*n* = 49) and MSSA (*n* = 50) strains. The bacteria were diluted in a specific lysis solution, mechanically disrupted, and then frozen and thawed. The supernatant after centrifugation was used for SELDI-TOF detection. Peaks at 3,081, 5,893, and 9,580 Da were detected in MSSA strains, and peaks at 5,709, 7,694, 15,308, and 18,896 Da were detected in MRSA strains. Almost all strains (97 of 99 strains) were correctly assigned as MRSA or MSSA. For routine practice, the preparation of the samples in such a specific way seems to be difficult. However, if we compare this technique with standard PCR detection, the labor intensities are similar.

Majcherzyk et al. (41) described the differentiation between isogenic teicoplanin-susceptible and teicoplanin-resistant strains of methicillin-resistant *S. aureus*. MALDI-TOF MS was found to have a superior discrimination potential compared to that of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) or peptidoglycan muropeptide digest patterns.

For application in routine diagnosis, the above-mentioned tests need to be further validated.

β -Lactamase Detection

SELDI-TOF MS was also used to discriminate between *Escherichia coli* strains that harbored different resistance genes (e.g., *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{SHV-12}, *bla*_{TEM-1}, *cat*, *strA*, *salI*, *salII*, *tdtB*, *dhfrI*, and *aadA1*) (42). With this method, the authors of that study were able to discriminate between bacterial species, but no specific peaks or pro-

files that allowed the detection of some resistance markers were presented in that article.

Camara and Hays (43) reported a study that focused on the detection of a specific β -lactamase peak for ampicillin-resistant *Escherichia coli* strains. After the cultivation of resistant strains in Luria-Bertani broth supplemented with ampicillin, proteins were extracted by using a formic acid-isopropyl alcohol-water solution and spotted onto a MALDI-TOF MS target by a sandwich method using sinapinic acid as a matrix. A peak of approximately 29 kDa that represented β -lactamase was successfully detected in the spectra. Those authors noted that this peak was not detectable using whole cells for bacterial identification or using the other matrices (2,5-dihydroxyacetophenone ferulic acid and 2,5-dihydroxybenzoic acid). The 29-kDa protein was then identified by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and liquid chromatography-MS peptide mass fingerprinting as a β -lactamase. To our knowledge, this is the first and last report that has shown the direct detection of β -lactamases in mass spectra of bacterial lysates.

Recently, Schaumann et al. (44) tried to differentiate between β -lactamase-producing and -nonproducing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. The samples were prepared by extraction using trifluoroacetic acid and acetonitrile. Although those researchers obtained clear and reproducible spectra, they were not able to find any difference between β -lactamase producers and nonproducers. No β -lactamase-specific peak was detected. The measurement, however, ranged from *m/z* 2,000 to 12,000, which seems to be smaller than the expected molecular mass of common β -lactamases (>27 kDa).

Detection of Vancomycin-Resistant *Enterococcus* spp.

A recently reported study conducted by Griffin and colleagues (45) demonstrated the ability of MALDI-TOF MS to distinguish between *vanB*-positive *Enterococcus faecium* and isolates that do not possess this resistance gene, which is responsible for resistance to glycopeptides. In this well-designed study, 67 *vanB*-positive *Enterococcus faecium* isolates were used. The sensitivity and specificity of the assay were 96.7% and 98.1%, respectively. It was also shown that this methodology is likely to indicate the relatedness of *Enterococcus faecium* strains to a degree that is similar to that of the existing gold standard for the analysis of relatedness, PFGE (45). It should be noted that a standard formic acid extraction method was used for MALDI-TOF MS measurements in this application. The authors of that study mentioned that the direct application of some Gram-positive bacteria (including enterococci) to the target without an extraction procedure cannot provide proper results due to the thickness of the peptidoglycan in the cell wall, which does not permit the proper acquisition of the spectra.

PROTEOMIC APPROACHES

Research on antibiotic resistance is focused mainly on the detection of specific genes and comparison of isolates with molecular genetics techniques. Proteomic studies, however, provide data concerning gene expression and do not focus on only a single gene. As defined in 1995, the proteome is "the entire PROTEIN complement expressed by a genome, or by a cell or tissue type" (46). Proteomics uses primarily electrophoretic techniques for the detection of proteins. The cell extracts obtained by selective lysis are usually separated by two-dimensional (2D) electrophoresis. In the first step, the extract is separated according to the isoelectric

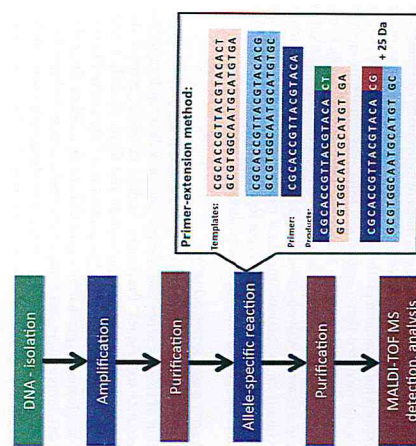


FIG 5 SNP detection by MALDI-TOF MS (according to data reported in reference 64).

chain bound to the nonreducing sugar) causes the molecular weight changes detectable by MALDI-TOF MS. In previously reported works, samples were usually measured in a negative mode. This condition, however, is not usually available in the instruments used in diagnostic laboratories. The changes in lipid A that are caused by 4'-phosphatase in colistin-resistant *Porphyromonas gingivalis* were observed by Coats et al. (61) as a change of the molecular weight, and a phosphoethanolamide modification of lipid A associated with colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* was reported by Becerro et al. (62). In both studies, the modified lipid A was identified by MALDI-TOF MS.

Recently, Cai et al. (63) developed a method for the detection of the OmpK36 protein in *Klebsiella pneumoniae*, which is responsible for the penetration of carbapenems into the periplasm. Those authors used a standard procedure for the isolation of porins by specific extraction with sodium *N*-lauroyl sarcosinate. The samples were then detected by using MALDI-TOF MS based on a simple determination of the molecular weight. Those authors were able to detect the loss of the main OmpK36 porin, which contributed to resistance to carbapenems. This method appears to make porin detection faster than detection by SDS-PAGE. However, porins are detected according to molecular weight only. A method based on a better MALDI-TOF MS identification of the detected porins (e.g., protein fingerprinting) should be developed. This technique will most likely be used only in research laboratories.

MINISEQUENCING

DNA analysis by MALDI-TOF MS can also be used to detect resistance mechanisms. The principles of MALDI-TOF MS-based sequencing methods were described by Pusch et al. (64). After DNA amplification, the amplicons are purified, and an allele-specific reaction is used to obtain DNA molecules that are measurable by MALDI-TOF MS. For an allele-specific reaction, the most common technique used in microbiological applications was a primer extension assay. In this technique, specific oligonucleotides are used, and the product is extended for only a few bases (Fig. 5). Based on the molecular mass of the product, changes in the DNA structure can be expected. For example, an A→C mutation decreases molecular mass by 24 Da, while an A→G mutation increases molecular mass by 16 Da (64). Due to the interactions of DNA with sodium and potassium, which result in salt formation, MALDI-TOF MS is limited to the analysis of molecules smaller than approximately 40 bp; therefore, the direct measurement of PCR products is difficult (64).

This technique was used for the detection of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) to identify SHV-type (65) and TEM-type (66) extended-spectrum β -lactamases. Resistance to rifampin and isoniazid in *M. tuberculosis* (67, 68) was also analyzed by MALDI-TOF MS sequencing.

Mutations in the *penA* and *penA* genes were detected in order to analyze β -lactam resistance in *Neisseria gonorrhoeae* (69), and subsequent works described the detection of resistance to fluoroquinolones, spectinomycin, and tetracycline (70, 71). That same group reported MALDI-TOF MS minisequencing for the detection of resistance in *Streptococcus pneumoniae* (72, 73). This approach has also been used to determine point mutations in PBPs in *Helicobacter pylori* strains resistant to amoxicillin (74).

Despite the number of publications on MALDI-TOF MS-based sequencing for the detection of antibiotic resistance, this

PAGE analysis for protein identification in resistant *E. coli*, *Salmonella enterica*, and *Mycobacterium tuberculosis* strains. All of those groups identified differences in protein expression levels among susceptible and resistant isolates.

A proteomic approach for the analysis of fluoroquinolone-resistant *Candida glabrata* strains was described by Rogers and colleagues (52). They mechanically disrupted the cells and separated the proteins by 2D electrophoresis. Membrane proteins prepared by a selective procedure were separated by SDS-PAGE only. That group identified several proteins and the differences in their expression levels that may contribute to azole resistance. Further analysis should be performed to demonstrate the real activity of these proteins.

Conclusion

Proteomic analysis is a powerful tool that is used to analyze metabolic pathways in prokaryotic and eukaryotic cells. This process provides more complex data than studies of the expression of single gene or a cluster of genes. Previous reports demonstrated the usefulness of this technique for determining resistance mechanisms. For new proteins that are identified as potential contributors to antibiotic resistance, their function should be demonstrated genetically (e.g., by gene deletion or cloning).

We do not believe that this technique can be used for the detection of antibiotic resistance mechanisms in routine diagnostic laboratories but can complement molecular genetic techniques in research laboratories until the time when whole-genome sequencing and its interpretation become widely available and fast.

ANALYSIS OF CELL WALL COMPONENTS

The importance of the cell wall in antibiotic resistance is highlighted by the fact that more than half of the targets of current antimicrobials are localized in the cell envelope. Other antibiotics have to overcome the cell wall barrier to reach their targets in the cytosol (10, 53, 54). Proteomic and genomic studies of the outer membrane of Gram-negative bacteria indicated that a complex system of cell components (porins, efflux pumps, and lipopolysaccharides, etc.) is responsible for antibiotic resistance via the regulation of the influx and efflux of different antibiotics (53). MALDI-TOF MS fingerprinting following SDS-PAGE or 2D electrophoresis, as described above, has been used for the identification of outer membrane and periplasmic proteins for which the expression levels differed in resistant isolates relative to the levels in the corresponding sensitive isolates (55–58). Such labor-intensive proteomic studies are useful for building a comprehensive database of bacterial protein fingerprints for comparative studies that provide insight into the roles of various cell components in antibiotic resistance (MASCOT; Matrix Science).

The use of MALDI-TOF MS is not limited to proteomics of the cell wall. Another example of its possible application is the detection of structural changes in lipopolysaccharides. The loss of the negative charge of lipid A due to postsynthetic modifications is especially associated with resistance to cationic antimicrobial peptides such as polymyxins (e.g., colistin) (59). For MALDI-TOF MS analysis, lipopolysaccharide can be extracted from the cell wall by a specific procedure, such as the hot-phenol method (60). In this method, lipopolysaccharide is solubilized by a water-saturated phenol and then precipitated. The samples are then applied with a proper matrix onto an MS target and analyzed. The modification of the structure of lipopolysaccharide (e.g., the loss of the fatty acid

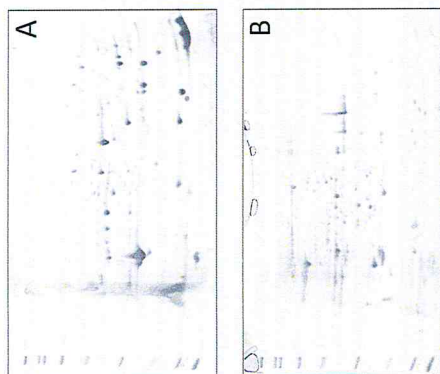


FIG 4 Example of two-dimensional electrophoretic separation of *Klebsiella pneumoniae* extracts. (A) Proteins recovered from the periplasmic space by the sucrose method; (B) proteins recovered from the cytoplasm by sonication.

point by using isoelectric focusing, and the proteins are then separated by SDS-PAGE (46). An example of the 2D electrophoretic separation of periplasmic and cytoplasmic proteins of *Klebsiella pneumoniae* is shown in Fig. 4. The protein map is then compared with a database by using specific software. The proteins of interest can be identified by peptide mass fingerprinting and/or amino acid sequencing (39, 46). The identification of the proteins is commonly performed by MALDI-TOF MS or MALDI-random TOF (MALDI-TOF/TOF) MS (39). The disadvantages of these techniques are their labor-intensiveness and the fact that the expression of the proteins may depend on the culture conditions (47).

Applications of Proteomic Analysis

A proteomic characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus* sp. isolates recovered from seagulls was reported by Radhouani et al. (47). That group separated protein extracts obtained by the sonication of bacteria by SDS-PAGE as well as 2D electrophoresis with spot identification followed by MALDI-TOF MS identification of the proteins. Those researchers identified nine proteins associated with tetracycline resistance and a protein associated with the ability of the bacterium to form a biofilm. The vancomycin-tetraplanin A-type resistance protein *vraA* was also detected in *Enterococcus* strains.

A study focused on a proteomic analysis of ampicillin-resistant *Fluorobacterium nucleatum* was reported by Al-Harouni and colleagues (48). The bacteria were resuspended in lysis buffer and mechanically disrupted. This crude extract was used for 2D electrophoretic separation followed by the identification of spots of interest. In resistant isolates, a class D β -lactamase of 29 kDa, a 37-kDa ATP-binding cassette (ABC), a transporter XTP-binding protein, and a 46-kDa enolase were identified.

Three other studies (49–51) used MALDI-TOF MS after SDS-

4. The quantification of antibiotics. The development of a method to determine antibiotic concentrations could aid in the analysis of the influx and efflux of an antibiotic.

Proteomic approaches in studies of resistant strains can complement molecular genetics techniques. Proteomic-level studies allow the detection of the behavior of the tested strains, the expression of proteins of interest, and posttranslational modifications. With the exception of whole-genome sequencing, which is not yet available for routine use, all molecular genetics techniques have been restricted to the detection of known resistance determinants. Proteomic analysis may be labor-intensive in routine laboratories, but it should be available in reference centers.

As demonstrated by many studies, MALDI-TOF MS can detect

[illegible]

Clinical Microbiology Reviews

application	MALDI-TOF MS	Application already developed	Type of laboratories that can use the method	Advantage	Disadvantage	Complementary method	Note
Detection of enzymatic activity	Detection of carbapenemases	Detection of other β -lactamases	Reference centers	Comparable with reference assay	No identification of β -lactamase type (genetic techniques are needed for epidemiological purposes)	Spectrophotometric detection of β -lactam hydrolysis spectra	
Detection of enzymatic activity	Detection of carbapenemases	Detection of other β -lactamases	Routine laboratories	Direct detection of β -lactamase activity	Needs special skills for interpretation of spectra	Phenotypic, inhibitor-based techniques	
				Turnaround time of ca. 3 h if fresh culture is available	Does not provide data about real susceptibility to β -lactams	Molecular genetics methods (e.g., PCR-based methods, sequencing, microarrays)	
				Detection of carbapenemases in <i>Acinetobacter baumannii</i>	Fresh bacterial culture must be available		
				Direct detection of enzymatic modifications	Needs purification of enzymes		
				Easy and fast technique for detection of resistance markers	Detection of resistance markers will probably require specific sample prep	Phenotypic detection of resistance	Validated for detection of <i>vanA</i> in <i>Enterococcus faecium</i>
Direct MALDI-TOF MS analysis of bacterial extracts	vancomycin-resistant enterococci	Detection of MRSA	Routine laboratories	Probably many different resistance markers can be detected	Some proteins in samples with many different molecules may be invisible by MALDI-TOF MS	Molecular genetics techniques	Other techniques need further validation
Proteomics	Analysis of proteins in resistance isolates	Detection of β -lactamases	Reference centers	Complex picture of protein expression	Labor-intensive method	Molecular genetics techniques	Not yet fully introduced into research on antibiotic resistance

the biological activity of enzymes responsible for the modification of antibiotic molecules, which is not possible with genetic techniques. The results of the studies presented here show that MALDI-TOF MS is a relevant tool for the detection of antibiotic resistance and opens new avenues for both clinical and experimental microbiology.

We do not believe, however, that the application of this technique to the determination of resistance mechanisms can replace standard susceptibility testing, because resistance to antibiotics is a complex process. Therefore, the detection of a limited number of specific determinants cannot provide a complete picture of antibiotic resistance.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank C. C. Papagiannitsis for critical reading of the manuscript. Jaroslav Hrabák and Eva Chudáková were partially supported by research project grants NT11032-6/2010 from the Ministry of Health of the Czech Republic and MSM0021620819 from the Ministry of Education of the Czech Republic and by the Charles University Research Fund (project number P36).

REFERENCES

- Seng P, Rolin J-M, Fournier PE, La Sola B, Drancourt M, Raoult D. 2010. MALDI-TOF mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol* 5:1733–1754.
- Weiser A, Schneider L, Jung J, Schubert S. 2012. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:965–974.
- Livermore DM. 2012. Fourteen years in resistance. *Int J Antimicrob* 40:283–294.
- Nordmann P, Dortet L, Poirel L. 2012. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the story! *Trends Mol Med* 18:263–272.
- Hrabák J, Nisenzová J, Chudáková E, Fridrichová M, Studenová V, Černá D, Urbáková P, Zemlíková H. 2011. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from a Czech patient previously hospitalized in Greece and in vivo selection of colistin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 55:3681–3685.
- Tzouvelekis S. 2012. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev* 25:682–707.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 39:1211–1233.
- Shahid S, Khan R, Zarilli R, Khan AU. 2008. Aminoglycosides versus bacteria—a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. *J Biomed Sci* 15:5–14.
- Smith CA, Baker EN. 2002. Aminoglycoside antibiotic resistance by enzymatic deactivation. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2:143–160.
- Nikaido H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:593–656.
- Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T. 2008. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev* 32:361–385.
- Strahlvitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* 22:664–689.
- Leclercq R, Cantón R, Brown DF, Giske CG, Heisig P, Macgowan AP, Mouton RP, Nordmann P, Rodloff AC, Rossolini GM, Soussi AP, Steinbakk M, Winstanley TG, Kahlmeter G. 21 October 2011. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect* [Epub ahead of print]. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03703.x.
- Ledebour M, Hordinka RL. 2011. Molecular detection of resistance determinants. *J Clin Microbiol* 49:520–524. doi:10.1128/JCM.00711-11.
- Niederman M. 2009. Treatment options for nosocomial pneumonia due to MRSA. *J Infect* 59(Suppl 1):S25–S31. doi:10.1016/S0163-4453(09)60005-0.
- Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, Cantón R, Rossolini GM, Campos J, Vatsopoulos A, Gniadkowski M, Toth A, Pfeifer Y, Jarlier V, Carmeli Y, CNSE Working Group. 2010. Carbapenem-non-susceptible
- Enterobacteriaceae* in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro Surveill* 15(46):pii=19711. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19711>.
- Taccarelli E. 2009. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: source control and surveillance organization. *Clin Microbiol Infect* 15(Suppl 7):31–38.
- Buyanik JD. 2004. The discovery and development of modified penicillins and cephalosporins-derived beta-lactamase inhibitors. *Curr Med Chem* 11:1951–1964.
- Patersson DJ, Bonomo RA. 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 18:657–686.
- Bush K. 2010. Alarming beta-lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Curr Opin Microbiol* 13:558–564.
- Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Mirangov V. European Network on Carbapenemases. 2012. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect* 18:432–438.
- Cordoglio G, Akova M, Amicante G, Cantón R, Cauda R, Duqueroi J, Edelman M, Frère JM, Fuzi M, Gallati M, Giamarellou H, Gniadkowski M, Koncan P, Lihšch B, Luzzaro F, Miragov V, Navarro E, Nordmann P, Pagani L, Poirel L, Poirel L, Souli M, Taccarelli E, Vatsopoulos A, Rossolini GM, ESCMID Study Group for Antimicrobial Resistance Surveillance. 2007. Metallo-beta-lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. *Int J Antimicrob Agents* 29:380–388.
- Bernauer S, Poirel L, Nordmann P. 2012. Spectrophotometry-based detection of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 74:88–90.
- Griffith D, Poirel L, Nordmann P. 2012. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 50:477–479.
- Burchardt J, Zimmermann S. 2011. Using matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol* 49:3321–3324.
- Hrabák J, Walková R, Studenová V, Chudáková E, Bergerová T. 2011. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 49:3222–3227.
- Pan C, Xu S, Zhou H, Yu Y, Ye M, Zou H. 2007. Recent developments in methods and technology for the analysis of biological samples by MALDI-TOF-MS. *Anal Bioanal Chem* 387:193–204.
- Hrabák J, Studenová V, Walková R, Zemlíková H, Jakubík V, Chudáková E, Gniadkowski M, Pfeifer Y, Perry JD, Wilkinson K, Bergerová T. 2012. 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* 50:2441–2443.
- Mesli E, Tounsi A, Rolin JM. 2012. Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One* 7:e31676. doi:10.1371/journal.pone.0031676.
- Spahrer K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kozarewa M. 2012. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against beta-lactam antibiotics. *J Clin Microbiol* 50:927–937.
- Hoof G, van Kampen JH, Meesters RJ, van Belkum A, Goossens WH, Luder MT. 2012. Characterization of beta-lactamase enzyme activity in bacterial lysates using MALDI-mass spectrometry. *J Proteome Res* 11:79–84.
- Bonini RA, Nas T, Poirel L, Nordmann P. 2012. Phenotypic, biochemical, and molecular techniques for detection of metallo-beta-lactamase NDM in *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 50:1419–1421.
- Kirpekar F, Douthett S, Roepstorff P. 2000. Mapping posttranscriptional modifications in 3S ribosomal RNA by MALDI mass spectrometry. *RNA* 6:296–306.
- Kehrenberg C, Schwarz S, Jacobsen L, Hansen LH, Vester B. 2005. A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and chloramphenicol resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2303. *Mol Microbiol* 57:1064–1073.
- Savic M, Lovric J, Tomić TJ, Vasiljević B, Conn GL. 2009. Determination of the target nucleotides for members of two families of 16S rRNA methyltransferases that confer resistance to partially overlapping

- phing groups of aminoglycoside antibiotics. *Nucleic Acids Res* 37:9750–9759.
- Edwards-Jones V, Claydon MA, Ewson DJ, Walker J, Fox AJ, Gordon DB. 2000. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *J Med Microbiol* 49:295–300.
- Du Z, Yang R, Guo Z, Song Y, Wang J. 2002. Identification of *Staphylococcus aureus* and determination of its methicillin resistance by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* 74:5487–5491.
- Bernardo K, Pakula N, Macht M, Krut O, Seifert H, Fleer S, Hünig F, Krenke M. 2002. Identification and discrimination of *Staphylococcus aureus* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Proteomics* 2:747–753.
- Shah H, Gharbia S. 2010. Mass spectrometry for microbial proteomics. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, United Kingdom.
- Shah HN, Rajakumar L, Ball G, Misra R, Al-Shahb A, Fang M, sub-populations of *Staphylococcus aureus*, using SELDI-TOF mass spectrometry and artificial neural network analysis. *Syst. Appl. Microbiol* 34:81–86.
- Majcherzyk PA, McKenna T, Moreillon P, Vaudaux P. 2006. The discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry to differentiate between isogenic teicoplanin-susceptible and teicoplanin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 255:233–239.
- Dubská L, Pilatová K, Dolejška M, Bortlíček Z, Frostova T, Litenský I, Valík D. 2011. Surface-enhanced laser desorption/ionization-time-of-flight (SELDI-TOF) mass spectrometry (MS) as a phenotypic method for rapid identification of antibiotic resistance. *Antonie L* 444–447.
- Canara JE, Hays FA. 2007. Discrimination between wild-type and antimicrobial-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 389:1633–1638.
- Shumakov R, Knoop N, Gopal GH, Losensky K, Rosenkrantz C, Shiga CS, Stettinberger V, Redford AC, Eschrich K. 2012. A step towards the discrimination of beta-lactamase-producing clinical isolates of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* by MALDI-TOF mass spectrometry. *Med Sci Monit* 18:M171–M177.
- Urbánek T, Hamilton B, Venter DJ. 2012. Use of matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak. *J Clin Microbiol* 50:2918–2931.
- Marshall T, Williams KM. 2002. Proteomics and its impact upon biomedical science. *Br J Biomed Sci* 59:47–64.
- Rodrigues H, Poeta P, Pinto L, Miranda J, Coelho C, Carvalho C, Rodrigues J, López M, Torres M, Vitorino R, Domingues P, Igrejas G. 2010. Proteomic characterization of *nmrA*-containing *Enterococcus* recovered from seagulls at the Berlengas Natural Reserve, W Portugal. *Proteome Sci* 8:48. doi:10.1186/1477-5956-8-48.
- Al-Hariri M, Skoug N, Balken B, Cash P. 2008. Proteomic analysis of ampicillin-resistant oral *Fusobacterium nucleatum*. *Oral Microbiol Immunol* 23:36–42.
- Pinto L, Poeta P, Vieira S, Caleja C, Radhouani H, Carvalho C, Vieira-Pinto Themoio P, Torres C, Vitorino R, Domingues P, Igrejas G. 2010. Genomic and proteomic evaluation of antibiotic resistance in *Salmonella* strains. *J Proteomics* 73:1535–1541.
- dos Santos KV, Diniz CG, de Castro Veloso L, de Andrade HM, da Silva G, da Fonseca Pires S, Santos AV, Apolinário ACM, de Carvalho MAR, de Macedo Farias L. 2010. Proteomic analysis of *Escherichia coli* with experimentally induced resistance to piperacillin/azobactam. *Res Microbiol* 161:268–275.
- Sharma P, Kumar B, Gupta Y, Singhal N, Kanoch VM, Venkatesan K, Bisht D. 2010. Proteomic analysis of streptomycin resistant and sensitive clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteome Sci* 8:59. doi:10.1186/1477-5956-8-59.
- Rogers PD, Vermeij JP, Edling TD, Hillard GM. 2006. Proteomic analysis of experimentally induced azole resistance in *Candida glabrata*. *J Antimicrob Chemother* 58:434–438.
- Davies-Reig A, Bolla JM, James CE, Lavigne JP, Chemtob J, Garnotel E, Molitor A, Pages JM. 2008. Membrane permeability and regulation of
- drug "influx and efflux" in enterobacterial pathogens. *Curr Drug Targets* 9:750–759.
- Drew D, Fröderberg L, Baars L, de Gier JW. 2003. Assembly and overexpression of membrane proteins in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1610:3–10.
- Grobner S, Linke D, Schütz W, Fladerer C, Madlung J, Autenrieth IB, Witte W, Pfeifer Y. 2009. Emergence of carbapenem-non-susceptible extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates at the university hospital of Tübingen, Germany. *J Med Microbiol* 58:912–922.
- Imperi F, Ciccosanti F, Perdomo A, Tiburzi F, Mancone C, Alonzi T, Asenjo P, Piacentini M, Vica P, Fimia GM. 2009. Analysis of the peptidase proteome of *Pseudomonas aeruginosa*: metabolically versatile opportunistic pathogen. *Proteomics* 9:1901–1915.
- Peng X, Xu C, Ren H, Lin X, Wu L, Wang S. 2005. Proteomic analysis of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of *Pseudomonas aeruginosa* responding to ampicillin, kanamycin, and tetracycline resistance. *J Proteome Res* 4:2257–2265.
- Xu G, Lin X, Ren H, Zhang Y, Wang S, Peng X. 2006. Analysis of outer membrane proteome of *Escherichia coli* related to resistance to ampicillin and tetracycline. *Proteomics* 6:462–473.
- Tran AX, Lester ME, Stead CM, Raetz CRH, Maskell DJ, McGrath SC, Cotter RJ, Trent MS. 2005. Resistance to the antimicrobial peptide polymyxin requires myristoylation of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* lipid A. *J Biol Chem* 280:28186–28194.
- Yi EC, Hackett M. 2000. Rapid isolation method for lipopolysaccharide and lipid A from Gram-negative bacteria. *Analyst* 125:651–656.
- Conti SK, To TT, Jain S, Brabant PH, Darveau RP. 2009. *Porphyromonas gingivalis* resistance to polymyxin B is determined by the lipid A 4'-phosphate. *PGN* 5:24. doi:10.1186/1475-2875-5-24.
- Becetto A, Liebet E, Arruda J, Bengoechea JA, Doumleth M, Horsey M, Dhanji H, Chert H, Gow R, Livermore DM, Woodford N. 2011. Phage holin-mediated modification of lipid A in colistin-resistant variants of *Acinetobacter baumannii* mediated by the pmrAB two-component regulatory system. *Antimicrob Agents Chemother* 55:3370–3379.
- Cai JC, Hu Y, Zhang R, Zhou HW, Chen GX. 2012. Detection of OmphK porin loss in *Klebsiella* spp. by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 50:2179–2182.
- Puech W, Wurmbsch JH, Thiele H, Kozarewa M. 2002. MALDI-TOF mass spectrometry-based SNP genotyping. *Pharmazie* 57:547–548.
- Strebberg E, Müller S. 2006. Detection and genotyping of HIV beta-lactamase variants by mass spectrometry after base-specific cleavage of in vitro-generated RNA hairpins. *J Clin Microbiol* 44:909–915.
- Bayramkhanov LN, Shidlov EA, Zhilutskova DG, Iltina EN, Edelman MV, Govorun VM. 2008. MALDI-TOF MS-based missequencing method for rapid detection of TEM-type extended-spectrum beta-lactamases in clinical strains of *Enterobacteriaceae*. *J Microbiol Methods* 75:385–391.
- Larionova EE, Shumakov TG, Chernousova LN, Govorun VM. 2007. Mass spectrometry based missequencing method for the rapid detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Microbiol Methods* 70:395–405.
- Wang H, Yue J, Zhang L, Xu Y, Chen J, Zhang M, Zhu B, Wang H, Wang H. 2007. A newly identified 191A/C mutation in the *Rv2629* gene that was significantly associated with rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Proteome Res* 6:4564–4571.
- Malakhova MV, Veshchagin VA, Iltina EN, Govorun VM, Zubkov MM, Pripitnevich TV, Kisina VI, Kubanova AA. 2006. Analysis of genetic markers of *N. gonorrhoeae* resistance to beta-lactam antibiotics. *Exp Biol Med* 141:1610–1615.
- Borovskaya AD, Malakhova MV, Veshchagin VA, Iltina EN, Govorun VM, Pripitnevich TV, Al-Hafagi N, Kubanova AA. 2007. Analysis of the contribution of molecular mechanisms into formation of gonococcal resistance to tetracycline. *Bull Exp Biol Med* 144:432–437.
- Iltina EN, Malakhova MV, Veshchagin VA, Govorun VM, Pripitnevich TV, Kubanova AA. 2007. Direct evaluation of drug resistance parameters in gonococci. *Bull Exp Biol Med* 144:227–230.
- Malakhova MV, Veshchagin VA, Iltina EN, Govorun VM, Filimonova OG, Gudrina SA, Sidorova SV. 2007. MALDI-TOF mass spectrometry in analysis of genetically determined resistance of *Streptococcus pneumoniae* to fluorquinolones. *Antibiot Khimioter* 52:10–17.
- Savinova TA, Iltina EN, Sidorova SV. 2010. A mass-spectrometric

- analysis of genetic markers of *S. pneumoniae* resistance to beta-lactam antibiotics. *Mol. Gen. Microbiol. Virol.* 3:16–25.
74. Shen J, Deng DJ, Ke Y, Zhang JZ. 2008. Detection of point mutation in an *in vitro*-selected amoxicillin-resistant strain of *Helicobacter pylori*. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 29:166–172.
75. Penno MAS, Ernst M, Hoffmann P. 2009. Optimal preparation methods for automated matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry profiling of low molecular weight proteins and peptides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23:2656–2662.
76. Li X, Wu X, Kim JM, Kim SS, Jin J, Li D. 2009. MALDI-TOF-MS analysis of small molecules using modified mesoporous material SBA-15 as assisted matrix. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 20:2167–2173.
77. Lin P-C, Tseng M-C, Su A-K, Chen Y-J, Lin C-C. 2007. Functionalized magnetic nanoparticles for small molecule isolation, identification, and quantification. *Anal. Chem.* 79:3401–3408.
78. Werno AM, Christian M, Anderson TP, Murdoch DR. 2012. Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* from nonpneumococcal streptococci of the *Streptococcus mitis* group by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 50:2863–2867.

Jaroslav Hrabák, Ph.D., is Assistant Professor of Microbiology at the Faculty of Medicine in Pízen, Charles University in Prague, Pízen, Czech Republic, and a collaborator of the National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic. His research in the field of antimicrobial resistance is focused mainly on carbapenemase-producing enterobacteria and *Pseudomonas* spp. and the use of MALDI-TOF MS in microbiology.



Radka Walková, M.D., graduated in general medicine at the Faculty of Medicine in Pízen and works as a clinical microbiologist at the University Hospital Pízen. She has been working on research in the field of bacterial resistance to antibiotics, focused on the use of MALDI-TOF MS.



Eva Chudáková, M.D., is a Ph.D. student at the Faculty of Medicine in Pízen, Charles University in Prague, Pízen, Czech Republic, where she graduated in general medicine. She works as a clinical microbiologist at the University Hospital Pízen. Her research interests include carbapenem resistance in enterobacteria, focused on resistant carbapenemase-nonproducing isolates.



Downloaded from <http://cmr.asm.org/> on May 17, 2013 by guest

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry for Detection of Antibiotic Resistance Mechanisms: from Research to Routine Diagnosis

Jaroslav Hrabák, Eva Chudáčková, Radka Walková

Ústav mikrobiologie, Lékařská fakulta a Fakultní nemocnice v Plzni, Univerzita Karlova v Praze, Plzeň, Česká republika

Shrnutí	103
Úvod	103
Požadavky na detekci mechanismů rezistence	103
Detekce enzymatické aktivity pomocí MALDI-TOF MS	104
Přímá detekce β -laktamázové aktivity	104
Detekce rRNA metyltransferázové aktivity	106
Přímá MALDI-TOF MS analýza bakteriálního extraktu	106
Detekce MRSA	107
Detekce β -laktamázy	107
Detekce vankomycin-rezistentního <i>Enterococcus</i> sp.	107
Proteomický přístup	107
Aplikace proteomické analýzy	108
Závěr	108
Analýza složek buněčné stěny	108
Minisekvencování	109
Budoucí perspektiva	109
Závěr	111
Poděkování	112
Reference	112

Shrnutí

MALDI-TOF MS (Ionizace a desorpce látek laserem za účasti matrice – doba letu) hmotnostní spektrometrie byla úspěšně aplikována jako identifikační postup v klinické mikrobiologii a je hojně používána v rutinní laboratorní praxi kvůli svým ekonomickým a diagnostickým výhodám. Rozsah použití MALDI-TOF MS neustále roste, počínaje rychlou druhovou identifikací a konče intenzivními laboratorními proteomickými studiemi bakteriální fyziologie. Cílem tohoto přehledu je shrnout informace, které již byly zveřejněny v souvislosti s MALDI-TOF MS a antibiotickou rezistencí a analyzovat budoucí pohledy v této oblasti. Jsme přesvědčeni, že současný výzkum by měl pokračovat ve 4 hlavních směrech, včetně detekce antibiotických modifikací degradací enzymů, detekce determinací mechanismů rezistence, přes proteomické studie multirezistentních bakterií a analýzy modifikací cívových lokalit, jako je ribozomální metylace. Kvantifikace antibiotik je pokládána za nový přístup studia influxu a effluxu bakteriálních buněk. Výsledky prezentované studie demonstrují MALDI-TOF MS jako relevantní nástroj pro detekci antibiotické rezistence a otevírají nové cesty pro klinickou i experimentální mikrobiologii.

Úvod

Ionizace a desorpce látek laserem za účasti matrice – doba letu (MALDI-TOF) hmotnostní spektrometrie (MS) byla poslední dobou představena mnoha mikrobiologickým laboratorům pro rutinní identifikaci bakterií a vláknitých hub. Ačkoli počáteční náklady na pořízení hmotnostního spektrometru jsou relativně vysoké, náklady na identifikaci jednoho druhu jsou

nízké v porovnání s náklady standardních biochemických nebo molekulárně-genetických technologií. Použití MALDI-TOF MS zkracuje diagnostický proces o přibližně 24 hodin (1,2).

Poslední dobou byly popsány jiné aplikace, které se zaměřují na detekci mechanismů antibiotické rezistence. Tyto metody mohou hrát důležitou roli v aplikacích hmotnostní spektrometrie v diagnostických mikrobiologických laboratořích. Záměrem tohoto přehledu je shrnout informace, které již publikovány byly a analyzovat budoucí pohledy na MALDI-TOF MS v oblasti detekce mechanismů antibiotické rezistence.

Požadavky na detekci mechanismů rezistence

Rezistence bakterií k antibiotikům se v posledních letech zvyšuje. Rezistentní bakterie mohou významně zkomplikovat léčbu infekcí u kriticky nemocných pacientů, zejména pacientů na odděleních chirurgie, hemat-onkologie a jednotkách intenzivní péče (3,4). Bakteriální izoláty, které jsou rezistentní na všechna dostupná antibiotika, již také popsána byla (5,6).

Bakterie mohou odolávat účinku antibiotik pomocí následujících mechanismů: produkci enzymů, které inaktivují molekuly antibiotik (např. β -laktamázy a aminoglykosid modifikované enzymy) (7-9), hyperprodukci nebo produkci nových odtokových pump nebo jinými změnami v buněčné stěně (např. porinové alterace) (10), mutacemi cílových genů (např. v ribozomálních proteinových nebo genech, které kódují proteiny vázající penicilin [PBPs] (8, 9, 11), spojkou metabolických drah (např. exprese druhových PBPs s nízkou afinitou vůči molekulám antibiotik) (11), a produkci proteinů, které chrání cílovou oblast (např. rezistence k chinolonům zprostředkovaná *Qnr*) nebo modifikovaných enzymů cílové oblasti (12).

V některých případech je detekce mechanismů rezistence doplněkem standardního postupu testování citlivosti s důrazem na kategorizaci izolátu jako rezistentního, hraničního nebo citlivého (13). Rychlá determinace mechanismu rezistence může také hrát klíčovou roli v primárním výběru antibiotické terapie (14, 15). Detekce kmenu meticilin-rezistentního *Staphylococcus aureus* (MRSA) nebo karbapenemáza-produkujících enterobakterií (CPE) je nezbytná pro prevenci přenosu těchto bakterií (16, 17).

Proto potřebují rutinní mikrobiologické laboratoře u některých bakterií rychlé a spolehlivé metody pro detekci mechanismů rezistence, které poskytnou informace důležité pro volbu správné, primární antibiotické terapie a poskytnou data pro odborníky z oblasti kontroly infekce při sestavování systému zdravotní péče.

MALDI-TOF MS analýza může být nejlépe aplikována při analýze všech možných mechanismů rezistence. Postupy, které již byly publikovány, jsou založeny na následujícím: analýza molekulárního DNA metylace a detekce mutací s minisekvencováním. U některých z těchto aplikací, MALDI-TOF MS poskytuje výsledky, které mohou být použity pro diagnostiku, zatímco některé z těchto metod jsou užitečné pouze pro referenční centra a výzkumné laboratoře.

Detekce enzymatické aktivity pomocí MALDI-TOF MS

Přímá detekce β -laktamázové aktivity

Nejčastějším mechanismem rezistence β -laktamů je hydrolyza amidu vázaného na β -laktamový kružek (Fig. 1). Produkt degradace hydrolyzy ukazuje molekulární hmotu odlišnou od přirozené molekuly. Některé β -laktamy jsou po hydrolyze dekarboxylovány s výsledkem další změny v molekulární hmotnosti. V závislosti na aktivní struktuře (active-site) se β -laktam dělí do dvou skupin: serinové enzymy (molekulová třída A, C a D) a metaloenzymy (třída B) (7, 18, 19). Velice dlouhou dobu byla třída A β -laktamů nejčastější skupinou (např. TEM, SHV, CTX-M). Momentálně se stala důležitou skupinou B β -laktamů (metalo- β -laktamázy) díky své schopnosti hydrolyzovat karbapenamázy. Geny

kódující metalo-β-laktamázy byly prvně rozšířeny mezi *Pseudomonas* spp., ale poslední dobou jsou rozšířeny mezi členy *Enterobacteriaceae* napříč světem. Toto rozšíření je v současné době následováno skupinou *Enterobacteriaceae* produkující A karbapenemázy (např. KPC a GES) (20).

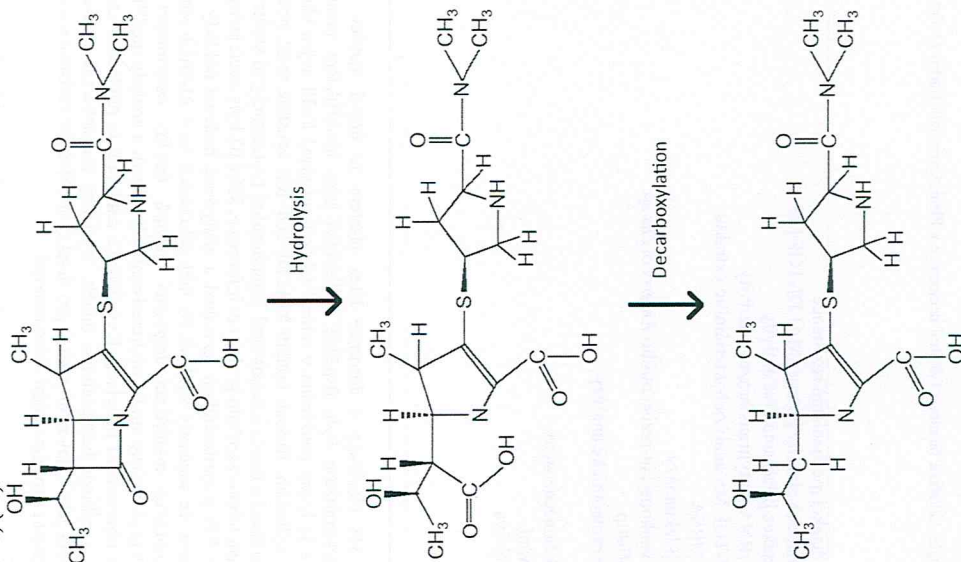


FIG 1 Meropenem a jeho degradace β-laktamázi.

Rychlá detekce klinicky důležitých β-laktamáz (např. rozšířené spektrum β-laktamáz a karbapenemáz) v rutinních diagnostických laboratořích může být zásadní pro primární antibiotickou terapii specifických pacientů stejně tak, jako pro prevenci šíření bakterií produkujících β-laktamázu při sestavování systému zdravotní péče (21).

V rutinních laboratořích byly představeny tři hlavní postupy /přístupy. Nejžnější techniky jsou založeny na schopnosti specifických inhibitorů inhibovat některé β-laktamázy (např. klavulanová kyselina pro rozšířené spektrum β-laktamáz, amino-fenylboroniková kyselina pro KPC-typ karbapenemázy a etylidiamin tetraoctová kyselina pro metalo-β-laktamázy). Inhibice β-laktamáz může být sledována syngiicky při použití metody diskové difúze, metody bujnové diluce nebo speciálního Etestu, který obsahuje antibiotikum, které má být testováno, společně s inhibitorem (6). Molekulárně-genetické techniky (např. PCR a microarrays) jsou běžné při rychlé detekci některých β-laktamáz a mohou detekovat geny β-laktamáz přímo z klinického vzorku. V současné době bylo popsáno mnoho různých β-laktamáz. Proto je velmi obtížné doporučit univerzální primery pro detekci nejméně jedné skupiny β-laktamáz. Navíc, negativní výsledek by neměl být interpretován jako nepřítomnost β-laktamáz. Přímá metoda používaná v referenčních laboratořích je založena na spektrofotometrické detekci hydrolyzy β-laktamu při použití buněčného extraktu β-laktamáz. Tato metoda je laboratorně náročná a nemůže být rutinně používána ve většině diagnostických laboratořích (22, 23). Další metodou pro přímou detekci karbapenemáz je Hodge test, který může být rutinně používán. Jeho interpretace, senzitivita a specifita, nicméně, může být obtížná (24).

V září 2011 byly zveřejněny první dvě studie, které se týkaly přímé detekce karbapenemáz pomocí MALDI-TOF MS (25, 26).

Analýzy antibiotik a produkty jejich degradace, které jsou menší než 1 000 Da, je možné detekovat MALDI-TOF MS pomocí specifické přípravy vzorku (27). Protože matrice je ve spektru také viditelná, detekovaná molekula by měla mít signifikantně rozdílnou hmotu. Například, bod, který reprezentuje neporušenou molekulu meropenemu, může být pozorován při rozlišení 384,5 m/z. Dimér α-cyano-4-hydroxyisokorické kyseliny (CHCA), běžná matrice používaná pro identifikaci bakterií a vláknitých hub, je odcitána v rozlišení 380 m/z. Bod matrice má obvykle větší intenzitu než meropenem, a proto body meropenemu a sodíkových solí meropenemu, které jsou produkty dekarboxylační degradace meropenemu, nejsou čistě viditelné ve spektru. Proto musí být zvolen jiný typ matrice.

Detekce β-laktamázové aktivity se provádí pomocí téměř stejné metodologie, která je publikována ve všech pracích. Čerstvá bakteriální kultura, většinou narostlá přes noc, se suspenduje v pufru a centrifuguje. Pelet se pak resuspenduje v reakčním pufru, který obsahuje β-laktamovou molekulu. Po inkubaci při 35° C po dobu 1-3 hodin, se reakční směs centrifuguje a supernatant se smíchá s příslušnou matricí pro změření MALDI-TOF MS (Fig. 2).

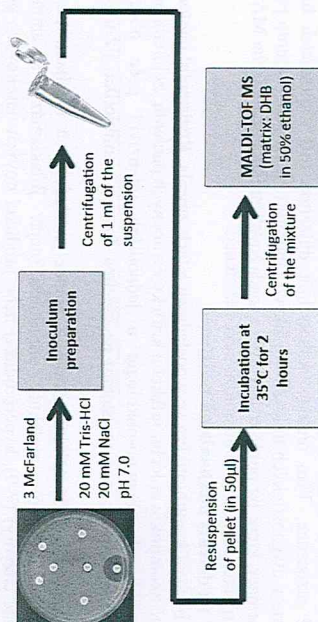
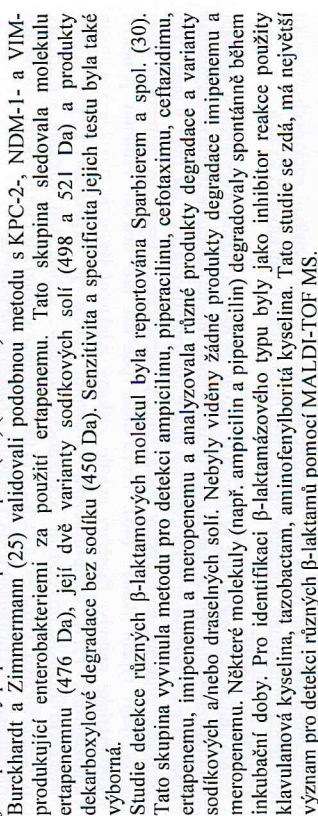


FIG 2 Průběh hydrolyzy při detekci karbapenemáz. Test je založen na metodě reportované Ing. Hrabákem a spol. (28). DHB, dihydrobenzooxová kyselina.

Následně jsou analyzována spektra obsahující body, které reprezentují β-laktamovou molekulu, její soli (většinou sodíkové soli), a/nebo produkty jejich degradace. Ve studii,

ppneumoniae, *Enterobacter cloacae* a *Serratia marcescens*) a 35 karbapenemázum neprodukujících izolátů. Tato metoda byla také schopna detekovat NDM-1-karbapenemázum v *Acinetobacter baumannii* izolátech (28). Dle našich zkušeností může být v tomto species také jednoduše detekován OXA-typ karbapenemáz (J.Hrabák, nepublikovaná data), podobně jako poznatky popsané Kempfem a spol. (29) (viz. níže).



Burckhardt a Zimmermann (25) validovali podobnou metodu s KPC-2-, NDM-1- a VIM-1-deriváty pro produkci enterobakteriemi za použití enterapenemu. Tato skupina sledovala molekulu enterapenemu (476 Da), její dvě varianty sodíkových solí (498 a 521 Da) a produkty dekarboxylové degradace bez sodíku (450 Da). Sensitivita a specifita jejích testů byla také výborná.

Studie detekce různých β -laktamových molekul byla reportována Sparbierem a spol. (30). Tato skupina vyvinula metodu pro detekci ampicilinu, piperacilinu, cefotaximu, cefazidimu a enterapenemu, imipenemu a meropenemu a analyzovala různé produkty degradace a varianty sodíkových a/nebo draselných solí. Nebyly viděny žádné produkty degradace imipenemu a meropenemu. Některé molekuly (např. ampicilin a piperacilin) degradovaly spontánně během inkubační doby. Pro identifikaci β -laktamázového typu byly jako inhibitor reakce použity klavulanová kyselina, tazobactam, aminofenylboritá kyselina. Tato studie se zdá, má největší význam pro detekci různých β -laktamů pomocí MALDI-TOF MS.

V současné době byly validovány další dvě studie pro MALDI-TOF MS detekci karbapenemáz (29, 31). Kempf a spol. použili jako indikátor imipenem. Testovali 3 karbapenemázy produkující izoláty *Klebsiella pneumoniae* (KPC a NDM-1), 4 izoláty *Pseudomonas aeruginosa* (VIM a IMP) a 63 OXA-23- a/nebo OXA-24-produkující izoláty *Acinetobacter baumannii*. Imipenem (300 m/z) a produkty jeho degradace (254 m/z) byly detekovány použitím CHCA matrice a AnchorChip destičky (Bruker Daltonik GmbH, Brém, Německo). Po dvou hodinách inkubace bylo správně detekováno 67 ze 70 karbapenemáz-produkujících izolátů a nebyl nalezen žádný falešně pozitivní výsledek. Prodloužení inkubační doby na 4 hodiny umožnilo správnou identifikaci všech producentů karbapenemáz. Práce této skupiny se těší velickému zájmu, protože OXA-typ karbapenemáz u *Acinetobacter baumannii* není možno jednoduše pomocí testu hmotnostní spektrometrie detekovat (32).

Jiný způsob přípravy vzorku pro detekci β -laktamázové aktivity byl zveřejněn Hooftem a spol. (31). Tato skupina použila bezbuněčné lysát a MALDI-TOF a MALDI-triple (QoQ) kvadrupolový přístroj. Prezentovaná data v jejich zprávě jasně ukazují na schopnost metody detekovat různé β -laktamové molekuly (penicilin G, ampicilin, cefotixim a imipenem) a možnou inhibici klavulanovou kyselinou a kromě toho zveřejňují reprodukovatelnost testu. Všechny zveřejněné studie, které popisují přímou detekci β -laktamázové aktivity, nezávisle prezentovaly podobné výsledky a umožnili nám usuzovat, že tento metodický přístup má velký potenciál, aby se mohl stát rutinní metodou pro detekci těchto enzymů, která je porovnatelná s referenčními testy spektrofotometru. (26). Manuální měření a analýzy hřejících spekter, nicméně, můžou být obtížná pro mikrobiology, kteří nejsou odborníky v oblasti hmotnostní spektrometrie. Proto by měl být pro diagnostické laboratoře k dispozici speciální software pro automatickou akvizici a interpretaci výsledků. Další nevýhodou metody je potřeba čerstvé kultury pro provedení analýzy. Detekce karbapenemázové aktivity přímo z klinického vzorku bez pomnožení ve specifickém kultivačním médiu může být obtížná a možná neproveditelná.

Detekce rRNA metyltransferázové aktivity

Metylace rRNA srovnává rezistenci inhibitorů proteinové syntézy, jako jsou aminoglykosidy, chloramfenikol a klindamycin (9). Kirpekar a spol. (33) vyvinuli metodu pro detekci modifikací včej rRNA pomocí MALDI-TOF MS. Tato metoda byla později použita k analýze metylace 23S rRNA produktem *cfr* genu, který je odpovědný za rezistenci na chloramfenikol,

florfenicol a klindamycin (34). Detekce metyltransferázové aktivity odpovědné za rezistenci na aminoglykosidy způsobené metylací 16S rRNA byla popsána Savicem a spol. (35). V této analýze, nicméně, bylo nutné použít purifikované ribozomy a purifikované enzymy. Po reakci ve speciálním pufru byla rRNA natrávena specifickou RNasou, což vedlo ke vzniku menších produktů, které byly poté analyzovány MALDI-TOF MS, aby se detekovala metylace molekuly (která způsobuje nárůst hmoty o 14 Da). Tato metoda je použitelná pro analýzu metyltransferáz, ale neměla by být zjednodušována pro použití v rutinních diagnostických technikách nebo referenčních centrech.

Přímá MALDI-TOF MS analýza bakteriálního extraktu

Pro rychlou detekci určení citlivosti by bylo užitečné najít postup, který by byl srovnatelný s identifikací mikrobů pomocí MALDI-TOF MS. Nicméně, do této chvíle bylo publikováno pouze několik článků, které byly zaměřeny na vývoj takovýchto technik. Někteří výzkumníci použili přípravu vzorku podobnou přípravě při bakteriální identifikaci, ale většina jich neměla úspěch. Jsme přesvědčeni, že je třeba pro detekci markerů rezistence použít specifický způsob přípravy vzorku nebo podmínky měření (např. selektivní proteinovou extrakci). V následujícím oddíle je přehled již dříve uveřejněných dat pro metilcin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), β -laktamázy a vankomycin rezistentní enterokoky.

Detekce MRSA

První studie rozlišení mezi metilcin citlivým *S. aureus* (MSSA) a MRSA kmeny byla uveřejněna Edwards-Jonesem a spol. v roce 2000 (36). Kmeny byly analyzovány pomocí MALDI-TOF MS při použití intaktních bakteriálních buněk a 5-chloro-2-merkaptobenzotiazolu jako matrice. Tito autoři byli schopni detekovat celkem 14 MRSA-specifických bodů (např. 511, 563, 640, 1 165, 1 229 a 2 127 m/z) a 2 MSSA-specifické body (2 548 a 2 647 m/z) v rozmezí 511 – 2 127 m/z a 2 548 – 2 647 m/z, respektive. Sedm jiných *S. aureus*-specifických bodů (např. 525, 617, 798 a 826 m/z) bylo detekováno také. Podobné výsledky byly zveřejněny Duem a spol., také úspěšně odlišili MRSA a MSSA (37). V roce 2002 Bernardo a spol. (38) nenalezli žádnou korelaci mezi MRSA a MSSA profily, ale demonstrovali reprodukovatelnost získaných spekter, což umožnilo použití této metody pro hledání nosokomiálních epidemii. Na rozdíl od Edwards-Jones a spol. (36) použili Bernardo a spol. pro analýzu bakteriální lyzát.

Selektivní navázání proteinu na terčik v MALDI-TOF MS při použití ProteinChip matice je doporučeno u laserové desorpce a ionizaci látek při zvětšení povrchu – doba letu (SELDI-TOF MS) (39, 40). Shah a spol. (40) použili tuto metodu pro detekci MRSA a úspěšně identifikovali 7 iontů, které umožnily rozlišení MRSA (n=49) a MSSA (n=50) kmenů. Bakterie byly rozpuštěny ve specifickém lyzačním roztoku, mechanicky rozrušeny, a pak zmrazeny a rozmrazeny. Pro detekci SELDI-TOF po centrifugaci byl použit supernatant. Byly detekovány body 3 081, 5 893 a 9 580 Da u MSSA kmenů a body 5 709, 7 694 a 15 308 a 18 896 Da u MRSA kmenů. Téměř všechny kmeny (97 z 99 kmenů) byly správně rozlišeny jako MRSA nebo MSSA. Pro rutinní práci je příprava vzorku takto specifickým způsobem obtížná. Nicméně pokud porovnáme tuto techniku se standardní PCR detekcí, laboratorní náročnost je minimální.

Majcherzyk a spol. (41) popsali diferenciaci mezi isogenicky teicoplanin-citlivými a teicoplanin-rezistentními metilcin-rezistentními kmeny *S. aureus*. U MALDI-TOF MS byl zjištěn kvalitní rozlišovací potenciál ve srovnání s pulsní gelovou elektroforézou (PFGE) nebo peptidoglykan mureopeptidovými zpracovávajícími modely.

Pro použití v rutinní diagnostice musí být výše zmíněné testy ještě dále validovány.

Detekce β -laktamázy

Technika SELDI-TOF MS byla také použita pro rozlišení mezi *Escherichia coli* kmeny obsahující různé geny rezistence (např. *bla*_{CTX-M-12}, *bla*_{SHV-12}, *bla*_{TEM}, *cat*, *strA*, *sul1*, *sul2*, *tetB*, *dhfr1* a *aadA1*) (42). V článku bylo prezentováno, že pomocí této metody byli

autoři studie schopni rozlišit mezi bakteriálními species, ale ne specifické body nebo profily, které by umožnily detekci některých markerů rezistence.

Camara a Hays (43) uveřejnili studii, která se zaměřila na detekci specifických-laktamázových bodů pro ampicilin-rezistentní *Escherichia coli* kmeny. Po kultivaci rezistentních kmenů v Luria-Bertani bujónu, který byl obohacen ampicilinem a proteiny, byla provedena extrakce za použití roztoku mravenčí kyseliny, isopropyl alkoholu a vody a provedeno nanesení na terčik MALDI-TOF MS destičky sendvičovou metodou při použití kyseliny sinapové jako matrice. Ve spektru byl úspěšně detekován bod asi 29 kDa, který reprezentoval β -laktamázu. Tito autoři si všimli, že tento bod nebyl detekovatelný při bakteriální identifikaci celých buněk nebo při použití jiné matrice (2,5-dihydroxyacetophenone ferulic acid a 2,5-dihydroxybenzoová kyselina). Protein 29 kDa byl pak detekován dodecyl sulfate-polyakrylamidovou gelovou elektroforézou (SDS-PAGE) a kapalinovou chromatografií-MS lhotnostního fingerprintingu jako β -laktamázy. Pokud je nám známo, toto je první a poslední zpráva, která představuje přímou detekci β -laktamáz v hmotnostním spektru bakteriálního lyzátu.

Nedávno Schaumann a spol. (44) vyzkoušeli determinaci mezi β -laktamáza-produkujícími a – neprodukujícími *Enterobacteriaceae* a *Pseudomonas aeruginosa* izoláty. Vzorky byly extrahovány pomocí trifluoroctové kyseliny a acetonitrilu. Ačkoli tyto výzkumníci získali čistá a reprodukovatelná spektra, nebyli schopni najít rozdíl mezi β -laktamáza producenty a neproducenty. Nebyl detekován žádný β -laktamáza specifický bod. Nicméně, měření v rozmezí 2 000 – 12 000 m/z, se zdálo být nižší než je předpokládaná molekulová hmotnost β -laktamáz (>27 kDa).

Detekce vankomycin-rezistentního *Enterococcus* sp.

V současné době zveřejněná studie, která byla provedena Griffinem a kolegy (45) demonstrovuje schopnost MALDI-TOF MS odlišit *vanB*-pozitivní *Enterococcus faecium* od izolátů, které neobsahují tento rezistentní gen, který je zodpovědný za rezistenci ke glykopeptidům. V této jamkové studii bylo použito 67 *vanB*-pozitivních *Enterococcus faecium* izolátů. Senzitivita a specifita testu byla 96,7% a 98,1%, respektive. Bylo také ukázáno, že tato metoda je schopna indikovat vztah *Enterococcus faecium* kmenů ke stupni, který je podobný existujícímu zlatému standardu pro vztahovou analýzu, PFGE (45). Mělo by být řečeno, že pro tato měření MALDI-TOF MS byla použita standardní metoda extrakce kyselinou mravenčí. Autoři této studie si všimli, že přímá aplikace některých G+ bakterií (včetně enterokoků) na terčik bez extrakce nemůže být věst k získání správných výsledků díky síle peptidoglykanu v buněčné stěně, která nedovolí správnou akvizici spektra.

Proteomický přístup

Výzkum antibiotické rezistence se zaměřuje hlavně na detekci specifických genů a srovnání izolátů pomocí molekulárně-genetických technik. Nicméně, proteomické studie poskytují data v rámci genové exprese a nezaměřují se pouze na jednotlivé geny. Jak bylo v roce 1995 definováno, proteom je „veškerý PROTEINOVÝ komplement vyjádřený genomem nebo buňkou nebo typem tkáně“ (46). Proteomika používá pro detekci proteinů primárně elektroforetické metody. Buněčný extrakt získaný selektivní lyzou je obvykle separován dvourozměrnou (2D) elektroforézou. V prvním kroku je separován extrakt podle isoelektrického bodu při použití isoelektrické fokuse a pak jsou proteiny separovány pomocí SDS-PAGE (46). Na obrázku 4 je uvedena jako příklad 2D elektroforetická separace peroplasmických a cytoplasmických proteinů *Klebsiella pneumoniae*.

Mapa proteinů je porovnávána s databází pomocí specifického softwaru. Proteiny, které nás zajímají, mohou být identifikovány pomocí fingerprintingu peptidové hmoty a/nebo sekvenčováním aminokyselin (39, 46). Identifikace proteinů je běžně prováděna pomocí MALDI-TOF MS nebo MALDI-tandem TOF (MALDI-TOF/TOF) MS (39). Nevýhodou

těchto technik je jejich pracovní náročnost a skutečnost, že exprese proteinů může být závislá na kultivačních podmínkách (47).

Aplikace proteomické analýzy

Radhouani a spol. reportoval proteomickou charakteristiku vankomycin-rezistentních *Enterococcus* sp. izolátů mořských racků. Tato skupina provedla separaci proteinových extraktů získaných sonikací bakterií pomocí SDS-PAGE a 2D elektroforézou pomocí bodové identifikace, která byla následována MALDI-TOF MS identifikací proteinů. Tito výzkumníci identifikovali devět proteinů, které měly spojitost s rezistencí k tetracyklinu a proteinu spojeném se schopností bakterie tvořit biofilm. Vankomycin-tetocoplanin A-typ rezistentní protein *vanA* byl také detekován u *Enterococcus durans*.

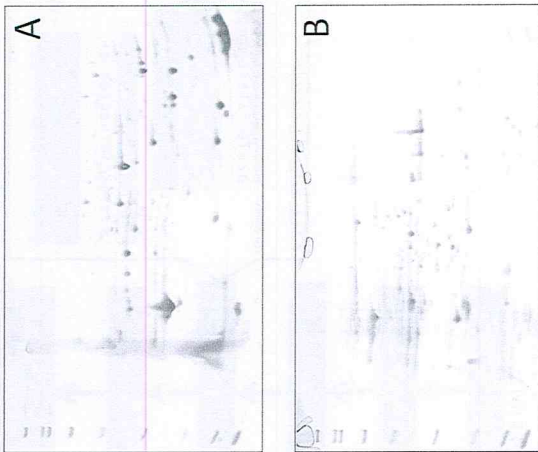


FIG 4. Příklad dvourozměrné elektroforetické separace extraktů *Klebsiella pneumoniae*. (A) Proteiny extrahované z periplasmického prostoru pomocí metody se sacharózou; (B) proteiny získané z cytoplasmny sonikací.

Studie, která se zaměřila na analýzu proteomů ampicilin-rezistentního *Fusobacterium nucleatum*, byla uveřejněna Al-Haronim a kolegy (48). Bakterie byly resuspendovány v lyzačním pufru a mechanicky roztřeseny. Tento hrubý extrakt byl použit pro 2D elektroforetickou separaci, která byla následována identifikací na terčiku. U rezistentních izolátů, byla identifikována třída D β -laktamáz se 29 kDa, 37-kDa ATP-binding cassette (ABC), transportér ATP-binding protein a 46-kDa enoláza.

Tři další studie (49-51) použily MALDI-TOF MS po SDS-PAGE analýze pro proteinovou identifikaci rezistentní *E. coli*, *Salmonella enterica* a *Mycobacterium tuberculosis* kmenů. Vše v těchto skupinách bylo identifikováno rozdíly na úrovni proteinové exprese mezi citlivými a rezistentními izoláty.

Proteomický přístup při analýze flukonazol-rezistentních *Candida glabrata* kmenů byl popsán Rogerem a kolegy (52). Mechanicky roztřesli buňky a separovali proteiny 2D elektroforézou. Membránové proteiny připravili selektivním postupem, kdy byly separovány pouze metodou

SDS-PAGE. Tato skupina identifikovala několik proteinů a rozdíly v hladině jejich exprese, které mohou mít souvislost s rezistencí k azolům. Další analýzy byly provedeny proto, aby demonstrovaly reálnou aktivitu těchto proteinů.

Závěr

Proteomická analýza je velmi silným nástrojem, který se používá při analýze metabolických způsobů u prokaryotických a eukaryotických buněk. Tento proces poskytuje ucelenější data než studie, využívající exprese jednoho genu nebo cluster genů. Především zprávy demonstrovaly možnost použití této techniky pro determinaci mechanismů rezistence. U nových proteinů, které jsou identifikovány jako potenciální pomocník antibiotické rezistence, by měla být jejich funkce zjišťována geneticky (např. genovou delecí nebo klonováním).

My nevěříme, že tato technika může být používána pro detekci mechanismů antibiotické rezistence v rutinních diagnostických laboratořích, ale může zkompletovat molekulárně genetické techniky ve výzkumných laboratořích až do doby, kdy plně genomové sekvenování a jeho interpretace bude plně rozšířeno a rychlé.

Analýza složek buněčné stěny

Na důležitost buněčné stěny u antibiotické rezistence je upozorňováno, protože faktem je, že více jak polovina cflů současných antimikrobiálních látek je lokalizována v buněčném obalu. Jiná antibiotika musí překonat bariéru buněčné stěny, aby se dostala ke svému cíli v cytosolu (10, 53, 54). Proteomika a genomové studie vnější membrány G- bakterií indikují, že komplexní systém buněčných komponent (poriny, odtokové pumpy a lipopolysacharidy, atd.) jsou odpovědné za antibioplickou rezistenci prostřednictvím regulace přítoku a odtoku různých antibiotik (53).

MALDI-TOF MS fingerprinting, které je následováno SDS-PAGE nebo 2D elektroforézou, jak již bylo popsáno, se používají pro identifikaci vnější membrány a periplasmatických proteinů, u kterých se hladina exprese liší u rezistentních izolátů a souvisí s korespondujícími citlivými izoláty (55-58). Takováto, na práci náročná proteomická studie, je použitelná pro stavbu komplexní databáze bakteriálních proteinových fingerprintů pro komparativní studii, která poskytuje pohled do funkce rozlišených buněčných složek při antibiotické rezistenci (MASCOT, Matrix Science).

Použití MALDI-TOF MS není limitováno proteomikou buněčné stěny. Dalším příkladem možné aplikace je detekce strukturálních změn lipopolysacharidů. Ztráta negativního náboje lipidu A díky postsyntetické modifikaci je speciálně spojena s rezistencí přes kationtové antimikrobiální peptidy jako jsou polymyxiny (např. colistin) (59). U MALDI-TOF MS analýzy může být extrahován lipopolysacharid z buněčné stěny specifickým postupem, jako je fenolová metoda za tepla (60). U této metody je lipopolysacharid rozpuštěn ve vodě, která je saturována fenolem a pak je precipitován. Vzorky jsou pak přerušeny příslušnou maticí na terčiku a analyzovány. Modifikace struktury lipopolysacharidů (např. ztráta řetězce mastných kyselin díky neredukujícím cukrům) způsobuje změny molekulární hmotnosti detekovatelné MALDI-TOF MS: V dříve uveřejněných pracích byly vzorky většinou měřeny v negativním režimu. Tento režim, nicméně, není obvykle dostupný na přístrojích v diagnostických laboratořích. Změny lipidu A, které jsou způsobeny 4'-fosfátázou u kolistin-rezistentní *Pseudomonas gingivalis*, byly sledovány Coatssem a spol. (61) jako změna molekulové hmotnosti a fosfoetanolamidové modifikace lipidu A spojené s rezistencí *Acinetobacter baumannii* na kolistin byly reportovány Beceirem a spol. (62). V obou studiích byl modifikovaný lipid A detekován pomocí MALDI-TOF MS:

V současné době vyvinul Cai a spol. (63) metodu pro detekci OmpK36 porinu u *Klebsiella pneumoniae*, která je zodpovědná za penetraci karbapenemů periplasmou. Tito autoři použili pro izolaci porinu standardní postup specifické extrakce pomocí sodium *N-lauroyl* sarcosinate. Vzorky pak byly detekovány MALDI-TOF MS na základě jednoduché

determinace molekulové hmotnosti. Tito autoři byli schopni detekovat ztrátu hlavního OmpK36 porinu, který se podílí na rezistenci na karbapenemázy. Tato metoda detekce porinu je rychlejší než metoda SDS-PAGE. Nicméně, poriny jsou detekovány pouze díky molekulové hmotnosti. Měla by být vyvinuta metoda založená na lepší MALDI-TOF MS identifikaci detekovaných porinů (např. proteinový fingerprinting). Tato metoda bude spíše používána ve výzkumných laboratořích.

Minisekvenování

Pro detekci mechanismů rezistence může být také použita DNA analýza pomocí MALDI-TOF MS. Principy založené na MALDI-TOF MS sekvenčních metodách byly popsány Puschem a spol. (64). Po DNA aplikaci je aplikován purifikován a alela-specifická reakce se použije pro získání DNA molekul, které jsou měřitelné pomocí MALDI-TOF MS. U alela-specifických reakcí byla nejběžnější technikou používanou v mikrobiologických aplikacích metoda natažení primeru. U této techniky jsou používány specifické oligonukleotidy a produkt je prodloužen pouze o několik bází (Obrázek 5). Na základě molekulární hmoty produktu mohou být očekávány změny v DNA struktuře. Například, A→C mutace snižuje molekulární hmotu o 24 Da, A→G mutace zvyšuje molekulární hmotu o 16 Da (64). Díky interakcím DNA se sodíkem a draslíkem, které resultují ve vznik soli je MALDI-TOF MS limitováno co se týče analýzy molekul menších než přibližně 40 bp; proto, přímé změření PCR produktu je obtížné (64).

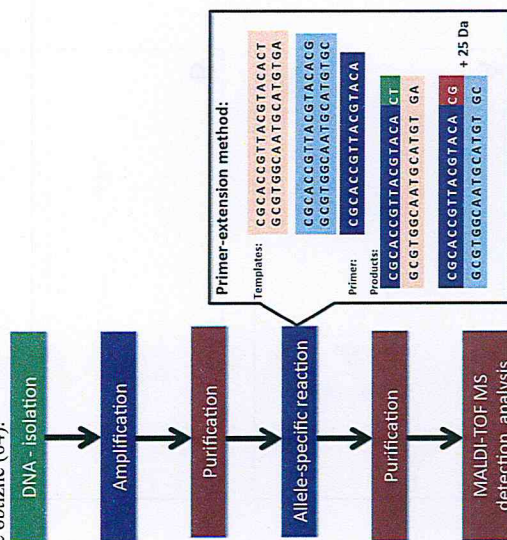


FIG 5 SNP detekce pomocí MALDI-TOF MS (dle dat zveřejněných v referenci 64).

Tato technika byla použita pro detekci jednonukleotidového polymorfismu (SNPs), aby se identifikoval SHV- typ (65) a TEM-typ (66) rozšířeného spektra β-laktamáz. Rezistence na rifampicin a isoniazid u *M.tuberculosis* (67, 68) byl také analyzována MALDI-TOF MS sekvenováním.

Mutace u genu *penA* a *ponA* byly detekovány proto, aby se analyzovala rezistence *Nisseria gonorrhoeae* (69) a pozdější práce popsaly detekci rezistence na fluorochinolony, spectinomycin a tetracyklin (70,71). Stejná skupina zveřejnila MALDI-TOF MS sekvenování u detekce rezistence *Streptococcus pneumoniae* (72,73). Tento přístup byl také použit u

determinace bodové mutace u PBPs u *Helicobacter pylori* kmenů rezistentních na amoxicilin (74).

Navzdory počtu publikací se jeví sekvenování pomocí MALDI-TOF MS pro detekci antibiotické rezistence jako náročné na práci a limitované malým rozměrem DNA fragmentů, které mohou být sekvenovány, bez jakékoli výhody oproti standardním sekvenovacím postupům. Jiné metody (např. PCR-based SNP detekce a DNA sekvenování) jsou dostupné a jsou používány v mnoha klinických laboratořích rutinně.

Budoucí perspektiva

MALDI-TOF MS může být používáno pro detekci molekul s širokým záběrem na molekulární hmotu. Antibiotika jsou obvykle malé molekuly (<1 000 Da), které komplikují svoji analýzu kvůli interakcím s maticí a interferencím s vysokou hladinou pozadí (75). Takovéto molekuly mohou být detekovány při použití jiné matrice a modifikovaných postupů přípravy vzorku (75, 76). Lin a spol. (77) uveřejnili zajímavou metodu založenou na nanočásticích, které byly funkční s proteinovou sondou s afinitou pro detekci molekuly a párovány maticí. Bylo úspěšně analyzováno 6 různých léků: kyselina salicylová, mefenamová kyselina, ketoprofen, flufenamic acid, sulindac a prednisol. Tento postup umožňuje purifikaci a koncentraci testované molekuly ze vzorku. Podle jejich výsledků se domníváme, že tato metoda může být použita pro (i) detekci determinací mechanismů rezistence (např. modifikované penicilin-vázané proteiny Qnr) a (ii) přímou analýzu antibiotických molekul a jejich purifikaci ze vzorku/reakčního roztoku.

Tato metoda může být použita nejen pro detekci determinací mechanismů rezistence, ale i pro detekci mikrobiálních toxinů a léků v krevních vzorcích.

Jako bylo výše popsáno, MALDI-TOF MS má velký potenciál k tomu, aby se stalo silnou technologií pro mikrobiologickou detekci. Některé zveřejněné metody potřebují další validaci nebo simplifikaci. Věříme, že budoucí výzkum aplikací MALDI-TOF MS pro identifikaci mechanismů antibiotické rezistence by se měl zaměřit zejména na tyto primární oblasti.

1. Přímá detekce enzymů, které degradují molekuly antibiotik, modifikací antibiotika. Tyto metody by měly být validovány pro rutinní diagnostiku při použití jednoduché přípravy bakteriální kultury nebo bakteriálních extraktů. Detekce β-laktamáz, hlavně karbapenemáz, již byla validována a je používána někde rutinně a také v referenčních laboratořích. Měly by být vyvinuty metody pro detekci ostatních enzymů (např. aminoglykosid-modifikující enzymy) aplikovatelné v rutinních a výzkumných laboratořích. Dle našeho názoru nebyl ještě takovýto test validován.
2. Detekce determinací mechanismů rezistence (např. Qnr proteiny a modifikované PBPs a β-laktamázy) a proteomické studie multirezistentních bakterií, které umožňují tvorbu kompletní databáze proteinových fingerprintů rezistentních izolátů pro detekci hlavních proteinů zodpovědných za rezistenci. V současné době byla validována metoda pro detekci vankomycin-rezistentního *Enterococcus* spp. Tato metoda se zdá být použitelná v diagnostických laboratořích pro rychlou detekci *vanB*-pozitivních *Enterococcus faecium* kmenů. Přímé rozlišení mezi MRSA a MSSA kmeny je velkou výzvou pro MALDI-TOF MS aplikace v diagnostických laboratořích. Navzdory uveřejněným pracím na toto téma, zejména poslední dobou práce Shaha a spol. (40), tyto postupy musí být dále optimalizovány a validovány. Dle našich nejlepších znalostí, nebyla uveřejněna žádná úspěšná metoda založená na detekci specifických bodů v bakteriálním lyzátu pro analýzy dalších rezistentních determinantů, jako jsou β-laktamázy.
3. Analýzy modifikací cílového místa (např. ribosomální metylace). Detekce metyltransferázové aktivity zodpovědné za rezistenci na aminoglykosidy, chloramfenikol a klindamycin, způsobená metylací 16S rRNA je stále ještě daleko od

aplikovatelnosti v rutinní diagnostice. Postup by měl být zjednodušen použitím surového bakteriálního extraktu.

4. Kvantifikace antibiotik. Vývoj metod pro determinaci koncentrace antibiotik by mohl pomoci při analýze přítoku a odtoku antibiotik.

Závěr

Představení MALDI-TOF MS jako rutinního diagnostického nástroje by mohlo znamenat revoluci v klinické mikrobiologii. Mikrobiologové dostali schopný nástroj s mnoha aplikacemi na molekulární úrovni. Nicméně, tato technika by měla být používána opatrně. Některé mikroby nemohou být správně identifikovány MALDI-TOF MS při použití současných dostupných postupů (78). Výhody a nevýhody této techniky ve srovnání se standardními, mikrobiologickými postupy jsou uvedeny v Tabulce 1.

Proteomický přístup ve studiích rezistentních kmenů může zkoumat molekuly genetické techniky. Studie na úrovni proteomu umožňují detekci chování testovaných kmenů, expresi proteinů, které nás zajímají a posttranslační modifikace.

S výjimkou celogenomového sekvenování, které ještě není dostupné pro rutinní použití, všechny molekulární genetické techniky jsou omezeny detekcí známých determinantů rezistence.

Proteomická analýza může být náročná na zpracování v rámci rutinních laboratoří, ale měla by být dostupná v referenčních centrech.

Jako bylo ukázáno v mnoha studiích, MALDI-TOF MS je schopno detekovat biologickou aktivitu enzymů odpovědných za modifikaci molekul antibiotik, což není možno s genetickými technikami. Výsledky studií prezentují, že MALDI-TOF MS je relevantním nástrojem pro detekci antibiotické rezistence a otevírá nové cesty jak v klinické, tak v experimentální mikrobiologii.

Nevěříme ale, že aplikace této techniky pro determinaci mechanismů rezistence může nahradit standardní testování citlivosti, protože rezistence k antibiotikům je komplexní proces. Proto, detekce limitovaného počtu specifických determinantů nemůže poskytnout kompletní obrázek antibiotické rezistence.

Poděkování

Děkujeme C. C. Papagiannitsisovi za kritickou kontrolu rukopisu.

Jaroslav Hrabák a Eva Chudáčková byly částečně podpořeny projekto-
vým grantem VT11032-6/2010 Ministerstva zdravotnictví ČR a MSM0021620819 Ministerstva školství ČR a výzkumným fondem Karlovy univerzity (projekt číslo P36)

Reference

1. Seng P, Rolain J-M, Fournier PE, La Scola B, Drancourt M, Raoult D. 2010. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol.* 5:1733–1754.
2. Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S. 2012. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93:965–974.
3. Livermore DM. 2012. Fourteen years in resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* 39:283–294.
4. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. 2012. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! *Trends Mol. Med.* 18:263–272.
5. Hrabák J, Niemczykova J, Chudáčková E, Fridrichová M, Studentová V, Cervená D, Urbásková P, Zemlicková H. 2011. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from a Czech patient previously hospitalized in Greece and in vivo selection of colistin resistance. *Folia Microbiol. (Praha)* 56:361–365.

6. Tzouveleki LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. 2012. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clin. Microbiol. Rev.* 25:682–707.
7. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1211–1233.
8. Shakil S, Khan R, Zarrilli R, Khan AU. 2008. Aminoglycosides versus bacteria—a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. *J. Biomed. Sci.* 15:5–14.
9. Smith CA, Baker EN. 2002. Aminoglycoside antibiotic resistance by enzymatic deactivation. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 2:143–160.
10. Nikaído H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:593–656.
11. Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T. 2008. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 32:361–385.
12. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 22:664–689.
13. Ledereq R, Cantón R, Brown DF, Giske CG, Heisig P, Macgowan AP, Mouton JW, Nordmann P, Rodloff AC, Rossolini GM, Soussy CJ, Steinbakk M, Winstanley TG, Kahlmeter G. 21 October 2011. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin. Microbiol. Infect.* [Epub ahead of print.] doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03703.x.
14. Ledebner NA, Hodinka RL. 2011. Molecular detection of resistance determinants. *J. Clin. Microbiol.* 49:S20–S24. doi:10.1128/JCM.00771-11.15. Niederman MS. 2009. Treatment options for nosocomial pneumonia due to MRSA. *J. Infect.* 59(Suppl 1):S25–S31. doi:10.1016/S0163-4453(09)60005-0.
16. Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, Cantón R, Rossolini GM, Campos J, Vatsopoulos A, Gniadkowski M, Toth A, Pfeifer Y, Jarlier V, Carmeli Y, CNSE Working Group. 2010. Carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro Surveill.* 15(46):pii_19711. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19711>.
17. Tacconelli E. 2009. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: source control and surveillance organization. *Clin. Microbiol. Infect.* 15(Suppl 7):31–38.
18. Buynak JD. 2004. The discovery and development of modified penicillins and cephalosporin-derived beta-lactamase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* 11:1951–1964.
19. Paterson DL, Bonomo RA. 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* 18:657–686.
20. Bush K. 2010. Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Curr. Opin. Microbiol.* 13:558–564.
21. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V, European Network on Carbapenemases. 2012. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin. Microbiol. Infect.* 18:432–438.
22. Cornaglia G, Akova M, Amicosante G, Cantón R, Cauda R, Docquier JD, Edelstein M, Frère JM, Fuzi M, Galleni M, Giamarellou H, Gniadkowski M, Koncan R, Libisch B, Luzzaro F, Miriagou V, Navarro F, Nordmann P, Pagani L, Peixe L, Poirel L, Souli M, Tacconelli E, Vatsopoulos A, Rossolini GM, ESCMID Study Group for Antimicrobial Resistance Surveillance. 2007. Metallo-beta-lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. *Int. J. Antimicrob. Agents* 29:380–388.
23. Bernabeu S, Poirel L, Nordmann P. 2012. Spectrophotometry-based detection of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 74:88–90.

24. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. 2012. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* **50**:477–479.
25. Burekhardt I, Zimmermann S. 2011. Using matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J. Clin. Microbiol.* **49**:3321–3324.
26. Hrabák J, Walková R, Studentová V, Chudácková E, Bergerová T. 2011. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption–ionization time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **49**:3222–3227.
27. Pan C, Xu S, Zhou H, Fu Y, Ye M, Zou H. 2007. Recent developments in methods and technology for analysis of biological samples by MALDI-TOF-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **387**:193–204.
28. Hrabák J, Studentová V, Walková R, Zemlicková H, Jakub V, Chudácková E, Gniadkowski M, Pfeifer Y, Perry JD, Wilkinson K, Bergerová T. 2012. 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.* **50**:2441–2443.
29. Kempf M, Bakour S, Flaudrops C, Berrazeg M, Brunel JM, Drissi M, Mesli E, Tounati A, Rolain JM. 2012. Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry. *PLoS One* **7**:e31676. doi:10.1371/journal.pone.0031676.
30. Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrewa M. 2012. Matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against β -lactam antibiotics. *J. Clin. Microbiol.* **50**:927–937.
31. Hooff GP, van Kampen JJ, Meesters RJ, van Belkum A, Goessens WH, Luider TM. 2012. Characterization of β -lactamase enzyme activity in bacterial lysates using MALDI-mass spectrometry. *J. Proteome Res.* **11**: 79–84.
32. Bonnin RA, Naas T, Poirel L, Nordmann P. 2012. Phenotypic, biochemical, and molecular techniques for detection of metallo- β -lactamaseNDM in *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* **50**:1419–1421.
33. Kirpekar F, Douthwaite S, Roepstorff P. 2000. Mapping posttranscriptional modifications in 5S ribosomal RNA by MALDI mass spectrometry. *RNA* **6**:296–306.
34. Kehrenberg C, Schwarz S, Jacobsen L, Hansen LH, Vester B. 2005. A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503. *Mol. Microbiol.* **57**: 1064–1073.
35. Savic M, Lovric J, Tomić TI, Vasiljevic B, Conn GL. 2009. Determination of the target nucleosides for members of two families of 16S rRNA methyltransferases that confer resistance to partially overlap-ping groups of aminoglycoside antibiotics. *Nucleic Acids Res.* **37**: 5420–5431.
36. Edwards-Jones V, Claydon MA, Evason DJ, Walker J, Fox AJ, Gordon DB. 2000. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *J. Med. Microbiol.* **49**:295–300.
37. Du Z, Yang R, Guo Z, Song Y, Wang J. 2002. Identification of *Staphylococcus aureus* and determination of its methicillin resistance by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* **74**:5487–5491.
38. Bernardo K, Pakulat N, Macht M, Krut O, Seifert H, Fieer S, Hüniger F, Krönke M. 2002. Identification and discrimination of *Staphylococcus aureus* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry. *Proteomics* **2**:747–753.
39. Shah H, Charbia S. 2010. Mass spectrometry for microbial proteomics. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, United Kingdom.
40. Shah HN, Rajakaruna L, Ball G, Misra R, Al-Shahib A, Fang M, Gharbia SE. 2011. Tracing the transition of methicillin resistance in sub-populations of *Staphylococcus aureus*,

- using SELDI-TOF mass spectrometry and artificial neural network analysis. *Syst. Appl. Microbiol.* **34**:81–86.
41. Majcherzyk PA, McKenna T, Moreillon P, Vaudaux P. 2006. The discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry to differentiate between isogenic teicoplanin-susceptible and teicoplanin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **255**: 233–239.
42. Dubská L, Pilatová K, Dolejška M, Bortlíček Z, Frostová T, Literák I, Valík D. 2011. Surface-enhanced laser desorption/ionization–time-of-flight (SELDI-TOF) mass spectrometry (MS) as a phenotypic method for rapid identification of antibiotic resistance. *Anaerobe* **17**: 444–447.
43. Camara JE, Hays FA. 2007. Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **389**: 1633–1638.
44. Schaumann R, Knoop N, Genzel GH, Losensky K, Rosenkranz C, Sfinu CS, Schellenberger W, Rodloff AC, Eschrich K. 2012. A step towards the discrimination of beta-lactamase-producing clinical isolates of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* by MALDI-TOF mass spectrometry. *Med. Sci. Monit.* **18**:MT71–MT77.
45. Griffin PM, Price GR, Schooneveldt JM, Schlebusch S, Tilse MH, Urbanski T, Hamilton B, Venter D. 2012. Use of matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak. *J. Clin. Microbiol.* **50**:2918–2931.
46. Marshall T, Williams KM. 2002. Proteomics and its impact upon biomedical science. *Br. J. Biomed. Sci.* **59**:47–64.
47. Radhouani H, Poeta P, Pinto L, Miranda J, Coelho C, Carvalho C, Rodrigues J, López M, Torres M, Vitorino R, Domingues P, Igrejas G. 2010. Proteomic characterization of *vanA*-containing *Enterococcus* recovered from seagulls at the Berlengas Natural Reserve, W Portugal. *Proteome Sci.* **8**:48. doi:10.1186/1477-5956-8-48.
48. Al-Harouni M, Skaug N, Bakken V, Cash P. 2008. Proteomic analysis of ampicillin-resistant oral *Fusobacterium nucleatum*. *Oral Microbiol. Immunol.* **23**:36–42.
49. Pinto L, Poeta P, Vieira S, Caleja C, Radhouani H, Carvalho C, Vieira-Pinto Themudo P, Torres C, Vitorino R, Domingues P, Igrejas G. 2010. Genomic and proteomic evaluation of antibiotic resistance in *Salmonella* strains. *J. Proteomics* **73**:1535–1541.
50. dos Santos KV, Diniz CG, de Castro Veloso L, de Andrade HM, da Silva Giusta M, da Fonseca Pires S, Santos AV, Apolonio ACM, de Carvalho MAR, de Macedo Farias L. 2010. Proteomic analysis of *Escherichia coli* with experimentally induced resistance to piperacillin/tazobactam. *Res. Microbiol.* **161**:268–275.
51. Sharma P, Kumar B, Gupta Y, Singhal N, Katoch VM, Venkatesan K, Bisht D. 2010. Proteomic analysis of streptomycin resistant and sensitive clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteome Sci.* **8**:59. doi: 10.1186/1477-5956-8-59.
52. Rogers PD, Vermitsky JP, Edlind TD, Hilliard GM. 2006. Proteomic analysis of experimentally induced azole resistance in *Candida glabrata*. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**:434–438.
53. Davin-Regli A, Bolla JM, James CE, Lavigne JP, Chevalier J, Garnotel E, Molitor A, Pages JM. 2008. Membrane permeability and regulation of drug “influx and efflux” in enterobacterial pathogens. *Curr. Drug Targets* **9**:750–759.
54. Drew D, Fröderberg L, Baars L, de Gier JW. 2003. Assembly and overexpression of membrane proteins in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1610**:3–10.
55. Grübner S, Linke D, Schütz W, Fladerer C, Madlung J, Autenrieth IB, Witte W, Pfeifer Y. 2009. Emergence of carbapenem-non-susceptible extended-spectrum β -lactamase-

- producing *Klebsiella pneumoniae* isolates at the university hospital of Tübingen, Germany. J. Med. Microbiol. 58:912–922.
56. Imperi F, Ciccosanti F, Perdomo A, Tiburzi F, Mancone C, Alonzi T, Ascenzi P, Piacentini M, Visca P, Fimla GM. 2009. Analysis of the periplasmic proteome of *Pseudomonas aeruginosa*, a metabolically versatile opportunistic pathogen. Proteomics 9:1901–1915.
57. Peng X, Xu C, Ren H, Lin X, Wu L, Wang S. 2005. Proteomic analysis of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of *Pseudomonas aeruginosa* responding to ampicillin, kanamycin, and tetracycline resistance. J. Proteome Res. 4:2257–2265.
58. Xu C, Lin X, Ren H, Zhang Y, Wang S, Peng X. 2006. Analysis of outer membrane proteome of *Escherichia coli* related to resistance to ampicillin and tetracycline. Proteomics 6:462–473.
59. Tran AX, Lester ME, Stend CM, Raetz CRH, Maskell DJ, McGrath SC, Cotter RJ, Trent MS. 2005. Resistance to the antimicrobial peptide polymyxin requires myristoylation of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* lipid A. J. Biol. Chem. 280:28186–28194.
60. Yi EC, Hackett M. 2000. Rapid isolation method for lipopolysaccharide and lipid A from Gram-negative bacteria. Analyst 125:651–656.
61. Coats SR, To TT, Jain S, Brahm PH, Darveau RP. 2009. *Porphyromonas gingivalis* resistance to polymyxin B is determined by the lipid A 4=phosphatase, PGN_0524. Int. J. Oral Sci. 1:126–135.
62. Beceiro A, Llobet E, Aranda J, Bengoechea JA, Doumith M, Hornsey M, Dhanji H, Chart H, Bou G, Livermore DM, Woodford N. 2011. Phosphocholamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of *Acinetobacter baumannii* mediated by the pmrAB two-component regulatory system. Antimicrob. Agents Chemother. 55:3370–3379.
63. Cai JC, Hu YY, Zhang R, Zhou HW, Chen G-X. 2012. Detection of OmpK36 porin loss in *Klebsiella* spp. by matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry. J. Clin. Microbiol. 50:2179–2182.
64. Pusch W, Wurmbach J-H, Thiele H, Kostrzewa M. 2002. MALDI-TOF mass spectrometry-based SNP genotyping. Pharmacogenomics 3:537–548.
65. Stürenburg E, Storm N, Sobottka I, Horstkotte MA, Scherpe S, Aepfelbacher M, Müller S. 2006. Detection and genotyping of SHV betalactamase variants by mass spectrometry after base-specific cleavage of *in vitro*-generated RNA transcripts. J. Clin. Microbiol. 44:909–915.
66. Ikryannikova LN, Shitikov EA, Zhivankova DG, Il'ina EN, Edelstein MV, Govorun VM. 2008. A MALDI TOF MS-based minisequencing method for rapid detection of TEM-type extended-spectrum beta-lactamases in clinical strains of *Enterobacteriaceae*. J. Microbiol. Methods 75:385–391.
67. Ikryannikova LN, Afanas'ev MV, Akopian TA, Il'ina EN, Kuz'min AV, Larionova EE, Smirnova TG, Chernousova LN, Govorun VM. 2007. Massspectrometry based minisequencing method for the rapid detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J. Microbiol. Methods 70:395–405.
68. Wang Q, Yue J, Zhang L, Xu Y, Chen J, Zhang M, Zhu B, Wang H, Wang H. 2007. A newly identified 191A/C mutation in the Rv2629 gene that was significantly associated with rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J. Proteome Res. 6:4564–4571.
69. Malakhova MV, Vereshchagin VA, Il'ina EN, Govorun VM, Zubkov MM, Pripitnevich TV, Kisina VI, Kubanova AA. 2006. Analysis of genetic markers of *N. gonorrhoeae* resistance to beta-lactam antibiotics. Bull. Exp. Biol. Med. 141:610–615.
70. Borovskaya AD, Malakhova MV, Vereshchagin VA, Il'ina EN, Govorun VM, Pripitnevich TV, Al-Hafagi N, Kubanova AA. 2007. Analysis of the contribution of

- molecular mechanisms into formation of gonococcal resistance to tetracycline. Bull. Exp. Biol. Med. 144:432–437.
71. Il'ina EN, Malakhova MV, Vereshchagin VA, Govorun VM, Pripitnevich TV, Kubanova AA. 2007. Direct evaluation of drug resistance parameters in gonococcus. Bull. Exp. Biol. Med. 144:227–230.
72. Malakhova MV, Vereshchagin VA, Il'ina EN, Govorun VM, Filimonova O, Grudina SA, Sidorenko SV. 2007. MALDI-ToF mass-spectrometry in analysis of genetically determined resistance of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones. Antibiot. Khimioter. 52:10–17.
73. Savinova TA, Il'ina EN, Sidorenko SV. 2010. A mass-spectrometric analysis of genetic markers of *S. pneumoniae* resistance to beta-lactam antibiotics. Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol. 3:16–25.
74. Shen J, Deng DJ, Ke Y, Zhang JZ. 2008. Detection of point mutation in an *in vitro*-selected amoxicillin-resistant strain of *Helicobacter pylori*. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi 29:166–172.
75. Penno MAS, Ernst M, Hoffmann P. 2009. Optimal preparation methods for automated matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry profiling of low molecular weight proteins and peptides. Rapid Commun. Mass Spectrom. 23:2636–2662.
76. Li X, Wu X, Kim JM, Kim SS, Jin J, Li D. 2009. MALDI-TOF-MS analysis of small molecules using modified mesoporous material SBA-15 as assisted matrix. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 20:2167–2173.
77. Lin P-C, Tseng M-C, Su A-K, Chen Y-J, Lin C-C. 2007. Functionalized magnetic nanoparticles for small-molecule isolation, identification, and quantification. Anal. Chem. 79:3401–3408.
78. Werno AM, Christner M, Anderson TP, Murdoch DR. 2012. Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* from nonpneumococcal streptococci of the *Streptococcus mitis* group by matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry. J. Clin. Microbiol. 50:2863–2867.

Tabulka 1 Možné aplikace MALDI-TOF MS pro klinickou mikrobiologii a mikrobiologický výzkum

MALDI-TOF MS aplikace	Aplikace již vyvinuté	Typ laboratoře, může metodu používat	Výhoda	Nevýhoda	Doplňková metoda	Poznámka
Detekce enzymatické aktivity	Detekce karbapenemáz	Rutinní laboratoře	Plná detekce β-laktamázové aktivity	Potřeba speciálních znalostí pro interpretaci spektr	Spektrometrická detekce β-laktamázové hydrolýzy	
Detekce ostatních B-laktamáz		Referenční centra	Srovnávací a referenční metody, vysoká citlivost a specifita (metrické testy)	Není identifikace typu β-laktamázy (potřeba genetických technik pro epidemiologické účely)	Fenotypizace, na inhibiční založené techniky	
Detekce vankomycin rezistentních enterokoků		Rutinní laboratoře	Rychlá a snadná technika pro detekci markerů rezistence	Detekce karbapenemáz u <i>Enterococcus faecium</i> a <i>Enterococcus faecalis</i> může být detekována viditelně	Fenotypizace detekce rezistence	
Detekce MRSA		Výzkumné laboratoře	Asi mnoho různých metod, které mohou být detekovány viditelně	Některé proteiny ve vzorku s mnoha molekulami mohou být MALDI-TOF MS detekovány viditelně	Molekulární genetické techniky	
Detekce B-laktamáz	Detekce OmpK36					

Tabulka 2 Možné aplikace MALDI-TOF MS pro klinickou mikrobiologii a mikrobiologický výzkum

MALDI-TOF MS aplikace	Aplikace již vyvinuté	Typ laboratoře, může metodu používat	Výhoda	Nevýhoda	Doplňková metoda	Poznámka
Detekce širokého spektra β-laktamáz	Detekce karbapenemáz	Rutinní laboratoře	Plná detekce β-laktamázové aktivity	Potřeba speciálních znalostí pro interpretaci spektr	Spektrometrická detekce β-laktamázové hydrolýzy	
Detekce ostatních B-laktamáz		Referenční centra	Srovnávací a referenční metody, vysoká citlivost a specifita (metrické testy)	Není identifikace typu β-laktamázy (potřeba genetických technik pro epidemiologické účely)	Fenotypizace, na inhibiční založené techniky	
Detekce vankomycin rezistentních enterokoků		Rutinní laboratoře	Rychlá a snadná technika pro detekci markerů rezistence	Detekce karbapenemáz u <i>Enterococcus faecium</i> a <i>Enterococcus faecalis</i> může být detekována viditelně	Fenotypizace detekce rezistence	
Detekce MRSA		Výzkumné laboratoře	Asi mnoho různých metod, které mohou být detekovány viditelně	Některé proteiny ve vzorku s mnoha molekulami mohou být MALDI-TOF MS detekovány viditelně	Molekulární genetické techniky	
Detekce B-laktamáz	Detekce OmpK36					

Tabulka 3 Možné aplikace MALDI-TOF MS pro klinickou mikrobiologii a mikrobiologický výzkum

MALDI-TOF MS aplikace	Aplikace již vyvinuté	Typ laboratoře, může metodu používat	Výhoda	Nevýhoda	Doplňková metoda	Poznámka
Detekce širokého spektra β-laktamáz	Detekce karbapenemáz	Rutinní laboratoře	Plná detekce β-laktamázové aktivity	Potřeba speciálních znalostí pro interpretaci spektr	Spektrometrická detekce β-laktamázové hydrolýzy	
Detekce ostatních B-laktamáz		Referenční centra	Srovnávací a referenční metody, vysoká citlivost a specifita (metrické testy)	Není identifikace typu β-laktamázy (potřeba genetických technik pro epidemiologické účely)	Fenotypizace, na inhibiční založené techniky	
Detekce vankomycin rezistentních enterokoků		Rutinní laboratoře	Rychlá a snadná technika pro detekci markerů rezistence	Detekce karbapenemáz u <i>Enterococcus faecium</i> a <i>Enterococcus faecalis</i> může být detekována viditelně	Fenotypizace detekce rezistence	
Detekce MRSA		Výzkumné laboratoře	Asi mnoho různých metod, které mohou být detekovány viditelně	Některé proteiny ve vzorku s mnoha molekulami mohou být MALDI-TOF MS detekovány viditelně	Molekulární genetické techniky	
Detekce B-laktamáz	Detekce OmpK36					

Formulář technických specifikací dodávky pro: ROP VIII_19 – Anaerobní box

Název zadavatele: Karlovarská krajská nemocnice a.s.
Sídlo: Bezručova 1190/19, 360 01 Karlovy Vary
IČ: 26365804

Specifikace dodávky	Požadovaná hodnota	Nabízená hodnota* Splněno ANO/NE
ROP VIII_19 - Anaerobní box	1ks	
Obchodní název a typové označení přístroje		BUGBOX anaerobní stanice (DUAL GAS)
Výrobce přístroje		Baker Ruskinn
Požadované parametry:		
Kapacita boxu	min. 270 petriho misek 90 mm	270 petriho misek 90 mm
Pracovní kapacita	min. 200 petriho misek 90 mm	200 petriho misek 90 mm
Vstupní komora pro transfer min. 10 petriho misek s automatickým přepouštěcím systémem	ano	Ano 10 misek
Anaerobní prostředí – připojení min. 2 tlakových lahví – N2 + N2/CO2/H2 + N2 proplachovací	ano	Ano
Postup při práci v bezrukavicovém prostředí	ano	Ano
Automatická regenerace katalyzátoru s roční nebo delší periodou	ano	Ano
Absorber toxických plynů s alespoň ročním cyklem výměny	ano	Ano
Automatické alarmy kritických stavů pro anaerobní prostředí – akustický a optický alarm	ano	Ano
Monitoring stavu plynů, kontrola nadměrné spotřeby plynů	ano	Ano
Výstup na externí alarm (zvukovou či optickou signalizaci), který oznámí nedokonalou anaerobiózu	ano	Ano
Vnitřní osvětlení – zářivka + halogenová inspekční lampa	ano	Ano
Nášlapné spínače – inspekční lampa, proplachování vstupní komory	ano	Ano
Redukční ventil N2	ano	Ano
Redukční ventil N2/CO2/H (směsný plyn) s připojením redukce	ano	Ano
Monitorovací alarmový systém - teplota, vlhkost, stav atmosféry	ano	Ano
Možnost připojení systému pro vstřikování plynů, vázaný na hladiny H2, pro snížení spotřeby plynů	ano	Ano
Vnitřní rozměry (V x Š x H)	min. 420x500x460 mm	420 x 500 x 460 mm
Veškeré příslušenství nutné k zahájení provozu a plné funkci zařízení	ano	Ano

**Uchazeč uvede údaje prokazující splnění požadovaných technických parametrů (u číselně vyjádřitelných hodnot uvede přímo nabízenou hodnotu parametru), případně uvede odkaz na přílohu nabídky, kde jsou tyto údaje uvedeny.*

V Brně dne 23.7.2015

Za uchazeče:

BioVendor - Laboratorní medicína a.s.
sídlo: Kapásek 1767/1, 621 00 Brno
IČ: 63471507, DIČ: CZ63471507
zaps. v OR vedeném KS v Brně
Odd. B., vložka 3917

MUDr. Viktor Růžicka
předseda představenstva
BioVendor – Laboratorní medicína a.s.

BUGBOX anaerobní stanice (DUAL GAS)

BAKER RUSKINN



Bugbox je špičkový anaerobní kultivační systém s excelentním anaerobním prostředím. Kultivace a snadná manipulace s miskami v kompletně kontrolované atmosféře – anaerobní prostředí, teplota, vlhkost. Systém vstupů pro ruce garantuje plnou volnost a jednoduchou manipulaci s miskami i jejich velmi snadné a ekonomické vkládání.

- kapacita: podle typu misek a stylu práce až cca 270 petri misek 90 mm (kultivace)
- kapacita cca 200 misek 90 mm (kultivace a práce se vzorky)
- vstupní komora pro transfer až 10 misek najednou s automatickým přepouštěcím systémem, přepouštěcí cyklus 15 sec., ekonomický provoz – pro proplach se používá N₂
- regulace vlhkosti od okolí až o 85%
- přesná regulace teploty - okolí +5°C až 45°C
- bezpečnost pro vzorky: automatické alarmy stavů kritických pro anaerobní prostředí včetně monitoringu stavu plynů, kontrola nadměrné spotřeby plynů, akustický, optický alarm,
- výstup na externí alarmový systém
- vnitřní osvětlení: zářivka + halogenová inspekční lampa,
- nášlapné spínače: inspekční lampa, proplachování vstupní komory, vstupních portů
- anaerobní prostředí: připojení 2 lahví - N₂/CO₂/H₂ (předmíchaný plyn: například 10% CO₂, 5% H₂, 85% N₂) + N₂ proplachovací

Pohodlný vstup pomocí Ezeeyin port:

- Ezee Sleeve direct hand entry systém - prostupy pro práci "holýma" rukama - bezrukavicové provedení, těsnění jen na zápěstí, rukávy v režimu - se zaplňováním před vstupem nebo v režimu zaplňované s okamžitým vstupem, vhodný pro dlouhodobou práci

Bezúdržbové řešení:

- automatická regenerace katalyzátoru vylučuje potřeby časté periodické výměny (roční perioda externí reaktivace nebo výměna)
- absorber toxických plynů s velkou kapacitou (roční výměna),

Rozměry

- vnější rozměry (vxšxh): 650 x 830 x 660 mm,
- vnitřní rozměry (vxšxh): 420 x 500 x 460 mm,
- rozměry přestupní komory (vxšxh): 200 x 100 x 100 mm,
- hmotnost 45 kg; 230V/50 Hz,

Sestava obsahuje:

- Ezee Sleeves porty M
- 1 x Catalyst
- 1 x Detox
- 3 x držák na petriho misky 90 mm
- drátěný zakladač na misky a jiný materiál
- Port Lube - mastek práškový farmaceutický indikátor anaerobního prostředí
- Monitorovací alarmový systém (teplota, vlhkost, stav atmosféry)
- Hadice a propojovací kit
- Redukční ventil N2 výst.tlak 0-4 BAR, se závitem na láhev W 24,32 x 1/14", výstupní hadice 6-8mm nebo variantně 6mm tvrdá
- Redukční ventil N2/CO2/H2 (směsný plyn) s připojením redukce T6 Jednostupňový, výst.tlak 6 BAR, se závitem na láhev M19x1,5 pravý (DIN14), výstupní hadice 6mm silnostěnná
- manuál v ČJ

Formulář pro zpracování nabídkové ceny

„Zdravotnické přístroje - část 10 - Mikrobiologie“

Označení	Popis	Počet kusů	Celková cena za dodávku bez DPH (Kč)	DPH %	Celkem DPH (Kč)	Cena celkem vč. DPH (Kč)
ROP VIII_18	Hmotnostní spektrofotometr pro identifikaci mikroorganismů	1	6 854 000,00 Kč	21	1 439 340,00 Kč	8 293 340,00 Kč
ROP VIII_19	Anaerobní box	1	478 000,00 Kč	21	100 380,00 Kč	578 380,00 Kč
Celková cena za spotřební materiál (24M) dle Přílohy č. 6 (buňka "H37") pro pol. ROP VIII_18			237 770,00 Kč	21	49 931,70 Kč	287 701,70 Kč
Celková nabídková cena			7 569 770,00 Kč		1 589 651,70 Kč	9 159 421,70 Kč

Uchazeč je povinen ocenit všechny položky tohoto formuláře.

V Brně dne 23.7.2015

BioVendor - Laboratorní medicína a.s.
Sídlo: Karásek 1767/1, 621 00 Brno
IČ: 63471507, DIČ: CZ63471507
zaps. v OR vedeném KS v Brně
Odd. B., vložka 3917

.....
MUDr. Viktor Růžicka, předseda představenstva



Adresy servisních středisek

Hmotnostní spektrometr pro identifikaci mikroorganismů

1. Společnost odpovědná za dodávku zboží do místa určení, jeho montáž, instalaci, uvedení do provozu a zaškolení obsluhy:

Bruker s.r.o.

IČ: 28297211, DIČ: CZ28297211

Adresa servisního střediska: Brno, Pražákova 1000/60, PSČ: 619 00

Kontakt pro hlášení požadavků na servisní zásah: 606 630 702, servis@bdal.com

Seznam servisních techniků oprávněných k provádění výše uvedených činností:

Ing. David Burian

Zaměstnavatel: Bruker s.r.o.

Vztah k uchazeči: subdodavatelský

Mgr. Pavel Lattenberg

Zaměstnavatel: Bruker s.r.o.

Vztah k uchazeči: subdodavatelský

Ing. Libor Feigerl

Zaměstnavatel: Bruker s.r.o.

Vztah k uchazeči: subdodavatelský

Ing. Tomáš Dvořák

Zaměstnavatel: Bruker s.r.o.

Vztah k uchazeči: subdodavatelský

2. Společnost odpovědná za poskytování záručního servisu po dobu záruční lhůty:

Bruker s.r.o.

IČ: 28297211, DIČ: CZ28297211

Adresa servisního střediska: Brno, Pražákova 1000/60, PSČ: 619 00

Kontakt pro hlášení požadavků na servisní zásah: 606 630 702, servis@bdal.com

Seznam servisních techniků oprávněných k provádění výše uvedených činností:

Ing. David Burian

Zaměstnavatel: Bruker s.r.o.

Vztah k uchazeči: subdodavatelský

Mgr. Pavel Lattenberg

Zaměstnavatel: Bruker s.r.o.

Vztah k uchazeči: subdodavatelský

Ing. Libor Feigerl

Zaměstnavatel: Bruker s.r.o.

Vztah k uchazeči: subdodavatelský

Ing. Tomáš Dvořák

Zaměstnavatel: Bruker s.r.o.

Vztah k uchazeči: subdodavatelský

Adresy servisních středisek

Anaerobní box

1. Společnost odpovědná za dodávku zboží do místa určení, jeho montáž, instalaci, uvedení do provozu a zaškolení obsluhy:

TRIGON PLUS spol. s r.o.

IČ: 46350110, DIČ: CZ46350110

Adresa servisního střediska Čestlice, Západní 93, PSČ: 251 01

Kontakt pro hlášení požadavků na servisní zásah: 272680190, mail@trigon-plus.cz

Seznam servisních techniků oprávněných k provádění výše uvedených činností:

Tomáš Vlasák

Zaměstnavatel: **TRIGON PLUS spol. s r.o.**

Vztah k uchazeči: **subdodavatelský**

2. Společnost odpovědná za poskytování záručního servisu po dobu záruční lhůty:

TRIGON PLUS spol. s r.o.

IČ: 46350110, DIČ: CZ46350110

Adresa servisního střediska Čestlice, Západní 93, PSČ: 251 01

Kontakt pro hlášení požadavků na servisní zásah: 272680190, mail@trigon-plus.cz

Seznam servisních techniků oprávněných k provádění výše uvedených činností:

Tomáš Vlasák

Zaměstnavatel: **TRIGON PLUS spol. s r.o.**

Vztah k uchazeči: **subdodavatelský**

Prohlášení o shodě

Podle § 12, odst.3, písm.a) zákona č. 22/1997 Sb.
o technických požadavcích na výrobky
a o změně a doplnění některých zákonů

Název organizace: Bruker s.r.o.
Adresa: Pražákova 1000/60, 619 00 Brno, Česká republika
IČ: 28297211

Vztah k výrobkům: výhradní zástupce

Prohlašuje na vlastní zodpovědnost, že výrobek

Výrobce: Bruker Daltonik GmbH
Fahrenheitstrasse 4
D-28359 Bremen
Německo

Výrobek: hmotnostní spektrometr Bruker microflex LT/SH (katalog. číslo 269944)

je ve shodě s následujícími normami nebo normativními dokumenty Evropské unie a je nositelem značky CE

- IEC 60825-1
- IEC 61010-1
- IEC 61326-1
- CISPR11
- CISPR11
- IEC 61000-4-2
- IEC 61000-4-3
- IEC 61000-4-4
- IEC 61000-4-5
- IEC 61000-4-6
- IEC 61000-4-11

Při posuzování shody byla použita i následující ustanovení směrnice:

- Směrnice Evropského Parlamentu a Rady č. 2006/95/EC
- EMC Směrnice č. 2004/108/EC

V Brně 14.2.2013

Bruker s.r.o. **BRUKER**
Pražákova 1000/60
619 00 Brno, Česká republika
IČ: 28297211, DIČ: CZ28297211
IČ DPH: SK4620232582

Mgr. Michal Boháč, Ph.D.
jednatel společnosti

Prohlášení o shodě

Podle § 12, odst. 3, písm a) zákona č. 22/1997 Sb.
o technických požadavcích na výrobky
a o změně a doplnění některých zákonů

Název organizace: Bruker s.r.o.
Adresa: Pražákova 1000/60, 619 00 Brno, Česká republika
IČ: 28297211

Vztah k výrobkům: výhradní zástupce

Prohlašuje na vlastní zodpovědnost, že výrobek

Výrobce: Bruker Daltonik GmbH
Fahrenheitstrasse 4
D-28359 Bremen
Německo

Výrobek: IVD MALDI Biotyper 2.3 CZ-cz

je ve shodě s následujícími normami nebo normativními dokumenty Evropské unie a je nositelem značky CE

- DIN EN ISO 13485
- DIN EN ISO 14971
- DIN EN 13642
- DIN EN 980
- DIN EN ISO 18113-3

Při posuzování shody byla použita i následující ustanovení směrnice:

- IVD Directive 98/79/EC
- EC procedura prohlášení o shodě podle přílohy III

V Brně 14.2.2014

Bruker s.r.o. **BRUKER**
Pražákova 1000/60
619 00 Brno, Česká republika
IČ: 28297211, DIČ: CZ28297211
IČ DPH: SK462023255/3

Mgr. Michal Boháč, Ph.D.
Jednatel společnosti

EC Declaration of Conformity

Ruskinn Technology Ltd.

Suite 3 Technium Digital, Sony Technology Centre,
Pencoed, Bridgend, CF35 5HZ, U.K.

We Ruskinn Technology Ltd. confirm that the products listed below meets the requirements of the European Directives:

- 73/23/EEC, 93/68/EEC (Low Voltage)
- 89/336/EEC, 92/31/EEC (Electromagnetic Compatibility)

Product Range: Ruskinn Anaerobic and Modified Atmosphere Workstations

Models: INVIVIO₂ Hypoxic and BUGBOX / CONCEPT Anaerobic Family of - Environmental Workstations.

Product Description:

A unique range of anaerobic, microaerophilic and hypoxic workstations designed to meet diverse scientific and research requirements. All workstations feature precise control over oxygen, temperature, and humidity and include "bare-hand" access without altering the internal atmosphere.

Applicable Standards:

For Electrical Safety: EN 61010-1: 2001 (2nd Edition)

For EMC: EN 61326: 1997 + A1: 1998 + A2: 2001
EN61000-3-2: 2000
EN61000-3-3: 1995 + A1: 2001

Year of affixation of the CE Mark 2005

Signed:



Date: 01.01.08

Samir Patel
Managing Director



Ruskinn Technology Ltd, Suite 3 Technium Digital, Sony Technology Park, Pencoed, Bridgend, CF35 5HZ, UK

Tel: +44 (0) 1656 868540 • Fax: +44 (0) 1656 868541

sales@ruskinn.com

www.ruskinn.com

Tlumočnická doložka

Jako tlumočnick jazyka českého a anglického jmenovaný dle zákona č. 36/1967 Sb., o znalcích a tlumočnících, ve znění pozdějších předpisů, rozhodnutím Krajského soudu v Brně ze dne 7.11. 2005, č.j. Spr 427/2005,

STVRZUJI,

že překlad souhlasí s textem připojené listiny. Na důkaz toho připojuji svůj podpis a razítko.

Tlumočnický úkon je zapsán v deníku pod poř. č. *28/80/2908/61* dne *11.10* 2014.

Interpreter's clause

I, Jan Struhár, a certified interpreter/translator for the Czech and English languages, appointed pursuant to Act No. 36/1967 Sb. (Coll.) on Certified Experts, Translators, and Interpreters, as amended by subsequent regulations, by the Regional Court in Brno, Czech Republic, on 7 November 2005, reference no. Spr 427/2005,

DO HEREBY CERTIFY:

that the document in the English/Czech language hereunto annexed is a true and faithful translation of the document in the English/Czech language also hereunto annexed.

In testimony whereof I have hereunto set my hand and affixed my seal, this *11th* day of *October* in the year two thousand and fourteen.

The interpreter's performance is entered in the journal under record no. *28/80/2908/61*


Mgr. Jan Struhár

soudní tlumočnick / certified interpreter/translator



ES Prohlášení o shodě

Ruskinn Technology Ltd.

Suite 3 Technium Digital, Sony Technology Centre,
Pencoed, Bridgend, CF35 5HZ, U.K. /Spojené království/

My, spol. Ruskinn Technology Ltd., potvrzujeme, že produkty uvedené níže
splňují požadavky evropských směrnic:

- 73/23/EHS, 93/68/EHS (Nízké napětí)
- 89/336/EHS, 92/31/EHS (Elektromagnetická kompatibilita, EMC)

Sortiment výrobků: Anaerobní a modifikované atmosférické pracovní stanice
Ruskinn

Modely: INVIVIO₂ Hypoxic /hypoxická/ a BUGBOX / CONCEPT Anaerobic
/anaerobní/ skupina - environmentálních pracovních stanic.

Popis produktu:

Unikátní sortiment anaerobních, mikroaerofilních a hypoxických pracovních stanic,
které jsou navrženy tak, aby vyhověly různorodým vědeckým a výzkumným
požadavkům.

Všechny pracovní stanice disponují precizním ovládáním kyslíku, teploty a vlhkosti
a zahrnují přístup "bare-hand" bez změny interní atmosféry.

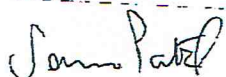
Platné normy:

Pro elektrickou bezpečnost: EN 61010-1: 2001 (2. vydání)

Pro EMC: EN 61326: 1997 + A1: 1998 + A2: 2001
EN61000-3-2: 2000
EN61000-3-3: 1995 + A1: 2001

Rok připojení označení CE

2005



Podepsal(a):

Datum: 01.01.08

Samir Patel
Managing Director
(výkonný ředitel)

 **RUSKINN**
TECHNOLOGY LTD

Ruskinn Technology Ltd, Suite 3 Technium Digital, Sony Technology Park, Pencoed, Bridgend, CF35 5HZ, UK
Tel: +44 (0) 1656 868540 • Fax: +44 (0) 1656 868541

sales@ruskinn.com
www.ruskinn.com

Tlumočnická doložka

Jako tlumočnick jazyka českého a anglického jmenovaný dle zákona č. 36/1967 Sb., o znalcích a tlumočnících, ve znění pozdějších předpisů, rozhodnutím Krajského soudu v Brně ze dne 7.11. 2005, č.j. Spr 427/2005,

STVRZUJI,

že překlad souhlasí s textem připojené listiny. Na důkaz toho připojuji svůj podpis a razítko.

Tlumočnický úkon je zapsán v deníku pod poř. č. *28/80/2908/61* dne *11.10* 2014.

Interpreter's clause

I, Jan Struhár, a certified interpreter/translator for the Czech and English languages, appointed pursuant to Act No. 36/1967 Sb. (Coll.) on Certified Experts, Translators, and Interpreters, as amended by subsequent regulations, by the Regional Court in Brno, Czech Republic, on 7 November 2005, reference no. Spr 427/2005,

DO HEREBY CERTIFY:

that the document in the English/Czech language hereunto annexed is a true and faithful translation of the document in the English/Czech language also hereunto annexed.

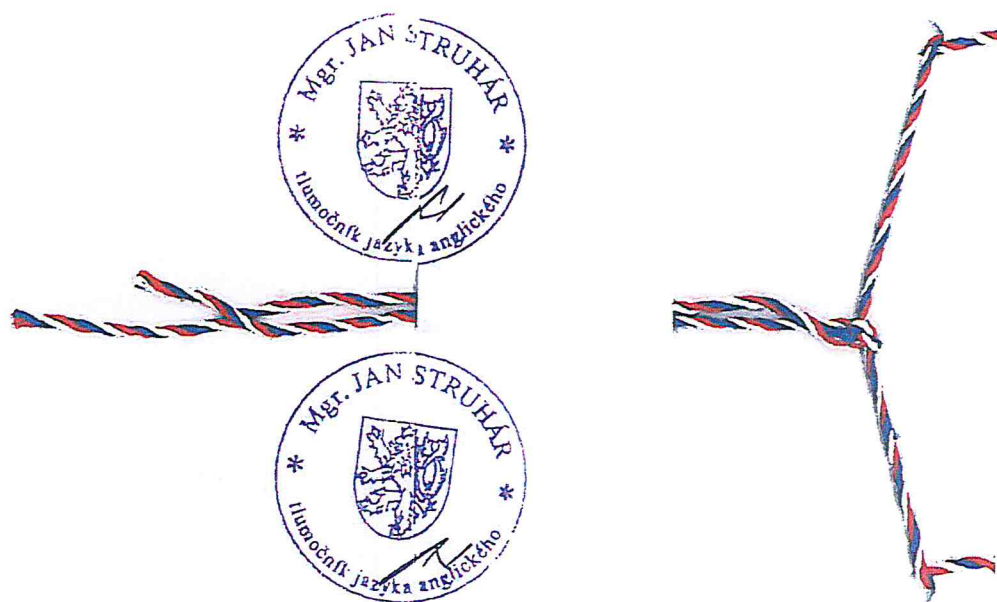
In testimony whereof I have hereunto set my hand and affixed my seal, this *11th* day of *October* in the year two thousand and fourteen.

The interpreter's performance is entered in the journal under record no. *28/80/2908/61*


Mgr. Jan Struhár

soudní tlumočník / certified interpreter/translator





Cenová nabídka

Dodávky spotřebního a pomocného materiálu pro "Hmotnostní spektrofotometr pro identifikaci mikroorganismů" - pol. ROP VIII_18

položka č.	Specifikace položek spotřebního a pomocného materiálu sloužícího k provedení požadovaných identifikací (systémové roztoky, kalibrátory, pipetovací špičky a veškerý materiál nutný k chodu systému) ¹	měrná jednotka (balení)	Množství položky sloužící k provedení odhadovaného počtu identifikací za rok - 20.000 identifikací/rok	Cena položky			Cena celkem za 24 měsíců		
				bez DPH	DPH	včetně DPH	bez DPH	DPH	vč. DPH
1	MALDI alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic acid, portioned (MALDI matrice)	10 ks	13,0	4 505,00 Kč	946,05 Kč	5 451,05 Kč	117 130,00 Kč	24 597,30 Kč	141 727,30 Kč
2	Bruker Bacterial Standard (kalibrant)	5 ks	3,0	6 925,00 Kč	1 454,25 Kč	8 379,25 Kč	41 550,00 Kč	8 725,50 Kč	50 275,50 Kč
3	Acetonitril, LC-MS CHROMASOLV, 99,9%	250 ml	1,0	2 159,00 Kč	453,39 Kč	2 612,39 Kč	4 318,00 Kč	906,78 Kč	5 224,78 Kč
4	Kyselina trifluoroctová, Reagent Plus, 99%	100 ml	1,0	406,00 Kč	85,26 Kč	491,26 Kč	812,00 Kč	170,52 Kč	982,52 Kč
5	Voda, LC-MS CHROMASOLV	1 ltr	1,0	555,00 Kč	116,55 Kč	671,55 Kč	1 110,00 Kč	233,10 Kč	1 343,10 Kč
6	Špičky Eppendorf, objem: 0,1-10 µl	1000 ks	21,0	1 472,00 Kč	309,12 Kč	1 781,12 Kč	61 824,00 Kč	12 983,04 Kč	74 807,04 Kč
7	Špičky Eppendorf, objem: 2-200 µl	1000 ks	1,0	907,00 Kč	190,47 Kč	1 097,47 Kč	1 814,00 Kč	380,94 Kč	2 194,94 Kč
8	Špičky Eppendorf, objem: 50-1000 µl	1000 ks	1,0	907,00 Kč	190,47 Kč	1 097,47 Kč	1 814,00 Kč	380,94 Kč	2 194,94 Kč
9	Eppendorf Safe-Lock mikrozkrumavky	1000 ks	1,0	1 169,00 Kč	245,49 Kč	1 414,49 Kč	2 338,00 Kč	490,98 Kč	2 828,98 Kč
10	Utěrky Kimtech Science, 2-vrstvé, bílé, rozměr 20,5x20 cm	200 ks	5,0	234,00 Kč	49,14 Kč	283,14 Kč	2 340,00 Kč	491,40 Kč	2 831,40 Kč
11	MALDI aplikátor kolonií	600 ks	34,0	40,00 Kč	8,40 Kč	48,40 Kč	2 720,00 Kč	571,20 Kč	3 291,20 Kč
12					- Kč	- Kč	- Kč	- Kč	- Kč
13					- Kč	- Kč	- Kč	- Kč	- Kč
14					- Kč	- Kč	- Kč	- Kč	- Kč
15					- Kč	- Kč	- Kč	- Kč	- Kč
16					- Kč	- Kč	- Kč	- Kč	- Kč
17					- Kč	- Kč	- Kč	- Kč	- Kč
18					- Kč	- Kč	- Kč	- Kč	- Kč
19					- Kč	- Kč	- Kč	- Kč	- Kč
20					- Kč	- Kč	- Kč	- Kč	- Kč
21					- Kč	- Kč	- Kč	- Kč	- Kč
22					- Kč	- Kč	- Kč	- Kč	- Kč
23					- Kč	- Kč	- Kč	- Kč	- Kč
24					- Kč	- Kč	- Kč	- Kč	- Kč
25					- Kč	- Kč	- Kč	- Kč	- Kč
26					- Kč	- Kč	- Kč	- Kč	- Kč
27					- Kč	- Kč	- Kč	- Kč	- Kč
28					- Kč	- Kč	- Kč	- Kč	- Kč
29					- Kč	- Kč	- Kč	- Kč	- Kč
30					- Kč	- Kč	- Kč	- Kč	- Kč
Celková nabídková cena							237 770,00 Kč		287 701,70 Kč
Cena 1 identifikace							5,94 Kč		7,19 Kč

¹ Zadavatel požaduje také nacenit kontrolní materiály. Týdně bude v průměru provedeno celkem 385 identifikací.

