

Säkerställande av ESBL-, AmpC- och karbapenemasproduktion med diskdiffusionsmetoden

1 Metodreferenser och avvikelser

CLSI Document M31-A3, Vol. 28, No 8. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard – Third Edition. CLSI 2008. ISBN 1-56238-659-X.

CLSI Document M100-S20 Vol 30, No.1. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. CLSI 2010. ISBN 1-56238-716-2.

2 Metodens syfte och tillämpningsområde

Denna metod används i situationer då känsligheten för cefotaxim eller andra 3 generationens cefalosporiner hos stammar av *E. coli*, *Klebsiella* sp. eller *Proteus mirabilis*, eller den *Salmonella* serotyp som undersöks anses vara avsevärt nersatt. Om nersatt känslighet för 3 generationens cefalosporiner påvisas hos andra enterobakterier, överenskommes från fall till fall om fortsatta undersökningar.

3 Definition(er)

β -laktamaser med utvidgat spektrum (ESBL, extended-spectrum β -lactamases) är β -laktamaser som kan hydrolysera tredje generationens cefalosporiner (såsom cefotaxim) och monobaktamer (aztreonam) och ibland också karbapenemer (såsom imipenem). De kan vanligen också bryta ned penicilliner och första och andra generationens cefalosporiner. Gener som kodar β -laktamaser med utvidgat spektrum förekommer särskilt hos gramnegativa bakterier (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* och *Salmonella* spp) av familjen *Enterobacteriaceae*. De förekommer också hos andra gramnegativa stavformade bakterier. ESBL-gener förekommer såväl i bakteriens kromosomer som i plasmiderna. De viktigaste genfamiljerna heter TEM, SHV, OXA och CTX. De olika enzymerna numreras familjevis, exempel TEM-3.

β -laktamaser av AmpC-typ anses inte vara egentliga Es β L enzymer. Es β L inhibitorer (t.ex. klavulansyra) förhindrar inte deras verksamhet. De bryter ändå ner β -laktamantibiotika i lika hög grad som Es β L. Även gener av AmpC-typ kan beroende på bakteriesläktet vara både kromosomala och i plasmider. Kromosomala gener framträder i allmänhet inte, och fenotypen AmpC+ beror oftast på produktion av plasmidmedierat enzym.

Karbapenemaser är β -laktamaser med utvidgat spektrum. De indelas i klasserna A och B (och D). Klass A representeras av t.ex. KPC, dvs. '*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase'. Klass B består av metallo- β -laktamaser (M β L). Enterobakterier som

Säkerställande av ESBL-, AmpC och karbapenemasproduktion med diskdiffusionsmetoden

producerar karbapenemaser håller på att bli en epidemiologiskt allt mera betydande typ av patogener än tidigare, både inom human- och djurmedicinen.

4 Princip

Med ESβL-AmpC-metoden undersöks med hjälp av testlappar bakteriestammens resistens mot tredje generationens cefalosporiner (cefpodoxim) utan EsβL- eller AmpC-inhibitorer och med dem. Testet kompletteras med en lapp på vilken utöver cefalosporin båda inhibitorerna också finns.

Vid screening för karbapenemasproducerande stammar används meropenem och ertapenem. Bakteriestammar som är klart resistenta mot meropenem undersöks vidare med hjälp av inhibitorer som lämpas för klasserna A och B karbapenemaser. Testserien kan också upptäcka eventuell AmpC-aktivitet.

5 Eventuella felkällor

För prestationstekniska fel, se metodbeskrivning Evira 3484.

ESBL-fenotypen kan täckas om stammen samtidigt producerar betalaktamaser som är resistenta mot klavulansyra.

Ett felpositivt resultat kan ges av de *K. pneumoniae* - och *E. coli* -stammar, som överproducerar SHV-1-enzym (inte ESBL) som orsakar ceftazidimresistens.

6 Arbetssäkerhet

Vid arbete i ett mikrobiologiskt laboratorium följs verksamhetsbeskrivning LAB 223. Vid hantering av bakterier som producerar betalaktamaser och karbapenemaser med brett spektrum följs verksamhetsbeskrivning LAB 740.

7 Miljöförhållanden och testlokaler

1. Sedvanlig laboratoriemiljö

8 Utrustning och redskap

1. Mikrobiologisk basutrustning
2. Värmeskåp $36,0 \pm 1,0$ °C
3. McFarland 0.5 -standarden eller nefelometer
4. Sterila bomullspinnar
5. Dreja för rotation av petriskålarna
6. Skjutmått eller linjal

Säkerställande av ESBL-, AmpC och karbapenemasproduktion med diskdiffusionsmetoden

9 Substrat och reagenser

9.1 Substrat

1. Blodagar
2. 0.9 % NaCl eller ickeselektiv buljong (tryptic soy broth, BHI-buljong, Mueller-Hinton -buljong)
3. Mueller-Hinton-II -agar (grundsubstrat)

Plattans tjocklek ska vara ca 4 mm vid mittpunkten. Beroende på tillverkaren fås en sådan platta, då 22-25 ml agar gjuts på en 9 cm platta.

9.2 Antibiotikalappar

ESBL - AmpC produktion: Mast Group Ltd, D68C AmpC & ESβL Detection Set

Lapp A:	CPD10 (cefpodoxim)
Lapp B:	CPD10 + ESβL inhibitor
Lapp C:	CPD10 + AmpC inhibitor
Lapp D:	CPD10 + ESβL inhibitor + AmpC inhibitor

Ertapenem 10 µg (CT1761B, Oxoid)

Meropenem 10 µg (CT0774B, Oxoid)

Säkerställande av produktion av karbapenemaser: Rosco Neo-Sensitabs ConfirmID (Carbapenemase/Metallo-β-Lactamase Confirmative Identification Pack) lappar

Meropenem 10 µg, kod MRP10

Meropenem 10 µg + boronsyra, kod MR+BO

Meropenem 10 µg + kloxacillin, kod MR+CX

Meropenem 10 µg + dipikolinsyra, kod MR+DP

10 Kontrollstammar

ESBL- AmpC -produktion:

E. coli ATCC 25922, Evira 257, ESBL/AmpC-negativ

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603, Evira 639, ESBL-positiv

E. coli, 21.6.2010/62, EC-4.7, AmpC-positiv

På ertapenem- och meropenemlappar används endast den negativa kontrollstammen

E. coli ATCC 25922, Evira 257

Karbapenemasproduktion:

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603, Evira 639, KPC- och MBL-negativ

Klebsiella pneumoniae BAA-1705, Evira 662, KPC-positiv

11 Utförande

Följ metodbeskrivning Evira 3484 punkt 10. Bakteriesuspension som har odlats i icke-selektivt substrat (buljong) sprids över två Müller-Hinton-II plattor. Sätt Mast

Säkerställande av ESBL-, AmpC och karbapenemasproduktion med diskdiffusionsmetoden

D68C lappar A, B, C och D på en av dessa i enlighet med bilden nedan. På den andra plattan sätts en meropenemlapp (CT0774B) och en ertapenemlapp (CT1761B).

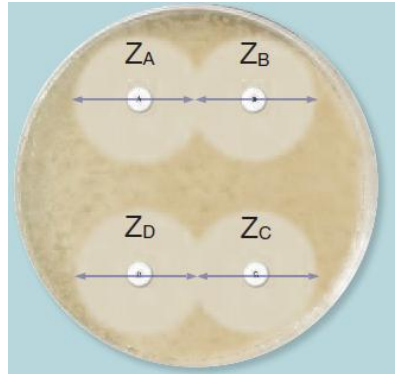


Bild: Placering av Mast A, B, C och D lappar på plattan

Diametern på inhiberingszonerna som har uppstått kring lapparna mäts med mm-mått eller med skjutmått.

Om inhiberingszonens diameter kring meropenemlappen är större än 22 mm, producerar stammen inte karbapenemaser. Om diametern är mindre än 16 mm, utreds resistensen noggrannare med hjälp av en karbapenemas diskserie. Om tolkning av inhiberingszoner mellan 16 – 22 mm beslutas från fall till fall. På en Müller-Hinton II platta som har gjorts på ovan beskrivna sätt placeras MRP10, MR+BO, MR+CX och MR+DP lappar på det sätt som bilden ovan visar. Ordningföljden på lapparna har ingen betydelse. Diametern på inhiberingszonerna som har uppstått kring lapparna mäts med mm-mått eller med skjutmått.

Om inhiberingszonens diameter kring ertapenemlappen är större än 25 mm, producerar stammen inte karbapenemaser. Om diametern är mindre än 22 mm, avtals särskilt om vidare undersökningar av stammen. Om tolkning av inhiberingszoner mellan 22 – 25 mm beslutas från fall till fall.

12 Resultat

12.1 Avläsning av resultaten

Mät inhiberingszonens diameter med en millimeters precision från den klara inhiberingszonens kant, det vill säga den punkt där bakterieväxten försvagas skarpt. Välj mätpunkterna så, att de är så långt från de närliggande lapparna och plattans kant som möjligt. Mät den svagt skönjbara, slöjliknande tillväxten på inhiberingszonens kant med i inhiberingszonen.

Mast D68C lappar

Producerar ESBL: $Z_B - Z_A$ och $Z_D - Z_C \geq 5$ mm och $Z_D - Z_B$ och $Z_C - Z_A < 5$ mm

Producerar AmpC: $Z_B - Z_A$ och $Z_D - Z_C < 5$ mm och $Z_D - Z_B$ och $Z_C - Z_A \geq 5$ mm

Producerar ESBL och AmpC: $Z_D - Z_C \geq 5$ mm och $Z_B - Z_A < 5$ mm

ESBL och AmpC negativ: skillnaderna mellan alla zoner ≤ 2 mm (jfr bilden)

Säkerställande av ESBL-, AmpC och karbapenemasproduktion med diskdiffusionsmetoden

Rosco karbapenemas diskserie

Inhiberingszonens omfattning jämfört med MRP10 lappens inhiberingszon

MR+BO	MR+CX	MR+DP	Tolkning
≥ 5 mm	≥ 5 mm	≤ 3 mm	AmpC (+ eventuell förlust av porin)
≥ 5 mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	KPC
≤ 3 mm	≤ 3 mm	≥ 5 mm	MβL
≥ 5 mm	≤ 3 mm	≥ 5 mm	event. KPC samt MβL

AmpC, KPC och MβL negativ: skillnaderna mellan alla zoner ≤ 2 mm

För att underlätta tolkningen har MS Excel-tabeller utarbetats för båda testerna, i vilka endast inmatas inhiberingszonernas uppmätta diameter. Tabellerna MAST_ESBL_AmpC_laskin.xlsm och Rosco_karbapenemaasi_laskin.xlsm ligger på servern under AMBI i mappen ESBL.

12.2. Hur resultaten anges

Ange resultatet av testet i samma svar som VetMIC-resultatet med hjälp av följande koder:

esblneg: Den undersökta stammen producerar inte B-laktamas med utvidgat spektrum (ESBL)

esblpos: Stammen producerar B-laktamas med utvidgat spektrum (ESBL)

ampcneg: Den undersökta stammen producerar inte AmpC β-laktamas

ampcpos: Den undersökta stammen producerar AmpC β-laktamas

I Elmo-analysresultatet klassificeras alla betalaktamers resultat som resistent, också amoxicillin-klavulansyra.

Resultatet av karbapenemasbestämningen sätts tillsvidare inte till undersökningsintyget på grund av osäkerhetsfaktorerna hos typningen som är baserad på fenotyp. Meropenemresistent bakteriestammar sänds till Institutet för hälsa och välfärd för genotypning (THL/Jari Jalava). Om sändning av prover avtalas alltid särskilt.

12.3 Användning av kontrollstammar

E. coli ATCC 25922: ska testas med ESBL -AmpC diskserie

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603: ska testas med båda diskserierna

Klebsiella pneumoniae BAA-1705: ska testas med karbapenemas diskserie

13 Metodens status

Metoden ingår i en internationell metodsamling

Officiell metod

Intern metod

Säkerställande av ESBL-, AmpC och karbapenemasproduktion med diskdiffusionsmetoden

14 Kvalitetssäkringsmetoder

Referensundersökningar laboratorierna emellan	<input checked="" type="checkbox"/>
Metodjämförelser	<input type="checkbox"/>
Användning av referensstammar/kontrollstammar	<input checked="" type="checkbox"/>
Inokulerade prover	<input type="checkbox"/>
Parallellbestämningar	<input type="checkbox"/>
Kontrollappar	<input type="checkbox"/>
Kontrollkort/häfte	<input type="checkbox"/>

15 Referenser

CLSI Document M31-A3, Vol. 28, No 8. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard – Second Edition. CLSI 2008. ISBN 1-56238-659-X.

CLSI Document M100-S20 Vol 30, No.1. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. CLSI 2010. ISBN 1-56238-716-2.

Bakterien lääkeherkkyden määrittäminen kiekkomenetelmällä. Versio 5.0. FiRe-standardi. Suomalainen mikrobilääkeresistenssin tutkimusryhmä – Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance (FiRe), 2006.

Jaakkonen, A., Laajakirjoisen β -laktamaasiresistenssiyden kehittyminen ja detektio, kandidaatintyö, Tekniska högskolan, fakulteten för kemi och materialvetenskaper, 2009.

Folkhälsoinstitutet, mikrobekologilaboratoriet, bakgrund till ESBL, http://www.ktl.fi/portal/suomi/osastot/bato/yksikot/mikrobioekologian_laboratorio/tutkimus/laajakirjoiset_beetalaktamaasit_esbl/ 22.10.2010.

Rosco Diagnosticas karbapenemas testserie
<http://www.eurobio.fr/images/Image/File/ROSCO/Fiche%20technique%20Carbapenemas%20-%20Metallo-B-Lactamase.pdf>

16 Ändringar sedan senaste version

Punkterna 6 och 10 har uppdaterats.

Denna anvisning sammanställdes av: Suvi Nykäsenoja, Katariina Pekkanen
25.6.2015