

ESBL-, AmpC- ja karbapenemaasituoton tutkiminen kiekkoherkkyysmenetelmillä

1 Menetelmäviitteet ja poikkeamat

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 Menetelmän tarkoitus ja soveltamisala

Tätä menetelmää käytetään tilanteessa, jossa tutkittavana olevien *E. coli* -, *Klebsiella* sp., tai *Proteus mirabilis* -kantojen, tai *Salmonella* -serotyypin herkkyuden kefotaksiimille tai muulle 3. polven kefalosporiinille katsotaan alentuneen merkittävästi. Jos alentunutta herkkyyttä 3. polven kefalosporiineille todetaan muilla enterobakteereilla, sovitaan jatkotutkimuksista tapauskohtaisesti.

3 Määritelmä(t)

Laajakirjoiset β -laktamaasit (ESBL, extended-spectrum β -lactamases) ovat entsyymejä, jotka pystyvät hydrolysoimaan kolmannen polven kefalosporiineja (esim. kefotaksiimi) ja monobaktaameja (esim. atstreonaami) ja joskus myös karbapeneemeja (esim. imipeneemi). Ne pystyvät yleensä hajottamaan myös penisilliinejä sekä ensimmäisen ja toisen polven kefalosporiineja. Laajakirjoisia β -laktamaaseja koodaavia geenejä esiintyy erityisesti gramnegatiivisissa *Enterobacteriaceae*-heimon bakteereissa (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ja *Salmonella* spp). Niitä on myös muissa gramnegatiivisissa sauvabakteereissa. ESBL-geenejä on sekä bakteerien kromosomeissa että plasmideissa. Tärkeimmät geeniperheet ovat nimeltään TEM, SHV, OXA ja CTX. Eri entsyymit numeroidaan perheittäin, esim. TEM-3.

AmpC-tyyppisiä β -laktamaaseja ei katsota varsinaisiksi ESBL-entsyymeiksi. ESBL-inhibiittorit (esim. klavulaanihappo) eivät estä niiden toimintaa. Ne hajottavat kuitenkin yhtä laajasti β -laktamiantibiootteja kuin ESBL:t. Myös AmpC tyypin geenit voivat olla bakteerisuvusta riippuen sekä kromosomaalisia että plasmideissa. Kromosomaalisia geenejä ei yleensä ilmentetä, ja AmpC+ fenotyyppi johtuu useimmiten entsyymin plasmidivälitteisestä tuotannosta.

Karbapenemaasit ovat laajakirjoisimpia β -laktamaaseja. Ne jaetaan A- ja B- (ja D-) tyyppihin. A-tyyppiä edustaa esim. KPC, eli '*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase'. B-tyyppi muodostuu metallo- β -laktamaaseista (M β L). Karbapenemaaseja tuottavat

ESBL-, AmpC- ja karbapenemaasituoton tutkiminen kiekkoherkkyysmenetelmillä

enterobakteerit ovat nousemassa epidemiologisesti entistä tärkeämmäksi patogeenityypiksi sekä humaani- että eläinlääketieteessä.

4 Periaate

ESBL-AmpC -menetelmässä tutkitaan test kiekkojen avulla bakteerikannan herkkyyttä kolmannen polven kefalosporiinille (kefopoksiimi) ilman ESBL- tai AmpC-inhibiittoreita ja niiden kanssa, Testin täydentää kiekko, jossa on kefalosporiinin lisäksi molempia inhibiittoreita.

Karbapenemaasituottajien seulontaan käytetään meropeneemiä ja ertapeneemiä. Meropeneemille selvästi resistentit kannat testataan A ja B -karbapenemaasityypeille soveltuvien inhibiittoreiden avulla. Testisarja voi havaita myös mahdollisen AmpC-aktiivisuuden.

5 Mahdolliset virhelähteet

Suoritustekniset virheet, katso menetelmäohje Evira 3484.

ESBL-fenotyyppi voi peittyä, jos kanta tuottaa samanaikaisesti klavulaanihakon resistenttejä betalaktamaaseja.

Virhepositiivisen tuloksen voivat antaa ne *K. pneumoniae* - ja *E. coli* -kannat, jotka ylituottavat keftatsidiimiresistenssiä aiheuttavaa SHV-1-entsyymiä (ei ESBL).

6 Työturvallisuus

Mikrobiologisessa laboratorioissa työskennellessä noudatetaan toimintaohjetta LAB 223. Laajakirjoisia beetalaktaaseja ja karbapenemaaseja tuottavien bakteerien käsittelyssä noudatetaan toimintaohjetta LAB 740.

7 Ympäristöolosuhteet ja testaustilat

1. Tavanomainen laboratorioympäristö

8 Laitteet ja välineet

1. Mikrobiologinen perusvälineistö
 2. Lämpökaappi $36,0 \pm 1,0$ °C,
 3. McFarland 0.5 -standardi tai nefelometri
 4. Steriilejä pumpulipuikkoja
 5. Dreijja petrimaljojen pyörittämiseen
 6. Työntötkki tai viivain
-

ESBL-, AmpC- ja karbapenemaasituoton tutkiminen kiekkoherkkyysmenetelmillä

9 Elatusaineet ja reagenssit**9.1 Elatusaineet**

1. veriagar
2. 0.9 % NaCl tai ei-selektiivinen kasvatusliemi (tryptic soy broth, BHI-liemi, Müller-Hinton -liemi)
3. Müller-Hinton-II -agar (perusalusta)

Maljan paksuuden tulee olla sen keskikohdassa n. 4 mm. Maljojen valmistajasta riippuen tällainen malja saadaan, kun 9 cm maljalle valetaan 22-25 ml agaria.

9.2 Antibioottikiekot

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

Kiekko A:	CPD10 (kefpodoksiimi)
Kiekko B:	CPD10 + ESβL inhibiittori
Kiekko C:	CPD10 + AmpC inhibiittori
Kiekko D:	CPD10 + ESβL inhibiittori + AmpC inhibiittori

Ertapenem 10 µg (CT1761B, Oxoid)

Meropenem 10 µg (CT0774B, Oxoid)

Karbapenemaasituoton varmistus: Rosco Neo-Sensitabs ConfirmID
(Carbapenemase/Metallo-β-Lactamase Confirmative Identification Pack) kiekot

Meropenem 10 µg, koodi MRP10

Meropenem 10 µg + boronihappo, koodi MR+BO

Meropenem 10 µg + kloksasilliini, koodi MR+CX

Meropenem 10 µg + dipikoliinihappo, koodi MR+DP

10 KontrollikannatESBL - AmpC -tuotto:

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

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603, Evira 639, ESBL-positiivinen

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

Ertapeneemi- ja meropenemikiekoille käytetään vain negatiivista kontrollikantaa

E. coli ATCC 25922, Evira 257

Karbapenemaasituotto:

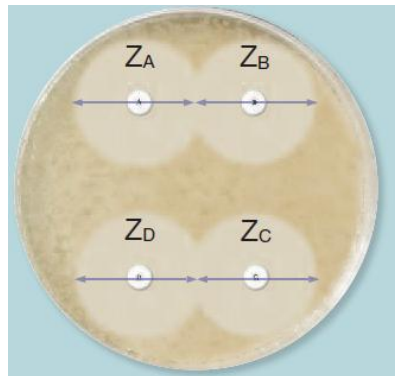
Klebsiella pneumoniae ATCC 700603, Evira 639, KPC ja MBL-negatiivinen

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

ESBL-, AmpC- ja karbapenemaasituoton tutkiminen kiekkoherkkyysmenetelmillä

11 Suoritus

Toimi Evira 3484 -menetelmäohjeen kohdan 10 mukaisesti. Ei-selektiivisessä alustassa (liemessä) kasvatettua bakteerisuspensiota levitetään kahdelle Müller-Hinton-II maljalle. Näistä toiselle asetetaan Mast D68C kiekot A, B, C ja D alla olevan kuvan mukaisesti. Toiselle maljalle asetetaan meropeneemikiekko (CT0774B) ja ertapeneemikiekko (CT1761B).



Kuva: Mast A, B, C ja D kiekkojen asettaminen maljalle

Kiekkojen ympärille syntyneiden estokehien halkaisijat (kuva) mitataan mm-mitalla tai työntötulkilla.

Mikäli estokehän halkaisija meropeneemikiekon ympärillä on suurempi kuin 22 mm, kanta ei ole karbapenemaasien tuottaja. Mikäli halkaisija on pienempi kuin 16 mm, resistenssiä selvitetään tarkemmin karbapenemaasi kiekkosarjan avulla. Välillä 16 – 22 mm olevan estokehän tulkinnasta päätetään tapauskohtaisesti. Edellä kuvatulla tavalla tehdyille Müller-Hinton II maljalle asetetaan MRP10, MR+BO, MR+CX ja MR+DP kiekot yllä olevassa kuvassa esitetyllä tavalla. Kiekkojen järjestyksellä ei ole merkitystä. Kiekkojen ympärille syntyneiden estokehien halkaisijat mitataan mm-mitalla tai työntötulkilla.

Mikäli estokehän halkaisija ertapeneemikiekon ympärillä on suurempi kuin 25 mm, kanta ei ole karbapenemaasien tuottaja. Mikäli halkaisija on pienempi kuin 22 mm, kannan jatkotutkimuksista sovitaan erikseen. Välillä 22 – 25 mm olevan estokehän tulkinnasta päätetään tapauskohtaisesti.

12 Tulokset**12.1 Tulosten tulkinta**

Mittaa estovyöhykkeen halkaisija millimetrin tarkkuudella kirkkaan estovyöhykkeen reunasta eli kohdasta, jossa bakteerikasvu heikkenee jyrkästi. Valitse mittauspisteet siten, että ne ovat mahdollisimman kaukana viereisistä kiekkoista ja maljan reunasta. Mittaa estokehän reunassa oleva, heikosti havaittava huntumainen kasvu mukaan estovyöhykkeeseen.

ESBL-, AmpC- ja karbapenemaasituoton tutkiminen kiekkoherkkyysmenetelmillä

Mast D68C kiekotESBL -tuottaja: $Z_B - Z_A$ ja $Z_D - Z_C \geq 5$ mm ja $Z_D - Z_B$ ja $Z_C - Z_A < 5$ mmAmpC -tuottaja: $Z_B - Z_A$ ja $Z_D - Z_C < 5$ mm ja $Z_D - Z_B$ ja $Z_C - Z_A \geq 5$ mmESBL ja AmpC -tuottaja: $Z_D - Z_C \geq 5$ mm ja $Z_B - Z_A < 5$ mmESBL ja AmpC -negatiivinen: kaikkien kehien erot ≤ 2 mm (vrt kuva)**Roscon karbapenemaasikiekkosarja**

Estokehän laajuus verrattuna MRP10 kiekon estokehään

MR+BO	MR+CX	MR+DP	Tulkinta
≥ 5 mm	≥ 5 mm	≤ 3 mm	AmpC (+ mahd. poriinin menetys)
≥ 5 mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	KPC
≤ 3 mm	≤ 3 mm	≥ 5 mm	M β L
≥ 5 mm	≤ 3 mm	≥ 5 mm	mahd. KPC sekä M β L

AmpC, KPC ja M β L -negatiivinen: kaikkien kehien erot ≤ 2 mm

Tulkinnan helpottamiseksi on molempia testejä varten laadittu MS Excel taulukot, joihin syötetään vain estokehien mitatut halkaisijat. Taulukot

MAST_ESBL_AmpC_laskin.xlsm ja Rosco_karbapenemaasi_laskin.xlsm sijaitsevat AMBIn hakemistossa ESBL.

12.2. Tulosten ilmoittaminen

Vastaa testin tulos samassa vastauksessa VetMIC-tuloksen kanssa käyttäen seuraavia koodeja:

esblneg: Tutkittu kanta ei tuota laajakirjoista β -laktamaasia (ESBL)esblpos: Kanta tuottaa laajakirjoista β -laktamaasia (ESBL)ampcneg: Tutkittu kanta ei tuota AmpC β -laktamaasiaampcpos: Tutkittu kanta tuottaa AmpC β -laktamaasia

Elmo-tutkimusvastauksessa kaikkien beetalaktaamien tulokset luokitellaan resistenteiksi, myös amoksisilliini-klavulaanin hapon.

Karbapenemaasimäärityksen tulosta ei toistaiseksi lisätä tutkimustodistukseen ilmiäsuun perustuvan tyyppityksen epävarmuustekijöiden takia. Meropeneemille resistentit bakteerikannat toimitetaan genotyyppitykseen Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitokseen (THL/Jari Jalava). Näytteen lähettämisestä on sovittava aina erikseen.

12.3 Kontrollikantojen käyttö*E. coli* ATCC 25922: testattava ESBL -AmpC -kiekkosarjalla*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603: testattava molemmilla kiekkoisarjoilla*Klebsiella pneumoniae* BAA-1705: testattava karbapenemaasikiekkosarjalla

ESBL-, AmpC- ja karbapenemaasituoton tutkiminen kiekkoherkkyysmenetelmillä

13 Menetelmän status

- | | |
|---|-------------------------------------|
| Kansainvälisen menetelmäkokoelman menetelmä | <input type="checkbox"/> |
| Virallinen menetelmä | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Sisäinen menetelmä | <input type="checkbox"/> |

14 Laadunvarmistusmenetelmät

- | | |
|---|-------------------------------------|
| Laboratorioiden väliset vertailututkimukset | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Menetelmävertailut | <input type="checkbox"/> |
| Vertailukantojen/kontrollikantojen käyttö | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Siirrostetut näytteet | <input type="checkbox"/> |
| Rinnakkaismääritykset | <input type="checkbox"/> |
| Kontrollikiekot | <input type="checkbox"/> |
| Valvontakortit/vihko | <input type="checkbox"/> |

15 Viitteet

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.

Bakteerien 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, Teknillinen korkeakoulu, kemian ja materiaalitieteiden tiedekunta, 2009.

Kansanterveyslaitos, mikrobiekologian laboratorio, ESBL-taustaa, http://www.ktl.fi/portal/suomi/osastot/bato/yksikot/mikrobioekologian_laboratorio/tutkimus/laajakirjoiset_beetalaktamaasit_esbl/ 22.10.2010.

Rosco Diagnostican karbapenemaasi testisarja <http://www.eurobio.fr/images/Image/File/ROSCO/Fiche%20technique%20Carbapenemases%20-%20Metallo-B-Lactamase.pdf>

16 Muutokset edelliseen versioon

Päivitetty kohdat 6 ja 10.

Tämän ohjeen laadinta: Suvi Nykäsenoja, Katariina Pekkanen 25.6.2015
