



# ESBL-, AmpC- ja karbapenemaasituoton tutkiminen kiekkoherkkyysmenetelmillä

## 1 Menetelmäviitteet ja poikkeamat

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard – Fourth Edition. CLSI document VET01-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. 3rd ed. CLSI Supplement VET01S. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.

Käyttöohje MASTDISCS™ ID AmpC and Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Detection Discs. Mast Group Ltd. [www.mastgrp.com](http://www.mastgrp.com).

## 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 merkitsevästi. Jos alentunutta herkkyyttä 3. polven kefalosporiineille todetaan muilla enterobakteereilla, sovitaan jatkotutkimuksista tapauskohtaisesti.

## 3 Määritelmä(t)

Laajakirjoiset  $\beta$ -laktamaasit (ESBL, extended-spectrum  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -laktamaaseja ei katsota varsinaisiksi ESBL-entsyymeiksi. ESBL-inhibiittorit (esim. klavulaanihappo) eivät estä niiden toimintaa. Ne hajottavat kuitenkin yhtä laajasti  $\beta$ -laktamiantibiootteja kuin ESBL:t. Myös AmpC tyyppin geenit voivat olla bakteerisuvusta riippuen sekä kromosomaalisia että plasmideissa. Kromosomaalisia geenejä ei yleensä ilmenetä, ja AmpC-fenotyyppi johtuu useimmiten entsyymin plasmidivälitteisestä tuotannosta.

Karbapenemaasit ovat laajakirjoisimpia  $\beta$ -laktamaaseja.



Mikrobiologia

## ESBL-, AmpC- ja karbapenemaasituoton tutkiminen kiekkoherkkyysmenetelmällä

---

### 4 Periaate

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

Karbapenemaasituottajien seulontaan käytetään meropeneemiä ja ertapeneemiä. Näille antibiooteille herkkyydeltään alentuneet kannat testataan nestelaimennusmenetelmällä (Evira 3591).

### 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 ylittävät keftatsidiimiresistenssiä aiheuttavaa SHV-1-entsyymiä (ei ESBL).

### 6 Työturvallisuus

Mikrobiologisessa laboratoriossa työskennellessä noudatetaan toimintaohjetta LAB 223. Laajakirjoisia beetalaktamaaseja 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. Työntötulppi tai viivain

### 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)
-



Mikrobiologia

## ESBL-, AmpC- ja karbapenemaasituoton tutkiminen kiekkoherkkyysmenetelmällä

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)

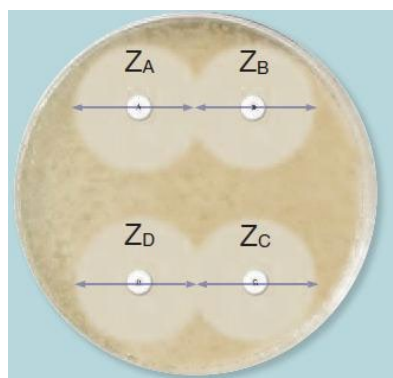
### 10 Kontrollikannat

*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 meropeneemikiekoille käytetään vain negatiivista kontrollikantaa  
*E. coli* ATCC 25922, Evira 257

### 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). Älä käytä pakkausten päällimmäistä kiekkoa vaan heitä se päivittäin pois.



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

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



Mikrobiologia

## ESBL-, AmpC- ja karbapenemaasituoton tutkiminen kiekkoherkkyysmenetelmällä

---

Mikäli estokehän halkaisija meropeneemikiekon ympärillä on pienempi kuin 22 mm tai ertapeneemikiekon ympärillä pienempi kuin 25, tutkitaan kanta nestelaimennusmenetelmällä menetelmäohjeen Evira 3591 mukaan EUVSEC2-paneelilla. Jos kanta näyttää myös nestelaimennusmenetelmällä herkkyydeltään alentuneelta, resistenssitekijät on syytä selvittää genotyyppisesti.

## 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.

#### Mast D68C kiekot

ESβL -tuottaja:  $Z_B - Z_A$  ja  $Z_D - Z_C \geq 5$  mm ja  $Z_D - Z_B$  ja  $Z_C - Z_A < 5$  mm

AmpC -tuottaja:  $Z_B - Z_A$  ja  $Z_D - Z_C < 5$  mm ja  $Z_D - Z_B$  ja  $Z_C - Z_A \geq 5$  mm

ESβL ja AmpC -tuottaja:  $Z_D - Z_C \geq 5$  mm ja  $Z_B - Z_A < 5$  mm

ESβL ja AmpC –negatiivinen: kaikkien kehien erot  $\leq 3$  mm (vrt kuva)

Tulkinnan helpottamiseksi testiä varten on laadittu MS Excel taulukko, johon syötetään vain estokehien mitatut halkaisijat. Taulukko MAST\_ESBL\_AmpC\_laskin.xlsm sijaitsee ANTI:n hakemistossa ESBL.

### 12.2. Tulosten ilmoittaminen

Vastaa testin tulos käyttäen seuraavia koodeja:

ESBL-tuotto todettiin/ei todettu

AmpC-tuotto todettiin/ei todettu

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

Karbapenemaasin tuottoa ei tämän menetelmän tulosten perusteella ilmoiteta, vaan mahdollisten lisätestien jälkeen.

### 12.3 Kontrollikantojen käyttö

*E. coli* ATCC 25922 (Evira 257): testattava ESBL/AmpC-kiekkosarjalla sekä ertapeneemi- ja meropeneemikiekoilla viikoittain (ei kuitenkaan silloin, jos tutkittavia kantoa ei ole)

*E. coli* ATCC 25922 (Evira 257) -, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (Evira 639) - ja *E. coli*, 21.6.2010/62 (EC-4.7) -kannoilla tehdään Mast Groupin kiekkojen testaus kuukausittain.

---



Mikrobiologia

## ESBL-, AmpC- ja karbapenemaasituoton tutkiminen kiekkoherkkyysmenetelmillä

---

### 13 Menetelmän status

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

### 14 Laadunvarmistusmenettelyt

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

Menetelmän laatua arvioidaan menetelmävertailun avulla vuosittain: kantoina käytetään EURL:n lähettämiä *E. coli* -kantoja ja tämän menetelmän antamia tuloksia verrataan Evira 3591 -menetelmällä saatuihin tuloksiin. Lisäksi käytetään viikoittaisia ja kuukausittaisia kontrollikantoja.

### 15 Viitteet

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard – Fourth Edition. CLSI document VET01-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. CLSI Supplement M100S. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016.

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

Jaakkonen, A., Laajakirjoisen  $\beta$ -laktamaasiresistenssiyden kehittyminen ja detektio, kandidaatintyö, Teknillinen korkeakoulu, kemian ja materiaalitieteiden tiedekunta, 2009.

### 16 Menetelmän käyttöönottovuosi

Menetelmä on otettu käyttöön vuonna 2011.

### 17 Muutokset edelliseen versioon

Päivitetty menetelmäviitteet sekä lisätty Mast Groupin oma ohje.  
Tarkennettu kontrollikantojen käyttö kohtiin 10 ja 12.3.  
Poistettu Roscon kiekkosarja karbapenemaasituoton osoittamiseksi ja muutettu mahdollisten karbapenemaasituottajien jatkotestaus.  
Päivitetty kohta 12.2 tulosten ilmoittaminen.

---



Mikrobiologia

## ESBL-, AmpC- ja karbapenemaasituoton tutkiminen kiekkoherkkyysmenetelmillä

---

Päivitetty kohta 14 laadunvarmistusmenettelyt.  
Lisätty kohta 16 menetelmän käyttöönottovuosi.  
Päivitetty viitteet.

Tämän ohjeen laadinta: Suvi Nykäsenoja 13.2.2018

14.2.2018 Siirryttäessä IMS toimintajärjestelmään, versiointi aloitettu alusta (v1).  
Tekninen päivitys

19.12.2018 Ylätunniste päivitetty organisaatiomuutoksen (1.1.2019) mukaisesti.  
Tekninen päivitys.