



Undersökning av ESBL-, AmpC- och karbapenemasproduktion med diskdiffusionsmetoden

1 Metodreferenser och avvikelser

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.

Anvisning MASTDISCS™ ID AmpC and Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Detection Discs. Mast Group Ltd. www.mastgrp.com.

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 enzymer som kan hydrolysera tredje generationens cefalosporiner (t.ex. cefotaxim) och monobaktamer (t.ex. aztreonam) och ibland också karbapenemer (t.ex. imipenem). De kan vanligen också bryta ned penicilliner och första och andra generationens cefalosporiner. Gener som kodar för β -laktamaser med utvidgat spektrum förekommer särskilt hos gramnegativa bakterier av familjen *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* och *Salmonella* spp). 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 enzymer numreras familjevis, exempel TEM-3.

β -laktamaser av AmpC-typ anses inte vara egentliga EsBL enzymer. EsBL inhibitorer (t.ex. klavulansyra) förhindrar inte deras verksamhet. De bryter ändå ner β -laktamantibiotika i lika hög grad som EsBL. 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.



Säkerställande av ESBL-, AmpC och karbapenemasproduktion med diskdiffusionsmetoden

4 Princip

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

Vid screening för karbapenemasproducenter används meropenem och ertapenem. Stammar med nedsatt känslighet för dessa antibiotika testas med buljongspädningsmetoden (Evira 3591).

5 Eventuella felkällor

För prestatationstekniska 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 -standard eller nefelometer
4. Sterila bomullspinnar
5. Drejskiva för rotation av petriskålar
6. Skjutmått eller linjal



Livsmedels- och fodemikrobiologi

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, Müller-Hinton -buljong)
3. Müller-Hinton-II -agar (bassubstrat)

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.

Säkerställande av ESBL-, AmpC och karbapenemasproduktion med diskdiffusionsmetoden

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)

10 Kontrollstammar

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

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 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). Använd inte den översta lappen i förpackningen, utan släng den dagligen.

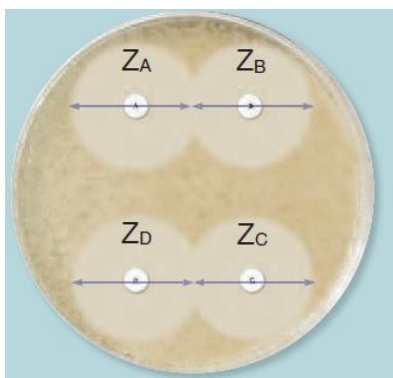


Bild: Placering av Mast A, B, C och D lappar på plattan

Diametern på inhiberingszonerna som uppstått kring lapparna (bilden) mäts med mm- mått eller med skjutmått.

Om inhiberingszonens diameter kring meropenemlappen är mindre än 22 mm eller mindre än 25 mm kring ertapenemdisken undersöks stammen med buljongspädningsmetoden enligt metodbeskrivning Evira 3591 med EUVSEC2-panel. Om stammen också med buljongspädningsmetoden visar sänkt känslighet, är det skäl att utreda resistensfaktorerna enligt genotyp.



Säkerställande av ESBL-, AmpC och karbapenemasproduktion med diskdiffusionsmetoden

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 ≤ 3 mm (jfr bilden)

För att underlätta tolkningen har en MS Excel-tabell utarbetats för testet, i vilken endast inmatas inhiberingszonernas uppmätta diameter. Tabellen MAST_ESBL_AmpC_laskin.xlsm finns i ANTIs katalog ESBL.

12.2. Hur resultaten anges

Ange resultatet av testet med följande koder:

ESBL-produktion påvisades/påvisades inte

AmpC-produktion påvisades/påvisades inte

I Elmo analysresultat klassificeras alla resultat för betalaktamer som resistent, också amoxicillin-klavulansyra.

Produktion av karbapenemas meddelas inte utgående från resultaten enligt denna metod, utan efter eventuella tilläggstester.

12.3 Användning av kontrollstammar

E. coli ATCC 25922 (Evira 257): ska testas med ESBL/AmpC diskserie samt ertapenem- och meropenemdiskar varje vecka (men ändå inte om det inte finns några stammar att undersöka).

E. coli ATCC 25922 (Evira 257), stammarna *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (Evira 639) och *E. coli*, 21.6.2010/62 (EC-4.7) testas med Mast Groups diskar varje månad.

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
Metodjämförelser
Användning av referensstammar/kontrollstammar
Inokulerade prover
Parallellbestämningar
Kontrollappar
Kontrollkort/häfte



Metodens kvalitet bedöms årligen med hjälp av metodjämförelse: som stammar används stammar av *E. coli* som sänts av EURL och resultaten som denna metod ger ska jämföras med resultaten som man fått med metoden Evira 3591. Dessutom används kontrollstammar per vecka och per månad.

15 Referenser

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.

Bakterien lääkeherkkyyden 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.

16 Årtal då metoden togs i bruk

Metoden togs i bruk år 2011.

17 Ändringar sedan senaste version

Metodreferenserna har uppdaterats och Mast Groups egen anvisning har lagts till.
Användningen av kontrollstammar har preciserats på punkterna 10 och 12.3.
Rosco diskserie för påvisande av produktion av karbapenemas har tagits bort och fortsatt testning av eventuella producenter av karbapenemas har ändrats.
Punkt 12.2 om meddelande av resultaten har uppdaterats.
Punkt 14 Kvalitetssäkringsmetoder har uppdaterats.
Punkt 16 Årtal då metoden togs i bruk har lagts till.
Referenserna har uppdaterats

Denna anvisning sammanställdes av: Suvi Nykäsenoja 13.2.2018

14.2.2018. Vid övergången till IMS verksamhetssystem började numreringen av versionerna om från början (v1). Teknisk uppdatering