

*Iztok Štrumbelj, Mateja Pirš*

# **Dokument SKUOPZ 002. Smernice za mikrobiologe - ugotavljanje ESBL in AmpC mehanizmov odpornosti pri enterobakterijah**

(delovno gradivo za mikrobiologe)

**Slovenska komisija za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila  
(SKUOPZ), december 2013**

*Dokument so pregledali člani delovne skupine SKUOPZ-a za gramnegativne bakterije in člani Slovenske komisije za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila (SKUOPZ) (navedeno po abecednem vrstnem redu ustanov):*

**Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo - Medicinska fakulteta Ljubljana**

Manica Mueller-Premru  
Katja Seme

**Inštitut za varovanje zdravja republike Slovenije**

Jana Kolman

**Inštitut za varovanje zdravja republike Slovenije - Oddelek za medicinsko mikrobiologijo**

Metka Paragi  
Marija Trkov

**Splošna bolnišnica Slovenj Gradec - Oddelek za mikrobiologijo**

Irena Piltaver-Vajdec

**Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergije Golnik - Laboratorij za mikobakterije**

Manca Žolnir Dovč

**Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergije Golnik - Laboratorij za respiratorno mikrobiologijo**

Viktorija Tomič

**Zavod za zdravstveno varstvo Celje - Laboratorij za medicinsko mikrobiologijo**

Barbara Zdolšek

**Zavod za zdravstveno varstvo Koper - Oddelek za medicinsko mikrobiologijo**

Martina Kavčič

**Zavod za zdravstveno varstvo Kranj - Laboratorij za medicinsko mikrobiologijo**

Helena Ribič

**Zavod za zdravstveno varstvo Maribor - Center za mikrobiologijo**

Slavica Lorenčič Robnik

**Zavod za zdravstveno varstvo Nova Gorica - Laboratorij za klinično mikrobiologijo**

Ingrid Berce

**Zavod za zdravstveno varstvo Novo mesto - Oddelek za medicinsko mikrobiologijo**

Tatjana Harlander

Predlagano citiranje:

Iztok Štrumbelj, Mateja Pirš. *Dokument SKUOPZ 002. Smernice za mikrobiologe - ugotavljanje ESBL in AmpC mehanizmov odporosti pri enterobakterijah* [internet]. Slovenska komisija za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila (SKUOPZ); december 2013. 1. izdaja. Dosegljivo na: <http://www.imi.si/strokovna-zdruzenja/skuopz>

Opomba: Smernice sledijo vodilom EUCAST (referenca 1), začetek uporabe smernic je predviden skupaj s prehodom na EUCAST.

»Še zlasti zaskrbljujoče je, da je pojav odpornost zoper protimikrobna zdravila trdovratne ali nepovratne narave, navkljub izvajanju ukrepov za zamejitev in smiselno rabo protimikrobnih zdravil.

Posledično je zgodnje uvajanje in izvajanje ukrepov za zaviranje razvoja in zaježitev širjenja odpornosti zoper protimikrobna zdravila ključnega pomena za uspeh javnozdravstvene strategije.«

\*“It is particularly worrisome that once it develops, AMR (antimicrobial resistance) is either irreversible or very slow to reverse despite the introduction of AMR containment and stewardship programmes. Consequently, early implementation of interventions to avoid the initial development and/or spread of AMR can be considered a key public health policy.”

Vir: World Health Organization. **The evolving threat of antimicrobial resistance - Options for action.** World Health Organization, 2012.

Prosto dostopna elektronska knjiga:

<http://www.who.int/patientsafety/implementation/amr/en/index.html> Dostop 16. 5. 2013.

## Področje smernic SKUOPZ (splošen pristop komisije)

Področje smernic SKUOPZ-a je praktična uporaba standardnih metod antibiograma (znotraj EUCAST ali CLSI sistema) v Sloveniji in različne metode za ugotavljanje mehanizmov odpornosti ter metode za osamitev odpornih bakterij iz vzorcev (gojišča, postopki).

Smernice so širši, razlagalni in vsebinsko širši dokumenti; skrajšan povzetek smernic za neposredno delo in dopolnilna podrobna navodila za posamezne postopke so v dodatnih dokumentih.

Standardni metodi antibiograma sta le dve:

- standardna dilucija (ki je zaenkrat ne uporabljamo)
- standardna disk-difuzija.

Vse ostale metode so komercialne in se SKUOPZ z njimi praviloma ne ukvarja, razen izjemoma\*:

- če smernice napotijo na ugotavljanje minimalnih inhibitornih koncentracij (MIK) pri določenem antibiotiku
- če je komercialno metodo koristno omeniti v postopkih za ugotavljanje mehanizmov odpornosti.

Za vse komercialne metode velja, da se v laboratoriju lahko uporabljajo, če so za namen uporabe validirane v strokovni literaturi ali v laboratorijih samih.

SKUOPZ spodbuja sodelovanje in delitev dela med laboratoriji, kadar so interne validacije potrebne in se, če validacijski laboratoriji to dovolijo, čim prej zaupno seznanja z rezultati še pred morebitnimi objavami teh validacij.

Laboratoriji se, da bi prihranili čas pri zbiranju podatkov, med seboj lahko seznanjajo z različnimi komercialnimi reagenti (imena, kataloške številke...) in dobavitelji, vendar podatki niso priporočilo laboratorija oz. osebe, ki podatke priskrbi, ampak zgolj informacija, ki jo ostali laboratoriji uporabijo po lastni presoji.

\* Analogen je npr. pristop EUCAST-a in EUCAST-ove delovne skupine za mehanizme odpornosti:

- EUCAST ne omenja komercialnih avtomatskih metod ali npr. gradient–difuzijske metode (kjer je antibiotik nanešen na testni listič v naraščajoči koncentraciji). Na svoji spletni strani navaja le proizvajalce različnih proizvodov za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila in se do njih ne opredeljuje.
- Delovna skupina EUCAST-a za mehanizme odpornosti izjemoma omenja nestandardne metode, npr. pri stafilokokih, da je primerna metoda za določitev MIK gradient-difuzija. Proizvajalce omenja zelo redko, ko želi navesti validirane metode iz literature ali edinega proizvajalca: npr. Rosco diske pri mehanizmih za ugotavljanje odpornosti proti karbapenemom, ker trenutno ni drugih proizvajalcev z naborom vseh diskov /tablet.

## **VSEBINA**

1. KRATICE IN KRATKA POJASNILA

2. NAMEN BESEDILA

3. IZHODIŠČA: ESBL IN AmpC MEHANIZEM ODPORNOSTI, KOMBINACIJE BETALAKTAMAZ

4. UGOTAVLJANJE OBČUTLJIVOSTI ZA CEFALOSPORINE ZA KLINIČNE NAMENE

4.a - DOLOČITEV S, I, R KATEGORIJE V IZVIDU BOLNIKA;

4.b - OPOMBA V IZVIDU PRI ZA CEFALOSPORINE 3. GENERACIJE OBČUTLJIVIH IZOLATIH DRUGE SKUPINE ENTEROBAKTERIJSKIH VRST

5. UGOTAVLJANJE ESBL IN AmpC – SPLOŠNA NAČELA IN PRESEJALNI TESTI

6. UGOTAVLJANJE ESBL – POTRDITVENI TESTI

7. UGOTAVLJANJE AmpC – POTRDITVENI TESTI

8. SHEMA POSTOPKA ZA UGOTAVLJANJE ESBL PO IDENTIFIKACIJI IZOLATA IZ DRUŽINE *ENTEROBACTERIACEAE* IN PO POZITIVNEM PRESEJALNEM TESTU NA PRISOTNOST ESBL.

9. REFERENCE

**CELOTNA VSEBINA TEGA DOKUMENTA SE NANAŠA LE NA PODROČJE OBČUTLJIVOSTI / ODPORNOSTI ENTEROBAKTERIJ, S Poudarkom NA CEFALOSPORINIH 3. IN 4. GENERACIJE.**

**SKORAJ V CELOTI SE BESEDILO OMEJUJE LE NA FENOTIPSE METODE.**

## 1. NEKATERE KRATICE IN KRATKA POJASNILA

AM	-	avtomatske metode za antibiogram – različne ploščice in kartice z antibiotiki v različnih koncentracijah, rezultati interpretirani z algoritmi aparata v S, I in R kategorijo.
AmpC	-	AmpC betalaktamaze
BL	-	betalaktamaze
CAZ	-	ceftazidim
CRO	-	ceftriakson
CTX	-	cefotaksim
ESBL	-	betalaktamaze razširjenega spektra - iz angl. "extended-spectrum beta-lactamases"
ESDRem	-	EUCAST Subcommittee for Detection of Resistance Mechanisms
FEP	-	cefepim
FOX	-	cefoksitin
GD	-	gradient-difuzija
kk	-	klavulanska kislina
MEM	-	meropenem
MHA	-	Mueller Hinton agar
MIK	-	minimalna inhibitorna koncentracija
PMZ	-	protimikrobna zdravila
SDD	-	standardna disk-difuzija
SMD	-	standardna mikrodilucija

### POJASNILA - KAKO DOLOČENE POJME RAZUMEMO V TEM BESEDILU:

**Klinični pomen:** pomen za uporabo določenega antibiotika za zdravljenje določenega bolnika.

**Epidemiološki pomen:** pomen za druge osebe – za ukrepe bolnišnične higiene ali za širše okolje.

## 2. NAMEN BESEDILA

Smernice so namenjene mikrobiologom. Temeljijo na ugotovitvi, da je ugotavljanje ESBL in AmpC pri enterobakterijah potrebno zaradi obvladovanja okužb in zaradi javno zdravstvenih razlogov (1). Ker je AmpC odpornost v Evropi večinoma redka (1), smo se pri AmpC odpornosti omejili na najpogostejši vrsti *E. coli* in *K. pneumoniae*.

Tretje poglavje – Izhodišča – navede nekaj osnov, da je branje smernic za praktično delo razumljivejše – branje za izvajanje praktičnega dela v laboratoriju ni potrebno, je zgolj pojasnjevalne narave. Poglavje je poenostavljeno, gre za smiselno povzeto literaturo, kakor jo razumeta avtorja in ne za pregleden članek neskončno zapletene teme.

Postopki (od četrtega poglavja naprej) so namenjeni praktičnemu delu v laboratoriju. V teh poglavjih, ki so podlaga za praktično delo, so postopki utemeljeni z referencami in napisani algoritemsko in jedrnato.

### CILJ PRAKTIČNIH POSTOPKOV:

- **Ugotavljanje ESBL pri vseh vrstah enterobakterij, ne glede na to, ali imajo prisotno naravno ali pridobljeno AmpC odpornost**
- **Ugotavljanje AmpC pri vrsti *Escherichia coli* in pri vrsti *Klebsiella pneumoniae*.**

## 3. IZHODIŠČA: ESBL IN AMPC MEHANIZEM ODPORNOSTI, KOMBINACIJE BETALAKTAMAZ

### KARBAPENEMAZE

Če ima sev karbapenemaze, je ugotovitev dodatne prisotnosti AmpC ali ESBL odpornosti za praktično ukrepanje manj pomembna, saj so karbapenemaze epidemiološko pomembnejše. Glej dokument SKUOPZ 001.

Za raziskovalne namene za ugotovitev sočasnih mehanizmov odpornosti lahko uporabimo molekularne metode; če želimo fenotipsko ugotavljati prisotnost ESBL v izolatu s karbapenemazami, moramo blokirati karbapenemazno aktivnost z boronično kislino (karbapenemaze razreda A) ali dipikolinično kislino (metalobetalaktamaze).

### ESBL

ESBL so bakterijski encimi, ki razgrajujejo številne betalaktamske antibiotike, vključno s cefalosporini tretje generacije, karbapenemov praviloma ne razgrajujejo in klavulanska kislina jih praviloma zavira. To ne pomeni, da so vsi izolati z ESBL klinično občutljivi za amoksisilin s klavulansko kislino - nekateri so, nekateri niso.

Po nekaterih avtorjih je opredelitev ESBL mnogo širša. Teoretično je opredelitev težka, a v praksi ni večjih težav v medsebojni komunikaciji.

Večina genov za ESBL je na plazmidih, ki poleg odpornosti proti laktamom beta pogosto vsebujejo gene za odpornost proti številnim drugim PMZ (npr. proti kinolonom, trimetoprimu s sulfametoksazolom, aminoglikozidom), tako da so bakterije z ESBL primer večkratno odpornih mikroorganizmov, proti katerim katere delujejo le redka PMZ.

### AmpC

#### **Osnove AmpC**

Po strukturalni klasifikaciji po Amblerju AmpC beta laktamaze (AmpC) sodijo v molekularni razred C (serinske BL). Po funkcionalni klasifikaciji po avtorjih Bush, Jacoby, Medeiros, sodijo v skupino 1: po imenu so cefalosporinaze, a imajo širok spekter substratov, praviloma jih običajni klinični inhibitorji betalaktamaz ne inhibirajo (klavulanska kislina, sulbaktam, tazobaktam), nasprotno, klavulanska kislina je induktor; za mikrobiološko diagnostiko se lahko uporabljajo različni drugi inhibitorji AmpC (boronična kislina, kloksacilin).

**Geni za AmpC so lahko na kromosomih (naravno prisotne BL AmpC) ali na plazmidih (»pridobljene BL AmpC«).**

## AmpC na kromosomih

Vrste, kjer kromosomskih AmpC ni:

- *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*
- Rod: *Proteus*
- Rod: *Salmonella*
- *Citrobacter diversus* (*koseri*), *C. amalonaticus*
- (tudi nekatere klinično redke vrste iz roda *Enterobacter*)

Vrste, kjer kromosomske AmpC so, a praviloma z neznatno in zato nepomembno ekspresijo (se fenotipsko ne izražajo, niso ne inducibilne ne konstitutivne):

- *Escherichia coli*
- rod: *Shigella*

Najpomembnejše vrste, kjer so kromosomske AmpC prisotne in klinično pomembne (inducibilno izražanje ali stabilna derepresija = konstitutivno izražanje), t. i. enterobakterijska skupine 2 po ESDReM:

- *Enterobacter aerogenes* in *E. cloacae*
- *Citrobacter freundii* kompleks
- *Serratia* spp.
- *Morganella morganii*
- *Providencia* spp.
- *Hafnia alvei*

Pri navedenih vrstah enterobakterij skupine 2 je inducibilnost naravno stanje stvari – od tod izvira naravna odpornost teh vrst. AmpC strukturni gen je brez antibiotika **pod vplivom svojih represorjev** in se brez induktorjev (induktorji so npr. betalaktamska PMZ) skorajda ne izraža (minimalna osnovna sinteza BL AmpC).

Betalaktamski antibiotiki so različno močni induktorji in hkrati substrati AmpC: sami torej spodbudijo izražanje strukturnega gena in se bolj (dobri substrati) ali manj (slabi substrati) razgrajujejo, ko AmpC nanje deluje. Ali je bakterija za antibiotik naravno občutljiva ali ne, je odvisno **od količine encima** (kako močna je indukcija) in **občutljivosti za razgradnjo antibiotika**. Naravna občutljivost skupine 2 kot posledica inducibilne AmpC je shematsko (za razlago, ni vedno natančno taka) navedena v vrstici spodnje tabele »naravni fenotip«.

Če pa se zgodi mutacija, prenehanje delovanja represorskih genov, se zgodi konstitutivna sekrecija AmpC – občutljivost teh sevov je navedena v vrstici spodnje tabele »konstitutivna odpornost« – sev ima zdaj konstitutivno odpornost, stalno izloča AmpC, brez indukcije. Ta lastnost je zdaj stalna in sev se lahko klonalno širi.

Problem je, da do te mutacije precej pogosto pride spontano; **pri različnih vrstah in različnih okužbah se to zgodi različno pogosto** (najpogosteje *Enterobacter* pri sepsi, 20 %). Prej občutljivi sev postane odporen proti cefalosporinom 3. generacije že med zdravljenjem. Tako CLSI kot EUCAST zato pri teh sevih predlagata opombo, ki opozarja na opisano možnost nastanka odpornosti.

Glej poglavje 4b.

	AM	AMC	Cef.1.g.	CXM	TZP	CAZ	CTX CRO	Cefepim	Karbapenemi
Naravni fenotip	R	R	R	Varia- bilno	S	S	S	S	S
Konstitutivna odpornost	R	R	R	R	R	R	R	S	S

Prehod nezaznavne produkcije AmpC v pomembno količino AmpC se lahko zgodi tudi pri *E. coli*: ali se spremeni promotor (bolj učinkovit), represor (zavrt ali odsoten), ali pa oba - zdaj sev konstitutivno proizvaja AmpC.



## AmpC na plazmidih

Do plazmidne AmpC lahko načeloma pride pri katerikoli vrsti enterobakterij. **Skoraj vse plazmidne AmpC se tvorijo konstitutivno, ne inducibilno.** Če pride do izražanja AmpC pri vrstah, ki gena za AmpC na kromosomu nimajo (npr. *K. pneumoniae*), vemo, da so pridobile plazmidno AmpC. Pri drugih vrstah, npr. pri *E. coli*, pa fenotipsko izražanje AmpC lahko pomeni kromosomske spremembe v regulaciji tvorbe AmpC ali pa pridobitev plazmida z AmpC - za razlikovanje obeh možnosti so potrebne molekularne preiskave.

Ravno širjenje plazmidnih AmpC pri *E. coli* in *K. pneumoniae* je verjetno povzročilo močno obuditev zanimanja za AmpC – ti sevi imajo pogosto pridruženo sočasno odpornost proti ne-betalaktamskim antibiotikom in imajo podobno odpornost kot ESBL sevi, z enakim epidemiološkim pomenom.

Ti sevi so v nekaterih državah (ZDA, Indija) zelo pogosti, predstavljajo več kot tretjino izolatov, odpornih proti cefalosporinom tretje generacije. V večini evropskih držav (vključno v Sloveniji) verjetno ni tako, vendar pa epidemiologija vedno lahko spremeni.

## Kombinacije ESBL, AmpC, karbapenemaz

Prof. Christian Giske je na 23. ECCMID-u omenil, da so precej pogoste kombinacije AmpC in ESBL.

Pri kombinaciji ESBL in karbapenemaz je potrebno paziti pri fenotipskih testih; karbapenemaze skupine A so različno močno inhibirane s klavulansko kislino in se pri njih lahko pojavi pozitiven ESBL test – ta problem smo praktično rešili (v bistvu zaobšli) s tem, da pri vseh sevih iščemo karbapenemaze in izolatih s karbapenemazami le-tem damo prednost pred ESBL.

Kolikor vemo, obseg problema, razen deležev ESBL pri *E. coli* in *K. pneumoniae*, v Sloveniji ni znan, a verjetno zaenkrat ravno ESBL pri *E. coli* in *K. pneumoniae* trenutno predstavlja večji del problema. Vendar je potrebno storiti korak naprej.

## ESDRem smernice, december 2013

**ESDRem** je decembra izdal veljavno verzijo smernic EUCAST (referenca 1), ki se obširno posveča betalaktamazam. V temu dokumentu naravni ali plazmidno povzročeni AmpC odpornosti veliko pozornosti posvečajo predvsem v delu o potrjevanju ESBL izolatov – predvsem v smislu, da prisotnost AmpC lahko povzroči lažno negativen ESBL test (redkejši, a možen je tudi lažno pozitiven ESBL test). Dokument tudi priporoča iskanje AmpC pri *E. coli* in *K. pneumoniae*.

### Trije načini (testi) za ugotavljanje ESBL ob (potencialni) prisotnosti AmpC odpornosti po ESDReM:

- Kombinirani disk cefepima (**FEP z in brez klavulanske kisline**).
- 4 kombinirani diski po CLSI, a na MHA z  **dodatkom kloksacilina v agarju samem**.
- 4 kombinirani diski po CLSI, a z  **dodatkom kloksacilina na vsakem od štirih diskov**.

Mehanizem delovanja FEP-a kot osnove za ESBL test pri izolatih z AmpC: ker AmpC ne razgrajuje cefepima, lahko klavulanska kislina v kombiniranem testu nemoteno inhibira prisotno ESBL in se občutljivost za cefalosporin ob dodatku klavulanske kisline poveča (povečanje cone – pozitiven ESBL test).

Mehanizem delovanja kloksacilina kot dodatka za ESBL test pri izolatih z AmpC: kloksacilin zavre AmpC, zato lahko klavulanska kislina v kombiniranem testu nemoteno inhibira prisotno ESBL in se občutljivost za cefalosporin ob dodatku klavulanske kisline poveča (povečanje cone – pozitiven ESBL test).

## RAZLIČNE OPOMBE NA RAZLIČNE TEME

**Opomba 1:** Zakaj se v postopkih v nadaljevanju govori le o kombiniranih diskih kot o edini fenotipski metodi za potrjevanje ESBL?

Druge tri (poleg kombiniranih diskov) možnosti sp:

1. ESBL test, delano z gradient difuzijsko metodo
2. ESBL test, delano s standardno mikrodilucijo
3. ESBL test kot sinergija diska cefalosporina 3. generacije z AMC diskom, pozitiven test je razširitev cone med diskoma.

Prva možnost je draga in pogosto težko odčitljiva; po ESDReM tudi manj specifična.

Druge možnosti v Sloveniji ne izvajamo.

Tretja možnost je poceni, a je potreben pri različno močnih ESBL različen razmak med diski, zato je treba včasih test ponavljati, poleg tega je metoda subjektivna, nemerljiva. Zato uporaba teh dveh metod nima smisla.

Metoda s kombiniranimi diski je poceni, enostavna za odčitavanje in da merljiv, objektivni rezultat.

ESDReM in SKUOPZ nimata stališča o avtomatskih komercialnih metodah za detekcijo BL ESBL ali AmpC.

**Opomba 2:** kot presejalni test za prisotnost AmpC pri *E. coli* in rodu *Klebsiella* ESDReM rutinsko priporoča MIK FOX. Ker bi bilo to predrago, smo prof. Giskeja vprašali, ali po njegovem mnenju lahko uporabimo cefoksitinski disk, s čimer se je strinjal. V ESDReM smernicah je navedena meja za odpornost proti FOX – (MIK > 8 mg/L je enako cona < 19 mm).

**Opomba 3:** pozitivni AmpC test pri rodu *Klebsiella* pomeni prisotnost plazmidne AmpC (ker *Klebsiella* nima kromosomske AmpC), pozitivni AmpC test pri *E. coli* pa je lahko posledica sprememb promotorjev ali represorjev na kromosomu ali pa plazmidne AmpC. Za ugotovitev, ali gre za plazmidno AmpC, potrebujemo molekularne teste. A zaenkrat le ugotavljamo delež AmpC izolatov.

**Opomba 4:** v presejalnih kriterijih v postopku ne omenjamo cefpodoksima: preseja z njim ima sicer veliko občutljivost, a slabo specifičnost. CTX/CRO in CAZ so tako ali tako del rutinskega antibiograma in zadoščajo.

**Opomba 5:** Cefepim ni cefalosporin 3. generacije.

**Opomba 6:** AmpC test I (I pomeni rimska številka ena). Pazi: pozitivna razlika je tu  $\geq 4$  mm!

AmpC test I je test, ki ugotavlja razliko med zaviralno cono (FOX + kloksacilin) in cono FOX.

Princip: cefoksitin je močno občutljiv skoraj za vse AmpC, kloksacilin pa je inhibitor AmpC.

Če FOX disku (ki ima ob prisotnosti AmpC zmanjšano cono), dodamo kloksacilin, se cona poveča.

(Cona FOX se lahko zmanjša tudi zaradi drugih vzrokov, npr. zaradi zmanjšanja porinov).

Za test sta potrebna 2 diska. Diska sta komercialno dostopna.

Amp C test I je primeren za *E. coli*, *K. pneumoniae* in *P. mirabilis* (reference 4, 6).

**Opomba 7:** AmpC test II (naveden je v ESDReM smernicah - II pomeni rimska številka dva,).

Princip: analogno ESBL testu, le da je namesto kk pri ESBL testu kot inhibitor uporabljen kloksacilin, ki je inhibitor AmpC.

Za test potrebujemo 4 diske/tablete. Tablete so komercialno dostopne.

**Opomba 8:** V ESDReM smernicah ni natančno napisano, kakšen test za AmpC s kloksacilinom je potreben - v algoritmu na strani 21 navajajo le test sinergije s kloksacilinom; v besedilu navajajo nekaj možnosti.

**Opomba 9:** Pri AmpC testih smo za inhibitor izbrali kloksacilin. **Boronična kislina** je enako dober inhibitor AmpC kot kloksacilin, o njej je **več literature**, vendar je zdaj kot inhibitor za AmpC test postala neuporabna, ker so se pojavile karbapenemaze skupine A, ki so ravno tako inhibirane z boronično kislino kot AmpC. Povečanje cone z boronično kislino lahko torej pomeni 1. ali prisotnost AmpC ali pa 2. prisotnost karbapenemaz skupine A.

#### 4. UGOTAVLJANJE OBČUTLJIVOSTI ZA CEFALOSPORINE ZA KLINIČNE NAMENE

##### 4a - DOLOČITEV S, I, R KATEGORIJE V IZVIDU BOLNIKA;

- Interpretacija rezultatov za **parenteralne cefalosporine** je skladna z »in vitro« rezultatom testiranja - **S, I ali R določamo le na osnovi MIK ali zaviralne cone diska** - ne glede na mehanizme odpornosti (2).

##### 4b - OPOMBA V IZVIDU PRI ZA CEFALOSPORINE 3. GENERACIJE OBČUTLJIVIH IZOLATIH IZ 2. SKUPINE ENTEROKTERIJSKIH VRST (2)

V izvidu pri rodovih *Enterobacter*, *Serratia* in vrstah *Citrobacter freundii* in *Morganella morganii* z rezultatom S za cefalosporine 3. generacije izolatu dodamo ustrezno opombo, da je med zdravljenjem s cefalosporini 3. generacije možen pojav odpornosti (2).

#### 5. UGOTAVLJANJE ESBL IN AmpC – SPLOŠNA NAČELA IN PRESEJALNI TESTI

##### **Enterobacteriaceae skupine 1 po ESDReM:**

*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*

##### **Enterobacteriaceae skupine 2 po ESDReM:**

*Enterobacter spp.*, *Citrobacter freundii* kompleks, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii*, *Serratia spp.*, *Hafnia alvei*

##### 5. 1. Presejalni kriteriji za ESBL po EUCAST-u – vzeti iz algoritma za ugotavljanje ESBL (1).

- POGOJ ZA USPEŠNO PRESEJANJE: ker so substratne specifičnosti ESBL različne, moramo vedno uporabiti dva cefalosporina: **CAZ** in (**CRO ali CTX**) (1). CRO in CTX imata podobno substratno specifičnost in sta med seboj zamenljiva (1). Torej: CAZ in CRO ali CAZ in CTX.
- Na ESBL je sumljiv izolat, ki ima I ali R rezultat pri vsaj enem od navedenih dveh testiranih cefalosporinov (presejalni test na ESBL je torej pozitiven).

##### 5. 2. Presejalni kriteriji za AmpC po EUCAST-u (vzeti iz algoritma za ugotavljanje AmpC in razlage na strani 16, da izražanje AmpC povzroči visoko stopnjo odpornosti proti cefalosporinom 3. generacije (1)).

Po dogovoru SKUOPZ zaenkrat omejujemo iskanje BL AmpC samo na vrsti *E. coli* in *K. pneumoniae*.

- POGOJ ZA USPEŠNO PRESEJANJE na AmpC pri teh dveh vrstah: uporabimo vsaj dva cefalosporina tretje generacije in takoj ali kasneje dodamo cefoksitin (cefoksitin poveča specifičnost presejalnega testa). Za presejalni test na AmpC je torej potrebno testirati najmanj enako kot za ESBL - CAZ in (CRO ali CTX).
- Laboratoriji, ki FOX diska vsakodnevno ne testirajo, za presejanje na AmpC uporabijo kriterij rezultat **R** diskov **CAZ** ali **CRO ali CTX** – nato FOX testirajo v sklopu običajnega ESBL testa – glej naslednjo stran.
- Po ESDReM ima pozitiven presejalni test na AmpC pri *E. coli* in *K. pneumoniae* izolat, ki ima **R** rezultat (ne I) pri vsaj enem od navedenih testiranih cefalosporinov tretje generacije **IN** cono FOX < 19 mm (ali MIK FOX > 8 mg/L).

## 6. UGOTAVLJANJE ESBL – POTRDITVENI TESTI

**Potrditveni testi za ESBL so kombinirani diski, teste naredimo ob pozitivnem presejalnem testu.**

Princip: razlika v zaviralni coni med diskom istega cefalosporina s klavulansko kislino in brez nje.

**Postopek je odvisen od tega, ali bakterijska vrsta praviloma vsebuje AmpC ali ne. Zato sta 2 algoritma:**

1. Algoritem 1 za enterobakterijske vrste skupine 1 (vrste, ki praviloma ne tvorijo BL AmpC)
2. Algoritem 2 za enterobakterijske vrste skupine 2 (BL AmpC so pri teh vrstah naravno prisotne).

**Algoritem 1:** ESBL potrditveni testi, ki sledijo pozitivnemu presejalnemu testu na ESBL pri skupini 1 enterobakterij (*E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*)

**Opomba 1:** FOX je obvezen del algoritma, ker pokaže na možnost AmpC odpornosti (z ali brez ESBL). FOX + kloksacilin disk ni nujen del algoritma, je pa praktičen, ker: a) zasede šesti prostor pri razdeljevalcu diskov - v primeru, da uporabljamo razdeljevalec diskov, zmanjša možnost kontaminacije; B) odpravi potrebo po dodatnem AmpC testu, če je cona cefoksitina < 19 mm.

<b>Opomba 2:</b> če v protokolu za izolacijo ESBL izolatov iz presejalnih kužnin uporabljamo ESBL test kot presejalni test za izključitev non-ESBL izolatov, (FOX+kloksacilin) disk izpustimo in namesto njega položimo MEM disk ter uporabimo smernice za ugotavljanje karbapenemaz, da ne bi spregledali morebitnega seva s karbapenemazami. Večina sevov s karbapenemazami na ESBL gojiščih dobro raste in imajo lahko pozitiven ali negativen ESBL test.	<b>Slika:</b>
	FOX
	CTX      Priporočen      CAZ razpored diskov, če uporabimo navedene diske.
	CAZ + kk      CTX +kk
	FOX + kloksacilin

**Interpretacija potrditvenih testov s kombiniranimi diski pri skupini 1 enterobakterij (*E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*)**

- Najprej odčitamo cono FOX, da ugotovimo, ali izolat morda vsebuje BL AmpC.
- Na osnovi tega izberemo navadni ali modificirani ESBL test in odčitamo rezultat.
- Modificirani ESBL testi so navedeni na naslednji strani.

**A) Cefoksitin zaviralna cona  $\geq 19$  mm (sev nima AmpC):**

- odčitaj običajni ESBL test.

	Razlika v coni med diskoma ( $\Delta$ ) na MHA	Pozitivno	Negativno
<b>ESBL test</b>	(CTX + kk) - (CTX)	$\Delta \geq 5$ mm	$\Delta < 5$ mm
<b>ESBL test</b>	(CAZ + kk) - (CAZ)	$\Delta \geq 5$ mm	$\Delta < 5$ mm

Za pozitiven rezultat ESBL testa pri izolatu zadošča razlika  $\geq 5$  mm pri vsaj enem paru diskov (par CAZ ali CTX z ali brez kk).

**Opomba:** pri vrsti *K. oxytoca* odsotnost razlike  $\geq 5$  mm pri disku CAZ in prisotnost razlike  $\geq 5$  mm pri disku CTX (ali FEP pri modificiranem testu) verjetno pomeni lažno pozitiven rezultat ESBL testa.

**B) Cefoksitin zaviralna cona  $\leq 18$  mm (možna prisotnost AmpC):**

- naredi in odčitaj modificirani ESBL test. Tri variante modificiranega testa so opisane na naslednji strani.

**Algoritem 2:** ESBL potrditveni testi, ki sledijo pozitivnemu presejalnemu testu na ESBL pri skupini 2 enterobakterij (*Enterobacter spp.*, *Citrobacter freundii* kompleks, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii*, *Serratia spp.*, *Hafnia alvei*) ALI, če ima enterobakterija skupine 1 cono FOX < 19 mm.

Ne delaj običajnega ESBL potrditvenega testa na navadnem MHA! Uporabi eno od treh variant spodaj.

Skupaj jih imenujemo: »modificirani ESBL test«, eno od variant uporabljamo ob možni prisotnosti AmpC.

• **Varianta 1 (osnovna možnost po ESDReM):**

	Razlika v coni med diskoma ( $\Delta$ ) na navadnem MHA	Pozitivno	Negativno
<b>ESBL test</b>	(FEP + kk) - (FEP)	$\Delta \geq 5$ mm	$\Delta < 5$ mm

- **Varianta 2. Naredi ESBL test z običajnimi diski na posebnem MHA s kloksacilinom** (MHA vsebuje kloksacilin): cone so tu pogosto velike, zato ročno položi 4 običajne diske za ESBL test. Ne polagaj FOX diska z ali brez kloksacilina. **Interpretacija con ESBL testa na MHA s kloksacilinom** je enaka kot na navadnem MHA:

	Razlika v coni med diskoma ( $\Delta$ ) na MHA s kloksacilinom	Pozitivno	Negativno
<b>ESBL test</b>	(CTX + kk) - (CTX)	$\Delta \geq 5$ mm	$\Delta < 5$ mm
<b>ESBL test</b>	(CAZ + kk) - (CAZ)	$\Delta \geq 5$ mm	$\Delta < 5$ mm

Za pozitiven rezultat ESBL testa pri izolatu zadošča razlika  $\geq 5$  mm pri vsaj enem paru diskov (par CAZ ali CTX z ali brez kk).

- **Varianta 3. Naredi ESBL test s posebnimi diski (ali tabletami) s kloksacilinom na navadnem MHA:** ročno položi 4 posebne diske / tablete (te so komercialno dostopne). **Interpretacija con:**

	Razlika v coni med diskoma ( $\Delta$ ) na navadnem MHA	Pozitivno	Negativno
<b>ESBL test</b>	(CTX + kloksacilin + kk) - (CTX + kloksacilin)	$\Delta \geq 5$ mm	$\Delta < 5$ mm
<b>ESBL test</b>	(CAZ + kloksacilin + kk) - (CAZ + kloksacilin)	$\Delta \geq 5$ mm	$\Delta < 5$ mm

Za pozitiven rezultat ESBL testa pri izolatu zadošča razlika  $\geq 5$  mm pri vsaj enem paru diskov (par CAZ+kloksacilin ali CTX+kloksacilin z ali brez kk).

**POROČANJE O ESBL REZULTATU V IZVIDU (velja za oba, 1. in 2. algoritem ESBL postopka):**

- Ob pozitivnem potrditvenem testu kratico ESBL uporabimo kot značilnost izolata, razen če je izolat CRE ali CPE-CRE (glej dokument SKUOPZ 001, ti dve značilnosti imata prednost pred značilnostjo ESBL).
- V opombi k izolatu izpišemo opombo, ki je za ESBL dogovorjena v lokalnem okolju laboratorija.

## 7. UGOTAVLJANJE AmpC – POTRREDITVENI TESTI

- Če je pri vrstah *E. coli* in *K. pneumoniae* presejalni test na AmpC pozitiven, naredimo potrditveni test za AmpC. Uporabimo eno od dveh variant.  
Kot je zgoraj navedeno, AmpC test I lahko izvedemo že kot del ESBL testa, če je to smiselno.

### Potrditveni AmpC test, varianta I:

	Razlika v coni med diskoma ( $\Delta$ ) na MHA	Pozitivno	Negativno
<b>AmpC test I</b>	(FOX + kloksacilin) - (FOX)	$\Delta \geq 4$ mm	$\Delta < 4$ mm

**Potrditveni AmpC test, varianta II** (za pozitiven rezultat zadošča razlika  $\geq 5$  mm pri vsaj enem paru diskov (par CAZ ali CTX z ali brez kloksacilina):

	Razlika v coni med diskoma ( $\Delta$ )	Pozitivno	Negativno
<b>AmpC test II</b>	(CTX + kloksacilin) - (CTX)	$\Delta \geq 5$ mm	$\Delta < 5$ mm
<b>AmpC test II</b>	(CAZ + kloksacilin) - (CAZ)	$\Delta \geq 5$ mm	$\Delta < 5$ mm

- Za druge enterobakterijske vrste skupine 1 AmpC testa praviloma ne delamo, ker ocenjujemo, da epidemiološko zaenkrat niso problem.
- Za enterobakterijske vrste skupine 2 velja: AmpC test pri teh vrstah ni smislen, ker so AmpC betalaktamaze pri njih naravno prisotne. Zato ga praviloma ne delamo; lahko naredimo AmpC test II, če nas zanima, ali se pri izolatu BL AmpC močno izraža, npr. ob odpornosti proti ertapenemu, ko ne dokažemo karbapenemaz.

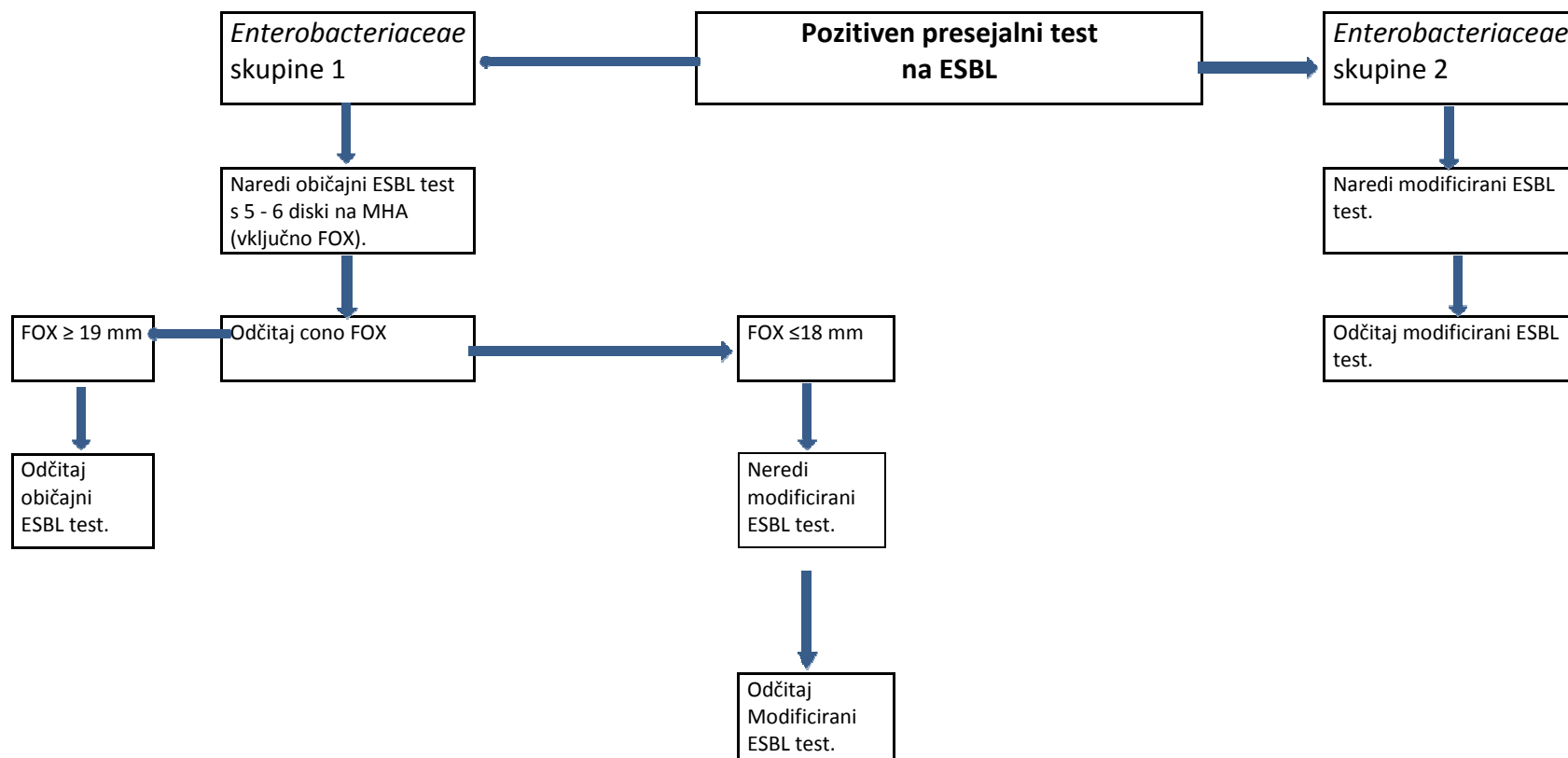
### Interpretacija AmpC pozitivnega rezultata glede na lokacijo genov za BL AmpC:

1. Pri vrsti *K. pneumoniae*, ki nima AmpC gena v svojem normalnem genomu, pomeni pozitiven fenotipski AmpC test prisotnost plazmidne BL AmpC.
2. Pri vrsti *E. coli*, ki ima AmpC gen v svojem normalnem genomu, vendar se običajno fenotipsko ne izraža, pomeni pozitiven AmpC test ali a) prisotnost plazmidne BL AmpC ali b) fenotipsko izražanje kromosomske BL AmpC zaradi povečane ekspresije gena za BL AmpC.  
Razlikovanje med a) in b) možnostjo je možno le z molekularnimi metodami.

### POROČANJE AmpC REZULTATOV V IZVIDU:

- kratice AmpC zaenkrat ne uporabljamo kot značilnost izolata, po presoji mikrobiologa o AmpC odpornosti poročamo v opombi v izvidu ali/in v pogovoru s klinikom, če je to umestno (če gre npr. za proti ertapenemu odporen izolat, npr. vrste *Enterobacter*, ki ima negativne teste na karbapenemaze in močno izraženo AmpC; ali *E. coli*, ki nima ESBL odpornosti, a je odporna proti cefalosporinom 3. generacije zaradi AmpC).

8. SHEMA POSTOPKA PO IDENTIFIKACIJI IZOLATA IZ DRUŽINE *ENTEROBACTERIACEAE* IN PO POZITIVNEM PRESEJALNEM TESTU NA PRISOTNOST ESBL.



*Enterobacteriaceae* skupine 1:

*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*

*Enterobacteriaceae* skupine 2:

*Enterobacter spp.*, *Citrobacter freundii* kompleks, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii*, *Serratia spp.*, *Hafnia alvei*

## 9. REFERENCE

1. Giske et al. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance; december 2013. [internet]. [citirano 2013 Dec 12] Dosegljivo na: <http://www.eucast.org/>
2. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4, preliminary, 2013 [internet]. [citirano 2013 Dec 12] Dosegljivo na: <http://www.eucast.org/>
3. Willems E, Verhaegen J, Magerman K, Nys S, Cartuyvels R. Towards a phenotypic screening strategy for emerging  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacilli. *Int J Antimicrob Agents*. 2013 Feb;41(2):99-109.
4. Tan TY, Ng LS, He J, Koh TH, Hsu LY. Evaluation of screening methods to detect plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(1):146-9
5. Ingram PR, Inglis TJ, Vanzetti TR, Henderson BA, Harnett GB, Murray RJ. Comparison of methods for AmpC  $\beta$ -lactamase detection in Enterobacteriaceae. *J Med Microbiol*. 2011;60(Pt 6):715-21.
6. Peter-Getzlaff S, Polsfuss S, Poledica M, Hombach M, Giger J et al. Detection of AmpC  $\beta$ -lactamase in *Escherichia coli*: comparison of three phenotypic confirmation assays and genetic analysis. *J Clin Microbiol*. 2011;49(8):2924-32.
7. Hansen F, Hammerum AM, Skov RL, Giske CG, Sundsfjord A, Samuelsen O. Evaluation of ROSCO Neo-Sensitabs for phenotypic detection and subgrouping of ESBL-, AmpC- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *APMIS*. 2012;120(9):724-32.
8. Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14 Suppl 1:90-103.
9. Munier GK, Johnson CL, Snyder JW, Moland ES, Hanson ND, Thomson KS. Positive extended-spectrum- $\beta$ -lactamase (ESBL) screening results may be due to AmpC  $\beta$ -lactamases more often than to ESBLs. *J Clin Microbiol*. 2010;48(2):673-4.