

Enterobacteriaceae resistentsusmehhanismide skriining ja kinnitamine

Resistentsusmehhanismide määramine eeldab mikroobide samastamist liigi tasemel. Vajadusel kasutada selleks täpsema samastamise (MALDI-TOF, sekveneerimine) võimalusi omavate laborite teenust.

S1. ESBL_M (AmpC tüüpi ensüümid) skriining. Kasutada kas esmase skriininguna või siis kui 3pk tsefalosporiinide suhtes esineb mittetundlikkus. AmpC esinemine ei välista ESBL_A esinemist ning vastupidi.

Tsefoksiitin resistentsus on iseloomulik tunnus derepresseeritud kromosomaalsele ja plasmiidsele AmpC-le. Positiivne kui MIC >8 või tsoon <19 mm (30 mkg disk).

S2. ESBL_A skriining. Tsefotaksiim ja tseftasidiim diskid. Alternatiivina Tsefpodoksiim, mis on madalama spetsiifilisusega.

ESBL kahtlus kui üks või mõlemad 3.pk. tsefalosporiinid mittetundlikud (MT või R; MIK>1).

S3. Karbapenemaaside skriining, soovitavalt esmases antibiogrammis. Hinnatakse meropenemi järgi. Kui esmases antibiogrammis on ertapeneem ja või imipineem tuleb ka nende mittetundlikkust arvestada, kuigi nende spetsiifilisus karbapenemaaside skriinimiseks on madalam. Kui esmases antibiogrammis puudub karbapeneem, siis testitakse tüve kindlasti karbapeneemi suhtes kui esineb mittetundlikkus 3.pk tsefalosporiini suhtes. **NB OXA-48 tüüpi karbapenemaaside puhul võib tüvi olla tundlik 3pk. tsefalosporiinidele mistõttu esmase karbapenem-skriiningu puudumisel võivad need tüved jääda avastamata.**

Hinnatakse EUCASTi skriiningkriteeriumite alusel (vt tabel)

Table 1. Clinical breakpoints and screening cut-off values for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (according to EUCAST methodology).

Carbapenem	MIC (mg/L)		Disk diffusion zone diameter (mm) with 10 µg disks	
	S/I breakpoint	Screening cut-off	S/I breakpoint	Screening cut-off
Meropenem ¹	≤2	>0.125	≥22	<28 ²
Ertapenem ³	≤0.5	>0.125	≥25	<25

¹Best balance of sensitivity and specificity

²Isolates with 25-27 mm only need to be investigated for carbapenemase-production if they are resistant to piperacillin-tazobactam and/or temocillin (temocillin contributes more to the specificity). Investigation for carbapenemases is always warranted if zone diameter of meropenem is <25 mm.

³High sensitivity but low specificity. Can be used as an alternative screening agent, but isolates with ESBL and AmpC may be resistant without having carbapenemases.

Kinnitav test

T1. AmpC kinnitav test (tsefsalosporiinid +/-kloksatsilliin).

T2. ESBL_A test. Tseftasidiimi ja tsefotaksiimi klavulaanhappe sünergismi test.

Method	Antimicrobial agent (disk content)	ESBL confirmation is positive if
ESBL gradient test	Cefotaxime +/- clavulanic acid	MIC ratio ≥ 8 or deformed ellipse present
	Ceftazidime +/- clavulanic acid	MIC ratio ≥ 8 or deformed ellipse present
Combination disk diffusion test (CDT)	Cefotaxime (30 μ g) +/- clavulanic acid (10 μ g)	≥ 5 mm increase in inhibition zone
	Ceftazidime (30 μ g) +/- clavulanic acid (10 μ g)	≥ 5 mm increase in inhibition zone
Broth microdilution	Cefotaxime +/- clavulanic acid (4 mg/L)	MIC ratio ≥ 8
	Ceftazidime +/- clavulanic acid (4 mg/L)	MIC ratio ≥ 8
	Cefepime +/- clavulanic acid (4 mg/L)	MIC ratio ≥ 8
Double disk synergy test (DDST)	Cefotaxime, ceftazidime and cefepime	Expansion of indicator cephalosporin inhibition zone towards amoxicillin-clavulanic acid disk

Kui selle põhjal mittemääratav tulemus, siis teha tsefepiimi sünergismi test (T3).

Alternatiivina võib kasutada MALDI-TOF vastavat testi. Automaatanalüsaatorite ESBL testi sobivust tuleks eelnevalt valideerida erinevate liikide suhtes (SYNLAB kogemus BD Phoenix-iga).

Negatiivse või mittemääratava ESBL tulemuse korral, teha kinnitav AmpC test T1. Kui nimetatud testide tulemus jääb ikka mittemääratavaks soovitatakse geneetilist uuringut resistentsusmehhanismi kindlakstegemiseks

T3. ESBL test. Kromosomaalse AmpC produtseerijatel teha ESBL kindlakstegemiseks tsefepiimi ja klavulaanhappe sünergismi test. Kui tulemus jääb mittemääratavaks soovitatakse geneetilist uuringut resistentsusmehhanismi kindlakstegemiseks.

Method	Antibiotic	Confirmation is positive if
ESBL gradient test Etest [®] ESBL	Cefepime +/- clavulanic acid	MIC ratio ≥ 8 or deformed ellipse present
Combination disk diffusion test	Cefepime (30 μ g) +/- clavulanic acid (10 μ g)	≥ 5 mm increase in inhibition zone
Broth microdilution	Cefepime +/- clavulanic acid (fixed concentration 4 mg/L)	MIC ratio ≥ 8
Double disk synergy test (DDST)	Cefotaxime, ceftazidime, Cefepime	Expansion of indicator cephalosporin inhibition zone towards amoxicillin-clavulanic acid disk

T4. Karbapenemaaside määramise testid. Tabelis esitatud kombineeritud diskide testid vastavalt EUCASTi soovitudele.

B-lactamase	Synergy observed as increase in zone diameter (mm) with 10 µg meropenem disk/tablet				Temocillin MIC >128 mg/L or zone diameter <11 mm
	DPA/EDTA	APBA/PBA	DPA+APBA	CLX	
MBL	+	-	-	-	Variable ¹
KPC	-	+	-	-	Variable ¹
MBL + KPC²	Variable	Variable	+	-	Variable ¹
OXA-48-like	-	-	-	-	Yes
AmpC + porin loss	-	+	-	+	Variable ¹
ESBL + porin loss	-	-	-	-	No

Abbreviations: MBL=metallo-β-lactamase, KPC=*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, DPA=dipicolinic acid, EDTA=ethylenediaminetetraacetic acid, APBA= aminophenyl boronic acid, PBA= phenyl boronic acid, CLX=cloxacillin.

¹ Temocillin susceptibility test is recommended only in cases where no synergy is detected, in order to differentiate between ESBL + porin loss and OXA-48-like enzymes (23, 24). When other enzymes are present the susceptibility is variable and does not provide any further indication of the β-lactamase present.

² There is one report supporting the use of commercial tablets containing double inhibitors (DPA or EDTA plus APBA or PBA) (25), but multi-centre studies or multiple single centre studies are lacking. This combination confers high-level resistance to carbapenems and is rare outside Greece.

Sobivad ka *lateral flow*, kolorimeetrised, MALDI-TOF karbapeneemi hüdrolüüsi testid. Testide tundlikkused ja spetsiifilisused erinevate karbapenemaaside suhtes võivad olla erinevad, mistõttu soovitame ebaselgetel juhtudel eri teste kombineerida.

T5. Karbapenemaasi geene määravad testid (PCR, WGS) – fenotüüpiliselt positiivsetel juhtudel tuleks määrata karbapenemaasi geen. PCR põhised testid määravad ainult sagedamini esinevaid resistentsusgeene, mistõttu negatiivne tulemus ei välista karbapenemaasi olemasolu.

Loetelud

L1. Vähenenud tundlikkus 3.pk. tsefalosporiinidele on sageli seotud ESBL_A -ga. Võib olla seotud ka plasmiidse või kromosomaalse AmpC-ga.

L2. 3.pk. tsefalosporiinide resistentsus on sageli seotud kromosomaalse beetalaktamaasi hüperproduktiooniga. Sellised tüved on reeglina tseftasidiim tundlikud (tsefotaksiim võib olla R/MT ja tsefotaksiim ESBL test ka pos.). Kui ESBL test tseftasidiimiga on positiivne, tegemist tõenäoliselt tõelise ESBL-ga. Kindlat vahet saab teha vaid molekulaarsete meetoditega.

L3. Neil mikroobidel on alati kromosomaalne AmpC. Enamasti repressseeritud (tundlikud tsefalosporiinidele). Kui stabiilselt derepressseeritud, siis on resistentsed. AmpC ei välista ESBL olemasolu. Täiendava ESBL testi teostamise vajadus sõltub eelkõige infektsioonikontrolli kaalutlustest.

Vastused

V1. Kromosomaalne või plasmiidne AmpC. Käituda kui plasmiidse korral (kuna ilma PCR kasutamata ei saa eristada plasmiidset ja kromosomaalset AmpC-d). Kajastatakse vastusel ESBL_M

Soovitav mitte ravida penitsilliinide ja 1.-2.pk. tsefalosporiinidega. Kui in vitro tundlikud 3.-4.pk. tsefalosporiinidele, siis kas (1) vastata vastavalt tulemusele ja lisada hoiatus: monoteeraapia on seotud resistentsuse selektsiooni riskiga või (2) mitte vastata. Piperatsilliin-tasobaktaam võib toimida teatud AmpC-de korral, T vastust väljastatakse MIKI alusel.

Teatada infektsioonikontrollile.

V2. Plasmiidne AmpC. Nimetatud mikroobidel kromosomaalset AmpC-d ei esine ja positiivse testi korral on see alati plasmiidne. Kajastatakse vastusel ESBL_M

Soovitav mitte ravida penitsilliinide ja 1.-2.pk. tsefalosporiinidega. Kui in vitro tundlikud 3.-4.pk. tsefalosporiinidele, siis kas (1) vastata vastavalt tulemusele ja lisada hoiatus: monoteeraapia on seotud resistentsuse selektsiooni riskiga või (2) mitte vastata. Piperatsilliin-tasobaktaam võib toimida teatud AmpC-de korral, T vastust väljastatakse MIKI alusel.

Teatada infektsioonikontrollile.

V3 . Kromosomaalne AmpC.

Nimetatud mikroobide grupil on alati kromosomaalne AmpC: repressseeritud – tundlik tsefalosporiinidele, derepressseeritud – resistentne. Võib vastata ilma kinnitava testita. Resistentsusmehhanismi vastusel ei kajastata.

Soovitav mitte ravida penitsilliinide ja 1.-2.pk. tsefalosporiinidega.

Enterobacter spp., K. aerogenes, Citrobacter freundii complex, Hafnia alvei: Kui in vitro tundlikud 3.-4.pk. tsefalosporiinidele, siis kas (1) vastata vastavalt tulemusele ja lisada hoiatus: monoteeraapia on seotud resistentsuse selektsiooni riskiga või (2) mitte vastata.

Serratia spp., Morganella morganii, Providencia spp. Resistentsuse tekke risk tsefalosporiinide monoterapiaga väike

V4. ESBL_A positiivne.

Kui tüvi on tundlik beetalaktaamide ja beetalaktamaasi inhibiitori kombinatsioonile, vastata vastavalt testi tulemusele

Kui tüvi on tundlik mõnele 3.-4.pk. tsefalosporiinile vastata vastavalt testi tulemusele, kuid lisada hoiatus: ebakindel ravi tulemus muude kui uroinfektsioonide ravi korral.lähtuda MIK väärtusest.

Teatada infektsioonikontrollile.

V5. KR AmpC ja ESBL positiivne.

Mitmete erinevate resistentsusmehhanismide kooseksisteerimisel on fenotüüpiliste testide kasutamine ja tõlgendamine problemaatiline. Kuna nimetatud mikroobide grupil on alati kromosomaalne AmpC (represeeritud või derepreseeritud) võib ESBL test anda raskesti tõlgendatavaid ja valenegatiivseid tulemusi. Lõpliku vastuse annab sellistel juhtudel vaid molekulaarne uuring.

Teatada infektsioonikontrollile.

V6. Metallobeetalaktamaas (MBL) positiivne.

V7. A-grupi (KPC tüüpi) karbapenemaas positiivne.

V8. OXA48 tüüpi karbapenemaas positiivne.

Tulemused (sh karbapeneemid) vastata vastavalt saadud MIC väärtustele

Teatada infektsioonikontrollile.

V9. Karbapenemaas negatiivne.

Tõenäoliselt muu mehhanism: ESBL_M ja/või ESBL_A kombinatsioonis poriinide kadumisega. Interpreteerida tabeli alusel ja vastata vastav leid.