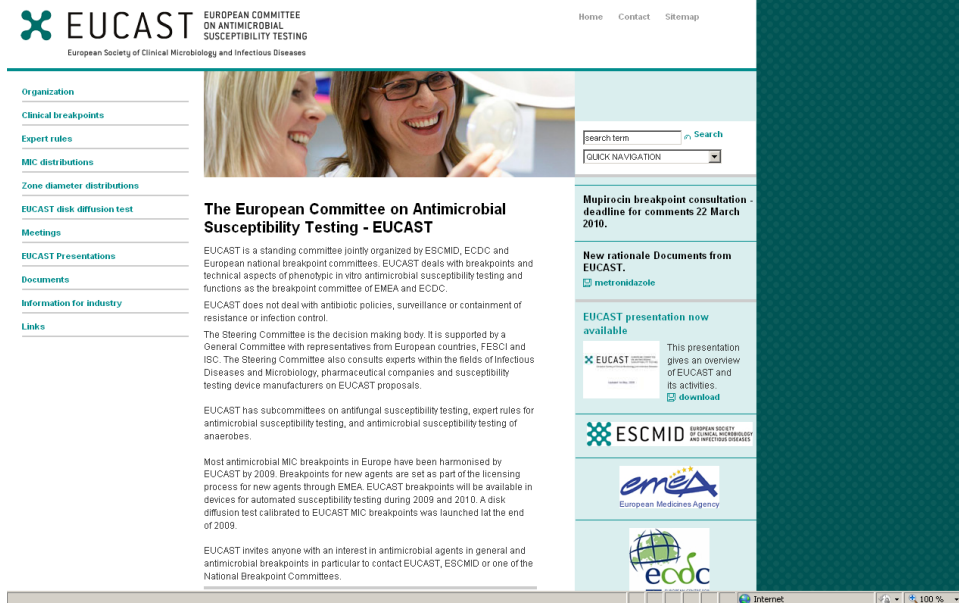


ESBL, AmpC kimutatása



The screenshot displays the EUCAST website interface. At the top left is the EUCAST logo and full name: "EUCAST EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases". Navigation links for "Home", "Contact", and "Sitemap" are in the top right. A left sidebar contains a menu with items like "Organization", "Clinical breakpoints", "Expert rules", "MIC distributions", "Zone diameter distributions", "EUCAST disk diffusion test", "Meetings", "EUCAST Presentations", "Documents", "Information for Industry", and "Links". The main content area features a large image of two scientists and a prominent article titled "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST". Below this, there are several news snippets: "Mupirocin breakpoint consultation deadline for comments 22 March 2010", "New rationale Documents from EUCAST" (with a link to metronidazole), and "EUCAST presentation now available" (with a download link). At the bottom, logos for ESCMID, EMEA (European Medicines Agency), and ECDC are visible. The browser's address bar shows "Internet" and a 100% zoom level.

Kristóf Katalin
Semmelweis Egyetem ÁOK, LMI
Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Laboratórium



Amp C típusú rezisztencia

○ *Kromoszomális*

- *E. coli*, *Shigella spp.*-intrinsic, alacsony szintű, nem indukálható, ritka a túltermelés
- *Morganella morgannii*-ra az enzim túltermelése, hiperprodukcója jellemző
- *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *C. freundii*, *P. stuartii*, *P. rettgeri*, *Acinetobacter spp.*, *Aeromonas spp.*, *C. violaceum*, *H. alvei*, *P. aeruginosa*, *Y. enterocolitica* az enzimet intrinsic és indukálható módon termelik (**ESCHAPM** csoport)
 - Ampicillin, cefazolin - erős induktor - jó szubsztrát
 - Karbapenemek - erős induktor - stabilak
 - Piperacillin, cefuroxim, aztreonam, oxyimino-cephalosporinok
 - Gyenge induktor – nem jó szubsztrát (enzim mennyiség-függő!)
 - β -laktamáz inhibitorok (!klavulánsav) - jó induktor
 - 4. generációs cephalosporinok – gyenge szubsztrát (gyorsabban jutnak át a külső membránon, mint a 3. generációs cephalosporinok; hamarabb hatás, mintsem, hogy az enzim hidrolizálná)

Amp C típusú rezisztencia

- III. generációs cefalosporinok, ureidopenicillinek, carboxypenicillinek hatására ún. **derepresszált mutánsok** szelektálódnak, melyekre már az AmpC enzim magas szintű és állandó termelése a jellemző.
- Ezek a törzsek a β -laktám antibiotikumok közül csak a karbapenemekre és alkalmanként a IV. generációs cefalosporinokra maradnak érzékenyek
- A szubsztrát molekula periplazmatikus térben való mennyisége befolyásolja a rezisztenciát
 - Külső membrán permeabilitás csökken (porin mutáció, efflux pumpa) \Rightarrow β -laktám antibiotikum bejutása csökken
 - Akár karbapenem rezisztencia!





Amp C típusú rezisztencia

○ *Plazmidon kódolt*

- 1989
- Jelenleg 7 enzimcsalád (43 CMY – CMY-2, 7 FOX, 4AAC, 4 LAT, 4 MIR-MIR-1 *E. cloacae*, 3 ACT, 3 MOX, 2 DHA (OEK 2009-2; 2010-49))
- Általában konstitutíve termelődnek
- *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Salmonella spp.*, *P. mirabilis*, *E. aerogenes*
- Rezisztencia: széles spektrumú cefalosporinokra, cefamicinre, aztreonamra változó
- Érzékeny: cefepim, karbapenemek
- Gyakran együtt kódolódnak aminoglikozid, kinolon, tetracyclin, egyéb β -laktamázzal (TEM-1, PSE-1, CTX-M, SHV, VIM-1)

Amp C típusú rezisztencia fenotípusos kimutatása – fenotípusos megerősítés pl.



○ D-teszt

- Ceftazidim (cefotaxim) körüli gátlási zóna D alakúra torzul cefoxitin (imipenem, amoxicillin/klavulánsav hatására)

○ Inhibitorok alkalmazása

- Cloxacillin; Bórsav származékok
 - 3-amino-fenil-boronsav (APB)
 - Benzo(b)thiophene-2-boronsav (BZBTHZB)
- Gátlószermentes cephalosporin (pl. ceftazidim) tartalmú korongok gátlási zónáját hasonlítjuk össze a gátlószeret tartalmazó korongok körüli gátlási zónával
- Kevésbé munkaigényes, könnyebben kivitelezhető
- Beépíthető a rutin tesztek közé



Amp C típusú rezisztencia

- Infekciókontroll szempontjából fontos az elkülönítése a kromoszomális és a plazmidos AmpC termelésnek
 - Plazmidos horizontálisan is terjed, akár különböző fajok között is
 - Kromoszomális a terápia során alakul ki (mutáció)
- Molekuláris módszerrel lehet
 - PCR/multiplex PCR



Megjegyzések – „ESBL”

- Ha a vizsgált izolátum bármelyik 3. vagy 4. generációs cefalosporinra rezisztens vagy mérsékelten érzékeny, de az amoxicillin/klavulánsav, ampicillin/sulbactam vagy piperacillin/tazobactam korongok körül érzékenynek megfelelő gátlási zóna látható, akkor ezt az érzékeny eredményt **csak nem komplikált húgyúti infekció esetében adjuk ki érzékenynek**, egyébként a szereket rezisztensnek vagy piperacillin/tazobactam esetében mérsékelten érzékenynek interpretáljuk.
- Amennyiben a vizsgált izolátum **ESBL** és van olyan cefalosporin származék, amelyre érzékenységet mutat, az érzékeny eredményt csak **MIC** meghatározás mellett szabad kiadni, és ajánlott a klinikus figyelmét felhívni, hogy cefalosporinok alkalmazásának terápiás sikere kérdéses.

ESBL szűrőtesztek és fenotípusos megerősítő tesztek - gyanú

Csökkent érzékenység cephalosporinokra és aztreonamra

CLSI ajánlás (2009):
E. coli, *K. pneumoniae*,
K. oxytoca, *P. mirabilis*

	gátlási zóna (mm)	MIC (µg/ml)
cefpodoxim 10	≤ 17	4/1(P.m.)
ceftazidim 30	≤ 22	1
ceftriaxon 30	≤ 25	1
cefotaxim 30	≤ 27	1
aztreonam 30	≤ 27	1

- A legszenzitívebb a cefpodoxim, de nem specifikus, különösen *E. coli* esetében.
- P. mirabilis*-ra csak a cefpodoxim, ceftazidim és cefotaxim validált.
- Cefotaxim érzékeny a CTX-M enzimekre, ceftazidim érzékeny a TEM és SHV enzimekre (beleértve a ceftazidimázokat is).
- Nem alkalmazható ESBL indikátorként: cefuroxim és cefalexin (más mechanizmus miatti rezisztencia), 4. gen. cefalosporinok (*in vitro* hatékonynak tűnhetnek).
- Cefoxitin: (ESBL+: É), AmpC: R



ESBL fenotípusos megerősítő tesztek

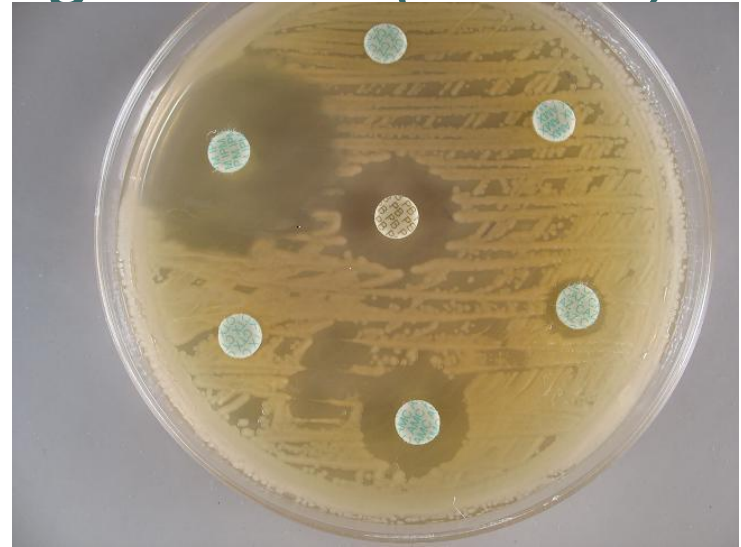
CLSI ajánlás (2009):

E. coli, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis*

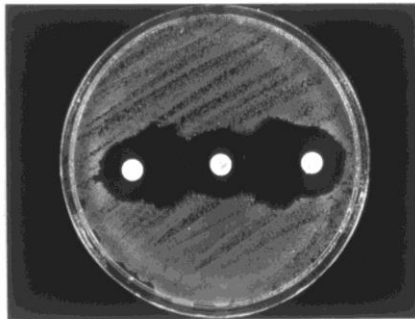
- Szinergia vizsgálat cefalosporinok és klavulánsav között
- *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Salmonella spp.*, *P. mirabilis* esetén bármelyik cefalosporin használható, amelyekre a szűrő tesztben rezisztens volt.
- (ESCHAPM) *Enterobacter*, *C. freundii*, *Morganella*, *Providencia*, *Serratia spp.*, *Hafnia spp.* esetén cefepimet vagy cefpiromot érdemes használni, mivel kevésbé hat rájuk a kromozómális AmpC β -laktamáz, amit a klavulánsav ezen speciosekben indukálhat.
- Kettős korong módszer
- Korong kombináció
- E-teszt

Kettős korong szinergia teszt (DDST)

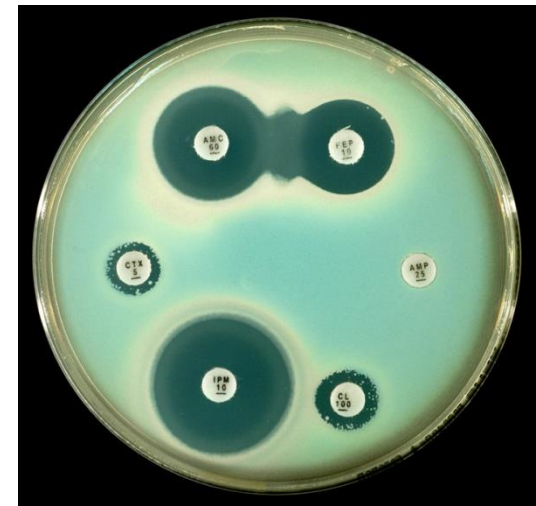
- Cefotaxim 30 μ g (ceftriaxon, ceftazidim, aztreonam) és amoxicillin/klavulánsav 20 μ g/10 μ g korongok egymástól 20-25 mm-re helyezve agar lemezen.
- A cefotaxim korong körüli gátlási zóna kiszélesedik az amoxicillin/klavulánsav korong felé.
- Ha a teszt negatív, a korongokat egymástól 1cm-re helyezve érdemes megismételni.



Double disc test for *K. pneumoniae* TEM-3⁺



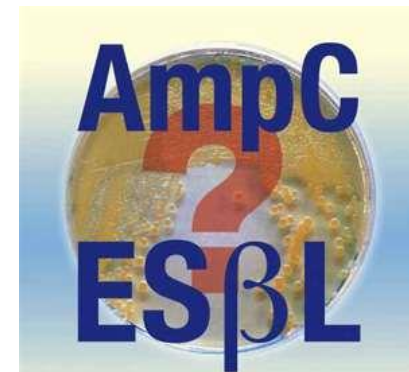
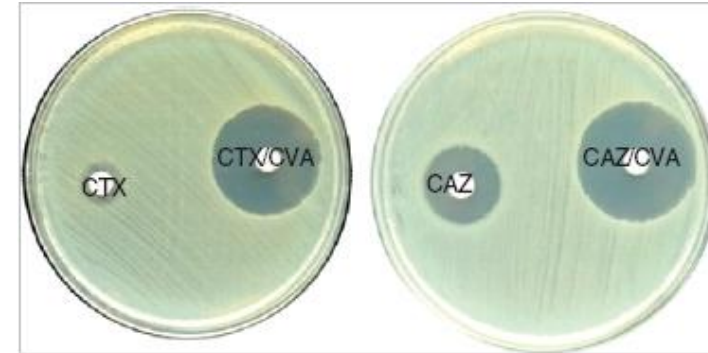
Ceftazidime 30 Augmentin 20+10 Cefotaxime 30 μ g



Szinergizmus AMC és FEP között, CTX és AMC között nem- magas aktivitású enzim

Kombinált korong módszer (DD)

- Ceftazidim és cefotaxim (és cefpodoxim) érzékenység vizsgálata önmagában és klavulánsavval (4 μ g/ml, ill. korongban 10 μ g) kombinálva.
- Ha klavulánsav mellett a gátlási zóna $\geq 50\%$ -kal vagy >5 mm-rel nagyobb valamelyik antibiotikum esetén, akkor az ESBL termelés igazolt.
- Ceftazidim és cefotaxim együttes vizsgálata szükséges a jobb szenzitivitás miatt.



D68C AmpC & ES β L
Detection Set

A .CPD

B. CPD10 + ES β L inhibitor

C. CPD10 + Amp C inhibitor

D. CPD10 + ES β L és AmpC
inhibitorok

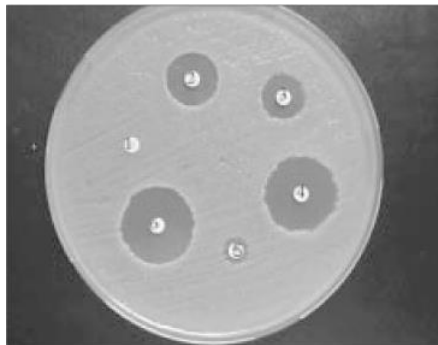


Figura 1 – Teste de adição de ácido clavulânico (Oxoid[®]) positivo em amostra de *K. pneumoniae*. Um aumento ≥ 5 mm é observado nos halos dos antimicrobianos associados ao ácido clavulânico quando comparados com os antimicrobianos sem o ácido clavulânico. 1 = cefpodoxima; 2 = cefpodoxima + ácido clavulânico; 3 = ceftazidima; 4 = ceftazidima + ácido clavulânico; 5 = cefotaxima; 6 = cefotaxima + ácido clavulânico

Commercially available systems for detection of ESBLs including KPC and AMPC

Monday, April 02, 2012, 12:30 - 13:30

Evaluation of a new chromogenic test (betaLACTA™ test) for rapid detection of third-generation cephalosporins nonsusceptible Enterobacteriaceae

M. Ben Soltana, C. Dallenne, A. Birgy, F. Compain, C. Verdet, S. Vimont, C. Favier, M. Juvin, G. Arlet* (Paris, Marnes-La-Coquette, FR)

Objectives: A new chromogenic test (betaLACTA™, Bio-Rad) was developed for rapid detection (2-15 min) of third-generation cephalosporins nonsusceptible Enterobacteriaceae (3GCns-E). Performances were determined through retrospective and prospective studies.

Methods: Retrospective analysis was performed on 72 3GCns-E producing well-characterized beta-lactamases (ESBL, n=36; AmpC, n=10; carbapenemases, n=12; and multiple beta-lactamases, n=14). Prospective study (3 months period) was performed on primary cultures isolated from various clinical samples inoculated on different agar media. BetaLACTA™ results were compared to disc diffusion method (ceftazidime and cefotaxime, 3GC) according to CA-SFM 2009 guidelines, then 3GCns-E were characterized by molecular techniques. BetaLACTA™ was performed by suspending 1 to 3 colonies in reagents and waiting for 2 to 15 min to interpret results as follow: no color change: negative; shift to red or purple: positive (any other color change was considered as non-interpretable).

Results: Retrospective study: Of the 72 3GCns-E, 66 were positive, four were negative (2 CMY-2, 1 DHA-1, 1 TEM-29) and two were non-interpretable (1 CMY-13, 1 OXA-48).

Prospective study: 571 isolates (80% from urines) including strains of *Escherichia coli* (n=405), *Klebsiella pneumoniae* (n=75), *Enterobacter* spp. (n=29) and other Enterobacteriaceae (n=62) were tested.

6/571 (1%) were non-interpretable with the test, other isolates gave the following results (see table):

Of the 77 3GCns-E, 64 produced an ESBL (83% belonged to CTX-M family), 13 produced an AmpC (9 chromosomally derepressed and 6 plasmid-mediated). BetaLACTA™ detected 100% of ESBL strains. The five false negatives were AmpC-producing strains and the two false positives were *K. oxytoca* hyperproducing chromosomal K1 beta-lactamase. In comparison with disc diffusion method, the test showed a sensitivity of 93.5%, a specificity of 99.6%, a positive predictive value of 97.3% and a negative predictive value of 98.9%.

Conclusion: The betaLACTA™ test is a rapid and reliable test for the detection of third-generation cephalosporins nonsusceptible Enterobacteriaceae. With excellent specificity and negative predictive value, we conclude that it should be used for therapeutic guidance and should help to monitor beta-lactamase resistance in clinical settings.

betaLACTA™	Disc diffusion method		Total
	3GC susceptible	3GC nonsusceptible	
Negative	486	5	491
Positive	2	72	74
Total	488	77	565



Egyéb módszerek

- E-tesztek (cefotaxim/ceftazidim/cefepim és cefotaxim/ceftazidim/cefepim+klavulánsav)
- Automata módszerrel (VITEK 2, Phoenix)
 - Speciális panelek az ESBL konfirmáláshoz
 - Expert systems

A fenotípusos konfirmáló teszt korlátai

- ESBL termelő törzsek negatív eredmény mutathatnak
 - csökkent porin termelés miatt,
 - TEM-1 vagy SHV-1 β -laktamáz hipertermelés miatt,
 - egyéb β -laktamázok (pl. AmpC, metallo- β -laktamáz, IRT) termelése miatt, melyek klavulánsavval nem gátolhatók,
 - ezek kombinációja miatt.
- A tesztek csak az *Enterobacteriaceae* speciosekre vonatkoznak



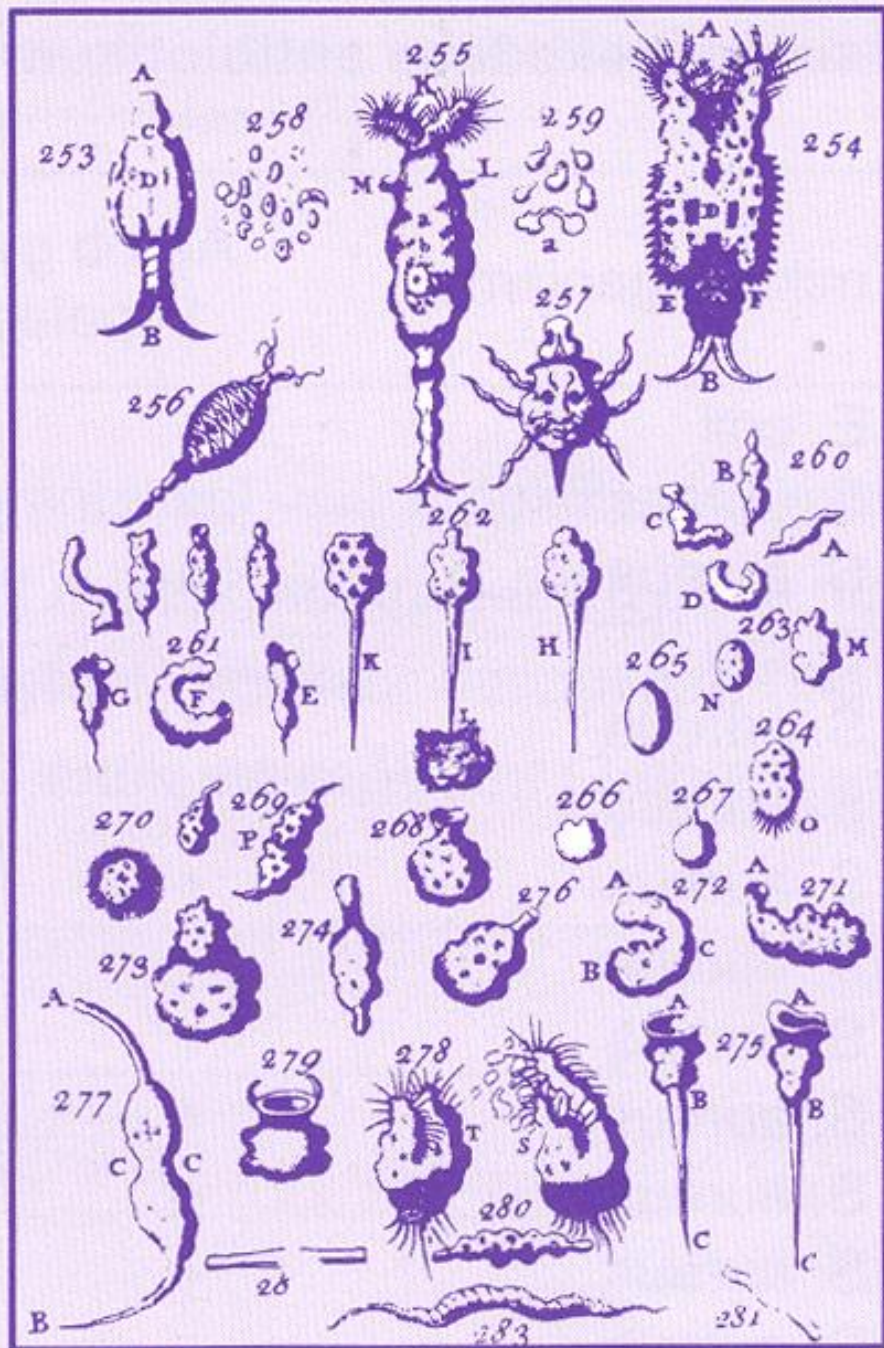
Változás

CLSI 2010 és 2011

- PK-PD tulajdonságok jobb megismerése és a limitált klinikai adatok alapján új interpretálási szabályok kerültek bevezetésre
- Ezek alkalmazása esetén nem szükséges ESBL irányában megvizsgálni az izolátumokat (nem szükséges ESBL pozitivitás esetén a cefalosporinok, aztreonam interpretációját érzékenyből rezisztensre átminősíteni)
- ESBL tesztek epidemiológiai és infekció kontroll szempontjából fontosak lehetnek

EUCAST

- A cefalosporinokra adott breakpointok minden klinikailag fontos rezisztencia-mechanizmus detektálására alkalmasak (ESBL és plazmid-mediálta AmpC is)
- Néhány izolátum ezek alapján mérsékelten érzékenynek vagy akár érzékenynek adódik, ennek megfelelően kell interpretálni pl. ESBL pozitivitás önmagában az interpretálást nem módosítja
- **ESBL detektálás és jellemzés epidemiológiai szempontból és infekció-kontroll miatt szükséges**



Front.º Pag. 130.

Bonles. fi.

Köszönöm a
figyelmet!