

Metoder för snabb detektion av ESBL- och ESBL_{CARBA}-producerande Enterobacteriaceae direkt från positiva blododlingsflaskor

Rapport av ST-projekt

Sammanställt för Referensgruppen för Antibiotikafrågor (RAF)

Författare:

Marie Thelander

ST-läkare, RAF-praktikant 2015-2016

Klinisk Mikrobiologi, Falu lasarett

Handledare:

Christian G. Giske

Klinisk mikrobiologi, Karolinska Universitetssjukhuset, Solna

Innehållsförteckning

| | |
|---|----|
| Sammanfattning..... | 3 |
| Bakgrund..... | 4 |
| Syfte..... | 5 |
| Metod..... | 6 |
| Resultat..... | 6 |
| Fenotypiska tester..... | 6 |
| Kolorimetriska snabbtest..... | 6 |
| Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF)..... | 9 |
| Lappdiffusionsmetoder..... | 13 |
| Genotypiska tester..... | 13 |
| PCR..... | 13 |
| Diskussion..... | 16 |
| Referenser..... | 18 |

Sammanfattning

För patienter med sepsis, svår sepsis och septisk chock är tiden till korrekt insatt antibiotika avgörande för utfallet, och bakteremi orsakad av ESBL-producerande Enterobacteriaceae är förknippad med ökad mortalitet vid försenad effektiv behandling. Det är således viktigt att snabbt upptäcka dessa ESBL/ESBL_{CARBA}-producerande bakterier för att patienten ska få korrekt behandling i tid och därmed öka chanserna till överlevnad. Idag tar det i regel 24 timmar eller mer innan ESBL/ESBL_{CARBA} kan detekteras från positiva blododlingar. Syftet med den här litteraturgenomgången är att undersöka vilka metoder för snabb detektion av ESBL/ESBL_{CARBA} som idag finns tillgängliga direkt från positiva blododlingsflaskor. Totalt har tolv studier inkluderats vilka beskriver fyra olika metoder. Metoderna som beskrivs är kolorimetriska snabbtest, MALDI-TOF, lappdiffusion och PCR. Alla dessa metoder ger svar inom 0,5-5,5 timmar. Sensitiviteten hos kolorimetriska snabbtest att upptäcka ESBL och karbapenemaser som KPC, IMP, VIM och NDM direkt från positiva blododlingsflaskor ligger på 100 %, medan sensitiviteten att upptäcka OXA-48 ligger på 91 %. Specificiteten för kolorimetriska snabbtest är 100 % för ESBL och undersökta karbapenemaser. Sensitiviteten hos MALDI-TOF att upptäcka ESBL och karbapenemaser hos Enterobacteriaceae ligger mellan 96 – 100 %, och specificiteten mellan 90 – 100 %. Sensitiviteten att upptäcka ESBL med lappdiffusion är 96 %, och specificiteten är 100 %. Denna metod tar längst tid, upp till fem och en halv timme. För PCR ligger sensitiviteten att upptäcka KPC och CTX-M mellan 93 - 100 %, och specificiteten mellan 99 - 100 %. Samtliga sensitivets- och specificitetsmått är författarnas egna resultat, liksom tidsangivelser för de olika metoderna. En begränsning med litteraturgenomgången är att det endast är metoder för snabb detektion av ESBL och ESBL_{CARBA} som inkluderats, metoder för snabb detektion av andra resistensmekanismer har inte studerats närmare.

Bakgrund

Vid sepsis, svår sepsis och septisk chock är tiden till korrekt insatt antibiotika en avgörande parameter för utfallet [1-4]. Bakteremi orsakad av ESBL-producerande Enterobacteriaceae är förknippad med ökad mortalitet och försenad insättning av effektiv behandling [5]. Det är således viktigt att snabbt upptäcka bakterier som är resistenta mot den empiriska behandlingen, och genom att tidigt hitta ESBL/ESBL_{CARBA}-producerande bakterier kan chanserna öka för patienten att få korrekt behandling i tid och därmed också chanserna till överlevnad.

I världen ses en oroväckande trend, där andelen ESBL- och ESBL_{CARBA}-producerande Enterobacteriaceae ökar [6-9]. Även i Sverige ökar andelen ESBL- och ESBL_{CARBA}. År 2015 rapporterades i Sverige 9584 fall av ESBL-producerande Enterobacteriaceae, vilket är en ökning med 8 % jämfört med 2014. För ESBL_{CARBA} har det varit en 145-procentig ökning från 47 rapporterade fall år 2014 till 115 rapporterade fall år 2015. De vanligaste karbapenemaserna i Sverige är OXA-48 och NDM [10]. I Europa är det *Klebsiella pneumoniae* karbapenemas (KPC) som har störst spridning, men OXA-48 karbapenemhydrolyserande oxacillinaser har snart nått samma spridning. Spridningen av New Delhi metalloβ-laktamas (NDM) har också ökat i Europa de senaste åren medan spridningen av Verona integronkodat metalloβ-laktamas (VIM) ligger på en stabil nivå. Imipenemas (IMP) är fortfarande sällsynt i Europa [11]. I de flesta europeiska länder är *Klebsiella pneumoniae* den vanligaste gramnegativa tarmbakterien som bär på ESBL_{CARBA} [12]. Från Grekland, Italien, Malta och Turkiet rapporteras att karbapenemasproducerande Enterobacteriaceae regelbundet isoleras från patienter på de flesta sjukhus vilket speglar en endemisk situation [11]. I Belgien, Frankrike, Malta, Rumänien, Spanien och Turkiet är det de OXA-48-liknande enzymerna som just nu sprids snabbast [11, 13]. Dessa karbapenemaser är en utmaning för de mikrobiologiska laboratorierna då de kan vara svåra att upptäcka. Dessa enzym tillhör klass D-β-laktamaserna och kan hydrolysera penicilliner och karbapenemer, men cefalosporiner i begränsad omfattning [14]. Ofta ses bara en diskret förhöjning av MIC-värdet för karbapenemer, vilket gör att de kan missas på laboratorierna [9,15].

Med dagens EUCAST-definierade screeningbrytpunkt för meropenem är dock risken mycket låg att missa karbapenemaser [16].

Ett ytterligare bekymmer med ESBL/ESBL_{CARBA}-bärande bakterier är att de ofta även bär på andra resistensgener, som finns lokaliserade på samma mobila element, vilket kan ge resistens mot kinoloner, aminoglykosider och trimetoprim [8, 17-18].

Tiden till detektion av ESBL- och ESBL_{CARBA}-producerande Enterobacteriaceae från positiva blododlingsflaskor anges till 24-48 timmar med de metoder, lappdiffusionstester och gradienttest, som oftast står till buds på laboratorierna runt om i Sverige [19]. På många laboratorier i Sverige görs snabbresistens där blodet från en larmande flaska direkt stryks på en resistensplatta med antibiotikalappar och inkuberas i 6 timmar. En förutsättning för att direktresistensen ska kunna läsas av är att det finns personal i tjänst. På mindre laboratorier blir det därför i regel bara de flaskor som larmar direkt på morgonen under vardagar som blir föremål för undersökning med snabbresistens. Fördelarna med metoden är att det går att få en snabbare indikation på om resistens föreligger, men metoden är mindre tillförlitlig jämfört med om framodlade kolonier används till resistensbestämningen [20]. Vid misstanke om ESBL/ESBL_{CARBA} görs bekräftande tester som ofta innebär inkubering över natt. Under de senaste åren har flera metoder utvärderats för snabb detektion av ESBL- och ESBL_{CARBA}-producerande Enterobacteriaceae direkt från positiva blododlingsflaskor. Trots att resistens även kan bero på andra mekanismer, är dessa mekanismer de viktigaste orsakerna till cefalosporin- respektive karbapenemresistens, och inriktning på att hitta dessa mekanismer kan därför utgöra ett surrogatmått på vanlig resistensbestämning.

Syfte

Syftet med litteraturgenomgången är att undersöka vilka metoder för snabb detektion av ESBL/ESBL_{CARBA} som idag finns tillgängliga direkt från blododlingsflaskor, samt hur känsliga och specifika dessa metoder är.

Metod

Sökning i PubMed med sökorden ”((ESBL OR extended spectrum beta lactamase) OR Carbapenemase) AND detection AND blood culture” gav 57 träffar under perioden 1997-2016 (fram till och med 12 aug 2016). Av dessa valdes 29 artiklar ut varav 17 förkastades på grund av litet material, att metoden ej gällde analys direkt från blododlingsflaska eller att tiden till identifikation av ESBL/ESBL-CARBA tagit för lång tid. Artiklar på annat språk än engelska förkastades också. Med snabb detektion avses svar inom sex timmar. Sammanlagt inkluderades 12 artiklar mellan 2005-2016.

Resultat

Fenotypiska tester

Kolorimetriska snabbtest

De kolorimetriska snabbtest som utvärderats för detektion av ESBL och ESBL_{CARBA} direkt från positiva blododlingar som inkluderats i den här litteraturgenomgången är Carba NP-testet för snabb detektion av karbapenemaser, ESBL NDP-testet för detektion av ESBL samt HMRZ-86 för detektion av ESBL. Principen för Carba NP-testet och ESBL NDP-testet bygger på att blododlingsbuljongen, eller en bakteriepellet från den positiva blododlingsbuljongen (olika för olika studier), blandas med valt indikatorantibiotika och vid förekomst av ESBL eller ESBL_{CARBA} hydrolyseras betalaktamringen och odlingsmediet försuras. Försurningen identifieras genom ett färgomslag genererad av pH-indikatorn fenolrött. Sensitiviteten enligt författarna för Carba NP- och ESBL NDP-testerna ligger mellan 91-100 % (för Carba NP är det OXA-48-producerande Enterobacteriaceae som drar ned sensitiviteten). Sensitiviteten enligt författarna för HMRZ-86 var efter modifikation av testet 100 %. Svar erhöles inom 0,5-5 timmar. Nedan presenteras de olika studierna kortfattat.

Carba NP

Carba NP-testet (Carba NP; Carbapenemase Nordmann-Poirel) beskrevs första gången 2012. Testet baseras på in vitro hydrolys av imipenem och ger ett färgomslag från rött till gult i närvaro av

karbapenemaser i provet [21]. År 2014 utvärderades Carba NP-testet för att upptäcka karbapenemasproducerande Enterobacteriaceae direkt från blododlingsflaskor. Etthundranittiotre karbapenemasproducerande isolat undersöktes samt 74 karbapenemasnegativa isolat. Blododlingsflaskor inokulerades med 1×10^3 CFU av respektive bakteriestam. De aeroba och anaeroba flaskorna inkuberades tills växt kunde påvisas (BactAlert system, växt inom 6-15 timmar). Testet kunde upptäcka KPC, IMP, VIM, NDM med 100 % sensitivitet och specificitet, medan sensitiviteten att upptäcka OXA-48-gruppens enzym hos Enterobacteriaceae var 91,3 %. Sammantaget var sensitiviteten 97,9 % och specificiteten 100 %. Svar erhöles inom 3-5 timmar, varav 3 timmar var inkubationstid följt av själva testet. För KPC sågs positiv reaktion vanligen inom 5-30 minuter, för MBL inom 15-60 minuter och för OXA-48 inom 30-60 minuter [22].

ESBL NDP

ESBL NDP (Nordmann/Dortet/Poirel)-testet beskrevs första gången 2012, och är även detta ett kolorimetriskt snabbtest. Cefotaxim används som indikatorantibiotika. Nittiosex-håls mikrotiterplattor används, men provet kan också analyseras i singelbrunnar/rör. Inhibition av ESBL-aktiviteten bevisas genom att tillsätta tazobaktam i ytterligare en brunn. Vid positivt test sker ett färgomslag från rött till gult i brunnen med cefotaxim, och oförändrad färg (röd) i brunnen med cefotaxim och tazobaktam.

I studien av Nordmann et al. testades ESBL NDP-testet både på framodlade stammar (215 ESBL-producerande och 40 icke-ESBLproducerande) och direkt från blododlingsflaskor inokulerade med ESBL-producerande bakterier (n=64) och icke-ESBL-producerande bakterier (n=24). Sensitiviteten och specificiteten att upptäcka ESBL från de framodlade stammarna var 92,6 % respektive 100 % (dock 100 % sensitivt att upptäcka CTX-M). Sexton ESBL-producerande bakterier känsliga för cefotaxim upptäcktes inte. Sensitiviteten och specificiteten att upptäcka ESBL från de inokulerade blododlingsflaskorna var båda 100 %. Dock var mängden bakterier som tillsattes i flaskorna ganska hög, 1×10^3 CFU av respektive stam tillsattes och flaskan inkuberades 24-48 timmar.

Bakteriekoncentrationen i blododlingsflaskorna låg mellan 1.0×10^7 - 5.2×10^9 CFU/ml. Svar erhöles inom två timmar [23].

ESBL NDP-testet testades senare prospektivt i vårdmiljö vid ett sjukhus utanför Paris direkt från positiva blododlingar. Efter positiv signal i BacT/Alert blododlingssystem gjordes gramfärgning och när gramnegativa bakterier konstaterades gjordes NDP-test och artidentifiering med MALDI-TOF direkt från blododling. Samma NDP-protokoll användes som från studien 2012. En positiv blododling per patient (n=245) med gramnegativa bakterier undersöktes. För resistensbestämning användes diskdiffusionsmetoden med brytpunkter från CLSI. MIC-värden för cefotaxim, ceftazidim och cefepim bestämdes på MH-plattor samt på MH-plattor innehållande tazobaktam. DDST användes för fenotypisk detektion av ESBL. Sedan gjordes PCR där TEM-, SHV- och CTX-M-primers användes. De 245 positiva blododlingarna utgjordes av 211 fall av Enterobacteriaceae, 31 fall av icke-kolhydratjäsande bakterier och 3 fall av anaerober. I tre blododlingsflaskor växte det två arter Enterobacteriaceae, men inga av dessa bar på ESBL. Fyrtiosju fall av ESBL-producerande Enterobacteriaceae hittades, de flesta av CTX-M-typ. Sensitiviteten, specificiteten, PPV och NPV var 100 %. Testet kunde även avslöja ett cefotaximhydrolyserande enzym som inte inhiberades av tazobactam hos en *K. pneumoniae* som producerade ett förvärvat cefalosporinas, hos 3 av 5 *E. cloacae* som överproducerade kromosomalt AmpC och 2 *Bacteroides*-stammar. Korrelationen mellan positivt NDP-test och intermediär känslighet för cefotaxim var 100 %, 76,6 % för ceftazidim och 74,4 % för cefepim. Resultat erhöles inom 30 minuter [24].

HMRZ-86

Ett annat kolorimetriskt snabbtest baseras på HMRZ-86, vilken är en kromogen cefalosporin. HMRZ-86 hydrolyseras av ESBL och MBL och vid positiv reaktion sker en färgförändring från gult till rött. I en studie från 2007 undersöktes 127 blododlingar varav 43 innehöll ESBL-producerande Enterobacteriaceae. Användningen av testet direkt på den positiva blododlingsbuljongen var till en början begränsad eftersom flaskorna med lyserat blod inte gick att tolka. Det var framför allt mediet i

den anaeroba buljongen som lyserade blodet. Initialt kunde bara 54 flaskor tolkas, varav 20 flaskor innehöll ESBL-producerande Enterobacteriaceae. Av dessa 20 ESBL hittades 19 stycken med HMRZ-86. Ett falskt negativt resultat för ett *E. coli*-isolat sågs. Positivt utslag sågs efter 30 minuter för alla 19 prover. För att komma åt problemet med lyserat blod gjordes en initial subkultur i buljong av blododlingsmediet, detta hade effekten att späda ut det lyserade blodet medan det gav tillräcklig bakterieväxt för testning med HMRZ-86. Efter inkubation i 37°C i rumsluft under 2 timmar sågs inga falskt positiva eller negativa resultat [25].

| Metod | Författare | Årtal | Undersökt resistensmekanism | Antal isolat med ESBL/ESBL-CARBA / antal testade blododlingar | Referensmetod | Sensitivitet | Specificitet | Tidsåtgång | Indikatorantibiotika |
|----------|--------------------|-------|--|---|--------------------------------------|---|--------------|------------|----------------------|
| Carba-NP | Dortet L, et al. | 2014 | KPC (n=50), IMP (n=27), VIM (n=37), NDM (n=33), OXA-48-gruppens enzym (n=46) | 193/267 | PCR | 97,9% (Sensitiviteten för KPC och MBL=100%, sensitiviteten för OXA-48-producerande Enterobacteriaceae =91,3%) | 100% | 3-5 h | Imipenem |
| ESBL NDP | Nordmann P, et al. | 2012 | TEM (n=15), SHV (n=17), CTX-M (n=32) | 64/88 | PCR | 100% | 100% | 1-2 h | Cefotaxim |
| | Dortet L, et al. | 2015 | CTX-M (n=45), SHV-12 (n=2) | 47/245 | Double Disc Synergy Test (CLSI), PCR | 100% | 100% | 0,5 h | Cefotaxim |
| HMRZ-86 | Jain S, et al. | 2007 | ESBL | 43/127 | Combined disc method | 100% | 100% | 2,5-4 h | HMRZ-86 |

Tabell 1. Detektion av ESBL/ESBL_{CARBA} direkt från positiva blododlingsflaskor med kolorimetriska snabbtest. Tidsåtgången räknas från larmande blododlingsflaska.

Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF)

I litteraturgenomgången har fyra studier inkluderats för detektion av ESBL/ESBL_{CARBA} direkt från positiva blododlingsflaskor med hjälp av MALDI-TOF. Både inokulerade blododlingsflaskor och blododlingar från patienter har använts. Sensitiviteten att upptäcka ESBL och ESBL_{CARBA} hos Enterobacteriaceae med MALDI-TOF låg mellan 96-100 %. För *A. baumannii* (tillhör ej Enterobacteriaceae) låg sensitiviteten att upptäcka OXA-enzym, NDM och VIM mellan 27-63 %. Svar erhöles inom 2-4,5 timmar. För att undersöka betalaktamasproduktion med MALDI-TOF inkuberas först gramnegativa bakterier 1-4 timmar med valt indikatorantibiotikum. Om bakterien bildar betalaktamas mot det antibiotika som testas sker en hydrolys av betalaktamringen. Eftersom

hydrolyserade och icke-hydrolyserade molekyler har olika vikt, kan dessa skillnader upptäckas med MALDI-TOF. Således monitoreras masspektrum hos valt antibiotika, när ursprungstoppar försvinner och nya toppar uppkommer kan den hydrolyserade produkten identifieras. Är bakterierna känsliga sker alltså ingen förändring av antibiotikaspektrat. Nedan följer en kortfattad presentation av respektive studie.

Snabb detektion av karbapenemasproducerande gramnegativa bakterier med hjälp av MALDI-TOF validerades i en tysk studie av Ghebremedhin et al. 2016. MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) användes både på framodlade kolonier och från positiva blododlingar. Totalt ingick 63 karbapenemasproducerande gramnegativa isolat och 35 karbapenemresistenta isolat utan karbapenemas. Från blododlingsflaskorna utvanns en bakteriepellet motsvarande 10^7 - 10^9 CFU. Bakteriepelleten löstes sedan upp i en imipenemlösning och inkuberades i 37° C under 4 timmar före MALDI-TOF analys. För *A. baumannii* (ej Enterobacteriaceae) med OXA-, NDM- och VIM-gener kunde bara 24/38 identifieras från blododlingar, vilket gav en sensitiviteten på 63,2 %. Av de 38 *Acinetobacter*isolaten bar 29 på OXA-enzym, sensitiviteten att upptäcka dessa var 72,4 %. Sensitiviteten att upptäcka de 25 karbapenemasproducerande Enterobacteriaceae- och *P. aeruginosa*-isolaten (n=2) i inokulerade blododlingsflaskor var 96 %. Ett *K. pneumoniae*-isolat med OXA-48 kunde inte upptäckas. För övrigt kunde alla KPC- (n=5), IMP- (n=3), NDM- (n=4), VIM- (n=6), och OXA- (n=6) producerande Enterobacteriaceae och *P. aeruginosa* upptäckas med MALDI-TOF direkt från inokulerade blododlingsflaskor. Specificiteten var 100 %. [26]

Snabb detektion av ESBL-producerande Enterobacteriaceae från blododlingsflaskor med hjälp av MALDI-TOF utvärderades i en spansk studie av Oviaño et al. 2014. I studien undersöktes totalt 141 blododlingsflaskor. Av dessa representerade 13 stycken riktiga bakteriemier medan 128 stycken var blododlingsflaskor inokulerade med kliniska bakterieisolat (1 mL av 0,5 McFarland standard). För blododlingsflaskorna med riktiga bakteriemier gjordes MALDI-TOF analysen vid signal på positiv växt (BacT/Alert 3D (Biomérieux)) medan analysen för flaskorna med tillsatta kliniska isolat gjordes efter

24 timmar. MALDI Sepsityper Kit (Bruker Daltonik GmbH) användes, tillverkarens anvisning följdes förutom att tvättlösningen användes två gånger istället för en gång i sista steget. Indikatorantibiotika var cefotaxim och/eller ceftazidim och cefotaxim/ceftazidim med klavulansyra. Inkubation gjordes i 60 eller 120 min vid 37° C före MALDI-TOFanalys. Av de 128 bakterieisolaten var 22 helt känsliga för cefotaxim och ceftazidim, 12 isolat bar på AmpC-enzym och 94 uttryckte ESBL (vilka bekräftades med fenotypiska eller molekylära metoder). Av de 13 bakteremierna utgjordes 10 av *E.coli* (7 av dessa bar på ESBL och 3 var helt känsliga), och 3 utgjordes av *Klebsiella pneumoniae* som alla uttryckte ESBL. Sammantaget var sensitiviteten att upptäcka ESBL-producerande Enterobacteriaceae från blododlingsflaskor 99 %. (Ett *E.coli*-isolat ($bla_{CTX-M-14}$, $MIC_{CTX}=12\text{mg/L}$, $MIC_{CAZ}\leq 1\text{mg/L}$) kunde inte identifieras, dock noterades en mycket svag cefotaximhydrolys hos detta isolat.) Specificiteten var 100 %. Sensitivitet och specificitet för MALDI-TOFanalyserna av de riktiga bakteremierna var vardera 100 %. För AmpC-producerande Enterobacteriaceae var sensitiviteten 83 % (10/12) och specificiteten 100 %. Svar erhöles inom 2 timmar (5 min proteinextraktion, hydrolys-analys 90-120 min, spektrum förvärv och analys 15min). Detektion av antibiotikahydrolys gick fortare med ökande MIC-värde. I studien noterades att CTX-M enzym kan hydrolysera cefotaxim på 60 minuter. CMY-2 som är det vanligaste AmpC-enzymet i studieregionen behöver ca 120 minuter för att hydrolysera ceftazidim. Övriga betalaktamaser har olika hydrolyseringstider beroende på respektive antibiotika MIC. Klavulansyra tillsattes för att utesluta närvaro av icke-ESBL mekanismer. När klavulansyra tillsattes försvann topparna från CTX/CAZ-hydrolysen vid ESBL-mekanism, medan alla AmpC-producerande stammar hade oförändrade toppar när klavulansyra tillsattes [27].

I en brasiliansk studie av Carvalhaes et al 2014 undersöktes kliniska blododlingar avseende karbapenemasaktivitet med MALDI-TOF. Hundra stycken blododlingsflaskor valdes slumpmässigt ut och MALDI-TOF MS identifierade 21 av 29 (72,4%) av de karbapenemasproducerande isolaten direkt från positiva blododlingsflaskor efter en 4 timmar lång inkubationsperiod. Av de 21 isolat som identifierades kunde 17 stycken detekteras redan efter 2 timmar. För att detektera KPC-2 var sensitivitet respektive specificitet 100 % (n=17 Enterobacteriaceae) och för SPM-1 100 % (n=1 *P.*

aeruginosa). Sämre resultat sågs för *A. baumannii* (ej Enterobacteriaceae) med OXA-23 och OXA-72 där 3/11 karbapenemasproducerande isolat kunde detekteras. Följande dag kunde de 8 övriga karbapenemasproducerande isolaten identifieras med MALDI-TOF från framodlade kolonier. Ertapenem användes som indikatorantibiotikum. Samtliga 29 isolat som identifierades som karbapenemasproducerande med MALDI-TOF konfirmerades med PCR och DNA-sekvensering. [28].

I en spansk studie från 2014 undersöktes 40 positiva blododlingar direkt med MALDI-TOF. Av dessa innehöll 19 blododlingar karbapenemasproducerande Enterobacteriaceae- och *P. aeruginosa* isolat, och 21 innehöll karbapenemasnegativa isolat. För varje stam inokulerades blododlingsflaskor (BACTEC) med 10 ml färskt sterilt blod och 1 ml suspension innehållande 10-100 CFU (18-24 h odling) av 0,5 McF och inkuberades tills att positiv växt kunde detekteras. De karbapenemaser som undersöktes i studien var IMP (n=5), VIM (n=10), OXA-48 (n=3), KPC (n=1). Ertapenem användes som indikatorantibiotikum. Två isolat (1 *Enterobacter cloacae* och 1 *E. coli*) klassificerades felaktigt som karbapenemasproducerande, detta pga. överuttryck av AmpC. Sensitiviteten var 100 % och specificiteten var 90 %. Svar erhöles inom maximalt 4,5 timmar [29].

| Metod | Författare | Årtal | Undersökt resistensmekanism | Antal isolat med ESBL/ESBL-CARBA / antal testade blododlingar | Referensmetod | Sensitivitet | Specificitet | Tidsåtgång | Indikatorantibiotika |
|-----------|--------------------------|-------|--|---|----------------------------|--|--------------|------------|----------------------|
| Maldi-TOF | Ghebremedhin B, et al. | 2016 | OXA (n=36), KPC (n=5), VIM (n=7), IMP (n=3), GIM (n=1), NDM (n=11) | 63/98 | PCR och sekvensering | 96 % (alla <i>A. baumannii</i> (n=38) bortråkande, sensitiviteten för dem är 63,2 %) | 100% | 4 h | Imipenem |
| | Oviaño M, et al. | 2014 | ESBL | 104/141 | Fenotypiska tester och PCR | 99% | 100% | 2 h | CTX, CAZ |
| | Carvalhoes CG, et al. | 2014 | KPC-2 (n=17), OXA-23, (n=10) OXA-72 (n=1), SPM-1 (n=1) | 29/100 | PCR och sekvensering | 100 % (alla <i>A. baumannii</i> (n=11) bortråkade, sensitiviteten för dem är 27 %). | 100% | 2-4 h | Ertapenem |
| | Hoyos-Mallecot Y, et al. | 2014 | IMP (n=5), VIM (n=10), OXA-48 (n=3), KPC (n=1) | 19/40 | PCR | 100% | 90% | 4,5 h | Ertapenem |

Tabell 2. Detektion av ESBL/ESBL_{CARBA} direkt från positiva blododlingsflaskor med MALDI-TOF. Tidsåtgången räknas från larmande blododlingsflaska.

Lappdiffusionsmetoder

I en brittisk studie från 2014 utvärderades cefpodoxim och cefpodoxim-klavulansyrallappar (Oxoid, Baskingstoke, UK) som placerats på Iso-Sensitestagar bestrukna med blod från spikade blododlingsflaskor (n=40) och blod från positiva patientblododlingar (n=23). En skillnad i zondiameter ≥ 5 mm (cefpodoxim/klavulansyrazon-cefpodoximzon) bedömdes ESBL-positiv. Bland de 40 isolaten som inokulerades i blododlingsflaskor var 22 stycken ESBL-positiva. Cirka 100 CFU mixades med 10 mL hästblod och inokulerades i BacT/ALERT (BioMerieux, Baskingstoke, UK) blododlingsflaska. Flaskorna inkuberades över natt. Tre droppar av den positiva blododlingen spreds sedan på Iso-Sensitestagar. Plattorna inkuberades aerobt i 37°C och granskades efter 3,5-6 h efter inkubationsstart regelbundet för växt/zonmätning. En slutlig mätning gjordes följande dag. En *E. coli*-stam växte dåligt och upptäcktes ej inom tidsintervallet, i övrigt kunde 21/22 av de ESBL-positiva isolaten upptäckas inom 3,5-4,6 timmar. Resultaten för de ESBL-negativa Enterobacteriaceae kom inom 3,5-5,25 h. Sedan testades även de 23 positiva kliniska blododlingarna enligt ovanstående metod, samtliga 5 ESBL-producerande Enterobacteriaceae upptäcktes inom 4,5-5,5 h [30].

| Metod | Författare | Årtal | Undersökt resistensmekanism | Antal isolat med ESBL/ESBL-CARBA / antal testade blododlingar | Referensmetod | Sensitivitet | Specificitet | Tidsåtgång | Indikatorantibiotika |
|---------------|---------------------|-------|-----------------------------|---|------------------------------|--------------|--------------|------------|----------------------|
| Lappdiffusion | Weinbren MJ, et al. | 2005 | CTX-M, TEM, SHV | 27/63 | Samma test med BSAC-inokulat | 96% | 100% | 3,5-5,5 h | Cefpodoxim |

Tabell 3. Detektion av ESBL/ESBL_{CARBA} direkt från positiva blododlingsflaskor med Lappdiffusion. Tidsåtgången räknas från larmande blododlingsflaska.

Genotypiska tester

PCR

Tre studier har inkluderats i litteraturgenomgången för snabb detektion av ESBL/ESBL_{CARBA} direkt från positiva blododlingar med hjälp av PCR. Två metoder gick ut på att detektera KPC och en metod detekterade CTX-M. Sensitiviteten låg mellan 92,9 - 100 % och svar erhöles inom 1,5-4 timmar. Nedan följer en kortfattad presentation av respektive studie.

I en studie från USA 2012 undersöktes 323 Enterobacteriaceae-isolat med PCR direkt från positiva blododlingsflaskor för att hitta KPC. Bland isolaten uppvisade 28 stycken (8,7 %) karbapenemresistens genom automatiserad eller manuell resistensbestämning mot imipenem, meropenem och ertapenem, eller med realtids-PCR. Sensitivitet, specificitet, PPV och NPV för RT-PCR jämfört med automatiserad metod (för imipenem och meropenem, Vitek 2, BioMerieux) var 92,9 %, 99,3 %, 92,9 % och 99,3 %. Jämfört med Ertapenem disk-diffusionsmetod var motsvarande siffror 96,4 %, 99,7 %, 96,4 % och 99,7 %, (CLSI tolkningskriterier). Tidsvinsten från larmande blododlingsflaska till säkerställd identifikation av karbapenemresistens anges till cirka 45 timmar (från 48 timmar till cirka 3 timmar) [31].

I en studie från Israel 2011 validerades en multiplex TaqMan realtidskvantitativ-PCR för detektion av KPC, med human RNAs-P-gen som internkontroll. Metoden tar mindre än 4 timmar och har optimerats för att kringgå de inhibitorer som förekommer i blododlingsbuljongen. I studien utvärderades 323 set blododlingar, varav 55 stycken (17 %) innehöll karbapenemresistenta bakterier. Sensitivitet, specificitet, PPV och NPV var 100 %. Detektionsgränsen var 19 CFU per reaktionsmix i Bactec-blododlingsflaskor med tillsatt humanblod [32].

I en japansk studie från 2011 undersöktes gramnegativa bakterier med och utan CTX-M ESBL från positiva blododlingsflaskor med PCR följt av mikrochip gelelektrofores. I studien undersöktes 255 blododlingsflaskor med avseende att identifiera bakterieart, och i 20 av fallen där det fanns misstanke om ESBL med combination disk method visade PCR-MGE att samtliga 20 isolat bar på CTX-M. Svar erhöles inom 1,5 timme [33].

| Metod | Författare | Årtal | Undersökt resistensmekanism | Antal isolat med ESBL/ESBL-CARBA / antal testade blododlingar | Referensmetod | Sensitivitet | Specificitet | Tidsåtgång |
|-------|--------------------|-------|-----------------------------|---|---|--------------|--------------|------------|
| PCR | Francis RO, et al. | 2012 | KPC | 28/321 (2 Salmonella spp testades ej) | Automatiserad metod (för imipenem och meropenem, Vitek 2 AST card GN35, bioMerieux) | 92,90% | 99,30% | 3 h |
| | Francis RO, et al. | 2012 | KPC | 28/323 | ErtapenemAST med Kirby-Bauer disk-diffusionsmetod (CLSI tolkningskriterier) | 96,40% | 99,70% | 3 h |
| | Hindiyeh M, et al. | 2011 | KPC | 55/323 | Modified Hodge test | 100% | 100% | 4 h |
| | Fujita S, et al. | 2011 | CTX-M | 20/255 | Combination disk method | 100% | 100% | 1,5 h |

Tabell 4. Detektering av ESBL/ESBL-CARBA direkt från positiva blododlingsflaskor med PCR. Tidsåtgången räknas från larmande blododlingsflaska.

| Metod | Fördelar | Nackdelar |
|--------------------------|---|--|
| Kolorimetriska snabbtest | Kan upptäcka ESBL- och karbapenemasaktivitet oberoende av enzym, även nya enzym. Kräver ingen dyr utrustning. Enkelt att använda. | Svårare att hitta OXA-48-gruppens enzym. Vissa problem med lyserat blod i en studie. |
| Maldi-TOF | Kan upptäcka ESBL- och karbapenemasaktivitet oberoende av enzym, även nya enzym. | Relativt dyr utrustning. Kompetenskrävande. Annat program än för artbestämning krävs. Vissa svårigheter att upptäcka OXA-48. |
| Lappdiffusion | Kan upptäcka ESBL- och karbapenemasaktivitet oberoende av enzym, även nya enzym. Kräver ingen dyr utrustning. Enkelt att använda. | Få publikationer av denna metod direkt från blododlingsflaskor. |
| PCR | Ger snabb information om specifika gener och genvarianter. | Riktat mot kända gener och genvarianter, nya enzym kan missas. Kompetenskrävande. Relativt dyr utrustning. |

Tabell 5. Sammanställning av fördelar och nackdelar med respektive metod.

Diskussion

De metoder för snabb detektion av ESBL- och ESBL_{CARBA}-producerande Enterobacteriaceae direkt från positiva blododlingsflaskor som idag står till buds är kolorimetriska snabbtest, MALDI-TOF, lappdiffusionsmetoder och PCR. Alla dessa metoder ger svar inom 0,5-5,5 timmar. Sensitivitet och specificitet att upptäcka ESBL och ESBL_{CARBA} hos Enterobacteriaceae direkt från positiva blododlingsflaskor med ovanstående metoder ligger mellan 91 – 100 % respektive 90 – 100 %. Microarray kan också användas för att detektera ESBL och ESBL_{CARBA} direkt från positiva blododlingsflaskor men kräver längre tid till detektion, från 6-8 timmar (personlig kommunikation, JT. Fishbain) [34-35].

Flera av de inkluderade studierna i den här litteraturgenomgången är små vilket gör det svårt att dra några större slutsatser, men eftersom det inte finns många studier inom området är resultaten ändå intressanta. Större studier välkomnas dock. Resultaten som redovisas i litteraturgenomgången kommer till stor del från laboratorier som utvecklat själva testerna, eller modifierat dem, och har inte utvärderats i större omfattning i andra studier. En ytterligare begränsning med litteraturgenomgången är att det endast är metoder för snabb detektion av ESBL och ESBL_{CARBA} som inkluderats, metoder för snabb detektion av andra resistensmekanismer har inte studerats närmare.

Bland de beskrivna metoderna i den här litteraturgenomgången är det ESBL NDP (ett kolorimetriskt test) som ger snabbast resultat, inom 30 minuter enligt studien av Dortet et al. Studien med flest antal undersökta isolat är Carba NP-studien som omfattar 193 karbapenemaspositiva isolat, dock baseras denna studie på inokulerade blododlingsflaskor och ej på blododlingar från patienter. Sensitiviteten att upptäcka KPC, IMP, VIM och NDM ligger på 100 %, medan OXA-48 är svårare att detektera. Problem att detektera OXA-gruppens enzym ses även med MALDI-TOF, men då rör det sig i de flesta fall om OXA-23 hos *A. baumannii* [26, 28]. Det kan också tilläggas att även andra karbapenemaser som NDM och VIM hos *A. baumannii* är svåra att detektera med MALDI-TOF [26].

Fördelarna med fenotypiska tester som kolorimetriska snabbtest, MALDI-TOF och lappdiffusion är att de kan upptäcka ESBL- och karbapenemasaktivitet oberoende av vilket enzym som produceras, vilket innebär detektion också av nya enzym. Dessutom är priset lågt vilket är en stor fördel i låginkomstländer där andelen ESBL- och ESBL_{CARBA}-producerande Enterobacteriaceae ofta är hög. Betalaktamresistens som orsakas av andra mekanismer än enzymproduktion, exempelvis porinförlust, kan inte hittas med kolorimetriska snabbtest och MALDI-TOF. Misstanke om annan resistensmekanism kan däremot uppkomma med lappdiffusion.

Fördelarna med molekylärbaserade metoder är att de snabbt ger information om specifika gener och genvarianter. Dock ställer de höga krav på personal och priset är relativt dyrt. Ett problem med realtids-PCR är att betalaktamasgener som kräver andra val av primers inte kan upptäckas, och detektion av en ESBL/karbapenemasgen kan heller inte garantera att genen uttrycks. Dessutom behövs detaljerad gensekvensanalys för att skilja mellan smalspektrum betalaktamaser och ESBL, vilket gäller TEM- och SHV-enzymtyper [23].

Att påvisa genotypisk resistens kan vara av stort intresse vid exempelvis utbrott, men för en patient som söker akut med sepsis räcker det i regel att få kännedom om den fenotypiska resistensen.

Vid fortsatt ökning av ESBL/ESBL_{CARBA} kan det vara av värde att införa snabbtester för blododlingar i rutin i Sverige, om det kan göra att svaret till behandlande läkare kan nå ut fortare. När en blododlingsflaska larmar på morgonen en vardag på ett mindre laboratorium kommer svar om att det kan röra sig om en ESBL/ESBL_{CARBA} på eftermiddagen. I dessa fall tillför snabbdiagnostik med kolorimetriskt snabbtest, MALDI-TOF eller PCR inte så mycket, men de kan dock ge en viss tidsvinst som kan vara av värde hos en svårt sjuk patient. För en ESBL/ESBL_{CARBA}-positiv blododlingsflaska som larmar på eftermiddagen torde vinsten med ett snabbtest för en svårt sjuk patient vara mycket stor, eftersom svaret då ges samma dag som flaskan larmar. I dagsläget är det knappast kostnadseffektivt att köra snabbtester på alla blododlingar, men för svårt septiska patienter eller patienter som ex

vårdats utomlands eller har någon annan riskfaktor för ESBL/ESBL_{CARBA} skulle snabbtest kunna göras.

Det är då avgörande med en god kommunikation mellan behandlande läkare och laboratoriet.

Största vinsten med snabb detektion är framför allt att hitta ESBL_{CARBA} hos patienter med sepsis eftersom dessa patienter i regel får behandling med betalaktamantibiotika och initialt är helt utan adekvat antibiotikabehandling. Detta gäller förstås även patienter med ESBL-sepsis, men dessa får om de är kraftigt allmänpåverkade bredare behandling med ex karbapenemer. Snabb detektion är även viktigt för att tidigt kunna sätta in adekvata smittskyddsåtgärder för att minska spridningen av ESBL och ESBL_{CARBA}.

Referenser

1. Kumar A, Ellis P, Arabi Y, Roberts D, Light B, Parrillo JE, et al. Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest*. 2009 Nov;136(5):1237-48.
2. Valles J, Rello J, Ochagavia A, et al. Community-acquired bloodstream infection in critically ill adult patients: impact of shock and inappropriate antibiotic therapy on survival. *Chest* 2003, 123:1615–1624.
3. MacArthur RD, Miller M, Albertson T, et al. Adequacy of early empiric antibiotic treatment and survival in severe sepsis: experience from the MONARCS trial. *Clin Infect Dis* 2004, 38:284–288.
4. Garnacho-Montero J, Garcia-Garmendia JL, Barrero-Almodovar A, et al.: Impact of adequate empirical antibiotic therapy on the outcome of patients admitted to the intensive care unit with sepsis. *Crit Care Med* 2003, 31:2742–2751.
5. Schwaber MJ, Carmeli Y. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae bacteremia: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Nov;60(5):913-20.

6. Ben-Ami R, Rodríguez-Baño J, Arslan H, Pitout JD, Quentin C, Calbo ES, et al. A multinational survey of risk factors for infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in nonhospitalized patients. *Clin Infect Dis*. 2009;49(5):682.
7. Brolund A. Overview of ESBL-producing Enterobacteriaceae from a Nordic perspective. *Infect Ecol Epidemiol*. 2014;4:24555.
8. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*. 2011 Oct; 17(10): 1791–1798.
9. Tängdén T, Giske CG. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. *J Intern Med*. 2015 May;277(5):501-12.
10. <https://www.folkhalsomyndigheten.se/pagefiles/24127/Swedres-Svarm-2015-15099.pdf>
11. Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann H, Monnet DL; European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) working group. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. *Euro Surveill*. 2015;20(45).
12. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-carbapenemase-producing-bacteria-europe.pdf>
13. Glasner C, Albiger B, Buist G, Tambić Andrasević A, Canton R, Carmeli Y. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: a survey among national experts from 39 countries, February 2013. *Euro Surveill*. 2013 Jul 11;18(28).
14. Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 15–22.
15. Dautzenberg MJ, Ossewaarde JM, de Kraker ME et al. Successful control of a hospital-wide outbreak of OXA-48 producing Enterobacteriaceae in the Netherlands, 2009 to 2011. *Euro Surveill* 2014; 19: pii: 20723.

16. Fattouh R, Tijet N, McGeer A, Poutanen SM, Melano RG, Patel SN. What Is the Appropriate Meropenem MIC for Screening of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Low-Prevalence Settings? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016;60(3):1556-1559. doi:10.1128/AAC.02304-15.
17. <https://www.folkhalsomyndigheten.se/pagefiles/17838/ESBL-producerande%20tarmbakterier.pdf>
18. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2010;10(9):597-602.
19. Matuschek E, Brown DF, Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Apr;20(4):O255-66.
20. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Direct_testing_guidance_note_Feb2012.pdf
21. Nordmann, Poirel, Dortet. Rapid Detection of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2012;18:1503-07.
22. Dortet L, Brécharde L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from blood cultures. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Apr;20(4):340-4.
23. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Rapid Detection of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012;50(9):3016-3022.
24. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of ESBL-producing Enterobacteriaceae in blood cultures. *Emerg Infect Dis*. 2015 Mar;21(3):504-7.
25. Jain S, Andrews J, Fraise A, Brenwald N. Rapid detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing Gram-negative bacilli in blood cultures. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Sep;60(3):652-4.
26. Ghebremedhin B, Halstenbach A, Smiljanic M, Kaase M, Ahmad-Nejad P. MALDI-TOF MS based

carbapenemase detection from culture isolates and from positive blood culture vials. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2016 Feb 2;15(1):5.

27. Oviaño M, Fernández B, Fernández A, Barba MJ, Mouriño C, Bou G. Rapid detection of Enterobacteriaceae producing extended spectrum beta-lactamases directly from positive blood cultures by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Nov;20(11):1146-57.

28. Carvalhaes CG, Cayô R, Visconde MF, Barone T, Frigatto EA, Okamoto D et al. Detection of carbapenemase activity directly from blood culture vials using MALDI-TOF MS: a quick answer for the right decision. *J Antimicrob Chemother*. 2014 Aug;69(8):2132-6.

29. Hoyos-Mallecot Y, Riazco C, Miranda-Casas C, Rojo-Martín MD, Gutiérrez-Fernández J, Navarro-Marí JM. Rapid detection and identification of strains carrying carbapenemases directly from positive blood cultures using MALDI-TOF MS. *J Microbiol Methods*. 2014 Oct;105:98-101.

30. Weinbren MJ, Borthwick MA. Rapid detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing organisms in blood culture. *J Antimicrob Chemother*. 2005 Jan;55(1):131-2.

31. Francis RO, Wu F, Della-Latta P, Shi J, Whittier S. Rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes in Enterobacteriaceae directly from blood culture bottles by real-time PCR. *Am J Clin Pathol*. 2012 Apr;137(4):627-32.

32. Hindiyeh M, Smollan G, Grossman Z, Ram D, Robinov J, Belausov N, et al. Rapid detection of blaKPC carbapenemase genes by internally controlled real-time PCR assay using bactec blood culture bottles. *J Clin Microbiol*. 2011 Jul;49(7):2480-4.

33. Fujita S, Yosizaki K, Ogushi T, Uechi K, Takemori Y, Senda Y. Rapid identification of gram-negative bacteria with and without CTX-M extended-spectrum β -lactamase from positive blood culture bottles by PCR followed by microchip gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*. 2011 Apr;49(4):1483-8.

34. Fishbain JT, Sinyavskiy O, Riederer K, Hujer AM, Bonomo RA. Detection of extended-spectrum β -lactamase and *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase genes directly from blood cultures by use of a nucleic acid microarray. *J Clin Microbiol.* 2012 Sep;50(9):2901-4.
35. Juiz P, Solé M, Pitart C, Marco F, Almela M, Vila J. Detection of extended-spectrum β -lactamase- and/or carbapenemase-producing Enterobacteriaceae directly from positive blood culture using a commercialised microarray technique. *Int J Antimicrob Agents.* 2014 Jul;44(1):88-9.