

Wykrywanie karbapenemaz – zalecenia 2015

Dorota Żabicka¹, Anna Baraniak², Elżbieta Literacka¹,
Marek Gniadkowski², Waleria Hryniewicz¹

1. Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Narodowy Instytut Leków

2. Zakład Mikrobiologii Molekularnej, Narodowy Instytut Leków

Pałeczki jelitowe z rodziny *Enterobacteriaceae*

U pałeczek jelitowych z rodziny *Enterobacteriaceae* najczęściej występują karbapenemazy KPC (klasa A), metalo- β -laktamazy VIM, NDM (MBL, klasa B) oraz (OXA-48 (klasa D). Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD) zgodnie z rekomendacjami EUCAST zaleca wykrywanie karbapenemaz u wszystkich izolatów *Enterobacteriaceae*, wykazujących obniżoną wrażliwość na którykolwiek z karbapenemów: ertapenem, meropenem lub imipenem. Właściwe wartości graniczne karbapenemów, które należy użyć aby zakwalifikować szczep do fenotypowych testów przesiewowych w kierunku wykrywania karbapenemaz zamieszczono w Tabeli 1.

Dla wszystkich szczepów spełniających kryteria zawarte w tabeli nr 1 należy wykonać testy:

1. test Carba NP (metodyka dostępna na stronie KORLD) oraz
2. fenotypowe testy przesiewowe (metodyka w załączniku 1):
 - a. test z EDTA w kierunku MBL (Lee, 2003)
 - b. test z kwasem boronowym w kierunku KPC (Doi, 2008)
 - c. test z krążkiem z temocyliną 30 μ g w kierunku OXA-48 (Głupczyński, 2012, van Dijk, 2013)

Algorytm wykonywania testów przesiewowych przedstawiono na rycinie nr 1.

Dodatni wynik testu Carba NP potwierdza występowanie karbapenemazy w badanym izolacie bakterii ze 100% pewnością. Wykonanie testu Carba NP przyspiesza wydanie wyniku na Oddział i do Zespołu ds. Kontroli Zakażeń Szpitalnych oraz podjęcie właściwych procedur zapobiegających rozprzestrzenianiu się szczepów wytwarzających karbapenemazy.

Tabela nr 1.

Kliniczne wartości graniczne oraz wartości odcięcia stosowane do wyboru szczepów do fenotypowych testów przesiewowych w kierunku wykrycia karbapenemaz u pałeczek Enterobacteriaceae (zgodnie z metodologią EUCAST); (EUCAST, 2013).

Karbapenem	Wartości MIC (mg/L)		Wielkość strefy zahamowania wzrostu, krążek 10 µg (mm)	
	Kliniczna wartość graniczna	Wartość odcięcia dla testów przesiewowych	Kliniczna wartość graniczna	Wartość odcięcia dla testów przesiewowych
Meropenem ¹	≤2	>0,12	≥22	<25 ²
Imipenem ³	≤2	>1	≥22	<23
Ertapenem ⁴	≤0,5	>0,12	≥25	<25

¹Meropenem wykazuje najlepszą czułość i specyficzność jako wskaźnik obecności karbapenemazy.

²W przypadku niektórych producentów OXA-48 wielkość strefy zahamowania wzrostu może dochodzić do 26 mm; w przypadku ognisk epidemicznych wywołanych przez szczepy OXA-48 można używać wartości odcięcia <27 mm, ale następuje wtedy obniżenie specyficzności testu.

³Nie zaleca się wyboru szczepów do badań przesiewowych na podstawie wyniku oznaczania wrażliwości dla samego imipenemu, ze względu na brak wyraźnej granicy wartości MIC i wielkości stref zahamowania wzrostu pomiędzy szczepami dzikimi i szczepami wytwarzającymi karbapenemazami.

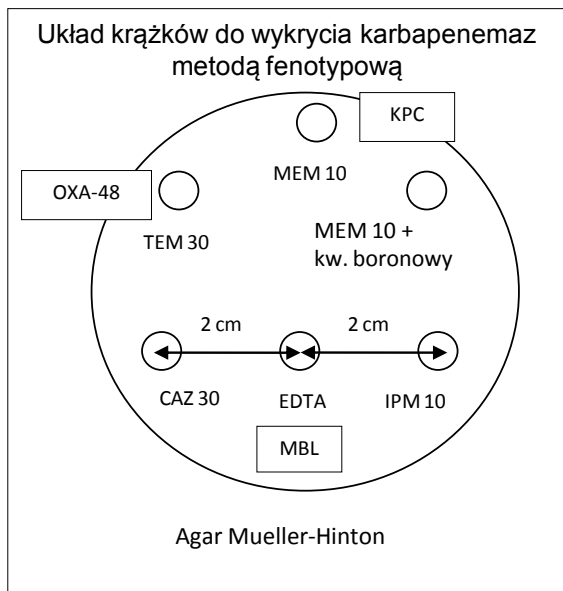
⁴Ertapenem wykazuje wysoką czułość wykrywania karbapenemaz, ale niską specyficzność.

Wszystkie szczepy z interpretacją „dodatni” w fenotypowych testach przesiewowych dla którejkolwiek z karbapenemaz (interpretacja: algorytm rycina nr 1) należy niezwłocznie przesłać do potwierdzenia do Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD) w celu potwierdzenia występowania karbapenemazy metodami referencyjnymi.

Do potwierdzenia należy wysłać **zarówno szczepy wyhodowane z zakażeń jak i z kolonizacji**. Jeśli w tym samym czasie od jednego pacjenta zostaną wyhodowane szczepy z zakażeń i z kolonizacji, to do potwierdzenia należy wysłać **pierwszy szczep wyhodowany z zakażenia**.

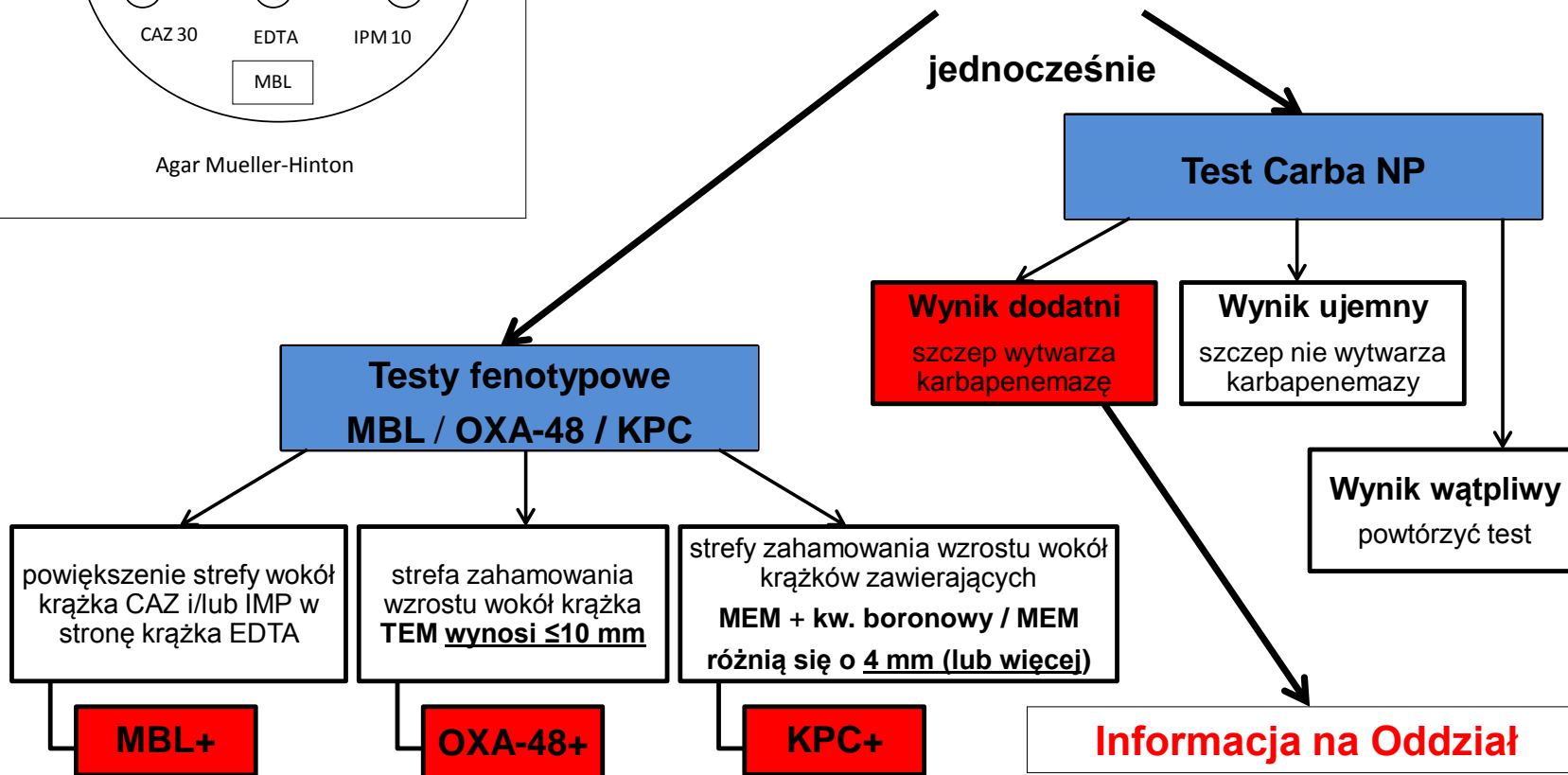
W przypadku wyhodowania szczepów w **ognisku epidemicznym** do potwierdzenia w KORLD należy przesłać **wszystkie szczepy wyhodowane w ognisku**.

Rycina 1. Algorytm wykonywania testów przesiewowych w celu wykrycia karbapenemaz u *Enterobacteriaceae*.



Wykrywanie karbapenemaz u *Enterobacteriaceae*
wszystkie izolaty spełniające następujące kryteria:

Karbapenem	Wartość MIC (mg/L)	Wielkość strefy zahamowania wzrostu krążek 10 µg (mm)
meropenem	>0,12	<25
imipenem	>1	<23
ertapenem	>0,12	<25



Opracowanie: Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Zakład Mikrobiologii Molekularnej, Narodowy Instytut Leków, Warszawa, 2015r.

Pałeczki niefermentujące z rodzajów *Pseudomonas* i *Acinetobacter*

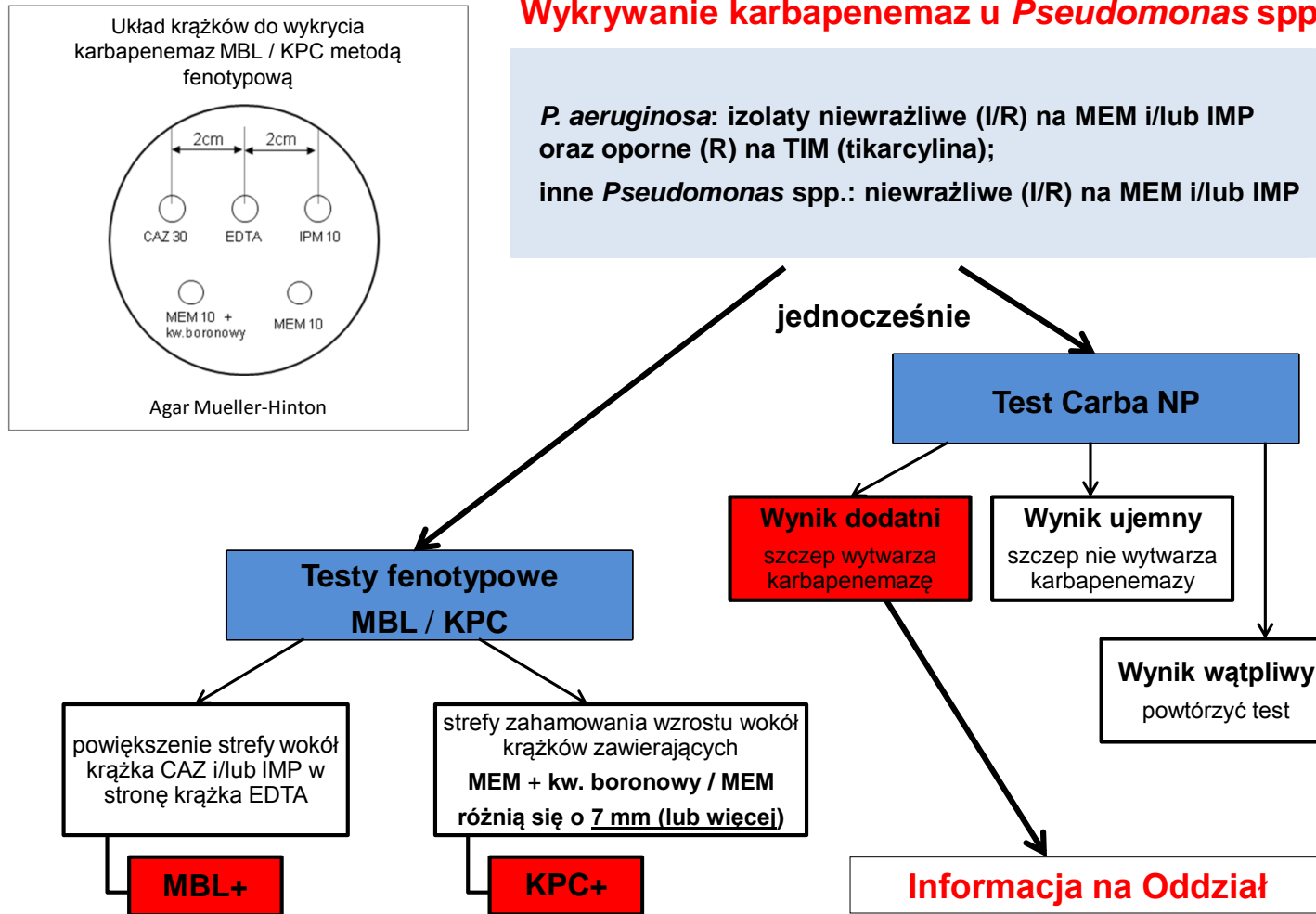
Pałeczki niefermentujące *Pseudomonas* spp. najczęściej wytwarzają karbapenemazy klasy B czyli MBL, natomiast *Acinetobacter* spp. karbapenemazy klasy D (karbapenemazy z rodziny OXA). Pojawiły się również doniesienia o występowaniu u tych drobnoustrojów karbapenemaz klasy A - KPC. Wykrywanie karbapenemaz u pałeczek niefermentujących należy wykonywać w przypadku szczepów spełniających następujące kryteria:

- *Pseudomonas aeruginosa*: izolaty niewrażliwe (średniowrażliwe lub odporne) na karbapenemy (imipenem, meropenem lub doripenem) i odporne na tikarcylinę z kwasem klawulanowym
- *Acinetobacter* spp. i pozostałe gatunki *Pseudomonas* spp.: izolaty niewrażliwe (średniowrażliwe lub odporne) na karbapenemy

Dla wszystkich szczepów spełniających powyższe kryteria należy wykonać test Carba NP/CarbAcineto (metodyka dostępna na stronie KORLD) oraz fenotypowe testy przesiewowe z EDTA w kierunku wykrycia MBL oraz test z kwasem boronowym w kierunku KPC (metodyka w załączniku 1). Testów fenotypowych w kierunku OXA nie wykonuje się. Algorytm wykonania testów przesiewowych dla *Pseudomonas* spp. przedstawia rycina nr 2, natomiast dla *Acinetobacter* spp. rycina 3. Metodykę wykonywania testów przesiewowych podano w załączniku nr 1.

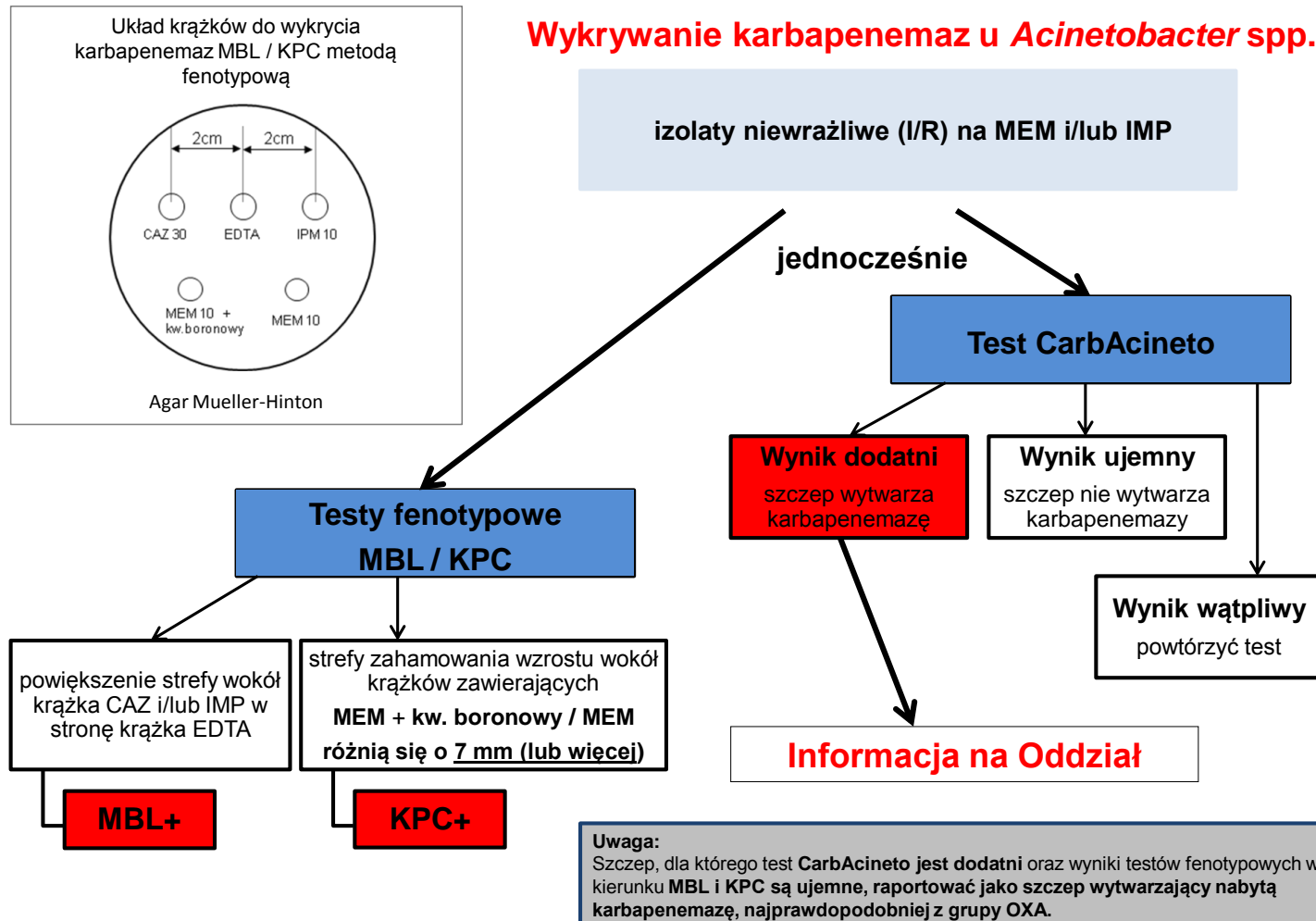
Do potwierdzenia przez KORLD należy przysyłać wszystkie szczepy wyhodowane z zakażeń, niewrażliwe na karbapenemy i wykazujące dodatni albo niejednoznaczny wynik testu w kierunku MBL lub dodatni wynik testu w kierunku KPC.

Rycina 2. Algorytm wykonywania testów przesiewowych w celu wykrycia karbapenemaz u pałeczek *Pseudomonas* spp.



Opracowanie: Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Zakład Mikrobiologii Molekularnej, Narodowy Instytut Leków, Warszawa, 2015r.

Rycina 3. Algorytm wykonywania testów przesiewowych w celu wykrycia karbapenemaz u pałeczek *Acinetobacter* spp.



Opracowanie: Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Zakład Mikrobiologii Molekularnej, Narodowy Instytut Leków, Warszawa, 2015r.

Literatura

1. Europejski komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości (EUCAST). Tabele interpretacji wartości granicznych minimalnych stężeń hamujących (MIC) oraz wielkości stref zahamowania wzrostu. Wersja 5.0, obowiązująca od 1 stycznia 2015r.. Strona internetowa Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów www.korld.edu.pl (2015)
2. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistance of clinical and/or epidemiological importance. Version 1.0, July 2013. Strona internetowa European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing www.eucast.org (2013)
3. M. Gniadkowski, D. Żabicka, W. Hryniewicz. Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki 2009. Oznaczanie wrażliwości pałeczek gram-ujemnych. Strona internetowa Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów www.korld.edu.pl (2009)
4. Lee K., Y. S. Lim, D. Yong, J. H. Yum, Y. Chong. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J. Clin. Microbiol., 41, 4623-4629 (2003)
5. Doi Y., B.A. Potoski, J.M. Adams-Haduch, H. E. Sidjabat, A. W. Pasculle, D. L. Paterson. Simple disk-based method for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-type β -lactamase by use of a boronic acid compound. J. Clin. Microbiol. 46, 4083-4086 (2008)
6. Glupczynski Y., Huang T.D., Bouchahrouf W., Rezende de Castro R., Bauraing C., Gérard M., Verbruggen A-M., Deplano A., Denis O., Bogaets P. Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates in Belgian hospitals. Int. J. Antimicrob. Agents. 39, 168-172 (2012)
7. van Dijk K., Voets G., Scharringa J., Voskuil S., Fluit A., Rottier W., Leverstein-Van Hall M., Cohen Stuart J. A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in Enterobacteriaceae using phenyl boronic acid, dipicolinic acid, and temocillin. Clin Microbiol Infect. 20(4):345-9 (2014)

Załącznik 1.

Metody wykrywania karbapenemaz – fenotypowe testy przesiewowe

Wykrywanie MBL testem fenotypowym z EDTA (Lee, 2003)

Oznaczenie wykonuje się metodą dyfuzyjno-krażkową zgodnie z metodyką EUCAST.

- Sterylne krążki bibułowe o średnicy 6 mm nasączyć 10 µl sterylnego 0,5M roztworu EDTA, pH 7,3-7,5.
- Na podłoże Mueller-Hinton agar nanieść zawiesinę bakterii o gęstości 0,5 McFarlanda w 0,9% NaCl
- Ułożyć **krążek z EDTA** i po jego obu stronach krążki z **ceftazydymem 30 µg** i **imipenemem 10 µg**, w odległości 2 cm od krążka z EDTA (między środkami krążków).
- Płytki inkubować w 35°C ± 1°C przez 18 ± 2 godz.
- Wynik dodatni testu: pojawienie się i wyraźne powiększenie strefy wokół krążka z ceftazydymem i/lub karbapenemem od strony krążka zawierającego EDTA, inhibitora MBL (obraz podobny do dodatniego wyniku oznaczania ESBL metodą dwóch krążków).

Wykrywanie KPC testem fenotypowym z kwasem boronowym (Doi, 2008)

Oznaczenie wykonuje się metodą dyfuzyjno-krażkową zgodnie z metodyką EUCAST.

- Przygotować **krążki meropenem + kwas fenyloboronowy**. Krążki meropenem 10 µg nasączyć 300 µg kwasu fenyloboronowego (20 µl roztworu o stężeniu 15 mg/ml) i zostawić na 30 min w temperaturze pokojowej.
- Na podłoże Mueller-Hinton agar nanieść zawiesinę bakterii o gęstości 0,5 McFarlanda w 0,9% NaCl.
- Ułożyć **krążek meropenem 10 µg** i w odległości nie mniejszej niż 3 cm **krążek meropenem + kwas fenyloboronowy**
- Płytki inkubować w 35°C ± 1°C przez 18 ± 2 godz.
- Wynik dodatni testu, podejrzenie produkcji KPC:
 - ✓ pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*: różnica (powiększenie) wielkości średnicy strefy zahamowania wzrostu wokół krążka z meropenemem w stosunku do krążka meropenem + kwas fenyloboronowy o 4 mm lub więcej;
 - ✓ pałeczek niefermentujących z rodzajów *Pseudomonas* i *Acinetobacter*: różnica (powiększenie) wielkości średnicy strefy zahamowania wzrostu wokół krążka z meropenemem w stosunku do krążka meropenem + kwas fenyloboronowy o 7 mm lub więcej.

Wykrywanie OXA-48 testem z krążkiem z temocyliną 30 µg (Glupczyński, 2012, van Dijk, 2013)

Oznaczenie wykonuje się metodą dyfuzyjno-krążkową zgodnie z metodyką EUCAST.

- Na podłoże Mueller-Hinton agar nanieść zawiesinę bakterii o gęstości 0,5 McFarlanda w 0,9% NaCl
- Ułożyć **krążek z temocyliną 30 µg**
- Płytki inkubować w 35°C ± 1°C przez 18 ± 2 godz.
- Wynik dodatni testu i podejrzenie produkcji OXA-48: średnica strefy zahamowania wzrostu mniejsza lub równa 10 mm.

Izolaty *Enterobacteriaceae* produkujące karbapenemazę OXA-48 wykazują wysoki poziom oporności na temocylinę (MIC od 128 do >256 mg/L) oraz oporność na piperacylinę z tazobaktamem (Glupczynski, 2012).

Szczepy kontrolne:

- *Escherichia coli* ATCC 25922 - kontrola jakości oznaczania lekowrażliwości, służy także do kontroli jakości oznaczenia ESBL jako kontrola negatywna
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 - kontrola jakości oznaczania lekowrażliwości służy także do kontroli jakości prawidłowej zawartości Ca²⁺ i Mg²⁺ w podłożu MHA
- *Pseudomonas aeruginosa* MIKROBANK 13.001 - służy do kontroli jakości oznaczania MBL (kontrola pozytywna, szczep MBL⁺).

Szczepy kontrolne do wykrywania karbapenemaz metodami fenotypowymi, zalecane przez EUCAST (2).

Szczep	Mechanizm
<i>K. pneumoniae</i> NCTC 13440	<u>kontrola dodatnia MBL+</u>
<i>K. pneumoniae</i> NCTC 13438	<u>kontrola dodatnia KPC +</u>
<i>K. pneumoniae</i> NCTC 13442	<u>kontrola dodatnia OXA-48+</u>
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 25955	<u>kontrola negatywna</u> (szczep wrażliwy na karbapenemy)