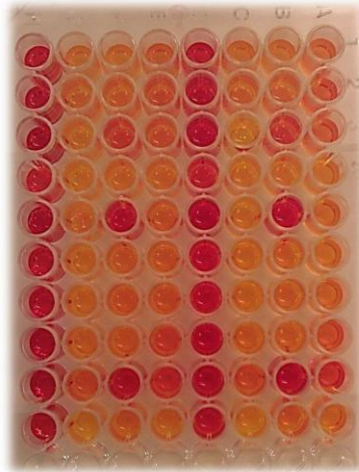




## Rapport 2-2014

Mars 2014



### Evaluering av Carba NP metoden for rask påvisning av ESBL<sub>CARBA</sub> hos *Enterobacteriaceae* og *Pseudomonas aeruginosa*

**Bjørg C. Haldorsen\***, **Arnfinn Sundsfjord** og **Ørjan Samuelson\***

Kompetansetjeneste for påvisning av antibiotikaresistens (K-res)

Avdeling for mikrobiologi og smittevern

Universitetssykehuset Nord-Norge, 9038 Tromsø.

\*Kontaktinformasjon: orjan.samuelson@unn.no (Ø. Samuelson) eller bjorg.haldorsen@unn.no (B. Haldorsen)

## Bakgrunn

Spredning av multiresistente Gram-negative bakterier er et økende globalt problem. Spesielt har karbapenemaseproduserende (ESBL<sub>CARBA</sub>) stammer fått stor oppmerksomhet (12). Bakterier som produserer ESBL<sub>CARBA</sub> er gjerne resistente mot eller har nedsatt følsomhet for alle  $\beta$ -laktamantibiotika (penicilliner, cefalosporiner og karbapenemer) og er som oftest også resistente mot andre viktige antibiotikagrupper, noe som begrenser behandlingsalternativene. ESBL<sub>CARBA</sub> gruppen deles inn i tre sub-grupper; ESBL<sub>CARBA-A</sub>, ESBL<sub>CARBA-B</sub> og ESBL<sub>CARBA-D</sub> (4). ESBL<sub>CARBA-A</sub> og ESBL<sub>CARBA-D</sub> er serinkarbapenemaser, mens ESBL<sub>CARBA-B</sub> er metallo- $\beta$ -laktamaser (MBL). Innenfor hver sub-gruppe er det beskrevet flere forskjellige typer/varianter. De mest vanligst forekommende er KPC (ESBL<sub>CARBA-A</sub>), VIM og NDM (ESBL<sub>CARBA-B</sub>) samt OXA-48 (ESBL<sub>CARBA-D</sub>).

Identifisering av ESBL<sub>CARBA</sub>-produserende Gram-negative bakterier er viktig for hensiktsmessig behandling og implementering av smittevern. Påvisning av ESBL<sub>CARBA</sub>-produksjon både fenotypisk og genotypisk er utfordrende. Spesielt hos Enterobacteriaceae kompliseres dette ytterligere ved at ESBL<sub>CARBA</sub>-positive isolater kan uttrykke relativt lavgradige MIC-verdier for karbapenemer og kategoriseres som sensitive etter gjeldene kliniske brytningspunkter. I henhold til gjeldende retningslinjer skal derfor Enterobacteriaceae-isolater som uttrykker meropenem MIC over villtype MIC (> 0.125 mg/ml) undersøkes videre for uttrykk av ESBL<sub>CARBA</sub>. Fenotypisk påvisning kan gjøres ved bruk av  $\beta$ -laktamasehemmere som for eksempel borsyre som hemmer ESBL<sub>CARBA-A</sub> og metallkelatorer (EDTA/dipikolinsyre) som hemmer ESBL<sub>CARBA-B</sub> (5,7). For ESBL<sub>CARBA-D</sub> gruppen er det ikke beskrevet noen spesifikke hemmere. Kommersielt finnes det tilgjengelig tabletter og gradienttester som kombinerer karbapenemer med forskjellige hemmere. Bruk av kløverblad (modifisert Hodge test) for deteksjon av ESBL<sub>CARBA</sub> er også beskrevet (7). Andre metoder inkluderer bruk av MALDI-TOF (6) og spektrofotometrisk deteksjon (1). For genotypisk påvisning er det beskrevet flere ulike molekylære metoder som for eksempel PCR og mikroarray. Utfordringen med genotypiske metoder er den store diversiteten av ESBL<sub>CARBA</sub>- $\beta$ -laktamaser.

Carba NP testen er en nylig beskrevet biokjemisk test for rask påvisning av ESBL<sub>CARBA</sub> (2,8). Metoden har vist relativt god spesifisitet og sensitivitet for påvisning av ESBL<sub>CARBA</sub>-produksjon hos Enterobacteriaceae og *Pseudomonas aeruginosa* (2,8,10,13). Metoden er basert på at det dannes syre når ESBL<sub>CARBA</sub>-enzymet bryter ned imipenem. Denne syredannelsen kan observeres som et fargeomslag fra rødt til gul/oransje ved bruk av en pH indikator (fenolrødt). I denne rapporten beskriver vi resultatene fra en uttesting av denne metoden ved K-res. Deler av uttesting ble gjort av en bioingeniørstudent som en avsluttende bacheloroppgave ved Universitetet i Tromsø.

## Material og metode

Stammematerialet i denne utprøvingen er presentert i Tabell 1 og bestod av til sammen 95 tidligere karakteriserte Enterobacteriaceae og *P. aeruginosa* med genotypisk påvist ESBL<sub>CARBA</sub> gener, samt ESBL<sub>CARBA</sub>-negative stammer.

Tabell 1. Stammematerialet fordelt på species og ESBL<sub>CARBA</sub> gruppe.

Species	ESBL <sub>CARBA</sub> -A (n=14)	ESBL <sub>CARBA</sub> -B (n=47)	ESBL <sub>CARBA</sub> -D (n=7)	ESBL <sub>CARBA</sub> negative (n=28)
<i>Escherichia coli</i> (n=13)	0	6 <sup>1</sup>	3 <sup>2</sup>	4
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=29)	10 <sup>3</sup>	14 <sup>4*</sup>	4 <sup>5*</sup>	2
<i>Enterobacter/Citrobacter sp</i> (n=10)	4 <sup>6</sup>	1 <sup>7</sup>	0	5
<i>Proteus mirabilis</i> (n=1)	0	1 <sup>7</sup>	0	0
<i>Morganella morgannii</i> (n=1)	0	0	0	1
<i>Providencia stuartii</i> (n=1)	0	1 <sup>7</sup>	0	0
<i>Serratia marcescens</i> (n=2)	0	1 <sup>8</sup>	0	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=38)	0	23 <sup>9</sup>	0	15

<sup>1</sup>NDM (n=5) og VIM (n=1), <sup>2</sup>OXA-48, <sup>3</sup>KPC, <sup>4</sup>NDM (n=7) og VIM (n=7), <sup>5</sup>OXA-48 (n=3) og OXA-181 (n=1), <sup>6</sup>KPC (n=2) og IMI (n=2), <sup>7</sup>NDM, <sup>8</sup>IMP, <sup>9</sup>VIM (n=15), NDM (n=1), IMP (n=3), GIM (n=1), SPM (n=1), AIM (n=1), og SIM (n=1)

\* *Klebsiella pneumoniae* positiv for både NDM og OXA-181.

### Fremgangsmåte:

- Bakteriestammene dyrkes over natt v/37°C på Mueller-Hinton (MH) agar (Oxoid, Basingstoke, England).
- 2 blå øser (10 µl) med bakterier resuspenderes i 200 µl B-PER II lysisbuffer (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA) i et eppendorf rør.
- Prøvene vortexes i 1 min.
- Prøvene innkuberes i romtemperatur i 30 min.
- Bakteriesuspensjonen sentrifugeres deretter i 5 min v/10000 x g.
- Løsning A lages som beskrevet i vedlegget. 12 mg imipenem/cilastin tilsettes pr 1 ml Løsning A (sluttkonsentrasjon 6 mg/ml imipenem).
- 30 µl av bakteriesupernatanten tilsettes 100 µl Løsning A uten imipenem og 100 µl Løsning A med imipenem.
- Rørene innkuberes i inntil 2 timer v/37°C.
- Fargeomslag fra rødt til gul/oransje i røret med Løsning A tilsatt imipenem, tolkes som positivt resultat. Ingen fargeomslag tolkes som negativt resultat. Ved fargeomslag i Løsning A uten imipenem tolkes dette som en inkonklusiv test.

## Resultater

Oppsummering av resultatene av Carba NP-testen er presentert i Tabell 2.

Tabell 2. Resultater av Carba NP test utført på ulike Enterobacteriaceae og *P. aeruginosa*.

Species	Antall	ESBL <sub>CARBA</sub> -gruppe	Carba NP resultat	
			Positiv	Negativ
<i>Escherichia coli</i>	6	B	6	0
	3	D	3	0
	4	Negativ	0	4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	A	10	0
	14	B	14	0
	4	D	4	0
	2	Negativ	0	2
<i>Enterobacter/Citrobacter sp</i>	4	A	4	0
	1	B	1	0
	5	Negativ	0	5
<i>Proteus mirabilis</i>	1	B	0	1
<i>Morganella morgannii</i>	1	Negativ	0	1
<i>Providencia stuartii</i>	1	B	0	1
<i>Serratia marcescens</i>	1	B	1	0
	1	Negativ	0	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23	B	22	1
	15	Negativ	0	15

Innenfor Enterobacteriaceae-gruppen ble alle stammene med genotypisk påvist ESBL<sub>CARBA</sub> gen positive med Carba NP-testen, med unntak av to NDM positive *Proteus mirabilis* og *Providencia stuartii* stammer. Det ble observert at noen stammer med OXA-48 (ESBL<sub>CARBA-D</sub>) ble svak positive (oransje farge) sammenlignet med stammer med ESBL<sub>CARBA-A</sub> og ESBL<sub>CARBA-B</sub>. Alle ESBL<sub>CARBA</sub> negative Enterobacteriaceae stammer ga negativt test resultat. Dette ga en sensitivitet og spesifisitet på henholdsvis 96 % og 100 %.

Blant *P. aeruginosa* stammene ble 22/23 stammer med genotypisk påvist ESBL<sub>CARBA</sub> funnet positive med testen. En *P. aeruginosa* stamme med VIM kom ut negativ. Alle ESBL<sub>CARBA</sub> negative *P. aeruginosa* stammer ga negativt test resultat. Dette ga også en sensitivitet og spesifisitet på henholdsvis 96 % og 100 %.

## Diskusjon og konklusjon

Resultatene viste at Carba NP testen er en sensitiv og spesifikk test for påvisning av ESBL<sub>CARBA</sub> produksjon hos Enterobacteriaceae og *P. aeruginosa*. To Enterobacteriaceae (*P. mirabilis* og *P. stuartii*) stammer med NDM samt en *P. aeruginosa* stamme med VIM testet negative med CarbaNP. Det er tidligere beskrevet falske negative resultater med NDM positive isolater (10), men årsaken til disse falske negative resultatene er uklare. Det er blitt beskrevet at vekstmedium og forskjeller mellom produsenter av Mueller-Hinton (MH) agar kan ha betydning for testen (3,11). I denne evalueringen ble det benyttet MH agar fra Oxoid, mens de som beskrev metoden anbefaler MH agar fra Becton-Dickinson (3). Ufullstendig lysering av bakteriene kan også være en mulig årsak til falske negative resultater (11).

OXA-48 som tilhører ESBL<sub>CARBA-D</sub> gruppen har relativt svak karbapenemaseaktivitet (9) og det er beskrevet at OXA-48 isolater komme ut som falske negative med Carba NP testen (10). Det ble ikke observert noen falske negative resultater med stammer positive for OXA-48 i vår utprøving, men det ble observert at noen isolater med OXA-48 ga et svakt positivt fargeomslag fra rødt til oransje i stedet for et klart fargeomslag til gult.

Basert på denne evalueringen og publiserte studier er Carba NP testen en relativt enkel test med god sensitivitet og spesifisitet for rask påvisning av ESBL<sub>CARBA</sub>-produksjon hos Enterobacteriaceae og *P. aeruginosa*. K-res er behjelpelig med kontrollisolater og metodikk hvis noen ønsker å etablere metoden i eget laboratorium. Innsending av isolater til referanselaboratorium for molekylær verifisering anbefales uansett i forhold til etablerte kriterier for å opprettholde den nasjonale overvåkingen og observerte falske negative resultater med testen.

## Takk

K-res ønsker å takke alle respektive norske kliniske mikrobiologiske laboratorier og eksterne samarbeidspartnere for innsendte isolater benyttet i uttestingen. En stor takk også til bioingeniørstudent Marthe Sofie Olsen Andreassen for bidrag i uttestingen.

## Referanser

1. **Bernabeu, S., L. Poirel, and P. Nordmann.** 2012. Spectrophotometry-based detection of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.* **74**:88-90.
2. **Dortet, L., L. Poirel, and P. Nordmann.** 2012. Rapid identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test. *Antimicrob.Agents Chemother.* **56**:6437-6440.
3. **Dortet, L., L. Poirel, and P. Nordmann.** 2014. Further proofs of concept for the Carba NP test. *Antimicrob.Agents Chemother.* **58**:1269.
4. **Giske, C. G., A. S. Sundsfjord, G. Kahlmeter, N. Woodford, P. Nordmann, D. L. Paterson, R. Canton, and T. R. Walsh.** 2009. Redefining extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: balancing science and clinical need. *J.Antimicrob.Chemother.* **63**:1-4.
5. **Hansen, F., A. M. Hammerum, R. L. Skov, C. G. Giske, A. Sundsfjord, and O. Samuelsen.** 2012. Evaluation of ROSCO Neo-Sensitabs for phenotypic detection and subgrouping of ESBL-, AmpC- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *APMIS* **120**:724-732.
6. **Hrabak, J., E. Chudackova, and R. Walkova.** 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin.Microbiol.Rev.* **26**:103-114.
7. **Nordmann, P., M. Gniadkowski, C. G. Giske, L. Poirel, N. Woodford, and V. Miriagou.** 2012. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin.Microbiol.Infect.* **18**:432-438.
8. **Nordmann, P., L. Poirel, and L. Dortet.** 2012. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg.Infect.Dis.* **18**:1503-1507.
9. **Poirel, L., A. Potron, and P. Nordmann.** 2012. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J.Antimicrob.Chemother.* **67**:1597-1606.
10. **Tijet, N., D. Boyd, S. N. Patel, M. R. Mulvey, and R. G. Melano.** 2013. Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **57**:4578-4580.
11. **Tijet, N., D. Boyd, S. N. Patel, M. R. Mulvey, and R. G. Melano.** 2014. Reply to "Further proofs of concept for the Carba NP test". *Antimicrob.Agents Chemother.* **58**:1270.
12. **Tzouvelekis, L. S., A. Markogiannakis, M. Psychogiou, P. T. Tassios, and G. L. Daikos.** 2012. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin.Microbiol.Rev.* **25**:682-707.
13. **Vasoo, S., S. A. Cunningham, P. C. Kohner, P. J. Simner, J. N. Mandrekar, K. Lolans, M. K. Hayden, and R. Patel.** 2013. Comparison of a novel, rapid chromogenic biochemical assay, the Carba NP test, with the modified Hodge test for detection of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. *J.Clin.Microbiol.* **51**:3097-3101.

## Vedlegg

Løsning A (fenolrødt-løsning):

- 0,15 g fenolrødt (Sigma P4758) løses i 30 ml dH<sub>2</sub>O.
- Tilsett 249 ml dH<sub>2</sub>O.
- Juster pH til 7.8 med 1M NaOH.
- Tilsett 2,7 ml 10 mM ZnSO<sub>4</sub> (→ 0,1 mM sluttkonsentrasjon)

Løsning A fordeles i 5 ml porsjoner og fryses v/-20 °C

Imipenem/Cilastin 500 mg. Levert fra sykehusapoteket

- Vei opp i porsjoner á 12 mg og frys disse v/-20°C .
- Bruk kryorør m/skrukork.