

Evalueringsrapport 2018-1:

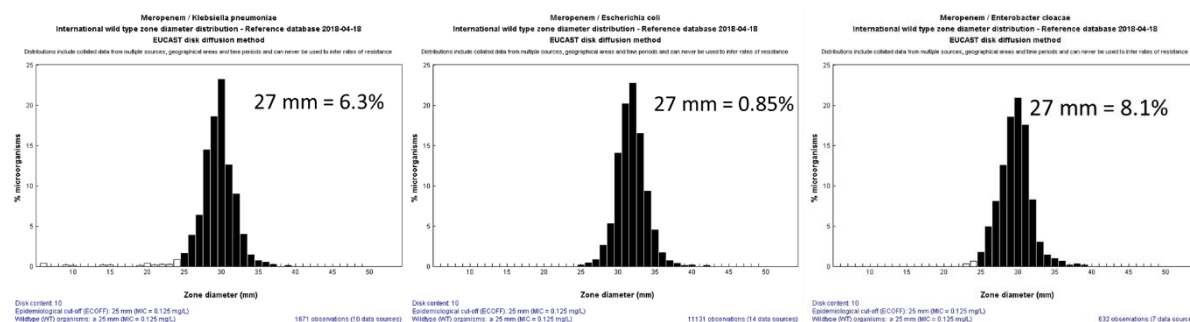
Endring i meropenem screeningsbrytningspunkt for påvisning av karbapenemaseproduserende Enterobacterales – konsekvenser for referansediagnostikk ved K-res

Björg Haldorsen (Bjorg.Christina.Haldorsen@unn.no), Arnfinn Sundsfjord (arnfinn.sundsfjord@uit.no) og Ørjan Samuelsen (orjan.samuelsen@unn.no)

Introduksjon

I november 2017 publiserte EUCAST nye anbefalinger for påvisning av resistensmekanismer av klinisk og/eller epidemiologisk betydning (1). I den nye anbefalingen er meropenem screeningsbrytningspunkt for påvisning av karbapenemaseproduserende Enterobacterales endret fra <27 mm til <28 mm. Videre er kriteriene for unntaket endret og isolater med en meropenem sonediameter på 25-27 mm og som er piperacillin-tazobaktam I/S skal nå ikke undersøkes videre. Det er ikke gjort noen endringer i forhold til meropenem MIC screeningsbrytningspunkt (MIC >0,125 mg/L). Disse endringene er integrert i NordicAST sin brytningspunktstabell (<http://www.nordicast.org/brytpunktstabeller>).

Bakgrunnen for endringen er studier som viser at karbapenemaseproduserende Enterobacterales kan ha en meropenem sonediameter på >27 mm (2). Utfordringen med denne endringen er at et større antall isolater må undersøkes. I et lavprevalensland som Norge vil sannsynligheten for at disse vil være karbapenemaseproduserende være lav. I hovedsak vil mekanismene for nedsatt følsomhet for meropenem sannsynligvis være forbundet med nedsatt permeabilitet, effluks og/eller endringer i penicillinbindende proteiner i kombinasjon med tilstedeværelse av ESBL og/eller AmpC β -laktamaser. Betydningen av endringen i nytt screeningbrytningspunkt vil være forskjellig for de enkelte species innen Enterobacterales. Endringen fører til at man går lengre inn villtype populasjonen (Figur 1) enn tidligere. Basert på EUCAST meropenem sonediameter distribusjoner for *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* og *Enterobacter cloacae* ser man at 27 mm representerer henholdsvis 6,3%, 0,85% eller 8,1% av total populasjonen. Det er verdt å merke seg at den epidemiologiske cut-off (ECOFF) verdien for meropenem og disse species er 25 mm.



Figur 1: Meropenem sonediameterdistribusjoner for *K. pneumoniae*, *E. coli* og *E. cloacae* fra EUCAST MIC og sonediameter database (http://www.eucast.org/mic_distributions_and_ecoffs/).

Innen Enterobacterales vil det også være ulikheter mellom de forskjellige species sine muligheter for å erverve seg andre mekanismer som fører til nedsatt følsomhet for karbapenemer enn karbapenemaser. Karbapenemaser er relativt mer vanlige hos *K. pneumoniae* og *E. coli*, enn hos andre Enterobacterales. Hos *Enterobacter* spp. er overproduksjon av den kromosomale AmpC β -

laktamasen i kombinasjon med porintap en vanlig årsak til nedsatt følsomhet/resistens mot karbapenemer (3-5).

De senere år har K-res mottatt et betydelig økende antall *Enterobacter* spp. isolater med nedsatt følsomhet for meropenem som var negative for karbapenemaseproduksjon. Vi ønsket derfor å undersøke følgende:

- Blir kriterier for innsending fulgt av laboratoriene?
- Hvor stor andel av innsendte isolater er karbapenemaseproduserende.
- Er det korrelasjon mellom disk diffusjon og MIC da MIC screeningsbrytningspunkt ikke er blitt endret.
- Egenskaper til fenotypiske og biokjemiske tester for påvisning av karbapenemaseproduksjon.

Formålet med studien var å undersøke om K-res burde komme med endrede kriterier for innsendelse av *Enterobacter* spp. med mistanke om karbapenemaseproduksjon eller om K-res burde endre egne referanseundersøkelser.

Materialer og metoder

Stammematerialet bestod av alle innsendte *Enterobacter* spp. ($n=182$) med mistanke om karbapenemaseproduksjon i årene 2014-2017 (Tabell 1). Følgende tester ble utført: (i) disk diffusjon (meropenem 10µg og piperacillin-tazobaktam 30-6µg, Oxoid, Basingstoke, UK), (ii) MIC bestemmelse med mikrobuljongfortynning (Sensititre, Trek Diagnostic systems/Thermo Fisher Scientific, East Grinstead, UK) (iii) PCR for karbapenemasegenene *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{OXA-48}* (6) og *bla_{IMI/NMC}* (7), (iv) β-CARBA test (Bio-Rad, Oslo, Norge), KPC, MBL and OXA-48 Confirm kit (ROSCO, Taastrup, Danmark) og AmpC Confirm kit (ROSCO, Taastrup, Danmark). I tillegg ble meropenem og piperacillin-tazobaktam sonediameter data fra NORM 2016 (8) innhentet for *Enterobacter* spp. og analysert.

Resultater

Totalt i perioden 2014-2017 ble det mottatt 182 *Enterobacter*-isolater med mistanke om karbapenemaseproduksjon (Tabell 1). Det er verdt å merke seg at i 2015 ble kriteriene for innsending av isolater endret. Fra 2015-2017 har antall isolater nær doblet seg.

Tabell 1. Antall isolater med mistanke om karbapenemaseproduksjon innsendt til K-res 2014-2017

År	Kriterier for innsending	Antall isolater
2014	Meropenem sonediameter: <25 mm/Meropenem MIC: >0,125 mg/L	11
2015	Meropenem sonediameter: <27 mm ^a /Meropenem MIC: >0,125 mg/L	42
2016	Meropenem sonediameter: <27 mm ^a /Meropenem MIC: >0,125 mg/L	52
2017	Meropenem sonediameter: <27 mm ^a /Meropenem MIC: >0,125 mg/L	77

^aUnntak: meropenem sonediameter 25-26 mm og piperacillin-tazobactam I/S

Basert på nye kriterier for innsending og analysering for karbapenemaseproduksjon viste diskdiffusjon og MIC data for meropenem at 21,4 % (39/182) av innsendte isolater ikke ville oppfylt kriteriene (Tabell 2). 17 % (31/182) av isolatene ville oppfylt kriteriene i forhold til disk diffusjon, men ikke i forhold til MIC. Fem isolater (2,8 %) ville oppfylt kriteriene i forhold til meropenem MIC, men hadde en meropenem diskdiffusjonssone på >27 mm.

Tabell 2. Disk diffusjon og MIC data innsendte isolater

Meropenem MIC (mg/L)	Meropenem sone diameter			
	>27 mm	25-27 mm + PIT I/S ^a	25-27 mm + PIT R ^b	<25 mm
≤0,12	32	7	26	5
0,25	4	0	16	13
0,5	1	0	9	12
≥1	0	1	2	54

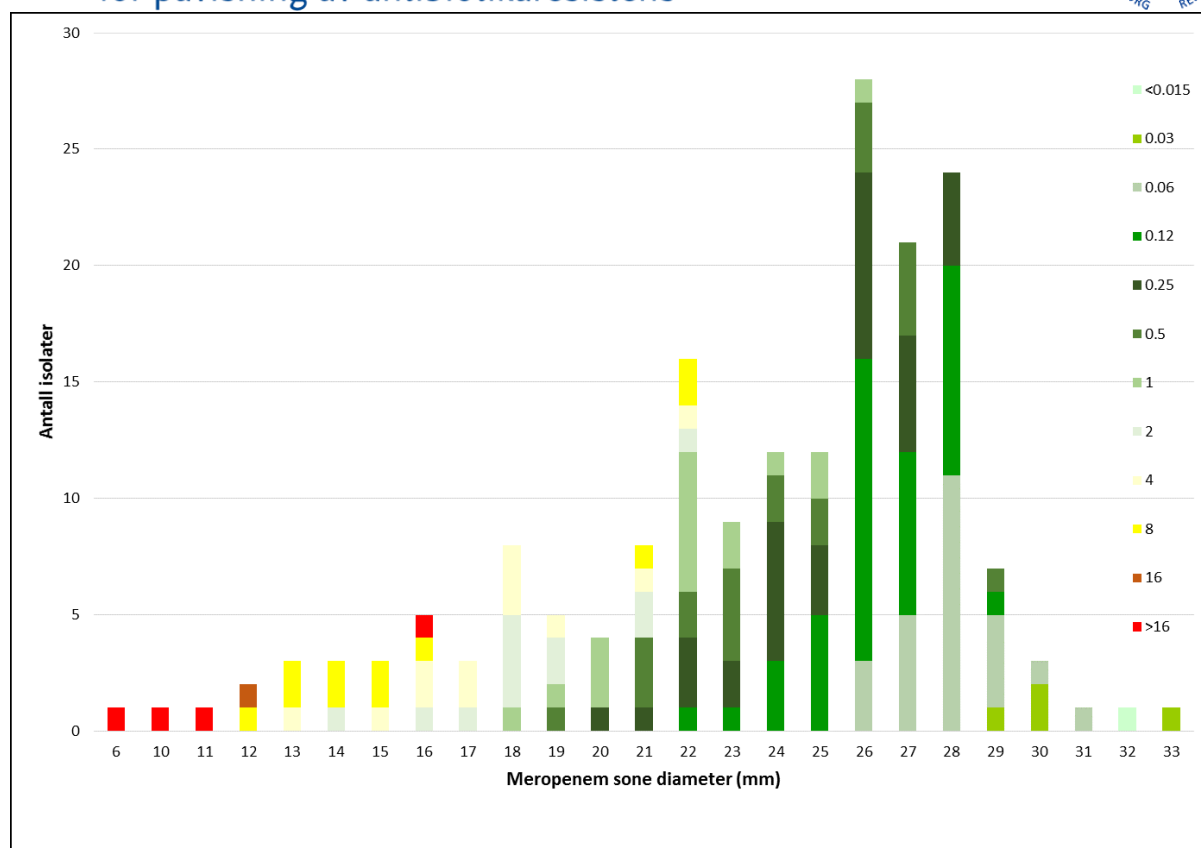
^a Piperacillin-tazobaktam I/S, ^b Piperacillin-tazobaktam R.

I forhold til kliniske brytningspunkter for meropenem viste analysen av korrelasjon mellom meropenem sonediameter og meropenem MIC en kategorisk overenstemmelse på 80,8 % (147/182) (Tabell 3, Figur 2). Ingen veldige alvorlige feil (R → S) ble observert. Ett isolat (0,5 %) testet sensitiv ved MIC bestemmelse, men resistent ved disk diffusjon (alvorlig feil). Andelen mindre feil (S → I, I → S, I → R eller R → I) var på 18,7 % (34/182).

Tabell 3. Meropenem (MER) sonediameter versus MER MIC^a

MER (mm)	MER MIC (mg/L)											
	<0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	>16
6												1
10												1
11												1
12										1	1	
13									1	2		
14								1		2		
15									1	2		
16								1	2	1		1
17								1	2			
18							1	4	3			
19						1	1	2	1			
20					1		3					
21					1	3		2	1	1		
22				1	3	2	6	1	1	2		
23				1	2	4	2					
24				3	6	2	1					
25				5	3	2	2					
26			3	13	8	3	1					
27			5	7	5	4						
28			11	9	4							
29		1	4	1		1						
30		2	1									
31			1									
32	1											
33		1										

^aHorisontale og vertikale linjer indikerer grenser for kliniske brytningspunkter etter NordicAST brytningspunktstabeller for tolkning av MIC-verdier og sonediameter versjon 8.0.



Figur 2. Pivot diagram som viser korrelasjonen mellom meropenem MIC og meropenem sone diameter.

I videre analysering ble isolatene ($n=40$) som ikke oppfylte kriteriene for undersøkelse for karbapenemaseproduksjon både med MIC og diskdiffusjon tatt ut av stammematerialet. Totalt ble 142 isolater inkludert videre.

Undersøkelse for tilstedeværelse av karbapenemase-gener (*bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{OXA-48}* og *bla_{IMI/NMC}*) med PCR viste at 7/142 isolater (4,9 %) var positive (Tabell 4). Henholdsvis to, tre og to isolater ble identifisert som karbapenemaseproduserende i 2014, 2016 og 2017. Ingen isolater var positiv for karbapenemase-gener i 2015. NDM ble påvist i 3 isolater, mens KPC, OXA-48-lik, VIM og IMI/NMC-A ble identifisert i enkeltisolater. Seks av tilfellene var assosiert med import. Alle isolatene ble kategorisert som resistent (6/7) eller intermediær (1/7) i forhold til meropenem med diskdiffusjon. Med MIC analyse ble 2/7 isolater kategorisert som resistent, mens henholdsvis 3 og 2 isolater ble kategorisert som følsom eller intermediær mot meropenem.

Med PCR-resultater som gullstandard ble isolatene videre undersøkt for karbapenemaseproduksjon med en biokjemisk test (β -CARBA test) og en fenotypisk test (ROSCO KPC, MBL, and OXA-48 Confirm kit). Seks av syv isolater ble positive for karbapenemaseproduksjon med β -CARBA testen (Tabell 4). Isolatet som var PCR positivt for *bla_{IMI/NMC-A}* testet negativt. IMI/NMC-A tilhører er en gruppe klasse A karbapenemaser som i hovedsak er funnet hos *Enterobacter* spp. Alle PCR negative isolater ble negative med β -CARBA testen. Dette gir en spesifisitet og sensitivitet på henholdsvis 100 % og 86 %. Den positive og negative prediktive verdien av β -CARBA testen ble henholdsvis 100 % og 99 %.

Tabell 4. *Enterobacter* spp. positive for karbapenemase-gener med PCR

År	Species	Karbapenemase	Meropenem MIC (mg/L)	Meropenem sonediameter (mm)	Import
2014	<i>E. cloacae</i> kompleks	KPC	>16	6	Jamaica
	<i>E. cloacae</i> kompleks	NDM	>16	16	Nei
2016	<i>E. cloacae</i> kompleks	OXA-48-lik	0,5	23	Brasil
	<i>E. cloacae</i> kompleks	VIM	1	22	Kroatia
	<i>E. cloacae</i> kompleks	IMI/NMC-A	8	13	Spania
2017	<i>E. cloacae</i> kompleks	NDM	2	22	Serbia
	<i>E. cloacae</i> kompleks	NDM	8	21	Marokko

Alle isolater som var PCR-positive for karbapenemase-gener ble korrekt gruppert etter karbapenemase klasse med KPC, MBL og OXA-48 Confirm Kit (Tabell 5). Isolatet med OXA-48-lik viste ingen synergi mellom meropenem og β -laktamase inhibitorene, men var temocillin resistent som er en indikator for OXA-48-lik. Av de isolatene som ble negative for karbapenemase-gener med PCR ble 9,6 % (13/135) falsk positiv for KPC eller annen klasse A karbapenemase (kun synergi mellom meropenem og borsyre). Tre isolater (2,2 %) ble falske positive for tilstedeværelse av OXA-48-lik (ingen synergi mellom meropenem og inhibitorer samt temocillin sonediameter ≤ 12 mm. Førti av 135 (30 %) isolater ble positive for AmpC (kromosomal eller plasmid-mediert) kombinert med porintap (synergi både mellom meropenem og borsyre og meropenem og kloxacillin). Dette gir testen en spesifisitet og sensitivitet på henholdsvis 88 % og 100 %. Den positive og negative prediktive verdien ble henholdsvis 30 % og 100 %. Med AmpC Confirm kit testet 91 % (129/142) av isolatene positive for AmpC. Med unntak av det karbapenemase-positive isolatet med OXA-48-lik ble alle andre de andre isolatene som var positive for karbapenemase-gener med PCR negative for AmpC.

Tabell 5. KPC, MBL and OXA-48 Confirm kit test resultater for karbapenemase PCR positive isolater.

Species	Karbapenemase	KPC, MBL and OXA-48 Confirm kit
<i>E. cloacae</i> kompleks	KPC	KPC eller annen klasse A karbapenemase
<i>E. cloacae</i> kompleks	NDM	Metallo- β -laktamase
<i>E. cloacae</i> kompleks	OXA-48-lik	Ingen synergi β -laktamase inhibitorer, temocillin sonediameter ≤ 12 mm
<i>E. cloacae</i> kompleks	VIM	Metallo- β -laktamase
<i>E. cloacae</i> kompleks	IMI/NMC-A	KPC eller annen klasse A karbapenemase
<i>E. cloacae</i> kompleks	NDM	Metallo- β -laktamase
<i>E. cloacae</i> kompleks	NDM	Metallo- β -laktamase

Analysering av meropenem og piperacillin-tazobaktam sonediameter distribusjoner for *Enterobacter* spp. fra blodkultur og urin innsamlet i NORM 2016 viste at 6,9 % (22/320 isolater) av populasjonen hadde en meropenem sonediameter på 27 mm. Av disse var 8 isolater piperacillin-tazobaktam resistente. Basert på innsamlingsperioden ble det videre estimert at for *Enterobacter* spp. vil endringen i screeningsbrytningspunkt føre til en økning på ca. 75 isolater per år. Dette er omtrent en dobling av isolater i forhold til tidligere screeningsbrytningspunkt. Ingen av isolatene i NORM 2016 med en meropenem sonediameter på 27 mm var karbapenemaseproduserende.

Diskusjon

Karbapenemresistens kan forårsakes av flere forskjellige mekanismer. Dette inkluderer kombinasjon av kromosomalt medierte mekanismer som nedsatt permeabilitet, effluks og/eller endringer i penicillinbindende proteiner i kombinasjon med tilstedeværelse av ESBL og/eller AmpC β -laktamaser. I tillegg kan karbapenemresistens forårsakes av plasmid-medierte karbapenemaser, β -laktamaser som kan bryte ned karbapenemer (9). Spredningen av plasmid-medierte karbapenemaser er spesielt bekymringsfull da karbapenemaseproduserende Gram-negative isolater er assosiert med multiresistens og dermed infeksjoner med få behandlingsalternativer. Påvisning av karbapenemaseproduserende Gram-negative stavbakterier er derfor viktig i forhold til infeksjonskontroll og folkehelsen for å hindre videre spredning. I Norge er karbapenemaseproduserende Gram-negative stavbakterier meldepliktige til MSIS etter bekreftelse ved Nasjonal kompetansetjeneste for påvisning av antibiotikaresistens (K-res).

Påvisning av tilstedeværelse av karbapenemaser er utfordrende av flere årsaker. Molekylær påvisning er utfordrende på grunn av et økende antall forskjellige karbapenemaser og varianter, mens fenotypisk påvisning utfordres på grunn av diversitet i aktivitetsspektrum og aktivitet mot karbapenemer. På grunn av varierende aktivitet mot karbapenemer, uttrykk og tilstedeværelse av andre resistensmekanismer vil nivå av resistens eller nedsatt følsomhet mot karbapenemer variere. Karbapenemaseproduserende Gram-negative kan derfor kategoriseres som følsomme i forhold til gjeldende kliniske brytningspunkter (2). EUCAST har derfor definert egne screeningsbrytningspunkter for påvisning av karbapenemaseproduserende Enterobacterales (1, 10).

Med bakgrunn i EUCAST og NordicAST sin endring i meropenem sonediameter screeningsbrytningspunkt ønsket vi å undersøke betydningen av dette for K-res og laboratoriene med tanke på om det burde gjøres endringer i analysen av isolater eller innsendingskriterier. Årsaken til dette er også at sannsynligheten for å oppdage flere karbapenemaseproduserende isolater vil være liten i et lavprevalens land som Norge og at man må se dette opp mot hvilke ressurser som bør legges inn i referansediagnostikken. Analysen har fokusert på *Enterobacter* spp. da K-res de senere år har sett en økning i innsendte *Enterobacter* spp. isolater med nedsatt følsomhet for meropenem og mistanke om karbapenemaseproduksjon (Tabell 1) og at karbapenemaser er relativt sjelden hos *Enterobacter* spp. sammenlignet med *E. coli* og *K. pneumoniae*.

Basert på data fra NORM er det estimert at antall *Enterobacter* spp. isolater ekstra som må analyseres vil sannsynligvis doble seg på grunn av endringen i screeningsbrytningspunkt. Videre viser resultatene at 21,4 % av innsendte isolater ikke vil oppfylle de nye kriteriene for videre undersøkelse. Analysering av *E. coli* og *K. pneumoniae* i NORM 2016 viser også at det vil være en markant økning i isolater som må analyseres (data ikke vist). Dette vil føre til en økt arbeidsmengde både for K-res og laboratoriene. Analysen av isolater bekrefter at andelen av karbapenemaseproduserende isolater blant *Enterobacter* spp. er lav (4,9 %) og data fra NORM

2016 viser at ingen isolater med en meropenem sonediameter på 27 mm var karbapenemasepositiv. Det samme gjelder for *E. coli* og *K. pneumoniae*. Videre viser resultatene at isolater som er positive for karbapenemaseproduksjon har en meropenem sonediameter nærmere det kliniske brytningspunktet for resistens enn screeningsbrytningspunktet (Tabell 4).

Ett av formålene med undersøkelsen var videre å se om det kunne legges inn tilleggsundersøkelser før isolater sendes inn til K-res. Både KPC, MBL and OXA-48 Confirm kit og β -CARBA testen viste relativt gode egenskaper i forhold til å påvise karbapenemaseproduksjon. β -CARBA testen viste ett falskt negativt resultat, mens KPC, MBL and OXA-48 Confirm kit var assosiert med en svært høy negativ prediktiv verdi.

Konklusjon

Med denne bakgrunn vil derfor K-res endre sin referansediagnostikk for karbapenemaseproduksjon hos *Enterobacter* spp. til følgende:

1. Isolater med meropenem-sonediameter 25-27 mm og piperacillin-tazobaktam resistent: Fenotypisk undersøkelse med β -CARBA test, KPC, MBL and OXA-48 Confirm Kit og AmpC Confirm Kit (ROSCO, Taastrup, Danmark). Isolatene vil også undersøkt med PCR for de mest vanlige karbapenemasegenene (KPC, VIM, NDM og OXA-48). K-res vil ikke utføre MIC bestemmelse med mikrobuljongfortynning med unntak der rekvirerende laboratorium spesifikt etterspør dette.
2. Isolater med meropenem-sonediameter < 25 mm og alle isolater med sonediameter 25-27 mm med samtidig mistanke om importsmitte: Undersøkelse som i punkt 1, men vil i tillegg undersøkes i forhold til MIC-bestemmelse med mikrobuljongfortynning.

Basert på det estimerte antall ekstra isolater i Norge og ingen entydige ekstra tilleggundersøkelser/kriterer vil K-res fortsatt anbefale at laboratoriene sender inn isolater kun basert på meropenem screeningkriteriene.

Referanser:

1. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf **Version 2.0**, (2017).
2. T. D. Huang *et al.*, Temocillin and piperacillin/tazobactam resistance by disc diffusion as antimicrobial surrogate markers for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in geographical areas with a high prevalence of OXA-48 producers. *J. Antimicrob. Chemother.* **69**, 445-450 (2014).
3. M. Doumith, M. J. Ellington, D. M. Livermore, N. Woodford, Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* **63**, 659-667 (2009).
4. F. C. Yang, J. J. Yan, K. H. Hung, J. J. Wu, Characterization of ertapenem-resistant *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese university hospital. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 223-226 (2012).
5. B. Babouee Flury *et al.*, Association of novel nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in *ampD* with cephalosporin resistance and phylogenetic variations in *ampC*, *ampR*, *ompF* and *ompC* in *Enterobacter cloacae* that are highly resistant to carbapenems. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 2383-90 (2016).
6. M. J. Ellington *et al.*, Multicentre evaluation of a real-time PCR assay to detect genes encoding clinically relevant carbapenemases in cultured bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents* **47**, 151-154 (2016).
7. D. A. Boyd *et al.*, *Enterobacter cloacae* complex isolates harboring *bla*_{NMC-A} or *bla*_{IMI}-type class A carbapenemase genes on novel chromosomal integrative elements and plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, pii: e02578-16 (2017).
8. NORM/NORM-VET 2016. Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway. **ISSN:1502-2307 (print)/1890-9965 (electronic)**, (2017).
9. K. Bush, The ABCD's of β -lactamase nomenclature. *J. Infect. Chemother.* **19**, 549-559 (2013).
10. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. **Version 8.1**, <http://www.eucast.org>, (2018).