



## Prosjektrapport 3-2014

Mars 2014

### Forekomst av ESBL<sub>M-C</sub> (plasmid-mediert AmpC) i *Escherichia coli* og *Klebsiella pneumoniae* isolater fra NORM 2010-2012 med nedsatt følsomhet for cefotaxim og/eller ceftazidim

Ørjan Samuelsen<sup>1\*</sup>, Bjørg C. Haldorsen<sup>1</sup>, Gunnar Skov Simonsen<sup>2</sup> og Arnfinn Sundsfjord<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Kompetansetjeneste for påvisning av antibiotikaresistens (K-res)

Avdeling for mikrobiologi og smittevern, Universitetssykehuset Nord-Norge, 9038 Tromsø.

<sup>2</sup>Avdeling for mikrobiologi og smittevern, Universitetssykehuset Nord-Norge, 9038 Tromsø.

\*Kontaktinformasjon:

orjan.samuelsen@unn.no (Ø. Samuelsen) eller arnfinn.sundsfjord@uit.no (A. Sundsfjord)

## Bakgrunn

I samråd med referansegruppen for K-res ble det i 2012 besluttet å gjøre en undersøkelse av forekomsten av ESBL<sub>M-C</sub> (plasmid-mediert AmpC) i *Escherichia coli* og *Klebsiella pneumoniae* isolater via NORM for å få en bedre oversikt over ESBL<sub>M-C</sub> situasjonen i Norge. K-res samlet derfor inn et utvalgt materiale fra NORM 2010-2012 for molekylær karakterisering. Det henvises også til en tidligere publisert rapport på hjemmesiden til K-res (<http://www.unn.no/rapporter-fra-k-res/category35882.html>) som omhandler analysing av innsendte isolater til K-res med mistanke om ESBL<sub>M-C</sub> fra samme periode.

## Materiale og metoder

Stammematerialet inkluderte alle *Escherichia coli* og *Klebsiella pneumoniae* isolater fra urin og blodkultur i NORM 2010-2012 med nedsatt følsomhet (I/R) for ceftazidim og/eller cefotaxim og som i NORM var klassifisert som ESBL<sub>A</sub>-negative. Totalt var det 45 *E. coli* isolater og 38 *K. pneumoniae* isolater som oppfylte kriteriene (Tabell 1).

Tabell 1. *E. coli* og *K. pneumoniae* isolater fra NORM 2010 – 2012 fordelt på årstall og klinisk materiale som inngikk i studien

Årstall	<i>E. coli</i>		<i>K. pneumoniae</i>	
	Urin	Blod	Urin	Blod
2010	8	8	*	7
2011	1	13	*	9
2012	4	11	10	12
Totalt	13	32	10	28

\* *Klebsiella* spp. fra urin inngikk ikke i innsamlingen av isolater til NORM i 2010 og 2011

Analysene inkluderte species identifisering og resistensprofil med VITEK2 (BioMerieux). Et utvalg av isolatene ble analysert fenotypisk for ESBL<sub>A</sub> og AmpC med kombinasjonsgradient tester (Liofilchem) og kombinasjonsdisker/tabletter (Becton Dickinson/ROSCO). Alle isolatene ble molekylært karakterisert for tilstedeværelse av ESBL<sub>M-C</sub>-gener (CMY, DHA, MOX, FOX, ACC, ACT og MIR) og ESBL<sub>A</sub>-gener (CTX-M, SHV- og TEM-ESBL<sub>A</sub> varianter) med mikroarray (Check-Points). *E. coli* isolater identifisert som positive for ESBL<sub>M-C</sub> eller hyperproduksjon av den kromosomale AmpC (cAmpC) gjennom den årlige molekylære analyseringen av antatte ESBL<sub>A</sub> positive isolater i NORM ble inkludert i utregningen av forekomst. Dette gjelder ikke for urin 2012 da kun blodkultur isolater innsendt som antatt ESBL<sub>A</sub> positive ble analysert i 2012.

## Resultater og diskusjon

### *E. coli* (n=45)

Ny resistensbestemmelse viste at 17/45 *E. coli* isolater var følsomme for både ceftazidim og cefotaxim med VITEK2. Blant disse var syv isolater resistente mot cefoxitin (MIC > 8mg/L) som er en indikator for ESBL<sub>M-C</sub>, forhøyet produksjon av den kromosomale AmpC β-laktamasen (cAmpC) og/eller redusert permeabilitet. Molekylære analyser av disse syv isolatene var negative for både ESBL<sub>M-C</sub> og ESBL<sub>A</sub> gener (Tabell 2). Fem av de syv *E. coli* isolatene som var resistente mot cefoxitin var fenotypisk positiv for AmpC-produksjon med kombinasjons gradient-tester/-tabletter. Disse tolkes som positive for cAmpC. To *E. coli* isolater som var følsomme for ceftazidim og cefotaxim, men resistente for cefoxitin var fenotypisk negativ for AmpC og negativ for ESBL<sub>M-C</sub>. Resistensmekanismen for denne cefoxitinresistensen er ikke kjent, men kan skyldes nedsatt permeabilitet på grunn av porindefekter eller effluks-mekanismer.

Blant isolater med reproducerbar nedsatt følsomhet for ceftazidim og/eller cefotaxim (n=28), viste molekulære analyser at 8/28 (29%) var positive for ESBL<sub>M-C</sub> (Tabell 2). Syv av disse var positiv for CMY-2 gruppen og ett isolat positivt for DHA. Tilsvarende antall isolater (n=8; 29%) var molekylært positive for ESBL<sub>A</sub>. Ingen isolater var positive for både ESBL<sub>M-C</sub> og ESBL<sub>A</sub>. Totalt tolv av 28 isolater (43%) var negative for både ESBL<sub>M-C</sub> og ESBL<sub>A</sub>. Alle disse var cefoxitin resistente og fenotypisk positive for hyperproduksjon av cAmpC.

Tabell 2. Resultater fra molekulære analyser av *E. coli* isolater med nedsatt følsomhet for ceftazidim og/eller cefotaxim i NORM 2010-2012.

Species/materiale	ESBL <sub>M-C</sub>		ESBL <sub>A</sub>					cAmpC	ukjent mekanisme <sup>1</sup>	VT <sup>2</sup>
	CMY-2	DHA	CTX-M gr. 1	CTX-M gr. 2	CTX-M gr. 9	SHV-ESBL	TEM-ESBL			
<i>E. coli</i> urin 2010 (n=8)	4	0	0	1	0	0	0	2	1	0
<i>E. coli</i> urin 2011 (n=1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>E. coli</i> urin 2012 (n=4)	0	0	1	0	0	0	0	2	1	0
<i>E. coli</i> blod 2010 (n=8)	1	1	0	0	0	0	1	4	0	1
<i>E. coli</i> blod 2011 (n=13)	1	0	1	0	1	0	0	5	0	5
<i>E. coli</i> blod 2012 (n=11)	1	0	0	0	1	1	1	4	0	3
<i>E. coli</i> totalt (n=45)	7	1	2	1	2	1	2	17	2	10

<sup>1</sup> Isolater med resistens for cefoxitin, følsomme for cefotaxime og ceftazidime samt negativ fenotypiske og molekulære tester for AmpC, ESBL<sub>M-C</sub> og ESBL<sub>A</sub>. <sup>2</sup> VT = villtype.

Ko-resistens mot andre antibiotika enn β-laktamer kan ofte observeres blant ESBL<sub>M-C</sub> isolater siden dette er en plasmid-mediert resistensmekanisme (1,2). Blant ESBL<sub>M-C</sub> positive isolater analysert her var henholdsvis 6/8 (75%) også resistent mot minst to av antibiotikaene gentamicin, tobramycin, ciprofloxacin, nitrofurantoin eller trimethoprim-sulfametoxazol (Tabell 3). To av de 17 (11,8%) identifiserte cAmpC isolatene var resistente mot ≥2 andre antibiotika.

Tabell 3. Antall og prosent ESBL<sub>M-C</sub> og cAmpC positive isolater med ko-resistens mot andre antibiotika (gentamicin, tobramycin, ciprofloxacin, nitrofurantoin eller trimethoprim-sulfametoxazol).

Ko-resistens ikke-β-laktamer	ESBL <sub>M-C</sub> (n=8)	cAmpC (n=17)
Ingen ko-resistens	1 (12,5%)	14 (82,4%)
Et antibiotikum	1 (12,5%)	1 (5,9%)
To antibiotika	2 (25%)	1 (5,9%)
Tre antibiotika	2 (25%)	1 (5,9%)
Fire antibiotika	2 (25%)	0 (0%)

Den totale årlige forekomsten av ESBL<sub>M-C</sub> og cAmpC blant *E. coli* isolater i NORM 2010-12 er presentert i Tabell 4. Isolater identifisert som positive for ESBL<sub>M-C</sub> eller cAmpC, gjennom den årlige analyseringen av antatte ESBL<sub>A</sub> positive isolater fra NORM er også inkludert. På grunn av få positive isolater og forskjeller i analyseringen av antatte ESBL<sub>A</sub> isolater mellom hvert år er det en stor usikkerhet i resultatene. Kun for 2011 er alle innsendte antatte ESBL<sub>A</sub> isolater analysert for tilstedeværelse av ESBL<sub>M-C</sub> og for 2012 ble ikke ESBL<sub>A</sub> isolater fra urin analysert. Det må også tas med i betraktning at cefoxitin ikke er med i NORM panelet slik at den totale forekomsten av slike resistensmekanismer kan være underestimert.

Samlet for urin og blod var forekomsten av isolater med ESBL<sub>M-C</sub> 0,1-0,2% og 0,3% for cAmpC i perioden 2010-2012. I en tidligere analysering av NORM isolater fra 2004 hvor seleksjonskriteriene også omfattet nedsatt følsomhet for cefoxitin var forekomsten av cAmpC 1%, mens ingen ESBL<sub>M-C</sub> isolater ble identifisert (3).

Tabell 4. Forekomst av henholdsvis ESBL<sub>M-C</sub> og cAmpC hos *E. coli* 2010-2012.

Species/materiale	Antall ESBL <sub>M-C</sub> eller cAmpC positive isolater				Forekomst av ESBL <sub>M-C</sub> og cAmpC	
	NORM ESBL <sub>M-C</sub> materiale <sup>1</sup>		NORM ESBL <sub>A</sub> materiale <sup>2</sup>		ESBL <sub>M-C</sub>	cAmpC
	ESBL <sub>M-C</sub>	cAmpC	ESBL <sub>M-C</sub>	cAmpC	ESBL <sub>M-C</sub>	cAmpC
<i>E. coli</i> urin 2010 (n=1093)	4	2	0	1	0,4%	0,3%
<i>E. coli</i> urin 2011 (n=940)	0	0	1	0	0,1%	0%
<i>E. coli</i> urin 2012 (n=955)	0	2	ND <sup>3</sup>	ND <sup>3</sup>	0%	0,2%
<i>E. coli</i> blod 2010 (n=1359)	2	4	0	1	0,1%	0,4%
<i>E. coli</i> blod 2011 (n=1438)	1	5	2	3	0,1%	0,6%
<i>E. coli</i> blod 2012 (n=1646)	1	4	2	3	0,2%	0,4%
<b>Samlet</b>						
<i>E. coli</i> urin og blod 2010 (n=2452)	6	6	0	2	0,2%	0,3%
<i>E. coli</i> urin og blod 2011 (n=2378)	1	5	3	3	0,1%	0,3%
<i>E. coli</i> urin og blod 2012 (n=2601)	1	6	2	3	0,1%	0,3%

<sup>1</sup> *E. coli* isolater fra urin og blodkultur i NORM 2010-2012 med nedsatt følsomhet (I/R) for ceftazidim og/eller cefotaxim og klassifisert i NORM som ESBL<sub>A</sub>-negative.

<sup>2</sup> *E. coli* isolater identifisert som positive for ESBL<sub>M-C</sub> eller cAmpC ved molekylær karakterisering av antatte ESBL<sub>A</sub> positive isolater i NORM.

<sup>3</sup> ikke undersøkt for tilstedeværelse av ESBL<sub>M-C</sub> eller cAmpC.

### ***K. pneumoniae* (n=38)**

Re-testing av *K. pneumoniae* isolatene viste at hele 32/38 (84%) var følsomme for ceftazidim og cefotaxim med VITEK2. Blant disse var 14 isolater resistente mot cefoxitin (MIC >8mg/L). Årsaken til denne separate resistensen mot cefoxitin er uklar. Kun 6 isolater var intermediært følsom eller resistent mot ceftazidim og/eller cefotaxim. Ingen av disse 6 isolatene var positive for ESBL<sub>M-C</sub> ved molekylære analyser, men tre av isolatene (50%) var molekylært positive for ESBL<sub>A</sub> (Tabell 5).

Tabell 5. Resultater fra molekylære analyser for ESBL<sub>M-C</sub> og ESBL<sub>A</sub> blant *K. pneumoniae*.

Species/materiale	ESBL <sub>M-C</sub>	ESBL <sub>A</sub>			VT/annen mekanisme <sup>1</sup>
		CTX-M gr. 9	SHV-ESBL	TEM-ESBL	
<i>K. pneumoniae</i> urin 2012 (n=10)	0	1	0	0	7/2
<i>K. pneumoniae</i> blod 2010 (n=7)	0	0	1	1	4/1
<i>K. pneumoniae</i> blod 2011 (n=9)	0	0	0	0	4/5
<i>K. pneumoniae</i> blod 2012 (n=12)	0	0	0	0	3/9
<i>K. pneumoniae</i> totalt (n=38)	0	1	1	1	18/17

<sup>1</sup> Isolater med resistens for cefoxitin og/eller nedsatt følsomhet/resistens for ceftazidim og/eller cefotaxim. VT = vill-type.

### **Konklusjon**

- Flere *E. coli* og *K. pneumoniae* isolater kategorisert i NORM som ESBL<sub>A</sub> negative og med nedsatt følsomhet for ceftazidim og/eller cefotaxim var ESBL<sub>A</sub> positive ved molekylære analyser.
- Flere *E. coli* og *K. pneumoniae* isolater kategorisert i NORM med nedsatt følsomhet for ceftazidim og/eller cefotaxim ble funnet følsomme for ceftazidim og/eller cefotaxim ved ny analysing.
- Nedsatt følsomhet for ceftazidim og/eller cefotaxim blant ESBL<sub>A</sub> negative *E. coli* isolater er i hovedsak forårsaket av hyperproduksjon av cAmpC.
- *E. coli* isolater følsomme for ceftazidim og cefotaxim, men resistente mot cefoxitin hadde fenotypiske funn forenlig med hyperproduksjon cAmpC.
- CMY er den mest utbredte ESBL<sub>M-C</sub> i norske kliniske *E. coli* isolater.
- *E. coli* isolater med ESBL<sub>M-C</sub> er oftere resistent mot andre andre antibiotikagrupper enn β-laktamer sammenlignet med cAmpC-isolater.
- Forekomsten av ESBL<sub>M-C</sub> er foreløpig lav i norske kliniske *E. coli* isolater, men har økt i antall siden analysing av isolater i NORM 2004 (3).
- ESBL<sub>M-C</sub> ble ikke identifisert blant *K. pneumoniae* isolater med nedsatt følsomhet for ceftazidim og/eller cefotaxim i denne studien.

### **Takk**

K-res ønsker å takke følgende laboratorier og kontaktpersoner for innsending av isolater til studien: Angela Kümmel (Sykehuset Levanger), Trond E. Ranheim og Marit Vattøy (Akershus Universitetssykehus), Gaute Syversen (Oslo Universitetssykehus Ullevål), Reidar Hide (Ålesund Sykehus), Unn Houge (Sørlandet Sykehus), Pirkko-Liisa Kellokumpu (Haugesund Sykehus), Hege Elisabeth Larsen (Nordlandssykehuset), Andreas Emmert (Unilabs), Kjersti Wik Larssen (St. Olavs Hospital), Carola Grub (Sykehuset Innlandet), Lisa Valle (Molde Sykehus), Ellen Grimstad (Vestre Viken, seksjon Drammen), Anita Brekken (Stavanger Universitetssykehus), Pia Langseth (Oslo Universitetssykehus, Rikshospitalet), Dagfinn Skaare (Sykehuset Vestfold), Reidar Hjetland (Førde Sentralsykehus), Ellen Haldis Josefsen (Universitetssykehuset Nord-Norge), Haima Mylvaganam (Haukeland Universitetssykehus), Sunniva Fagerås Røst (Oslo Universitetssykehus, Radiumhospitalet), Anne C. Hollekim (Sykehuset Østfold), Inger M. B. Johansen (Vestre Viken, seksjon Bærum).

#### Referanser

1. **Edquist, P., M. Ringman, B. O. Liljequist, K. T. Wisell, and C. G. Giske.** 2013. Phenotypic detection of plasmid-acquired AmpC in *Escherichia coli*-evaluation of screening criteria and performance of two commercial methods for the phenotypic confirmation of AmpC production. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 32(9):1205-10.
2. **Sundsfjord, A., G. S. Simonsen, B. Haldorsen, E. W. Lundblad, and O. Samuelsen.** 2008. Bredspektrede betalaktamaser hos gramnegative stavbakterier. *Tidsskr.Nor Laegeforen.* **128**:2741-2745.
3. **Tofteland, S., K. H. Dahl, B. Aasnaes, A. Sundsfjord, and U. Naseer.** 2012. A nationwide study of mechanisms conferring reduced susceptibility to extended-spectrum cephalosporins in clinical *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. isolates. *Scand.J.Infect.Dis.* **44**:927-933.