

**Iztok Štrumbelj, Mateja Pirš**

## **Dokument SKUOPZ 002.**

### **Smernice za mikrobiologe - ugotavljanje odpornosti proti karbapenemom in ugotavljanje karbapenemaz - enterobakterije, *Acinetobacter baumannii* in *Pseudomonas aeruginosa* - 3. izdaja, april 2022.**

Dokument velja od 4. aprila 2022, od uvedbo smernic za določanje občutljivosti bakterij po EUCAST v.12.

Ta, tretja izdaja dokumenta, je usklajena s smernicami EUCAST v. 12, 2022.

Napačno bi bilo uporabljati to izdajo smernic za CR-bakterije

hkrati s testiranjem občutljivosti po prejšnjih smernicah EUCAST - ali obratno.

**Slovenska komisija za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila (SKUOPZ), tretja izdaja, elektronski vir.**

*Pozor: dokument smo preštevilčili: prej je bil to dokument SKUOPZ 001, zdaj je 002.*

Dokument je dostopen na spletni strani: <https://imi.si/skuopz>

## Predgovor - področje smernic SKUOPZ

Področje smernic SKUOPZ je praktična uporaba standardnih metod antibiograma (znotraj EUCAST) v Sloveniji in različne metode za ugotavljanje mehanizmov odpornosti ter metode za osamitev odpornih bakterij iz vzorcev (gojišča, postopki).

Smernice so razlagalni in vsebinsko širši dokumenti od navodil. Standardni metodi antibiograma sta le dve:

- standardna dilucija\*
- standardna disk-difuzija.

\* v veliki večini primerov mikrodilucijska metoda (z izjemami: ponekod se uporablja dilucija v agarju). Skratka, referenčna metoda je dilucijska metoda, za vsako bakterijsko skupino posebej je navedena v dokumentih EUCAST. Gre za določanje MIK v predpisanih okoliščinah, ki so včasih specifične za posamezen antibiotik in/ali bakterijsko vrsto.

Vse ostale metode so komercialne in se SKUOPZ z njimi praviloma ne ukvarja, razen izjemoma\*:

- če smernice napotijo na ugotavljanje minimalnih inhibitornih koncentracij (MIK) pri določenem antibiotiku
- če je komercialno metodo koristno omeniti v postopkih za ugotavljanje mehanizmov odpornosti.

Za vse komercialne metode velja, da se v laboratoriju lahko uporabljajo, če so za namen uporabe validirane / kalibrirane pri proizvajalcu, v strokovni literaturi ali v laboratorijih samih – pred uporabo je preverjeno ustrezno izvajanje metode v laboratoriju samem.

SKUOPZ spodbuja sodelovanje in delitev dela med laboratoriji, kadar so interne validacije potrebne in se, če validacijski laboratoriji to dovolijo, čim prej zaupno seznanja z rezultati še pred morebitnimi objavami teh validacij.

Laboratoriji se, da bi prihranili čas pri zbiranju podatkov, med seboj lahko seznanjajo z različnimi komercialnimi reagenti (imena, kataloške številke...) in dobavitelji, vendar podatki niso priporočilo laboratorija oz. osebe, ki podatke priskrbi, ampak zgolj informacija, ki jo ostali laboratoriji uporabijo po lastni presoji.

Imena komercialnih testov omenjamo, če so specifična za metodo.

Zaželeno je, da sta za vsako metodo navedena vsaj dva proizvajalca.

\* Naš pristop je analogen pristopu EUCAST-a in EUCAST-ove delovne skupine za mehanizme odpornosti:

- EUCAST v dokumentih o antibiogramu praviloma ne omenja posameznih komercialnih avtomatskih metod ali gradient-difuzijske metode (kjer je antibiotik v naraščajoči koncentraciji nanesen na trak).
- Delovna skupina EUCAST-a za mehanizme odpornosti izjemoma omenja nestandardne metode, kadar je to potrebno - npr. pri stafilokokih, da je za določitev nekaterih MIK gradient-difuzija primerna metoda. Proizvajalce omenja zelo redko, ko želi navesti specifične metode iz literature ali edinega proizvajalca.

V dokumentu opredelimo klinično in mikrobiološko odpornost proti karbapenemom.

- Klinična odpornost pomeni kategorija R v izvidu (za opredelitev CR-bakterij je določen nabor antibiotikov z R)
- Mikrobiološka odpornost pomeni prisotnost mehanizmov odpornosti (karbapenemaz), izolat je lahko hkrati klinično odporen, ni pa to nujno, lahko je za opredeljene karbapeneme v kategoriji S ali I. Odpornost je lahko posledica tvorbe karbapenemaz, lahko pa je posledica drugih mehanizmov kot je na primer tvorba betalaktamaz ESBL ali AmpC v kombinaciji z izgubo porinov. Za opredelitev CP-bakterij šteje naslednji mehanizem odpornosti: tvorba karbapenemaz .

**Pozor: dokument smo preštevilčili: prej je bil to dokument SKUOPZ 001, zdaj je 002.**

**Predlog citiranje dokumenta:** Iztok Štrumbelj, Mateja Pirš. Dokument SKUOPZ 002. Smernice za mikrobiologe - ugotavljanje odpornosti proti karbapenemom in ugotavljanje karbapenemaz - enterobakterije, *Acinetobacter baumannii* in *Pseudomonas aeruginosa* - 3. izdaja, april 2022 [internet]. Slovenska komisija za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila (SKUOPZ). Tretja izdaja, april 2022. Dostopno na: <https://imi.si/skuopz>

## **VSEBINA – KAZALO**

1. KRATICE - 4
2. KRATKA POJASNILA - 4
3. UGOTAVLJANJE OBČUTLJIVOSTI ZA KARBAPENEME ZA KLINIČNE NAMENE - DOLOČITEV S, I, R KATEGORIJ V IZVIDU BOLNIKA - 5
4. DOLOČITEV MINIMALNIH INHIBITORNIH KONCENTRACIJ KARBAPENEMSKIH ANTIBIOTIKOV ZA ENTEROBAKTERIJE S KOMERCIALNIMI TESTI - 5
5. **SPLOŠNA NAČELA PRI GRAMNEGATIVNIH BAKTERIJAH - UGOTAVLJANJE KLINIČNE ODPORNOSTI PROTI KARBAPENEMOM ZA OPREDELITEV CR-BAKTERIJ IN UGOTAVLJANJE KARBAPENEMAZ ZA OPREDELITEV CP-BAKTERIJ - 6**

5.1 Ugotavljanje klinične odpornosti proti karbapenemom za opredelitev CR-bakterij - 6

5.2 Ugotavljanje karbapenemaz za opredelitev CP-bakterij - 6

**5.3 Povzetek mikrobioloških opredelitev vseh CR- in CP-bakterij (s tabelo opredelitev) - 6**

5.4. Koga obveščati o CR- in CP-bakterijah? - 8

6. ODPORNOST PROTI KARBAPENEMOM IN KARBAPENEMAZE PRI *enterobakterijah* - 8
7. ODPORNOST PROTI KARBAPENEMOM IN KARBAPENEMAZE PRI *Pseudomonas aeruginosa* - 12
8. ODPORNOST PROTI KARBAPENEMOM IN KARBAPENEMAZE PRI *Acinetobacter baumannii* – 13
9. REFERENCE – 14
10. TEHNIČNI DODATEK (SPLOŠNE LASTNOSTI TESTOV ZA KARBAPENEMAZE IN PODATKI O VALIDACIJAH) – 15

**Opomba:** v točki 9 je nekaj referenc za nadaljnje branje.

Nanje se v besedilu nismo sklicevali s številkami, razen na tiste, ki navajajo vir fenotipskih testov na karbapenemaze, ki so navedeni v tem dokumentu, ter v nekaterih drugih pomembnih primerih.

Ostale reference so informativne.

## 1. KRATICE

SDD	- standardna disk-difuzija
GD	- gradient-difuzija
SMD	- standardna mikrodilucija
AM	- avtomatske metode za antibiogram – različne ploščice in kartice z antibiotiki v različnih koncentracijah, rezultati interpretirani z algoritmi aparata v S, I in R kategorijo
CLSI	- Clinical and Laboratory Standards Institute
EUCAST	- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
ESDRem	- EUCAST Subcommittee for Detection of Resistance Mechanisms
MIK	- minimalna inhibitorna koncentracija antibiotika
ETP	- ertapenem
IPM	- imipenem
MEM	- meropenem
CPE*	Izolat (še) ne izpolnjuje pogojev za CRE, z zanesljivimi fenotipskimi in / ali molekularnimi metodami je ugotovljeno, da tvori karbapenemaze. Izvor kratice CPE: »Carbapenemase Producing <i>Enterobacteriaceae</i> « (angl.)
CRE*	- »Proti karbapenemom odporne enterobakterije« Izvor kratice: »Carbapenem Resistant <i>Enterobacteriaceae</i> « (angl.) Izolat, za katerega (še) ne vemo, ali tvori karbapenemazo, je pa odporen proti meropenemu (rezultat R) ali imipenemu (rezultat R)
CRE-CPE*	- Enterobakterije, ki tvorijo karbapenemaze (CPE) in so klinično odporne proti meropenemu (rezultat R) ali imipenemu (rezultat R) (CRE)
CDC	- Centers for Disease Control and Prevention (ZDA)
HPA	- Health Protection Agency (Velika Britanija)
CRAb*	- »Proti karbapenemom odporni <i>Acinetobacter baumannii</i> Izvor kratice: »Carbapenem Resistant <i>A. baumannii</i> «(angl.)
CRPs*	- »Proti karbapenemom odporni <i>Pseudomonas aeruginosa</i> « Izvor kratice: »Carbapenem Resistant <i>P. aeruginosa</i> «(angl.)
CRAb-CP*	- »Proti karbapenemom odporni <i>Acinetobacter baumannii</i> , ki tvori karbapenemazo.« Izvor kratice: »CP – pomeni »carbapenemase producing« (angl.)
CRPs-CP*	- »Proti karbapenemom odporni <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , ki tvori karbapenemazo.« Izvor kratice: »CP – pomeni »carbapenemase producing« (angl.)

\* Vsebina teh kratic je podrobno opredeljena v dokumentu: [»Enterobakterije, \*Acinetobacter baumannii\* in \*Pseudomonas aeruginosa\* - označevanje večkratno odpornih izolatov in okrajšave preiskav nadzornih kužnin – 2. izdaja, april 2022.](#) Dokument je dostopen na spletni strani SKUOPZ – (referenca 2).

## 2. KRATKA POJASNILA

**Karbapenem:** antibiotik iz skupine karbapenemskih antibiotikov. Ertapenem je karbapenem, vendar odpornost proti njemu ni del kriterijev za CRE, *A. baumannii* in *P. aeruginosa* sta proti njemu naravno odporna.

**Klinični pomen:** primernost določenega karbapenema za zdravljenje bolnika se v antibiogramu izraža s kategorijami S, I ali R. Le R pomeni odpornost, S in I pomenita občutljivost, pod določenimi pogoji.

**Epidemiološki pomen:** pomen za druge osebe – za ukrepe bolnišnične higiene ali za širše okolje.

**Proti karbapenemom odporen:** v literaturi splošne opredelitve ni, potrebno je pozorno preveriti opredelitev v besedilu - običajno je jasno opredeljeno, sicer je treba razbirati pomen iz konteksta.

**Angleške kratice, npr. CRE, CPE in podobne:** v literaturi splošne opredelitve ni, potrebno je pozorno preveriti opredelitev v besedilu - običajno je jasno opredeljeno, sicer je treba razbirati pomen iz konteksta. Uporaba teh kratic ni tako ustaljena kot je npr. pri kratici ESBL.

### 3. UGOTAVLJANJE OBČUTLJIVOSTI ZA KARBAPENEME ZA KLINIČNE NAMENE - DOLOČITEV S, I, R KATEGORIJ V IZVIDU BOLNIKA

Za antibiogram za klinične namen (za določitev kategorije S, I, R v izvidu) večinoma uporabljamo standardno metodo za izvedbo antibiograma (SDD) in **od aprila 2014** dalje interpretacijo **po EUCAST: verzijo, ki se po sklepih SKUOPZ v državi uporablja – če je to izvedljivo, je to zadnja objavljena verzija**<sup>1</sup>. Standardne mikrodilucije v praksi za testiranje vseh izolatov v običajnem dnevnem delu ne uporabljamo, je pa seveda sprejemljiva metoda, saj je referenčna metoda.

#### <sup>1</sup> Delovno srečanje SKUOPZ, dne 28. 1. 2014, sklep št. 5.

Za uporabo komercialnih metod za določitev S, I, R kategorije v izvidu veljajo **splošna načela iz predgovora**: »Za komercialne metode velja, da se v laboratoriju lahko uporabljajo, če so za namen uporabe validirane / kalibrirane pri proizvajalcu, v strokovni literaturi ali v laboratorijih samih – in pred uporabo preverjeno ustrezno izvajanje metode v laboratoriju.«

Interpretacija v S, I, R kategorijo ni odvisna od prisotnosti ali odsotnosti karbapenemaz, ampak le od zaviralnih con, določenih s SDD, ali od MIK, dobljenih s SMD.

### 4. DOLOČITEV MINIMALNIH INHIBITORNIH KONCENTRACIJ KARBAPENEMSKIH ANTIBIOTIKOV ZA ENTEROKTERIJE S KOMERCIALNIMI TESTI

S katero metodo določeno **vrednost MIK** izpišemo v izvid, če ne delamo standardne mikrodilucije?

- S, I, R kategorijo določimo in izpišemo na osnovi rezultata SDD, ki je pri karbapenemih pri enterobakterijah boljše metoda kot komercialna GD (referenci 4 in 5).
- če gre za CRE ali CRE-CPE v izvid lahko izpišemo vrednost MIK na osnovi GD – dobljenih MIK ne interpretiramo v S, I, R kategorijo
- vrednosti MIK, ki jo dajejo AM, ne izpišemo v izvid\* – za to uporabimo GD ali SMD.

\* v referenci 5 avtorji navajajo velike razlike MIK istih izolatov, ki so jih testirali z različnimi AM in GD. Rezultati MIK, pridobljeni z AM so odvisni od vrste aparata, trenutnega algoritma aparata in uporabljenih »ploščic/kartic«.

Zakaj klinični zdravnik poleg R rezultata ob odpornosti **včasih** potrebuje MIK? Ker kljub rezultatu karbapenema R nekatere študije kažejo, da je kombinirana uporaba karbapenema z drugim antibiotikom do določenega MIK karbapenema koristna, kljub temu, da je rezultat antibiograma R; z MIK klinik lažje izbere najmanj prizadeti karbapenem, če ga bo uporabil v dvotirnem zdravljenju. Večina priporočil za zdravljenje na osnovi MIK karbapenemov izhaja iz rezultatov GD ali SMD. Z razvojem novih antibiotikov z inhibitorji karbapenemaz se je potreba po MIK za karbapeneme zmanjšala.

#### **Povzetek kliničnega testiranja v praksi in določanje MIK (povzetek 3. in 4. točke):**

1. Standardna metoda za testiranje enterobakterij na občutljivost za karbapeneme je SDD – na osnovi teh rezultatov izdamo končni rezultat S, I, R za določen karbapenem.
2. MIK, če je potreben, določimo z GD ali SMD in to vrednost izpišemo v izvid. V izvid ne vpisujemo MIK, ki so rezultat AM.
3. Rezultata MIK, dobljene z GD, ne uporabimo za določitev S, I, R kategorije, ampak le za določitev vrednosti MIK.
4. Mehanizem odpornosti (karbapenemaza prisotna ali ne) ne vpliva na kategorijo odpornosti (S, I, R).

Ker so proti karbapenemom klinično in/ali mikrobiološko odporne bakterije posebno pomembne, so v izvidih posebej označene. V postopku iskanja karbapenemaz je osnovni vir referenca 1, na spletu: [https://www.eucast.org/resistance\\_mechanisms](https://www.eucast.org/resistance_mechanisms)

**EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, 2017.** V nadaljevanju bomo ta dokument navajali kot ESDReM 2017.

## 5. SPLOŠNA NAČELA PRI GRAMNEGATIVNIH BAKTERIJAH - UGOTAVLJANJE KLINIČNE ODPORNOSTI PROTI KARBAPENEMOM ZA OPREDELITEV CR-BAKTERIJ IN UGOTAVLJANJE KARBAPENEMAZ ZA OPREDELITEV CP-BAKTERIJ -6

### 5.1 Ugotavljanje klinične odpornosti proti karbapenemom za opredelitev CR-bakterij

Za opredelitev klinično odporne bakterije, ki sodi v CR-bakterije, **določimo antibiotike, ki jih moramo testirati in določimo, kateri antibiotiki morajo imeti rezultat R**, da jih uvrstimo med CR-bakterije.

### 5.2 Ugotavljanje karbapenemaz za opredelitev CP-bakterij

#### 1. Presejalni testi na karbapenemaze

Praviloma, a ne vedno, je prvi korak t.i. presejalni test na karbapenemaze v antibiogramu. To je lahko:

1. kategorija odpornosti R pri vnaprej določenih antibiotikih predstavlja pozitiven presejalni test. Pri vrstah *P. aeruginosa* in pri *A. baumannii* presejalni kriteriji ustrezajo **kliničnim kriterijem za R** kategorijo tistih antibiotikov, ki opredeljujejo CR-bakterije.
2. Pri enterobakterijah imamo posebne presejalne kriterije - poseben MIK ali zaviralna cona sta presejalni test; pod to razmejitveno zaviralno cono je presejalni test na karbapenemaze pozitiven, nad njo je presejalni test negativen – včasih so predpisani pogoji za več antibiotikov, za kombinacijo dveh antibiotikov. Primer presejalnega testa je presejalna zaviralna cona meropenema pri enterobakterijah, ki je veliko večja od klinične cone za I ali R kategorijo. Glej naslednje tri strani.

#### 2. Potrditveni testi so:

- a) fenotipski (podrobno o njih v nadaljevanju besedila)
- b) molekularni.

Interpretacijo fenotipskih postopkov glej v ustreznih delih tega dokumenta, izvedbo testov v drugih virih, tu bomo navedli samo rezultate testov, ki vplivajo na opredelitev značilnosti oz. uporabo molekularnih testov:

- prve izolate bolnika, ki so v fenotipskem postopku pozitivni, pošljemo na molekularno analizo, če je le mogoče – to je klinično in epidemiološko pomembno za enterobakterije in *P. aeruginosa*, epidemiološko tudi za *A. baumannii*.
- izolate, kjer rezultat fenotipskega postopka za ugotavljanje karbapenemaz ni nedvoumno pozitiven ali negativen, pošljemo na molekularno analizo.
- pri izolatih, kjer je postopek nedvoumno negativen, zaključimo s testiranjem (glej dele tega dokumenta o fenotipskih testih).

Molekularne teste za določitev karbapenemaz izvajajo specializirani laboratoriji, trenutno IMI MF LJ in NLZOH, Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Maribor.

- Pozitiven test specializiranega laboratorija velja kot nedvoumna potrditev prisotnosti karbapenemaz v izolatu.
- Molekularni testi za dokaz genov za karbapenemaze so specifični in podajo rezultat samo za nabor iskanih genov. Negativen rezultat pomeni odsotnost iskanih tarčnih genov za karbapenemaze.
- Če so fenotipski testi pozitivni in molekularni testi negativni, to pomeni odsotnost iskanih tarčnih genov za karbapenemaze.
- Rezultat molekularnega testa je lahko negativen, če je prisotna nova različica iskanega gena, prav tako bo negativen, če je prisoten gen za karbapenemazo, ki ga ni v naboru tarč. Če fenotipski testi kljub negativnim molekularnim rezultatom jasno kažejo na tvorbo karbapenemaz, se z ustreznim (mednarodnim) referenčnim laboratorijem skušamo dogovoriti za nadaljnje analize izolata.

### 5.3 Povzetek mikrobioloških opredelitev vseh CR- in CP-bakterij (s tabelo opredelitev)

Opomba: dvočrkovnim oznakam CR- in CP- pri enterobakterijah dodamo črko E, ker je to običajno v mnogih virih (iz kratic CR in CP pri enterobakterijah nastaneta kratici CRE in CPE). Povzetek testov je v Tabeli 1.

**Tabela 1. Povzetek mikrobioloških opredelitev CR(E) bakterij in CP(E) bakterij različnih skupin bakterij**

Vrsta izolata	Značilnost (oznaka) izolata	Opredelitev mikrobioloških kriterijev za navedeno značilnost izolata
Enterobakterije	CRE <sup>1</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>odpornost (R):</b> imipenem in/ali meropenem<sup>2</sup></li> </ul>
Enterobakterije	CRE-CPE <sup>1</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>odpornost (R):</b> imipenem in/ali meropenem<sup>2</sup></li> <li>• z zanesljivimi fenotipskimi in / ali molekularnimi metodami je ugotovljeno, da izolat izloča karbapenemaze.</li> </ul>
Enterobakterije	Preverjamo možnost CPE <sup>1</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>občutljiv (S/I) za meropenem in imipenem<sup>3</sup></b></li> <li>• Izpolnjeni <b>presejalni kriteriji</b> za preverjanje prisotnosti karbapenemaz</li> </ul>
Enterobakterije	CPE <sup>1</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>občutljiv (S/I) za meropenem in imipenem<sup>3</sup></b></li> <li>• z zanesljivimi fenotipskimi in / ali molekularnimi metodami je ugotovljeno, da izolat izloča karbapenemaze.</li> </ul>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CRPs <sup>1</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>odpornost (R)</b> proti vsaj enemu predstavniku iz vsake od treh betalaktamskih skupin – penicilini / cefalosporini / karbapenemi. <ul style="list-style-type: none"> <li>• piperacilin-tazobaktam</li> <li>• ceftazidim in/ali cefepim</li> <li>• imipenem in/ali meropenem</li> </ul> </li> <li>• vedno testiramo vsaj en antibiotik iz vsake od treh skupin: penicilini / cefalosporini / karbapenemi. Ertapenema ne testiramo, ker je proti njemu <i>P. aeruginosa</i> <u>naravno odporen</u>.</li> </ul>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CRPs-CP <sup>1</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• z zanesljivimi fenotipskimi in / ali molekularnimi metodami je ugotovljeno, da izolat izloča karbapenemaze.</li> </ul>
<i>Acinetobacter baumannii</i> (kompleks)	CRAb <sup>1</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>odpornost (R):</b> imipenem in/ali meropenem.</li> <li>• ertapenema ne testiramo, ker je acinetobakter proti njemu <u>naravno odporen</u>.</li> </ul>
<i>Acinetobacter baumannii</i> (kompleks)	CRAb-CP <sup>1</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• z zanesljivimi fenotipskimi in / ali molekularnimi metodami je ugotovljeno, da izolat izloča karbapenemaze.</li> </ul>

<sup>1</sup> izbrani fenotipski testi in njihova interpretacija (brez izvedbenih navodil za teste) so navedeni kasneje.

<sup>2</sup> običajno testiramo imipenem in meropenem.

Meropenem je pri enterobakterijah praviloma obvezen, ker na coni / MIK meropenema temelji najbolj občutljivi in hkrati specifični fenotipski presejalni test za karbapenemaze. Izjemoma, če laboratorij ne more testirati meropenema, kot presejalni test za karbapenemaze lahko uporabi presejalni test z ertapenemom, vendar je ta presejalni test precej manj specifičen (glej stran 8).

Rezultat ertapenema na opredelitev CRE bakterij ne vpliva, ni kriterij v opredelitvi CRE (izolat, ki je med karbapenemi odporen le proti ertapenemu, ne sodi v CRE kategorijo). Ertapenem je lahko le presejalni test in klinično uporaben antibiotik, ne pa kriterij za CRE oznako / značilnost. Izolirana odpornost proti ertapenemu je namreč precej pogosta in nespecifična – povzročajo jo veliko mehanizmov odpornosti.

<sup>3</sup> CPE: oba za CRE klasifikacijo pomembna karbapenema, ki ju testiramo – imipenem ali meropenem – morata biti pri testiranju v kategoriji I/S, da izolat sodi v kategorijo CPE. Če je namreč vsaj eden od testiranih R, je že izpolnjen pogoj za CRE. Če testiramo le enega od obeh, mora le-ta biti I/S, da je izolat v kategoriji CPE.

Če od obeh pomembnih karbapenemov testiramo le imipenem, moramo poleg njega testirati tudi ertapenem, ki je v tem primeru obvezen presejalni test na karbapenemaze. Glej opombo 2.

#### 5.4. Koga obveščati o CR- in CP-bakterijah?

To je kritična informacija in zato je potrebno naročniku nemudoma sporočiti rezultat (vsekakor istega dne). **Podrobnosti se določijo na lokalni ravni: ali zadošča obveščanje oddelka, ali tudi SOBO/ZOBO/KOBO.** Obveščanje na nacionalnem nivoju o pojavu CR ali CP izolatov: zaenkrat se na nacionalnem nivoju ti izolati posamično ne spremljajo, za prijavo ni zakonskih temeljev; občasno potekajo epidemiološke študije izolatov.

#### 6. ODPORNOST PROTI KARBAPENEMOM IN KARBAPENEMAZE PRI ENTEROBAKTERIJAH

*Kriterij za CRE (klinična odpornost izolata):*

- Izolat je odporen (kategorija R) proti vsaj enemu karbapenemu – imipenemu ali meropenemu
- Vedno testiramo vsaj enega od obeh: imipenem ali meropenem; če izberemo imipenem, moramo zraven testirati ertapenem, ker vedno potrebujemo tudi presejalni test na karbapenemaze.

*Presejalni test na karbapenemaze pri enterobakterijah:*

Vedno testiramo vsaj en karbapenem, imipenem in/ali meropenem.

Kot presejalni test na prisotnost lahko uporabljamo PRESEJALNE zaviralne cone ali MIK meropenema in ertapenema. Podatke EUCAST (ESDRem 2017) prikazujemo v tabeli 2. **Optimalo občutljivost ima meropenemski disk – presejalne cone so navedene spodaj.** Ertapenem ima slabo specifičnost, po Pasteranu in sod. (referenca 9) tudi občutljivost ni optimalna. Ertapenem je sprejemljiv, ni pa optimalen.

<sup>2</sup>Kot presejalni test za fenotipsko detekcijo karbapenemaz pri enterobakterijah bomo uporabili začetek algoritma 1, stran 6/43 omenjenega dokumenta - za vse primoizolate in reizolate.

<sup>2</sup>Delovno srečanje SKUOPZ, 12. 9. 2017, sklep št. 1; »omenjeni dokument« v sklepu 1 je dokument ESDReM 2017, izdaja iz leta 2017.

**Tabela 2. Presejalne vrednosti con in MIK po ESDReM 2017 smernicah iz leta 2017 (veljavne aprila 2022).**

Antibiotik	Mejna vrednost za pozitiven presejalni test – cona v mm	Mejna vrednost za pozitiven presejalni test – MIK SMD v mg/L
Meropenem *	< 28*	> 0,125
Ertapenem**	< 25	> 0,125

\* Mejna vrednost z najboljšim odnosom med specifičnostjo in občutljivostjo. Če je cona meropenema od 25 do 27 mm, so testi na karbapenemaze potrebni le, če je izolat hkrati odporen proti piperacilin/tazobaktamu in/ali temocilinu. Testi na karbapenemaze so vedno potrebni, če je cona meropenema manjša od 25 mm.

\*\* Ertapenem ima po ESDReM odlično občutljivost, a slabo specifičnost. Lahko je alternativni presejalni antibiotik namesto meropenema, a tudi izolati z AmpC in ESBL odpornostjo so proti ertapenemu neredko odporni.

**Algoritem presejalnih testov je na sliki 1 na naslednji strani, na tej strani so ista pravila v nekaj stavkih.**

**Pred interpretacijo presejalnega testa v besedi ali na sliki algoritma zaokrožimo izmerjeno zaviralno cono na cel milimeter, brez decimalk.**

**Presejalni test na karbapenemaze je pozitiven v naslednjih dveh primerih – sledijo potrditveni testi:**

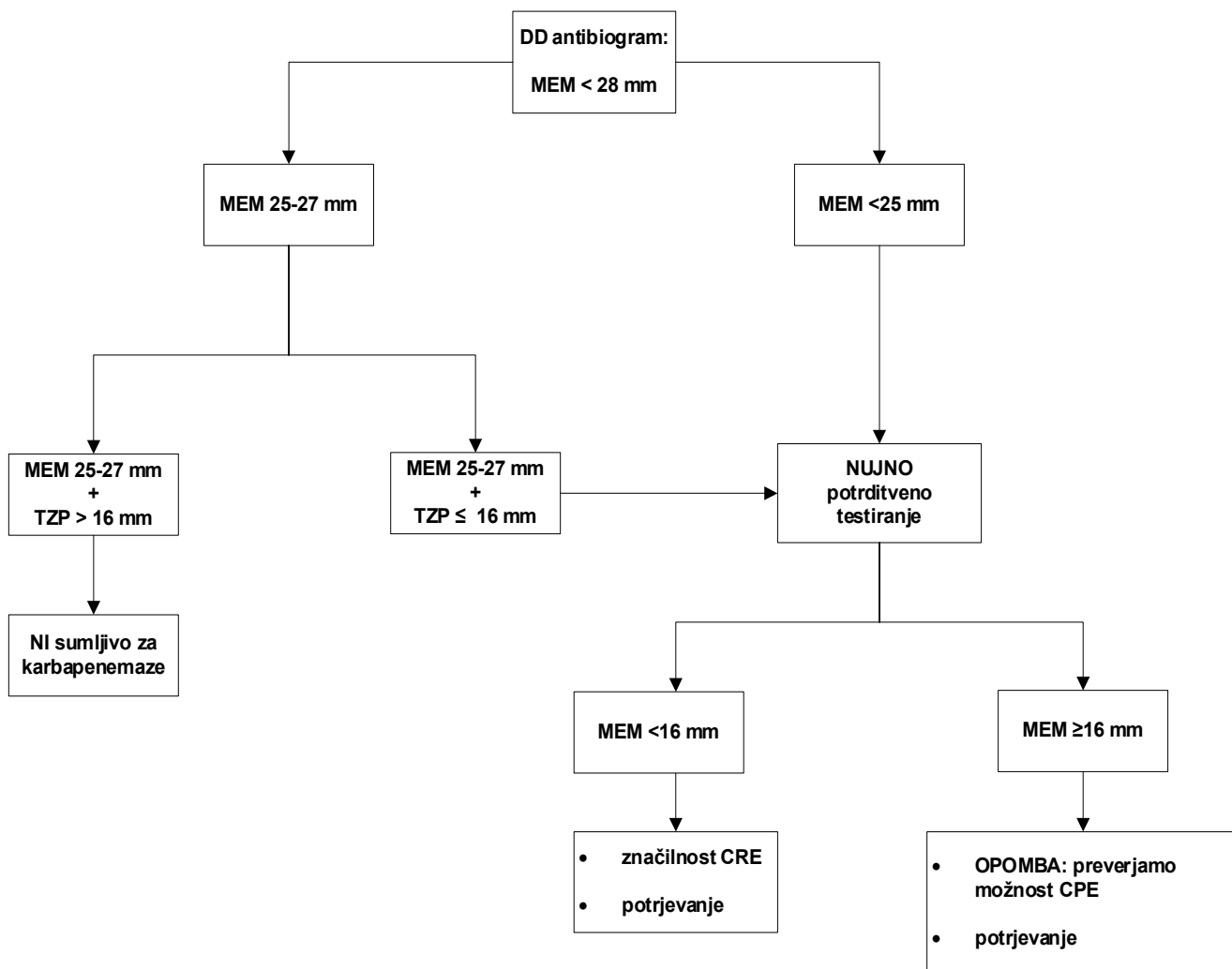
1. Če je zaviralna cona **meropenema < 25 mm** (rezultat piperacilin-tazobaktama ni pomemben) ALI
2. Če je zaviralna cona **meropenema 25 – 27 mm in cona piperacilin-tazobaktama ≤ 16 mm.\***

\*Velja namreč interpretacija R za piperacilin-tazobaktam **iz leta 2017**, ko je ESDReM 2017 izdal dokument.

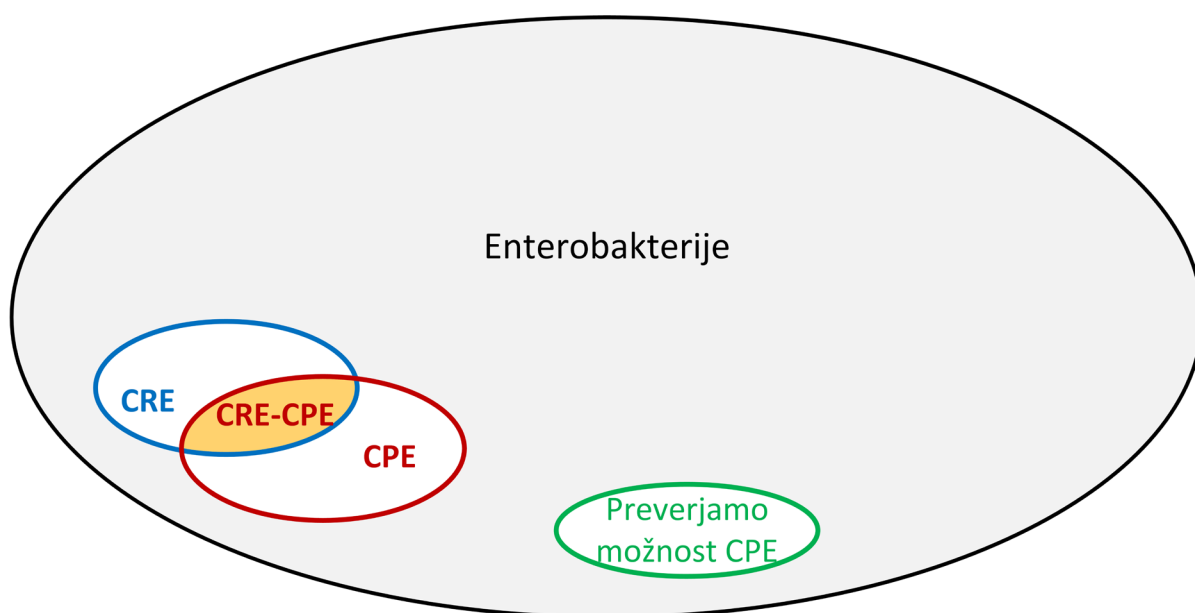
**Presejalni test na karbapenemaze je negativen – zaključek: karbapenemaze niso prisotne:**

1. Če je zaviralna cona **meropenema ≥ 28 mm** ALI
2. Če je zaviralna cona **meropenema 25 – 27 mm** in je cona piperacilin-tazobaktama **>16 mm.**





*Slika 1 (zgoraj). Presejalni testi in potrditveno testiranje na karbapenemaze – razločitveno drevo (slika: M. Pirš)*



*Slika 2 (zgoraj) Enterobakterije s klinično (R v antibiogramu - CRE) in /ali mikrobiološka odpornostjo (prisotnost karbapenemaz - CPE) – shematski prikaz presečne množice CRE-CPE (slika: prikaz I. Štrumbelj, oblikovanje Mateja Pirš).*

#### Razlaga slike:

*Modri in rjavo-rdeči okvir in presečno polje oker barve na sliki 2 prikazujejo končno stanje, ko so vsi potrebni testi za opredelitev tvorbe karbapenemaz opravljeni (fenotipski in/ali molekularni). Izjema je zeleni okvir, kjer gre začasno stanje – dokler testi na karbapenemaze niso končani.*

**Rjavo-rdeči okvir** vsebuje klinično odporne bakterije (CRE) (meropenem ali imipenem R).

**Modri okvir** vsebuje bakterije z ugotovljeno karbapenemazo (CPE).

**Rumeno - oker polje**, je presečna množica navedenih dveh okvirov, vsebuje bakterije, ki vsebujejo obe značilnosti (CRE-CPE).

**Zeleni okvir** kaže **prehodno stanje pred končanimi testi** na karbapenemaze, ko je presejalni test na karbapenemaze pozitiven, rezultatov potrditvenih testov pa še ni, zato ne vemo, ali gre za CPE bakterije.

### Potrditveni test na karbapenemaze pri enterobakterijah

Ob pozitivnem presejalnem testu sledi potrditveni test, najbolj uporabni so testi iz treh skupin, ki imajo različen način delovanja, posledično tudi različen spekter tarč, občutljivost in specifičnost, čas do rezultata. Pregled pomembnih (za uporabo in interpretacijo) lastnosti testov na karbapenemaze za enterobakterije - Beta Carba, Carba 5 NG, in zCIM test - je v Tehničnem apendiksu.

#### **Enterobakterije – kriteriji za potrjevanje ali izključevanje karbapenemaz pri izolatu s fenotipskimi testi**

Pojasnilo: običajno naredimo 1 test ali 2, toliko da pridemo do izpolnitve kriterijev, izjemoma naredimo 3.

#### **Karbapenemaza je POTRJENA (CPE), ČE:**

Prvi CPE izolat določene bakterijske vrste pri preiskovancu:

- zadošča kriterij A: pozitiven Carba 5 NG test ali:
- zadošča kriterij B: pozitivna sta oba testa: Beta Carba in zCIM.

Reizolat iste bakterijske vrste pri preiskovancu:

- zadošča en pozitiven test: Beta Carba ali zCIM ali Carba 5 NG.

#### **Karbapenemaza je IZKLJUČENA (ni CPE), ČE:**

Prvi možen CPE izolat določene bakterijske vrste pri preiskovancu:

- zadošča kriterij A: negativna oba testa, zCIM in Beta Carba, ali:
- zadošča kriterij B: negativna oba testa, zCIM in Carba 5 NG.

Reizolat iste bakterijske vrste pri preiskovancu (z enakim antibiogramom kot prejšnji izolat):

- zadošča kriterij A: negativen test zCIM
- zadošča kriterij B: opravljena dva testa, oba negativna: Beta Carba in Carba 5 NG.

*Če laboratorij ne izvaja fenotipskih potrditvenih testov, pošlje izolat s pozitivnim presejalnim testom v laboratorij, ki izvaja potrditveni postopek, najbolje v laboratorij, ki izvaja tudi molekularne teste; morda bodo molekularni testi potrebni po končanju fenotipskih testov.*

#### CRE, CPE in CRE-CPE oznake za enterobakterije; prednostni seznam značilnosti

Tu opredeljujemo, katera »značilnost« ima prednost pri označevanju izolatov – pravilo je, da ima tvorba karbapenemaz (CRE-CPE ali CPE) prednost pred samo CRE značilnostjo:

1. Če je izolat CRE-CPE, dobi »značilnost« **CRE-CPE**
2. Če je izolat CPE, dobi značilnost **CPE**
3. Če izolat ni CPE, a ustreza opredelitvi CRE, dobi značilnost **CRE** ne glede na ostale mehanizme odpornosti; ostale mehanizme odpornosti (npr. ESBL) lahko dodamo kot drugo značilnost ali izpišemo v opombi.
4. Če izolat ni ne CRE-CPE ne CRE ne CPE, a ustreza opredelitvi za ESBL, dobi značilnost **ESBL**.

*(Če ni nič od navedenega, gre verjetno za AmpC, vendar teh betalaktamaz ne izpisujemo kot značilnost.)*

## 7. ODPORNOST PROTI KARBAPENEMOM IN KARBAPENEMAZE pri *Pseudomonas aeruginosa*

Kriterij za CRPs (klinična odpornost izolata):

- Izolat je hkrati odporen (kategorija R) proti vsaj enemu od antibiotikov iz vsake od treh betalaktamskih skupin – penicilini/cefalosporini/karbapenemi.

Vedno testiramo vsaj en ustrezen antibiotik iz vsake od treh skupin: piperacilin-tazobaktam / (ceftazidim in/ali cefepim)/ (imipenem in/ali meropenem).

- Penicilin: piperacilin-tazobaktam
- Cefalosporina: ceftazidim, cefepim
- Karbapenema: meropenem, imipenem (proti ertapenemu so nefermentativni bacilli intrinzično odporni).

### POSTOPEK ZA KARBAPENEMAZE:

#### Presejalni test na karbapenemaze pri *Pseudomonas aeruginosa*:

Ne uporabljamo posebnih presejalnih con ali MIK, kot je to pri enterobakterijah.

**Pozitivni presejalni test:** izpolnjeni kriteriji za CRPs.

**Negativni presejalni test:** kriteriji za CRPs niso izpolnjeni.

#### Potrditveni fenotipski test na karbapenemaze pri *Pseudomonas aeruginosa*:

Na voljo so enaki potrditveni testi kot za enterobakterije, le da se namesto zCIM testa uporablja mCIM, pregled testov je v Tehničnem dodatku.

#### ***Pseudomonas aeruginosa* – kriteriji za potrjevanje ali izključevanje karbapenemaz pri izolatu**

Pojasnilo: običajno naredimo 1 test ali 2, toliko da pridemo do izpolnitve kriterijev, izjemoma naredimo 3.

#### **Karbapenemaza je POTRJENA (CP), ČE:**

Prvi CP izolat *P. aeruginosa* pri preiskovancu:

- zadošča kriterij A: pozitiven Carba 5 NG test ali:
- zadošča kriterij B: pozitivna sta oba testa: Beta Carba in mCIM.

Reizolat pri preiskovancu:

- zadošča en pozitiven test: Beta Carba ali mCIM ali Carba 5 NG.

#### **Karbapenemaza je IZKLJUČENA (ni CP), ČE:**

Prvi možen CP izolat *P. aeruginosa* pri preiskovancu:

- zadošča kriterij A: negativna oba testa, mCIM in Beta Carba, ali:
- zadošča kriterij B: negativna oba testa, mCIM in Carba 5 NG.

Reizolat *P. aeruginosa* pri preiskovancu (z enakim antibiogramom kot prejšnji izolat):

- zadošča kriterij A: negativen test mCIM
- zadošča kriterij B: opravljena dva testa, oba negativna: Beta Carba in Carba 5 NG.

## 8. ODPORNOST PROTI KARBAPENEMOM IN KARBAPENEMAZE pri *Acinetobacter baumannii*

### Kriterij za CRAb (klinična odpornost izolata):

- Izolat je odporen (kategorija R) proti vsaj enemu karbapenemu.
- Vedno testiramo vsaj en karbapenem, imipenem in/ali meropenem (proti ertapenemu so nefermentativni bacilli intrinzično odporni, zato ertapenema tu ne testiramo).

### **POSTOPEK ZA KARBAPENEMAZE:**

#### Presejalni test na karbapenemaze pri *Acinetobacter baumannii*:

Ne uporabljamo posebnih presejalnih con ali MIK, kot je to pri enterobakterijah.

**Pozitivni presejalni testi:** izpolnjeni kriteriji za CRAb.

**Negativni presejalni testi:** kriteriji za CRAb niso izpolnjeni.

#### Potrditveni test na karbapenemaze pri *Acinetobacter baumannii*:

**Velja stališče ESDReM 2017:** fenotipski testi pri CRAb za potrditev karbapenemaz niso priznani.

Ugotovili smo, da je Beta Carba odličen test tudi za karbapenemaze CRAb, vendar so podatki neobjavljeni in jih še ne moremo upoštevati. Velja: **fenotipskih testov za potrditev karbapenemaz pri CRAb NI.**

#### *Acinetobacter baumannii* – kriteriji za potrjevanje ali izključevanje karbapenemaz pri izolatu

Fenotipski testi: jih ni.

Molekularni testi:

Če je le možno, prve izolate CRAb pri pacientih pošljemo v molekularno potrditev (in ugotovitev tipa karbapenemaz).

- Če molekularna preiskava potrdi gene za karbapenemazo, izolat postane CRAb-CP.
- Če molekularna preiskava NE potrdi genov za karbapenemazo, izolat ostane CRAb.

Ukrepi hospitalne higijene so enaki ne glede na prisotnost ali odsotnost karbapenemaz oz. kratice – CP <sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Velika večina CRAb izolatov tvori karbapenemaze, a vsakodnevno tega ne določamo.

## 9. REFERENCE

1. EUCAST subcommittee for detection of resistance mechanisms. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 2.0 1 July 2017. [http://www.eucast.org/resistance\\_mechanisms/](http://www.eucast.org/resistance_mechanisms/) Pristop: 3. 4. 2022
2. Pirš M, Štrumbelj I, Lejko – Zupanc T, Mrvič T. Enterobakterije, *Acinetobacter baumannii* in *Pseudomonas aeruginosa* - označevanje večkratno odpornih izolatov in okrajšave preiskav nadzornih kužnin [internet]. Slovenska komisija za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila (SKUOPZ). 2. izdaja, april 2022. <http://www.imi.si/skuopz> Pristop: 4. 4. 2022
3. Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske CG, Gniadkowski M, Malamou-Lada E, Martinez-Martinez L, Navarro F, Nordmann P, Peixe L, Pournaras S, Rossolini GM, Tsakris A, Vatopoulos A, Cantón R. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16(2): 112-22.
4. Endimiani A, Perez F, Bajaksouzian S, Windau AR, Good CE, Choudhary Y, Hujer AM, Bethel CR, Bonomo RA, Jacobs MR. Evaluation of updated interpretative criteria for categorizing *Klebsiella pneumoniae* with reduced carbapenem susceptibility. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(12): 4417-25.
5. Bulik CC et al. Comparison of MEM MICs and susceptibilities for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates by various testing methods. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(7): 2402-6.
6. Health Protection Agency and the Advisory Committee on Antimicrobial Resistance and Healthcare Associated Infections (ARHAI) (kontakt: D. Livermoore). Advice on Carbapenemase Producers: Recognition, infection control and treatment. [internet] Publicirano: 31.01.2011. Pristop: 26. 9. 2013
7. HPA - Health Protection Agency. (2013). Laboratory Detection and Reporting of Bacteria with Carbapenem-Hydrolysing  $\beta$ -lactamases (Carbapenemases). UK Standards for Microbiology Investigations. P 8 issue 1. [internet] <http://www.hpa.org.uk/SMI/pdf>. Pristop: 26. 9. 2013
8. Willems E, Verhaegen J, Magerman K, Nys S, Cartuyvels R. Towards a phenotypic screening strategy for emerging  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacilli. *Int J Antimicrob Agents.* 2013; 41(2): 99-109.
9. Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, Rapoport M, Corso A. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(6): 1631-9.
10. Vading M, Samuelsen Ø, Haldorsen B, Sundsfjord AS, Giske CG. Comparison of disk diffusion, Etest and VITEK2 for detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* with the EUCAST and CLSI breakpoint systems. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17(5):668-74.
11. CDC. Guidance for Control of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. CDC 2012. [internet] <http://www.cdc.gov/hai/pdfs/cre/CRE-guidance-508.pdf> Pristop: 26. 9. 2013
12. Landman D. et al. Accuracy of Carbapenem Nonsusceptibility for Identification of KPC-Possessing Enterobacteriaceae by Use of the Revised CLSI Breakpoints. *J Clin Microbiol.* 2011 November; 49(11): 3931–3933.
13. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18(9): 1503-7.
14. Baeza LL, et al. Comparison of five methods for detection of carbapenemases in Enterobacteriales with proposal of a new algorithm. *Clin Microbiol Infect* 2019; 25(10):1286.e9-1286.e15.
15. \* Tempe, AZ. Methods Application and Interpretation Working Group CLSI AST Subcommittee Meeting, January 16, 2017. Internet, dostop 3. 4. 2022 [https://clsi.org/meetings/ast\\_old/ast-meeting-files-resources](https://clsi.org/meetings/ast_old/ast-meeting-files-resources)
16. Simner PJ et al. Carbapenemase Detection among Carbapenem-Resistant Glucose-Nonfermenting Gram-Negative Bacilli. *J Clin Microbiol.* 2017 Sep; 55(9): 2858–2864.
17. Štrumbelj I., Glažar P., Petrovič Ž. Vrednotenje fenotipskih testov Beta Carba in mCIM za detekcijo karbapenemaz pri vrstah *Pseudomonas aeruginosa* in *Acinetobacter baumannii*. NLZOH, junij 2019. Interni dokument NLZOH.
18. Originalna navodila NG Biotech: NG-Test CARBA 5 (Ref: ENO002CAR, Rev:180123). LOT: 180605-01, Rok uporabe: 2020-05
19. Boutal H., Vogel A., Devilliers K., Plaisance M., Simon S., Volland H., et al. A multiplex lateral flow immunoassay for the rapid identification of NDM-, KPC-, IMP- and VIM-type and OXA-48-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2018 Apr 1; 73 (4)
20. Saleh A., Göttig S., Hamprecht AG. Multiplex Immunochromatographic Detection of OXA-48, KPC, and NDM Carbapenemases: Impact of Inoculum, Antibiotics, and Agar. *Journal of Clinical Microbiology*, 2018 Apr 25; 56 (5)
21. Šterbenc A, Cerar Kišek, Krošelj N, Pirš M. Performance of the NG-Test CARBA 5 rapid test for detection of KPC, OXA-48-like, NDM, VIM, and IMP carbapenemases. ECCMID, Poster P1252, Amsterdam 2019.
22. Štrumbelj I, Petrovič Ž., Hrast B. Vrednotenje fenotipskega testa za ugotavljanje karbapenemaz CARBA 5 – NG. NLZOH, junij 2019. Interni dokument NLZOH.
23. Navodilo proizvajalca. Biorad.  $\beta$ -Carba test. Package insert. Oznaka verzije: 881159 – 2015/05
24. Bernabeu S, Dortet L, Naas T. Evaluation of the  $\beta$ -CARBA™ test, a colorimetric test for the rapid detection of carbapenemase activity in Gram-negative bacilli. *J Antimicrob Chemother.* 2017 Mar 10. doi: 10.1093/jac/dkx061. Hinič V, Reist J, Egli A. Evaluation of the rapid biochemical  $\beta$ -CARBA™ test for detection of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *J Microbiol Methods.* 2018 Jan;144:44-46.

Opomba \*, referenca 15: kako dostopamo do nje: na zgoraj in tu navedenem spletnem naslovu CLSI: [https://clsi.org/meetings/ast\\_old/ast-meeting-files-resources](https://clsi.org/meetings/ast_old/ast-meeting-files-resources) odpremo mapo »January 2017«, tam datoteko z naslovom 2017\_Jan\_AST\_Methods\_App\_Imple\_WG\_Presentation; to je iskana datoteka.

## 10. TEHNIČNI DODATEK (SPLOŠNE LASTNOSTI TESTOV ZA KARBAPENEMAZE IN PODATKI O VALIDACIJAH - VERIFIKACIJAH)

Tehnični dodatek je na naslednjih straneh.

- V Tabeli 2 so pregledno predstavljene lastnosti najpomembnejših fenotipskih testov za karbapenemaze pri enterobakterijah.

Prva dva testa (Beta Carba in Carba 5 NG) na enak način uporabljamo tudi za *P. aeruginosa*.

**Razlika je v tretjem testu, v vrsti CIM testa** - namesto zCIM testa pri *P. aeruginosa* uporabimo drugo varianto testa, imenovano mCIM, s podobnimi lastnostmi kot zCIM, le da je **čas prve inkubacije 4 ure (pri zCIM testu, ki se uporablja za enterobakterije, je čas prve inkubacije – prvi dan – 2 uri).**

Razlike med obema variantama CIM testa so tudi v reagentih, v praksi pomembna razlika je čas izvajanja prvi dan testa: za **mCIM potrebujemo 4 ure prve inkubacije**, za **zCIM pa 2 uri prve inkubacije**.

- Sledi podrobna razprava o skupnih principih priprave in uporabe inokuluma.
- Tej razpravi sledi kratek nabor objavljenih validacij in povzetek interne verifikacije testov.

**Tabela 2. Lastnosti potrditvenih fenotipskih karbapenemaznih testov za enterobakterije.**

	<b>Beta Carba<sup>®*</sup></b> <b>(ref. 14, 21)</b>	<b>Carba 5 NG<sup>®</sup></b> <b>(ref. 17)</b>	<b>zCIM za enterobakterije</b> <b>(ref. 14)</b>
<b>Princip testa</b>	Razgradnja neznanega cefalosporinskega kromogena s karbapenemazami.	Imunokromatografija. Karbapenemaza v vzorcu je antigen (AG): v ploščici so protitelesa (PT) proti 5 glavnim (pogostim) karbapenemazam.	Razgradnja meropenema v disku s karbapenemazami vzorca v prvi inkubaciji. Količina meropenema v disku MEM se zmanjša. S tem diskom naredimo SDD s standardnim sevom <i>Escherichia coli</i> .
<b>Indikator pozitivnosti ob prisotnosti karbapenemaz</b>	Sprememba barve raztopine.	Kompleks AG – PT se vidi kot črtica na lističu ob črki, ki označuje skupino karbapenemaz.	Zaviralna cona okrog MEM je majhna (pod mejo za pozitivnost), ker je MEM v disku razgrajen.
<b>Tarča testa (kdaj je test pozitiven)</b>	Vse karbapenemaze, ki razgrajujejo neznan substrat v testu.	Vse karbapenemaze, proti katerim ima test PT: skupine KPC, VIM NDM, OXA-48, IMP,	Vse karbapenemaze.
<b>Kdaj je test lažno negativen</b>	1. Če je učinkovitost karbapenemaze prešibka. 2. Če karbapenemaza ne razgrajuje testnega kromogena.	1. Če je učinkovitost karbapenemaze prešibka. 2. Če karbapenemaza ni ena od tarčnih karbapenemaz.	1. Če je učinkovitost karbapenemaze prešibka.
<b>Potreben inokulum</b>	Majhen.	Majhen.	Zelo velik.
<b>Čas od začetka do konca testa</b>	25 min (ali manj ob pozitivnosti)	15 minut (ali manj ob pozitivnosti)	1 dan: prvi dan rabimo 2 uri, nato odčitamo naslednji dan.
<b>Realna izvedljivost</b>	Če je na voljo nekaj kolonij na ustreznem gojišču, isti dan.	Če je na voljo nekaj kolonij na ustreznem gojišču, isti dan.	Rezultat je dan po tem, ko že imamo dovolj kolonij za veliki inokulum, potreben za test.
<b>Cena reagentov</b>	Srednja.	Zelo velika.	Majhna.
<b>Cena dela</b>	Srednja.	Srednja.	Zelo velika.
<b>Občutljivost za vse karbapenemaze</b>	Dobra.	Skupaj dobra: odlična za tarčne karbapenemaze, test je specifičen, drugih karbapenemaz ne zazna.	Odlična. Zazna vse, razen karbapenemaz z zelo šibko učinkovitostjo.
<b>Specifičnost</b>	Zelo dobra. Odlična je specifičnost kombinacije: Beta Carba + mCIM plus.	Odlična. Zato za fenotipski dokaz karbapenemaze zadostuje pozitivnost samo tega testa.	Zelo dobra. Odlična je specifičnost kombinacije dveh testov: Beta Carba + mCIM.
<b>Povzetek</b>	Hiter test z dobro občutljivostjo in dobro specifičnostjo.	Hiter test z zelo dobro občutljivostjo in <b>odlično specifičnostjo</b> .	»Počasen« vsaj 1-dnevni test z <b>odlično občutljivostjo</b> in zelo dobro specifičnostjo.

\* Namesto Beta Carba testa je mogoče uporabiti »in house« teste Carba NP ali Carba Blue, če je testa laboratorij uspešno verificiral v svojem okolju. Občutljivost je podobna kot pri testu Beta Carba, odvisno od vrste karbapenemaz in izhodiščnega agarja, kjer kolonije zrastejo; teoretično je rezultat istodnevni (testa trajata nekaj ur), vendar oba testa potrebuje ta **velik inokulum**, zato je pred testom včasih potrebno precepljanje. **Velja; kjer je v tem dokumentu naveden Beta Carba, sta navedena testa, Carba NP ali Carba Blue, alternativa, čeprav v besedilu nista izrecno navedena.**



## Skupne opombe – podrobnosti glede inokuluma in nekaj podatkov o vrednotenjih fenotipskih karbapenemaznih testov za enterobakterije in *P. aeruginosa*.

Celotne izvedbene podrobnosti testov so v referencah in internih navodilih laboratorijev.

**Podrobnosti izvedbe so izjemno pomembne pri vseh treh testih. Pomembni dejavniki so:**

- izvorni agar, lokacija kolonij na agarju (ob diskih karbapenemov, če so položeni)
- količina inokuluma,
- homogenizacija inokuluma.

Tu navajamo nekaj splošnih nasvetov za pripravo inokuluma, nato pa vire za izvedbo testov z opombami o validacijah in verifikacijah. **Sama izvedba testov v tem dokumentu ni opisana.**

V tem dokumentu so predstavljene **lastnosti testov, ki utemeljujejo kriterije uporabe posameznih testov ali kombinacije različnih testov**, po katerih zaključimo, da izolat tvori karbapenemaze (potrditev) ali jih ne (izključitev karbapenemaz). S temi kombiniranimi kriteriji dosežemo občutljivost in specifičnost blizu 100 %. Pomembne lastnosti treh testov so v navedene v: [Tabeli 2](#).

- **Beta Carba test** prinese stroškovno učinkovito hitrost do rezultata.
- Celokupno veliko občutljivost in specifičnost prinašata testa **Carba 5 NG** in varianti **CIM testa (14)**.

Najprej bomo v besedilu navedli nekaj podrobnosti za pripravo inokuluma, ki je bistven za vse teste, ter podatke o občutljivosti in specifičnosti za tri pomembne, praktično uporabne teste za potrjevanje karbapenemaz.

Trije testi, ki so jih kot primerne ocenili tudi nemški avtorji v veliki primerjavi testov, so: CIM test, ki ima dve varianti, mCIM in zCIM, test Beta Carba in test Carba 5 NG (14). Najprej pa o inokulumu za te teste.

1. **Inokulum:** kateri agarji so primerni za pridobitev inokuluma, je specifično za vsak test. Nekatera selektivna gojišča za karbapenemaze so primerna, nekatera niso. MHA mora imeti npr. dovolj cinka. **Ustrezni izhodiščni agarji so navedeni v navodilih za posamezen test.**

**1.a)** Količina kolonij v »polni zanki«: Slika 1 prikazuje, kaj pomeni polna 10 µL mikrobiološka zanka; enaka oblika (krogla) inokuluma velja za 1 µL zanko, le manjša je.



**Slika 3 (zgoraj).** Polna 10 µL mikrobiološka zanka pri karbapenemaznih testih je krogla, ne vodoravna »opna« v zanki.

Polno 10 µL mikrobiološko zanko uporabimo za zCIM in mCIM test, 1µL zanko pa za Beta Carba test in Carba 5 NG test: proizvajalec količino Carba 5 NG opredeljuje kot 1 do 2 koloniji: v praksi gre tudi tu za približno 1µL kroglo: zanjo porabimo približno 1 do 2 koloniji.

**1.b)** Drugi dejavniki, ki so pomembni:

- za metalobetalaktamaze **količina cinka** v gojišču
- za vse teste je koristno, da vzamemo **inokulum iz roba inhibicijske cone karbapenema** ali iz **USTREZNEGA selektivnega gojišča za karbapenemaze**, kjer zrastejo bakterije z najbolj učinkovitimi karbapenemazami. Niso vsi selektivni agarji dobro izhodišče za vse teste – pogledati je treba navodila posameznega testa.

**1c)** Pomembno je, da inokulum **iz zanke sprostimo v reagent**: zlasti iz 1µL zanke ga je težko sprostiti: včasih je potrebo več kot 30 sekund intenzivnega vrtenja zanke, da se iz zanke prenese v reagent, nato ga je treba homogenizirati, da je površina delovanja karbapenemaz v testu čim večja in s tem povečana učinkovitost in hitrost reakcije, kar pripomore k vidnosti / coni reakcije v indikatorskem sistemu testa.

## 2. Nekaj o posameznih testih (referenca 14 »pokriva« vse tri teste za enterobakterije)

Referenca 14 je nujno branje za vsakega mikrobiologa, zaradi rezultatov in spremnega besedila, je vir za **izvedbo zCIM** (z kot *angl.* »zinc«) testa ter za primerjavo občutljivost in specifičnost **zCIM**, **Beta Carba** in **Carba 5 NG** (zadnja dva testa izvajamo po navodilih proizvajalca) in kombinacij testov pri enterobakterijah. Teste so validirali z mnogimi, večinoma šibkimi karbapenemazami iz mnogih molekularnih skupin.

- Kot edini test je imel zCIM 97,8 % občutljivost, Carba 5 NG 88 % in Beta Carba 74 % občutljivost.
- Kot edini test je imel **zCIM 97,7 % specifičnost**, Carba 5 NG 100 % in Beta Carba 100 % specifičnost.

Najboljša **kombinacija** testov je bila **zCIM + Carba 5 NG**, ki je imela 99,3 % občutljivost.

Avtorji navajajo, da ima Beta Carba variabilno občutljivost; ko so MHA dopolnili s cinkom, je občutljivost Beta Carba narasla iz 74 % na 96 %. Na splošno je v raziskavah test Beta Carba imel od 65 do 97 % občutljivost.

Diski z inhibitorji karbapenemaz po ESDReM 2017 so bili nesprejemljivo slabi: le **85 % občutljivost in le 77 % specifičnost**. Mnogokrat je težava prisotnih večih karbapenemaz hkrati, katerih delovanje je nepredvidljivo. Zato teh testov, ki so bili včasih osnova fenotipske metode, ni več v algoritmih detekcije.

### **mCIM test za *P. aeruginosa* (m kot »modified«, oznaka avtorjev)(ref. 15 – 17).**

V dveh validaciji so za *P. aeruginosa* ugotovili 97 % občutljivost in 100 % specifičnost v eni, v naslednji validaciji pa obratno (15, 16). Izvedba testa **mCIM testa** je drugačna kot za **enterobakterije (zCIM test)**!

*Vse teste smo verificirali tudi v Sloveniji, zanimiva je validacija Carba 5 NG v Ljubljani, IMI (ECCMID poster); tudi proti ciljnim karbapenemazam (ki so tarča testa) so ugotovili le 91 % občutljivost, drugod je ta odstotek okrog 98-100 %. Avtorji so nizko občutljivost komentirali s podatkom, da so testirali veliko število izolatov s šibko izraženimi karbapenemazami.*

*Interno verifikacijo pri 28 neselekcioniranih izolatih s tarčnimi karbapenemazami so opravili tudi v NLZOH, občutljivost je bila 100 %, pri 4 negativnih izolatih pa je bil rezultat pravilno negativen.*

*V NLZOH so 33 izbranih (obogateno s »šibko izraženimi karbapenemazami«) izolatov *P. aeruginosa* testirali z Beta Carba in mCIM: med drugim so ugotovili, da je **TSB s cinkom, ki je nujen za zCIM, uporaben tudi za mCIM**: ni bilo nobene razlike v conah mCIM, če so uporabili za mCIM navadni TSB ali TSB s cinkom (enake cone).*

*Občutljivost vsakega od testov samega je bila 100 %, specifičnost vsakega pa 92 % (en izolat od 33 je bil lažno pozitiven). Oba testa pri istem izolatu sta bila pozitivna pri 31/33 izolatih, specifičnost tega kriterija SKUOPZ (kriterij: morata biti za potrditev tvorbe karbapenemaz potrebna dva ne-imunokromatografska pozitivna testa) je bila torej 100 %. Po en napačni rezultat je bil pri različnih izolatih – vzrok je bil očitno drugačen in ker imata testa drugačen mehanizem delovanja, se lažna pozitivnost ni pokazala hkrati.*

3. **Povzetek:** za enterobakterije in *P. aeruginosa* je priporočljiva uporaba **različnih CIM testov**, ki sam zase dosega skoraj 100 % občutljivost, specifičnost je dobra, a ni zadostna (možna je tudi uporaba originalnega CIM testa).

Beta Carba in Carba 5 NG test se uporabljata na enak način za enterobakterije in *P. aeruginosa*.

**Carba 5 NG je praktično 100 % specifičen**, Beta Carba manj.

Občutljivost obeh testov je odvisna predvsem od tega, kakšno populacijo testiramo (ali gre za tarčne karbapenemaze v zadostni količini). Navedene lastnosti testov so temelj za opisani protokol potrditvenih testov.

## 4. Principi kriterijev za interpretacijo testov – koliko katerih testov uporabimo, kakšni morajo biti rezultati

1. Pri **prvih izolatih** je predtestna verjetnost karbapenemaz v povprečju srednja, zato moramo **za potrditev** uporabiti: en test, ki je sam skoraj 100 % specifičen (Carba 5 NG) **ALI** kombinacijo dveh testov z različnimi mehanizmi delovanja (npr. zCIM in Beta Carba); tudi s to kombinacijo dobimo skoraj 100 % specifičnost, s čimer je verjetnosti lažno pozitivnih rezultatov blizu 0 %.
2. Pri po okoliščinah sodeč enakih **reizolatih** pri istem bolniku je predtestna verjetnost karbapenemaz tako velika, da **za potrditev** prisotnosti karbapenemaz zadošča 1 pozitivni karbapenemazni test, katerikoli.
3. **Za izključitev** prisotnosti karbapenemaz pri prvem sumljivem izolatu sta potrebna **2 negativna testa**, eden od njiju **mora biti CIM test** (zCIM pri enterobakterijah in mCIM pri *P. aeruginosa*), ki je kot samostojen test najbolj občutljiv, detektira **vse tipe karbapenemaz**, če se le dovolj izražajo, a vseeno ni 100 % občutljiv.
4. Pri po okoliščinah sodeč enakih **reizolatih** brez karbapenemaz pri istem bolniku je predtestna verjetnost odsotnosti karbapenemaz tako velika, da **za izključitev** prisotnosti karbapenemaz zadošča negativni CIM test, ali pa 2 druga karbapenemazna testa (Beta Carba in Carba 5 NG).