



**AF BIOANALYTIKER ZAHRA TOMA**  
KLINISK BIOKEMISK AFDELING  
FREDERIKSSUND SYGEHUS

# Cephalosporin-screening og ESBL-detektion

**Professionsbachelorprojekt viser, at screening for nedsat sensitivitet over for Cefpodoxim ikke kan bruges til direkte at konkludere tilstedeværelse af ESBL. Samtidig kan følsomhed over for Cefpodoxim ikke overføres direkte til Cefuroxim, da en del af isolaterne har vist selvstændig resistens over for dette antibiotikum.**

Bakterier modstår antibiotika ved at udvikle resistens over for disse antibiotika. Det er videnskabeligt bevist, at forøget anvendelse af antibiotika til behandling af patienter og dyr fremkalder resistens mod de anvendte antibiotika. Den mest bekymrende resistens set i et klinisk og epidemisk perspektiv er ESBL (Extended Spectrum  $\beta$ -laktamase enzymproducerende bakterier), hvor ESBL-enzymet nedbryder  $\beta$ -laktam antibiotika.

ESBL-enzymet produceres af medlemmer af Enterobacteriaceae f.eks. E. coli og Klebsiella sp., som er almindelige humanpatogener.  $\beta$ -laktam er en gruppe antibiotika, der omfatter penicilliner, Cefalosporiner og andre. Disse antibiotika er de mest anvendte antibiotika i patientbehandling af bl.a. blodforgiftning, bughindebetændelse og urinvejsinfektion.

ESBL-bakterier forårsager en dramatisk stigning af bakteriel resistens over for  $\beta$ -laktam antibiotika i gram-negative bakterier. Denne resistens kan over-

føres via plasmider, og de kan sprede sig fra person til person gennem suboptimal hygiejne. Derfor spredes disse bakterier hurtigt på hospitalsafdelinger mellem patienter og personale. Infektion med ESBL-bakterier er opportunistisk. De er harmløse for raske mennesker, mens de er skadelige for svage patienter. Da disse bakterier er resistente over for en lang række antibiotika, bl.a. 3.-generations cephalosporiner, kan infektioner med ESBL bevirke behandlingskomplikationer og måske dødsfald hos svage patienter og patienter i intensivafsnit. ESBL-bakterier er kun følsomme over for Carbapenemer, som er bredt spektrum  $\beta$ -laktam antibiotika over for såvel gram-positive som gram-negative bakterier. Carbapenemer er højresistente overfor  $\beta$ -laktamase enzymer og omfatter bl.a. imipenem, meropenem.

## Foruroligende stigning i DK

Nosocomielle udbrud af ESBL-producerende bakterier er blevet meget almindelige i hele verden. I Danmark blev ESBL tidligere kun lejlighedsvist fundet importeret med patienter, som havde været indlagt på udenlandske sygehuse, men efter midten af 1990'erne blev de fundet hyppigere (1). Jensen et al. 2003 viste, at ESBL-forekomsten var 1,3 % hos stammer isoleret fra patientprøver (2).

En stigende forekomst af multiresistente isolater blev også opdaget på Rigshospitalet i 2004. Disse isolater stammede fra kroniske patienter, som var hospitalsindlagte og under langvarig antibiotikabehandling (3). I Ugeskrift for Læger rapporterede overlæge Dennis Schrøder Hansen i 2006, at ESBL

ses med stadig større hyppighed i helt almindelige prøver fra både almen praksis og hospitaler (1).

Men den store rystelse kom i 2007, da Ekstra Bladet den 4. juli 2007 rapporterede, at 14 patienter på Hillerød Hospital var diagnosticeret med ESBL Klebsiella pneumoniae, som er den samme bakterie, der kostede to svenske liv på et sygehus i Uppsala (4). Samtidig har Nyhedsbrev for Nordsjællands Hospital, "På tværs" rapporteret den 5. juli 2007, at 22 patienter bærende ESBL- Klebsiella pneumoniae var blevet indlagt på Hillerød Hospital i perioden mellem januar 2006.- 4. juni 2007, og med stigende antal i de sidste to måneder af perioden (5). Senest har Statens Serum Institut besluttet efter sommerferien 2007 at undersøge, hvor stort problemet er i Danmark (se faktabox modsatte side) (6).

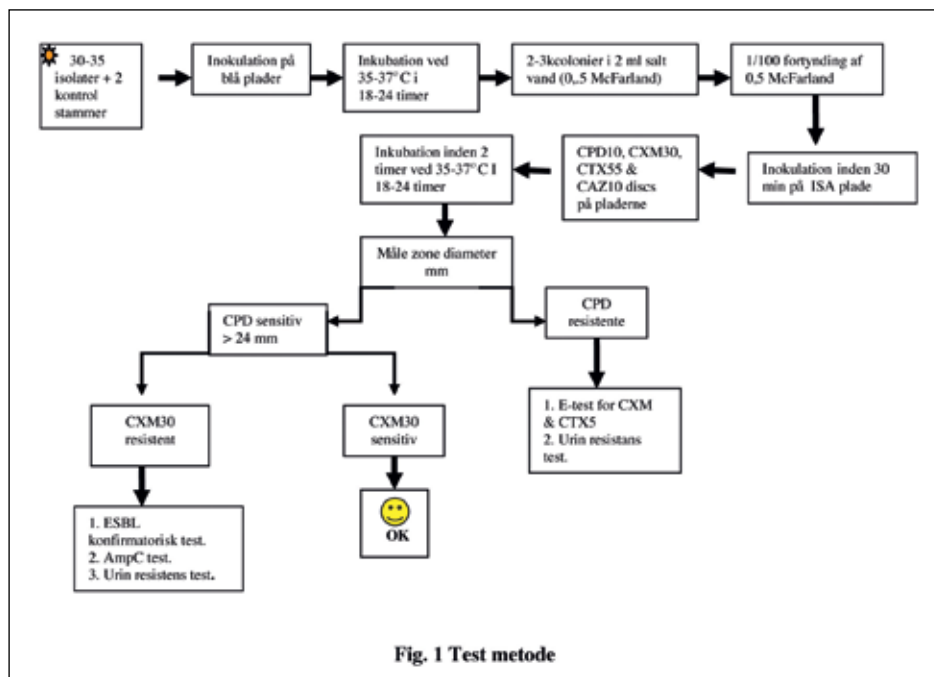
## Detektion foregår i to trin

Der er begrundet frygt for, at udbrud af ESBL-producerende bakterier på danske sygehuse vil blive en realitet, hvis ikke der indføres forsigtighedsregler, der kan detektere disse bakterier i patientprøver. Derfor er detektion af ESBL blevet en nødvendig procedure på alle klinisk mikrobiologiske laboratorier over hele landet.

Detektion af ESBL-producerende bakterier udføres med en to-trins metode fra RAF (den svenske referencegruppe for antibiotika):

- Første trin er screening for nedsat følsomhed over for en markør.
- Andet trin er konfirmatorisk ESBL-test af de resistente isolater.

Proceduren tager sammenlagt mindst to dage. Det er lang tid at vente for en



svag patient, hvis behandling bliver forsinket i mindst 24 timer. Derfor er det overordentlig vigtigt at bruge en vel-fungerende screenings-agent, som kan detektere ESBL med høj akkuratessse, så vi nedsætter patientens ventetid.

### Vil undersøge pålidelighed af resistensmarkør

Klinisk Mikrobiologisk Afdeling på Hillerød Hospital har besluttet at screene alle patientprøver for ESBL ved rutine-resistensbestemmelse fra den 1. september 2007. Den anvendte screeningsmetode er at bruge Cefpodoxim som screeningsmarkør for andre cephalosporiner: Cefuroxim, Cafotaxim og Ceftaxidim.

Udgangspunktet for mit projekt var at undersøge pålideligheden af Cefpodoxim-resistens som markør for de andre Cephalosporin-resistenser. Med andre ord at teste for Cefpodoxim-resistens og undersøge, om resultaterne kan overføres direkte til de andre cephalosporiner.

De bakteriearter, som blev testet, er fire medlemmer af Enterobacteriaceae, E. coli, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca og Proteus mirabilis. Disse er de mest hyppige humane patogener, der er ESBL-producerende.

### Metode

255 isolater (et isolat pr. patient) blev opsamlet fra patientprøver i Klinisk Mikrobiologisk Afdeling på Hillerød Hospital. Prøverne kom fra forskellige kategorier dvs. podning, urin, blod, ekspektorat og fæces. Undersøgelsesmetoden forklares i diagrammet fig. 1

ESBL-detektion blev udført efter RAF-metoden i to trin:

- Resistens-bestemmelse for de fire cephalosporiner: Cefpodoxim, Cefuroxim, Cefotaxim og Ceftazidim.
- ESBL-konfirmatorisk test for de isolater, som var resistente over for Cefpodoxim i trin 1.

Konfirmatorisk test udføres med antibiotika-discs til resistensbestemmelse af bakterier over for: Ceftazidim± clavulansyre og Cefotaxim ±clavulansyre. En hæmningszone difference på  $\geq 5$  mm ved tilstedeværelse af clavulansyre er indikation for ESBL-produktion.

### Resultater

Undersøgelsen viste variation mellem Cefpodoxim-resistens og de andre cephalosporiner testet (tabel 1).

Af de fire bakteriearter viste Klebsiella pneumoniae den højeste procent resistens over for Cefpodoxim (7,50 %), ESBL-produktion (6,25 %) og der blev påvist en afvigelse mellem Cefpodoxim-resistens og de andre cephalosporiner testet. Disse har den højeste procent af resistens (7,50 %) over for Cefuroxim, mens de var følsomme over for Cefpodoxim.

Klebsiella oxytoca er den bakterieart med næststørst resistens over for Cefpodoxim (5,56 %) og ESBL-produktion (2,78 %) dog blev der ikke påvist Cefuroxim-resistens alene.

På tredjepladsen kom E. coli-resistens over for Cefpodoxim (3,93 %), ESBL (1,96 %).

Proteus mirabilis var følsomme over for alle 4 cephalosporiner testet.

Resultaterne i tabel 1 viser også, at ikke alle Cefpodoxim-resistente isolater var positive ved ESBL-konfirmatorisk

### NY UNDERSØGELSE: ESBL I 3-6 % AF ALLE KLINISK PÅVISTE COLI-BAKTERIER

De klinisk mikrobiologiske afdelinger og Statens Serum Institut har undersøgt prævalensen af ESBL. Over en periode på 2 måneder i 2007 har 13 ud af landets 15 mikrobiologiske afdelinger indsendt alle kliniske fund af ESBL-producerende bakterier til Statens Serum Institut.

Hovedparten af de fundne ESBL-producerende bakterier var E. coli og Klebsiella pneumoniae. Begge er tarmbakterier, der kan give alvorlige infektioner. Klebsiella pneumoniae endda af en alvorligere karakter end E. coli, ligesom bakterien ofte er mere resistent end E. coli. Samtlige indsendte prøver med E. coli og Klebsiella pneumoniae blev screenet for forekomst af ESBL, og resultatet er, at 3-6 % af samtlige prøver indeholdt ESBL. Seruminstitutet har ud af den samlede mængde prøver gemt 300 isolater, som de er i gang med at ESBL-typebestemme, ligesom der udføres en udvidet resistensbestemmelse på isolaterne. Statens Serum Institut har endnu ikke opgjort undersøgelsen endeligt, men professor og leder af antibiotikaforskningen ved Statens Serum Institut, Niels Frimodt-Møller oplyser, at det ser ud til, at der i fundene af ESBL er en ophobning af CTX-M-gruppe 1. Således tilhører 70 % af fundene gruppen CTX-M gruppe 1, der er kendt som den type ESBL, der florerer mest i Nordeuropa.

"Vi ved ikke, hvorfor det netop er CTX-M gruppe 1, der er så succesrig og spreder sig. Vi kan se, at stigningen er kommet samtidig med en øget brug af bredspektret antibiotika på sygehuse, og det tyder på en sammenhæng, men der er også andre faktorer i spil," siger Niels Frimodt-Møller. -jk

Stamme	Prøve fra	P/S/PH	Resistent overfor CPD og			Andre resistenser					
Ec.	Urin	S	CXM	CTX		AMP	S	W			
	Urin	P	CXM	CTX		AMP	S	W		NA	
Kpn.	Urin	S	CXM	CTX	CAZ	AMP	S	W	CN	NA	
	Urin	P	CXM	CTX		AMP	S	W	CN		
	Urin	P	CXM	CTX	CAZ	AMP	S	W	CN	NA	MEL
	Urin	S		CTX		AMP			CN		
	Urin	S	CXM	CTX	CAZ	AMP	S	W	CN	NA	
Kox.	Urin	S	CXM	CTX	CAZ	AMP					MEL

Tabel 2. Cefpodoxim resistente ESBL positive isolater og andre resistens  
 Ec: *E.coli*; Kpn: *Klebsiella pneumoniae*; Kox: *Klebsiella oxytoca*; CXM: Cefuroxim; CTX: Cefotaxim; CAZ: Ceftazidim; AMP: ampicillin; S: sulfonamid; W: trimethoprim; CN: gentamycin; NA: nalidixic acid og MEL: mecillinam.

test. Med denne test viste *Klebsiella pneumoniae* de højste procent ESBL-positive isolater (83,33 %), hvor *E. coli* og *Klebsiella oxytoca* kun viste 50 %.

## Konklusion

Udgangspunktet for mit projekt var at undersøge pålideligheden af Cefpodoxim som resistens-markør for de andre Cephalosporiner.

Mine undersøgelser viser, at screening for nedsat sensitivitet over for Cefpodoxim ikke kan bruges til direkte at konkludere tilstedeværelse af ESBL. Samtidig kan følsomhed over for Cefpodoxim ikke overføres direkte til Cefuroxim, da en del af isolaterne har vist selvstændig resistens over for dette antibiotikum.

Det betyder, at den anvendte metode er lidt for grov til at påvise den nøjagtige forekomst af ESBL, og man skal derfor være varsom med at konkludere på baggrund af resultaterne.

## Diskussion

Hvis et patientisolat er følsomt over for screeningsagenten (Cefpodoxim), kan man konkludere, at isolatet er følsomt over for de andre cephalosporiner. Resultaterne kan direkte sendes til hospitalet, hvor patienten bliver behandlet. Dette kan være nyttigt, hvis alle isolaterne følger de typiske resistensmønstre, dvs. at isolaterne ikke udvikler selvstændigt resistens over for andre cephalosporiner. Et problem kan opstå, hvis et isolat har udviklet resistens over for et andet Cephalosporin, og patienten er behandlet med dette.

Projektets primære mål er at afdække deviationen mellem resistens over for Cefpodoxim og de andre cephalosporiner. Cefpodoxim er et 3.-generations cephalosporin, som anvendes til at screene et 2.-generations cephalosporin (Cefuroxim), som måske ikke følger 3.-generations resistensmønstre. RAF anbefaler, at hvis 3. generation er resistent, så kan 2.

generations cephalosporiner ligeledes rapporteres resistente. (7).

RAF anbefaler Cefpodoxim som screeningsagent. Men Cefpodoxim følsomhed betyder ikke, at alle andre cephalosporiner opfører sig på samme måde. Det har dette projekt tydeligt vist.

Afvigelsen kan forklares, når man afbilder hæmningszonens diameter for hvert cephalosporin i forhold til screeningsagenten, her Cefpodoxim (fig. 2). Hvis resistensmønstre over for de to cephalosporiner ligner hinanden, falder alle punkterne i den nederste venstre eller den øverste højre firkant. Falder punkterne i den venstre side (nederste og øverste), betyder det, at isolaterne er Cefpodoxim-resistente. Samtidig kan disse isolater være resistente over for det andet cephalosporin (falder i den venstre nederste firkant) eller følsomme over for det andet cephalosporin (falder i den venstre øverste firkant). Alle isolaterne, der falder i den venstre side, kan være ESBL-kandidater. Disse isolater er omringet med rød cirkel, og de undergik ESBL-konfirmatorisk test. Hvis isolaterne er følsomme over for screeningsagenten og er resistente over for det andet cephalosporin, falder punkterne i den nederste højre firkant, og disse isolater vises i figuren i den blå firkant.

## To slags afvigelser i resistens

Projektet har vist to slags afvigelser i resistensmønstre:

I den første er isolaterne følsomme over for Cefpodoxim og resistente over for Cefuroxim (isolaterne i den blå firkant). Dette resistensmønster sås i 9 ud af 255 isolater (3,53 %), i *Klebsiella pneumoniae*-isolater (6 ud af 80 isolater, 7,50 %) og i *E. coli* (3 ud af 102 isolater, 2,94 %).

Hvis resultatet sendes til afdelingen som følsomme over for cephalospori-

ner, og patienten bliver behandlet med cefuroxim, kan der opstå et problem. I det beskrevne tilfælde ville afdelingen i givet fald rapportere 9 falske ud af 255 isolater eller 7,50 % af *Klebsiella pneumoniae*-isolater og 2,94 % *E.coli*-isolater.

Sagt på en anden måde kan 75 patienter ud af 1000, som er inficeret med *Klebsiella pneumoniae*, og 294 ud af 10 000 patienter, som er inficeret med *E. coli*, blive udsat for forkert behandling. Dette tal er meget alarmerende, når man overvejer den mulige indvirkning på patientbehandlingen og de konsekvenser, som det kan få.

Den anden form for afvigelse i resistensmønster er isolater, der er resistente over for screeningsagenten (Cefpodoxim), mens de er følsomme over for andre cephalosporiner (isolaterne falder i den øverste venstre firkant, og punkterne er omringet af rød cirkel).

Den slags resistens blev påvist for alle tre cephalosporiner testet, og isolaterne er mulige ESBL-kandidater. Med ESBL-konfirmatorisk test viste det sig, at ikke alle er ESBL-producerende, derfor skal ESBL-konfirmatorisk test udføres på alle isolater, som er resistente over for Cefpodoxim. Ellers risikerer man at rapportere isolaterne som værende resistente over for alle cephalosporiner, mens de i virkeligheden kun er cefpodoxim-resistente. For at begrænse brugen af disse antibiotika vil man i stedet anvende Carbapenem og på den måde imidlertid være medvirkende til at forøge resistensen herfor, som det allerede er påvist for især *Klebsiella* spp. og *Enterobacter* spp.(8).

Udbredelse af ESBL er tydeligt påvist i denne undersøgelse både som nosocomiel infektion og i samfundet. ESBL producerende isolater fra samfundet udgjorde 1/3 af ESBL-isolaterne i denne undersøgelse. Disse fund er i over-

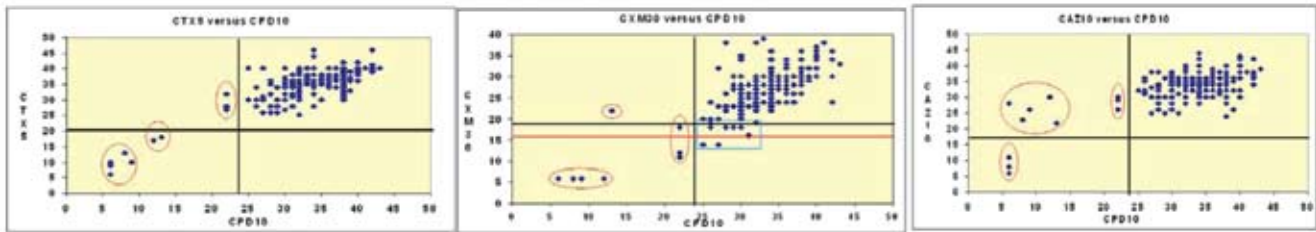


Fig.2. Hæmningszonediameter overfor screeningsagent og hver af de andre cephalosporiner for t *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* og *Proteus mirabilis*  
Hvor CPD: Cefpodoxim; CTX: Cefotaxim CAZ: Ceftazidim og CXM: Cefuroxim

ensstemmelse med ESBL-udbredelsen i Europa (9 og 10) og Danmark (1, 2, 11 og 12).

En mulig forklaring kan være indtagelsen af svinekød. I Danmark er forbruget af Cephalosporiner til svin steget med 300 % fra 24 kg i 2001 til 98 kg i 2006. Dette har bevirket et selektivt tryk, der fremmer udbredelsen af ESBL-produktion. Dette kunne være årsagen til den hyppige forekomst af ESBL-producerende *E. coli*-producerende ESBL fra syge svin (11).

Et andet problem forbundet med ESBL er forøget multiresistens over for andre antibiotika. Resistens over for trimethoprim, sulfamethoxazole og aminoglycoside overføres hyppigt på samme plasmid. Yderligere kan Quinolon-resistens overføres på samme plasmid (11). Undersøgelsen har vist et lignende resistensmønster blandt de mest resistente *Klebsiella pneumoniae*-isolater (Tabel 2).

Disse observationer viser, at vi måske har vendt det blinde øje til en multiresistent bakterie, som er resistent over for mindst 3 grupper antibiotika ud over cephalosporiner.

## Perspektivering

Vi er i Danmark er ikke tilstrækkeligt beskyttet mod ESBL, og derfor skal en passende rutine etableres for ESBL. Omfanget af problemet bør undersøges nærmere på en regional skala, så forekomsten af disse bakterier er grundigt undersøgt fra prøver i hele landet. Dette kan hjælpe til at grundlægge en strategi for de generelle procedurer, som bør følges i alle landets kliniske mikrobiologiske afdelinger. ♦

TAK TIL SIGRID ANDERSEN FOR SPROGLIG ASSISTANCE TIL ARTIKLEN.

## VEJLEDERE PÅ BACHELORPROJEKTET

JESPER BAHRENSCHEER, ADJUNKT, BIOANALYTIKERUDDANNELSEN KØBENHAVN  
HANNE KOFOD OG LENE LEERBECK, BIOANALYTIKERUNDERVISERE, HILLERØD SYGEGEHUS

	Total antal	CPD/R	ESBLs	CPD /S og CXM /R	CPD/R plus		
					CTX/R og CAZ /S	CTX/S og CAZ/S	CXM/S
<i>E. coli</i>	102	4	2	3	1	2	0
%		3,92%	1,96%	2,94 %	0,98%	1,96%	0,00%
<i>K. pneumoniae</i>	80	6	5	6	1	1	1
%		7,50%	6,25%	7,50 %	1,25%	1,25%	1,25%
<i>K. oxytoca</i>	36	2	1	0	1	0	0
%		5,56%	2,78%	0,00%	2,78%	0,00%	0,00%
total antal stammer	255	12	8	9	3	3	1
% af total		4,70%	3,13%	3,53%	1,18%	1,18%	0,39%

Tabel 1. Resistente isolater overfor CPD10, CXM30 og ESBL angivet i antal og procent

Hvor CPD: Cefpodoxime, CXM: Cefuroxime; CTX: cefutaxim; CAZ: Ceftazidim; R: resistent og S: følsom.



## REFERENCER

- Hansen, D. S.; "Nye  $\beta$ -lactamase hos enterobakterierne" UGESKR LÆGER, 168/12; 2006.
- Jensen, H.N., Hansen, D.S. and Friis-Møller, A.; "Screening for extended Spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) in *E. coli* and *Klebsiella* strains- a method study with clinical implication", 2003.
- Årsberetning, Infektionshygiejnisk Enhed, Diagnostisk Center, Rigshospitalet, 2004.
- Jakob Rohde-Brøndum, "Dræber-bakterie på dansk sygehus" 4. jul. 2007, Ekstra Bladet
- På Tværs, Nyhedsbrevet for Nordsjællands Hospital, Nr. 33, 5. juli 2007.
- www.ssi.dk.
- www.srag.org
- ([http://www.hpa.org.uk/infections/topics\\_az/antimicrobial\\_resistance/alert.html](http://www.hpa.org.uk/infections/topics_az/antimicrobial_resistance/alert.html))
- Mirelis, B.; Navarro, F.; Miro, E. ; Mesa, R.J. ; Coll, P. ; and Prats G.; "Community Transmission of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase"; Emerging Infectious Diseases; vol. 9; No. 8; 2003
- Pitout, E. D. D.; Nordmann, P.; Laupland, K.B. and Poirel, L.; "Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBLs) in the community" Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 56;52-59; 2005.
- DANMAP, "Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark": The Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme, 2006.
- Jensen, L. B.; Hasman, H.; Agersø, Y.; Emborg, H.D. and Aarestrup, F.M. "First description of an oxyimino-Cephalosporin-resistant, ESBL-carrying *Escherichia coli* isolated from meat sold in Denmark" Journal of Antimicrobial Chemotherapy; doi:10.1093/jac/dk1048, 2006.