

Technická příručka EUCAST pro potvrzení produkce ESBL u *Enterobacterales* pomocí kombinovaných disků (CDT).

Nový obsah disků s kombinací cefotaximu nebo ceftazidimu s klavulanovou kyselinou a bez kyseliny klavulanové.

Výskyt *Enterobacterales* produkujících beta-laktamázu s rozšířeným spektrem (ESBL) se celosvětově zvyšuje. K fenotypovému potvrzení produkce ESBL u *Enterobacterales* se používá disková difuze s cefalosporinovými disky bez kyseliny klavulanové a s kyselinou klavulanovou.

Pro standardní vyšetření antibiotické citlivosti diskovou difuzí EUCAST k cefotaximu a ceftazidimu se používají disky s obsahem 5 µg, resp. 10 µg. EUCAST pro potvrzení produkce ESBL doposud (stejně jako CLSI) doporučoval použití disků cefotaximu 30 µg a ceftazidimu 30 µg bez a s 10 µg klavulanové kyseliny (CLAV). Nyní EUCAST doporučuje používat pro standardní diskovou difuzi i pro potvrzení ESBL kombinované disky se stejným obsahem (cefotaxim 5 µg a ceftazidim 10 µg).

EUCAST v multicentrické studii (**Příloha 1**) porovnává výsledky dříve doporučených disků a navrhovaných nových disků. Kombinované disky obsahující cefotaxim 5 µg ± CLAV 10 µg a ceftazidim 10 µg ± CLAV 10 µg vykazují stejnou senzitivitu a specifitu jako disky s obsahem 30 µg cefotaximu a 30 µg ceftazidimu.

Interpretační kritéria

O pozitivní produkci ESBL svědčí zvětšení průměru zóny cefotaximu nebo ceftazidimu v přítomnosti kyseliny klavulanové o ≥ 5 mm ve srovnání se samotným cefalosporinem.

Kontrola kvality disků pro confirmaci ESBL

EUCAST doporučuje kontrolovat kvalitu confirmačních disků pro produkci ESBL pomocí *Escherichia coli* ATCC 25922 a *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. Tabulky pro kontrolu kvality EUCAST uvádějí cílové hodnoty a rozmezí pro disky s 5 µg cefotaximu a 10 µg ceftazidimu. Kmen *E. coli* ATCC 25922 by s kombinovanými disky by měl vytvářet zóny v rozmezí ± 1 mm ve srovnání se samotným cefalosporinem. Při testování kombinovaných disků s *K. pneumoniae* ATCC 700603 by měla být splněna tato kritéria:

K. pneumoniae ATCC 700603

Disk	Kritéria*
cefotaxim 5 µg + klavulanová kyselina 10 µg	zvětšení průměru zóny kolem disku obsahujícího kombinaci cefotaxim + klavulanová kyselina o ≥ 3 mm ve srovnání se samotným cefotaximem
ceftazidim 10 µg + klavulanová kyselina 10 µg	zvětšení průměru zóny kolem disku obsahujícího kombinaci ceftazidim + klavulanová kyselina o ≥ 5 mm ve srovnání se samotným ceftazidimem.

*Kritéria jsou identická s kritérii pro kombinované disky s obsahem 30 µg cefotaximu \pm 10 µg CLAV a 30 µg ceftazidimu \pm 10 µg CLAV.

Doporučení

EUCAST doporučuje laboratořím, aby pro rutinní fenotypové potvrzení produkce ESBL u *Enterobacterales* zavedly kombinované disky obsahující 5 µg cefotaximu a 10 µg ceftazidimu bez a s 10 µg kyseliny klavulanové. EUCAST ukládá výrobcům diagnostických disků zpřístupnit disky s 5 µg cefotaximu \pm 10 µg CLAV a 10 µg ceftazidimu \pm 10 µg CLAV k potvrzení identické biologické aktivity disků cefotaximu a ceftazidimu bez a s klavulanovou kyselinou. Za tímto účelem musí být disky bez a s klavulanovou kyselinou vyráběny paralelně a prodávány jako diagnostická souprava.

Příloha 1

Multicentrická studie s kombinovanými disky pro potvrzení ESBL u *Enterobacterales*

Cíl

Cílem této studie bylo zjistit, zda pro potvrzení ESBL u *Enterobacterales* poskytují kombinované disky s 5 µg cefotaximu (CTX) a 10 µg ceftazidimu (CAZ) bez a s klavulanovou kyselinou (CLAV) 10 µg stejné výsledky jako disky obsahující 30 µg CTX a 30 µg CAZ.

Metoda

Celkem 45 kmenů *Escherichia coli* a 5 kmenů *Klebsiella pneumoniae* bylo třemi laboratořemi testováno diskovou difúzní metodou EUCAST na agaru Mueller-Hinton Oxoid (Thermo Fisher Scientific). Byly vyhodnoceny tři sady kombinovaných disků; 5 µg CTX ± 10 µg CLAV a 10 µg CAZ ± 10 µg CLAV výrobců MAST a Liofilchem, které byly porovnávány s 30 µg CTX ± 10 µg CLAV a 30 µg CAZ ± 10 µg CLAV výrobce MAST. Izoláty byly považovány za ESBL pozitivní, jestliže u jednoho nebo obou cefalosporinů došlo v přítomnosti kyseliny klavulanové k zvětšení průměru zóny o ≥ 5 mm ve srovnání se samotným cefalosporinem. Přítomnost nebo nepřítomnost genů rezistence k beta-laktamům byla identifikována pomocí amplikonového sekvenování nové generace (amplicon-based next generation-sequencing) (Ion Torrent), viz **tabulka 1**.

Tabulka 1. Vlastnosti studovaných izolátů (50 *Enterobacterales*), detekované sekvenováním nové generace.

Mechanismus rezistence	Žádný	ESBL			AmpC		ESBL + AmpC
		CTX-M skupina 1	CTX-M skupina 9	CTX-M skupiny 1+9	CIT	DHA	CTX-M skupina 1+ CIT
Geny rezistence	-						
<i>E. coli</i>	6	10	23	1	2	1	2
<i>K. pneumoniae</i>	0	5	0	0	0	0	0

Výsledky

Senzitivita a specifita u všech kombinací disků ve všech třech laboratořích byla 100 %. Produkce ESBL byla pozitivně potvrzena u všech producentů samotné ESBL (39/50) a producenti obou enzymů ESBL a AmpC (2/50) podle očekávání nebyli detekováni žádným z kombinovaných disků. Zvětšení průměru zóny přítomností kyseliny klavulanové u disků obsahujících 30 µg CTX a 30 µg CAZ bylo podobné jako u disků s obsahem 5 µg CTX a 10 µg CAZ (**Tabulka 2**).

Tabulka 2. Zvětšení průměru zóny způsobené přidáním kyseliny klavulanové (mm)

Disk	Výrobce disků	Negativní výsledky	Pozitivní výsledky
Cefotaxim 30 µg ± kyselina klavulanová 10 µg	Mast	0 - 2	14 - 28
Ceftazidim 30 µg ± kyselina klavulanová 10 µg	Mast	0 - 4	4 - 22
Cefotaxim 5 µg ± kyselina klavulanová 10 µg	Mast	0 - 2	16 - 26
Ceftazidim 10 µg ± kyselina klavulanová 10 µg	Mast	0 - 4	4 - 23
Cefotaxim 5 µg ± kyselina klavulanová 10 µg	Liofilchem	0 - 2	14 - 25
Ceftazidim 10 µg ± kyselina klavulanová 10 µg	Liofilchem	0 - 2	3 - 21

Závěr

Studie ukázala, že kombinované disky obsahující cefotaxim 5 µg ± CLAV 10 µg a ceftazidim 10 µg ± CLAV 10 µg vykazují stejnou senzitivitu a specifitu jako kombinované disky s obsahem 30 µg cefotaximu a 30 µg ceftazidimu. V laboratoři je výhodné používat pro konfirmaci ESBL disky o stejném obsahu jako pro standardní metodu vyšetření citlivosti.