



FAKULTET FOR NATURVITENSKAP

Institutt for bioingeniørfag

Norges teknisk- naturvitenskapelige universitet  
Norwegian University of Science and Technology (NTNU)

Evaluering av MBT STAR-Carba for deteksjon av  
karbapenemaseproduserende bakterier ved hjelp av  
MALDI-TOF MS

Evaluation of MBT STAR-Carba for the detection of  
carbapenemase producing bacteria using MALDI-  
TOF MS

*Av / by*

Kristine Wiik og Tonje Herstad Sørensen

Trondheim, 2022

## Forord

Bacheloroppgaven er det avsluttende arbeidet ved Bachelor i bioingeniørfag ved Fakultet for naturvitenskap, Institutt for bioingeniørfag ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU) i Trondheim. Bachelorprosjektbeskrivelsen og målsetningen for oppgaven ble utarbeidet ved avdeling for medisinsk mikrobiologi (AMM) ved St. Olavs hospital i Trondheim. Oppgaven ble i sin helhet utført ved laboratoriet ved AMM i perioden mars-mai 2022. AMM sto for tildeling av laboratorie plass, nødvendig utstyr, instrumenter og prøvemateriale til utførelsen av bachelorprosjektet.

Vi vil gjerne takke alle som har bidratt med sin tid, kompetanse og veiledning i bachelorprosjektet. Først vil vi takke vår prosessveileder ved utdanningen, universitetslektor Marthe Lind Kroknes, som har vært en strukturert veileder med positiv innstilling. Hun har bidratt med sin faglige kompetanse og kommet med gode innspill ved flere gjennomlesninger av oppgaven.

Vi vil takke vår hovedveileder på lab, fagansvarlig bioingeniør Siri Beate Nergård Valle for god veiledning og oppfølging gjennom bachelorprosjektet. Vi vil også takke alle våre faglige veiledere; spesialbioingeniør Kjersti Haugum, fagansvarlig bioingeniør Alexander Husby og overlege Jan Egil Afset, for faglig innføring i relevante temaer for prosjektet, og for å ha vært tilgjengelig for faglige spørsmål. En spesiell takk rettes til Kjersti Haugum som også bidro med gjennomlesning og tilbakemeldinger i skriveprosessen. Vi ønsker også å takke fagansvarlig bioingeniør An-Magritt Stjern Flakne som utførte og ga innføring i PCR-analysene for oss. Til slutt vil vi også takke øvrige ansatte ved AMM, som har vært hjelpelige og imøtekommende på laboratoriet.

Sted og dato: Trondheim, 19/05-2022



Kristine Wiik



Tonje Herstad Sørensen

## Sammendrag

Antibiotikaresistens i form av karbapenemaseproduksjon i Gram-negative bakterier er en økende helseutfordring på verdensbasis. Plasmidmedierte karbapenemasegener gir økt spredningspotensiale, og spres raskt til og mellom klinisk viktige Gram-negative bakterier.

Bachelorprosjektet ble utført i regi av avdeling for medisinsk mikrobiologi ved St. Olavs hospital, og hadde som hensikt å undersøke og evaluere MBT STAR-Carba kittets evne til å detektere karbapenemaseproduksjon i Gram-negative bakterier. Metoden vil, dersom denne tas i bruk, kunne bidra i avdelingens arbeid med å raskt bekrefte/avkrefte eventuell karbapenemaseproduksjon i klinisk viktige Gram-negative bakterier.

Resultater for eventuell karbapenemaseproduksjon/karbapenemasegener i 35 utdelte bakterieisolater ble opparbeidet ved bruk av metodene fenotypisk lappediffusjon, PCR og O.K.N.V.I. Resist-5 og sammenlignet med resultater oppnådd av de samme bakterieisolatene ved bruk av MBT STAR-Carba.

MBT STAR-Carba detekterte karbapenemaseproduksjon i alle de 23 bakterieisolatene med kjent karbapenemaseproduksjon. Det ble også detektert hydrolyse av imipenem i fire av bakterieisolatene ved analysering med MBT STAR-Carba, selv om disse ikke hadde tidligere påvist karbapenemaseproduksjon. I tillegg forekom uoverensstemmelse mellom resultatene for fire andre prøver som kan skyldes svakheter ved de ulike anvendte metodene.

Det ble konkludert med at videre tiltak er nødvendig for å kunne vurdere om MBT STAR-Carba kan tas i bruk ved avdeling for medisinsk mikrobiologi ved St. Olavs hospital. Videre tiltak bør inkludere helgenomsekvensering av bakterieisolatene hvor dette ikke var utført i forkant av bachelorprosjektet. Dette kan bidra i arbeidet med å undersøke om MBT STAR-Carba gjør feil i sin deteksjon av karbapenemaseproduksjon i Gram-negative bakterier.

## Abstract

Carbapenemase production in Gram negative bacteria makes antibiotic resistance an increasing global health challenge. Plasmid mediated carbapenemase genes facilitate the spread of carbapenem resistance in and between Gram negative bacteria of clinical importance.

This bachelor's project was assigned by the Department of Medical Microbiology at St. Olavs hospital in Trondheim, Norway. The project's aim was to research and evaluate the MBT STAR-Carba kit's ability to detect carbapenemase production in Gram negative bacteria. If evidence suggests that MBT STAR-Carba could be implemented in the laboratory, the method could help with quick confirmation or debunking of carbapenemase production in Gram negative bacteria of clinical importance.

The applied methods to achieve results about the assigned bacterial isolates were agar tablet/disc diffusion method, PCR and O.K.N.V.I. Resist-5. Comparison of the results on the bacterial isolates' status on presence or absence of carbapenemase production and carbapenemase genes were done between the previously mentioned methods and MBT STAR-Carba.

MBT STAR-Carba detected carbapenemase production in all 23 bacteria isolates with known carbapenemase production. In addition, hydrolyzation of imipenem in four bacterial isolates were detected by MBT STAR-Carba, although these isolates had no previously detected carbapenemase production. Discrepancies also occurred between the achieved results for four other isolates. These discrepancies may be due to weaknesses in the other applied methods.

It was concluded that further efforts are necessary to properly evaluate whether MBT STAR-Carba can be implemented at the Department of Medical Microbiology at St. Olavs Hospital. Further efforts should include whole genome sequencing of the bacteria isolates where this had not been done previously to the bachelor's project. This can contribute to the work of researching whether MBT STAR-Carba makes errors in the detection of carbapenemase production in Gram negative bacteria.

## Innholdsfortegnelse

Forord.....	i
Sammendrag.....	ii
Abstract .....	iii
1 Innledning.....	1
1.1 Viktigheten av antibiotika .....	1
1.2 Betalaktamantibiotika.....	2
1.3 Resistensmekanismer hos betalaktamantibiotika .....	3
1.4 Antibiotikaresistens .....	5
1.4.1 Spredning av resistensmekanismer.....	5
1.4.2 Utvikling av nye grupper betalaktamantibiotika .....	6
1.5 Klassifisering av betalaktamaser .....	8
1.6 Karbapenemresistens i Gram-negative bakterier.....	11
1.7 Antibiotikaresistens i verden .....	11
1.8 Antibiotikaresistens i Norge .....	14
1.9 Resistensutvikling og spredning på sykehus .....	17
1.10 Tiltak mot antibiotikaresistens og spredning av antibiotikaresistens .....	18
1.11 Påvisning av betalaktamresistens i laboratoriet.....	20
1.11.1 Fenotypisk påvisning med lappediffusjon.....	20
1.11.2 O.K.N.V.I. Resist-5 .....	21
1.12 Deteksjon av karbapenemaseproduksjon hos Gram-negative bakterier ved hjelp av MBT STAR-Carba og MALDI-TOF MS .....	22
1.12.1 MALDI-TOF MS .....	22
1.13 Problemstilling .....	24
2 Materiale og Metode .....	25
2.1 Prøvemateriale og kontroller .....	25
2.2 Deteksjon av karbapenemaseproduksjon i Gram-negative bakterier ved bruk av MBT STAR-Carba og analysemetoden MALDI-TOF MS.....	28

2.2.1	Utførelse av MBT STAR-Carba ved hjelp av analysemetoden MALDI-TOF MS .....	30
2.3	Deteksjon av karbapenemaseproduksjon i Gram-negative bakterier ved bruk av andre anvendte analysemetoder .....	30
2.3.1	Fenotypisk påvisning av karbapenemaser med lappediffusjon .....	30
2.3.2	PCR .....	33
2.3.3	O.K.N.V.I. Resist-5 .....	33
3	Resultater .....	35
3.1	Resultater oppnådd fra MBT STAR-Carba ved hjelp av MALDI-TOF MS .....	35
3.2	Resultater fra anvendte metoder ved AMM .....	37
3.2.1	Fenotypisk påvisning av karbapenemaser med lappediffusjon .....	37
3.2.2	PCR .....	37
3.2.3	O.K.N.V.I. Resist-5 .....	38
3.3	Samlet fremstilling av resultater .....	38
4	Diskusjon .....	41
4.1	Resultatsammenligning, styrker og svakheter ved metodene .....	41
4.2	Videre tiltak for vurdering om MBT STAR-Carba kittet skal tas i bruk ved AMM .....	43
5	Konklusjon .....	44
6	Referanser .....	45
7	Vedlegg .....	50
	Vedlegg 1 .....	50
	Vedlegg 2 .....	51
	Vedlegg 3 .....	53
	Vedlegg 4 .....	55
	Vedlegg 5 .....	59
	Vedlegg 6 .....	63

# 1 Innledning

## 1.1 Viktigheten av antibiotika

Vanlige bakterieinfeksjoner kunne i preantibiotisk tid få store, negative konsekvenser (1), utbrudd av sykdommer som i dag enkelt kan behandles med antibiotika, medførte ofte høy dødelighet. Et eksempel på dette er barn som ble smittet av gruppe-A-streptokokker. Slik smitte medførte en 10 % dødelighet før antibiotika ble oppdaget. I dag er det til sammenligning minimalt med alvorlige følger av denne sykdommen (2).

Det var også slik at bakterieinfeksjoner sterkt økte risikoen for f.eks. postoperative infeksjoner, og gjorde operasjoner og kirurgiske inngrep svært risikofylte. Oppdagelsen av penicillin i 1929 er derfor en stor milepæl i medisinsk historie (1). Introduksjonen av antibiotika til klinikken i 1940-årene revolusjonerte evnen vår til å behandle bakterieinfeksjoner (3). Antibiotika er helt avgjørende for inngrep som utføres i moderne medisin fordi det benyttes i både behandling av bakterieinfeksjoner og til forebygging av postoperative infeksjoner (1). Pasienter kan takket være antibiotika unngå dødelige infeksjoner etter å ha fått operert inn fremmedlegemer, og pasienter med nedsatt immunforsvar, som bl.a. kreftpasienter, overlever tilfeller med sepsis grunnet adekvat antibiotikabehandling (1).

En studie utført ved Boston City Hospital i 1929-1935 av inneliggende pasienter (n = 1586) gir et bilde av virkeligheten i preantibiotisk tid. I denne studien ble dødeligheten av pneumokokkpneumoni hvor bakteriemi også inntraff undersøkt. Dødeligheten blant disse pasientene ble funnet å være 28 - 100 %, avhengig av pasientenes alder (4).

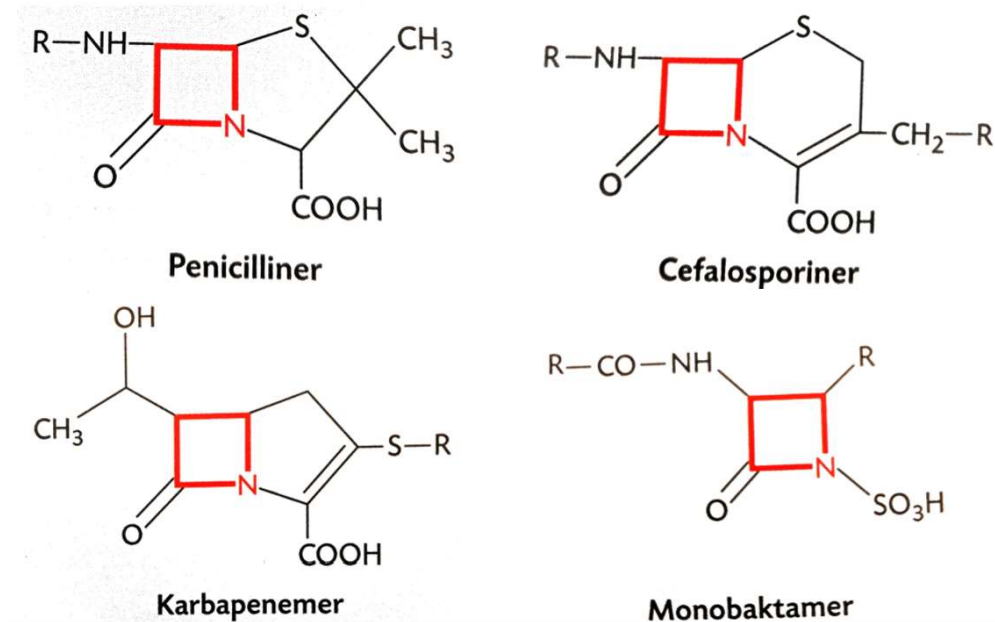
I en annen, mindre observasjonsstudie fra 1944 utført ved samme sykehus fikk pasienter (n = 37) syke med pneumokokkpneumoni penicillinbehandling. I 90 % av tilfellene opphørte akutte symptomer hos pasientene innen 48 timer etter oppstart av penicillinbehandling (4). I 80 % av tilfellene opphørte feber innen 48 timer. I tillegg fikk ingen av pasientene bakteriemi eller pussansamlinger i kroppens hulrom (empyem) som følge av infeksjonen etter ren penicillinbehandling (4). Pasientene som fikk penicillinbehandling i denne studien, hadde 81 % overlevelse. Mange av disse var i utgangspunktet alvorlig syke (4). Den høye overlevelsen er en kontrast til den høye dødeligheten i den preantibiotiske studien fra 1929 - 1935 (1).

## 1.2 Betalaktamantibiotika

Den mest sentrale antibiotikagruppen som brukes i dag er betalaktamantibiotika. Det finnes fire hovedklasser av disse; penicilliner, cefalosporiner, monobaktamer og karbapenemer (3).

Betalaktamantibiotika kjennetegnes ved en felles ringstruktur: betalaktamringen.

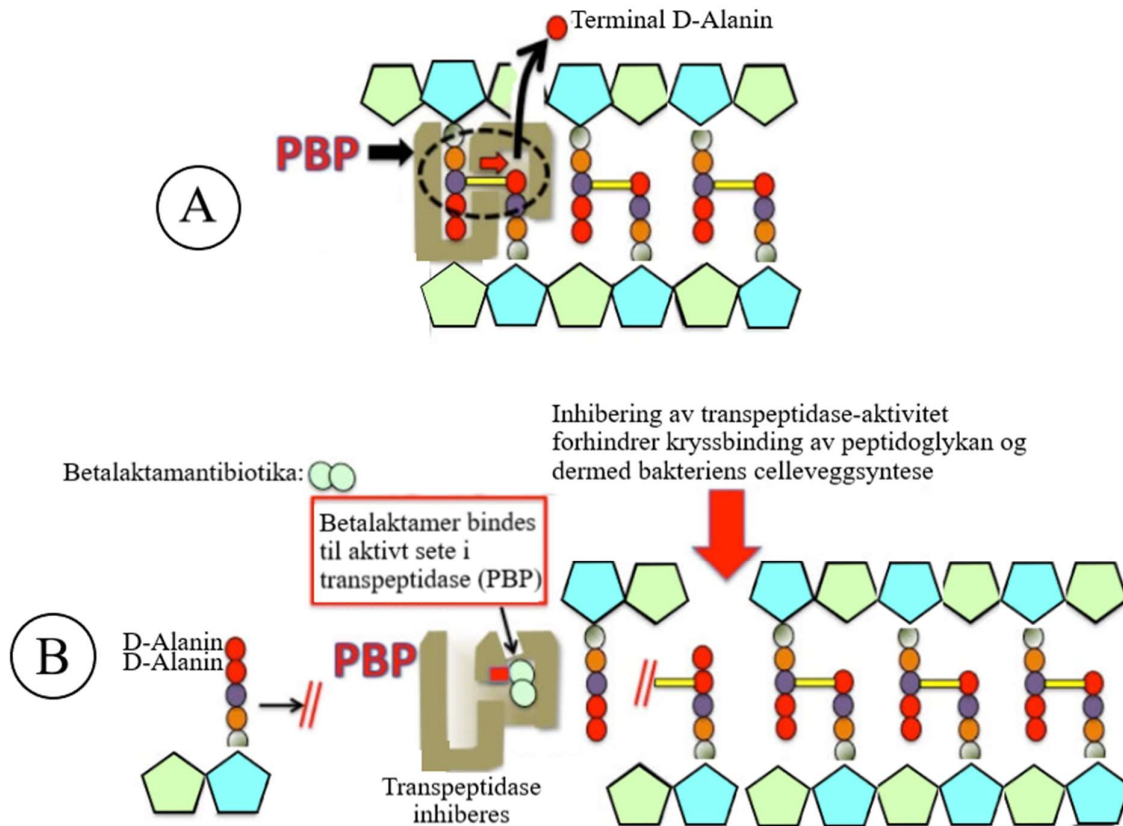
Betalaktamringen utgjør kjernestrukturen i alle betalaktamantibiotika (1,5). Figur 1 viser kjemisk grunnstruktur for de fire gruppene betalaktamantibiotika. Betalaktamringen er illustrert i rød farge på figuren.



Figur 1: Figuren illustrerer den kjemiske grunnstrukturen til de fire gruppene betalaktamantibiotika. De fire gruppene kjennetegnes ved betalaktamringen som er farget i rødt. Figur tatt fra (1).

Betalaktamringen er hovedmekanismen til den antibakterielle funksjonen til betalaktamantibiotika, ettersom denne reagerer med penicillin-bindende protein (PBP) som finnes i bakteriens cellevegg (3,6). Bindingen av betalaktamringen til PBP inhiberer syntesen av bakteriens cellevegg ved å hindre kryssbindingen av peptidoglykaner i både Gram-negative og Gram-positive bakterier (6). Utilstrekkelig syntese av bakteriens cellevegg som følge av inhibering av PBP resulterer i celledødd (6,7). Figur 2 illustrerer hvordan PBP normalt deltar i syntese av bakteriens cellevegg (A) og hvordan betalaktamantibiotika bindes til PBP sitt aktive sete og dermed inhiberer kryssbindingen av peptidoglykanet i bakteriens cellevegg (B).





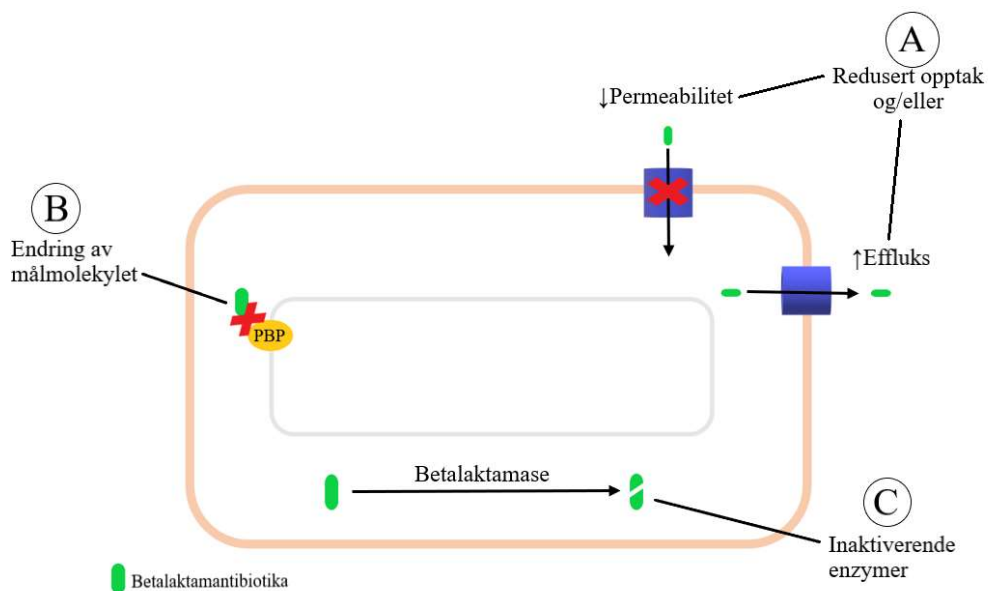
Figur 2: Normal deltakelse av penicillin-bindende protein (PBP) i bakteriens celleveggsyntese (A), samt inhibering av celleveggsyntese som følge av at betalaktamantibiotika bindes til bindingssetet i PBP (B). Betalaktamantibiotika har lignende struktur med peptidoglykanets terminale D-Alanin og bindes derfor til PBP slik at kryssbindingen av peptidoglykan ikke finner sted. Figur modifisert fra (8).

### 1.3 Resistensmekanismer hos betalaktamantibiotika

Overforbruk av betalaktamantibiotika har ført til resistensdannelse. Det finnes flere typer resistensmekanismer. En av disse er modifisering av målmolekylet PBP, som skyldes mutasjoner i gensekvensen som koder for PBP eller at en annen versjon av PBP uttrykkes. Redusert permeabilitet av antibiotika ved at bakterien nedregulerer porinkanaler i cellemembranen, oppregulering av efflukspumper i cellemembranen som pumper antibiotika ut av bakterien og produksjon av inaktiverende enzymer er andre eksempler på resistensmekanismer (3,9).

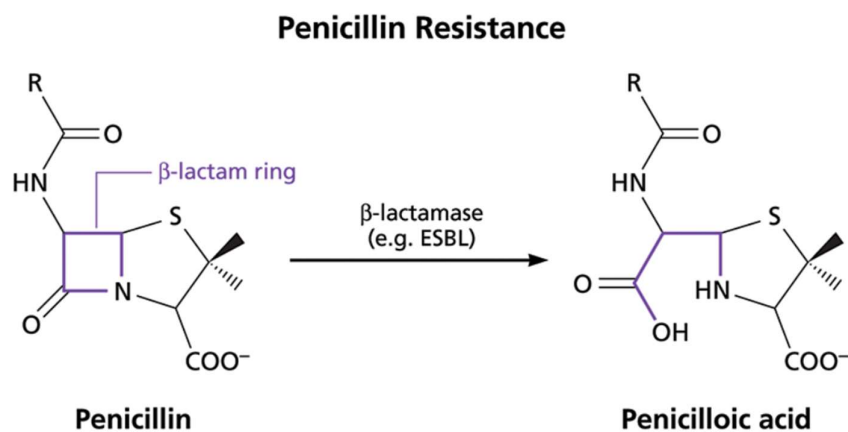
Blant Gram-negative bakterier er inaktiverende enzymer den mest sentrale resistensmekanismen mot betalaktamantibiotika. Enzymene kalles betalaktamaser, og er en fellesbetegnelse på bakterieproduserte enzymer som inaktiverer eller ødelegger betalaktamantibiotika (3,5). Resistens mot betalaktamantibiotika skapes ofte som følge av en

kombinasjon av flere resistensmekanismer. I klinikken er resistensmekanismer som redusert permeabilitet- eller økt effluks av betalaktamantibiotika ofte kombinert med betalaktamaser (3). Figur 3 viser eksempler på vanlige resistensmekanismer rettet mot betalaktamantibiotika.



Figur 3: Figuren illustrerer resistensmekanismer mot betalaktamantibiotika. Resistensmekanismene inkluderer: Redusert opptak av betalaktamantibiotika som følge av nedsatt permeabilitet eller økt effluks (A), endring av målmolekylet PBP (B) og inaktiverende enzymer (C). Figur basert på (1), samt en illustrasjon fra en intern presentasjon fra faglig veileder ved avdeling for medisinsk mikrobiologi (AMM) ved St. Olavs hospital.

Betalaktamaser inaktiverer betalaktamantibiotika ved å hydrolysere betalaktamringen. Figur 4 viser kløyvingen av betalaktamringen i penicillin (3,5,9).



Figur 4: Figuren viser en betalaktamase som hydrolyserer betalaktamringen i penicillin. Figur tatt fra (10).

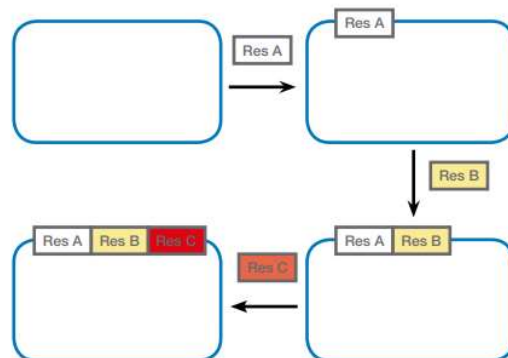
## 1.4 Antibiotikaresistens

### 1.4.1 Spredning av resistensmekanismer

Gener som koder for resistensmekanismer (resistensgener) kan være plassert på bakteriens kromosom eller være plassert på mobile genetiske elementer i bakterien, som f.eks. plasmider (3,5). Spredningen av resistensmekanismer kan skje ved vertikal eller horisontal genoverføring. Grunnlaget for vertikal genoverføring er videreføring av gener gjennom bakteriens formering. Bakterier formerer seg ved mitose, hvor morbakterien og datterbakterien blir kloner av hverandre. Morbakterien overfører sine identiske gener til datterbakterien. (11). I tillegg kan det under DNA-replikeringen oppstå mutasjoner, som kan resultere i nye resistensgener som videreføres til nye datterbakterier (12).

Bakterier har også evnen til å spre resistensgener gjennom horisontal genoverføring, hvor gener overføres til andre bakterier av samme art, eller av forskjellige arter og subarter. Overføringen av gener utføres ved hjelp av plasmider eller andre genetiske elementer (5,11). Plasmider er sirkulære dobbeltrådig DNA-molekyler som deler seg uavhengig av bakteriens kromosomale DNA, da de ikke er integrert her (13). De kan inneholde gener som koder for egenskaper som skaper resistens mot antibiotika, og resistensgenet blir da plasmidmediert. Resistensgener overført gjennom horisontal genoverføring videreføres til neste generasjon av bakterier via mitose (5,11).

Det kan forekomme opphopning av flere resistensgener på samme plasmid. Resistensgenene på plasmidet kan dermed være rettet mot flere ulike antibiotikagrupper, eller kode for flere ulike betalaktamaser (3,5). En bakterie betegnes som multiresistent dersom den er resistent mot 3 eller flere antibiotikagrupper (5). Figur 5 beskriver hvordan multiresistens utvikler seg ved overføring av flere resistensgener til et plasmid.



Figur 5: Illustrasjon av oppsamling av resistensgener (A, B og C) på plasmid, en prosess som fører til multiresistens. Figur tatt fra (5).

Plasmidmediert resistens anses som en større risiko enn resistensgener plassert på bakteriers kromosom, da de plasmidmedierte genene kan spres raskere, også mellom ulike bakteriearter og føre til multiresistens (5).

Utviklingen av antibiotikaresistens styres av evolusjonsprinsippet (11). Bakterier som utvikler en bestemt type resistens, vil overleve eksponeringen for tilsvarende antibiotika og proliferere (12). Utvikling og bruk av nye generasjoner antibiotika har dermed også bieffekten at det kan oppstå bakteriestammer med utviklet resistens (14). Det er i dag påvist resistensgener og resistensmekanismer mot alle tilgjengelige antibiotika som benyttes i behandlingen av klinisk viktige bakterier. I tillegg er det ikke utviklet noen nye antibiotikaklasser de siste 20 årene (1). Utviklingen av antibiotikaresistens styres av evolusjonsprinsippet (11). Bakterier som utvikler en bestemt type resistens, vil overleve eksponeringen for tilsvarende antibiotika og proliferere (12). Utvikling og bruk av nye generasjoner antibiotika har dermed også bieffekten at det kan oppstå bakteriestammer med utviklet resistens (14). Det er i dag påvist resistensgener og resistensmekanismer mot alle tilgjengelige antibiotika som benyttes i behandlingen av klinisk viktige bakterier. I tillegg er det ikke utviklet noen nye antibiotikaklasser de siste 20 årene (1).

#### 1.4.2 Utvikling av nye grupper betalaktamantibiotika

Antibiotika har revolusjonert medisinske behandlingsmuligheter. Likevel kan ikke fungerende antibiotika regnes som en selvfølge. Ved oppdagelsen av penicillin i 1929 advarte forskeren Alexander Fleming om muligheten for at bakterier kunne utvikle resistens mot penicillin (1).

Den første generasjonen av penicilliner, som inkluderer penicillin G som Fleming oppdaget, kan kun brukes i behandling av et smalt spekter med bakterier, bla. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) og noen andre Gram-positive kokker (2,15). Det ble oppdaget resistens mot penicillin G til og med før det ble tatt i klinisk bruk. Betalaktamaser utgjorde en sentral resistensmekanisme mot penicillin G (5,15). For å motarbeide resistens mot betalaktamer ble det benyttet to ulike metoder. Den ene metoden innebærer produksjon av penicilliner som ikke hydrolyseres av betalaktamaser (15). Den andre metoden innebærer bruk av betalaktamase-inhibitorer, som innebærer at antibiotikaen er tilsatt molekyler eller substanser som hemmer bestemte betalaktamaser. Bakterien som produserer den aktuelle betalaktamasen opptrer dermed mindre resistent ved kontakt med betalaktamase-inhibitoren (15,16). Betalaktamase-inhibitorer administreres sammen med betalaktamantibiotika, og øker effekten av antibiotikabehandlingen mot den resistente bakterieinfeksjonen (16,17).

Tidlig på 1960-tallet ble mer bredspektrede penicilliner, eksempelvis ampicillin, introdusert. Dette middelet er aktivt mot et bredere spektrum bakterier og var en av de første penicillinene med noe aktivitet mot Gram-negative bakterier. Ampicillin kan brukes i behandling av infeksjoner som f.eks. *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*), *Escherichia coli* (*E. coli*) og *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*). Dessuten hadde middelet en nedsatt sensitivitet til betalaktamaser, da det var i stand til å beskytte betalaktamringen (5,15).

Bakterier utviklet likevel resistensmekanismer mot ampicillin. Allerede i 1965, bare noen år etter ampicillin ble syntetisert for første gang, ble den første betalaktamasen rettet mot ampicillin oppdaget. Genet som koder for denne betalaktamasen er plasmidmediert og sprer seg derfor hurtig. Utviklingen av nye betalaktamantibiotika har gått parallelt med oppdagelsen av nye betalaktamaser siden dette (5).

Cefalosporinene ble utviklet som et svar på produksjon av betalaktamaser rettet mot ampicillin hos bakteriene *E. coli* og *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), samt spredningen av disse betalaktamasene til andre bakteriearter som *H. influenzae* og *Neisseria gonorrhoeae* (18). Cefalosporinene deles inn i generasjoner, fra 1. – 5. generasjons cefalosporiner (5,15). Den første generasjonen av cefalosporiner er smalspektret, og benyttes i behandlingen av enkelte Gram-positive bakterier, eksempelvis *S. aureus*, streptokokker og noen Gram-negative bakterier (15). For å utvide spekteret av bakterier dette middelet er effektivt mot, ble ytterligere generasjoner av cefalosporiner syntetisert. 2. – 5. generasjons cefalosporiner kan derfor benyttes i behandlingen av infeksjoner med enkelte Gram-positive og Gram-negative bakterier (5,15).

Betalaktamgruppen karbapenemer, som er den nyeste generasjonen av betalaktamantibiotika (19), ble utviklet som et svar på spredningen av ekstendert spektrum betalaktamaser (ESBL) (5). Strukturen til karbapenemer skiller seg fra penicilliner ved at den inneholder en karbapenemring koblet til betalaktamringen, som beskytter den mot de fleste betalaktamaser (20,21). Aktivitetsspektrumet til karbapenemer er bredere enn for penicilliner og cefalosporiner, og benyttes i behandling av infeksjoner med bakterier som produserer ESBL og AmpC-betalaktamaser (15,20,21). Det finnes flere resistensmekanismer mot karbapenemer, hvor den vanligste er karbapenemaser (20). Tabell 1 gir en oversikt over det antibakterielle spektrumet til ulike betalaktamgrupper.

Tabell 1: Oversikt over det antibakterielle spektrumet til betalaktamgruppene; penicilliner, cefalosporiner, monobaktamer og karbapenemer. Dersom betalaktamet er aktivt mot Gram-negative og/eller Gram-positive bakterier angis dette med «+». «(+)) betegner begrenset aktivitet og repertoar, og «-» betegner ingen aktivitet. Tabell modifisert fra (5).

Betalaktamgruppe		Eksempler	Antibakterielt spektrum	
			Gram-negativ	Gram-positiv
<b>Penicilliner</b>	Smalspektrede	Penicillin G	-	+
	Bredspektrede	Ampicillin	(+)	+
<b>Cefalosporiner</b>	1. generasjon	Cefalotin	(+)	+
		Cefaleksin		
	2. generasjon	Cefuroksim	+	+
		Cefoxitin		
	3. generasjon	Cefotaksim	+	+
Ceftazidim				
4. generasjon	Cefepim Cefpirom	+	+	
5. generasjon	Ceftobiprole Ceftaroline	+	+	
<b>Monobaktamer</b>	-	Aztreonam	+	-
<b>Karbapenemer</b>	-	Imipenem Meropenem	+	+

### 1.5 Klassifisering av betalaktamaser

Betalaktamaser navngis avhengig av hvilket substrat de er spesifikke for, og dermed hvilken betalaktamantibiotika de har evne til å hydrolysere. Dersom betalaktamase har mest aktivitet ovenfor penicilliner kalles den en penicillinase. Enzymer med mest aktivitet ovenfor cefalosporiner eller karbapenemer kalles henholdsvis cefalosporinaser eller karbapenemaser (5).

I dag er det oppdaget flere tusen ulike betalaktamase-enzymmer. Det er to identifikasjonssystemer som benyttes for å skille mellom de ulike enzymene, hvor Ambler-systemet er det mest sentrale. Dette systemet deler enzymene inn i fire ulike klasser; A, B, C og D, med bakgrunn i enzymenes hydrolytiske mekanismer. Klassene differensieres videre inn i serin-betalaktamaser (SBL) og metallo-betalaktamaser (MBL). Fordelingen opptrer

ettersom SBL har aminosyren serin i sitt aktive sete og MBL er sink-avhengige.

Betalaktamasene fra klasse A, C og D inngår som SBL og betalaktamaser fra klasse B som MBL (3).

De ulike klassene har flere sentrale betalaktamaser, eksempelvis AmpC fra klasse C. Denne betalaktamasen har kromosomalt plasserte gener i mange viktige Gram-negative bakterier. Klasse B og D betalaktamaser har aktivitet mot et bredt spektrum betalaktamantibiotika, som inkluderer penicilliner, cefalosporiner og karbapenemer (3). Tabell 2 viser en oversikt over hvilke klasser som inngår i Ambler-klassifiseringen, samt eksempler på betalaktamaser som inkluderes i hver klasse (3,20).

Tabell 2: Oversikt over Ambler-klassifiseringen. Betalaktamaser deles etter Ambler-klassifisering inn i serin-betalaktamaser (SBL) og metallo-betalaktamaser (MBL), som kommer frem av tabellen. Tabellen viser også tilhørende underklasser, hhv. Ambler-klassene A, C og D som er SBL, og B som er MBL, samt eksempler på hvilke betalaktamaser som inngår i hver klasse (3,20).

<b>Ambler-klassifisering</b>				
	SBL			MBL
<b>Klasser</b>	A	C	D	B
<b>Eksempler på betalaktamaser<sup>1</sup></b>	SHV	AmpC	OXA	NDM
	TEM	CMY		VIM
	CTX-M	FOX		IMP
	KPC	DHA		
	IMI			

<sup>1</sup> Forkortelser til de nevnte betalaktamasene: SHV (Sulphydryl variant), TEM (navngitt fra en pasient ved navn Temoniera), CTX-M (cefotaximase), KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) og IMI (Imipenem-hydrolysing beta-lactamase) (3,20). CMY, FOX og DHA er familier av plasmidmedierte AmpC-betalaktamaser (5). OXA (Oxacillin-hydrolysing carbapenemase) (20). NDM (New Delhi metallo-lactamase), VIM (Verona integron-encoded metallo-lactamase) og IMP (Imipenem-resistant Pseudomonas) (20).

Det er andre klassifikasjonssystemer som forenkler inndelingen av betalaktamaser, eksempelvis fordeling av ekstendert spektrum betalaktamaser (ESBL) (22). ESBL er en gruppe betalaktamaser som kan hydrolysere penicilliner, cefalosporiner med ekstendert spektrum og/eller karbapenemer, og skaper derfor en utfordring i behandlingen av bakterieinfeksjoner (3,5,18). Disse enzymene kan videre deles inn i tre subgrupper; ESBL<sub>A</sub>, ESBL<sub>M</sub> og ESBL<sub>CARBA</sub> (5). Mange betalaktamaser fra Ambler-klassifiseringen inngår også i

dette klassifikasjonssystemet. Dette skyldes at mange betalaktamaser fra Ambler-klassifiseringen, også regnes som ESBL (22).

ESBL<sub>A</sub> kjennetegnes ved at de hydrolyserer penicilliner, 1. – 4. generasjons cefalosporiner og monobaktamer. De kjennetegnes også ved at de inhiberes av betalaktamaseinhibitorer som klavulansyre (3,5,18). ESBL som inngår i denne subgruppen tilsvarer Ambler-klassifiseringens klasse A ESBL-enzymmer (22).

Subgruppen ESBL<sub>M</sub> tilsvarer Ambler-klassifiserings klasse C (22), og består av plasmidmedierte AmpC-betalaktamaser og OXA-enzymmer. OXA-enzymmer fra denne subgruppen er sjeldne, og det er derfor hovedsakelig plasmidmedierte AmpC-betalaktamaser denne subgruppen består av (5). Her er det viktig å ta i betraktning at OXA-enzymene fra Ambler-klasse C, og dermed ESBL<sub>M</sub>, ikke er de samme som OXA-enzymene fra Ambler-klasse D (5,20). ESBL<sub>M</sub> kjennetegnes ved at de hydrolyserer penicilliner og cefalosporiner med ekstandert spektrum. Subgruppen kjennetegnes også ved at de inhiberes av betalaktamase-inhibitorerne kloksacillin og borsyre (5).

ESBL<sub>CARBA</sub> består av karbapenemaser, ESBL-enzymmer rettet mot karbapenemer. Økt forbruk av karbapenemer har sannsynligvis ført til utviklingen og spredningen av disse enzymene. Karbapenemaser har aktivitet mot stort sett alle betalaktamantibiotika, og bakterier som produserer disse enzymene er derfor gjerne resistent mot alle betalaktamantibiotika. Subgruppen ESBL<sub>CARBA</sub> tilsvarer Ambler-klassifiseringens klasse A, B og D ESBL-enzymmer (5,22). Tabell 3 viser en oversikt over subgrupper som inngår i klassifiseringen av ESBL, samt eksempler på ESBL som inkluderes i hver subgruppe (5,20). En fullstendig oversikt over denne inndelingen av ESBL kan sees i vedlegg 1.

Tabell 3: Oversikt over ESBL subgrupper, samt eksempler på ESBL som inngår i hver subgruppe.

<b>Klassifisering av ESBL</b>			
<b>Subgrupper</b>	ESBL <sub>A</sub>	ESBL <sub>M</sub>	ESBL <sub>CARBA</sub>
<b>Eksempler på ESBL</b>	TEM SHV CTX-M	Plasmidmediert AmpC OXA	KPC NDM VIM IMP IMI OXA-48



## 1.6 Karbapenemresistens i Gram-negative bakterier

Både Gram-positive og Gram-negative bakterier kan produsere betalaktamaser (3,5). Den ledende resistensmekanismen blant Gram-positive bakterier er i dag en modifisering av målmolekylet PBP. Resistensproblematikken rundt Gram-positive bakterier skyldes derfor i all hovedsak andre resistensmekanismer enn produksjon av enzymer. Til sammenligning er hovedresistensmekanismen til Gram-negative bakterier produksjon av betalaktamaser, hvor mange av disse er plasmidmedierte. Grunnet bruk og overforbruk av betalaktamantibiotika har plasmidmedierte betalaktamaser spredd seg til mange klinisk viktige Gram-negative bakterier (3). Karbapenemresistens er også mest utbredt blant Gram-negative bakterier, hvor karbapenemaseproduksjon er den mest utbredte resistensmekanismen (20,21).

Infeksjoner med karbapenemresistente bakterier er en verdensomspennende helseutfordring (21). I 2017 publiserte WHO en liste over antibiotika-resistente patogene bakterier som bør prioriteres (23,24). De Gram-negative karbapenemresistente bakteriene *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) og *Enterobacteriaceae* (f.eks. *E. coli* og *K. pneumoniae*) er her av spesiell interesse (21,23,24).

Karbapenemresistent *Enterobacteriaceae* (CRE) vektlegges, hvor karbapenemaseproduserende bakterier er av spesiell bekymring (20). Karbapenemaseproduserende *Enterobacteriaceae* (CPE) har gjerne plasmidmedierte resistensgener som øker spredningspotensialet og kompliserer overvåkning og smittesporing (20,23). Infeksjoner med CPE har ofte få behandlingsalternativer, da bakteriene gjerne er multiresistente (5,20,21). Dødeligheten blant pasienter som smittes med slike bakterier er høy, da pasienten ofte dør av sekundære sykdommer som infeksjon i blodet eller pneumoni (23,24).

## 1.7 Antibiotikaresistens i verden

Ulike land har ulike forutsetninger for å forhindre og bekjempe resistensutvikling. Blant annet er den etablerte kunnskapen om utfordringene ved antibiotikabruk, resistensutvikling og spredning varierende. Tilgjengelige ressurser, befolkningstetthet, sanitære forhold, standard på sykehusene, økonomi, politikk og etablerte systemer for overvåkning av sykdomsutbrudd er noen av faktorene som har betydning for resistenssituasjonen i et land (25). Gjennomsnitts- og lavinntektsland har dermed høyere forekomst av antibiotikaresistens enn høy-inntektsland (26). Ifølge Verdens Helseorganisasjon (WHO) er humanitære kriser, krig og naturkatastrofer andre faktorer som gir økt risiko for overføring av infeksjonssykdommer (27). Økende

antibiotikaresistens forekommer i hele verden (25), og spesielt på steder hvor antibiotika er tilgjengelig uten resept (28).

Land i Asia-Stillehavs-regionen har høy forekomst av antimikrobiell resistens, herunder antibiotikaresistens (26). Regionen er ifølge WHO sannsynligvis mest risikoutsatt i verden for antimikrobiell resistens (26,29), hvor et av landene som inngår i denne regionen er India. I en systematisk oversiktsstudie fra 2021, «A One Health Review of Community-Acquired Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* in India», tar mange av de omtalte studiene for seg betydningen av enkel tilgang på antimikrobielle legemidler som en forsterker av problemet med antimikrobiell resistens i India (30).

Studien viser mikrobiell resistens i *E. coli* mot seks klinisk relevante legemidler. De isolerte bakteriestammene i størsteparten av studiene (n = 20) kom fra kilder i miljøet, hovedsakelig innsjøer, elver og vannreservoarer. I en av studiene som omtales i den systematiske oversiktsstudien ble prevalensen av resistente koliforme bakterier, herunder *E. coli* undersøkt. Bakteriene ble isolert fra elva Yamuna, her ble 86,6 % av isolatene regnet som multiresistente, med resistens mot tre eller flere legemiddelklasser. En fjerdedel av isolatene var resistente mot 10 eller flere legemidler (30).

I USA er det 2,8 millioner infeksjoner med antibiotikaresistente bakterier årlig og 35 000 årlige dødsfall som følge av disse infeksjonene. Dette kommer frem av rapporten «Antibiotic Resistance Threats in the United States 2019» fra Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (31).

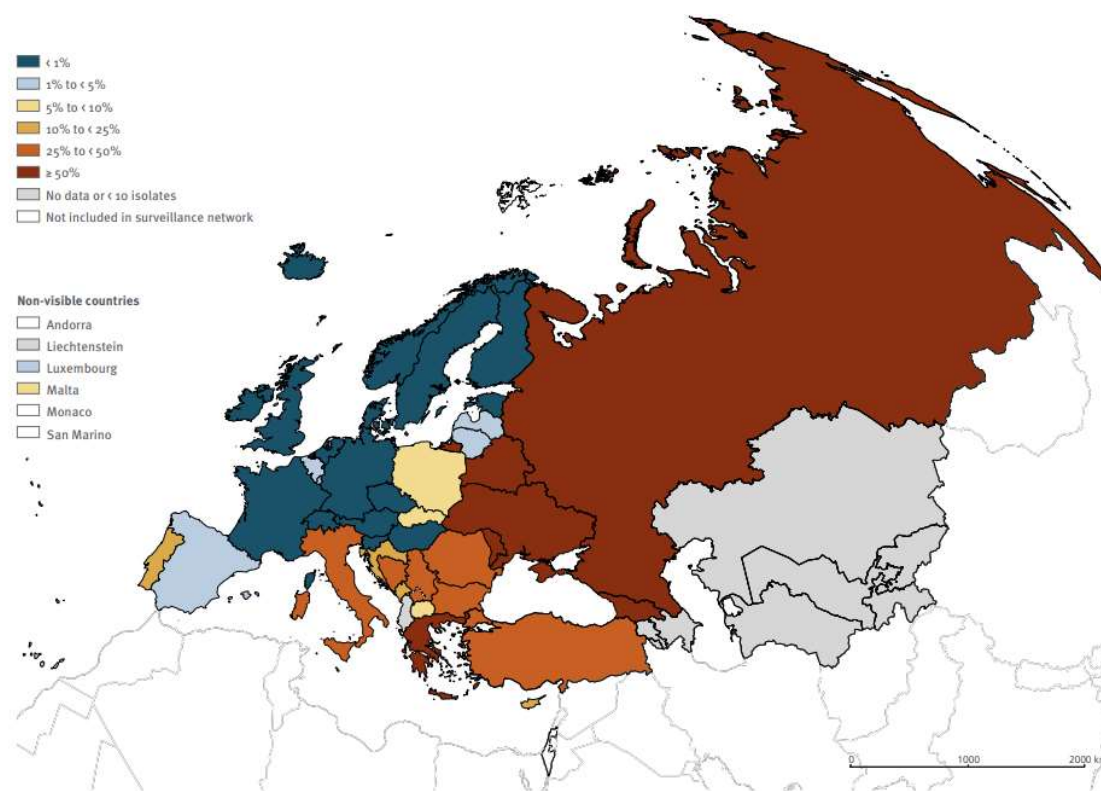
Antibiotikaresistens er også en stor helseutfordring i den europeiske regionen til WHO, ifølge rapporten «Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022» fra European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) og WHO sitt regionale kontor i Europa (32).

Med bakgrunn i invasive isolater hentet fra Europa så man en forskjell i antimikrobiell resistens (AMR) mellom Nordvest- og Sørøst-Europa, hvor forekomsten av AMR var klart høyere i Sørøst-Europa. Dette gjenspeiles i situasjonen av resistens mot 3. generasjons cefalosporiner i isolater av *E. coli* og *K. pneumoniae*, samt resistens mot karbapenemer i isolater av *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* og *Acenitobacter species* (spp.). Forekomsten av disse resistente isolatene er høyere i Sørøst- enn Nordvest-Europa (32).

Forekomsten av resistens mot 3. generasjons cefalosporiner var høyere blant isolater av *K. pneumoniae* enn blant *E. coli*. Spredningen av resistente isolater av *K. pneumoniae* er utbredt.

Av totalt 41 land rapporterte 18 land i Europa at 50% eller mer av deres isolater var resistente mot 3. generasjons cefalosporiner. Til sammenligning rapporterte fem av 41 land om det samme for isolater av *E. coli* (32).

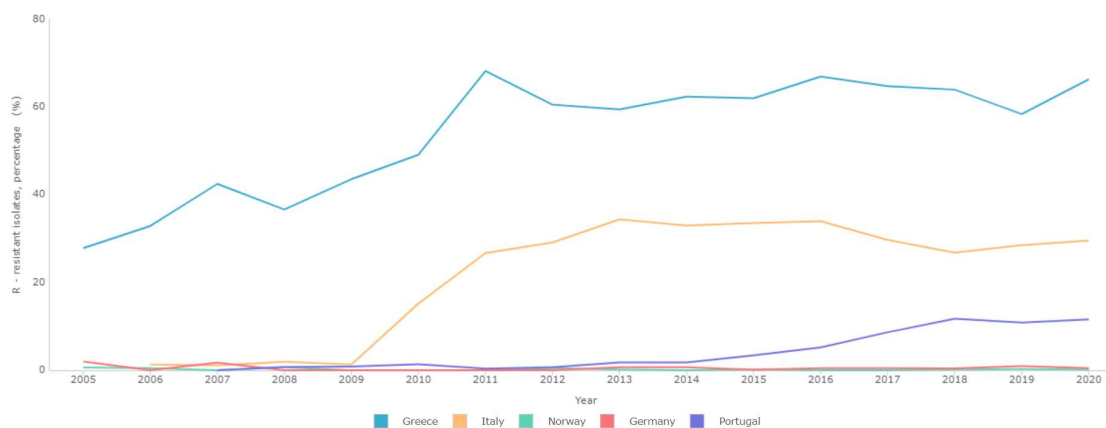
Antallet karbapenemresistente isolater av *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* og *Acenitobacter* spp. er høyt. Til sammenligning var forekomsten av karbapenemresistente isolater av *E. coli* sjeldne. Seks av 41 land i Europa rapporterte at 50% eller mer av deres *K. pneumoniae* isolater var karbapenemresistente. Til sammenligning rapporterte ingen land om det samme for isolater av *E. coli*, men seks av 40 land i Europa rapporterte at 1% eller mer av deres *E. coli* isolater var karbapenemresistente (32). Figur 6 viser en illustrasjon av hvilke land i Europa som rapporterte om karbapenemresistente *K. pneumoniae* isolater, samt prosentandelen disse utgjorde av det totale antallet *K. pneumoniae* isolater (32).



Note: data for Serbia and Kosovo (All references to Kosovo in this document should be understood to be in the context of the United Nations Security Council resolution 1244 (1999)) were combined for this map. Data for the United Kingdom for 2020 do not include Scotland and Wales.  
Data sources: 2020 data from the Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance (CAESAR, ©WHO 2021. All rights reserved.) and 2020 data from the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net, ©ECDC 2021).  
Map production: ©WHO.

Figur 6: Figuren viser land i WHO-regionen i Europa som rapporterte om karbapenemresistente (imipenem/meropenem) invasive isolater av *K. pneumoniae*, samt prosentandelen disse utgjorde av det totale antallet rapporterte invasive *K. pneumoniae*-isolater. Dataen er fra 2020. Figur tatt fra (32).

Figur 7 gir et eksempel på utviklingen av karbapenemresistens blant *K. pneumoniae* isolater i noen utvalgte europeiske land (33).



Figur 7: Figuren viser prosentandelen karbapenemresistente *K. pneumoniae*-isolater rapportert fra noen utvalgte land i Europa i perioden 2005 til 2020. Landene inkluderer: Hellas, Italia, Norge, Tyskland og Portugal, slik at både Nordvest- og Sørøst-Europa representeres. Isolatene ble rapportert til ECDC, og det er dette datamaterialet som er representert i figuren. Figur tatt fra (33). I søket er kategoriene «Antimicrobial resistance», «Klebsiella pneumoniae», «Carbapenems», «R – resistant isolates, percentage» og «2020» valgt.

## 1.8 Antibiotikaresistens i Norge

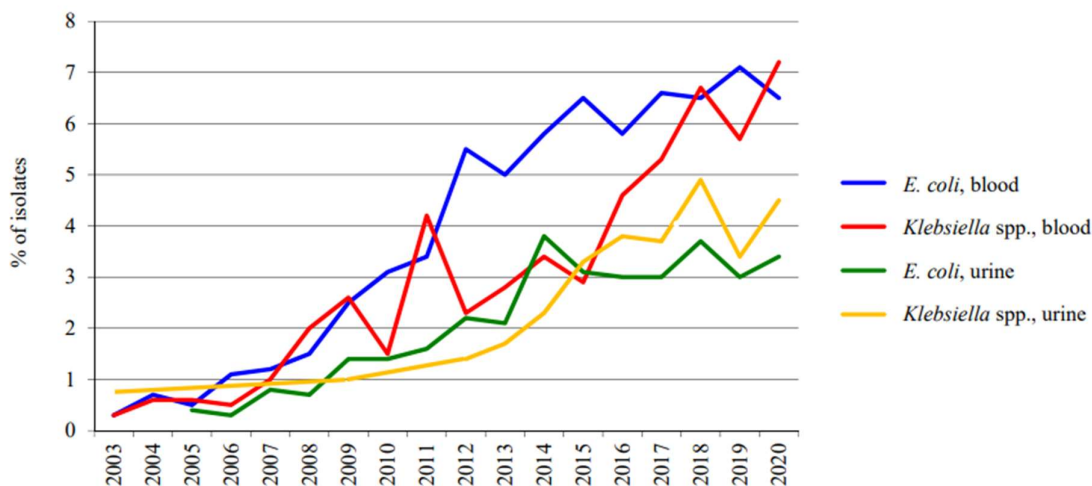
Antibiotikaresistens er også et aktuelt tema i Norge. Norsk overvåkingssystem for antibiotikaresistens hos mikrober (NORM) og Veterinærinstituttet produserer i samarbeid den årlige rapporten NORM/NORM-VET. NORM/NORM-VET omhandler bruk av antimikrobielle midler og forekomsten av antimikrobiell resistens (AMR) i Norge (34).

I rapporten fra 2020 under kapitlet «Human Clinical Isolates» ble blant annet forekomsten av ESBL-positive og karbapenemresistente *E. coli*-isolater og *K. pneumoniae*-isolater fra blodkultur og urinveier undersøkt. Bakterieisolatene ble isolert fra pasienter i Norge i 2020. Forekomsten presenteres i tabell 4. *E. coli*-bakterieisolatene ble opparbeidet over en periode på 6 måneder. De 22 diagnostiske laboratoriene i Norge og 11 referanselaboratorier bidro i undersøkelsen av bakterieisolatene og i overvåkingssystemet av bakterieisolater av interesse (35).

Tabell 4: Forekomst i prosent (%) av meropenemresistente og ESBL-positive isolater av *E. coli* og *K. pneumoniae* fra blodkulturer og urinveier fra pasienter i Norge, rapportert i NORM/NORM-VET i 2020.

Bakteriesiolat fra	Antall bakterieisolater (n)	Meropenemresistente isolater [%]	ESBL-positive isolater [%]
<i>E. coli</i> (blodkultur)	2087	0,0	6,5
<i>E. coli</i> (urinveier)	2520	0,0	3,4
<i>K. pneumoniae</i> (blodkultur)	632	0,0	9,7
<i>K. pneumoniae</i> (urinveier)	699	0,1	5,7

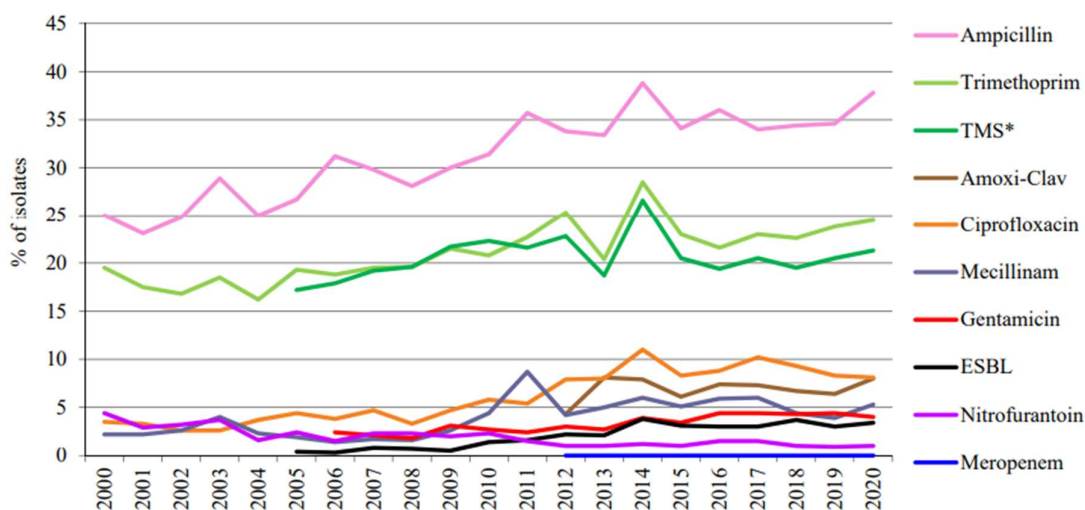
Figur 8 viser utviklingen av prevalensen av ESBL-produksjon i bakterieisolater av *E. coli* og *Klebsiella* species (*K. spp.*) fra blodkultur og urinveier. Bakterieisolatene ble opparbeidet ved norske sykehus i perioden 2003-2020, og viser en lav men økende prevalens av ESBL-produkerende bakterieisolater.



Figur 8: Prevalensen av ESBL-produksjon i bakterieisolater opparbeidet fra pasienter i Norge i perioden 2003-2020.

Figuren omfatter ESBL-produksjon i bakterieisolater av *E. coli* og *K. spp.* fra blodkulturer og urin. Figur tatt fra (35).

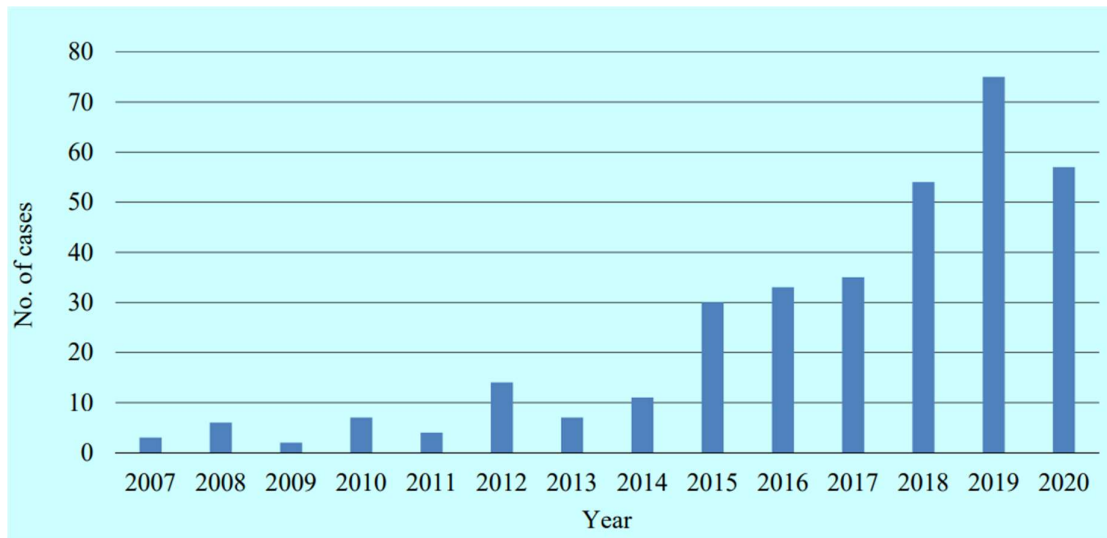
I NORM/NORM-VET 2020 ble det konkludert med at det i Norge fremdeles er lav forekomst av antibiotikaresistens i kliniske bakterieisolater fra mennesker (34). Likevel skjer det en liten økning i antibiotikaresistens over tid i kliniske bakterieisolater. Figur 9 viser prevalensen av antibiotikaresistens for flere ulike antimikrobielle legemidler i *E. coli*-isolater fra urinveier i perioden 2000-2020 (35).



Figur 9: Prevalensen av antibiotikaresistens mot flere ulike antimikrobielle midler i *E. coli*-isolater fra urinveier. Bakterieisolatene er opparbeidet ved norske sykehuslaboratorier. \*TMS=Trimethoprim-sulfamethoxazole. Figur tatt fra (35).

I Norge er forekomsten av karbapenemresistente bakterieisolater fremdeles lav i forhold til i andre deler av verden. Likevel øker forekomsten også her (36). En økt forekomst av antibiotikaresistens i verden gir økt risiko for spredning av antibiotikaresistente mikrober til Norge, og det forekommer importsmitte av karbapenemase-produserende Gram-negative bakterier til Norge, (34,36).

Figur 10 viser forekomsten av identifiserte karbapenemase-produserende *Enterobacterales* (CPE) i Norge fra 2007-2020. I 2020 ble det identifisert 57 isolater, som er litt høyere enn de 54 identifiserte isolatene i 2018. I 2019 ble 75 isolater av CPE identifisert. Nedgangen i 2020 fra 2019 antas å skyldes nedsatt reisevirksomhet under koronaviruspandemien (34,36).



Figur 10: Antall identifiserte isolater av karbapenemaseproduserende Enterobacteriales (CPE) i Norge fra 2007-2020. Figur tatt fra artikkelen «Carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Norway 2020» presentert i NORM/NORM-VET 2020 (36).

NORM/NORM-VET-rapporten påpeker nødvendigheten av gode rutiner for antibiotikaforbruk og tiltak mot spredning av resistente bakterier. Videre innsats er nødvendig for å opprettholde situasjonen med lav forekomst av antibiotikaresistens i Norge (34,35).

### 1.9 Resistensutvikling og spredning på sykehus

Pasienter på sykehus er en spesielt sårbar gruppe for infeksjoner. Immunsupprimerte pasienter kan få behov for antibiotikabehandling for å bekjempe infeksjoner som oppstår. I tillegg er enkelte pasienter i utgangspunktet innlagt på sykehus som følge av alvorlige infeksjoner som krever antibiotikabehandling. Antibiotika benyttes også forebyggende for å redusere risiko for infeksjon under medisinske inngrep og operasjoner på sykehus (1).

I primærhelsetjenesten er det store omfanget av antibiotikabruk hovedutfordringen (37). Primærhelsetjenesten og reseptbelagte kjøp fra apotek utgjorde 84% av innkjøpene av antibakterielle midler, herunder antibiotika, i Norge i 2020 (38). I sykehus og på sykehjem er derimot utfordringen at det oftere benyttes bredspektret antibiotika og høye doser i behandling av pasienter (37).

Sykehusene i Norge sto i 2020 for omtrent 8% av innkjøpte definerte døgndoser (DDD) av antibiotika til menneskelig bruk. Dette utgjør en drastisk nedgang fra 2019, hvor sykehusene sto for 11% av innkjøpte DDD. Det antas at nedgangen har sammenheng med koronaviruspandemien (38).

Antibiotikabruk gir økt grobunn for seleksjon av antibiotikaresistente bakterier (1). Eventuelle antibiotikaresistente bakterier kan selekteres, ved at disse overlever antibiotikabehandlingen som gis pasientene. Svekket normalflora som følge av antibiotikabehandling øker risikoen for opportunistisk vekst av de resistente bakteriene. Oppvekst av antibiotikaresistente bakterier kompliserer behandlingen av pasienten, og forløpet av infeksjonen kan bli svært alvorlig når de resistente bakteriene fortsetter å vokse i pasienten (20).

Når en pasient er bærer eller har en infeksjon med antibiotikaresistente bakterier kan dette også føre til resistensspredning. Det er en risiko for at andre bakteriearter i pasienten eller i sykehusmiljøet kan erverve antibiotikaresistens og multiresistens gjennom horisontal genoverføring fra de allerede resistente bakteriene. Eksempelvis er den viktigste faktoren i spredningen av karbapenemresistens helsevesen-assosiert spredning av CRE (20).

### 1.10 Tiltak mot antibiotikaresistens og spredning av antibiotikaresistens

For å hindre spredning av antibiotikaresistente bakterier på sykehusene er det avgjørende med rask deteksjon av resistente bakterier i de mikrobiologiske laboratoriene. Passende smitteregimer kan da iverksettes og spredning til andre pasienter, ansatte og omgivelser kan forhindres. Forhindring av spredning av resistente og multiresistente bakterier er et viktig virkemiddel i kampen mot økt antibiotikaresistens og utviklingen av flere antibiotikaresistente bakteriearter. Et annet viktig tiltak mot antibiotikaresistens i sykehusene er å velge å bruke smalspektret antibiotika over bredspektret antibiotika der dette er mulig. I statusrapporten for styringsgruppen i 2018 var et av målene som ble arbeidet for å redusere bruken av bredspektret antibiotika ved sykehus med 30 % fra 2012 innen utgangen av 2020 (37,39).

Overvåking av resistenssituasjonen, og rapportering av nye resistenstilfeller er også viktige tiltak mot spredning av antibiotikaresistens. I Norge har Norsk overvåkningssystem for antibiotikaresistens i mikrober (NORM) en slik nasjonal overvåking av resistenssituasjonen. NORM utgir årlig en felles rapport om antibiotikaresistens i bakterier fra mennesker og dyr sammen med den veterinærmedisinske utgaven av NORM (NORM-VET) (34,40).

For å kunne overvåke resistente bakterier må resistensmekanismene først påvises. Kompetansesenter for påvisning av antibiotikaresistens (K-res) er et referanselaboratorium som mottar prøver fra mikrobiologiske laboratorier i hele Norge. Her skjer en endelig påvisning av resistensmekanismer, og følsomhet for spesielle antibiotika undersøkes (41).

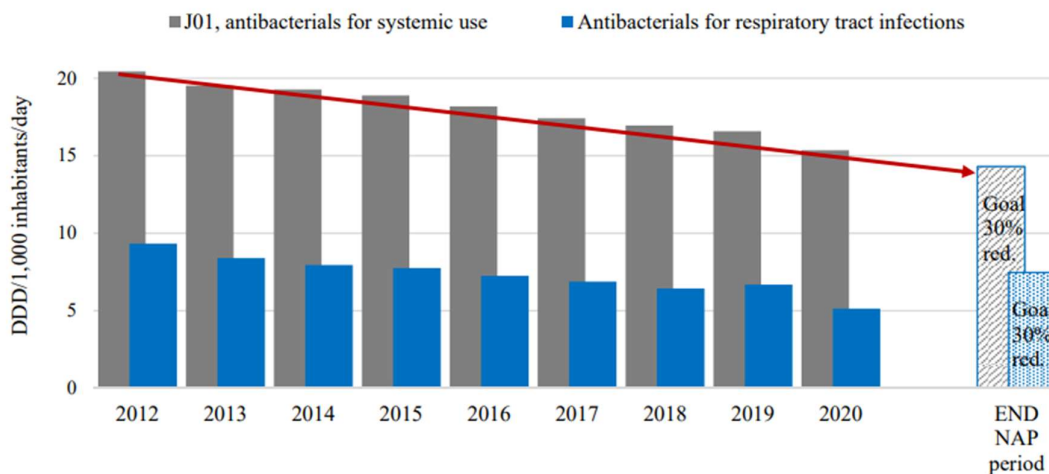
Enkelte bakterier som påvises i laboratoriet kan være meldepliktige, og må meldes inn til Meldingssystem for smittsomme sykdommer (MSIS). MSIS overvåker og registrerer



forekomst av meldepliktige sykdommer i Norge (42). Forekomsten av karbapenemaseproduserende *Enterobacterales* (CPE), *P. aeruginosa* og *Acinetobacter spp.* har vært meldepliktig til Meldesystemet for infeksjonssykdommer (MSIS) siden 2012 (34,36).

Andre viktige virkemidler mot økt antibiotikaresistens inkluderer korrekt og tilstrekkelig antibiotikabehandling, samt å unngå unødvendig bruk av antibiotika (1). Holdningskampanjer og spredning av informasjon om korrekt bruk av antibiotika både i befolkningen og til helsepersonell og leger er viktige tiltak for å forebygge antibiotikaresistens. Nasjonal kompetansetjeneste for antibiotikabruk i spesialisthelsetjenesten (KAS) har ansvar for å spre og bygge kompetanse om antibiotikabruk nasjonalt i Norge (43).

Norge utøver en restriktiv bruk av antibiotika. Det arbeides likevel stadig for å utforme og oppnå mål om mer rasjonell og korrekt antibiotikabruk som skal bidra til forebygging av resistensutvikling og spredning. Det norske Helse- og omsorgsdepartementet lagde i 2016 en handlingsplan for å nå målene til nasjonal strategi mot antibiotikaresistens i 2015-2020 (44). Målsetningen til handlingsplanen var blant annet å redusere antibiotikabruken i den norske befolkningen med 30 % fra nivået i 2012 innen utgangen av 2020, og foreskrivingen av antibiotika ved luftveisinfeksjoner med 20% i samme tidsrom (37,39,44). Målet ble nådd for antibiotikabruk mot luftveisinfeksjoner, men ikke for antibiotika til systemisk bruk, som vist av figur 11 hentet fra NORM/NORM-VET-rapporten fra 2020 (38).



Figur 11: Figuren viser salg av antibiotika til menneskelig systemisk bruk (grå søyler) og til behandling av luftveisinfeksjoner (blå søyler) i definerte døgndoser (DDD)/1000 innbyggere/dag. De stiplede søylene i tilsvarende farger viser målsetningen for utgangen av 2020 for reduksjon i antibiotikabruk. Figur tatt fra (38).

Resistenssituasjonen, retningslinjene for antibiotikabruk og forebyggende og motvirkende tiltak varierer stort i ulike deler av verden. For å forebygge og bekjempe antibiotikaresistens er det nødvendig med en holistisk tilnærming. Høy forekomst av antibiotikaresistens ett sted vil utgjøre en helsetrussel alle steder på grunn av faren for spredning (45). Derfor må alle land samarbeide med å innhente og dele informasjon om antibiotikaresistente mikrober. WHO har utarbeidet en «Global Action Plan» som skal redusere effekten av antimikrobielle mikrober gjennom økt overvåkning av mikrober med antimikrobiell resistens i middels- og lavinntektsland. «Global Action Plan» bygger på prinsippet «One Health». Dette er en tilnærming som tar for seg samspillet mellom mennesker, dyr og miljø i global helse (30).

### 1.11 Påvisning av betalaktamresistens i laboratoriet

Ved avdeling for medisinsk mikrobiologi på St. Olavs hospital brukes ulike metoder for deteksjon av karbapenemresistente Gram-negative bakterier. Dette inkluderer metodene fenotypisk lappediffusjon, PCR og O.K.N.V.I. Resist-5.

#### 1.11.1 Fenotypisk påvisning med lappediffusjon

Ved funn av bakteriekolonier med resistens mot ekstandert spektrum betalaktamer, blir ofte gradienttester eller lappediffusjon med kombinasjonslapper benyttet for å fenotypisk påvise de ulike betalaktamasene det er mulig bakteriene produserer (5). De fleste laboratorier i Norge benytter brytningspunkter fra EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) eller NordicAST (Nordic Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) (5,46). Tabellene fra disse to komiteene minner om hverandre, da NordicASTs tabeller med brytningspunkter baserer seg på EUCASTs tabeller, men NordicASTs tabeller med brytningspunkter inkluderer kommentarer som er tilpasset nordiske forhold (46).

Enkelte betalaktamaser hemmes av betalaktamase-inhibitorer, et konsept som benyttes under fenotypisk påvisning av betalaktamaser. Det benyttes ulike kombinasjonslapper avhengig av hvilken subgruppe av ESBL som ønskes påvist. Eksempelvis kan tilstedeværelse av ESBL<sub>A</sub> påvises ved å undersøke forskjell i brytningspunkter mellom ulike cefalosporiner, som cefotaksim og ceftazidim, med og uten klavulansyre. ESBL<sub>A</sub> påvises gitt at forskjellen i brytningspunkter er over 5mm (5). Dersom bakteriekolonien produserer ESBL<sub>A</sub> vil kombinasjonslappen med cefalosporinet og klavulansyre gi større hemningssone enn lappen med cefalosporinet alene. Dette skyldes at ESBL<sub>A</sub>, som er resistensmekanismen til bakterien, hemmes av klavulansyre. Det er synergi mellom cefalosporinet og klavulansyren.

Eksempler på utførelse av fenotypisk påvisning av ulike subgrupper av ESBL vises i tabell 5, hentet fra (5,47). Dette er likevel bare en enkel oversikt, flere krav til påvisning av de ulike ESBL subgruppene kan forekomme. Oversikt over algoritmer for påvisning av ESBL<sub>A</sub>, ESBL<sub>M</sub> og ESBL<sub>CARBA</sub> kan også sees i NordicASTs tabeller med brytningspunkter, v. 12.0 utgitt januar 2022 (47).

Tabell 5: Oversikt over eksempler på hvordan fenotypisk påvisning utføres.

ESBL subgruppe	Kombinasjonslapper		Synergi med	Krav til forskjell i hemningssone [mm]
	Antibiotika	Betalaktamase-hemmere		
<b>ESBL<sub>A</sub></b>	Cefalosporiner (eks. cefatoksim og ceftazidim)	Klavulansyre	Klavulansyre	≥5
<b>MBL</b>	Karbapenemer (eks. meropenem)	Dipikolinsyre (DPA)	DPA	≥5
<b>ESBL<sub>CARBA</sub> (Spesifikt enzymet KPC)</b>	Karbapenemer (eks. meropenem)	Borsyre, EDTA	Borsyre	≥4

### 1.11.2 O.K.N.V.I. Resist-5

O.K.N.V.I. Resist-5 er basert på antigen-antistoff-bindinger. Monoklonale antistoffer rettet mot gitte karbapenemaser er strategisk plassert som linjer i membranen til lateral-flow-testen. En identifiserende bokstav markerer den spesifikke plasseringen av stripen med monoklonale antistoffer tilhørende den bestemte karbapenemasen. I membranen til testen befinner det seg gull-nanopartikkel-konjugater som vil skape komplekser med prøven når denne tilsettes. Dette skyldes at membranen inneholder flere ulike konjugater, hvor hver enkelt er rettet mot en gitt karbapenemase. Gitt at karbapenemasene det undersøkes for er til stede i prøven vil kompleksene diffundere oppover membranen til de når sitt respektive monoklonale antistoff, reagere med dette og skape en synlig agglutinasjon. Denne agglutinasjonen vil observeres som en rød linje i membranen (48).

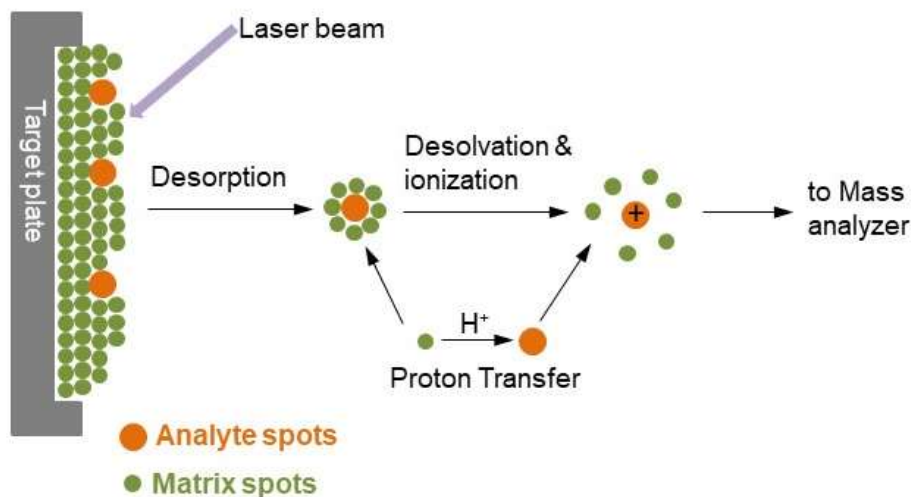
## 1.12 Deteksjon av karbapenemaseproduksjon hos Gram-negative bakterier ved hjelp av MBT STAR-Carba og MALDI-TOF MS

Rask deteksjon av eventuelle karbapenemaseproduserende bakterier i pasientprøver er nyttig, da dette kan bidra til en forbedring i behandlingen av pasienten. Dette er også viktig mtp. smittevern, da man kan redusere sannsynligheten for at bakterien spres videre (20,49).

Den nylig utviklede fenotypiske testen, MBT STAR-Carba, identifiserer karbapenemaseproduksjon hos Gram-negative bakterier. MBT STAR-Carba benytter analyseprinsippet MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry) (49). Denne metoden kan bidra i arbeidet med å raskt bekrefte/avkrefte eventuell karbapenemaseproduksjon i klinisk viktige Gram-negative bakterier.

### 1.12.1 MALDI-TOF MS

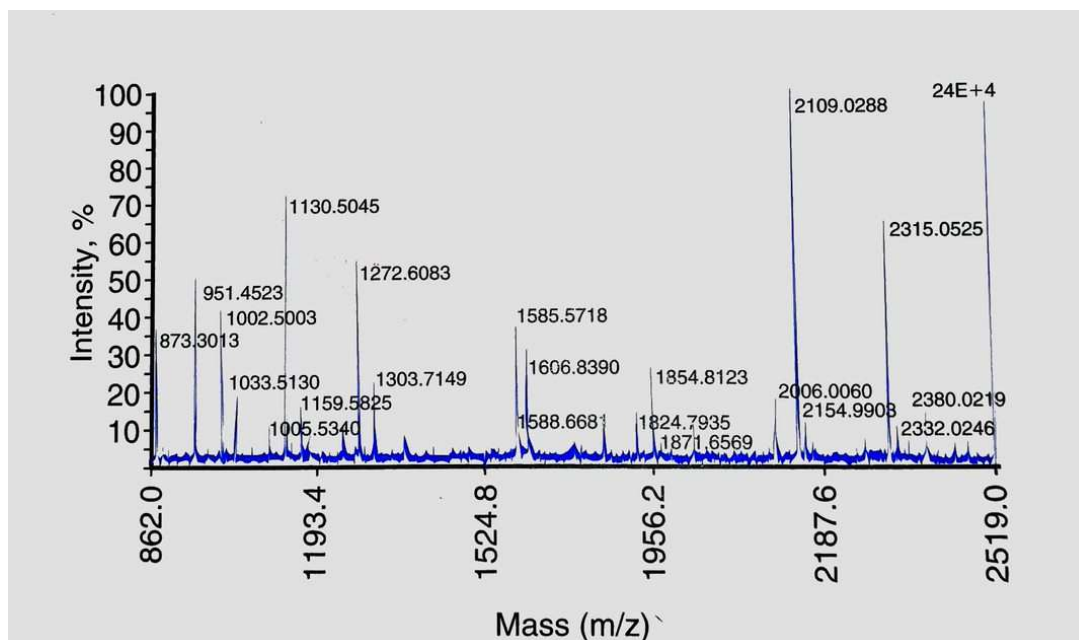
Før ionisering med MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) må prøven blandes med matriks, plasseres på en plate og tørkes. Matriks krystalliseres og analyttmolekyler innlemmes i krystallene. MALDI benytter en UV-laser som bestråler prøven kokrystallisert med matriks, slik at prøve og matriks «skytes ut» fra platen de er adsorbent til. Matriks ioniseres av laseren, og denne ladningen overføres til prøven ved at matriks-molekylene protonerer molekylene i prøven. Nøytrale molekylene fra prøven har nå fått en ladning. MALDI er en myk ioniseringsteknikk, da proteinene i prøven omdannes til ioniserte molekylene i gassfasen uten at de fragmenteres eller degraderes (50–53). Denne prosessen er beskrevet i figur 12 nedenfor.



Figur 12: Ionisering av en prøve kokrystallisert med matriks vha. MALDI. Figur tatt fra (50).

Ionene som er dannet ved hjelp av MALDI vil bevege seg inn i time-of-flight (TOF) masseanalysatoren hvor de akselereres i et magnetisk felt, og separeres i henhold til masse-ladning-ratioen ( $m/z$ ) deres. Ionene tilføres den samme kinetiske energien ved start, da vil ionene med den laveste  $m/z$ -ratioen bevege seg raskere gjennom det magnetiske feltet enn de med høyere  $m/z$ -ratio. Dermed vil lettere ioner nå detektoren tidligere enn tyngre ioner. Ved å måle tiden ionene benytter gjennom det magnetiske feltet kan størrelsen til ionene beregnes (50–53).

Det dannes massespektre (MS), hvor  $m/z$ -ratioen plottes mot relativ mengde av ioner. Førsteaksen viser dermed  $m/z$ -ratioen til hvert ion, og andreaksen viser mengden av hvert ion i forhold til ionet det er mest av. Dette ionet, «base peak», tildeles en relativ mengde på 100%, slik at de andre ionene fordeler seg deretter. Relativ mengde av et ion tilsvarer signalintensiteten. Ionet med en masse som tilsvarer det opprinnelige molekylet kalles et molekylion. Molekylionet kan fragmenteres, og produktene som dannes kalles fragmentioner. Både molekylionet og fragmentionene vil derfor være karakteristiske for forbindelsen som analyseres (52). Figur 13 viser et eksempel på et massespekter anskaffet ved bruk av MALDI-TOF MS. De dannede massespektrene sammenlignes med kjente massespektre fra databaser, og kan brukes i identifisering eller deteksjon av komponenter med kjente massespektre (53).



Figur 13: Figuren viser et eksempel på et massespekter anskaffet ved bruk av analysemetoden MALDI-TOF MS. Førsteaksen viser  $m/z$ -ratioen til ionene og andreaksen viser signalintensiteten til ionene gitt i prosent (%). «Base peak» kan her sees ved signaltoppen med høyest signalintensitet, som er signaltoppen med  $m/z$ -ratio 2109,0288. Molekylionet er ionet med størst masse, og kan sees ved signaltoppen med  $m/z$ -ratio  $24E + 4$ . Figur tatt fra (52).

### 1.13 Problemstilling

I denne bacheloroppgaven vurderes kittet MBT-STAR-Carba sin evne til å detektere karbapenemaseproduksjon i Gram-negative bakterier ved bruk av analysemetoden MALDI-TOF MS. Deteksjonsmetoden gjør det mulig å skille karbapenemresistente Gram-negative bakterier som produserer karbapenemaser fra Gram-negative bakterier med andre resistensmekanismer som gjør dem karbapenemresistente, samt bakterier uten karbapenemresistens.

## 2 Materiale og Metode

### 2.1 Prøvemateriale og kontroller

I dette prosjektet ble 35 Gram-negative bakterieisolat undersøkt for karbapenemaseproduksjon. Dette inkluderer kjente referansestammer, bakterieisolat sendt fra kompetansesenter for påvisning av antibiotikaresistens (K-res) i Tromsø, samt bakterieisolat fra pasientprøver fra avdeling for medisinsk mikrobiologi (AMM) ved St. Olavs hospital. Bakterieisolat 6 - 24 var tilsendt fra og analysert ved K-res, bakterieisolat 25 - 34 var pasientprøver analysert ved AMM og bakterieisolatene 1 - 5 var referansestammer.

Bakterieisolatenes resistensegenskaper var kjent som følge av tidligere analysering ved de ulike laboratoriene, før de ble tatt i bruk i bachelorprosjektet. Av de tildelte bakterieisolatene var 23 av isolatene karbapenemresistente som følge av karbapenemaseproduksjon. 12 av isolatene var karbapenemresistent med andre resistensmekanismer, eller ikke karbapenemresistent. Oversikt over bakterieisolatene med prøvenummer, bakterieart, evt. referansestamme og kjente gen/resistensegenskaper er presentert i tabell 6.

Referansestammene var fra stammesamlingene Culture Collection University of Gothenburg (CCUG) og American Type Culture Collection (ATCC) (54,55). Alle bakterieisolatene var spredd på blodagar (Columbia 5% Sheep Blood (SB)) ved prosjektstart.

Tabell 6: Tabellen presenterer bakterieisolatenes tildelte prøvenummer, evt. referansestamme, bakterieart og kjente gen/resistensegenskaper.

<b>Tildelt prøvenummer (evt. referansestamme)</b>	<b>Bakterieart</b>	<b>Gen/resistensegenskap</b>
<b>Positiv kontroll (Prøve 35) (ATCCBAA1705)</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
<b>Negativ kontroll (Prøve 5) (ATCC700603)</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Karbapenemase negativ
<b>Prøve 1 (CCUG64452)</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-48
<b>Prøve 2 (ATCCBAA1144)</b>	-	Karbapenemase negativ

<b>Prøve 3 (CCUG56233)</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
<b>Prøve 4 (CCUG58547)</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM
<b>Prøve 6</b>	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>complex</i>	KPC
<b>Prøve 7</b>	<i>Escherichia coli</i>	OXA-181
<b>Prøve 8</b>	<i>Escherichia coli</i>	IMP-26
<b>Prøve 9</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-162
<b>Prøve 10</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1
<b>Prøve 11</b>	<i>Enterobacter absuriae</i>	KPC-2
<b>Prøve 12</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-27
<b>Prøve 13</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-48
<b>Prøve 14</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM-1 OXA-181
<b>Prøve 15</b>	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>complex</i>	IMI-9
<b>Prøve 16</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2
<b>Prøve 17</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM-1
<b>Prøve 18</b>	<i>Klebsiella variicola</i>	OXA-48
<b>Prøve 19</b>	<i>Escherichia coli</i>	VIM-29
<b>Prøve 20</b>	<i>Proteus mirabilis</i>	NDM-1
<b>Prøve 21</b>	<i>Escherichia coli</i>	NDM-5
<b>Prøve 22</b>	<i>Citrobacter species</i>	NDM-1
<b>Prøve 23</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-48
<b>Prøve 24</b>	<i>Escherichia coli</i>	OXA-48
<b>Prøve 25</b>	<i>Escherichia coli</i>	Karbapenemase negativ
<b>Prøve 26</b>	<i>Escherichia coli</i>	Karbapenemase negativ
<b>Prøve 27</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Karbapenemase negativ
<b>Prøve 28</b>	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>complex</i>	Karbapenemase negativ



<b>Prøve 29</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Karbapenemase negativ
<b>Prøve 30</b>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Karbapenemase negativ
<b>Prøve 31</b>	<i>Escherichia coli</i>	Karbapenemase negativ
<b>Prøve 32</b>	<i>Escherichia coli</i>	Karbapenemase negativ
<b>Prøve 33</b>	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>complex</i>	Nedsatt følsomhet for meropenem
<b>Prøve 34</b>	<i>Hafnia alvei</i>	Nedsatt følsomhet for meropenem

To av de kjente referansestammene, ATCC700603 og ATCCBAA1705 ble anvendt som hhv. negativ og positiv kontrollstamme for analysemetoden MBT STAR-Carba. Disse referansestammene er spesifikt anbefalt til bruk som hhv. negativ og positiv kontroll for metoden MBT STAR-Carba (56). Referansestammene som ble brukt som kontroller ved MBT STAR-Carba kittet ble også analysert som prøver (prøve 5 og 35) med de andre anvendte analysemetodene. Dette inkluderer fenotypisk lappediffusjon, PCR og O.K.N.V.I. Resist-5. Ved bruk av PCR ble interne kontroller ved AMM anvendt. Referansestammer for kontroller og hvilke analysemetoder de ble anvendt ved er presentert i tabell 7.

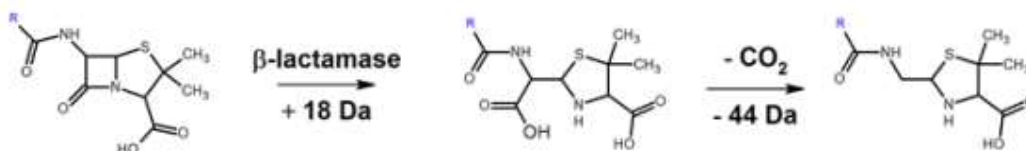
Tabell 7: Oversikt over hvilke referansestammer som benyttes som kontroller ved analysemetodene fenotypisk lappediffusjon, O.K.N.V.I. Resist-5, PCR og MBT STAR-Carba.

<b>Analysemetode</b>	<b>Kontroll</b>	<b>Referansestammer for kontroller</b>
<b>ROSCO</b>	-	Ingen referansestamme benyttet som kontroll
<b>PCR</b>	Positiv kontroll	A5-71 (NDM+) CCUG58547 (VIM+) CCUG56233 (KPC+) CCUG64452 (OXA-48+)
	Negativ kontroll	Ingen stammereferanse benyttet som kontroll
<b>O.K.N.V.I Resist-5</b>	-	Ingen stammereferanse benyttet som kontroll
<b>MBT STAR-Carba</b>	Positiv kontroll	ATCCBAA1705
	Negativ kontroll	ATCC700603

## 2.2 Deteksjon av karbapenemaseproduksjon i Gram-negative bakterier ved bruk av MBT STAR-Carba og analysemetoden MALDI-TOF MS

For å påvise karbapenemaseproduksjon i Gram-negative bakterier vha. MALDI-TOF MS ble kittet MBT STAR-Carba (*Bruker Daltonics GmbH & Co. KG*) benyttet. Kittet inneholder alle reagenser som er nødvendig for å utføre metoden. Blant reagensene er «MBT STAR-Carba Antibiotic Reagent» som inneholder karbapenemet imipenem. Andre reagenser i kittet inkluderer: MBT STAR Buffer, MBT STAR Matrix, MBT STAR Matrix Solvent og MBT STAR-ACS (56). Instrumentet MALDI Biotyper sirius fra produsenten Bruker ble benyttet til analyser utført med MBT STAR-Carba kittet.

Analysemetoden detekterer en forskyvning i massespekter, som skyldes at bakterieproduserte karbapenemaser hydrolyserer betalaktamringen i imipenem. Hydrolysering av betalaktamringen endrer strukturen, og dermed massen, til imipenemet og forårsaker et masseskift av imipenemets signaltopper (9). Figur 14 viser hvordan hydrolysering av betalaktamringen til et betalaktamantibiotika endrer den kjemiske strukturen til molekylet.



Figur 14: Figuren illustrerer hydrolysering av betalaktamringen til betalaktamantibiotika, samt reaksjoner som følger. Figur tatt fra (9).

Imipenem har forhåndsdefinerte signaltopper som er karakteristiske for molekylet. Ved hydrolysering av imipenems betalaktamring endres massen til imipenem, og dermed også signaltoppene. Hydrolysert imipenem har også karakteristiske signaltopper. Instrumentets software benytter signalintensiteten til de predefinerte toppene for både hydrolysert og ikke-hydrolysert imipenem til å beregne tallverdien logRQ for alle prøvene som analyseres. Formel 1 viser hvordan logRQ beregnes. Denne verdien representerer graden av hydrolysering av imipenem i prøven. En høy logRQ-verdi representerer en høy grad av hydrolysering (9).

$$\log RQ = \log \frac{\sum \text{intensities}_{\text{hydrolyzed}}}{\sum \text{intensities}_{\text{non-hydrolyzed}}} \quad (1)$$

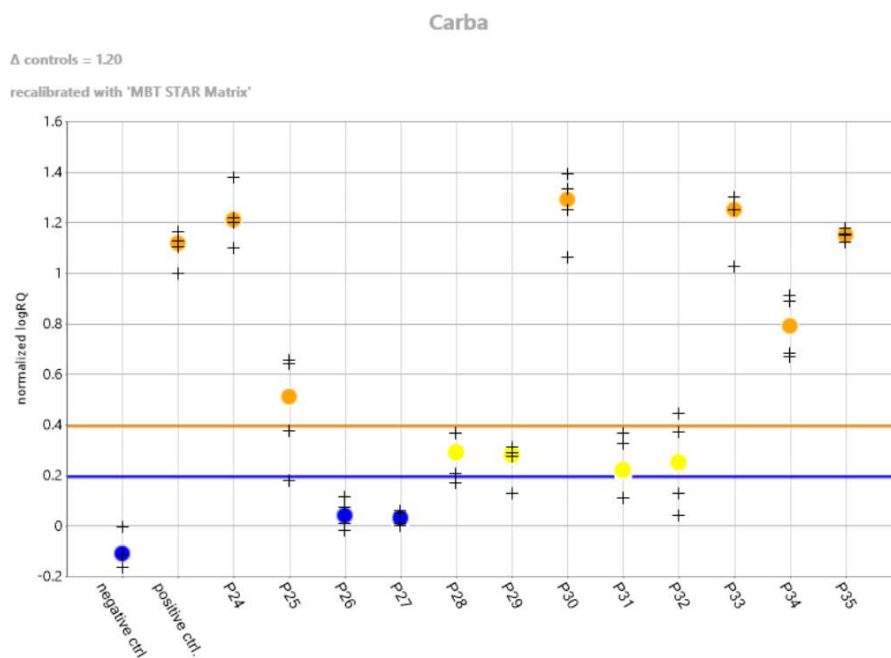
For hver analysegjennomkjøring med MBT STAR-Carba ble det analysert en positiv og en negativ kontrollstamme. Det blir også beregnet logRQ-verdier for kontrollstammene, hvor verdiene benyttes til å normalisere logRQ-verdiene til prøvene (9).

For at analysen skulle godkjennes måtte den beregnede delta-verdien til kontrollene være  $>0,70$ . Delta er en verdi som benyttes til å vurdere kvaliteten til kontrollene. Delta beregnes ved å trekke den negative kontrollens høyeste beregnede logRQ fra den positive kontrollens laveste beregnede logRQ. Disse verdiene utgjør de minst representative verdiene for kontrollene. Dersom delta beregnes til lavere enn kravet ( $>0,70$ ), vil ingen resultater presenteres av instrumentet MALDI Biotyper sirius fra produsenten Bruker (9).

Prøvene plasseres i et diagram, hvor en predefinert «Decision limit» er satt. Figur 15 viser eksempler på presentasjon av prøveresultat i det beskrevne diagrammet. «Decision limit» er empirisk bestemt for karbapenemet som benyttes i kittet. Nedre og øvre grense for «Decision limit» er i dette kittet definert ved normaliserte logRQ-verdier satt til hhv. 0,2 og 0,4 (9).

Prøvene klassifiseres som negative (non-hydrolysert) dersom de har en normalisert logRQ-verdi lavere enn den nedre grensen til «Decision limit», og positive (hydrolysert) dersom den normaliserte logRQ-verdien er høyere enn øvre grense i «Decision limit». Dersom prøvene får en normalisert logRQ-verdi innenfor «Decision limit» kan ikke prøvene differensieres (9).

Figur 15 illustrerer dette.



Figur 15: Figuren viser resultatet av en utført analyse med MBT STAR-Carba kittet ved hjelp av analyseprinsippet MALDI-TOF MS. X-aksen viser positiv kontroll, negativ kontroll og prøver. Y-aksen viser normalisert logRQ-verdi. Prøver og kontrollere hvor det ble detektert hydrolyse av imipenem er merket med oransje, og har en høyere normalisert logRQ-verdi enn øvre «Decision limit»-grense. Prøver og kontrollere hvor imipenem er non-hydrolysert er merket med blå, og har en lavere normalisert logRQ-verdi enn nedre «Decision limit»-grense. Prøver merket med gul er ikke differensiert, da de har en normalisert logRQ-verdi mellom øvre og nedre «Decision limit»-grense.

### 2.2.1 Utførelse av MBT STAR-Carba ved hjelp av analysemetoden MALDI-TOF MS

Bakterieisolatene ble spreidd på blodagar (Columbia 5% Sheep Blood (SB)) og inkubert i 18-24 timer ved 35°C +/- 2°C (CO<sub>2</sub> atmosfære), som anbefalt i manualen til MBT STAR-Carba kittet. Nødvendige reagenser, som MBT STAR-Carba Antibiotic Reagent og MBT STAR Matrix, ble også tillagd før utførelse av deteksjonsmetoden.

Bakteriesuspensjoner ble laget ved å slemme bakterier (1 µL, hvit øse) i MBT STAR-Carba Antibiotic Reagent. Bakteriesuspensjonene ble inkubert ved 35°C (+/- 2°C) i 30-35 minutter, under en konstant risting på 750rpm. Etter inkubering ble bakteriesuspensjonene (1 µL) overført til sin respektive brønn på platen. Matriks (1 µL) ble deretter tilsatt til bakteriesuspensjonene, før de ble analysert av instrumentet MALDI Biotyper sirius ved AMM.

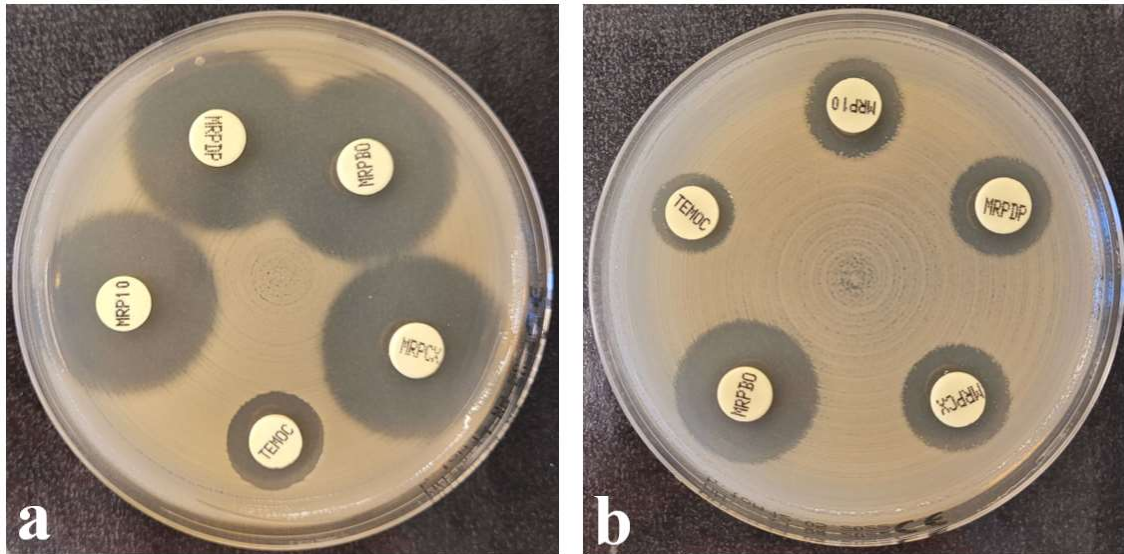
En detaljert fremgangsmåte for denne metoden kan sees i vedlegg 2.

## 2.3 Deteksjon av karbapenemaseproduksjon i Gram-negative bakterier ved bruk av andre anvendte analysemetoder

### 2.3.1 Fenotypisk påvisning av karbapenemaser med lappediffusjon

Alle bakterieisolatene ble undersøkt for karbapenemasene KPC, MBL og OXA-48 med fenotypisk lappediffusjon vha. kittet «KPC, MBL and OXA-48 Confirm Kit: Carbapenemases» (Rosco, Danmark) (57). Bakteriekolonier ble høstet og slemmet i NaCl (0,9 %) til 0,5 McFarland. Løsningene ble deretter spreidd på Muller Hinton agar (MH-agar) uten blod, og antibiotika- og kombinasjonslapper ble plassert på agaren. Antibiotikalappene og kombinasjonslappene som ble benyttet er beskrevet i tabell 8. MH-agarene ble deretter inkubert i 16-20 timer ved 35°C +/-2°C i vanlig atmosfære.

Etter inkubasjon ble det undersøkt for forekomst av synergi mellom antibiotika og betalaktamase-hemmer. Eventuell forskjell i hemningssoner mellom meropenem-lappen (MRP10) og kombinasjonslappene (MRPBO, MRPD og MRPCX) ble sammenlignet med kravene oppgitt i tabell 8. Denne tabellen er hentet fra St. Olavs EQS: «ESBL/ESBL carba hos Enterobacterales, screening, funn, besvaring» (22). Figur 16 viser resultatet av fenotypisk lappediffusjon for negativ kontroll (a) og positiv kontroll (b).



Figur 16: Illustrasjon av utført fenotypisk lappediffusjon ved hjelp av Rosco-kittet. Figuren viser resultatet av fenotypisk lappediffusjon for negativ kontroll (a) og positiv kontroll (b). For negativ kontroll (a) sees svært liten differanse mellom meropenemlappen (MRP10) og kombinasjonslappene (MRPBO, MRPDP og MRPCX). Bakteriestammen er negativ, og det sees ikke synergier. For positiv kontroll (b) som er positiv for KPC sees synergier i kombinasjonslappen som inneholder meropenem og borsyre (MRPBO). Differansen mellom hemningssonen rundt meropenem-lappen (MRP10) og kombinasjonslappen MRPBO er større enn 4 mm. Dette påviser tilstedeværelse av KPC, og samsvarer med kravene oppgitt i tabell 8.

Tilstedeværelse av OXA-48, OXA-48-lignende enzymer eller ESBL(a) kan verken bekreftes eller avkreftes med denne metoden. OXA-48 er normalt resistent mot middelet temocillin, men det har i senere tider blitt påvist OXA-48-lignende enzymer som er temocillin-sensitive. Testen kan dermed ikke utelukke om bakterieisolatet er negativ eller positiv for OXA-48, eller OXA-48-lignende enzymer. Dette gir en usikkerhet i resultatet, og må undersøkes ytterligere med supplerende tester, eksempelvis PCR og/eller O.K.N.V.I Resist-5.

Tabell 8: Tolkning av resultater ved fenotypisk påvisning av karbapenemaser (ESBL<sub>CARBA</sub>) i bakteriestammer fra familien Enterobacteriaceae. Tabellen viser krav til differanse i millimeteroner mellom meropenem-lapp og kombinasjonslapper.

		Meropenem + Phenylboronic MRPBO	Meropenem + DPA MRPDP	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	Temocillin <sup>(b)</sup> 30 µg
AmpC + porin loss	Meropenem 10 µg MRP10	≥ 4 mm and	≤ 3 mm	≥ 5 mm	≥ 12 mm
ESBL + porin loss (a)	Meropenem 10 µg MRP10	≤ 3 mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	≥ 12 mm
KPC	Meropenem 10 µg MRP10	≥ 4 mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	Variable
	Meropenem + Cloxacillin (MRPCX)	≥ 4 mm	-	-	-
MBL	Meropenem 10 µg MRP10	< 4 mm	≥ 5 mm	≤ 3 mm	Variable
OXA-48 and similars	Meropenem 10 µg MRP10	≤ 3 mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	≤ 12 mm
OXA-48 + ESBL (a)	Meropenem 10 µg MRP10	≤ 3 mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	≤ 12 mm

(a) Synergism CAZ / Clavulanate

(b) Hemningssonen rundt temocillin vurderes (ikke differansen til meropenems hemningssone). Temocillin er ikke en kombinasjonslapp og man kan derfor ikke vurdere synergi med meropenem.

### 2.3.2 PCR

Duplex PCR ble benyttet til å påvise resistensgenene VIM, NDM, KPC og OXA-48. Ved denne metoden benyttes to prober som er spesifikk for hvert sitt gen. Hver av probene har en unik fluorofor festet til seg slik at instrumentet kan skille mellom dem. Genene er fordelt i to ulike PCR-reaksjoner kalt «Carba 1» og «Carba 2» som beskrevet i tabell 9.

Tabell 9: Liste over fluoroforer og resistensgener som ble benyttet under hver PCR duplex-analyse.

Carba 1		Carba 2	
Resistensgen	Fluorofor	Resistensgen	Fluorofor
VIM	FAM	KPC	FAM
NDM	Texas Red	OXA-48	Texas Red

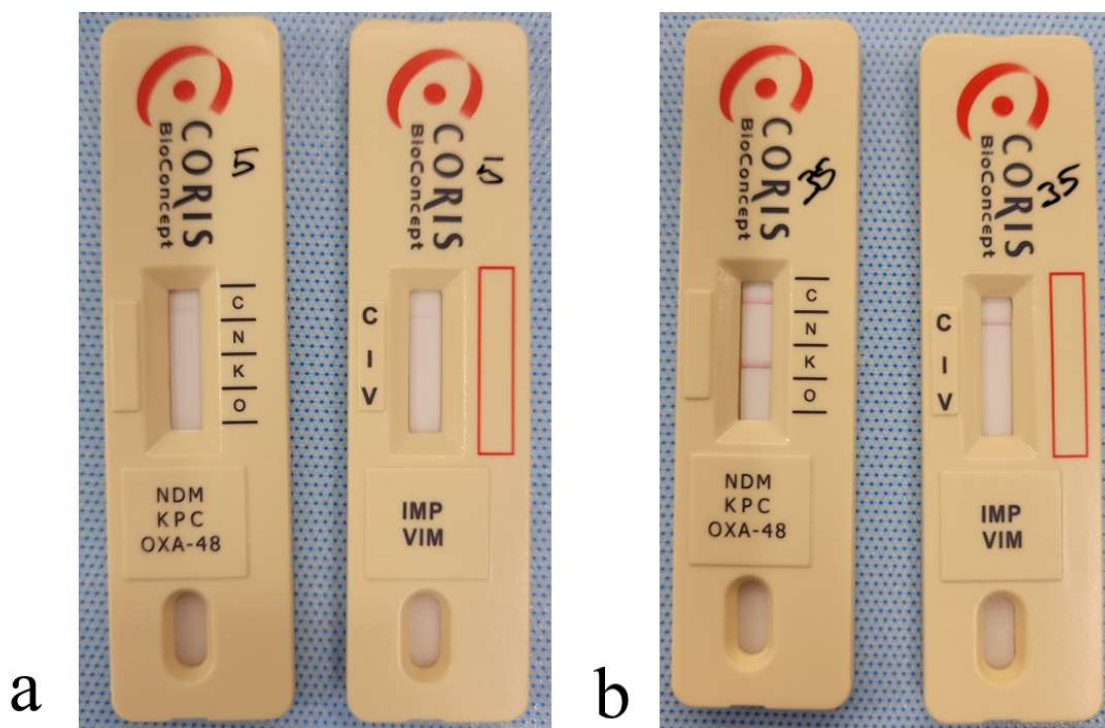
Før PCR-analysen ble DNA isolert fra bakterieisolatene ved hjelp av varmelysing. Ett rør med skrukork ble benyttet til hvert bakterieisolat. Det ble først tilsatt fosfatbufret saltvann (PBS) (200 µL). Bakteriekolonier (1 µL, hvit øse) fra isolatene ble slemmet oppi sitt respektive rør med PBS-løsning. Løsningene ble inkubert på varmeblokk (Eppendorf Thermomixer c), ved 95°C i 15 min, under konstant risting. Etter varmelysing ble alle løsningene fortynnet 1:10, med Molecular grade water (MGW, G-Biosciences).

Fremgangsmåten for utførelse av PCR-reaksjonen kan sees i St. Olavs hospitals prosedyre: «ESBL CARBA, Enterobacterales real-time PCR» (58).

### 2.3.3 O.K.N.V.I. Resist-5

O.K.N.V.I. Resist-5 (Coris BioConcept) ble benyttet til å påvise om bakterieisolatene produserer karbapenemasene; OXA-48, KPC, NDM, VIM og IMP. Kitten inneholder to lateral-flow-tester, som sees i figur 17. Den ene testen identifiserer OXA-48, KPC og NDM. Den andre testen identifiserer VIM og IMP. Ved positiv test for en eller flere av karbapenemasene dannes en rød linje ved siden av karbapenemasens tilhørende bokstav. For å kunne vurdere et gyldig testresultat skal det også dannes en rød linje ved test-kontrollens tilhørende bokstav (C). Bokstavene O, K, N, V og I representerte henholdsvis karbapenemasene OXA-48, KPC, NDM, VIM og IMP. Figur 17 viser resultatene av de to lateral-flow-testene for hhv. negativ kontroll (a) og positiv kontroll (b). Begge test-kontrollene fikk en rød eller lyserød strek, som kreves for å kunne avlese et gyldig test-resultat. Negativ kontroll (a) er negativ for alle de kjente karbapenemasene, da ingen ytterligere rød linje kan

sees. Positiv kontroll (b) er positiv for KPC, da en ytterligere rød linje kan sees ved bokstaven K.



Figur 17: Illustrasjon av utført O.K.N.V.I. Resist-5 test. Figuren viser resultatet av negativ kontroll (a) og positiv kontroll (b), hvor testene hhv. er merket med «5» og «35». Begge testene kan godkjennes, da en rød linje kan sees ved kontrollstripen. Enhver antydning til strek gjelder som et positivt resultat.

Testen ble utført ved å lage bakteriesuspensjoner i buffer for hver av bakterieisolatene og avsette 3 dråper av denne på applikasjonsstedet for prøven. Fremgangsmåten i vedlegg 3 ble fulgt for å utføre lateral-flow-testen. Resultatene av testen ble avlest innen 15 minutter etter applikasjon av prøven.



### 3 Resultater

MBT STAR-Carba kittet ble testet ut på 35 isolater som bestod av karbapenemresistente bakterier med ulike resistensmekanismer, samt isolater som ikke er resistente for karbapenemer. For å evaluere MBT STAR-Carba kittet ble de samme isolatene testet og sammenlignet med andre metoder som benyttes ved AMM i dag. Dette inkluderer O.K.N.V.I. Resist-5, som påviser kjente karbaresistens-gener, og fenotypisk påvisning med lappediffusjon. PCR er også en metode som benyttes, selv om den ikke er ferdig validert. Denne påviser også kjente karbaresistens-gener.

#### 3.1 Resultater oppnådd fra MBT STAR-Carba ved hjelp av MALDI-TOF MS

MBT STAR-Carba kittets evne til å detektere karbapenemaseproduksjon i Gram-negative bakterier ved hjelp av analysemetoden MALDI-TOF MS ble her undersøkt. Bakterieisolatene ble analysert over flere analysegjennomkjøringer. Alle de presenterte gjennomkjøringene fikk en delta på  $>70$  som oppfyller analysekravet for kvalitetskontrollene. Tabell 10 viser en oversikt over resultatene fra MBT STAR-Carba. Denne tabellen beskriver prøvenes differensiering, logRQ og delta for den aktuelle analysegjennomkjøringen.

Tjueto prøver ble differensiert ved første analysegjennomkjøring. Resultatene er i tabell 10 merket som hydrolysert (H) eller non-hydrolysert (NH). Prøvene 2, 28, 29, 31 og 32 ble ikke differensiert ved første analysegjennomkjøring. De aktuelle prøvene ble analysert på nytt samme dag ved bruk av de samme bakteriesuspensjonene, med unntak av prøve 2 som ble analysert på nytt dagen etter.

Tabell 10: Oppnådde resultater for deteksjon av karbapenemaseproduksjon i bakterieisolatene ved bruk av MBT STAR-Carba-kittet og analyseprinsippet MALDI-TOF MS. Prøver hvor imipenem ble hydrolysert er angitt som H og prøver hvor imipenem er non-hydrolysert er angitt som NH.

Prøvenummer	Differensiering	LogRQ	Delta
1	H	2,00	0,80
2	NH	-0,26	0,82
3	H	1,43	0,80
4	H	1,53	0,80
5	NH	-0,48	0,82
6	H	1,38	0,82
7	H	1,06	0,82
8	H	1,26	0,82

<b>9</b>	H	1,24	0,82
<b>10</b>	H	1,29	0,82
<b>11</b>	H	1,47	0,82
<b>12</b>	H	1,14	0,82
<b>13</b>	H	1,49	0,82
<b>14</b>	H	1,33	0,84
<b>15</b>	H	1,58	0,84
<b>16</b>	H	1,31	0,84
<b>17</b>	H	1,27	0,84
<b>18</b>	H	1,74	0,84
<b>19</b>	H	1,36	0,84
<b>20</b>	H	1,32	0,84
<b>21</b>	H	1,63	0,84
<b>22</b>	H	1,60	0,84
<b>23</b>	H	1,53	0,76
<b>24</b>	H	1,21	1,20
<b>25</b>	H	0,51	1,20
<b>26</b>	NH	0,04	1,20
<b>27</b>	NH	0,03	1,20
<b>28</b>	NH	-0,18	0,71
<b>29</b>	NH	-0,75	0,71
<b>30</b>	H	1,29	1,20
<b>31</b>	NH	-0,83	0,71
<b>32</b>	NH	-0,95	0,71
<b>33</b>	H	1,25	1,20
<b>34</b>	H	0,79	1,20
<b>35</b>	H	1,15	1,20

## 3.2 Resultater fra anvendte metoder ved AMM

### 3.2.1 Fenotypisk påvisning av karbapenemaser med lappediffusjon

Tilstedeværelse av karbapenemasene KPC, MBL og OXA-48 ble fenotypisk påvist ved hjelp av lappediffusjonskittet: «KPC, MBL and OXA-48 Confirm Kit: Carbapenemases». Tabell 11 viser antall prøver som fikk påvist karbapenemasene KPC og MBL, samt hvilke prøver som fikk resultatet OXA-48 eller lignende karbapenemaser (OXA-48 like). Som vedlegg 4 ligger en tabell med ytterligere resultater som ligger til grunn for oppsummeringen i Tabell 11.

Tabell 11: Resultater fra fenotypisk påvisning av karbapenemasene KPC, MBL og OXA-48 like i prøver, samt positiv kontroll-stamme (prøve 35) og negativ kontroll-stamme (prøve 5), ved bruk av lappediffusjonskittet fra Rosco.

Karbapenemaser	Antall positive prøver
KPC	6
MBL	7
OXA-48 like <sup>1</sup>	22

<sup>1</sup>Tilstedeværelsen av OXA-48 like enzymer kan ikke bekreftes eller avkreftes med kittet: «KPC, MBL and OXA-48 Confirm Kit: Carbapenemases». Bakterieisolater beskrevet som positive for OXA-48 like enzymer i denne tabellen kan derfor ikke utelukkes at er negative for karbapenemaser.

### 3.2.2 PCR

Duplex PCR ble benyttet for å påvise karbapenemasegenene KPC, NDM, VIM og OXA-48 i prøvene. Resultatene for prøvene, samt interne kontroller som er benyttet, er presentert i tabell 12. Fjorten av prøvene ble negative for alle genene som påvises med PCR-metoden. Negativ intern kontroll (MGW) for PCR-programmet ble også negativ for alle genene. De negative resultatene inngår ikke i tabellen. Ytterligere PCR-resultater kan sees i vedlegg 5 og 6.

Tabell 12: Antall prøver som er positive, inkludert positiv og negativ kontrollstamme (hhv. Prøve 35 og prøve 5), for karbapenemasegenene KPC, NDM, VIM og OXA-48 ved bruk av duplex PCR. De positive interne PCR-kontrollene er også oppført som positive for sine respektive karbapenemasegen.

Gener	Antall positive prøver	Positive interne kontroller
KPC	5	KPC+
NDM	5	NDM+
VIM	4	VIM+
OXA-48	8	OXA-48+

### 3.2.3 O.K.N.V.I. Resist-5

O.K.N.V.I. Resist-5, ble benyttet for å påvise produksjon av karbapenemasene OXA-48, KPC, NDM, VIM og IMP i bakterieisolatene. De oppnådde positive resultatene presenteres i tabell 13. Test-kontrollen ble godkjent for alle prøvene. Tretten av prøvene ble negative for alle karbapenemasene som påvises med O.K.N.V.I. Resist-5 og inngår ikke i tabellen.

Tabell 13: Resultater oppnådd ved testen O.K.N.V.I. Resist-5 presenteres i tabellen. Antall positive prøver for karbapenemasene; KPC, NDM, VIM, OXA-48 og IMP er oppgitt.

<b>Karbapenemaser</b>	<b>Positive prøver</b>
<b>KPC</b>	5
<b>NDM</b>	5
<b>VIM</b>	4
<b>OXA-48</b>	8
<b>IMP</b>	1

### 3.3 Samlet fremstilling av resultater

Resultatene fra MBT STAR-Carba ble sammenlignet med resultatene fra fenotypisk lappediffusjon, PCR og O.K.N.V.I Resist-5 som vist i tabell 14. De kvalitetssikrede resultatene som er brukt til sammenligning vises også i tabell 14.

For 27 av 35 (77,1%) bakterieisolater var det overensstemmelse mellom de ulike oppnådde resultatene fra analysemetodene. Av de 27 bakterieisolatene med overensstemmelse i resultatene var 8 (29,6%) non-hydrolyserte (NH) og 19 (70,4 %) hydrolyserte (H).

Som presentert i tabell 14 viser bakterieisolat 8, 14, 15, 20, 25, 30, 33, 34 uoverensstemmelse i resultatene oppnådd fra enkelte av de anvendte analysemetodene. Disse utgjør 22,9 % av bakterieisolatene.

Tabell 14: Samlet fremstilling av oppnådde resultater for påvist karbapenemase/gen for bakterieisolatene ved hjelp av MBT STAR-Carba, PCR, fenotypisk lappediffusjon og O.K.N.V.I. Resist-5. Tabellen viser også en oversikt over hvilke av bakterieisolatene som har kjente karbapenemaser. Resultater med uoverensstemmelse er farget oransje.

Bakterieisolat	MBT STAR-Carba	Fenotypisk lappediffusjon	PCR	O.K.N.V.I. Resist-5	Kjente karbapenemaser
1	H	OXA-48*	OXA-48	OXA-48	OXA-48
2	NH	OXA-48	Negativ	Negativ	Karbapenemase negativ
3	H	KPC	KPC	KPC	KPC
4	H	MBL	VIM	VIM	VIM
5	NH	OXA-48	Negativ	Negativ	Karbapenemase negativ
6	H	KPC	KPC	KPC	KPC
7	H	OXA-48	OXA-48	OXA-48	OXA-181
8	H	OXA-48	Negativ	IMP	IMP-26
9	H	OXA-48	OXA-48	OXA-48	OXA-162
10	H	MBL	VIM	VIM	VIM-1
11	H	KPC	KPC	KPC	KPC-2
12	H	MBL	VIM	VIM	VIM-27
13	H	OXA-48	OXA-48	OXA-48	OXA-48
14	H	OXA-48*	OXA-48 og NDM	OXA-48 og NDM	NDM-1 og OXA-181
15	H	KPC	Negativ	Negativ	IMI-9
16	H	KPC	KPC	KPC	KPC-2
17	H	MBL	NDM	NDM	NDM-1
18	H	OXA-48	OXA-48	OXA-48	OXA-48
19	H	MBL	VIM	VIM	VIM-29
20	H	OXA-48	NDM	NDM	NDM-1
21	H	MBL	NDM	NDM	NDM-5
22	H	MBL	NDM	NDM	NDM-1
23	H	OXA-48	OXA-48	OXA-48	OXA-48

<b>24</b>	H	OXA-48	OXA-48	OXA-48	OXA-48
<b>25</b>	H	OXA-48	Negativ	Negativ	Karbapenemase negativ
<b>26</b>	NH	OXA-48	Negativ	Negativ	Karbapenemase negativ
<b>27</b>	NH	OXA-48	Negativ	Negativ	Karbapenemase negativ
<b>28</b>	NH	OXA-48	Negativ	Negativ	Karbapenemase negativ
<b>29</b>	NH	OXA-48	Negativ	Negativ	Karbapenemase negativ
<b>30</b>	H	OXA-48	Negativ	Negativ	Karbapenemase negativ
<b>31</b>	NH	OXA-48	Negativ	Negativ	Karbapenemase negativ
<b>32</b>	NH	OXA-48	Negativ	Negativ	Karbapenemase negativ
<b>33</b>	H	OXA-48	Negativ	Negativ	Nedsatt følsomhet for meropenem
<b>34</b>	H	OXA-48	Negativ	Negativ	Nedsatt følsomhet for meropenem
<b>35</b>	H	KPC	KPC	KPC	KPC

\*Prøvene er KPC og MBL negative ifølge tolkningstabellen til lappediffusjonskittet «KPC, MBL and OXA-48 Confirm Kit: Carbapenemases».

## 4 Diskusjon

### 4.1 Resultatsammenligning, styrker og svakheter ved metodene

MBT STAR-Carba detekterte hydrolyse av imipenem i alle de 23 bakterieisolatene som hadde kjent karbapenemaseproduksjon. Det var også samsvar mellom resultatene fra alle de anvendte metodene for disse bakterieisolatene som presentert i tabell 14. Testen detekterte også hydrolyse av imipenem i prøvene 25, 30, 33 og 34. Disse prøvene hadde ingen kjent karbapenemaseproduksjon, og fikk heller ikke påvist dette med de andre anvendte metodene i bachelorprosjektet. De anvendte metodene vil bare påvise bestemte karbapenemaser eller karbapenemasegener. Ifølge tidligere rapporter som omtaler MBT STAR-Carba kittet kan metoden detektere hydrolysering av imipenem, uavhengig av hvilket enzym som gjør dette (59). En styrke med MBT STAR-Carba kan dermed være at nye karbapenemaser kan detekteres, som ikke kan detekteres ved bruk av de andre metodene.

Prøvene 33 og 34 har ikke en tidligere påvist karbapenemase eller et karbapenemasegen, men hydrolyserte i dette prosjektet imipenem, som ble detektert av MBT STAR-Carba. Begge disse bakterieisolatene har nedsatt følsomhet for meropenem, som tyder på at en annen resistensmekanisme kan være til stede. Tidligere rapporter som omtaler MBT STAR-Carba kittet påpeker at metoden bare påviser karbapenemresistens i form av betalaktamaser. Andre resistensmekanismer som porintap eller efflukspumper detekteres ikke, da dette ikke ender i hydrolysering av imipenem som metoden kan påvise (59). En mulig forklaring på detektert hydrolysering av imipenem i prøve 33 og 34 er at disse kan ha en karbapenemase til stede som ikke detekteres av de andre anvendte metodene. Dette gjelder også for prøve 25 og 30. En annen forklaring er at hydrolyseringen av imipenem i prøve 25, 30, 33 og 34 også kan skyldes en tilfeldig feil av MBT STAR-Carba. For å kunne være sikker på om hydrolyseringen skyldes en ukjent karbapenemase eller en tilfeldig feil vil et videre tiltak være å helgenomsekvensere de aktuelle bakterieisolatene. Prøvene bør også analyseres på nytt for å undersøke om det samme resultatet reproduseres.

Ved litteratursøk gjennom databasene «pubmed» (60) og «oria» (61) ble det ikke funnet fagartikler som antyder at deteksjon av karbapenemaser i bakterieartene til prøve 25, 30, 33 eller 34 er mer krevende enn i andre bakteriearter. Bakterieartene til prøvene er henholdsvis *E. coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae complex* (*E. cloacae complex*) og *Hafnia alvei*. Det ble heller ikke funnet noen fagartikler som antyder at autohydrolyse kan ha forårsaket disse uoverensstemmelsene. Videre litteratursøk på eventuell autohydrolyse av

imipenem ved bruk av MBT STAR-Carba kan være aktuelt. Det samme kan litteratursøk om spesielle utfordringer knyttet til deteksjon av karbapenemaser i bestemte bakteriarter.

En annen viktig feilkilde å vurdere ved uventede resultater, er om det kan ha skjedd en prøveforbytting. En mulighet er å spre bakteriestammen på nye skåler flere ganger, og utføre analysene på nytt. Får prøvene samme resultat ved flere gjennomkjøringer er sannsynligheten mindre for at det kan ha skjedd en prøveforbytting. Helgenomsekvensering av prøven etter analysering er en annen mulighet for å utelukke at prøveforbytting kan ha skjedd.

MBT STAR-Carba hydrolyserte imipenem i prøvene 8, 14, 15 og 20, noe som er forventet ut fra at prøvene tidligere har fått påvist karbapenemasegen. Det var imidlertid uoverensstemmelse mellom enkelte av de oppnådde resultatene for prøvene i tabell 14, ved bruk av de andre anvendte metodene.

For prøve 8, som er IMP-26 positiv, er det overensstemmelse i resultatene mellom MBT STAR-Carba og O.K.N.V.I Resist-5. PCR påviste som forventet ikke genet IMP-26 i prøve 8, fordi metoden kun påviser genene VIM, NDM, KPC og OXA-48. Ved fenotypisk lappediffusjon ble ikke IMP-26 påvist, selv om dette er en MBL. Ifølge pakningsvedlegget til «KPC, MBL and OXA-48 Confirm Kit: Carbapenemases» vil metoden kun påvise NDM- og VIM-typer av MBL (62). Det vil derfor også her være forventet at IMP-26 ikke detekteres.

Prøve 15, som er en *E. cloacae complex*, har et kjent karbapenemasegen, IMI-9. Det var uoverensstemmelser mellom det kjente karbapenemasegenet og de anvendte metodene PCR, O.K.N.V.I. Resist-5 og fenotypisk lappediffusjon. En begrensning for disse metodene er at genet/karbapenemasegenet IMI-9 ikke påvises. Et uventet resultat var at KPC ble påvist ved fenotypisk lappediffusjon. Det kan være verdt å undersøke om det er av betydning at KPC og IMI begge er karbapenemaser som tilhører Ambler-klasse A. Både KPC og IMI hemmes av betalaktamasehemmeren borsyre, som benyttes i lappediffusjonskittet «KPC, MBL and OXA-48 Confirm Kit: Carbapenemases». I en rapport fra K-res (63) fikk IMI-positive bakterieisolater av *E. cloacae complex* påvist KPC eller annen klasse A karbapenemase ved bruk av det overnevnte lappediffusjonskittet. Dette underbygger overnevnte hypotese, og kan være en forklaring på hvorfor fenotypisk lappediffusjon påviste KPC for prøve 15.

Det er også andre mulige årsaker til uoverensstemmelse mellom resultatene fra fenotypisk lappediffusjon og de andre anvendte metodene, slik det ble for prøvene 14, 15 og 20. Prøve 14, som er NDM-1 og OXA-181 positiv, og prøve 20, som er NDM-1 positiv, har kjent karbapenemaseproduksjon, som påvises av MBT STAR-Carba. For prøve 14 gjenspeiler ikke



dette resultatet av fenotypisk lappediffusjon, som ble negativ for MBL, og dermed NDM-1. MBL ble heller ikke påvist ved fenotypisk lappediffusjon av prøve 20.

Manglende eller feil påvisning av karbapenemaseproduksjon ved lappediffusjon kan skyldes for eksempel svikt i antibiotikalappene eller at bakterien ikke uttrykker karbapenemase fenotypisk. En annen usikkerhet ved fenotypisk lappediffusjon er at enkelte bakteriestammer kan ha egenskaper som gjør det vanskelig å få til en fullstendig homogen bakterieløsning, f.eks. dersom bakteriene løses dårlig i vann. Dette kan forårsake en falsk for lav tetthet i bakterieløsningen. Sverming er en annen egenskap ved noen bakterietyper som også kan gjøre avlesning av hemningszone utfordrende. Prøve 20 er en *Proteus mirabilis* som svermer på vekstmedier, noe som kan være en grunn til at NDM-1 ikke ble påvist ved fenotypisk lappediffusjon for denne prøven. Ettersom prøvene 14, 15 og 20 fikk uventede svar ved bruk av fenotypisk lappediffusjon, vil et videre tiltak være å utføre en ny fenotypisk lappediffusjon av de aktuelle prøvene for å undersøke om samme resultat reproduseres.

EQS-prosedyren «ESBL/ESBL Carba hos Enterobacterales, screening, funn, besvaring» (22) sier at bekrefting eller avkrefting av karbapenemaser/karbapenemasegen først skal skje etter en samlet vurdering av fenotypiske og genotypiske tester. Dette fordi det er usikkerheter, begrensninger og mulige feilkilder ved de ulike metodene.

#### 4.2 Videre tiltak for vurdering om MBT STAR-Carba kittet skal tas i bruk ved AMM

For å kunne vurdere om MBT STAR-Carba kittet kan tas i bruk for deteksjon av karbapenemaseproduksjon i Gram-negative bakterier ved AMM, er det nødvendig med videre utprøving av metoden. Bakteriestammene som ble analysert i bachelorprosjektet bør analyseres flere ganger ved bruk av MBT STAR-Carba, for å undersøke metodens reproduserbarhet og repeterbarhet. I tillegg bør bakterieisolatene 25-34 helgenomsekvenseres, da disse ikke var helgenomsekvensert i forkant av bachelorprosjektet. Deretter bør ny resultatsammenligning ved bruk av metodene MBT STAR-Carba, PCR, fenotypisk lappediffusjon og O.K.N.V.I. Resist-5 utføres.

## 5 Konklusjon

Ved bruk av MBT STAR-Carba kittet ble karbapenemaseproduksjon detektert i alle de 23 bakterieisolatene som i forkant av bachelorprosjektet fikk påvist karbapenemaseproduksjon ved helgenomsekvensering. Dette ble også bekreftet ved hjelp av de andre metodene som ble undersøkt.

Det forekom uoverensstemmelser i resultatene mellom MBT STAR-Carba og de andre anvendte metodene; fenotypisk lappediffusjon, PCR og O.K.N.V.I. Resist-5 for prøvene 25, 30, 33 og 34. MBT STAR-Carba detekterte hydrolyse av imipenem i prøvene selv om de ikke hadde kjent karbapenemaseproduksjon, eller fikk dette påvist ved bruk av de andre anvendte metodene i bachelorprosjektet. For å vurdere om hydrolyseringen skyldes en tilfeldig feil av MBT STAR-Carba eller en karbapenemase som ikke påvises med de andre anvendte metodene i prosjektet, er det nødvendig å utføre helgenomsekvensering av de aktuelle bakterieisolatene.

Videre tiltak i form av reanalysering av alle bakterieisolatene og helgenomsekvensering av aktuelle bakterieisolater må utføres for å vurdere om MBT STAR-Carba ikke bare kan påvise, men også med sikkerhet kan avkrefte karbapenemaseproduksjon i bakterieisolater. Det bør også utelukkes om eventuelle feil kan skyldes autohydrolyse. Dersom MBT STAR-Carba etter videre tiltak viser god presisjon, resultatene stemmer overens med de andre anvendte analysemetodene og uoverensstemmelser i prøver hvor hydrolysering av imipenem ble detektert utelukkes ved helgenomsekvensering, kan analysemetoden være et godt tilskudd for å detektere kjente og ukjente karbapenemaser i Gram-negative bakterieisolater ved avdeling for medisinsk mikrobiologi ved St. Olavs hospital.

## 6 Referanser

1. Rollag H, Müller F, Tønjum T. Kapittel 44: Antibakterielle midler. I: Medisinsk mikrobiologi. 4. utg. Oslo: Gyldendal; 2019.
2. Sosial- og helsedepartementet. Plan for å motvirke antibiotikaresistens [Internett]. 030005-990326. regjeringen.no; 1998 [sitert 28. mars 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.regjeringen.no/no/dokumenter/plan-for-a-motvirke-antibiotikaresistens/id101959/>
3. Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, Colenso CK, Hirvonen VHA, Takebayashi Y, mfl.  $\beta$ -Lactamases and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J Mol Biol.* 23. august 2019;431(18):3472–500.
4. Singer M, Nambiar S, Valappil T, Higgins K, Gitterman S. Historical and Regulatory Perspectives on the Treatment Effect of Antibacterial Drugs for Community-Acquired Pneumonia. *Clinical Infectious Diseases.* 1. desember 2008;47(Supplement\_3):S216–24.
5. C. Haldorsen B, Samuelsen Ø. Multiresistente Gram-negative bakterier - et økende globalt helseproblem. *Bioingeniøren.* 2012;16–21.
6. Bush K, Bradford PA.  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 1. august 2016;6(8):a025247.
7. Fisher JF, Mobashery S.  $\beta$ -Lactam Resistance Mechanisms: Gram-Positive Bacteria and *Mycobacterium tuberculosis*. *Cold Spring Harb Perspect Med.* mai 2016;6(5):a025221.
8. Sharma R. Cell wall synthesis inhibitors- Definition, Examples, Inhibition, Resistance [Internett]. *The Biology Notes.* 2021 [sitert 10. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://thebiologynotes.com/cell-wall-synthesis-inhibitors/>
9. MBT STAR-BL Module User Manual. Bruker Daltonik GmbH; 2019. REF: 1836423.
10. Harris PNA. Clinical Management of Infections Caused by Enterobacteriaceae that Express Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase and AmpC Enzymes. *Semin Respir Crit Care Med.* februar 2015;36(1):56–73.
11. Olsvik Ø. Antibiotikaresistens - en gammel fiende. *Bioingeniøren.* 2012;8–10.
12. How Bacteria Build Resistance at the Cellular Level [Internett]. GW-UMT. 2017 [sitert 9. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://onlinepublichealth.gwu.edu/resources/antibiotic-resistance-at-cellular-level/>
13. Andreassen L. Bakteriologi for dummies. *Bioingeniøren.* 2012;11.
14. Bush K, Fisher JF. Epidemiological Expansion, Structural Studies, and Clinical Challenges of New  $\beta$ -Lactamases from Gram-Negative Bacteria. *Annual review of microbiology.* 2011;65(1):455–78.
15. Christensen SB. Drugs that changed society: History and current status of the early antibiotics: Salvarsan, sulfonamides, and  $\beta$ -lactams. *Molecules (Basel, Switzerland).* 2021;26(19):6057-.

16. Khanna NR, Gerriets V. Beta Lactamase Inhibitors. I: StatPearls [Internett]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [sitert 10. mai 2022]. Tilgjengelig på: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557592/>
17. Drawz SM, Bonomo RA. Three Decades of  $\beta$ -Lactamase Inhibitors. *Clin Microbiol Rev.* januar 2010;23(1):160–201.
18. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a Clinical Update. *Clin Microbiol Rev.* oktober 2005;18(4):657–86.
19. Sletteng SA. I førstelinjen mot resistente bakterier. *Bioingeniøren.* 2012;12–5.
20. Smith HZ, Kendall B. Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae. I: StatPearls [Internett]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [sitert 28. mars 2022]. Tilgjengelig på: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551704/>
21. Codjoe FS, Donkor ES. Carbapenem Resistance: A Review. *Med Sci (Basel).* 21. desember 2017;6(1):1.
22. Husby A, Lind Kroknes M. ESBL/ESBL Carba hos Enterobacterales, screening, funn, besvaring. St. Olavs hospital - avdeling for medisinsk mikrobiologi; 2021. ID-nr: 38912 – EQS.
23. Wilson H, Török ME. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Microbial Genomics* [Internett]. juli 2018 [sitert 11. mai 2022];4(7). Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6113871/>
24. World Health Organization (WHO). WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed [Internett]. [sitert 11. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
25. Yam ELY, Hsu LY, Yap EPH, Yeo TW, Lee V, Schlundt J, mfl. Antimicrobial Resistance in the Asia Pacific region: a meeting report. *Antimicrob Resist Infect Control.* desember 2019;8(1):202.
26. Sugianli AK, Ginting F, Parwati I, de Jong MD, van Leth F, Schultsz C. Antimicrobial resistance among uropathogens in the Asia-Pacific region: a systematic review. *JAC-Antimicrobial Resistance.* 18. januar 2021;3(1):dlab003.
27. World Health Organization (WHO). Surveillance in emergencies [Internett]. [sitert 27. april 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.who.int/emergencies/surveillance>
28. World Health Organization (WHO). Antibiotic resistance [Internett]. 2020 [sitert 14. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
29. World Health Organization (WHO). Antimicrobial resistance in the South-East Asia [Internett]. [sitert 27. april 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.who.int/southeastasia/health-topics/antimicrobial-resistance>

30. Rajagopal K, Chandy SJ, Graham JP. A One Health Review of Community-Acquired Antimicrobial-Resistant Escherichia coli in India. IJERPH. 18. november 2021;18(22):12089.
31. U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Antibiotic Resistance Threats in the United States 2019. Atlanta: GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019 des.
32. World Health Organization and the European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022 - 2020 data. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2022.
33. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Surveillance Atlas of Infectious Diseases [Internett]. [sitert 12. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>
34. Akselsen PE, Torp Andersen C, Salvesen Blix H, Caugant D, Elstrøm P, Enger H, mfl. NORM/NORM-VET 2020. Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway. Tromsø/Oslo: Norsk overvåkingssystem for antibiotikaresistens hos mikrober (NORM), Veterinærinstituttet (VET) og Folkehelseinstituttet (FHI); 2021. Report No.: ISSN:1502-2307 (print) / 1890-9965 (electronic).
35. Skov Simonsen G, Torp Andersen C, Caugant D, Elstrøm P, Enger H, Width Gran F, mfl. NORM/NORM-VET 2020. Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway: Human Clinical Isolates. Tromsø/Oslo: Norsk overvåkingssystem for antibiotikaresistens hos mikrober (NORM), Veterinærinstituttet (VET) og Folkehelseinstituttet (FHI); 2021. Report No.: ISSN:1502-2307 (print) / 1890-9965 (electronic).
36. Samuelsen Ø, Janice J, Sundsfjord A, Elstrøm P, Kacelnik O. Carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Norway 2020. Norwegian National Advisory Unit on Detection of Antimicrobial Resistance, Department of Microbiology and Infection Control, University Hospital of North Norway and UiT The Arctic University of Norway, Tromsø, Department of Antibiotic Resistance and Infection Prevention, Norwegian Institute of Public Health; 2020 Norge. Report No.: ISSN:1502-2307 (print) / 1890-9965 (electronic).
37. Høie B, Aspaker E, Listhaug S, Sundtoft T. Nasjonal strategi mot Antibiotikaresistens 2015–2020. Oslo: Helse- og omsorgsdepartementet; 2015 jun s. 1–30. Report No.: I-1164 B.
38. Salvesen Blix H, Neteland M, Akselsen PE, Høye S. NORM/NORM-VET 2020. Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway: Usage in Humans. Tromsø/Oslo: Norsk overvåkingssystem for antibiotikaresistens hos mikrober (NORM), Veterinærinstituttet (VET) og Folkehelseinstituttet (FHI); 2021. Report No.: ISSN:1502-2307 (print) / 1890-9965 (electronic).
39. Helsedirektoratet - Avdeling kommunale helse- og omsorgstjenester. 2018: Statusrapport fra styringsgruppen Handlingsplan mot antibiotikaresistens i helsetjenesten [Internett]. 2019 nov s. 1–40. Report No.: IS-2863. Tilgjengelig på: <http://www.helsedirektoratet.no/>

40. Universitetssykehuset Nord-Norge. NORM - Norsk overvåkingssystem for antibiotikaresistens hos mikrober [Internett]. 2022 [sitert 13. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://unn.no/fag-og-forskning/norm-norsk-overvakingssystem-for-antibiotikaresistens-hos-mikrober>
41. Universitetssykehuset Nord-Norge. K-res - Nasjonal kompetansetjeneste for påvisning av antibiotikaresistens [Internett]. 2022 [sitert 13. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://unn.no/fag-og-forskning/k-res>
42. Folkehelseinstituttet (FHI). Om Meldingssystem for smittsomme sykdommer (MSIS) [Internett]. 2022 [sitert 13. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.fhi.no/hn/helseregistre-og-registre/msis/meldesystemet-for-smittsomme-sykdommer/>
43. Nasjonal kompetansetjeneste for antibiotikabruk i spesialisthelsetjenesten (KAS). Om kompetansetjenesten – Antibiotika.no [Internett]. 2022 [sitert 13. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.antibiotika.no/kas-2/om-kompetansetjenesten-2/>
44. Helse- og omsorgsdepartementet. Handlingsplan mot antibiotikaresistens i helsetjenesten [Internett]. 2016 s. 1–23. Report No.: I-1171 B. Tilgjengelig på: <https://www.regjeringen.no/contentassets/915655269bc04a47928fce917e4b25f5/handlingsplan-antibiotikaresistens.pdf>
45. Folkehelseinstituttet (FHI). Én-helse (One Health) [Internett]. 2020 [sitert 15. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.fhi.no/sv/smittsomme-sykdommer/smitte-fra-mat-vann-dyr/flere-artikler/en-helse/>
46. Nordic Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - NordicAST. Brytpunktstabeller [Internett]. NordicASTs breakpoint tables. [sitert 18. mai 2022]. Tilgjengelig på: <http://www.nordicast.org/brytpunktstabeller>
47. Nordic Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (NordicAST). NordicAST brytningspunktstabell v. 12.0 2022. 2022.
48. O.K.N.V.I. Resist-5. Coris BioConcept;
49. Ota Y, Furuhashi K, Hirai N, Ishikawa J, Nagura O, Yamanaka K, mfl. Evaluation of MBT STAR-Cepha and MBT STAR-Carba kits for the detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and carbapenemase producing microorganisms using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Microbiol Methods*. 1. april 2021;183:106166.
50. Proteomics C. MALDI-TOF Mass Spectrometry [Internett]. Creative Proteomics. [sitert 18. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.creative-proteomics.com/technology/maldi-tof-mass-spectrometry.htm>
51. Bruker. MALDI-TOF [Internett]. [sitert 18. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/mass-spectrometry/maldi-tof.html>
52. Rifai N, Horvath AR, Wittwer CT. Tietz fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics. 8. St. Louis, Mo: Elsevier; 2019. 201–214 s.

53. Haugum K, Bjørkli Rolstad K, Nergård Valle SB. MALDI-TOF MS, Identifikasjon av bakterier og gjærsopp. St. Olavs hospital - avdeling for medisinsk mikrobiologi; 2021. ID-nr: 20838 – EQS.
54. Culture Collection University Of Gothenburg [Internett]. [sitert 19. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.ccug.se/>
55. ATCC: The Global Bioresource Center [Internett]. [sitert 19. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.atcc.org/>
56. Instructions for Use MBT STAR-Carba Kit. Bruker; 2019. REF: 1867701.
57. Rosco Kits [Internett]. [sitert 19. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.rosco.dk/?id=14&c=Detection-of-resistance-mechanisms>
58. Ukjent forfatter før prosedyren er godkjent/revidert. ESBL CARBA, Enterobacterales real-time PCR. ID-nr: 44618.
59. Anantharajah A, Tossens B, Olive N, Kabamba-Mukadi B, Rodriguez-Villalobos H, Verroken A. Performance Evaluation of the MBT STAR®-Carba IVD Assay for the Detection of Carbapenemases With MALDI-TOF MS. *Front Microbiol.* 20. juni 2019;10:1413.
60. National Center for Biotechnology Information (NCBI), National Library of Medicine (NLM) , NIH. PubMed [Internett]. [sitert 17. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>
61. NTNU Universitetsbiblioteket. oria.no [Internett]. [sitert 17. mai 2022]. Tilgjengelig på: [https://bibsys-almaprimo.hosted.exlibrisgroup.com/primo-explore/search?vid=NTNU\\_UB](https://bibsys-almaprimo.hosted.exlibrisgroup.com/primo-explore/search?vid=NTNU_UB)
62. ROSCO. KPC/Metallo-B-Lactamase Confirm Kit, KPC+MBL detection Kit, KPC/MBL and OXA-48 Confirm Kit. ROSCO; 2017.
63. K-res. Meropenem screeningsbrytningspunkt Enterobacterales 2018.
64. Giske CG, Sundsfjord AS, Kahlmeter G, Woodford N, Nordmann P, Paterson DL, mfl. Redefining extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: balancing science and clinical need. *J Antimicrob Chemother.* januar 2009;63(1):1–4.

## 7 Vedlegg

### Vedlegg 1

En fullstendig oversikt over Giske og kollegaer sitt forslag om klassifikasjon av ESBL inn i subgruppene ESBL<sub>A</sub>, ESBL<sub>M</sub> og ESBL<sub>CARBA</sub>. Figuren viser også definisjonene av de ulike subgruppene. Figur tatt fra (64).

Acquired $\beta$ -lactamases with hydrolytic activity against extended-spectrum cephalosporins and/or carbapenems			
	ESBL <sub>A</sub>	ESBL <sub>M</sub>	ESBL <sub>CARBA</sub>
$\beta$ -Lactamase classes	High prevalent ESBL <sub>A</sub> CTX-M TEM-ESBLs SHV-ESBLs VEB PER	ESBL <sub>M-C</sub> (Plasmid-mediated AmpC) CMY FOX MIR MOX DHA LAT BIL ACT ACC	ESBL <sub>CARBA-A</sub> KPC GES-2, -4, -5, -6, -8 NMC SME IMI-1, -2
	Low prevalent ESBL <sub>A</sub> GES-1, -3, -7, -9 SFO-1 BES-1 BEL-1 TLA IBC CMT <sup>a</sup>	ESBL <sub>M-D</sub> (OXA-ESBL) OXA-10-group OXA-13-group OXA-2-group OXA-18 OXA-45	ESBL <sub>CARBA-B</sub> (MBL) IMP VIM SPM-1 GIM-1 SIM-1 AIM-1
			ESBL <sub>CARBA-D</sub> (OXA-carbapenemases) OXA-23-group OXA-24-group OXA-48 <sup>b</sup> OXA-58-group
Operational definition	Non-susceptibility to extended-spectrum cephalosporins  AND clavulanate synergy	Non-susceptibility to extended-spectrum cephalosporins  AND phenotypic detection (ESBL <sub>M-C</sub> ) OR genotypic detection (ESBL <sub>M-D</sub> )	Non-susceptibility to extended-spectrum cephalosporins and at least one carbapenem  AND ESBL <sub>CARBA</sub> detected with phenotypic and/or genotypic methods

<sup>a</sup>Resistant to clavulanic acid inhibition.

<sup>b</sup>OXA-48 producing isolates may appear susceptible to cephalosporins *in vitro*.



## Vedlegg 2

Norsk oppsummering av fremgangsmåten beskrevet i brukermanualen for MBT STAR-Carba kittet: «Instructions for Use MBT STAR-Carba Kit» (56). Den norske fremgangsmåten er benyttet i bachelorprosjektet.

### Tillaging av MBT STAR-Carba Antibiotic Reagent:

1. Ta MBT STAR-Carba Antibiotic Reagent, samt MBT STAR Buffer, ut av fryseren og vent til de når romtemperatur (20 - 25°C).
  - Antall beholdere med MBT STAR-Carba Antibiotic Reagent som er nødvendig kan regnes ut ved formelen nedenfor:
$$\text{Antall beholdere} = \frac{(\text{Antall prøver} + \text{Antall kontroller})}{3}$$
2. Bland bufferen kort vha. vortex.
3. Åpne MBT STAR-Carba Antibiotic Reagent, og ta ut rørene.
  - Rist ned innholdet.
4. Tilsett MBT STAR Buffer (50 µL) til hver tube med MBT STAR-Carba Antibiotic Reagent og mix vha. vortex i 30 sekunder (+/- 5 sekunder).
  - Pipettespissen skal ikke berøre røret ved avsetting.
5. La løsningene stå i 2 minutter (+/- 30 sekunder) før de igjen vortexes i 30 sekunder (+/- 5 sekunder).

### Tillaging av MBT STAR Matrix:

1. Ta MBT STAR Matrix og MBT STAR Matrix solvent ut av fryseren og vent til de når romtemperatur (20 - 25°C).
2. Bland MBT STAR Matrix solvent kort vha. vortex.
3. Tilsett MBT STAR Matrix solvent (50 µL) til MBT STAR Matrix tuben og mix vha. vortex i 2 minutter (+/- 30 sekunder).

### Carba Workflow:

1. Sett inkubator til de rette innstillingene: 35°C (+/- 2°C) i 30 - 35 minutter, risting ved 750rpm.
  - NB! Enkelte bakterietyper, t.d *Acinetobacter spp.*, skal ha forlenget inkuberingstid, 60 – 65 minutter.

2. Høst kolonier fra stammereferansene/prøvene vha. hvit øse (1 µL), og slem disse oppi tillagde MBT STAR-Carba Antibiotic Reagent. Bland godt slik at løsningen blir homogen og blakket.
  - Løsningen skal ha samme utseende som fortynnet skummet melk.
  - NB! Vær konsekvent med mengde bakterier og farge på løsning.
3. Vortex løsningene i 10 sekunder (+/- 5 sekunder).
4. Inkuber løsningene ved de oppgitte innstillingene, under risting.
5. Klargjør instrumentet, MALDI Biotyper sirius. Skriv ut prøveoppsettet på prøvebrønnene.
  - Hver prøve/kontroll får tildelt 2 brønner.
6. Tilsett aktuelle kolonier og MBT STAR-ACS (1 µL) i angitte brønner. La tørke.
7. Tilsett MBT STAR Matrix (1 µL) til alle de brukte brønnene. La tørke.
8. Sett prøvebrønnene på instrumentet, MALDI Biotyper sirius, og følg prosedyren i «MBT STAR-BL Module User Manual» (9).

## Vedlegg 3

Pakningsvedlegget til O.K.N.V.I. Resist-5. Fremgangsmåten for metoden kan sees under overskriften «VIII. Procedure».

### O.K.N.V.I. RESIST-5



www.corisbio.com  
IFU-58R11/TB/01

Manufacturer:  
Coris BioConcept  
Science Park CREALYS  
Rue Jean Sonet 4A  
B - 5032 GEMBOUX  
BELGIUM  
Tel.: +32(0)81.719.917  
Fax: +32(0)81.719.919  
info@corisbio.com  
Produced in BELGIUM

**In vitro rapid diagnostic test for the detection of OXA-48, KPC, NDM, VIM and IMP carbapenemases in bacterial culture**

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE  
FOR PROFESSIONAL USE ONLY

EN

References: K-15R11, 2x20 cassettes, buffer, 20 tubes and droppers

(EN) For instructions For Use in your language: (FR) Pour obtenir les notices dans la langue de votre choix: (ES) Para las instrucciones de uso en su idioma: (PT) Para instruções de uso na sua língua: (IT) Per le istruzioni di Uso nella sua lingua: (DE) Für Gebrauchsanleitungen in ihrer Sprache: (NL) Voor Gebruiksaanwijzing in uw eigen taal:	<a href="http://www.e-labeling.eu/cor58R110">www.e-labeling.eu/cor58R110</a>
	(EU) +800 135 79 135 (non-EU) +31 20 794 7071 (CA) +1 855 805 8530 (AR, CO, UY, AU, NZ) +800 135 79 135

#### I. INTRODUCTION

Carbapenemase-producing Organisms (CPO), and more specifically, Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) represent a major public health concern worldwide due to their broad spectrum of resistance to antibiotics including, besides carbapenems, most classes of antimicrobial agents, and thus leaving very few options for the management of infected patients. Besides CREs, CPOs also include nonfermenting Gram-negative bacilli (NFGNB), such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* that exhibit resistance not only to beta lactam and other groups of antibiotics, but also to carbapenems. The rapid spread of CPOs and genes encoding these resistances has led to nosocomial outbreaks and endemic situations in several countries in Europe as well as elsewhere worldwide.

Development of new rapid diagnostic tests to track antimicrobial resistance patterns is considered as one of the priority core actions by international experts and health authorities. NDM and KPC represent two of the most increasing and prevalent carbapenemases in many countries. On the other hand, class D OXA-48 type carbapenemases are the most challenging resistance mechanisms to be detected by clinical laboratories. VIM is not only present in Enterobacteriaceae but is also highly prevalent in non-fermenting bacteria.

Class B IMP-type is a plasmid-mediated carbapenemase that should be regarded as a major potential problem since they degrade not only C3G but also carbapenem antimicrobial drug like Imipenem. Inhibitor-based phenotypic confirmatory tests exist for the confirmation of class A (KPC) and class B (VIM, IMP, NDM) carbapenemases. Nowadays, definitive confirmation of CPO resistance mechanism relies on molecular assays. These tests are expensive and can only be performed in dedicated environment and by skilled personnel, hence limiting their more generalized usage.

O.K.N.V.I. RESIST-5 test is part of Coris BioConcept RESIST range of antimicrobial resistance diagnostic tests.

#### II. PRINCIPLE OF THE TESTS

These tests are ready to use and are based on a membrane technology with colloidal gold nanoparticles. Our kit is aimed to the detection of carbapenemases from a single bacterial colony isolate of Enterobacteriaceae or NFGNB growing on agar plate. Each pouch contains: 2 lateral-flow cassettes for the identification of (i) OXA-48, KPC, NDM and (ii) VIM and IMP.

**Identification of OXA-48, KPC and NDM.** A nitrocellulose membrane is sensitised with:

- (1) a monoclonal antibody directed against OXA-48 carbapenemases and variants (except OXA-163-like carbapenemases) ("O" line)
- (2) a monoclonal antibody directed against KPC carbapenemases ("K" line)
- (3) a monoclonal antibody directed against NDM carbapenemases ("N" line)
- (4) a control capture reagent (upper "C" line).

Four different colloidal gold nanoparticles conjugates are dried on a membrane: a conjugate directed against a second epitope of the OXA-48 carbapenemase, a conjugate directed against a second epitope of the KPC carbapenemase, a third conjugate specific to NDM carbapenemase and a control conjugate to valid the test conditions.

**Identification of VIM and IMP.** A nitrocellulose membrane is sensitised with:

- (1) a monoclonal antibody directed against VIM carbapenemases ("V" line).
- (2) a monoclonal antibody directed against IMP carbapenemases ("I" line)
- (3) a control capture reagent (upper "C" line).

Three different colloidal gold nanoparticles conjugates are dried on a membrane: a conjugate directed against VIM carbapenemases, a conjugate directed against IMP carbapenemases and a control conjugate.

When the provided buffer containing the resuspended bacteria comes into contact with the strip, the solubilised conjugates migrate with the sample by passive diffusion, while conjugates and sample material come into contact with the immobilised respective antibodies that are adsorbed onto the nitrocellulose strip. If the sample contains an OXA-48, KPC, NDM, VIM or IMP carbapenemase, the respective complexes made of the conjugates and either OXA-48, or KPC, or NDM or VIM or IMP will remain bound to their respective specific lines (OXA-48: "O" line; KPC: "K" line; NDM: "N" line; VIM: "V" line; IMP: "I" line). The migration continues by passive diffusion and both conjugates and sample material come into contact with the (upper) line control reagent that binds a control conjugate ("C" line), thereby producing a red line.

The result is visible within 15 minutes in the form of red lines on the strip.

#### III. REAGENTS AND MATERIALS

##### 1. O.K.N.V.I. RESIST-5 (2x20 cassettes)

20 sealed pouches containing two lateral-flow cassettes and one desiccant. Each cassette contains one sensitised strip.

##### 2. LY-A buffer vial (15 mL)

Saline solution buffered to pH 7.5 containing TRIS, NaNO<sub>2</sub> (<0.1%) and a detergent.

#### 3. Instruction for use (1)

#### 4. Semi-rigid disposable collection tubes with droppers (20)

#### IV. SPECIAL PRECAUTIONS

- All operations linked to the use of the test must be performed in accordance with Good Laboratory Practices (GLP).
- All reagents are for *in vitro* diagnostic use only.
- Pouch must be opened with care.
- Avoid touching nitrocellulose with your fingers.
- Wear gloves when handling samples.
- Never use reagents from another kit.
- Green lines indicate immunoreagents adsorption sites. Green colour disappears during the test.
- The quality of the reagents cannot be guaranteed beyond their shelf-life dates or if reagents are not stored under required conditions as indicated in the insert.

#### V. WASTE DISPOSAL

- Dispose of gloves, swabs, test tubes and used devices in accordance with GLP.
- Each user is responsible for the management of any waste produced, and must ensure that it is disposed of in accordance with the applicable legislation.

#### VI. STORAGE

- An unopened pouch may be kept at between 4 and 30°C and used until the shelf-life date indicated on the packaging. Once the pouch is opened, run the test immediately.
- Avoid freezing devices and buffer.

#### VII. SPECIMEN HANDLING AND COLLECTION

Specimens to be tested should be obtained and handled by standard microbiological methods.

Make sure that the specimens are not treated with solutions containing formaldehyde or its derivatives.

Culture media tested and validated with Coris BioConcept RESIST kits are listed on the website: <https://www.corisbio.com/Products/Human-Field/OKNVI-RESIST-5.php>

#### VIII. PROCEDURE

##### PREPARATIONS OF THE TEST:

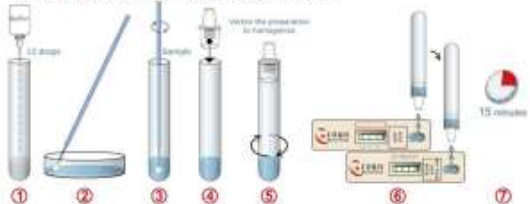
Allow kit components, in unopened packaging, and specimens (in the event that the plate containing colony to be tested was kept at 4°C) to equilibrate at room temperature (15-30°C) before performing a test.

Open the pouch and remove the device. Once opened, run the test immediately. Indicate the patient's name or specimen number on the device (one device per sample).

##### SPECIMEN PREPARATION PROCEDURE:

Performance claims with regard to sample types other than bacterial colonies have not been established. We recommend the use of fresh bacterial colonies for optimal test performance.

1. Prepare one semi-rigid tube and add 12 drops of LY-A buffer in the tube.
2. Harvest bacteria by taking one colony with a disposable bacteriological loop and dip the loop in the bottom of the semi-rigid tube containing the buffer.
3. Stir thoroughly before removing the loop.
4. Insert tightly the dropper on the semi-rigid tube.
5. Vortex the preparation to homogenize. The entire bacterial colony must be suspended into the buffer.
6. Invert the test tube and add slowly 3 drops of diluted sample into the sample well of each of the two cassettes labelled (i) NDM, KPC and OXA-48 and (ii) IMP and VIM. Alternatively, add 100µl of diluted sample with a micropipette to each cassette sample well.
7. Allow to react for 15 min max and read the result.



Positive results may be reported as soon as the test and control lines become visible. Do not take the appearance of new lines into account after the reaction time has passed.

The result must be read on still wet strip.

#### IX. INTERPRETING RESULTS

The results are to be interpreted as follows for each of the two cassettes:

**Negative test result:** a reddish-purple line appears across the central reading window at the Control line (C) position. No other line is present.

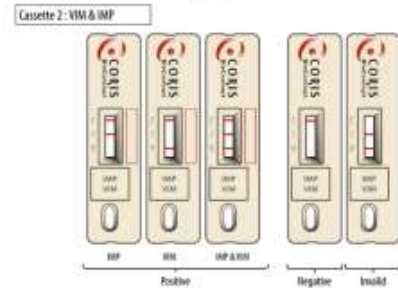
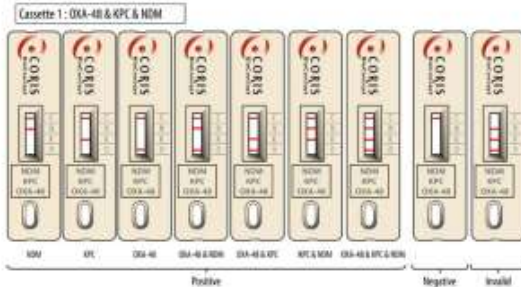
**Positive test result:** in addition to a reddish-purple line at the Control line (C), a visible reddish-purple line appears at one of the Test lines position ("N" or "K" or "O") on cassette labelled (i) NDM, KPC, OXA-48 or at one of the Test lines position ("I" or "V") on cassette labelled (ii) IMP and VIM. Intensity of the test line may vary according to the quantity of antigens as well as of the variant type present in the sample. Any reddish-purple test line (OXA-48, KPC, NDM, VIM and IMP), even weak, should be considered as a positive result.

If a positive test line appears beside of the "O" mark, the sample contains OXA-48 or OXA-48-like variants. If it appears beside the "K" mark, the sample contains KPC variants; beside the "N" mark, the sample contains NDM; the "V" mark, the sample contains VIM; and beside of the "I" mark, IMP is present in the sample. Combinations of positive test lines can occur.

In this case the sample contains the combination of several carbapenemases.

**Invalid test result:** The absence of a Control line indicates a failure in the test procedure. Repeat invalid tests with a new test device.

Note: during the drying process, a very faint shadow may appear in the Test line positions. It should not be regarded as a positive result.



**X. PERFORMANCE**

**A. Detection Limit**

The detection limit determined with purified recombinant proteins of OXA-48, KPC, NDM, VIM and IMP have been evaluated at 0.125 ng/mL, 0.625 ng/mL, 0.25 ng/mL, 0.23 ng/mL and 1.56 ng/mL, respectively.

**B. Retrospective study**

The test cassettes were validated by comparison with reference molecular method (validated in house multiplex PCR including sequencing) in the National Reference Laboratory for Multidrug-Resistant Gram Negative Bacilli (Belgium) in a retrospective study performed on 164 non duplicated, consecutive suspected CPE clinical isolates collected between 2013 and 2018 from 78 Belgian hospitals.

Molecular method	Positive	Negative	Total
<b>OXA-48 test</b>			
Positive	40	0	40
Negative	0	124	124
<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>124</b>	<b>164</b>

95 % Confidence Interval <sup>1</sup>

Sensitivity: 100 % (89.1 to 100 %)  
 Specificity: 100 % (96.3 to 100 %)  
 Positive Predictive value: 100 % (89.1 to 100 %)  
 Negative predictive value: 100 % (96.3 to 100 %)  
 Agreement: 100 % (164/164)

Molecular method	Positive	Negative	Total
<b>KPC test</b>			
Positive	25	0	25
Negative	0	139	139
<b>Total</b>	<b>25</b>	<b>139</b>	<b>164</b>

95 % Confidence Interval <sup>1</sup>

Sensitivity: 100 % (83.4 to 100 %)  
 Specificity: 100 % (96.6 to 100 %)  
 Positive Predictive value: 100 % (83.4 to 100 %)  
 Negative predictive value: 100 % (96.6 to 100 %)  
 Agreement: 100 % (164/164)

Molecular method	Positive	Negative	Total
<b>NDM test</b>			
Positive	31	0	31
Negative	3	130	133
<b>Total</b>	<b>34</b>	<b>130</b>	<b>164</b>

95 % Confidence Interval <sup>1</sup>

Sensitivity: 91.2 % (75.2 to 97.7 %)  
 Specificity: 100 % (96.4 to 100 %)  
 Positive Predictive value: 100 % (86.3 to 100 %)  
 Negative predictive value: 97.7 % (93.0 to 99.4 %)  
 Agreement: 98.2 % (161/164)

Molecular method	Positive	Negative	Total
<b>VIM test</b>			
Positive	36	0	36
Negative	4	124	128
<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>124</b>	<b>164</b>

95 % Confidence Interval <sup>1</sup>

Sensitivity: 90 % (70.4 to 99.7 %)  
 Specificity: 100 % (96.3 to 100 %)  
 Positive Predictive value: 100 % (88.0 to 100 %)  
 Negative predictive value: 96.9 % (91.7 to 99.0 %)  
 Agreement: 97.6 % (160/164)

IMP test	Molecular method	Positive	Negative	Total
Positive		16	0	16
Negative		3	145	148
<b>Total</b>		<b>19</b>	<b>145</b>	<b>164</b>

95 % Confidence Interval <sup>1</sup>

Sensitivity: 84.2 % (59.5 to 95.8 %)  
 Specificity: 100 % (96.8 to 100 %)  
 Positive Predictive value: 100 % (75.9 to 100 %)  
 Negative predictive value: 98.0 % (93.7 to 99.5 %)  
 Agreement: 98 % (161/164)

**C. Repeatability and reproducibility**

To check intra-batch accuracy (repeatability), the same positive samples and a buffer solution were processed 16 times on kits of the same production batch in the same experimental conditions. All observed results were confirmed as expected. To check inter-batch accuracy (reproducibility), some samples (positive and buffer) were processed on kits from three different production batches. All results were confirmed as expected.

**XI. LIMITS OF THE KIT**

The test is qualitative and cannot predict the quantity of antigens present in the sample. Clinical presentation and other test results must be taken into consideration to establish diagnosis. A positive test does not rule out the possibility that other antibiotic resistance mechanisms may be present.

**XII. TECHNICAL PROBLEMS / COMPLAINTS**

If you face a technical problem or if performances do not correspond with those indicated in this package insert:

1. Record the lot number of the kit concerned.
2. If possible, keep the sample in the appropriate storage condition during the complaint management.
3. Contact Coris BioConcept ([client.coris@corisbio.com](mailto:client.coris@corisbio.com)) or your local distributor.

**XIII. BIBLIOGRAPHIC REFERENCES**

A. J. Wesley MacDonald and V. Chhabhal Evaluation of the RESIST-4 O.K.N.V immunochromatographic lateral flow assay for the rapid detection of OXA-48, KPC, NDM and VIM carbapenemases from cultured isolates *Access Microbiology* 2019;1

B. T. Phala, S. Desmet Detection of carbapenemase production in *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care centre Annual Meeting of the Royal Belgian Society of Laboratory Medicine November 15th, 2010 Belgium

C. Oueslati S, Iorga BI, Tili L, Exlie C, Zavala A, Dortet L, Jousset AB, Bernabeu S, Bonnin RA, Naas T. Unravelling ceftazidime/avibactam resistance of KPC-28, a KPC-2 variant lacking carbapenemase activity. *J Antimicrob Chemother.* 2019 Aug 1;74(8):2219-2246

D. Brolund A, Lagerqvist N, Byfors S, Struelens MJ, Monnet DL, Albigier B, Kohlenberg A. Worsening epidemiological situation of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe, assessment by national experts from 37 countries, July 2018. *Euro Surveill.* 2019 Feb; 24 (9) 1566-7917

E. Oliveira J, Reygaert WC. Gram Negative Bacteria. StatPearls Publishing; 2019 Jan-2019

F. Beza LL, Pfennigwerth N, Greissl C, Göttig S, Saleh A, Stelzer J, Gutermann SG, Hemprecht A. Comparison of five methods for detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae with proposal of a new algorithm. *Clin Microbiol Infect.* 2019 Mar 18; pii: S1196-7434(19)30194-4

G. Röchner S, Kamsalanbhalah S, Küsters U, Kolbert M, Pfennigwerth N, Mack D. Evaluation of a novel immunochromatographic lateral flow assay for rapid detection of OXA-48, NDM, KPC and VIM carbapenemases in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *J Med Microbiol.* 2019 Mar;68(3):379-381.

H. Glupczynski Y, Evvard S, Huang TD, Bogaerts P. Evaluation of the RESIST-4 K-Set assay, a multiplex immunochromatographic assay for the rapid detection of OXA-48-like, KPC, VIM and NDM carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2019 Feb 6; doi: 10.1093

I. Coite A, Bonacorsi S, Truong J, Hobson C, Doit C, Morjault A, Bidel P, Birgy A. Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Positive Blood Culture Using an Immunochromatographic RESIST-4 O.K.N.V. Assay. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018 Nov 26;62(12), pii: e01628-18

J. Köck R, Daniels-Haard I, Becker K, Mellmann A, Friedrich AW, Mevius D, Schwarz S, Jurke A. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in wildlife, food-producing, and companion animals: a systematic review. *Clin Microbiol Infect.* 2018 Dec;24(12):1241-1250

K. Greissl C, Saleh A and Hemprecht A. Rapid detection of OXA-48-like, KPC, NDM, and VIM carbapenemases in Enterobacteriaceae by a new multiplex immunochromatographic test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018 Nov 17; doi: 10.1007/s00967-018-3432-2

L. Kolenda C, Benoit R, Carricajo A, Bonnet R, Dauwalder O, Laurent F. Evaluation of the New Multiplex Immunochromatographic O.K.N.V. K-Set Assay for Rapid Detection of OXA-48-like, KPC, NDM, and VIM Carbapenemases. *J Clin Microbiol.* 2018 Oct 25;56(11): e01247-18.

M. K.Villageas-Tran, A.A. Mariaggi, A. Godmer, M. Lambot, T. Leclitpoux, G. Arlet, Y. Benzarara and S. Gailah. P2333 - A new method for detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae carriage. 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Infectious Diseases April 21 – 24, 2018.

N. Y. Glupczynski, T.D. Huang, S. Evvard and P. Bogaerts. P2328 – Evaluation of the NV K-Set, a new lateral flow assay for the detection of VIM and NDM producing bacteria. 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Infectious Diseases April 21 – 24, 2018.

O. P. Bogaerts, S. Evvard, L. Denome, Q. Gilleman, P. Mertens, T.-D. Huang, T. and Y. Glupczynski. Evaluation of a new lateral flow assay for the detection of VIM-producing bacteria. 37e Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse 18-19 décembre, 2017 Paris

P. C.Mathlouthi N, Al-Beyssari C, Bakour S, Rolain JM, Chouchani C. Prevalence and emergence of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Mediterranean basin. *Crit Rev Microbiol.* 2017 Feb; 43(1):43-61

Last update 21 SEPTEMBER 2020

<b>REF</b>	Catalogue number		Manufacturer
<b>IVD</b>	In vitro diagnostic medical device		Temperature limits
	Contains sufficient for use tests	<b>LOT</b>	Batch code
	Consult instructions for use		Do not reuse
	Keep dry		Use by
<b>DIL SPE</b>	Diluent specimen	<b>CONT NaCl</b>	Contains Sodium azide

<sup>1</sup> Newcombe, Robert G. "Two-Sided Confidence Intervals for the Single Proportion: Comparison of Seven Methods." *Statistics in Medicine*, 17, 857-872 (1998).

## Vedlegg 4

Resultater fra fenotypisk lappediffusjon med kittet «KPC, MBL and OXA-48 Confirm Kit: Carbapenemases» fra Rosco.

Koloni	Antibiotika	Hemningszone (mm)	Differanse fra meropenem (mm)	Resultat
Prøve 1	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	22,8	-0,8	OXA-48
	Meropenem + DPA MRDP	21,2	-2,4	like/ESBL(a)
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	21,0	-2,6	KPC Neg
	Temocillin 30 µg	10,4	13,2	MBL Neg
	Meropenem 10 µg	23,6	-	
Prøve 2	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	29,2	2,8	OXA-48
	Meropenem + DPA MRDP	26,8	0,4	like/ESBL(a)
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	25,6	-0,8	
	Temocillin 30 µg	21,8	-4,6	
	Meropenem 10 µg	26,4	-	
Prøve 3	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	20,8	9,9	KPC Pos
	Meropenem + DPA MRDP	13,0	2,1	
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	11,0	0,1	
	Temocillin 30 µg	12,0	1,1	
	Meropenem 10 µg	10,9	-	
Prøve 4	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	13,2	1,0	MBL Pos
	Meropenem + DPA MRDP	25,8	13,6	
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	13,0	0,8	
	Temocillin 30 µg	9,0	-3,2	
	Meropenem 10 µg	12,2	-	
Prøve 5	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	27,7	-1,5	OXA-48
	Meropenem + DPA MRDP	29,4	0,2	like/ESBL(a)
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	30,6	1,4	
	Temocillin 30 µg	18,0	-11,2	
	Meropenem 10 µg	29,2	-	
Prøve 6	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	22,4	13,4	KPC Pos
	Meropenem + DPA MRDP	9,0	0,0	
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	9,0	0,0	
	Temocillin 30 µg	9,0	0,0	
	Meropenem 10 µg	9,0	-	
Prøve 7	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	21,2	-0,4	OXA-48
	Meropenem + DPA MRDP	21,4	-0,2	like/ESBL(a)
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	21,4	-0,2	
	Temocillin 30 µg	9,0	-12,6	
	Meropenem 10 µg	21,6	-	
Prøve 8	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	16,2	-3,0	OXA-48
	Meropenem + DPA MRDP	21,6	2,4	like/ESBL(a)
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	21,4	2,2	
	Temocillin 30 µg	22,4	3,2	
	Meropenem 10 µg	19,2	-	

Prøve 9	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	20,0	1,4	OXA-48 like/ESBL(a)
	Meropenem + DPA MRPDP	19,0	0,4	
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	19,4	0,8	
	Temocillin 30 µg	9,0	-9,6	
	Meropenem 10 µg	18,6	-	
Prøve 10	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	15,6	0,2	MBL Pos
	Meropenem + DPA MRPDP	21,8	6,4	
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	16,7	1,3	
	Temocillin 30 µg	9,0	-6,4	
	Meropenem 10 µg	15,4	-	
Prøve 11	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	22,2	11,7	KPC Pos
	Meropenem + DPA MRPDP	12,4	1,9	
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	12,0	1,5	
	Temocillin 30 µg	18,4	7,9	
	Meropenem 10 µg	10,5	-	
Prøve 12	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	9,0	0,0	MBL Pos
	Meropenem + DPA MRPDP	21,4	12,4	
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	9,0	0,0	
	Temocillin 30 µg	9,0	0,0	
	Meropenem 10 µg	9,0	-	
Prøve 13	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	19,0	-2,2	OXA-48 like/ESBL(a)
	Meropenem + DPA MRPDP	19,0	-2,2	
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	19,4	-1,8	
	Temocillin 30 µg	9,0	-12,2	
	Meropenem 10 µg	21,2	-	
Prøve 14	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	9,0	0,0	OXA-48  like/ESBL(a) KPC Neg MBL Neg
	Meropenem + DPA MRPDP	11,4	2,4	
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	9,0	0,0	
	Temocillin 30 µg	9,0	0,0	
	Meropenem 10 µg	9,0	-	
Prøve 15	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	28,8	12,6	KPC Pos
	Meropenem + DPA MRPDP	18,7	2,5	
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	17,0	0,8	
	Temocillin 30 µg	23,6	7,4	
	Meropenem 10 µg	16,2	-	
Prøve 16	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	23,8	7,7	KPC Pos
	Meropenem + DPA MRPDP	17,2	1,1	
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	17,2	1,1	
	Temocillin 30 µg	16,6	0,5	
	Meropenem 10 µg	16,1	-	
Prøve 17	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	10,6	1,6	MBL Pos
	Meropenem + DPA MRPDP	22,6	13,6	
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	10,4	1,4	
	Temocillin 30 µg	9,0	0,0	
	Meropenem 10 µg	9,0	-	

Prøve 18	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	20,5	-1,1	OXA-48
	Meropenem + DPA MRDPDP	21,6	0,0	like/ESBL(a)
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	22,7	1,1	
	Temocillin 30 µg	11,4	-10,2	
	Meropenem 10 µg	21,6	-	
Prøve 19	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	18,0	0,8	MBL Pos
	Meropenem + DPA MRDPDP	23,0	5,8	
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	18,0	0,8	
	Temocillin 30 µg	9,0	-8,2	
	Meropenem 10 µg	17,2	-	
Prøve 20	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	19,4	-1,6	OXA-48
	Meropenem + DPA MRDPDP	23,0	2,0	like/ESBL(a)
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	21,0	0,0	
	Temocillin 30 µg	25,7	4,7	
	Meropenem 10 µg	21,0	-	
Prøve 21	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	16,4	2,6	MBL Pos
	Meropenem + DPA MRDPDP	21,2	7,4	
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	16,0	2,2	
	Temocillin 30 µg	15,0	1,2	
	Meropenem 10 µg	13,8	-	
Prøve 22	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	16,8	3,1	MBL Pos
	Meropenem + DPA MRDPDP	21,4	7,7	
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	12,2	-1,5	
	Temocillin 30 µg	9,0	-4,7	
	Meropenem 10 µg	13,7	-	
Prøve 23	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	22,2	0,0	OXA-48
	Meropenem + DPA MRDPDP	20,3	-1,9	like/ESBL(a)
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	22,9	0,7	
	Temocillin 30 µg	10,4	-11,8	
	Meropenem 10 µg	22,2	-	
Prøve 24	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	20,0	1,2	OXA-48
	Meropenem + DPA MRDPDP	20,0	1,2	like/ESBL(a)
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	19,0	0,2	
	Temocillin 30 µg	9,0	-9,8	
	Meropenem 10 µg	18,8	-	
Prøve 25	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	28,9	0,1	OXA-48
	Meropenem + DPA MRDPDP	29,8	1,0	like/ESBL(a)
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	30,5	1,7	
	Temocillin 30 µg	19,0	-9,8	
	Meropenem 10 µg	28,8	-	
Prøve 26	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	30,6	0,0	OXA-48
	Meropenem + DPA MRDPDP	30,6	0,0	like/ESBL(a)
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	31,0	0,4	
	Temocillin 30 µg	18,4	-12,2	
	Meropenem 10 µg	30,6	-	
Prøve 27	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	29,6	0,0	OXA-48
	Meropenem + DPA MRDPDP	29,6	0,0	like/ESBL(a)
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	29,6	0,0	
	Temocillin 30 µg	23,6	-6,0	
	Meropenem 10 µg	29,6	-	

Prøve 28	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	28,4	1,0	OXA-48
	Meropenem + DPA MRDPDP	26,4	-1,0	like/ESBL(a)
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	28,0	0,6	
	Temocillin 30 µg	17,0	-10,4	
	Meropenem 10 µg	27,4	-	
Prøve 29	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	27,6	0,0	OXA-48
	Meropenem + DPA MRDPDP	26,8	-0,8	like/ESBL(a)
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	28,6	1,0	
	Temocillin 30 µg	22,8	-4,8	
	Meropenem 10 µg	27,6	-	
Prøve 30	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	30,4	0,6	OXA-48
	Meropenem + DPA MRDPDP	29,0	-0,8	like/ESBL(a)
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	30,2	0,4	
	Temocillin 30 µg	22,6	-7,2	
	Meropenem 10 µg	29,8	-	
Prøve 31	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	30,6	-0,6	OXA-48
	Meropenem + DPA MRDPDP	30,6	-0,6	like/ESBL(a)
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	31,4	0,2	
	Temocillin 30 µg	19,4	-11,8	
	Meropenem 10 µg	31,2	-	
Prøve 32	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	31,0	1,4	OXA-48
	Meropenem + DPA MRDPDP	30,0	0,4	like/ESBL(a)
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	29,6	0,0	
	Temocillin 30 µg	24,0	-5,6	
	Meropenem 10 µg	29,6	-	
Prøve 33	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	29,0	1,2	OXA-48
	Meropenem + DPA MRDPDP	25,6	-2,2	like/ESBL(a)
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	26,8	-1,0	
	Temocillin 30 µg	14,6	-13,2	
	Meropenem 10 µg	27,8	-	
Prøve 34	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	28,6	2,6	OXA-48
	Meropenem + DPA MRDPDP	27,2	1,2	like/ESBL(a)
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	28,6	2,6	
	Temocillin 30 µg	14,0	-12,0	
	Meropenem 10 µg	26,0	-	
Prøve 35	Meropenem + Phenylboronic MRPBO	23,0	9,4	KPC Pos
	Meropenem + DPA MRDPDP	14,0	0,4	
	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	15,6	2,0	
	Temocillin 30 µg	11,8	-1,8	
	Meropenem 10 µg	13,6	-	



## Vedlegg 5

Rådata fra PCR-analysen utført ved hjelp av prosedyren «ESBL CARBA, Enterobacterales real-time PCR» (58).

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
A01	FAM	VIM	Unkn	K+	-
A02	FAM	VIM	Unkn	P8	-
A03	FAM	VIM	Unkn	P16	-
A04	FAM	VIM	Unkn	P24	-
A05	FAM	VIM	Unkn	P32	-
A07	FAM	KPC	Unkn	K+	22,29
A08	FAM	KPC	Unkn	P8	-
A09	FAM	KPC	Unkn	P16	19,77
A10	FAM	KPC	Unkn	P24	-
A11	FAM	KPC	Unkn	P32	-
B01	FAM	VIM	Unkn	K-	-
B02	FAM	VIM	Unkn	P9	-
B03	FAM	VIM	Unkn	P17	-
B04	FAM	VIM	Unkn	P25	-
B05	FAM	VIM	Unkn	P33	-
B07	FAM	KPC	Unkn	K-	-
B08	FAM	KPC	Unkn	P9	-
B09	FAM	KPC	Unkn	P17	-
B10	FAM	KPC	Unkn	P25	-
B11	FAM	KPC	Unkn	P33	-
C01	FAM	VIM	Unkn	P1	-
C02	FAM	VIM	Unkn	P10	18,99
C03	FAM	VIM	Unkn	P18	-
C04	FAM	VIM	Unkn	P26	-
C05	FAM	VIM	Unkn	P34	-
C07	FAM	KPC	Unkn	P1	-
C08	FAM	KPC	Unkn	P10	-
C09	FAM	KPC	Unkn	P18	-
C10	FAM	KPC	Unkn	P26	-
C11	FAM	KPC	Unkn	P34	-
D01	FAM	VIM	Unkn	P2	-
D02	FAM	VIM	Unkn	P11	-
D03	FAM	VIM	Unkn	P19	19,11
D04	FAM	VIM	Unkn	P27	-
D05	FAM	VIM	Neg Ctrl	Neg	-
D07	FAM	KPC	Unkn	P2	-
D08	FAM	KPC	Unkn	P11	17,55
D09	FAM	KPC	Unkn	P19	-
D10	FAM	KPC	Unkn	P27	-

D11	FAM	KPC	Neg Ctrl	Neg	-
E01	FAM	VIM	Unkn	P3	-
E02	FAM	VIM	Unkn	P12	21,09
E03	FAM	VIM	Unkn	P20	-
E04	FAM	VIM	Unkn	P28	-
E05	FAM	VIM	Pos Ctrl	VIM+	27,86
E07	FAM	KPC	Unkn	P3	22,30
E08	FAM	KPC	Unkn	P12	-
E09	FAM	KPC	Unkn	P20	-
E10	FAM	KPC	Unkn	P28	-
E11	FAM	KPC	Pos Ctrl	KPC+	26,40
F01	FAM	VIM	Unkn	P4	21,28
F02	FAM	VIM	Unkn	P13	-
F03	FAM	VIM	Unkn	P21	-
F04	FAM	VIM	Unkn	P29	-
F07	FAM	KPC	Unkn	P4	-
F08	FAM	KPC	Unkn	P13	-
F09	FAM	KPC	Unkn	P21	-
F10	FAM	KPC	Unkn	P29	-
G01	FAM	VIM	Unkn	P6	-
G02	FAM	VIM	Unkn	P14	-
G03	FAM	VIM	Unkn	P22	-
G04	FAM	VIM	Unkn	P30	-
G07	FAM	KPC	Unkn	P6	22,19
G08	FAM	KPC	Unkn	P14	-
G09	FAM	KPC	Unkn	P22	-
G10	FAM	KPC	Unkn	P30	-
H01	FAM	VIM	Unkn	P7	-
H02	FAM	VIM	Unkn	P15	-
H03	FAM	VIM	Unkn	P23	-
H04	FAM	VIM	Unkn	P31	-
H07	FAM	KPC	Unkn	P7	-
H08	FAM	KPC	Unkn	P15	-
H09	FAM	KPC	Unkn	P23	-
H10	FAM	KPC	Unkn	P31	-
A01	Texas Red	NDM	Unkn	K+	-
A02	Texas Red	NDM	Unkn	P8	-
A03	Texas Red	NDM	Unkn	P16	-
A04	Texas Red	NDM	Unkn	P24	-
A05	Texas Red	NDM	Unkn	P32	-
A07	Texas Red	OXA48	Unkn	K+	-
A08	Texas Red	OXA48	Unkn	P8	-
A09	Texas Red	OXA48	Unkn	P16	-
A10	Texas Red	OXA48	Unkn	P24	18,08

A11	Texas Red	OXA48	Unkn	P32	-
B01	Texas Red	NDM	Unkn	K-	-
B02	Texas Red	NDM	Unkn	P9	-
B03	Texas Red	NDM	Unkn	P17	21,81
B04	Texas Red	NDM	Unkn	P25	-
B05	Texas Red	NDM	Unkn	P33	-
B07	Texas Red	OXA48	Unkn	K-	-
B08	Texas Red	OXA48	Unkn	P9	15,77
B09	Texas Red	OXA48	Unkn	P17	-
B10	Texas Red	OXA48	Unkn	P25	-
B11	Texas Red	OXA48	Unkn	P33	-
C01	Texas Red	NDM	Unkn	P1	-
C02	Texas Red	NDM	Unkn	P10	-
C03	Texas Red	NDM	Unkn	P18	-
C04	Texas Red	NDM	Unkn	P26	-
C05	Texas Red	NDM	Unkn	P34	-
C07	Texas Red	OXA48	Unkn	P1	16,08
C08	Texas Red	OXA48	Unkn	P10	-
C09	Texas Red	OXA48	Unkn	P18	19,32
C10	Texas Red	OXA48	Unkn	P26	-
C11	Texas Red	OXA48	Unkn	P34	-
D01	Texas Red	NDM	Unkn	P2	-
D02	Texas Red	NDM	Unkn	P11	-
D03	Texas Red	NDM	Unkn	P19	-
D04	Texas Red	NDM	Unkn	P27	-
D05	Texas Red	NDM	Neg Ctrl	Neg	-
D07	Texas Red	OXA48	Unkn	P2	-
D08	Texas Red	OXA48	Unkn	P11	-
D09	Texas Red	OXA48	Unkn	P19	-
D10	Texas Red	OXA48	Unkn	P27	-
D11	Texas Red	OXA48	Neg Ctrl	Neg	-
E01	Texas Red	NDM	Unkn	P3	-
E02	Texas Red	NDM	Unkn	P12	-
E03	Texas Red	NDM	Unkn	P20	20,17
E04	Texas Red	NDM	Unkn	P28	-
E07	Texas Red	OXA48	Unkn	P3	-
E08	Texas Red	OXA48	Unkn	P12	-
E09	Texas Red	OXA48	Unkn	P20	-
E10	Texas Red	OXA48	Unkn	P28	-
F01	Texas Red	NDM	Unkn	P4	-
F02	Texas Red	NDM	Unkn	P13	-
F03	Texas Red	NDM	Unkn	P21	19,93
F04	Texas Red	NDM	Unkn	P29	-
F05	Texas Red	NDM	Pos Ctrl	NDM+	27,00

F07	Texas Red	OXA48	Unkn	P4	-
F08	Texas Red	OXA48	Unkn	P13	18,11
F09	Texas Red	OXA48	Unkn	P21	-
F10	Texas Red	OXA48	Unkn	P29	-
F11	Texas Red	OXA48	Pos Ctrl	OXA48+	29,92
G01	Texas Red	NDM	Unkn	P6	-
G02	Texas Red	NDM	Unkn	P14	20,71
G03	Texas Red	NDM	Unkn	P22	18,91
G04	Texas Red	NDM	Unkn	P30	-
G07	Texas Red	OXA48	Unkn	P6	-
G08	Texas Red	OXA48	Unkn	P14	19,16
G09	Texas Red	OXA48	Unkn	P22	-
G10	Texas Red	OXA48	Unkn	P30	-
H01	Texas Red	NDM	Unkn	P7	-
H02	Texas Red	NDM	Unkn	P15	-
H03	Texas Red	NDM	Unkn	P23	-
H04	Texas Red	NDM	Unkn	P31	-
H07	Texas Red	OXA48	Unkn	P7	19,44
H08	Texas Red	OXA48	Unkn	P15	-
H09	Texas Red	OXA48	Unkn	P23	20,64
H10	Texas Red	OXA48	Unkn	P31	-

## Vedlegg 6

PCR-kurver for hhv. Carba 1 (øverst) og Carba 2 (nederst) anskaffet ved hjelp av prosedyren «ESBL CARBA, Enterobacterales real-time PCR» (58).

