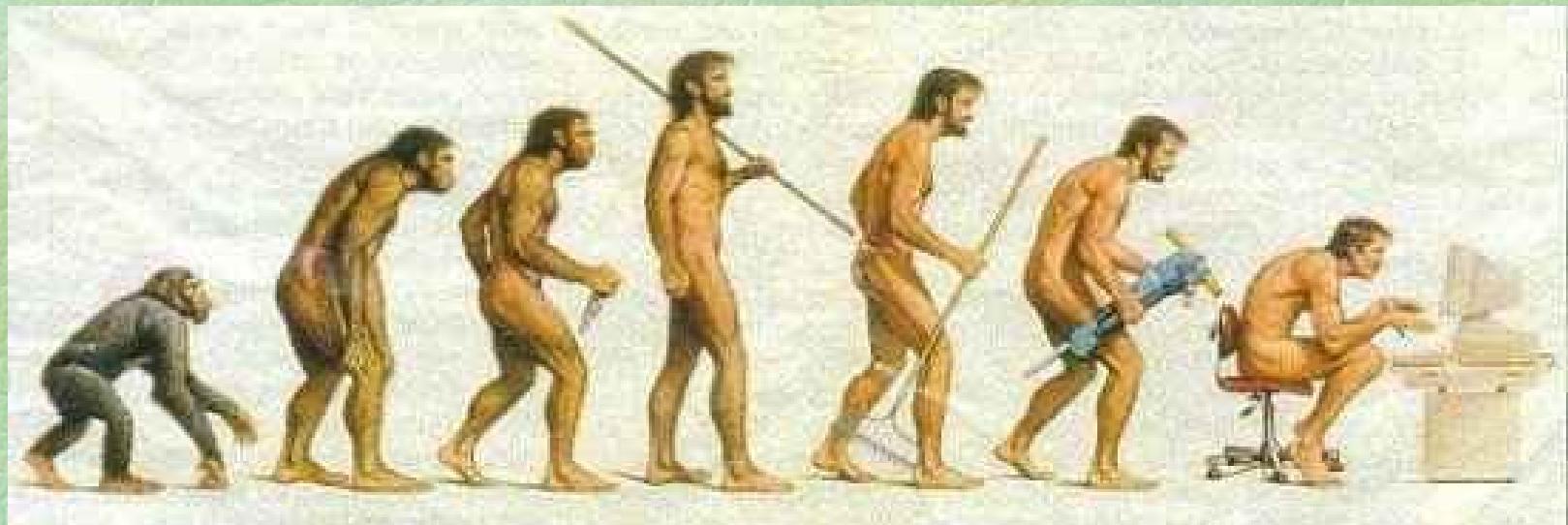


# DANRES

- status per 20. marts 2007



Extended Spectrum Beta-Lactamases



# DSKM

Dansk Selskab for Klinisk Mikrobiologi

Forside

Historie

Love

Bestyrelse

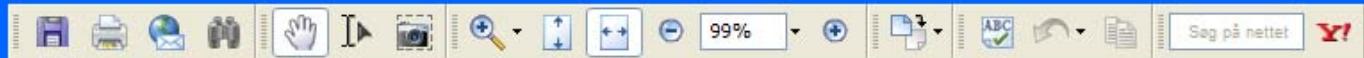
Udvalg

Rapporter

Hæderspriser

Web-master  
Jens K. Møller

Opdateret den  
23.02.2006



Sag på nettet



## ESBL-reference

### Baggrund og formål

På DANRES-mødet 24.5.2005 hvor resultaterne af en rundsending af 10 ESBL m.m. producerende stammer blev gennemgået (LINK), blev der fra flere sider udtrykt ønske om at have et sted at sende (formodede) ESBL-stammer hen, for at få disse verificeret og videre undersøgt. Efterfølgende udtænkte og fremlagde vi på DANRES-mødet 1.11.2005 et forslag til en sådan referencefunktion. Dette forslag blev diskuteret på mødet og med afsæt i dette vil vi forslå:

- 1) En i første omgang tidsbegrænsset (01.01.06 til 30.06.06) indsamling af alle ESBL-stammer fra alle KMA. Data og resultater vil blive fremlagt på et efterfølgende DANRES-møde til diskussion; konsekvenser for behandling og diagnostik, fremtidig samarbejde, eventuel publicering m.m.
- 2) Efter 30.06.06 kan de laboratorier der fortsat måtte ønske det indsende ESBL-stammer til videre undersøgelse og karakterisering.

Ny side 1 - Microsoft Internet Explorer

Filer Rediger Vis Foretrukne Funktioner Hjælp

Tilbage Søg

Adresse http://www.d-s-k-m.suite.dk/ 2 blocked Check AutoLink Options

Google Search 2 blocked Check AutoLink Options

# DSKM

Dansk Selskab for Klinisk Mikrobiologi

Forside

Historie

Love

Bestyrelse

Udvalg

Rapporter

Hæderspriser

[Web-master](#)  
Jens K. Møller

Opdateret den  
23.02.2006



[Medlemskab](#) [Aktuelt](#) [Nyt fra bestyrelsen](#) [ESCMID](#)

[DSKM møder](#) [Årsmøde på Sandbjerg](#) [Andre møder](#) [Kopi af færedrag](#)

[MDS-koder](#) [KMA'er i Danmark](#) [Uddannelse](#)

[LINKS](#) [DANRES](#) 

Internettet

start Ny side 1 - Microsoft ... Microsoft Excel - VEC... Microsoft PowerPoint ... DA 17:04

Ny side 1 - Microsoft Internet Explorer

Filer Rediger Vis Foretrukne Funktioner Hjælp

Tilbage Søg

Adresse http://www.d-s-k-m.suite.dk/ Hyperlinks

Google Hyperlinks

Check spelling of text you type on any web form in English

# DSKM

Dansk Selskab for Klinisk Mikrobiologi

**DANRES**

Samarbejde om overvågning af resistensforholdene i Danmark

**Side under opbygning!**

[Referat fra DANRES mødet den 25.01.2005](#)

**ESBL-samarbejde!**

Dennis Schröder Hansen, KMA Hillerød  
[DSH@ssi.dk](mailto:DSH@ssi.dk)

Niels Frimodt-Møller, AAS SSI  
[NFM@ssi.dk](mailto:NFM@ssi.dk)

Indsamling af ESBL isolater ([se oplæg](#))

Indsendelsessekretariat ([regneark kan downloades](#))

Udført Internettet

start Ny side 1 - Microsoft ... Microsoft Excel - VEC... Microsoft PowerPoint ... DA 17:07

**ESBL-indsendelsesskema** (kun enterobakterier, og kun ét isolat af samme species per patient)

1. Indsendende KMA:		2. Indsendelsesdato:	/ / 200_.	
3. Patientidentifikation (CPR)		—		
4. Lokalt prøvenummer:				
5. Prøvens geografi; hospital (navn-afdeling)/praksis (bynavn):				
6. Prøvetagningsdato:	/ / 200_.			
7. Prøven taget fra	Urin	Nedre luftveje	Blod	Andet:
8. Nosocomial (> 48 timer)	Community acquired			
9. Species	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. mirabilis</i>	Andet:
10. Identifieret ved hjælp af	API 20E	API 32E	Vitek 1/2	Andet:
11. Anvendt screeningstest	Cefpodoxime	Cefuroxime	Cephadroxil	Andet:
12. Anvendt konfirmatorisk test	DD-synergy-test	E-test med CL/TZ	Kombinationsdisk	Andet:
13. Kommentarer:				
Isolater indsendes løbende til:				
Frank Hansen, Afdelingen for Antibiotikaresistens og Sygehushygiejne, bygning 47 rum 107, Statens Serum Institut, 2300 København S				

# ESBL-isolater indsendt til VEC per 17/03/07

	Indsendt 17/3/07	1/1 – 30/6 2006 (+data)
Esbjerg	6	2
Herlev	66 (27+38 uden data)	0
Herning	32	8
Hillerød	33	6
Hvidovre	284	99
Næstved	27	18
SSI	36	8
Viborg	15	14
Ålborg	50	15
Århus	25	20
Odense	32	32
Total	(+2 uden data)	608 (+1 uden data) 225

21 mulige dubletter med samme CPR

# **ESBL-isolater indsendt til VEC per 17/03/07**

<b>Hjemme/Hospital</b>	Per 17/3 2007	1/1-30/6 2006
Nosocomiel	104	44
Community acquired	58	40
Ikke oplyst	446	141
Total	608	225

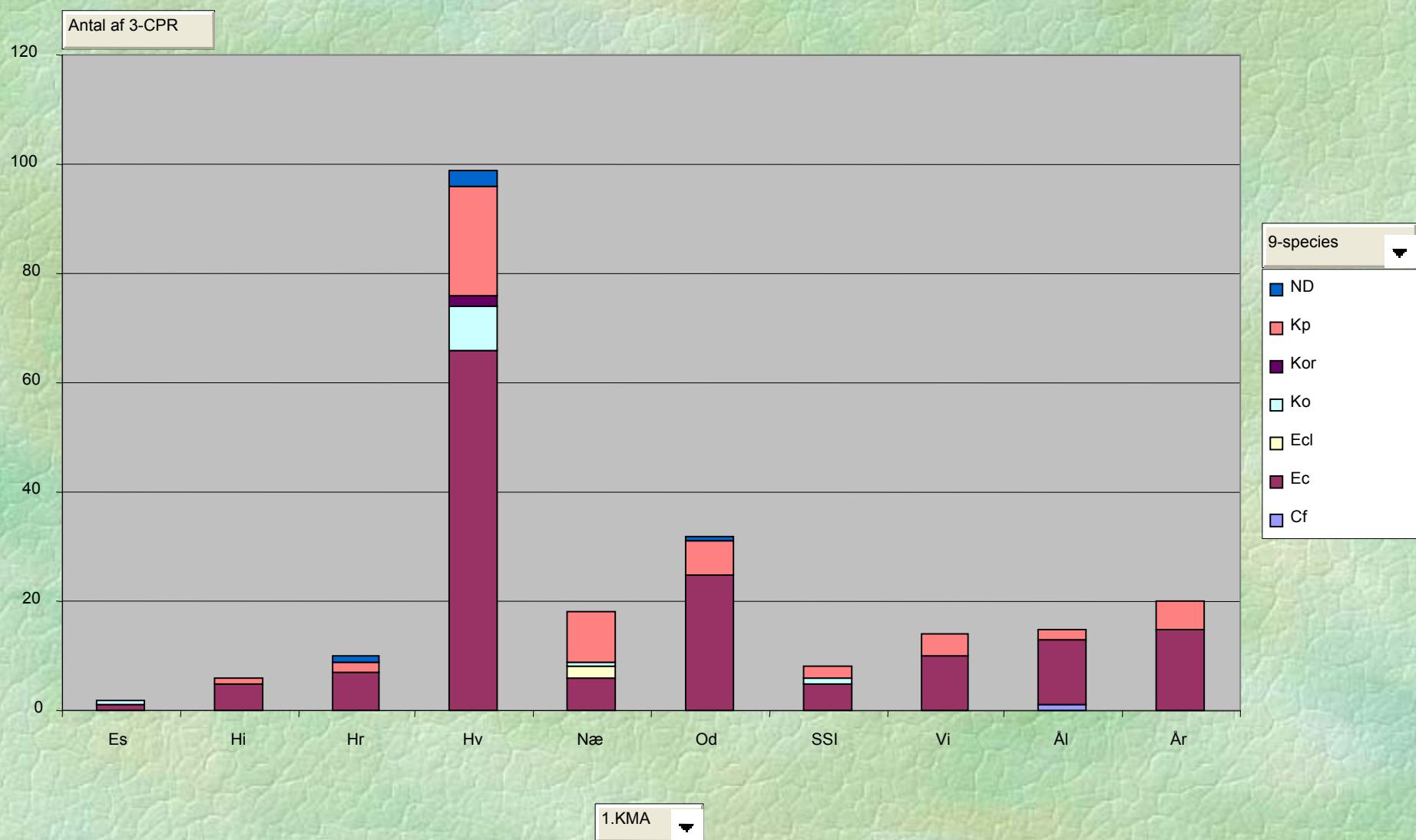
# ESBL-isolater indsendt til VEC per 17/03/07

Prøvemateriale	Per 17/3 2007	1/1-30/6 2006
Blod	48	13
Abdomen, indre	24	10
Podning sår m.m.	37	18
Trakealsekret	27	9
Urin	463	173
CVK	3	1
Andet	6	1
Total	608	225

# ESBL-isolater indsendt til VEC per 17/03/07

Species	Per 17/3 2007	1/1-30/6 2006
<i>C. freundii</i>	2	1
<i>E. cloacae</i>	6	2
<i>E. coli</i>	395	153
<i>K. ornithinolytica</i>	4	2
<i>K. oxytoca</i>	36	11
<i>K. pneumoniae</i>	148	51
Andet/ikke oplyst	17	5
Total	608	225

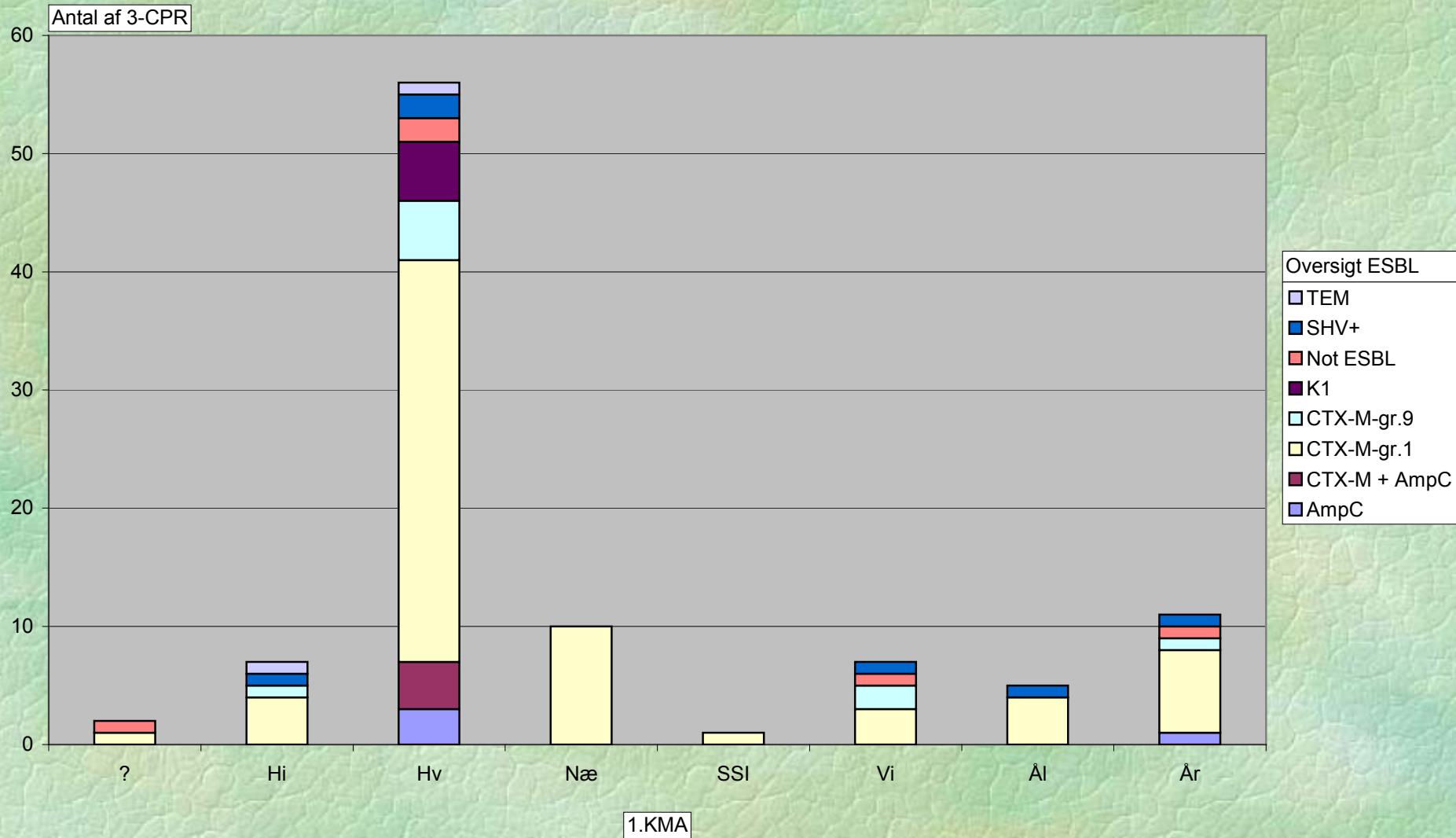
# 225 ESBL-isolater indsendt til VEC i perioden 1/1 - 30/6 2006



# 99 første ESBL-isolater indsendt til VEC

ESBL gener	Antal
CTX-M-gr.1	64
CTX-M-gr.9	9
SHV-12/-28/-61 + AmpC/CTX-M	6
K1 ( <i>K. oxytoca</i> )	5
CTX-M + AmpC	4
AmpC	4
TEM-52, TEM-123	2
Andet (incl. Non-ESBL)	5
Total	99

# 99 første ESBL-isolater indsendt til VEC



## Prævalensundersøgelse af ESBL-producerende *E. coli*, *K. pneumoniae* og *P. mirabilis* fra urin og blod i perioden 1.maj til 30. juni 2007

Forud for indsamlingen af ESBL isolater 1.januar – 30. juni 2006, var spørgsmålet om der var ESBL-producerende enterobakterier i prøver fra danske patienter i nævneværdi grad. Med indsendelsen af ca. 300 isolater fra den omtalte periode og 600 indtil dato, er dette bekræftet, og det kan konstateres at de overvejende drejer sig om ESBL af CTX-M typen, og at isolaterne først og fremmest bliver fundet i urinen fra både hospitaliserede patienter og patienter fra almen praksis. Mens nogle afdelinger har været meget dedikerede og systematiske i deres indsamling, har andre enten ikke deltaget eller ikke udvist helt samme grad af entusiasme. KMA Århus oplyser at de har fundet en prævalens på ca. 3 %. De til dato opnåede resultater vil blive fremlagt på næste DANRES møde 20. marts i Odense.

For at kunne vurdere problemets omfang og dokumentere om dette er et problem i (fortsat) stigning, og for at få afklaret den nationale geografi, er det blevet påtrængende nødvendigt at finde prævalensen af disse stammer i DK. Vi vil derfor foreslå at der laves en landsdækkende prævalensundersøgelse af ESBL-producerende *E. coli*, *K. pneumoniae* og *P. mirabilis* fra urin og blod i perioden **1.maj til 30.juni 2007**. Vi har bestræbt os på at gøre protokollen så simpel og lidet arbejdskrævende som muligt.

Dennis S Hansen, KMA Hillerød Hospital

Niels Frimodt Møller, SSI

Robert L Skov, SSI

Ulrik Justesen, KMA, Odense Universitetshospital

Kurt Fuursted, KMA, Århus Sygehus

Ole Heltberg, KMA, Næstved Sygehus

Tove Højbjerg, KMA, Aalborg Sygehus

## PROTOKOL

<b>Periode</b>	Prøver modtaget i laboratoriet i perioden <b>1.maj - 30. juni 2007</b> .
<b>Species</b>	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> og <i>P. mirabilis</i>
<b>Prøvekategorier</b>	Blod og urin (både fra hospital og praksis)
<b>Hvilke isolater</b>	Alle isolater som resistensundersøges (primær og sekundær). Grundet den korte undersøgelsesperiode bør hver patient kun optræde én gang (undtaget er fund af ESBL i 2. eller senere prøve).
<b>Screeningtest</b>	1) Cefpodoxime, eller 2) Cefotaxime <u>og</u> ceftazidime, se tabel nedenfor
<b>Konfirmatorisktest</b>	1) Kombinationsdisk (cefotaxime <u>og</u> ceftazidime fra Oxoid/Rosco), eller 2) E-test (CT/CTL <u>og</u> TZ/TZL), eller 3) Vitek 2, AST-N041 kortet
<b>Data</b>	Data indsendes før 31/7 på vedhæftede dataark til Dennis Hansen (DSH@ssi.dk). Der rapporteres antal undersøgte isolater i de to prøvekategorier, antal screeningtest positive og antal konfirmatorisk test positive, for hver af de tre species.
<b>Isolater</b>	Alle ESBL konfirmatorisk test positive isolater bedes indsendt til Frank Hansen, SSI med ”ESBL prævalens” anført på indsendelsesskemaet (kan fortsat hentes på DSKMs hjemmeside).

			Mueller-H	ISA	ISA+blod	DBA
cefpodoxime	Oxoid	CPD 10		<b>&lt; 25 mm</b>		
	Rosco	CFPOX 30	<b>&lt; 20 mm</b>			<b>&lt; 24 mm</b>
cefotaxime	Oxoid	CTX 5		<b>&lt; 24 mm*</b>		
	Rosco	CFTAX 30	<b>&lt; 26 mm</b>	<b>&lt; 34 mm*</b>		<b>&lt; 28 mm*</b>
ceftazidime	Oxoid	CAZ 10		<b>&lt; 24 mm*</b>		
	Rosco	CEZDI 30	<b>&lt; 24 mm</b>	<b>&lt; 28 mm*</b>		<b>&lt; 28 mm*</b>

\* Screening af alle isolater som er I eller R. Den **anbefaede metode** er angivet med fed skrift.

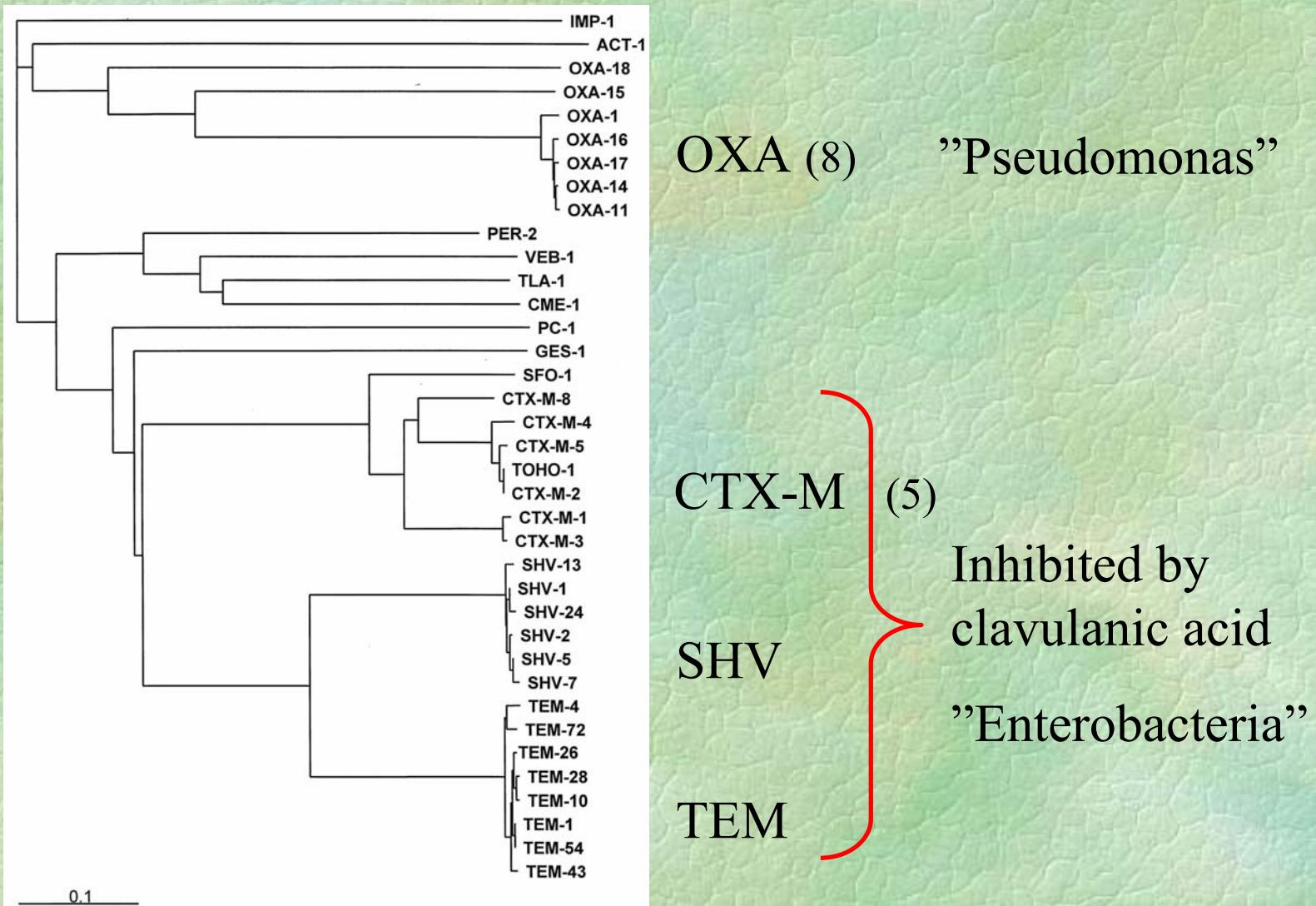
Kun én prøve med samme species per patient (CPR); undtagelse er sekundært fund af ESBL-producerende isolat hos allerede inkluderet patient.			
Screeningstest anvendt	1) Disk/tablet(er): _____ 2) Resistensagar: _____		
Konfirmatorisktest anvendt	1) Kombinationsdisk: _____ 2) E-test (CT/CTL etc.): _____		
<b>Blod</b> , totalt antal undersøgte patienter (eventuelt også antal kolber)			
<b>Urin</b> , totalt antal undersøgte patienter (eventuelt også antal uriner)			
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. mirabilis</i>
Identifikationsmetode (la+, PGUA; Vitek; API20E; etc.)			
<b>Blod</b> , antal undersøgte			
<b>Blod</b> , antal screenede			
<b>Blod</b> , antal konfirmatorisk positive			
<b>Urin-P</b> (praksis), antal undersøgte			
<b>Urin-P</b> , antal screenede			
<b>Urin-P</b> , antal konfirmatorisk positive			
<b>Urin-H</b> (hospital), antal undersøgte			
<b>Urin-H</b> , antal screenede			
<b>Urin-H</b> , antal konfirmatorisk positive			

Extra materiale...

# **Number of $\beta$ -lactamases (ESBLs) primo 2006**

- TEM 150 (155 per 10-09-06 [www.lahey.org/studies](http://www.lahey.org/studies))
- SHV 88
- OXA 88
- CTX-M 53
- IMP 22
- VIM 12
- Smaller number of many other  $\beta$ -lactamases
- Approximately 50% with ESBL activity

# ESBL phylogeny



# Classification by Bush-Jacoby-Medieros functional groups and Ambler molecular classes

VOL. 8, 1995

**β-LACTAMASES IN BACTERIAL RESISTANCE**

559

TABLE I. Correspondence between Ambler's molecular classification of β-lactamases and the functional groups of Bush et al.<sup>a</sup>

Structural class (Ambler)	Functional group (Bush)	Activity <sup>b</sup>							Inhibition by clavulanic acid
		Penicillins	Cephalosporins	Oxazolidinones	Cephalosporins	Cefazosin	Acarbose	Imipenem	
<b>Serine β-lactamases</b>									
A	2a	+++	+	-	±	-	-	-	++
	2b	+++	+	+	++	-	-	-	++
	2be	+++	+	+	++	++	++	-	++
	2br	+++	+	+	+	-	-	-	-
	2c	++	+++	+	+	-	-	-	+
	2e	++	++	-	++	++	++	-	++
	2f	++	+	?	+	+	++	++	+
C	1	++	±	Inhibitor	+++	+	Inhibitor	-	-
D	2d	++	+	+++	+	-	-	-	±
Undetermined <sup>c</sup>	4*	++	++	++	Y	Y	-	-	-
<b>Zinc β-lactamases</b>									
B	3	++	++	++	++	++	+	++	-

\* Data from Ambler's classification (4, 226) and the classification of Bush et al. (37). This table includes some simplifications. In particular, (i) group 2d includes molecular class A metallo-β-lactamases from *Actinomycete* and *Streptomyces* spp., as well as class D enzymes from gram-negative rods; (ii) hydrolytic activity varies within each group, and (iii) sequences remain to be determined for many enzymes indicated in Bush's scheme.

<sup>b</sup> +++, preferred substrate (highest  $K_m$ ); ++, good substrate; +, hydrolyzed; ±, barely hydrolyzed; -, stable; Y, variable within group; ?, uncertain.

<sup>c</sup> None of Bush's group 4 enzymes has yet been sequenced; they are assumed to be serine types because they lack carbapenemase activity.

# ESBL...a working definition

- $\beta$ -lactamases capable of conferring bacterial resistance to penicillins, 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> generations cephalosporins, and aztreonam, by hydrolysis and which are inhibited by  $\beta$ -lactamase inhibitors (clavulanic acid)
- belongs to functional group  
2be (class A, serin  $\beta$ -lactamase, TEM, SHV, CTX-M)  
(2d (class D, serin  $\beta$ -lactamase, OXA))
- often on plasmids

# EPIDEMIOLOGY

- 1982 → 2000
- SHV & TEM
- EU, Frankrig, USA
- Hospitalized patients
- *K. pneumoniae*
- Gentamicin resistance and MR
- 2000 →
- CTX-M
- Sydamerika, WW
- Community acquired
- *E. coli*
- Less co-resistance

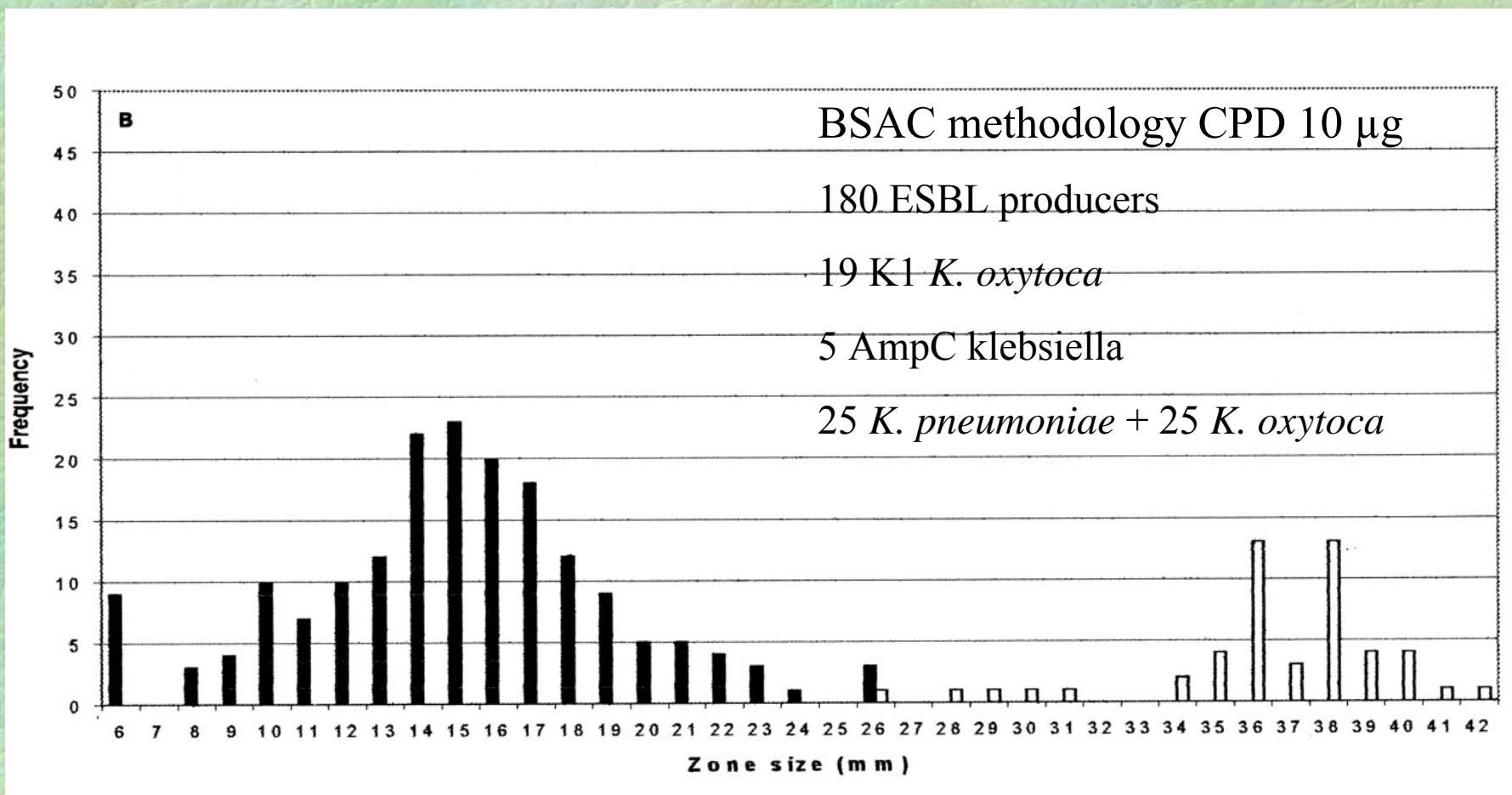
# The two steps of ESBL detecting:

1. screening
2. confirmatory testing



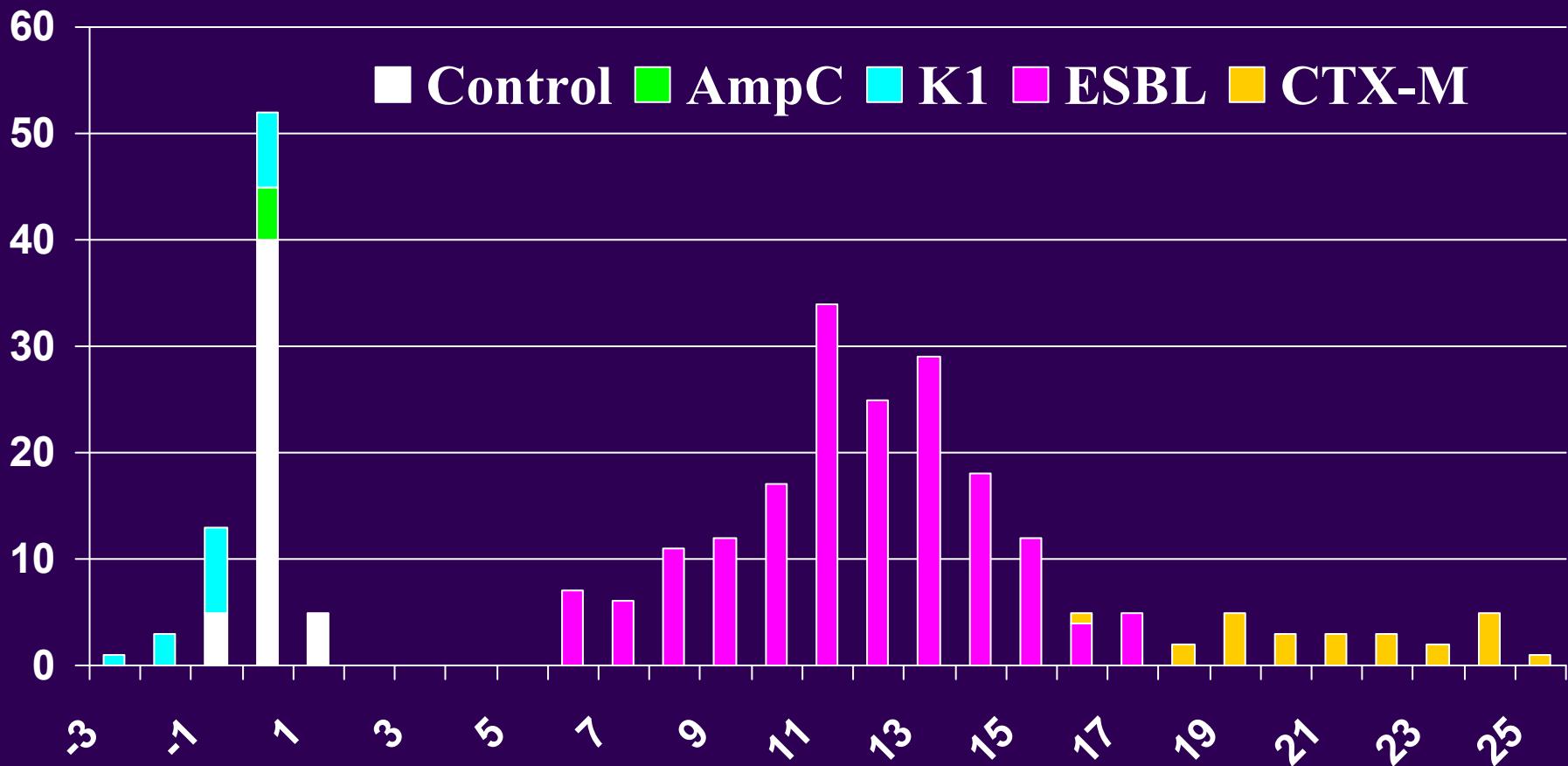
- A) Travel anamnesis
- B) ↓ susceptibility to a cephalosporine
- C) ↓ susceptibility to gentamicin

# 1. screening

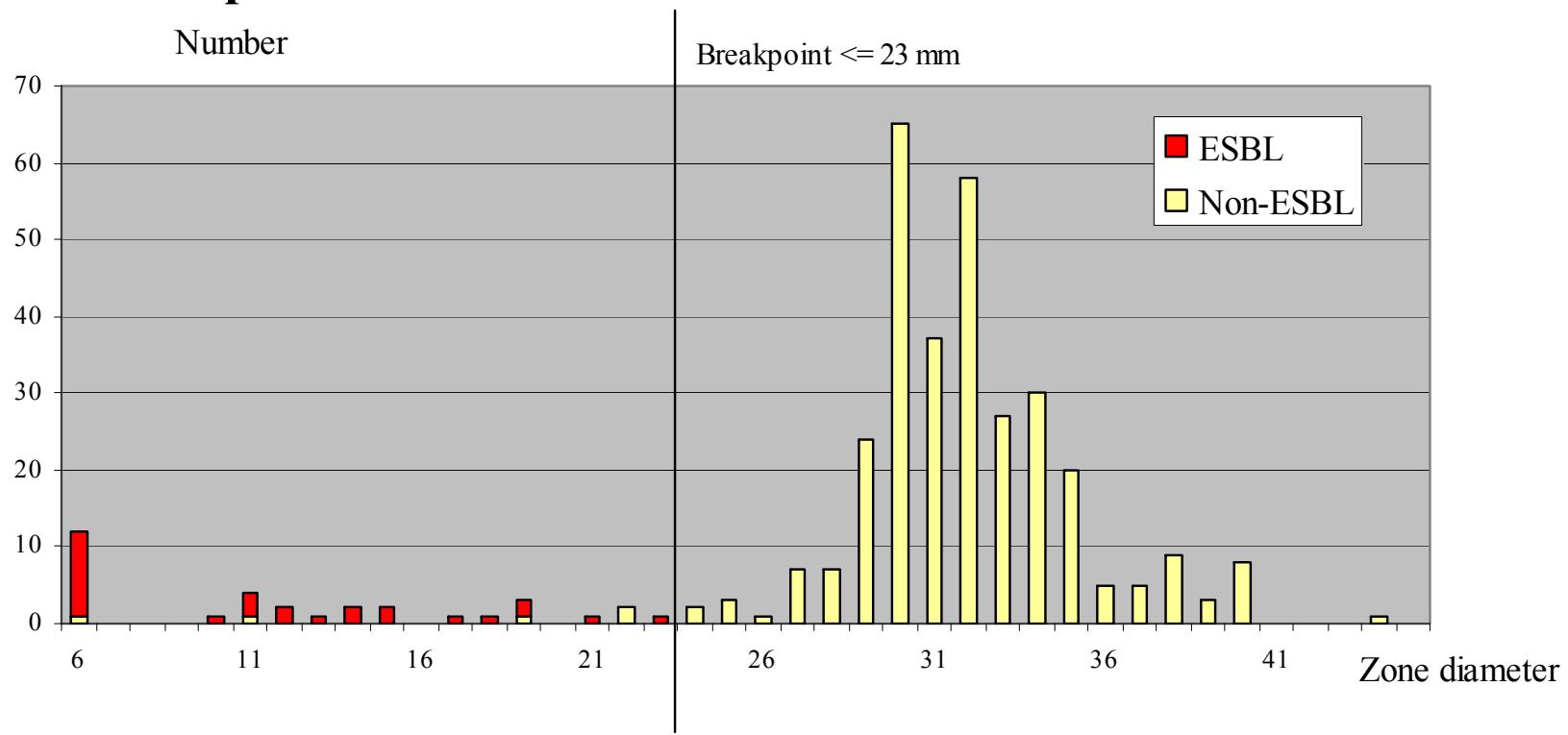


Carter MW (Livermore) JCM 2000;38:4228-32

# *Zone differences (mm), Klebs & E. coli c'pod/clav 10+1 µg - c'pod 10 µg*

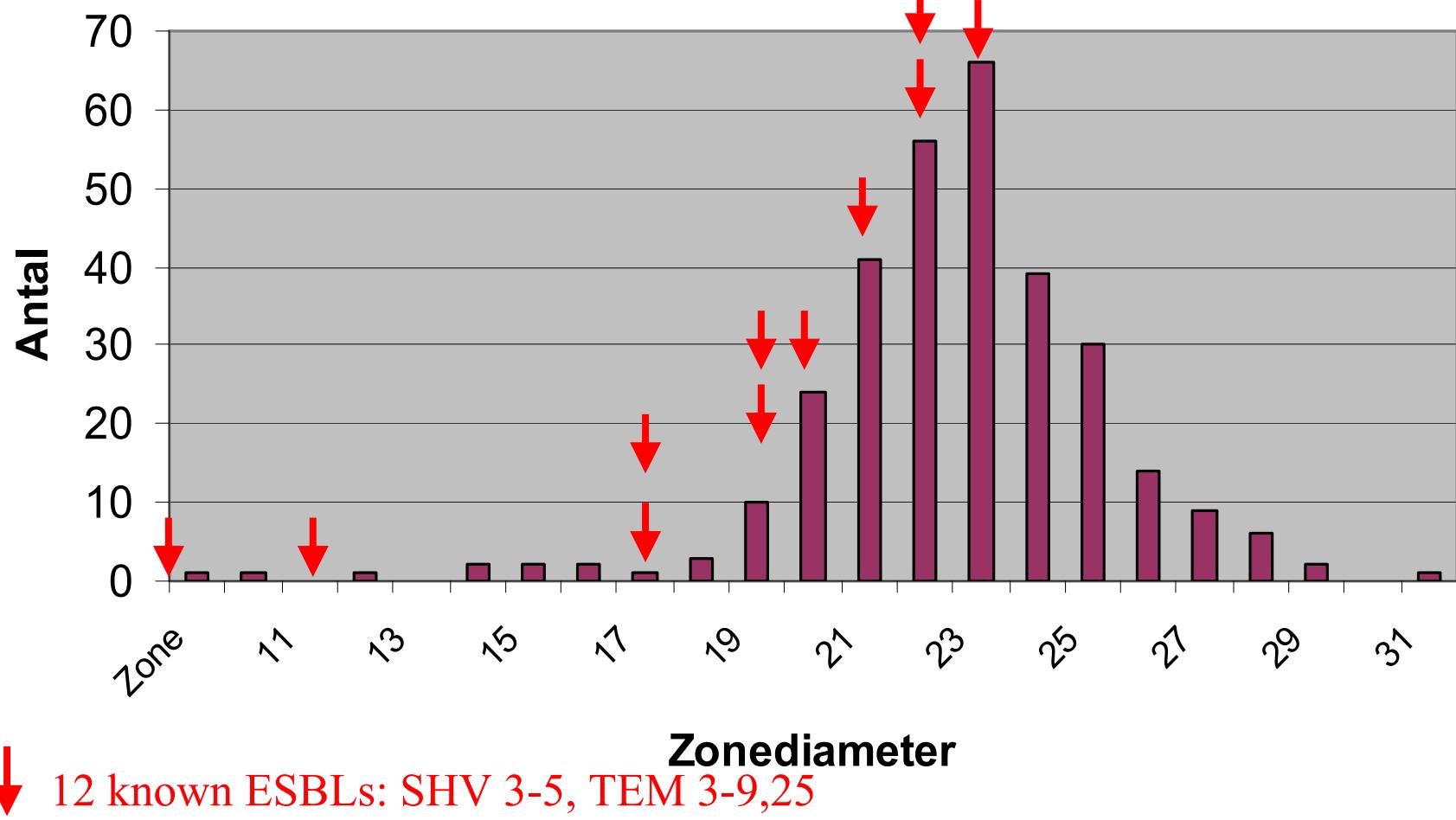


## Cefpodoxime zones for 318 E.coli and 28 ESBL strains



SRGA methodology, Isosensitest agar without blood, CPD 10 µg Oxoid disc

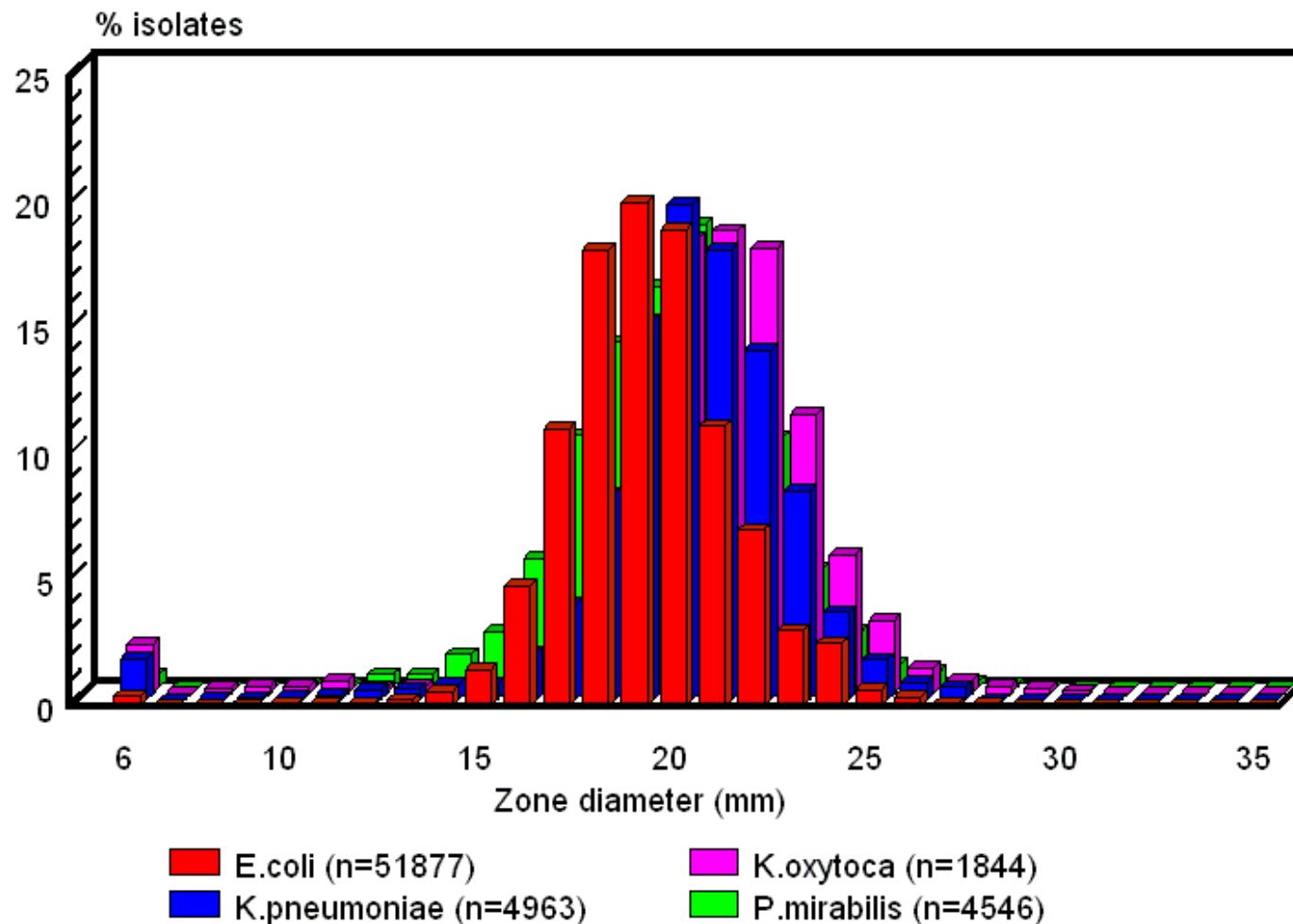
## Cefalexinzone for E.coli



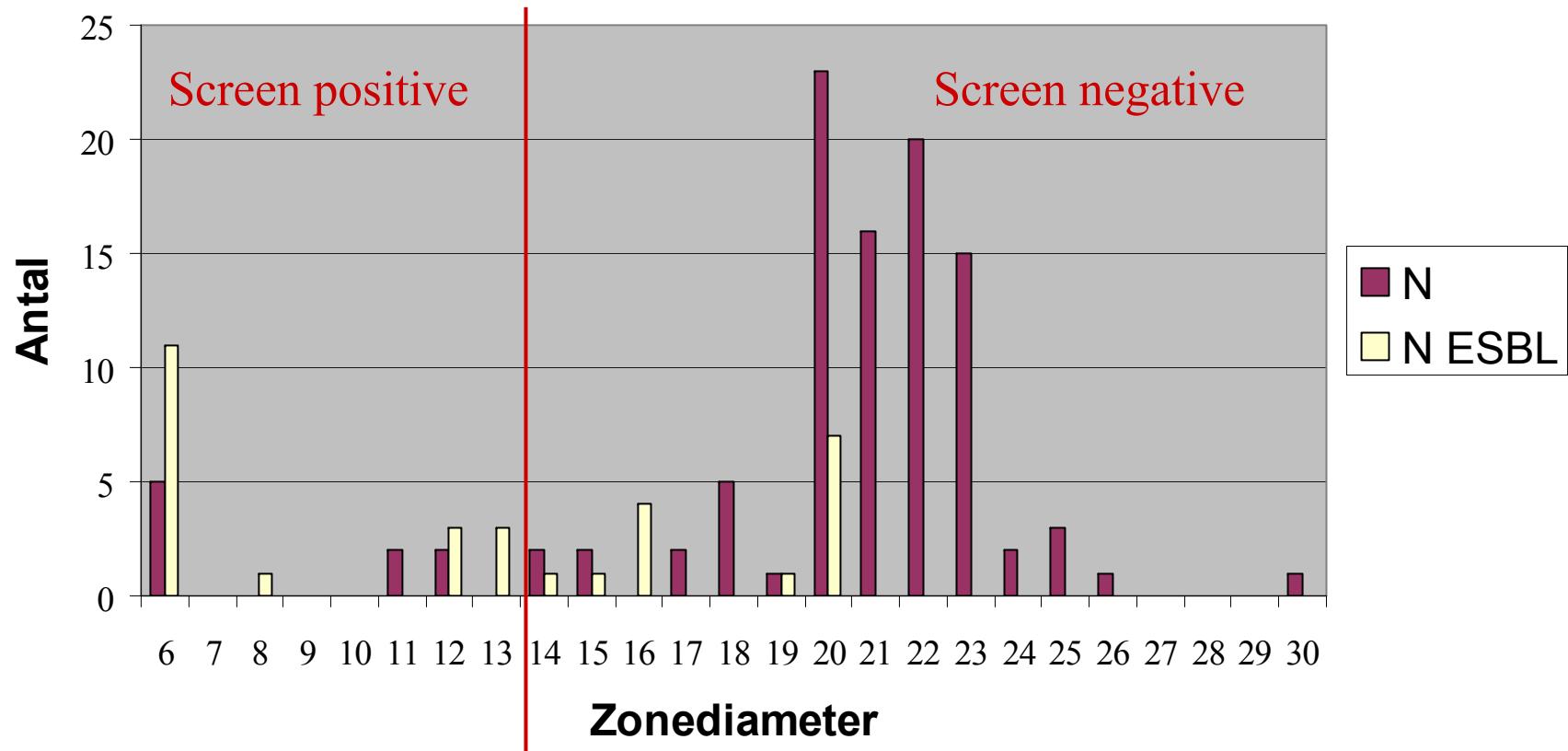
## Screening for betalactam resistance\* using Cefadroxil 30 µg disk

SRGA breakpoints on ISA (Oxoid), semiconfluent inoculum, 18-20 h incubation, 36 C, ambient air

The following breakpoints valid for *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* and *Proteus mirabilis*: ESBL-screen negative  $\geq 14$  mm; ESBL-screen positive zone diameter  $\leq 13$  mm Breakpoints for *Citrobacter* spp are 10/9 mm.



## Cefadroxil zonediameter E.coli



# Choice of indicator cephalosporin



	Sensitivity	Specificity
Cefotaxime & ceftazidime	Good	Good
Cefpodoxime	Good	Moderate
Cefuroxime	Poor	Poor
Cephalexin or cephadrine	Moderate	Poor
Cefpirome or Cefepime	Poor	Good

## 2. confirmatory testing

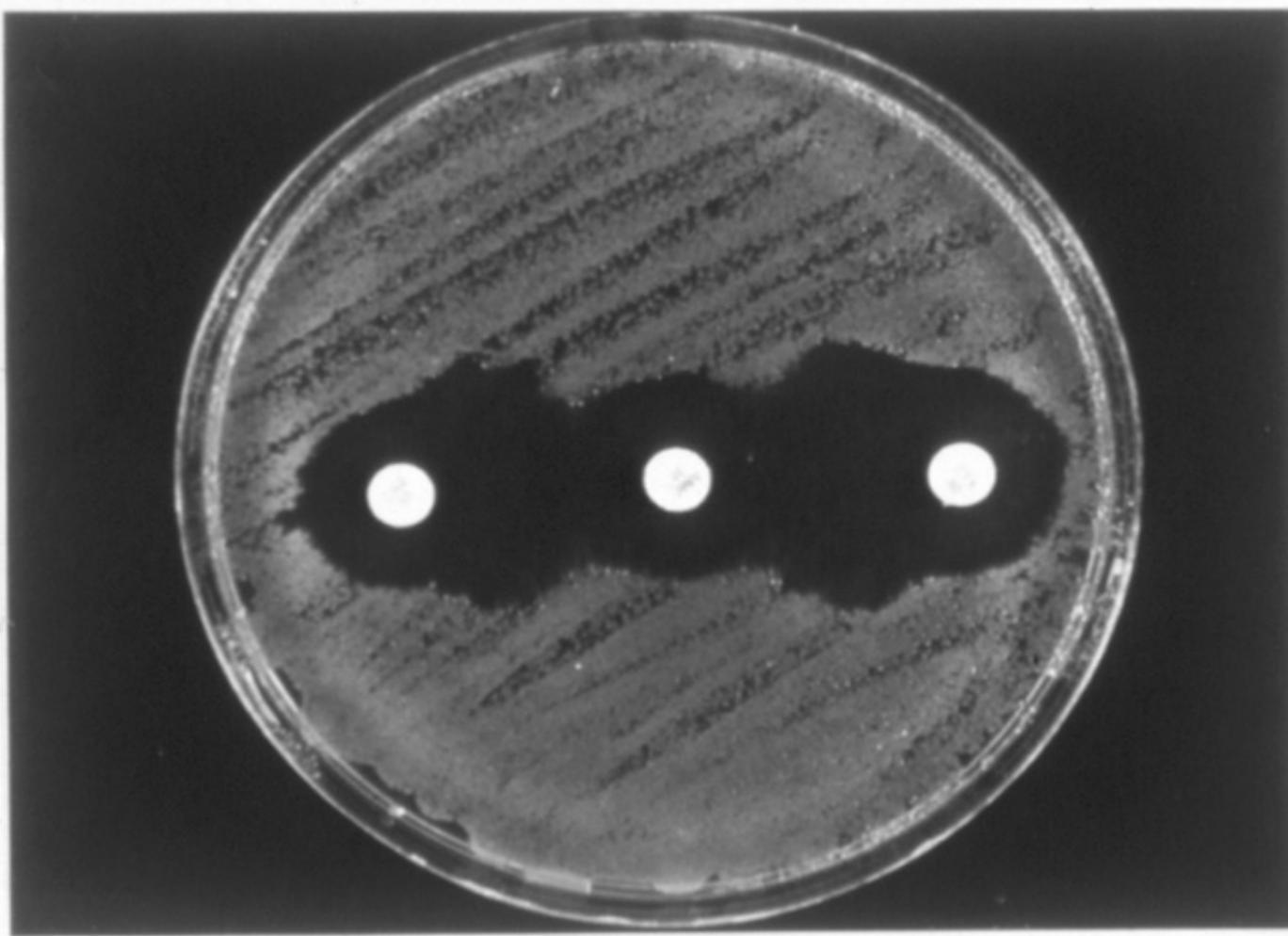


Demonstrate synergy with clavulanic acid:

- Double disc
- Combination disc
- Etest

## Double disc test for *K. pneumoniae* TEM-3<sup>+</sup>

---

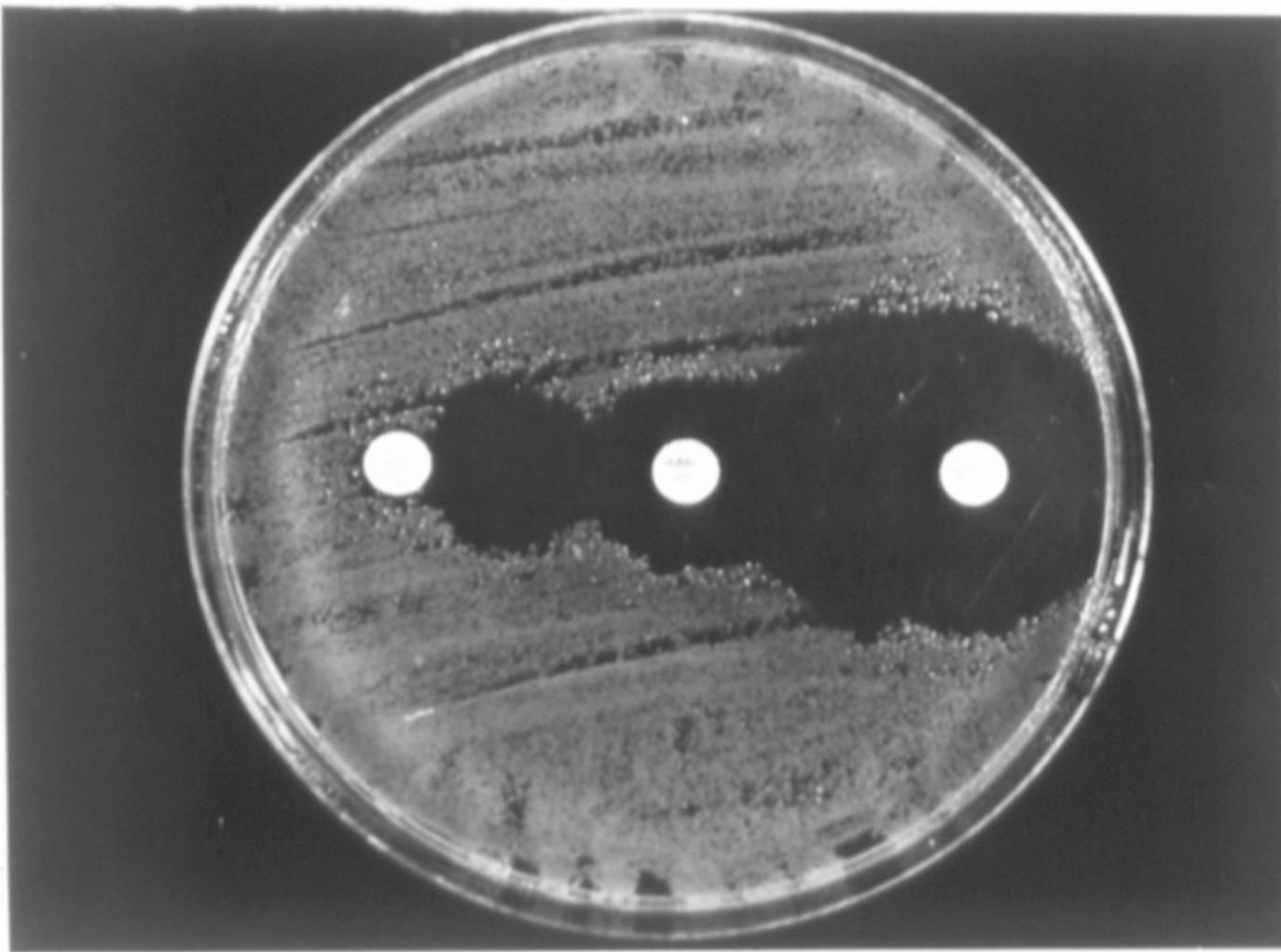


---

Ceftazidime 30   Augmentin 20+10   Cefotaxime 30 µg

# Double disc test for *K. pneumoniae* TEM-10<sup>+</sup>

---



---

Ceftazidime 30   Augmentin 20+10   Cefotaxime 30 µg

*K. pneumoniae* with 2 + confirmatory phenotypic tests:  
-double disk (synergism) and  
-double disc test with Roco Neosensitabs

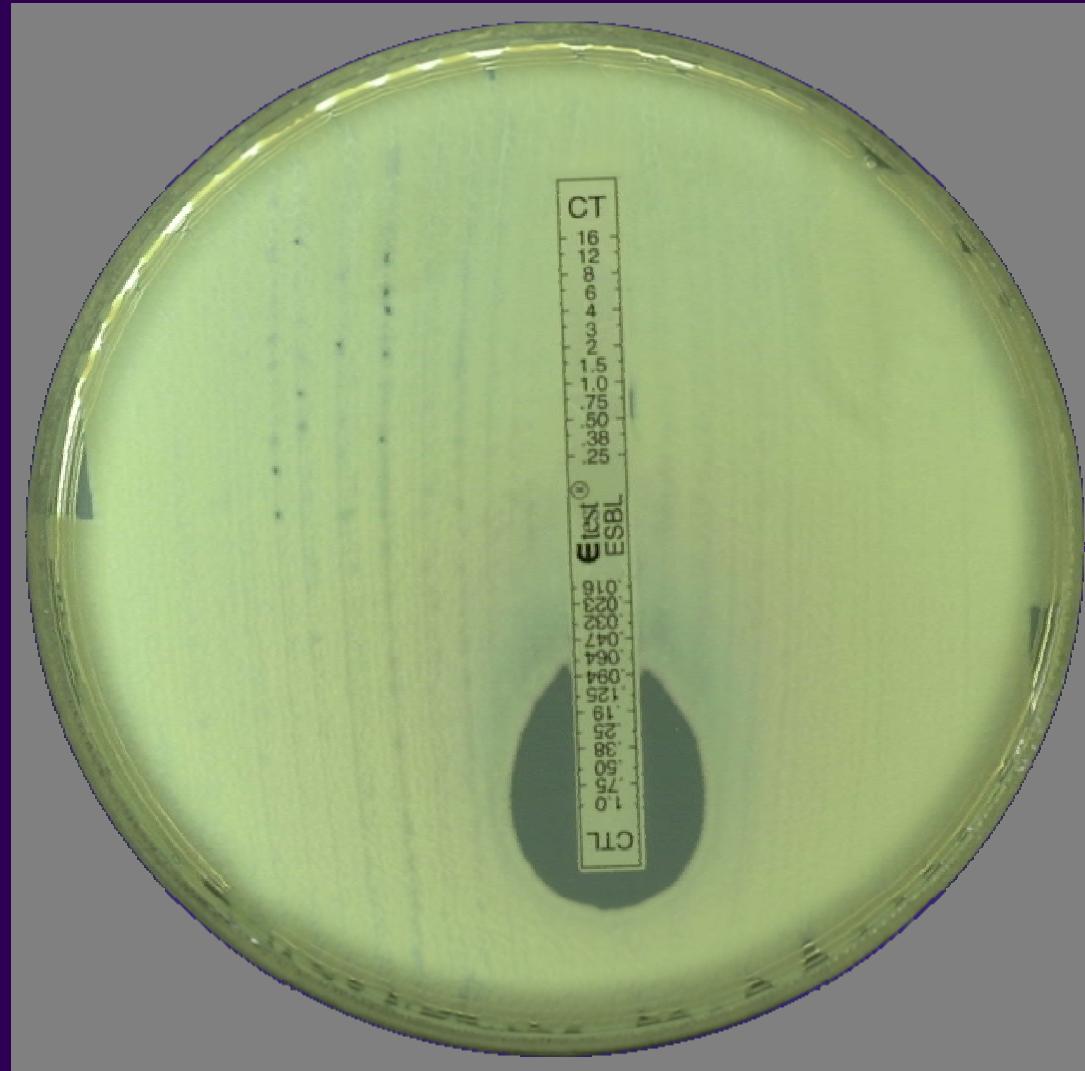


# *Etest for ESBLs*



Cefotaxime

Cefotaxime  
+  
clavulanate

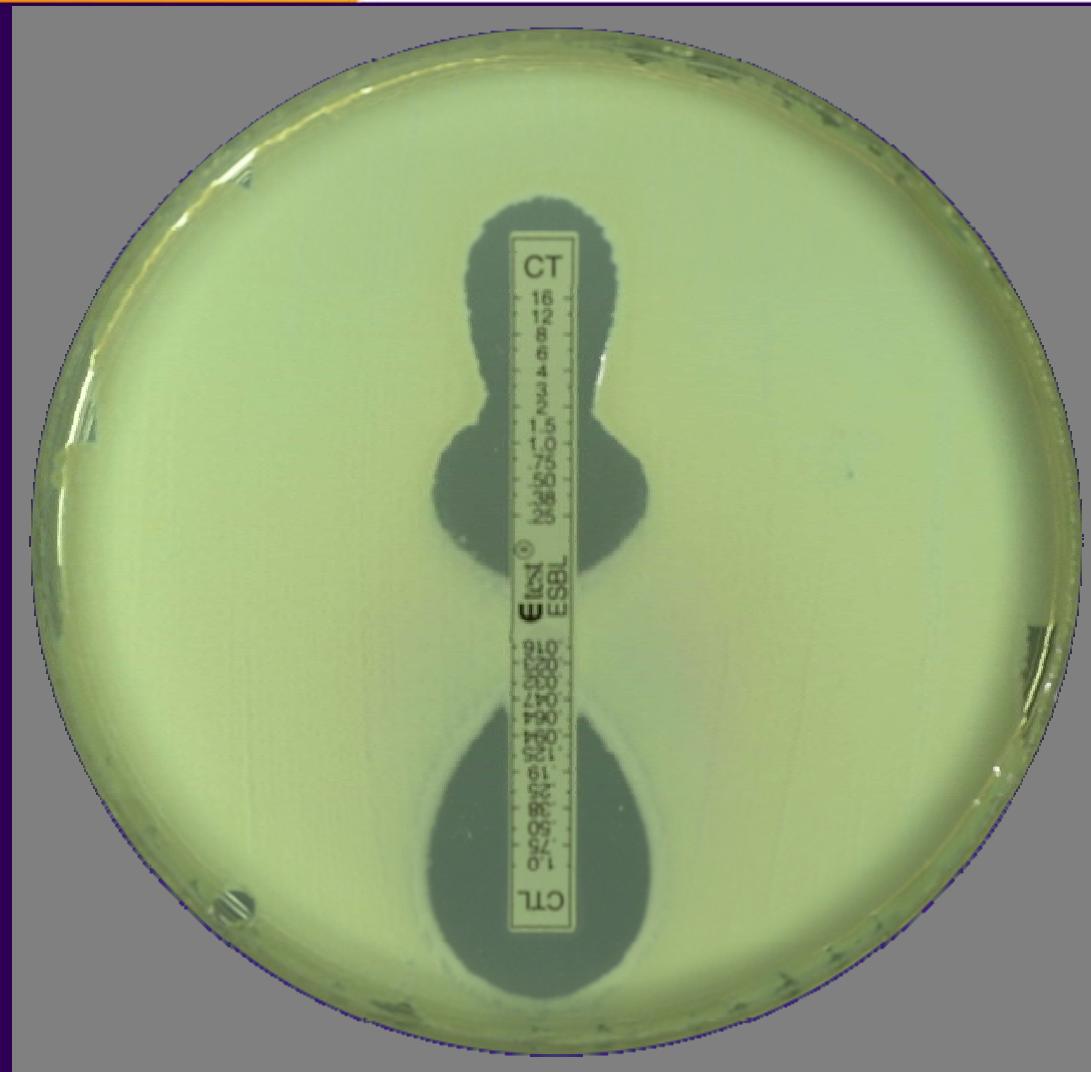


# *Etest for ESBLs*



Cefotaxime

Cefotaxime  
+  
clavulanate



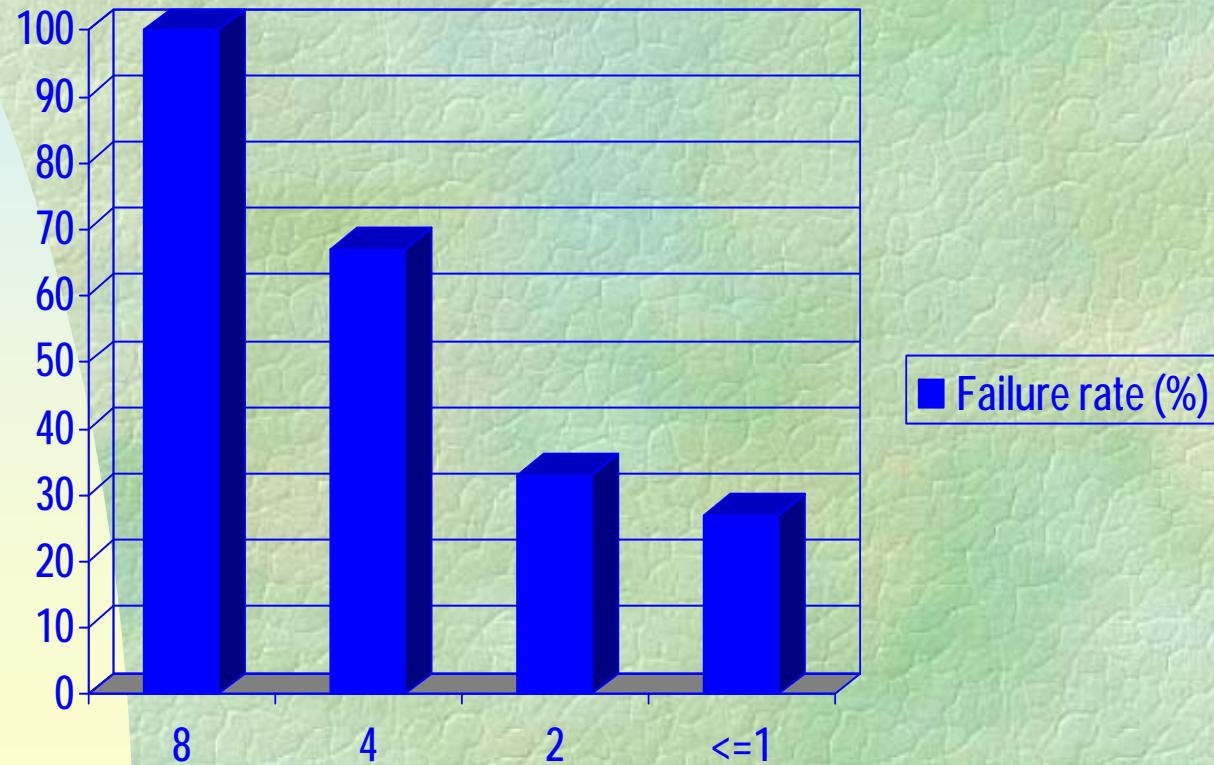
# ESBL confirmatory tests



	Pro	Contra
<b>Double disc</b>	Cheap	Best disc spacing varies with strain
<b>Combination disc</b>	Cheap, sensitive & specific	Batch variation; Controls critical
<b>Etest</b>	Sensitive Internally controlled	More expensive; False +ve's with K1 in <i>K. oxytoca</i>

# Outcome by MIC for susceptible isolates

All 4 patients with intermediate susceptible strains had clinical failure (2 died)



Failure 54% (15 of 28) for MICs 2-8  $\mu\text{g/ml}$

# Efficacy of different $\beta$ -lactams against a TEM-26 ESBL producing *K. pneumoniae* in the rat intra-abdominal abscess model

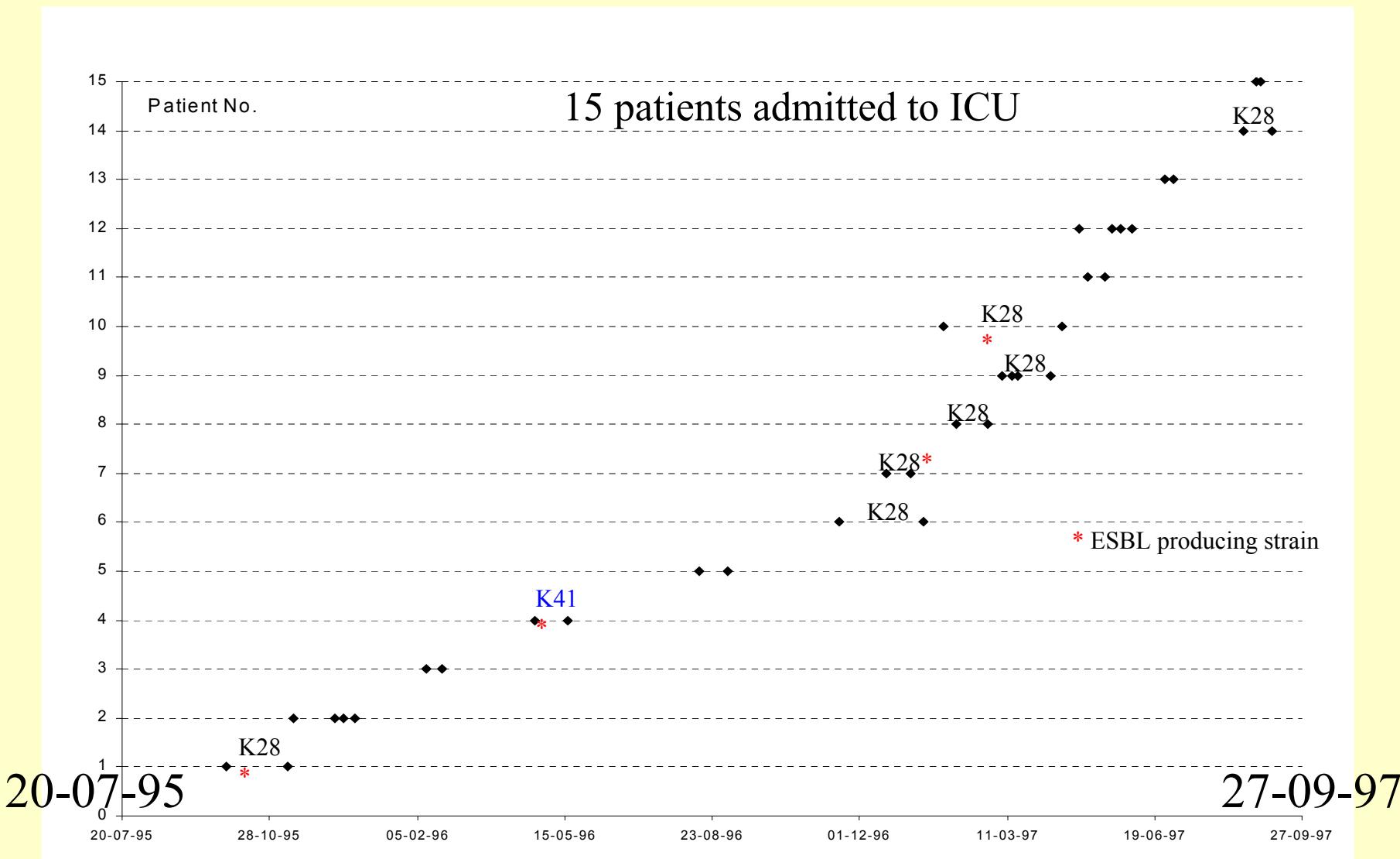
	MIC 10 <sup>5</sup> CFU/ml	MIC 10 <sup>8</sup> CFU/ml	log10 CFU/g
None	-	-	8.02
Cefoperazone	2	256	7.41
Cefoperazone+sulbactam	0,5	256	5.84
Cefotaxime	10,5	256	7.26
Cefpirome	1	>256	7.80
Ceftazidim	>256	-	8.85
Imipenem	0,5	16	4.99

# ESBL & Denmark

## Case 1: 75-year old female

- June 1993 transferred to Hvidovre Hospital after traffic accident in Turkey. Multiple injuries and respirator treatment. Prophylactic antibiotic treatment with ceftazidime, vancomycin and tobramycin.
- Culture from urine day 18 grew MR K. pneumoniae. This strain was not kept.  
Pt discharged to rehab. unit.
- March 1994 re-admitted with stroke. In urine MR *K. pneumoniae*, K-type K20, SHV-5  
After 3 weeks discharged to rehab. unit.

# A Two-year Lasting Outbreak of Multiple Antibiotic Resistant K. pneumoniae K28 in an Intensive Care Unit in Denmark



# Figure 1 Ribogroup of 13 MRKP strains isolated in the ICU

Strain	RiboGroup	RiboPrint(R) Pattern
1:B-8	RIB01 58-S-6	
1:H-3	RIB01 58-S-6	
2:A-1	RIB01 58-S-6	
1:F-5	RIB01 58-S-6	
1:F-8	RIB01 58-S-6	
2:A-8	RIB01 58-S-6	
1:E-8	RIB01 58-S-6	
2:B-1	RIB01 58-S-6	
2:B-2	RIB01 58-S-6	
2:B-7	RIB01 58-S-6	
1:D-4	RIB01 182-S-6	
1:E-6	RIB01 182-S-6	
2:A-6	RIB01 182-S-6	

# The prevalence of ESBL producing *E. coli* and *Klebsiella* strains in the Copenhagen area of Denmark

Anne Kjerulf

Dennis S Hansen

Dorthe Sandvang

Frank Hansen

Niels Frimodt-Møller

Herlev Hospital

Hvidovre Hospital &  
Hillerød Sygehus

Statens Serum Institut

Statens Serum Institut

Statens Serum Institut

# Material & Methods 1

## Four strain collections

- A:** 380 consecutive isolates mostly from urine,  
27/2 to 24/3 2003, Hvidovre Hospital
- B:** 200 gentamicin resistant isolates,  
1998 to 2003, Hvidovre Hospital
- C:** 210 consecutive blood isolates,  
1/7 to 31/12 2001, Herlev Hospital
- D:** 68 cefuroxime resistant isolates,  
1/1 2002 to 30/6 2003, Herlev Hospital

## Material & Methods 2

Screening with Cefpodoxime ( $\leq 23$  mm)

Oxoid discs on Iso-sensitest agar  $\div$  blood

Phenotypic confirmatory test ( $\geq 5$ mm)

Oxoid combination discs method

Cefpodoxime, Ceftazidime and  
Cefotaxime +/- clavulanic acid

PCR & sequencing for TEM, SHV, OXA and  
CTX-M (group 1, 2 and 9) enzymes

# Results 1

	Species	Screening positive N	Confirmatory-test positive N	Prevalence of ESBL phenotype (%)	ESBL Genes	Prevalence of ESBL genes (%)
					CTX-M    SHV	
<b>A</b> (380)	<i>E. coli</i>	9	3	0.8	2	1
	<i>K. pneumoniae</i>	0	0			
	<i>K. oxytoca</i>	3	0			
<b>B</b> (200)	<i>E. coli</i>	19	13*	8.0	6	6
	<i>K. pneumoniae</i>	3	3			1
	<i>K. oxytoca</i>	0	0			
<b>C</b> (210)	<i>E. coli</i>	5	0	0		0
<b>D</b> (68)	<i>E. coli</i>	34	29	70.6	22	5
	<i>K. pneumoniae</i>	18	17		13	1
	<i>K. oxytoca</i>	3	2			

\*Positive only with cefepime +/- clavulanic acid

## Results 2

	Non-ESBL phenotype	ESBL phenotype
TEM (63)	TEM-1b	
SHV (30)	SHV-1,11,26,28 (14) LEN (1) OKP (1)	SHV-2 (6) SHV-12 (7) SHV-38 (1)
OXA (4)	OXA-10	
CTX-M (43)		group 1 (36) group 2 (1) group 9 (6)