

CPE Detektion

Carbapenemasen bei Enterobakterien erkennen

Rainer Hartl

Nationales Referenzzentrum für
nosokomiale Infektionen und Antibiotikaresistenz
Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Tropenmedizin
Krankenhauses der Elisabethinen Linz



- **Betalaktamasen: bakterielle Enzyme, die den Betalaktamring von Betalaktamantibiotika hydrolysieren können**
- **CPE: Carbapenemase produzierende Enterobakterien**
- **Weltweit wird eine rasante Zunahme von Bakterien mit diesem Resistenzmechanismus beschrieben**
- **Aufgrund der stark eingeschränkten therapeutischen Optionen wird CPE auch von Seiten des ECDC hohe Aufmerksamkeit geschenkt**

Clin. Microbiol .Infect. 2012 18: 413–431

- **Ambler Klasse A (Serin Carbapenemase): KPC, GESlike etc.**
 - Hydrolysieren so gut wie alle Betalaktame
- **Ambler Klasse B (Metallobetalaktamase): VIM, IMP, NDM etc.**
 - Hydrolysieren Penicilline, Cephalosporine und Carbapeneme
 - Keine Aktivität gegenüber Monobactamen
- **Ambler Klasse D (Oxacarbapenemase): OXA-48**
 - Zahlreiche Varianten: OXA-181, OXA-162, OXA-244, OXA-245, OXA-247 : Hydrolysieren Penicilline, Schmalspektrumcephalosporine und Carbapeneme (OXA-48 ist die effizienteste Klasse D Carbapenemase)
 - Oxyiminobetalaktame und Aztreonam werden nur schlecht hydrolysiert

Clin. Microbiol. Rev. 2007 20: 440–458

- **Beschreibung neuer Carbapenemasen**

- Bsp.: OXA-244 und OXA-245 in *K. pneumoniae* Isolaten

J. Antimicrob. Chemother. 2013 68: 317–321

- **Beschreibung von Carbapenemasen bei neuen Species**

- Bsp.: GIM-1 in *Enterobacter cloacae* in Deutschland

Antimicrob. Chemother. 2013 68: 558–561

- **Globale Verbreitung von bisher lokal begrenzten Enzymen**

- Erstbeschreibung von OXA-48 in den USA

J. Clin. Microbiol. 2013 51: 680-683



CASE REPORT

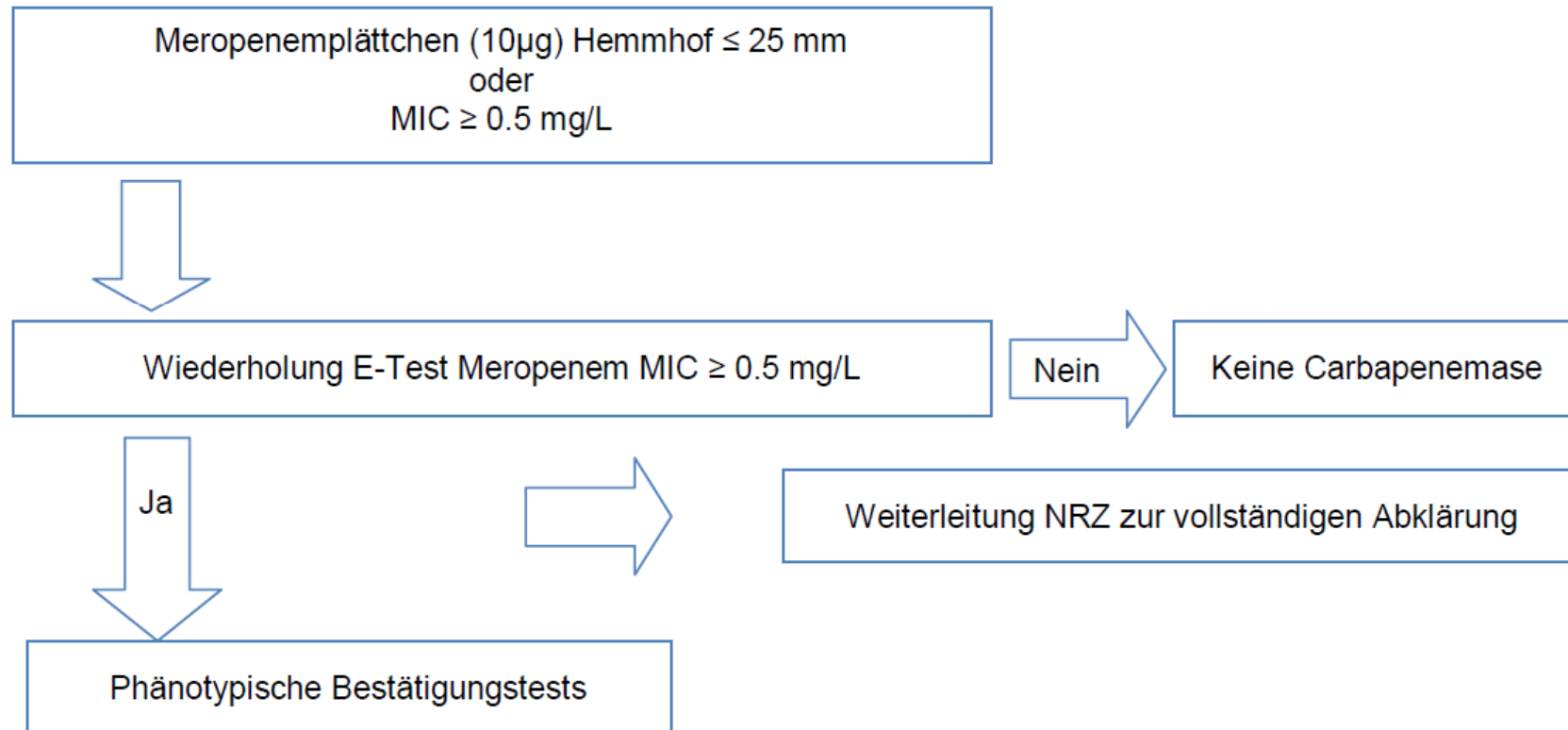
First Clinical Cases of OXA-48-Producing Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States: the “Menace” Arrives in the New World

Amy J. Mathers,^{a,b} Kevin C. Hazen,^{b,c} Joanne Carroll,^b Anthony J. Yeh,^a Heather L. Cox,^a Robert A. Bonomo,^d Costi D. Sifri^{a,e}

- **Nach EUCAST für Carbapeneme sensibel interpretierte Enterobakterien (Meropenem ab ≤ 2 mg/L) können ein Carbapenemasegen tragen**
- **Herabgesetzte Sensibilität gegenüber Carbapenemen beruht nicht zwangsläufig auf einer Carbapenemase (Bsp.: CTX-M ESBL oder AmpC in Kombination mit Porinveränderung oder Efflux Pumpen)**
- **Eine Kombination mehrerer Resistenzmechanismen bringt phänotypische Methoden an ihre Grenzen, sodass molekularbiologische Abklärung und Funktionstests in den Vordergrund rücken**

- **Prinzipiell ist jedes Isolat, das eine Carbapenem MHK oberhalb der Wildtypverteilung aufweist, als potentiell Carbapenemasegen tragend anzusehen**
- **Unwahrscheinlich ist das Vorliegen von CPE wenn:**
 - Die Genera **Proteus, Morganella und Providencia** NUR **Imipenem resistant** sind. Diese weisen gegenüber Imipenem intrinsisch eine niedrige Empfindlichkeit auf
 - **Enterobacter spp.** mit Cephalosporin- und **Ertapenem Resistenz** auftreten und diese voll empfindlich sind für Imipenem und Meropenem (MHK liegt in der Wildtyp Verteilung)

Schema für Carbapenemase-Screening bei Enterobakterien



- **Testsystem, das Carbapenemasen aller 3 Ambler Klassen nachweisen kann (a)**
- **Für Ambler Klasse A und B Carbapenemasen existieren spezifische Inhibitoren. Durch Synergismuskachweis mit Carbapenemen ist eine Zuordnung möglich (b)**

	Testsystem	Carbapenemase			Reduzierte Permeabilität	
		A	B	D	mit AmpC	mit ESBL
a	Modifizierter Hodge Test	+	+	+	positives Ergebnis möglich	positives Ergebnis möglich
b	Meropenem-Borsäure-Synergismus	+	-	-	+	-
	Meropenem-Cloxacillin Synergismus	-	-	-	+	-
	Meropenem-Dipikolinsäure Synergismus	-	+	-	-	-
	Imipenem-EDTA Synergismus	-	+	-	-	-
	ESBL Screening	-	-	-	-	+

- **Modifizierter Hodge Test gemäß CLSI 2012**
- **Dient dem Nachweis aller Carbapenemaseklassen**
- **Keine Diskriminierung möglich**
- **Sensitivität sehr gut bei Klasse A, weniger gut bei Klasse D**
- **Sensitivität schlecht bei Klasse B (V.a. NDM-1 ca. 50%)**
 - Eventuell Verbesserung durch Gallezusatz J. Microbiol. Methods 2010 83: 149–152
J. Clin. Microbiol. 2012 50: 477-479
 - NDM-1: Steigerung durch ZnSO₄ (100 µg/ml) auf 85% mgl
- **Spezifität ist niedrig (V.a. bei AmpC und ESBL)**
- **Zeitintensiv und häufig schwierige Interpretation (subjektive Komponente)**
- **Mit Modifikationen auch für *P. aeruginosa* anwendbar (Indikatorstamm *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603)**

J. Clin. Microbiol. 2011 49: 4301–4303.

- **Klasse A Enzyme werden durch Borsäure und deren Derivate inhibiert**
 - Meist APBA (Aminophenylborsäure)
 - Bessere Diskriminierung mittels PBA (Phenylborsäure) beschrieben
 - Sowohl Combined Disc Test als auch DDST J. Clin. Microbiol. 2011 49:8
- **Klasse B Enzyme werden durch EDTA sowie Dipikolinsäure inhibiert**
 - Sowohl Combined Disc Test als auch DDST, E-Test MBL
 - EDTA hat schlechtere Spezifität als DPA Clin Microbiol Infect. 2011 552-556
- **Zur Abgrenzung von AmpC mit Efflux bzw. Porinverlust kann Cloxacillin verwendet werden**
- **Mittels geschickter Kombination können auch Klasse A und B gleichzeitig nachgewiesen werden**
J Antimicrob Chemother 2010 65: 1664–1671

- **OXA-48 CPE können sehr niedrige Carbapenem MHKs aufweisen**
J. Antimicrob. Chemother. 2012 67: 1597–1606
- **Es ist kein inhibitorbasiertes Testsystem zum Nachweis von Ambler Klasse D Enzymen verfügbar**
Med. Microbiol. 2011 60: 677-678
- **Bei zahlreichen OXA-48 CPE konnte eine sehr hohe MHK gegenüber Temocillin beobachtet werden**
Int. J. Antimicrob. Agents. 2012 39: 168–172
- **ESBL und AmpC weisen für Temocillin in der Regel niedrige MHKs auf**
J. Antimicrob. Chemother. 2006 57: 1012–1014
- **Detektionskit mit Temocillinblättchen kommerziell verfügbar**
 - Z.B. : KPC + MBL and OXA-48 Confirm ID Kit, Rosco

- **In Kombination mit den bekannten Synergismustestungen besteht bei einer Temocillin MHK von ≥ 128 mg/L und fehlendem Synergismusnachweis der hochgradige Verdacht auf OXA-48 als zugrundeliegender Mechanismus**

RESEARCH NOTE

Temocillin and meropenem to discriminate resistance mechanisms leading to decreased carbapenem susceptibility with focus on OXA-48 in *Enterobacteriaceae*

R. Hartl^{1,2}, S. Widhalm², H. Kerschner^{1,2} and P. Apfalter^{1,2}

1) Institute of Hygiene, Microbiology and Tropical Medicine, National Reference Centre for Nosocomial Infections and Antimicrobial Resistance, Elisabethinen Hospital and 2) Analyse BioLab, Linz, Austria

Clin Microbiol Infect. Epub, Ahead of print

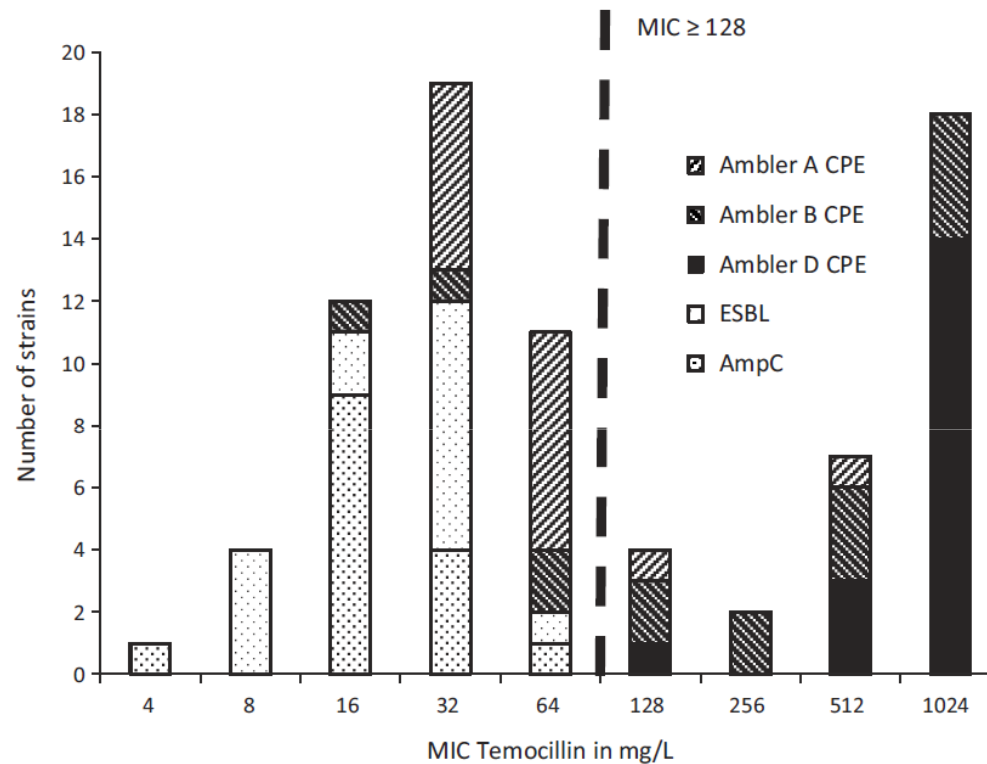
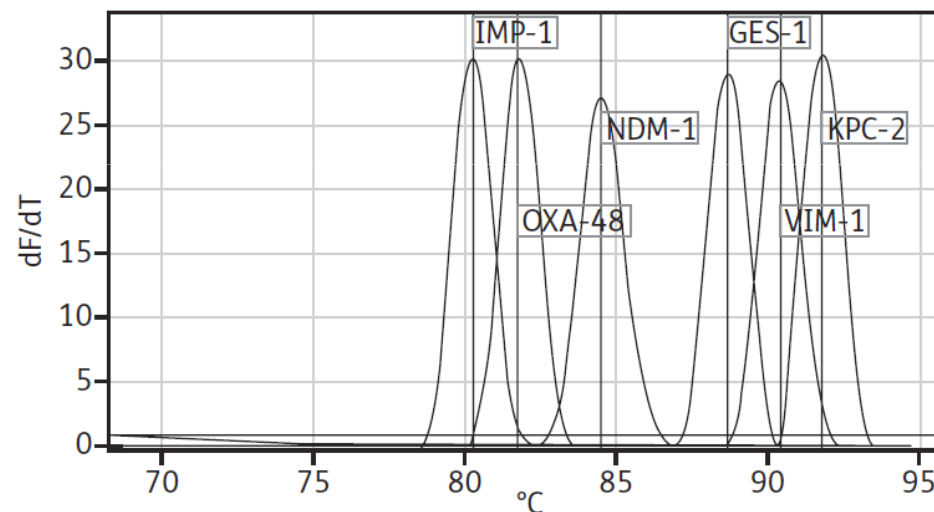


FIG. 1. Temocillin MIC distribution of the tested isolates sorted by resistance mechanism. MIC, minimal inhibitory concentration; CPE, carbapenemase producing *Enterobacterium*; ESBL, extended spectrum β -lactamase.

- **„Reine“ Resistenzphänotypen sind bei CPE äußerst selten**
- **Meist treten zusätzlich Resistenzmechanismen auf**
 - Porinveränderungen, erworbene AmpCs mit Hyperproduktion
 - ESBL
- **Unterschiedliche genetische Elemente mobilisieren Betalaktamasegene und führen zu einer Kumulation von Resistenzmechanismen**
- **In Kombination ergibt sich dann oft ein MDR, XDR oder sogar PDR Phänotyp, der nur mittels Molekularbiologie eindeutig zugeordnet werden kann**

- **Prinzipiell sollte jede unklare Konstellation mittels PCR überprüft werden**
- **Zahlreiche konventionelle und real time PCRs zur simultanen Detektion unterschiedlicher Betalaktamasen verfügbar**



J. Antimicrob .Chemother. 2012 67: 906–909

Figure 1. Results from the real-time multiplex PCR melting curves of the amplicons generated by primers targeting the six carbapenemases types. The gene targets, from left to right, are as follows: *bla*_{IMP} type (T_m 80.1°C), *bla*_{OXA-48} (T_m 81.6°C), *bla*_{NDM-1} (T_m 84°C), *bla*_{GES} type (T_m 88.4°C), *bla*_{VIM} type (T_m 90.3°C) and *bla*_{KPC} type (T_m 91.6°C).

- **Kommerziell Verfügbare Testsysteme**

- Ligasemedierte Amplifikation mit anschließender Microarray Hybridisierung (Check-Points®, Check ESBL bzw. MDR)

J. Antimicrob. Chemother. 2012 67: 1865–1869

- Multiplex PCR mit anschließender Visualisierung der Amplifikate per reverser Hybridisierung mit spezifischen Oligonukleotid-Sonden (Amplex, hyplex®)

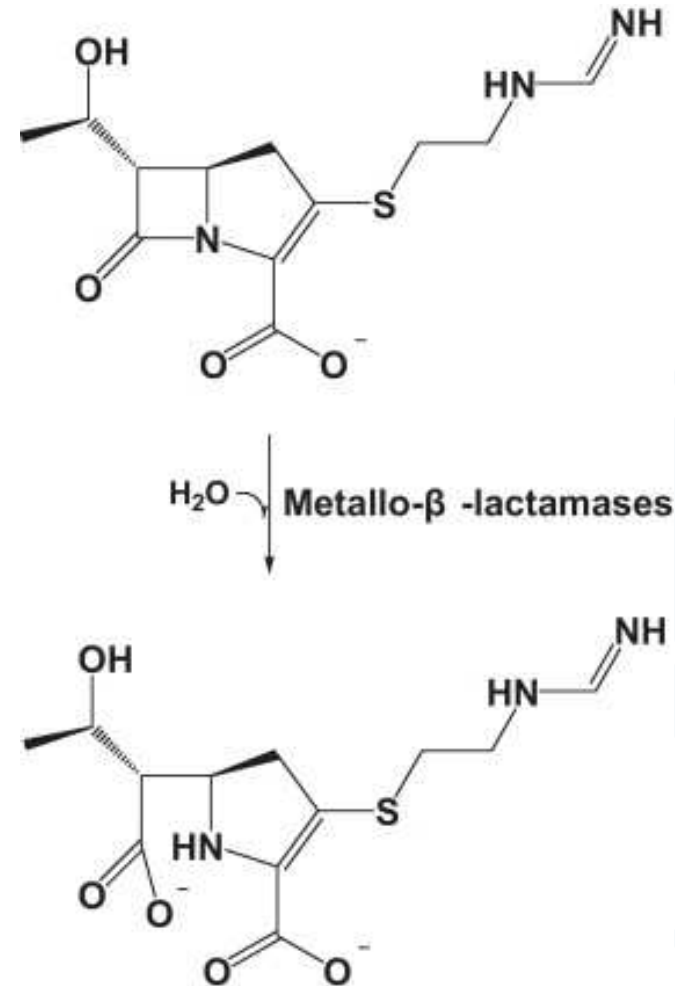
J. Microbiol . Methods 2010 83: 185-187

- Hochdurchsatz System mit Microarraydetection für 54 Resistenzgene (identibac® AMR-ve)

Int. J. of Antimicrobial Agents 2008 31: 440-451

-

- Bei Isolate mit erhöhten Carbapenem MHKs, die molekularbiologisch keinen Nachweis einer Carbapenemase zeigen und phänotypisch nicht eindeutig zuzuordnen sind, sollte ein direkter Nachweis der Hydrolyse von Carbapenemen angestrebt werden
- Mehrere, teilweise sehr einfache und kostengünstige Methoden stehen zur Verfügung

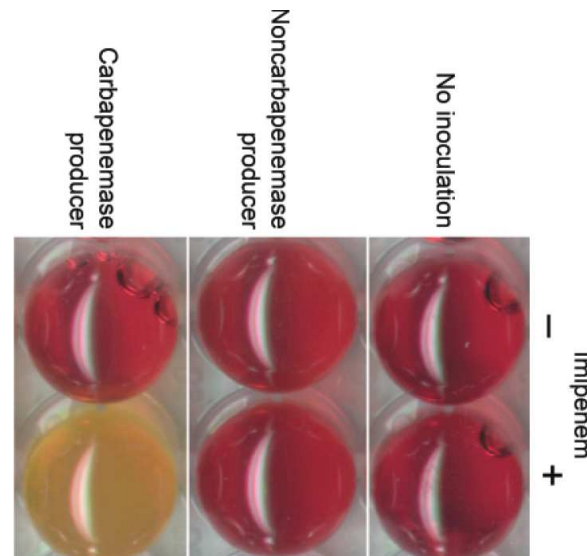


Thermochimica acta 2012 539: 67-70

- **Carba NP Test: Imipenem Hydrolyse ergibt eine carboxylierte Form von Imipenem, diese ergibt eine pH Wert Abnahme, die über Phenolrot als Indikator angezeigt wird**
 - Erlaubt Carbapenemasedetektion in *Pseudomonas spp.* mit Ausnahme von *blaGES*
 - Carba NP Test kombiniert mit EDTA und Tazobactam erlaubt Zuordnung zu Ambler Klasse A, B und (D) bei *Enterobacteriaceae* und *Pseudomonas spp.*

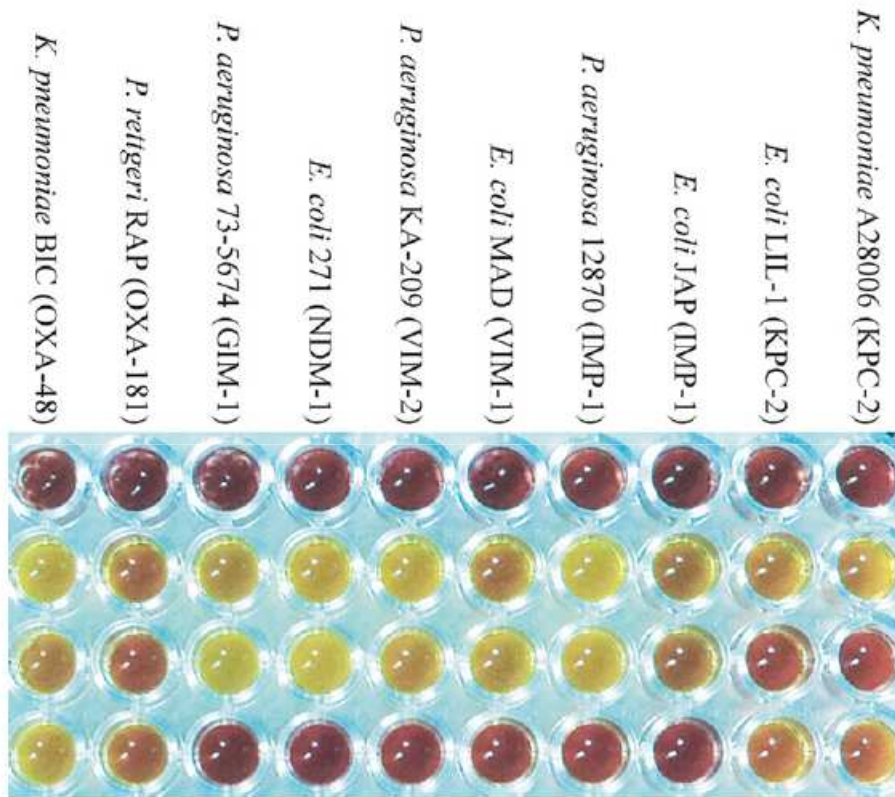
J. Clin. Microbiol. 2012 50: 3773-3776

Antimicrob. Agents Chemother. 2012 12: 6437-6440



Betalaktamaseassay

B



No antibiotic

Imipenem + Zn²⁺

Imipenem + Zn²⁺ + Tazobactam

Imipenem + EDTA

Antimicrob. Agents Chemother. 2012 12: 6437-6440

- **Spektrophotometrische Detektion von Imipenemhydrolyse mittels UV Spektrometrie**

Diag. Microbio. and Infectious Disease 2012 74: 88–90

- **Nachweis der Carbapenemhydrolyse mittels MALDI-ToF**
 - Schnelle Methode (innerhalb weniger Stunden), Detektion von Carbapenemaseaktivität aus Blutkultur möglich

J. Clin. Microbiol. 2012 50: 927-936

- Nachweis von CPE aller Ambler Klassen möglich (z.B.: OXA-48, OXA-162)

J. Clin. Microbiol. 2012 50: 2441- 2443
J. Clin. Microbiol. 2011 49. 3321–3324

- Geeignet zum Carbapenemasenachweis bei Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa und Acinetobacter baumannii

PLoS ONE 2012 2: e31676

- **CPE nehmen weltweit weiterhin stark zu**
- **Das Erkennen von CPE in der Routinediagnostik ist schwierig**
- **Phänotypische Methoden sind zur Bestätigung nicht immer ausreichend**
- **Molekularbiologische Nachweismethoden sind der Goldstandard in der Bestätigungsdiagnostik von CPE. Sie sollten in jeder unklaren Situation zum Einsatz kommen**
- **Bei unklarer Phänotypie und negativer Molekularbiologie kann ein Betalaktamaseassay zur weiteren Abklärung eingesetzt werden**



Nationales Referenzzentrum für Nosokomiale Infektionen und Antibiotikaresistenz

[STARTSEITE](#)
[AKTUELLES](#)
[FACHBEREICHE](#)
[KUNDENSERVICE](#)
[WIR ÜBER UNS](#)
[KONTAKT](#)
 » **NATIONALES
REFERENZZENTRUM**

[IHMT](#)
[Hintergrund](#)
[AURES](#)
[PROHYG 2.0](#)
[Carbapenemasen](#)
[Libysche Patienten](#)

Das Referenzzentrum

Das nationale Referenzzentrum für nosokomiale Infektionen und Antibiotikaresistenz wird seit 2003 im Auftrag des Bundesministeriums für Gesundheit in Allianz zweier bettenführender Krankenanstalten, dem **Allgemeinen Krankenhaus der Stadt Wien** und dem **AÖ Krankenhaus der Elisabethinen Linz** geführt. Diese Kombination zweier etablierter Institutionen stellt repräsentative Zahlen, Fakten, Erkenntnisse und Empfehlungen in der gegenständlichen Thematik sicher.

Das nationale Referenzzentrum am **Klinischen Institut für Krankenhaushygiene der Medizinischen Universität Wien** beschäftigt sich mit verschiedenen Aspekten nosokomialer Infektionen, deren Erfassung, Analyse der Daten (z.B. im ANISS) sowie Entwicklung von Strategien zur Vermeidung solcher Infektionen.

Die fachlichen Schwerpunkte am **Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Tropenmedizin (IHMT)** des AÖ Krankenhaus der Elisabethinen Linz liegen im Bereich Antibiotikaresistenzen (Surveillance, Austestung) und Antibiotikaverbrauch. Darüber hinaus ist diesem nationalen Referenzzentrum „Alles rund um das Antibiogramm“ ein vordergründiges Anliegen.

Kontakt

Wir freuen uns über Ihre Kontaktaufnahme unter +43 (0)732 7676-3654 oder office@referenzzentrum.at und sind jederzeit gerne für Sie da!

Diese Seite wird von der analyse BioLab im Auftrag des nationalen Referenzzentrums für nosokomiale Infektionen und Antibiotikaresistenz gehostet.

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!

