

Detektion von Carbapenemasen nach dem NAK-Algorithmus

Axel Hamprecht

Institut für medizinische Mikrobiologie u. Virologie

Inhalt

Carbapenemasedetektion bei Enterobakterien – warum?

Methoden

Entwicklung eines Algorithmus

Warum Carbapenemase-Detektion?

Nicht alle Carbapenemasen werden d. automatisierte Systeme erkannt

Schlechteres Outcome bei Therapie mit Carbapenemen

Schnelle Therapieanpassung

Hygienemanagement

Meldepflicht

Warum diese Leitlinie?

Nicht alle Labore haben Methoden zur Detektion von Carbapenemasen etabliert

Vielzahl an kommerziellen Methoden heute verfügbar

Vorschlag zur Diagnostik

N | A | K
Nationales Antibiotika-
Sensitivitätstest-Komitee

Empfehlungen zur Detektion von Carbapenemasen bei Enterobakterien
(Enterobacterales)

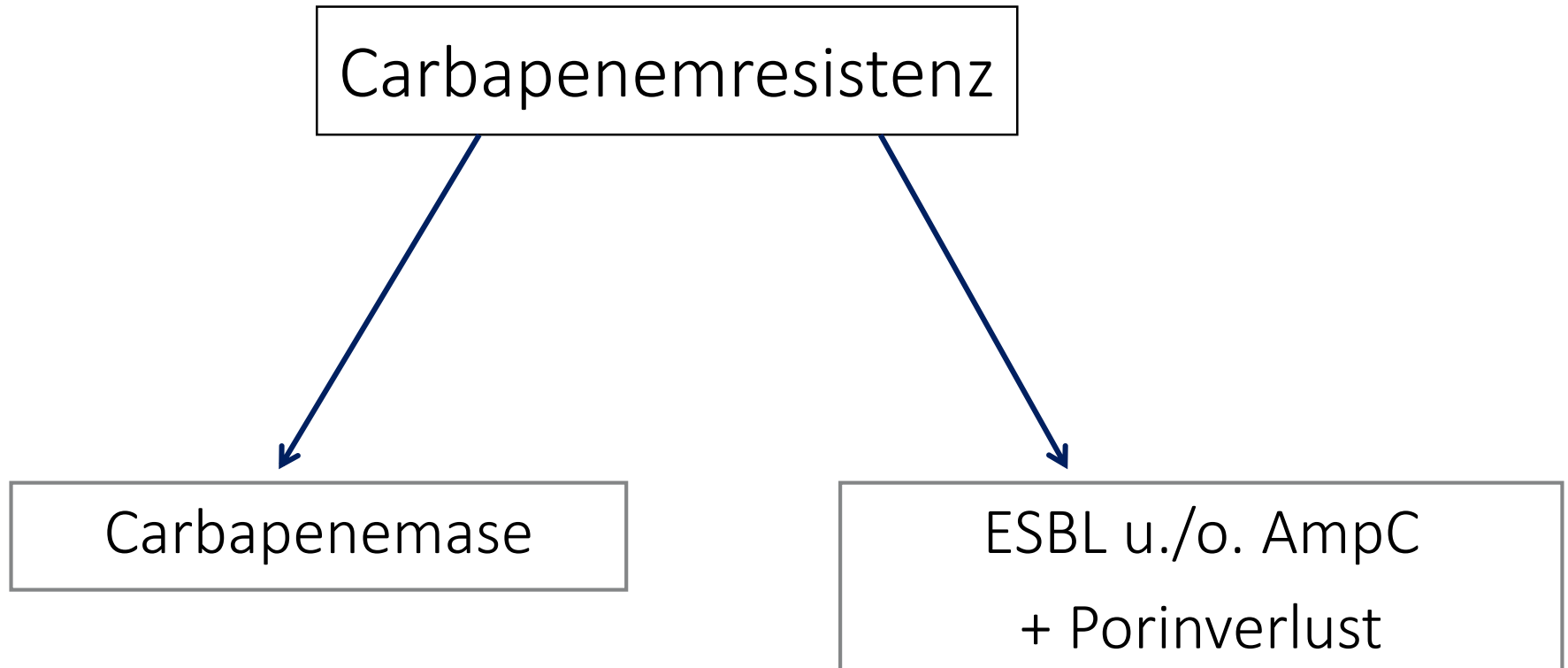
A. Hamprecht, M. Kresken, D. Mack, E. Molitor, S. Gatermann

Inhalt

Hintergrund der Carbapenemresistenz 2

<https://www.nak-deutschland.org/nak-dokumente/detektion-von-resistenzmechanismen/dokumente.html>

DD Carbapenemresistenz



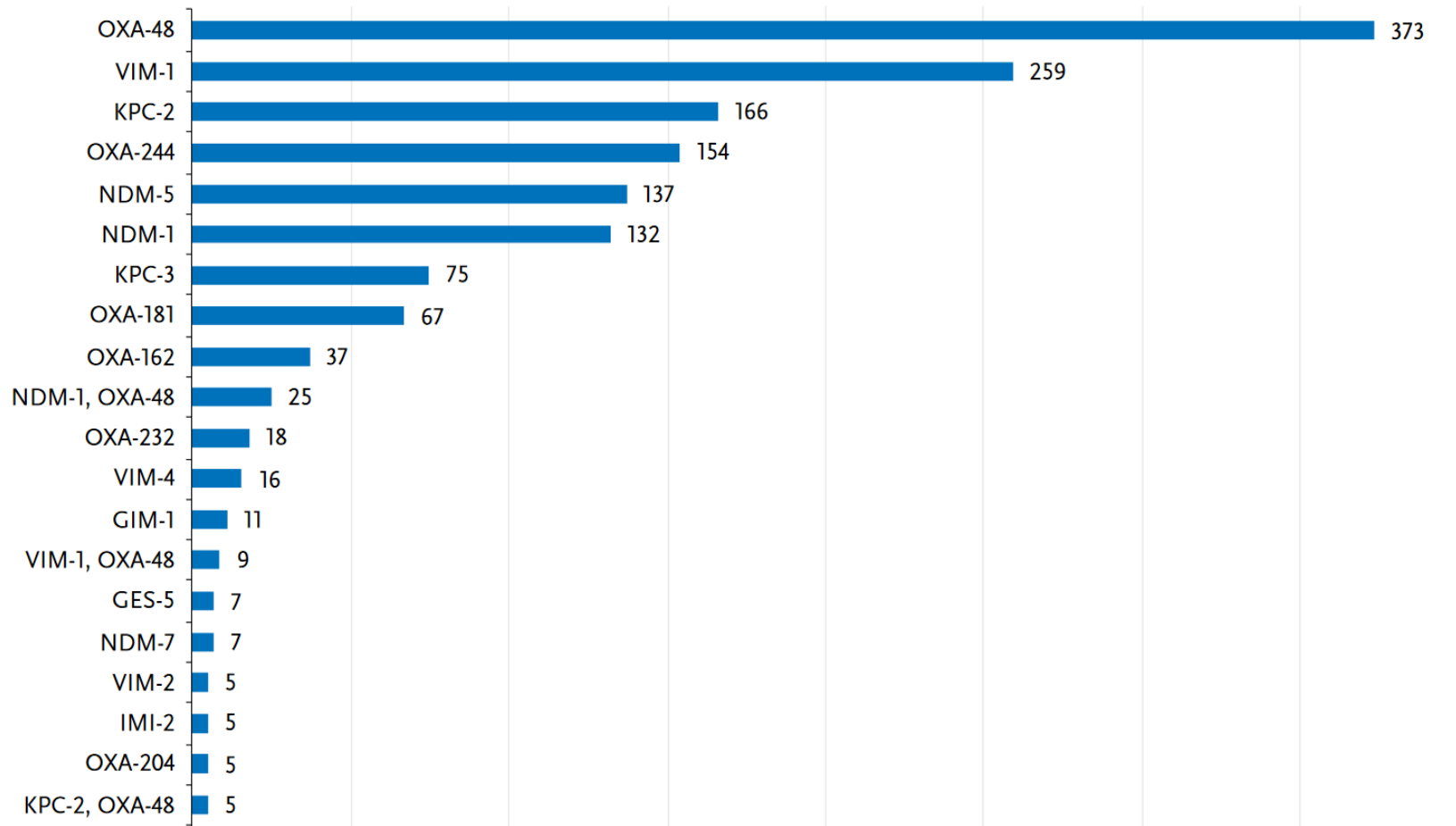
Carbapenemasen - Schwierigkeiten

Viele Carbapenemase-produzierende Stämme in D haben niedrige MHKs

Häufigste Carbapenemasen in D

- OXA-48-like
- VIM
- NDM
- KPC

Carbapenemasen im NRZ Bochum 2020



Pfennigwerth N, Schauer J
Epid Bull 2021;36:4 -1

Was muss ich bei der Resistenztestung beachten?

Idealerweise Ertapenem, Meropenem u. Imipenem testen

Ertapenem: höchste Sensitivität/niedrigste Spezifität

Sind klin. Breakpoints ausreichend?

	S	I	R
Ertapenem	$\leq 0,5$		$>0,5$
Imipenem	≤ 2	4	>4
Meropenem	≤ 2	4-8	>8

251 Carbapenemase-bildende Enterobakterien, d. PCR+ WGS bestätigt

	Ertapenem $\leq 0,5$ mg/L	Imipenem ≤ 2 mg/L	Meropenem ≤ 2 mg/L
Vitek	11,6 %	27,9 %	39,0 %

Screening Breakpoints v. EUCAST

Table 1. Clinical breakpoints and screening cut-off values for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (according to EUCAST methodology).

Carbapenem	MIC (mg/L)		Disk diffusion zone diameter (mm) with 10 µg disks	
	S/I breakpoint	Screening cut-off	S/I breakpoint	Screening cut-off
Meropenem ¹	≤2	>0.125	≥22	<28 ²
Ertapenem ³	≤0.5	>0.125	≥25	<25

¹Best balance of sensitivity and specificity

²Isolates with 25-27 mm only need to be investigated for carbapenemase-production if they are resistant to piperacillin-tazobactam and/or temocillin (temocillin contributes more to the specificity). Investigation for carbapenemases is always warranted if zone diameter of meropenem is <25 mm.

³High sensitivity but low specificity. Can be used as an alternative screening agent, but isolates with ESBL and AmpC may be resistant without having carbapenemases.

EUCAST Detection of Resistance Mechanisms
V 2.0 2017

NAK Screening-Grenzwerte

Ertapenem > 0,125 mg/L

Meropenem > 0,125 mg/L

Imipenem > 1 mg/L

UND

Ampicillin-Sulb. >16 mg/L

Speziesabhängig → Steigerung d. Spezifität

Screeningkriterien

	Cut-off (MHK)	Bemerkung
Gruppe I (Morganellaceae) <i>Proteus</i> spp. <i>Serratia</i> spp., <i>M. morganii</i> , <i>Providencia</i> spp.	Ertapenem > 0,125 mg/L u./o. Meropenem > 0,125 mg/L Bei <i>Proteus</i> spp. zusätzlich Ampicillin-Sulbactam >16 mg/L	Eine isolierte Imipenem-Resistenz ist nicht weiter abklärungsbedürftig
Gruppe II (AmpC-Bildner) <i>Enterobacter</i> spp., <i>K. aerogenes</i> , <i>C. freundii</i> complex <i>Hafnia</i> spp.	Meropenem > 0,125 mg/L u./o. Imipenem > 1 mg/L	AmpC ± ESBL und Porinveränderung häufig! Keine Berücksichtigung von Ertapenem
Gruppe III <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp. (außer <i>K. aerogenes</i>)	Ertapenem > 0,125 mg/L u./o. Meropenem > 0,125 mg/L u./o. Imipenem > 1 mg/L UND Ampicillin-Sulbactam > 16 mg/L	Bei Erfüllung der Kriterien häufig Vorliegen einer Carbapenemas
Gruppe IV (andere Spezies)	Ertapenem > 0,125 mg/L u./o. Meropenem > 0,125 mg/L u./o. Imipenem > 1 mg/L UND Ampicillin-Sulbactam > 16 mg/L	

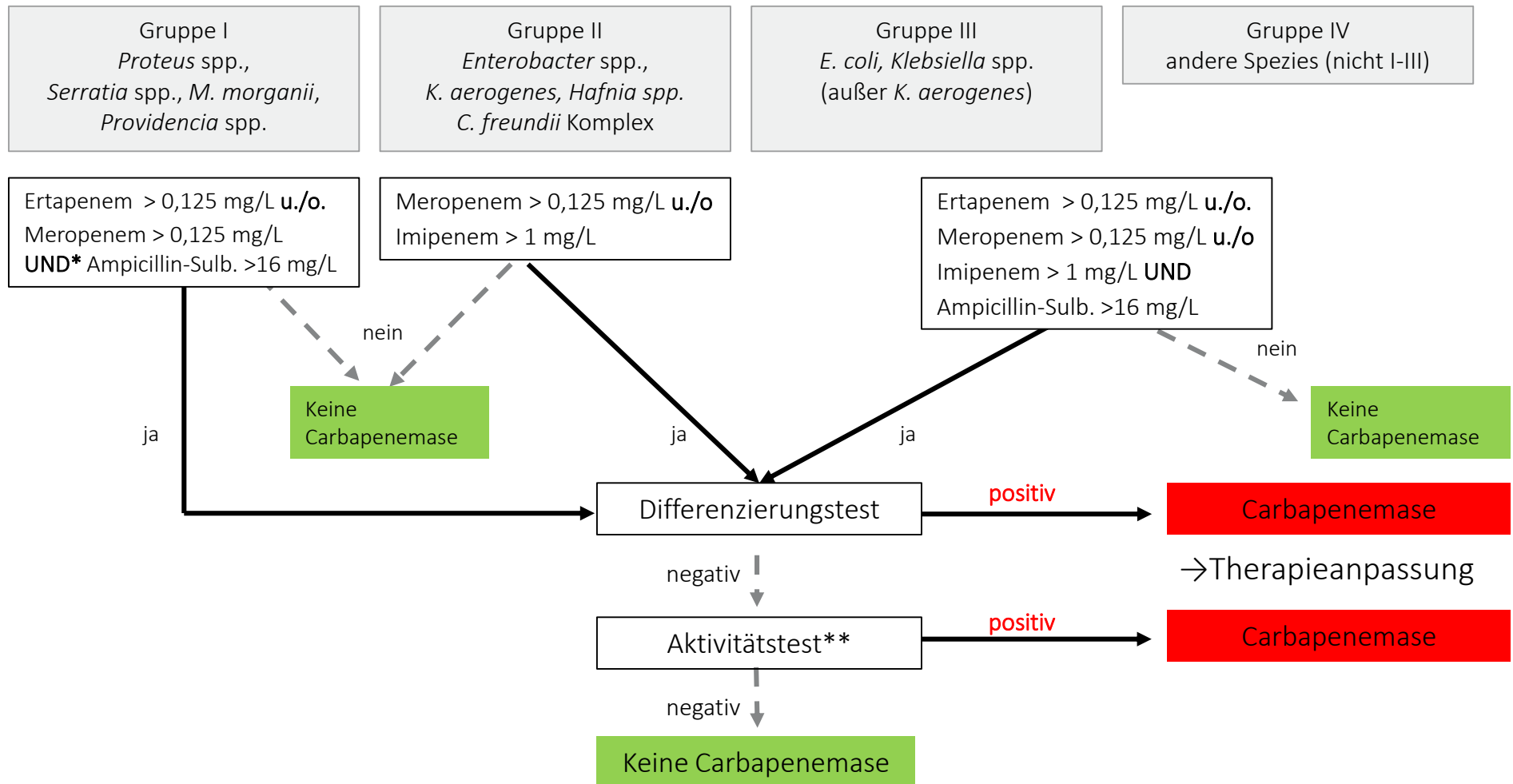
Meßbereiche

MHK-Bereich: idealerweise bis unter Screening-Grenzwert

Falls automatisiertes System nicht bis zum Screening-BP misst – nächst höhere Stufe verwenden

erhöhte Carbapenem-MHKs (über den Screening-Cut-Off) d. 2. Verfahren bestätigen

Allgemeines Vorgehen



*gilt nur für *Proteus* spp.

**Bei positivem Aktivitätstests aber negativem/unklarem Differenzierungstest weitere Abklärung empfohlen (NRZ, WGS)

Welche Tests zur Carbapenemase-Bestätigung einsetzen?

Jedes Labor sollte zwei verschiedene Tests etabliert haben:

1. Test, der eine Differenzierung der wichtigsten Gruppen erlaubt
→ Therapiesteuerung
2. Test der Carbapenemase-Aktivität (unabhängig vom Genotyp)
→ seltene Carbapenemasen

Tests sollten validiert sein an klinischen Isolaten aus Deutschland

Kein einzelnes Verfahren kann 100% aller Carbapenemasen detektieren!

Differenzierungstests

Differenzierungstests

Es sollten die 4 wichtigsten Gruppen differenziert werden können:

Klasse A Carbapenemasen (v.a. KPC)

Klasse B Carbapenemasen (MBLs, VIM, NDM, GIM)

Klasse D Carbapenemasen (Oxacillinasen, in D v.a. OXA-48-like)

© Cepheid



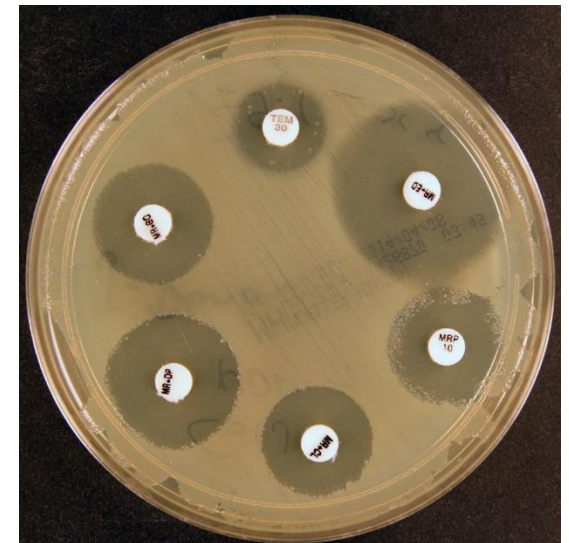
© GenePoc/Meridian



© CorisBioconcept



© NG Biotech



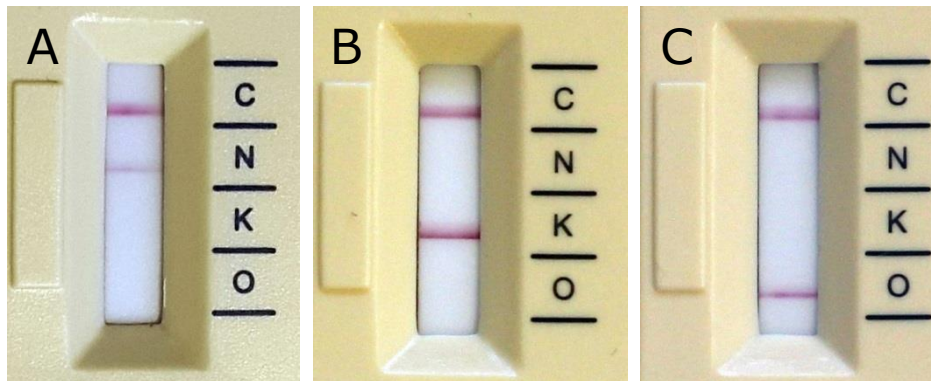
Immunochematographische Nachweisverfahren

immunochematographischer Nachweis von KPC, NDM, VIM und OXA-48-like Carbapenemasen ($\pm$ einige IMP-Varianten bei CARBA-5)

Sensitivität 99-100%, Spezifität 100%

sehr schnell (2-15 min)

Für NDM-/VIM-Nachweis müssen Bakterien von Agar mit ausreichendem Zink-Gehalt geerntet werden



Greissl C et al.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2019
Feb;38(2):331-335

Rösner et al.,

J Med Microbiol. 2019 Mar;68(3):379-381

Immunochromatographische Tests

Derzeit zwei verschiedene Hersteller
Coris Bioconcept/Belgien
NG biotech/Frankreich

© CorisBioconcept



© NG Biotech



Inhibitoren-Test/Combination Disk Test

Prinzip: Hemmung der Carbapenemase-Aktivität durch Inhibitoren

→ Zunahme des Hemmhofdurchmessers

Erlaubt Rückschlüsse auf Typ der Carbapenemase (Metallo-/KPC)

Für OXA-48 gibt es keine Inhibitoren

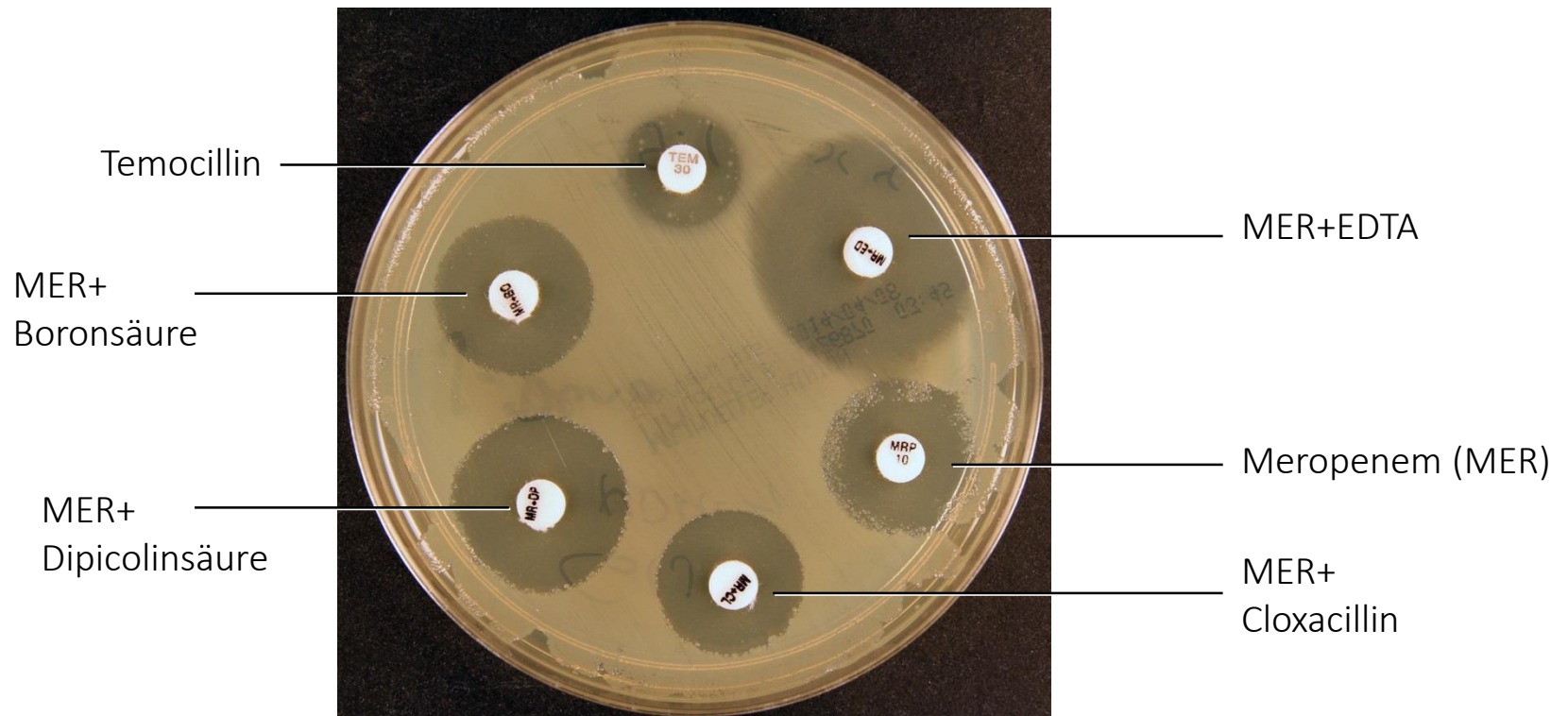
„in house“ oder kommerzielle Tests erhältlich

~16-20h

Inhibitoren-Test

Hemmhofvergrößerung durch

- › EDTA/Dipicolinsäure → Metallo- β -Laktamase
- › (Aminophenyl-)Boronsäure → KPC
- › Boronsäure UND Cloxacillin → AmpC [+Porinverlust]



E. coli NDM-1

Vergleich v. Inhibitorentests

	Inhibitorentests			Faropenem	zCIM
	Value for test				
Parameter	MAST-CDT	ROS-CDT	LIO-CDT	FAR	zCIM
No. of true-positive isolates/total no. of isolates	91/106	91/106	102/106	105/106	104/106
Sensitivity (%) (CI)	86 (78–92)	86 (78–92)	96 (91–99)	99 (95–100)	98 (93–100)
No. of true-negative isolates/total no. of isolates	46/47	46/47	41/47	38/47	47/47
Specificity (%) (CI)	98 (89–100)	98 (89–100)	87 (74–95)	81 (67–91)	100 (92–100)
Youden index	0.84	0.84	0.83	0.80	0.98

MAST-CDT=Mastdiscs Combi Carba plus (MAST)

ROS-CDT=KPC/MBL and OXA-48 Confirm kit (Rosco)

LIO-CDT=KPC&MBL&OXA-48 disc kit (Liofilchem)

FAR=Faropenem (MAST)

zCIM=zink-supplementierter CIM-Test

→ Sensitivität d. Inhibitorentests 86-96%, Spezifität 87-98%

Sattler et al., J Clin Microbiol. 2021 Aug 18;59(9)

Aktivitätstests

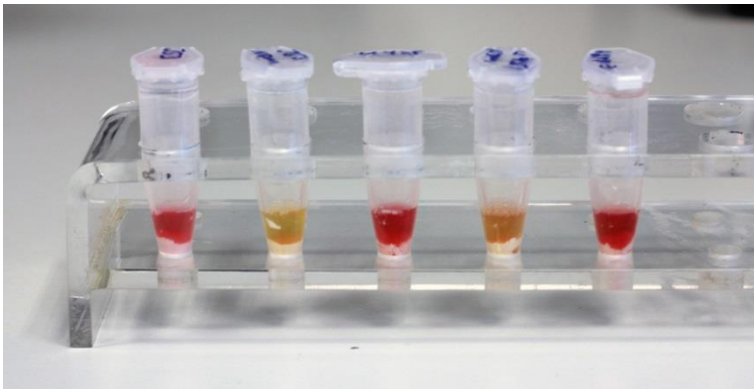
Aktivitätstests

Test, der eine Carbapenemase-Aktivität anzeigt unabhängig vom Genotyp

→ seltene Carbapenemasen: GIM, IMI, IMP, GES, OXA-58 etc.

Beispiele hierfür sind

1. Carbapenemase-Inaktivierungs-Methode (CIM), in verschiedenen Variationen
2. Colorimetrische Tests wie CARBA-NP Test, β -CARBA, Carba Blue u.a.
3. Hydrolysenachweis mittels MALDI-ToF
4. (Modifizierter Hodge Test)



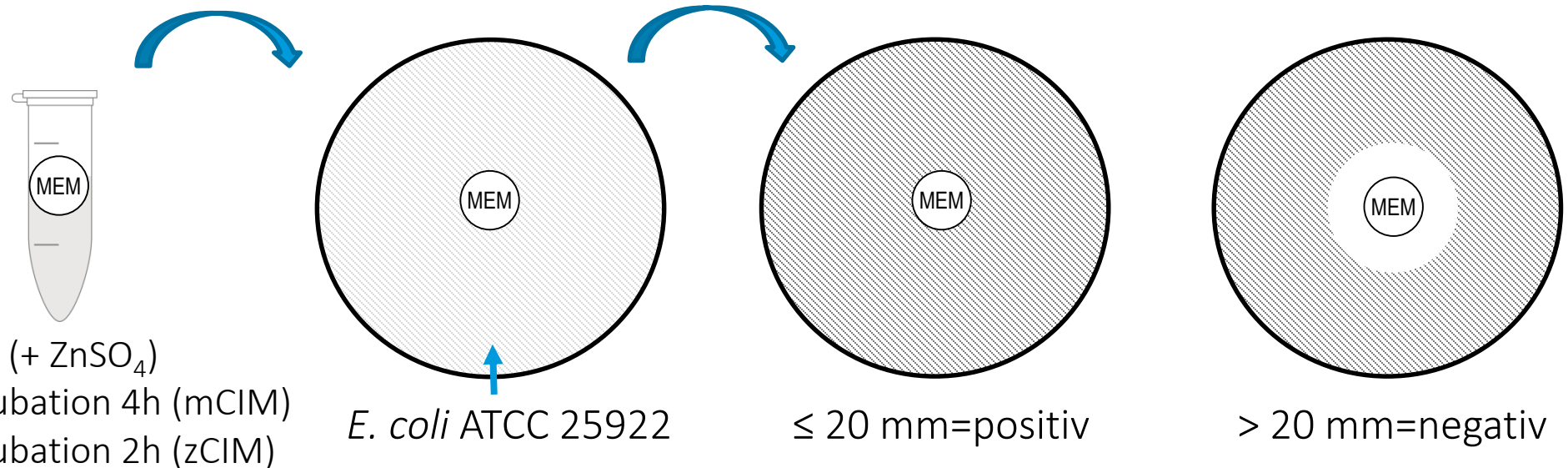
CIM/mCIM/zCIM-Test

Weist Carbapenemase-Aktivität nach; günstig

Hohe Sensitivität/Spezifität (~98%/98-100% für zCIM^{1,2})

Lange Turn-around time (10-18 h)

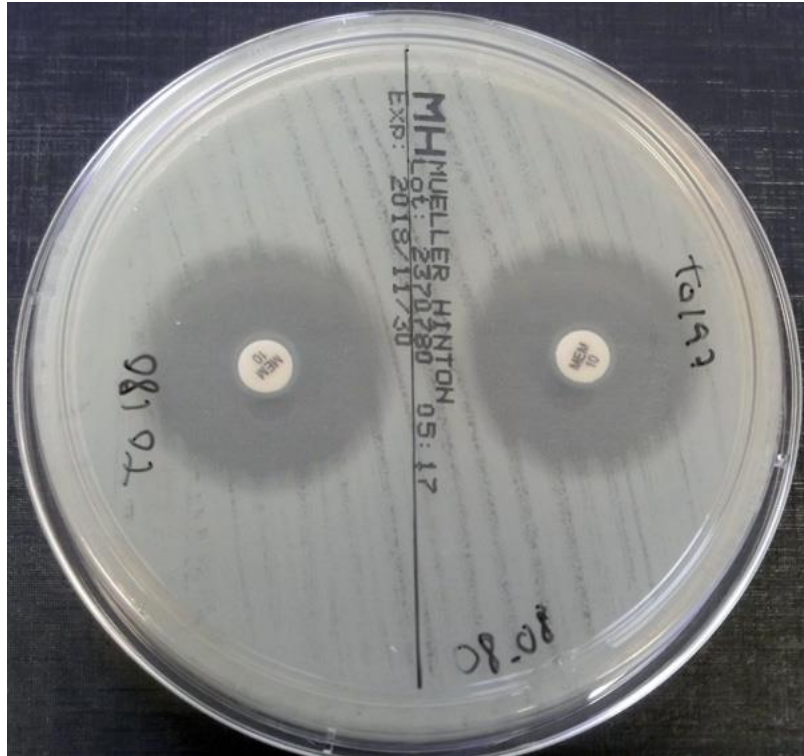
Keine Unterscheidung d. Carbapenemase-Familien



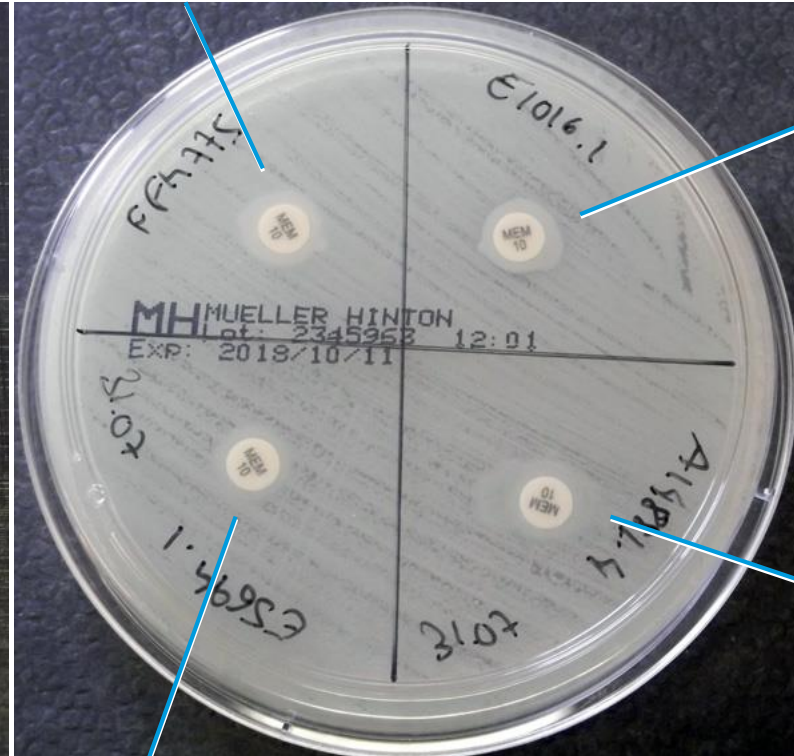
¹Baeza et al., Clin Microbiol Infect. 2019 Oct;25(10):1286.e9-1286.e15

²Sattler et al., J Clin Microbiol. 2021 Aug 18;59(9)

zCIM-Test



Carbapenemase-negativ



VIM-1

Baeza et al., Clin Microbiol Infect. 2019
Oct;25(10):1286.e9-1286.e15

Vergleich CIM-Varianten

Conditions	Sensitivity % (95 CI)	Specificity % (95 CI)	Cut-off		
			Positive	Indeterminate	Negative
CIM (H₂O)	69.6	100	6 mm	-	> 6 mm
	87.0	100	≤ 24 mm	-	>24 mm
H₂O+ZnSO₄	91.3	100	≤ 25 mm	-	> 25 mm
mCIM (TSB)	84.8	100	≤ 15 mm or 16-18 mm with MC	16-18 mm w/o MC or > 18 mm with MC	> 18 mm (clear inhibition zone)
	93.5	100	≤ 23 mm	-	>23 mm
zCIM (TSB+ZnSO₄)	97.8	100	≤ 20 mm	-	> 20 mm

w/o: without; MC: microcolonies

Baeza et al., Clin Microbiol Infect. 2019
Oct;25(10):1286.e9-1286.e15

Validierung an Routineproben

251 Carbapenemase-produzierende Enterobacteriaceae von 2012-2020

Sensitivität 248/251 (98,8%)

Falsch-negative

- › 2x OXA-244 (*E. coli*, *K. pneumoniae*)
- › 1x VIM (*E. cloacae*)

→ längere Inkubation 4h (analog mCIM)

Colorimetrische Tests

Hydrolyse von Carbapenem bewirkt
pH-Änderung → Farbumschlag

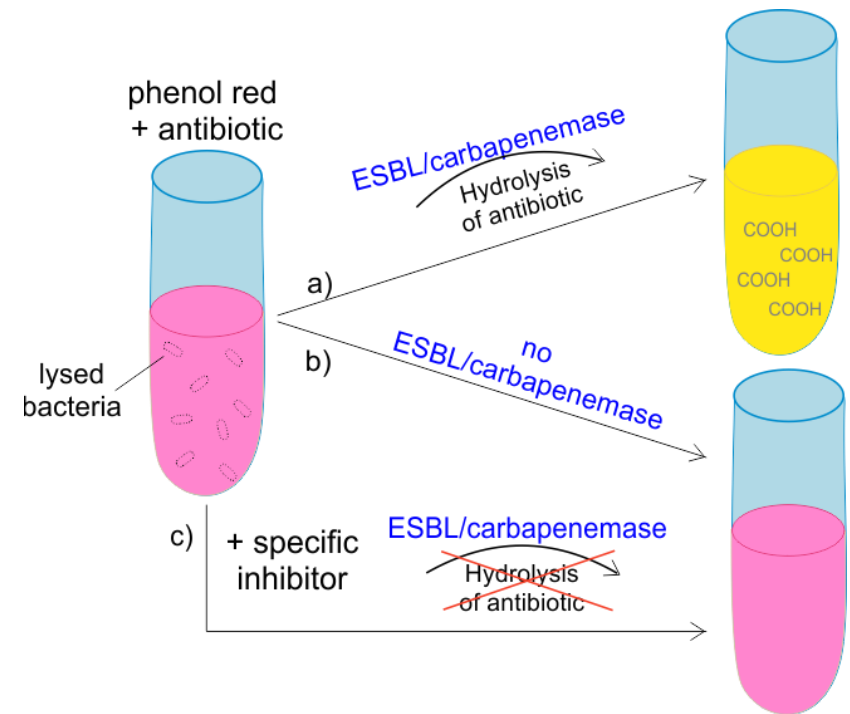
Relativ schnell (0,5-2h), gute Sensitivität
(90-100%)

Funktioniert nicht von allen (Selektiv-)Agars

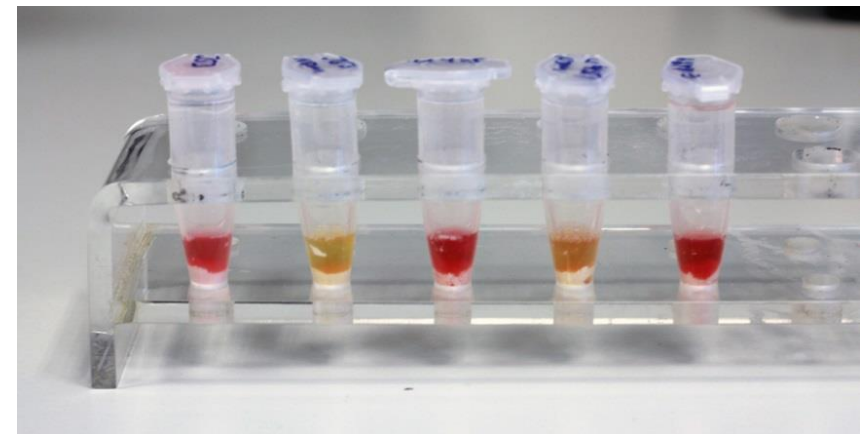
Probleme bei OXA-48-like, IMI, GES

Ablesung subjektiv

Kommerzielle Tests teuer



Noster et al., Antibiotics 2021 21;10(9):1140

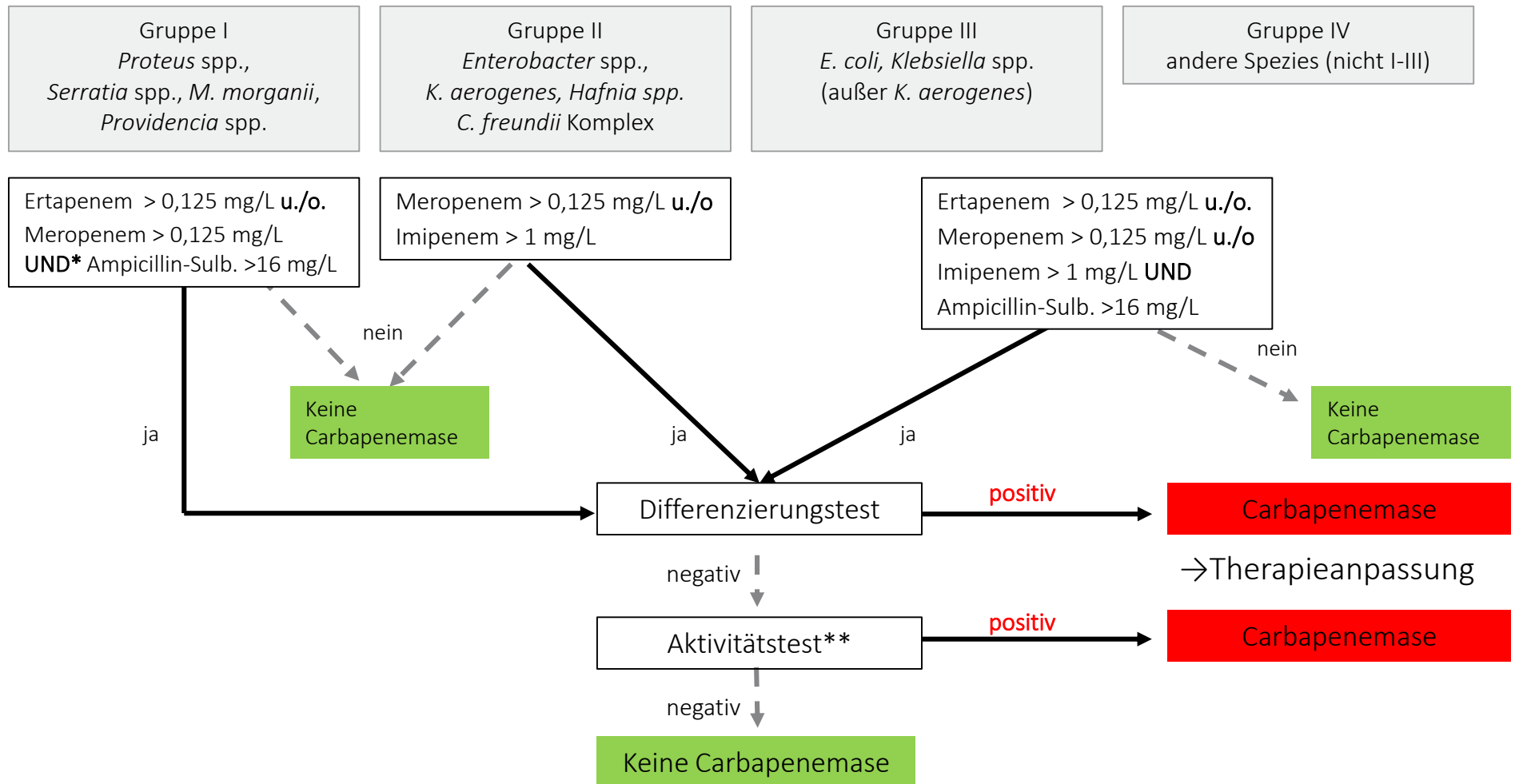


Vergleich Carbapenemasedetektion (n=152)

Isolate mit **OXA-48-like**, KPC, NDM, VIM, IMP, IMI, GES, OXA-58

	GenXpert (Cepheid)	CARBA-5 (NG)	OKNV (Coris)	zCIM (in house)	β-Carba (bioRad)
Prinzip	Real-time PCR	Immuno- chromatogr.	Immuno- chromatogr.	Hydrolyse- Assay	Colori- metrisch
Sensitivität (O-V-N-K)	100%	99.2%	98.5%	97.6%	76.6%
Sensitivität (alle CPE)	88,2%	88,2%	84,2%	97,4%	(73,7%)
Spezifität	100%	100%	100%	97,7%	100%

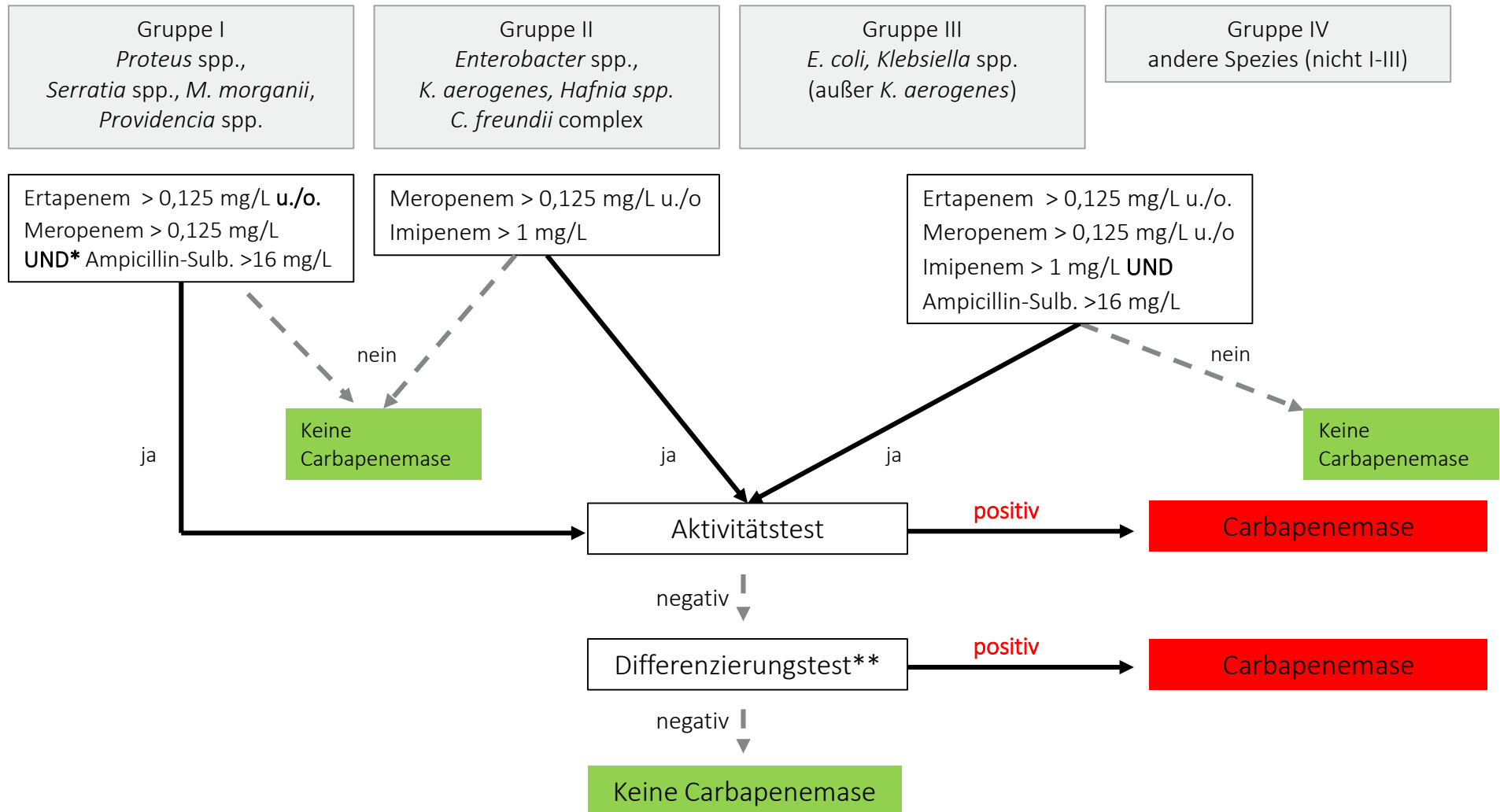
Allgemeines Vorgehen – hohe klin. Relevanz



*gilt nur für *Proteus* spp.

**Bei positivem Aktivitätstests aber negativem/unklarem Differenzierungstest weitere Abklärung empfohlen (NRZ, WGS)

Niedrige klin. Relevanz oder niedrige Prätest-Wahrscheinlichkeit



*gilt nur für *Proteus* spp.

**Kann entfallen, falls niedrige Prätestwahrscheinlichkeit

Bei positivem Combination Disk Test oder bei unklaren Aktivitätstests weitere Bestätigung (PCR oder immunochromatograph. Test empfohlen).

Bei positivem Aktivitätstests aber unklarem Differenzierungstest weitere Abklärung empfohlen (NRZ, WGS)

Typische Resistenzen bei Carbapenemasen

	AMS	TZP	CAZ	FEP	TEM	AZT	MEM	IPM	CZA	FDC	Bemerkung
KPC											Typischerweise hohe Carbapenem-MHKs; Selten CZA-Resistenz
MBLs (NDM, VIM, GIM, IMP u.a.)											Niedrige MHKs z.T. bei VIM, NDM; AZT S, sofern nicht ESBL oder AmpC zusätzlich; CZA-Resistenz
OXA-48- Gruppe											Niedrige Cephalosporin-MHKs, MEM z.T. <2 mg/L, TZP meist > 64 mg/L; TEM-Resistenz
OXA-48- Gruppe + ESBL											Carbapeneme z.T. < 2 mg/L; TZP meist > 64 mg/L
IMI											Oft in <i>E. cloacae</i> Komplex

Grün=typischerweise empfindlich

Gelb= variable Empfindlichkeit

Rot= typischerweise liegt eine Resistenz vor

AMS= Ampicillin-Sulbactam; TZP=Piperacillin-Tazobactam; CAZ=Ceftazidim; FEP=Cefepim; TEM=Temocillin; AZT=Aztreonam;
MEM=Meropenem; IPM=Imipenem; CZA=Ceftazidim-Avibactam; FDC=Cefiderocol; S=sensibel

Zusammenfassung

2-stufiger Algorithmus zur Detektion von Carbapenemasen

Differenzierungstest → häufige Carbapenemase, schnelle Therapieanpassung

Aktivitätstest → seltene Carbapenemasen

Für Isolate aus D evaluiert

Meisten Carbapenemasen werden mit 2-stufigem Algorithmus detektiert

Speziesabhängige Screeningkriterien steigern Spezifität

Algorithmus kann angepasst werden an Dringlichkeit/Prätest-

Wahrscheinlichkeit u. vorhandene Methoden

in jedem Labor durchführbar

Danke für Ihre Aufmerksamkeit