

CAT
Critically Appraised Topic

**Naar een optimale workflow voor de detectie van carbapenemase-producerende
Enterobacteriaceae vanuit screeningsstalen**

Author: Simon Degandt

Supervisor: Dr. Johan Colaert

Date: 14-5-2013

CLINICAL BOTTOM LINE

Carbapenemase-producerende Enterobacteriaceae (CPE) vormen de laatste jaren een hot topic in de microbiologie. Deze multiresistente stammen produceren namelijk een bepaald β -lactamase, carbapenemase genaamd, dat carbapenem-antibiotica hydrolyseert. Hierdoor verliezen deze breedspectra antibiotica hun antimicrobiële werking. Carbapenems zijn een klasse binnen de β -lactam-antibiotica die vaak gebruikt worden als laatste redmiddel bij complexe infectie met multiresistente micro-organismen. De dreiging deze carbapenems te verliezen door de gestage opkomst van CPE is meer dan zorgwekkend.

Elk microbiologisch laboratorium wordt dan ook verwacht in staat te zijn om CPE tijdig op te sporen. Daarbij is de detectie van asymptomatisch CPE-dragerschap via een gerichte screening belangrijk zodat de nodige ziekenhuishygiënische maatregelen snel toegepast kunnen worden. Momenteel is er nog geen algemene snelle, efficiënte manier van CPE-detectie voorhanden waardoor de meeste microbiologische laboratoria op zoek zijn naar een optimale workflow om deze kiemen te detecteren.

Dit is ook het geval binnen AZ Groeninge, waar momenteel CPE opgespoord wordt via een chromogeen medium, gevoeligheidsbepalingen, syngietesten met inhibitoren en een PCR confirmatie. Dit ganse proces duurt 3 tot 5 dagen. In deze CAT wordt op zoek gegaan naar een meer optimale workflow via een korte literatuurstudie en via het uitproberen van enkele nieuwe technieken zoals de Carba NP test en een rechtstreekse multiplex PCR.

De Carba NP test is een eenvoudige, snelle en goedkope biochemische test die kwalitatief bepaalt of een bepaalde stam al dan niet een carbapenemase produceert. De reagentia zijn echter relatief instabiel en hun bereiding vergt enige ervaring en manuele precisie. Daarbij zijn de resultaten niet helemaal reproduceerbaar waardoor de test voorlopig geen plaats heeft in een sluitende CPE-screening.

Bij het rechtstreeks moleculair testen op een rectale wisser worden 2 PCR-methodes geëvalueerd. De commercieel beschikbare kit van Check-Points Health BV (Check-MDR Carba) geeft een kwalitatief resultaat

over de aanwezigheid van carbapenemase-productie. Om deze rechtstreeks uit te voeren op een rectale wisser moet deze wisser wel eerst selectief aangerijkt worden. De resultaten zijn zeer precies en over het algemeen worden ook bij zeer lage concentraties een correct resultaat bekomen. De tweede methode, een in-house multiplex PCR, geeft aan de hand van smeltcurves aan welk type carbapenemase al dan niet geproduceerd wordt. Het rechtstreeks uitvoeren van deze PCR-methode op een selectieve aanrijking van de rectale wisser leidt tot de precieze detectie van de meest frequente types van CPE, op het IMP-type na. Voorlopig ligt de detectielimiet van de in-house PCR duidelijk hoger dan bij de commerciële kit. Verder sleutelwerk is dus vereist om de analytische sensitiviteit van de in-house PCR te verhogen. Beide moleculaire methodes geven binnen anderhalve dag een antwoord, maar zijn, net zoals de meeste moleculaire testen, beduidend duurder.

Momenteel zijn carbapenemase-producerende Enterobacteriaceae (CPE) een hot topic in de microbiologie. Bij deze epidemiologisch succesvolle stammen zitten de resistentiegenen ingebouwd in plasmiden en integrons, die snel uitgewisseld kunnen worden, zelfs tussen verschillende species. Deze eigenschappen hebben wereldwijd al tot verschillende uitbraken geleid. Het efficiënt diagnosticeren van CPE-stammen is van dubbel belang: enerzijds vormen carbapenems vaak het laatste redmiddel bij ernstige infecties met multiresistente gramnegatieve bacteriën en dreigen deze carbapenems nu ook verloren te gaan. Anderzijds zijn CPE-stammen niet altijd eenvoudig te herkennen als dusdanig, vooral omdat bij bepaalde types de MIC-waarden slechts licht verhoogd zijn. Hierdoor worden deze stammen volgens de huidige breekpunten nog steeds als gevoelig gerapporteerd.

Het tijdig indijken van deze nieuwe klasse multiresistente kiemen gebeurt op twee fronten. Aan de ene kant moeten kiemen met een verdacht antibiogram (verhoogde MIC-waarden voor carbapenems, volledige resistente tegen temocilline...) verder onderzocht worden, maar aan de andere kant moeten ook asymptomatische dragers opgespoord worden om ziekenhuisuitbraken te vermijden.

Met deze CAT willen we binnen AZ Groeninge op zoek gaan naar een optimale detectie van CPE-dragerschap. Momenteel wordt CPE-dragerschap opgespoord door het uitstrijken van een rectale wisser op een CPE-selectieve bodem. Elke groei wordt geïdentificeerd en de gevoeligheid wordt bepaald via een geautomatiseerd systeem (Vitek2, bioMérieux). Kiemen met een verdacht antibiogram worden vervolgens verder uitgewerkt via inhibitietesten met disk-diffusie (Rosco) en eventueel via een PCR-test. Dit ganse proces neemt zeker 3 tot 5 werkdagen in beslag. Wetende dat deze patiënten normaliter in afwachting van het resultaat moeten geïsoleerd worden, is duidelijk dat dit geen ideale manier van werken is.

Met deze CAT proberen we een meer optimale workflow uit te werken. Hierbij worden twee methodes diepgaander geëvalueerd. Enerzijds wordt een biochemische test, de Carba NP test, in gebruik genomen. Met deze test kan aan de hand van enkele kolonies in korte tijd carbapenemase-productie opgespoord worden. Bij de tweede strategie worden 2 moleculaire technieken rechtstreeks toegepast op een rectale wisser om carbapenemase-genen te detecteren. Hiervoor moet de wisser eerst selectief worden aangerijkt in een bouillon gesupplementeerd met een carbapenem. Bij beide strategieën wordt een resultaat de dag na afname van de wisser bekomen, wat een enorme tijdwinst zou betekenen.

QUESTION(S)

- 1) Wat is de laatste stand van zaken in de literatuur wat betreft screening naar asymptomatische CPE-dragerschap?
- 2) Is de Carba NP test een geschikte methode voor CPE-detectie in de dagdagelijkse praktijk?
- 3) Geeft het gebruik van een rechtstreekse CPE-PCR op een rectale wisser betrouwbare resultaten?

SEARCH TERMS

- 1) Pubmed: "carbapenemase" [MeSH], "Carba NP Test" [MeSH], "carbapenemase+pcr", "carbapenemase+screening"
MeSH Database (PubMed): MeSH term: "carbapenemase"
- 2) The Cochrane Library (<http://www.update-software.com/cochrane>)
- 3) SUM search (<http://sumsearch.uthscsa.edu/>)
- 4) UpToDate Online version 22.0 (2013)

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

1. Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NCJ. Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiol.* 2005;8(5):525–33.
2. Livermore DM. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8(4):557–84.
3. Livermore DM, Woodford N. The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. *Trends Microbiol.* 2006;14(9):413–20.
4. Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol.* 2010;300(6):371–9.
5. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(3):440–58.
6. Glupczynski Y, Huang TD, Bouchahrouf W, Rezende de Castro R, Bauraing C, Gérard M, et al. Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates in Belgian hospitals. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;39(2):168–72.
7. Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(5):413–31.
8. WIV (Jans B). Epidemiologie van carbapenemase producerende enterobacteriaceae (CPE) en aanbevelingen in België: 2012
9. Nordmann P, Cornaglia G. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a call for action! *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(5):411–2.
10. Ben-David D, Maor Y, Keller N, Regev-Yochay G, Tal I, Shachar D, et al. Potential role of active surveillance in the control of a hospital-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2010;31(6):620–6.

11. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 3.1, valid from 2013-02-11
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M100- S20 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, valid from 2010-01-01
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M100- S22 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, valid from 2012-01-01
14. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(10):1791–8.
15. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(5):432–8.
16. Livermore DM, Andrews JM, Hawkey PM, Ho P-L, Keness Y, Doi Y, et al. Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly? *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(7):1569–77.
17. Cohen Stuart J, Leverstein-Van Hall M a. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;36(3):205–10.
18. Nordmann P, Poirel L. Strategies for identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(3):487–9.
19. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Modified Hodge Test for Carbapenemase Detection in Enterobacteriaceae. 2–4.
20. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2012;50(2):477–9.
21. Pasteran F, Mendez T, Rapoport M, Guerriero L, Corso A. Controlling false-positive results obtained with the Hodge and Masuda assays for detection of class a carbapenemase in species of enterobacteriaceae by incorporating boronic Acid. *J Clin Microbiol.* 2010;48(4):1323–32.
22. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid Detection of producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(9):1503–7.
23. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas* spp. *J Clin Microbiol.* 2012;50(11):3773–6.
24. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(12):6437–40.
25. Willems E, Verhaegen J, Magerman K, Nys S, Cartuyvels R. Towards a phenotypic screening strategy for emerging β -lactamases in Gram-negative bacilli. *Int J Antimicrob Agents.* 2013;41(2):99–109.
26. Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol.* 2011;49(9):3321–4.
27. Hrabák J, Walková R, Studentová V, Chudácková E, Bergerová T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2011;49(9):3222–7.

28. Wang L, Han C, Sui W, Wang M, Lu X. MALDI-TOF MS applied to indirect carbapenemase detection: a validated procedure to clearly distinguish between carbapenemase-positive and carbapenemase-negative bacterial strains. *Anal Bioanal Chem.* 2013
29. Monteiro J, Widen RH, Pignatari ACC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(4):906–9.
30. Naas T, Cuzon G, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray (Check-MDR CT102) for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum β -lactamases and of KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM-1 carbapenemases. *J Clin Microbiol.* 2011;49(4):1608–13.
31. Mangold K a, Santiano K, Broekman R, Krafft C a, Voss B, Wang V, et al. Real-time detection of blaKPC in clinical samples and surveillance specimens. *J Clin Microbiol.* 2011;49(9):3338–9.
32. Singh K, Mangold K a, Wyant K, Schora DM, Voss B, Kaul KL, et al. Rectal screening for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases: comparison of real-time PCR and culture using two selective screening agar plates. *J Clin Microbiol.* 2012;50(8):2596–600.
33. Hindiyeh M, Smollen G, Grossman Z, Ram D, Davidson Y, Mileguir F, et al. Rapid detection of blaKPC carbapenemase genes by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2008;46(9):2879–83.
34. Giani T, Tascini C, Arena F, Ciullo I, Conte V, Leonildi a, et al. Rapid detection of intestinal carriage of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase during an outbreak. *J Hosp Infect.* 2012;81(2):119–22.
35. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Laboratory Protocol for Detection of Carbapenem-Resistant or Carbapenemase-Producing , *Klebsiella* spp . and *E . coli* from Rectal Swabs. (5):1–6.
36. Vrioni G, Daniil I, Voulgari E, Ranellou K, Koumaki V, Ghirardi S, et al. Comparative evaluation of a prototype chromogenic medium (ChromID CARBA) for detecting carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in surveillance rectal swabs. *J Clin Microbiol.* 2012;50(6):1841–6.
37. Nordmann P, Girlich D, Poirel L. Detection of carbapenemase producers in Enterobacteriaceae by use of a novel screening medium. *J Clin Microbiol.* 2012;50(8):2761–6.
38. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Comparison of the SUPERCARBA, CHROMagar KPC, and Brilliance CRE screening media for detection of Enterobacteriaceae with reduced susceptibility to carbapenems. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;75(2):214–7.
39. Samra Z, Bahar J, Madar-Shapiro L, Aziz N, Israel S, Bishara J. Evaluation of CHROMagar KPC for rapid detection of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2008;46(9):3110–1.
40. Carrër A, Fortineau N, Nordmann P. Use of ChromID extended-spectrum beta-lactamase medium for detecting carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2010;48(5):1913–4.
41. Adler A, Navon-Venezia S, Moran-Gilad J, Marcos E, Schwartz D, Carmeli Y. Laboratory and clinical evaluation of screening agar plates for detection of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from surveillance rectal swabs. *J Clin Microbiol.* 2011;49(6):2239–42.
42. Wilkinson KM, Winstanley TG, Lanyon C, Cummings SP, Raza MW, Perry JD. Comparison of four chromogenic culture media for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2012;50(9):3102–4.
43. Slotboom BJ, Nijhuis RHT, Van Zwet AA. Accurate detection of VIM , OXA-48 , NDM , KPC and IMP carbapenemase-producing micro-organisms in patients within the first 24 hours after hospital admission. Poster

44. Moran-Gilad J, Schwartz D, Navon-Venezia S, Carmeli Y. Laboratory evaluation of the ESwab transport system for the recovery of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(7):1429–33.

A. Literatuurstudie

I. B-lactam antibiotica en hun resistentie

Vandaag zijn de β -lactam antibiotica, waartoe penicilline behoort, de meest gebruikte antibiotica. Dit komt door hun relatief goede werking, lage kosten, goede distributie en minimale bijwerkingen. B-lactam antibiotica werken in op transpeptidase enzymen die instaan voor de synthese van de bacteriële celwand. Karakteristiek voor deze groep antibiotica is de β -lactamring. Verder worden ze onderverdeeld in vier deelgroepen: penicillines, cefalosporines, carbapenems en monobactams. (1)

Jammer genoeg is gebleken dat bacteriën in staat zijn zich snel aan te passen aan antimicrobiële middelen en werd de laatste decennia meer en meer resistentie tegen β -lactam antibiotica waargenomen. Resistentie tegen β -lactam antibiotica is te wijten aan 3 mechanismen, die al dan niet gelijktijdig aanwezig zijn. Als eerste mechanisme ontwikkelt het micro-organisme celwand transpeptidases die ongevoelig zijn voor β -lactams. Normaliter binden β -lactams covalent aan transpeptidases, enzymen die instaan voor de biosynthese van de peptidoglycaanlaag van de bacteriële celwand. Deze enzymen worden ook penicilline-bindingsproteïnen (PBP) genoemd. Productie van nieuwe celwandactieve PBP's met een verminderde affiniteit voor β -lactam antibiotica kunnen in resistentie resulteren. Een bekend voorbeeld hiervan is de methicilline-resistentie bij *Staphylococcus aureus*, gekend als de ziekenhuisbacterie MRSA. (1)

Een tweede mechanisme is het ontwikkelen van een verminderde penetratie doorheen de celwand. Bij gramnegatieve micro-organismen dringen β -lactam antibiotica het buitenmembraan binnen via porines. Een verandering in porinestructuur of een afname in het aantal porines veroorzaakt een verminderde penetratie en dus een lagere activiteit van het antibioticum. Een ander mechanisme dat leidt tot een verminderde antibiotica-accumulatie is het ontwikkelen van efflux-pompen, die het antibioticum terug naar buiten pompen. Het meest gekende voorbeeld hiervan is de MexAB-OprM pomp bij *Pseudomonas aeruginosa*. (1)

Het derde en meest frequente resistentiemechanisme is de productie van β -lactam hydrolyserende enzymen, β -lactamases genaamd. B-lactamases binden aan β -lactam antibiotica en door hydrolyse wordt de β -lactamring geopend, waardoor deze inactief wordt. (1)

2. B-lactamases

B-lactamases vormen een zeer heterogene groep, met één gemeenschappelijke noemer: de mogelijkheid tot het hydrolyseren van minstens één soort β -lactam antibiotica. (2)

Oorspronkelijk werden β -lactamases geklassificeerd volgens fenotypische eigenschappen zoals het hydrolytisch spectrum en de gevoeligheid voor inhibitoren. Een vaak gebruikte klassificatie werd opgesteld door Bush in 1989 en bijgewerkt in 1995. Het probleem bij dergelijke klassificatie is dat de klassen zeer slecht afgelijnd zijn en dat een kleine puntmutatie er voor kan zorgen dat een bepaalde β -lactamase van klasse verandert. (2)

Een moleculaire klassificatie gebaseerd op de aminozuursequentie werd voor het eerst voorgesteld door Ambler in 1980. Deze klassificatie is stabiel en eenvoudig opgedeeld in 4 klassen (klasse A tot en met D). (2)

Op zich kunnen β -lactamases grosso modo verdeeld worden in 2 soorten: de algemene β -lactamases die hydrolyse van de β -lactamring bewerkstelligen via een serine-ester mechanisme. Een kleinere groep gebruikt daarentegen zink-ionen om de β -lactamring te onderbreken. In de Ambler-klassificatie vormen deze zink-gebaseerd β -lactamases een aparte klasse, namelijk Ambler klasse B. Vandaar dat deze klasse ook de metallo- β -lactamases genoemd worden. Alle andere, serine-gebaseerde, β -lactamases zijn verdeeld over klassen A, C en D. (2,3)

Er bestaan verschillende types β -lactamases zoals penicillinasen, AmpC, ESBL, carbapenemases... Deze kunnen zowel chromosomaal als plasmidair voorkomen. Daarbij zijn ze constitutioneel aanwezig of worden ze geïnduceerd. Kortom, het is duidelijk dat deze β -lactamases een zeer heteroge verzameling van uiteenlopende types vormen. Een samenvatting van de Ambler-klassificatie wordt gegeven in tabel 1. (2,4)

Tabel 1 Ambler-klassificatie. Modificatie uit Pfeifer et al. (4)

KLASSE	β -LACTAMASE	VOORBEELDEN	RESISTENT TEGEN O.A.
Klasse A	Breed-spectrum β -lactamases	TEM-1, TEM-2, SHV-1, SHV-11	ampicilline
	ESBL TEM-type	TEM-3, TEM-52	penicilline, 4de gen cefalosporines
	ESBL SHV-type	SHV-5, SHV-12	penicilline, 4de gen cefalosporines
	ESBL-CTX-M-type	CTX-M-1, CTX-M-15	penicilline, 4de gen cefalosporines
	Carbapenemases	KPC, GES, SME	alle β -lactams
Klasse B	Metallo- β -lactamase	VIM, IMP, NDM	alle β -lactams
Klasse C	AmpC cefamycinasen (chromosomaal)	AmpC	cefoxitine, 3de gen cefalosporines
Klasse D	AmpC cefamycinasen (plasmidair)	CMY, DHA, MOX, FOX, ACC	cefoxitine, 3de gen cefalosporines
	Breed-spectrum β -lactamases	OXA-1, OXA-9	oxacilline, ampicilline
	ESBL OXA-type	OXA-2, OXA-10	penicillines, 4de gen cefalosporines
	Carbapenemases	OXA-48	ampicilline, imipenem
		OXA-23, OXA-24, OXA-58	alle β -lactams

3. Carbapenemases en carbapenemase-producerende Enterobacteriaceae (CPE)

Carbapenems behoren tot de β -lactam antibiotica en hebben een zeer breed antimicrobieel spectrum, vooral tegen gramnegatieve bacteriën. Gezien dit zeer breed spectrum wordt deze klasse graag achter de hand gehouden om hun activiteit te bewaren. Toch worden ze vaak empirisch voorgeschreven bij ernstige infecties en in het geval van infecties met ESBL of AmpC β -lactamases zijn ze de eerste keuze. Sedert de introductie van het eerste carbapenem, imipenem, in 1985, zijn Enterobacteriaceae ongeveer 20 jaar lang gevoelig gebleven. Maar nu steekt resistentie meer en meer de kop op. De exponentiële toename is vooral te wijten aan carbapenem hydrolyserende β -lactamasen, carbapenemases genoemd. Deze carbapenemases waren eerst chromosomaal aanwezig in non-fermenters, vooral *P. aeruginosa*, maar zijn via horizontale gentransfer overgegaan naar de Enterobacteriaceae, waar deze stammen epidemiologisch zeer succesvol zijn gebleken. Zoals in tabel 1 te zien is zijn de carbapenemases verdeeld over 3 Ambler-klassen, namelijk klasse A, B en D. (5)

3.1. Types carbapenemases

3.1.1. Ambler-klasse A (5)

Carbapenemases van klasse A zijn in de regel resistent tegen penicillines, cefalosporines, aztreonam en carbapenems. Daarentegen zijn ze gevoelig aan β -lactamase-inhibitoren zoals boorzuur, clavulaanzuur en tazobactam. Chromosomale vormen zoals SME, IMI, NMC duiken slechts sporadisch op en zijn nooit geassocieerd met mobiele elementen.

Het plasmidair gecodeerde KPC en in mindere mate GES zijn wel frequent voorkomende carbapenemases. Genen voor KPC en GES bevinden zich op transfereerbare plasmiden waardoor ze makkelijk verspreiden naar andere Enterobacteriaceae en *Pseudomonas* species.

KPC heeft sedert 2004 al meerdere uitbraken veroorzaakt in de VSA, vooral in New York. Ondertussen komt dit type carbapenemase wijdverspreid voor en is het endemisch in landen zoals in Israël.

3.1.2. Ambler-klasse B (5)

Deze metallo- β -lactamases zijn resistent tegen penicillines, cefalosporines, carbapenems en β -lactam-inhibitoren. Daarentegen zijn ze gevoelig voor aztreonam en metaal-ion-chelatoren zoals EDTA en dipicolinezuur.

Deze groep kwam eerst chromosomaal voor bij opportunistische pathogenen zoals *Bacillus cereus*, *Aeromonas* species en *Stenotrophomonas maltophilia*, maar sedert eind jaren 90 worden ze meer en meer teruggevonden op plasmiden en transposons.

De meest gekende klasse B carbapenemases zijn VIM, NDM en IMP.

3.1.3. Ambler-klasse D (5)

Carbapenemases van klasse D zijn resistent tegen penicillines, de vroege cefalosporines en β -lactamase-inhibitoren. Ze vertonen over het algemeen een zwakke carbapenemase-activiteit, waardoor ze vaak slechts een discrete verhoging van de MIC-waarde van carbapenems veroorzaken. Als die MIC-waarde lager is dan het breekpunt, kunnen deze carbapenemases gemist worden. Recentelijk heeft prof. Glupczynski een associatie vastgesteld met temocilline-resistentie, wat een handig hulpmiddel kan zijn in de detectie. (6)

De meeste gekende carbapenemase van klasse D die voorkomt bij de Enterobacteriaceae is OXA-48. Het eerste geval van OXA-48 is beschreven in 2004 in Turkije. Tegenwoordig komt het endemisch voor in Noord-Afrika en het Midden-Oosten.

3.2. Epidemiologie

Het eerste geval van CPE in Europa werd vastgesteld in Griekenland in november 2001: bij een gehospitaliseerde patiënt werd *E. coli* geïsoleerd met een verminderde gevoeligheid voor carbapenems. Het bleek te gaan om de metallo- β -lactamase, VIM-I. Reeds snel doken over gans Griekenland, alsook op Kreta, nieuwe gevallen op met deze VIM-I. Bij deze uitbraken werd het VIM-I aangetroffen bij *K. pneumoniae* in plaats van bij de primaire *E. coli*. Via horizontale gentransfer moet het plasmidair bla_{VIM-I} gen dus overgedragen zijn naar een ander species, namelijk *K. pneumoniae*. (7)

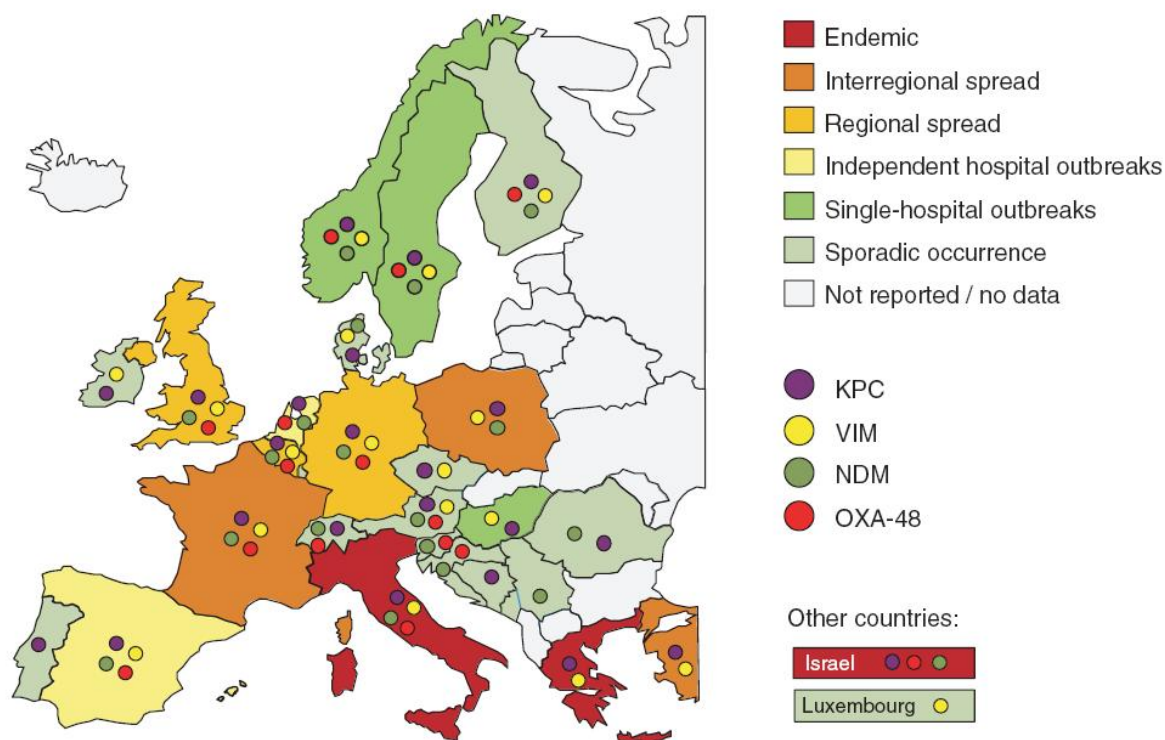
Ondertussen is Griekenland veruit de koploper op het vlak van CPE-incidentie in Europa. Liefst 70,8% van *K. pneumoniae* stammen betrokken in invasieve infecties, worden als carbapenem resistent of

intermediair gerapporteerd (EARSS-Net 2011). Dit cijfer loopt zelfs op als men dit enkel zou bekijken voor IZ eenheden. Op de tweede plaats komt Italië met 29,6%. Bij de meeste andere Europese landen ligt dit cijfer rond 0,3%.

In Europa is de prevalentie van CPE dus variabel, met een duidelijke noord-zuid as: aan de ene kant een hoge prevalentie in Griekenland, Italië, Turkije en Israël, en aan de andere kant een zeer lage prevalentie in de Scandinavische landen, Zwitserland, Duitsland en Tsjechië (figuur 1). (7)

In België is er sedert 2010 een duidelijke toename in het aantal CPE-gevallen. In 2010 waren er 19 gevallen, in 2011 50 gevallen en in 2012 476 gevallen. Enerzijds is er een reële toename, maar anderzijds is er ook een toename van de participatie aan de CPE-surveillance. Meer en meer laboratoria gaan namelijk actief op zoek naar CPE-kolonisatie of -infectie. (8)

Uit de cijfers van het referentielaboratoria blijkt ook dat het in België bijna altijd gaat om het type OXA-48 en het species *K. pneumoniae*. (8)



Figuur 1 CPE-prevalentie in Europa (Canton 2012)

3.3. Laboratoriumdiagnostiek

3.3.1. Nut

Waarom moet CPE, en vooral CPE-dragerschap, opgespoord worden? Met andere woorden, waarom is men bevreesd voor micro-organismen met dergelijk resistentieprofiel?

Eerst en vooral omdat voor het eerst de carbapenem-antibiotica bedreigd zijn. Deze klasse van antibiotica vormt in gecompliceerde infecties met multiresistente kiemen, zoals ESBL-infecties,

vaak het laatste redmiddel. Indien de opkomst van CPE zich kan doorzetten verdwijnen ook deze breed-spectrum antibiotica en zijn patiënten die geïnfecteerd geraken met deze kiemen vaak een vogel voor de kat. De mortaliteit bij CPE-infecties is in de meeste studies dan ook zeer hoog, meestal meer dan 50%. (9)

Daarnaast is een snelle CPE-screening uiterst belangrijk om snel de juiste isolatiemaatregelen te kunnen toepassen en zo ziekenhuisuitbraken te vermijden of te bestrijden. Dit is vooral gebleken uit de studie van Ben-Davis et al. waarbij een Israëlisch ziekenhuis te kampen had met een uitbraak van KPC-producerende *K. pneumoniae*. Pas na het starten van een uitgebreide screening op CPE-dragerschap en de bijhorende isolatiemaatregelen kon de uitbraak tot halt geroepen worden en was de uitbraak enkele maanden nadien voorbij. (10)

De diagnostiek is tweeledig. Enerzijds moet CPE opgespoord worden in klinische stalen zoals urineculturen, hemoculturen en respiratoire culturen. Hierbij zijn goede breekpunten van belang. Daarnaast is een gerichte CPE-screening noodzakelijk om asymptomatische dragerschap vroegtijdig op te sporen. Eenmaal een kiem verdacht wordt van carbapenemase-productie moet deze accuraat en snel geconfirmeerd worden.

3.3.2. Detectie

De detectie van CPE in klinische stalen is gebaseerd op de resultaten van gevoeligheidsbepalingen bekomen via disk diffusie of via geautomatiseerde systemen. Enterobacteriaceae die duidelijk resistent zijn tegen carbapenem-antibiotica kunnen eenvoudig als CPE herkend en geconfirmeerd worden. Jammer genoeg komt de carbapenemase-activiteit bij bepaalde CPE-stammen, zoals OXA-48, slechts zeer beperkt tot uiting, zoals vaak het geval is bij het type OXA-48, net de meest prevalentie kiem in België. Dit leidt tot een discrete afname in de gevoeligheid van de kiem voor carbapenems en bijgevolg tot lage MIC-waarden die onder het breekpunt kunnen vallen en dus als gevoelig worden gerapporteerd. (5)

In tabel 2 worden de huidige breekpunten van zowel de European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), als Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) weergegeven. EUCAST hanteerde in het verleden reeds relatief lage breekpunten. Sedert 2011 bleven die breekpunten behouden, maar werd opgemerkt dat de kiem moet gerapporteerd worden zoals gemeten volgens de EUCAST-breekpunten. Een CPE met MIC-waarden lager dan het breekpunt mag dus in de regel behandeld worden met een carbapenem. Speciale testen voor carbapenemase-detectie zijn enkel aanbevolen voor epidemiologische en ziekenhuishygiënische doeleinden. (11)

CLSI heeft sinds 2011 drastisch de breekpunten aangepast. Voor 2011 lagen de breekpunten relatief hoog, waardoor veel CPE nog als gevoelig werden gerapporteerd. De nieuwe breekpunten zijn zeer scherp bijgesteld en zijn momenteel lager dan die van de EUCAST. Net als bij de EUCAST-breekpunten, moet in het geval van CPE de gevoeligheid gerapporteerd worden zoals gemeten. (12,13)

Tabel 2 EUCAST en CLSI carbapenem-breekpunten bij Enterobacteriaceae (11-13)

	voor 2011		EUCAST		voor 2011			CLSI		
	MIC breekpunt (mg/L)		Zone diameter (mm)		MIC breekpunt (mg/L)			Zone diameter (mm)		
	S ≤	R >	S ≥	R <	S ≤	I	R ≥	S ≥	I	R ≤
Ertapenem	0,5	1	25	22	2	4	8	19	16-18	15
Imipenem	2	8	22	16	4	8	16	16	14-15	13
Meropenem	2	8	22	16	4	8	16	16	14-15	13

	na 2011		EUCAST		na 2011			CLSI		
	MIC breekpunt (mg/L)		Zone diameter (mm)		MIC breekpunt (mg/L)			Zone diameter (mm)		
	S ≤	R >	S ≥	R <	S ≤	I	R ≥	S ≥	I	R ≤
Ertapenem	0,5	1	25	22	0,25	0,5	1	23	20-22	19
Imipenem	2	8	22	16	1	2	4	23	20-22	19
Meropenem	2	8	22	16	1	2	4	23	20-22	19

Zowel CLSI als EUCAST besluiten dus dat een carbapenemase-producerende stam als gevoelig gerapporteerd mag worden als de MIC-waarde onder hun vooropgestelde breekpunten ligt. Het opsporen van carbapenemase-productie zou hierbij niet noodzakelijk zijn voor de dagdagelijkse praktijk. Enkele auteurs weerleggen echter deze beweringen. Nordmann et al. schuift drie redenen naar voren waarom CPE met een MIC-waarde onder deze breekpunten niet als gevoelig gerapporteerd mag worden. Eerst en vooral zijn er nog weinig studies die het succes van carbapenems in dergelijke gevallen aantonen. Daarbij weet men niet hoe sterk de carbapenemase activiteit in vivo is op de plaats van infectie. En ten slotte vreest men voor een in vivo selectie van carbapenem-resistente kiemen, die eventueel ook gebaseerd zijn op andere resistentiemechanismen. (14,15)

Ook Livermore et al. contesteert deze nieuwe richtlijnen van CLSI en EUCAST. Deze richtlijnen vertrouwen te veel op een accurate gevoeligheidsbepaling en houden geen rekening met de inter-laboratorium-variatie van MIC-waarden via geautomatiseerde gevoeligheidsbepalingen. Tenslotte gaat er kostbare epidemiologische informatie verloren en kunnen uitbraken te laat opgespoord worden. (16)

Kortom stellen deze auteurs voor om nog lagere breekpunten in te stellen ter detectie van CPE. Een meropenem en ertapenem MIC-waarde van $\geq 0,5$ mg/L is voor Cohen Stuart et al. voldoende om verder te zoeken naar carbapenamases. Voor imipenem wordt een hogere afkapwaarde van 2 mg/L voorgesteld aangezien de MIC-distributie van imipenem in de wild-type populatie oploopt tot 1 mg/L. Daarbij zou imipenem enkel gebruikt mogen worden voor CPE detectie bij *E. coli*, *Klebsiella* spp, *Salmonella* spp en *Citrobacter* spp. (17)

Nordmann et al. stelt voor, op basis van eigen expertise, om alle Enterobacteriaceae met een MIC voor ertapenem $\geq 0,5$ mg/L en voor meropenem en imipenem ≥ 1 mg/L verder te controleren op carbapenemase-activiteit. (18)

Tot slot merkte Glupczynski et al. op dat bij OXA-48 stammen er vaak een associatie te zien is met temocilline-resistentie. Dus een lichte MIC-stijging van een carbapenem in combinatie met temocilline-resistentie, is een extra argument om een stam te verdenken voor OXA-48-productie. (6)

3.3.3. Confirmatie

3.3.3.1. Modified Hodge Test

De Modified Hodge Test gold bij de opkomst van CPE als de referentiemethode om carbapenemase-productie te bevestigen. Indien correct uitgevoerd volgens de CLSI richtlijnen, kan de aanwezigheid van diffundeerbare carbapenemases aangetoond worden. (19)

De rationale achter de MHT is het opsporen van een verstoring van de inhibitiezone van een carbapenem-gevoelige *E. coli* rond een carbapenem-schijfje door een verdachte stam doorheen de inhibitiezone te enten. Indien de stam effectief een carbapenemase produceert, wordt het antibioticum geïnactiveerd en kan de gevoelige *E. coli*-stam toch ingroeien langs de verdachte kiem. (19)

Ondertussen omschrijven meeste auteurs deze methode als zeer omslachtig en tijdrovend. Daarnaast is de aflezing soms moeilijk en aflezer-afhankelijk en zijn zowel de sensitiviteit (door een slechte NDM detectie) als de specificiteit (door vals-positieve resultaten met bepaalde AmpC en ESBL producers) niet optimaal. (15)

Girlich et al. probeerde de sensitiviteit te verhogen door zink toe te voegen aan het cultuurmedium om zo NDM producers beter te detecteren. (20)

Pasteran et al. creëerde een MHT gebaseerd op boorzuur en oxacilline. Zo verminderde het aantal vals-positieve resultaten met een verhoging van de specificiteit tot gevolg. Daarbij kunnen bij deze aangepaste MHT carbapenemases van Ambler-klasse A onderscheiden worden van de andere klassen. (21)

Ondanks deze wijzigingen wordt de MHT niet vaak in de praktijk toegepast.

3.3.3.2. Carba Nordmann-Poirel test

In 2012 ontwikkelden Nordmann en Poirel een eenvoudige biochemische test om bacteriële groei relatief snel te evalueren op carbapenemase-productie. Het principe van deze “Carba NP test” is zeer simpel. De bacterie wordt eerst via een buffer gelyseerd. Daarna wordt deze suspensie vermengd met een fenolroodbuffer en het carbapenem imipenem. Indien de bacterie een carbapenemase produceert, wordt het toegevoegde imipenem gehydrolyseerd waardoor de rode buffer verzuurt en van kleur omslaat van rood naar oranje/geel. Deze omslag is reeds duidelijk na maximaal 2 uren. De eerste resultaten met deze test zijn alvast veelbelovend. Daarbij is de test snel en goedkoop. (22,23)

Ondertussen is er een tweede versie van deze Carba NP test ontwikkeld. Hierbij probeert men, naast de detectie van carbapenemase-productie, ook te weten te komen tot welke Ambler-klasse de carbapenemase behoort. Dit doet men door aan de test enerzijds tazobactam en anderzijds EDTA toe te voegen, inhibitoren van respectievelijk Ambler-klasse A en B. Indien geen enkele inhibitor effect heeft op de carbapenemase-activiteit, wordt de stam tot Ambler-klasse D gerekend. (24)

3.3.3.3. Inhibitor-gebaseerde gecombineerde double-disk synergietesten

Fenotypisch kan men carbapenemase-productie opsporen aan de hand van hun gevoeligheid voor bepaalde inhibitoren. Deze inhibitoren zijn enerzijds β -lactamase-inhibitoren zoals clavulaanzuur, boorzuur en tazobactam, die Ambler-klasse A carbapenemases inhiberen, en anderzijds metaal-ion-chelatoren zoals EDTA en dipicolinezuur, die Ambler-klasse B carbapenemases inhiberen. Voor Ambler-klasse D bestaan er geen specifieke inhibitoren, waardoor deze klasse, die toch het meest prevalent is in België, niet opgespoord kan worden. (5)

In deze testen kan er enorm gevarieerd worden met het type en dosis van antibioticum, het type en dosis van inhibitor, de afstand tussen de schijfjes, het medium en de combinaties van antibiotica en inhibitoren. Onlangs werd in een grote literatuurstudie geconcludeerd dat ter confirmatie van Ambler-klasse A carbapenemases de gewijzigde MHT volgens Pasteran et al. of een commercieel beschikbare boorzuur-gebaseerde double-disk synergietest (KPC + MBL Confirm ID kit, Rosco Diagnostica A/S) de voorkeur genieten. Voor de klasse B carbapenemases ontbreken voorlopig voldoende data met commercieel beschikbare testen. Bijgevolg wordt de voorkeur gegeven aan een huisbereide synergietest. (25)

3.3.3.4. Massa spectrometrie

Een andere, veelbelovende piste is het opsporen van carbapenemase-producerende stammen via massa spectrometrie. Kortweg is de initiële uitwerking grosso modo dezelfde als bij de Carba NP test: de verdachte stam wordt eerst enkele uren geïncubeerd samen met meropenem. Daarna wordt via massaspectrometrie nagegaan of piek van het meropenem-molecule nog teruggevonden kan worden. Is dit niet het geval, dan is het toegevoegde meropenem gehydrolyseerd door de carbapenemase-producerende stam. Recente resultaten tonen alvast een sensitiviteit en specificiteit van 100%. (26–28)

Gezien meer en meer laboratoria beschikken over MALDITOF (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight) voor de identificatie van micro-organismen, lijkt deze methode in de nabije toekomst een plaats te hebben in de detectie van CPE.

3.3.3.5. Moleculaire biologie

Moleculaire technieken blijven de referentiemethode voor identificatie en differentiatie van carbapenemases. In de literatuur zijn meestal studies teruggevonden met enkelvoudige PCR-methodes waar op zoek wordt gegaan naar een specifiek gen, bijvoorbeeld bla_{KPC}, bla_{NDM},... Daarnaast zijn er ook succesvolle resultaten van in-house multiplex real-time PCR protocols gepubliceerd die verschillende types carbapenemase-genen kunnen detecteren. (29)

Een andere moleculaire techniek is de DNA microarray techniek, waarbij carbapenemases zowel geïdentificeerd als gedifferentieerd kunnen worden. Een commercieel beschikbare versie (Check-MDR CT102 DNA microarray, Check-Points Health BV) van deze techniek

toonde een goede performantie: naast de meest frequente types carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, NDM en IMP) kunnen ook enkele ESBL-types (TEM, SHV en CTX-M) gedifferentieerd worden met een hoge sensitiviteit en specificiteit. (30)

Deze moleculaire technieken worden doorgaans toegepast op bacteriële kolonies. Toch zijn er enkele artikels verschenen waarbij de genotypische confirmatie rechtstreeks gebeurt op klinische stalen, zoals rectale wissers. Bij bijna al deze studies gebeurt dit met een enkelvoudige PCR waarbij gezocht wordt naar het bla_{KPC}-gen. Daarbij worden de stalen meestal eerst aangerijkt in 5 mL tryptic soy broth (TSB) met een schijfje ceftazidime (31,32), terwijl andere studies meteen een korte extractie uitvoeren na de wisser te hebben geëludeerd in saline (33,34).

De belangrijkste nadelen van deze moleculaire technieken zijn de hoge kostprijs, de nood aan een goed uitgerust molecuulair laboratorium en aan goed opgeleide laboratoriumtechnologen en de onmogelijkheid om nieuwe carbapenemase-genen op te sporen. (15)

3.3.4. Screening

3.3.4.1. Staalsoort

Gezien de intestinale flora meestal het reservoir vormt van Enterobacteriaceae, zijn stoelgangsstalen en bij voorkeur rectale wissers de meest geschikte stalen om patiënten te screenen op CPE-dragerschap. Hierbij moet het verpleegkundig team goed geëduceerd worden dat peri-anale wissers bij voorkeur niet gebruikt worden vanwege een lagere sensitiviteit. (15)

3.3.4.2. CDC-methode

De Centers for Disease Control and Prevention (CDC) stelt een eenvoudige methode voor bij het opsporen van CPE uit een rectale wisser. De rectale wisser dient eerst aangerijkt te worden in 5 mL TSB waaraan een schijfje 10 µg ertapenem of 10 µg meropenem is toegevoegd. De aanrijking wordt vervolgens, na 18 uren incubatie, overgeënt op een MacConkey agar en opnieuw geïncubeerd. Elke bacteriële groei dient verder geconfirmeerd te worden op carbapenemase-productie. (35)

De belangrijkste tekortkoming van deze test is vooral de lage specificiteit voor CPE. Carbapenemase-producerende non-fermenters zoals *Pseudomonas aeruginosa* en *Acinetobacter baumannii*, kunnen ook doorgroeien, maar deze worden op een MacConkey agar gemakkelijk herkend als lactose-negatieve kolonies, terwijl de meeste CPE lactose-positief zijn. Ook Enterobacteriaceae die carbapenem-resistent zijn op basis van andere resistentiemechanismen kunnen doorgroeien. Daarnaast is de sensitiviteit ook niet optimaal, en zouden vooral stammen met een matige carbapenem-resistentie, zoals OXA-48, gemist worden. (35)

Vrioni et al. vergelijkt de CDC-methode met 4 andere screeningstechnieken. De CDC-methode toont de laagste sensitiviteit (89,1%) en de op een na laagste specificiteit (86,4%).

Enkel een methode waarbij de rectale wisser rechtstreeks wordt uitgestreken op een MacConkey agar gesupplementeerd met meropenem (1 µg/mL) scoort slechter. Daarnaast duurt het een dag langer om resultaten te bekomen met de CDC-methode in vergelijking met de andere 4 methodes. (36)

3.3.4.3. Selectieve media

Net zoals er selectieve, chromogene media bestaan voor screening van MRSA, GBS en ESBL, zijn er ook CPE-selectieve media ontwikkeld. Eerst werden media gebruikt die ontwikkeld waren voor ESBL zoals ChromID ESBL (bioMérieux), maar ondertussen zijn verschillende CPE-selectieve media op de markt: ChromID Carba (bioMérieux), Brilliance CRE (Oxoid), CHROMagar KPC (CHROMagar) en Supercarba (Nordmann et al.). (36–42) Het Supercarba medium, ontwikkeld door Nordmann et al., is een niet-commercieel medium dat bestaat uit een Drigalski agar gesupplementeerd met ertapenem, cloxacilline en zinksulfaat (37). Zowel op vlak van sensitiviteit als specificiteit scoort het Supercarba medium beter dan ChromID ESBL, CHROMagar KPC en Brilliance CRE. De uitstekende sensitiviteit is gebaseerd op een superieure detectie van OXA-48 in vergelijking met de andere media. Dit goedkoop medium is jammer genoeg niet commercieel beschikbaar. Commercialisatie is niet mogelijk door de instabiliteit van de reagentia waardoor de bodem slechts 7 tot 10 dagen houdbaar is. (37,38)

CHROMagar KPC was de eerste chromogene bodem voor carbapenemase, maar meer precies voor het KPC-type carbapenemase. Hoewel sommige studies deze bodem aanprijzen (39), wordt deze bodem vooral afgeraden wegens de lage sensitiviteit voor carbapenemases met een slechts een beperkte aantasting van de carbapenem-gevoeligheid, zoals OXA-48 (40,41).

Tegenwoordig worden ChromID Carba en Brilliance CRE het meest frequent gebruikt. Wat betreft de sensitiviteit besluit Wilkinson et al. dat ChromID CARBA (91%) duidelijk beter scoort dan Brilliance CRE (78%). Dit komt vooral omdat op het Brilliance CRE medium enkele IMP-stammen niet groeien. Brilliance CRE heeft daarentegen wel een hogere specificiteit dan ChromID Carba (89% vs 66%) doordat er een betere inhibitie is van *Pseudomonas* spp. (42)

Door de geringe verschillen tussen beide media kan eender welke keuze gerechtvaardigd worden. Wat betreft de kostprijs, is het Brilliance CRE medium goedkoper dan het ChromID Carba medium (€0,899 vs €1,24/plaat). Tekortkomingen van beide media blijven de matige detectie van OXA-48-stammen en de relatief korte houdbaarheid. (36,42)

Onlangs bracht de firma bioMérieux een nieuw medium op de markt dat selectief is voor OXA-48 carbapenemases. Gezien de gevoeligheid voor de andere carbapenemase-types erg laag is, moet deze plaat voorlopig gecombineerd worden met ChromID Carba, waardoor de kostprijs voor de media per staal als het ware verdubbelt. Eind 2014 zou er wel een biplaat gecommmercialiseerd worden die beide media combineert.

Tenslotte is het niet helemaal duidelijk of de rectale wisser selectief aangerijkt moeten worden, zoals bij de CDC-methode, vooraleer ze uitgeplaat worden op de selectieve media. Enkele studies zien alleszins geen meerwaarde in deze aanrijkingstap en achten het niet nodig het screeningsproces hierdoor een dag te vertragen. (36,41)

B. Studie

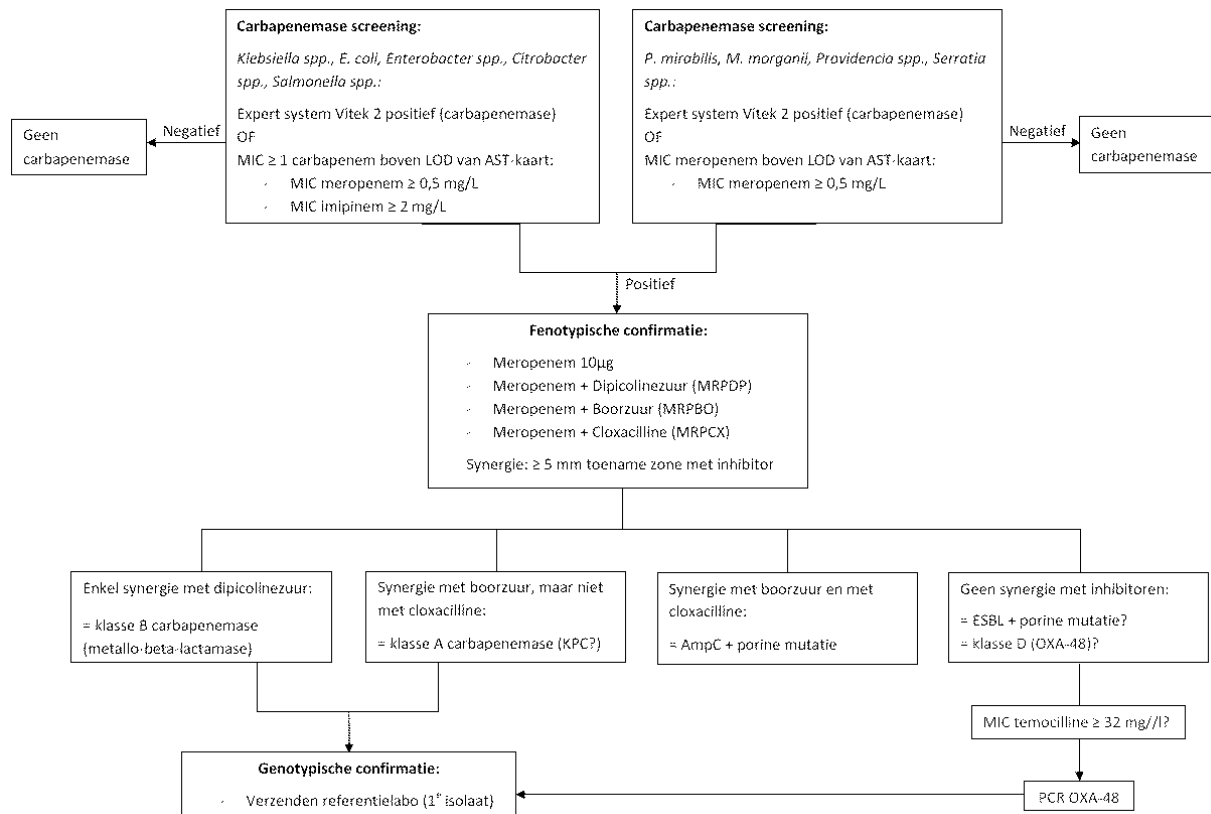
I. Huidige workflow AZ Groeninge

In AZ Groeninge is de workflow momenteel gebaseerd op een combinatie van een chromogeen medium met het werkschema uitgewerkt door Cohen Stuart (17).

Als chromogeen medium werd gekozen voor het Brilliance CRE medium (Oxoïd). Zoals hierboven beschreven lijkt dit medium de gulden middenweg tussen een goede specificiteit, door een goede inhibitie van non-fermenters, en het detecteren van stammen met een laaggradige carbapenemase-activiteit zoals OXA-48 carbapenemases. Omdat het nut van een aanrijksstap nog niet helemaal is opgehelderd, wordt een halve Brilliance CRE agar direct geënt met een rectale wisser en 's anderdaags de andere helft nadat de wisser is aangerijkt in 5mL TSB + meropenem.

In het werkschema van Cohen Stuart wordt eerst een onderscheid gemaakt op basis van de identificatie. Daarom wordt elke bacteriële groei op het chromogene medium geïdentificeerd via MALDITOF (Vitek MS, bioMérieux) en op basis van deze identificatie wordt al dan niet beslist om een geautomatiseerd antibiogram aan te maken (Vitek2, bioMérieux) (zie figuur 2). Indien het antibiogram, naargelang de kiem, aan bepaalde voorwaarden voldoet, wordt ter confirmatie deze kiem uitgetest met KPC + MBL Confirm ID kit (Rosco Diagnostica A/S). Op basis hiervan kan een CPE die tot Ambler-klasse A of B behoort, gedetecteerd worden. Indien geen synergie optreedt, behoort de stam eventueel tot Ambler-klasse D. Om dit uit te sluiten wordt vervolgens beroep gedaan op de frequente associatie met temocilline-resistentie bij OXA-48: bij concomitante temocilline-resistentie wordt de stam verder genotypisch geconfirmeerd via een in-house PCR techniek op OXA-48-productie. Indien geen temocilline-resistentie waargenomen, is vermoedelijk een ander mechanisme de oorzaak van deze resistentie, zoals een combinatie van ESBL-productie met een porine-mutatie. Deze werkwijze is samengevat in figuur 2

Dit ganse screeningsproces duurt ongeveer 3 tot 5 werkdagen, wat kan leiden tot een onnodige pre-emptieve isolatie van de patiënt. In een poging dit proces sneller en efficiënter te laten verlopen werden voor deze CAT twee concepten uitgetest om in een nieuwe flowchart in te passen: de Carba NP test en een rechtstreekse multiplex RT PCR op de rectale wisser.



Figuur 2 Huidig detectieschema CPE, AZ Groeninge

2. Carba NP test

2.1. Principe

De Carba NP test is een biochemische test waarvan de kleurbuffer op voorhand dient bereid te worden. Deze kleurbuffer, Solution A genaamd, vergt enige ervaring in de bereiding. Kortweg is Solution A een fenolroodoplossing waaraan zinksulfaat en natriumhydroxide wordt toegevoegd. Deze laatste reagent dient druppelsgewijs toegevoegd te worden tot een pH van 7,8 wordt bereikt. Deze oplossing is gedurende meerdere maanden stabiel bij -20°C. Hoewel deze bereiding simpel lijkt, is de uitvoering toch omslachtig. Vooreerst is het oplossen van fenolroodpoeder in water zeer moeilijk, vooral bij een concentratie van 0,5% gewicht/volume. Daarnaast moet de pH zeer fijn geregeld worden met behulp van een pH-meter en een roerplaat.

Per kiem worden in twee eppendorpjes een 3-tal kolonies opgelost en gecentrifugeerd in 100 µL lysisbuffer. In het ene eppendorpje wordt 100 µL Solution A toegevoegd, in het andere 100 µL Solution A met imipenem aan een concentratie van 6 mg/mL. Per run worden ook een positieve en een negatieve controle meegenomen. Bijvoorbeeld een gekende CPE-stam en een wild type *K. pneumoniae* als positieve en negatieve controle respectievelijk.

Alle eppendorpjes worden vervolgens geïncubeerd in de broedstoof op 37°C en tenslotte afgelezen na maximum 2 uren.

Indien de stam een carbapenemase produceert wordt het toegevoegde imipenem afgebroken waardoor de oplossing verzuurt en geel kleurt. Dit geeft volgende interpretatieschema:

	Solution A	Solution A + imipenem
Geen carbapenemase	rood	rood
Carbapenemase	rood	oranje/geel
Geen interpretatie mogelijk	geel	geel

Daarbij kan de snelheid waarmee de test positief wordt een idee geven over welk type carbapenemase het gaat:

- KPC: positief na 2 tot 30 minuten
- OXA-48: positief na 30 tot 60 minuten
- NDM, VIM, IMP: positief na 15 tot 60 minuten

2.2. Opzet

De Carba NP test wordt op 2 wijzen geëvalueerd. Eerst wordt de test 5x uitgevoerd op een selectie van 20 gekende stammen. Deze stammen worden geselecteerd als carbapenemase-producerende stammen uit de collectie van AZ Groeninge. Deze lijst bevat niet enkel Enterobacteriaceae, maar ook enkele stammen van carbapenemase-producerende *Pseudomonas aeruginosa* en *Acinetobacter baumannii*. Het type carbapenemase werd reeds in het verleden voor elke stam moleculair bevestigd. De MIC-waarden voor meropenem en imipenem worden bepaald aan de hand van een Etest (bioMérieux) volgens de CLSI-richtlijnen. Daarnaast wordt telkens een wild type *E. coli* meegenomen als negatieve controle. De eerste test wordt uitgevoerd dezelfde dag waarop Solution A wordt bereid en waarop imipenem wordt afgewogen. De 2^{de}, 3^{de} en 4^{de} test worden telkens met ongeveer een week tussen uitgevoerd. Ten slotte wordt de test nog een laatste maal uitgevoerd na ruim een maand. Telkens wordt dezelfde Solution A gebruikt en de imipenem die was afgewogen bij de eerste test. Solution A wordt bewaard op -20°C en de afgewogen imipenem op 5°C. Door de test te verspreiden in de tijd wordt de stabiliteit van de test uitgedaagd over een langere tijdsperiode dan wordt aangeraden in de aanbevelingen van Nordmann et al (22). De test wordt telkens door 2 personen afgelezen, waarvan minstens 1 persoon geblindeerd is.

Om de reproduceerbaarheid te evalueren wordt bij 3 stammen 3 dagen na elkaar de Carba NP test 3 maal uitgevoerd. De 3 stammen zijn een duidelijk positieve KPC-stam, een zwak positieve OXA-48-stam en een negatieve wild type *E. coli*. Ook hier wordt de test door 2 onafhankelijke lezers geïnterpreteerd.

Daarnaast wordt de test ook 2 maanden in de praktijk gebruikt, naast de huidige detectie van CPE. De Carba NP test wordt hierbij rechtstreeks uitgevoerd op de kolonies die groeien op de Brilliance CRE plaat.

2.3. Resultaten en analyse

Tabel 3 Resultaten Carba NP test

Soort carbapenemase	MIC meropenem (mg/L)	MIC imipenem (mg/L)	14/02/13	21/02/13	1/03/13	10/03/13	26/04/13
KPC K. pneumoniae ATCC-BAA1705	≥32	≥32					
KPC K. pneumoniae Stam AZ Groeninge	≥32	≥32					
KPC K. pneumoniae WIV EQC	≥32	≥32					
OXA-48 K. pneumoniae Stam HH Roeselare	0,5	1					
OXA-48 K. pneumoniae Stam UZ Gent	0,5	0,75					
OXA-48 K. pneumoniae Stam AZ Groeninge	≥32	≥32					
OXA-48 K. pneumoniae Stam AZ Groeninge	8	8					
OXA-48 K. pneumoniae WIV EQC	2	12					
OXA-48 E. coli Stam AZ Groeninge	0,5	1					
OXA-58 A. baumannii Stam VUB	≥32	≥32					
OXA-23 A. baumannii Stam AZ Groeninge	≥32	≥32					
VIM S. marescens Stam UZ Gent	≥32	≥32					
VIM P. aeruginosa Stam UZ Gent	≥32	≥32					
VIM P. aeruginosa Stam ULB	≥32	≥32					
VIM P. aeruginosa Stam ULB	≥32	≥32					
VIM P. aeruginosa Stam ULB	≥32	≥32					
VIM P. aeruginosa Stam ULB	≥32	≥32					
VIM K. pneumoniae WIV EQC	≥32	≥32					
NDM K. pneumoniae ATCC-BAA2145	≥32	≥32					
IMP K. pneumoniae Stam Nordmann-Poirel	≥32	≥32					

Tabel 3 vat alle resultaten samen waarbij de test 5 maal wordt uitgevoerd op 20 stammen met carbapenemase-activiteit. Wat eerst opvalt is dat beide *A. baumannii*-stammen (OXA-58 en OXA-23) telkens negatief zijn. Vermoedelijk is er naast de oxacillinase-activiteit nog een ander mechanisme aanwezig dat de hoge MIC-waarden voor de carbapenems verklaart. Daarbij denken we vooral aan een verminderde celwandpermeabiliteit door porinmutaties of door de opregulatie van effluxpompen. Oorspronkelijk is de test ontwikkeld voor de detectie van CPE. Maar daarnaast kunnen ook carbapenemase-positieve *P. aeruginosa* gedetecteerd worden via de Carba NP test, met uitzondering van het GES-type (23). Wat betreft het gebruik van de Carba NP test bij carbapenemase-producerende *A. baumannii* zijn er nog geen resultaten gepubliceerd. Bij deze 2 stammen blijkt het aantonen van carbapenemase-productie van *A. baumannii* alvast niet mogelijk.

Verder zijn 3 OXA-48 stammen bij 1 van de 5 testen negatief. Ook is er 1 VIM-producerende *P. aeruginosa*-stam die negatief blijft bij 2 testen. Bij 2 van deze 3 OXA-48-stammen zijn deze variabele resultaten misschien te verklaren door de geringe stijging in MIC-waarden voor carbapenems, maar dit gaat dan weer niet op voor de 3^{de} OXA-48-stam. Gezien de negatieve resultaten niet voorkomen bij de laatste test (na 1 maand), kan deze variabiliteit niet te wijten zijn aan instabiliteit van de reagentia. Eventueel kan een verklaring gevonden in het gebruikte inoculum. Nordmann et al. schrijft voor $\frac{1}{4}$ à $\frac{1}{3}$ van een gekalibreerde 10 μ L-entoog te gebruiken, wat ongeveer overeenkomt met 3 tot 5 kolonies. Gezien bij ons opzet een entoog van 10 μ L te groot was voor het gebruik met een eppendorf van 1,5 mL, werd als alternatief gebruik gemaakt van een 1 μ L-entoog, dat telkens met minstens 3 kolonies werd geïnoculeerd. Misschien worden de vals-negatieve resultaten verklaard door een te laag inoculum.

Deze hypothese werd kort uitgetest op een OXA-48-stam met discrete hydrolyse-activiteit. De test werd 15 keer uitgevoerd op de stam: 5x met een hoog inoculum (5 kolonies), 5x met een matig inoculum (3 kolonies) en 5x met een laag inoculum (1 kolonie). Bij het hoge en het matige inoculum is de kleuromslag duidelijk te merken. Bij het lage inoculum variëren de resultaten, of was de kleuromslag zeer discreet. Het is dus belangrijk een voldoende hoog inoculum te gebruiken om tot een betrouwbaar resultaat te komen.

Hoewel de kleuromslag soms zeer subtiel kan zijn, wordt er nooit een verschil vastgesteld bij de aflezing door verschillende personen.

Indien de *A. baumannii*-stammen niet meegerekend worden, wordt een sensitiviteit van 94,5% (85/90) bekomen.

Wat betreft de reproduceerbaarheid waren duidelijk positieve stalen telkens duidelijk positief en negatieve stalen duidelijk negatief. Zwak positieve stalen daarentegen waren minder duidelijk. Soms was de kleuromslag zeer discreet en twee maal werd het staal als negatief beoordeeld. Tussen de aflezers was er opnieuw geen verschil.

Gedurende de studie werden 11 rectale wissers opgestuurd. Slechts bij 2 stalen werd er bacteriële groei bekomen op Brilliance CRE. Tweemaal ging het om een *E. coli*-stam, met een lage MIC-waarden voor meropenem, imipenem en temocilline. Beide stammen bleven negatief met de Carba NP test.

2.4. Kostprijs reagentia

€2,2 / test

Imipenem op zich is een instabiel en duur product. Deze hoge kostprijs kan omzeild worden door in plaats van zuiver imipenem, het goedkopere commercieel preparaat Tienam® (MSD) te gebruiken. Dit product bestaat uit 50% imipenem en 50% cilastatine. Dus 12 mg Tienam® komt overeen met 6 mg imipenem.

Daarnaast kost de lysisbuffer ongeveer €350 voor 125 mL. Hiermee kunnen zeker 208 testen uitgevoerd worden en de buffer is jarenlang houdbaar op kamertemperatuur.

2.5. Besluit

De Carba NP test is een snelle en goedkope test om kwalitatief carbapenemase-activiteit op te sporen bij Enterobacteriaceae en de meeste *Pseudomonas* spp. De test lijkt alvast onbruikbaar voor de detectie van carbapenemase-producerende *A. baumannii*. Bij deze evaluatie werd een sensitiviteit van 94,5% bekomen. Dit is hoog, maar niet voldoende om de test als sluitstuk te gebruiken bij het screenen naar CPE-dragerschap.

Gedurende de studie werden vals-negatieve resultaten vastgesteld bij enkele OXA-48-stammen en bij een VIM-producerende *P. aeruginosa*. De reagentia van de test zijn instabiel, maar dit lijkt niet rechtstreeks de oorzaak van deze vals-negatieve resultaten te zijn. Een korte evaluatie toonde daarentegen aan dat het gebruikte inoculum ook belangrijk en voldoende hoog moet zijn. Misschien vergen de reagentia na verloop van tijd een hoger inoculum om tot betrouwbare resultaten te bekomen.

Kortweg is de Carba NP test een elegante test, maar voorlopig niet betrouwbaar genoeg om in de routine te gebruiken. De firma bioMérieux zou echter bezig zijn met de commercialisatie van deze test, wat misschien tot meer betrouwbare resultaten zal leiden.

3. PCR rechtstreeks

3.1. Principe

Moleculaire detectie van carbapenemase-genen blijft de meest accurate methode om CPE op te sporen. Doordat op de selectieve chromogene media vaak niet-CPE doorgroeit, is het niet mogelijk elk type kolonie genotypisch te gaan confirmeren. Moleculaire testen worden dus vaak pas uitgevoerd nadat de stam eerst is uitgetest met enkele fenotypische testen. Hierdoor wordt heel wat tijd verloren, wat een snelle screening niet ten goede komt.

Het rechtstreeks uitvoeren van moleculaire technieken op een rectale wisser in het kader van CPE-screening zou daarbij niet alleen een significante tijds winst betekenen, maar vermoedelijk ook een

hogere sensitiviteit. Deze laatste veronderstelling berust op het feit dat stammen met een lage carbapenemase-activiteit via fenotypische methodes gemist kunnen worden.

In AZ Groeninge is er momenteel een multiplex real-time PCR voorhanden waarmee 5 types carbapenemases (OXA-48, KPC, VIM, NDM en GES) kunnen gedetecteerd worden. Deze methode is enkel beschreven uitgaande van bacteriële groei (29). Om tot een snellere detectie van het juiste type CPE te komen, wordt als doel vooropgesteld deze real-time PCR rechtstreeks uit te voeren op een rectale wisser. Hiervoor wordt de poster van Slotboom et al. als uitgangspunt gebruikt (43). In deze studie wordt een commerciële real-time PCR van Check-Points Health BV (Check-MDR Carba) toegepast op een rectale wisser na aanrijking in 5mL TSB gesupplementeerd met ertapenem. Het grote verschil met de in-house PCR is dat bij Check-MDR Carba enkel de aanwezigheid van carbapenemase-productie wordt opgespoord aan de hand van fluorescentie-probes, terwijl bij de in-house PCR ook enkele carbapenemase-types worden verder gedifferentieerd aan de hand van smeltcurves.

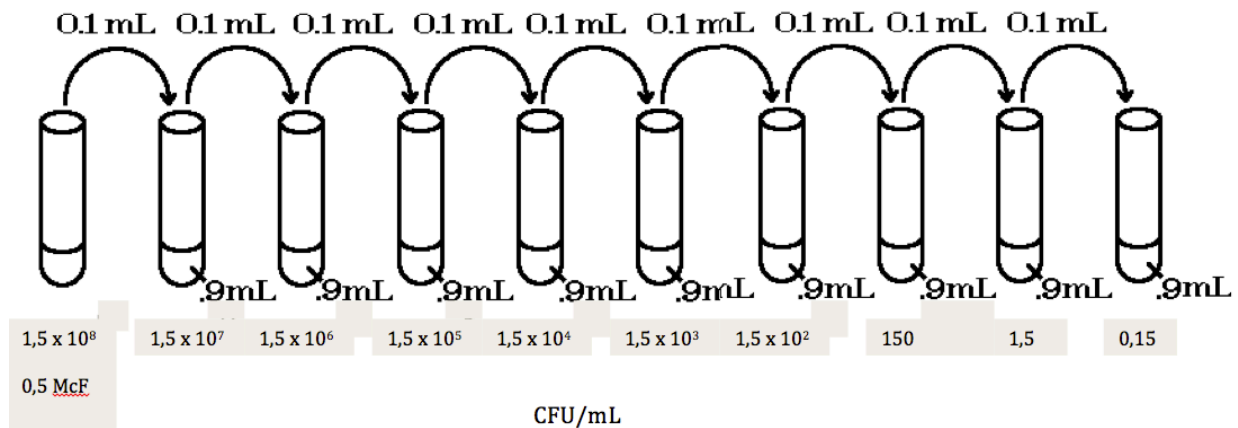
3.2. Opzet

Deze evaluatie wordt onderverdeeld in verschillende stappen. Eerst wordt de Check-MDR Carba kit van Check-Points Health BV aangekocht. Vervolgens wordt van de meest frequente types CPE 5 stammen uit de eigen collectie geselecteerd (KPC, OXA-48, NDM, VIM en IMP). Elke stam wordt serieel verdund en vermengd met een pool van faecesstalen om zo een rectale wisser na te bootsen (44). Vervolgens worden deze gesimuleerd rectale wissers selectief aangerijkt in 5 mL TSB met een schijfje 10 µg ertapenem. Door op deze aangerijkte wissers vervolgens Check-MDR Carba toe te passen, wordt onderzocht of er achtergrond-interferentie is met de faecale flora. Daarnaast wordt per type carbapenemase de limit of detection (LOD) opgespoord. In een laatste test wordt de aanrijkingssap onderzocht, waarbij de vergelijking wordt gemaakt tussen een aanrijking met 10 µg ertapenem, een aanrijking met 10 µg meropenem en een aanrijking zonder antibioticum.

Bij de tweede stap wordt de in-house PCR toegepast op een selectieve aanrijking van de gesimuleerde rectale wisser.

3.2.1. Seriële verdunningsreeks

Uitgaande van verse culturen wordt per stam een 0,5 McF-suspensie gemaakt in een steriele saline-oplossing. Vervolgens wordt een 10-voudige verdunningsreeks gemaakt tot een finale concentratie van ongeveer 0,15 CFU/mL wordt bekomen (zie figuur 3)



Figuur 3 Seriële 10-voudige verdunningsreeks

3.2.2. Simuleren rectale wisser (44)

Een rectale wisser wordt gesimuleerd door 5 verschillende faecesstalen te vermengen in een saline-oplossing. Deze faecessuspensie wordt vervolgens 1:1 vermengd per concentratie, waardoor de bacteriële concentraties nog eens gehalveerd worden.

3.3. Stap I – Check-MDR Carba - LOD

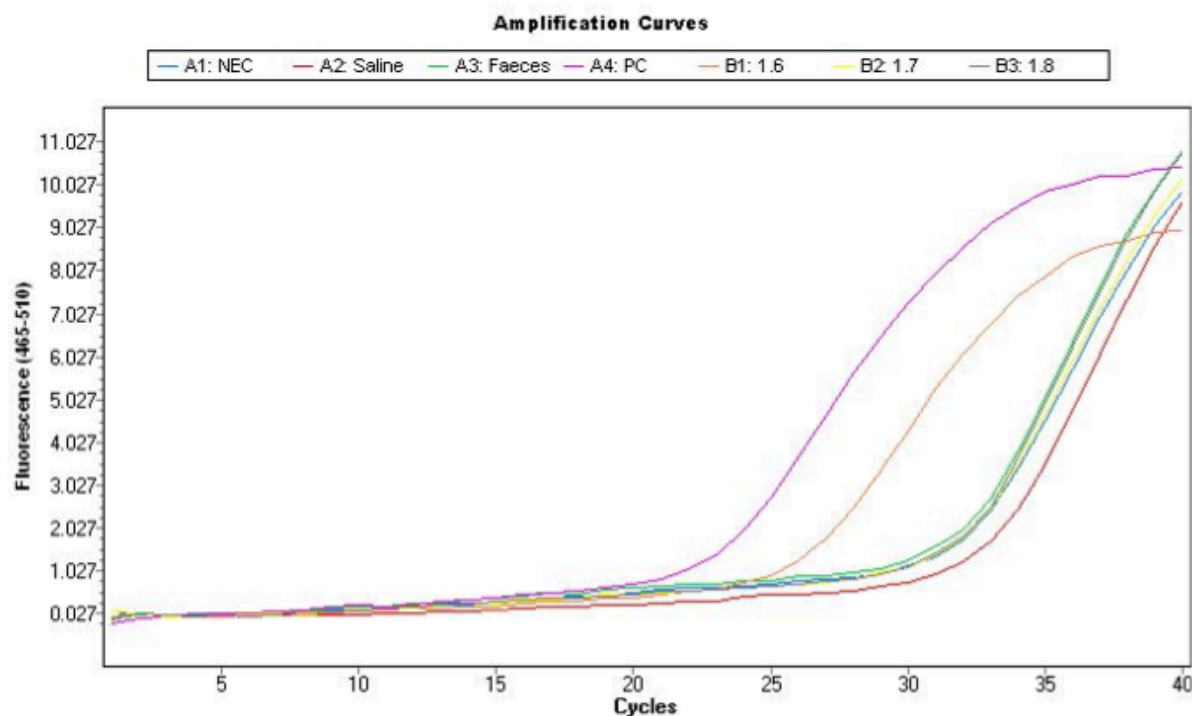
3.3.1. Opzet

Per type carbapenemase worden op 3 concentraties (750 CFU/mL, 75 CFU/mL en 7,5 CFU/mL) de PCR uitgevoerd. Eerst wordt 100 μ L van de oplossing overgebracht in 5 mL TSB met een 10 μ g ertapenem-schijfje. Na een overnacht incubatie op 37°C. Elke oplossing wordt vervolgens eerst uitgestreken over een MacConkey-agar en daarna wordt 200 μ L een DNA-extractie uitgevoerd met de NucliSENS EasyMAG (bioMérieux). Vervolgens wordt het protocol van Check-Points Health BV uitgevoerd op de LightCycler z480 (Roche). Als afkapwaarde wordt een Ct-waarde van 30 cycli vooropgesteld.

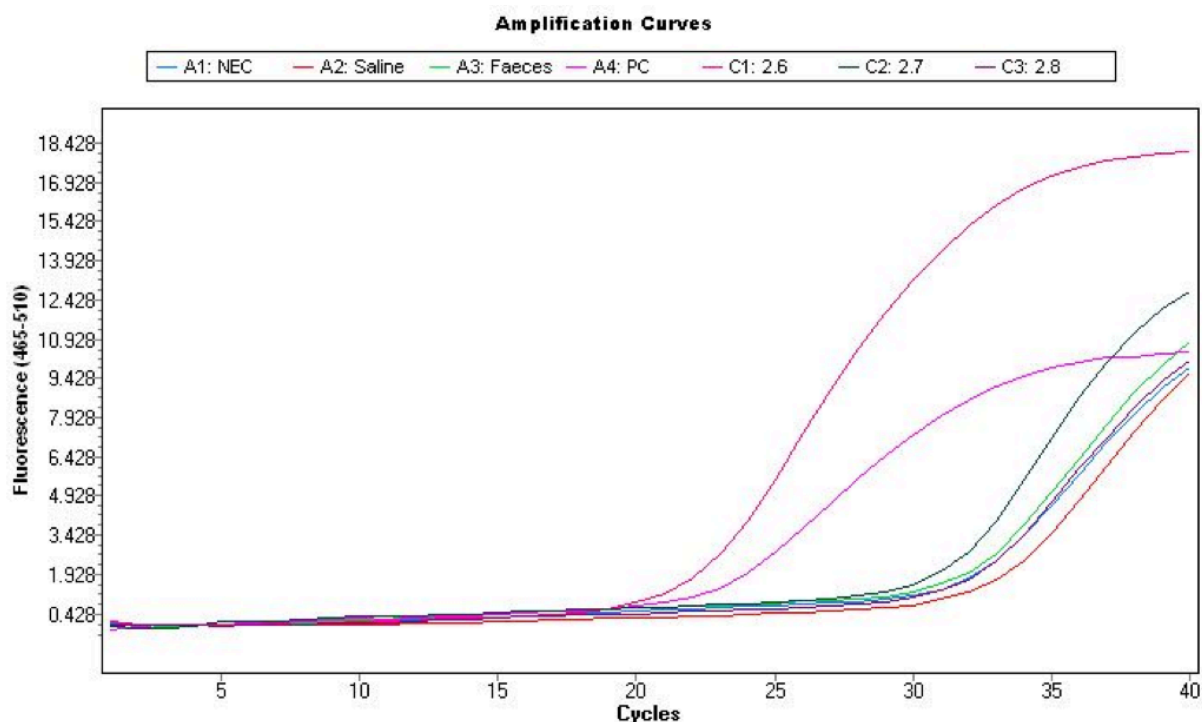
Per test wordt ook een PCR uitgevoerd op een aanrijking met enkel faecessuspensie en een aanrijking met enkel saline. Deze dienen als negatieve controle en als een controle op achtergrond-interferentie.

3.3.2. Resultaten

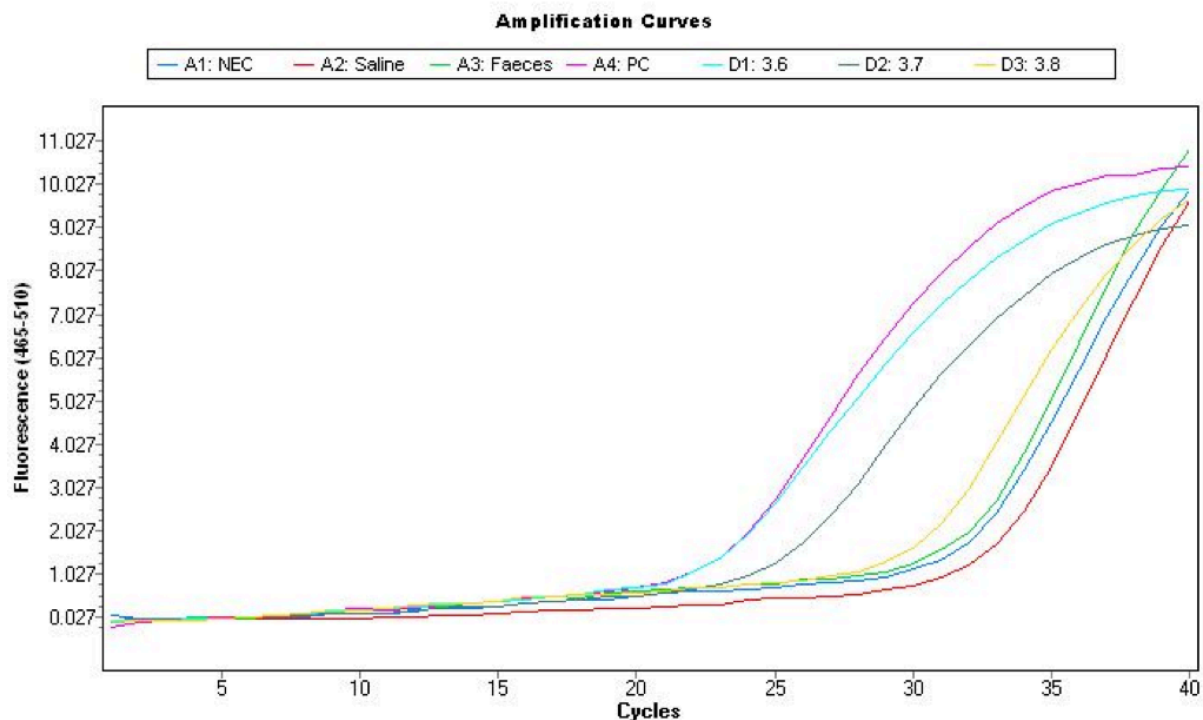
De bekomen amplificatiecurves worden weergegeven in onderstaande figuren (figuur 4-8) en tabel (tabel 5).



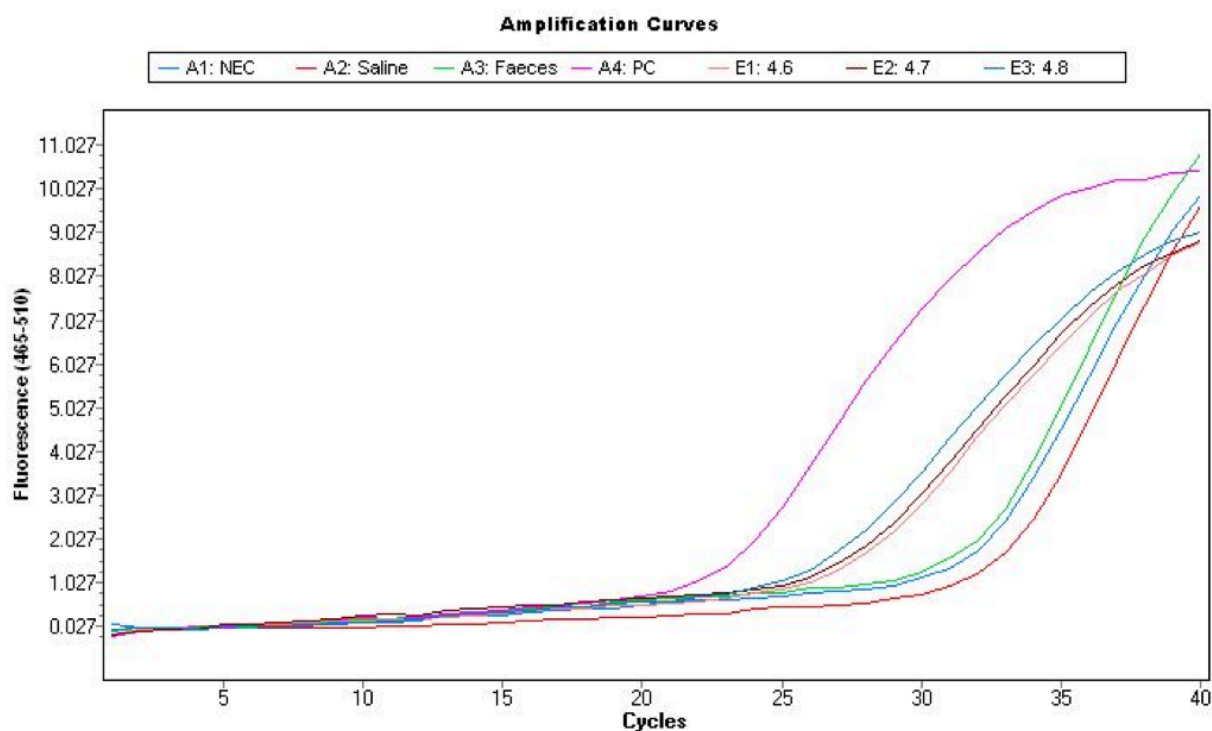
Figuur 4 Check-MDR Carba bij KPC-stam; NEC = negatieve extractie controle; Saline = rectale wisser zonder faeces en CPE; Faeces = rectale wisser met faeces zonder CPE; PC = positieve controle; 1.6 = KPC 750 CFU/mL; 1.7 = KPC 75 CFU/mL; KPC 7,5 CFU/mL.



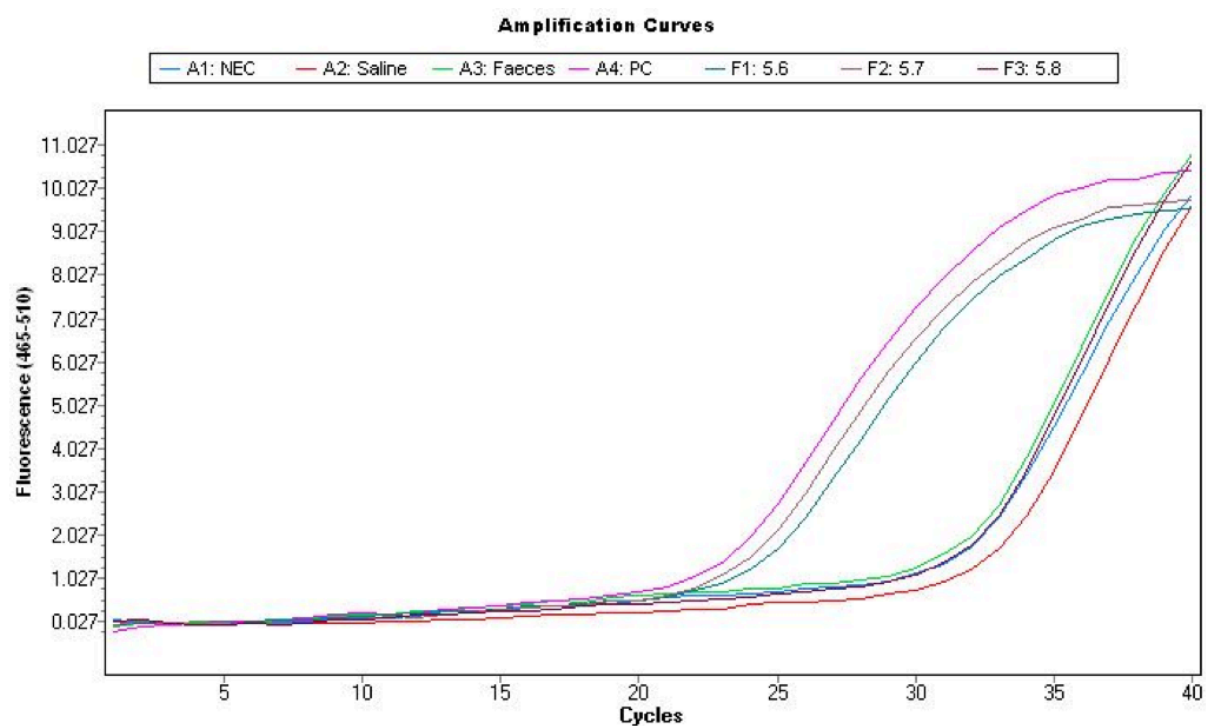
Figuur 5 Check-MDR Carba bij OXA-48-stam; NEC = negatieve extractie controle; Saline = rectale wisser zonder faeces en CPE; Faeces = rectale wisser met faeces zonder CPE; PC = positieve controle; 1.6 = OXA-48 750 CFU/mL; 1.7 = OXA-48 75 CFU/mL; OXA-48 7,5 CFU/mL.



Figuur 6 Check-MDR Carba bij VIM-stam; NEC = negatieve extractie controle; Saline = rectale wisser zonder faeces en CPE; Faeces = rectale wisser met faeces zonder CPE; PC = positieve controle; 1.6 = VIM 750 CFU/mL; 1.7 = VIM 75 CFU/mL; VIM 7,5 CFU/mL.



Figuur 7 Check-MDR Carba bij NDM-stam; NEC = negatieve extractie controle; Saline = rectale wisser zonder faeces en CPE; Faeces = rectale wisser met faeces zonder CPE; PC = positieve controle; 1.6 = NDM 750 CFU/mL; 1.7 = NDM 75 CFU/mL; NDM 7,5 CFU/mL.



Figuur 8 Check-MDR Carba bij IMP-stam; NEC = negatieve extractie controle; Saline = rectale wisser zonder faeces en CPE; Faeces = rectale wisser met faeces zonder CPE; PC = positieve controle; 1.6 = IMP 750 CFU/mL; 1.7 = IMP 75 CFU/mL; IMP 7,5 CFU/mL.

Tabel 3 Resultaten Check-MDR Carba

STAM	Concentratie (CFU/mL)	Ct FAM-kanaal	Ct Cy5-kanaal (IC)	Groei op McC
KPC	750	26,14	31,58	groei (<i>K. pneumoniae</i>)
	75	32,05	32,75	geen groei
	7,5	32,08	32,93	geen groei
OXA-48	750	22,24	31,85	groei (<i>K. pneumoniae</i>)
	75	31,2	32,41	geen groei
	7,5	31,99	33,06	geen groei
VIM	750	22,85	31,65	groei (<i>K. pneumoniae</i>)
	75	25,3	31,69	groei (<i>K. pneumoniae</i>)
	7,5	30,22	32,73	geen groei
NDM	750	27,73	31,79	groei (<i>K. pneumoniae</i>)
	75	27,37	31,99	groei (<i>K. pneumoniae</i>)
	7,5	26,65	31,88	groei (<i>K. pneumoniae</i>)
IMP	750	24,26	31,76	groei (<i>K. pneumoniae</i>)
	75	23,58	31,55	groei (<i>K. pneumoniae</i>)
	7,5	32,17	33,08	geen groei
Faecessuspensie		32,02	32,81	geen groei
Saline		33	33,72	geen groei
Negatieve extractie controle (NEC)		32,04	32,97	/
Positieve controle (PC)		22,89	32,71	/

De 5 CPE-stammen worden allen met een relatief lage LOD gedetecteerd. Meestal ligt dit rond 75 tot 750 CFU/mL. Voor NDM ligt dit zelfs nog lager. De analytische sensitiviteit van de test lijkt dus ruim te voldoen.

De faecessuspensie lijkt niet te interfereren met de detectie van de carbapenemase-genen.

3.3.3. Kostprijs reagentia

Ongeveer €90/test

3.4. Stap 2 – Check-MDR Carba – selectieve aanrijking

3.4.1. Opzet

Tenslotte wordt nagegaan welk antibioticum meest geschikt was om de rectale wisser selectief aan te rijken. Daarvoor wordt de KPC-stam aangerijkt zonder antibioticum, met ertapenem en met meropenem.

3.4.2. Resultaten

Tabel 4 Resultaten Check-MDR Carba

STAM	Concentratie (CFU/mL)	Ct FAM-kanaal	Ct Cys-kanaal (IC)	Groei op McC
KPC zonder AB	750	29,87	33,39	faecale flora
	75	30,69	33,59	faecale flora
	7,5	31,58	34,33	faecale flora
KPC + ertapenem	750	22,85	32,45	groei (<i>K. pneumoniae</i>)
	75	22,62	32,38	groei (<i>K. pneumoniae</i>)
	7,5	32,18	33,33	geen groei
KPC + meropenem	750	22,85	33,46	groei (<i>K. pneumoniae</i>)
	75	24,07	31,85	groei (<i>K. pneumoniae</i>)
	7,5	32,2	33,9	geen groei
Faecessuspensie		32,38	33,51	geen groei
Saline		32,22	33,01	geen groei
Negatieve extractie controle (NEC)		32,09	32,77	/
Positieve controle (PC)		23,11	31,69	/

Een aanrijking zonder antibioticum doet de faecale flora sterk overheersen, zodat de KPC-producerende *K. pneumoniae* onderdrukt wordt. Tussen een aanrijking met ertapenem of meropenem wordt geen verschil waargenomen, althans wat de KPC-stam betreft. Gezien de doorgaans hogere MIC-waarden voor ertapenem en gezien ook Slotboom et al. dit antibioticum verkiest, wordt ook in deze studie ertapenem gebruikt voor de selectieve aanrijking.

3.5. Stap 3 – In-house multiplex PCR

3.5.1. Opzet

Op basis van de resultaten bekomen in de eerste stap, wordt het experiment herhaald maar met de in-house multiplex real-time PCR. Opnieuw wordt 200 µL van de aanrijking gebruikt. De DNA-extractie gebeurt eveneens via de NucliSENS EasyMAG (bioMérieux). De amplificatie zelf gebeurt op de Rotor-Gene Q (Qiagen).

3.5.2. Resultaten

De LOD ligt bij deze test over het algemeen veel hoger. Bij alle stammen is de smeltcurve pas zichtbaar bij een concentratie van $7,5 \times 10^5$ CFU/mL. Gezien de in-house multiplex PCR nog niet op punt gesteld is voor de detectie van IMP, werd de IMP-stam zelfs niet gedetecteerd bij de hoogste concentratie. Er werd opnieuw geen interferentie waargenomen met faecale flora.

In het verder verloop van de studie zullen we pogen de LOD te verlagen om tot een aanvaardbare analytische sensitiviteit te komen. Een eerste denkpiste hiervoor is het aanpassen van het DNA-extractie programma.

3.5.3. *Kostprijs*

Ongeveer €27/test

4. **Besluit**

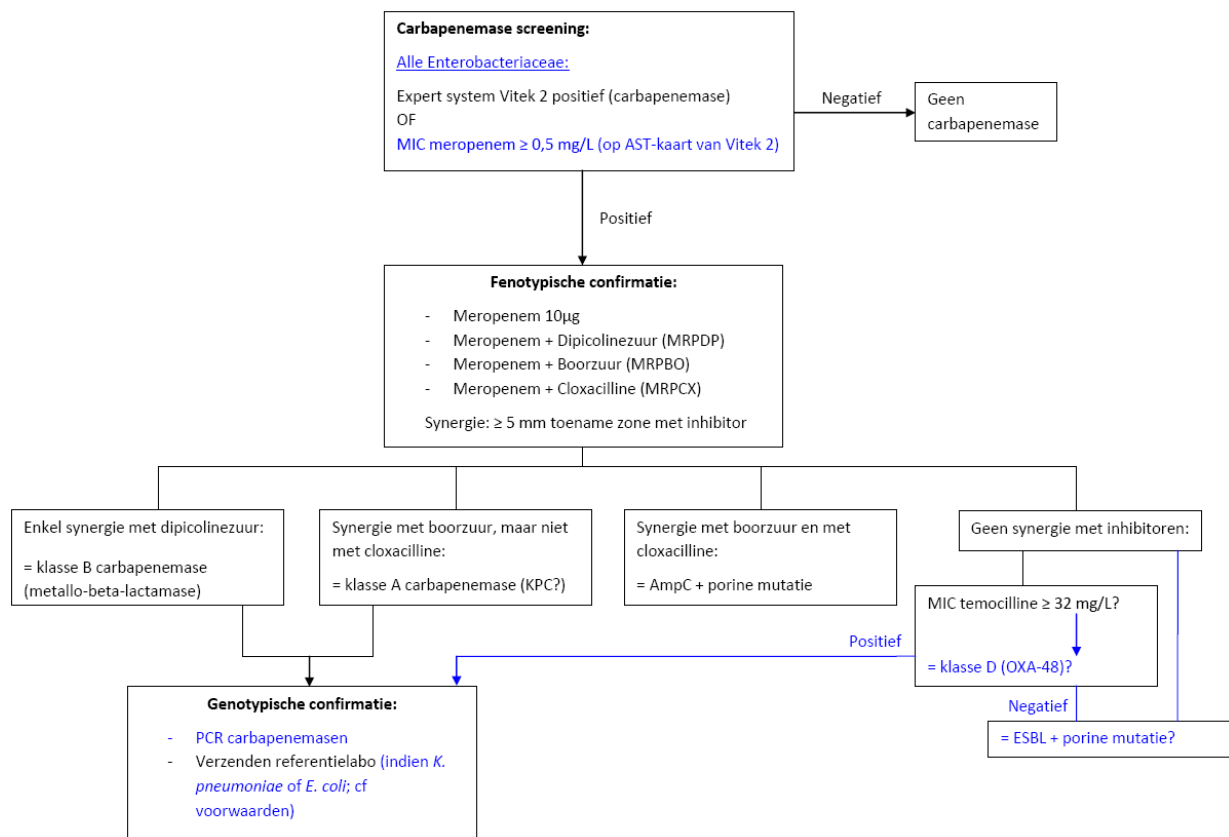
Zowel de Carba NP test als de rechtstreekse genotypische confirmatie op rectale wissers zijn veelbelovende technieken die het screeningsproces naar CPE drastisch kunnen versnellen.

De Carba NP test is voorlopig niet reproduceerbaar genoeg gebleken om het gebruik in de praktijk te rechtvaardigen. De instabiliteit van de reagentia, de bereiding van solution A en het gebruikte inoculum doen de test variëren, vooral bij de zwak-positieve stammen. Om deze test te commercialiseren moet een IVD-label bekomen worden, waardoor vermoedelijk deze problemen eerst zullen moeten verholpen worden. Als dit lukt heeft de Carba NP test in de toekomst zeker een plaats in de workflow van CPE-detectie.

De rechtstreeks toepassing van Check-MDR Carba (Check-Points Health BV) op rectale wissers geeft een LOD van 75 tot 750 CFU/mL. Of deze LOD voldoende is voor een goede analytische sensitiviteit moet blijken uit studies met klinische stalen. De in-house PCR heeft voorlopig alvast een te hoge LOD, waardoor deze niet bruikbaar is in de praktijk. Toch is het wenselijk om in de toekomst de in-house PCR te gebruiken in plaats van Check-MDR Carba. Niet alleen omdat de kostprijs van de in-house PCR beduidend lager ligt, maar ook omdat de in-house PCR tussen de verschillende carbapenemase-types kan differentiëren. Daarom zal er bij de verderzetting van deze CAT gezocht worden naar manieren om de LOD te verlagen en bijgevolg de analytische sensitiviteit van de test te verhogen. Een ander actiepoint is het panel van de in-house multiplex PCR uitbreiden met het IMP-type carbapenemase.

Tot slot zijn er met deze CAT voorlopig geen grote mogelijkheden gevonden tot het versnellen van de workflow bij CPE-screening. Op basis van het artikel van Nordmann et al. kan het werkschema enigszins vereenvoudigd worden (figuur 9) (18). In plaats van MIC-waarden te formuleren per species, stelt Nordmann et al. voor om elke stijging in MIC-waarde van een carbapenem verder fenotypisch uit te werken. Daarnaast zal elke stam die op basis van fenotypische testen verdacht is voor CPE, geconfirmeerd worden via de in-house multiplex PCR (figuur 9).

Voorts staan enkele plannen op stapel om de CPE-screening in de nabije toekomst te versnellen. Hierbij denken we aan de toepassing op MALDITOF, de commercialisatie van de Carba NP test en het uitbrengen van de biplaat ChromID Carba/OXA-48.



Figuur 9 Voorstel tot nieuw detectieschema CPE AZ Groeninge

To do/ACTIONS

- 1) In-house multiplex PCR:
 - a. carbapenemase-gen bla_{IMP} toevoegen aan panel
 - b. LOD bij rechtstreekse PCR op rectale wisser optimaliseren om zo de analytische sensitiviteit te verhogen
- 2) Opvolgen van de literatuur wat betreft nieuwe technieken die de efficiëntie van screening naar CPE-dragerschap kan verhogen (malditof, commercialisatie Carba NP test, biplaat ChromID carba/OXA-48)