



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

Simon Degandt
ASO klinische biologie
14 mei 2013

Supervisor: Dr. J. Colaert

CPE

- = Carbapenemase-producerende Enterobacteriaceae



B-lactam antibiotica

Penicillines

- B-lactamase gevoelige nauwspectrumpenicillines (benzylpenicilline)
- Penicillinase resistente nauwspectrumpenicillines (methicilline, oxacilline)
- B-lactamase gevoelige breedspectrumpenicillines (ampicilline, amoxicilline)
- B-lactamase gevoelige anti-pseudomonas penicillines (piperacilline)
- Penicillines met G- activiteit (temocilline)
- B-lactamase-inhibitoren (clavulaanzuur, tazobactam)

Cefalosporines

- 1^{ste} generatie (cefazoline)
- 2^{de} generatie (cefuroxime)
- 3^{de} generatie (ceftriaxone, cefotaxime, ceftazidime)
- 4^{de} generatie (cefepime)

Monobactams

- Aztreonam

Carbapenems

- Imipenem
- Meropenem
- Ertapenem

Resistentie β -lactam AB



Ambler klassificatie

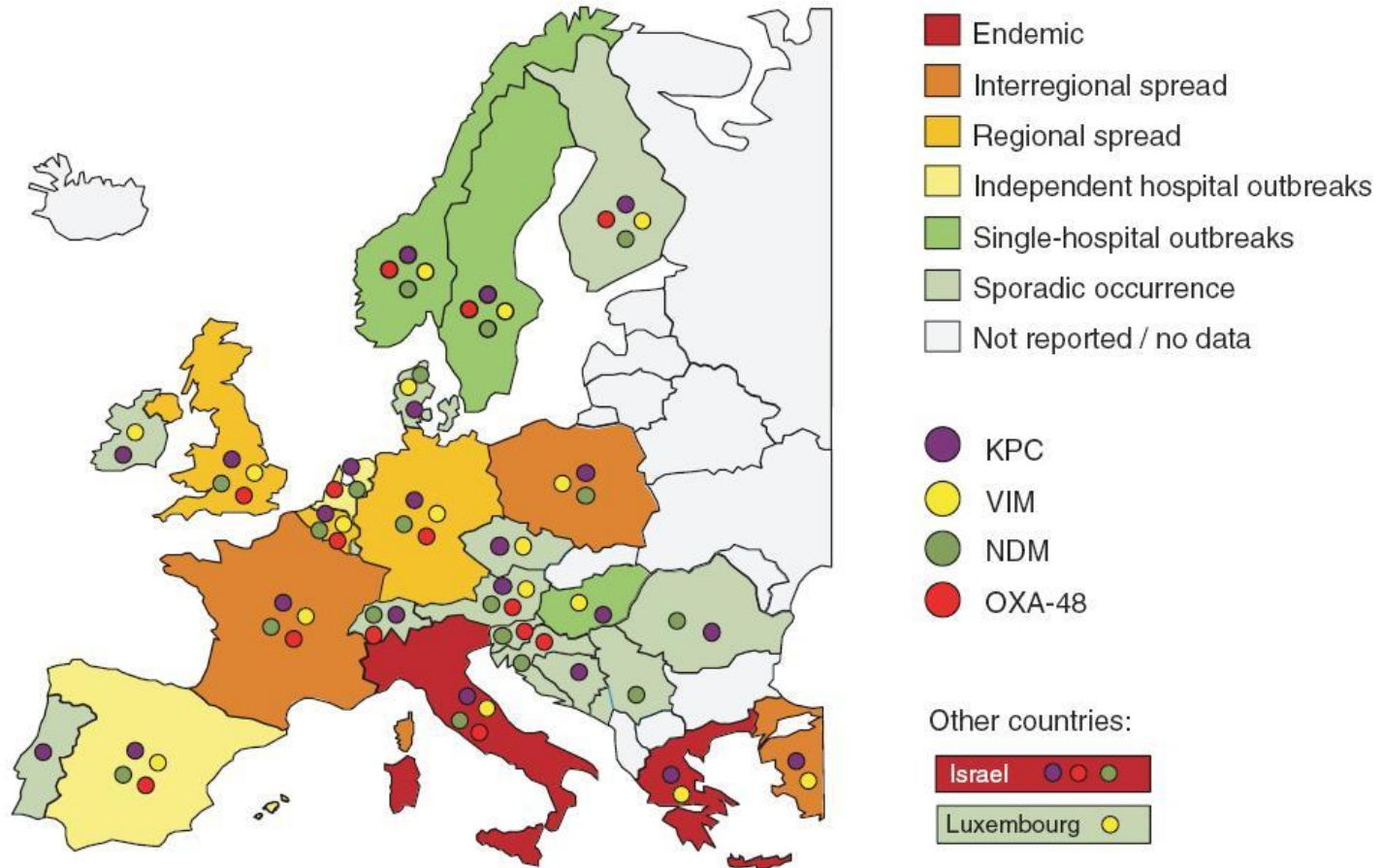
KLASSE	β -LACTAMASE	VOORBEELDEN	RESISTENT TEGEN O.A.
Klasse A	Breed-spectrum β -lactamases	TEM-1, TEM-2, SHV-1, SHV-11	ampicilline
	ESBL TEM-type	TEM-3, TEM-52	penicilline, 4de gen cefalosporines
	ESBL SHV-type	SHV-5, SHV-12	penicilline, 4de gen cefalosporines
	ESBL-CTX-M-type	CTX-M-1, CTX-M-15	penicilline, 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

Gemodificeerd schema uit Pfeifer 2010

Carbapenemase

- Verschillende types
- Ambler-klasse A
 - **KPC** (Klebsiella pneumoniae carbapenemase)
- Ambler-klasse B
 - **NDM** (New Delhi metallo- β -lactamase)
 - **VIM** (Verona integron encoded metallo- β -lactamase)
 - **IMP** (Imipenemase)
- Ambler-klasse D
 - **OXA-48** (Oxacillinase type 48)

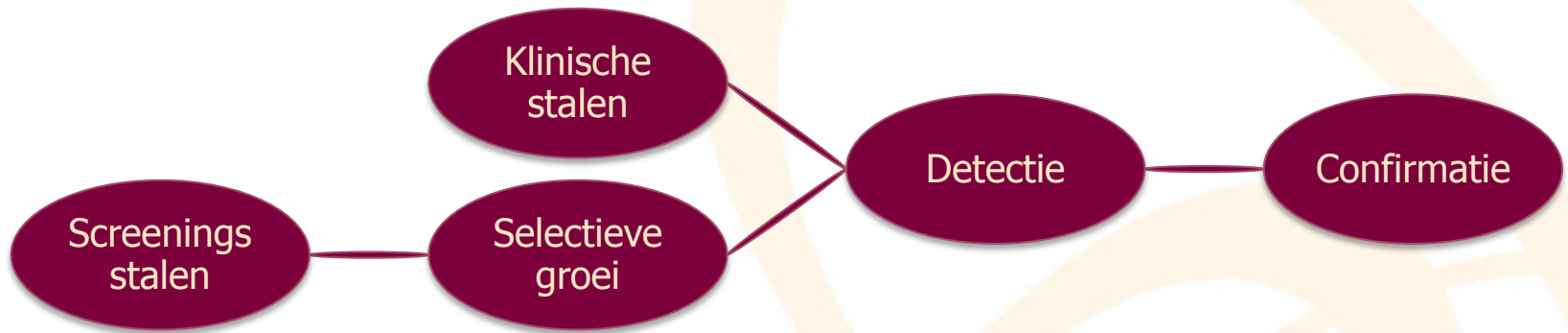
Epidemiologie - Europa



Waarom hot topic?

1. Carbapenem-AB vaak laatste optie
Bv ESBL-infecties
2. Epidemiologisch gunstige stammen
 - Horizontale gentransfer, voornamelijk plasmidair
 - Verspreiding tussen verschillende species binnen Enterobacteriaceae
3. Nog relatief weinig voorkomend
 - Nog controleerbaar!

Opsporen CPE in labo



- **Detectie:**
gebaseerd op gevoeligheidsbepalingen
- **Confirmatie:**
fenotypische en genotypische testen
- **Selectieve groei:**
Verdachte stammen selecteren uit flora via selectieve aanrijking of selectieve media

CPE-detectie

- Op basis van gevoeligheidsbepalingen
 - Vaak overduidelijk, maar soms zeer discreet (OXA-48)
 - EUCAST en CLSI: aanpassingen sedert 2011

voor 2011

	EUCAST				CLSI					
	MIC brekpunt (mg/L)		Zone diameter (mm)		MIC brekpunt (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				CLSI					
	MIC brekpunt (mg/L)		Zone diameter (mm)		MIC brekpunt (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

CPE-detectie

- *Aanbevelingen EUCAST en CLSI:*
 - In geval van ESBL en CPE mag gevoeligheid doorgegeven volgens breekpunt, zonder aanpassingen
 - Opsporen van mechanisme niet nodig in routine
 - Motivatie: te vaak carbapenem bij ESBL
- *Tegenargumenten (Nordmann en Livermore):*
 - Weinig evidentie carbapenem in monotherapie bij CPE
 - In vivo CPE-activiteit op plaats van infectie?
 - In vivo selectie van carbapenem-R stammen?
 - Inter-laboratorium variatie MIC-bepalingen?
 - Verlies van kostbare epidemiologische gegevens

Modified Hodge Test

- Oorspronkelijk dé fenotypische confirmatie
- Principe



- Minpunten:
 - Zeer omslachtig en tijdrovend
 - Soms moeilijke aflezing
 - Mindere sensitiviteit: door slechte NDM-detectie
 - Mindere specificiteit: door vals-positieve resultaten (AmpC en ESBL)

Synergietesten

- Inhibitor-gebaseerde gecombineerde double-disk synergietesten
- Gebaseerd op inhibitoren:
 - **B-lactamase-inhibitoren:** clavulaanzuur, boorzuur, tazobactam
-> Inhibitie klasse A (KPC)
 - **Metaal-ion-chelatoren:** EDTA, dipicolinezuur
-> Inhibitie klasse B (VIM, NDM, IMP)
- Veel variatie:
 - Type en dosis antibioticum
 - Type en dosis inhibitor
 - Combinatie inhibitor/antibioticum
 - Medium
 - Afstand tussen schijfjes
- Klasse D niet

Synergietesten

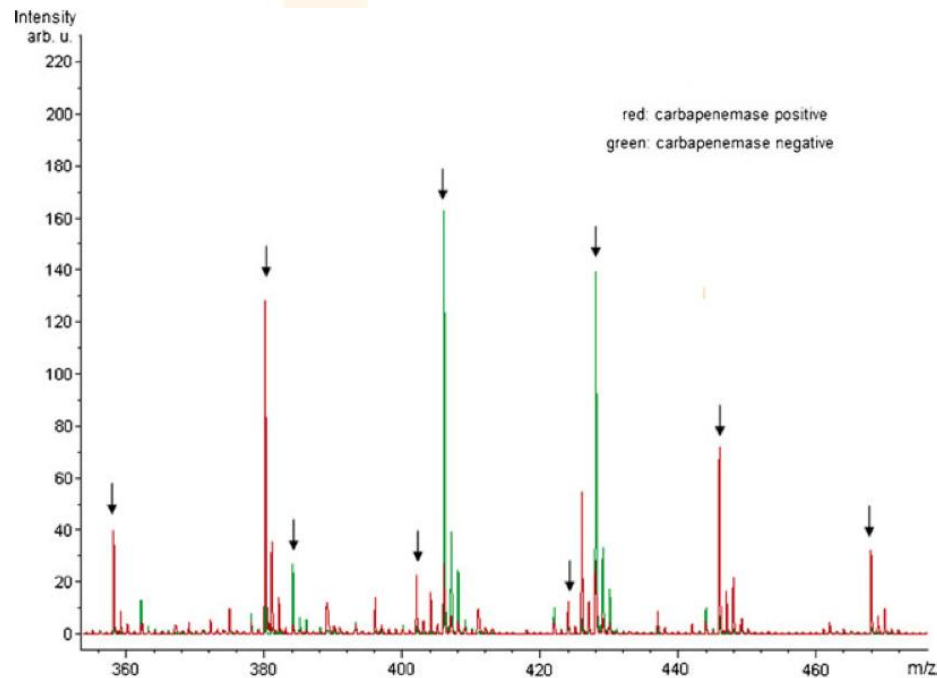
- KPC + MBL Confirm ID kit (Rosco Diagnostica A/S)



		Meropenem + Boronic MR+BO	Meropenem + DPA MR+DP	Meropenem + Cloxacillin MR+CX
AmpC + porin loss	Meropenem 10 µg MRP10	≥ 5mm AND	< 5mm	≥ 5mm
KPC	Meropenem 10 µg MRP10	≥ 5mm	< 5mm	< 5mm
MBL	Meropenem 10 µg MRP10	< 5mm	≥ 5mm	< 5mm

Massaspectrometrie

- Principe: opsporen degradatie van toegevoegde meropenem

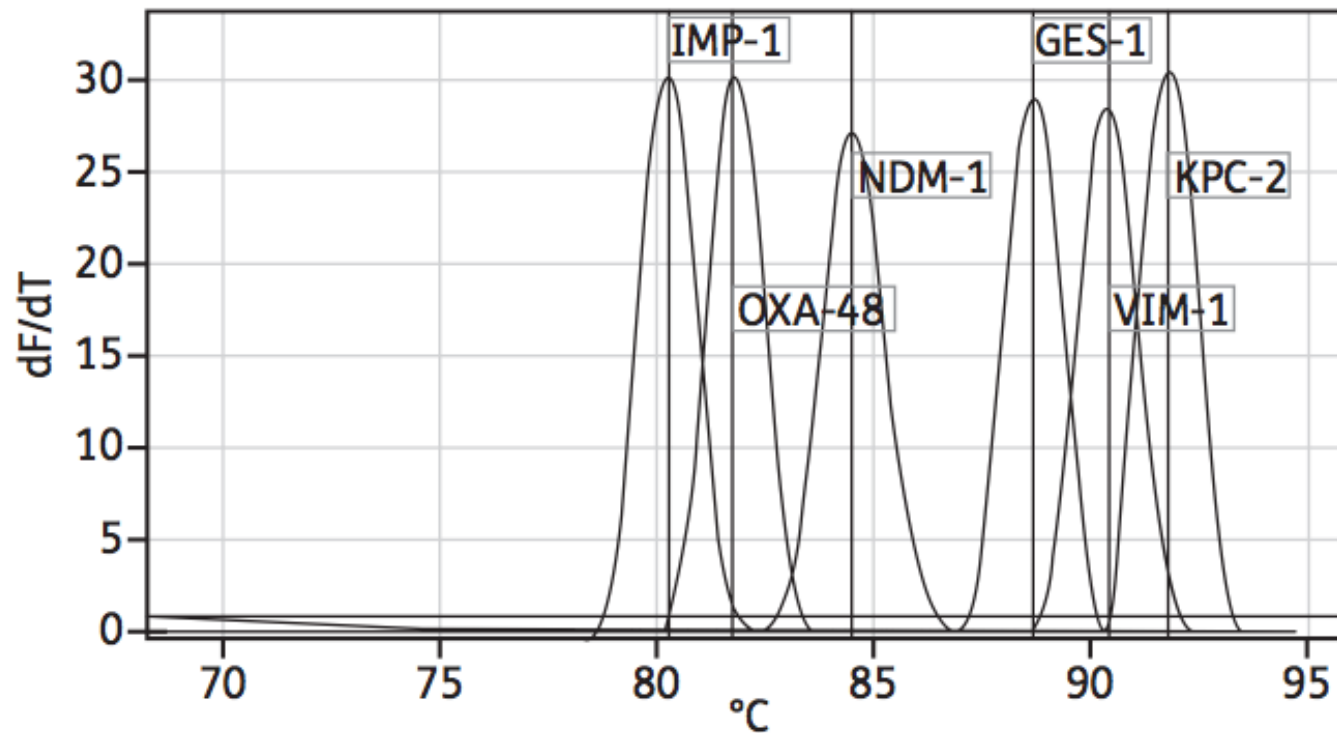


- MALDITOF?
- veelbelovende techniek

Wang et al. 2013

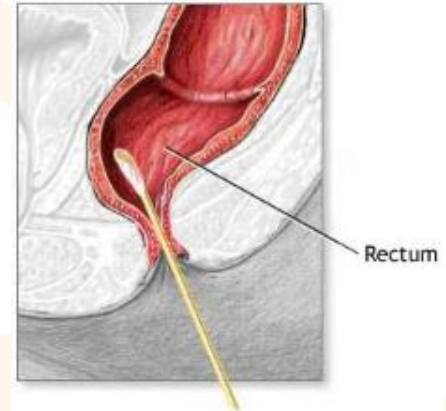
Moleculaire biologie

- PCR:
 - Gouden standaard
 - Enkelvoudige en multiplex



Screening – selectieve groei

- Rectale wisser of stoelgangsstaal
- Selectieve aanrijking: **CDC-methode**
 - Principe
 - Minpunten:
 - Lage specificiteit:
 - doorgroei non-fermenters (lactose-negatief)
 - doorgroei andere R-mechanismen
 - Lage sensitiviteit:
 - Missen van stammen met zwakke carbapenamse-activiteit (OXA-48)
 - Traag (min 2 dagen)
 - Vrioni et al. 2012
- Selectieve media



CDC-methode

- Vrioni et al. 2012

TABLE 3 Performance of the five culture screening methods for detection of CPE in active surveillance

Method ^a	Sensitivity (%) ^b	Specificity (%) ^c	PPV (%)	NPV (%)	Accuracy (%)
→ CDC-TS	89.1	86.4	80.4	92.7	87.4
ESBL-BH	92.4	93.3	90.4	94.8	93.0
chromID ESBL	92.4	84.7	73.9	94.8	85.1
chromID CARBA	92.4	96.9	93.4	94.8	95.1
MCM	89.1	85.2	78.8	92.7	86.7

^a CDC-TS, inoculation of swabs in tryptic soy broth with a 10-μg ertapenem disk followed by plating to MacConkey agar (100 μl of the selective tryptic soy broth after overnight enrichment); ESBL-BH, inoculation of swabs in brain heart infusion broth with a 10-μg ertapenem disk followed by plating to a chromID ESBL plate (100 μl of the selective brain heart infusion broth after 4 to 6 h of enrichment); MCM, supplementation of MacConkey agar plates with meropenem (1 μg/ml).

^b Differences in sensitivities among the five screening methods were not significantly different ($P = 0.631$).

^c Differences in specificities among the five screening methods were significantly different ($P = 0.014$).

Selectieve media

- Meestal chromogene media, zoals bij MRSA, GBS, ESBL
- Eerst media voor ESBL gebruikt
Bv. ChromID ESBL (bioMérieux)
- Specifieke CPE-media
 - **Supercarba** (Nordmann et al.)
 - **CHROMagar KPC** (CHROMagar)
 - **Brilliance CRE** (Oxoïd)
 - **ChromID Carba** (bioMérieux)
- Algemene tekortkomingen:
 - Allemaal slechte OXA-48 detectie
 - Beperkte houdbaarheid
 - Aanrijking nodig?

Selectieve media

- Supercarba (Nordmann et al.)

Pro

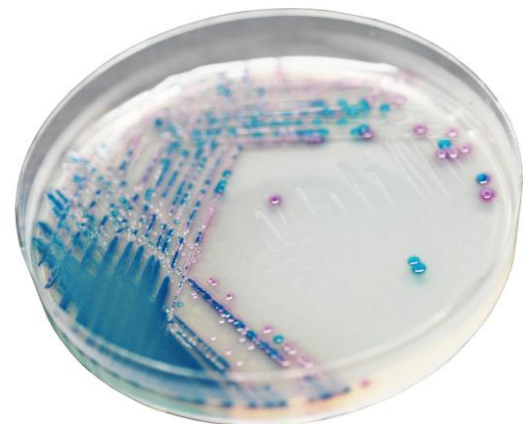
- Goedkoop
- Uitstekende specificiteit
- Uitstekende sensitiviteit, zelfs OXA-48

Contra

- Niet commercieel beschikbaar
- Niet chromogeen
- Instabiele reagentia
- 7-10 dagen houdbaar

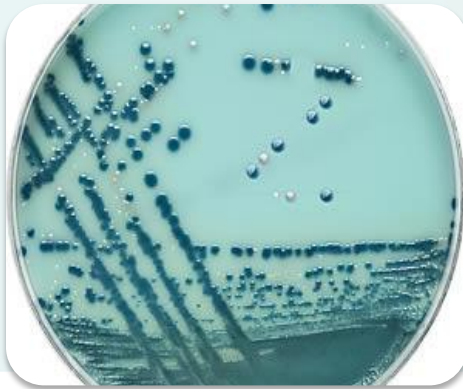
- CHROMagar KPC

- Ontwikkeld specifiek voor KPC
- Lage sensitiviteit



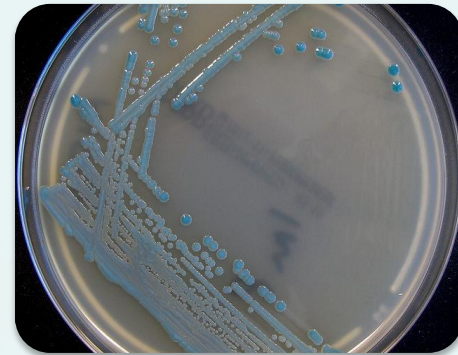
Selectieve media

- Brilliance CRE en ChromID Carba vaakst gebruikt
- Wilkinson et al. 2012



Brilliance CRE

Sensitiviteit 78%
Specificiteit 89%
± € 0,9 /plaat

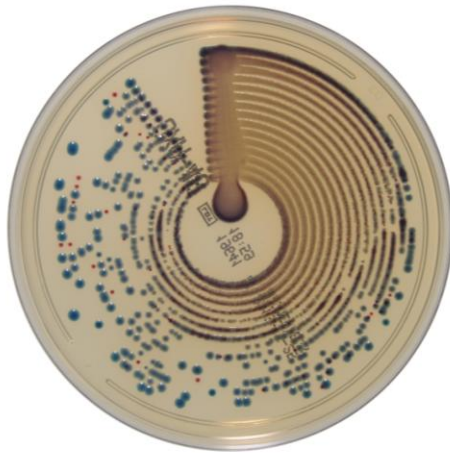


ChromID Carba

Sensitiviteit 91%
Specificiteit 66%
± € 1,25 /plaat

Selectieve media

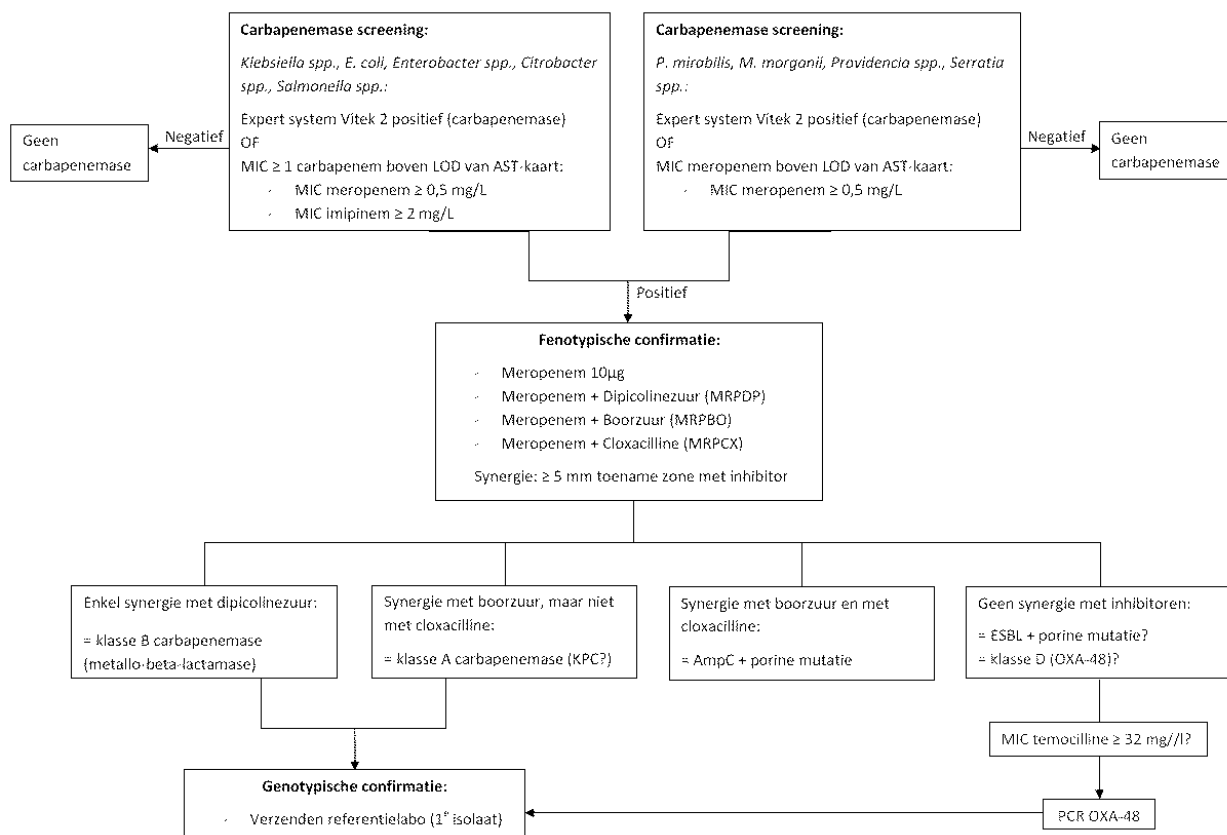
- Recentelijk nieuw medium, specifiek voor OXA-48:
ChromID OXA-48 (bioMérieux)



- Te gebruiken in combinatie met ChromID Carba
Andere types worden onderdrukt
- Principe?
- Eind dit jaar biplaat op markt

Situatie AZ Groeninge

- Brilliance CRE: direct én aanrijking (TSB+meropenem)
- Detectieschema gebaseerd op studie Cohen Stuart et al.

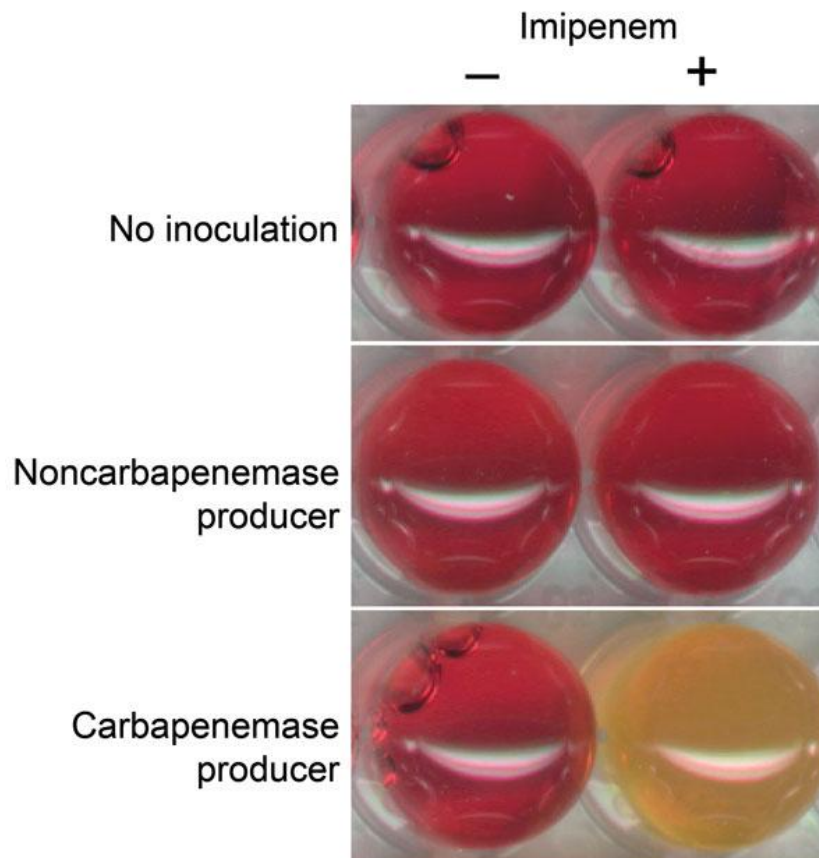


Vraagstelling

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?

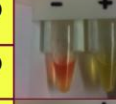
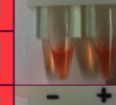
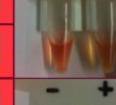
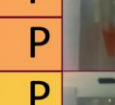
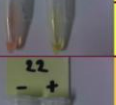
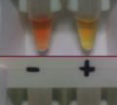
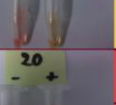
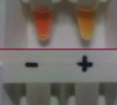
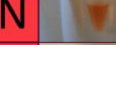
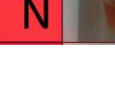
Carba NP test

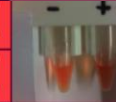
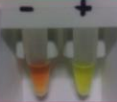
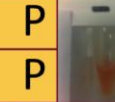
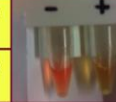
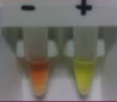
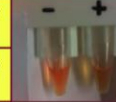
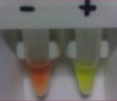
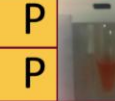
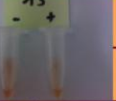
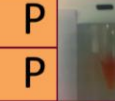
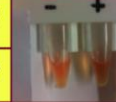
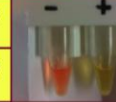
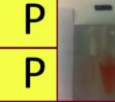
- Ontwikkeld door **Nordmann-Poirel**
- Eenvoudige biochemische test: snel en goedkoop



Carba NP test

- Panel van 20 carbapenemase-producerende stammen
 - Enterobacteriaceae en non-fermenters
 - MIC imipenem en meropenem via Etest
 - 5x test uitvoeren: 4x met 1 week tussen, laatste 1,5 maand tussen
 - 2 aflezers
- Reproduceerbaarheid
 - 3 stammen:
 - Duidelijk positief
 - Zwak positief
 - Negatief
 - 3 dagen, 3x test uitvoeren
 - 2 aflezers
- Gebruik in de routine

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	 P	 P	 P	 P	 P
KPC K. pneumoniae Stam AZ Groeninge	≥32	≥32	 P	 P	 P	 P	 P
KPC K. pneumoniae WIV EQC	≥32	≥32	 P	 P	 P	 P	 P
OXA-48 K. pneumoniae Stam HH Roeselare	0,5	1	 P	 N	 P	 P	 P
OXA-48 K. pneumoniae Stam UZ Gent	0,5	0,75	 P	 N	 P	 P	 P
OXA-48 K. pneumoniae Stam AZ Groeninge	≥32	≥32	 P	 N	 P	 P	 P
OXA-48 K. pneumoniae Stam AZ Groeninge	8	8	 P	 P	 P	 P	 P
OXA-48 K. pneumoniae WIV EQC	2	12	 P	 P	 P	 P	 P
OXA-48 E. coli Stam AZ Groeninge	0,5	1	 P	 P	 P	 P	 P
OXA-58 A. baumannii Stam VUB	≥32	≥32	 N	 N	 N	 N	 N

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
OXA-23 A. baumannii Stam AZ Groeninge	≥32	≥32	 N N	 N N	 N N	 N N	 N N
VIM S. marescens Stam UZ Gent	≥32	≥32	 P P	 P P	 P P	 P P	 P P
VIM P. aeruginosa Stam UZ Gent	≥32	≥32	 N N	 P P	 P P	 N N	 P P
VIM P. aeruginosa Stam ULB	≥32	≥32	 P P	 P P	 P P	 P P	 P P
VIM P. aeruginosa Stam ULB	≥32	≥32	 P P	 P P	 P P	 P P	 P P
VIM P. aeruginosa Stam ULB	≥32	≥32	 P P	 P P	 P P	 P P	 P P
VIM P. aeruginosa Stam ULB	≥32	≥32	 P P	 P P	 P P	 P P	 P P
VIM K. pneumoniae WIV EQC	≥32	≥32	 P P	 P P	 P P	 P P	 P P
NDM K. pneumoniae ATCC-BAA2146	≥32	≥32	 P P	 P P	 P P	 P P	 P P
IMP K. pneumoniae Stam Nordmann-Poirel	≥32	≥32	 P P	 P P	 P P	 P P	 P P

Carba NP test

- Panel van 20 carbapenemase-producerende stammen:
 - *A. baumannii* geen effect
 - Variabiliteit in resultaten:
 - Stabiliteit reagentia?
 - Inoculum?
 - Sensitiviteit 94,5% (85/90)
 - Geen verschil in aflezing
- Reproduceerbaarheid:
 - Zwak positief 2x als negatief beoordeeld: inoculum?
- Gebruik in de routine:
 - 11 rectale wissers
 - 2x groei op Brilliance CRE
 - 2x *E. coli*: meropenem S, temocilline S
 - Carba NP test 2x negatief

Carba NP test

Pro

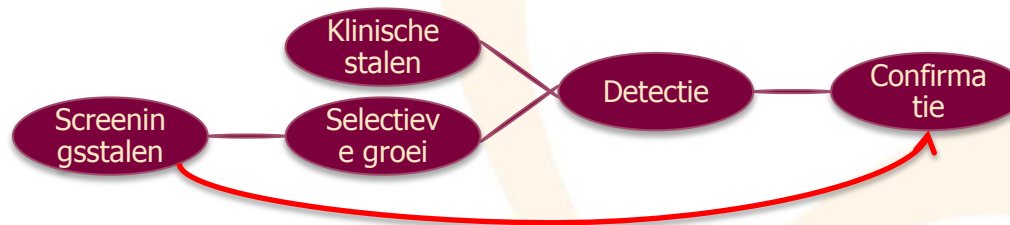
- Snel
- Eenvoudig
- Goedkoop: €2,2/test

Contra

- Instabiele reagentia
- Variabele resultaten (inoculum?)
- CP *A. baumannii* gemist

Rechtstreekse PCR

- Idee:
PCR op rectale wisser, ipv op bacteriële groei



- Enkele voorbeelden literatuur, maar met enkelvoudige PCR
- Hier gebaseerd op poster Slotboom et al.
 - Met commerciële kit: Check-MDR Carba (Check-Points Health BV)
 - Na selectieve aanrijking in TSB + ertapenem/ceftazidime

Conclusion

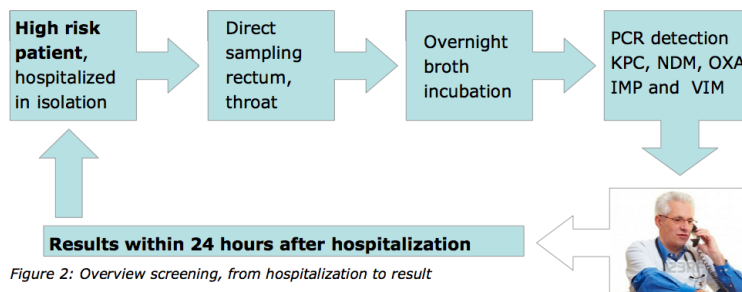


Figure 2: Overview screening, from hospitalization to result

Rechtstreekse PCR

- Uitwerking:
 - 5 types CPE selecteren (KPC, OXA-48, VIM, NDM en IMP)
 - 10-voudige seriële verdunningsreeks per kiem: LOD opsporen
 - Simuleren rectale wissers: verstoring door faecale flora?
 - Selectieve aanrijking: ertapenem, meropenem en zonder AB
 - Eerste op Check-MDR CARBA
 - Vervolgens op in-house PCR

Rechtstreekse PCR

Check-MDR Carba

- Extractie NucliSENS EasyMAG (bioMérieux)
- LightCycler Z480 (Roche)
- Fluorescentie-probes
- KPC, OXA-48, VIM, NDM, IMP
- Geen differentiatie types
- ± €90/test

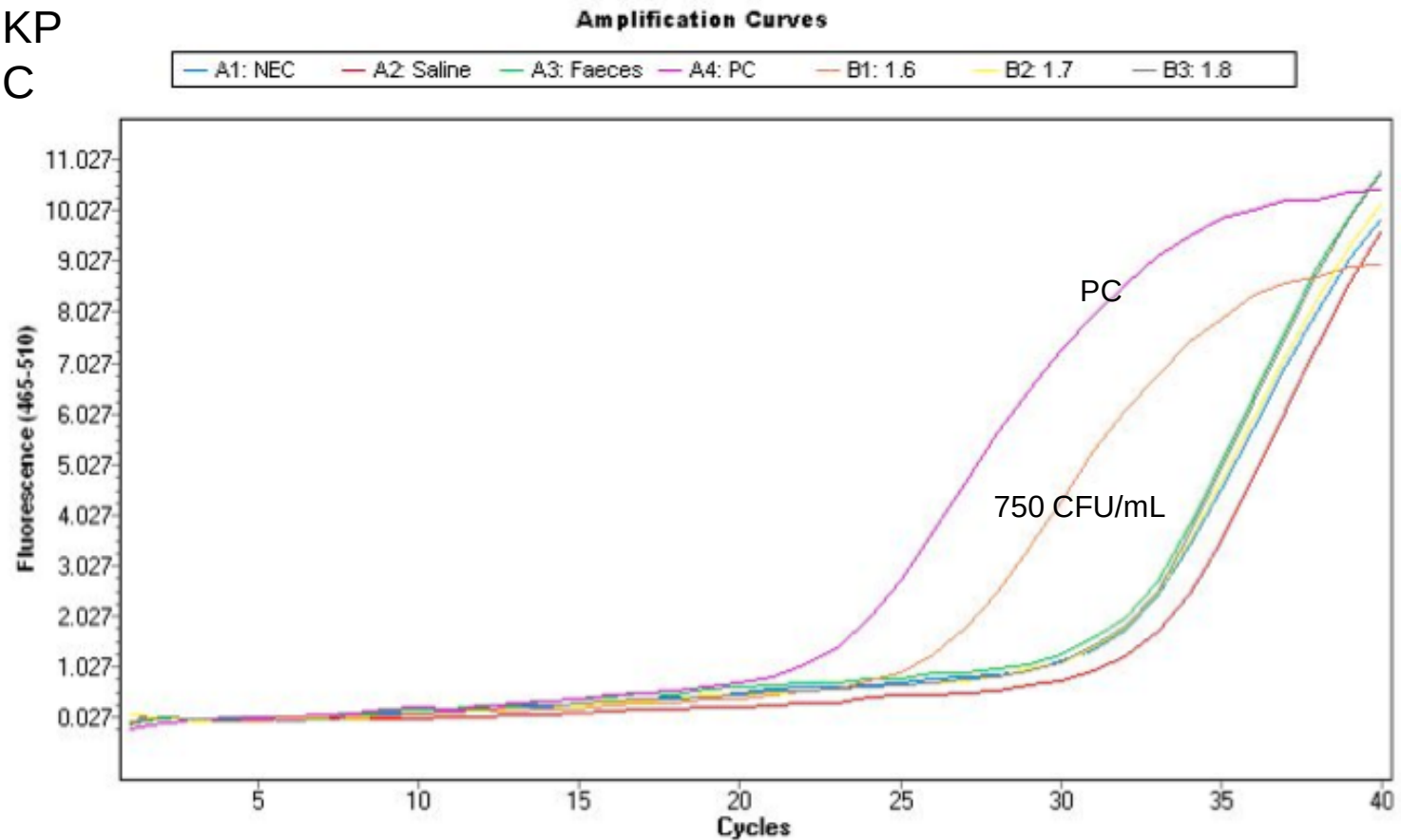
In-house PCR

(Monteiro et al. 2012)

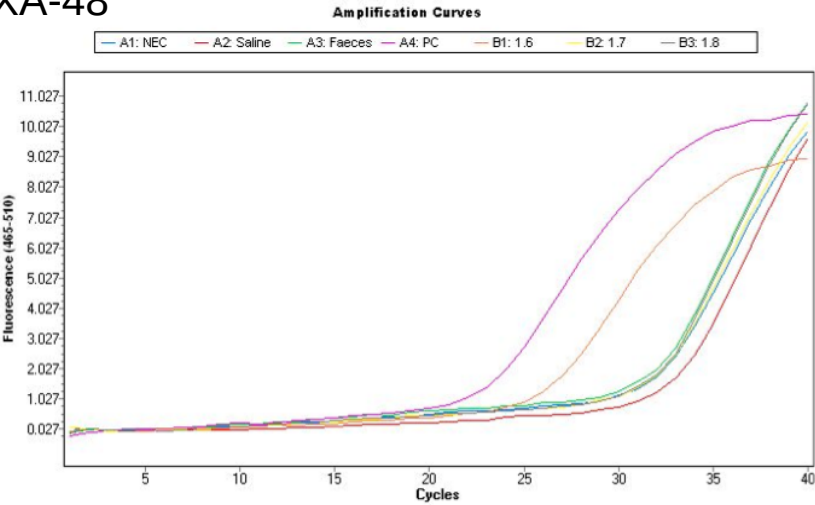
- Extractie NucliSENS EasyMAG (bioMérieux)
- Rotor-Gene Q (Qiagen)
- SYBR Green en smeltcurves
- KPC, OXA-48, VIM, NDM, GES, (IMP)
- Differentiatie verschillende types
- ± 27€/test

Stap 1 – Check-MDR Carba

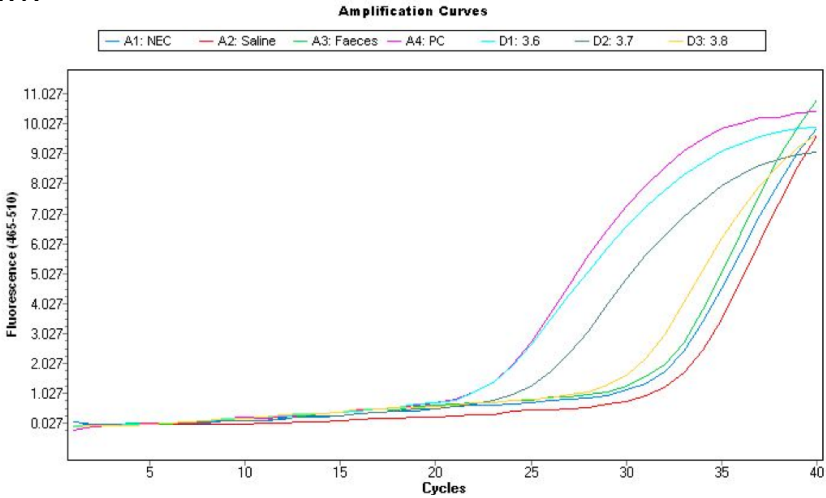
KP
C



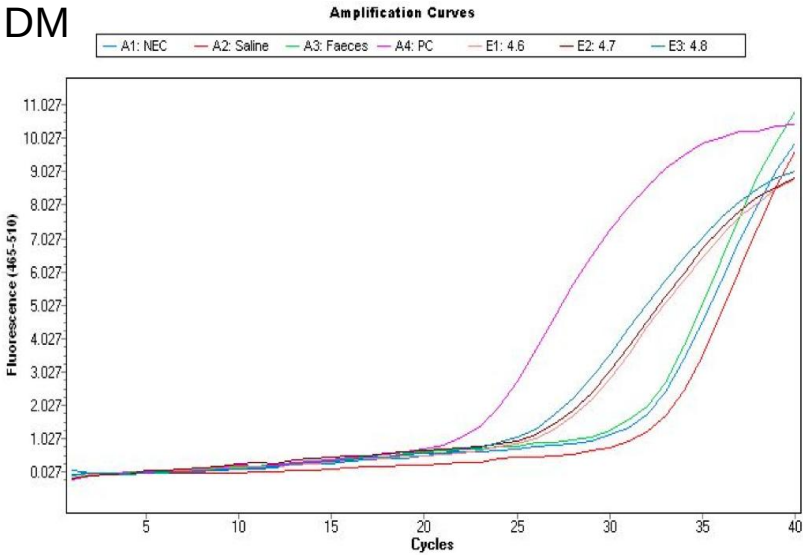
OXA-48



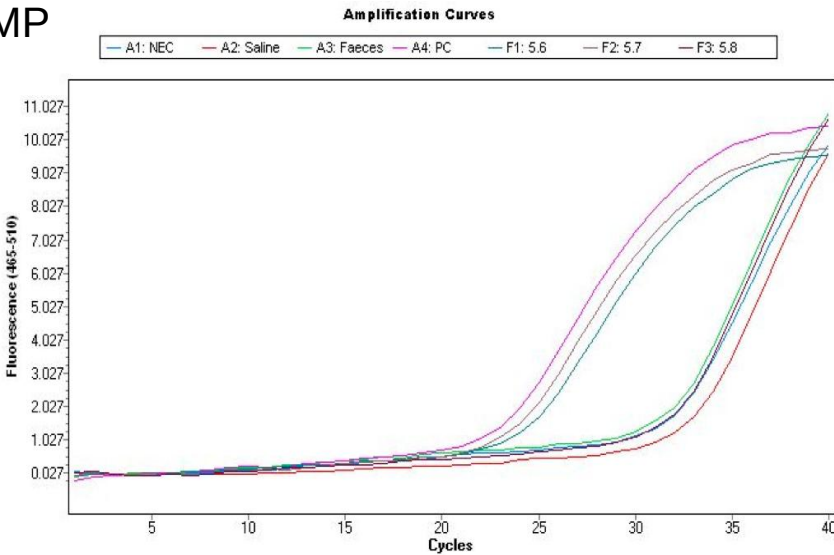
VIM



NDM



IMP



STAM	Concentratie (CFU/mL)	Ct FAM-kanaal	Ct Cys-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	/

Selectieve aanrijking

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	/

Stap 2 – In-House PCR

- Zelfde opzet als Stap 1
 - Aanrijking met ertapenem
 - Kritische concentraties
 - Eerste resultaten:
 - Beduidend hogere LOD: $7,5 \times 10^5$ CFU/mL
 - > lage analytische sensitiviteit
 - IMP niet gedetecteerd
- ➡ IMP toevoegen aan panel
- ➡ LOD optimaliseren (DNA-extractie programma?)

Vraagstelling

naar asymptomatische CPE-dragerschap?

2. Is de Carba NP test een geschikte methode voor CPE-detectie in de dagdagelijkse praktijk?

Voorlopig niet: nog niet 100% betrouwbaar
-> commercialisatie?

3. Geeft het gebruik van een rechtstreekse CPE-PCR op een rectale wisser betrouwbare resultaten?

Check-MDR Carba: ja, mits selectieve aanrijking
In-house PCR: te hoge LOD
-> ruimte voor optimalisatie?

To Do

1. In-house multiplex PCR:
 - carbapenemase-gen bla_{IMP} toevoegen aan panel
 - 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 kunnen verhogen
 - malditof
 - commercialisatie Carba NP test
 - biplaat ChromID carba/OXA-48

