

Bilag 4: Undersøgelse for Carbapenemase Producerende Organismer (CPO)

bærertilstand - en metodevejledning

Udarbejdet af: Mikala Wang, Dennis Schrøder Hansen, Pia Littauer, Helga Schumacher, Anette Hammerum

Anbefalinger:

Ved undersøgelse for Carbapenemase producerende organisme (CPO) bærertilstand tages rektalpodning eller fæces. Desuden podes fra sår og fremmedlegemer og ved brug af KAD undersøges urin. Ved intuberede patienter undersøges luftvejssekret. Ved kendt CPO bærertilstand undersøges prøver fra tidligere lokalisationer, hvis muligt.

For at opnå højeste sensitivitet for CPO anbefales anvendelse af en selektiv opformeringsbouillon indeholdende 0.25 mg/L meropenem natten over, inden udsåning på selektiv chromogen plade eller MacConkey agar med meropenem disk.

Undersøgelse for CPO er i denne anbefaling dyrkningsbaseret. Endelig konfirmation af CPO baserer sig på påvisning af gener der koder for carbapenemaser.

Baggrund:

Carbapenemer (doripenem, ertapenem, imipenem, meropenem) er betalaktam antibiotika, der har et meget bredt spektrum omfattende næsten alle grampositive og gramnegative bakterier, aerobe såvel som anaerobe. Resistens kan skyldes tilstedeværelsen af forskellige carbapenemaser, men kan også skyldes at isolatet producerer en extended spectrum cefalosporinase i kombination med porin ændringer. De hyppigst forekommende carbapenemaser er *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), Oxacillinase betalaktamase (OXA) samt metallobetalaktamaser (MBL) såsom Verona integron-kodet metallobetalaktamase (VIM) og New Delhi metallo-betalaktamase (NDM). Mere sjældne typer er IMP, GIM, SIM og SPM. Alle disse enzymer kodes af gener, der ofte er overførbare, hvorfor de kan spredes fra bakterie til bakterie (horisontal spredning) i tillæg til klonal (vertikal) spredning.

Hos enterobakterier *Enterobacteriaceae* findes oftest KPC, OXA-48, NDM og i nogle tilfælde VIM, mens der hos *Acinetobacter* spp. oftest findes produktion af OXA enzymer samt NDM. Hos *Pseudomonas aeruginosa* ses oftest produktion af VIM og i nogle tilfælde NDM samt i sjældne tilfælde IMP, GIM, SIM og SPM.

Carbapenemase-producerende *Enterobacteriaceae* kan bæres i tarmen uden symptomer. Patienterne kan også være koloniseret med carbapenemase producerende *Acinetobacter* spp og *Pseudomonas aeruginosa*. Der findes ikke dokumenterede metoder til at fjerne en sådan bærertilstand. Antibiotikabehandling kan medvirke til at fastholde bærertilstanden samt føre til opformering og større udskillelse.

Carbapenemase producerende organismer (CPO) er ofte resistente overfor alle betalaktam antibiotika samt de fleste andre klasser af antibiotika. Behandlingsmulighederne ved infektion er således oftest meget begrænsede og mortaliteten er høj. Det er derfor vigtigt, at identificere patienter med CPO og isolere disse patienter således at smittespredning forhindres.

Prøvetagning:

Prøvetagningsudstyr og transportmedier indgår ikke i denne anbefaling.

Ved undersøgelse for CPO bærertilstand tages rektalpodning eller fæces. Desuden podes fra sår og fremmedlegemer og ved KAD-brugere undersøges urin. Ved intuberede patienter undersøges luftvejssekret. Ved kendt CPO bærertilstand undersøges prøver fra tidligere lokalisationer, hvis muligt.

Dyrkningsbaseret detektion.

For at opnå højeste sensitivitet for CPO anbefales opformering i selektiv bouillon natten over efterfulgt af udsåning på selektiv chromogen plade eller MacConkey agar med meropenem disk med aflæsning efter 18-24 timer. Udenlandske studier indikerer at sensitiviteten for ESBL og carbapenemaser øges ved selektiv opformering^{1,10,11}. Danske erfaringer viser at sensitiviteten for ESBL øges ca. 10 % ved anvendelse af selektiv opformeringsbouillon (Dennis Schrøder Hansen, personal communication).

Tabel 1 indeholder en oversigt af hidtidige publicerede tests af selektive chromogene plader¹⁻⁹. Studierne undersøger meget forskellige testpopulationer, hvilket gør det vanskeligt at sammenligne sensitivitet og specificitet af de selektive plader. I en udbrudssituation kan resistensprofilen af udbrudsstammen have betydning for valg af selektiv plade. Med henblik på detektion af alle typer af carbapenemaser inkl. OXA-48-producerende isolater med lave carbapenem MIC-værdier, opnår SUPERCARBA samt chromID® CARBA SMART, BioMérieux (CARBA & OXA-48 splitplade) højest sensitivitet og specificitet i de hidtil publicerede test.

Metodebeskrivelse

1. Opformering i selektiv bouillon natten over ved 35 °C.
 - a. Fx. BHI opformeringsbouillon indeholdende meropenem 0,25 mg/L (Evt. kan 1/4 meropenem (10 µg) disk tilsættes 10 ml BHI bouillon.)
 - b. Kulpodepind overføres til opformeringsbouillon og medinkuberes. Fra væsker (urin, Eswab mm.) kan overføres 100 µl materiale til opformeringsbouillon. Alternativt kan en podepind dyppes i prøvematerialet (fx fæces) og overføres til opformeringsbouillon.
2. Fra opformeringsbouillon udsås 10µl på selektiv kromogen plade, MacConkey plade eller blå plade med 10 µg meropenem disk. Pladerne inkuberes ved 35 °C i 18-24 timer.
3. Ved vækst på kromogene plader eller i meropenem-zone på MacConkey plade gøres species identifikation samt resistensundersøgelse. Der anbefales supplerende undersøgelser ved:
 - a. *Enterobacteriaceae* med meropenem zone < 27 mm ved disk diffusion eller MIC > 0,125 mg/L
 - b. *P. aeruginosa* med kombineret meropenem, imipenem og ceftazidim resistens
 - c. *Acinetobacter* spp. med meropenem resistens

Disse isolater anbefales sendt til SSIs referencelaboratorium til yderligere undersøgelse.

Supplerende undersøgelser ved nedsat carbapenemfølsomhed

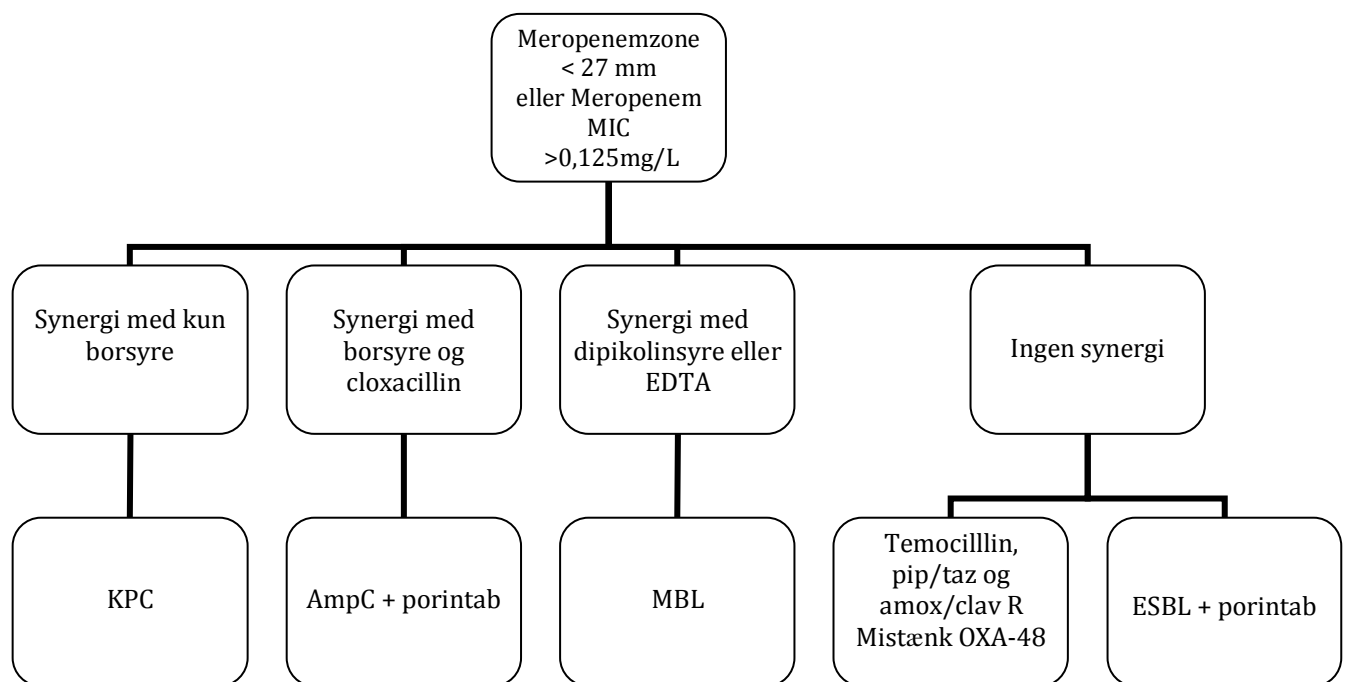
1. Inhibitor-baserede tests

a. *Enterobacteriaceae*.

Fænotypisk påvisning af carbapenemaser gøres ved påvisning af synergi med carbapenem i kombination med en beta-laktamase inhibitor, der hæmmer enten metallo-betalaktamaser (fx EDTA, dipikolinsyre) eller KPC (fx borsyre). For OXA-48 kendes ingen specifikke inhibitorer, men OXA-48 er karakteriseret ved nedsat følsomhed for carbapenemer, følsomhed for cefalosporiner og resistens mod temocillin, amoxicillin-klavulansyre samt piperacillin-tazobaktam (Figur 1).

Figur 1:

Algoritme for påvisning af carbapenemaser hos *Enterobacteriaceae*, modificeret efter NordicAST

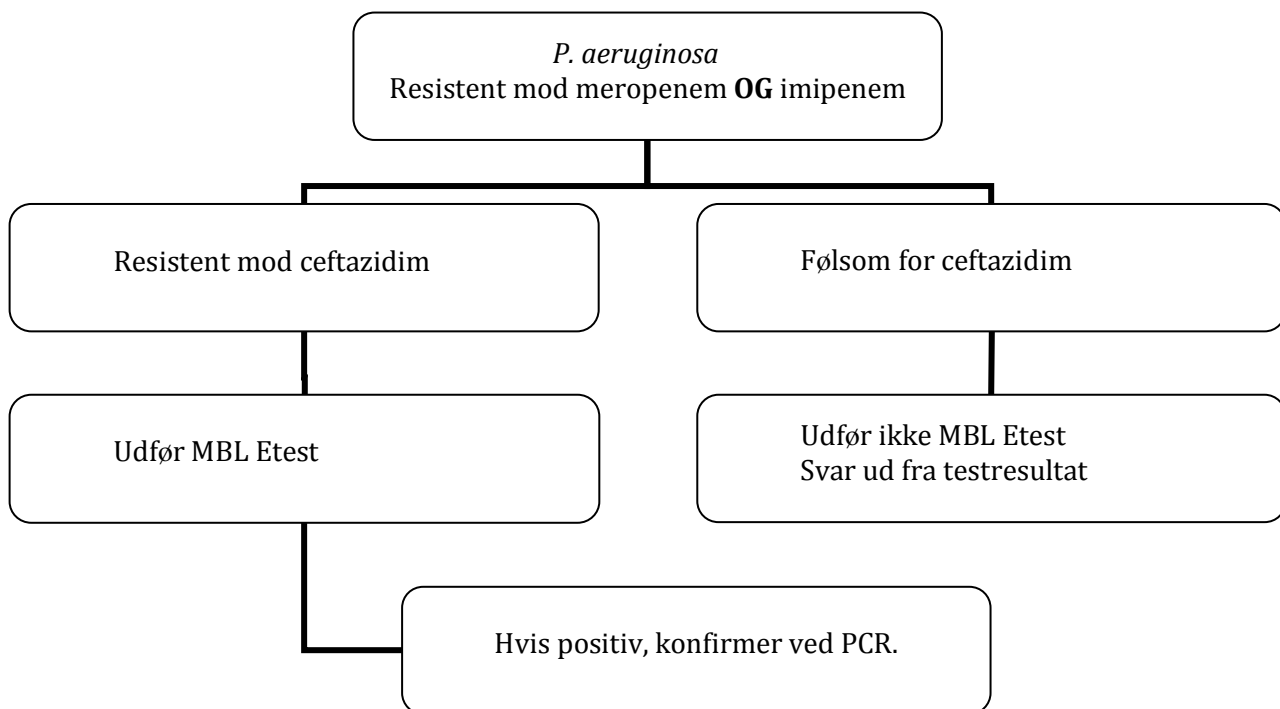


b. *P. aeruginosa* og *Acinetobacter* spp.

Ved mistanke om carbapenemase-produktion hos *Pseudomonas aeruginosa* og *Acinetobacter* spp. anbefales fænotypisk undersøgelse for synergisme med MBL-inhibitorer såsom EDTA. Dog har inhibitor-baserede test som fx MBL Etest lav specificitet¹² og et positivt resultat bør altid konfirmeres ved genotypisk påvisning (Figur 2).

Figur 2:

Algoritme for påvisning af carbapenemaser hos *P. aeruginosa*, modificeret efter NordicAST



2. Modified Hodge Test (MHT) / kløverbladstest

Metoden anvendes til at vurdere teststammens evne til hydrolysere carbapenem ved påvirkning af en følsom indikatorstamme, der derved får en karakteristisk kløverbladslignende inhibitionszone. Metoden er blevet rapporteret at have utilstrækkelig sensitivitet overfor især MBL-producerende stammer og bør ikke anvendes til *Pseudomonas* spp og *Acinetobacter* spp¹². Både AmpC- og ESBL-producerende isolater kan give falsk positive resultater¹³⁻¹⁶.

3. CARBA NP

CARBA NP er en fænotypisk test baseret på in vitro hydrolyse af imipenem påvist ved farveomslag af phenolrødt til gul. Testen udføres på mindre end 2 timer og anvendes til både *Enterobacteriaceae* og *Pseudomonas* spp. CARBA NP kan enten påvise om teststammen er carbapenemase producerende eller ej, eller ved kombination med specifikke inhibitorer detektere hvilken type carbapenemase der er til stede. Hidtidige studier rapporterer om meget høj sensitivitet og specificitet¹⁷⁻²¹.

4. MALDI-TOF

MALDI-TOF giver mulighed for indirekte at vise carbapenemase produktion ved påvisning af ændring i masse efter hydrolyse af carbapenem. Dette gøres ved inkubation af isolatet i en carbapenem-holdig opløsning i 2 til 3 timer. Herefter analyseres supernatanten for nedbrydningsprodukter fra det pågældende carbapenem ved MALDI-TOF. Dette funktionelle assay synes lovende men yderligere studier er nødvendige for at validere metoden²²⁻²⁴.

Genomisk detektion af carbapenemaser

Positive fund ved fænotypisk undersøgelse for carbapenemase produktion bør altid konfirmeres ved molekylærbiologiske assays i form af PCR eller kommercielle microarrays til påvisning af carbapenemase gener.

Tolkning

Carbapenemaser medierer resistens mod stort set alle beta-laktam antibiotika (undtaget cefalosporin-følsomhed hos OXA-48 samt aztreonam-følsomhed hos MBL). Ifølge EUCAST kan også CPO med lav carbapenem MIC besvares ud fra princippet "report-as-tested". Da der endnu er begrænsede kliniske data for denne praksis, anbefales det at tolke antibiogrammet med forsigtighed, hvis der er terapeutiske alternativer. Kliniske studier indikerer at kombinationsbehandling der inkluderer carbapenemer har størst terapeutisk effekt²⁵.

Referencer

1. Girlich D, Bouihat N, Poirel L, Benouda A, Nordmann P. High rate of faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase and OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at a university hospital in Morocco. *Clin Microbiol Infect* 2014;20(4):350-4.
2. Papadimitriou-Olivgeris M, Bartzavali C, Christofidou M, Bereksi N, Hey J, Zambardi G, et al. Performance of chromID(R) CARBA medium for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae detection during rectal screening. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014;33(1):35-40
3. 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.
4. Girlich D, Anglade C, Zambardi G, Nordmann P. Comparative evaluation of a novel chromogenic medium (chromID OXA-48) for detection of OXA-48 producing Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;77(4):296-300.
5. 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.
6. 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 Jun;(6):1841-6.
7. Singh K, Mangold KA, Wyant K, Schora DM, Voss B, Kaul KL, Hayden MK, Chundi V, Peterson LR. 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.
8. Adler A, Navon-Venezia S, Moran-Gilad J, Marcos E, Schwartz D, and 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): 2239–2242.
9. Samra Z, Bahar J, Madar-Shapiro L, Aziz N, Israel S, and Bishara J. Evaluation of CHROMagar KPC for Rapid Detection of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(9): 3110–3111.
10. Diederer B, Chang C, Euser S, Stuart JC. Evaluation of four screening protocols for detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing members of the Enterobacteriaceae. *J Med Microbiol* 2012;61(3):452-3.
11. Murk JL, Heddema ER, Hess DL, Bogaards JA, Vandenbroucke-Grauls CM, Debets-Ossenkopp YJ. Enrichment broth improved detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing bacteria in throat and rectal surveillance cultures of samples from patients in intensive care units. *J Clin Microbiol* 2009;47(6):1885-7.
12. Hansen F, Hammerum AM, Skov R, Haldorsen B, Sundsfjord A, Samuelsen O. Evaluation of the total MBL confirm kit (ROSCO) for detection of metallo- β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014;79(4):486-8.
13. 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): 477–479.
14. Wang P, Chen S, Guo Y, Xiong Z, Hu F, Zhu D, Zhang Y. Occurrence of False Positive Results for the Detection of Carbapenemases in Carbapenemase-Negative *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates. *PLoS One.* 2011;6(10).
15. Carvalhaes CG, Picão RC, Nicoletti AG, Xavier DE, Gales AC. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results *J Antimicrob Chemother.*

16. Pasteran FG, Mendez T, Guerriero L et al. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1631–9.
17. Nordmann P, Poirel L, Dortet L Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(9):1503-7.
18. 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.
19. Vasoo S, Cunningham SA, Kohner PC, Simner PJ, Mandrekar JN, Lolans K, Hayden MK, Patel R. Comparison of a novel, rapid chromogenic biochemical assay, the Carba NP test, with the modified Hodge test for detection of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol.* 2013;51(9):3097-101.
20. Milillo M, Kwak YI, Snesrud E, Waterman PE, Lesho E, McGann P. Rapid and simultaneous detection of blaKPC and blaNDM by use of multiplex real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2013;51(4):1247-9.
21. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Further proofs of concept for the Carba NP test. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(2):1269
22. 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.
23. 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): 3321–3324.
24. Hrabák J, Studentová V, Walková R, Zemlicková H, Jakub V, Chudácková E, Gniadkowski M, Pfeifer Y, Perry JD, Wilkinson K, Bergerová T. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2012;50(7):2441-3.
25. Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(4):682-707.

Tabel 1: Test af selektive medier til detektion af carbapenemaser hos *Enterobacteriaceae*

Reference	Medie	Sensitivitet (%)	Specificitet (%)	Test materiale	Kommentarer
Girlich et al, Clin Microbiol Infect 2014 (ref 1)	ChromID ESBL	90 (uden opformering) 100 (opformering)	29,9	77 rektalpodninger 10 OXA-48	Opformering i BHI med 0,25 mg/L ertapenem
	Brilliance CRE	80 (uden opformering) 100 (opformering)	71,6		
	SUPERCARBA	80 (uden opformering) 100 (opformering)	52,2		
Papadimitriou-Olivgeris et al, Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2014 (ref 2)	ChromID CARBA	96,5	91,2	177 rektalpodninger 88 KPC, 1 VIM	
	MacConkey m. imipenem disk	89,5	31,9		
	TSB m. ertapenem (2 mg/L)	98,8	80,2		
Girlich et al, Diagn Microbiol Infect Dis 2013 (ref 3)	SUPERCARBA	96,5	60,7	142 isolater 43 OXA-48, 20 KPC, 18 VIM, 17 IMP, 16 NDM	
	Brilliance CRE	76,3	57,1		
	CHROMagar KPC	43	67,8		
Girlich et al, Diagn Microbiol Infect Dis 2013 (ref 4)	SUPERCARBA	96,1	52,5	117 isolater 53 OXA-48, 4 OXA-48 varianter, 10 KPC, 10 MBL	
	ChromID OXA-48	70,1	100 (for OXA-48)		
	ChromID CARBA	40,3	67,5		
	ChromID OXA-48 & CARBA	94,8	67,5		

Reference	Medie	Sensitivitet (%)	Specificitet (%)	Test materiale	Kommentarer
Wilkinson et al, J Clin Microbiol 2012 (ref 5)	Brilliance CRE	78	66	200 isolater 88 NDM, 9 IMP, 12 KPC, 15 OXA-48, 6 VIM	
	ChromID CARBA	91	89		
	ChromID ESBL	96	19		
	Colorex KPC	56	77		
	TSB m. ertapenem (2 mg/L)	78	69		
	TSB m. meropenem (2 mg/L)	47	79		
Vrioni et al, J Clin Microbiol 2012 (ref 6)	TSB m. ertapenem (2 mg/L)	89,1	86,4	200 rektalpodninger 63 KPC, 29 VIM	
	BHI m. ertapenem (1 mg/L), ChromID ESBL	92,4	93,3		
	ChromID ESBL	92,4	84,7		
	ChromID CARBA	92,4	96,9		
	MacConkey m. meropenem disk	89,1	85,2		
Singh et al, J Clin Microbiol 2012 (ref 7)	ChromID ESBL	77,3	100	95 rektalpodninger, heraf 66 positive for KPC	
	VACC (vanco, amphi B, cefta, clinda)	77,3	100		
Adler et al, J Clin Microbiol 2011 (ref 8)	CHROMagar KPC	84,9	88,7	139 rektalpodninger, heraf 32 KPC positive	
	MacConkey m. imipenem (1 mg/L)	84,9	94,3		
	MacConkey m. carbapenem discs	84,9	88,7		
Samra et al, J Clin Microbiol 2008 (ref 9)	CHROMagar KPC	100	98,4	120 rektalpodninger, heraf 41 KPC positive	
	MacConkey m. carbapenem discs	92,7	95,9		