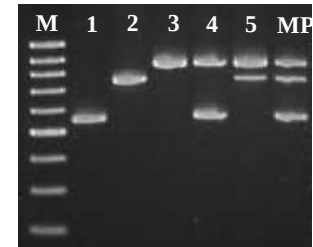


Phänotypische & genotypische Detektion von Beta-Laktamasen





► Welche?

ESBL

AmpC

Carbapenemasen

► Wo?

→ Enterobacteriaceae

→ Enterobacteriaceae

→ Enterobacteriaceae , *A. baumannii*, *P. aeruginosa*

► Warum?

KRINKO-Definition (Bundesgesundheitsblatt 10/2012)

ESBL-Bildung (CTX-Resistenz) + Fluorochinolonresistenz → 3MRGN
(Ausnahme Neonatologie)

Carbapenemase-Bildung → 4MRGN
(Carbapenemase-Meldepflicht derzeit in Hessen und Sachsen)

Hausinterne Surveillance

Ausbruchsauklärung

Epidemiologie Deutschlandweit

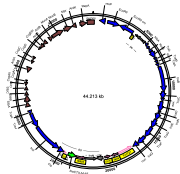
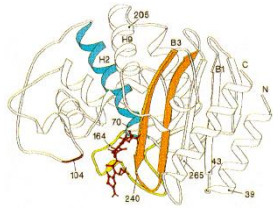
Klinische Relevanz; therapeutische Wertung?

ESBL → Extended-Spectrum β -Lactamases



- ▶ β -Lactam hydrolysierende Enzyme, gebildet von vielen Enterobacteriaceae

▶ Ursprung



TEM-1 → > 190 Enzymvarianten

→ > 90 TEM-ESBL

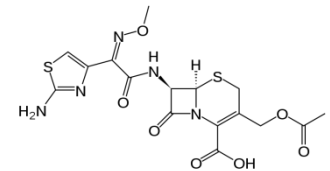
SHV-1 → > 140 Enzymvarianten

→ > 50 SHV-ESBL

CTX-M → > 100 Enzymvarianten

→ > 100 CTX-M-ESBL

Seltenere ESBL: PER, GES, VEB, OXA



▶ Phänotyp:



Resistenz gegen Aminoacylpenicilline (Ampicillin)

1., 3., 4. Gen. Cephalosporine (Cefotaxim, Cefpodoxim, Ceftazidim, Cefepim)

Monobactame (Aztreonam)

Empfindlich gegenüber Cephamycinen (z.B. Cefoxitin) und Carbapenemen (Imipenem, Meropenem)

ESBL-Inhibitoren: Clavulansäure, Sulbactam, Tazobactam

AmpC β -Laktamasen



Chromosomal-kodierte AmpC β -Laktamasen

Enterobacter cloacae

Citrobacter freundii

Hafnia alvei

Morganella morganii

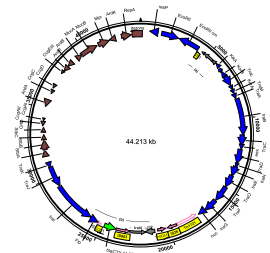
Aeromonas hydrophila

Escherichia coli

Plasmid-kodierte AmpC β -Laktamasen

CMY
ACC
ACT

FOX
LAT
MOX



z.B. in *E. coli*, *K. pneumoniae* und
Proteus mirabilis

high-level AmpC-Expression

► Phänotyp:

Resistenz gegen Aminoacylpenicilline, 1./3. Gen. Cephalosporine
und Cephamicine (z.B. Cefoxitin, Cefotetan)

Empfindlich gegenüber Carbapenemen

nicht hemmbar durch ESBL-Inhibitoren (Clavulansäure)

AmpC-Inhibitor: Cloxacillin



► Ursprung:

KPC → „*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase“ überwiegend in *K. pneumoniae*
Import aus „Endemiegebieten“ (z.B. Griechenland, Israel)

VIM → in *P. aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *E. coli*, *E. cloacae*
Import aus Mittelmeerregion (Italien, Spanien)

NDM-1 → in Enterobacteriaceae und *A. baumannii* aus Indien, Nordafrika

} Metallo-Beta-
Laktamasen
(MBL)

OXA-48 → in Enterobacteriaceae (Import überwiegend aus Türkei, Nordafrika)

OXA-58/23/24 → in *Acinetobacter baumannii*, überwiegend aus Mittelmeerregion

In Deutschland Ausbrüche nach Import aber auch z.T. regionale Verbreitung möglich

- **Phänotyp:** Resistenz gegen Aminoacylpenicilline, 1.-4. Gen. Cephalosporine und Carbapeneme
- Empfindlich gegenüber Aztreonam → Metallo-Beta-Laktamasen (MBL)
nicht hemmbar durch ESBL-Inhibitoren (Clavulansäure)
- Carbapenemase-Inhibitoren: EDTA (MBL); Borsäure (KPC)**

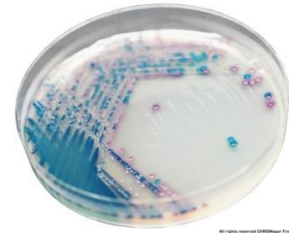
► ESBL/AmpC

Agar MC Conkey + Cefotaxim (1µg/ml): erfasst alle ESBL/AmpC-bildende Enterobacteriaceae



Chromogene Selektivmedien für ESBL-bildende Bakterien:
Enthalten Cefotaxim oder Cefpodoxim (+ Cloxacillin als AmpC-Inhibitor)

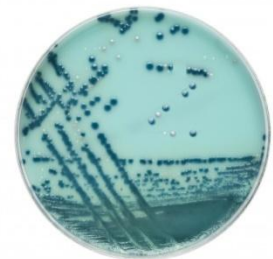
Bsp. Brilliance ESBL Agar (Oxoid); ChromID ESBL (Biomerieux),
Chromagar ESBL (MAST)



► Carbapenemasen

Chromogene Selektivmedien für Carbapenemase-bildende Bakterien:
Enthalten Meropenem oder Ertapenem

Bsp. Brilliance CRE Agar (Oxoid)
ChromID Carba (Biomerieux)
Chromagar KPC (MAST)
SUPERCARBA medium (Nordmann P., et al., JCM, 2012)



Automatensystemhinweis:

- ▶ **„ESBL-positiv“** → Cefotaxim-/Ceftazidim-resistent und Hemmbarkeit durch ESBL-Inhibitor (Clavulansäure)
- ▶ **„AmpC-positiv“** → „High-level-Cephalosporinase“ oder „Cephamycinase“
Cefotaxim-/Ceftazidim-/Cefoxitin-resistent und keine Hemmbarkeit durch ESBL-Inhibitor (Clavulansäure)



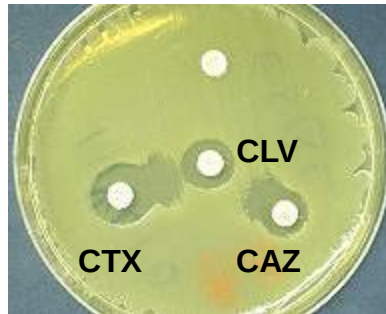
Manuelle ESBL/AmpC Bestätigungstests (Agardiffusion)

- ▶ **Etest ESBL** → Cefotaxim/Ceftazidim/Cefepim + Clavulansäure
- ▶ **Etest AmpC** → Cefotetan/Cefoxitin+ Cloxacillin
- ▶ **Disk-Tests ESBL/AMPC** → z.B. Annäherungstests, Kombinations-Disk-tests

Phänotypische Detektion: ESBL



Disk-Tests



CTX = Cefotaxim

CLV = Clavulansäure

CAZ = Ceftazidim

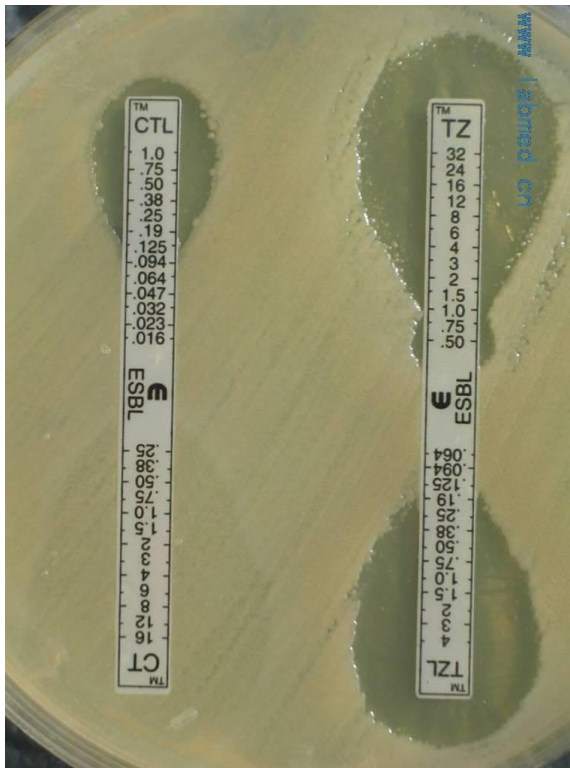
CT = Cefotaxim

CTL = Cefotaxim + Clavulansäure

TZ = Ceftazidim

TZL = Ceftazidim + Clavulansäure

Etest



E. coli mit ESBL-Typ CTX-M-1



K. pneumoniae mit ESBL-Typ CTX-M-15

Kombinationstest: ESBL & AmpC



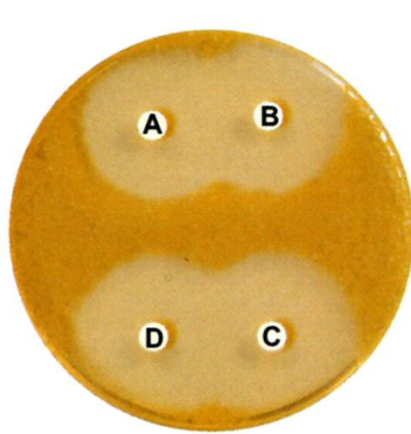
D68C **ESBL/AmpC** ID (Mast)

A Cefpodoxim

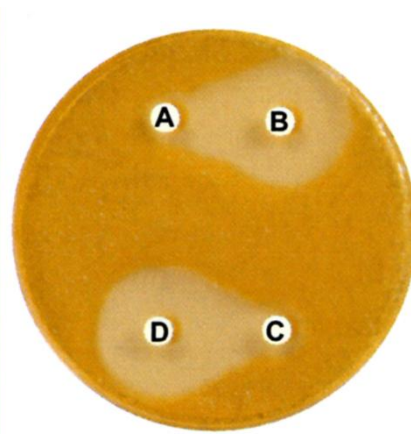
B Cefpodoxim + ESBL-Inhibitor

C Cefpodoxim + AmpC-Inhibitor

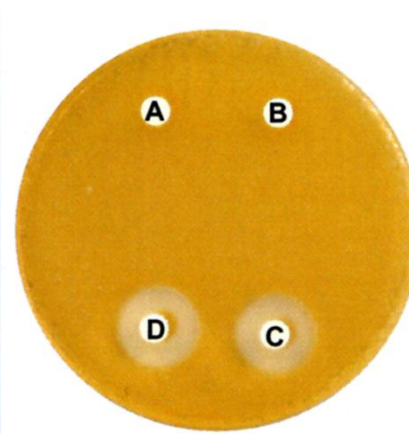
D Cefpodoxim + ESBL- und AmpC-Inhibitor



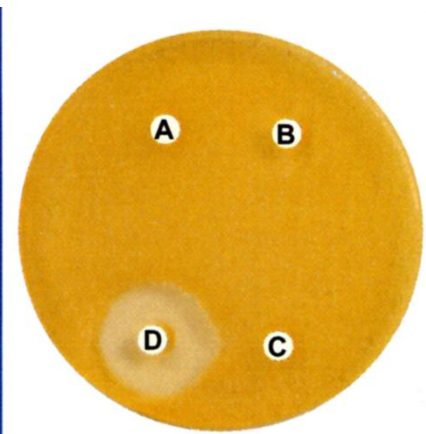
ESBL-negativ
AmpC-negativ



ESBL-positiv



AmpC-positiv



ESBL-positiv
AmpC-positiv

Aber: Wird nur sehr wenig β -Laktamase oder werden verschiedene andere β -Laktamasen (z.B. K1(OXY) β -Laktamase *K. oxytoca*) gebildet, kann es zu falsch negativen/positiven bzw. nicht eindeutigen Ergebnissen kommen

This biochemical test (**<1h**) was based on the *in vitro* detection of a cephalosporin (cefotaxime) hydrolysis that is inhibited by tazobactam addition. The ESBL activity was evidenced by a color change (red to yellow) of a pH indicator (red phenol) due to carboxyl-acid formation resulting from cefotaxime hydrolysis that was reversed by addition of tazobactam (positive test).



Automatensystemhinweis:

- ▶ **Resistent o. intermediär-resistent gegen Imipenem/Meropenem/Ertapenem:**
→ „Carbapenemasebildung (KPC oder MBL) oder Permeabilitätsverlust + ESBL/High-Level-Cephalosporinase“



Manuelle Carbapenemase Bestätigungstests (Agardiffusion)

- ▶ **Etest MBL** → Imipenem + Imipenem/EDTA
- ▶ **Disk-Tests** → z.B. Kombinations-Disk-Tests mit Carbapenemase Inhibitoren
- ▶ **Allg. Carbapenemase-Bildung**
→ mod. Hodge Test,
→ Imipenem/Meropenem-Hydrolyse (Carba NP, MALDI)

Carbapenemresistenz durch Porinverlust + ESBL/AmpC



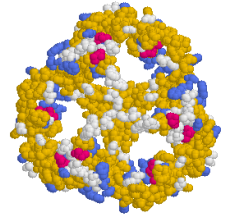
► Ursache:

Mutationen in Poringen führen zum Porinverlust (Permeabilitätsverlust)

Porine = Außenmembranproteine (OMP, outer membrane proteins)

Kommt ESBL/AmpC-Bildung hinzu → Carbapenemresistenz

Häufig bei *Enterobacter aeromonas*, *K. pneumoniae*, *E. coli*



► Phänotyp:

AMP	PIP/TAZ	CTX	IPM	MPM	ETP
R	R	R	0,25 - > 32	0,5 - > 32	R

Ertapenemresistenz

Erhöhte MHK oder Resistenz für Meropenem + Imipenem

MHK Meropenem $\geq$ MHK Imipenem

AMP, Ampicillin; PIP/TAZ, Piperacillin/Tazobactam; CTX, Cefotaxim; ETP, Ertapenem; MPM, Meropenem; IPM, Imipenem

► Mod. Hodge-Test

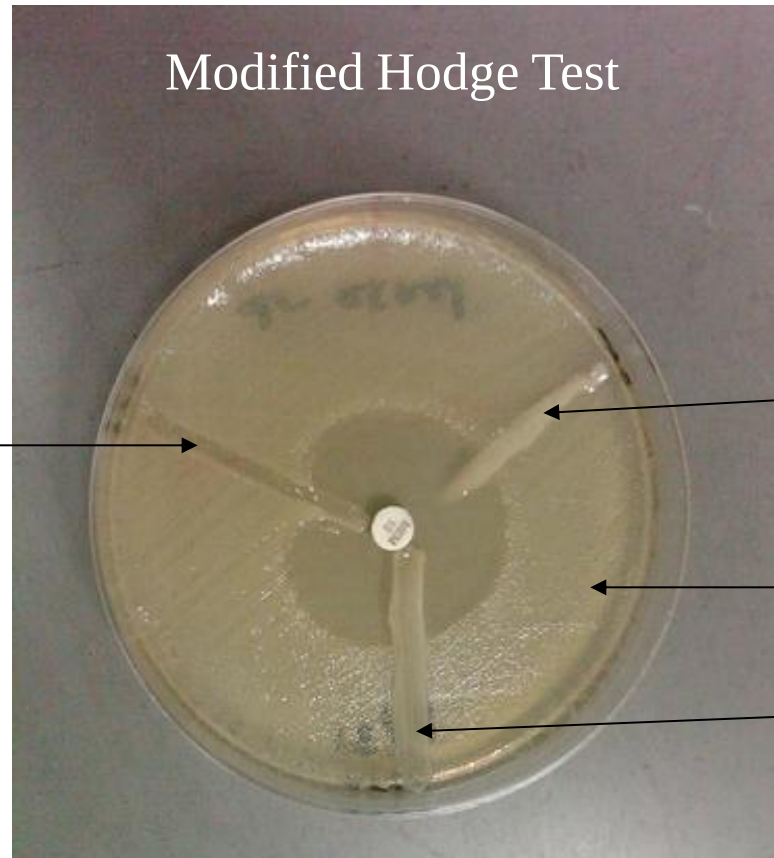
Disks:

Imipenem

Meropenem

Ertapenem

K. pneumoniae
Carbapenemase
Bildner



Modified Hodge Test

K. pneumoniae
Carbapenem-sensitiv

E. coli -Referenzstamm
Carbapenem-sensitiv

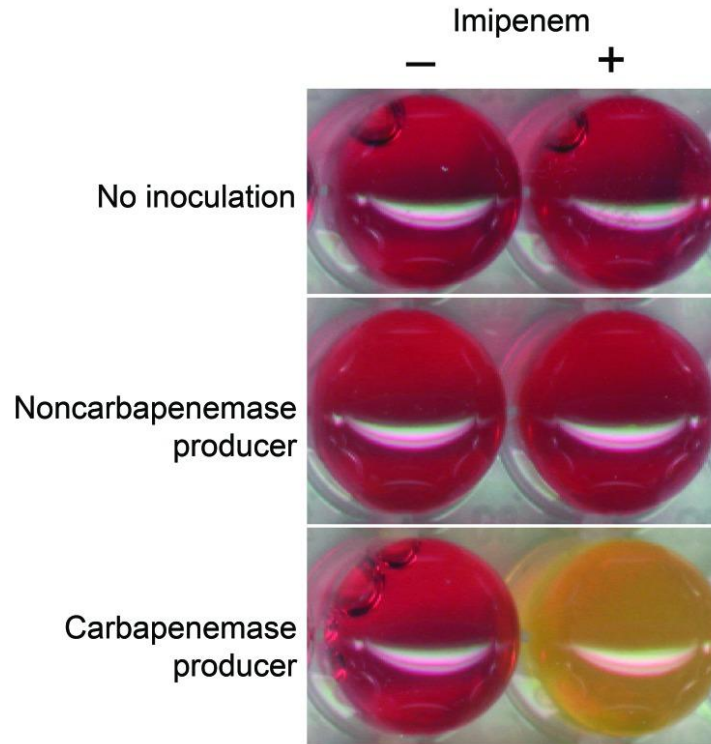
K. pneumoniae
Carbapenem-resistent aber
kein Carbapenemase-Bildner

- allg. Nachweis von Carbapenemase-Bildung (KPC, MBL, **insbesondere OXA-48**)
- für epidemiologische Zwecke (Ausbruchsmanagement) geeignet
- falsch positive Ergebnisse (z.B. bei AmpC-Bildung) möglich

Girlich, D., Poirel, L., Nordmann, P., 2012. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in Enterobacteriaceae. J. Clin. Microbiol. 50, 477-479.

► Carba NP Test

[Nordmann P, Poirel L, Dortet L](#). Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. [Emerg Infect Dis](#). 2012 ; 18:1503-7.



To rapidly identify carbapenemase producers in Enterobacteriaceae, we developed the Carba NP test. The test uses isolated bacterial colonies and is based on in vitro **hydrolysis of a carbapenem, imipenem**. It was 100% sensitive and specific compared with molecular-based techniques. This rapid (<2 hours), inexpensive technique may be implemented in any laboratory.

► Imipenem/Meropenem Hydrolyse + Nachweis mit UV-Spec. oder MALDI-TOF

Bernabeu S., et al., DMID 2012; Hrabák et al., JCM, 2012;
Burckhardt I., et al., JCM, 2011

Phänotypische Detektion: Carbapenemase OXA-48



▶ Phänotyp: OXA-48	AMP	PIP/TAZ	CTX	CAZ	IPM	MPM	ETP
	R	R	S/I	S	0,5 - > 32	0,25 - > 32	R

▶ Phänotyp: OXA-48+ESBL	AMP	PIP/TAZ	CTX	CAZ	IPM	MPM	ETP
	R	R	R	I/R	0,5 - > 32	0,25 - > 32	R

Häufig in *K. pneumoniae* und *E. coli*

Ertapenemresistenz

Erhöhte MHK oder Resistenz für Meropenem + Imipenem

MHK Meropenem <= MHK Imipenem

PIP/TAZ-resistent

Sensibel gegenüber Ceftazidim/Cefotaxim (wenn kein ESBL vorhanden!)

Temocillinresistenz!

phänotyp. Nachweismöglichkeit → mod. Hodge Test, Carba-NP-Test etc.

AMP, Ampicillin; PIP/TAZ, Piperacillin/Tazobactam; CTX, Cefotaxim; CAZ, ceftazidim; ETP, Ertapenem; MPM, Meropenem; IPM, Imipenem

Phänotypische Detektion: Carbapenemase KPC



► Phänotyp:
KPC

AMP	PIP/TAZ	CTX	IPM	MPM	ETP
R	R	R	0,5 - > 32	0,25 - > 32	R

Häufig in *K. pneumoniae* (Verbreitung der klonalen Linie ST258 *K.p.* mit KPC-2/3)

Ertapenemresistenz

Erhöhte MHK oder Resistenz für Meropenem + Imipenem

MHK Meropenem $\leq$ MHK Imipenem

PIP/TAZ-resistent

Nachweismöglichkeit „indirekt“ → mod. Hodge Test, Carba-NP-Test ect.

Disk-Tests → mit Borsäure/Borsäurederivaten als KPC-Inhibitor

AMP, Ampicillin; PIP/TAZ, Piperacillin/Tazobactam; CTX, Cefotaxim; ETP, Ertapenem; MPM, Meropenem; IPM, Imipenem

Phänotypische Detektion: Metallo- β -Laktamasen (MBL)



► Phänotyp:

MBL

AMP	PIP/TAZ	CTX	ATM	IPM	MPM	ETP
R	R	R	S	0,5 - > 32	0,25 - > 32	R

MBL-Varianten: NDM, VIM häufig; IMP, GIM, GES seltener

Häufig in *K. pneumoniae*, *E. coli* sowie *P. aeruginosa*, *A. baumannii*

Ertapenemresistenz

Erhöhte MHK oder Resistenz für Meropenem + Imipenem

MHK Meropenem $\leq$ MHK Imipenem

PIP/TAZ-resistent

Sensibel gegenüber Aztreonam (nur wenn keine ESBL vorhanden!)

Nachweismöglichkeit „indirekt“ $\rightarrow$ mod. Hodge Test, Carba-NP-Test etc.

Disk-Tests $\rightarrow$ mit EDTA/EDTA-Derivaten als MBL-Inhibitor

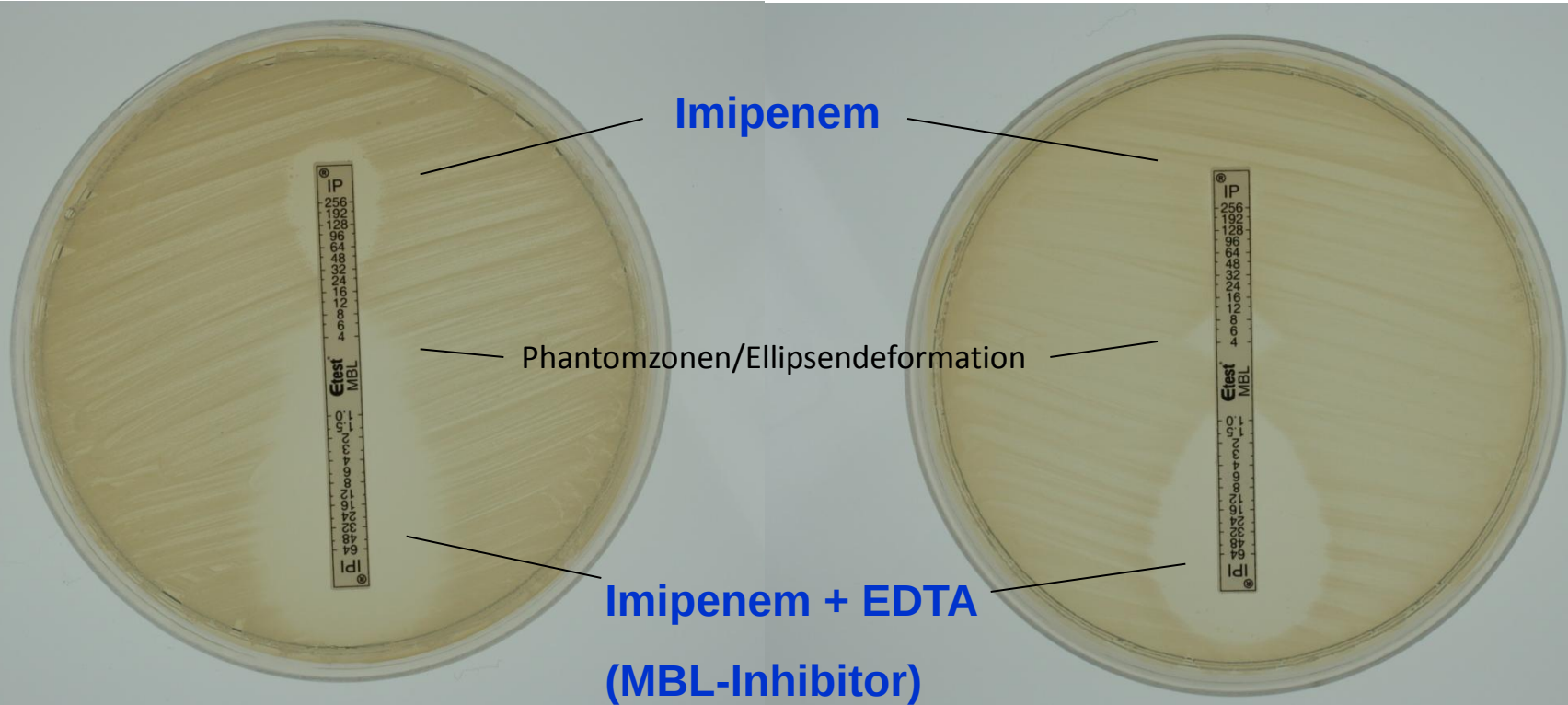
AMP, Ampicillin; PIP/TAZ, Piperacillin/Tazobactam; CTX, Cefotaxim; ATM, Aztreonam; ETP, Ertapenem; MPM, Meropenem; IPM, Imipenem

Beispiel: MBL Etest



K. pneumoniae

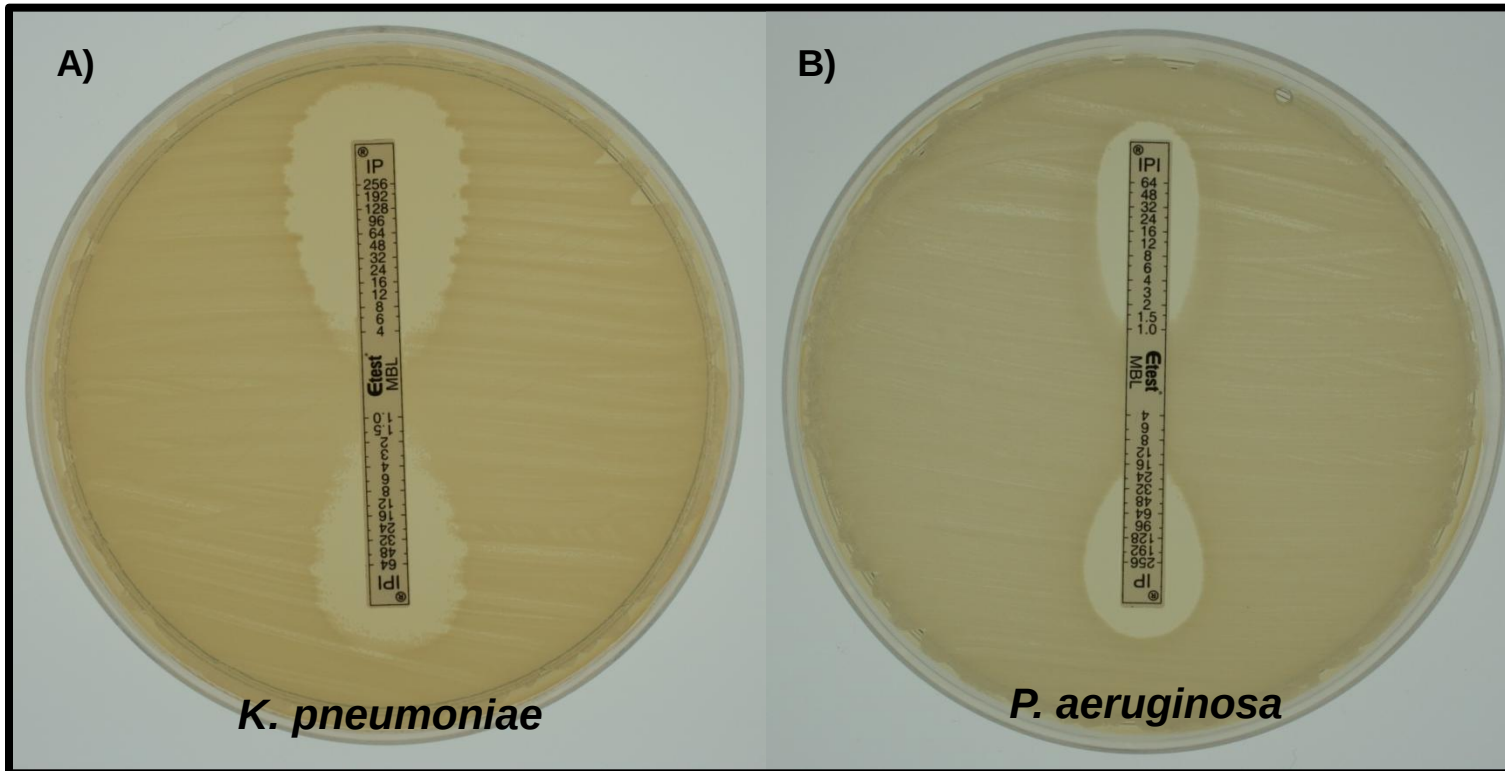
E. coli



Metallo- β -Lactamase-positiv

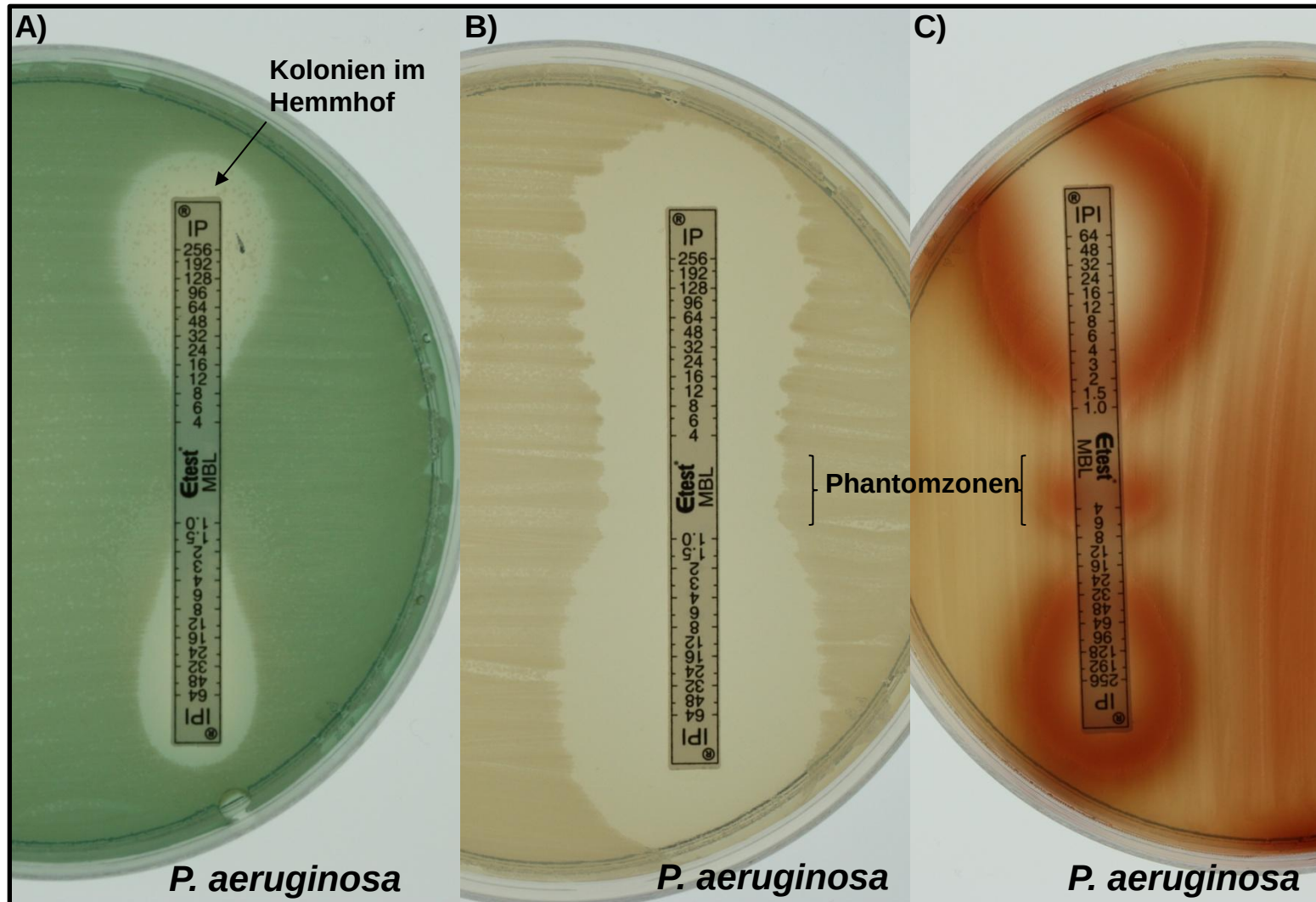
Beispiel: MBL Etest

Metallo- β -Lactamase-negativ



MBL-Etest. Keines der beiden Isolate *K. pneumoniae* und *P. aeruginosa* bildet eine Carbapenemase der Klasse D (Metallo- β -Lactamase). A) Das *K. pneumoniae* Isolat zeigt einen erhöhten MHK-Wert für Imipenem, der nicht durch EDTA beeinflusst wird. B) Das *P. aeruginosa* Isolat ist Imipenem-resistent. In Kombination mit EDTA ist eine Reduktion des MHK-Wertes sichtbar; dies ist allerdings auf die allgemeine wachstumshemmende Wirkung des EDTA zurückzuführen (dieser schmale Hemmhof bei *P. aeruginosa* ist als falsch-positiv zu werten). Erst Hemmhofdeformationen und Phantomzonen zeigen eine mögliche MBL-Bildung bei *P. aeruginosa* deutlich an. IP, Imipenem; IPI, Imipenem+EDTA

Etest: Metallo- β -Laktamasen (MBL)



MBL-Etest. Alle drei *P. aeruginosa* Isolate bilden eine Carbapenemase der Klasse D (Metallo- β -Lactamase). A) Es sind Kolonien im Hemmhof des Imipenem-Teststreifens zu sehen, die auf eine resistente Subpopulation hindeuten – das Isolat ist MBL-verdächtig. B) Der Test zeigt große Hemmhöfe aber eine Phantomzone in der Mitte des Teststreifens – das Isolat ist MBL-verdächtig. C) Der Test zeigt eine deutliche Phantomzone in der Mitte des Teststreifens – das Isolat bildet MBL. Die Phänomene A-C werden durch unterschiedlich große Produktionsmengen der VIM-2 Metallo- β -Lactamase in *P. aeruginosa* verursacht.

IP, Imipenem; IPI, Imipenem+EDTA

Kombinationstests: Carbapenemasen



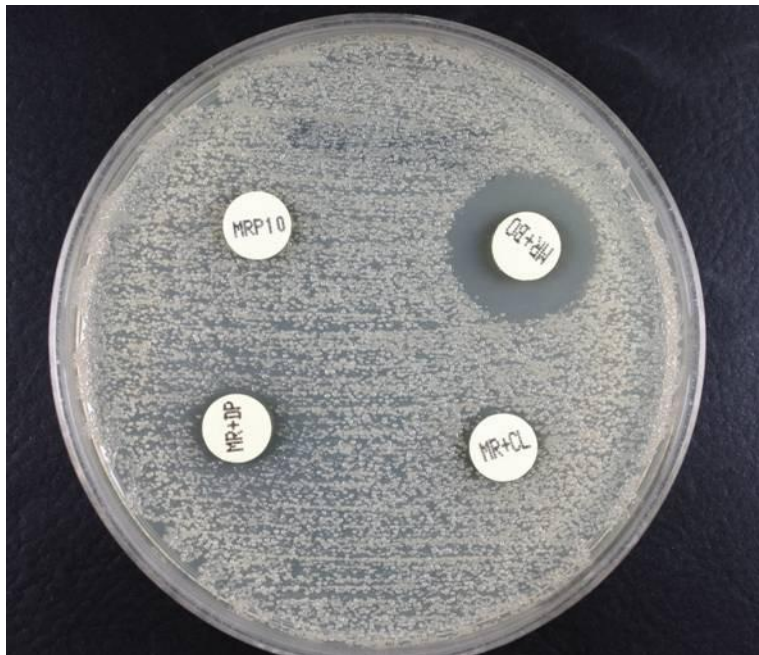
„KPC/MBL/AmpC ID-Test“ (Rosco Diagn.) oder „Carba-Disk Test (MAST)

MRP Meropenem

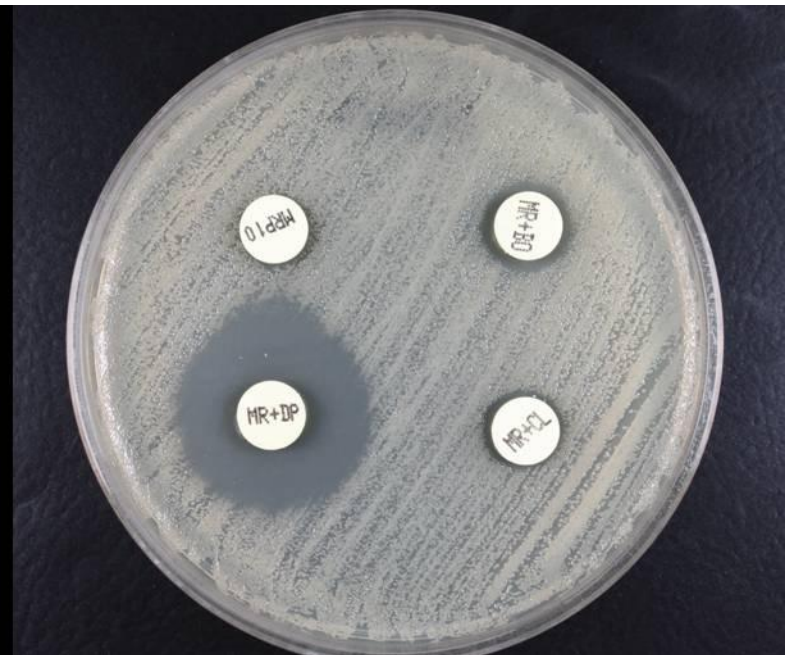
MR+DP Meropenem + MBL-Inhibitor

MR+BO Meropenem + KPC-Inhibitor

MR+CL Meropenem + AmpC-Inhibitor



KPC-positiv



MBL-positiv (z.B. VIM, NDM)

Borsäurederivat = KPC-Inhibitor

EDTA-Derivat = MBL-Inhibitor

Genotypische Detektion von β -Laktamasen



► Warum?

Bsp. : Produktion von β -Lactamase in geringer Menge
→ Falsch-negative phänotypische Testergebnisse

Bsp. : Produktion mehrerer unterschiedlicher β -Lactamasen
→ Unspezifische/nicht auswertbare phänotypische Tests

Vorteil für lokale Surveillance und Ausbruchsmanagement

Bsp.: Nach Ausbruchsgeschehen wird ein weiteres Isolat mit identischen Phänotyp gefunden

► Phänotyp:
Ausbruchsisolate

AMP	CTX	ATM	ETP	CIP	SXT
R	R	R	S	R	R

CTX-M-ESBL

► Phänotyp: neues Isolat

AMP	CTX	ATM	ETP	CIP	SXT
R	R	R	S	R	R

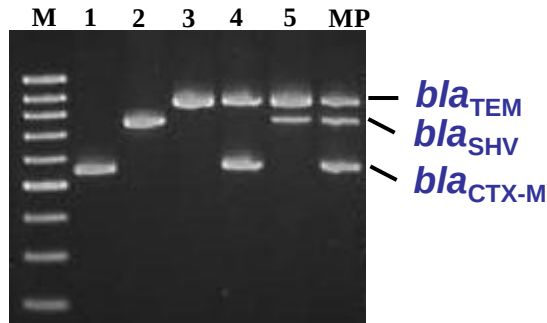
TEM-ESBL

Die genotypische Detektion ermöglicht die sofortige Unterscheidung von Ausbruchsisolaten und Nichtausbruchsisolaten

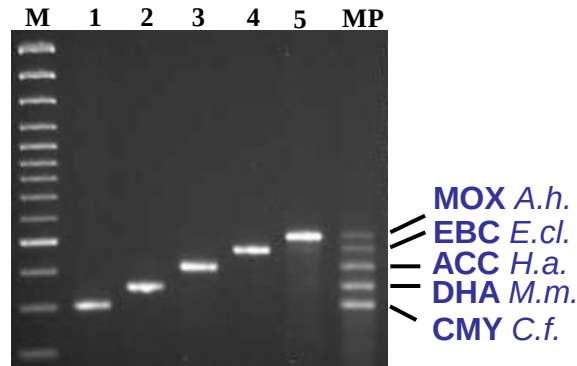
Genotypische Detektion von ESBL/AmpC

► PCR and Sequenzierung der ESBL- und AmpC-Gene

Bsp. ESBL-Multiplex-PCR



Bsp.: AmpC-Multiplex-PCR



Klinische Diagnostik:

- **PCR und Hybridisierung** mit spezifischen Oligonucleotid-Sonden und ELISA Detektion → Identifizierung von TEM-ESBL/non-ESBL, **hyplex® ESBL ID** SHV-ESBL/non-ESBL und CTX-M
- **PCR und Hybridisierung** mit spezifischen Oligonucleotid-Sonden und Microarray Detektion → Identifikation von TEM-ESBL/non-ESBL, SHV-ESBL/non-ESBL, CTX-M-Gruppen und AmpC β -Laktamasen

▶ RT-PCR für Carbapenemase-Gene Monteiro J., et al., JAC, 2012

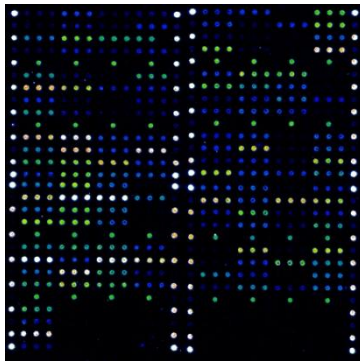
▶ PCR+Hybridisierung (Microarray)



▶ PCR+Hybridisierung (ELISA)

hyplex® ESBL ID

Cuzon G, et al., JAC, 2012; Kaase M., et al., JCM, 2012



Nachweis von Carbapenemase-Genen:

KPC/NDM/OXA-48

z.T. bis hin zum genauen Carbapenemase-Typ
(z.B. KPC-3) [Peter H. et al., JCM, 2012](#)



RKI Arbeitsgruppe Enterobacteriaceae and Nonfermenter

Christoph Eller, Sibylle Müller-Bertling, Christine Günther

RKI: Nationales Referenzzentrum Staphylokokken (MRSA) / Enterokokken

Guido Werner, Ullrich Nübel, Franziska Layer, Birgit Strommenger

Robert Koch Institut Berlin

Prof Dr. Martin Mielke

Dr. Tim Eckmanns



Bundesministerium
für Gesundheit

pfeifery@rki.de

