

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und  
Hygiene

der Universität zu Köln

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Krönke

Entwicklung eines universellen Testverfahrens zur zeitnahen  
Identifizierung von Carbapenemase-produzierenden Enterobakterien aus  
Blutkulturen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Maria Meier  
aus Berlin

promoviert am 27. Januar 2022

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2022

Dekan:                   Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink  
1. Gutachter            Universitätsprofessor Dr. med. A. Hamprecht  
2. Gutachterin:        Privatdozentin Dr. med. N. Jazmati  
3. Gutachter:           Professor Dr. med. Th. Miethke

#### Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.<sup>1</sup>

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgender Person erhalten:

Prof. Dr. med. Axel Hamprecht

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

#### Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 24/2011) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 26.02.2021

Unterschrift: .....

<sup>1</sup>Bei kumulativen Promotionen stellt nur die eigenständig verfasste Einleitung und Diskussion die Dissertationsschrift im Sinne der Erklärung gemäß dieses Anhangs dar.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Prof. Dr. med. Axel Hamprecht von mir selbst ausgeführt worden.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind von mir mit Unterstützung von den medizinisch technischen Assistenten Frau Yvonne Stelzer und Herr Ahmad Saleh durchgeführt worden.

## **Danksagungen**

In erster Linie möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Axel Hamprecht für die Überlassung des hochinteressanten Themas und die ausgezeichnete Betreuung dieser Arbeit danken. Er hat mich zu jeder erdenklichen Zeit absolut zuverlässig und professionell mit zahlreichen Anregungen und kompetentem Rat unterstützt.

Ein weiterer großer Dank gebührt M. Sc. Yvonne Stelzer für die interessanten Gespräche, ihre Hilfsbereitschaft, die Einarbeitung in die Methodik und die Unterstützung der Versuche mit Rat und Tat. An dieser Stelle möchte ich außerdem meinem Mitdoktoranden Tsvetan Tsvetkov für die Loyalität, Hilfsbereitschaft und erheiternden Diskussionen herzlich danken.

Ein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern des Pilzlabors, die mir oft durch gute Gespräche die Inkubationszeiten verkürzt haben.

Meiner Familie, meinem Patenonkel Dr. Tobias Ederhof, meinem Onkel Dr. Roland Meier, meinen Mitbewohnern und meinen Freunden bin ich dankbar für alle unterstützenden und motivierenden Worte und Taten und dafür, dass sie immer für mich da waren. Meiner Mutter danke ich für die Unterstützung während des gesamten Studiums.

Ich möchte Paolo Berding für seine Geduld, sein Verständnis, seine Unterstützung, seine Ermutigungen und seinen Beistand ganz besonders danken.

Ich bedanke mich von ganzem Herzen bei meinem Partner Felix Caspar Lange für seinen Beistand, seine moralische Unterstützung, sein Vertrauen und seine Liebe.

Vielen Dank.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>6</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>7</b>
1.1 Enterobakterien.....	8
1.2 Resistenzlage .....	9
1.3 Einteilung der Carbapenemasen nach Ambler .....	11
1.4 Geografische Verteilung der Carbapenemasen .....	14
1.4.1 Carbapenemase-produzierende Enterobakterien und Sepsis .....	17
1.4.2 Die häufigsten Carbapenemasen in Deutschland.....	18
1.5 Funktionsweise von Carbapenemasen .....	19
1.6 Detektion von Carbapenemasen aus Blutkulturen.....	20
1.6.1 PCR.....	20
1.6.2 MALDI-TOF-Massenspektrometrie .....	21
1.6.3 Immunchromatographische Tests .....	21
1.6.4 Colorimetrische Tests .....	22
1.6.5 Carbapenem Inactivation Method.....	22
1.7 Zielsetzung der Arbeit .....	23
<b>2. Publikationen</b> .....	<b>24</b>
2.1 Publikation 1 .....	24
2.2 Publikation 2.....	30
2.3 Darstellung der Eigenleistung.....	38
<b>3. Diskussion</b> .....	<b>38</b>
3.1 Limitierungen der vorliegenden Arbeit .....	41
3.2 Vergleich der Tests .....	43
<b>4. Zusammenfassung</b> .....	<b>45</b>
<b>5. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>46</b>
<b>6. Lebenslauf</b> .....	<b>54</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AmpC	Ampicillinase C
<i>bla</i>	$\beta$ -Laktamase-Gen
CIM	Carbapenem Inactivation Method
CRE	Carbapenem-resistente Enterobakterien
CPE	Carbapenemase produzierende Enterobakterien
CTX-M	Cefotaximase Munich $\beta$ -Laktamase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESBL	Extended-Spectrum- $\beta$ -Laktamase
GES	Guiana extended spectrum
GIM	German Imipenemase
ICT	Immunchromatographischer Test
IMI/NMC-A	Imipenemase/Non-Metallo-Carbapenemase-A
IMP	Imipenemase
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
LB-Medium	lysogeny broth Medium
MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight Mass spectrometry
MRGN	multiresistente gramnegative Bakterien
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
NDM	New-Delhi- Metallo- $\beta$ -Laktamase
NRZ	nationales Referenzzentrum für gramnegative Krankenhauserreger
OXA	Oxacillinase
PBP	Penicillin-bindendes Protein
PCR	Polymerase Chain Reaction/Polymerase-Kettenreaktion
SHV	Sulphydryl Variable $\beta$ -Laktamase
SME	<i>Serratia-marcescens</i> -Enzym
TEM	Temoniera $\beta$ -Laktamase
VIM	Verona integron Metallo- $\beta$ -Laktamase

# 1. Einleitung

Die Sepsis gehört zu den meist gefürchteten Komplikationen einer Infektion. Trotz aller therapeutischen Fortschritte sind die weltweiten Fallzahlen steigend und die Letalität mit ca. 25-40 % ausgesprochen hoch [1, 2]. In Deutschland stieg die Inzidenz beispielsweise von 2009 mit 200.535 bis 2013 mit 279.530 Fällen um ca. 40 % [2]. Zu den häufigsten Erregern einer Sepsis gehören gramnegative Enterobakterien, insbesondere *Escherichia coli* (*E. coli*), worauf etwa 30 % aller Fälle zurückzuführen sind [3].

Ein entscheidender prognostischer Faktor für das Überleben septischer Patienten ist der frühe Einsatz einer zielgerichteten Antibiotikatherapie [4-7]. Diese gestaltet sich mit zunehmenden Resistenzen der Erreger immer schwieriger. So gehören Breitspektrumantibiotika wie Piperacillin/Tazobactam, Ceftriaxon oder Carbapeneme heutzutage zu der leitliniengerechten kalkulierten Antibiotikatherapie einer Sepsis [8]. Bei weitem können durch diese Antibiotika nicht alle Erreger abgedeckt werden. Eine besondere Gefahr geht hierbei von Bakterienstämmen aus, die zu den 4MRGN (multiresistente gramnegative Erreger) gehören, also resistent gegenüber vier der hauptsächlich gegen sie eingesetzten Antibiotikaklassen sind. Per definitionem gehören Carbapenemase-produzierende Enterobakterien (CPE) zu den 4MRGN [9]. Durch die Expression von Carbapenemasen entwickeln die entsprechenden Stämme Resistenzen gegenüber Aminoacylpenicillinen wie Piperacillin, Cephalosporinen (der 1., 2., teilweise auch der 3. und 4. Generation), wie beispielsweise Ceftriaxon oder Ceftazidim, und gegenüber Carbapenemen [10]. Somit werden durch die Carbapenemasen die hauptsächlich zur kalkulierten Antibiotikatherapie der Sepsis eingesetzten Antibiotika in ihrer Wirksamkeit limitiert. Aus diesem Grund ist es von großer Bedeutung, CPE als potentielle Sepsiserreger möglichst schnell zu detektieren. Dies gilt umso mehr, wenn man bedenkt, dass die Überlebenschance bei einer Sepsis maßgeblich vom Zeitpunkt der zielgerichteten Antibiotikagabe abhängt [4-7].

Derzeit existiert eine Reihe von biochemischen, colorimetrischen, phänotypischen und molekularbiologischen Testverfahren, welche die Identifikation von CPE ermöglichen. Diese erfordern jedoch in der Regel das Vorliegen einer Reinkultur auf einem Festmedium. Abgesehen von Polymerase-Kettenreaktion (PCR)- und Massenspektrometrie-basierten Analysemethoden beträgt die aktuelle Mindestanalysezeit dieser Tests 18-24 Stunden [11-14]. Für die PCR und

Massenspektrometrie sind wiederum eine umfassende apparative und personelle Ausstattung erforderlich. Zudem bedarf es zum Teil mehrerer PCRs, um alle Carbapenemasen zu detektieren. Daher fehlt derzeit ein für Blutkulturen geeignetes Testverfahren, welches sowohl eine zeitnahe Resistenzprüfung erlaubt, als auch unabhängig vom jeweilig spezifischen Genotyp des Enzyms funktioniert und letztendlich ohne größere Kosten und apparativen Aufwand in jedem klinisch-mikrobiologischen Labor umsetzbar ist.

Folglich wurden in dieser Doktorarbeit drei colorimetrische und ein phänotypisches Testverfahren für die schnelle, kostengünstige und zuverlässige Anwendung an Blutkulturen entwickelt und evaluiert.

## **1.1 Enterobakterien**

Die Familie der Enterobakterien aus der Ordnung Enterobacterales gehört zur Klasse der Gammaproteobakterien des Phylums Proteobacteria. Es handelt sich um gramnegative, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien, die Glukose und andere Zucker oxidativ oder fermentativ metabolisieren können. Eine Vielzahl von Gattungen werden den Enterobakterien zugeordnet, wobei einige obligat pathogen und andere Opportunisten sind.

Bei den Opportunisten handelt es sich etwa um Gattungen wie *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter* und *Escherichia*, welche Teil des physiologischen intestinalen Mikrobioms sind. Als fakultativ pathogene Erreger können Sie Pneumonien, Harnwegsinfektionen, Sepsis, Neugeborenen-Meningitis oder Weichteilinfektionen hervorrufen. Fakultativ pathogene Enterobakterien spielen insbesondere bei nosokomialen Infektionen eine große Rolle, wobei speziell die Sepsis als schwere Folge dieser Infektionen hervorzuheben ist.

Die Gattungen *Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella* und enteropathogene *E. coli*-Stämme stellen obligat pathogene Varianten dar. Sie gehören nicht zur natürlichen intestinalen Flora und lösen Krankheiten wie die Pest, Typhus, Enterokolitis oder die bakterielle Ruhr aus.

Insgesamt sind Enterobakterien als Verursacher diverser Infektionskrankheiten weltweit für Millionen Todesfälle verantwortlich; allein durch die darmpathogenen *E. coli*-Stämme sterben jährlich ca. eine Million Menschen [15].

## 1.2 Resistenzlage

Seitdem Antibiotika fester Bestandteil der Therapie von Infektionskrankheiten sind, stellen Resistenzen gegen die entsprechenden Antibiotika ein schwerwiegendes Problem dar. Je häufiger und weitläufiger ein bestimmtes Antibiotikum eingesetzt wird, desto eher verbreiten sich Resistenzen dagegen [16, 17]. Bildlich gesprochen, findet also ein Wettlauf zwischen neuen Antibiotika (-klassen) und den dazugehörigen Resistenzen statt. Aus der Perspektive der molekularen Evolutionsbiologie stellt jedes einzelne Antibiotikum einen Selektionsdruck dar, dem eine jeweilig gegebene Bakterienspezies versucht, durch Ausbildung oder Erwerb adäquater Resistenzmechanismen auszuweichen. Dabei existieren verschiedene Mechanismen, durch die Bakterien unempfindlich gegen Antibiotika werden können. Zu diesen gehören beispielsweise (i) die strukturelle/molekulare Veränderung von Targetproteinen (z.B. Penicillin-bindende Proteine), (ii) die vermehrte Expression von Effluxpumpen, (iii) Porinverlust, (iv) die enzymatische Inaktivierung von Antibiotika sowie (v) kombiniertes Wirken dieser Mechanismen. Die Verbreitung der verschiedenen Mechanismen variiert dabei zwischen gramnegativen und –positiven Gattungen. Der vorwiegend bei grampositiven Bakterien vorzufindende Resistenzmechanismus ist die strukturelle Änderung der Penicillin-bindenden Proteine. Sie spielt unter anderem bei der Resistenz von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) oder Penicillin-resistenten *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) eine Rolle. Die Expression der hydrolytisch aktiven  $\beta$ -Laktamasen taucht heutzutage vor allem bei gramnegativen Gattungen und dabei insbesondere bei Enterobakterien auf und ist hier der vorherrschende Grund für Resistenzen gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika [15]. Zu den  $\beta$ -Laktamasen gehören die Penicillinasen, Cephalosporinasen und Carbapenemasen, die sich unter anderem durch ihr Substratspektrum unterscheiden [18].

Die erste Penicillinase wurde im Jahre 1940, schon vor der intensiven Anwendung des Penicillins einige Jahre später, beschrieben [19]. Eine relevante Verbreitung der Penicillinasen begann allerdings erst, als das Antibiotikum klinisch flächendeckend insbesondere bei Infektionen durch *Streptokokken* und *Staphylokokken* eingesetzt wurde [16]. Durch die Verbreitung der Penicillinasen verloren Penicilline in vielen Fällen ihre Wirkung gegen grampositive Bakterien. Mit der Entwicklung weiterer Penicilline wie Ampicillin, ein vor allem gegen gramnegative Bakterien wirksames Aminopenicillin, weitete sich das Problem der Resistenz durch  $\beta$ -Laktamasen auch auf Enterobakterien und andere gramnegative Spezies aus [20]. Dadurch ist Ampicillin seit langem nicht mehr empirisch etwa gegen *E. coli* einsetzbar. Der Ampicillin-resistente Anteil von *E. coli* - Isolaten liegt in Deutschland aktuell bei ca. 50 %, in zahlreichen anderen europäischen Ländern bei über 60 % [21]. Unter anderem deshalb wurde Ampicillin durch Cephalosporine oder das breiter wirksame Aminoacylpenicillin Piperacillin in der empirischen Antibiotikatherapie von enterobakteriellen Infektionen abgelöst. Analog zu den Penicillinasen bzw. frühen  $\beta$ -Laktamasen kam es aufgrund des breiten Einsatzes dieser Antibiotika und des damit einhergehenden Selektionsdrucks zu der Entwicklung von Extended-Spectrum- $\beta$ -Laktamasen (ESBL) [22, 23]. ESBL können Penicilline, teilweise Cephalosporine der 1. bis 4. Generation und Monobaktame hydrolysieren und sind inzwischen weit verbreitet. Die schnelle Verbreitung dieser Resistenz wurde vorrangig durch den Plasmid-vermittelten horizontalen Gentransfer begünstigt [24]. Diesem Resistenzproblem wurde mit dem Einsatz von ESBL-Inhibitoren wie Clavulansäure oder Tazobactam und den ESBL-festen Carbapenemen begegnet. ESBL-Inhibitor- $\beta$ -Laktam-Antibiotika-Kombinationen wie Piperacillin/Tazobactam und Carbapeneme können von ESBL nicht inaktiviert werden [18] und sind aktuell auch deshalb Bestandteil leitliniengerechter Antibiotikatherapien von schweren Infektionskrankheiten wie Pneumonien oder der Sepsis [8].

Es zeigte sich jedoch auch hier, dass sich im Laufe der Zeit  $\beta$ -Laktamasen entwickelt hatten, die fähig sind, Carbapeneme zu spalten und aufgrund ausreichender molekularer Abweichung gegenüber den klassischen ESBL durch ESBL-Inhibitoren nicht mehr gehemmt werden können [18, 25, 26]. Diese Enzyme werden dementsprechend als Carbapenemasen bezeichnet. Je nach Carbapenemasetyp können Penicilline, Cephalosporine der 1., 2., sowie teilweise auch der 3. und 4. Generation und Carbapeneme in ihrer Wirksamkeit ausgeschaltet werden [10, 18].

Die verbleibenden Therapieoptionen sind auf Grund koexistenter weiterer Resistenzen häufig ausschließlich Antibiotika wie Colistin, Fosfomycin oder Tigecyclin. Sie weisen jedoch zum Teil schwerwiegende Nebenwirkungen wie beispielsweise Neuro-, Nephro- oder Pankreatotoxizität auf. Außerdem zeigt Colistin bei Blutstrominfektionen nur eine mäßige Wirkung [10].

Während die Carbapenemase-bildenden Enterobakterien zunächst im Rahmen klonaler Ausbrüche vorkamen, verbreiten sich die Carbapenemasen seit den 1990er Jahren zunehmend auch Spezies-übergreifend [27]. Dabei spielen bis heute die Plasmid-lokalisierten Carbapenemasetyphen, die erstmals zu dieser Zeit identifiziert wurden [28-30], eine entscheidende Rolle. Die Plasmid-vermittelte Dissemination der Carbapenemasen ist ein Problem, das durch gramnegative Bakterien verursacht wird. Hierbei spielen vor allem Enterobakterien aufgrund ihrer hohen klinischen Relevanz eine entscheidende Rolle. Die Produktion von Carbapenemasen stellt inzwischen den wichtigsten Resistenzmechanismus von Enterobakterien dar, der zu einer Carbapenemresistenz führt [10, 11, 31]. In Deutschland liegt die Prävalenz von CPE noch bei < 0,5 %, wohingegen CPE in anderen Ländern bereits endemisch verbreitet sind [21, 32, 33] (Siehe Kapitel 1.5).

### **1.3 Einteilung der Carbapenemasen nach Ambler**

Aus molekularbiologischer Sicht sind Carbapenemasen eine heterogene Gruppe und gehören unterschiedlichen  $\beta$ -Laktamase-Gruppen an. Im Klassifizierungssystem nach Ambler werden Carbapenemasen bzw.  $\beta$ -Laktamasen in Abhängigkeit von ihrer Aminosäuresequenz und ihres aktiven Zentrums in vier verschiedene Klassen eingeteilt. Unterschieden werden die Klassen A, B, C und D, wobei die Klasse C keine Carbapenemasen im eigentlichen Sinne enthält. Die  $\beta$ -Laktamasen der Klassen A, C und D besitzen in ihrem aktiven Zentrum einen Serinrest. Bei der Klasse B handelt es sich um Metallo- $\beta$ -Laktamasen, bei denen das aktive Zentrum von Zink-Ionen gebildet wird. Des Weiteren unterscheiden sich die Enzyme der verschiedenen Klassen in ihrer hydrolytischen Aktivität (siehe Tabelle 1)[18, 27, 34, 35].

Die am häufigsten vorkommende Klasse A Carbapenemase *Klebsiella-pneumoniae*-Carbapenemase (KPC) ist in der Lage, sämtliche  $\beta$ -Laktam-Antibiotika zu inaktivieren: Penicilline, Cephalosporine der 1. bis 4. Generation, Carbapeneme und Monobaktame. Somit besitzt sie das breiteste Resistenzspektrum aller Carbapenemasen [10, 27].

Weitere Klasse-A-Carbapenemasen sind u.a. die Imipenemase/Non-Metallo-Carbapenemase-A (IMI/NMC-A), *Serratia-marcescens*-Enzym (SME) und Guiana extended spectrum (GES) [36].

Die am weitesten verbreiteten Metallo- $\beta$ -Laktamasen beziehungsweise Carbapenemasen der Klasse B sind die Verona-Integron-Metallo- $\beta$ -Laktamase (VIM) und New-Delhi-Metallo- $\beta$ -Laktamase (NDM). Ihr Substratspektrum beinhaltet alle  $\beta$ -Laktame, abgesehen von Aztreonam. Durch Metallion-Chelatoren wie Ethylendiamintetraacetat (EDTA) können Klasse B Carbapenemasen gehemmt werden. Weitere Carbapenemasen der Klasse B sind u.a. die German Imipenemase (GIM) und die Imipenemase (IMP) [10, 27].

Zur Klasse C gehören die chromosomal-kodierten Ampicillinase-C- $\beta$ -Laktamasen (AmpC) und Plasmid-kodierte Cephamicinasen, bei denen es sich nicht um Carbapenemasen handelt, da Carbapeneme nicht zu ihrem Substratspektrum gehören. Phänotypisch kann es allerdings infolge einer Überexpression der Klasse C Enzyme in Verbindung mit weiteren Mechanismen dennoch zu einer Carbapenem-Resistenz kommen [27, 37].

Die Serin-Carbapenemasen der Klasse D setzen sich aus den Oxacillinase- $\beta$ -Laktamasen (OXA) zusammen. Es ist zu beachten, dass nicht alle Mitglieder der OXA-Familie Carbapenemase-Aktivität aufweisen [38]. Die am weitesten verbreitete OXA-Carbapenemase ist die OXA-48 [39, 40]. Sie besitzt innerhalb der Klasse D die höchste hydrolytische Aktivität gegenüber Carbapenemen [41]. Weitere OXA-Carbapenemasen, wie OXA-162, OXA-181 oder OXA-163 etc., werden auf Grund genetischer Ähnlichkeiten unter dem Begriff OXA-48-like Carbapenemasen zusammengefasst [42]. Es existiert darüber hinaus jedoch eine Vielzahl weiterer OXA-Carbapenemasen [43]. Verglichen mit anderen Carbapenemasen besitzen die Klasse D Enzyme das schmalste Substratspektrum, da sie keine hydrolytische Aktivität gegenüber Cephalosporinen der 3. und 4. Generation oder gegenüber Aztreonam aufweisen. Die Empfindlichkeit gegenüber Carbapenemen ist außerdem meist nicht komplett aufgehoben sondern nur reduziert [44].

**Tabelle 1:** Klassifikation der  $\beta$ -Laktamasen nach Ambler [34, 35]

Klasse	Vertreter	Substratspektrum	Spezies	geografische Verteilung
<b>A (Serin-<math>\beta</math>-Laktamasen)</b>				
Carbapenemasen	KPC-2 (KPC-2 bis KPC-22) und andere	Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme, Monobaktame	<i>K. pneumoniae</i>	USA, Südamerika, Griechenland, Israel, China
ESBL	TEM, SHV, CTX-M	$\beta$ -Laktame variabel, keine Carbapeneme	Enterobacteriaceae, Nonfermenter	
<b>B (Metallo-<math>\beta</math>-Laktamasen)</b>				
Carbapenemasen	NDM-1 (NDM-1 bis NDM-16)	Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme	<i>K. pneumoniae, E. coli</i>	Indien, Pakistan, Bangladesch, Balkan-Staaten, Großbritannien, Mittlerer Osten
	VIM-1 (VIM-1 bis VIM-46)		<i>E. coli, K. pneumoniae, P. aeruginosa</i>	Griechenland, Italien
	GIM-1, GIM-2		<i>P. aeruginosa, Enterobacteriaceae</i>	Deutschland
	Andere			
<b>C (AmpC-Cephymycinasen)</b>				
	chrososomal kodierte AmpC Plasmid-kodierte AmpC (FOX, MOX, DHA, CMY etc.)	$\beta$ -Laktame variabel, keine Carbapeneme	<i>Enterobacter spp.</i> <i>Citrobacter spp.</i>	
<b>D (Oxacillinasen)</b>				
Carbapenemasen	OXA-48-like (OXA-48, OXA-162, OXA-181 etc.) und andere	Penicilline, Cephalosporine der 1. und 2. Generation, Carbapeneme variabel	<i>K. pneumoniae, E. coli</i>	Türkei, Mittlerer Osten, Nordafrika, Europa inkl. Deutschland
ESBL	OXA-2, OXA-10 und andere	$\beta$ -Laktame variabel, keine Carbapeneme	Enterobacteriaceae, Nonfermenter	

## 1.4 Geografische Verteilung der Carbapenemasen

Allgemein ist ein weltweiter Anstieg des Auftretens von CPE zu beobachten, wobei die meisten Carbapenemasen aus *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) Isolaten nachgewiesen werden [27, 33, 39]. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Datenlage insbesondere bezüglich endemischer Länder oft unzureichend ist.

In Griechenland lag der Anteil Carbapenem-resistenter *K. pneumoniae*-Isolate 2017 beispielsweise bei ca. 65 %, in Italien bei 30 %, in Rumänien bei 23 % und auf Zypern bei 16 % (Abbildung 2) [21]. Nicht nur in Südeuropa ist eine derart gehäufte Prävalenz feststellbar. In Indien weisen ca. 56 % der *K. pneumoniae*-Isolate eine Carbapenem-Resistenz auf, in Pakistan 42 %, in China 36 % und in der Türkei 30 %. Auch in Lateinamerika besteht eine relevante Verbreitung von Carbapenem-Resistenzen, wobei für Argentinien mit 14 %, Ecuador mit 33 % und Venezuela mit 24 % die vergleichsweise verlässlichsten Daten existieren (Abbildung 1) [33].

Die KPC, NDM, VIM und OXA-48 stellen die Carbapenemasen mit der weltweit höchsten Prävalenz dar. Die Häufigkeit der einzelnen Carbapenemase-Subtypen variiert auf den Kontinenten bzw. von Land zu Land, wobei sich die KPC bisher am erfolgreichsten verbreitet hat [27, 39].

Der erste KPC-produzierende Stamm war *K. pneumoniae* und wurde 1996 in North Carolina, USA beschrieben [29]. Endemische Ausmaße hat die Verbreitung der KPC gegenwärtig an der Ostküste der USA, in Puerto Rico, Kolumbien, Griechenland, Israel und Teilen von China angenommen [39, 45, 46]. *K. pneumoniae* ist auch hier die Spezies, bei der dieses Enzym am häufigsten nachgewiesen wird [39]. Durch die Lokalisation von *bla*<sub>KPC</sub> auf Plasmiden kommt sie aber auch bei anderen Enterobakterien vor [47]. Aktuell sind mehr als 60 KPC-Carbapenemasetypen bekannt [43].

Die Metallo- $\beta$ -Laktamase NDM ist der bisher häufigste Carbapenemasetyp, der in Asien nachgewiesen wird, speziell in China, Pakistan, Bangladesch und Indien [39, 48]. Dabei ist in Indien das Vorkommen nicht nur auf Krankenhäuser beschränkt, sondern weitete sich auch auf NDM-produzierende Enterobakterien aus, die u.a. im Leitungswasser gefunden

werden [49]. Weitere Gebiete mit einer hohen NDM-Prävalenz sind die Balkan-Staaten, Großbritannien und der Mittlere Osten. Am häufigsten wird die NDM von *K. pneumoniae* und *E. coli* produziert.  $bla_{NDM}$ -tragende Plasmide gelten allerdings als besonders mobil, sind dadurch weniger an Speziesgrenzen bzw. klonale Verbreitung gebunden und kommen deshalb in allen Enterobakterien und anderen gramnegativen Spezies vor [39, 48]. Die Ausbreitung seit der ersten Isolierung von NDM aus einem *K. pneumoniae* Stamm im Jahr 2009 verläuft vermutlich unter anderem deshalb so erfolgreich [50]. Mittlerweile sind über 20 Carbapenemasen vom NDM-Typ bekannt [43].

Die ebenfalls zu den Metallo- $\beta$ -Laktamasen gehörende VIM ist vor allem in Europa, speziell in Griechenland und Italien vorzufinden. Bekannt sind die VIM-Carbapenemasen seit der ersten Beschreibung im Jahr 1999 in Italien aus einem *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) Isolat [51]. Bezüglich der Enterobakterien wird sie vermehrt aus *K. pneumoniae* und *E. coli* isoliert, kommt aber hauptsächlich in *P. aeruginosa* vor. [52-54]. Über 60 Carbapenemasetypen werden aktuell der VIM-Familie zugeordnet [43].

OXA-48 stellt den relevantesten Carbapenemasetyptyp der Klasse D nach Ambler dar und wurde erstmals im Jahr 2004 bei einem *K. pneumoniae* Isolat aus der Türkei nachgewiesen [44]. Derzeit sind fast 500 verschiedene OXA-Typen bekannt, von denen ca. ein Drittel Carbapenemase-Aktivität aufweist [43]. OXA-48 ist vor allem in der Türkei, im Mittleren Osten und Nordafrika verbreitet und außerdem die am häufigsten in Europa vorkommende Carbapenemase. Sie wird hauptsächlich aus *K. pneumoniae* und *E. coli* isoliert. Die Dissemination erfolgt sowohl über klonale als auch Plasmid-vermittelte Übertragung [39, 53, 55].

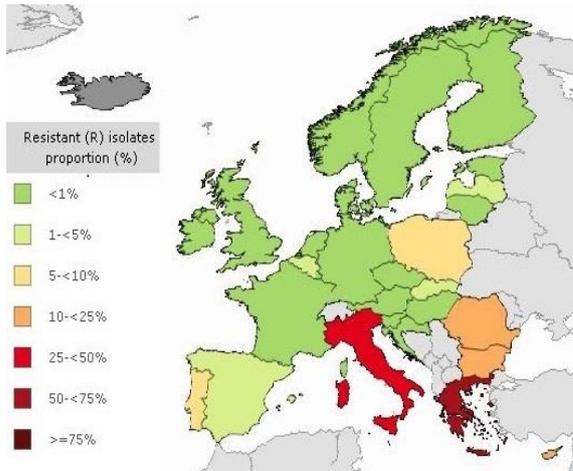
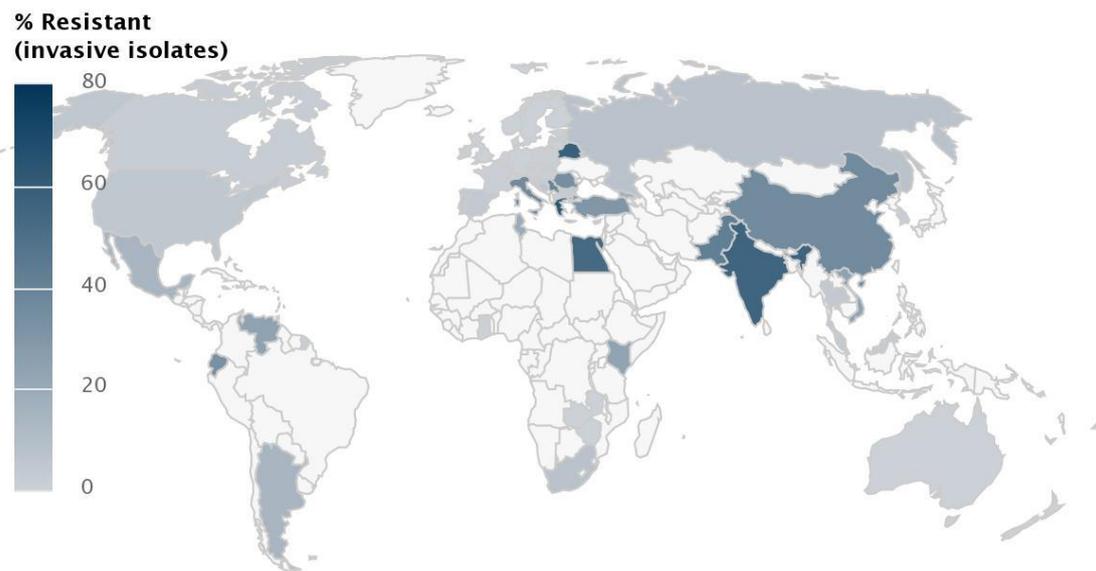


Abbildung 1: ECDC-Darstellung zum Anteil invasiver Isolate von *K. pneumoniae* mit Carbapenem-Resistenz 2017, nach Land. Nicht sichtbare Länder: Malta mit einem Anteil von 10 %, Luxemburg mit 0,0 %, Liechtenstein keine Daten. Bildnachweis: European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) 2018 [21].

### Resistance of *Klebsiella pneumoniae* to Carbapenems



Center for Disease Dynamics, Economics & Policy (cddep.org) © Natural Earth

Abbildung 2: CDDEP-Darstellung zum Anteil Carbapenem-resistenter invasiver Isolate von *K. pneumoniae* 2012-2017, nach Land.

Bildnachweis: The Center for Disease, Dynamics Economics & Policy. ResistanceMap: Antibiotic resistance. 2020. <https://resistancemap.cddep.org/AntibioticResistance.php>. Zuletzt abgerufen am 27.01.2020 [33].

### 1.4.1 Carbapenemase-produzierende Enterobakterien und Sepsis

Die Sepsis ist eine lebensbedrohliche Erkrankung mit einer hohen Letalität. In Deutschland liegt diese bei ca. 25 %, in anderen Ländern wie z. B. Spanien sogar bei bis zu 40 % [1, 2]. Eine effektive und zeitnahe Antibiotikatherapie gehört dabei zu den entscheidenden lebensrettenden Maßnahmen [4-6, 8]. Diese gestaltet sich umso schwieriger, je mehr Resistenzen der zugrundeliegende Erreger aufweist. Blutstrominfektionen, die durch Carbapenem-resistente Enterobakterien (CRE) verursacht werden, waren in Studien mehrheitlich mit einer höheren Letalität assoziiert, als jene, bei denen der ursächliche Erreger Carbapenem-sensibel war. Sowohl das schwierige und oft insbesondere initial nicht ausreichend bekannte Resistenzspektrum als auch die häufig notwendige Antibiotika-Kombinationstherapie sind vermutlich Gründe dafür [10, 56-61]. Der Anteil CRE-assoziiierter Blutstrominfektionen liegt in Deutschland zurzeit bei 0,2 %, wobei die Anzahl Carbapenem-resistenter Isolate von Enterobakterien aus deutschen Krankenhäusern steigt [8, 32, 62-64]. Die internationale Datenlage zur Epidemiologie CRE-assoziiierter Blutstrominfektionen ist aktuell noch nicht ausreichend valide, um verlässliche Rückschlüsse auf die Entwicklung der Inzidenz zu ziehen. Dennoch existieren einige Studien, die zumindest einen Einblick in diese Thematik bieten. In einer Studie aus Yangon, Myanmar trat bei 14 % der Sepsis-verursachenden Erreger eine Carbapenem-Resistenz auf [65]. In einer Studie aus sieben südamerikanischen Ländern produzierten 21 % der septischen Keime eine Carbapenemase und waren ebenfalls mit einer höheren Sterberate assoziiert [58]. Eine türkische Studie zeigte, dass knapp 40 % der dortigen Sepsis-verursachenden *Klebsiella*-Stämme Carbapenem-resistent waren [66]. *K. pneumoniae* Stämme, die in einer Studie aus Israel zu einer Sepsis geführt haben, waren in 22% der Fälle Carbapenem-unempfindlich [60]. Bei pädiatrischen Patienten in einer Studie aus Indien wiesen 27 % der Sepsis-verursachenden gramnegativen Bakterien eine Carbapenem-Resistenz auf [67]. Obgleich die Studien unterschiedlich belastbare Daten enthalten, kann angenommen werden, dass die Epidemiologie von Carbapenem-resistenten Keimen, die Blutstrominfektionen verursachen, mit der allgemeinen Carbapenemase-Prävalenz der jeweiligen Länder korreliert.

Da die Carbapenemase-Prävalenz in den letzten Jahren dramatisch gestiegen ist [21, 39], ist es umso wichtiger, die Diagnostik von CPE-bedingten Blutstrominfektionen zu

verbessern und allgemein zugänglich zu machen. Diesbezüglich wäre es insbesondere hilfreich, eine niedrigschwellig einsetzbare und kostengünstige Analytik zu etablieren, welche zudem in der Lage ist, die Resistenzen mit einem vertretbaren Zeitaufwand, das heißt maximal innerhalb weniger Stunden, bei guter Sensitivität und Spezifität zu bestimmen.

#### **1.4.2 Die häufigsten Carbapenemasen in Deutschland**

Seit Beginn der statistischen Datenerhebung von CPE durch das nationale Referenzzentrum für gramnegative Krankenhauserreger (NRZ) im Jahr 2009 ist OXA-48 die häufigste Carbapenemase in Deutschland, gefolgt von VIM-1, NDM-1, KPC-2 sowie KPC-3 (Abbildung 3). Der größte Teil der von Enterobakterien produzierten Carbapenemasen wird dabei in *K. pneumoniae* nachgewiesen, gefolgt von *E. coli* und *E. cloacae*. Die zur Abklärung des Vorliegens einer Carbapenemase an das NRZ gesendeten Isolate stammten aus verschiedenen Patientenmaterialien, wobei es sich im Jahr 2017 bei 3,2 % davon um Blutkulturen handelte.

In Deutschland ist eine steigende Prävalenz und Diversität von Carbapenemasen zu beobachten. Das hohe Aufkommen von KPC-2 im Jahr 2014 war auf einen multiklonalen Ausbruch in einem Krankenhaus in Südhessen zurückzuführen. Es wird auf Grund der breiten Speziesverteilung bei diesem Ausbruch angenommen, dass hier der horizontale Gentransfer eine bestimmende Rolle eingenommen hat.

Ungeachtet der derzeit noch relativ geringen Prävalenz von Carbapenemasen insgesamt, findet nach wie vor auch in Deutschland der weltweit erstmalige Nachweis bisher unbekannter Carbapenemasen statt. Das unterstreicht die Wichtigkeit von Nachweismethoden, die in der Lage sind, Carbapenemasen mit unbekannter Nukleotidsequenz zu detektieren. Entsprechende Nachweismethoden werden im Rahmen dieser Arbeit untersucht [21, 32, 62-64].

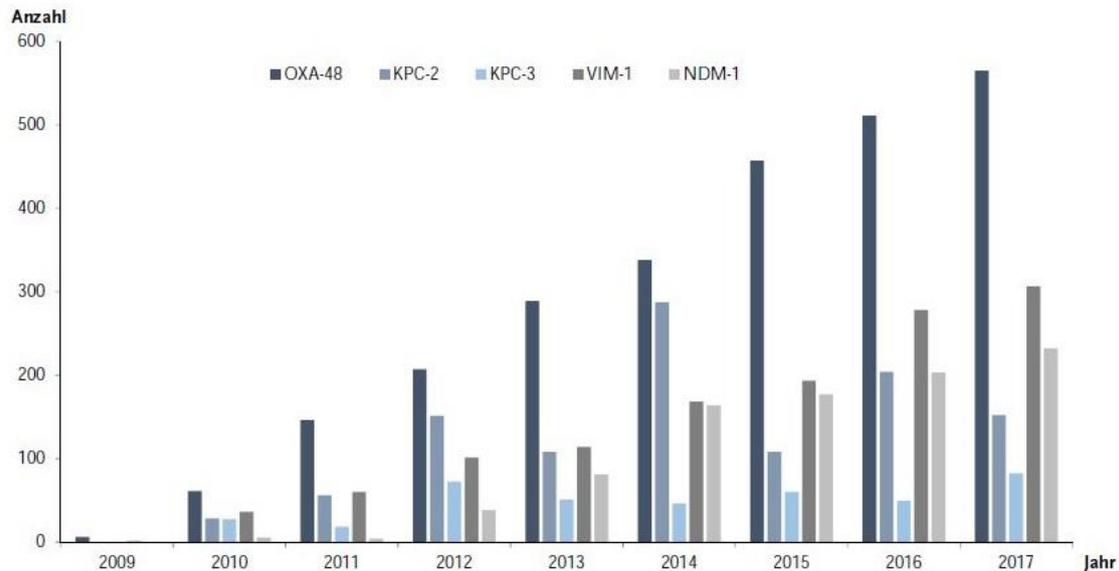


Abbildung 3: RKI-Darstellung der Verteilung von Carbapenemasen bei Enterobakterien im zeitlichen Verlauf 2009-2017.

Bildnachweis: Robert-Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin Nr. 28, 2018 (mit freundlicher Genehmigung des Robert-Instituts, gemäß der Creative Commons Namensnennung 4.0

International Lizenz: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de> ) [62].

## 1.5 Funktionsweise von Carbapenemasen

Durch Carbapenemasen werden bei einer entsprechenden Antibiotikatherapie  $\beta$ -Laktam-Antibiotika inaktiviert. Dies erfolgt durch die hydrolytische Spaltung des  $\beta$ -Laktamrings. Der konkrete Angriffspunkt ist hierbei die polare Atombindung zwischen dem asymmetrischen Stickstoffatom und der Carbonylgruppe. Carbapenemasen befinden sich im periplasmatischen Raum des Bakteriums und spalten  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, nachdem diese durch Porine in diesen Raum eingetreten sind. So verhindern sie die Bindung des Antibiotikums an das Penicillin-bindende Protein (PBP) und heben dadurch seine Wirkung auf [68]. Durch die Hydrolyse wird bei jeder Spaltung ein Proton freigesetzt, wodurch eine pH-Wert-Änderung erfolgt, welche für die in dieser Arbeit vorgestellten Testverfahren diagnostisch genutzt werden soll (Abbildung 4).

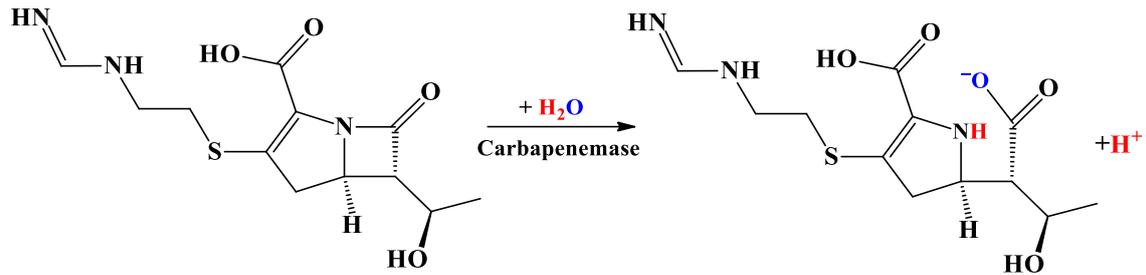


Abbildung 4: Darstellung der enzymatischen Deaktivierung von Imipenem. Hydrolytische Spaltung des  $\beta$ -Laktam-Rings durch Carbapenemasen mit Freisetzung eines Protons. Bildnachweis: Zhai *et al.*, *Thermochim. Acta*, 2012 [69].

## 1.6 Detektion von Carbapenemasen aus Blutkulturen

Für die Detektion von CPE aus Blutkulturen existieren derzeit zahlreiche Verfahren, die sich entweder molekularbiologischer, phänotypischer, colorimetrischer oder massenspektrometrischer Prinzipien bedienen. Diese Verfahren unterscheiden sich allerdings nicht nur in den Testverfahren sondern auch hinsichtlich Kosten, Zeitaufwand, Einsetzbarkeit, notwendiger Laborausstattung sowie Sensitivität und Spezifität. Dabei wird die PCR aktuell sowohl aufgrund ihrer Zuverlässigkeit (Sensitivität und Spezifität) als auch ihres relativ geringen Zeitaufwandes als Goldstandard angesehen [70, 71].

### 1.6.1 PCR

Für die Detektion von Carbapenemasen bzw. ihrer Gene (*bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>OXA-48-like</sub>* etc.) werden in der Diagnostik vorzugsweise Real-Time-Multiplex-PCR basierte Assays eingesetzt. Carbapenemasen mit bekannter Nukleotidsequenz können mit dieser Methode schnell und zuverlässig nachgewiesen werden [12, 70, 72-74].

### **1.6.2 MALDI-TOF-Massenspektrometrie**

Mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie (Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierungsmassenspektrometrie kombiniert mit Flugzeitanalyse; engl. matrix-assisted laser desorption ionization = MALDI, time of flight = TOF) können inzwischen nicht nur Bakterienspezies zuverlässig identifiziert, sondern auch das Vorliegen einer Carbapenemase nachgewiesen werden. Hierfür wird der zu testende Stamm zusammen mit einem Carbapenem inkubiert, sodass das Carbapenem durch die ggf. vorhandene Carbapenemase gespalten wird. Das gespaltene Carbapenem und die Nebenprodukte weisen aufgrund ihres abweichenden Masse-Ladungsverhältnisses eine andere Flugzeit auf als das ungespaltene Carbapenem. Diese Flugzeit kann mithilfe der MALDI-TOF-MS gemessen werden, indem die auf einer Matrix befindlichen Moleküle durch einen Laser desorbiert, ionisiert und mittels eines elektrischen Felds beschleunigt werden. Die Unterschiede der Flugzeiten bzw. das Massenspektrogramm werden mithilfe einer Referenzdatenbank ausgewertet.

Eine weitere Möglichkeit, die die MALDI-TOF-MS bietet, ist der direkte Nachweis der Carbapenemasen mittels Carbapenemase-assoziiierter Proteine [75].

### **1.6.3 Immunchromatographische Tests**

Die kommerziell erhältlichen immunchromatographischen Tests (ICT) ermöglichen die Detektion der Carbapenemasen NDM, KPC, VIM, OXA-48-like und OXA-163-like [76]. Es handelt sich hierbei um Lateral Flow Tests, die auf einem dem Schwangerschaftstest ähnlichen Prinzip beruhen. Monoklonale Antikörper gegen spezifische Epitope der jeweiligen Carbapenemase sind auf einer mit kolloidalen Gold-Nanopartikeln versetzten Nitrozellulosemembran innerhalb einer Lateral-Flow-Kassette gebunden. Die zu testende Probe wird auf den Teststreifen gegeben und gelangt mittels Kapillarkräften zu den gebundenen Antikörpern. Enthält die Probe ein spezifisches Carbapenemase-Epitop, wird dies durch die Bindung an den entsprechenden Antikörper und mithilfe des kolloidalen Golds sichtbar gemacht [77, 78].

#### 1.6.4 Colorimetrische Tests

Die colorimetrischen Tests beruhen auf folgendem Prinzip: Die Freisetzung des Protons bei der hydrolytischen Spaltung eines Carbapenems und die damit einhergehende pH-Wert-Senkung werden durch eine Indikatorsubstanz sichtbar gemacht. Die Testlösungen enthalten daher unter anderem den Indikatorfarbstoff Phenolrot und das Carbapenem Imipenem. Diese Testlösungen werden dem entsprechend aufbereiteten Stamm hinzugefügt. Bei gegebenem Enzymangebot und damit einhergehender Hydrolyse des Carbapenems findet ein Farbumschlag von beispielsweise rot nach gelb statt (Abbildung 5).

Der zu testende Stamm muss nach bisher etablierten Analyseprotokollen zuvor auf einem Festmedium kultiviert werden, erst im Anschluss daran kann der Test durchgeführt werden.

Dadurch ergibt sich eine Mindestanalysezeit von 18-24 h für Blutkulturen. Auch hier existieren Protokolle, die die Blutkulturdiagnostik auf eine Detektionszeit von 5-6 h verkürzen können [79-81].



Abbildung 5: Ergebnisse einer Testung mithilfe eines colorimetrischen Tests (hier Carba NP Test). Links: positives Testergebnis, der getestete Stamm bildet eine Carbapenemase (NDM-7). Rechts: negatives Testergebnis.

#### 1.6.5 Carbapenem Inactivation Method

Bei der Carbapenem Inactivation Method (CIM-Test) wird überprüft, ob der zu testende Bakterienstamm ein Meropenem-Testplättchen inaktiviert, was auf die Expression einer Carbapenemase hinweist. Hierzu wird jenes Meropenem-Plättchen in einer Suspension inkubiert, die den zu testenden Stamm enthält. Anschließend wird untersucht, ob eine Inaktivierung des in dem Plättchen enthaltenen Meropenems stattgefunden hat.

Dies geschieht mithilfe eines Carbapenem-sensiblen Stamms, der auf ein Festnährmedium als Bakterienrasen zusammen mit dem Plättchen aufgetragen wird. Wenn dieses Meropenem-Plättchen keinen Hemmhof auf diesem Bakterienrasen erzeugt, bildet der getestete Stamm eine Carbapenemase (Abbildung 6). Ausgehend von einer positiven Blutkultur erfolgt im unmodifizierten Originalprotokoll also ein Kultivierungsschritt des zu testenden Stamms auf einem Festmedium (18-20 h). Darauf folgt die Herstellung einer Bakteriensuspension bestehend aus diesem Stamm mit anschließender Inkubation des Meropenem-Plättchens in dieser Suspension (2-4 h). Jenes Meropenem-Plättchen wird im letzten Schritt auf einem Festmedium mit einem Meropenem-sensiblen Stamm kultiviert (18-20 h). Daraus ergibt sich eine Gesamtanalysezeit von 38- 40 h [82].

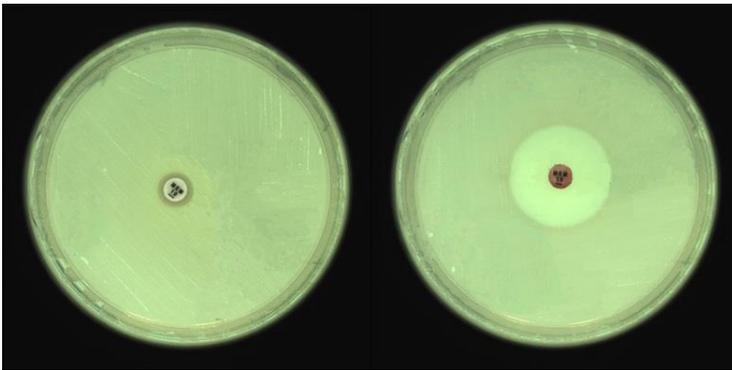


Abbildung 6: Ergebnisse einer Testung mithilfe des CIM-Tests. Links: positives Testergebnis, kein Hemmhof, der getestete Stamm bildet eine Carbapenemase (NDM-1). Rechts: negatives Testergebnis mit Hemmhof.

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Doktorarbeit war es, aus den colorimetrischen/phänotypischen Methoden CIM-Test, NP Carba Test,  $\beta$ -Carba-Test, Neo-Rapid Carb Kit ein Testverfahren zu entwickeln, um CPE direkt aus einer positiven Blutkultur nachweisen zu können. Dies sollte ohne zeitaufwendige Kultivierung auf Festmedien oder in Flüssigmedien erfolgen. Der Test sollte schnell, kostengünstig, zuverlässig und universell einsetzbar sein (*Carbapenemase-Schnelltest*). Die angestrebte Verkürzung der Analysezeit von 18-24 h auf ca. 2-3 h soll einen früheren Einsatz einer zielgerichteten und resistenzangepassten Antibiotikatherapie ermöglichen. Durch diesen signifikanten Zeitgewinn soll ein diagnostischer Beitrag zur Reduktion der Letalität von speziell Enterobakterien-assoziiertes Sepsis geleistet werden.

## 2. Publikationen

### 2.1 Publikation 1

Author's personal copy

European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases  
<https://doi.org/10.1007/s10096-018-3422-4>

ORIGINAL ARTICLE



## Rapid detection of carbapenemases directly from positive blood cultures by the $\beta$ -CARBA test

María Meier<sup>1</sup> · Axel Hamprecht<sup>1,2</sup>

Received: 19 September 2018 / Accepted: 5 November 2018  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

### Abstract

The rapid detection of blood stream infections (BSI) by carbapenemase-producing Enterobacterales (CPE) is indispensable to early optimize antibiotic treatment and to improve survival. While phenotypic tests are time-consuming and PCR is expensive and not available in many routine laboratories, colorimetric tests (e.g., Carba NP test) can provide rapid results at moderate cost. However, up to now, the detection of CPE-BSI requires a further 3-h incubation in broth supplemented with zinc sulfate and imipenem after a blood culture has become positive, thereby causing delay and additional hands-on time. The purpose of this study was to develop and evaluate a new method for the detection of CPE directly from positive blood culture without the need for incubation in broth, based on the commercially available colorimetric  $\beta$ -CARBA test. For the evaluation, blood cultures spiked with 140 different Enterobacterales isolates producing diverse beta-lactamases were tested with the new method. Of these, 70 were CPE (OXA-48-like, NDM, KPC, VIM, and GIM). After blood cultures turned positive, blood culture fluid was drawn, and erythrocytes were hemolyzed with SDS, washed, and equilibrated before the  $\beta$ -CARBA was performed on the bacterial pellet. All carbapenemases were reliably detected, including weak carbapenemases of the OXA-48 group. The sensitivity was 100% (95% CI 94.9–100) and the specificity 94.3% (95% CI 89.2–99.4). The time to result was 20 to 45 min. Carbapenemases can rapidly and reliably be detected directly from blood cultures using the new method, which could help to improve the outcome of these difficult-to-treat infections.

**Keywords** Carbapenemase · Carba NP · Blood stream infection · NDM · OXA-48

### Introduction

Carbapenemase-producing Enterobacterales (CPE) are increasingly reported from invasive infections and are associated with higher mortality and increased cost and length of hospital stay [1]. The rapid detection of CPE from severe infections, especially blood stream infections (BSI), is of paramount importance, since the fast initiation of appropriate antibiotic therapy may help to improve patient management and clinical outcome. Currently, by standard methods, 16–20 h are required to detect carbapenem resistance after a blood

culture has become positive, e.g., by disk diffusion or other susceptibility tests. If resistance to a carbapenem is observed, further confirmatory tests have to be performed for the detection of a carbapenemase, which take additional time. Several methods have been described to shorten the time for the detection of CPE from blood cultures, including nucleic acid-based techniques, magnetic resonance, MALDI-TOF analysis, immunochromatographic tests (ICT), the new rapid disk diffusion testing proposed by EUCAST, and others [2–5]. Most of these assays require further equipment, significant hands-on time or an additional incubation on agar or in broth. Additionally, several of these tests (e.g., PCR, ICT) only recognize a subset of carbapenemases.

Colorimetric assays (e.g., Carba NP test and commercial assays) indicate carbapenemase activity by the inactivation of a carbapenem (typically imipenem), resulting in a pH shift which subsequently leads to a color change of an indicator (e.g., phenol red) [6]. The advantage is the recognition of a broader spectrum of enzymes than with most available PCRs or ICTs. Colorimetric assays have

✉ Axel Hamprecht  
axel.hamprecht@uk-koeln.de

<sup>1</sup> Institute for Medical Microbiology, Immunology and Hygiene, University Hospital of Cologne, Goldenfelsstrasse 19-21, 50935 Cologne, Germany

<sup>2</sup> DZIF (German Centre for Infection Research), Partner Site Bonn-Cologne, Cologne, Germany

been validated for the use from solid media, e.g., Mueller-Hinton agar. Variations have been reported for the use directly from blood cultures; however, they require an additional culture on solid or liquid media (2–4 h), followed by lysis and incubation in the presence of a carbapenem and the pH indicator, thereby leading to a long hands-on time and time to result [2].

The  $\beta$ -CARBA test is a new commercially available colorimetric assay, which is rapid and easy to use and has shown good performance in the detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae grown on solid media [7]. In this study, we developed and evaluated a novel method for the rapid detection of carbapenemase activity directly from positive blood culture bottles using this assay.

## Materials and methods

### Bacterial isolates

A total of 140 Enterobacteriaceae isolates from the clinical microbiology laboratory of two German University hospitals (Frankfurt, Cologne) and from previous studies were included [8–13]. Of these, 70 were carbapenemase producers: OXA-48 ( $n=19$ ), NDM ( $n=15$ ), KPC ( $n=11$ ), VIM ( $n=14$ ), GIM ( $n=3$ ), OXA-48-like ( $n=6$ ), and OXA-48-like + NDM ( $n=2$ ) (Table 1). Additionally, 70 non-carbapenemase-producing isolates served as negative controls; of these, 68 were clinical isolates with other beta-lactamases (e.g., extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL), AmpC) and two were quality control strains without beta-lactamase activity (*E. coli* ATCC 25922, *E. coli* J53).

All isolates were characterized for the presence of *bla*<sub>OXA-48-like</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>GIM</sub>, and *bla*<sub>KPC</sub> and of ESBL genes by PCR and subsequent Sanger sequencing as previously reported [8–11]. Additionally, all isolates negative for carbapenemases by PCR were tested for carbapenemase activity using the Carba NP test [6].

### Inoculation and processing of blood culture bottles

A bacterial suspension equivalent to 0.5 McFarland was diluted 1:1000. Subsequently, 10  $\mu$ L of this solution was mixed with 5 mL of human blood from healthy volunteers for a final inoculum of ~300 cfu/mL of blood and inoculated into a BD Bactec Plus Aerobic blood culture bottle (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). The bottles were then incubated in a Bactec FX automate (Becton Dickinson) until they flagged positive. All positive blood culture bottles were controlled for purity by inoculation of 100  $\mu$ L blood culture fluid onto sheep blood agar. From the blood cultures, 2 mL of fluid was taken to perform the tests.

### $\beta$ -CARBA test

For the  $\beta$ -CARBA test, 2 mL of blood culture fluid was mixed with 200  $\mu$ L of 10% SDS (AppliChem, Darmstadt, Germany) and incubated at room temperature for 5 min in order to lyse the erythrocytes. The sample was centrifuged for 1 min at 13,000 $\times$ g in a tabletop centrifuge and the supernatant discarded. The bacterial pellet was washed first with 1 mL distilled water, followed by 1 mL phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) to remove remaining blood cells and balance the pH value. Subsequently, the bacterial pellet was subjected to the  $\beta$ -CARBA test (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany) as recommended by the manufacturer for bacteria grown on solid media. Briefly, the pellet was mixed with 40  $\mu$ L of R1 reagent and 40  $\mu$ L of R2. Following incubation for 30 min at 37  $^{\circ}$ C, the test results were read. Any color change in the first 30 min, from yellow to orange, red, or purple, was interpreted as positive.

## Results

In the first part of the evaluation, a protocol for the analysis of blood cultures with the  $\beta$ -CARBA test was developed. To achieve a high inoculum, 2 mL of the blood culture was used and bacteria were concentrated, followed by a subsequent hemolysis of erythrocytes. We tested several hemolyzing agents, some of which compromised readability or gave rise to false-positive results (e.g., saponin, data not shown). With 10% SDS, complete hemolysis was reached with no interference with the  $\beta$ -CARBA test. A further washing with water and PBS was done to equilibrate the bacterial suspension and to facilitate reading of a color change. Using this method, the  $\beta$ -CARBA test showed good results and carbapenemase-producing isolates could be easily detected by the color change from yellow to red, purple, or orange (Fig. 1). All carbapenemases were detected, resulting in a sensitivity of 100% (Table 2). There were no differences between species and carbapenemases, also, weakly hydrolyzing enzymes could be easily interpreted, including all OXA-48-like producing isolates ( $n=25$ ). Isolates producing more than one carbapenemase were equally well detected. The overall specificity of the test was 94.3%, and 4/70 carbapenemase-negative isolates gave rise to false-positive results. The test from blood cultures was easy to perform and results were available after 20–45 min, with 15 min hands-on-time for the preparation of the blood culture and maximum 30 min incubation time until a color change could be observed. However, in 31 out of 70 isolates, a color change could be noted within the first 5 min.

**Table 1** Isolates included in the study

Carbapenemase production	No. of isolates						All species
	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>C. freundii</i>	Others	
Carbapenemase positive	25	1	18	7	14	5	70
OXA-48-like	9		12	2	2		25
OXA-48	6		9	2	2		19
OXA-162	1						1
OXA-181			2				2
OXA-204	1						1
OXA-232			1				1
OXA-244	1						1
KPC	9				1	1	11
KPC-2	8				1	1	10
KPC-3	1						1
NDM	5		4	2		4	15
NDM-1	5		3	2		4	14
NDM-7			1				1
VIM	1		1	1	11		14
VIM-1	1		1	1	9		12
VIM-2					2		2
GM		1		2			3
GIM-1		1		2			3
Double carbapenemase producers							2
NDM-1/OXA-232	1						1
NDM-5/OXA-181			1				1
Carbapenemase negative	15	3	50	1	1		70
Total	40	4	68	8	15	5	140

Others: *Citrobacter braakii* (n = 1), *Proteus mirabilis* (n = 1), *Providencia stuartii* (n = 1), *Raoultella ornitholytica* (n = 1), *Serratia marcescens* (n = 1)

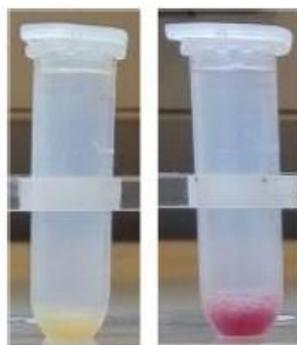
## Discussion

This study demonstrates that with the newly developed method, the most common carbapenemases can reliably be detected directly from positive blood cultures within 20–45 min.

However, both the inoculum and hemolysis procedure were critical to obtain a sensitivity of 100%. Hemolysis was necessary because erythrocytes affected the color of the test if they had not been hemolyzed. Additionally, after hemolysis, a higher inoculum of 2 ml blood culture fluid could be used, which was important for isolates with weak carbapenemase expression, e.g., OXA-48-like. With a lower inoculum (200 µl or 500 µl), not all carbapenemases were detected (data not shown). Using the newly developed protocol, all carbapenemases could be reliably detected. Our results are in line with a previous study on the β-CARBA test from solid media, reporting a better sensitivity when a higher inoculum was used [14]. Compared to previous evaluations [7, 14, 15], in the present study, more isolates with different carbapenemases were included and the β-CARBA test was evaluated for its use directly from positive blood cultures. The

sensitivity was 100%, which was similar [7] or higher than previously reported from solid media [14–16]. The specificity reached 94.3%, as four isolates gave rise to false-positive results (*K. oxytoca* (n = 3) and *E. coli* (n = 1)). Of these, three were ESBL producers (CTX-M-1, CTX-M-3, and CTX-M-9), and one *K. oxytoca* had no ESBL, but showed hyperproduction of the chromosomal K1 β-lactamase. When grown on sheep blood agar, the β-CARBA result was negative in 4/4 isolates, indicating either interference with the hemolysis procedure or culture conditions in the blood culture bottle. False-positive results with the β-CARBA test have been also reported before with isolates grown on solid agars, e.g., with *K. oxytoca* and hyperproduction of K1 β-lactamase or with *E. cloacae* and AmpC hyperproduction [19].

Other colorimetric tests have been evaluated for the use from blood cultures, e.g., the Carba NP test [2]. While this test yielded comparable results (sensitivity 97.9%, specificity 100%), it is not well suited for a routine laboratory since it requires preparation of different reagents before the test can be done. Additionally, 300 µl blood culture fluid has to be incubated with imipenem and zinc sulfate in liquid broth for



**Fig. 1** Results of the  $\beta$ -CARBA test from blood cultures: negative (left) and positive (right)

3 h, before the Carba NP test can be performed, resulting in longer hands-on time and time to result (3 to 5 h). Recently, two other colorimetric tests were assessed for the detection of CPE from blood culture: the CNPT-direct and the Blue Carba test, both modifications of the Carba NP test [17]. In this study, sensitivity from spiked blood cultures was 87% (53/61); most false-negative results were caused by OXA-48-producing isolates (sensitivity 64% (7/11)). Compared to the two studies mentioned above, our protocol shows a comparable performance with a higher sensitivity especially for OXA-48 carbapenemases and a significantly shorter time to result (20–45 min vs. 3–5 h) and hands-on time.

Other methods have been reported for the detection of carbapenemases directly from positive blood cultures, e.g., MALDI-TOF hydrolysis assays or molecular methods, e.g., the Verigene assay [3, 4]. Each approach has specific strengths and weaknesses regarding performance, associated costs, and time to result. Compared to the MALDI-TOF hydrolysis assay, the advantage of the  $\beta$ -CARBA test is the easy test format and the shorter time to result. Additionally, a broth culture and further incubation are necessary after a blood culture has become positive, requiring an additional 3 to 5 h compared to 20–45 min with the  $\beta$ -CARBA test. With the Verigene assay, the time to result is longer (~2 h) and the assay is considerably more expensive than the  $\beta$ -CARBA test. Furthermore, for both the MALDI-TOF hydrolysis assay and the Verigene assay, additional equipment and software is necessary. The detection of carbapenemases from blood cultures using an immunochromatographic assay has recently been reported [5]. Sensitivity and specificity of 100% and a short time to result (20–45 min) have been demonstrated with this method, but currently only KPC, NDM, and OXA-48-like can be detected. In contrast, with the  $\beta$ -CARBA test, other carbapenemases can be detected that are not included in the panels of the molecular or immunochromatographic assays.

**Table 2** Performance of the  $\beta$ -CARBA test from blood cultures

	$\beta$ -CARBA test	
	Positive	Negative
<b>Carbapenemase</b>		
<b>Ambler class D (n = 25)</b>		
OXA-48 (n = 19)	19	0
OXA-162 (n = 1)	1	0
OXA-181 (n = 2)	2	0
OXA-204 (n = 1)	1	0
OXA-232 (n = 1)	1	0
OXA-244 (n = 1)	1	0
Total class D (%)	25 (100)	0 (0)
<b>Ambler class A (n = 11)</b>		
KPC-2 (n = 10)	10	0
KPC-3 (n = 1)	1	0
Total class A (%)	11 (100)	0 (0)
<b>Ambler class B (n = 32)</b>		
NDM-1 (n = 14)	14	0
NDM-7 (n = 1)	1	0
VIM-1 (n = 12)	12	0
VIM-2 (n = 2)	2	0
GIM-1 (n = 3)	3	0
Total class B (%)	32 (100)	0 (0)
<b>OXA-48-like + NDM (n = 2)</b>		
OXA-232 + NDM-1 (n = 1)	1	0
OXA-181 + NDM-5 (n = 1)	1	0
Total (NDM + OXA-48-like) (%)	2 (100)	0 (0)
Total (%)	70 (100)	0 (0)
<b>No carbapenemases (n = 70)</b>		
Total (%)	4 (5.7)	66 (94.3)
Sensitivity, 95% CI	100%, 94.9–100	
Specificity, 95% CI	94.3%, 89.2–99.4	

CI confidence interval

In this proof of principle study, a new protocol for the detection of CPE from blood cultures using the  $\beta$ -CARBA test was developed and systematically assessed, resulting in the detection of the most important carbapenemases with 100% sensitivity and 94.3% specificity. The study included a large number of molecularly characterized isolates with the most prevalent carbapenemases in Germany, OXA-48-like, KPC, NDM, VIM, and GIM making up 98.3% of all CPE sent to the National Reference laboratory for nosocomial pathogens [18]. However, the study has some limitations. Since the prevalence of BSI with CPE at our institution is too low for a prospective evaluation, we had to use spiked blood cultures to include a sufficient number of isolates with different carbapenemase variants. Additionally, only one isolate of *E. cloacae* and

*C. freundii* was included, which overexpressed AmpC  $\beta$ -lactamase. It has been shown that these strains may produce false-positive results in the  $\beta$ -CARBA or other colorimetric tests [19]. Furthermore, aerobic blood culture bottles from one manufacturer were evaluated (Becton Dickinson). Results might not be identical when other blood culture media are used. Therefore, our results should be verified in a routine microbiology laboratory setting with a sufficient number of patients with BSI caused by CPE. Additionally, the  $\beta$ -CARBA test has been shown to be suboptimal for the detection of IMI- or GES-type carbapenemases [16]. These carbapenemases are rare in Germany, but in areas where these carbapenemases are more prevalent, the low sensitivity of the  $\beta$ -CARBA test for these variants has to be considered.

## Conclusions

The present study demonstrates that with the new method, OXA-48-like, KPC, NDM, GIM, and VIM carbapenemases from CPE can be reliably detected directly from positive blood culture bottles. With only 20–45 min time to result, the new method is more rapid than other currently available assays and can be performed in any routine microbiology laboratory, as no additional equipment is required. Especially in regions with a high CPE prevalence and/or in patients known to be colonized, our protocol may help to rapidly identify patients with CPE bloodstream infections and early optimize the management of patients with these difficult-to-treat infections. Further studies are necessary to evaluate the performance of the assay in clinical routine.

**Acknowledgements** We thank Stephan Göttig from the University Hospital of Frankfurt for providing carbapenemase-producing isolates.

**Funding information** This study was supported by grants from the Faculty of Medicine, University Hospital of Cologne.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** AH reports grants from German Center for Infection Research and personal fees from Becton Dickinson, Bruker Daltonics, MSD/Merck, Astellas, Gilead, and Oxoid, outside the submitted work. MM has no conflict of interest to report.

**Ethical approval** All procedures performed in this study were in accordance with the ethical standards of the institutional and national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

**Informed consent** The study was approved by the ethics committee of the University Hospital Cologne (approval number 08-160) and written informed consent was obtained from all healthy volunteers who donated blood for this study.

## References

1. Falagas ME, Lourida P, Poulidakos P, Rafailidis PI, Tansarli GS (2014) Antibiotic treatment of infections due to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: systematic evaluation of the available evidence. *Antimicrob Agents Chemother* 58(2):654–663
2. Dorlet L, Brechard L, Poirel L, Nordmann P (2014) Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from blood cultures. *Clin Microbiol Infect* 20(4):340–344. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12318>
3. Fernández J, Rodríguez-Lucas C, Fernández-Suárez J, Vázquez F, Rodicio MR (2016) Identification of Enterobacteriaceae and detection of carbapenemases from positive blood cultures by combination of MALDI-TOF MS and Carba NP performed after four hour subculture in Mueller Hinton. *J Microbiol Methods* 129:133–135. <https://doi.org/10.1016/j.jmimet.2016.08.014>
4. Ledebor NA, Lopansri BK, Dhiman N, Cavagnolo R, Carroll KC, Granato P, Thomson R, Butler-Wu SM, Berger H, Samuel L, Pancholi P, Swyers L, Hansen GT, Tran NK, Polage CR, Thomson KS, Hanson ND, Winegar R, Buchan BW (2015) Identification of gram-negative bacteria and genetic resistance determinants from positive blood culture broths by use of the Verigene gram-negative blood culture multiplex microarray-based molecular assay. *J Clin Microbiol* 53(8):2460–2472. <https://doi.org/10.1128/jcm.00581-15>
5. Hamprecht A, Velteschild JJ, Seifert H, Saleh A (2018) Rapid detection of NDM, KPC and OXA-48 carbapenemases directly from positive blood cultures using a new multiplex immunochromatographic assay. *PLoS One* 13(9):e0204157. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204157>
6. Nordmann P, Poirel L, Dorlet L (2012) Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 18(9):1503–1507. <https://doi.org/10.3201/eid1809.120355>
7. Compain F, Gallah S, Eckert C, Arlet G, Ramashefso A, Decre D, Lavollay M, Podgajen I (2016) Assessment of Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae with the Rapid and Easy-to-Use Chromogenic Beta Carba Test. *J Clin Microbiol* 54(12):3065–3068. <https://doi.org/10.1128/JCM.01912-16>
8. Hamprecht A, Poirel L, Göttig S, Seifert H, Kasse M, Nordmann P (2013) Detection of the carbapenemase GIM-1 in Enterobacter cloacae in Germany. *J Antimicrob Chemother* 68(3):558–561. <https://doi.org/10.1093/jac/dks447>
9. Hamprecht A, Rohde AM, Behnke M, Feigl S, Gastmeier P, Gebhardt F, Kern WV, Knobloch JK, Michnik A, Obermann B, Querbach C, Peter S, Schneider C, Schroder W, Schwab F, Taccconelli E, Wiese-Posselt M, Wille T, Willmann M, Seifert H, Zweigner J, Group D-AS (2016) Colonization with third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae on hospital admission: prevalence and risk factors. *J Antimicrob Chemother* 71(10):2957–2963. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw216>
10. Saleh A, Gottig S, Hamprecht AG (2018) Multiplex immunochromatographic detection of OXA-48, KPC, and NDM carbapenemases: impact of inoculum, antibiotics, and agar. *J Clin Microbiol* 56(5). <https://doi.org/10.1128/JCM.00050-18>
11. Koroska F, Göttig S, Kasse M, Steinmann J, Gatermann S, Sommer J, Wille T, Plum G, Hamprecht A (2017) Comparison of phenotypic tests and an immunochromatographic assay and development of a new algorithm for detection of OXA-48-like carbapenemases. *J Clin Microbiol* 55(3):877–883. <https://doi.org/10.1128/JCM.01929-16>
12. Gruber TM, Gottig S, Mark L, Christ S, Kempf VA, Wichelhaus TA, Hamprecht A (2015) Pathogenicity of pan-drug-resistant *Serratia marcescens* harbouring blaNDM-1. *J Antimicrob Chemother* 70(4):1026–1030. <https://doi.org/10.1093/jac/dku482>

13. Jazmati N, Hein R, Hamprecht A (2016) Use of an enrichment broth improves detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in clinical stool samples. *J Clin Microbiol* 54(2):467–470. <https://doi.org/10.1128/JCM.02926-15>
14. Simon M, Richert K, Pfennigwerth N, Pfeifer Y, Reischl U, Gatermann S, Gesiner A, Jantsch J (2018) Carbapenemase detection using the beta-CARBA test: influence of test conditions on performance and comparison with the RAPIDEC CarbaNP assay. *J Microbiol Methods* 147:17–19. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.02.005>
15. Shalom O, Adler A (2018) Comparative study of 3 carbapenem-hydrolysis methods for the confirmation of carbapenemase production in Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis* 90(2):73–76. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.10.008>
16. Bernabeu S, Dortet L, Naas T (2017) Evaluation of the beta-CARBA test, a colorimetric test for the rapid detection of carbapenemase activity in gram-negative bacilli. *J Antimicrob Chemother* 72(6):1646–1658. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx061>
17. de Lima-Morales D, Avila H, Soldi T, Dalmolin TV, Lutz L, Aquino V, Zavascki AP, Barth AL (2018) Rapid detection of carbapenemase production directly from blood culture by colorimetric methods: evaluation in a routine microbiology laboratory. *J Clin Microbiol*. <https://doi.org/10.1128/JCM.00325-18>
18. Pfennigwerth N (2018) Report of the National Reference Center for Nosocomial Pathogens. *Epid Bull* 28:263–267. <https://doi.org/10.17886/EpiBull-2018-034>
19. Noël A, Huang TD, Berlin C, Hoebeke M, Bouchahrouf W, Yunus S, Bogner P, Glupczynski Y (2017) Comparative evaluation of four phenotypic tests for detection of Carbapenemase-producing gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol* 55(2):510–518. <https://doi.org/10.1128/JCM.01853-16>

## 2.2 Publikation 2



# Systematic Comparison of Four Methods for Detection of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriales* Directly from Blood Cultures

Maria Meier,<sup>a</sup>  Axel Hamprecht<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Institute for Medical Microbiology, Immunology and Hygiene, University Hospital of Cologne, Cologne, Germany  
<sup>b</sup>DZIF (German Centre for Infection Research), Bonn-Cologne, Germany

**ABSTRACT** Early identification of infections caused by carbapenemase-producing *Enterobacteriales* (CPE) can help to optimize patient treatment and improve outcome. In this study, protocols for rapid detection of carbapenemase production directly from positive blood cultures were developed applying a concentration and hemolysis step before a test for carbapenemase production was performed. Four different methods (three modified colorimetric assays [ $\beta$ -Carba, bcCarba NP, and NeoRapid Carb] and a variation of the carbapenem inactivation method [CIM] test with blood cultures [bcCIM]) were assessed on blood cultures spiked with 185 different molecularly characterized *Enterobacteriales* isolates. The challenge collection included 81 carbapenemase-negative isolates and 104 CPEs (OXA-48 [ $n = 25$ ], NDM [ $n = 20$ ], KPC [ $n = 18$ ], VIM [ $n = 25$ ], GIM [ $n = 5$ ], OXA-48-like [ $n = 9$ ], and OXA-48-like plus NDM [ $n = 2$ ]). The sensitivity/specificity was 99.0%/95.1% for bcCarba NP, 99.0%/91.4% for NeoRapid Carb, 100%/95.1% for  $\beta$ -Carba and 100%/100% for bcCIM. Weakly hydrolyzing carbapenemases (e.g., OXA-48-like) were also well detected by the assays. The time to result was 20 to 45 min for  $\beta$ -Carba, 2 to 3 h for bcCarba NP, 2.5 to 2 h for NeoRapid Carb, and 18 to 24 h for bcCIM. In conclusion, all assays demonstrated good detection of CPE. The protocols can be easily implemented in any clinical microbiology laboratory and could help to optimize therapy early in bloodstream infections by CPE.

**KEYWORDS** carbapenemase, Carba NP, blood stream infection, NDM, OXA-48, KPC, VIM,  $\beta$ -Carba, CIM, CPE, colorimetric

**B**lood stream infections (BSI) with carbapenemase-producing *Enterobacteriales* (CPE) are associated with higher mortality and increased cost and length of hospital stay (1). The prompt initiation of appropriate antibiotic therapy can improve patient management and clinical outcome; the rapid detection of CPE is therefore of utmost importance. Standard methods used today (e.g., conventional disk diffusion testing or other susceptibility techniques) typically require 16 to 20 h after a blood culture has become positive to detect carbapenem resistance. In the case of carbapenem resistance, further confirmatory tests have to be performed for the detection of a carbapenemase, which take additional time, e.g., colorimetric tests, PCR, immunochromatographic tests (ICTs), or the carbapenem inactivation method (CIM) or modified CIM (mCIM) (2–5). Different assays can shorten the time for the detection of CPE from BSI, including, nucleic acid-based techniques, matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) analysis, and others (6–9). However, for most tests, significant hands-on time or additional incubation steps on agar or in broth are required. Furthermore, some tests (e.g., PCR and ICT) only target a subset of carbapenemases (e.g., the four most common: OXA-48, KPC, NDM, and VIM).

**Citation** Meier M, Hamprecht A. 2019. Systematic comparison of four methods for detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriales* directly from blood cultures. *J Clin Microbiol* 57:e00709-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.00709-19>

**Editor** Karen C. Carroll, Johns Hopkins University School of Medicine

**Copyright** © 2019 Meier and Hamprecht. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Axel Hamprecht, [axel.hamprecht@uk-koeln.de](mailto:axel.hamprecht@uk-koeln.de).

**Received** 1 May 2019

**Returned for modification** 28 May 2019

**Accepted** 7 August 2019

**Accepted manuscript posted online** 14 August 2019

**Published** 23 October 2019

**TABLE 1** Isolates included in the study

Carbapenemase production	No. of Isolates					All species
	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	Others <sup>a</sup>	
Carbapenemase positive	39	26	13	19	7	104
OXA-48-like	12	18	2	2		
OXA-48	7	14	2	2		
OXA-162	1	1				
OXA-181	1	1				
OXA-204	1					
OXA-232	1	1				
OXA-244	1	1				
KPC	16			1	1	
KPC-2	15			1	1	
KPC-3	1					
NDM	8	5	3		4	
NDM-1	8	4	3		4	
NDM-7		1				
VIM	2	2	4	16	1	
VIM-1	2	2	2	12		
VIM-2				3		
VIM-4			1	1		
VIM-27			1			
VIM-39					1	
GIM			4		1	
GIM-1			4		1	
Multiple carbapenemases						
NDM-1/OXA-232	1					
NDM-5/OXA-181		1				
Carbapenemase negative	18	55	3		3	81
Total	57	81	16	21	10	185

<sup>a</sup>Others includes *K. oxytoca*, *Citrobacter baakii*, *Enterobacter asburiae*, *Raoultella ornithinolytica*, *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii*, and *Serratia marcescens*.

The advantage of colorimetric assays (e.g., Carba NP test) is the broader detection of carbapenemase activity than for most available PCRs or ICTs. Colorimetric assays contain a carbapenem which is hydrolyzed by a carbapenemase and subsequently leads to a pH shift resulting in a color change of an indicator (e.g., bromothymol blue or phenol red) (2, 10). Besides Carba NP, several commercial colorimetric tests are available, e.g., Rapidec Carba NP, NeoRapid CARB, or  $\beta$ -CARBA (11–15). These tests have been validated for the use from solid media; additionally, protocols for the direct detection of CPE from blood cultures have been proposed. However, usually, an additional culture on solid or liquid medium (2 to 4 h) is necessary, which is followed by lysis and incubation in the presence of a carbapenem and the pH indicator, resulting in a long hands-on time and a long time to result (6). Most studies have investigated a single assay only, and few data are available on the comparison of different phenotypic tests for CPE detection from blood cultures (16).

In the present study, we developed rapid protocols for the detection of carbapenemases from positive blood culture bottles and systematically compared the performance of four different tests on a collection of 185 *Enterobacterales* isolates.

#### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial isolates.** A total of 185 nonduplicate *Enterobacterales* isolates from different years, wards, and centers were included in the analysis (Table 1). One hundred four isolates were carbapenemase producers which had been characterized in previous studies (17–20): OXA-48 ( $n = 25$ ), NDM ( $n = 20$ ), KPC ( $n = 18$ ), VIM ( $n = 25$ ), GIM ( $n = 5$ ), OXA-48-like ( $n = 9$ ), OXA-48-like plus NDM ( $n = 2$ ). Additionally, 81 strains served as negative controls, most of them produced extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL);

additionally, two quality control strains without beta-lactamase activity were included (*Escherichia coli* ATCC 25922 and *E. coli* J53).

All strains were analyzed phenotypically for carbapenemases using meropenem disks in combination with the inhibitors EDTA, boronic acid, and cloxacillin (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy). Additionally, all isolates with elevated MICs for eropenem, imipenem, or meropenem were assessed by PCR for the presence of *bla*<sub>CTXA-48-90w</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, and *bla*<sub>KPC</sub> (17–19, 21, 22). Carbapenemase-negative isolates were characterized for ESBLs using the CLSI combination disk test. Additionally, isolates were assessed by microarray Check-MDR CT101 (Check-Points, Wageningen, Netherlands) for production of *bla*<sub>CTX-M.1</sub> (group 1), *bla*<sub>CTX-M.2</sub> (group 2), *bla*<sub>CTX-M.9</sub> (group 3), *bla*<sub>TEM</sub>, and *bla*<sub>SHV</sub>. Isolates which were positive for *bla*<sub>CTX-M</sub> were further characterized by sequencing the open reading frame as previously described (23) using primers listed in Table S4 in the supplemental material.

**Inoculation and processing of blood cultures.** A bacterial suspension equivalent to McFarland 0.5 was prepared in a 0.85% sodium-chloride solution from bacterial colonies grown on Columbia blood agar and diluted 1:1,000. Subsequently, 10  $\mu$ l of this diluted suspension was mixed with 5 ml human blood from healthy volunteers for a final inoculum of ~300 CFU/ml and inoculated into BD Bactec Plus Aerobic blood culture bottles (BD, Heidelberg, Germany). Bottles were incubated in a Bactec FX automated blood culture system (BD); after blood cultures were flagged as positive, 7 ml blood culture fluid was drawn and used for the different assays. Additionally, all blood cultures were tested for purity by inoculating 100  $\mu$ l of blood culture fluid onto sheep blood agar.

**Evaluation of hemolysis protocols.** The first step of developing rapid test protocols for the analysis of blood cultures was the evaluation of a suitable hemolytic agent for each test method. Therefore, the following hemolytic agents were assessed with 10 test isolates: saponin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), sodium dodecyl sulfate (SDS; AppliChem, Darmstadt, Germany), ammonium-chloride potassium lysis buffer (ACK; consisting of 150 mM KHCO<sub>3</sub> [Carl Roth, Karlsruhe, Germany] and 10 mM NH<sub>4</sub>Cl [Sigma-Aldrich]), and Triton X (Sigma-Aldrich). The impacts of the hemolysis protocols on results and readability were analyzed. Additionally, different sample volumes were compared to achieve the overall best sensitivity without giving rise to false-positive results. For the  $\beta$ -CARBA test, 10% SDS provided complete hemolysis without interference with the test. For the Carba NP test and NeoRapid CARB, 5% saponin showed the best results for hemolysis with minimal interference and was therefore selected for the study. Triton-X and ACK lysis buffer resulted in less complete hemolysis and/or gave rise to false-positive results (data not shown). After blood culture fluid was drawn for the different protocols and erythrocytes were lysed, the bacterial pellet was washed with water and phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) for all protocols to optimize readability and pH values.

**bcCarba NP test.** A modified procedure of Carba NP using blood cultures (bcCarba NP) was developed that did not require an additional incubation in brain heart infusion (BHI) broth as previously described for this assay (2, 6). For bcCarba NP, 2  $\times$  1 ml blood culture fluid was transferred to 1.5-ml reaction tubes and mixed with 200  $\mu$ l of saponin 5% (Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany) to lyse the blood cells. After incubating at room temperature for 5 min, the samples were centrifuged and supernatants discarded (all centrifugation steps were undertaken at 13,000  $\times$  g for 1 min). The bacterial pellets were washed with 1 ml distilled water and 1 ml PBS. Subsequently, 50  $\mu$ l NaCl 0.85% and 50  $\mu$ l bacterial protein extraction reagent (B-PERII; Thermo Fisher Scientific, Duisburg, Germany) were added to lyse the bacterial cells. After 30 min of incubation at room temperature, 100  $\mu$ l test solution without imipenem (negative control) was added to the first reaction tube and 100  $\mu$ l with imipenem (positive control) was added to the other reaction tube. During incubation at 37°C for a maximum of 2 h, any color change of the positive control from red to orange or yellow, while the negative control remained red, was interpreted as positive. Test solutions were prepared according to the methods described by Nordmann et al. (2).

**$\beta$ -CARBA test.** For the  $\beta$ -Carba test (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany), 2 ml of the positive blood culture was mixed with 200  $\mu$ l of 10% SDS (AppliChem, Darmstadt, Germany) and incubated at room temperature for 5 min to lyse erythrocytes. The sample was centrifuged subsequently, and the supernatant was discarded. The bacterial pellet was washed with 1 ml distilled water and 1 ml PBS. After centrifugation and discarding the supernatant, the bacterial pellet was subjected to the  $\beta$ -Carba test as recommended by the manufacturer. Briefly, the pellet was mixed with 40  $\mu$ l of R1 reagent and 40  $\mu$ l of R2. After incubating at 37°C for 30 min, the results were read. Any color change within these 30 min from yellow to orange, red, or purple was interpreted as positive.

**NeoRapid CARB.** For the NeoRapid CARB (Rosco, Taastrup, Denmark), 1 ml of the blood culture fluid was lysed with 5% saponin as described above for the Carba NP test. After washing, 150  $\mu$ l 0.85% NaCl and 50  $\mu$ l B-PERII were added and incubated at room temperature for 30 min; 100  $\mu$ l of this mixture was transferred to a second tube. Then, 100  $\mu$ l 0.85% NaCl was added to both tubes. The tablet containing imipenem was added to one tube (positive control), the tablet without imipenem was added to the other (negative control). During incubation at 37°C for 60 to 90 min, any color change of the positive control from red to orange or yellow, while the negative control remained red, was interpreted as positive.

**bcCIM.** For the blood culture CIM (bcCIM) test, 10  $\mu$ l of 10 mM ZnSO<sub>4</sub> was added to 1 ml of the blood culture fluid. A 10- $\mu$ g meropenem disk (Oxoid, Wesel, Germany) was immersed in the fluid and incubated at 37°C for 2 h. After incubation, the meropenem disk was removed and placed on a Muller-Hinton agar (MHA) plate which had been inoculated with a suspension of *E. coli* ATCC 25922 (0.5 McFarland). The plate was incubated at 37°C for 16 to 22 h. Subsequently, the inhibition zone was measured and classified as follows: >19 mm, negative; 15 to 19 mm, indeterminate; <15 mm, positive for carbapenemase production (4).



**FIG 1** Test results with  $\beta$ -Carba, bcCarba NP, NeoRapid Carba, and bcCIM. A positive result for each test is shown on the left, with a negative result on the right.

## RESULTS

With the new protocols that include a lysis/concentration step, good and rapid results were achieved. Carbapenemase production was detected by color change for  $\beta$ -Carba, from yellow to either orange, red, or purple, and from red to red/orange or yellow for bcCarba NP and the NeoRapid CARB kit (Fig. 1).  $\beta$ -Carba detected all carbapenemases, resulting in a sensitivity of 100% and specificity of 95.1% (Table 2). There were no differences between species and carbapenemases; also, weakly hydrolyzing enzymes were easily interpreted, including all OXA-48-like-producing isolates ( $n = 34$ ) (see Table S1 in the supplemental material). bcCarba NP also gave good results, reaching 99.0% sensitivity and 95.2% specificity (Table 2). Only one of two OXA-244-expressing isolates produced a false-negative result (Table 3; see also Table S3). All other OXA-48-like-carbapenemases were detected. NeoRapid CARB detected all carbapenemases except one OXA-244, resulting in a sensitivity of 99.0% and specificity of 91.4% (Table 2).

Most of the false-positive results with  $\beta$ -Carba, Carba NP, or NeoRapid CARB KIT were caused by *Klebsiella oxytoca* (three isolates) (Table S3).

For the adaptation of the CIM test for blood culture (bcCIM), different volumes were tested. The best results were achieved with 1 ml blood culture fluid. To improve the detection of metallo-beta-lactamases (MBL), supplementation with  $ZnSO_4$  was necessary. With this method, the presence of carbapenemases was detected reliably by assessing the inhibition zone (Fig. 1). All carbapenemases were detected by bcCIM and there were no false-positive results, resulting in a sensitivity of 100% and specificity of 100%.

## DISCUSSION

This study demonstrated that with the modification of phenotypic tests proposed, rapid and reliable detection of carbapenemase production can be achieved directly from positive blood cultures. With all methods, the most common carbapenemases could be detected within 20 to 45 min ( $\beta$ -Carba test), 1.5 to 2 h (NeoRapid CARB), 2 to 3 h (bcCarba NP), or 18 to 24 h (bcCIM). To achieve these results, it was necessary to concentrate bacteria and to hemolyze erythrocytes in order to avoid an impact on the color/reading of the colorimetric tests. Both the hemolysis procedure and inoculum were critical to obtain the observed sensitivities.

The  $\beta$ -Carba test achieved excellent results for the detection of the most common

**TABLE 2** Comparison of the performance, hands on time, and costs of the different assays

Category	Value			
	$\beta$ -Carba	bcCarba NP	NeoRapid CARB	bcCIM
Sensitivity (% [CI] <sup>a</sup> )	100 (96.5–100)	99.0 (97.2–100)	99.0 (97.2–100)	100 (96.5–100)
Specificity (% [CI])	95.1 (90.3–99.8)	95.1 (90.3–99.8)	91.4 (85.2–97.8)	100 (95.6–100)
Time to result	20–45 min	2–3 h	1.5–2 h	18–24 h
Cost per test (\$)	~6.20	~1.90	~2.40	~0.85

<sup>a</sup>CI, 95% confidence interval.

**TABLE 3** Performance of the assays stratified by carbapenemase variant

Carbapenemase	No. of isolates <sup>a</sup>							
	$\beta$ -Carba		bcCarba NP		NeoRapid CARB		bcCIM	
	P	N	P	N	P	N	P	N
<b>Ambler class D (n = 34)</b>								
OXA-48 (n = 25)	25		25		25		25	
OXA-162 (n = 2)	2		2		2		2	
OXA-181 (n = 2)	2		2		2		2	
OXA-204 (n = 1)	1		1		1		1	
OXA-232 (n = 2)	2		2		2		2	
OXA-244 (n = 2)	2		1	1	1	1	2	
Total (n [%])	34 (100)		33 (97.1)	1 (2.9)	33 (97.1)	1 (2.9)	34 (100)	
<b>Ambler class A (n = 18)</b>								
KPC-2 (n = 17)	17		17		17		17	
KPC-3 (n = 1)	1		1		1		1	
Total (n [%])	18 (100)		18 (100)		18 (100)		18 (100)	
<b>Ambler class B (n = 50)</b>								
NDM-1 (n = 19)	19		19		19		19	
NDM-7 (n = 1)	1		1		1		1	
VIM-1 (n = 18)	18		18		18		18	
VIM-2 (n = 3)	3		3		3		3	
VIM-4 (n = 2)	2		2		2		2	
VIM-27 (n = 1)	1		1		1		1	
VIM-39 (n = 1)	1		1		1		1	
GIM-1 (n = 5)	5		5		5		5	
Total (n [%])	50 (100)		50 (100)		50 (100)		50 (100)	
OXA-48 plus NDM-1 (n = 2)	2		2		2		2	
Total (n [%])	2 (100)		2 (100)		2 (100)		2 (100)	
Total carbapenemase positive (n [%])	104 (100)		103 (99.0)	1 (1.0)	103 (99.0)	1 (1.0)	104 (100)	
<b>No carbapenemases (n = 81)</b>								
Total carbapenemase negative (n [%])	4 (4.9)	77 (95.1)	4 (4.9)	77 (95.1)	7 (8.6)	74 (91.4)		81 (100)

<sup>a</sup>P, positive result; N, negative result.

carbapenemases (VIM, KPC, NDM, OXA-48-like, and GIM), which exceeded those reported from other studies on this assay on bacterial colonies from agar plates (15, 17). The good performance of this assay from blood cultures could also be related to the medium and the inoculum, which have previously been shown to affect the performance of this test (15). Additionally, no isolates with IMI or GES production were included, which are not well detected with this test (17). Nevertheless, the  $\beta$ -Carba test achieved very reliable results in this study, with a sensitivity of 100% and specificity of 95.1%. These results are in line with results from the previous study on this assay from blood cultures (20); however, similar isolate collections were used in both studies, which could partly explain the comparable performance.

The detection of carbapenemases by bcCarba NP directly from positive blood cultures showed excellent sensitivity (99.0%) and specificity (95.1%). Compared to previous studies on Carba NP from blood cultures, bcCarba NP does not require additional cultivation on solid or in liquid media (6, 16), leading to a significant time reduction (2 to 3 h time to result instead of 5 to 6 h). The reliability of our protocol is similar to that in previous studies (6) but with a higher sensitivity in isolates producing OXA-48-like carbapenemases.

The modification of NeoRapid CARB allows the reliable detection of carbapenemases within a short time, without the need to prepare numerous different reagents, as for the "homemade" Carba NP/bcCarba NP test. Our protocol differed from that provided by the manufacturer by the use of saponin instead of Triton X-100 for hemolysis, because the protocol provided by the manufacturer gave rise to false-negative results among our OXA-48-producing isolates (data not shown). The specificity

of the NeoRapid CARB was slightly lower than for the other tests. However, other studies show similar results on isolates grown on solid medium, with sensitivity and specificity values ranging from 89% to 100% and 70% to 100%, respectively (11, 13, 14).

We also tested another commercial version of Carba NP (Rapidec Carba NP). However, with positive blood cultures as a matrix, no reliable results were achieved and the assay was not further investigated.

The overall better performance of the  $\beta$ -Carba test than of the two other colorimetric tests could be the result of the higher volume/inoculum which could be used with this assay (2 ml) or the different hemolysis reagent. For the other assays, a volume of 2 ml gave rise to false-positive results and impaired readability; therefore, 0.5 ml (NeoRapid CARB) or 1 ml (bcCarba NP) was employed. Additionally, different hemolysis reagents had to be used, since some reagents affected readability and gave rise to false-positive or false-negative results, e.g., when SDS was used with bcCarba NP or NeoRapid Carb. We observed that *K. oxytoca* isolates gave rise to false-positive results in the three colorimetric tests from blood culture fluid (see Table S3 in the supplemental material). These isolates were correctly identified as carbapenemase negative when the tests were performed from Columbia blood agar, and the false-positive result is therefore likely caused by the blood culture medium or the hemolysis procedure. It is difficult to reliably identify the cause of the false-positive results, as three different tests ( $\beta$ -Carba test, bcCarba NP, and NeoRapid CARB) were affected; additionally, two different hemolytic agents (SDS for  $\beta$ -Carba and saponin for bcCarba NP and NeoRapid CARB) and test principles were involved. The three *K. oxytoca* isolates also produced different  $\beta$ -lactamases (Hyper K1, CTX-M-9, and CTX-M-3/TEM-1). Therefore, the false-positive results are linked to the species rather than the  $\beta$ -lactamase. Noel et al. also describe false-positive results for *K. oxytoca* and the  $\beta$ -Carba test (14). Among our collection, *K. oxytoca* was overrepresented compared to the epidemiology of Gram-negative bloodstream infections. Likely, this problem will occur less frequently in clinical routine. A solution could be to perform species identification from blood cultures, at least when a positive result is achieved. This can ideally be done by MALDI-TOF, using the same pellet as for the carbapenemase assays (24). This has the advantage that the species identification provides additional information for the selection of the most appropriate therapy.

The false-negative results for bcCarba NP ( $n = 1$ ) and NeoRapid CARB ( $n = 1$ ) were both recorded in OXA-244-producing isolates (Table S3). The tests were repeated both from a freshly inoculated blood culture and from bacteria harvested from Columbia blood agar, which also led to the same results. Therefore, it is unlikely that the hemolysis protocol caused the false-negative results. OXA-244 belongs to the group of OXA-48-like carbapenemases which are weakly hydrolyzing enzymes, which likely explains these results. A lower sensitivity of Carba NP for OXA-48-like carbapenemases (91.3% versus 100% for other carbapenemases) was described previously (6).

The CIM test and the modified version (mCIM) are based on the inactivation of meropenem by carbapenemases (3, 4) and are recommended by CLSI as a phenotypic method for carbapenemase detection on isolates grown on solid media. In the present study, a protocol for the use from blood cultures (bcCIM) was developed. With bcCIM, all carbapenemase-producing isolates were reliably identified, and no carbapenemase-negative strain led to false-positive results. Our results are in line with studies using samples from solid media (3, 4). Using blood culture samples, MBLs were only partly detected. To improve the detection of MBLs, zinc sulfate was added to the blood samples, leading to a sensitivity of 100% including MBLs. An improved sensitivity of mCIM with zinc supplementation (zCIM) was also recently reported for isolates grown on solid media (17). Despite the high sensitivity, specificity, and low costs, bcCIM has the disadvantage of a long time to result and therefore cannot be considered a rapid test. It has to be further investigated if similar results can be reached by a shorter incubation time (e.g., 4 to 6 h instead of 18 to 24 h).

Other tests for the detection of carbapenemases or carbapenem resistance from blood cultures are available, e.g., PCR, ICTs, or the newly developed EUCAST rapidAST.

Using rapidAST, carbapenem resistance can be detected for *E. coli* or *Klebsiella pneumoniae* within 4 to 8 h, but no breakpoints are currently available for other *Enterobacteriales* species (25). Molecular assays or ICTs only detect the carbapenemases that are targeted, e.g., usually the four or five most common ones (7, 9). However, the identification of the carbapenemase by PCR or ICT has the advantage that treatment can be more rapidly adapted, e.g., ceftazidime-avibactam can be used in most infections by KPC or OXA-48-like producers.

The decision to perform any of the tested assays (or alternative assays such as PCR or ICT) largely depends on the epidemiology and on individual risk factors. In countries with high prevalence (e.g., Italy, Greece or India), the additional information about carbapenemase production will likely be useful and help in clinical decision making. In a low-endemicity setting such as in Germany or the northern European countries with CPE prevalence of <1%, the tests will likely not be cost effective and could be reserved only for patients with risk factors, e.g., patients that are known to be colonized with a CPE or those that have been transferred from a high-risk region.

In this study, we improved current methods for the detection of carbapenemases from blood cultures and systematically compared four different assays on a large set of molecularly characterized CPE isolates. The tests assessed in this study are easy to perform and can detect many different carbapenemases, as they are based on the hydrolysis of a carbapenem. Our study has some limitations. Not all different carbapenemase variants could be tested. Nonduplicate clinical isolates from different years, wards, and centers were used for this evaluation. However, molecular typing was not performed for all isolates, and so clonality of some isolates cannot be fully excluded. Additionally, spiked blood cultures were used, which might not reflect the different conditions present in clinical blood cultures (e.g., different inoculum or incubation time or presence of antibiotics) and could therefore lead to different results compared to those with clinical samples. Nevertheless, we challenged the assays with isolates of 11 different species and 16 different carbapenemases, including many weakly hydrolyzing variants. All assays performed well and could help to optimize therapy early in bloodstream infections by CPE. The protocols can be easily implemented in any clinical microbiology laboratory. Further tests are required to assess the performance of the assays on clinical samples.

#### SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/JCM.00709-19>.

**SUPPLEMENTAL FILE 1**, PDF file, 0.6 MB.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Yvonne Stelzer and Anne Brunke for excellent technical assistance.

This study was supported by grants from the Faculty of Medicine, University Hospital Cologne, to M.M. and A.H. A.H. was supported by grants from the DZIF (German Centre for Infection Research).

We declare no conflict of interest.

#### REFERENCES

- Falagas ME, Lourida P, Poulidakos P, Rafailidis PI, Tansarli GS. 2014. Antibiotic treatment of infections due to carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: systematic evaluation of the available evidence. *Antimicrob Agents Chemother* 58:654–663. <https://doi.org/10.1128/AAC.01222-13>.
- Nordmann P, Poirel L, Dortet L. 2012. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 18:1503–1507. <https://doi.org/10.3201/eid1809.120355>.
- van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LM. 2015. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in Gram-negative rods. *PLoS One* 10:e0123690. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123690>.
- Pierce VM, Simner PJ, Lonsway DR, Roe-Carpenter DE, Johnson JK, Brasso WB, Bobenchik AM, Lockett ZC, Charnot-Katsikas A, Ferraro MJ, Thomson RB, Jr, Jenkins SG, Limbago BM, Das S. 2017. Modified carbapenem inactivation method for phenotypic detection of carbapenemase production among *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 55:2321–2333. <https://doi.org/10.1128/JCM.00193-17>.
- Greissl C, Saleh A, Hamprecht A. 2019. Rapid detection of OXA-48-like, KPC, NDM, and VIM carbapenemases in *Enterobacteriales* by a new multiplex immunochromatographic test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 38:331–335. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3432-2>.
- Dortet L, Brechard L, Poirel L, Nordmann P. 2014. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from blood cultures. *Clin Microbiol Infect* 20:340–344. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12318>.
- Ledeboer NA, Lopansri BK, Dhiman N, Cavagnolo R, Carroll KC, Granato

- P, Thomson R, Butler-Wu SM, Berger H, Samuel L, Pancholi P, Swyers L, Hansen GT, Tran NK, Polage CR, Thomson KS, Hanson ND, Winegar R, Buchan BW. 2015. Identification of Gram-negative bacteria and genetic resistance determinants from positive blood culture broths by use of the Verigene Gram-negative blood culture multiplex microarray-based molecular assay. *J Clin Microbiol* 53:2460–2472. <https://doi.org/10.1128/JCM.00581-15>.
8. Fernández J, Rodríguez-Lucas C, Fernández-Suárez J, Varquez F, Rodicio MR. 2016. Identification of *Enterobacteriaceae* and detection of carbapenemases from positive blood cultures by combination of MALDI-TOF MS and Carba NP performed after four hour subculture in Mueller Hinton. *J Microbiol Methods* 129:133–135. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.08.014>.
  9. Hamprecht A, Vehreschild JJ, Seifert H, Saleh A. 2018. Rapid detection of NDM, KPC and OXA-48 carbapenemases directly from positive blood cultures using a new multiplex immunochromatographic assay. *PLoS One* 13:e0204157. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204157>.
  10. Bennett PM, Walsh TR, Payne DJ, MacGowan AP. 1995. A clinical isolate of *Aeromonas sobria* with three chromosomally mediated inducible  $\beta$ -lactamases: a cephalosporinase, a penicillinase and a third enzyme, displaying carbapenemase activity. *J Antimicrob Chemother* 35:271–279. <https://doi.org/10.1093/jac/35.2.271>.
  11. Dortet L, Agathine A, Naas T, Cuzon G, Poirel L, Nordmann P. 2015. Evaluation of the RAPIDEC CARBA NP, the Rapid CARB Screen and the Carba NP test for biochemical detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 70:3014–3022. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv213>.
  12. Poirel L, Nordmann P. 2015. Rapidec Carba NP test for rapid detection of carbapenemase producers. *J Clin Microbiol* 53:3003–3008. <https://doi.org/10.1128/JCM.00977-15>.
  13. Huber CA, Sidjabat HE, Zowawi HM, Kvaskoff D, Reed S, McNamara JF, McCarthy KL, Harris P, Toh B, Willan AM, Paterson DL. 2016. Detection of carbapenemase activity in *Enterobacteriaceae* using LC-MS/MS in comparison with the neo-rapid CARB kit using direct visual assessment and colorimetry. *J Microbiol Methods* 131:68–72. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.10.005>.
  14. Noel A, Huang TD, Berhin C, Hoebeke M, Bouchahrouf W, Yunus S, Bogaerts P, Glupczynski Y. 2017. Comparative evaluation of four phenotypic tests for detection of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol* 55:510–518. <https://doi.org/10.1128/JCM.01853-16>.
  15. Simon M, Richert K, Pfennigwerth N, Pfeifer Y, Reischl U, Gatermann S, Gessner A, Jantsch J. 2018. Carbapenemase detection using the beta-CARBA test: influence of test conditions on performance and comparison with the RAPIDEC CarbaNP assay. *J Microbiol Methods* 147:17–19. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.02.005>.
  16. Lima-Morales D, Avila H, Soldi T, Dalmolin TV, Lutz L, Aquino V, Zavascki AP, Barth AL. 2018. Rapid detection of carbapenemase production directly from blood culture by colorimetric methods: evaluation in a routine microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 56:e00325-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.00325-18>.
  17. Baeza LL, Pfennigwerth N, Greisl C, Gottig S, Saleh A, Stelzer Y, Gatermann SG, Hamprecht A. 18 March 2019. Comparison of five methods for detection of carbapenemases in *Enterobacteriales* with proposal of a new algorithm. *Clin Microbiol Infect* <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.03.003>.
  18. Jazmati N, Jazmati T, Hamprecht A. 2017. Importance of pre-enrichment for detection of third-generation cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* (3GCREB) from rectal swabs. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 36:1847–1851. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3000-1>.
  19. Koroska F, Gottig S, Kaase M, Steinmann J, Gatermann S, Sommer J, Wille T, Plum G, Hamprecht A. 2017. Comparison of phenotypic tests and an immunochromatographic assay and development of a new algorithm for detection of OXA-48-like carbapenemases. *J Clin Microbiol* 55:877–883. <https://doi.org/10.1128/JCM.01929-16>.
  20. Meier M, Hamprecht A. 2019. Rapid detection of carbapenemases directly from positive blood cultures by the beta-CARBA test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 38:259–264. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3422-4>.
  21. Hamprecht A, Poirel L, Göttig S, Seifert H, Kaase M, Nordmann P. 2013. Detection of the carbapenemase GIM-1 in *Enterobacter cloacae* in Germany. *J Antimicrob Chemother* 68:558–561. <https://doi.org/10.1093/jac/dks447>.
  22. Hamprecht A, Rohde AM, Behnke M, Feihl S, Gastmeier P, Gebhardt F, Kern WW, Knobloch JK, Mischnik A, Obermann B, Querbach C, Peter S, Schneider C, Schroder W, Schwab F, Tacconelli E, Wiese-Posselt M, Wille T, Willmann M, Seifert H, Zweigner J, DZIF-ATHOS Study Group. 2016. Colonization with third-generation cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* on hospital admission: prevalence and risk factors. *J Antimicrob Chemother* 71:2957–2963. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw216>.
  23. Lucena Baeza L, Pfennigwerth N, Hamprecht A. 17 July 2019. Rapid and easy detection of carbapenemases in *Enterobacteriales* in the routine laboratory using the new GenePOC Carba/Revogene Carba C assay. *J Clin Microbiol* <https://doi.org/10.1128/JCM.00597-19>.
  24. Christner M, Rohde H, Welters M, Sobottka I, Wegscheider K, Aepfelbacher M. 2010. Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by use of matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry fingerprinting. *J Clin Microbiol* 48:1584–1591. <https://doi.org/10.1128/JCM.01831-09>.
  25. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2018. EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from positive blood culture bottles, v 1.0. [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/RAST/Methodology\\_EUCAST\\_RAST\\_v1\\_20181126.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/RAST/Methodology_EUCAST_RAST_v1_20181126.pdf).

### **2.3 Darstellung der Eigenleistung**

Alle Arbeiten zur Etablierung der Testprotokolle direkt aus Blutkulturen wurden von mir selbstständig durchgeführt. Diese beinhalten sowohl die technische Durchführung, als auch den systematischen Vergleich der folgenden Schritte: die Etablierung geeigneter Hämolyseverfahren, die Etablierung der Testprotokolle, die Beimpfung der Blutkulturen, die Bearbeitung der Blutkulturen, die Evaluierung der Testprotokolle und die statistische Auswertung der Ergebnisse.

Die Material-, Methoden- und Ergebnisteile der Publikationen wurden von mir geschrieben.

Mein Doktorvater Prof. Dr. med. Axel Hamprecht hat das Thema und die technischen Verfahren ausgewählt, die Einleitungen und Diskussionen der Publikationen verfasst und das Manuskript finalisiert.

## **3. Diskussion**

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung und Evaluierung (Proof of Concept) von Testverfahren, welche die Detektion von Carbapenemase-produzierenden Stämmen in positiven Blutkulturen in direkter Analyse ohne Verwendung einer erneuten zeitintensiven Anzucht auf festen Kulturmedien ermöglichen. Hierzu wurden die Blutkulturproben in speziellen Verfahren derart aufbereitet, dass sie direkt für die Tests verwendet werden konnten.

Die entscheidenden Schritte der nunmehr hierdurch ermöglichten, direkten Analyse, die im Rahmen dieser Dissertation untersucht und optimiert werden mussten, bestanden erstens in der Ermittlung eines geeigneten pH-Wertes in den Proben und dessen Optimierung, sowie zweitens in der Hämolyse mittels eines geeigneten Hämolyseverfahrens und der damit einhergehenden erforderlichen Konzentrierung der Bakteriendichte. Durch die entsprechende adäquate Anpassung dieser wesentlichen Aufbereitungsschritte konnte die Zeit zur Resistenzbestimmung signifikant von vorher 5-6 Stunden im Rahmen der klassischen, auf Kulturmedien beruhenden

Resistenzbestimmung, auf nunmehr maximal 3 Stunden, beim  $\beta$ -Carba-Test sogar auf lediglich ca. 30-45 Minuten, reduziert werden [80].

Die Sensitivitäten und Spezifitäten des Carba-NP-Tests, des  $\beta$ -Carba-Tests, des Neo-Rapid Carb Kits und des CIM-Tests, die mithilfe der hier präsentierten Methoden erreicht werden konnten, lagen zwischen 99 und 100 % beziehungsweise 91 und 100 %. Die Genauigkeiten sind somit vergleichbar oder besser als in anderen Studien [83, 84].

Bei den hier erarbeiteten Varianten der colorimetrischen Tests zur Verkürzung der Detektionszeit ist im Vergleich zu ähnlichen Verfahren dank des Hämolyse-schritts kein weiterer Kultivierungsschritt auf der Basis nährstoffreicher Universalmedien wie Schoko-Agar oder Brain Heart Infusion notwendig. In den Protokollen von Dortet et al. oder Nastro et al. werden hierfür beispielsweise 3 bzw. zusätzliche 4 Stunden beansprucht, sodass dort die Gesamtdetektionszeit bei ca. 4-6 h liegt [80, 81]. Die von De Lima Morales et al. vorgestellte Modifikation von colorimetrischen Tests bedient sich des Kultivierungsschrittes in lysogeny broth Medium (LB-Medium), wodurch die Detektionszeit 3-5 h in Anspruch nimmt. Hinzukommend zeigte sie mit 64 % eine deutlich unterlegene Sensitivität in Bezug auf OXA-48-produzierende Enterobakterien [79].

Andere Detektionsmethoden, die mit Proben direkt aus Blutkulturen auskommen, sind die PCR als einzige ausreichend evaluierte Methode und die MALDI-TOF-MS, sowie immunchromatographische Tests. Diese Verfahren liefern sehr zuverlässige Ergebnisse, wobei die PCR als Goldstandard in der Diagnostik gilt. Sie liefert Ergebnisse innerhalb von ca. 3 h. Die detektierbaren Carbapenemasen sind bei der PCR allerdings auf bereits bekannte Typen beschränkt, die durch die jeweiligen PCR Primer erfasst werden können. Unbekannte Carbapenemasetypen werden bei der PCR-basierten Detektion nicht detektiert. Die Real-Time-Multiplex-PCR ermöglicht zwar den Nachweis mehrerer Carbapenemasegene gleichzeitig, allerdings handelt es sich hierbei lediglich um die am häufigsten vorkommenden Versionen. Sollte das zu testende Isolat eine weniger häufig auftretende Carbapenemase produzieren, wäre ggf. eine weitere PCR notwendig, was zu einem erhöhten Zeitaufwand und höheren Kosten führt [12, 70-74].

Mit der MALDI-TOF-MS ist es möglich, Carbapenemasen unabhängig vom Carbapenemasetypen innerhalb ungefähr einer Stunde nachzuweisen. Während die MALDI-TOF-MS-basierte Detektion von Carbapenemasen zunächst nur mit Bakterienmaterial von Festmedien möglich war, existieren gegenwärtig Protokolle, die mit Bakterienmaterial direkt aus positiven Blutkulturen auskommen und somit einen erheblichen zeitlichen Vorteil aufweisen. Die Gesamtdetektionszeit wird dadurch auf ca. 1 bis 2 h reduziert [14, 85-90]. Indessen gestaltet sich die Auswertung der entsprechenden Massenspektrogramme schwieriger und erfordert eine gewisse Expertise [14, 85-90].

Für beide Detektionsverfahren gilt, dass die notwendigen Geräteausrüstungen kostenintensive Investitionen darstellen, welche insbesondere in Ländern, in denen Carbapenemasen endemisch auftreten, oft nicht möglich sind.

Der Nachweis von Carbapenemasen aus Blutkulturen mithilfe von immunochromatographischen Tests (ICT) liefert vergleichbar zuverlässige Ergebnisse binnen kurzer Zeit. Auch hier ist die Nachweisbarkeit der Carbapenemasen lediglich auf die am häufigsten vorkommenden Typen beschränkt. Zu diesen zählen die NDM, KPC, VIM, OXA-48-like und OXA-163-like-Carbapenemasen. Die Detektion dieser Carbapenemasen mithilfe der ICT wurde bisher unterschiedlich gut evaluiert, es existieren allerdings etablierte Protokolle für kultivierte Kolonien und direkte Blutkulturproben. Diese Methode bietet sehr zuverlässige Ergebnisse innerhalb kurzer Zeit (< 1 h), insbesondere auch in Bezug auf die Blutkulturdiagnostik [76, 91, 92]. Mit einem Kostenaufwand von 8-10 Euro pro Testung ist diese Methode für den Einsatz in der Routinediagnostik allerdings eher hochpreisig und daher wenig geeignet [76, 91, 92].

Die hier präsentierten modifizierten Testverfahren sind hingegen aufgrund ihres Testprinzips generell in der Lage, sämtliche Enzyme mit hydrolytischer Aktivität gegenüber Carbapenemen zu detektieren, unabhängig davon, ob diese auf molekulargenetischer Ebene bereits differenziert wurden. Beide Vorteile, Kosteneffizienz und die universelle Nachweisbarkeit von Carbapenemasen (inklusive unbekannter), qualifizieren die modifizierten Tests in besonderer Weise dafür, auch in der Routine-Labor-Diagnostik verwendet werden zu können, in denen Carbapenemasen zum Teil endemisch vorkommen.

### 3.1 Limitierungen der vorliegenden Arbeit

Für die Testung der modifizierten Protokolle wurden ausschließlich mit Bakteriensuspensionen gespikte Blutkulturen verwendet.

Die Beimpfung der Blutkulturen erfolgte mit einer Bakteriendichte, entsprechend einer finalen Konzentration im Blut von ca. 300 cfu/ml, dadurch könnte die Dichte der Bakterien in den positiven Blutkulturen zumindest in der Exponentialphase möglicherweise höher als in positiven Blutkulturen aus dem Klinikalltag gewesen sein. Bei Erreichen der Plateauphase sollte sich die Bakteriendichte jedoch nicht mehr unterscheiden. Die zu Beginn der Austestung verwendete „physiologischere“ Ausgangsdichte führte zu oft dazu, dass die Blutkulturen im Blutkulturautomaten nicht als positiv erkannt wurden. Die Validierung des Verfahrens an Blutkulturen aus dem Klinikalltag steht noch aus.

Die in dieser Arbeit eingesetzten CPE beinhalteten Carbapenemasen vom Typ KPC, NDM, OXA-48, OXA-48-like, VIM und GIM – diese Varianten machen circa 98,5 % aller Carbapenemasen in Deutschland nach Zahlen von 2018 des NRZ aus [62]. Da somit nicht das gesamte Carbapenemasespektrum untersucht wurde und insbesondere die in Deutschland seltenen Carbapenemasen wie GES oder IMI (circa 1,5 %) nicht inkludiert waren, ist anzunehmen, dass unter Einbeziehung dieser und anderer seltenen Carbapenemasetypen die Sensitivitäten und Spezifitäten der modifizierten Testprotokolle von den hier ermittelten abweichen können. Dies gilt speziell für den  $\beta$ -Carba Test, welcher in der Arbeit von Baeza et al. die Carbapenemasen GES und IMI nicht detektieren konnte [84]. Dennoch sei erwähnt, dass der  $\beta$ -Carba Test mit der hier angewandten Modifizierung sehr gute Ergebnisse erzielte und auch schwächer hydrolysierende Carbapenemasen mit einer Sensitivität von 100 % und einer Spezifität von 95 % detektiert wurden.

Die Untersuchungen mit *K. oxytoca* Stämmen führten bei allen Tests häufiger zu falsch positiven Ergebnissen, was vermuten lässt, dass diese Nachweisverfahren für diese Spezies nur mit Vorsicht eingesetzt werden sollten. Zu ähnlichen Schlussfolgerungen kamen Noël et al. in Bezug auf den  $\beta$ -Carba-Test [93]. In dieser Arbeit gehörten drei der 81 Carbapenemase-negativen Stämme zu der Spezies *K. oxytoca*. Drei der vier falsch

positiven Ergebnisse des Carba-NP-Tests und des  $\beta$ -Carba-Tests wurden durch *K. oxytoca* verursacht, beim Neo-Rapid Carb-Kit waren es zwei von sieben.

Das jeweilige falsch negative Ergebnis des Carba-NP-Tests und des Neo-Rapid Carb-Kits wurde durch Stämme verursacht, die eine OXA-244 exprimiert haben. Insgesamt waren zwei der 104 Carbapenemase-positiven Isolate Stämme, die eine OXA-244 produziert haben. Die zweite OXA-244 wurde durch die beiden Tests also jeweils als richtig positiv erkannt. Dennoch sind die falsch negativen Ergebnisse ein Hinweis darauf, dass Carbapenemase mit einer geringeren hydrolytischen Aktivität gegenüber Carbapenemen wie z.B. OXA-244 mit einer niedrigeren Sensitivität durch diese Tests detektiert werden können. In der modifizierten Version von Dortet et al. war die Sensitivität durch falsch negative Ergebnisse bei OXA-48-like Carbapenemase mit 91 % ebenfalls etwas eingeschränkt [80].

Die Beurteilung des Farbumschlages erfolgte auch durch Mitarbeiter, denen die zugrundeliegende Bakterienstamm/Carbapenemase u.U. bekannt war. Eine Verzerrung ist dadurch prinzipiell nicht ausschließbar. Da der weit überwiegende Teil der Proben aber vollkommen eindeutige Farbumschläge zeigte, ist durch diese fehlende Verblindung keine Verzerrung anzunehmen. Bei allen uneindeutigen Farbumschlägen wurde hingegen stets ein zweiter, für den Resistenzmechanismus verblindeter Auswerter hinzugezogen.

Der CIM-Test sollte separat von den anderen drei vorgestellten Testverfahren betrachtet werden, da es sich hierbei nicht um einen Schnelltest im engeren Sinne handelt. Die Methode wurde dennoch in diese Arbeit integriert und modifiziert, da sie in den Punkten Sensitivität, Spezifität und Kostenaufwand sehr vielversprechend ist. Der Zeitaufwand konnte mithilfe der oben genannten Modifizierung von ca. 48 h auf 20-24 h reduziert werden. In der Arbeit von Sfeir et al. wurde der CIM-Test ebenfalls für die Detektion von Carbapenemase aus Blutkulturen überarbeitet. Die dort präsentierte Vorgehensweise beinhaltet aber einen zusätzlichen Arbeitsschritt (Hinzugabe von Tryptic Soy Broth) und eine längere Inkubationszeit (4 anstatt 2 h) und ist somit aufwendiger [94].

Zusammenfassend sind neben der Testung mit Blutkulturen aus dem klinischen Alltag zur weiteren Evaluation der Protokolle auch Testungen mit zusätzlichen Spezies und Carbapenemase innerhalb einer Multi-Center-Studie oder mehrerer Single-Center-Studien notwendig.

### 3.2 Vergleich der Tests

Alle Tests lieferten zuverlässige Ergebnisse in kurzer Zeit. In Tabelle 2 werden die Tests in den Aspekten Kosten, Zeitaufwand und Zuverlässigkeit verglichen. Hervorzuheben sind dabei der  $\beta$ -Carba-Test und der CIM-Test. Der  $\beta$ -Carba-Test lieferte bei geringstem Zeitaufwand die zuverlässigsten Ergebnisse nach dem CIM-Test. Der CIM-Test ist aufgrund des relativ hohen Zeitaufwandes zwar kein Schnelltest, bietet aber die zuverlässigsten Ergebnisse bei mit Abstand geringsten Kosten (Tabelle 2).

Der  $\beta$ -Carba-Test qualifiziert sich somit insbesondere bei akuten Sepsisfällen mit sofortigem Handlungsbedarf dazu, in die Routinediagnostik integriert zu werden, wohingegen der CIM-Test ein äußerst geeignetes Verfahren zum flächendeckenden Carbapenemasescreening darstellen würde. Alle für den CIM-Test notwendigen Materialien sind in mikrobiologischen Laboren ohnehin vorhanden, wodurch dieses Testverfahren niederschwellig und universell eingesetzt werden kann. Verfahren, die derzeit unter anderem zum Carbapenemasescreening bzw. zur Bestätigung des Vorliegens einer Carbapenemase eingesetzt werden, weisen bezüglich der Blutkulturdiagnostik einen ähnlichen Zeitaufwand wie der CIM-Test auf, besitzen aber z.T. eine erheblich geringere Zuverlässigkeit. Je nach Hersteller liegt beispielsweise die Spezifität des Combination Disk Tests bei 61-80 % und die Sensitivität bei ca. 93 % [12, 92].

Tabelle 2: Vergleich der verschiedenen Carbapenemase-Tests.

	NP-Carba-Test	Neo-Rapid Carb Kit	$\beta$ -Carba-Test	CIM-Test
<b>Zeitaufwand</b>	2-3 h	1,5-2 h	30-45 min	20-24 h
<b>Kosten*</b>	ca. 1,70 €	ca. 2,12 €	ca. 5,50 €	ca. 0,75 €
<b>Sensitivität**</b>	99 % (103/104)	99 % (103/104)	100 % (104/104)	100 % (104/104)
<b>Spezifität**</b>	95 % (77/81)	91 % (74/81)	95 % (77/81)	100 % (81/81)

\* Preis pro Testung

\*\*Angaben der Sensitivitäten und Spezifitäten jeweils in Prozent, sowie in Klammern den Quotienten aus den jeweiligen absoluten Zahlenwerten, bei n=104 Carbapenemase-positiven Stämmen und n=81 Carbapenemase-negative Stämmen.

## 4. Zusammenfassung

Die Sepsis ist eine gefürchtete Komplikation von Infektionskrankheiten und hat nach wie vor eine hohe Letalität. Zu den häufigsten Erregern einer Sepsis gehören gramnegative Enterobakterien, insbesondere *E. coli*. Der zielgerichtete und schnelle Einsatz von Antibiotika ist maßgebend für die Prognose und gestaltet sich besonders bei Enterobakterien schwierig, die eine Carbapenemase produzieren.

Für die schnelle Detektion von Carbapenemase-produzierenden Enterobakterien aus Blutkulturen steht derzeit als einzige ausreichend evaluierte Methode die PCR zur Verfügung. Dieses Verfahren ist kostenintensiv und benötigt eine anspruchsvolle apparative und personelle Ausstattung. Kostengünstigere Verfahren wie colorimetrische oder phänotypische Tests sind dagegen mit einer Analysezeit von mindestens 18-24 h sehr zeitintensiv.

Ziel dieses Projekts war es, mittels colorimetrischen/phänotypischen Methoden ein schnelles Testverfahren zu entwickeln, um Carbapenemasen direkt aus einer positiven Blutkultur detektieren zu können. Hierbei wurden der NP Carba-Test, das Neo-Rapid Carb Kit, der  $\beta$ -Carba-Test und die Carbapenem Inactivation Method so modifiziert, dass sie ohne vorherige Kultivierung auf Festmedien eingesetzt werden konnten.

Der zeitaufwendige Schritt der Kultivierung auf Fest-/ Flüssigmedien wurde durch ein Hämolyseverfahren ersetzt. Dies reduziert die Analysezeit auf eine Gesamtdauer von 30 min bis 3 h. Für die Evaluierung der entwickelten Testprotokolle wurden Blutkulturen mit insgesamt 185 Bakterienstämmen beimpft und getestet.

Die resultierenden Sensitivitäten der verschiedenen Testversionen lagen bei 99-100 % und die Spezifitäten bei 91-100 %. Die Verfahren stellen eine schnelle, kostengünstige und zuverlässige Methode dar und können ohne aufwendige molekularbiologische Ausstattung in allen mikrobiologischen Laboren eingesetzt werden. Dadurch kann eine schnelle Detektion von Carbapenem-resistenten Erregern und verbesserte Behandlung von Blutstrominfektionen durch diese Erreger erreicht werden. Der Einsatz dieser Verfahren kann zur Senkung der Letalität beitragen, insbesondere bei nosokomial erworbenen Blutstrominfektionen.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, Angus DC, Reinhart K (2016). Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med.* 193(3): 259-72
2. Fleischmann C, Thomas-Rueddel DO, Hartmann M, Hartog CS, Welte T, Heublein S, Dennler U, Reinhart K (2016). Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis. *Dtsch Arztebl Int.* 113(10): 159-66
3. Opota O, Croxatto A, Prod'hom G, Greub G (2015). Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art. *Clin Microbiol Infect.* 21(4): 313-22
4. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, Kumar A, Sevransky JE, Sprung CL, Nunnally ME, Rochweg B, Rubenfeld GD, Angus DC, Annane D, Beale RJ, Bellingham GJ, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith C, De Backer DP, French CJ, Fujishima S, Gerlach H, Hidalgo JL, Hollenberg SM, Jones AE, Karnad DR, Kleinpell RM, Koh Y, Lisboa TC, Machado FR, Marini JJ, Marshall JC, Mazuski JE, McIntyre LA, McLean AS, Mehta S, Moreno RP, Myburgh J, Navalesi P, Nishida O, Osborn TM, Perner A, Plunkett CM, Ranieri M, Schorr CA, Seckel MA, Seymour CW, Shieh L, Shukri KA, Simpson SQ, Singer M, Thompson BT, Townsend SR, Van der Poll T, Vincent JL, Wiersinga WJ, Zimmerman JL, Dellinger RP (2017). Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Crit Care Med.* 45(3): 486-552
5. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, Suppes R, Feinstein D, Zanotti S, Taiberg L, Gurka D, Kumar A, Cheang M (2006). Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med.* 34(6): 1589-96
6. Ferrer R, Martin-Loeches I, Phillips G, Osborn TM, Townsend S, Dellinger RP, Artigas A, Schorr C, Levy MM (2014). Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and septic shock from the first hour: results from a guideline-based performance improvement program. *Crit Care Med.* 42(8): 1749-55
7. Hirsch EB, Tam VH (2010). Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res.* 10(4): 441-51
8. Bodmann KF, Grabein B, Kresken M, Derendorf H, Stahlmann R, Ott SR, Olzowy B, Eckmann C, Wagenlehner F, Sunderkötter C, Vossen MG, Dohmen PM, Shah PM, Mutters R, Walger P, Wilke M (2019). S2k-Leitlinie: Kalkulierte parenterale Initialtherapie bakterieller Erkrankungen bei Erwachsenen. [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/082-0061\\_S2k\\_Parenterale\\_Antibiotika\\_2019-08.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/082-0061_S2k_Parenterale_Antibiotika_2019-08.pdf) (Zuletzt abgerufen am 25.02.2021)
9. Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention(KRINKO) (2012). Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 55(10): 1311-54

10. Hamprecht A, Göttig S (2014). Treatment of Infections Caused by Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Current Treatment Options in Infectious Diseases*. 6(4): 425-38
11. Cohen Stuart J, Leverstein-Van Hall MA, Dutch Working Party on the Detection of Highly Resistant Microorganisms (2010). Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents*. 36(3): 205-10
12. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JD (2012). Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. *J Clin Microbiol*. 50(12): 3877-80
13. Nordmann P, Poirel L, Dortet L (2012). Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*. 18(9): 1503-7
14. Burckhardt I, Zimmermann S (2011). Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol*. 49(9): 3321-4
15. Suerbaum S, Burchard GD, Kaufmann SHE, Schulz TF (2016). *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 8 ed. Hannover, Berlin, Hamburg: Springer
16. Davies J, Davies D (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 74(3): 417-33
17. Ventola CL (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *PT*. 40(4): 277-83.
18. Bush K, Jacoby GA (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 54(3): 969-76
19. Abraham E. P., Chain E. (1940). An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. *Nature*. 146(3713): 837-
20. Medeiros AA (1997). Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin Infect Dis*. 24 Suppl 1: S19-45
21. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2018). Data from the ECDC Surveillance Atlas - Antimicrobial resistance. . [http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial\\_resistance/database/Pages/database.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/database.aspx) (Zuletzt abgerufen am 25.02.2021)
22. Oliver A, Perez-Diaz JC, Coque TM, Baquero F, Canton R (2001). Nucleotide sequence and characterization of a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase (CTX-M-10) isolated in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 45(2): 616-20
23. Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B (1985). Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*. 28(2): 302-7
24. Livermore DM (1995). beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*. 8(4): 557-84

25. Canton R, Morosini MI, de la Maza OM, de la Pedrosa EG (2008). IRT and CMT beta-lactamases and inhibitor resistance. *Clin Microbiol Infect.* 14 Suppl 1: 53-62
26. Page MG (2000). b-Lactamase inhibitors. *Drug Resist Updat.* 3(2): 109-25
27. Queenan AM, Bush K (2007). Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 20(3): 440-58, table of contents
28. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S (1991). Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 35(1): 147-51
29. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC (2001). Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 45(4): 1151-61
30. Bando K, Watanabe K, Muto Y, Tanaka Y, Kato N, Ueno K (1992). Conjugal transfer of imipenem resistance in *Bacteroides fragilis*. *J Antibiot (Tokyo).* 45(4): 542-7
31. Meletis G (2016). Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther Adv Infect Dis.* 3(1): 15-21
32. Robert Koch-Institut (RKI) (2016). Bericht des Nationalen Referenzzentrums (NRZ) für gramnegative Krankenhauserreger. *Epidemiologisches Bulletin.* (2/2016): 11-5
33. The Center for Disease Dynamics Economics & Policy. (2020). Antibiotic Resistance Map: Resistance of *Klebsiella pneumoniae* to Carbapenems. <https://resistancemap.cddep.org/AntibioticResistance.php> (Zuletzt abgerufen am 25.02.2021)
34. Ambler RP (1980). The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 289(1036): 321-31
35. Hall BG, Barlow M (2005). Revised Ambler classification of beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 55(6): 1050-1
36. Walther-Rasmussen J, Hoiby N (2007). Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 60(3): 470-82
37. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA (2002). Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 46(1): 1-11
38. Evans BA, Amyes SG (2014). OXA beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 27(2): 241-63
39. Nordmann P, Naas T, Poirel L (2011). Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 17(10): 1791-8
40. Poirel L, Potron A, Nordmann P (2012). OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother.* 67(7): 1597-606
41. Walther-Rasmussen J, Hoiby N (2006). OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 57(3): 373-83

42. Oueslati S, Nordmann P, Poirel L (2015). Heterogeneous hydrolytic features for OXA-48-like beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 70(4): 1059-63
43. Naas T., Oueslati S., Bonnin R. A., Dabos M. L., Zavala A., Dortet L., Retailleau P., Iorga B. I. (2017). Beta-lactamase database (BLDB) - structure and function. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 32(1): 917-9
44. Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P (2003). Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 48(1): 15-22
45. Nordmann P, Cuzon G, Naas T (2009). The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis.* 9(4): 228-36
46. Navon-Venezia S, Leavitt A, Schwaber MJ, Rasheed JK, Srinivasan A, Patel JB, Carmeli Y (2009). First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(2): 818-20
47. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, Cornaglia G, Garau J, Gniadkowski M, Hayden MK, Kumarasamy K, Livermore DM, Maya JJ, Nordmann P, Patel JB, Paterson DL, Pitout J, Villegas MV, Wang H, Woodford N, Quinn JP (2013). Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis.* 13(9): 785-96
48. Khan AU, Maryam L, Zarrilli R (2017). Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo-beta-lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC Microbiol.* 17(1): 101
49. Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA (2011). Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis.* 11(5): 355-62
50. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR (2009). Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(12): 5046-54
51. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM (1999). Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 43(7): 1584-90
52. Vatopoulos A (2008). High rates of metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece--a review of the current evidence. *Euro Surveill.* 13(4)
53. Canton R, Akova M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Miriagou V, Naas T, Rossolini GM, Samuelsen O, Seifert H, Woodford N, Nordmann P, European Network on Carbapenemases (2012). Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 18(5): 413-31

54. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P (2005). Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev.* 18(2): 306-25
55. Carrer A, Poirel L, Yilmaz M, Akan OA, Feriha C, Cuzon G, Matar G, Honderlick P, Nordmann P (2010). Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(3): 1369-73
56. Falagas ME, Tansarli GS, Karageorgopoulos DE, Vardakas KZ (2014). Deaths attributable to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. *Emerg Infect Dis.* 20(7): 1170-5
57. Ghafur AK, Vidyalakshmi PR, Kannaian P, Balasubramaniam R (2014). Clinical study of carbapenem sensitive and resistant Gram-negative bacteremia in neutropenic and nonneutropenic patients: The first series from India. *Indian J Cancer.* 51(4): 453-5
58. Villegas MV, Pallares CJ, Escandon-Vargas K, Hernandez-Gomez C, Correa A, Alvarez C, Rosso F, Matta L, Luna C, Zurita J, Mejia-Villatoro C, Rodriguez-Noriega E, Seas C, Cortesia M, Guzman-Suarez A, Guzman-Blanco M (2016). Characterization and Clinical Impact of Bloodstream Infection Caused by Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Seven Latin American Countries. *PLoS One.* 11(4): e0154092
59. Lübbert C (2016). Epidemiologie und Therapie von Infektionen durch Carbapenem resistente Enterobakterien (CRE) in Deutschland. *Arzneiverordnung in der Praxis.* 43(2): 80-91
60. Ben-David D, Kordevani R, Keller N, Tal I, Marzel A, Gal-Mor O, Maor Y, Rahav G (2012). Outcome of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Clin Microbiol Infect.* 18(1): 54-60
61. Tamma PD, Goodman KE, Harris AD, Tekle T, Roberts A, Taiwo A, Simner PJ (2017). Comparing the Outcomes of Patients With Carbapenemase-Producing and Non-Carbapenemase-Producing Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Bacteremia. *Clin Infect Dis.* 64(3): 257-64
62. Robert Koch-Institut (RKI) (2018). Bericht des Nationalen Referenzzentrums (NRZ) für gramnegative Krankenhauserreger. *Epidemiologisches Bulletin.* (28/2018): 263-7
63. Robert Koch-Institut (RKI) (2017). Bericht des Nationalen Referenzzentrums (NRZ) für gramnegative Krankenhauserreger. *Epidemiologisches Bulletin.* (26/2017): 229-33
64. Robert Koch-Institut (RKI) (2013). Zur aktuellen Situation bei Carbapenemase-bildenden gramnegativen Bakterien. *Epidemiologisches Bulletin.* (19/2013): 167-71
65. Myat TO, Hannaway RF, Zin KN, Htike WW, Win KK, Crump JA, Murdoch DR, Ussher JE (2017). ESBL- and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Patients with Bacteremia, Yangon, Myanmar, 2014. *Emerg Infect Dis.* 23(5): 857-9
66. Baykara N, Akalin H, Arslantas MK, Hanci V, Caglayan C, Kahveci F, Demirag K, Baydemir C, Unal N (2018). Epidemiology of sepsis in intensive care units in Turkey: a multicenter, point-prevalence study. *Crit Care.* 22(1): 93

67. Thacker N, Pereira N, Banavali SD, Narula G, Vora T, Chinnaswamy G, Prasad M, Kelkar R, Biswas S, Arora B (2014). Epidemiology of blood stream infections in pediatric patients at a Tertiary Care Cancer Centre. *Indian J Cancer*. 51(4): 438-41
68. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA (2011). Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother*. 55(11): 4943-60
69. Zhai L, Yang KW, Liu CC, Gao HZ, Yang X, Shi Yi, Wen J (2012). Thermokinetic characterization of imipenem hydrolysis with metallo- $\beta$ -lactamase CcrA from *Bacteroides fragilis*. *Thermochimica Acta*. 539: 67-70
70. Nordmann P, Poirel L (2013). Strategies for identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. 68(3): 487-9
71. Francis RO, Wu F, Della-Latta P, Shi J, Whittier S (2012). Rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes in enterobacteriaceae directly from blood culture bottles by real-time PCR. *Am J Clin Pathol*. 137(4): 627-32
72. van der Zee A, Roorda L, Bosman G, Fluit AC, Hermans M, Smits PH, van der Zanden AG, Te Witt R, Bruijnesteijn van Coppenraet LE, Cohen Stuart J, Ossewaarde JM (2014). Multi-centre evaluation of real-time multiplex PCR for detection of carbapenemase genes OXA-48, VIM, IMP, NDM and KPC. *BMC Infect Dis*. 14: 27
73. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 70(1): 119-23
74. Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, Kubasek C, Silbert S (2012). Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob Chemother*. 67(4): 906-9
75. Chang KC, Chung CY, Yeh CH, Hsu KH, Chin YC, Huang SS, Liu BR, Chen HA, Hu A, Soo PC, Peng WP (2018). Direct detection of carbapenemase-associated proteins of *Acinetobacter baumannii* using nanodiamonds coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Microbiol Methods*. 147: 36-42
76. Coris BioConcept (2017). RESIST-4 O.K.N.V.; <http://www.corisbio.com/Products/Human-Field/RESIST-4-OKNV.php> (Zuletzt abgerufen am 25.02.2021)
77. Pasteran F, Denorme L, Ote I, Gomez S, De Belder D, Glupczynski Y, Bogaerts P, Ghiglione B, Power P, Mertens P, Corso A (2016). Rapid Identification of OXA-48 and OXA-163 Subfamilies in Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacilli with a Novel Immunochromatographic Lateral Flow Assay. *J Clin Microbiol*. 54(11): 2832-6
78. Ote I, Bogaerts P, Denorme L, Borlon C, Thunissen C, Glupczynski Y, Leclipteux T, Mertens P (2015). Development of a novel immunochromatographic confirmatory test for the detection of OXA-48 carbapenemase in Enterobacteriaceae. *25th Eur Cong Clin Microbiol Infect Dis*. 25
79. Lima-Morales D, Avila H, Soldi T, Dalmolin TV, Lutz L, Aquino V, Zavascki AP, Barth AL (2018). Rapid Detection of Carbapenemase Production Directly from Blood Culture

- by Colorimetric Methods: Evaluation in a Routine Microbiology Laboratory. *J Clin Microbiol.* 56(9)
80. Dortet L, Brechard L, Poirel L, Nordmann P (2014). Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from blood cultures. *Clin Microbiol Infect.* 20(4): 340-4
  81. Nastro M, Ayora M, Garcia S, Vay C, Famiglietti A, Rodriguez CH (2017). Rapid Blue-Carba test: reduction in the detection time of carbapenemases performed from a 4-hour bacterial lawn. *J Chemother.* 29(3): 150-3
  82. van der Zwaluw K., de Haan A., Pluister G. N., Bootsma H. J., de Neeling A. J., Schouls L. M. (2015). The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PLoS One.* 10(3): e0123690
  83. Simon M., Richert K., Pfennigwerth N., Pfeifer Y., Reischl U., Gatermann S., Gessner A., Jantsch J. (2018). Carbapenemase detection using the beta-CARBA test: Influence of test conditions on performance and comparison with the RAPIDEC CarbaNP assay. *J Microbiol Methods.* 147: 17-9
  84. Baeza L. L., Pfennigwerth N., Greissl C., Gottig S., Saleh A., Stelzer Y., Gatermann S. G., Hamprecht A. (2019). Comparison of five methods for detection of carbapenemases in Enterobacterales with proposal of a new algorithm. *Clin Microbiol Infect.*
  85. Hrabak J, Chudackova E, Walkova R (2013). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (maldi-tof) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin Microbiol Rev.* 26(1): 103-14
  86. Hrabak J, Studentova V, Walkova R, Zemlickova H, Jakubu V, Chudackova E, Gniadkowski M, Pfeifer Y, Perry JD, Wilkinson K, Bergerova T (2012). 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.* 50(7): 2441-3
  87. Carvalhaes CG, Cayo R, Visconde MF, Barone T, Frigatto EA, Okamoto D, Assis DM, Juliano L, Machado AM, Gales AC (2014). Detection of carbapenemase activity directly from blood culture vials using MALDI-TOF MS: a quick answer for the right decision. *J Antimicrob Chemother.* 69(8): 2132-6
  88. Hooff GP, van Kampen JJ, Meesters RJ, van Belkum A, Goessens WH, Luider TM (2012). Characterization of beta-lactamase enzyme activity in bacterial lysates using MALDI-mass spectrometry. *J Proteome Res.* 11(1): 79-84
  89. Bernabeu S, Poirel L, Nordmann P (2012). Spectrophotometry-based detection of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 74(1): 88-90
  90. Kempf M, Bakour S, Flaudrops C, Berrazeg M, Brunel JM, Drissi M, Mesli E, Touati A, Rolain JM (2012). Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *PLoS One.* 7(2): e31676

91. Wareham DW, Shah R, Betts JW, Phee LM, Momin MH (2016). Evaluation of an Immunochromatographic Lateral Flow Assay (OXA-48 K-SeT) for Rapid Detection of OXA-48-Like Carbapenemases in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 54(2): 471-3
92. Giske CG, Martinez-Martinez L, Cantón R , Stefani S, Skov R , Glupczynski Y, Nordmann P, Wootton M, Miriagou V, Simonsen GS, Zemlickova H, Cohen-Stuart J, Gniadkowski M (2017). EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance.
93. Noel A, Huang TD, Berhin C, Hoebeke M, Bouchahrouf W, Yunus S, Bogaerts P, Glupczynski Y (2017). Comparative Evaluation of Four Phenotypic Tests for Detection of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria. *J Clin Microbiol.* 55(2): 510-8
94. Sfeir M. M., Satlin M. J., Fauntleroy K. A., Jenkins S. G., Westblade L. F. (2019). Blood-Modified Carbapenem Inactivation Method (Blood-mCIM): a Phenotypic Method for Detecting Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae Directly from Positive Blood Culture Broths. *J Clin Microbiol.*
95. Meier M, Hamprecht A. (2019) Rapid detection of carbapenemases directly from positive blood cultures by the  $\beta$ -CARBA test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 38(2):259-264
96. Meier M, Hamprecht A. (2019) Systematic Comparison of Four Methods for Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacterales Directly from Blood Cultures. *J Clin Microbiol.* 57(11)

## 6. Lebenslauf

Maria Meier

**Adresse:** Keplerstraße 49, 50823 Köln  
**Kontaktdaten:** Mobil: 01573 5161522  
Web: mmeier5@smail.uni-koeln.de  
**Geboren:** Am 30.09.1992 in Berlin  
**Familienstand:** ledig

---

### Schulischer und akademischer Bildungsgang

**2005-2009**  
**2009-2012**

Humboldt-Gymnasium, Berlin Tegel  
Marie-Curie-Gymnasium, Berlin Wilmersdorf

- Abitur 05/2012, Note 1,0

**03/2013-11/2019**

**Studium der Humanmedizin**  
Universität zu Köln  
1. Staatsexamen 03/2015, Note 2,25  
2. Staatsexamen 10/2018, Note 1  
3. Staatsexamen 11/2019, Note 2  
Approbation 12/2019

**2015-2018**

**Famulaturen**

- Severinsklösterchen Köln: Viszeralchirurgie
- Universitätsklinik Köln: Psychiatrie
- Praxis Andrea Wende: Allgemeinmedizin
- Sankt Antoniuskrankenhaus Köln: internistische Ambulanz
- Praxis Dr. med. Michael Hoffmann: Dermatologie

**11/2018 – 11/2019**

**Praktisches Jahr**

1. Terial: Psychosomatik, Universitätsklinik Köln
2. Terial: Chirurgie, Heilig-Geist-Krankenhaus Köln Longerich
3. Terial: Innere Medizin, Marienhospital Brühl

### Promotion

**04/2017 – 1/2022**

**Entwicklung eines universellen Testverfahrens zur schnellen Identifizierung von Carbapenemase-produzierenden Enterobakterien aus Blutkulturen.**  
Institut für Immunologie, medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinik Köln  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Axel Hamprecht

### Publikationen

**02/2019**

**Rapid detection of carbapenemases directly from positive blood cultures by the  $\beta$ -CARBA test.** Maria Meier, Axel Hamprecht. European Journal of clinical Microbiology. 2019 Feb; 38(2):259-264. doi: 10.1007/s10096-018-3422-4

**10/2019**

**Systematic comparison of four methods for the detection of carbapenemase-producing Enterobacterales directly from blood cultures.** Maria Meier, Axel Hamprecht. Journal of Clinical Microbiology. 2019 Oct 23;57(11). pii: e00709-19. doi: 10.1128/JCM.00709-19

## Stipendien

2013 – 2015 04/2017 – 04/2018	Deutschlandstipendium Promotionsstipendium KölnFortune
----------------------------------	---

## Assistenzärztliche Weiterbildung

03/2020 - 09/2020	<b>Informationszentrale gegen Vergiftungen</b> Allgemeine Pädiatrie, Universitätsklinik Bonn
-------------------	---

Seit 12/2020	<b>Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie, Diabetologie und Intensivmedizin</b> Krankenhaus Düren
--------------	---

## Fortbildungen

03/2020	<b>Reise- und Tropenmedizin</b> CRM Basisseminar
---------	---

## Klinische Erfahrungen

05/2020 – 11/2020	<b>Reisemedizinische Impfberatung</b> Globetrotter Köln
-------------------	--

11/2020	<b>Corona-Biomonitoring</b> Gesundheitsamt Köln
---------	--

Köln, 30. April 2022

Maria Meier