

Karbapenemasdetektion med MALDI-TOF

Martin Sundqvist

MD, PhD

Laboratoriemedicinska länskliniken, Klinisk Mikrobiologi

Universitetssjukhuset Örebro

Hur funkar det?



Vad gör mass-spektrometern?

- Laser bombarderar provpunkterna (*Laser Desorption*)
- Excitation av matrix (*Matrix Assisted*) → jonisering av proteiner, proteinfragment (*Ionization*)
- Separation i vacuum (flygrör)
- Detektion av energi i en detektor och uträkning av flygtid (*Time Of Flight*) ger ett så kallat m/z kvot som kan översättas med molekylvikt (Da)

Detektion av resistens

Utmaning: Resistensdetektion ≠ Känslighetstest

- Påvisa subtyper associerade med resistens

- Diff between *cfiA*-neg and *cfiA*-pos *B.fragilis* (Wybo JCM 2011, Nagy J. Med. Microbiology 2011)

- Påvisa toppar associerade med resistens

- *E.coli*, m/z peak of 29 000 (Camara Anal Bioanal Chem 2007)
- *F.nucleatum* m/z peak of 29 000 (Al-Haroni Oral Microbiol. Immunol. 2008)
- OmpK36 porin loss in *Klebsiella* spp. (Cai JCM 2012)
- Specifika toppar associerade med olika SSCMec i *S.aureus* (Ultraflex) (Lu Anal Chem 2012)

- Påvisa hydrolys

- Betalaktamaser (Sparbier JCM 2012)
- Karbapenemaser (Burckhardt JCM 2011, Sparbier JCM 2012, Hrabak JCM 2011, 2012, Kempf PLoS One 2012)

Betalaktamas detektion

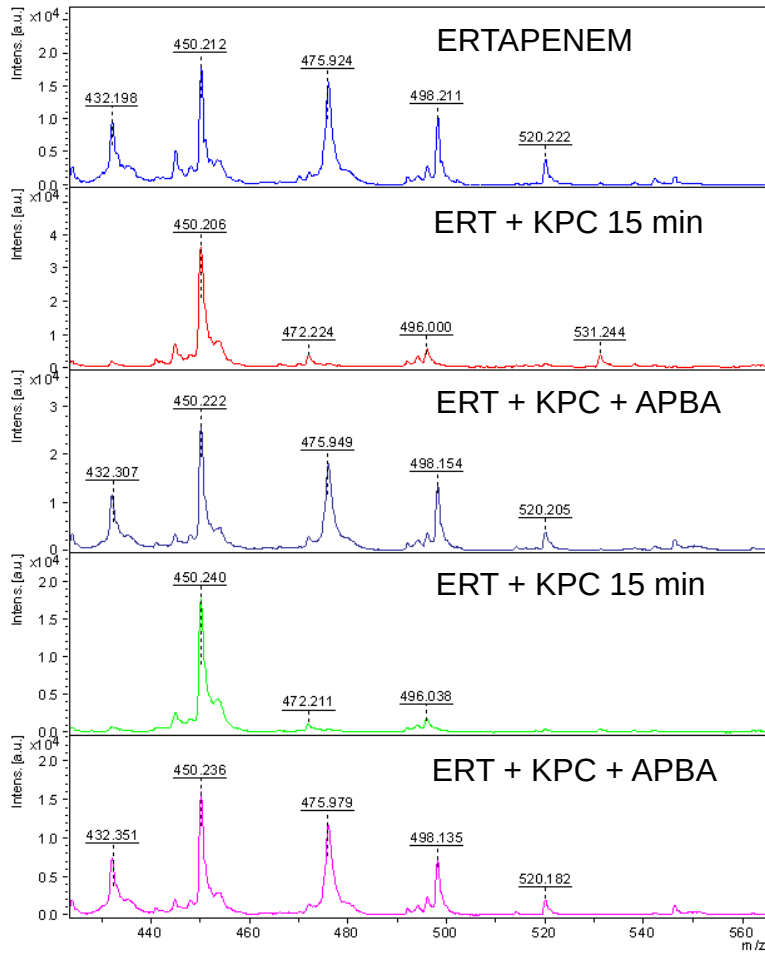
- *E.coli* och *K.pneumoniae*
- AMP, PIP, CTX, CFZ, IMI, ERT, MER
- 1µl bakterier i 10 µl ab-suspension och från BC
- 3h
- Kvot mellan hydrolyserat/inte hydrolyserat
- CTX instabilt
- ERT mycket bra
- MER and IMI bara förlust av toppar
- Inhibitorer OK

Karbapenemas-detektion

– Ertapenem (Burckhardt JCM 2011, Sparbier JCM 2012, Johansson et al manuskript)

- + tydliga nedbrytningstoppar
- + HCCA matrix
- + Enterobacteriaceae (KPC, VIM, IMP, NDM-1)
- + B.fragilis (CfiA)
 - För få stammar testade
 - P.aeruginosa/VIM?
 - Oxa?
- Imipenem (Kempf PloS One 2012, Sparbier JCM 2012)
- Meropenem (Hrabak JCM 2011 and 2012, Sparbier 2012)
- Faropenem (Mirande et al, Poster MSACL San Diego 2013)

Hydrolyys av Ertapenem



- 4 McF
- KPC 15 min (hämmas av APBA)
- NDM och VIM 2h (hämmas av DPA)

Men!

- OXA-ofullständig hydrolyys på 5h (24h)
- 4/10 *Pseudomonas aeruginosa* stammar med VIM hydrolyserar inte alls...

Sannolikt beroende på samtidig porinförlust.

Karbapenemas-detektion

- Imipenem (Kempf PloS One 2012, Sparbier JCM 2012, Alvarez-Buylla JCM 2013)
 - + Verkar fungera bra på *Acinetobacter* spp (Kempf och Alvarez-Buylla)
 - + Oxa-23, Oxa-51-like, Oxa-58
 - Bara enstaka stammar testade av Enterobacteriaceae, fåtal *P.aeruginosa* med KPC, NDM-1, VIM, IMP (Kempf)
- Ertapenem (Sparbier JCM 2012, Johansson et al manuskript)
- Meropenem (Hrabak JCM 2011 and 2012, Sparbier 2012)
- Faropenem (Mirande et al, Poster MSACL San Diego 2013)

Hydrolysis of Imipenem

- *Acinetobacter*
- Imipenem-cilastatin
- ESBL_{carba} om förlust av en eller flera toppar
- 4h (Kempf)
- 1h (Alvarez –Byulla)
- 100% sens
- 100% spec
- DPA/ZnSO₄ (Alvarez –Byulla)

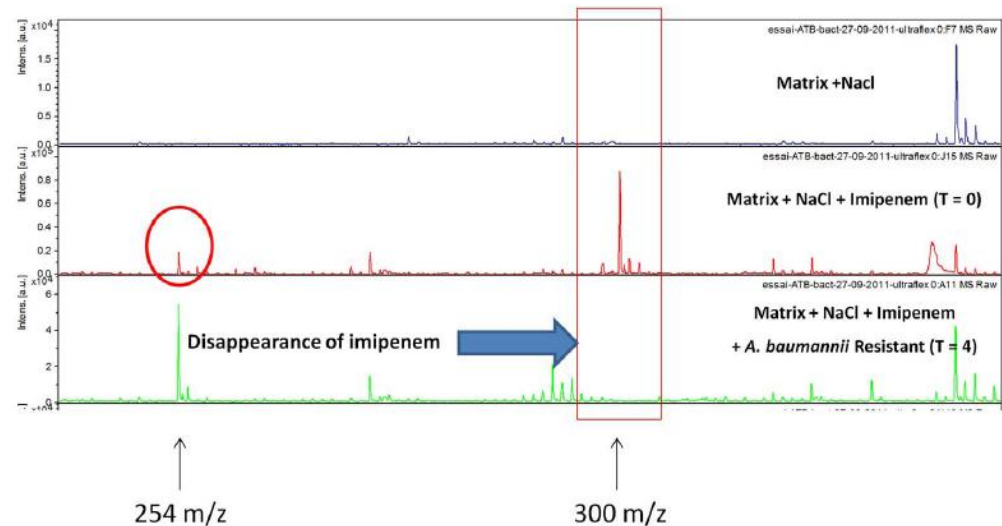
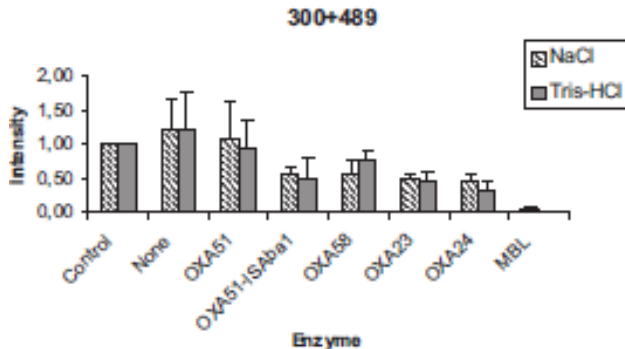


Figure 2. Mass spectra of the imipenem hydrolysis assay with a carbapenem-resistant *A. baumannii* strain. Incubation at 37°C during 4 h; NaCl 0.45%; imipenem concentration 0.25 mg/mL. Units of the x axis represent the mass per charge in Daltons [m/z (Da)] and that of the y axes, the relative intensity (a.u., arbitrary units).
doi:10.1371/journal.pone.0031676.g002

Karbapenemas-detektion

– Meropenem (Hrabak JCM 2011 and 2012, Sparbier 2012)

- + Detektion av bred panel av karbapenemaser hos många species (Hrabak 2012)
- Annan matrix (DHB)
- Inte utprovat med hämmare
- Enstaka isolat negativa (*P.aeruginosa* VIM)

- Ertapenem (Brukhardt JCM 2011, Sparbier JCM 2012, Johansson et al manuskript)
- Imipenem (Kempf PloS One 2012, Sparbier JCM 2012, Alvarez-Buylla JCM 2013)
- Faropenem (Mirande et al, Poster MSACL San Diego 2013)

Hydrolys av Meropenem

- Meropenem
- Enterobacteriaceae och Pa
- 8 McF
- 3h
- Två toppar försvinner
 - 383 och/eller 405
- Sens. 96.7% (Pa)
- Spec. 97,9% (Pa)
- Modifierad metod, NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, OXA-162

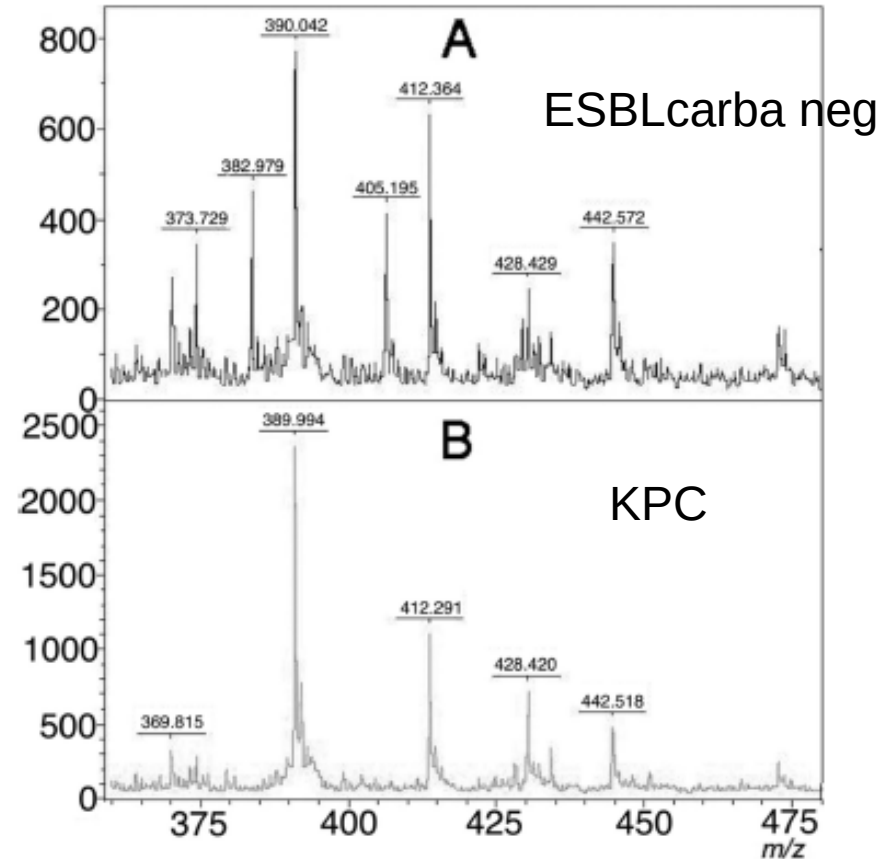


FIG. 3. Mass spectra of the meropenem hydrolysis assay of a non-carbapenemase-producing isolate (A) and a carbapenemase (KPC-2)-producing isolate (B). Units on the y axes represent relative intensity.

Hydrolys av Faropenem

- Faropenem
- 2 McF
- KPC
- 3h inkubering
- Beräkning av Ratio T0 och T3h
- 2/9 isolat detekterades inte
- Första studien med VitekMS RoU

Karbapenemasdetektion med MALDI-TOF

- Snabbt (15 min – 4h)
- Ingen metod detekterar alla olika enzymer hos alla arter
- Hämmare kan användas för verifiering
- Ganska arbetskrävande
- Kommersiell metod finns inte på marknaden
 - Bruker utvecklar en mjukvara för detektion av flera betalaktamaser, bl.a. ertapenem (patent)
 - BioMerieux , Ingen publikation men postrar som visar på möjligheten med instrumentet

Tack

Växjö

- **Åsa Johansson**
- Josefin Ekelöf

Karolinska

Christian Giske