

Sykehuset i Vestfold

Betalaktamresistens hos *Haemophilus influenzae*

AFA-kurset 2017
Dagfinn Skaare


Arbeidsgruppen for antibiotikaspørsmål og metoder for resistensbestemmelse (AFA)



Sykehuset i Vestfold

Agenda

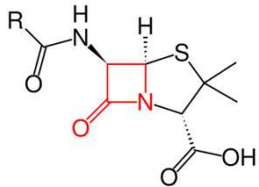
- Betalaktamantibiotika
- Mekanismer for betalaktamresistens
- Resistensbestemmelse
- Epidemiologi
- Demonstrasjon



Sykehuset i Vestfold

Betalaktamantibiotika

- Penicilliner, cefalosporiner og karbapenemer
- **Betalaktamring**
- Binder seg til penicillin-bindende proteiner (PBP) og hemmer syntese av peptidoglykan

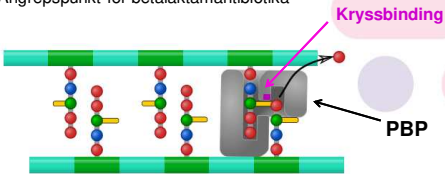


Illustrasjon: Wikipedia

Sykehuset i Vestfold

Peptidoglykan

- Livsviktig nettformet struktur i celleveggen
- Syntetiseres av penicillinbindende proteiner (PBP)
- PBP2 og PBP3: Transpeptidaser
 - Katalyserer kryssbinding av peptidkjeder
 - Angrepspunkt for betalaktamantibiotika

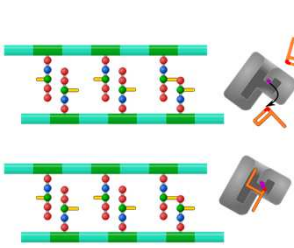


Illustrasjon: Wikipedia

Sykehuset i Vestfold

Betalaktamantibiotika

- Etterligner naturlig substrat for PBP
- Binder seg til PBP og hemmer transpeptidaseaktiviteten

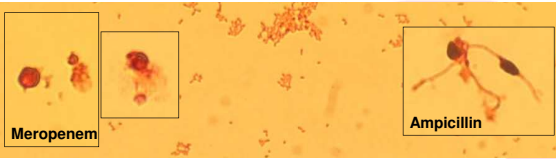


Illustrasjon: Wikipedia


Sykehuset i Vestfold

Effekt – *H. influenzae*

- Hemming av PBP gir forutsigbare morfologiske endringer
 - PBP2 (stavform): Sfæriske celler
 - PBP3 (celledeling): Filamenter med utposninger
- Bakteriolyse → celledød



Meropenem Ampicillin



Betalaktamresistens – H. influenzae

- Betalaktamaser (TEM, ROB)
 - Overførbare gener (mobile genetiske elementer)
 - Kun resistens mot penicilliner (penicillinaser)
 - Hemmes av betalaktamasehemmere
- Endret penicillinbindende protein 3 (rPBP3)
 - Spontane punktmutasjoner og rekombinasjon i *ftsI*
 - Variabel grad av resistens mot penicilliner, cefalosporiner og karbapenemer
 - Hemmes ikke av betalaktamasehemmere

Betalaktamase

Betalaktamasehemmere hemmer betalaktamaser (klavulansyre, tazobactam)

Inaktivt molekyl

Betalaktamringen åpnes her (hydrolyse)

Illustrasjon: Wikipedia

Endret PBP3 (rPBP3)

Mutasjoner i *ftsI*

- Endret form på bindingsstedet
- Redusert affinitet for betalaktamaser
- Svakere hemming av transpeptidasen
- Økt toleranse for betalaktamantibiotika

北里生命科学研究所
Kiiatsato Institute for Life Sciences

rPBP3: Trinnvis utvikling

Trinn 2-3: Høygradig

Trinn 1: Lavgradig

rPBP3: Trinnvis utvikling

Wild type

Low

High(-)

High(+)

III-like(-)

III-like(+)

AMP: Ampicillin
CTX: Cefotaxime
CRO: Ceftriaxone

Skaare et al. Eurosurveillance 2014

Resistensbestemmelse

NordicAST

- Brytningspunkttabell
 - Sone- og MIC-brytningspunkter
 - Algoritme betalaktamresistens
- Metodedokumenter
 - Haemophilus influenzae og betalaktamresistens
 - Påvisning av betalaktamase hos Staphylococcus spp., Enterococcus faecalis, Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis, Neisseria gonorrhoeae og Neisseria meningitidis

www.nordicast.org

NordicAST Nordic Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

Organisation **Methods** Breakpoints Quality control Resistenspaneler FAQ Workshops

Links RSS

Methods

Explanatory methods documents

Visa 50 rader

| Kod | Titel |
|--------------------------------|---|
| Anaerøber | Anaerøbe bakterier og resistens |
| Påvisning af ESBL | Enterobacteriaceae: Detection of ESBL A / ESBLM / ESBLCARBA |
| Påvisning af ESBL (DK version) | Enterobakterier: Påvisning af plasmid-medieret AmpC, ESBL og carbapenemaser (DK version) |
| Enterokokker | Enterokokker og vancomycinresistens |
| PK/PD | Farmakokinetik og farmakodynamik |
| Haemophilus | Haemophilus influenzae and beta-lactam resistance / Haemophilus influenzae og betalaktamresistens |
| Enterokokker | Højgradig aminoglykosid-resistens hos enterokokker |
| Pseudomonas | Pseudomonas aeruginosa og carbapenemaser (ESBL-CARBA) |
| Betalaktamasepåvisning | Påvisning af betalaktamase hos Staphylococcus spp., Enterococcus faecalis, Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis, Neisseria gonorrhoeae og Neisseria meningitidis |

www.nordiccast.org

Betalaktamasepåvisning

NordicAST

Betalaktamase positive isolater rapporteres R for penicilliner uten betalaktamasehemmer (uansett sonestørrelse/MIC)

| Mikrobe | Sonekant | Kløverblad | Acidimetri | Iodometri | Kromogent cefalosporin |
|--------------------------------------|----------|------------|------------|-----------|------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ++ | ++ | + | + | +(a) |
| Koagulase negative stafylokokker (b) | - | - | - | - | - |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (c) | - | IE | ++ | ++ | ++ |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | - | ++ | ++ | + | ++ |
| <i>Moraxella catarrhalis</i> (c) | - | IE | - | - | ++ |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | - | ++ | ++ | + | ++ |
| <i>Neisseria meningitidis</i> | - | IE | IE | IE | ++ |

++ Anbefalt metode + Alternativ metode - Anbefales ikke IE Dokumentasjon mangler

www.nordiccast.org

Screening betalaktamresistens

NordicAST

Metodokument: Haemophilus
 Titel: Haemophilus influenzae and beta-lactam resistance / Haemophilus influenzae og betalaktamresistens

Ut fra screeningresultatene kan det avgjøres med høy grad av sannsynlighet/sannolikhet om isolatet mangler/saknar resistensmekanismer mot betalaktamer, eller om det har én eller begge resistensmekanismer [11-13]. Ved negativ screening for betalaktamresistens kan isolatet bevareres S for alle penicilliner, cefalosporiner og carbapenemer med kliniske brytningspunkter. Ved screeningresultater som indikerer PBP3-mediert resistens utføres SIR-kategorisering for de enkelte betalaktamer med lappediffusjon eller MIC-bestemmelse. Amoksisillin (i.v og p.o) bør tolkes fra ampicillin.

www.nordiccast.org

Rasjonale

- To resistensmekanismer
- Tre tester

| Resistensmekanisme | Penicillin lapp | Betalaktamase | Cefalosporin lapp |
|--------------------|-----------------|---------------|-------------------|
| Betalaktamase | R | + | S |
| Endret PBP3 | R | - | R |
| Begge | R | + | R |

Haemophilus influenzae
ALGORITME FOR PÅVISNING AV BETALAKTAMRESISTENS

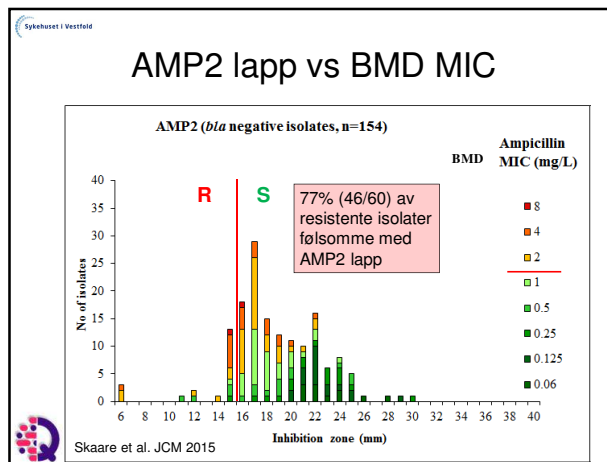
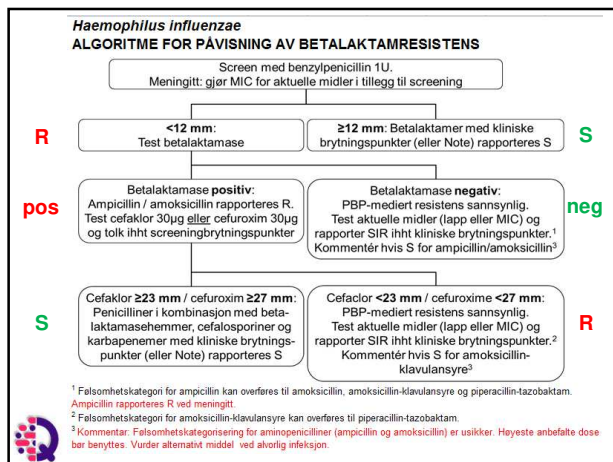
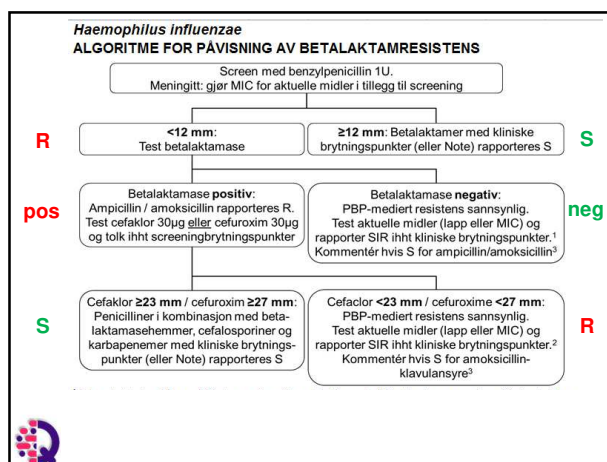
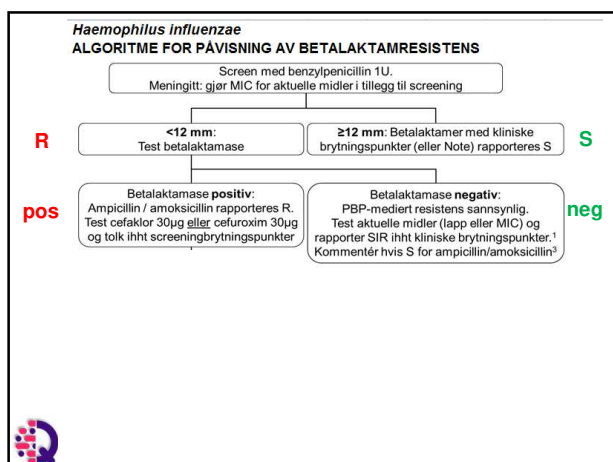
Screen med benzympenicillin 1U.
 Meningitt: gjør MIC for aktuelle midler i tillegg til screening

Haemophilus influenzae
ALGORITME FOR PÅVISNING AV BETALAKTAMRESISTENS

Screen med benzympenicillin 1U.
 Meningitt: gjør MIC for aktuelle midler i tillegg til screening

R <12 mm: Test betalaktamase

≥12 mm: Betalaktamer med kliniske brytningspunkter (eller Note) rapporteres **S**



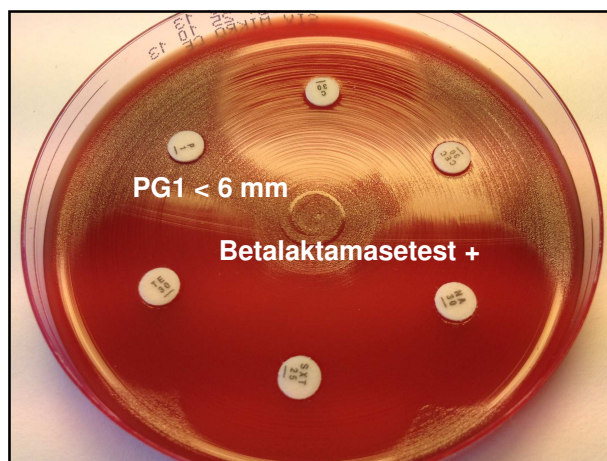
Ampicillin Etest vs BMD MIC

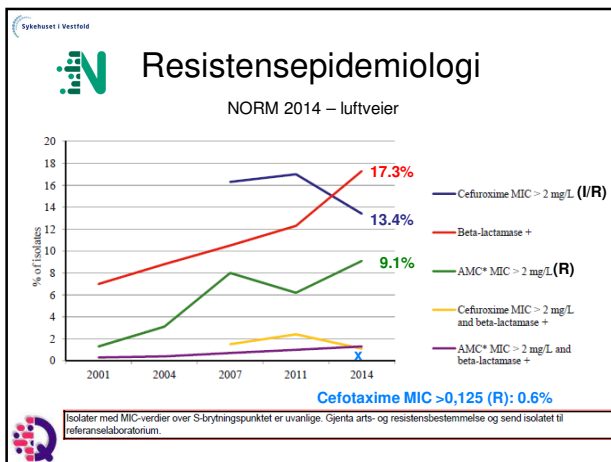
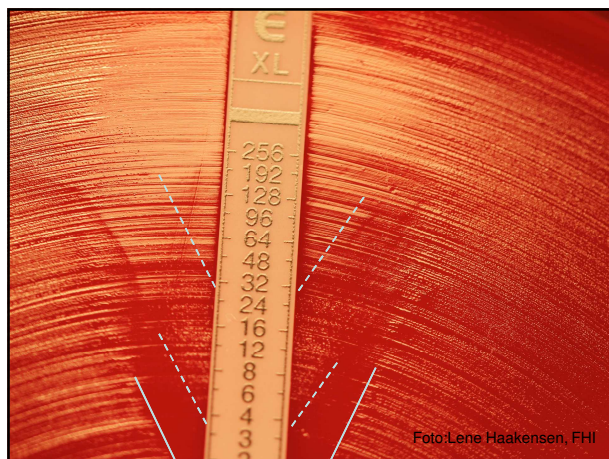
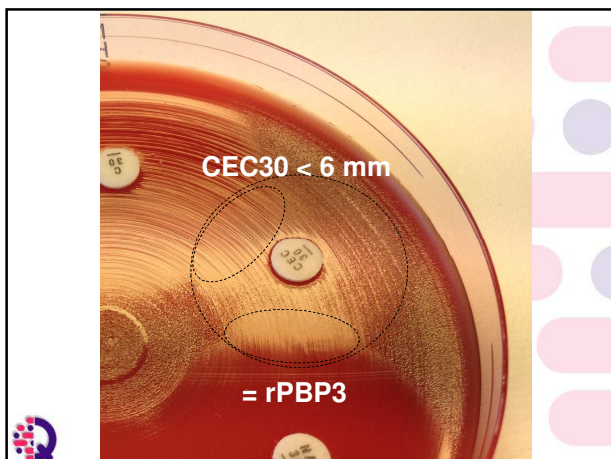
Table 35 Susceptibility categorization of *H. influenzae* (bla negative, n=154) by Etest (HTM) with BMD MIC (HTM) and EUCAST breakpoints [111] as gold standard. Data from [467]

| Etest ^a | BMD MIC (mg/L) | | | | | | n | % | EA ^b / FSR ^c |
|--------------------|----------------|-------|------|-----|----|----------------|----|-------|------------------------------------|
| | 0.06 | 0.125 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | | | |
| AMP | | | | | | | | | |
| +3 | 2 | | | | | | 2 | 1.3% | |
| +2 | 7 | 6 | 3 | 1 | | | 17 | 11.0% | |
| +1 | 2 | 12 | 4 | 10 | 1 | 1 | 30 | 19.5% | |
| 0 | | | 8 | 3 | 21 | 3 | 35 | 22.7% | 69.5% ^b |
| -1 | | | 2 | 2 | 9 | 26 | 42 | 27.3% | |
| -2 | | | | | 1 | 5 | 17 | | |
| -3 | | | | | | 2 ^d | 1 | 2 | |
| CA | 11 | 18 | 17 | 15 | 31 | 4 | 96 | 62.3% | |
| ME | | | 1 | 1 | | | 2 | 1.3% | |
| VME | | | | | | 33 | 18 | 2 | 88.3% ^e |

88% (53/60) av resistente isolater følsomme med Etest

Skaare et al. JCM 2015





Resistens epidemiologi

NORM / NORM-VET 2016 HUMAN CLINICAL ISOLATES

Haemophilus influenzae in blood cultures and cerebrospinal fluids

TABLE 50. *Haemophilus influenzae* in blood cultures and cerebrospinal fluids in 2016 (n=81). Sampling, laboratory methods, and data handling are described in Appendix 5.

| | Susceptible | Intermediately susceptible | Resistant |
|-----------------------------|-------------|----------------------------|-----------|
| Penicillin G (mm) | 72.8 | - | 27.2 |
| Beta-lactamase | 82.7 | - | 17.3 |
| Ampicillin | 81.5 | - | 18.5 |
| Amoxicillin-clavulanic acid | 100.0 | - | 0.0 ?? |
| Cefuroxime | 81.5 | 7.4 | 11.1 |
| Cefotaxime | 100.0 | - | 0.0 |
| Ceftriaxone | 100.0 | - | 0.0 |

Demonstrasjon

- Læringsmål**
 - Få kjennskap til NordicASTs testalgoritme for resistensbestemmelse av betalaktamantibiotika med lappediffusjon
- Materiale og metoder**
 - Skåler med resistensoppsett
 - Villypestamme
 - Tre stammer med ukjent(e) resistensmekanisme(r)
 - Algoritme og sonebrytningspunkter

Demonstrasjon

- Utled resistensmekanismer
 - Screeninglapper (PG1, CEC30)
 - Betalaktamasetest (resultat på skål)

| H. influenzae Stamme | 1. Screening | | | | Resistensmekanismer | |
|----------------------|-------------------|-----|---------------------|-----|-------------------------------------|------------|
| | PG1 (S≥12 / R<12) | | CEC30 (S≥23 / R<23) | | Beta-laktamase (resultat på skålen) | Endret PBP |
| | Sone | S/R | Sone | S/R | | |
| ATCC 49766 | | | | | | |
| ATCC 49247 | | | | | | |
| RAF-M 284 | | | | | | |
| SIV-A23 | | | | | | |

Demonstrasjon

2. Utfør følsomhetskategorisering (S/R)

- Ampicillin
- Amoksisicillin-klavulansyre
- Cefotaksim

| H. influenzae Stamme | 2. Klinisk følsomhetskategorisering | | | | | |
|-------------------------|--|-----|---|-----|--|-----|
| | Ampicillin AMP2 (S \geq 16 / R<16) | | Amoksi-klavulan AMC3 (S \geq 15 / R<15) | | Cefotaksim CTX5 (S \geq 27 / R<27) | |
| | Sone | S/R | Sone | S/R | Sone | S/R |
| ATCC 49766 | | | | | | |
| ATCC 49247 | | | | | | |
| RAF-M 284 | | | | | | |
| SiV-A23 | | | | | | |

ATCC 49766

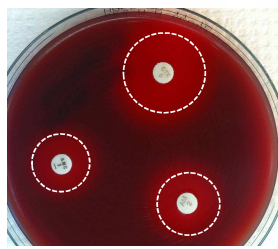
PG1 \geq 12 mm = S

Betalaktamase: **Negativ**

CEC30 \geq 23 mm = S

Negativ screening – ingen resistensmekanismer

Alle betalaktamer = S



AMP2: \geq 16 mm = S
AMC3: \geq 15 mm = S
CTX5: \geq 27 mm = S

ATCC 49247

PG1: <12 mm = R

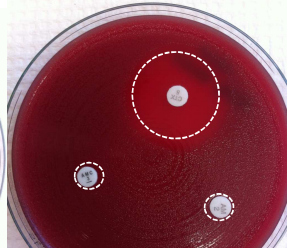
Betalaktamase: **Negativ**

CEC30: <23 mm = R

Mekanisme: Endret PBP

Cefuroxim: R
Ampicillin (meningitt): R

Øvrige: Lapp eller MIC



AMP2: <16 mm = R
AMC3: <15 mm = R
CTX5: \geq 27 mm = S

RAF-M 284

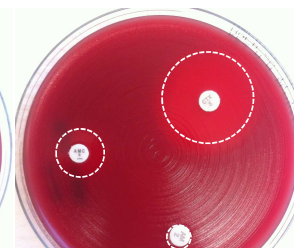
PG1: <12 mm = R

Betalaktamase: **Positiv**

CEC30: \geq 23 mm = S

Mekanisme: Bla

Bla-følsomme penicilliner: R
Øvrige betalaktamer: S



AMP2: <16 mm = R
AMC3: \geq 15 mm = S
CTX5: \geq 27 mm = S

SiV-A23

PG1: <12 mm = R


Betalaktamase: **Positiv**

CEC30: <23 mm = R

Endret PBP og Bla

Bla-følsomme penicilliner: R
Cefuroxim: R

Øvrige: Lapp/MIC



AMP2: <16 mm = R
AMC3: <15 mm = R
CTX5: <27 mm = R