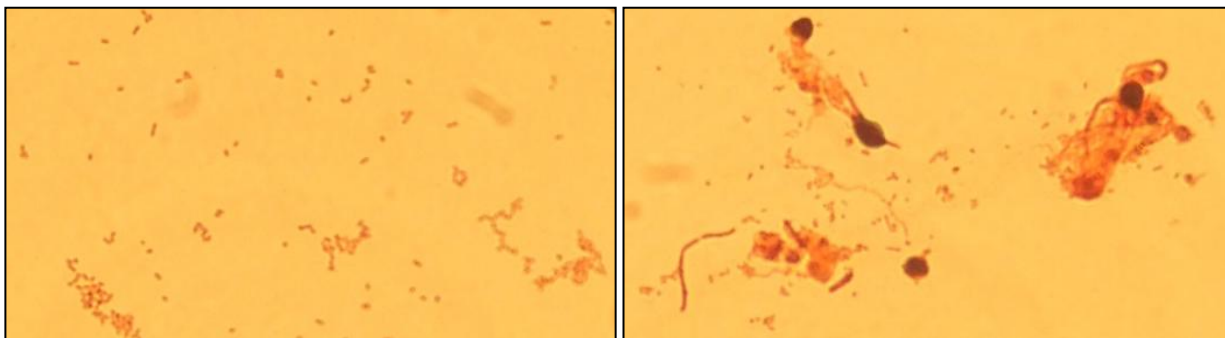




Før og etter
eksponering for
ampicillin
(følsom stamme)

Betalaktamresistens hos *Haemophilus influenzae*

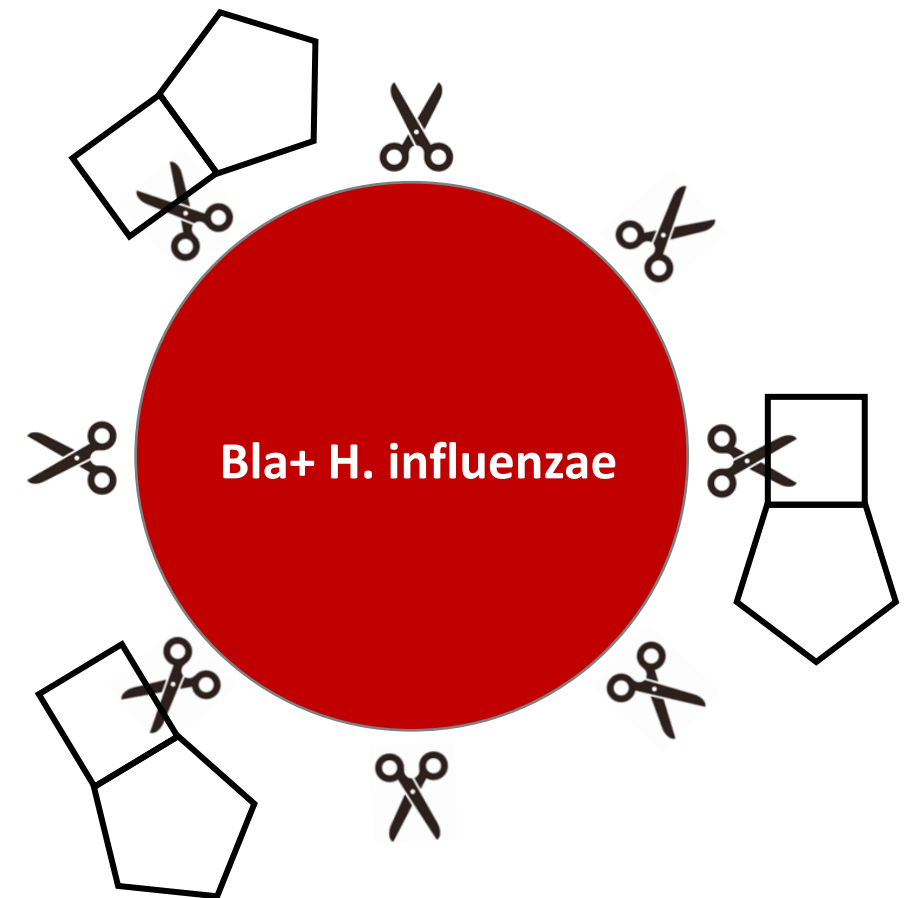
Dagfinn Skaare dagfinn.skaare@siv.no

Overlege / postdok, mikrobiologisk avdeling, Sykehuset i Vestfold

AFA-kurs 15. januar 2026

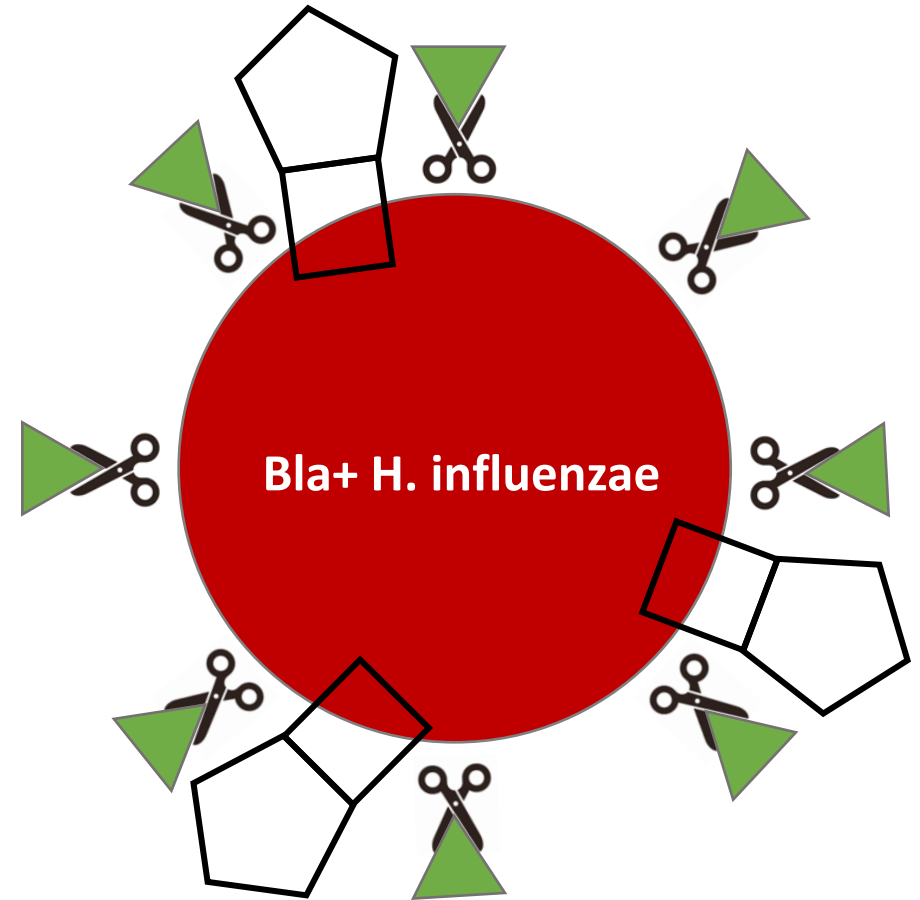
Betalaktamase (Bla) hos *H. influenzae*

- Smalspektrede enzymer som bryter betalaktambindingen i *penicilliner*
- Oftest TEM-1, sjelden ROB-1
- Overføres med integrative konjugative elementer (ICE, 82-85%) eller plasmider
- Virker ekstracellulært
- Oftest høygradig uttrykt (MIC > R-bp)



Betalaktamase (Bla) hos *H. influenzae*

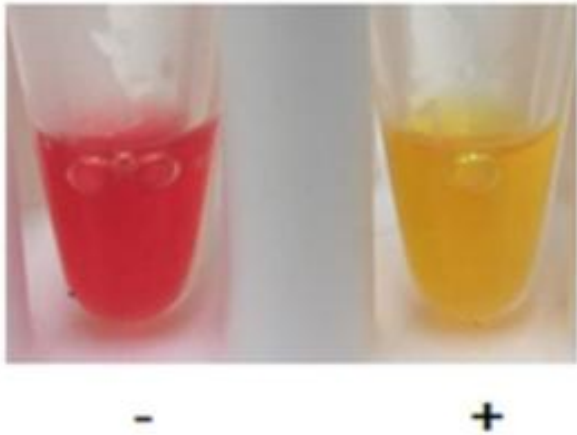
- Smalspektrede enzymer som bryter betalaktambindingen i *penicilliner*
- Oftest TEM-1, sjelden ROB-1
- Overføres med integrative konjugative elementer (ICE, 82-85%) eller plasmider
- Virker ekstracellulært
- Oftest høygradig uttrykt (MIC > R-bp)
- Hemmes av betalaktamasehemmere (klavulansyre, tazobaktam mfl.)



Påvisning av betalaktamase

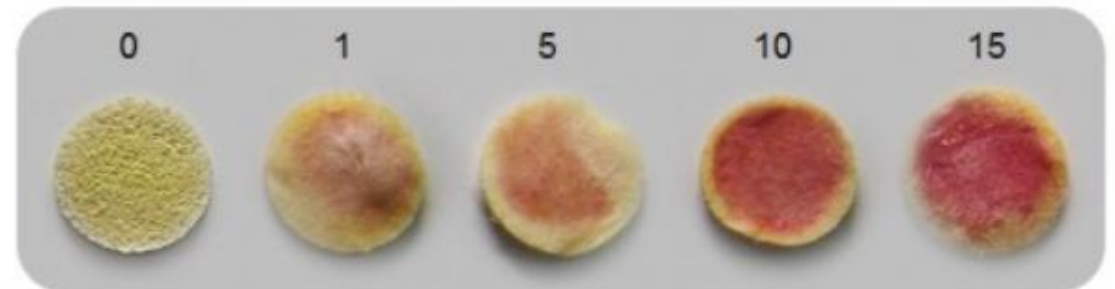
- Acidimetri

- Indikator: Penicillin + fenolrødt
- Fall i pH gir fargeomslag (5 min)
- Agar, papir eller væske



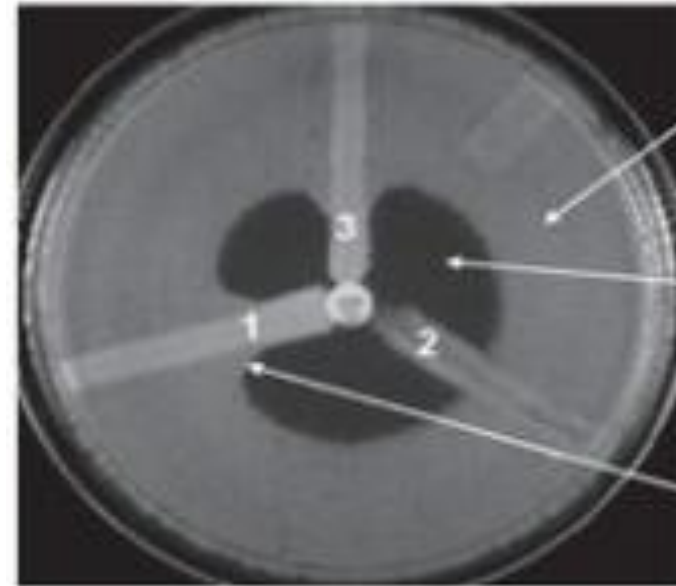
- Nitrocefin/cefinaase

- Indikator: Kromogent cefalosporin
- Hydrolysering gir fargeomslag (1-2 min)
- Papir eller væske



Påvisning av betalaktamase

- Kløverbladtest (Hodge test)
 - Prinsipp først beskrevet av Ørstavik & Ødegaard ([APMIS 1971](#))
 - Utnytter at resistensmekanismen virker ekstracellulært, dvs. at en betalaktamase-produserende stamme også kan beskytte naboen
 - Upraktisk som rutinemetode



(Bildet viser *E. coli*, men metoden fungerer like godt med *H. influenzae*)

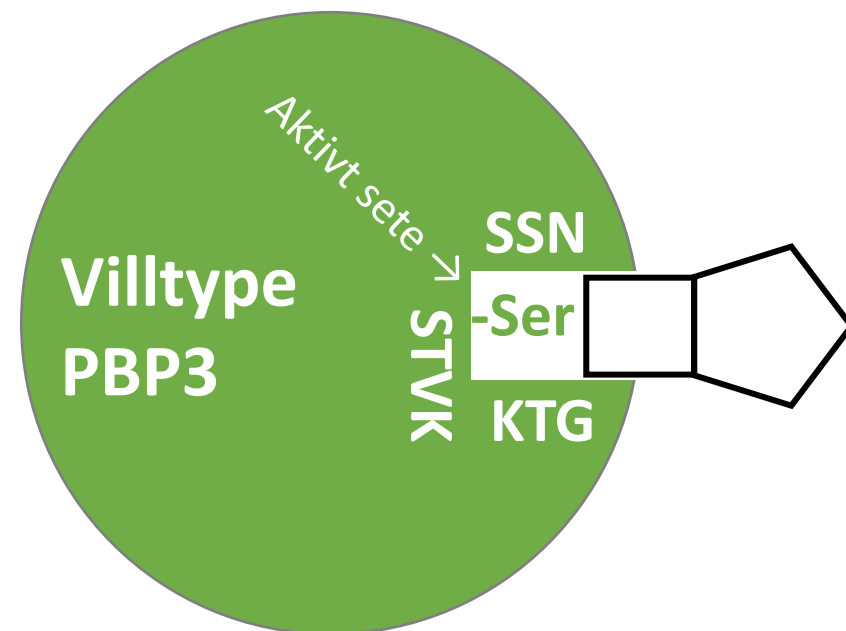
Bakgrunn av følsom indikatorstamme (f.eks. ATCC 49766)

Hemningssone rundt indikatorlapp (f.eks. PG1)

Innvekst av indikatorstammen langs betalaktamase-produserende stamme (f.eks. ATCC 35056)

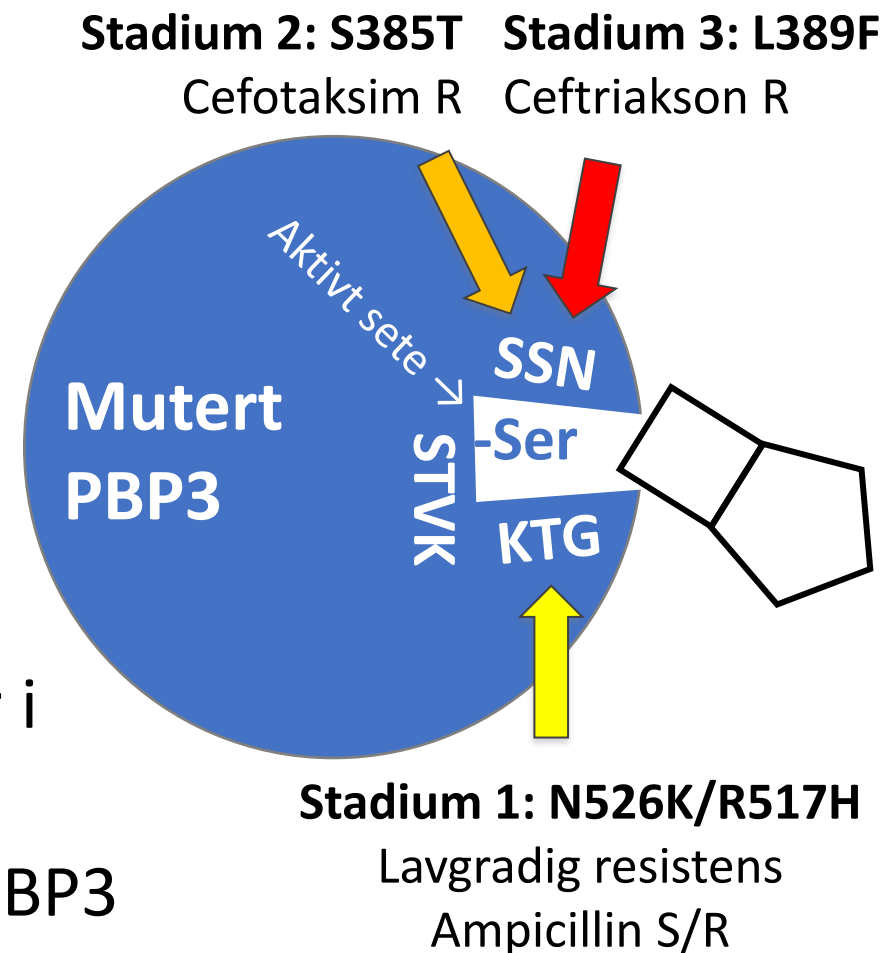
Kromosomal resistens hos *H. influenzae*

- Mutasjoner i *ftsI*-genet som koder for penicillinbindende protein 3 (PBP3)
- Essensielt enzym i peptidoglykansyntesen
- Hovedangrepspunkt for betalaktamer



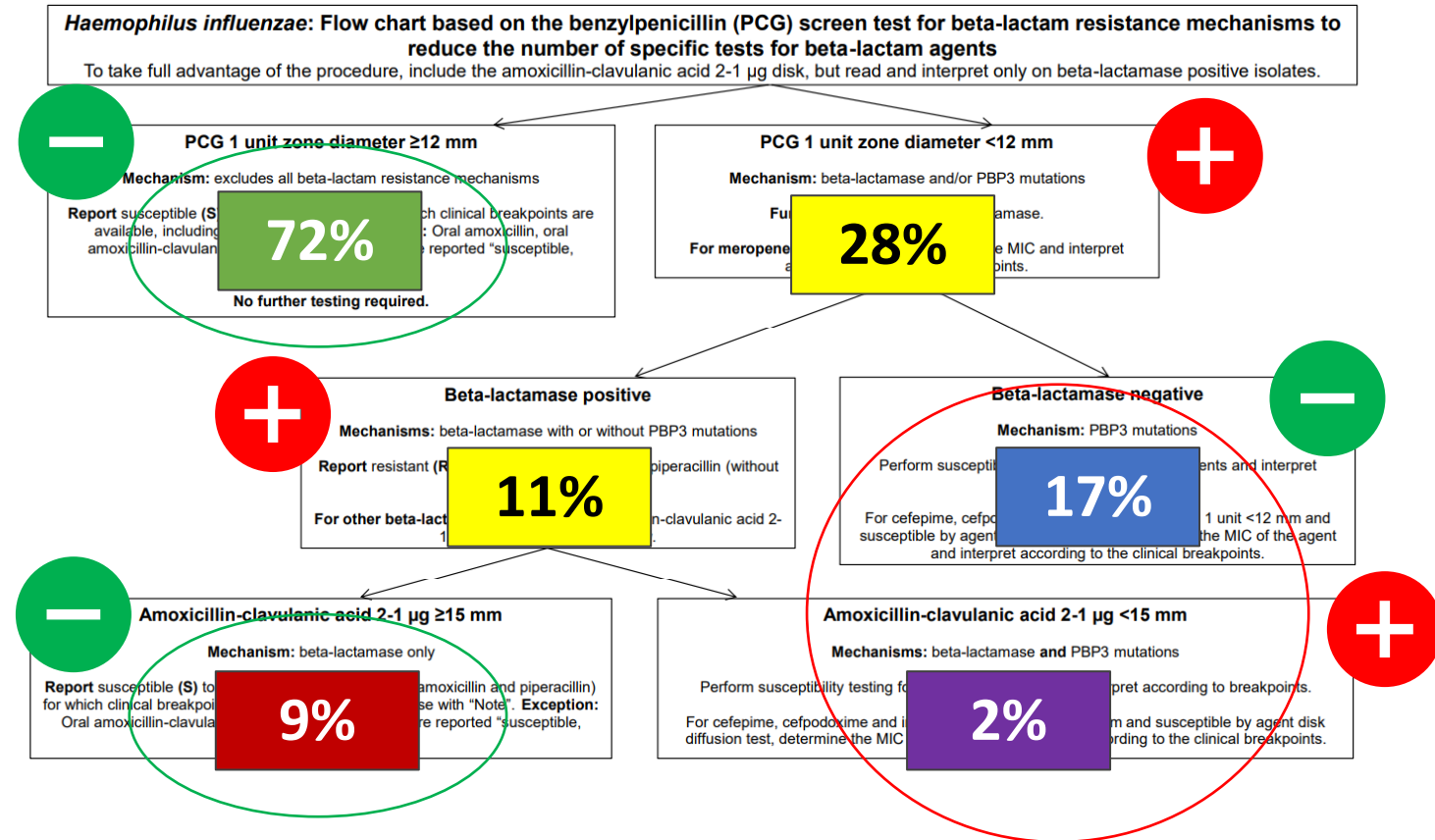
Kromosomal resistens hos *H. influenzae*

- Mutasjoner i *ftsI*-genet som koder for penicillinbindende protein 3 (PBP3)
- Essensielt enzym i peptidoglykansyntesen
- Hovedangrepspunkt for betalaktamer
- Mutert PBP3 (rPBP3) har bevart enzymatisk aktivitet, men lav affinitet for betalaktamer
- Resistensnivået øker med antall substitusjoner i nøkkelposisjoner rundt aktivt sete
- 1-2% av norske *H. influenzae* er stadium 2-3 rPBP3



Algoritme for resistensbestemmelse

- Tre-trinns screening for resistensmekanismer
- Ved negativ screening og kun Bla: SIR-kategorisering uten videre testing
- Ved rPBP3: Testing av aktuelle midler og SIR-kategorisering iht. kliniske brytningspunkter



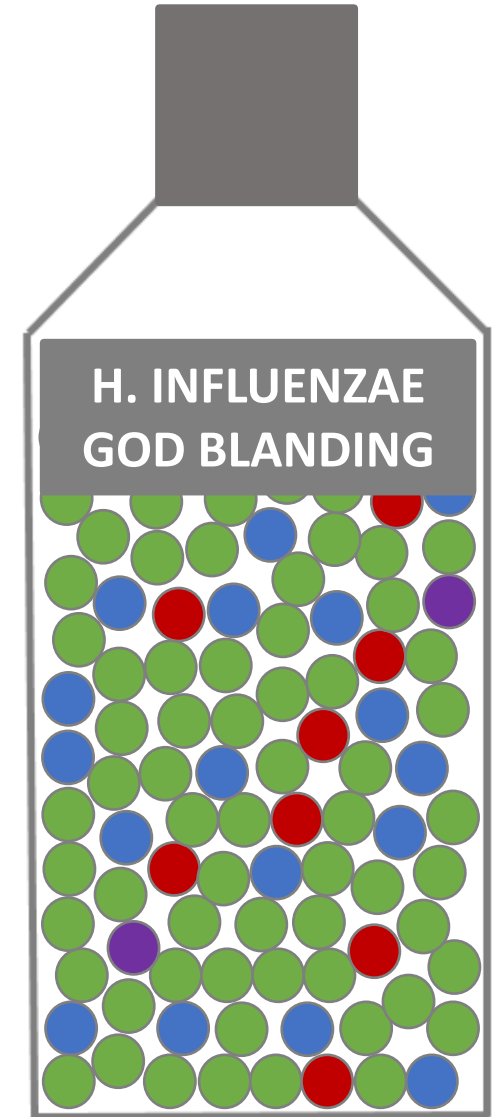
Screening for resistensmekanismer

Av 100 *H. influenzae* i norske luftveier har

- 72 ingen resistensmekanismer (villtype)
- 9 kun betalaktamase (Bla+)
- 17 kun kromosomal resistens (rPBP3+)
- 2 begge deler (Bla+ rPBP3+)

Supplerende
testing
nødvendig

Hvordan finne ut hvilke isolater som har hva?



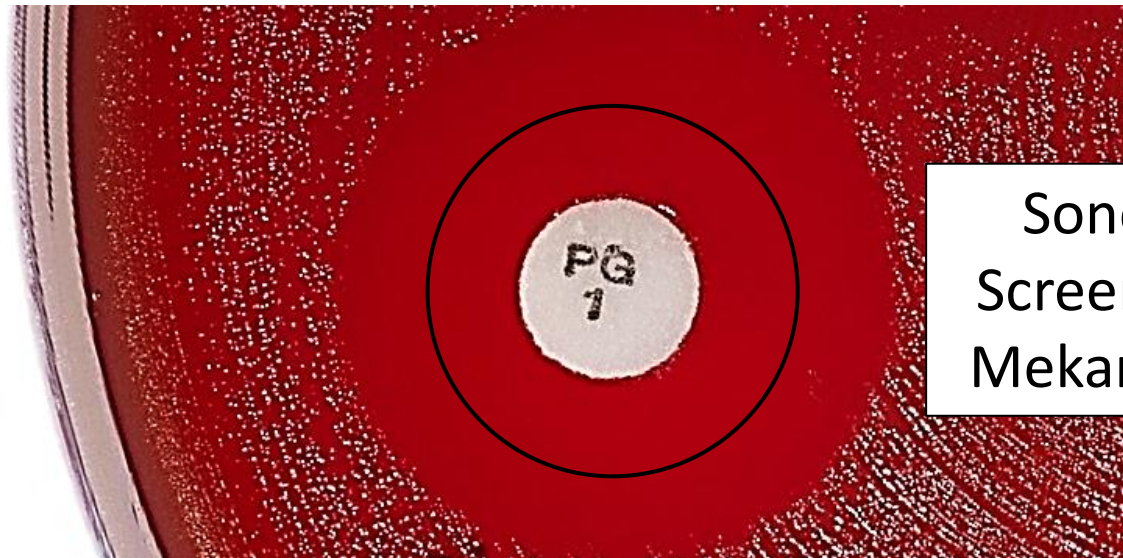
Trinn 1: PG1 lapp

- Benzylpenicillin 1 unit (brytningspunkt 12 mm)
- Detekterer all ervervet resistens
- Skiller ikke mellom ulike resistensmekanismer

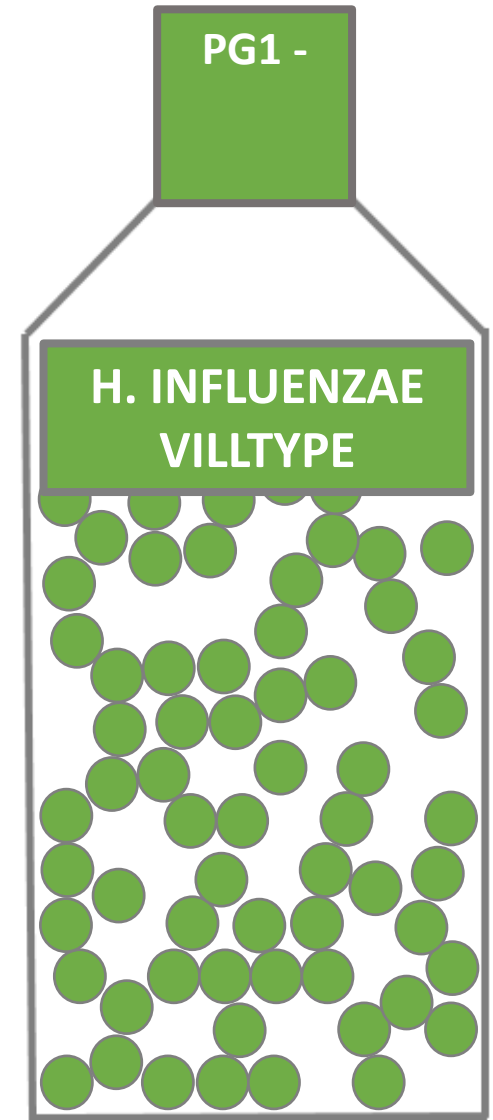


Trinn 1: PG1 lapp

- Benzylpenicillin 1 unit (brytningspunkt 12 mm)
- Detekterer all ervervet resistens
- Skiller ikke mellom ulike resistensmekanismer

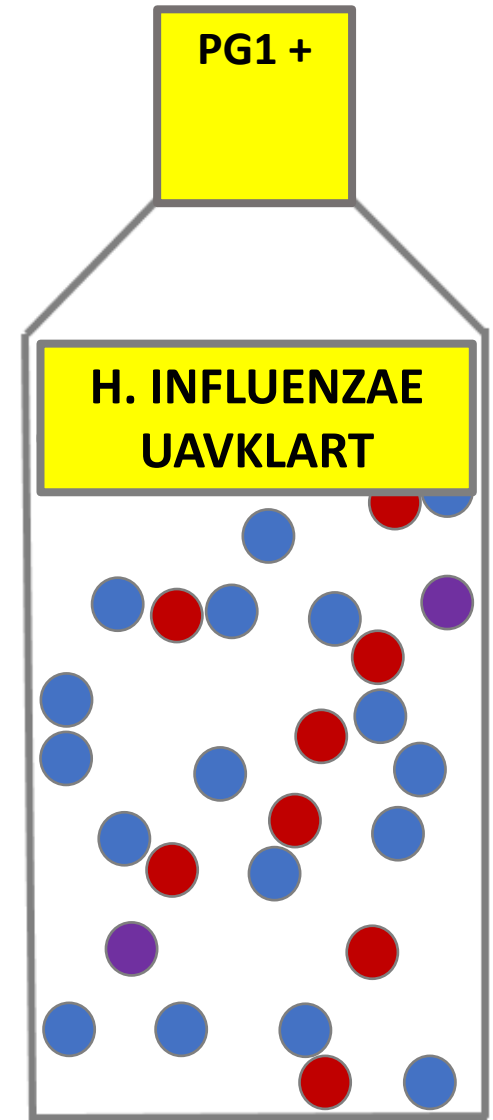


Sone ≥ 12 mm
Screening **negativ**
Mekanisme: Ingen



Trinn 1: PG1 lapp

- Benzylpenicillin 1 unit (brytningspunkt 12 mm)
- Detekterer all ervervet resistens
- Skiller ikke mellom ulike resistensmekanismer



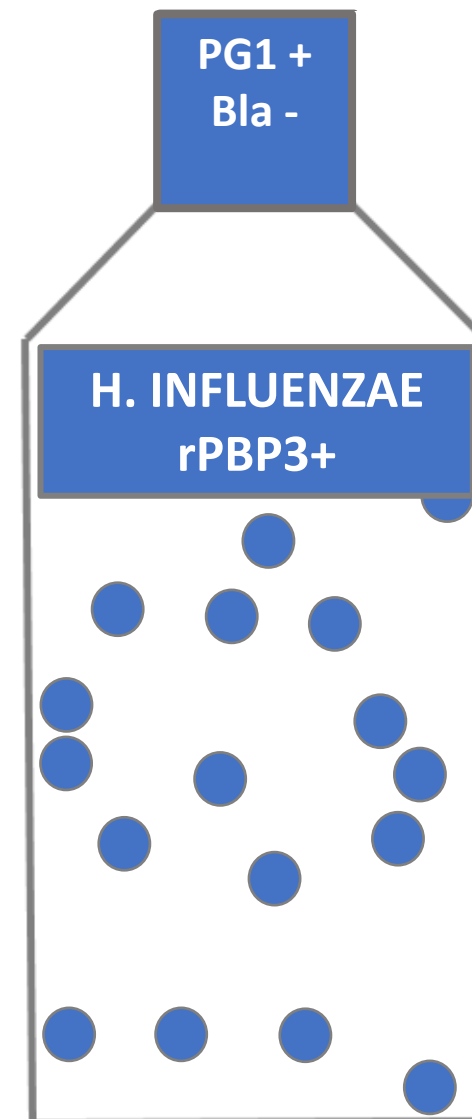
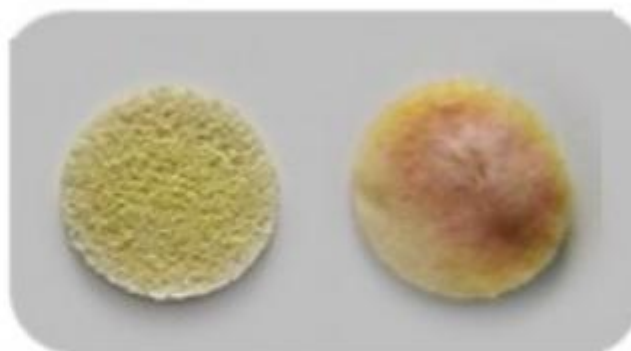
Trinn 2: Betalaktamase

- Hvis PG1 < 12 mm: Gjør betalaktamasetest
- **Negativ:** Kun rPBP3+

Acidimetri



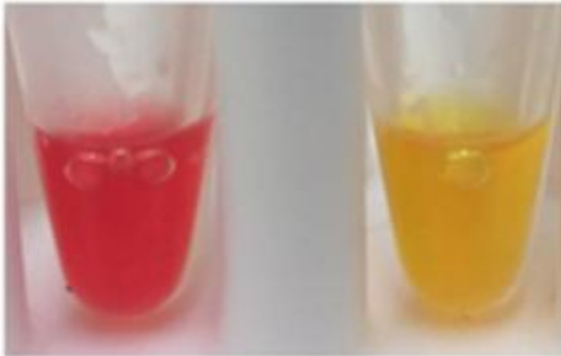
Nitrocefin



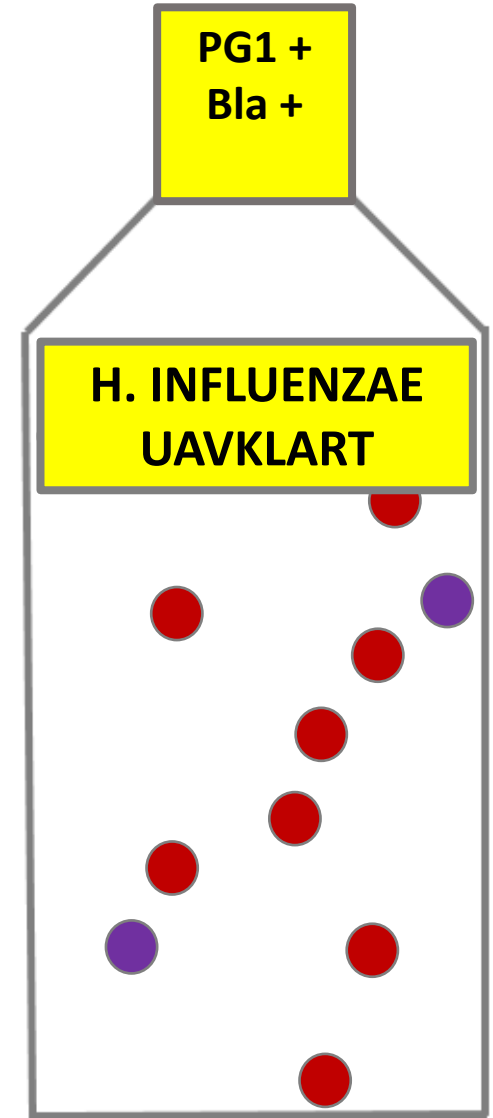
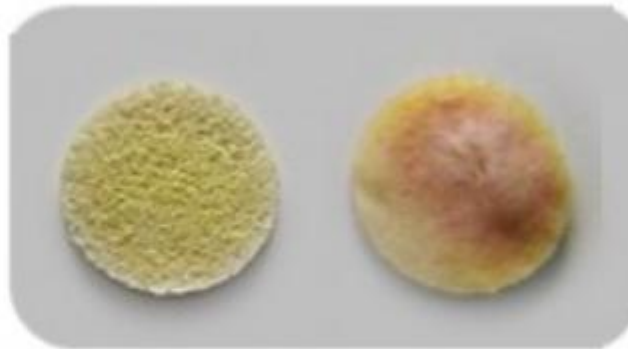
Trinn 2: Betalaktamase

- Hvis PG1 < 12 mm: Gjør betalaktamasetest
- **Negativ:** Kun rPBP3+
- **Positiv:** Kun Bla+, eller både Bla+ og rPBP3+

Acidimetri

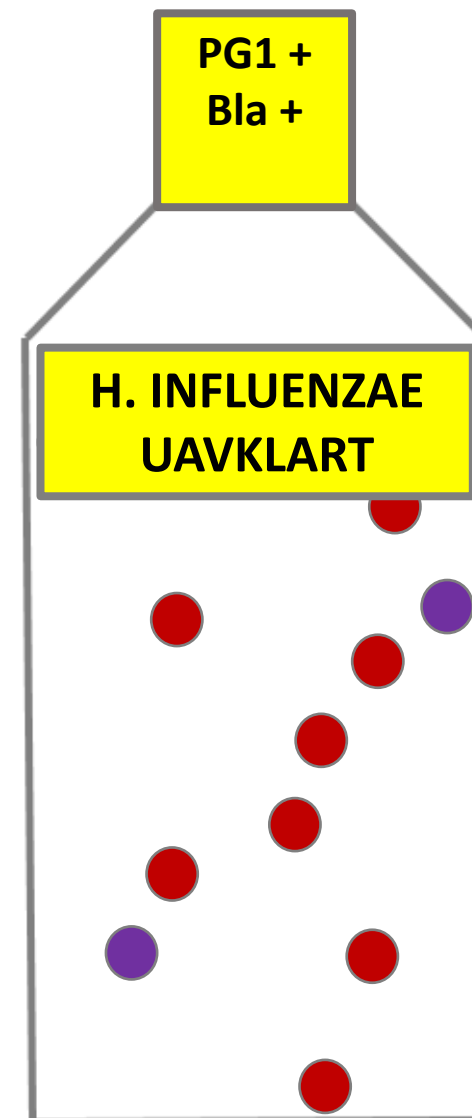


Nitrocefim



Trinn 3: AUG3 lapp

- Hvis PG1 < 12 mm og betalaktamasetest positiv:
- Amoksicillin-klavulansyre 2-1 µg (bp 15 mm)
- Detekterer rPBP3 ved samtidig Bla+

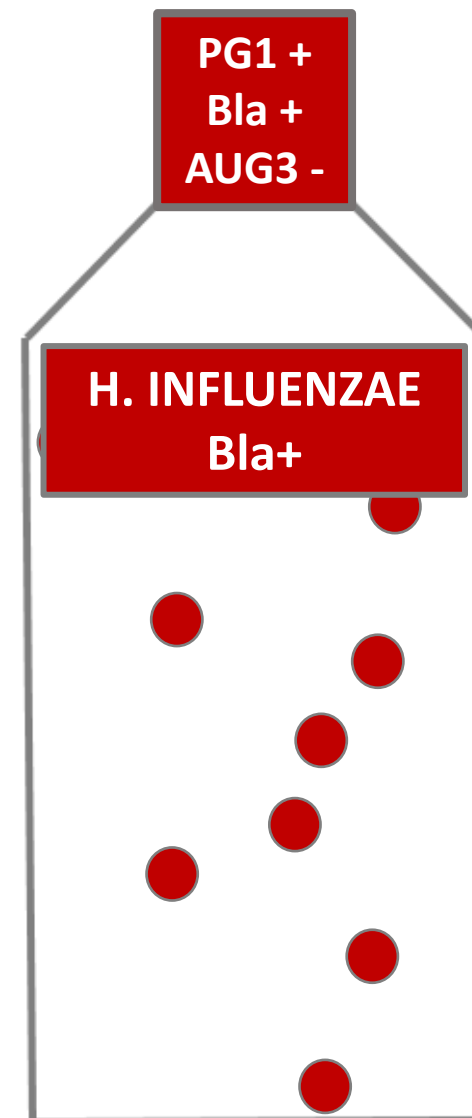


Trinn 3: AUG3 lapp

- Hvis PG1 < 12 mm og betalaktamasetest positiv:
- Amoksicillin-klavulansyre 2-1 µg (bp 15 mm)
- Detekterer rPBP3 ved samtidig Bla+

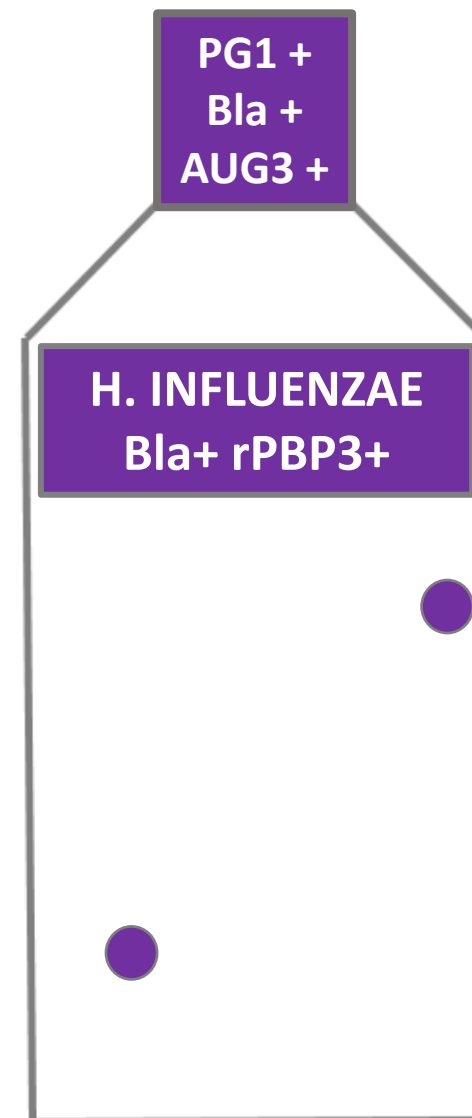
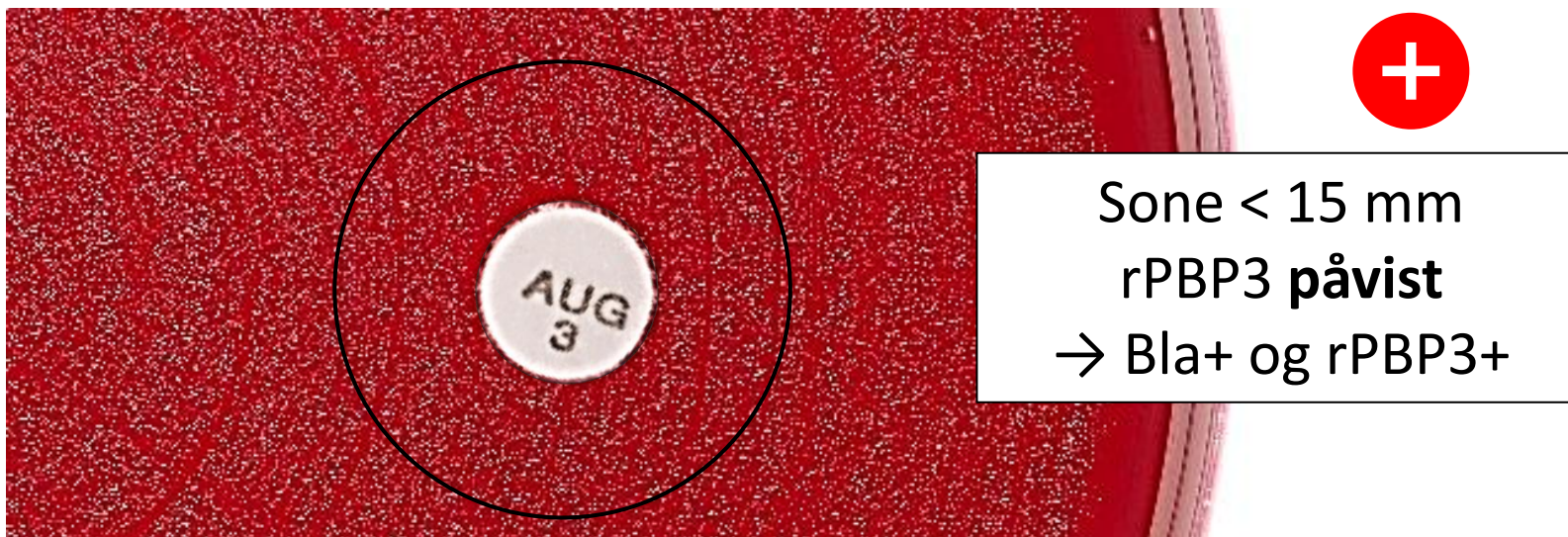


Sone ≥ 15 mm
rPBP3 **ikke påvist**
→ Kun Bla+



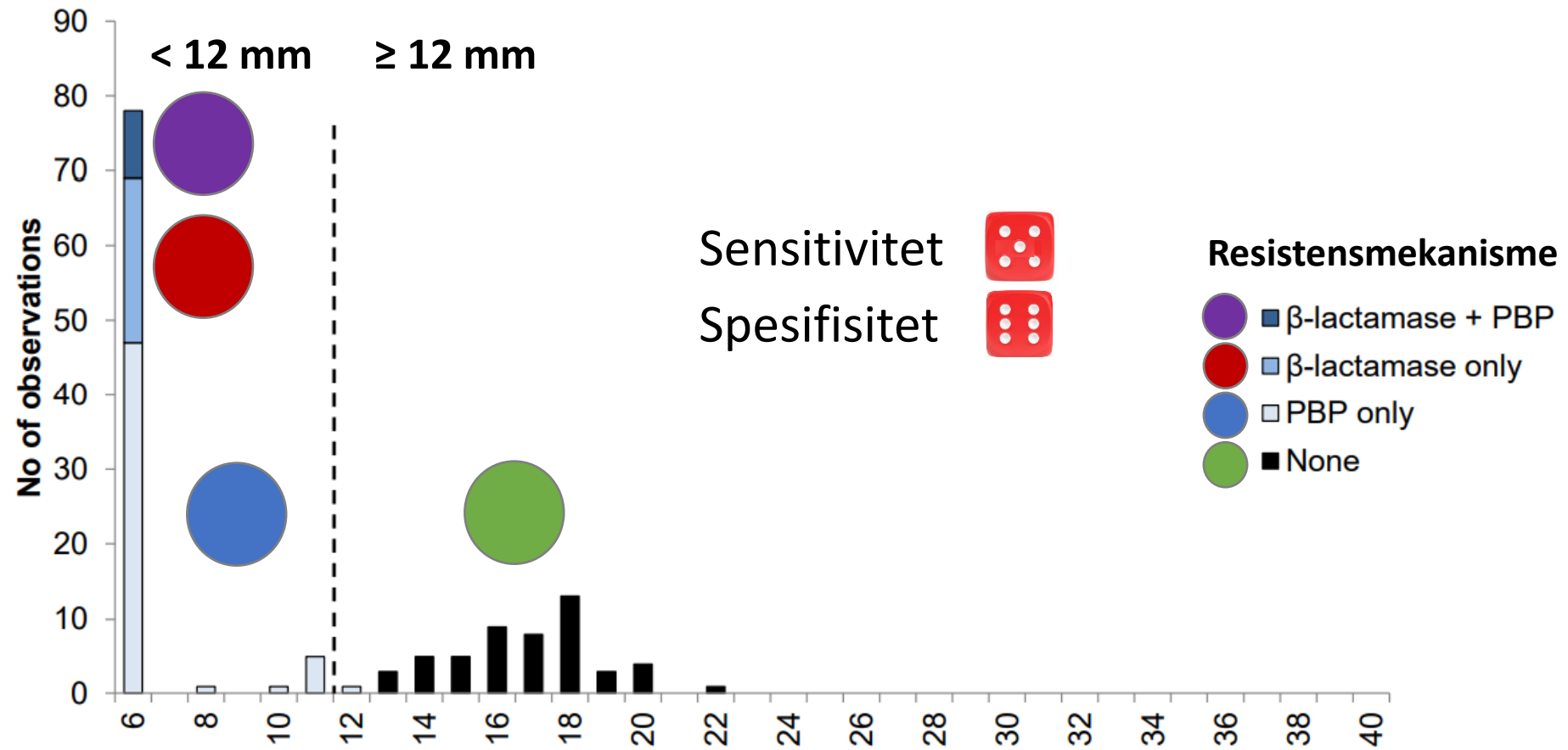
Trinn 3: AUG3 lapp

- Hvis PG1 < 12 mm og betalaktamasetest positiv:
- Amoksicillin-klavulansyre 2-1 µg (bp 15 mm)
- Detekterer rPBP3 ved samtidig Bla+

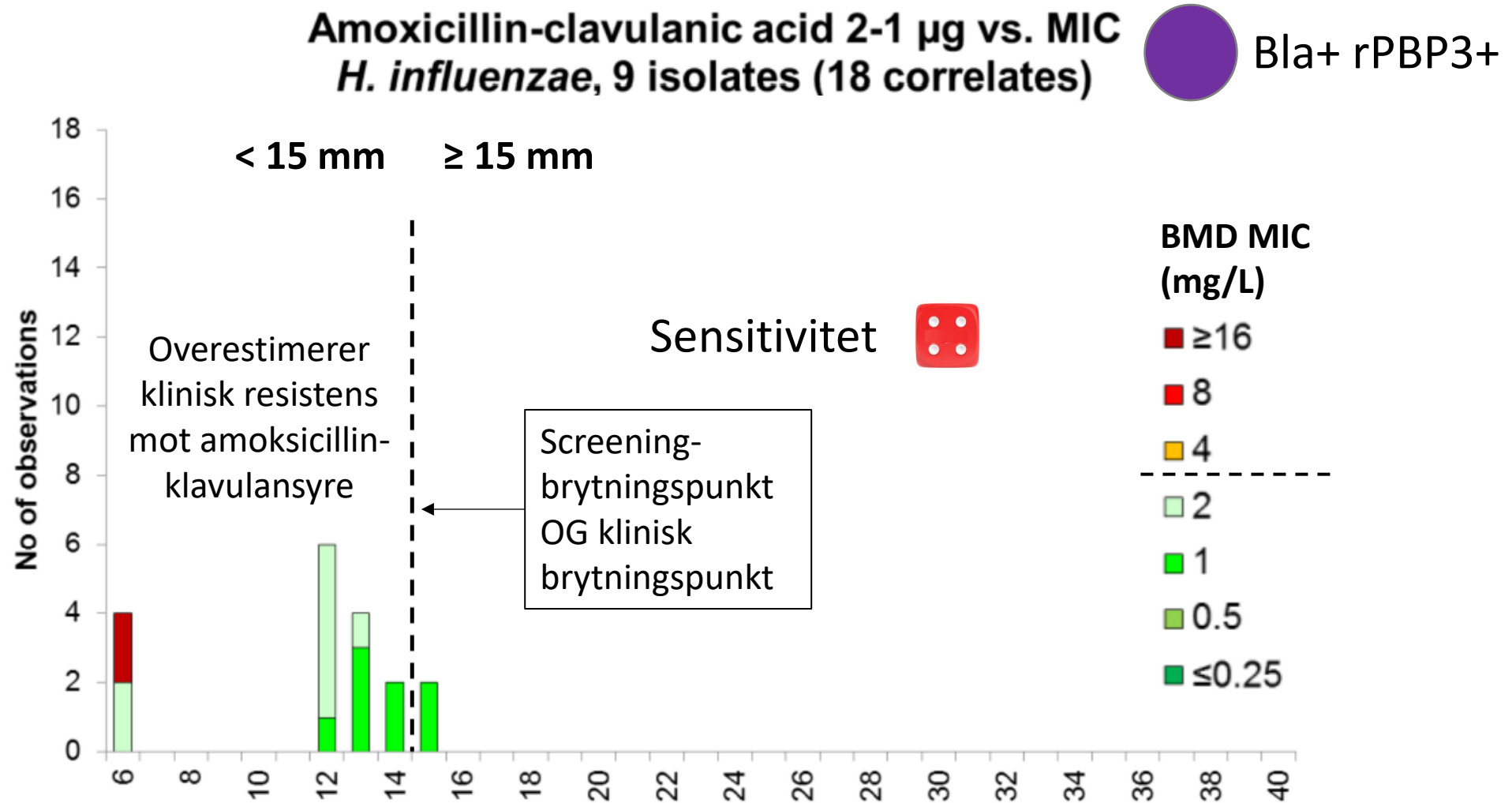


Hvor pålitelig er PG1?

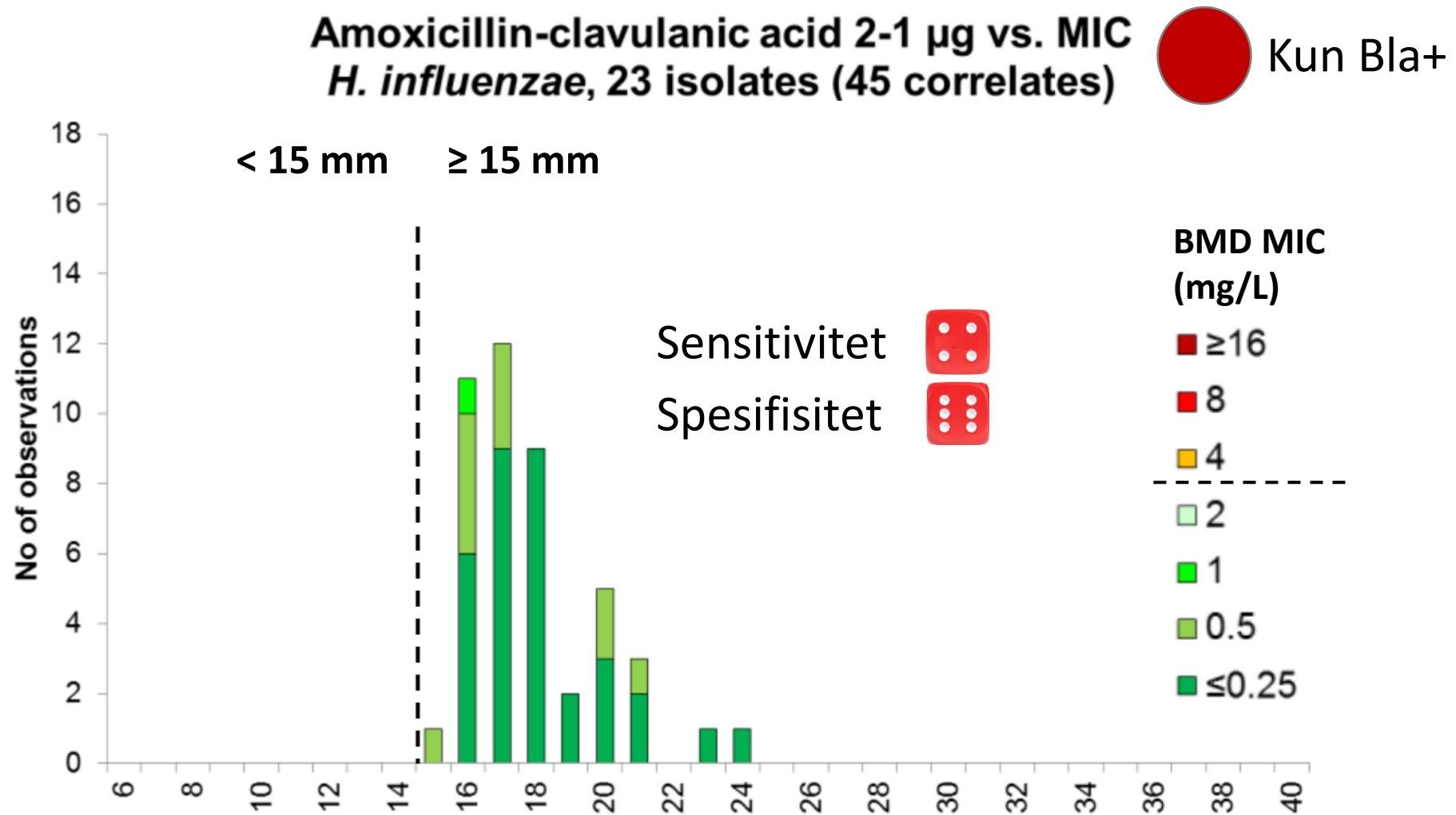
**Benzylpenicillin 1 unit vs. β -lactam resistance mechanism
H. influenzae, 137 clinical isolates**



Hvor pålitelig er AUG3?



Hvor pålitelig er AUG3?



SIR-kategorisering (unntatt meningitt)

- Negativ screening: Midler med brytningspunkter eller Note er S (eller I)*
- Bla+: Ampicillin og amoksicillin rapporteres R
- rPBP3+: Test aktuelle midler og tolk iht. brytningspunkter

Resistens- mekanisme	Ampicillin Amoksicillin	Amoksi-klav Pip-tazo	Cefotaksim Ceftriakson	Meropenem
● Ingen	S (I)*	S (I)*	S	S
● Bla+	R	S (I)*	S	S
● Bla+ rPBP3+	R	Lapp/MIC	Lapp/MIC	Lapp/MIC
● rPBP3+	Lapp/MIC	Lapp/MIC	Lapp/MIC	Lapp/MIC

SIR-kategorisering (meningitt)

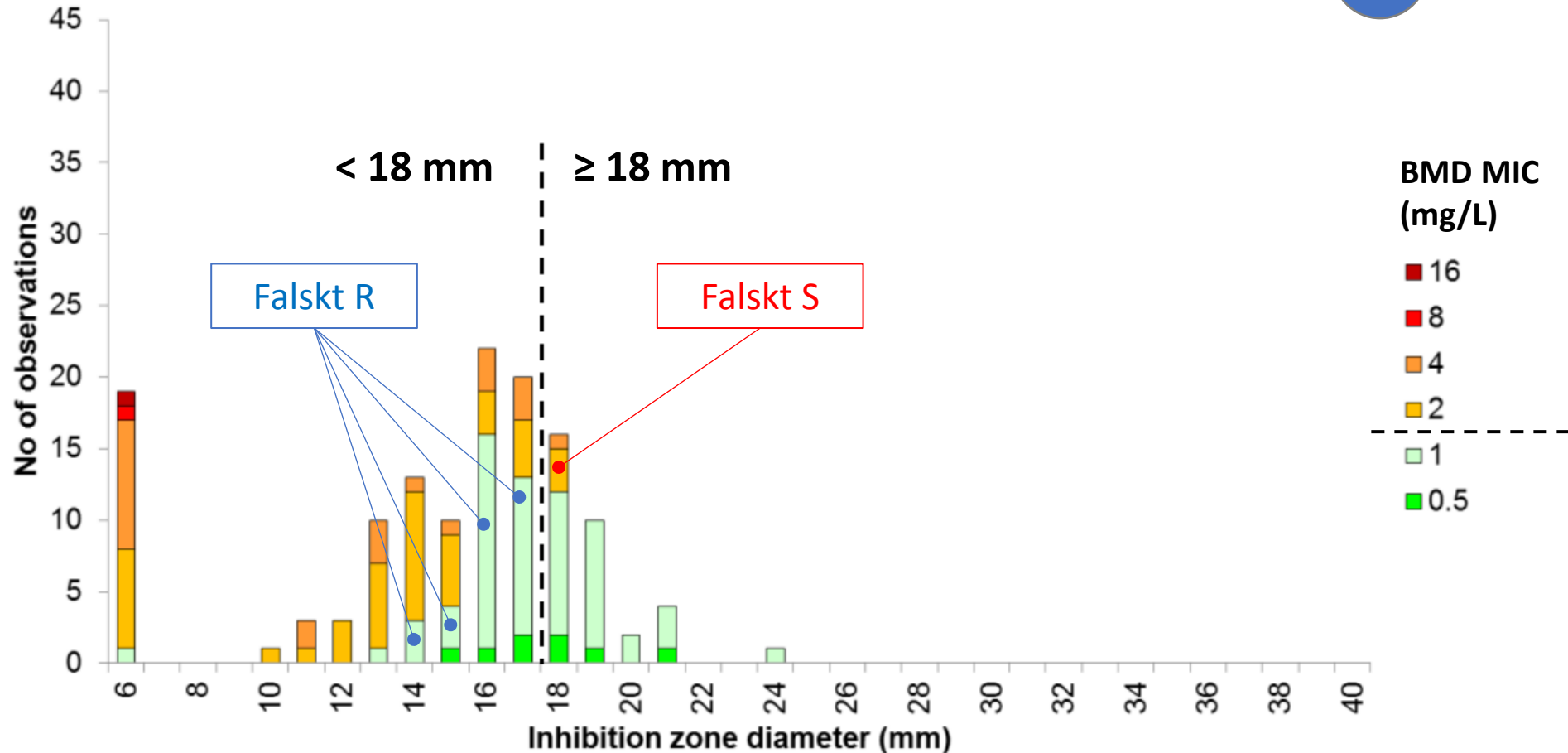
- Positiv screening (PG1 < 12 mm): Ampicillin R, gjør meropenem MIC
- rPBP3+: Test cefotaksim og ceftriakson (lapp/MIC)
- Tolk iht. brytningspunkter (obs særskilte meningitt-bp for meropenem)

Resistens- mekanisme	Ampicillin Amøksicillin	Amøksi-klav Pip-tazø	Cefotaksim Ceftriakson	Meropenem
● Ingen	S	Ikke aktuelt	S	S
● Bla+	R	Ikke aktuelt	S	MIC
● Bla+ rPBP3+	R	Ikke aktuelt	Lapp/MIC	MIC
● rPBP3+	R	Ikke aktuelt	Lapp/MIC	MIC

Ampicillin: Lapp eller gradient MIC?

Ampicillin 2 µg vs. MIC
H. influenzae, 68 isolates (134 correlates)

 Kun rPBP3+



Ampicillin: Lapp eller gradient MIC?

TABLE 1 Categorization of susceptibility of beta-lactamase-negative isolates ($n = 154$) to ampicillin, amoxicillin, and cefuroxime by Etest (HTM)

Drug and MIC guideline	Difference ^b	BMD MIC (mg/liter)										<i>n</i>	%
		0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	≥32		
Ampicillin Etest	+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
Etest MIC	-1			2	2	9	26	3				42	27.3
<i>lavere enn</i>	-2					1	5	17				23	14.9
BMD MIC	-3						2 ^e	1	2			5	3.2

Samme kolleksjon testet med AMP2 ($S \geq 18/R < 18$):

- Færre ampicillin-R falskt S (17/60, 28%)
- Flere ampicillin-S falskt R (24 versus 2)

88% (53/60) av
ampicillin-R isolater
falskt S med Etest

Aminopenicilliner og rPBP3 – teststrategi?

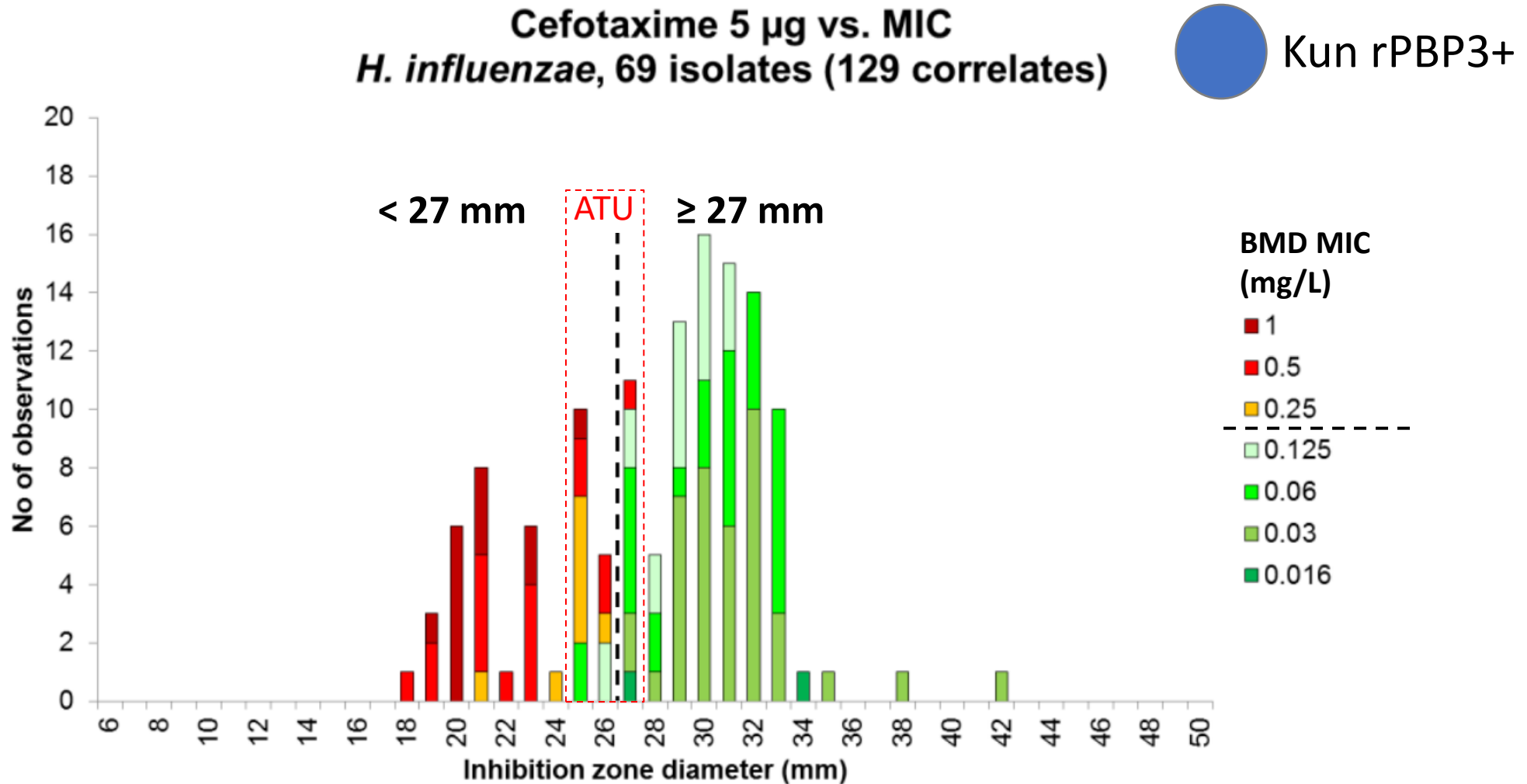
- Ifølge EUCAST og NordicAST kan amoksicillin utledes fra ampicillin, men hva med amoksicillin-klavulansyre?
- Brytningspunktene splitter rPBP3-populasjonen, og separat testing av aminopenicilliner ± klavulansyre kan derfor gi meningsløse resultater
 - Ampicillin og amoxicillin S/I, amoksicillin-klavulansyre R
 - Ampicillin og amoxicillin R, amoksicillin-klavulansyre S/I
- Alternative løsninger
 - a) Test ampicillin → utled amoksicillin og amoksi-klav
 - b) Test amoksi-klav → utled ampicillin og amoksicillin (SiV-metoden)

Mentimeter *Haemophilus influenzae*

Hva er rutinemetode for resistensbestemmelse av ikke-invasive H. influenzae mot **ampicillin** ved deres laboratorium?

- a. Screening + lappediffusjon
- b. Screening + gradient MIC
- c. Kun lappediffusjon (ingen screening)
- d. Kun gradient MIC (ingen screening)
- e. Annet

Cefotaksim: Lapp eller gradient MIC?



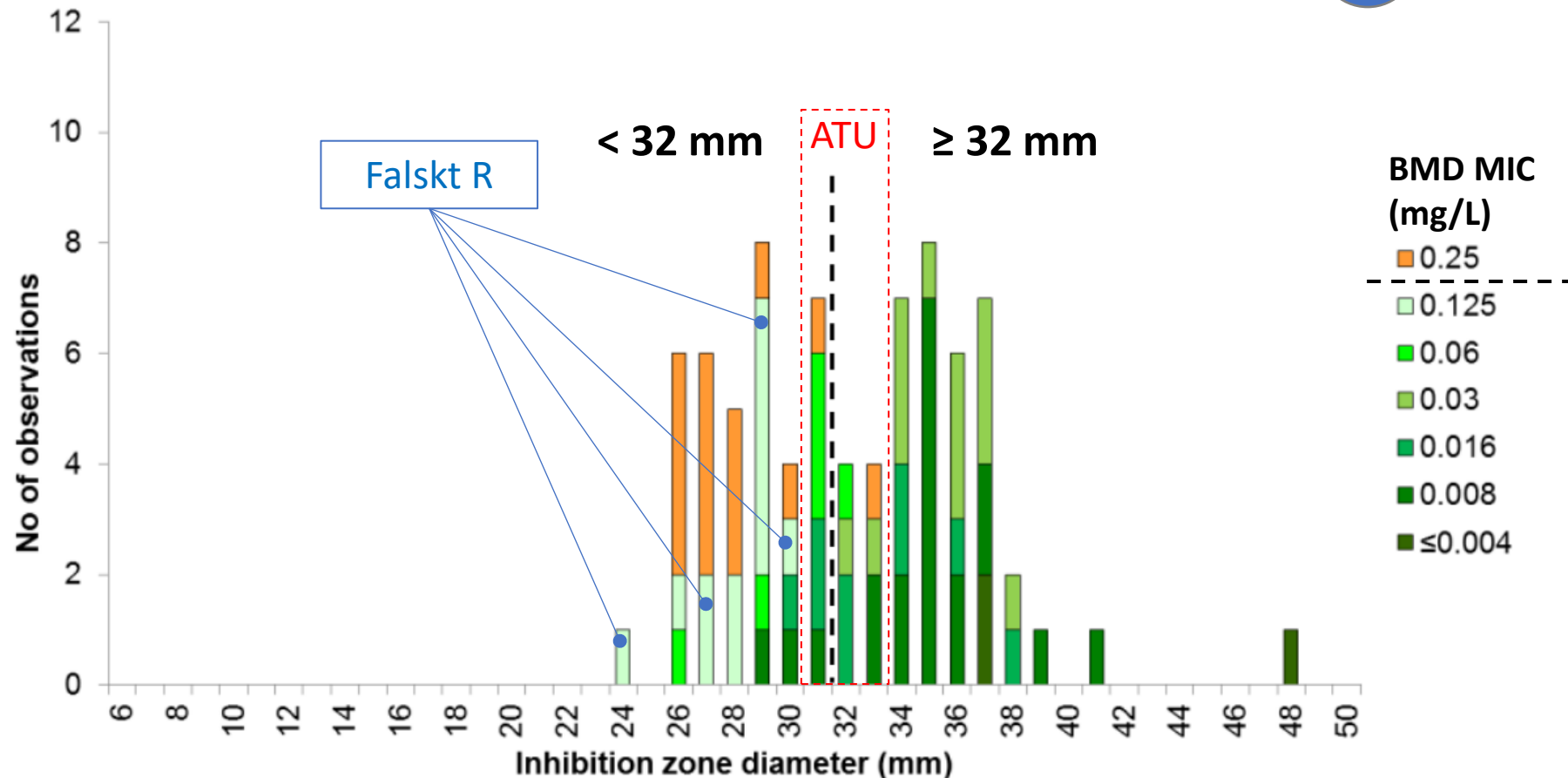
Cefotaksim: Lapp eller gradient MIC?

Cefotaxime gradient MIC (mg/L)	No. of isolates	Cefotaxime broth microdilution (BMD) MIC (mg/L)					Falsely resistant	
		0.125	0.25	0.5	1	2	No. of isolates	%
4	2	-	-	1	-	1	-	-
2	60	-	-	10	49	1	-	-
1	65	-	-	24	39	2	-	-
0.5	28	-	6	17	4	1	-	-
0.25	56	20	29	5	2	-	20	35.7%
No. of isolates	211	20	35	57	94	5	20	9.5%
%	100.0%	9.5%	16.6%	27.0%	44.5%	2.4%		

Ceftriakson: Lapp eller gradient MIC?

Ceftriaxone 30 µg vs. MIC
H. influenzae, 60 isolates (78 correlates)

 Kun rPBP3+

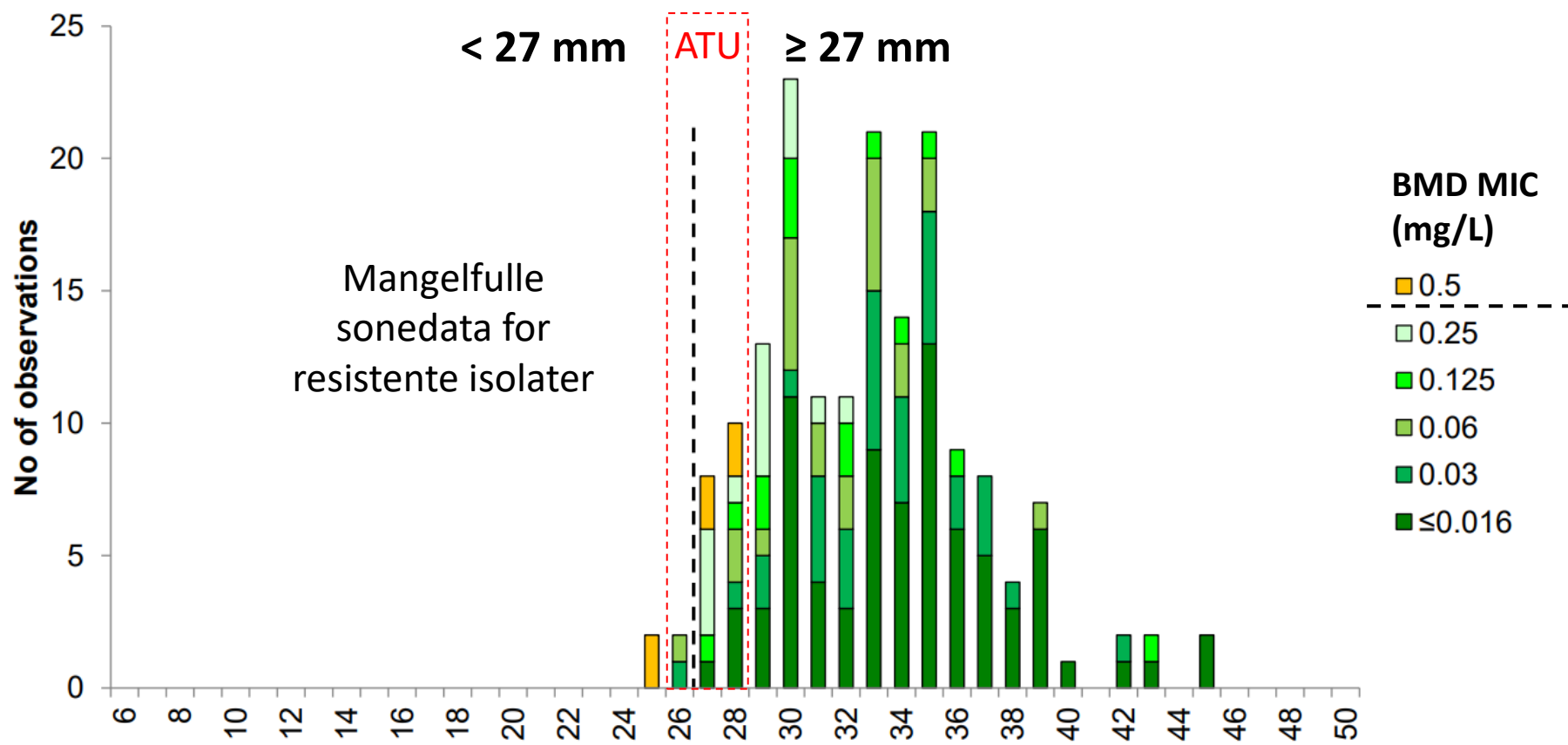


Ceftriakson: Lapp eller gradient MIC?

Ceftriaxone MIC (mg/L)	BMD				
Gradient diffusion	≤0.06	0.12	0.25	0.5	Total
0,5	Falskt R		4	2	6
0,25			35	5	43
0,125	1	3	12	1	17
0,064	3	4			7
0,032	8	3			11
0,016	1				1
Total	13	13	51	8	85

Pip-tazo: Lapp eller gradient MIC?

Piperacillin-tazobactam 30-6 µg vs. MIC
H. influenzae, 161 isolates (171 correlates)



Pip-tazo: Lapp eller gradient MIC?

Piperacillin/tazobactam MIC (mg/L)	BMD				Total
	≤ 0.06	0.125	0.25	0.5	
1	Falskt R	1	2	1	4
0.5	2	7	6		15
0.25	7	24	3		34
0.125	14	10	1	1	26
0.06	11	5			16
0.03	2	1		Falskt S	3
Total	36	48	12	2	98

Oppsummering

- Screening for resistensmekanismer har høy sensitivitet og spesifisitet
- SIR – aminopenicilliner
 - Kategoriske feil er hyppig → test ett middel og utled de andre to
 - Lappediffusjon relativt ofte falskt R, men gradienttester er enda oftere falskt S
- SIR – cefotaksim, ceftriakson og piperacillin-tazobaktam
 - Lappediffusjon pålitelig for cefotaksim, men relativt ofte falskt R for ceftriakson
 - Gradient MIC > BMD for cefotaksim (1-2 trinn) og < BMD for ceftriakson (1 trinn)
 - Mangelfull dokumentasjon for piperacillin-tazobaktam (både lapp og gradient)
- BMD bør brukes mer i rutinediagnostikk