

# Betalaktamasepåvisning

**Påvisning av betalaktamase hos *Staphylococcus* spp.,  
*Enterococcus faecalis*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella*  
*catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae* og *Neisseria meningitidis***

Truls Leegaard, Avdeling for mikrobiologi og smittevern,  
Akershus universitetssykehus (AHUS), Lørenskog

- Publisert på NordicASTs hjemmeside 1.1.2013
- Basert på tilsvarende dokument fra AFA (Arbeidsgruppen for antibiotikaspørsmål): Tveten, Y. AFAs anbefalte metode(r) for påvisning av betalaktamase. Versjon 1.1.1, 2010

# Bakgrunn

- Betalaktamaser er enzymer som inaktiverer betalaktamantibiotika ved å hydrolysere betalaktamringen.
- Gener som koder for disse enzymene er lokalisert kromosomalt eller på mobile genetiske elementer.
- Produksjonen kan være konstitutiv eller induserbar.
- Betalaktamasene utgjør en stor og heterogen gruppe med varierende evne til inaktivering av ulike betalaktamer.
- Hos *Staphylococcus* spp., *Enterococcus faecalis*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae* og *Neisseria meningitidis* er det i hovedsak smalspektrede betalaktamaser som har klinisk betydning.
- Smalspektrede betalaktamaser er serin-betalaktamaser (Ambler klasse A) innenfor subgruppene 2a og 2b i Bush-Jacoby sitt klassifikasjonssystem (1).

- Fenotypiske metoder for fenotypisk påvisning av betalaktamaseproduksjon kan deles inn i to kategorier:
  - A. Direkte tester
  - B. Mikrobiologiske tester.
- Falskt positive og falskt negative reaksjoner forekommer, og supplerings med PCR-basert påvisning av betalaktamasegener kan i noen tilfeller være nødvendig for å oppnå et sikkert resultat.
- Kvalitetskontroll med referansestammer anbefales alltid utført i forbindelse med testing:
  - *S. aureus* ATCC 25923 og ATCC 29213
  - *H. influenzae* ATCC 49766 (betalaktamase negative) og CCUG 23969 (betalaktamase positive)

# Direkte tester

## Kromogene cefalosporiner

- Nitrocefins er et kromogent cefalosporin som endrer farge fra gult til rødt når det hydrolyseres av betalaktamaseenzymer.
- Benyttes i kommersielle tester og betraktes som mer sensitiv enn acidimetriske/iodometriske tester for påvisning av betalaktamase hos *M. catarrhalis*, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* og *H. influenzae* (unntatt ROB-1).
- Ved testing av stafylokokker kan kun positive resultater tillegges vekt.



# Acidimetriske / iodometriske tester

- Begge testprinsipper benytter penicillin som substrat og en fargeindikator som detekterer nedbrytningsproduktet (penicilloic acid) etter betalaktamasemediert hydrolyse av betalaktamringen.
- Ved iodometri er fargeindikatoren et jod-stivelseskompleks som pga reduksjon av jod vil avfarges ved tilstedeværelse av penicilloic acid. Ved acidimetri påvises et pH-fall ved hjelp av fenolrødt.
- Acidimetriske tester er spesielt nyttige for testing av *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae* og *N. meningitidis*.

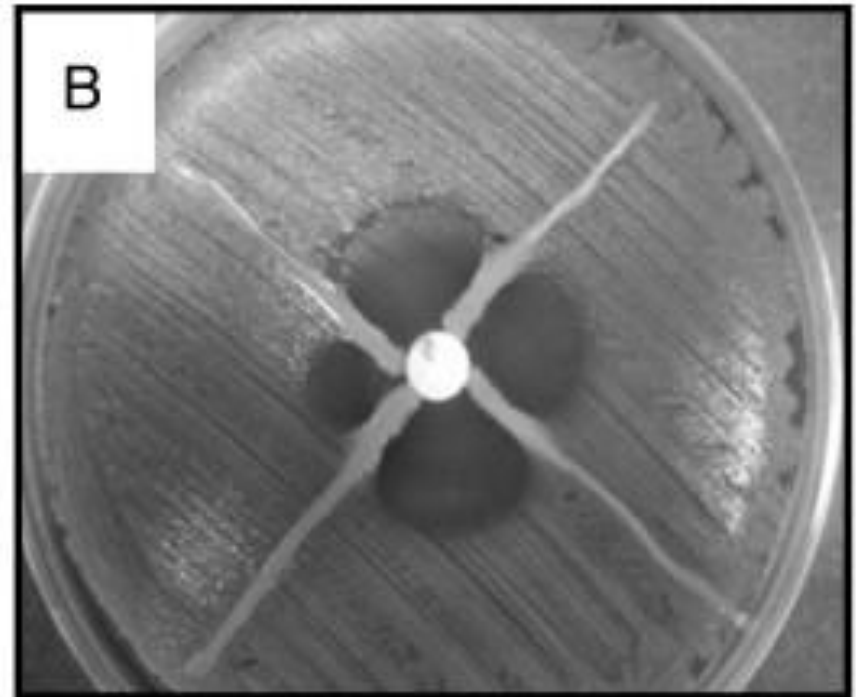
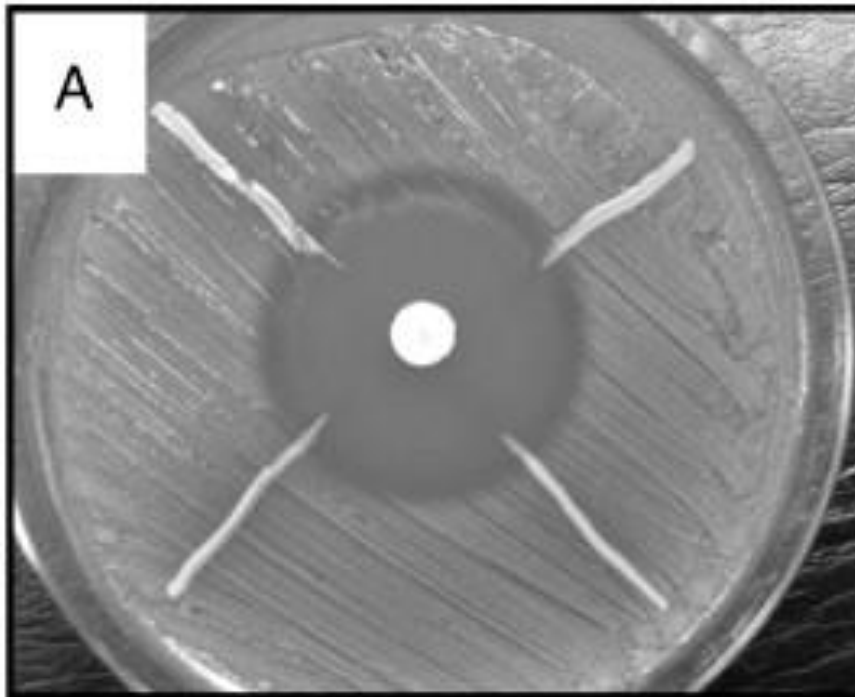


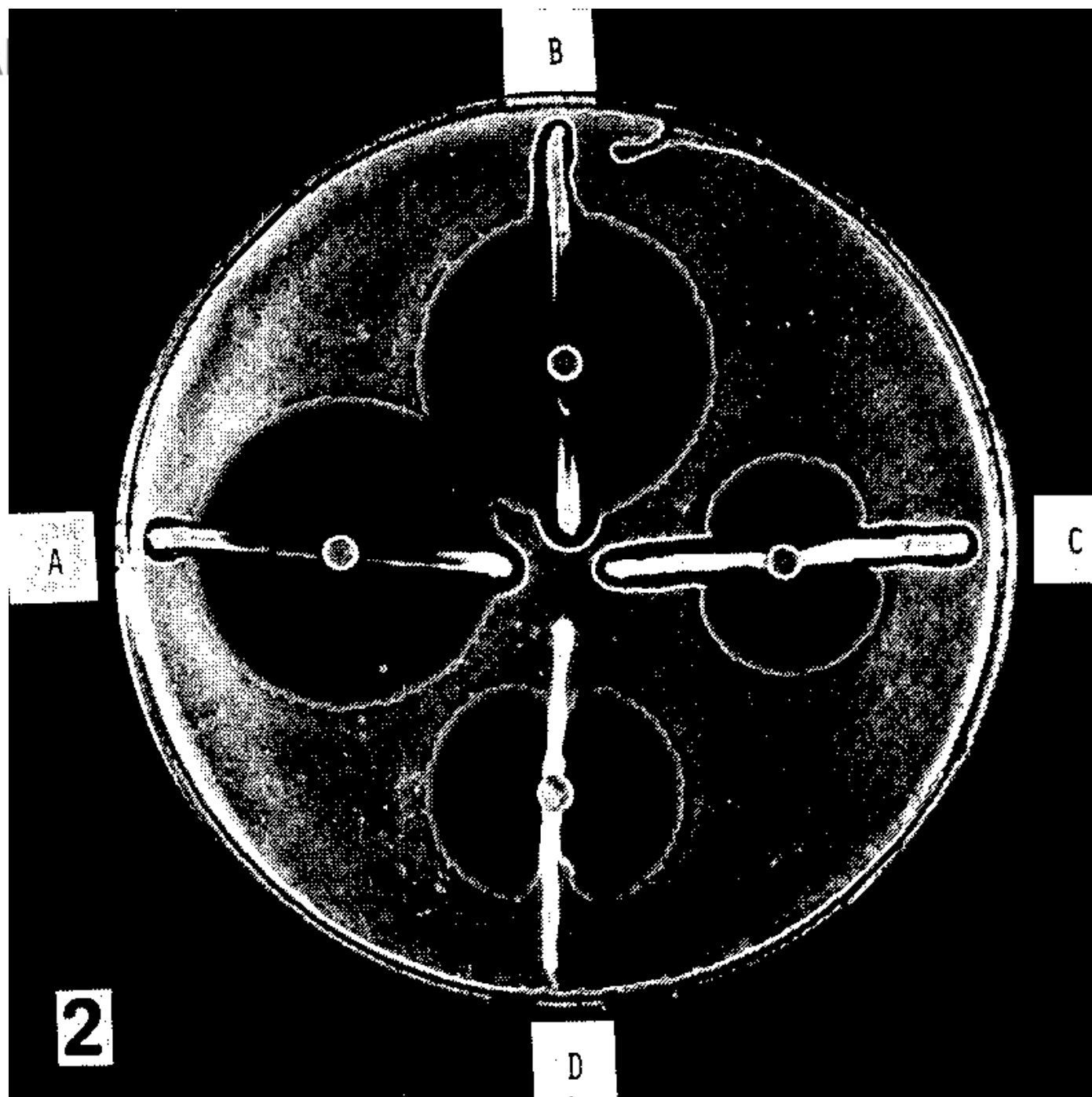
**Figure 3.**  $\beta$ -Lactamase production with acidimetric method.

# Mikrobiologiske tester

## Kløverbladtest

- En suspensjon av en penicillinfølsom indikatorstamme spres over hele overflaten på en agarskål
- Etter tørking såes teststammen ut i et kryss på skålen, og en lapp med benzylpenicillin plasseres midt i krysset
- Skålen inkuberes i 16-18 t ved  $35\pm 2$  C
- Dersom teststammen produserer betalaktamase vil penicillin som er diffundert ut i mediet brytes ned og inaktiveres nær veksten av stammen
- Indikatorstammen kan dermed vokse inn mot penicillinlappen langs teststammen slik at det dannes et karakteristisk kløverbladmønster
- Metoden er godt egnet for testing av *H. influenzae* og *S. aureus* men anbefales ikke benyttet til testing av KNS.





# Mikrobiologiske tester

## Bedømmelse av sonekant

- Lappediffusjon med penicillinlapp og bedømmning av sonekanten er en god metode for påvisning av betalaktamaseproduksjon, spesielt for *S. aureus*
- Hvis isolatet danner betalaktamase er hemningssonen skarpt avgrenset med fullt utviklede kolonier i randsonen og eventuelt i selve sonen
- Hos betalaktamase negative isolater avtar kolonistørrelsen i randsonen gradvis innover i hemningssonen ("diffus", "strandbredd")
- Vekstmønsteret er viktigere å bedømme enn sonens størrelse
- Isolater med skarp sonekant rapporteres som resistent uansett om sonediameteren er større enn brytningspunktet

a)



b)



# Mikrobespesifikke anbefalinger

# *Staphylococcus* spp.

- Penicillinresistens hos stafylokokker skyldes induserbare, plasmidbårne penicillinaser som kodes for av genet blaZ. Påvisning av betalaktamase kan være vanskelig, ettersom blaZ positive stammer kan ha benzylpenicillin MIC lavere enn S-brytningspunktet og fenotypiske metoder for påvisning av betalaktamase hos *S. aureus* da har lav sensitivitet. Induksjon av betalaktamaseproduksjon kan være nødvendig for å oppnå et positivt resultat.
- Data fra SSI har vist at bedømmelse av sonekant samt kløverbladtest har meget høy korrelasjon med tilstedeværelse av blaZ selv uten induktion og NordicAST anbefaler således disse to testene for påvisning av betalaktamase hos *S. aureus*.
- For KNS har samtlige fenotypiske tester lav sensitivitet og spesifisitet. Rutinemessig testing av KNS anbefales derfor ikke og rapportering av følsomhetskategori for betalaktamasefølsomme pencilliner frarådes.

# *Enterococcus faecalis*

- Betalaktamaseproduksjon er sjelden hos enterokokker, men det er rapportert isolater med plasmidoverført penicillinase som likner penicillinaser hos stafylokokker.
- Betalaktamaseproduksjon uttrykkes ofte lavgradig og kan derfor være vanskelig å detektere med fenotypiske metoder. Rutinemessig testing anbefales ikke.

# *Haemophilus influenzae*

- Betalaktamaseproduksjon hos *H. influenzae* er plasmidoverført og resistens uttrykkes konstitutivt. Den vanligst forekommende betalaktamasen er TEM-1, som kan detekteres med kromogent cefalosporin og acidimetriske tester (2;4;12) og med kløverbladmetoden (8). Kromogent cefalosporin har lav sensitivitet for påvisning av den sjeldnere forekommende betalaktamasen ROB-1 (2).

# *Moraxella catarrhalis*

- Mer enn 90 % av *M. catarrhalis* er betalaktamaseproduserende, vanligvis som følge av kromosomale BRO-1 eller BRO-2 betalaktamaser. Testing er vanligvis ikke indisert. Av direkte tester for betalaktamasepåvisning er det kun kromogent cefalosporin som har vist å gi pålitelig resultat (4;13).

# *Neisseria gonorrhoeae* og *Neisseria meningitidis*

- Mens betalaktamaseproduksjon hos gonokokker i form av plasmidoverført TEM-1 betalaktamase har fått vid utbredelse, er betalaktamaseproduserende meningokokker svært sjeldne . Både direkte tester og kløverbladtest kan brukes til påvisning av betalaktamase hos gonokokker. Hos meningokokker er det vist at kromogent cefalosporin kan brukes for påvisning.

# Oppsummering av mikrobepesifikke anbefalinger

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