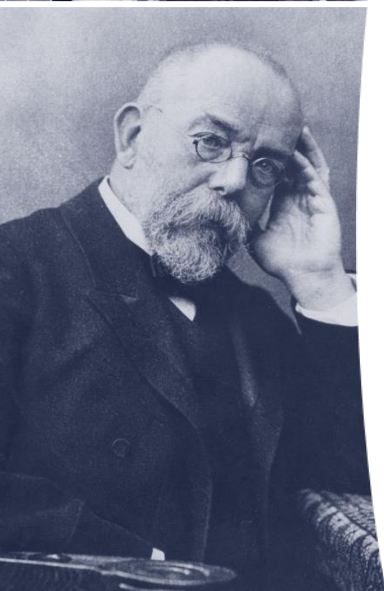




Resistenzen bei gram-positiven Bakterien gegen Linezolid, Tigecyclin und Daptomycin

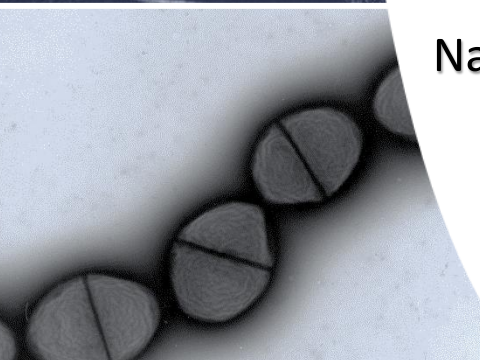
**G. Werner, F. Layer, B. Strommenger,
C. Cuny, S. Fiedler, J. Bender, I. Klare**

**Nationales Referenzzentrum für Staphylokokken und Enterokokken
FG Nosokomiale Infektionserreger und Antibiotikaresistenzen**

Abt. Infektionskrankheiten

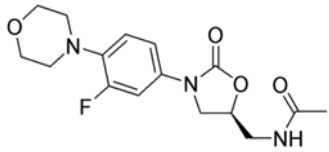
Robert Koch-Institut, Bereich Wernigerode

14./15.04.2014, Bad Honnef Symposium, Königswinter



Themen

- 1. Resistenz gegenüber Linezolid bei Enterokokken**
- 2. Resistenz gegenüber Linezolid bei KNS**
- 3. Resistenz gegenüber Daptomycin bei MRSA**
- 4. Resistenz gegen Tigecyclin bei Enterokokken**
- 5. Resistenz gegen Ceftarolin bei MRSA**



Linezolid und Oxazolidinon-Antibiotika

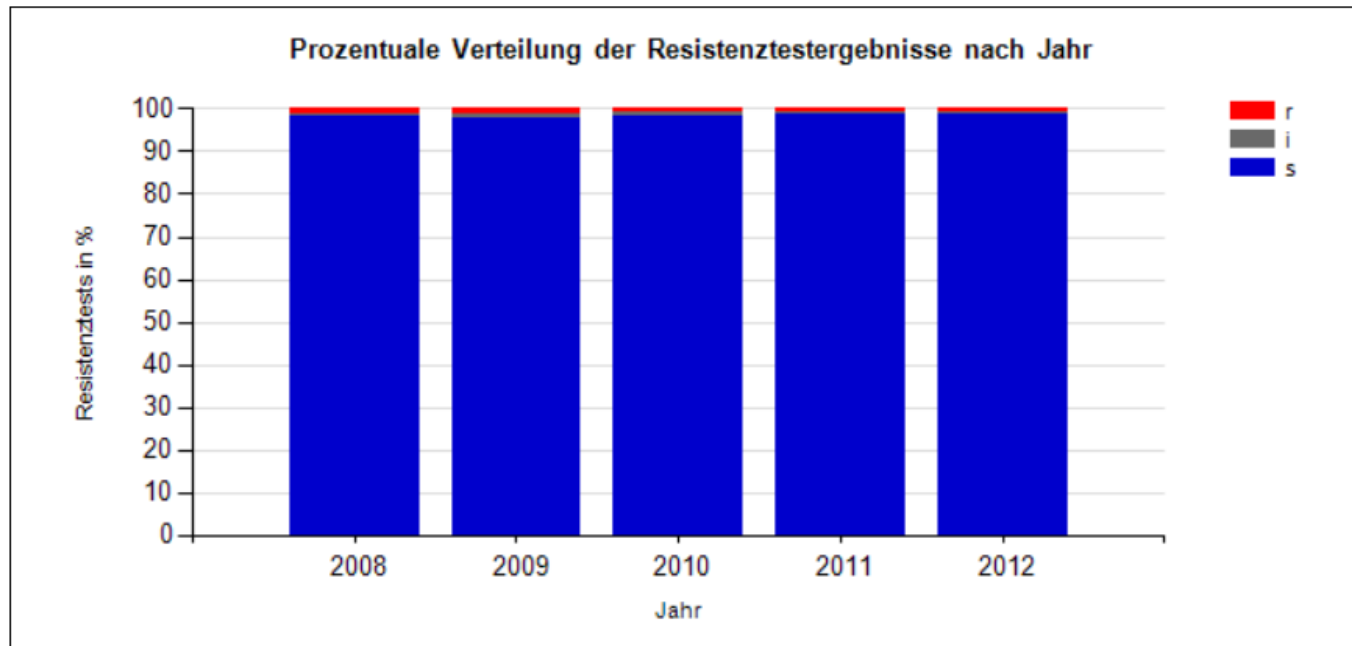
- ☐ **Vollsynthetisches Antibiotikum**
- ☐ **Hemmung der Initiation der bakteriellen Proteinbiosynthese**
- ☐ **Resistenz nach EUCAST: MHK >4 mg/L**
- ☐ **Resistenz vermittelt durch:**
 - ☐ **Veränderung ribosomaler rRNA/rDNA** (Enterokokken, Staphylokokken)
 - ☐ **Veränderung ribosomaler Proteine** (Staphylokokken)
 - ☐ **Plasmid-vermittelte Methyltransferasen *cfr*** (Enterokokken, Staphylokokken)

Linezolidresistenz in *E. faecium* (ARS)

Datenstand: 24.11.2013

Intervall	R		I		S		Total
	n	%	n	%	n	%	n
Jahr 2012	65	0,9	8	0,1	6888	99,0	6961
Jahr 2011	27	0,6	22	0,5	4517	98,9	4566
Jahr 2010	32	0,9	29	0,8	3475	98,3	3536
Jahr 2009	27	1,0	25	1,0	2566	98,0	2618
Jahr 2008	14	1,0	12	0,8	1401	98,2	1427

MHK R >4 mg/L



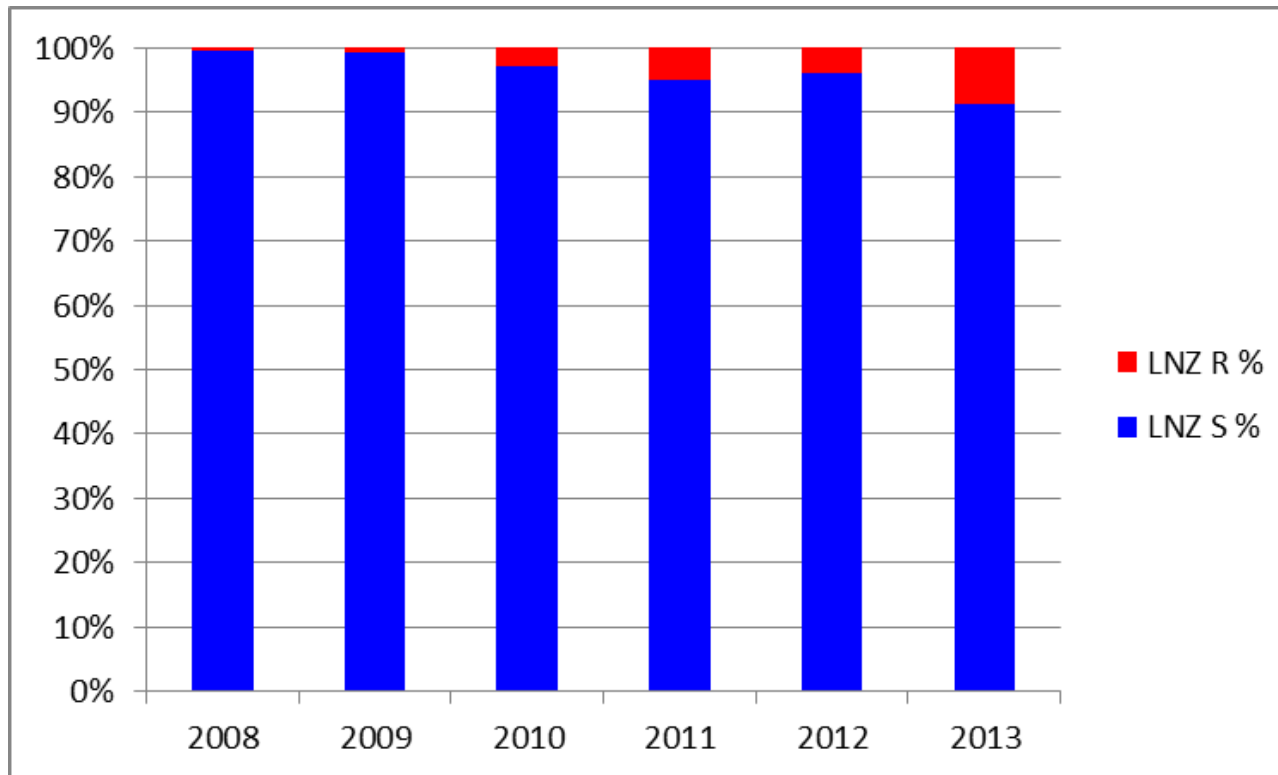
Linezolidresistenz in *E. faecium* (NRZ)



I. Klare

Jahr	LNZ R	LNZ R %	LNZ S	LNZ S %	Total
2013	76	8,88	780	91,12	856
2012	41	4,05	971	95,95	1012
2011	39	4,92	753	95,08	792
2010	10	2,97	327	97,03	337
2009	3	0,84	354	99,16	357
2008	2	0,62	321	99,38	323

EUCAST



Linezolidresistenz in *E. faecium*

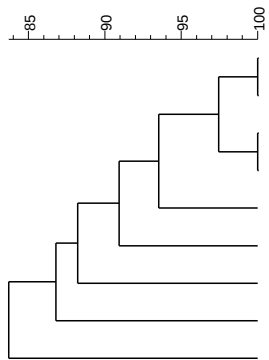


I. Klare

Einzelne Kliniken zeigten Häufungen mit Linezolid-resistenten VRE (*E. faecium*)

RFLP8b

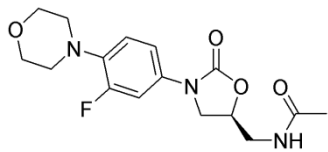
RFLP8b



Stamm	Jahr	<i>esp</i>	<i>hyl</i>	<i>van</i>	Patient	Station	Material
UW9075	2011	+	-	vanA	D., W.; m (58); Hämatologie/Onkologie	13068; Stuhl	
UW9076	2011	+	-	vanA	D., F.; m (49); Hämatologie/Onkologie	13845; Stuhl	
UW9048	2011	+	-	vanA	D., W.; m (58); Hämatologie/Onkologie	ANR 6392-1; Stuhl	
UW9054	2011	+	-	van-neg.	Z., B.; w (59); Hämatologie/Onkologie	ANR 9672; MSU	
UW9073	2011	+	-	vanA	S., I.; w (67); Hämatologie/Onkologie	9871; Rektalabstrich	
UW9074	2011	+	-	vanA	K., P.; w (50); Hämatologie/Onkologie	10654; MSU	
UW9087	2011	+	-	vanA	P., E.; w (58); Hämatologie/Onkologie	ANR 17929; Rektalabstrich	
UW9047	2011	+	-	vanA	M., A.; m (22); Hämatologie/Onkologie	ANR 6389-1; Stuhl	
UW9053	2011	+	-	vanA	H., L.; w (20); Hämatologie/Onkologie	ANR 7337; Rektalabstrich	

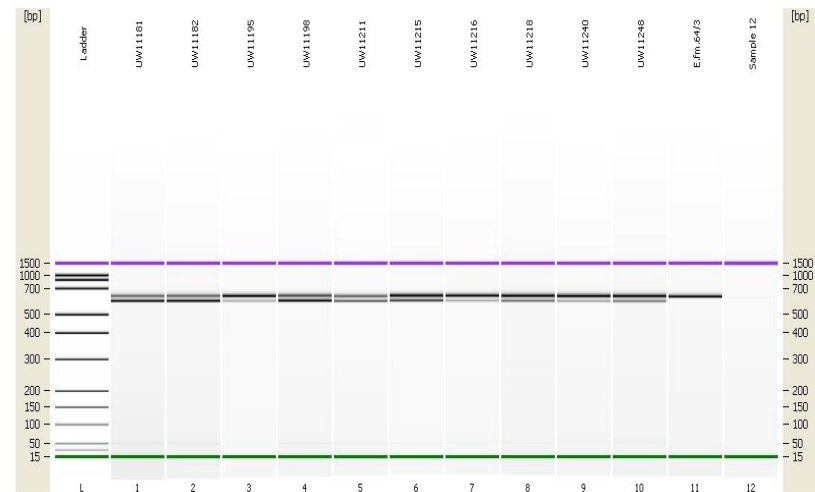
Makrorestriktionsanalyse eines Clusters von VRE-Isolaten (MLST ST117) mit zusätzlicher Resistenz gegen Linezolid.

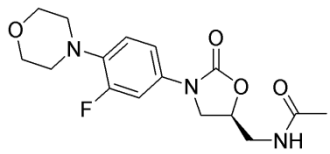
Legende: *esp*, Gen für Enterococcal surface protein; *hyl*, Gen für Hyaluronidase; *van-ne.*, *van-negativ*; m, male; f, female. Der *van*-negative Stamm UW9054 hat offenbar das *vanA*-Gencluster verloren.



Linezolidresistenz in *E. faecium*

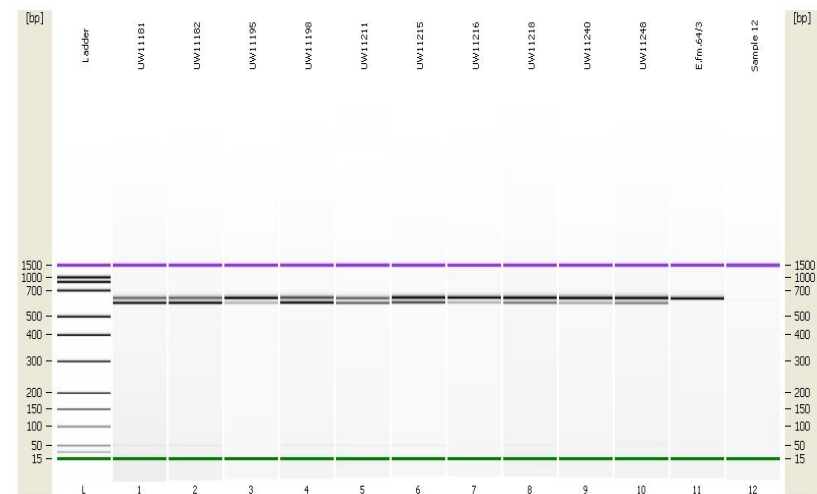
- In Enterokokken vermittelt durch Mutation G2576T in 23S rDNA
- In *E. faecium* 6 rDNA-Gene/Allele pro Genom (in *E. faecalis* n= 4)
- Mutation G2576T generiert neue *NheI* Schnittstelle: Amplifikation der 23S rDNA und Restriktion der Amplifikate; Auftrennung im Agilent BioAnalyzer (s. unten; Werner et al., 2004)
- **NRZ:**
n= 186 LNZ-resistente *E. faecium* aus 46 Laboren/Krankenhäusern
 - 50 *vanA* (26,9 %) und 23 *vanB* (12,4 %)





Linezolidresistenz in *E. faecium*

- 181/186 Isolate zeigten Mutationen in der 23S rDNA (2-5 von 6 Allelen mutiert)
- Kein LNZ-resistentes Isolat hatte alle 6 Allele mutiert(?!)
- LNZ-resistente Isolate zeigten einen stabilen LNZ-Phänotyp/MHK und Genotyp (Anzahl der Mutationen) beim Passagieren über 7 Wochen im Antibiotika-freien Medium (n= 6)
- Zwei Isolate besaßen eine plasmid-vermittelte LNZ Resistenz über *cfr* (zusätzlich zu den 23S rDNA Mutationen)



Linezolidresistenz in *S. aureus* (ARS)

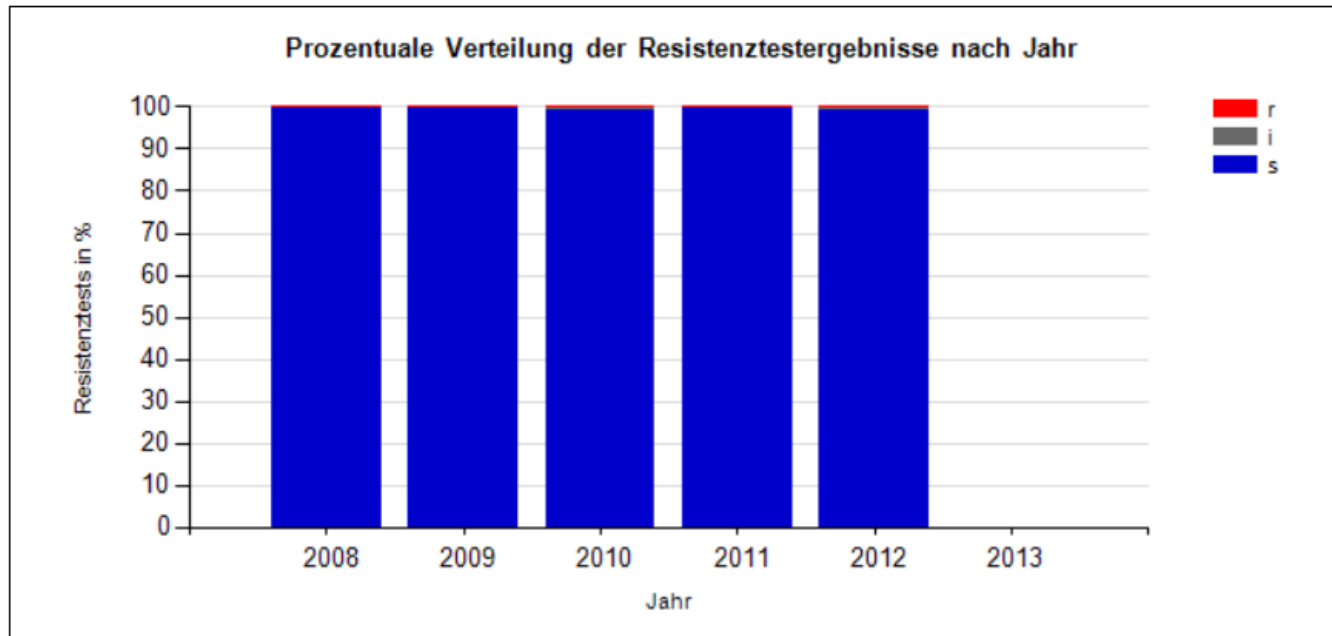
Datenstand: 03.04.2014

Intervall	R		I		S		Total
	n	%	n	%	n	%	n
Jahr 2012	18	0,1	1	0,0	33758	99,9	33777
Jahr 2011	15	0,1	0	0,0	22423	99,9	22438
Jahr 2010	9	0,0	1	0,0	19638	99,9	19648
Jahr 2009	4	0,0	0	0,0	16319	100,0	16323
Jahr 2008	3	0,0	0	0,0	12213	100,0	12216

MHK R >4 mg/L

NRZ 2012: n= 2

NRZ 2013: n= 2

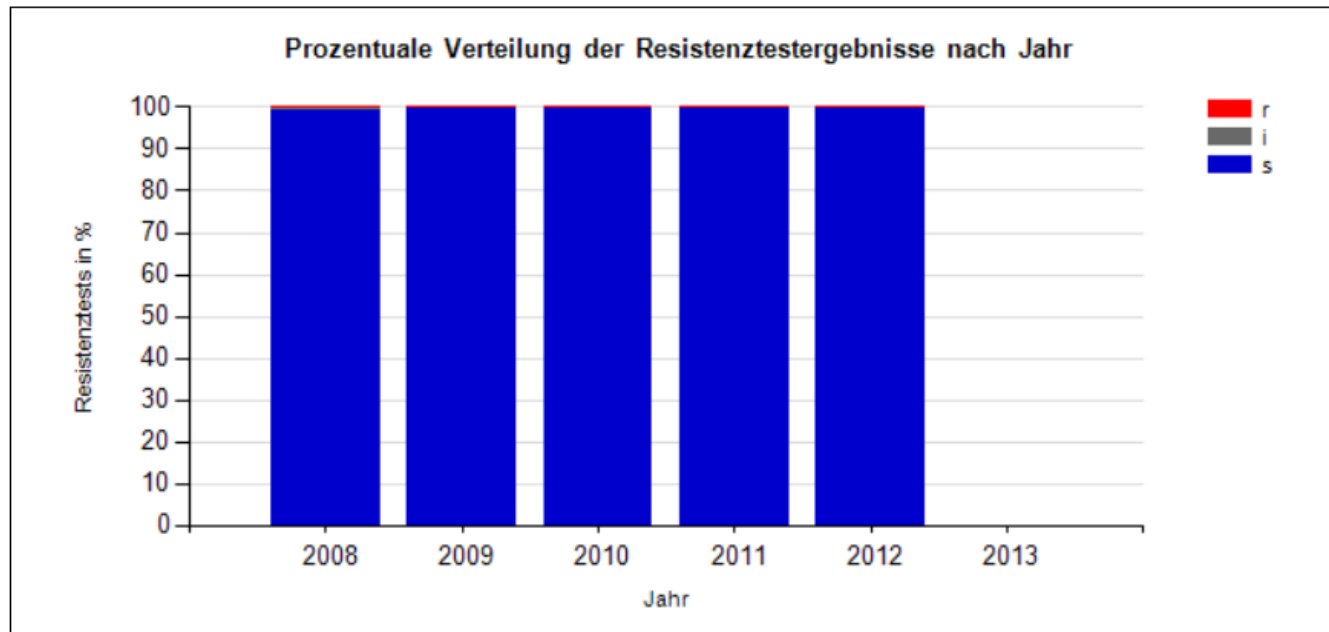


Linezolidresistenz in KNS (ARS)

Datenstand: 03.04.2014

Intervall	R		I		S		Total
	n	%	n	%	n	%	n
Jahr 2012	49	0,2	0	0.0	31466	99,8	31515
Jahr 2011	61	0,3	0	0.0	21282	99,7	21343
Jahr 2010	28	0,2	0	0.0	16784	99,8	16812
Jahr 2009	11	0,1	0	0.0	13224	99,9	13235
Jahr 2008	4	0,0	1	0,0	10246	100,0	10251

MHK R >4 mg/L



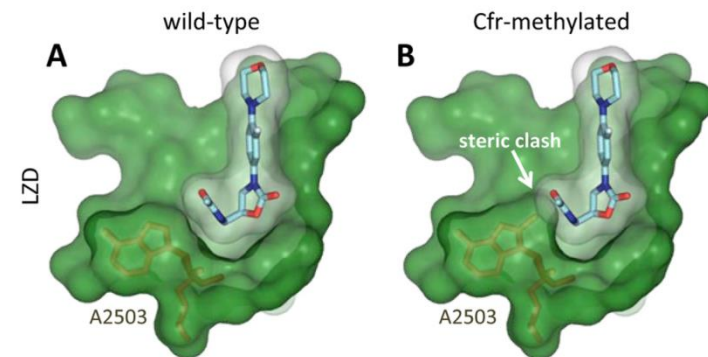
Linezolidresistenz in KNS aus Einsendungen an das NRZ



F. Layer

Isolate	Hospital	MIC LZD (mg/L)	<i>cfr</i> gene ¹
12-00333	A	16	negative
12-00408	A	32	negative
12-01787	A	>256	positive
12-02300	A	>256	positive
12-02355	A	64	negative
12-02762	A	>256	negative
12-03156	A	32	negative
12-03157	A	48	negative
12-03158	A	96	negative
13-00398	A	32	negative
12-00389	B	8	negative
12-00322	C	16	positive
12-02178	C	6	positive
12-02179	C	8	positive
12-01569	D	>256	negative
12-02439	D	>256	negative
12-02585	D	>256	negative
12-03707	D	>256	negative
12-03718	D	>256	negative
12-03723	D	>256	negative
12-03821	D	>256	negative
12-03822	D	>256	negative
12-03823	D	>256	negative
12-04603	D	>256	negative
13-00042	D	>256	negative
13-01042	D	>256	negative
13-01488	D	>256	negative
13-01520	D	>256	negative
13-00905	E	>256	negative
13-00906	E	>256	negative
13-01045	E	>256	negative
13-01201	F	32	negative
13-01202	F	32	negative
13-01203	F	16	negative
12-01631	G	>256	positive
13-01084	H	>256	negative

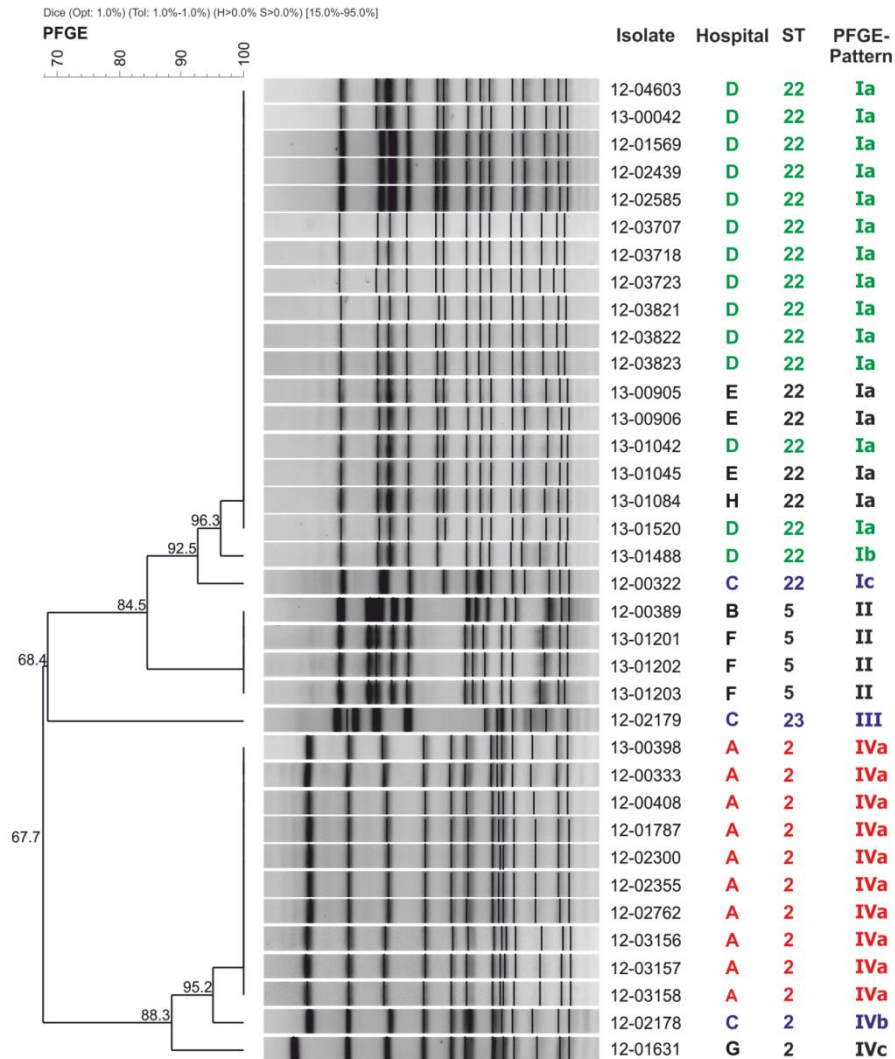
- Mehrere Isolate aus 2 KH mit Verdacht auf klonale Verbreitung (MDR *S. epidermidis*)
- LNZ resistenz bestätigt durch MBV und Etest®
- LNZ MHK von 8 - >256 mg/L
- 6 Isolate besaßen Plasmid-vermittelte LNZ Resistenz über *cfr*



Linezolidresistenz in KNS aus Einsendungen an das NRZ



F. Layer



■ MLST Typisierung

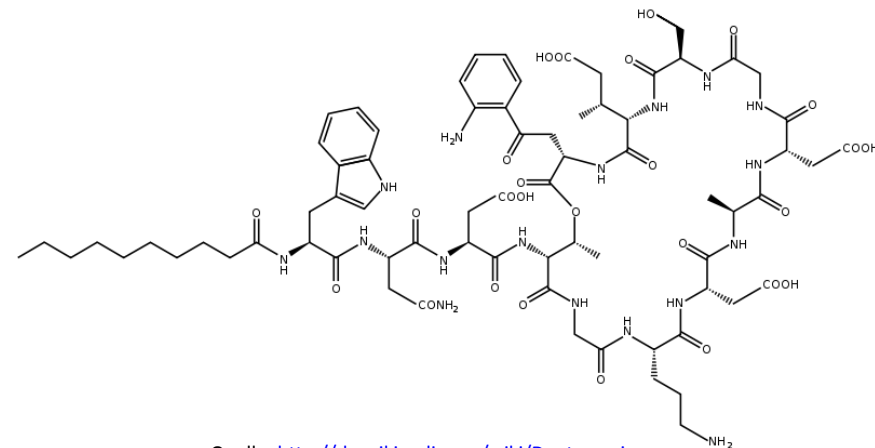
- Die meisten Isolate sind CC5 (ST2, ST5, ST22) und gehören zum häufigsten klonalen Komplex bei Hospital-assoziierten *S. epidermidis* und auch in der Allgemeinbevölkerung

■ Transfer des *cfr* Plasmids

- in sensiblen Stamm führte zu Linezolid-resistenten Staph.
- Illumina Plasmidseq: pSCFS3-Typ

Daptomycinresistenz in MRSA/VRE aus NRZ-Einsendungen

- Daptomycin ist ein zyklisches Lipopetid mit bakterizider Wirkung
- wirkt auf die Zellmembran
- Resistenzen resultieren aus Veränderungen der Struktur und Zusammensetzung der Zellmembran sowie des Ladungspotenzials (**MHK R >1 mg/L**)
- Resistenzen in MRSA und VRE sind ähnlich
- Einsendungen an das NRZ, *S. aureus*:
 - 2008: 0,6%
 - 2009: 1,3%
 - 2010: 1,6%
 - 2011: 2,1%
 - 2012: 1,0%
 - 2013: 2,7%
- (Einsendungen an das NRZ, Enterokokken: 1 Isolat)

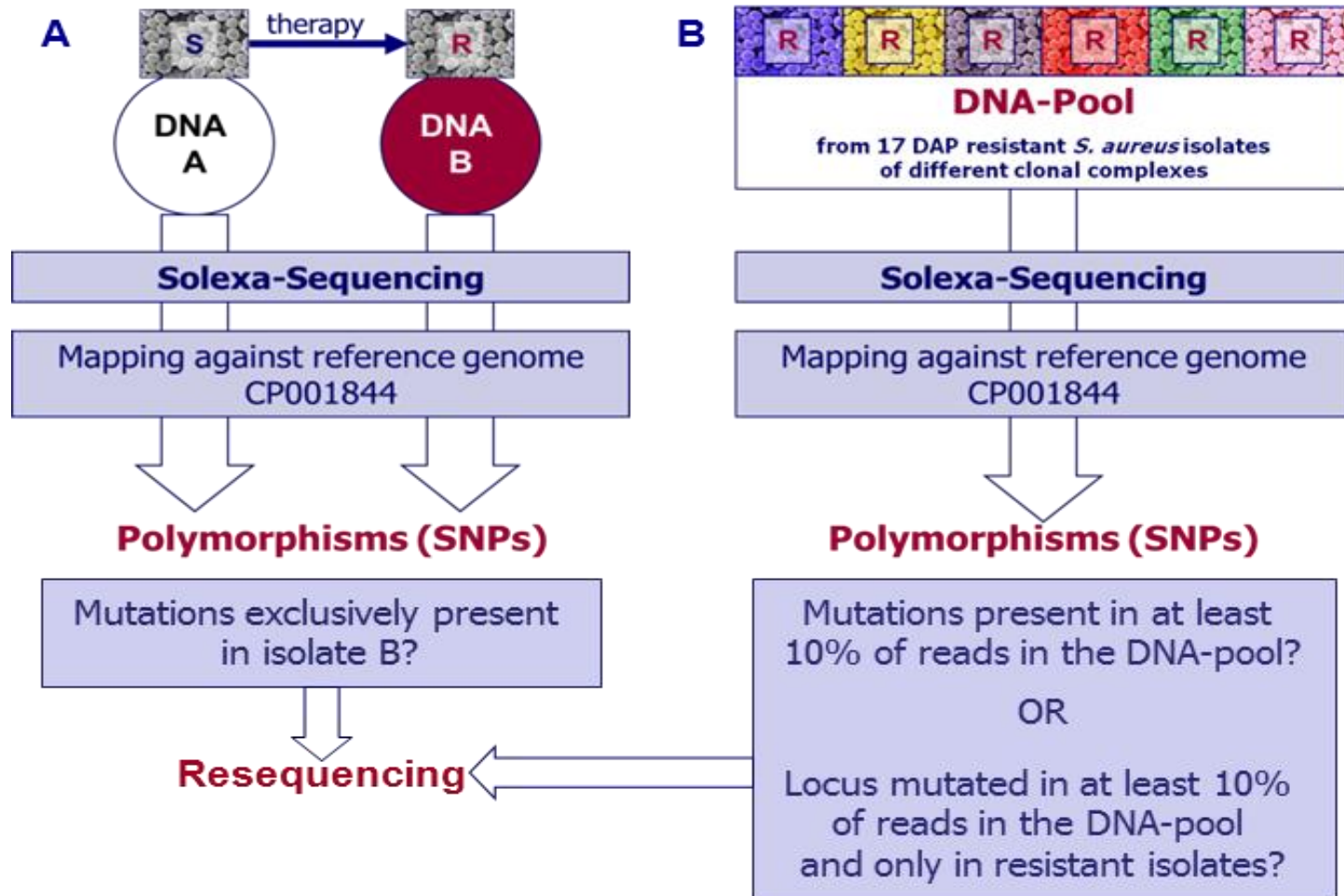


Quelle: <http://de.wikipedia.org/wiki/Daptomycin>



B. Strommenger

Daptomycinresistenz in MRSA aus NRZ-Einsendungen



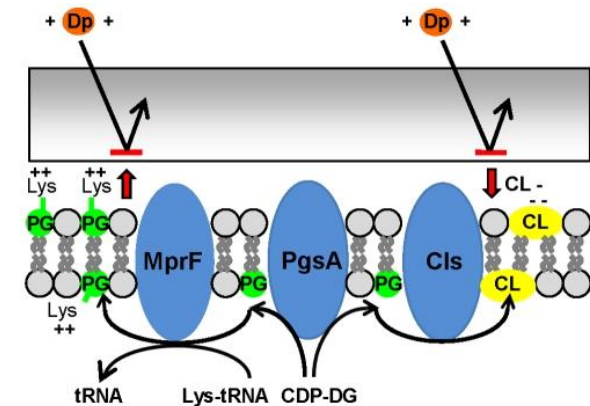
Daptomycinresistenz in MRSA aus NRZ-Einsendungen



B. Strommenger

Locus in 04-02981	ORF*	Annotation*	Gene category	AA ⁺ changes	CC ¹
SA2981_1314	<i>mprF</i>	phosphatidylglycerol lysyltransferase	Phospholipid biosynthesis	10	3
SA2981_0254		Teichoic-acid synthase	Cell wall metabolism	3	2
SA2981_0019	<i>walK</i>	Two-component sensor kinase	Signal transduction	2	2
SA2981_0184	<i>argJ</i>	Glutamate N-acetyltransferase	Metabolism	4	3
SA2981_1488	<i>ypdF</i>	Aminopeptidase	Metabolism	2	2
SA2981_0244		PTS permease	Metabolism	2	2
SA2981_1184	<i>katA</i>	Catalase	Metabolism	2	2
SA2981_1025	<i>purL</i>	Phosphoribosyl-formylglycinamide synthetase	Metabolism	2	2

*refers to annotation of *S. aureus* 04-02981 CP001844); *amino acid; ¹CC clonal complexes affected

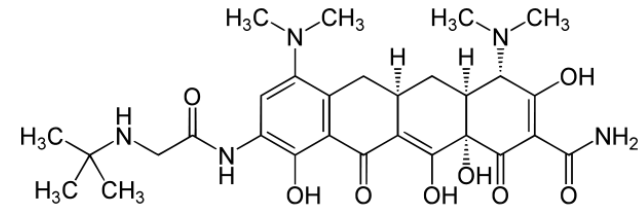


Peleg et al., 2012, PLOS One 7:e28316

Funktionelle Gruppen mutierter Gene in Daptomycin-resistenten MRSA

Tigecyclin und Tigecyclin-Resistenz

- Tetracyclin-Derivat
- zugelassen seit 11/2007
- Bakteriostatisch, inhibiert Proteinbiosynthese



Tigecyclin

Resistenz

- 1. Tigecyclin-resistanter *E. faecium* (MHK Etest 6 mg/L; Werner *et al.*, 2008)
- Mechanismus in *Enterococcus* spp. unbekannt

MHK R >0,5 mg/L

Mechanismus

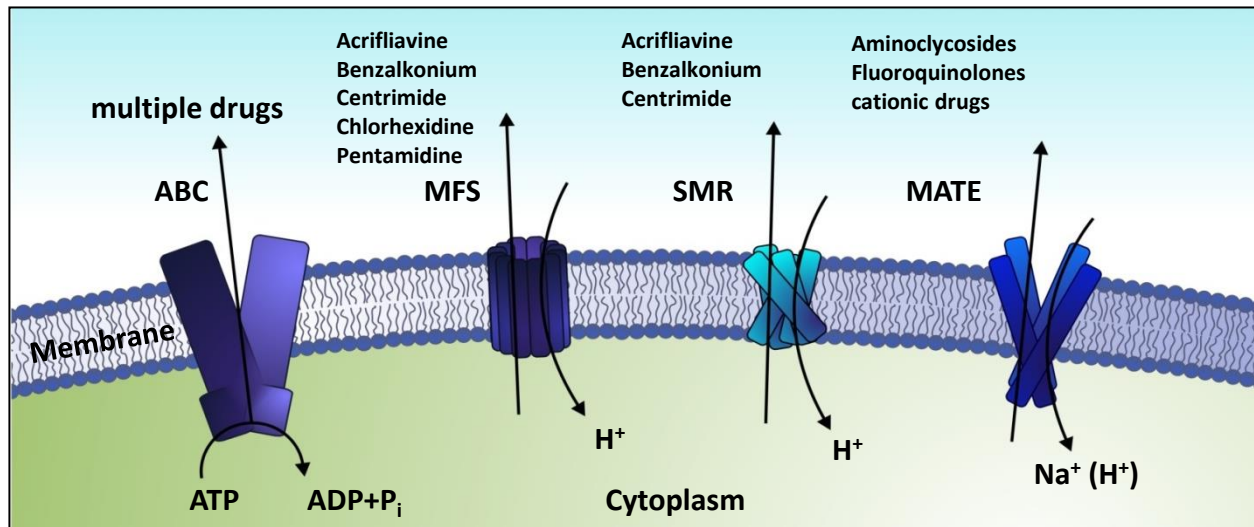
Tigecyclin-Resistenz in Gram-negativen Bakterien und in *S. aureus*

- Beteiligung von **Efflux-Pumpen** bzw. deren Regulatoren bei der Tigecyclin-Resistenz in
 - *Pseudomonas aeruginosa* (Dean *et al.*, 2003);
 - *Klebsiella pneumoniae* (Ruzin *et al.*, 2005);
 - *Acinetobacter baumannii* (Damier-Pioll *et al.*, 2008);
 - *Burkholderia* spp. (Rajendran *et al.*, 2010).
- Beteiligung einer **MATE Effluxpumpe** bei in vitro generierten Tigecyclin-resistenten *S. aureus* (McAleese *et al.*, 2005)



S. Fiedler

Tigecyclinresistente Enterokokken aus NRZ Einsendungen



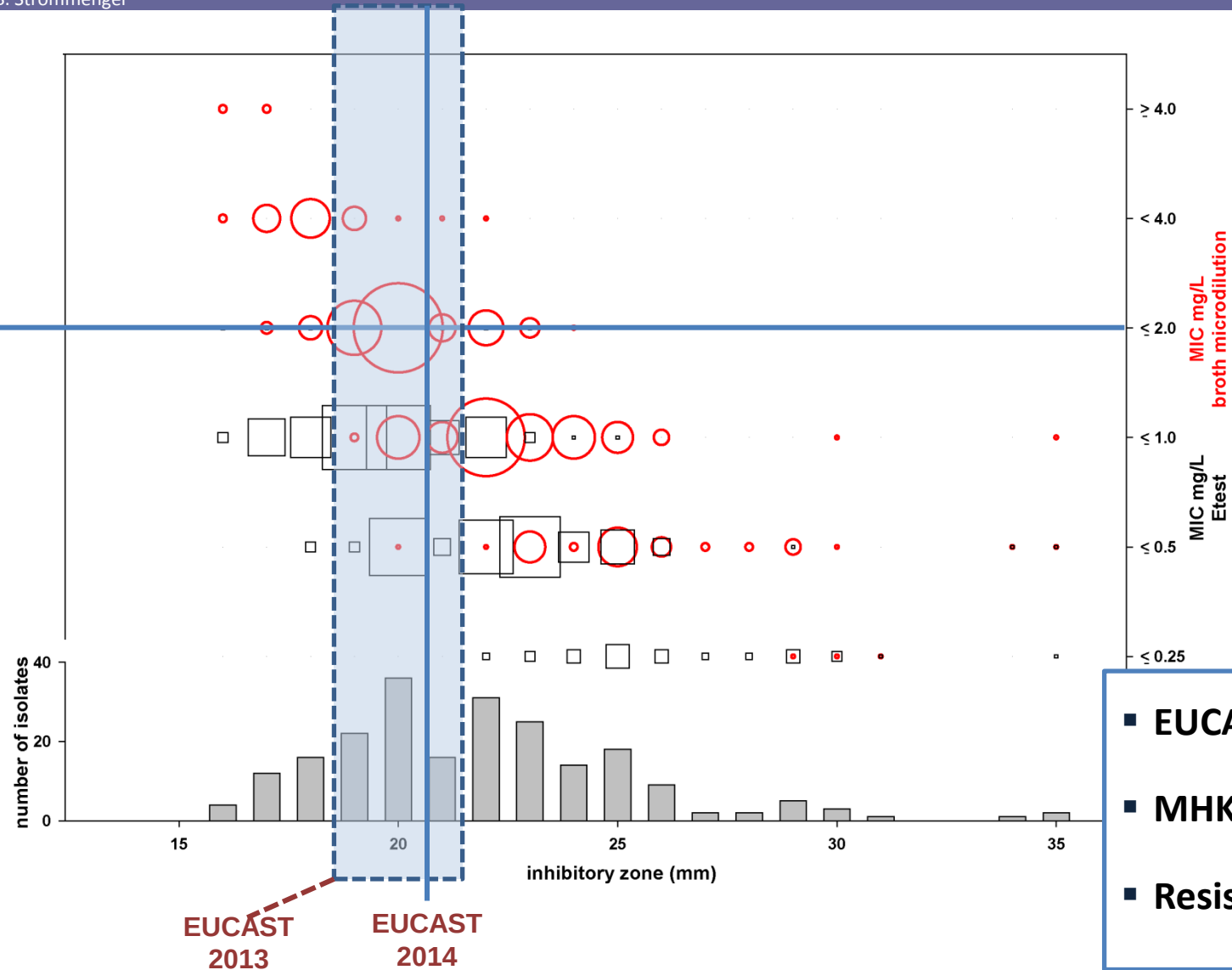
27 Tigecyclin-resistente Enterokokken-Isolate (2007 and 2014)

- 17 *E. faecium* isolates; 10 *E. faecalis* isolates
- MHK Tigecyclin zwischen 1,0 - 16,0 µg/ml
- Identifikation des Mechanismus durch:
 - Gezielte Hemmung von Effluxpumpen im Beisein von Tigecyclin (Omeprazol, Paroxetin, etc.)
 - Vergleich mit in vitro generierten isogenen Mutanten mit hohen MHK und Verlust der Resistenz
 - Real-time RT-PCR, Ganzgenom- und Transkriptomanalysen

Ceftarolin-Empfindlichkeit bei MRSA (s. Poster)



B. Strommenger



- EUCAST 2013/2104
- MHK/AD vs. Etest
- Resistenz: ST228, ST239

Zusammenfassung

- Resistenzen gegen Linezolid sind anhand der NRZ-Daten bei Enterokokken (und KNS?) zunehmend, bei MRSA prinzipiell eher selten
- Ursachen der Linezolid-Resistenz waren bekannte Mutationen in ribos. Genen
- Einsendungen zeigten Ausbrüche mit Linezolid-resistenten VRE und KNS
- 1-3% der MRSA-Einsendungen an das NRZ waren gegen Daptomycin-resistent
- Ursachen der Daptomycin-Resistenz sind bekannte Mutationen (*mprF*, *yycG/walk*,...)
- Resistenzen gegen Tigecyclin sind selten (MRSA/VRE); Mechanismus unbekannt
- Erfassung der Ceftarolin-Empfindlichkeit ist schwierig
- Unempfindlichkeit gegen Ceftarolin ist hoch bei best. MRSA-Klonen (ST228, ST239)

Vielen Dank an alle unsere Einsender!