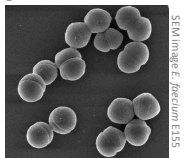


## Resistens hos enterokokker - fokus glykopeptid- & oxazolidinonresistens

Kristin Hegstad



Senior researcher and coordinator at Norwegian National Advisory Unit on Detection of Antimicrobial Resistance (K-res)

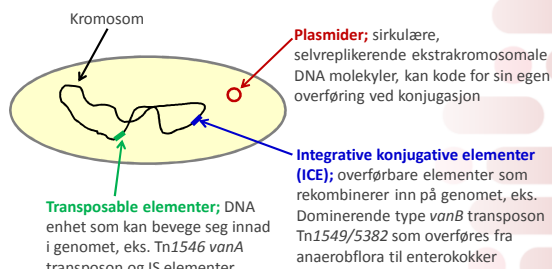


Professor II at Research group of Host Microbe Interactions, Department of Medical Biology, UIT

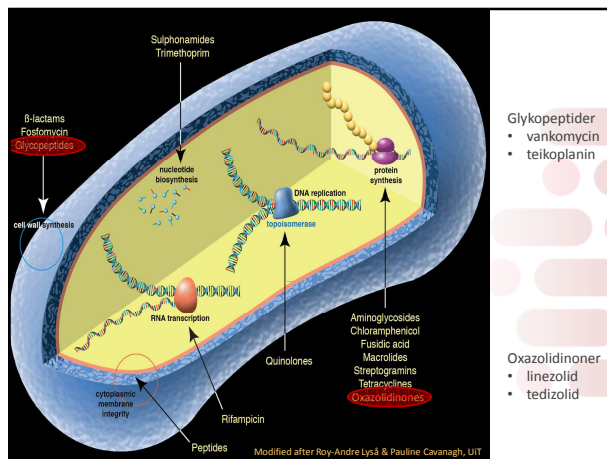
## Enterokokker

- Gram+, del av normalflora i tarmen
  - typisk < 0.1% av tarmmikrobiota hos mennesker
- Økende viktighet som sykehuspatogen
  - Overlever i ekstreme miljøer
    - pH, salt, temperaturer, kjemiske desinfeksjonsmidler
    - *E. faecium* > 90 dager på sykehustøy og plastikk
    - *E. faecium kultur* > 5 år uttørket i dyrkningskolbe
  - Iboende resistens mot mange antimikrobielle midler
    - cefalosporiner, sulfonamider, linkosamider, lave nivå av aminoglykosider og quinopristin-dalfopristin (*E. faecalis*)
  - Erverver lett ny resistens
    - ampicillin, høye nivå av aminoglykosider, vankomycin, linezolid, quinopristin-dalfopristin, daptomycin, tigecyklin
  - Suksessfulle sykehuskloner
    - akkumulert resistens- og virulensfaktorer
    - genomer > 25% større enn hos kommensale isolater

## Hovedtyper av mobile genetiske elementer (MGE) hos enterokokker



- *vanA* og *vanB* transposoner ofte på konjugative plasmider
- *optrA* ofte på plasmider

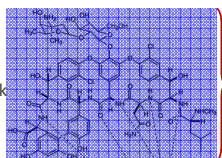


Glykopeptider  
• vankomycin  
• teikoplanin

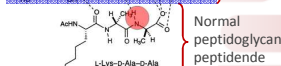
Oxazolidinoner  
• linezolid  
• tedizolid

## Glykopeptidantibiotika

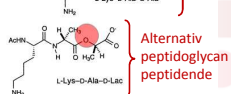
- Vankomycin, teikoplanin
  - God effekt på Gram+
  - Hovedsakelig baktericid virkning, men bakteriostatisk mot enterokokker
  - Hemmer celleveggsyntesen
    - Binder med høy affinitet til D-alanin-D-alanin peptidsidekjedens ende
- Resistens
  - Binder dårligere til alternative peptidender



Vankomycin



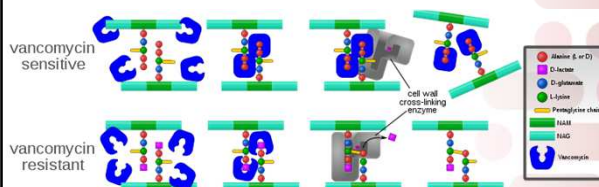
Normal peptidoglycan peptide



Alternativ peptidoglycan peptide

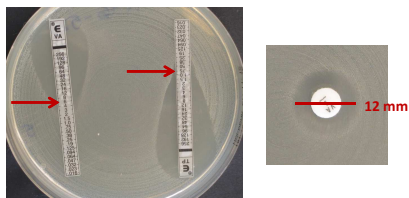
Nicas 1997 Trends Microbiol 5:240-9

## Endret target → dårligere binding av glykopeptid



### NordicAST brytningspunkter for glykopeptider

- Vankomycin MIC R > 4 mg/L  
Sonediameter R < 12 mm
- Teikoplanin MIC R > 2 mg/L  
Sonediameter R < 16 mm



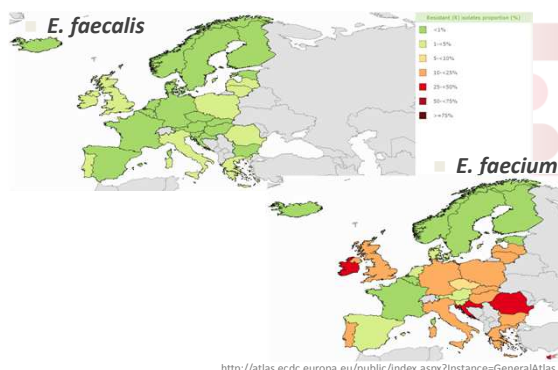
### VRE feno-/genotyper

Resistens	Ervervet					Iboende
	Høy	Varierende	Høy	Moderat	Lav	
Nivå	VanA	VanB	VanM	VanD	VanE, VanG, VanL, VanN	VanC
Type	VanA	VanB	VanM	VanD	VanE, VanG, VanL, VanN	VanC
MIC mg/L:						
Vankomycin*	≥ 16	≥ 1	> 256	≥ 32	6-32	2-32
Teikoplanin	> 8	0,5-1	> 0,75	4-64	0,5	0,5-1
Uttrykk**	I	I	I	K	I/(K)	K/I
# gener i kluster	7	7	6	6	4-7	5
Overførbar	+	+	+	?	-/+ (VanG&N)	-
Distribusjon	Ulike enterokokk species og <i>S. aureus</i>	Ulike enterokokk species og ikke-enterokokk normalflora	<i>E. faecium</i>	Ulike enterokokk species og ikke-enterokokk normalflora	<i>E. faecalis</i> / <i>E. faecium</i> VanG også i ikke-enterokokk normalflora	<i>E. gallinarum</i> og <i>E. casseliflavus</i> Ervervet vanC i noen <i>E. faecalis</i> og <i>E. faecium</i>

\* Kliniske brytningspunkter vankomycinresistens hos enterokokker R > 4 mg/L  
\*\* K – konstitutiv, I – induserbart

Modified Table 2 from Hegstad 2010 Clin Microbiol Infect 16:541-54

### VRE: Europa 2015



<http://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Instance=GeneralAtlas>

### Resistente enterokokker – infeksjoner og kolonisering i Norge

Jyllc	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Østfold	-	-	1	-	1	-	-	-	2	67	24	4	2	2	4
Akershus	-	-	1	1	1	1	1	1	1	-	2	7	23	10	21
Oslo	-	1	-	-	-	1	-	1	13	4	2	13	8	24	50
Hedmark	-	-	2	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	2	1
Oppland	-	1	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	3	1
Buskerud	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	5	8	1	5
Vestfold	-	-	-	-	2	-	1	1	-	3	2	3	8	3	4
Telemark	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	3	2
Aust-Agder	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Vest-Agder	3	-	-	2	-	-	2	-	-	-	-	1	3	2	3
Rogaland	1	-	1	-	-	1	1	3	16	2	7	5	1	4	41
Hordaland	-	-	-	1	-	1	-	41	236	84	64	24	15	73	143
Sogn og Fjordane	-	-	-	1	-	-	-	2	16	2	3	-	-	2	19
Møre og Romsdal	-	1	-	-	-	-	-	1	2	3	2	6	1	3	-
Sør-Trøndelag	-	1	1	-	-	-	-	1	1	1	3	41	5	3	3
Nord-Trøndelag	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	-	-
Nordland	-	-	2	-	1	-	-	-	-	1	4	-	3	3	4
Troms	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	1	-	2
Finnmark	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Totalt	5	4	10	4	8	6	6	51	289	168	118	110	81	140	307

Hovedsakelig vanB *E. faecium*

Hovedsakelig vankomycin variable vanA+ *E. faecium*

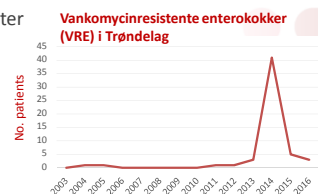
<http://www.msis.no> 08/11/2017

### Vankomycin variable enterokokker (VVE)

- Inneholder *van* gener men har glykopeptidfølsom fenotype – kan bli resistent når eksponert for glykopeptider (vankomycin &/eller teikoplanin)
- Vanskelig å detektere med fenotypiske metoder
  - Terapisvikt

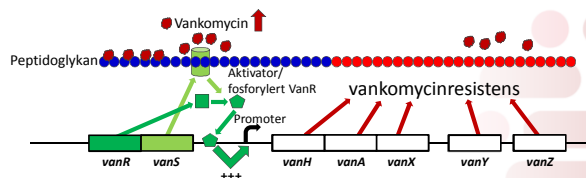
### VVE prevalens

- Ukjent
  - Utbrudd i Kanada startet i 2009
  - Utbrudd i Trøndelag 2013-2015
    - To initiale kliniske tilfeller
    - Screenet over 15000 prøver med *vanA* PCR
  - Sporadiske isolater



### Spørsmål 1 og 2

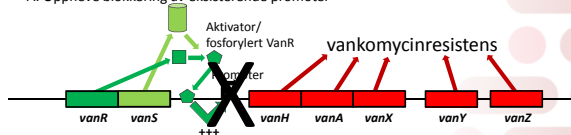
### Normal *vanA* kluster – induserbart uttrykk



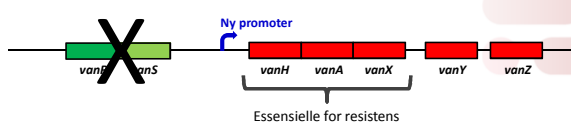
Modifisert slide fra Audun Sivertsen

### Mekanismer involvert i variabel *vanA* resistens

A. Oppheve blokkering av eksisterende promotor

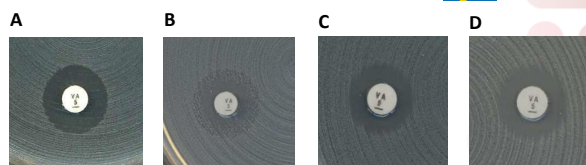


B. Ny promotor uavhengig av aktivator



### VRE deteksjonsmetoder (1)

EUCAST diskdiffusjon med 5 µg vankomycin disk

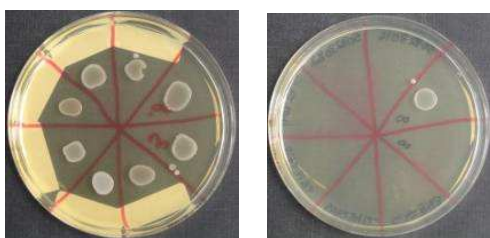


- A) Skarp sonekant og sonediameter  $\geq 12$  mm rapporteres som følsom
- B-D) Fuzzy sonekant eller kolonier innen sonen rapporteres som resistent selv om sonediameter er  $\geq 12$  mm

<http://www.eucast.org.no>

### VRE deteksjonsmetoder (2)

CLSI vankomycin agarscreen på BHI med 6 mg/L vankomycin

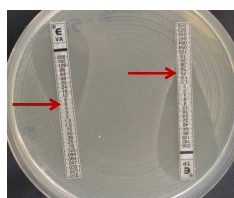


BHI                      BHI with 6 mg/L vancomycin  
**Vekst** (inkludert små kolonier eller tåkevekst) på BHI med vankomycin regnes som positiv/resistent

Metode fra Swenson 1994 JCM 32:1700-4

### MIC bestemmelse (1)

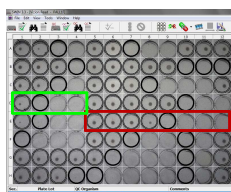
MH agar med vankomycin og teikoplanin MIC test strips



**Avlesing MIC verdier;**  
 Les av MIC der kanten på bakterieveksten (inhiberingsellipsen) krysser strippen

## MIC bestemmelse (2)

Broth microdilution i MH buljong – brønner med ulike konsentrasjoner av antibiotika



Sensititre™ Gram positive MIC plate GPALL1F

Linezolid konsentrasjon 1 - 8 mg/L  
Vankomycin kons. 0.25 - 32 mg/L

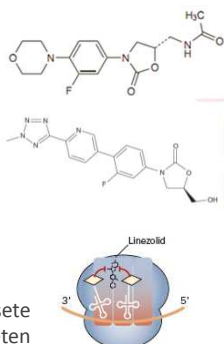
Avlesing MIC verdier;

Les av MIC som laveste konsentrasjon hvor antibiotika fullstendig hemmer synlig vekst

## Spørsmål 3

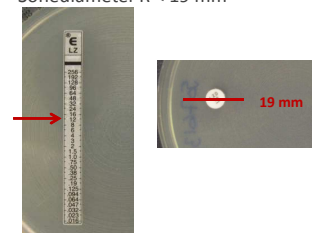
## Oxazolidinoner

- **Linezolid**
  - NordicAST brytningspunkt R > 4 mg/L
- **Tedizolid**
  - 4-16 ganger mer potent enn linezolid mot stafylokokker og enterokokker
- Blokkerer initiering av proteinsyntesen ved binding til peptidyltransferase sentret i A sete lommen i 50S ribosom subenheten



## NordicAST brytningspunkter for linezolid

- Linezolid MIC R > 4 mg/L  
Sonediameter R < 19 mm



## Mekanismer oxazolidinonresistens

### Mutasjoner i ribosomet mest vanlige

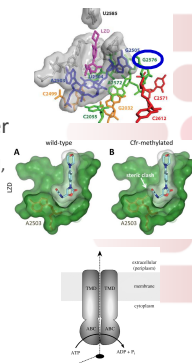
- Hovedsakelig **G2576U** mutasjon i 23S rRNA V domenet
- Kryssresistens mot linezolid og tedizolid
- Opptrer ofte etter behandling med oxazolidinon

### *cfr* og *cfrB*: overførbare metyltransferaser

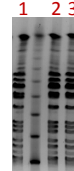
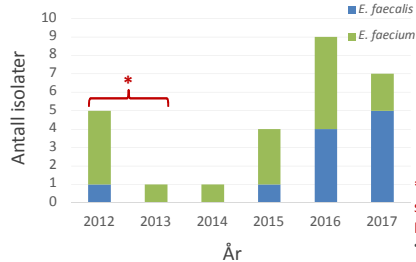
- Metylerer A2503 i 23S rRNA V domenet
- Gir ikke resistens mot tedizolid, men mot linezolid, fenikoller, linkosamider, pleuromutiliner og streptogramin A
- Uttrykt hos enterokokker?
- Ofte på plasmider og /eller transposon

### *optrA*: overførbare ABC transportere

- Pumper ut både linezolid og tedizolid samt fenikoller
- Ofte på plasmid
- Funnet hos *E. faecalis*, *E. faecium* og *S. sciuri*



## Linezolidresistente enterokokker i Norge

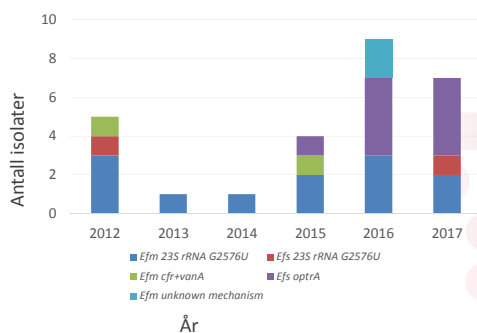


- \*3 isolater fra samme sykehus med identiske PFGE mønstre (over)
- Slektskap stemmer med WGS data som viser kun 18-32 SNP forskjeller i kjernegenomet

Status 07/11/2017 K Hegstad

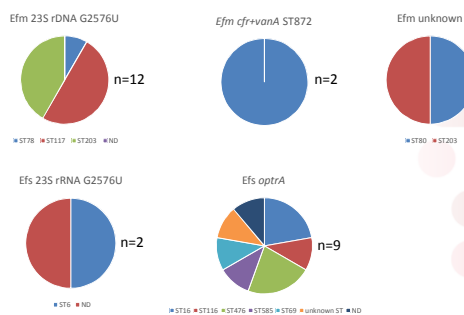
Hegstad et al., 2014. Scand J Infect Dis 46:712-5

## Linezolidresistensmekanismer



Status 07/11/2017 K Hegstad

## Linezolidresistensmekanismer & kobling mot sekvenstyper (ST)



Status 07/11/2017 K Hegstad

## Spørsmål 4 og 5

## Oppsummering - resistens hos enterokokker i Norge

To hovedtyper overførbart **vankomycinresistens**;

- **vanA**
  - Høygradig resistens mot vankomycin og teikoplanin
  - Gener kan være inaktiverte, men bli resistente under behandling
    - Ulike mekanismer involvert i variabel resistens
- **vanB**
  - Vankomycin MIC 1 -  $\geq$  256 mg/L og følsom for teikoplanin
  - Kan være vanskelig å fange opp med eksisterende fenotypiske metoder
  - Transposon kan bli ervervet fra anaerobfloraen i tarmen
- Ny variant på fremmarsj?
  - 2 caser **vanD** i år

Mutasjoner i ribosomet mest vanlig årsak til **linezolidresistens**

- Overførbart resistens (**optrA**) på fremmarsj