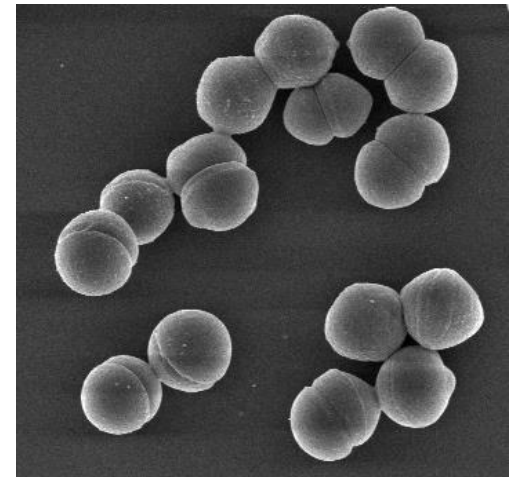


Resistens hos enterokokker - fokus glykopeptid- & linezolidresistens

Kristin Hegstad



SEM image of *E. faecium*, T. Wagner

Enterokokker

- Gram+, del av normalfloraen i tarmen
 - typisk < 1% av tarmmikrobiota hos mennesker
- Species som hovedsakelig forårsaker infeksjon
 - *E. faecalis* > *E. faecium*
- Viktig sykehuspatogen siste tiårene
 - Overlever i ekstreme miljø
 - pH, salt, temperaturer, kjemiske desinfeksjonsmidler
 - *E. faecium* overlever >90 dager på sykehus tøy og plastikk
 - *E. faecium* kultur > 4 år uttørket i dyrkningskolbe
 - Iboende resistent mot mange antimikrobielle midler
 - Cefalosporiner, sulfonamider, linkosamider, β -lactamer, lavgradige nivå av aminoglykosider og quinopristin-dalfopristin (*E. faecalis*)
 - Erverver lett nye resistensdeterminanter
 - Suksessfulle kloner har akkumulert virulensfaktorer

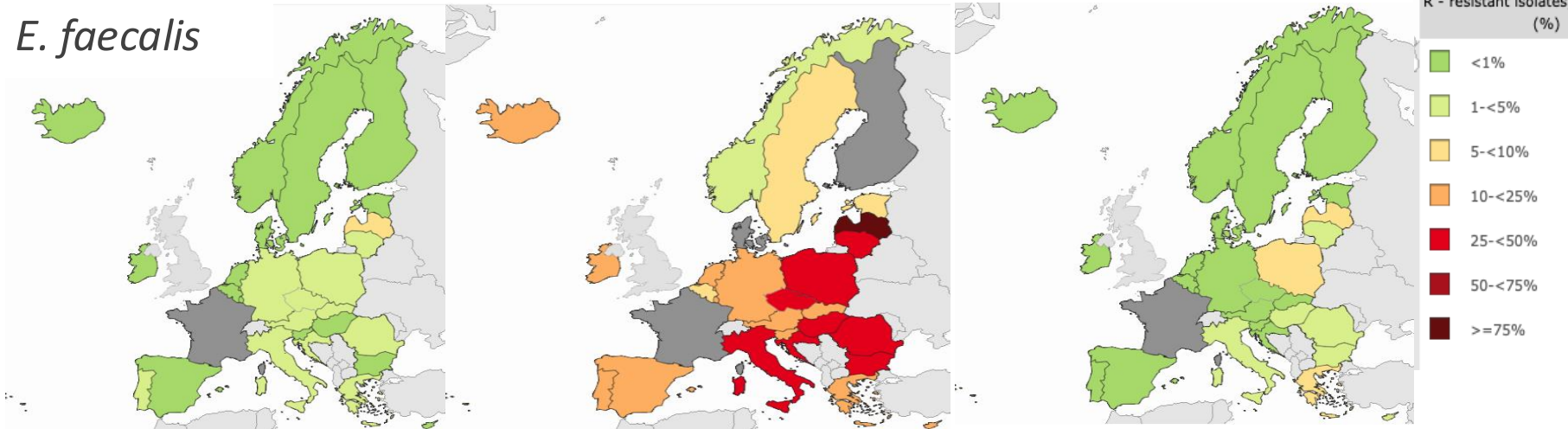
Resistens *E. faecalis* versus *E. faecium* 2023

Aminopenicilliner

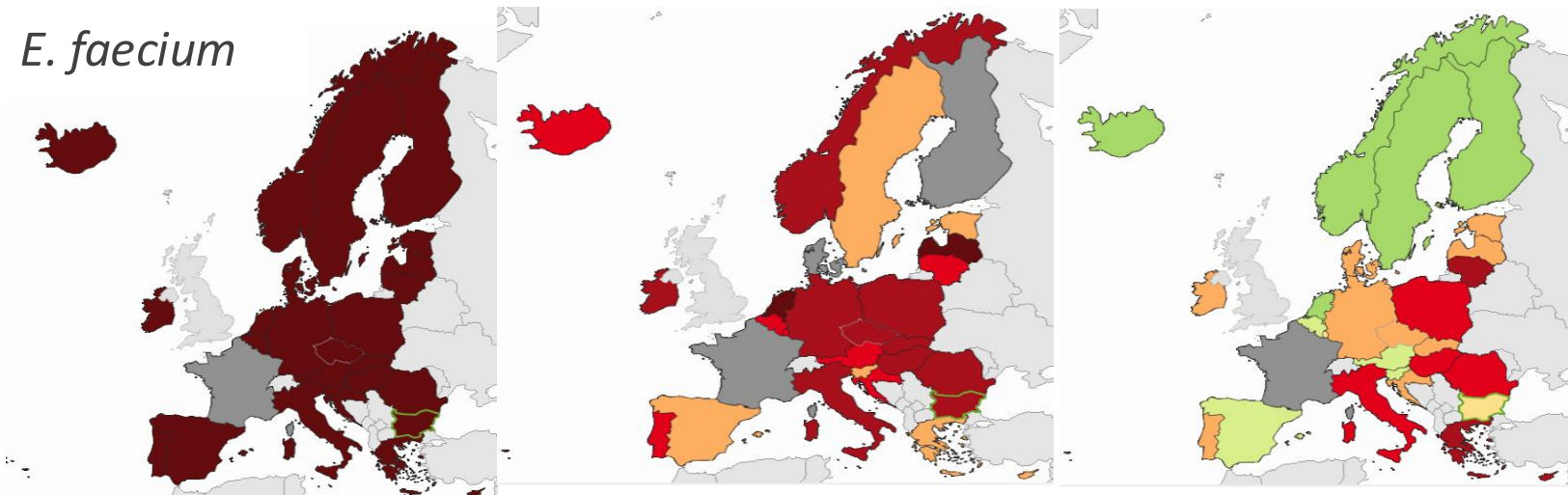
Høye nivå gentamicin

Vankomycin

E. faecalis



E. faecium



Invasive isolater, % R

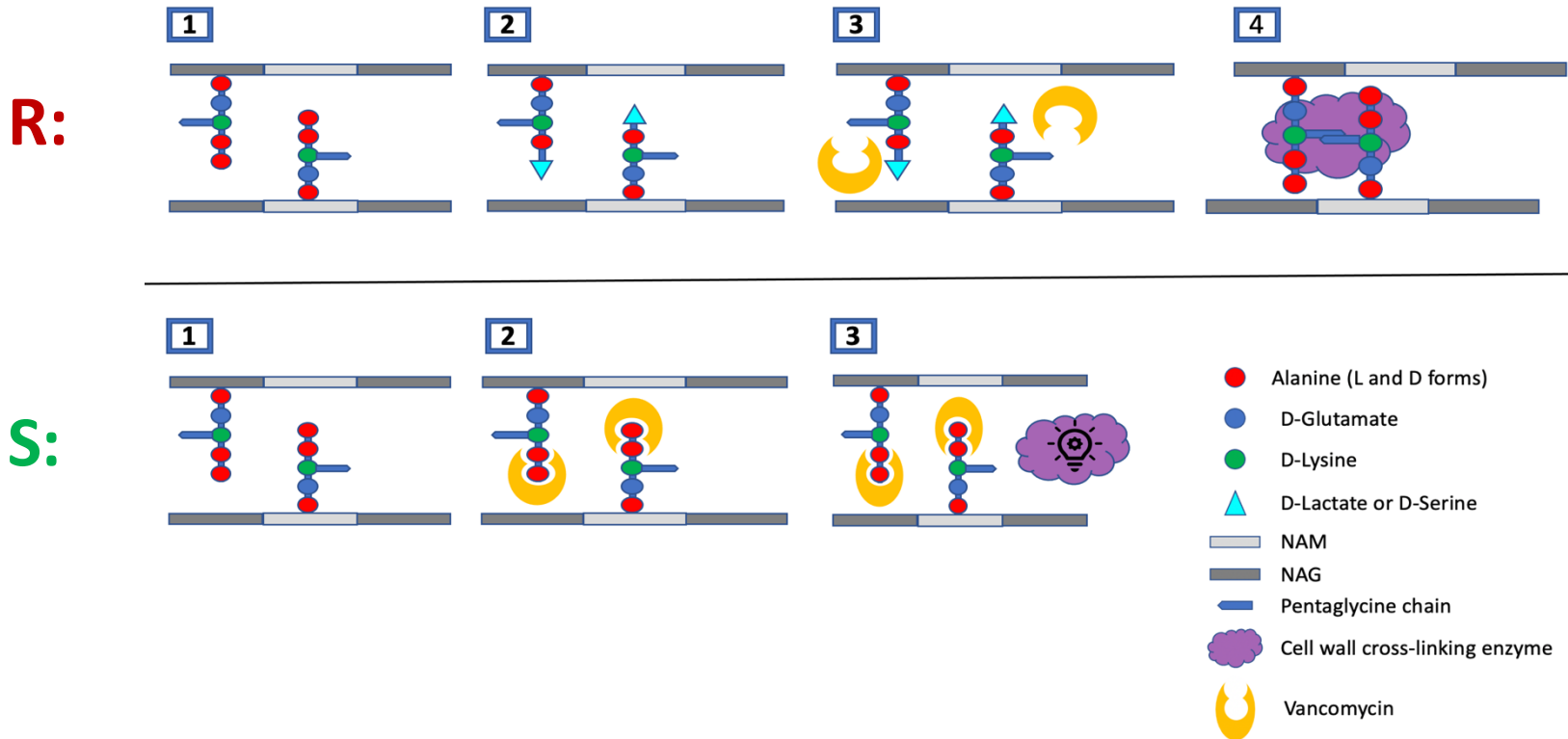
<http://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Instance=GeneralAtlas>

E. faecium suksessfulle høyrisiko kloner (A1) sykehuskloner

Figur Fylogenetisk tre
fra Lebreton 2013

- Genomer > 25% større enn hos kommensale isolater
- Akkumulert
 - resistens gener
 - virulens gener; hovedsakelig adhesjon og biofilm
 - mobile genetiske elementer

Vankomycinresistens: Endret target → dårligere binding av glykopeptid



AFA/NordicAST kliniske brytningspunkter enterokokker:

Vankomycin

MIC R > 4 mg/L

Sonodiameter R < 12 (*Efs* og *Efm*)/15 mm

Teikoplanin

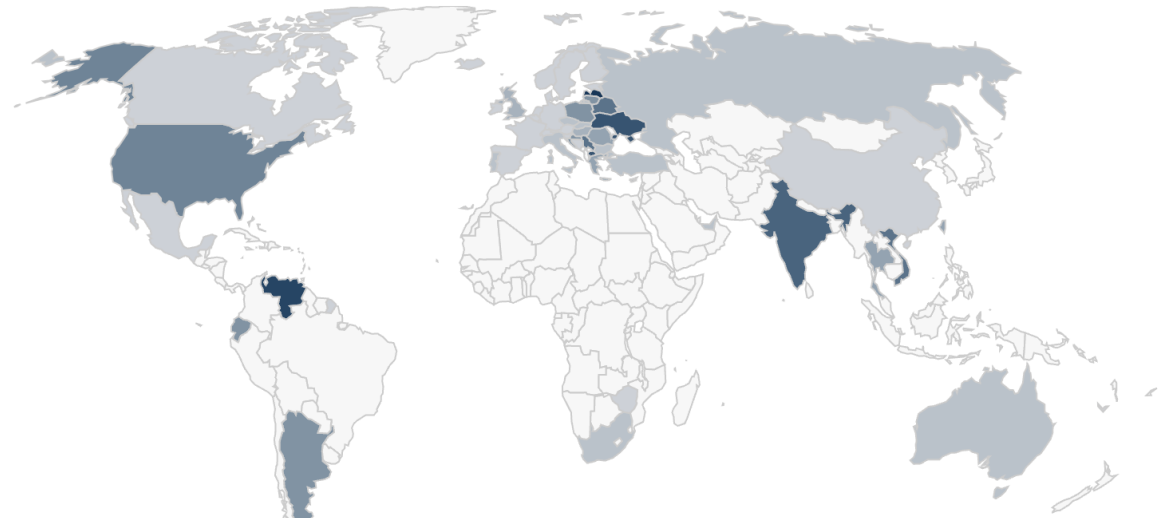
MIC R > 2 mg/L

Sonodiameter R < 16 mm

Vankomycinresistente enterokokker

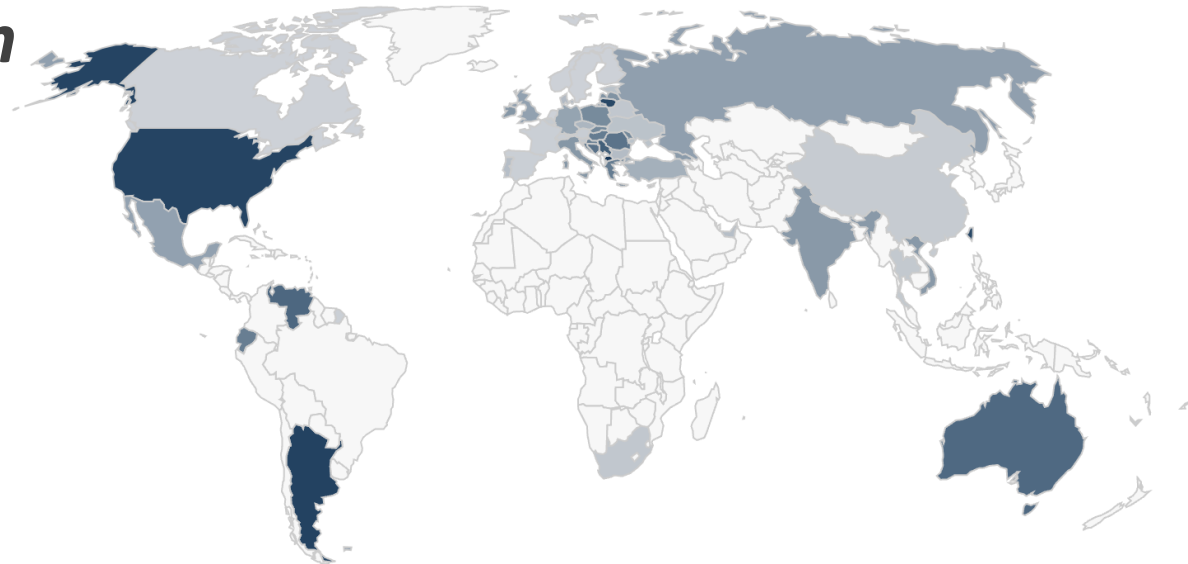
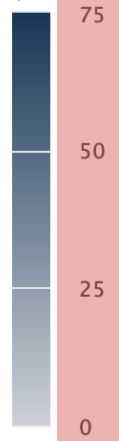
E. faecalis

% Resistant
(invasive isolates)

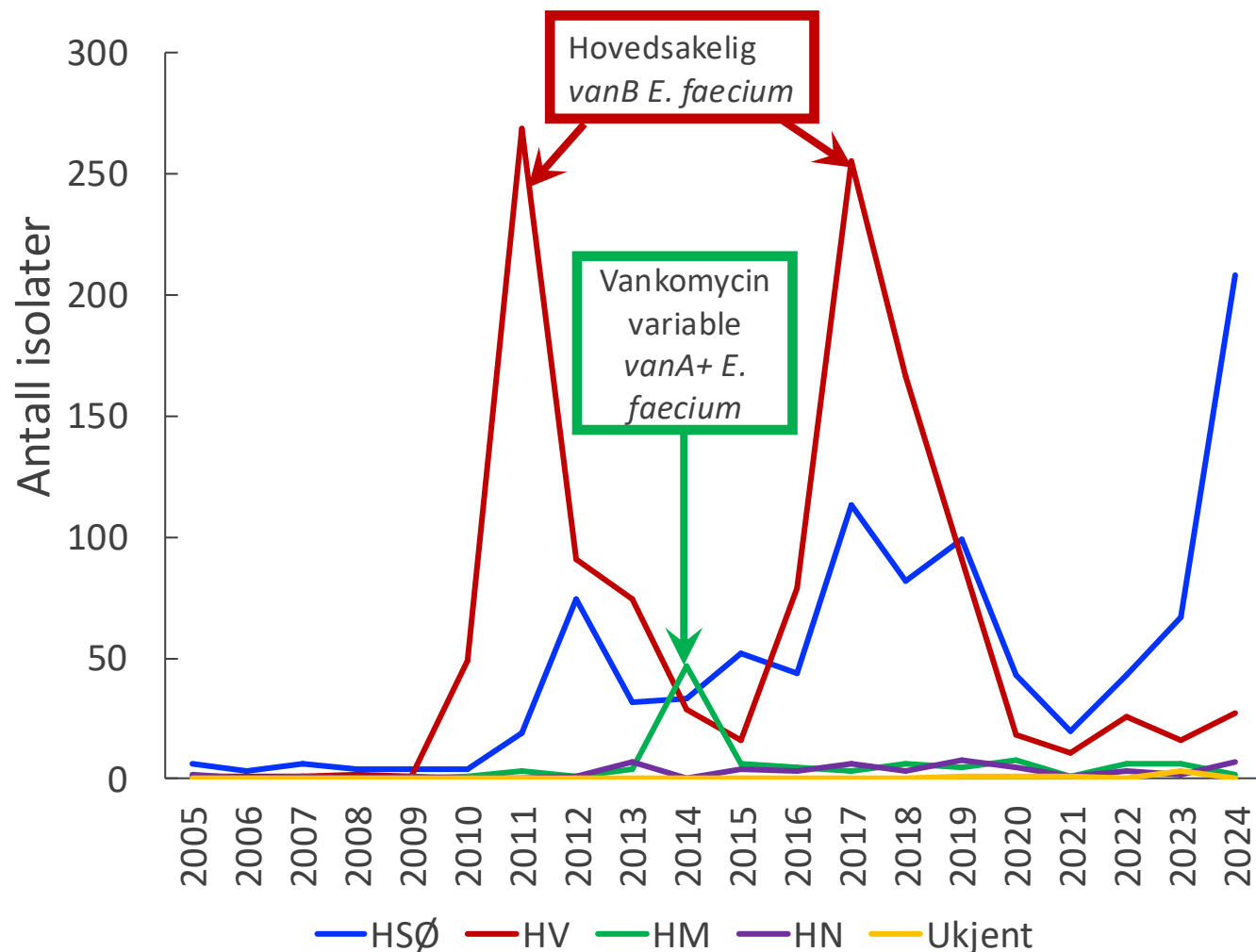


E. faecium

% Resistant
(invasive isolates)



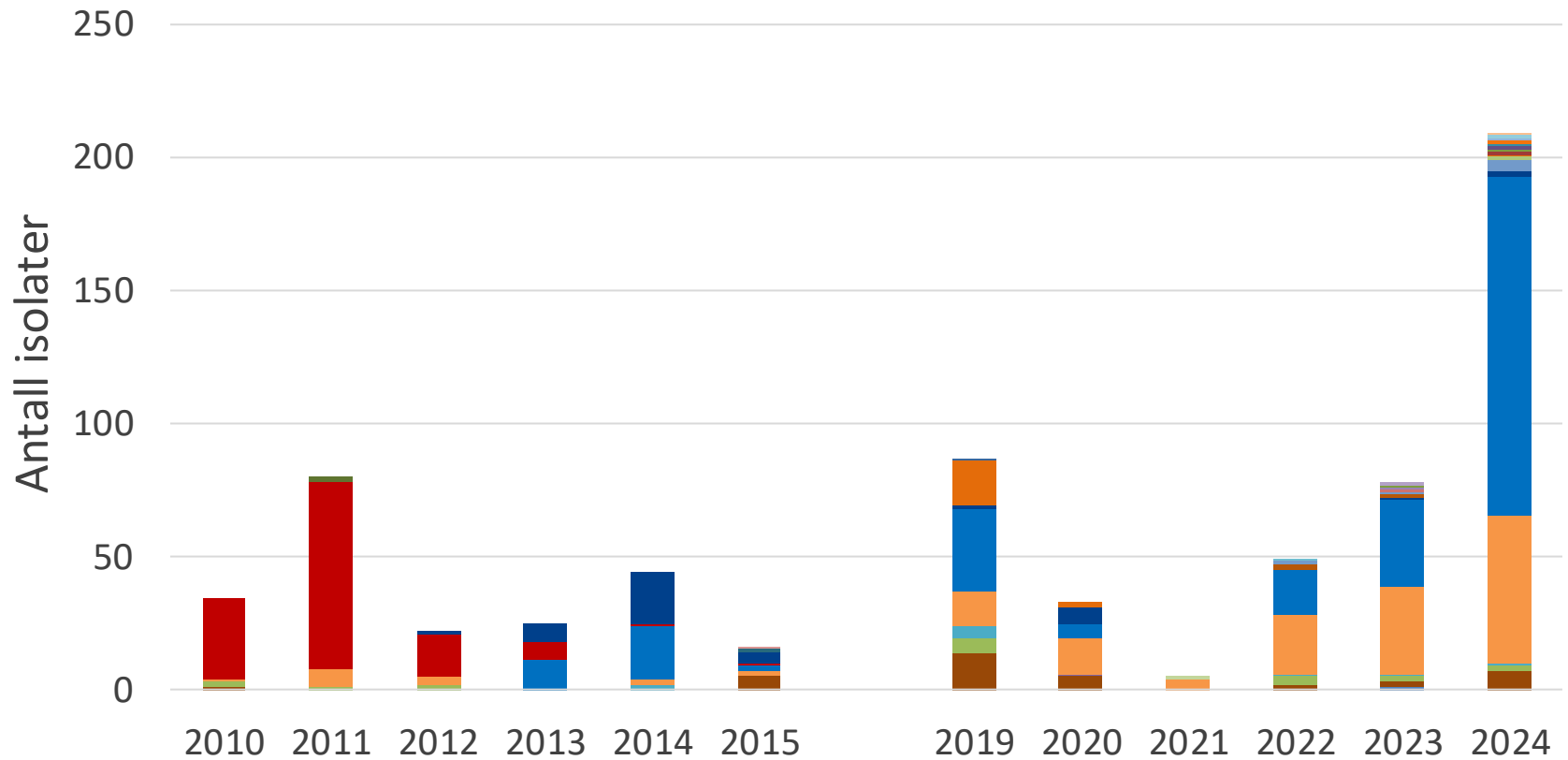
VRE i Norge (per helse region)



2024:

- Flere mindre og et stort utbrudd
- Hovedsakelig
 - *E. faecium*
 - *vanA* og *vanB*
- Manglet referanselab før 2019

Norske VRE *faecium* ST endring over tid



ST5 ST17 ST18 ST22 ST78 ST80 ST117 ST192 ST202 ST203
 ST233 ST262 ST375 ST551 ST552 ST612 ST761 ST787 ST789 ST792
 ST817 ST1299 ST1421 ST1478 ST1746 ST2063 ST2137 ST2471 ST2529 ST2553

Globale sykehusadapterte kloner

VRE deteksjonsmetoder (1)

EUCAST diskdiffusjon med 5 μ g vankomycin disk

A



B



C



D



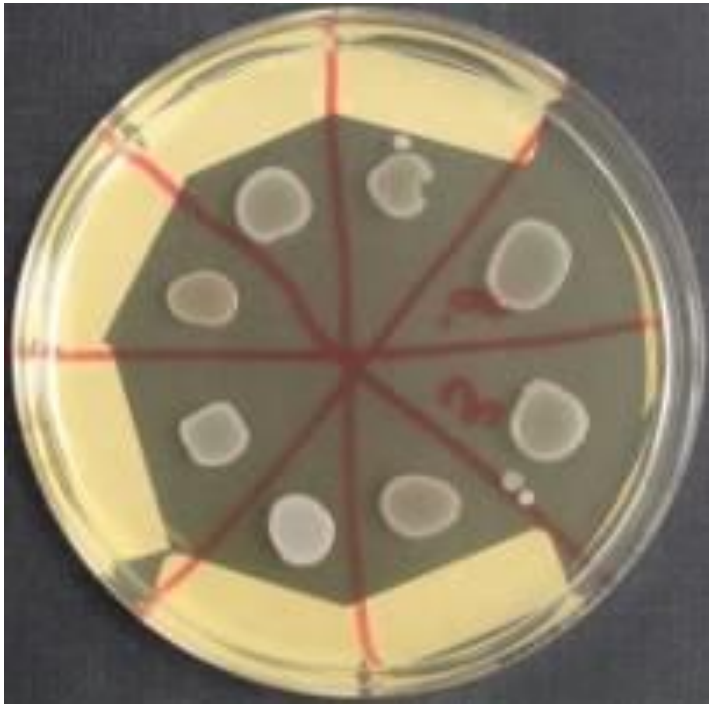
A) Skarp sonekant og sonediameter ≥ 12 mm rapporteres som følsom

B-D) Fuzzy/ujevn sonekant eller kolonier innen sonen rapporteres som resistent selv om sonediameter er ≥ 12 mm

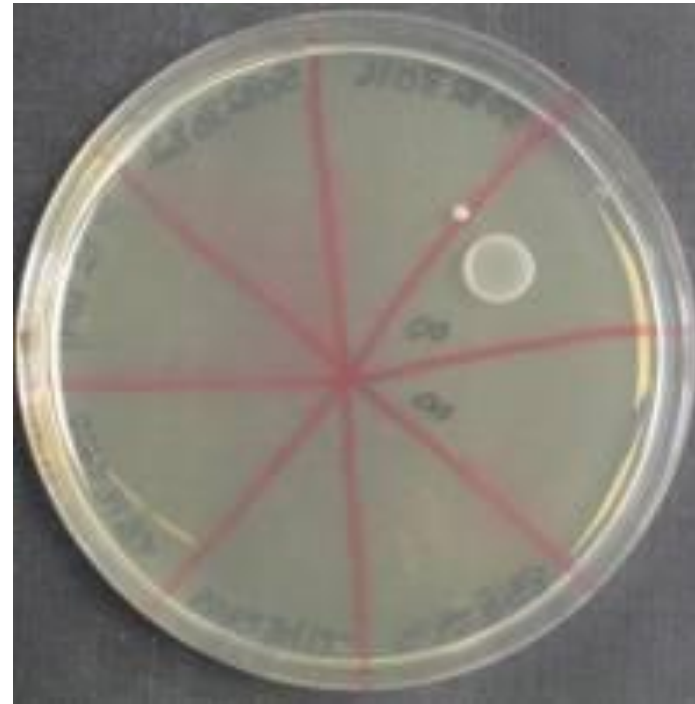
NB! Leses av etter 24 timer

VRE deteksjonsmetoder (2)

CLSI vankomycin agar screen



BHI

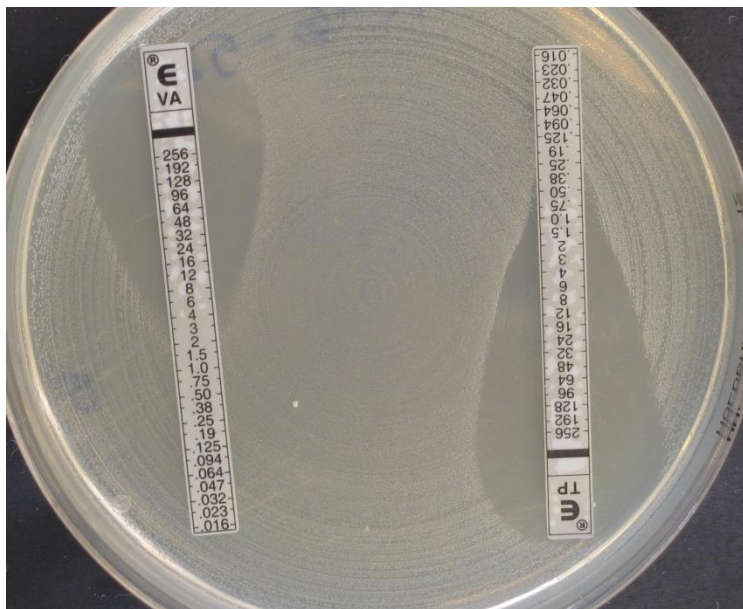


BHI med 6 mg/L vankomycin

Vekst (inkludert små kolonier eller tåkevekst) **etter 24 timer på BHI med vankomycin regnes som positiv/resistent**

MIC bestemmelse (1)

MH agar med vankomycin og teikoplanin MIC test strips

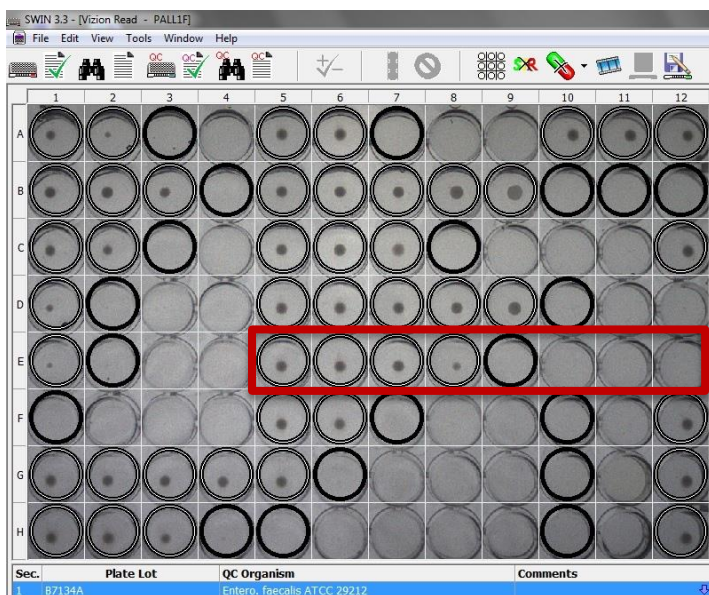


Avlesing MIC verdier;

Les av MIC (etter 24 timer) der kanten på bakterieveksten (inhiberingsellipsen) krysser strippen

MIC bestemmelse (2)

Broth micro dilution i MH buljong – brønner med ulike konsentrasjoner av antibiotika



Sensititre™ Gram positive MIC plate GPALL1F

Vankomycin kons. 0.25 – 32 mg/L,
leses av etter 24 t

Avlesing MIC verdier;

MIC leses som laveste konsentrasjon hvor antibiotika fullstendig hemmer synlig vekst

Vankomycinresistente enterokokker (VRE) feno-/genotyper

Resistens	Ervervet					Iboende
Nivå	Høy	Lav til høy	Høy	Moderat	Lav	Lav
Type	VanA	VanB	VanM	VanD, VanP	VanE, VanG/ VanL/ VanN	VanC
MIC mg/L: Vankomycin*	≥ 32	≥ 1	> 256	≥ 4	6-32	2-32
Teikoplanin	> 8	0,5-1	> 0,75	0,5-64	0,5	0,5-1
Uttrykk**	I	I		K/?	I/(K)	K/I
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. faecium</i>	<i>E. faecalis</i> / <i>E. faecium</i> VanG også i ikke-enterokokk normalflora	<i>E. gallinarum</i> og <i>E. casseliflavus</i> Ervervet <i>vanC</i> i noen <i>E. faecalis</i> og <i>E. faecium</i>

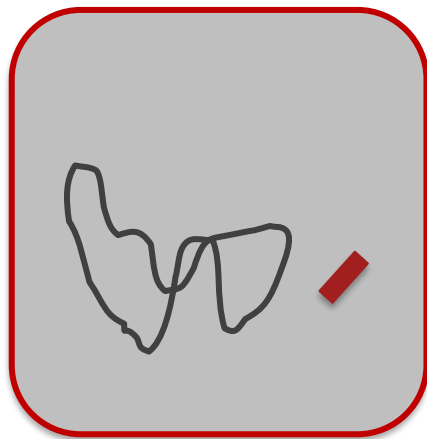
* Kliniske brytningspunkter vankomycinresistens hos enterokokker R > 4 mg/L

** K – konstitutivt, I – induserbart

Problem 1: *vanB* lavgradig vankomycinresistens

- Induserbar lavgradig resistens
- MIC ned mot og under brytningspunktet
- Vanskelig å detektere fenotypisk

vanB med lavgradig resistens – nydannelse av VRE i pasienten



Anaerobe tarm-
bakterier med *vanB*

+



E. faecium(*Efm*)
uten *vanB*

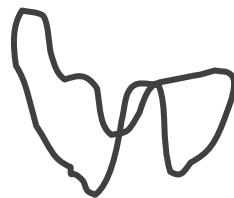
Bredspektrede
antibiotika +
vankomycin



vanB+ Efm med lav
MIC for vankomycin

 *vanB* ICE

 plasmid

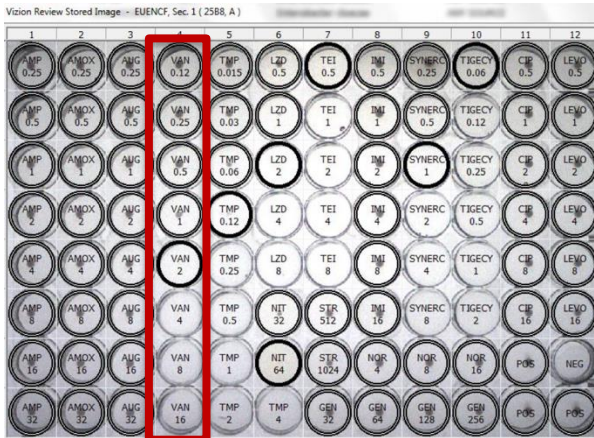


Kromosom

Pålitelighet fenotypiske tester *vanB* VRE med lavgradig vankomycinresistens

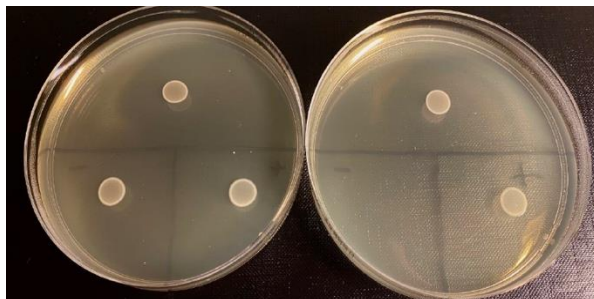
Pålitelig

Buljongfortynning (BMD)



Vankomycin agar screen

(BHI -/+ 6 mg/L vankomycin)



Noe utfordrende

EUCAST disk diffusjon

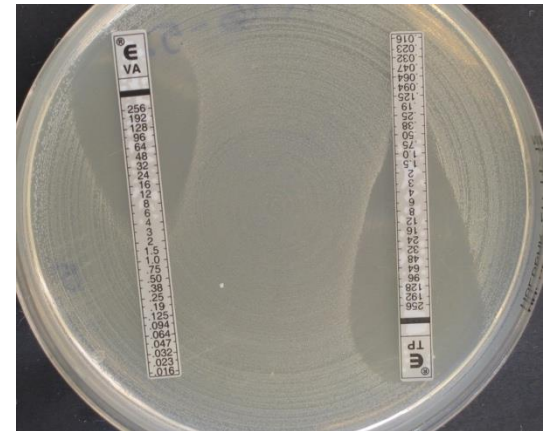
bedømme sonekant

krever erfaring



**Høy grad av alvorlige feil
(R kategorisert som S)**

Gradient strips



Vitek automatisert AST



Basic, Haldorsen *et al.* 2019. Poster ECCMID, Madrid Spain
EUCAST warning gradient strips

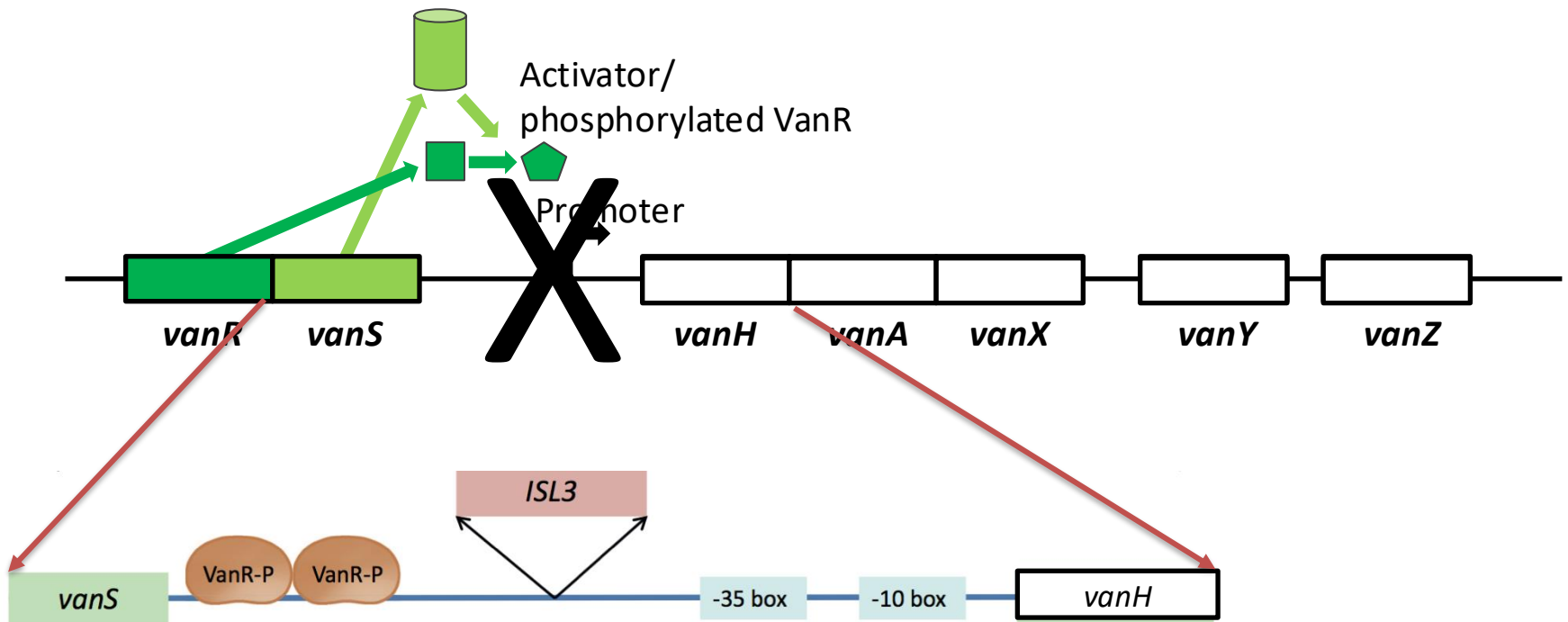
Problem 2: Vankomycin Variable Enterokokker (VVE)

- Har *van* gener men glykopeptidfølsom fenotype – kan bli **resistent** når eksponert for glykopeptider -> terapisvikt
- **Hvorfor?**
 - S fenotype fordi uttrykk av resistensgenene er slått av
 - genetiske endringer kan føre til uttrykk (R fenotype)
- Vanskelig/ikke mulig å detektere med fenotypiske metoder

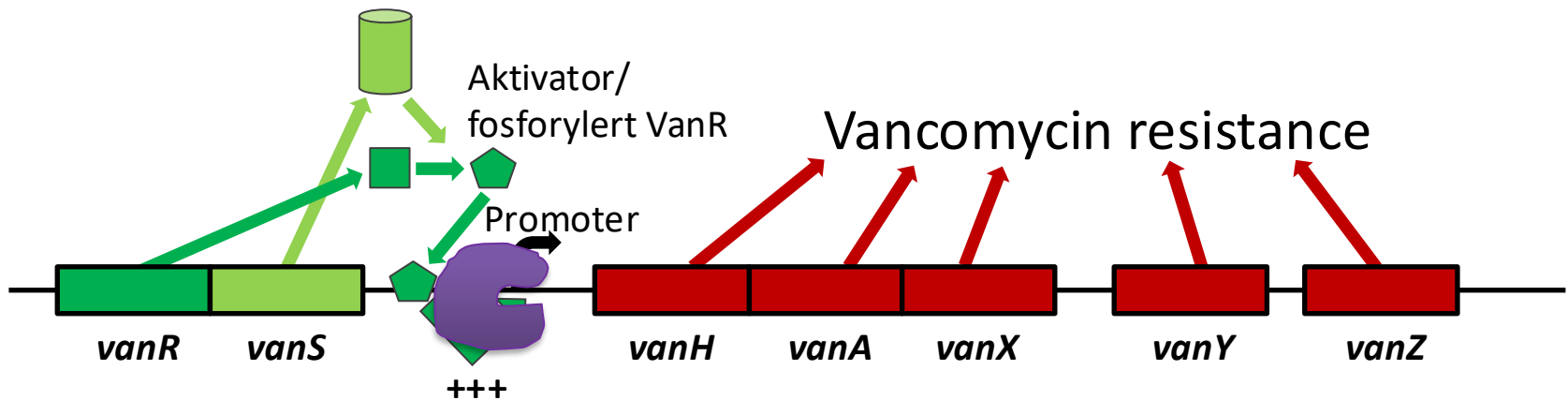
VVE

- Utbrudd
 - Canada 2009-2011 *Efm* ST18
 - Multisenter studie 2015-16 47% fortsatt *vanA*+ VVE
 - Trøndelag 2013-2015; 49 caser *Efm* ST203-CT465
 - To initiale caser -> screenet > 15.000 prøver med *vanA* PCR
 - Overført plasmid til *E. faecalis*
 - København 2016-2017; 4-7% VVE *Efm* ST1421-CT1134
 - Spredt til alle 5 regioner i Danmark og til Færøylene
- Korea: økt prevalens - 2004 (4,7%) - 2008 (13%)
- Porto Portugal: 98% av VRE *Efm* er *vanA* og 4% av disse VVE
- Sporadiske isolater
- Økt mortalitet
- Viktige VRE kloner startet som VVE
- Ulike genetiske mekanismer involvert i variabel resistens

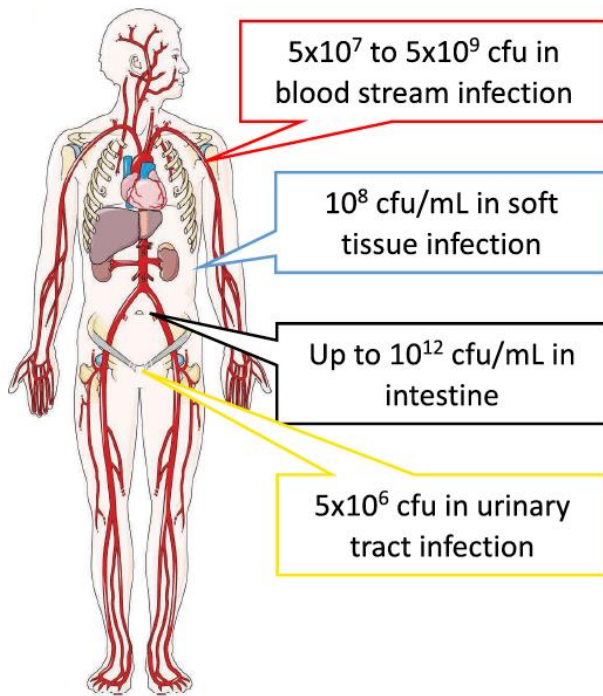
Norsk VVE-S (MIC <2 mg/L) – inducible promoter blocked by IS element



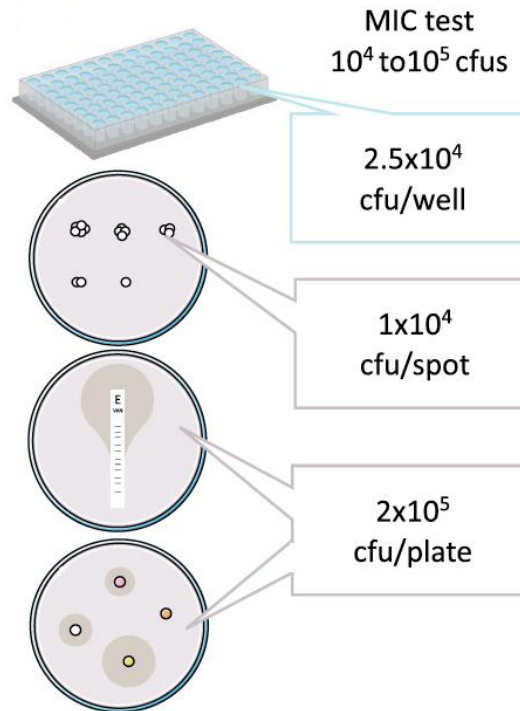
Norske VVE-R (MIC > 256 mg/L) – blokkering av promoter opphevet



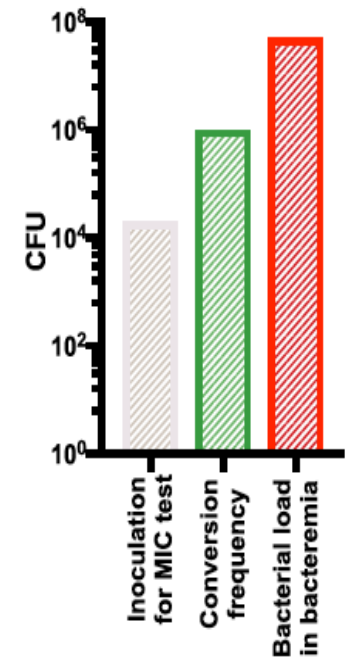
Utfordringer i deteksjon av VVE



Bakteriemengder oppnådd ved infeksjon



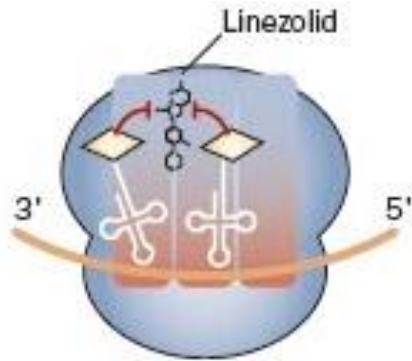
Bakterieinokulum mengder ved fenotypisk testing



Sammenligning av mengder med resistens reversjonsfrekvens

Linezolid virkningsmekanisme

Blokkerer peptidyltransferase senteret (PTC) i ribosomet:



Bakteriostatisk middel for enterokokker

AFA/NordicAST brytningspunkt:

$R > 4 \text{ mg/L}$

Sonediameter:

$R < 20 \text{ mm}$

Mekanismer linezolidresistens

Mutasjoner i ribosomet

- Hovedsakelig **G2576U** mutasjon i 23S rRNA V domenet
- Opptrer ofte etter behandling med linezolid
- Variabel MIC – avhengig av antall 23S rRNA kopier som har fått mutasjonen

Overførbar ribosomal beskyttelse

optrA, poxtA og poxtA-Ef

- MIC kan være lavere/rundt brytningspunktet

Pålitelighet fenotypiske tester linezolidresistens

Method	Reference MIC (BMD)			Genotype
	Essential agreement (EA) %	Bias %	Categorical agreement (CA) %	CA%
EUCAST disk diffusion (DD)	NA	NA	87.0	97.8
Etest	99.7	+10.0	90.5	82.9
MIC Test Strips (MTS)	84.5	+71.0	84.1	98.6

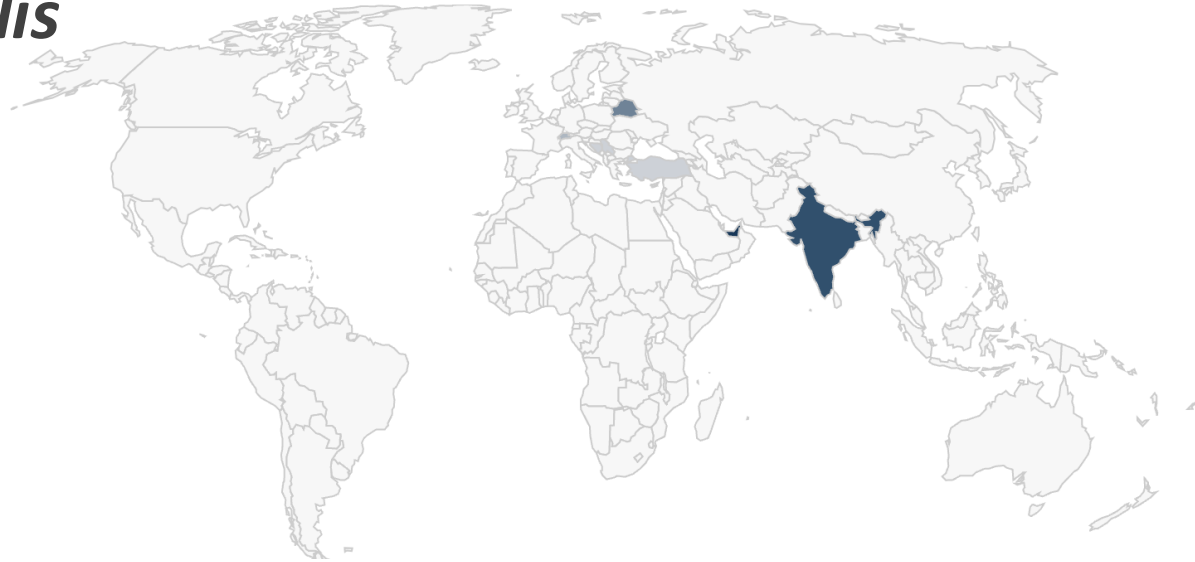
Etest og DD høyeste CA sammenlignet med BMD referanse MIC

DD og MTS konsistente i å detektere stammer med genotypisk linezolidmekanisme

Linezolidresistente enterokokker

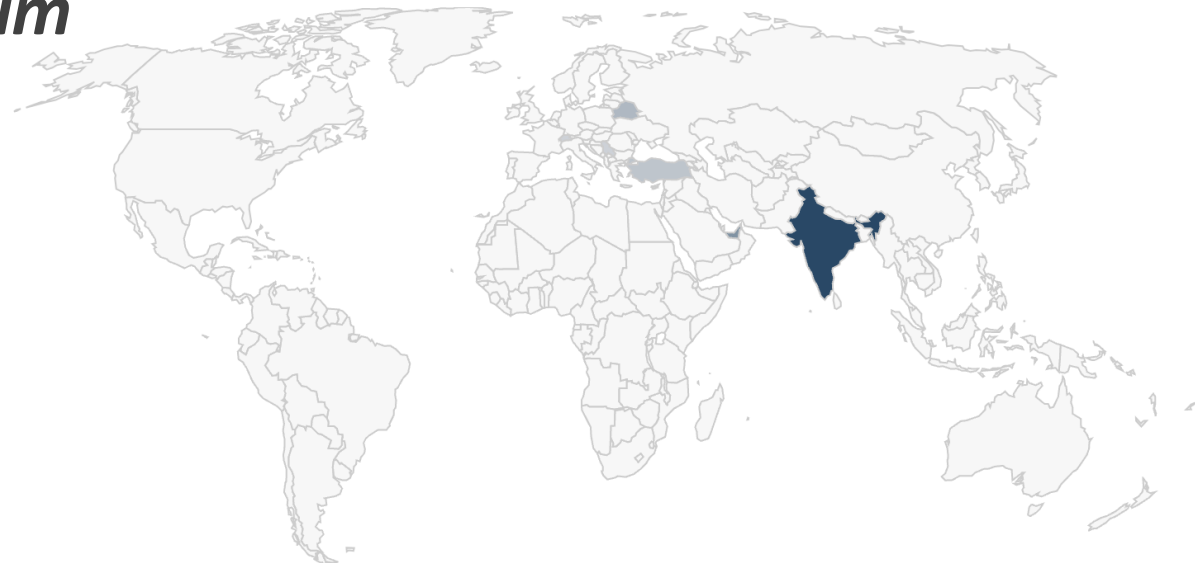
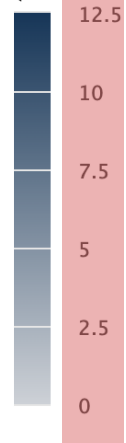
E. faecalis

% Resistant
(invasive isolates)

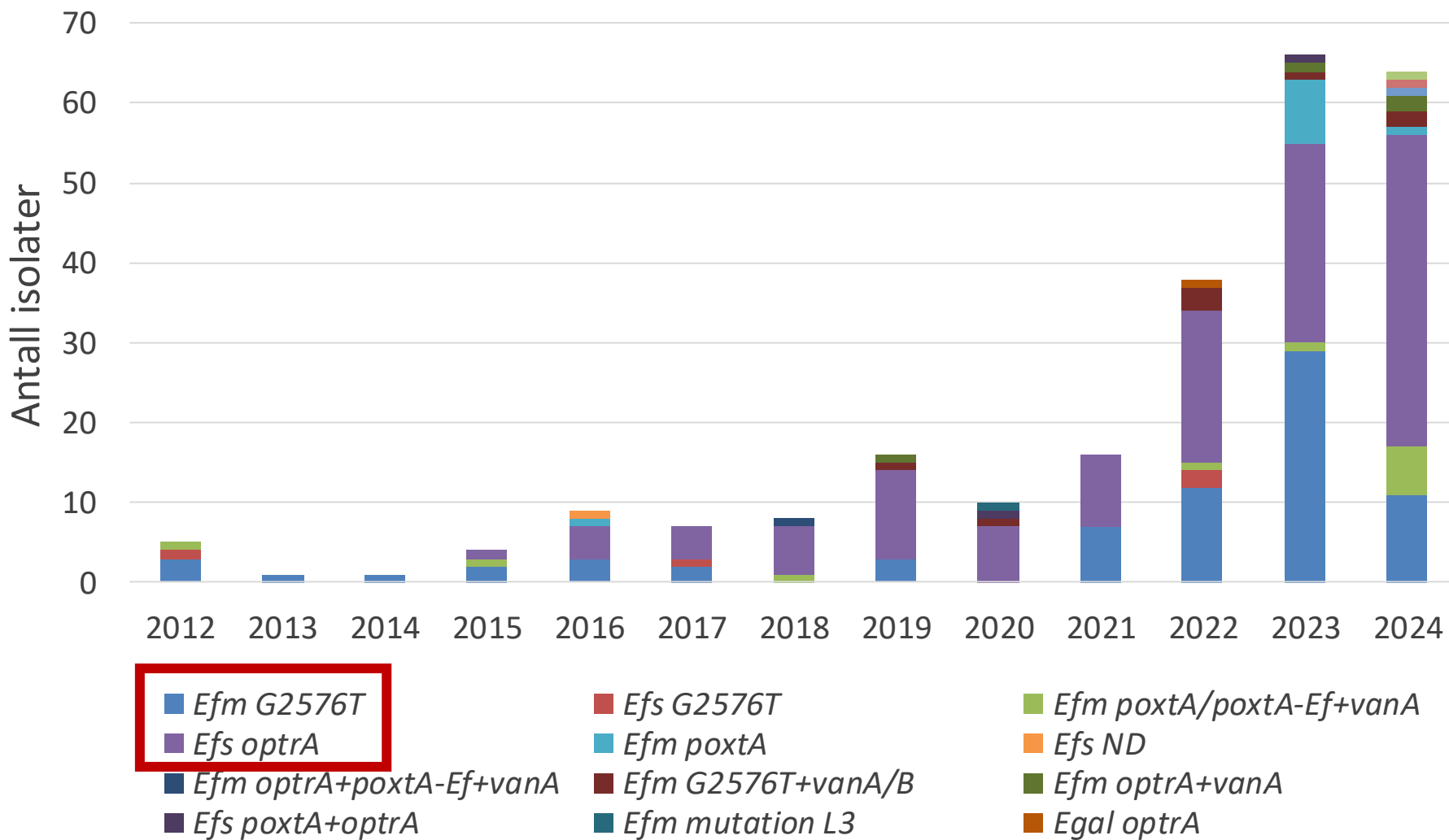


E. faecium

% Resistant
(invasive isolates)

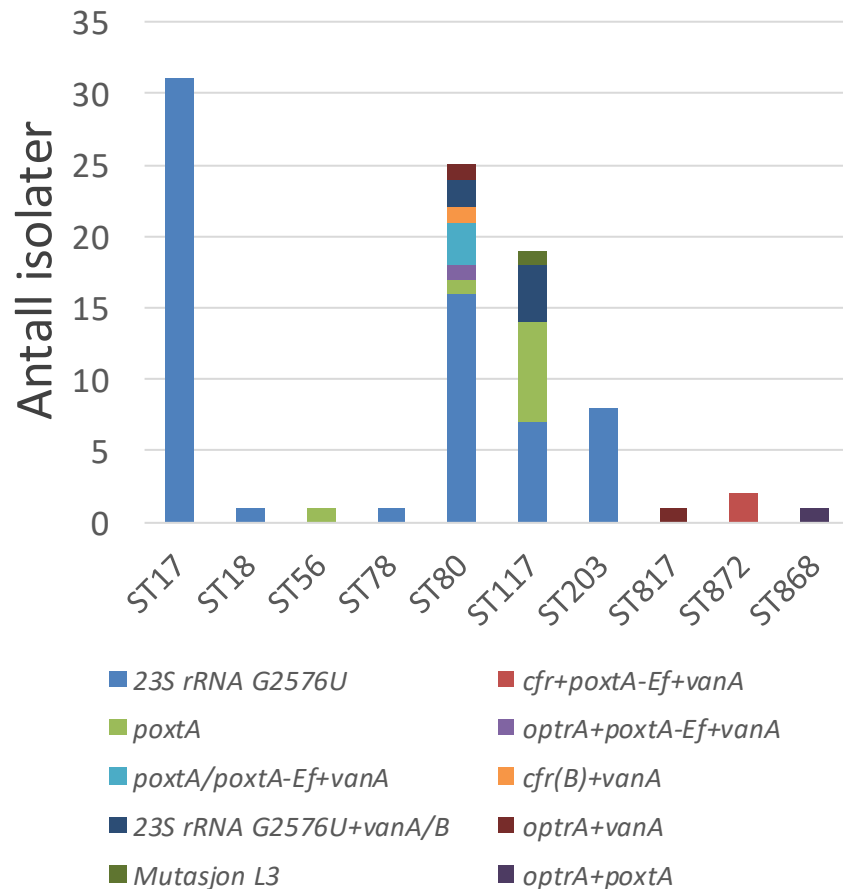


Linezolidresistente enterokokker og deres mekanismer i Norge

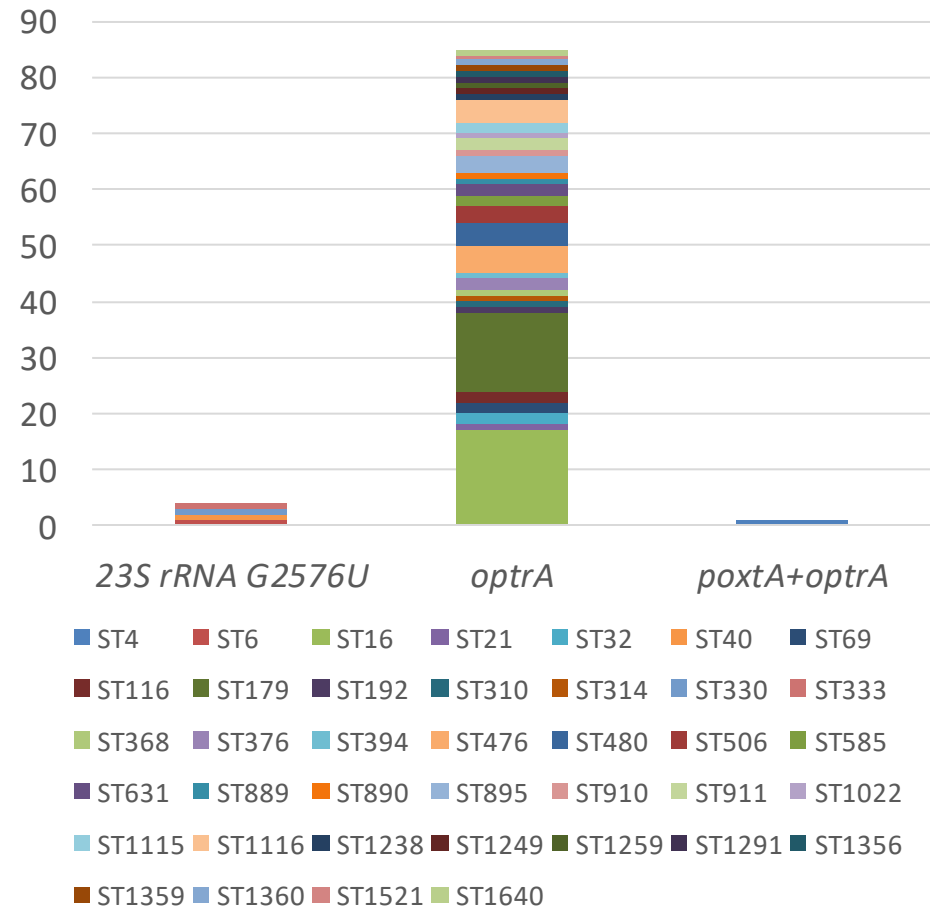


Linezolidresistensmekanismer - kobling mot ST typer og VRE

E. faecium



E. faecalis



LVRE hovedsakelig importert fra Asia

Oppsummering

VRE kan være vanskelig å påvise fenotypisk

To hovedtyper overførbart **vankomycinresistens**;

- ***vanA***

Vanligvis høygradig resistent mot vankomycin og teikoplanin

VVE - *van* gener som ikke uttrykkes før etter genetisk endring

- ***vanB***

Vankomycin MIC 1 - ≥ 256 mg/L og følsom for teikoplanin

VRE kan nydannes i pasienten – *vanB* erverves fra anaerobfloraen i tarmen $\Rightarrow$ lavgradig resistens rundt/under klinisk brytningspunkt

Linezolidresistens:

- Mutasjoner i ribosomet vanligst hos *E. faecium*
- Overførbart resistens - flere varianter av proteiner som beskytter ribosomet
Gir ofte MIC rundt brytningspunktet
optrA mange steder blitt dominerende i *E. faecalis*