

Ergebnisse der Resistenzsurveillance im Veterinärbereich:

Aktuelle Daten zur Florfenicolempfindlichkeit bei Zielorganismen und Kommensalen

Stefan Schwarz & Corinna Kehrenberg

Institut für Tierzucht
der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL),
Neustadt-Mariensee



&
Arbeitsgruppe "Antibiotikaresistenz" der



Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) e.V.

Monitoringstudien im Veterinärbereich in Deutschland

1. Zwei komplementäre Monitoringprogramme:

valide Einschätzung der Resistenzlage der wichtigsten Infektionserreger von landwirtschaftlichen Nutztieren, Heim- und Hobbytieren

GERM-Vet: BVL

→ Tierärztl. Praxis (2003) 31(G): 122-131

→ Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. (2004) 117: 480-492

BfT-GermVet: FAL Neustadt, LMU München, FU Berlin

→ Ergebnisse ab Jan. 2007 verfügbar

2. Zusätzliche Monitoringstudien:

Empfindlichkeitssituation spezifischer Erregergruppen gegenüber einzelnen meist neuen Wirkstoffen auf

→ Florfenicol

→ Pirlimycin

Florfenicol

Einsatz von Florfenicol

- seit 1995 zugelassen zur Bekämpfung von Atemwegsinfektionen bei Rindern
 - *Pasteurella multocida*,
 - *Mannheimia haemolytica*,
 - *Histophilus somni*
- seit 2000 zugelassen zur Bekämpfung von Atemwegsinfektionen bei Schweinen
 - *Pasteurella multocida*,
 - *Actinobacillus pleuropneumoniae*,
 - [- *Streptococcus suis*; *Bordetella bronchiseptica*]
- ausschließliche Verwendung als Injektionspräparat;
keine Zulassung zur Futter- und/oder Wassermedikation

Florfenicol

Florfenicol ist auch **wirksam gegenüber chloramphenicol-resistenten Stämmen**, bei denen die Resistenz auf

- **Chloramphenicol Acetyltransferasen (CAT)** oder
- **Chloramphenicol Exportern (CmlA, CmlB)** beruht.



Wenn Bakterien resistent gegenüber Florfenicol werden wollen, können sie **nicht** auf vorhandene Chloramphenicolresistenzgene zurückgreifen



verzögerte Resistenzentwicklung gegenüber Florfenicol ist zu erwarten

Florfenicolempfindlichkeit

Studien zur *in-vitro* Empfindlichkeit boviner Zielorganismen

Spezies	Zeitraum	N *	MHK-Werte (mg/L)			% Resistenz
			Range	MHK ₅₀	MHK ₉₀	
<i>P. multocida</i>	2000/01	122	≤ 0.12 – 1	0.25	0.5	0.0
	2002/03	95	≤ 0.12 – 1	0.25	0.5	0.0
	2004/05	87	0.25 – 0.5	0.25	0.5	0.0
<i>M. haemolytica</i>	2000/01	118	0.25 – 2	1	2	0.0
	2002/03	98	≤ 0.12 – 1	0.5	1	0.0
	2004/05	81	0.25 – 2	0.5	1	0.0

* Anzahl untersuchter Isolate

aus: Priebe & Schwarz (2003) Antimicrob. Agents Chemother. 47: 2703-2705
Kehrenberg, Mumme, Wallmann, Verspohl, Tegeler, Kühn, & Schwarz (2004)
J. Antimicrob. Chemother. 54: 572-574

Florfenicolempfindlichkeit

Studien zur *in-vitro* Empfindlichkeit porciner Zielorganismen

Spezies	Zeitraum	N *	MHK-Werte (mg/L)			% Resistenz
			Range	MHK ₅₀	MHK ₉₀	
<i>P. multocida</i>	2000/01	212	≤ 0.12 – 2	0.25	0.5	0.0
	2002/03	103	≤ 0.12 – 2	0.5	0.5	0.0
	2004/05	77	0.25 – 1	0.5	0.5	0.0
<i>A. pleuropneumoniae</i>	2000/01	45	≤ 0.12 – 2	0.25	0.5	0.0
	2002/03	63	≤ 0.12 – 0.5	0.25	0.25	0.0
	2004/05	30	0.25	0.25	0.25	0.0
<i>B. bronchiseptica</i>	2000/01	160	1 – 32	4	8	6.3
	2002/03	131	0.5 – 32	2	2	0.8
	2004/05	96	1 – 4	2	4	0.0
<i>S. suis</i>	2000/01	99	0.25 – 2	1	2	0.0
	2002/03	105	0.5 – 2	1	2	0.0
	2004/05	73	1 – 2	1	2	0.0

* Anzahl untersuchter Isolate

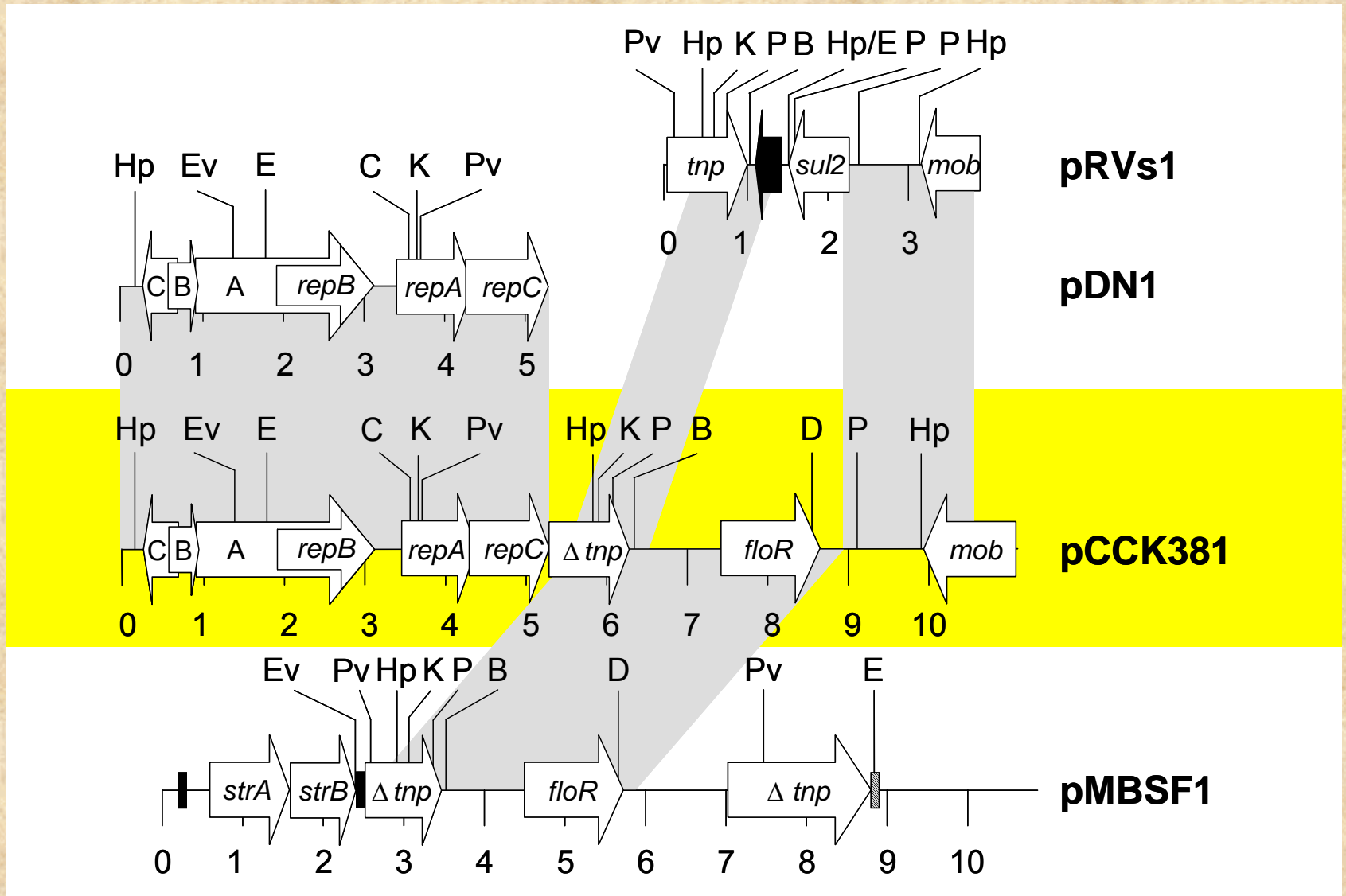
Florfenicolresistenz - UK

- Monitoring der Florfenicolempfindlichkeit in UK durch **Veterinary Laboratories Agency**
- ein **erstes florfenicolresistentes *P. multocida*-Isolat** wurde 2003 bei einem an Pneumonie verendeten Kalb nachgewiesen
- **weitere Analysen** dieses Isolats erfolgten in unserem Labor:



- PCR-gerichtete Überprüfung der Präsenz bis dato bekannter Florfenicol-Resistenzgene
- Nachweis der Plasmidlokalisation
- Klonierung und komplette Sequenzierung des Florfenicol-Resistenzplasmids

Florfenicolresistenz - UK

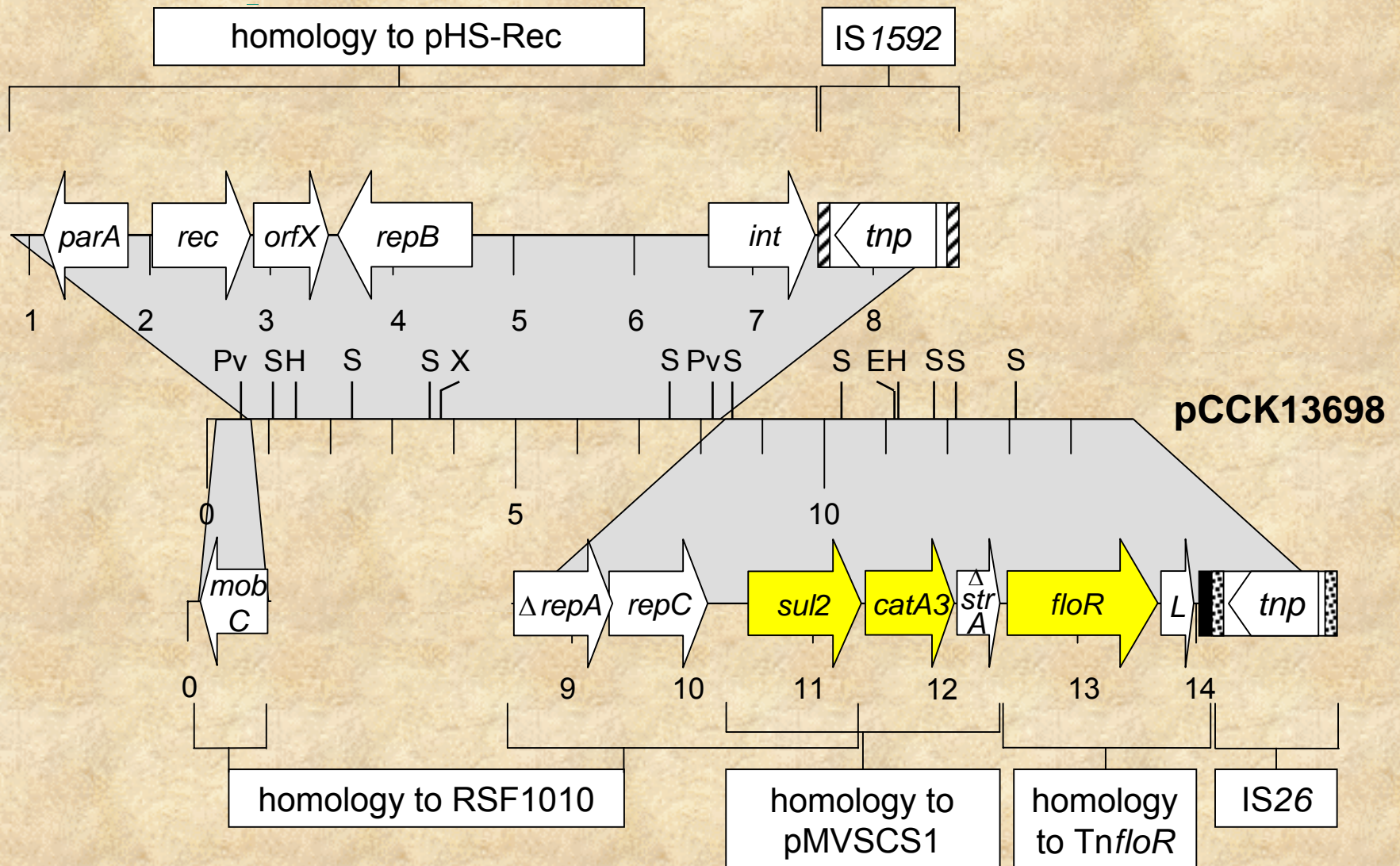


aus: Kehrenberg & Schwarz (2005) J. Antimicrob. Chemother. 55: 773-775

Florfenicolresistenz - UK

- das Gen *floR* ist auf einem mobilisierbaren Plasmid lokalisiert
→ Möglichkeit zur horizontalen Ausbreitung
- Untersuchungen in der Folgezeit bei Kälbern der gleichen Farm und umliegender Farmen ergaben **keinen** weiteren Nachweis von florfenicolresistenten *Pasteurella*- oder *Mannheimia*-Isolaten
- 2005: vereinzelte Nachweise florfenicol-resistenter *Pasteurellaceae* in **Deutschland** (GERM-Vet) und in **Frankreich** (AFSSA, Lyon)

Florfenicolresistenz - Frankreich



Florfenicolempfindlichkeit bei Kommensalen

- bei der Anwendung von antimikrobiellen Wirkstoffen werden nicht nur die **Zielorganismen** bekämpft
- auch die **apathogene bakterielle Begleitflora** ist der Wirkung der antimikrobiellen Substanzen ausgesetzt



Untersuchungen zur Florfenicolresistenz bei:

- *Escherichia coli*
- *Staphylococcus* spp.

Florfenicolresistenz bei Staphylokokken - *fexA*

- Zwei neue Phenicolresistenzgene bei Staphylokokken mit MHK-Werten von $\geq 16 \mu\text{g/ml}$

fexA : phenicolspezifischer Exporter aus der Major Facilitator Superfamily

→ Resistenz gegenüber Phenicolen

Kehrenberg & Schwarz (2004) Antimicrob. Agents Chemother. 48: 615-618.

cfr : rRNA Methylase

→ Resistenz gegenüber Phenicolen und Linkosamiden

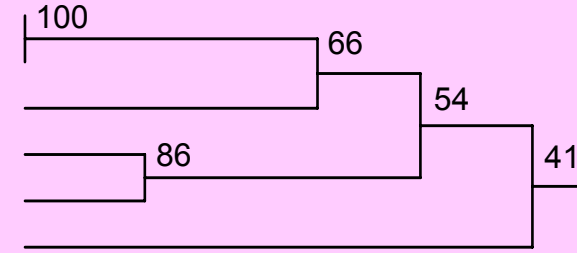
Kehrenberg *et al.* (2005) Mol. Microbiol. 57: 1064-1073.

Identität auf Aminosäureebene (%)



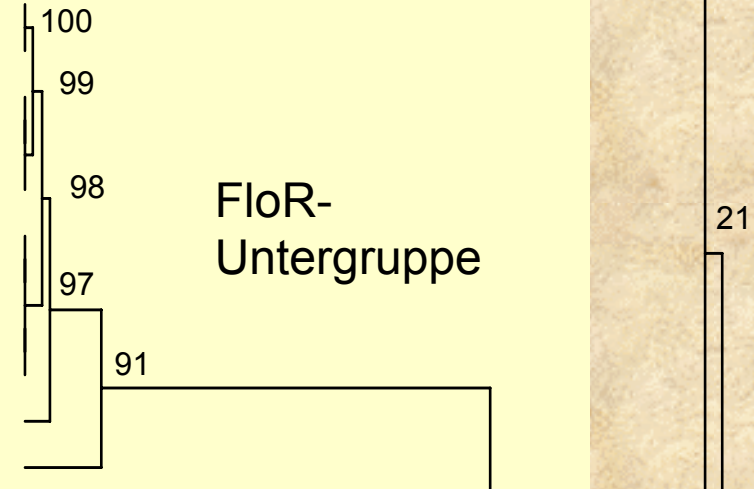
Boden-
bakterien

<i>C. striatum</i>	Cmr
<i>C. glutamicum</i>	Cmx
<i>S. lividans</i>	Cml
<i>R. rhodochrous</i>	CmrA
<i>R. fascians</i>	Cmr, CmlB
<i>S. venezuelae</i>	CmlV

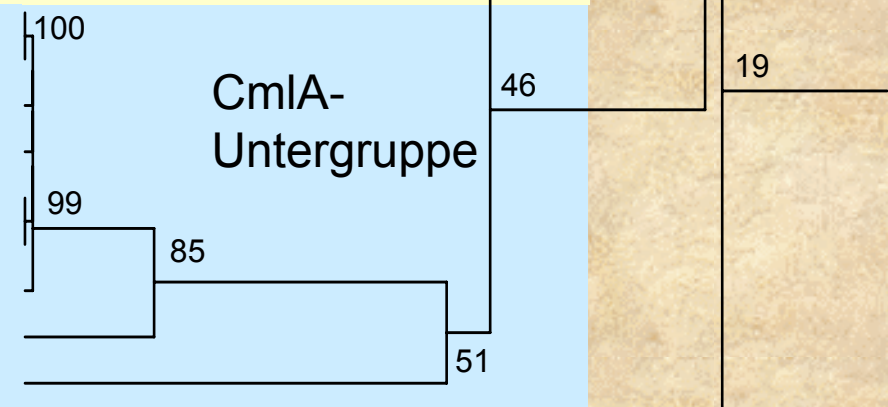


klinisch
relevante
Bakterien

<i>V. cholerae</i>	FloR FloR
<i>E. coli</i>	Flo FloR FloR
<i>Salmonella</i>	FloR FloR CmlA-like Flo
<i>K. pneumoniae</i>	FloR
<i>Ph. damsela</i>	pp-Flo



<i>S. Typhimurium</i>	CmlA
<i>P. aeruginosa</i>	CmlA
<i>Pseudomonas spp.</i>	CmlA
<i>P. aeruginosa</i>	CmlA6
<i>E. coli</i>	CmlA5
Uncultured bacterium	CmlA5
<i>K. pneumoniae</i>	CmlA1
<i>E. aerogenes</i>	CmlA2
<i>E. coli</i>	Cml

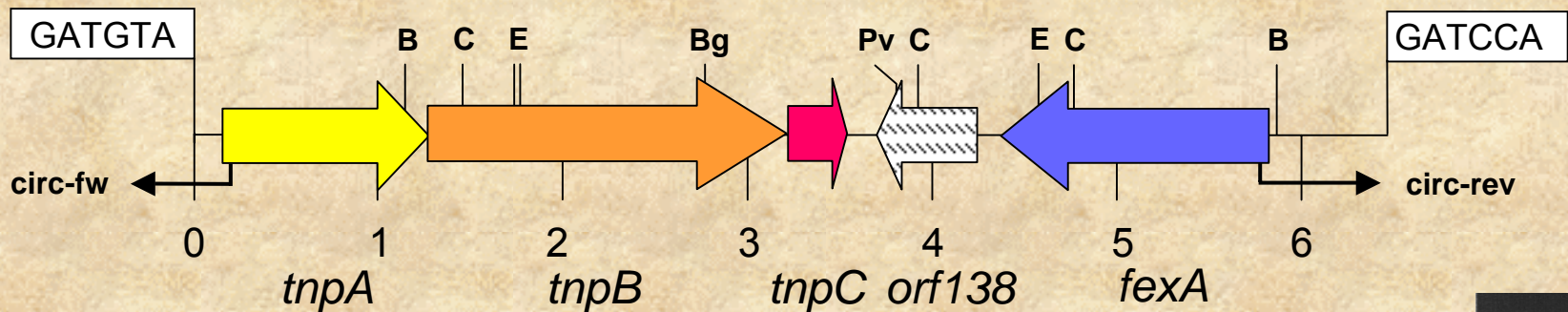


S. lentus **FexA**



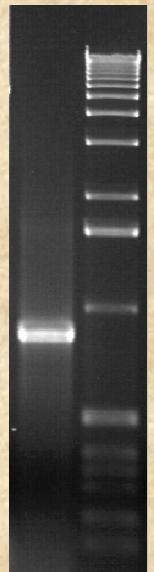
Analyse der *fexA* flankierenden Regionen

Transposon Tn558

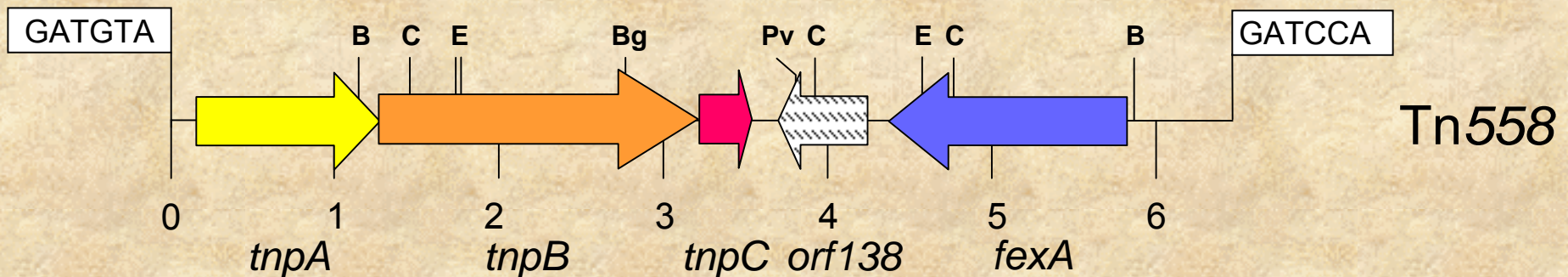
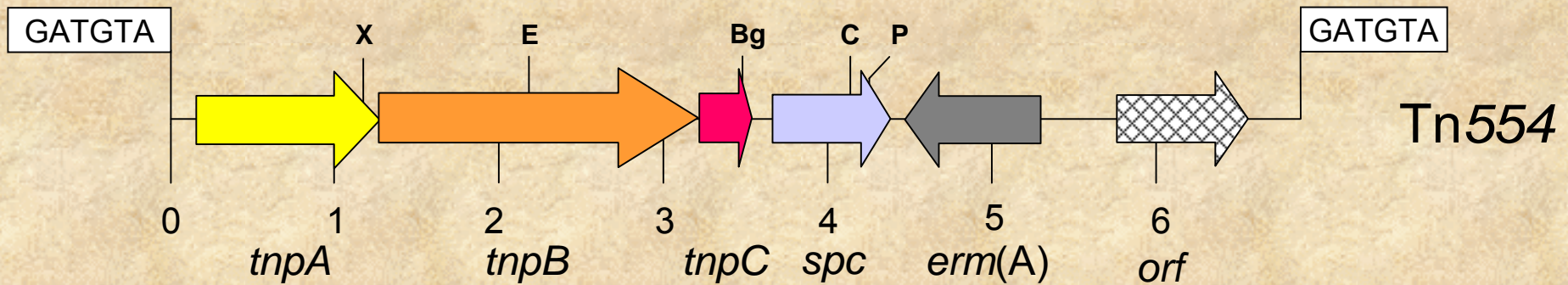
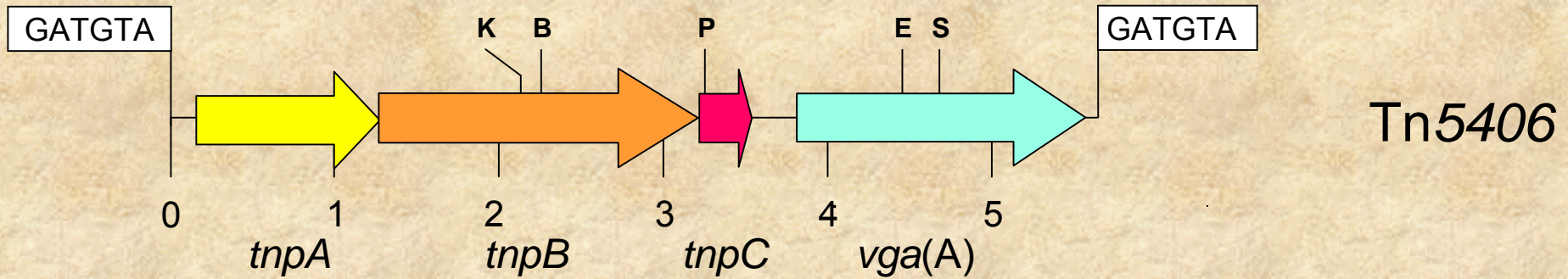


Funktionelle Aktivität von Tn558 ?

- PCR Assays zum Nachweis zirkulärer Zwischenformen
- Sequenzanalysen der PCR-Amplikons



Vergleich von Transposonstrukturen



Florfenicolresistenz bei Staphylokokken - *cfr*

- Zwei neue Phenicolresistenzgene bei Staphylokokken mit MHK-Werten von $\geq 16 \mu\text{g/ml}$

fexA : phenicolspezifischer Exporter aus der Major Facilitator Superfamily

→ Resistenz gegenüber phenicols only

Kehrenberg & Schwarz (2004) Antimicrob. Agents Chemother. 48: 615-618.

cfr : rRNA Methylase

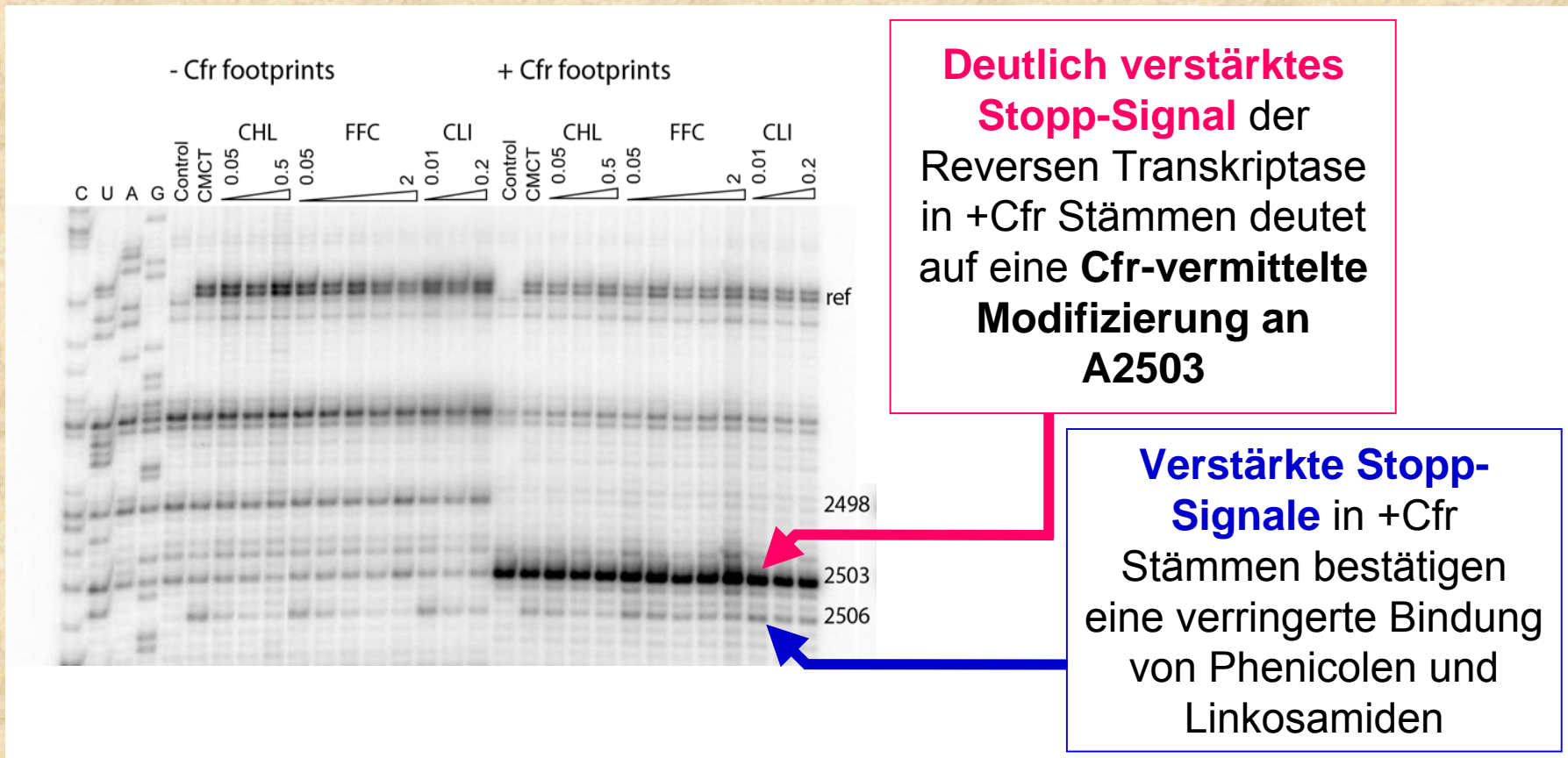
→ Resistenz gegenüber Phenicolen und Linkosamiden

Kehrenberg *et al.* (2005) Mol. Microbiol. 57: 1064-1073.

Cfr-vermittelte Resistenz

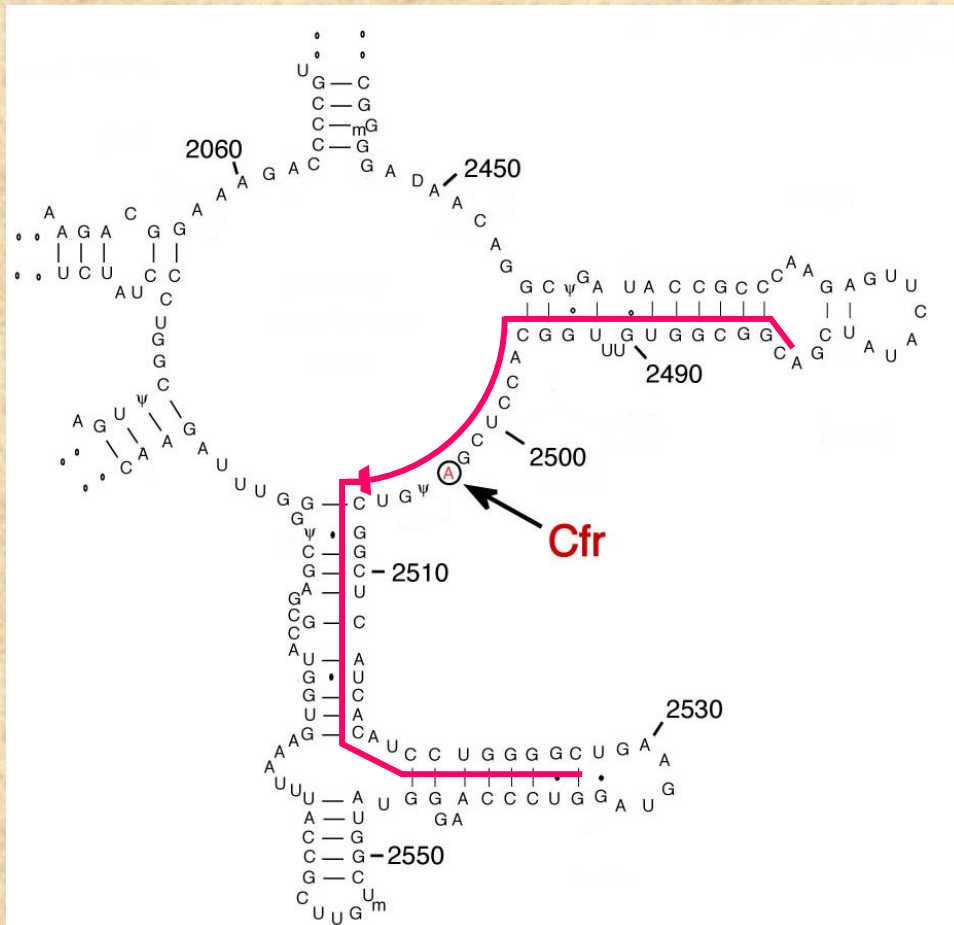
Verringerte Bindung von Phenicolen und Linkosamiden

Cfr-vermittelte Modifikation an Position A2503 in der 23S rRNA



Klärung des Cfr-Resistenzmechanismus

Massenspektrometrische Untersuchungen



MALDI-TOF MS

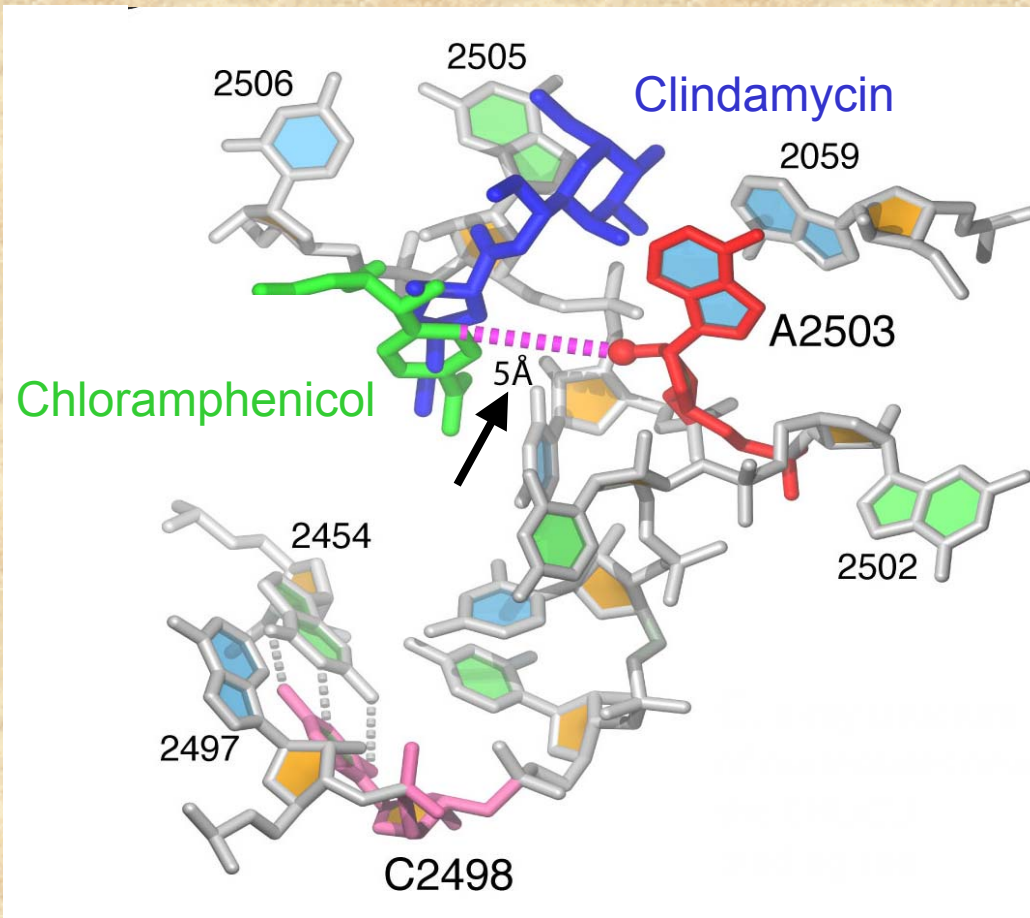
Untersuchungen konzentrierten sich auf einen 45 Nukleotide (n) großen Bereich inklusive der Position A2503



Modifikation an Position A2503 stellt eine **Methylierung** dar

Klärung des Cfr-Resistenzmechanismus

Cfr-vermittelte Methylierung an A2503



A2503 liegt nur 5Å von der überlappenden Bindungsstelle von Phenicolen und Linkosamiden entfernt.



Cfr-vermittelte Methylierung an A2503 **verhindert die korrekte Positionierung** von Phenicolen und Linkosamiden.



Resistenz gegenüber Phenicolen und Linkosamiden

Cfr-vermittelte Multiresistenz

Frage:

Beeinträchtigt die Cfr-vermittelte Methylierung die Bindung weiterer antimikrobieller Wirkstoffe an das Peptidyltransferase-Zentrum ?



Pleuromutiline (Tiamulin, Valnemulin),
Streptogramin A-Antibiotika (Virginiamycin M₁)
Oxazolidinone (Linezolid)

+

"Negativkontrollen"

Makrolide (Erythromycin, Aivlosin), Ketolide (Telithromycin)

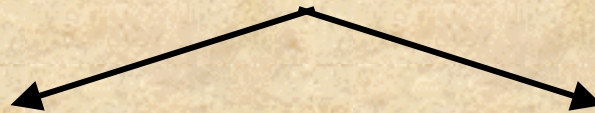
Cfr-vermittelte Multiresistenz

Frage:

Werden die MHK-Werte durch die verringerte Bindung beeinträchtigt ?



MHK-Bestimmung
(gemäß CLSI Richtlinien)



E. coli AS19
E. coli AS19 :: pBluescript II SK+
E. coli AS19 :: pBamHI (Δcfr)
E. coli AS19 :: pBglIII (*cfr*)

S. aureus RN4220
S. aureus RN4220 :: pSCFS1 (*cfr*)
S. aureus RN4220 :: pSCFS3 (*cfr* + *fexA*)
S. aureus RN4220 :: pSCFS2 (*fexA*)

Cfr-vermittelte erhöhte MHK-Werte für Phenicole und Pleuromutiline

Bakterien	<i>cfr</i> Präsenz	Zusätzliche Resistenz- gene	MHK-Werte (µg/ml)			
			CHL	FFC	TIA	VAL
<i>E. coli</i> AS19	—		4	0.5	0.031	0.015
<i>E. coli</i> AS19::pBluescript II SK+	—	<i>bla</i> _{TEM-116}	4	0.5	0.031	0.015
<i>E. coli</i> AS19::pBamHI	Δcfr	<i>bla</i> _{TEM-116}	4	0.5	0.031	0.015
<i>E. coli</i> AS19::pBgIII	<i>cfr</i>	<i>bla</i> _{TEM-116}	16	8	4	0.125
<i>S. aureus</i> RN4220	—		4	2	0.063	0.031
<i>S. aureus</i> RN4220::pSCFS3	<i>cfr</i>	<i>fexA</i>	256	128	≥ 128	1
<i>S. aureus</i> RN4220::pSCFS1	<i>cfr</i>	<i>erm</i> (33), <i>spc</i> , <i>Isa</i> (B)	64	32	≥ 128	≥ 128
<i>S. aureus</i> RN4220::pSCFS2	—	<i>fexA</i>	64	32	0.063	0.031

Cfr-vermittelte erhöhte MHK-Werte für Streptogramine und Oxazolidinone

Bakterien	cfr Präsenz	Zusätzliche Resistenz- gene	MHK-Werte (µg/ml)			
			VIR M ₁	VIR	Q-D	LZD
<i>E. coli</i> AS19	—		2	0.5	0.25	4
<i>E. coli</i> AS19::pBluescript II SK+	—	<i>bla</i> _{TEM-116}	2	0.5	0.25	4
<i>E. coli</i> AS19::pBamHI	Δ <i>cfr</i>	<i>bla</i> _{TEM-116}	2	0.5	0.25	4
<i>E. coli</i> AS19::pBgIII	<i>cfr</i>	<i>bla</i> _{TEM-116}	128	16	16	64
<i>S. aureus</i> RN4220	—		4	0.5	0.25	0.5
<i>S. aureus</i> RN4220::pSCFS3	<i>cfr</i>	<i>fexA</i>	128	4	1	4
<i>S. aureus</i> RN4220::pSCFS1	<i>cfr</i>	<i>erm</i> (33), <i>spc</i> , <i>Isa</i> (B)	128	8	4	8
<i>S. aureus</i> RN4220::pSCFS2	—	<i>fexA</i>	4	0.5	0.25	0.5

Cfr-vermittelter Anstieg in den MHK-Werten für Linkosamide, aber **nicht** für Makrolide/Ketolide

Bakterien	cfr Präsenz	Zusätzliche Resistenz- gene	MHK-Werte (µg/ml)			
			CLI	ERY	AIV	TEL
<i>E. coli</i> AS19	—		8	0.25	0.5	0.25
<i>E. coli</i> AS19::pBluescript II SK+	—	<i>bla</i> _{TEM-116}	8	0.25	0.5	0.25
<i>E. coli</i> AS19::pBamHI	Δ <i>cfr</i>	<i>bla</i> _{TEM-116}	8	0.25	0.5	0.25
<i>E. coli</i> AS19::pBgIII	<i>cfr</i>	<i>bla</i> _{TEM-116}	≥ 512	0.25	0.5	0.25
<i>S. aureus</i> RN4220	—		0.125	0.25	2	≤ 0.063
<i>S. aureus</i> RN4220::pSCFS3	<i>cfr</i>	<i>fexA</i>	256	0.25	2	≤ 0.063
<i>S. aureus</i> RN4220::pSCFS1	<i>cfr</i>	<i>erm(33), spc, Isa(B)</i>	256	≥ 128	2	≤ 0.063
<i>S. aureus</i> RN4220::pSCFS2	—	<i>fexA</i>	0.125	0.25	2	≤ 0.063

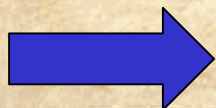
Verteilung von *cfr* und *fexA* bei Staphylokokken

Isolat no#	Spezies	Herkunft	Resistenzmuster	Resistenzgene		MHK _{Cm}	MHK _{Ff}
				Plasmid	Chromosom		
1	<i>S. aureus</i>	Pferd	Tc,Sm,Km,Gm,Sp,Amp,Em,Cli,SxT,Cm,Ff	<i>fexA</i>		256	64
2	<i>S. lentus</i>	Rind	Tc,Sp,Em,Cli,Cm,Ff	<i>fexA+cfr</i>		>256	>128
3	<i>S. lentus</i>	Rind	Tc,Sp,Em,SxT,Cm,Ff		<i>fexA</i>	128	32
4	<i>S. chromogenes</i>	Rind	Tc,Km,Sp,Amp,Em,Cli,SxT,Cm,Ff		<i>fexA</i>	256	64
5	<i>S. simulans</i>	Rind	Tc,Sm,Km,Sp,Em,Cm,Ff	<i>fexA</i>		256	32
6	<i>S. simulans</i>	Rind	Tc,Sm,Sp,Em,Cli,Cm,Ff	<i>cfr</i>	<i>fexA</i>	32	32
7	<i>S. simulans</i>	Rind	Tc,Sm,Sp,Em,Cli,Cm,Ff	<i>cfr</i>		32	16
8	<i>S. lentus</i>	Rind	Tc,Sm,Sp,Em,Cli,Sxt,Cm,Ff	<i>fexA</i>		64	32
9	<i>S. sciuri</i>	Rind	Tc,Sm,Gm,Sp,Em,Cli,Cm,Ff	<i>cfr</i>	<i>fexA</i>	32	64
10	<i>S. aureus</i>	Mensch	Tc,Sm,Km,Gm,Sp,Amp,Em,Cli,SxT,Cm,Ff	unbekannt	unbekannt	>256	>128
11	<i>S. aureus</i>	Schwein	Tc,Sm,Sp,Amp,Em,Cli,Cm,Ff	<i>fexA+cfr</i>		256	>128
12	<i>S. lentus</i>	Schwein	Tc,Sm,Sp,Cli,Cm,Ff	<i>fexA+cfr</i>		256	>128

Amp = Ampicillin, Cli = Clindamycin, Cm = Chloramphenicol, Em = Erythromycin, Ff = Florfenicol, Gm = Gentamicin, Km = Kanamycin, Sm = Streptomycin, Sp = Spectinomycin, SxT = Sulfamethoxazol/Trimethoprim, Tc = Tetracyclin

Zusammenfassung

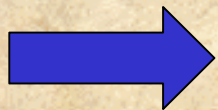
- Florfenicol besitzt auch 10 Jahre nach der Einführung in die klinisch-veterinärmedizinische Nutzung eine hervorragende Wirksamkeit gegenüber den Zielorganismen
- Resistenzen werden - wenn auch selten - bei Zielorganismen (*P. multocida*) und Kommensalen (*E. coli*, *Staphylococcus* spp.) beobachtet
 - *floR* bei *E. coli* von Rindern und Schweinen
 - *cfr* und/oder *fexA* bei *Staphylokokken*
- alle drei Gene, *floR*, *cfr* und *fexA*, sind auf Plasmiden lokalisiert, die meist noch andere Resistenzgene tragen



Co-Transfer von Resistenzgenen

Zusammenfassung

- *cfr* ist das erste und bislang einzige Gen, das transferable Resistenz gegenüber Pleuromutilinen und Oxazolidinonen vermittelt.
- Die Cfr Methylase ist die einzige bislang bekannte rRNA-Methylase, die Resistenz gegenüber fünf verschiedenen Gruppen von Wirkstoffen vermittelt



betroffene Wirkstoffklassen stellen zum Teil **Reserveantibiotika** (Oxazolidinone) bzw. **wichtige Neuentwicklungen** (Pleuromutiline) im humanmedizinischen Bereich dar

Danksagung

TZ/FAL

Vera Nöding
Roswitha Becker
Kerstin Meyer
Kristina Kadlec



**Institut National de la Recherche
Agronomique (INRA),
Nouzilly, France
Axel Cloeckart**



**BVL,
Berlin**

Jürgen Wallmann
Heike Kaspar



**Agence Française de Sécurité
Sanitaire des Aliments (AFSSA),
Lyon, France
Danièle Meunier
Hayette Targant
Jean-Yves Madec**



**Veterinary Laboratories Agency,
Suffolk, UK
Jon Rogers
Paul Todd**



**University of Southern Denmark,
Odense, Denmark
Birte Vester
Jacob Poehlsgaard**



**University of Copenhagen,
Copenhagen, Denmark
Katherine S. Long**

