

Resistente Keime von Tieren: Verbreitung von Keimen oder Verbreitung von Resistenzgenen ?

**Stefan Schwarz, Kristina Kadlec, Geovana Brenner Michael,
Andrea T. Feßler und Anne-Kathrin Schink**

Institut für Nutztiergenetik, Friedrich-Loeffler-Institut (FLI),
Neustadt-Mariensee

Grundlegende Vorbemerkungen

➤ Entstehung von Resistenzen:

- Erwerb einer **Mutation**; meist in einem chromosomal lokalisierten Gen, dessen Genprodukt die Zielstruktur für das betreffende Antibiotikum darstellt
- Erwerb eines **Resistenzgens**, das auf einem mobilen genetischen Element (Plasmid, Transposon, Genkassette, ICE, ...) lokalisiert ist

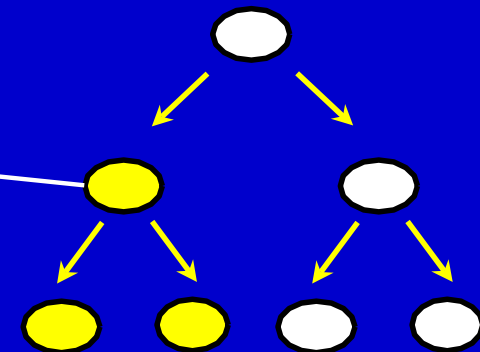
➤ Vermehrtes Auftreten einer Resistenzeigenschaft:

- vertikale (klonale) Verbreitung resistenter Bakterien
- horizontale und vertikale Verbreitung von Resistenzgenen

Vertikale Ausbreitung

● **resistent** ○ empfindlich

resistenzvermittelnde
Mutation im Bakterien-
genom



Vertikale Verbreitung von Antibiotikaresistenzen

- Resistenz basiert auf Mutationen in Haushaltsgenen:
 - Fluorchinolonresistenz
 - Spectinomycinresistenz
 - Rifampicinresistenz

- Mutation soll möglichst einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Fitness der Bakterien haben.

- Unterschiedliche Bakterien können die gleichen Mutationen ausbilden.

Beispiel 1

Chromosomale resistenzvermittelnde Mutation

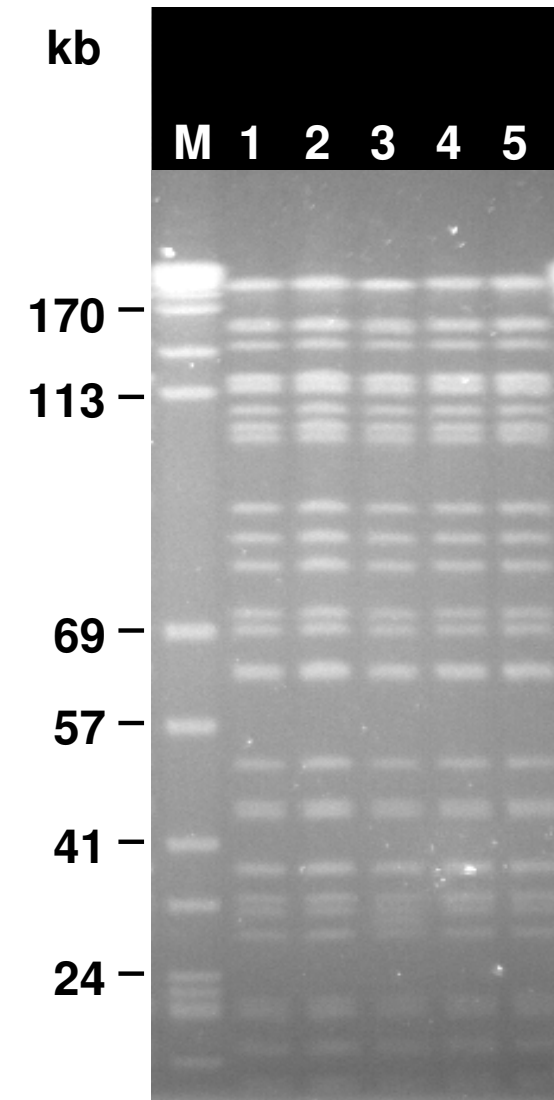
Rifampicinresistenz bei methicillinresistenten *Staphylococcus pseudintermedius* von Hunden

- Rifampicin ist ein Reserveantibiotikum für die Therapie von Infektionen durch multiresistente MRSP-Isolate
- Rifampicinresistenz entwickelt sich rasch unter der Therapie (**keine Rifampicin-Monotherapie !!**)
- Rifampicinresistenz basiert auf Mutationen im Gen *rpoB*

Rifampicinresistenz bei MRSP

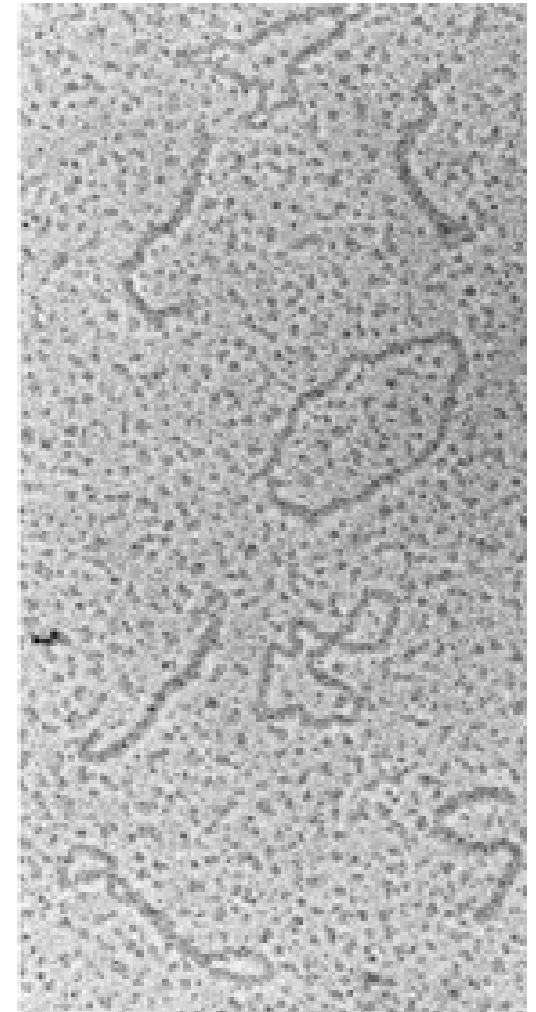
Isolate no.	Sampling date	Resistance phenotype	F M
1	10-12-2007	BLA-TET-ML-SXT-GEN-ENR	0
2	04-02-2008	BLA-TET-ML-SXT-GEN-ENR-RIF	≥
3	11-06-2008	BLA-TET-ML-SXT-GEN-ENR-RIF	≥
4	11-08-2008	BLA-TET-ML-SXT-GEN-ENR-RIF	≥
5	02-09-2008	BLA-TET-ML-SXT-GEN-ENR-RIF	≥

- Singulärer Basenaustausch CAC (His) → C
- Beginn der Rifampicintherapie Ende Jan 20
- Erster resistenter Stamm: Feb 2008
- Persistenz für >7 Monate



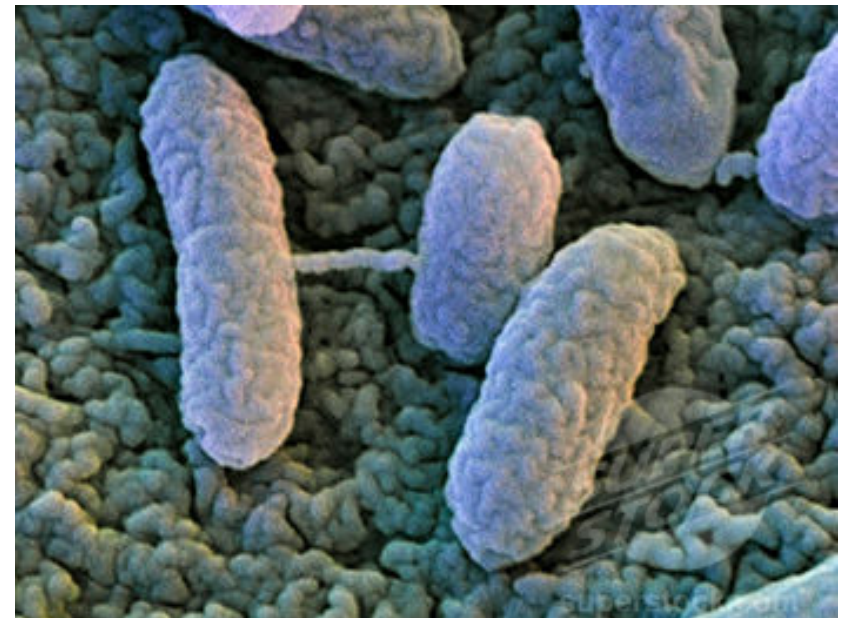
Vertikale Ausbreitung von mobilen Resistenzgenen

- Plasmide spielen als Träger von Resistenzgenen eine wichtige Rolle bei der Ausbreitung von Resistenzen
- Plasmide liegen in unterschiedlichen Kopienzahlen vor:
 - High-copy Plasmide (20-150 Kopien pro Bakterienzelle)
 - Low-copy Plasmide (1-2 Kopien pro Bakterienzelle)
- Plasmide werden bei der Zellteilung auf die Tochterzellen verteilt.

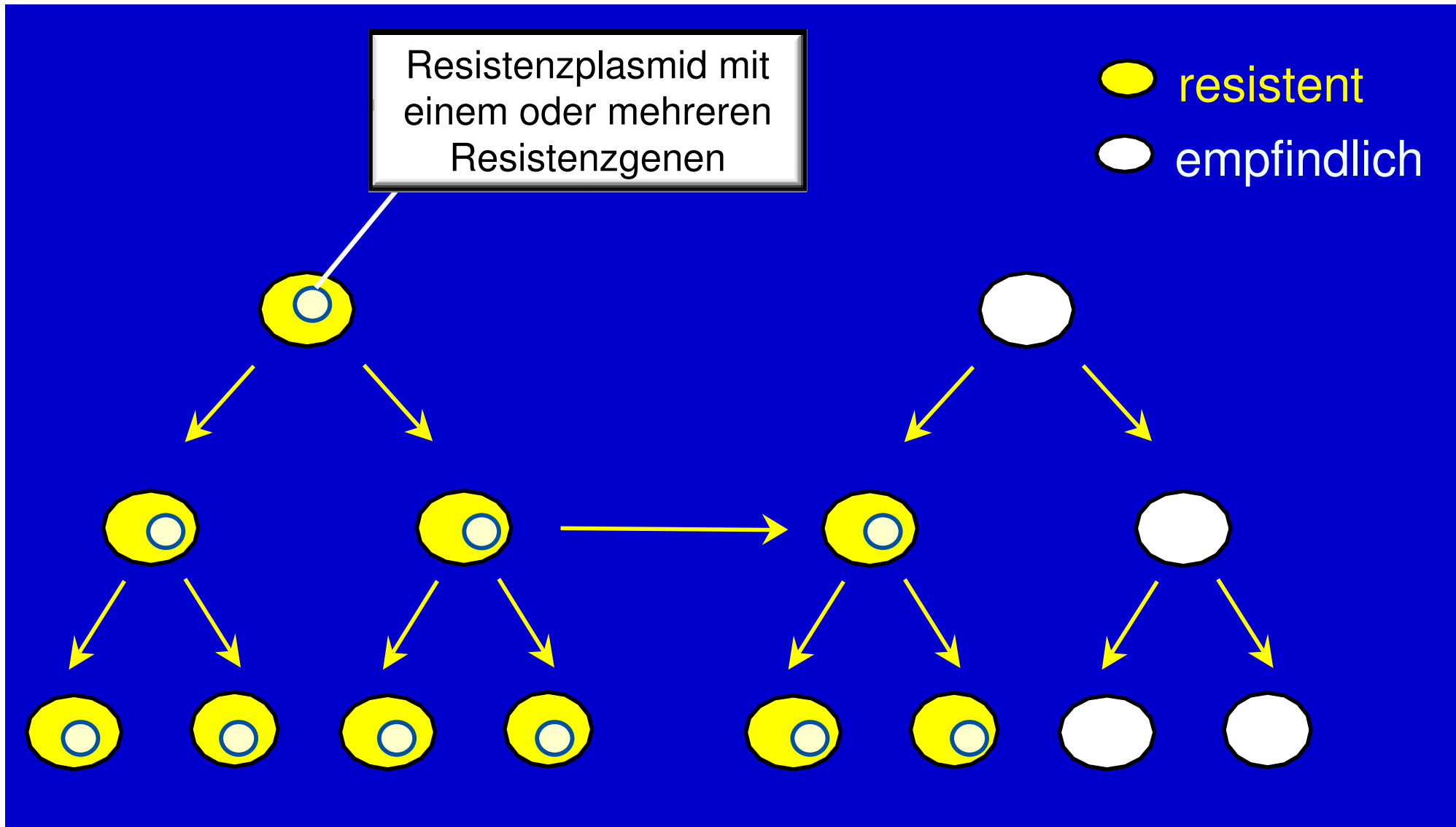


Horizontale Ausbreitung von mobilen Resistenzgenen

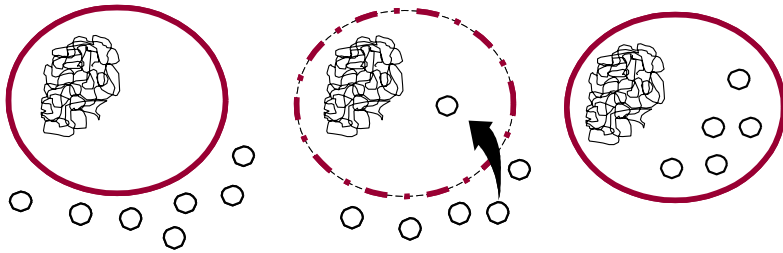
- Plasmide und andere mobile genetische Elemente können auch zwischen Bakterien der gleichen und unterschiedlicher Spezies und Genera ausgetauscht werden:
 - Intraspezies-Transfer
(*S. aureus* ↔ *S. aureus*)
 - Interspezies-Transfer
(*S. aureus* ↔ *S. hyicus*)
 - Intergenust-Transfer
(*E. faecalis* ↔ *S. aureus*)



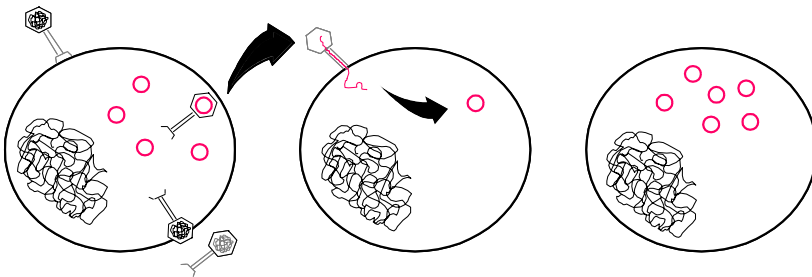
Horizontale + vertikale Ausbreitung mobiler Resistenzgene



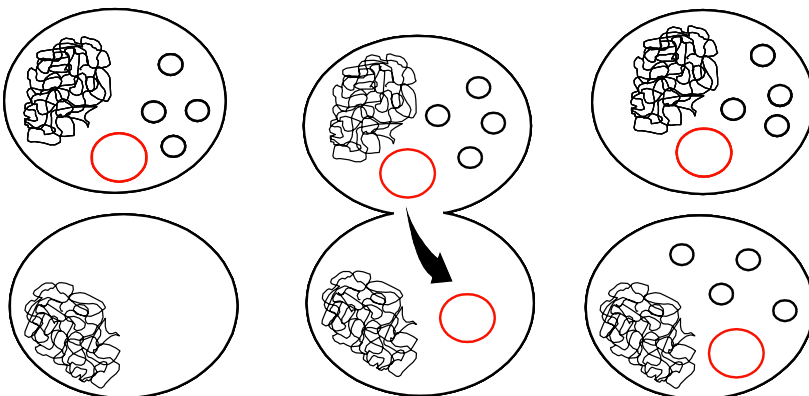
Transformation



Transduktion



Konjugation - Mobilisierung



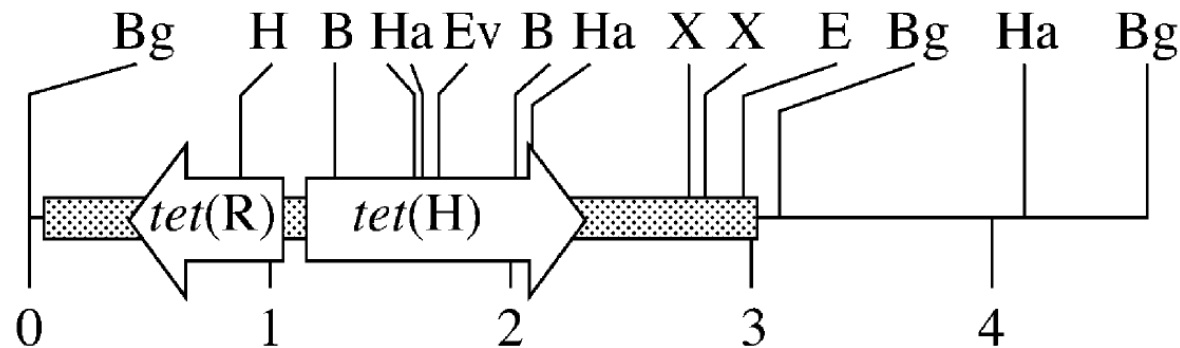
Wege der horizontalen Ausbreitung von Resistenzgenen:

- Transformation
(nackte DNA)
- Transduktion
(Beteiligung von Phagen)
- Konjugation
(inkl. Mobilisierung)

Beispiel 2

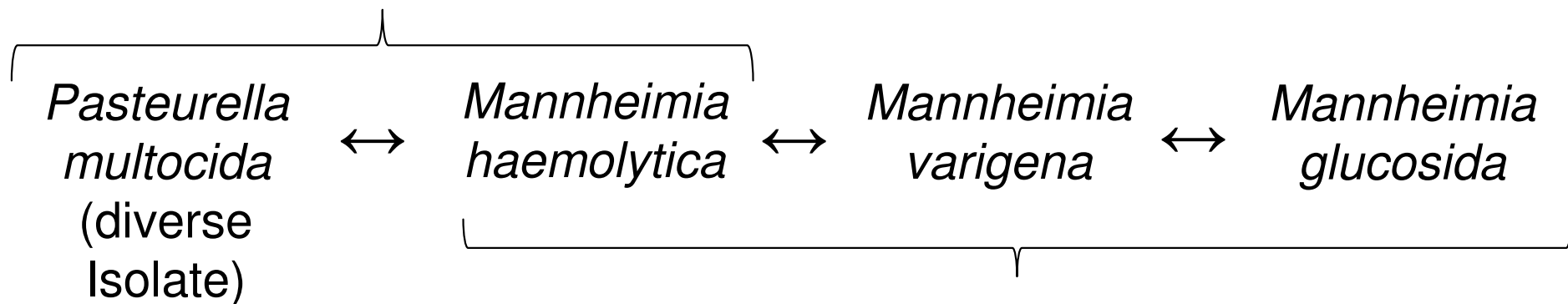
**Kleines, nicht-konjugatives Plasmid mit
singulärem Resistenzgen**

Horizontale Ausbreitung von mobilen Resistenzgenen



Tetracyclin-
Resistenzplasmid
pMHT1

Intergenus-Transfer

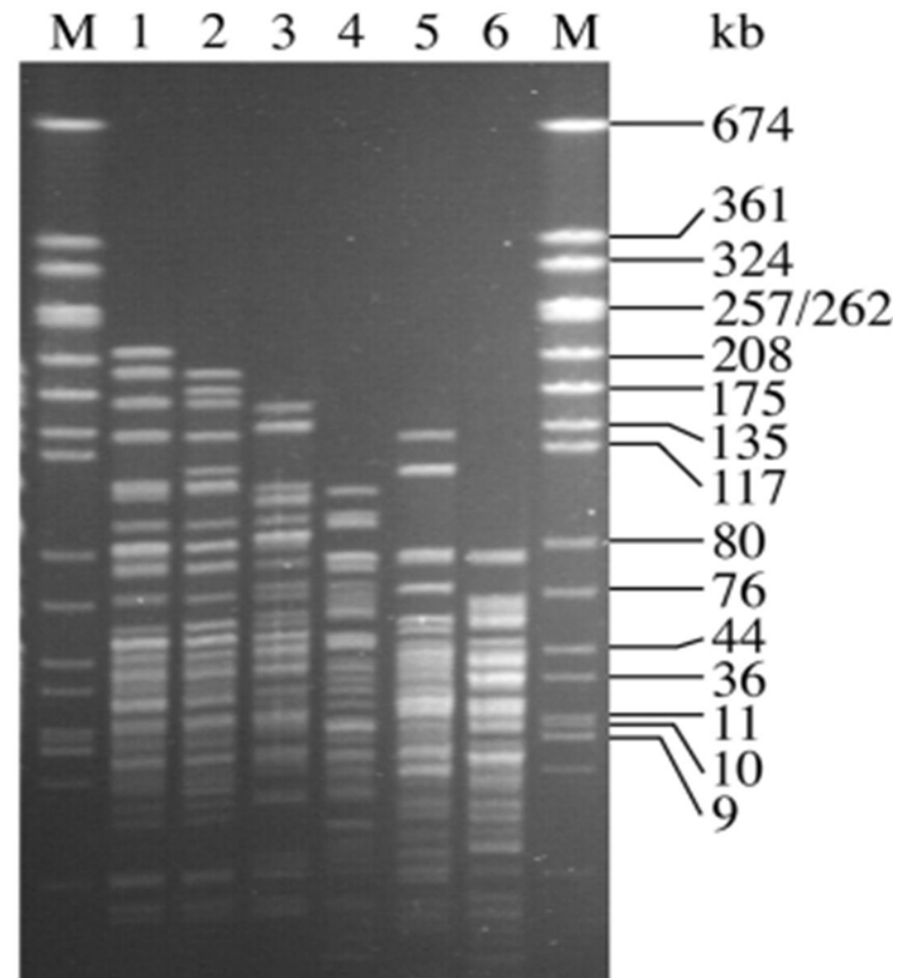


Intraspezies-Transfer

Interspezies-Transfer

*Sma*I-Pulsfeld-Gelelektrophoresemuster pMHT1-tragender Isolate

- Spur 1: *P. multocida*
 Spur 2: *P. multocida*
 Spur 3: *P. multocida*
 Spur 4: *M. varigena*
 Spur 5: *M. haemolytica*
 Spur 6: *M. glucosida*
 Spur M: Längenstandard

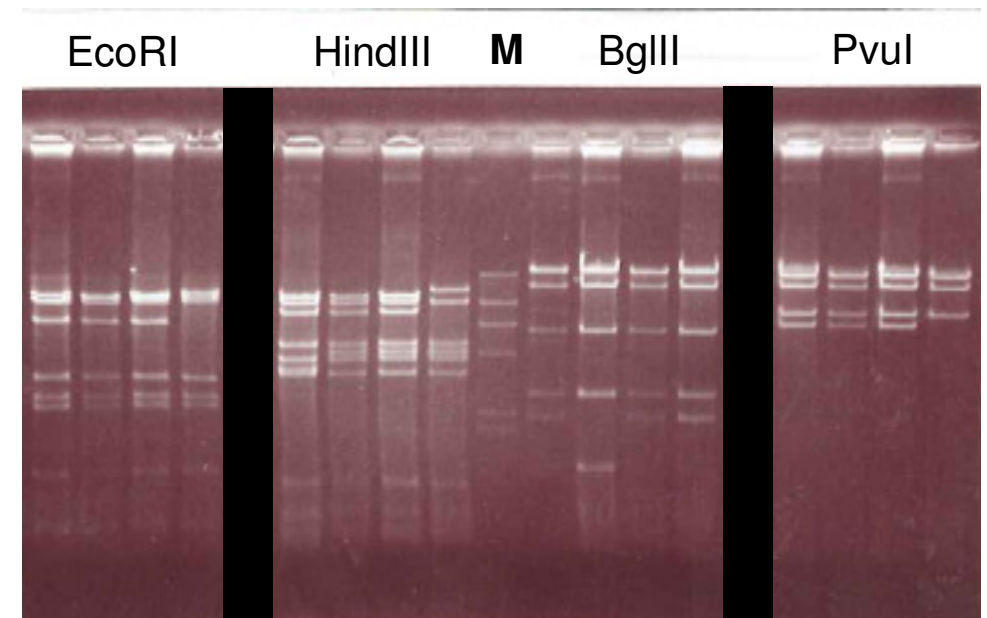


Beispiel 3

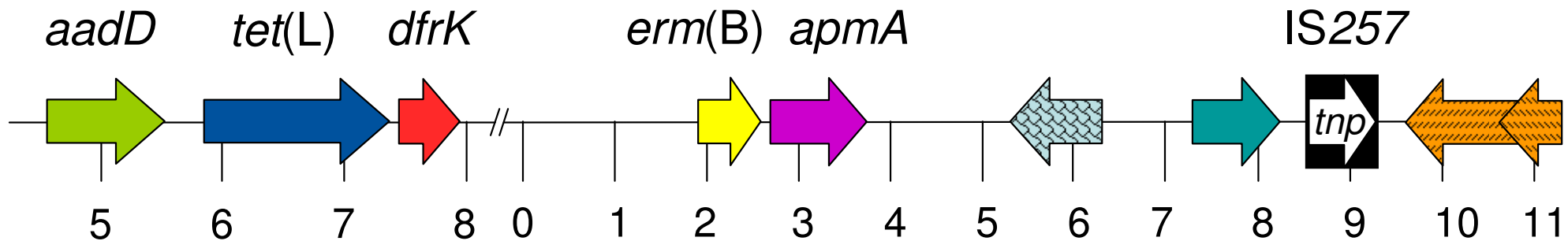
**Größeres, nicht-konjugatives Plasmid mit
fünf Resistenzgenen**

Apramycin-Resistenzplasmide bei MRSA CC398 von Schweinen, Rindern und Geflügel

- Nachweis von Apramycinresistenz bei 7/107 MRSA CC398 unterschiedlicher tierartlicher und geographischer Herkunft
- Alle 7 Isolate verfügten über strukturell eng verwandte Plasmide von ca. 40 kb Apramycin-Resistenzplasmide
- Komplettssequenzierung eines dieser Plasmide



Apramycin-Resistenzplasmide bei MRSA CC398 von Schweinen, Rindern und Geflügel



- Plasmid pAFS11 verfügt über fünf Resistenzgene:
 - *aadD*: Kanamycin/Neomycinresistenz
 - *tet(L)*: Tetracyclinresistenz
 - *dfrK*: Trimethoprimresistenz
 - *erm(B)*: Makrolid-/Linkosamid-/Streptogramin B-Resistenz
 - *apmA*: Apramycinresistenz
- Co-Lokalisation → Co-Selektion und Persistenz

Beispiel 4

**Integratives konjugatives Element mit
zwölf Resistenzgenen**

Horizontale Ausbreitung von mobilen Resistenzgenen

- Weitere mobile genetische Elemente, die bei der horizontalen Ausbreitung von Resistenzen eine wichtige Rolle spielen:
 - Transposons (können auch konjugativ sein)
 - Genkassetten
 - ICEs (= Integrative Conjugative Elements)

Journal of Antimicrobial Chemotherapy Advance Access published October 14, 2011

J Antimicrob Chemother
doi:10.1093/jac/dkr406

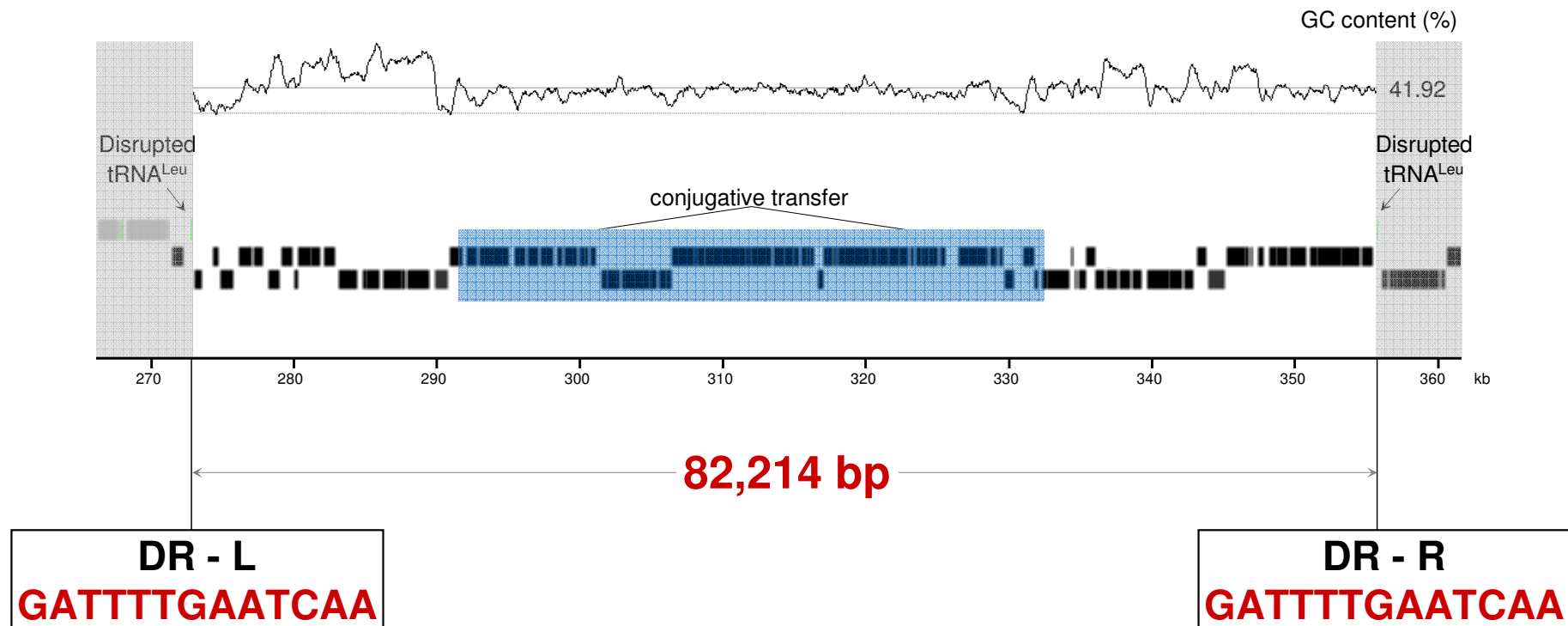
**Journal of
Antimicrobial
Chemotherapy**

**ICEPmu1, an integrative conjugative element (ICE)
of *Pasteurella multocida*: analysis of the regions that comprise
12 antimicrobial resistance genes**

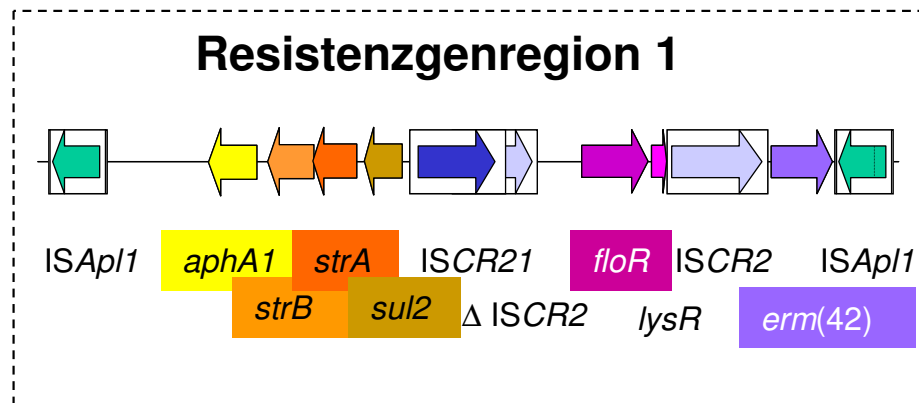
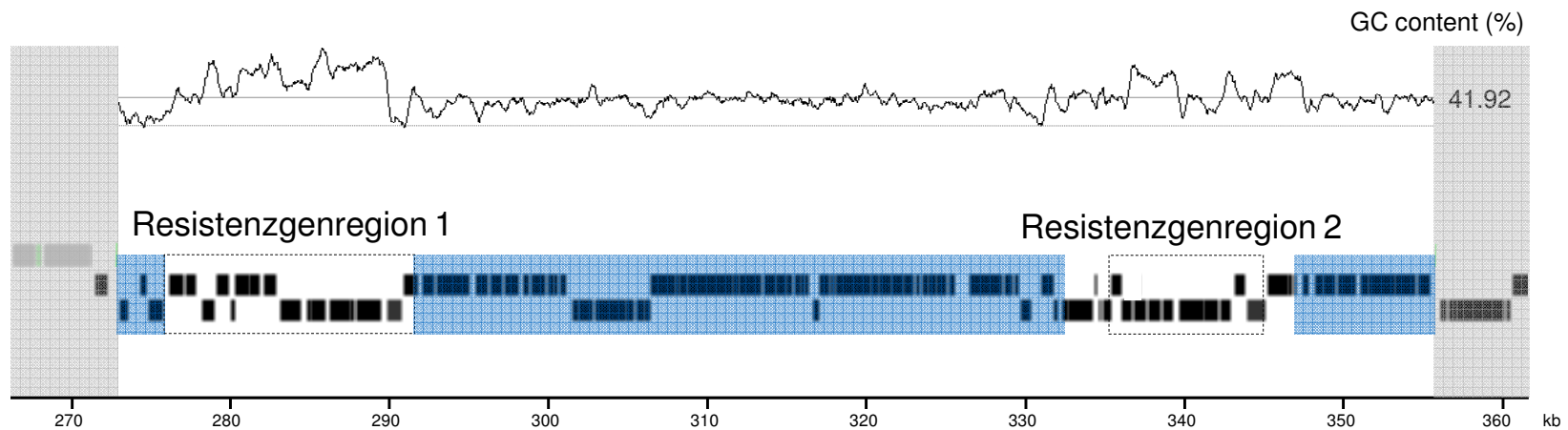
Geovana Brenner Michael^{1,2}, Kristina Kadlec¹, Michael T. Sweeney³, Elzbieta Brzuszkiewicz², Heiko Liesegang²,
Rolf Daniel², Robert W. Murray³, Jeffrey L. Watts³ and Stefan Schwarz^{1*}

¹Institute of Farm Animal Genetics, Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Neustadt-Mariensee, Germany; ²Göttingen Genomics Laboratory, Institute of Microbiology and Genetics, Georg-August-University, Göttingen, Germany; ³Pfizer Animal Health, Kalamazoo, MI, USA

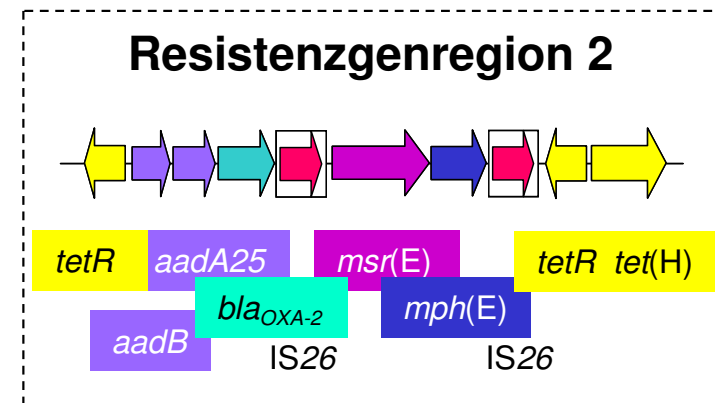
ICEPmu1



ICEPmu1



ca. 15.7 kb



ca. 9.8 kb

- *ICEPmu1* ist ein aktives Element
- springt mit Transferfrequenzen von 10^{-4} – 10^{-6}
- exprimiert seine Resistenzgene auch in fremden Wirten wie *E. coli*

Strain	<i>ICEPmu1</i> transfer frequency	MIC values (mg/L)												
		TET	CHL	FFC	SUL	STR	KAN	NEO	GEN	SPE	AMP	TUL	TIL	CLIN
<i>P. multocida</i> 36950	donor	32	16	8	≥1024	≥256	≥128	≥32	128	≥512	0.25	≥128	≥128	≥128
<i>P. multocida</i> E348-08 Rif ^R	recipient	0.5	≤0.5	0.25	128	4	8	8	2	16	0.25	4	8	8
<i>P. multocida</i> E348-08 Rif ^R :: <i>ICEPmu1</i>	1.4×10^{-4}	32	8	8	512	≥256	≥128	≥32	32	≥512	0.25	64	64	≥128
<i>M. haemolytica</i> 39229 Rif ^R	recipient	0.5	1	1	64	8	8	16	2	64	0.12	4	8	16
<i>M. haemolytica</i> 39229 Rif ^R :: <i>ICEPmu1</i>	1.0×10^{-5}	32	16	16	256	≥256	≥128	≥32	256	≥512	0.12	≥128	≥256	≥128
<i>E. coli</i> HK225 Rif ^R	recipient	1	4	4	16	≥256	16	8	4	16	2	4	64	≥128
<i>E. coli</i> HK225 Rif ^R :: <i>ICEPmu1</i>	2.9×10^{-6}	64	128	256	≥1024	≥256	≥128	≥32	128	≥512	32	32	≥256	≥128

Resistenzgene:

↑
tet(H)↑
floR↑
sul2↑
strA
strB
aadA25↑
aphA1↑
aadB ↑
aadA25↑
*bla*_{OXA-2}↑
msr(E)-
mph(E)↑
erm(42)

Folgen des horizontalen Resistenzgen-Transfers

- Viele Plasmide, Transposons, ICEs etc. verfügen über mehr als nur ein einzelnes Resistenzgen.
- Mit dem Transfer eines solchen Elements werden auch alle Resistenzgene des mobilen Elements auf neue Wirtsbakterien übertragen.
- Der Selektionsdruck durch die **Anwendung eines Antibiotikums** reicht aus, damit Bakterien ein Multiresistenzplasmid, ~transposon oder ~ICE nicht verlieren.
- Kenntnisse zur Resistenzgenetik sind wichtig, um Persistenz und Co-Selektion zu verstehen.

Abschätzung des Ausbreitungspotenzials

- Kenntnisse über genetische Grundlagen, Lokalisation, Organisation und Verknüpfung („Physical linkage“) von Resistenzeigenschaften
 - Chromosomale Mutation oder Resistenzgen
 - Wenn Resistenzgen:
 - auf mobilem genetischen Element lokalisiert ?
 - mit anderen Resistenzgenen co-lokalisiert oder verknüpft ?
 - konjugatives Element / nicht-konjugatives Element ?
 - Wirtsspektrum des Elements ?
 - Transferfrequenz ?

Forschungsverbund MedVet-Staph: *Staphylococcus aureus* (MRSA and MSSA) as zoonotic pathogen



Forschungsverbund RESET: ESBL and (fluoro)quinolone resistance in *Enterobacteriaceae*



Verbreitung von Keimen oder Verbreitung von Resistenzgenen ?

Beides

Im Einzelfall ist jeweils mit geeigneten molekularen Typisierungsverfahren abzuklären, ob es sich um die Ausbreitung eines Klons (bspw. in einem Tierbestand, Krankenhaus) oder um die Verbreitung von mobilen Resistenzgenen handelt.

Besten Dank für Ihre Aufmerksamkeit