

Epidemiologische und molekulargenetische
Charakterisierung der Chinolon- und Makrolidresistenz bei
Staphylococcus aureus und *Streptococcus pneumoniae* sowie
der Desinfektionsmittelunempfindlichkeit bei
Staphylococcus aureus

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Mechthild Boos
aus Haan

Pro Büro & Papier GmbH, Düsseldorf

2002

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Referent: Prof. Dr. J.F. Ernst

Korreferent: Prof. Dr. F.J. Schmitz

Tage der mündlichen Prüfungen:

Hauptfach: Mikrobiologie 4.11.2002

1. Nebenfach: Biochemie: 7.11.2002

2. Nebenfach: Genetik: 12.11.2002

Abschlusssitzung: 13.11.2002

Ich bedanke mich bei

meinem Mann und meinen Eltern und Freunden, die meine Arbeit mit Interesse verfolgt haben und mich immer unterstützten

Prof. Dr. Ernst für die Übernahme des Referats und der Betreuung und für Hilfestellungen und Beratung

Prof. Dr. Schmitz für die Überlassung des Themas, für die freundliche Unterstützung, für den Humor und die gute Zusammenarbeit

der Arbeitsgruppe Schmitz für das gute Arbeitsklima, für manche Hilfe und viele gute Ratschläge

dem Institut für medizinische Mikrobiologie und Virologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, insbesondere Prof. Dr. Heinz und Prof. Dr. Hadding, die mir Arbeitsmaterial und Geräte zur Verfügung stellten und mit Rat zur Seite standen

der Nährbodenküche und der ganzen Funktionsabteilung für alle ihre Hilfe und die gute Laune

Dr. Andreas Beyer vom Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) für seine große, geduldige Hilfe

Dr. Karl Köhrer und Sybille Scheuring vom BMFZ für gute Ratschläge

den MTA's der mikrobiologischen Diagnostik für Tipps und Hilfe

der gesamten mikrobiologischen Diagnostik für das gute Arbeitsklima

und

bei Prof. Dr. Weiß und Frau Prof. Dr. Knust für die Übernahme der mündlichen Prüfungen

Folgende Artikel sind aus dieser Arbeit hervorgegangen:

Originalarbeiten

Schmitz, F. J., D. Milatovic, M. Boos, S. Mayer, and A. C. Fluit. 2002. *In-vitro* activity of the novel des-F86) quinolone BMS-284756 against genetically characterised clinical streptococcal isolates, including strains with reduced quinolone susceptibility. J. Antimicrob. Chemother. **49**: 698-701.

Boos, M., S. Mayer, K. Köhrer, S. Scheuring, A.C. Fluit, and F.-J. Schmitz. 2002. *In-vitro* activity of the novel des-fluoro(6) quinolone BMS-284756 against mutants of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, and *Staphylococcus aureus* selected with different quinolones. Antimicrob. Agents Chemother. **46**: 580-582.

Schmitz, F.-J., M. Boos, S. Mayer, H. Jagusch, and A. C. Fluit. 2001. Increased *in-vitro* potency of the novel des-F(6) quinolone BMS-284756 against genetically defined clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother. **49**: 283-287.

Mayer, S., M. Boos, A. Beyer, A. C. Fluit, and F.-J. Schmitz. 2001. Distribution of the antiseptic resistance genes *qacA*, *qacB* and *qacC* in 497 methicillin-resistant and – susceptible European isolates of *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob Chemother. **47**: 896-897.

Schmitz, F.-J., A. Fischer, M. Boos, S. Mayer, D. Milatovic, and A. C. Fluit. 2001. Quinolone-resistance mechanisms and *in-vitro* susceptibility patterns among European isolates of *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, and *Streptococcus pneumoniae*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **20**: 219-222.

Schmitz, F.-J., R. Sadurski, A. Kray, M. Boos, R. Geisel, K. Köhrer, J. Verhoef, and A. C. Fluit. 2000. Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. J. Antimicrob. Chemother. 45: 891-894.

In Druck befindliche Originalarbeiten

Reinert R., A. Al-Lahham, R. Lütticken, M. Boos, and F.-J. Schmitz. Characterisation of clinical *Streptococcus pneumoniae* strains from Germany with a decreased susceptibility to fluoroquinolones. J. Antimicrob. Chemother.

Übersichtsartikel

Mayer, S., M. Boos, A. Beyer, D. Hafner, and F.-J. Schmitz. 2001. Verteilung der Qac-Effluxproteine bei *S.aureus*. Hygiene & Medizin 26: 333-225.

In Druck befindliche Übersichtsartikel

Schmitz, F. J., S. Mayer, M. Boos, J. Verhoef, and A.C. Fluit für die europäischen SENTRY Teilnehmer. Resistenzmechanismen und Ermittlung der *in-vitro* Aktivitäten verschiedener Antibiotika bei *Streptococcus pneumoniae* Isolaten aus europäischen Universitätskliniken. Chemotherapie Journal

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.1.1 Klinische Relevanz	1
1.1.1.1 Transfer von Resistenzgenen in <i>S. aureus</i>	3
1.1.2 Pathogenitätsfaktoren	5
1.2 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	6
1.2.1 Klinische Relevanz	7
1.2.2 Pathogenitätsfaktoren	8
1.3 Fluorochinolone und das Disfluorochinolon BMS 294756	10
1.3.1 Fluorochinolone	10
1.3.2 Wirkungsweise	11
1.3.2.1 DNA-Gyrase	12
1.3.2.2 Topoisomerase IV	13
1.3.2.3 Wirkung der Chinolone	13
1.3.3 Resistenzmechanismen	14
1.3.4 BMS 294756	18
1.4 Makrolide, Lincosamide und Streptogramine	19
1.4.1 Wirkmechanismen der MLS-Antibiotika	19
1.4.1.1 Makrolide	19
1.4.1.2 Lincosamide	20
1.4.1.3 Streptogramine	21
1.4.1.4 Ketolide	21
1.4.2 Genetische Grundlagen der Resistenz gegenüber Makroliden, Lincosamiden und Streptograminen	22
1.4.2.1 Modifizierung der zellulären Angriffsstelle	24
a) <i>erm(A)</i>	26
b) <i>erm(B)</i>	26
c) <i>erm(C)</i>	27
1.4.2.2 Ausschleusung der Wirkstoffe	28

a) „Major faciliator“-Gruppe	29
b) „ABC-Transporter“-Gruppe	29
1.4.2.3 Inaktivierung der Wirkstoffe	30
a) Laktonhydrolasen	30
b) Nukleotidyltransferasen	31
c) Acetyltransferasen	31
d) Esterasen	32
e) Phosphorylasen	32
1.4.2.4 Resistenzvermittelnde Mutationen in den ribosomalen Proteinen L4 und L22 sowie in der 23S-rRNA	32
1.5 Desinfektionsmittel	34
1.5.2 QacA und B	34
1.5.3 QacC	36
2. Zielsetzung	38
3. Material und Methoden	40
3.1 Material	40
3.1.1 Chemikalien	40
3.1.1.1 Lösungen und Feststoffe	40
3.1.1.2 Antibiotika	40
3.1.1.3 Fertig-Kits	41
3.1.1.4 Primer	41
3.1.2 Geräte	42
3.1.3 Plastik- und Einwegartikel	42
3.1.4 Bakterienstämme	43
3.1.5 Nährmedien	43
3.2 Methoden	44
3.2.1 Mikrobiologische Methoden	44
3.2.1.1 Anzucht von Bakterien	44
3.2.1.2 Stammhaltung	44
3.2.1.3 Wachstumsmessung	44
3.2.1.4 Messung der optischen Dichte	44
3.2.1.5 Bestimmung der Lebendkeimzahl	45

3.2.1.6	Sterilisation	45
3.2.1.7	Methoden zur Identifizierung von Bakterien	45
a)	<i>S. aureus</i>	45
b)	<i>S. pneumoniae</i>	46
3.2.1.8	Resistenztestungen	46
a)	Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration	46
b)	Reserpintest	47
c)	Der Agar-Diffusionstest	47
d)	Die Bestimmung der spontanen Mutationsrate	47
3.2.2	Molekularbiologische Methoden	48
3.2.2.1	Die Polymerase-Kettenreaktion	48
3.2.2.2	Lysatherstellung	49
3.2.2.3	Agarosegelelektrophorese	49
3.2.2.4	Die Sequenzierung	49
3.2.2.5	Pulsfeldgelelektrophorese	51
4.	Ergebnisse	52
4.1	Fluorochinolone und BMS 294756	52
4.1.1	Epidemiologische Verteilung der Resistenzen	53
4.1.1.1	<i>S. aureus</i>	53
4.1.1.2	<i>S. pneumoniae</i>	56
4.1.2	Epidemiologie der Resistenzmutationen	59
4.1.2.1	<i>S. aureus</i>	60
4.1.2.2	<i>S. pneumoniae</i>	64
4.1.3	Das Disfluorochinolon BMS 2947576	68
4.2	Makrolide	78
4.2.1	Epidemiologische Verteilung der Resistenzen	78
4.2.1.1	<i>S. aureus</i>	79
4.2.1.2	<i>S. pneumoniae</i>	83
4.2.2	Epidemiologische Verteilung der Makrolidresistenzgene	85
4.2.2.1	<i>S. aureus</i>	86
4.2.2.2	<i>S. pneumoniae</i>	89
4.2.3	Strukturelle Veränderungen in der Regulatorregion von <i>ermA</i>	91

4.2.4	Charakterisierung von in vitro erzeugten Ketolid-resistenten Mutanten	94
4.3	Desinfektionsmittel	101
5.	Diskussion und Ausblick	104
5.1	Fluorochinolone und BMS 294756	105
5.1.1	Epidemiologische Verteilung der Resistenzen	105
5.1.1.1	<i>S. aureus</i>	105
5.1.1.2	<i>S. pneumoniae</i>	107
5.1.2	Epidemiologie der Resistenzmutationen	107
5.1.2.1	<i>S. aureus</i>	107
5.1.2.2	<i>S. pneumoniae</i>	109
5.1.3	BMS 294756	110
5.2	Makrolide	111
5.2.1	Epidemiologische Verteilung der Resistenzen	112
5.2.1.1	<i>S. aureus</i>	112
5.2.1.2	<i>S. pneumoniae</i>	114
5.2.2	Epidemiologische Verteilung der Resistenzgene	114
5.2.2.1	<i>S. aureus</i>	115
5.2.2.2	<i>S. pneumoniae</i>	116
5.2.3	Strukturelle Veränderungen in der Regulatorregion von <i>ermA</i>	117
5.2.4	Molekulare Charakterisierung von in vitro erzeugten ketolidresistenten Mutanten	120
5.3	Desinfektionsmittel	126
5.4	Ausblick	127
6.	Zusammenfassung	130
7.	Literatur	131

Abkürzungen

A	Adenin
ABT	Abbot 773
ATP	Adenosintriphosphat
Azi	Azithromycin
BMFZ	Biologisch-medizinisches Forschungszentrum
BMS	Bristol-Meyer-Sqibb 284756
C	Cytosin
c	Konzentration
Cipro	Ciprofloxacin
Clari	Clarithromycin
Clina	Clinafloxacin
Clinda	Clindamycin
d	Schichtdicke
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Dinucleotid-Triphosphate
E	Extinktion
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Ery	Erythromycin
G	Guanin
Gati	Gatifloxacin
Gemi	Gemifloxacin
Grepa	Grepafloxacin
I	Ausgangslichtstärke
I_0	Eingangslichtstärke
IgG	Immunoglobulin
IR	inverted repeat
IS	inserting sequence
M	Makrolide
MFS	Major Facilitator Superfamily
MHK	minimale Hemmkonzentration

MIC	minimal inhibitory concentration
min	Minuten
ML	Makrolide, Linkosamide
MLS	Makrolide, Linkosamide, Streptogramine
MLS _B	Makrolide, Linkosamide, Streptogramine
Moxi	Moxifloxacin
mRNA	Messenger-RNA
MRSA	Methicillin-resistenter <i>S. aureus</i>
MSSA	Methicillin-sensibler <i>S. aureus</i>
ORF	open reading frame
PBP	Penicillin-binding Protein
PCR	Polymerase chain reaction
ps	Plasmide
QRDR	Quinolone-resistance-determining Region
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
sec	Sekunden
Sita	Sitafloxacin
Spar	Sparfloxacin
T	Thymin
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trova	Trovafloxacin
tRNA	Transfer-RNA
Ts	Transposon
TSST1	Toxic-Shock-Syndrom Toxin1
U	Uracil
V	Volt
Visa	Vancomycin-intermediär-resistenter <i>S. aureus</i>

Drei- und Einbuchstabencodes für Aminosäuren

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

1. Einleitung

Die therapeutische Behandlung von Infektionskrankheiten, die durch Bakterien ausgelöst werden, wird in zunehmendem Maße durch Antibiotikaresistenzen erschwert. Für den Behandelnden ist es daher wichtig zu wissen, welche Antibiotika noch bedenkenlos einzusetzen sind. In der vorliegenden Arbeit werden die Resistenzeigenschaften für einige wichtige antibakterielle Substanzen, namentlich Chinolone und Makrolide, sowie Desinfektionsmittel, von zwei verbreiteten Erregern, *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pneumoniae*, näher untersucht.

1.1 Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus ist einer der wichtigsten und häufigsten Erreger bakterieller Infektionen. Besonders immungeschwächten Patienten kann er gefährlich werden. Besorgniserregend ist dabei die in den letzten Jahren deutlich zunehmende Resistenzrate gegenüber Methicillin und anderen gängigen Antibiotika.

1.1.1 Klinische Relevanz

S. aureus gehört zur Gattung der Staphylococci innerhalb der Familie der *Micrococceae*. Staphylococci sind fakultativ anaerob. *S. aureus* ist in der Lage, Katalase und Koagulase zu bilden und β -Hämolyse zu verursachen. Zusammen mit *Escherichia coli* gehört *S. aureus* zu den häufigsten Erregern bakterieller Erkrankungen beim Menschen (Archer *et al.*, 1998). Besondere Bedeutung erlangt er als Erreger nosokomialer, das heißt im Klinikum erworbener Infektionen. Bestimmte Stämme können im Krankenhaus epidemisch auftreten. Die Virulenz und Epidemiefähigkeit ist dabei je nach Stamm unterschiedlich. *S. aureus* kann invasive Infektionen wie Furunkel und Karbunkel, aber auch andere Wundinfekte, Sinusitis, Otitis media und Mastitis puerperalis verursachen (Sheagren, 1985; Jain *et al.*, 2001), aber auch Toxikosen, hauptsächlich

Lebensmittelvergiftungen durch Enterotoxinproduktion (Dinges *et al.*, 2000), und Mischformen wie die Dermatitis exfoliativa, der Pemphigus neonatorum, die bullöse Impetigo und das Toxic-Schock-Syndrom (Dinges *et al.*, 2000; McCormick *et al.*, 2001).

Von besonderer Bedeutung unter den *S. aureus*-Stämmen, die in Krankenhäusern auftreten, sind aufgrund der mit ihnen verbundenen therapeutischen Probleme die Methicillin-resistenten *S. aureus*-Stämme (MRSA) (Archer *et al.*, 1998; Schmitz, 1998). Methicillin ist ein semisynthetisches, Penicillinase-festes β -Laktam-Antibiotikum. Besonders problematisch ist, dass neben der Methicillinresistenz zahlreiche Multiresistenzen auftreten (Schmitz *et al.*, 1997). Bei den MRSA-Isolaten treten nicht nur Resistenzen gegen alle Antibiotika mit β -Laktam-Struktur wie Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme und Monobactame auf, sondern auch gegen sehr viele Antibiotika ohne β -Laktam-Struktur. Hier sind vor allem die Makrolide, die Lincosamide und die Gyrasehemmer, zu denen die Fluorochinolone gehören, zu nennen (Archer *et al.*, 1998; Schmitz *et al.*, 1998). Häufig besteht nur noch eine Sensibilität gegen die beiden Glycopeptide Teicoplanin und Vancomycin. Es droht allerdings auch schon hier die Gefahr einer Resistenzentwicklung (Mulligan *et al.*, 1993). MRSA sind bedeutsame Erreger nosokomialer Infektionen (Archer *et al.*, 1998). Dabei erhöht der intensive Antibiotikaeinsatz im Krankenhaus, insbesondere mit Breitbandantibiotika, das Risiko einer MRSA-Infektion, da ein künstlicher Selektionsvorteil für resistenter Keime geschaffen wird. Besonders betroffen von solchen nosokomialen MRSA-Infektionen sind die Großkliniken, wo sie auch eine wesentliche Ursache für Mortalität darstellen (Emori *et al.*, 1993; Martone *et al.*, 1992).

Der Resistenzmechanismus, der bei Methicillin wirksam ist, ist die Synthese eines neuen, zusätzlichen penicillinbindenden Proteins, des sogenannte PBP2a. Die PBP sind membrangebundene Enzyme, die an der Bakterienzellwandsynthese beteiligt sind. Üblicherweise binden alle β -Laktam-Antibiotika kovalent an die PBP. Dabei wird die Zellwandsynthese unterbrochen und das Zellwachstum inhibiert. MRSA besitzen neben den üblichen PBP 1-4 das zusätzliche PBP2a. Das PBP2a mit einer wesentlich geringeren Affinität zu den β -Laktam-Antibiotika. So entsteht ein

alternativer Stoffwechselweg zur Bildung einer intakten Zellwand. Auf diese Weise sind MRSA gegen alle Antibiotika mit β -Laktam-Struktur resistent (Bradley *et al.*, 1992; Schmitz, 1996). Das Protein PBP2a wird durch das *mecA*-Gen kodiert, dem dadurch eine zentrale Bedeutung für die Ausbildung der Methicillinresistenz zukommt. MRSA-Isolate verfügen in der Regel über das *mecA*-Gen und sein Genprodukt PBP2a (DeLencastre *et al.*, 1991; DeLencastre *et al.*, 1994).

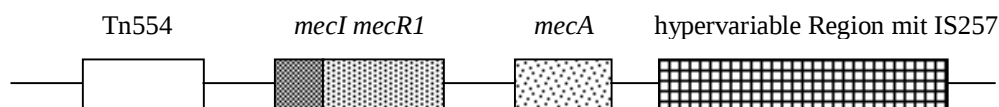
Sogenannte Low-level-resistente MRSA verfügen nicht über das *mecA*-Gen und damit auch nicht über PBP2a. Eine solche Resistenz gegenüber Methicillin in *mecA*-negativen Stämmen kann durch eine gesteigerte β -Lactamase-Produktion, die Bildung eines normalen PBP mit herabgesetzter Bindungskapazität, die Bildung einer neu beschriebenen Methicillinase, sowie durch einige noch unbekannte Faktoren herbeigeführt werden. Die klinische Bedeutung der low-level-Resistenz ist bis jetzt allerdings gering (Schmitz *et al.*, 1996).

1.1.1.1 Transfer von Resistenzgenen in *S. aureus*

Wie schon beschrieben, geht mit der Methicillin-Resistenz häufig auch eine Multiresistenz gegen andere Antibiotikaklassen und Antibiotika einher. Da jeweils andere Mechanismen (und daher andere Gene) beteiligt sind, ist anzunehmen, dass die Akkumulation von mehreren Resistenzgenen in einem Stamm das Resultat einer Kombination aus Zell-zu-Zell-Transfer, spontaner Mutation und Selektion ist (Lyon *et al.*, 1987). Selektion findet vor allem in Krankenhäusern statt, wo der Antibiotikagebrauch hoch ist. Eine wichtige Rolle spielen multiresistente koagulasenegative Staphylococci, die die Haut kolonisieren und sensible Stämme im Krankenhaus verdrängen (Archer *et al.*, 1983). Diese multiresistenten Keime stellen ein großes Reservoir an Resistenzgenen bereit, die unter Staphylococci aller Spezies verbreitet werden können (Archer, 1988). Dabei werden durch Konjugation Plasmide von Zelle zu Zelle übertragen. Auf diesen Plasmiden lokalisiert sind verschiedene Transposons, die unterschiedliche Resistenzgene tragen können. Ein Beispiel hierfür ist Transposon Tn554. Tn554 liegt auf dem gleichen genetischen Element wie *mecA*, der *mec*-Determinante. Hierbei handelt es sich um ein großes, heterologes, chromosomales Insert (Beck *et*

al., 1986), das neben dem Tn554 und dem *mecA*-Gen in der sogenannten Hypervariablen Region die Insertionsstelle IS257 trägt, die als Integrationsstelle für weitere Resistenzdeterminanten fungiert (Gillespie *et al.*, 1987). Tn5543 trägt Gene zur Ausbildung einer Erythromycin-Resistenz (*erm(A)*) und einer Spectinomycin-Resistenz (*spc*) Abbildung 1 zeigt eine schematische Darstellung der *mec*-Determinante und des Transposons Tn554.

mec-Determinante:



Tn554:

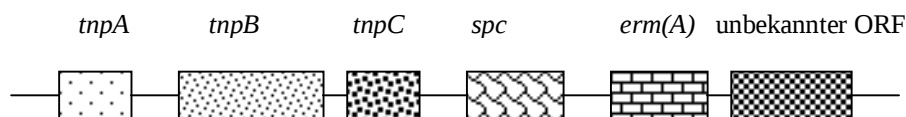


Abbildung 1. Schematische Darstellung der *mec*-Determinante und von Tn554. Die Gene haben folgende Funktionen: *mecI-mecR1*: Regulationselemente der Methicillin-Resistenz; *mecA*: kodiert für Pbp2a; *tnpA*, *tnpB*, *tnpC*: nötig zur Transposition, *erm(A)*: MLS-Resistenz, *spc*: Spectinomycin-Resistenz

Weitere wichtige Resistenzdeterminanten sind die Transposons Tn4001 (Resistenzgene gegen Gentamycin, Tobramycin und Kanamycin), Tn4002 (Resistenzgen gegen Penicillin) und Tn4003 (Resistenzgen gegen Trimethoprim), die alle drei zusammen mit Desinfektionsmittelgenen wie *qacA* auf Plasmiden der pSK1-Familie gefunden werden können (Townsend *et al.*, 1987), sowie konjugative Plasmide, die generell Resistenzgene gegen Gentamycin, Tobramycin und Kanamycin tragen und zusätzlich Resistenzgene gegen weitere Aminoglycoside, Trimethoprim, Penicillin und einige Desinfektionsmittel tragen können (Archer *et al.*, 1986; Goering *et al.*, 1983). Viele der Resistenzdeterminanten auf diesen Plasmiden werden von Kopien der Insertionssequenz IS257 flankiert.

1.1.2 Pathogenitätsfaktoren

S. aureus ist in der Lage, eine Vielzahl von Pathogenitätsfaktoren zu bilden. Dazu gehören:

*Plasmakoagulase

Die Plasmakoagulase ist ein extrazelluläres Enzym mit Thrombinfunktion, das heißt, es wandelt Fibrinogen in Fibrin um. Dies geschieht dadurch, dass das Enzym an das humane Prothrombin im Plasma bindet. Die 8 existierenden Serovarietäten werden durch verschiedene Allele des Gens *coa* kodiert. Auch der „Clumping factor“ bindet an Fibrinogen und wandelt es in Fibrin um. Jedoch handelt es sich hier um eine zellwandgebundene Koagulase. Beide Proteine sind wesentlich an der Bildung von Furunkeln beteiligt (Foster *et al.*, 1988).

*Protein A

Protein A bindet an den F_C-Teil von Immunoglobulin G (IgG). Es wird angenommen, dass durch diese Bindung an das Immunoglobulin die Bindung an opsonisierende Antikörper verhindert wird und die Phagozytose so erschwert wird. Die Bindung an IgG erfolgt am aminoterminalen Teil des Proteins, wohingegen der carboxyterminale Bereich für die Bindung an die Zellwand des Erregers verantwortlich ist (Anthony *et al.*, 1988).

* Kapselpolysaccharide

Besonders virulente *S. aureus*-Stämme sind in der Lage, Kapselpolysaccharide zu bilden. Es treten elf verschiedene Kapselpolysaccharide auf. Kapseln erschweren die Phagozytose (Anthony *et al.*, 1988).

* Superantigene

Bei Superantigenen handelt es sich um Produkte von Bakterien und Viren, die in Verbindung mit MHC-Klasse-II-Molekülen in der Lage sind, viele verschiedene CD4⁺-T-Zellen sehr effizient zu stimulieren, häufig über die unspezifische Bindung an konstante Teile der V α - und V β -Ketten der T-Zellen. Die stimulierten T-Zellen produzieren überschüssige Mengen an Zytokinen, wodurch es letztendlich zur Immunsuppression kommt. Bei *S. aureus* kommen als Superantigene die Enterotoxine A-E, das TSST 1 und das Exfoliativtoxin vor

(Dinges *et al.*, 2000; McCormick *et al.*, 2001). Die fünf serologisch unterscheidbaren Enterotoxine sind die Auslöser einer Staphylococcen-Lebensmittelvergiftung. Das Exfoliativtoxin sorgt für eine Epidermolyse (Dinges *et al.*, 2000). Das TSST 1 ist für das Toxic-Schock-Syndrom verantwortlich, indem es die Synthese von Interleukin 1, dem Tumor-Nekrose-Faktor β und Interferon γ anregt (Betley *et al.*, 1992). Die Enterotoxine und TSST können in einem Stamm alleine oder kombiniert auftreten. Manche Kombinationen, wie TSST 1 und Enterotoxin C, kommen häufiger vor (McCormick *et al.*, 2001; Dinges *et al.*, 2000; Betley *et al.*, 1992).

* Hämolsine

S. aureus bildet vier verschiedene Hämolsine, die Toxine α , β , γ und δ , wobei aber nur das erste und das letzte wichtige Pathogenitätsfaktoren sind (Dinges *et al.*, 2000). Das α -Toxin ist ein hämolytisches, zytotoxisches Enzym, das von den meisten Stämmen synthetisiert wird. Es ist in der Lage, sowohl humane Erythrozyten als auch Endothelzellen, Liposomen, Monozyten und Kreatinozellen zu lysieren. (Dinges *et al.*, 2000; Bhakdi *et al.*, 1991). Das δ -Toxin ist in der Lage, verschiedene Gewebszellen und intrazelluläre Organellen unspezifisch zu lysieren. Es zeigt nur eine geringe Affinität zu humanen Erythrozyten (Dinges *et al.*, 2000; Schmitz *et al.*, 1997).

* Leukocidin

Das Leukocidin degranuliert Mikrophagen und Makrophagen (Dinges *et al.*, 2000).

1.2 *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae ist einer der häufigsten Krankheitserreger beim Menschen (Holm, 1982). In den letzten Jahrzehnten hat die Resistenz gegenüber Penicillin G sowie anderen Antibiotika weltweit deutlich zugenommen (Tomasz, 1997). Zusätzlich zum vermehrten Auftreten einer Resistenz gegen β -Laktam-Antibiotika werden zunehmend häufig Isolate mit einer Resistenz gegenüber Makroliden und Chinolonen, entweder einzeln oder in Kombination, beobachtet, wobei die zugrundeliegenden genetischen Resistenzmechanismen in den letzten Jahren weitgehend aufgeklärt wurden.

1.2.1 Klinische Relevanz

S. pneumoniae (oder Pneumococcen) gehört zur Gattung der Streptococcen. Pneumococcen sind fakultativ anaerob. Die meisten Stämme tragen eine Kapsel, weshalb sie als S-Form (für smooth) bezeichnet werden. Von den Kapseln sind mehr als 80 Serotypen bekannt. (Garcia *et al.*, 1997). Unbekapselte Stämme werden als R-Form (für rough) bezeichnet. R-Formen sind nicht virulent (Austrian 1981). Besonders durch eine Erkrankung mit Pneumococcen gefährdet sind Personen mit einer Immunsuppression und ältere Menschen. Eine aktive Schutzimpfung mit den aufgereinigten Kapselpolysacchariden ist möglich (Obaro, 2002; Jedrzejak, 2001). Pneumococcen sind hauptsächlich für Entzündungskrankheiten verantwortlich. An erster Stelle steht die Pneumonie, die als Lobärpneumonie und als Bronchopneumonie auftreten kann (McCullers *et al.*, 2001). Des Weiteren sind Pneumococcen die häufigsten Erreger der eitrigen Meningitis, die bei Kindern als Komplikation einer Otitis media auftritt (Faden, 2001). Weitere Erkrankungen sind Lungenabszesse, Pleura-Empyem, Perikarditis, Endokarditis und Sepsis. Im Rahmen einer direkten Ausbreitung vom Nasopharynx aus können eine Otitis media, eine Sinusitis oder eine Mastoiditis entstehen (Jain *et al.*, 2001; Faden, 2001). Pneumococcen werden häufig als Erreger von Konjunktivitis bei Neugeborenen und Kleinkindern gefunden. Diese Erkrankung kann bei schwerem Verlauf zur Erblindung führen (Austrian, 1981).

Ein zunehmendes Problem ist die Penicillin-Resistenz bei Pneumococcen. Die Resistenz gegen β -Laktamantibiotika wird bei *S. pneumoniae* durch veränderte Penicillin-Binde-Proteine (PBP) verursacht (Hagenbeck, 1998). Diese Enzyme sind essentielle, membrangebundene Enzyme, die an späteren Schritten der Mureinbiosynthese beteiligt sind. PBPs sind Multidomänenproteine, die neben einer N- und C-terminalen Domäne auch eine „Penicillinbindungsdomäne“ enthalten. Auf ihr lassen sich drei Peptidmotive nachweisen, die auch in β -Lactamasen der Klasse A und C vorkommen: die Ser-XxxXxx-Lys-Box mit dem aktiven Serin; ein Ser-Xxx-Asn-Motiv und eine Lys(Ser/Thr)Gly-Sequenz (Hagenbeck, 1998). Diese Proteine werden als Penicilloyl-Serin-Transferasen

zusammengefasst. Je nach Antibiotikum sind die zur Inhibierung nötigen Konzentrationen verschieden. Niedrige bis intermediäre Resistenz gegen Cefotaxim und Oxacillin werden durch Veränderungen in PBP2x, gegen Piperacillin durch PBP2b vermittelt (Dowson *et al.*, 1994; Grebe *et al.*, 1996). Hohe Resistenzen, wie sie in klinischen Isolaten beobachtet werden, sind das Resultat von sehr komplexen Veränderungen, die nicht nur ein, sondern mehrere PBP betreffen (Hagenbeck, 1998). Bekanntermaßen zeigt sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Resistenz gegenüber Penicillin und einer Resistenz gegenüber Makroliden, Clindamycin, Tetracyclin, Chloramphenicol und Cotrimoxazol (Tomasz, 1997). Eine wichtige Rolle beim Übertragen von Resistenzdeterminanten spielt bei Streptococcen die Transformation. Dabei wird freie, lösliche DNA aus dem Spenderbakterium freigesetzt und von Empfängerbakterien aufgenommen.

1.2.2 Pathogenitätsfaktoren

Über die Pathogenitätsfaktoren von Pneumococcen ist noch nicht soviel bekannt wie bei Staphylococcen (Mitchell, 2000). Einige wichtige Faktoren sind jedoch:

***Pneumolysin**

Dieses intrazelluläre Hämolysin wird bei der Autolyse der Zellen frei. Es wirkt als thiol-aktiviertes Zytolysin, indem es sich an Cholesterol von Zellmembranen bindet, sich in diese inseriert und durch Oligomerisierung von 20-80 Molekülen eine transmembranöse Pore bildet, was zum Zelltod führt (Jedrzejak, 2001). In sublytischen Konzentrationen hemmt Pneumolysin die Funktion von Phagozyten und Lymphozyten. Darüber hinaus aktiviert Pneumolysin das Komplement, indem es sich an die Fc-Region von IgG bindet; aus Monozyten kann es IL-1 β und TNF- α freisetzen (Watson *et al.*, 1995). Pneumolysin ist auch in der Lage, zilienträgende Epithelzellen zu zerstören und dadurch die Infektionsschranke im oberen Respirationstrakt wirkungslos zu machen (Watson *et al.*, 1995; Mitchell, 2000).

*psaA

Das Protein psaA (und weitere, bisher nur unzureichend beschriebene Oberflächenmoleküle) vermittelt die Bindung der Bakterienzelle an Glykokonjugatrezeptoren auf Epithelzellen (Jedrzejewski, 2001; Watson *et al.*, 1995).

*C-Substanz

In der Zellwand verankerte Teichonsäuren stellen die C-Substanz, ein Antigen, dar. Im Serum von Patienten mit akuten Entzündungen tritt ein β -Globulin auf, das die C-Substanz der Pneumococci ausfällt. Dieses β -Globulin wird als C-reaktives Protein bezeichnet. Bildungsort ist die Leber, wo es nach Stimulation durch Interleukin-1 gebildet wird (Mitchell, 2000).

*Neuraminidasen

Auch über diese Proteine ist nur wenig bekannt. Sie können durch Sialinsäureabspaltung Rezeptoren freilegen (Jedrzejewski, 2001).

*Kapselpolysaccharide

Die Kapsel wirkt phagozytosehemmend. Dies wird durch die Maskierung gebundener Komplementkomponenten erreicht, die dadurch nicht zur Opsonisierung führen – sie werden von den entsprechenden Rezeptoren auf Phagozyten nicht mehr erkannt (Garcia *et al.*, 1997; Watson *et al.*, 1995). Schwere Pneumococcenerkrankungen werden durch Kapseltypen ausgelöst, die kein Komplement aktivieren. Dadurch entgehen sie der komplementvermittelten Phagozytose. Dies ist besonders nachteilig in der Frühphase der Infektion, bevor sich Antikörper bilden (Tuomola, 1999).

*IgA1-Protease

IgA1-Protease kann die Etablierung auf der Schleimhaut durch Abbau von IgA-Antikörpern unterstützen (Watson *et al.*, 1995).

1.3 Fluorochinolone und das Disfluorochinolon BMS 294756

In der vorliegenden Arbeit werden aus der Antibiotikaklasse der Chinolone die moderneren Substanzen, namentlich die Fluorochinolone und das Disfluorochinolon BMS 294756, behandelt.

1.3.1 Fluorochinolone

Anfang der sechziger Jahre wurde eine antibakteriell wirksame Substanzklasse entdeckt: Die Chinoloncarbonsäuren. Dazu zählten Wirkstoffe wie die Nalidixinsäure und die Chinolone der ersten Generation wie Oxolinsäure. Diese Antibiotika wiesen ein breites Wirkspektrum im gram-negativen Bereich auf, jedoch war die orale Anwendung problematisch. Die in den darauffolgenden Jahren entwickelten Derivate erlangten nur wenig Bedeutung, da sie über ein zu schmales Wirkungsspektrum oder über ungünstige pharmakokinetische Eigenschaften verfügten. Einzig die Pipemidsäure wird heute noch bei Harnwegsinfekten angewendet (Heisig, 1997). Den entscheidenden Fortschritt brachte 1982 die Einführung eines Fluor-Liganden am C6-Atom. Dadurch entstanden die modernen Fluorochinolone. Ausgehend von dem 4-Chinolonringsystem weisen die modernen Fluorochinolone folgende Strukturmerkmale auf:

- Eine Carboxylgruppe an Position 3
- Ein Fluorligand an Position 6
- Ein Piperazinring an Position 7

Die Substituenten an der 1-Nitrogen-position der Chinolonringe und an der para-Position des Piperazinringes variieren zwischen den einzelnen Antibiotika (Wolfson *et al.*, 1985).

Abbildung 2 zeigt die Strukturen einiger wichtiger Fluorochinolone.

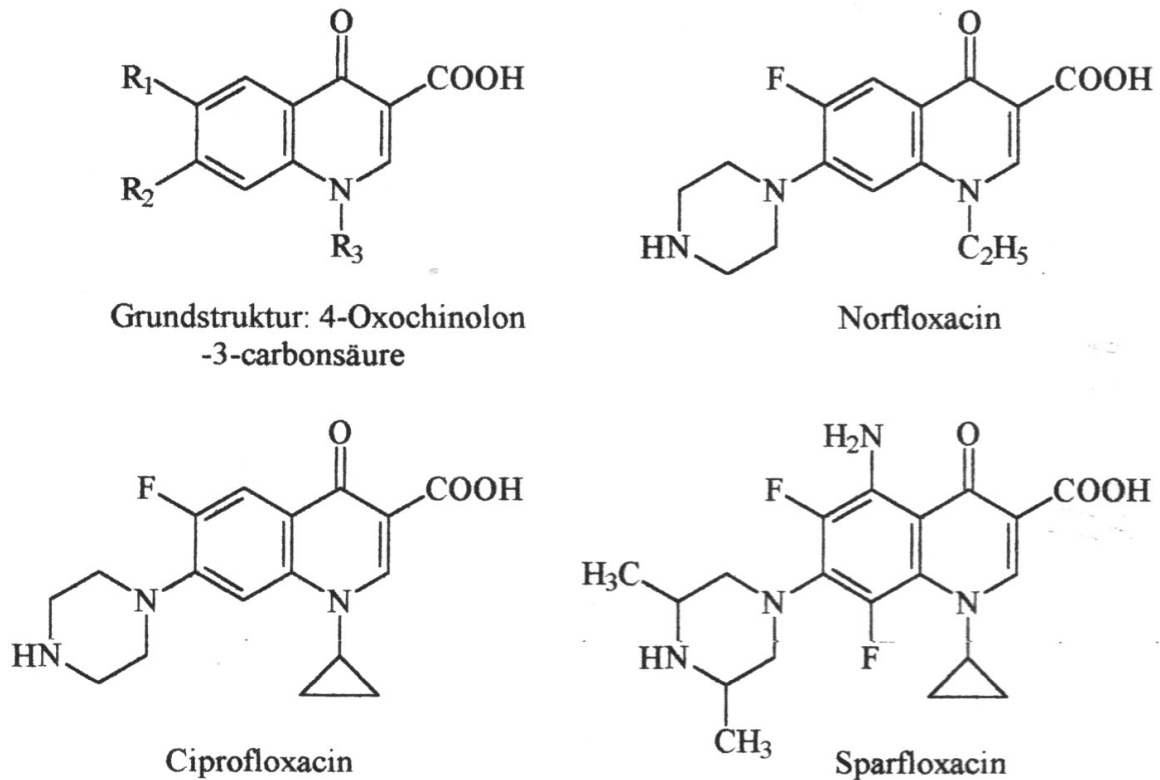


Abbildung 2. Strukturen einiger wichtiger Fluorochinolone. Links oben: Struktur des Grundgerüsts

Das Wirkungsspektrum der Fluorochinolone umfasst viele Vertreter der Enterobacteriaceae sowie gram-negative Kokken wie *Neisseria gonorrhoeae*.

Die Aktivität ist bei gram-positiven Erregern generell etwas schwächer, aber immer noch ausreichend, so dass Fluorochinolone auch bei der Bekämpfung von Infektionen mit gram-positiven Kokken Anwendung finden (Jorgensen *et al.*, 1999; Heisig, 1997). Die neueste Entwicklung stellt die Substanz BMS-284756 dar, die über keinen Fluorliganden am C6-Atom mehr verfügt.

1.3.2 Wirkungsweise

Die Angriffsziele der Chinolone sind zwei für die Bakterienzelle essentielle Enzyme, die DNA-Gyrase und die DNA-Topoisomerase IV. Da beide Enzyme an der DNA- und RNA-Synthese beteiligt sind, beeinflussen die Chinolone die Zellteilung und das Zellwachstum. Beide Enzyme gehören zur Klasse der Typ-II-

Topoisomerasen (Chen *et al.*, 1996; Drlica *et al.*, 1997; Heisig, 1994; Khodursky *et al.*, 1995).

1.3.2.1 DNA-Gyrase

Die wichtigste Aufgabe der DNA-Gyrase ist es, die Überspiralisierung der DNA aufrecht zu erhalten. Die Gyrase führt negative Spiralwindungen in die DNA ein, indem sie mit dem carboxyterminalen Ende der GyrA-Untereinheit an die DNA bindet. Die Gyrase bindet *als* Tetramer aus je zwei A- und B-Untereinheiten (Chen *et al.*, 1996). Dabei wird die DNA positiv überspiralisiert. Dann wird ein DNA-Abschnitt mittels Strangbruch und –Wiedervereinigung durch einen anderen hindurchgeführt. So entsteht eine negativ ausgerichtete Überspiralisierung. Dieser Vorgang ist ATP-abhängig; ATP bindet dabei an die GyrB-Untereinheit. Außerdem ist die Gyrase in der Lage, in einem ATP-unabhängigen Prozess die Überspiralisierung wieder aufzuheben. Dadurch wird die vorhandene ATP-Menge zum Schlüsselfaktor für das Verhältnis an Überspiralisierung und Entspannung. Da die ATP-Produktion von extrazellulären Faktoren abhängt, reagiert die Gyrase in ihrer Funktion auf Umwelteinflüsse wie Salzkonzentration und den Sauerstoffpartialdruck (Drlica *et al.*, 1997). Auch die Temperatur und der pH-Wert beeinflussen den Grad der Überspiralisierung, aber es ist noch nicht geklärt, ob dies ATP-abhängig geschieht. Des weiteren kann die Überspiralisierung durch Gyraseinhibitoren beeinflusst werden, besonders bei Mangel an Topoisomerase I. Dieses Enzym verhindert die Anhäufung von zu vielen Überwindungen. Nimmt der Grad der Überspiralisierung ab, steigert sich die *gyr*-Expression (Chen *et al.*, 1996; Drlica *et al.*, 1997). Die Gyrase hat weiterhin die Aufgabe, Knoten in der DNA zu entfernen, und sie spielt eine Rolle bei der Faltung der DNA-Stränge. Die zwei Untereinheiten der Gyrase werden durch die Gene *gyrA* und *gyrB* kodiert. (Gellert *et al.*, 1976, Pan *et al.*, 1998; Zechiederich *et al.*, 1997).

1.3.2.2 Topoisomerase IV

Die Hauptaufgabe der Topoisomerase IV besteht in der Decatinierung, also in der Trennung der Tochterchromosomen nach der Replikation. Wie die Gyrase ist auch die Topoisomerase IV ein Tetramer aus je zwei gleichen Untereinheiten, codiert durch die Gene *parC* und *parE* (bzw. *grlA* und *grlB* in *Staphylococcus aureus*) (Gellert *et al.*, 1976; Chen *et al.*, 1996; Drlica *et al.*, 1997). Neben der Trennung der Tochterchromosomen wird vermutet, dass die Topoisomerase IV ähnlich wie die Topoisomerase II in eukaryontischen Zellen DNA-crossovers detektiert und entfernt. Weiterhin zeigt die Topoisomerase IV auch eine Überspiralisierung-entspannende Aktivität. Dadurch kann sie bei einem Defekt die Aufgaben der Topoisomerase I übernehmen (Gellert *et al.*, 1976, Pan *et al.*, 1998; Zechiedrich *et al.*, 1997).

1.3.2.3 Wirkung der Chinolone

Chinolone hemmen die DNA-Replikation und -Transkription, indem sie mit hoher Affinität an den Enzym-DNA-Komplex binden und so das Wiederverschließen von Doppelstrangbrüchen, die die Enzyme eingeführt haben, verhindern. Im Laufe des Replikationsvorganges treffen solche Komplexe auf Replikationsgabeln, woraufhin es zur irreversiblen Fixierung dieser Komplexe kommt (Hiasa *et al.*, 1996). Abbildung 3 zeigt schematisch einen Gyrase-Chinolone-DNA-Komplex.

Mechanismus und beruht auf Mutationen in den Genen der Gyrase und der Topoisomerase IV. Als besonders wichtig hat sich dabei die sogenannte Quinolone Resistance Determining Region (QRDR) in *gyrA* und *parC/grlA* erwiesen (Ferrero *et al.*, 1995). Diese QRDR bei den Typ-II-Topoisomerasen liegt bei allen bisher untersuchten Bakterienspezies hochkonserviert vor. Häufig vorkommende Resistenzmutationen liegen an den gleichen Positionen, den „hot spots“ (Heisig, 1997; Schmitz, 1998). Die unterschiedliche numerische Bezeichnung der Mutationen bei den verschiedenen Bakterienspezies werden durch Insertionen und Deletionen außerhalb der QRDR verursacht.

Bei *Escherichia coli* und den meisten gram-negativen Erregern sind am häufigsten Mutationen in der Gyrase-Untereinheit A zu finden, wobei vor allem die Aminosäuren 83 und 87 betroffen sind. In der Topoisomerase IV-Untereinheit ParC sind die hot spots an den Positionen 80 und 84 lokalisiert. Einzelmutationen kommen mit einer Häufigkeit von ca. 10^{-8} vor. Die resistenzvermittelnden Mutationen in den *gyrA* bzw. *parC/ grlA* Genen haben einen Aminosäureaustausch in der Nähe des aktiven Zentrums des Enzyms (Tyr122 in *E. coli*) und eine geringere Affinität zu Chinolonen zur Folge. Mutationen in *gyrB/ parE* führen meist zu einer gemäßigten Resistenzerhöhung gegenüber Chinolonen. In der Klinik sind sie nicht relevant (Heisig, 1997; Heisig, 1994; Schmitz *et al.*, 1998; Wiedemann *et al.*, 1999; Witte, 1998).

Wenn man die Mutationsfolge betrachtet, stellt man einen deutlichen Unterschied zwischen gram-negativen und gram-positiven Bakterien fest. Bei gram-negativen Bakterien ist die Affinität der Chinolone zur Gyrase höher als zur Topoisomerase IV. Die Gyrase stellt somit die erste Zielstruktur dar. Zur Resistenzvermittlung erscheint zunächst eine Einzelmutation in *gyrA*. Dadurch wird die Affinität der Gyrase zu den Chinolonen herabgesetzt, so dass jetzt die Topoisomerase zum ersten Ziel wird. Eine Einzelmutation in *gyrA* erhöht den MHK-Wert um zwei bis fünf Stufen. Damit wird der Grenzwert für die klinische Resistenz bei *Escherichia coli* für moderne Fluorochinolone noch nicht erreicht. Klinische Resistenz wird durch eine Doppelmutation in *gyrA* und eine zusätzliche Mutation in *parC* hervorgerufen; der MHK- Wert steigert sich um etwa 8 Stufen in Relation zur

MHK eines empfindlichen Wildstamms (Heisig, 1997). Die Mutation im Topoisomerase IV Gen manifestiert sich phänotypisch also nur in Kombination mit einer Doppelmutation im Gyrasegen, weil Gyrase zunächst das primäre Target darstellt. Nach Herabsetzen der Affinität durch eine Mutation wird Topoisomerase IV zum primären Target; wird die Empfindlichkeit der Topoisomerase IV durch eine Mutation in *parC* vermindert, wird die Gyrase wieder zum primären Target (Heisig, 1997; Heisig, 1994).

Bei den gram-positiven Bakterien hängt die Mutationsfolge sowohl von der Bakterienspezies, als auch vom verwendeten Chinolonantibiotikum ab. Zunächst wurde angenommen, dass Topoisomerase IV immer die primäre Zielstruktur darstellt, aber 1997 zeigten Untersuchungen von Pan und Fisher (Pan *et al.*, 1997), dass offensichtlich Sparfloxacin bei *Streptococcus pneumoniae* zunächst die Gyrase hemmt (Ferrero *et al.*, 1995; Janoir *et al.*, 1996; Munoz *et al.*, 1996; Ng *et al.*, 1996). Die Mutationsfolge für die Kombination verschiedener Chinolone und Bakterienspezies scheint unterschiedlich zu sein (Fukuda *et al.*, 1999; Varon *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu *Escherichia coli* treten klinische Resistenzen eher auf, da aufgrund der höheren natürlichen Unempfindlichkeit Mutationen im *parC*/*grrA* Gen oft schon zu MHK-Werten nahe dem klinischen Grenzwert führen (Schmitz *et al.*, 1998; Pan *et al.*, 1996). Tritt je eine Mutation in beiden Genen auf, so ist zum Beispiel für Ciprofloxacin klinische Resistenz immer erreicht. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der häufigsten Mutationen in den QRDR von *gyrA* und *grrA* bzw. *parC* bei *S. aureus* und *S. pneumoniae* sowie die daraus resultierenden MHK-Werte für Ciprofloxacin.

Tabelle 1: Übersicht über die am häufigsten vorkommenden Mutationen in der Gyrase-Untereinheit GyrA und der Topoisomerase IV-Untereinheit ParC/GrlA bei *S. aureus* und *S. pneumoniae* und korrelierende MHK-Werte für Ciprofloxacin (in mg/l)

Spezies	Mutation		MHK Ciprofloxacin
	GyrA (Gen: <i>gyrA</i>)	ParC/GrlA (Gen: <i>parC/GRLA</i>)	
<i>S. aureus</i>	-	-	0,25
	-	Ser80Phe	2-4
	-	Ser80Tyr	2
	-	Glu84Lys	2-4
	Ser84Leu	-	1
	Glu88Lys	Ser80Phe	8-16
	Ser84Leu	Ser80Tyr	16
	Ser84Leu	Ser80Phe	8-32
	Ser84Leu	Glu84Lys	8-32
	-	Ser80Phe, Glu84Lys	4
	Ser84Leu	Ser80Phe, Glu84Lys	256
	Glu88Lys	Ser80Phe, Glu84Val	64
<i>S. pneumoniae</i>	-	-	1
	Ser81Phe	-	8-16
	Ser81Tyr	-	4-8
	-	Ser79Phe	2-8
	-	Ser79Tyr	2-4
	Ser81Phe	Asp83Asn, Lys137Asn	4
	Ser81Phe	Ser79Phe	8-128
	Ser81Phe	Ser79Phe, Lys137Asn	8-16
	Ser81Tyr	Ser79Phe	32-128

Tabelle nach Fukuda *et al.* (1999), Pestova *et al.* (1996) und Schmitz *et al.* (1998).

Neben Empfindlichkeitsänderungen der Enzyme haben bei den gram-positiven Bakterien noch Effluxpumpen Bedeutung, die einen erhöhten Auswärtstransport der Chinolone bewirken, z.B. NorA bei *S. aureus* und PmrA bei *S. pneumoniae* (Kaatz *et al.*, 1993; Gill *et al.*, 1999; Zeller *et al.*, 1997). Mutationen im Bereich des Promotors führen zu einer Überexpression solcher Effluxproteine und damit zu einer verringerten Konzentration des Antibiotikums in der Zelle (Kaatz *et al.*, 1993; Schmitz *et al.*, 1998). Dabei gilt aber, dass diese Art der Resistenz aufgrund von verminderter Akkumulation des Antibiotikums zwar häufig auftritt, aber für sich

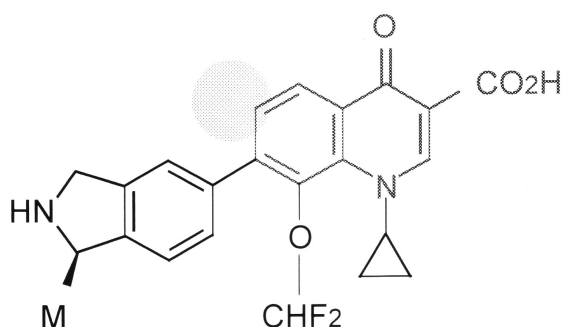
alleine meistens noch keine klinische Resistenz verursacht und nur in Kombination mit Zielstruktur-Mutationen eine Rolle spielt. Diese Efflux-Pumpen sind Multidrug-Transporter, die durch den biochemischen Protonengradienten betrieben werden (Neyfakh *et al.*, 1993). Sie transportieren zum Beispiel Fluorochinolone, Ethidiumbromid, Chloramphenicol, Tetranylphosphonium und Rhodamin G6. Die Effluxpumpen in *S. aureus* und *S. pneumoniae* gehören zur Major Facilitator Superfamily (MFS). Die MFS-Pumpen können durch Reserpin, ein pflanzliches Alkaloid, inhibiert werden (Markham *et al.*, 1996; Markham, 1999). Der Stoffeflux ist vom transmembranen Protonengradienten abhängig und kann durch Membranprotonophore gehemmt werden. Das Indolalkaloid aus *Rauwolfia serpentina* ist ein solches Protonophor. Reserpin zeigt dabei keine Wirkung auf das Zellwachstum.

1.3.4 BMS 294756

Fluorochinolonresistenz in *S. aureus* ist ein wachsendes Problem. Dadurch sind die Behandlungsmöglichkeiten mit Ciprofloxacin und anderen älteren Chinolonen bei Staphylococceninfektionen eingeschränkt. Es war also nötig, neue, wirksamere Chinolone zu entwickeln. Eines dieser neuen Chinolone ist BMS-294756 (kurz BMS), das im Gegensatz zu den bis jetzt gebräuchlichen Substanzen keinen Fluor-Liganden am C6-Atom trägt. Die Abbildung 4 zeigt die Struktur von BMS.

Abbildung 4

Struktur von BMS 294756



BMS hat ein breites antibakterielles Spektrum (Fung-Tomc *et al.*, 2000; Takahata *et al.*, 1999).

Auch bei der Behandlung von Pneumococceninfektionen wäre BMS eine Alternative. Hier wird zum größten Teil mit β -Lactam-Antibiotika therapiert. Jedoch hat sich in den letzten Jahren zunehmend eine β -Lactam-Resistenz und damit einhergehend eine Multiresistenz ausgebreitet. Auch die Zahl fluorochinolonresistenter Pneumokokken nimmt zu (Tomasz, 1997).

1.4 Makrolide, Lincosamide und Streptogramine

Die sogenannten MLS-Antibiotika sind eine weitere, häufig eingesetzte Antibiotikaklasse. MLS-Antibiotika werden gerne als Alternative zu β -Lactam-Antibiotika genutzt.

1.4.1 Wirkmechanismen der MLS-Antibiotika

Die Wirkmechanismen der MLS-Antibiotika ähneln sich und zielen auf die Proteinbiosynthese ab, indem sie an unterschiedlichen Strukturen der prokaryontischen Ribosomen binden.

1.4.1.1 Makrolide

Makrolide werden in der Humanmedizin häufig zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten eingesetzt. Makrolide sind Proteinbiosynthesehemmer und wirken hauptsächlich bei gram-positiven Bakterien wie *S. aureus* und *S. pneumoniae*, können aber auch bei einigen gram-negativen Bakterien eingesetzt werden (Retsema *et al.*, 2001). Sie bilden eine recht heterogene Gruppe und bestehen aus 12- bis 16- gliedrigen Lactonringen. An diesen Ring sind zwei Aminozucker oder ein Desoxyzucker glycosidisch gebunden (Retsema *et al.*, 2001; Douthwaite *et al.*, 2001). Die Abbildung 5 zeigt die Struktur von Erythromycin, dem wichtigsten Makrolid.

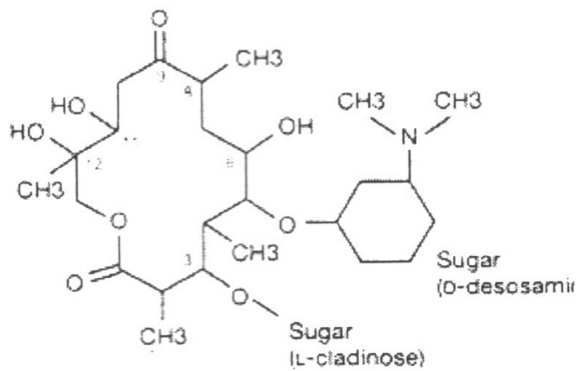


Abbildung 5. Molekularstruktur
des wichtigsten Makrolides
Erythromycin

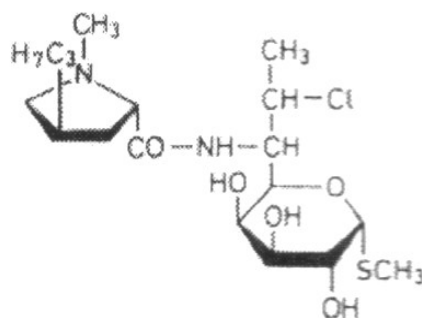
Makrolide wirken an den 50-S-Untereinheiten der bakteriellen Ribosomen, indem sie an das ribosomale Protein L15 in der Peptidyltransferaseregion binden. Damit bewirken sie eine vorzeitige Ablösung der t-RNAs während der Translokation des Ribosoms, indem die Positionierung der t-RNA beim Transfer von der Aminoacylbindungsstelle auf die Peptidylbindungsstelle sterisch behindern. Einige Makrolide wie Erythromycin behindern außerdem die richtige Zusammenlagerung der 50-S-Untereinheit der Ribosomen (Douthwaite *et al.*, 2001; Douthwaite, 2001).

1.4.1.2 Lincosamide

Zur Gruppe der Lincosamide gehören im Wesentlichen nur zwei Substanzen: Lincomycin, das aus der Aminosäure trans-1-Methyl-4-Propyl-L-Prolin und dem α -Methylthioglycosid der Aminooctose Lincosamin besteht, sowie Clindamycin, das ein 7-Chlor-7-Desoxy-Lincomycin ist (Ruiz *et al.*, 1990). Abbildung 6 zeigt die Struktur des Clindamycin.

Abbildung 6.

Clindamycin.



Lincosamide wirken ähnlich wie Makrolide. Durch eine Bindung an die

23S-rRNA der Ribosomen wird die Peptidyltransferase inhibiert. Dadurch kommt es zu einer fehlerhaften Positionierung der t-RNA an der Aminoacylbindungsstelle. Dies verhindert die Verknüpfung der Aminosäuren zu Peptiden und es kommt zu einem Elongationsabbruch (Ruiz *et al.*, 1990). Das Wirkungsspektrum der Lincosamide umfasst hauptsächlich gram-positive Bakterien, aber auch einige gram-negative Anaerobier (Paradisi *et al.*, 2001).

1.4.1.3 Streptogramine

Die Struktur und Wirkung der Streptogramine ist der der übrigen MLS-Antibiotika sehr ähnlich (Paradisi *et al.*, 2001). Zu den Streptograminen gehört das Synercid, ein Kombinationspräparat aus dem Streptogramin A Quinopristin und dem Streptogramin B Dalfopristin (Low *et al.*, 1997).

1.4.1.4 Ketolide

Ketolide sind eine neue Antibiotikaklasse. Sie basieren auf der Struktur der Makrolide, und zwar sind sie aus einem 14-gliedrigen Macrolactonring hervorgegangen (Douthwaite, 2001). Die Ketolide bestehen zur Zeit nur aus zwei Substanzen, dem Telithromycin und dem ABT-773 (Lawrence, 2001; Leclercq, 2001). Diese unterscheidet sich von den klassischen Makroliden durch zwei Schlüsselstrukturen: An der C3-Position des Lactonringes ist ein weiterer Lactonring glycosidisch mit dem Hauptring verbunden. Des weiteren befindet sich an Position 1 eine Seitenkette mit zwei weiteren Ringen (Douthwaite *et al.*, 2001; Douthwaite, 2001). Die Abbildung 7 zeigt die Struktur von Telithromycin.

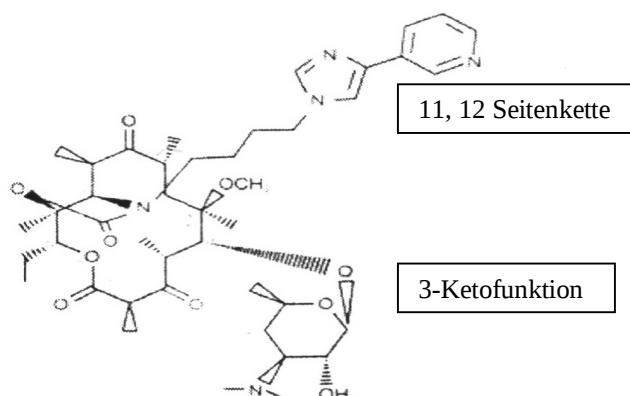


Abbildung 7.
Molekularstruktur des
Ketolides Telithromycin

Aufgrund des ähnlichen Aufbaus ist ihre Wirkungsweise analog zu der der Makrolide. Auch Telithromycin hemmt die Proteinbiosynthese und zwar indem es an die Adeninreste 2058 und 2059 in der Domäne V der 23S-rRNA bindet. Hier wird ebenfalls die Elongation der Peptidkette inhibiert (Douthwaite *et al.*, 2001). Das Einsatzgebiet der Ketolide umfasst im gram-positiven Bereich Erreger wie Staphylokokken und Streptokokken sowie einige Bacillus-Arten, im gram-negativen Bereich z.B. *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* und *Bordetella pertussis*. (Auterhoff *et al.*, 1999; Kuschinsky *et al.*, 1993)

1.4.2 Genetische Grundlagen der Resistenz gegenüber Makroliden, Lincosamiden und Streptograminen

Bei Staphylococcen und Pneumococcen sind bislang vier verschiedene Resistenzmechanismen bekannt, mit deren Hilfe sich diese Bakterien erfolgreich gegen die inhibitorischen Effekte der Makrolide, Lincosamide oder Streptogramine zur Wehr setzen. Diese Resistenzmechanismen umfassen:

- die chemische Modifikation der zellulären Angriffsstelle der Wirkstoffe,
- das Ausschleusen der Wirkstoffe aus der Bakterienzelle,
- die enzymatische Inaktivierung der Wirkstoffe sowie
- Mutationen in den ribosomalen Proteinen L4 und L22 sowie in der 23S rRNA (Depardieu *et al.*, 2001).

Jeder der drei erstgenannten Mechanismen wird dabei von mehreren unterschiedlichen Genen repräsentiert, deren Genprodukte – zum Teil auch in Abhängigkeit vom Expressionstyp – unterschiedliche Resistenzphänotypen vermitteln. Das Vorkommen der verschiedenen Resistenzgene bei den in dieser Übersicht beschriebenen grampositiven Kokken ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: MLS-Resistenzgene bei Bakterien der Gattungen *Staphylococcus* und *Streptococcus* (Roberts *et al.*, 1999)

Mechanismus	Gen	Resistenzphänotyp *	Vorkommen bei	
			<i>Streptococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>
rRNA-Methylase	<i>erm</i> (A)	M ₁₄₋₁₆ LS _B	+	+
	<i>erm</i> (B)	M ₁₄₋₁₆ LS _B	+	+
	<i>erm</i> (C)	M ₁₄₋₁₆ LS _B	+	+
	<i>erm</i> (F)	M ₁₄₋₁₆ LS _B	+	+
	<i>erm</i> (Q)	M ₁₄₋₁₆ LS _B	+	-
	<i>erm</i> (Y)	M ₁₄₋₁₆ LS _B	-	+
ATP-bindende Transporter	<i>msr</i> (A)	M ₁₄ S _B	-	+
	<i>vga</i> (A)	S _A	-	+
	<i>vga</i> (B)	S _A	-	+
„Major facilitator„	<i>mef</i> (A)	M ₁₄	+	+
Esterase	<i>ere</i> (A)	M _{14,15}	-	+
	<i>ere</i> (B)	M _{14,15}	-	+
Hydrolase	<i>vgb</i> (A)	S _B	-	+
	<i>vgb</i> (B)	S _B	-	+
Nukleotidyltransferase	<i>lnu</i> (A)	L	-	+
	<i>lnu</i> (B)	L	-	-
Acetyltransferase	<i>vat</i> (A)	S _A	-	+
	<i>vat</i> (B)	S _A	-	+
	<i>vat</i> (C)	S _A	-	+
	<i>vat</i> (D)	S _A	-	-
	<i>vat</i> (E)	S _A	-	-
Phosphorylase	<i>mph</i> (C)	M ₁₄₋₁₆	-	+

* M₁₄₋₁₆LS_B = 14-, 15-, 16-gliedrige Makrolide, Lincosamide, B-Komponenten der Streptogramine; M₁₄ = 14-gliedrige Makrolide; M₁₄₋₁₆ = 14-, 15-, 16-gliedrige Makrolide; M_{14, 15} = 14- und 15-gliedrige Makrolide; M_{14, 16} = 14- und 16-gliedrige Makrolide; L = Lincosamide; S_A = A-Komponenten der Streptogramine; S_B = B-Komponenten der Streptogramine

1.4.2.1 Modifizierung der zellulären Angriffsstelle

Dieser Resistenzmechanismus basiert auf der Wirkung einer Adenin-N⁶-Methylase, die eine oder zwei Methylgruppen auf den Adeninrest an Position 2058 in der 23S rRNA überträgt. Mit dieser Mono- oder Dimethylierung wird ein Anheften der Makrolide, aber auch der Lincosamide und B-Komponenten der Streptogramine verhindert, woraus sich der in Tabelle 1 dargestellte M₁₄₋₁₆LS_B-Resistenzphänotyp erklären lässt (Werckenthin, 1997). Bei Staphylococcen und Streptococcen sind bislang sechs verschiedene Methylasegene, *erm*(A), *erm*(B), *erm*(C), *erm*(F), *erm*(Q) und *erm*(Y), bekannt (Roberts *et al.*, 1999), von denen jedoch nur die drei erstgenannten Gene von klinischer Relevanz sind. Die verbleibenden drei *erm*-Gene, *erm*(F), *erm*(Q) und *erm*(Y), wurden bislang nur bei einzelnen Isolaten von Staphylokokken und Streptokokken identifiziert. Westh *et al.* beobachteten bei der Untersuchung makrolidresistenter Staphylokokken aus Dänemark eine zeitliche Variabilität in der Dominanz bestimmter *erm*-Gene (Westh *et al.*, 1995). So kam bei *S. aureus*-Isolaten aus den Jahren 1959 - 1971 hauptsächlich *erm*(A) vor, während sich seit Anfang der 80er Jahre bevorzugt *erm*(C) nachweisen lässt. Bei Streptococcen kommt hauptsächlich *erm*(B) vor (Nishijima *et al.*, 1999; Shortridge *et al.*, 1999).

Die *erm*-Gene der Klassen A, B und C können induziert oder konstitutiv exprimiert werden. Induzierbare *erm*(A)- und *erm*(C)-Gene besitzen eine dem Methylasegen vorgeschaltete intakte Regulatorregion, die aus zwei bzw. drei Paaren umgekehrt komplementärer Sequenzen (inverted repeat-sequences IR1 – IR6) sowie einem bzw. zwei Leserahmen für ein bzw. zwei kleine regulatorische Peptide (15 aa-Peptid und 19 aa-Peptid) besteht. Von dem *erm*-Gen und seiner Regulatorregion wird eine gemeinsame mRNA transkribiert, die aufgrund der umgekehrt komplementären Sequenzen unterschiedliche Sekundärstrukturen ausbilden kann. In Abwesenheit der induzierenden Antibiotika kommt es durch die Paarungen IR1:IR2, IR3:IR4 sowie IR5:IR6 zur Ausbildung einer „inaktiven“ Konformation, bei der die *erm*-Gen-assoziierte Ribosomenbindungsstelle und der Start des Methylasegens in der mRNA-Sekundärstruktur verborgen sind und somit eine effiziente Translation der Transkripte verhindert wird (Leclercq *et al.*,

1991). Zur induzierbaren Regulation von *erm*-Genen sind in der jüngeren Vergangenheit Übersichtsarbeiten erschienen, in denen die Ausbildung von Sekundärstrukturen und die damit verbundenen Konsequenzen für die Translation – meist am Beispiel des Gens *erm(C)* – detailliert beschreiben wurden (Weisblum *et al.*, 1995; Weisblum, 1998). Abbildung 8 zeigt den Translationsattenuator von *erm(C)* in induzierter und nicht induzierter Formation.

Abbildung 8a. Inaktive Konformation der *erm(C)* mRNA im nicht-induzierten Zustand in Abwesenheit von 14- und 15-gliedrigen Makroliden.

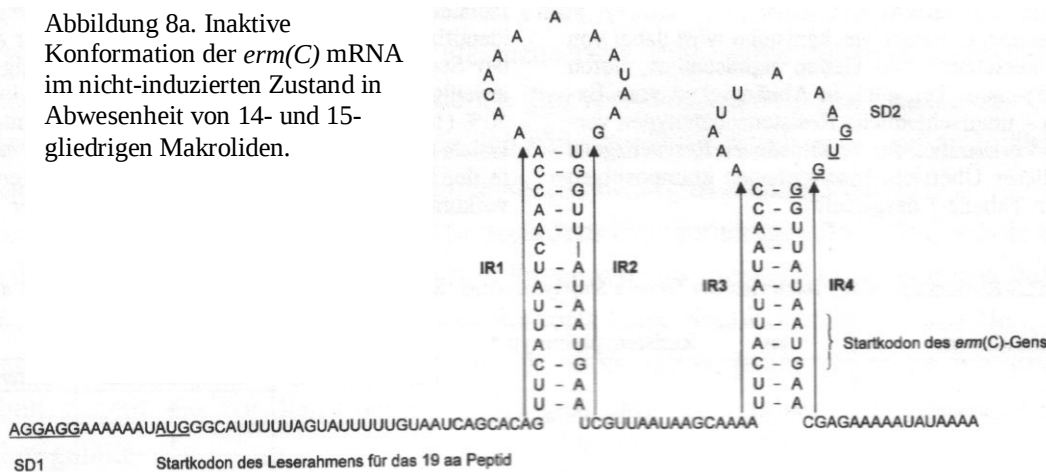
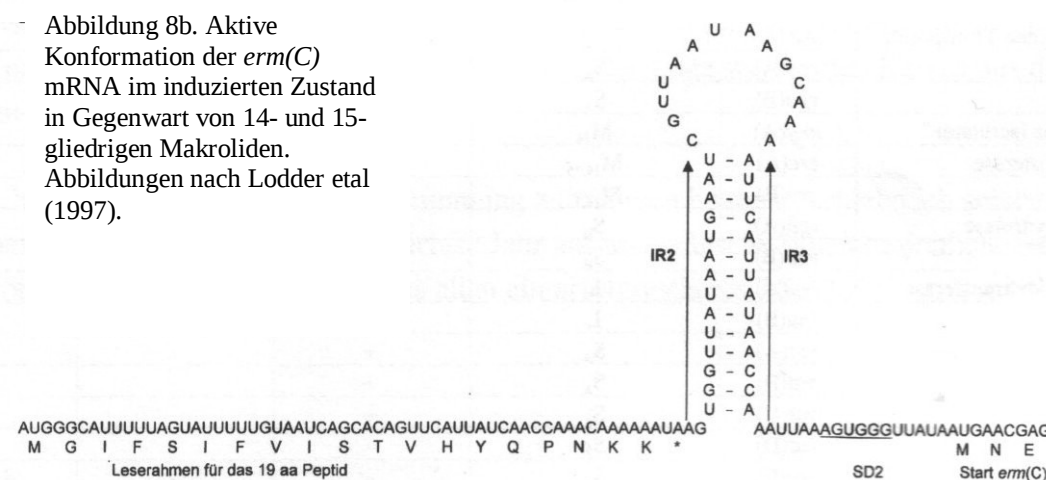


Abbildung 8b. Aktive Konformation der *erm(C)* mRNA im induzierten Zustand in Gegenwart von 14- und 15-gliedrigen Makroliden. Abbildungen nach Lodder et al (1997).



Die induzierbare Regulation des *erm(B)*-Gens lässt sich aufgrund der im Vergleich zu *erm(A)* und *erm(C)* erheblich komplizierter aufgebauten Regulatorregion nicht mit dem bekannten Attenuationsmodell erklären. Da die von den *erm*-Genen kodierten Methylasen keine bislang bekannten Funktionen im physiologischen Stoffwechsel der Bakterien besitzen, stellt die induzierbare Expression einen ökonomisch sinnvollen Mechanismus dar, welcher gewährleistet, dass das Genprodukt nur dann in entsprechenden Mengen produziert wird, wenn es auch tatsächlich benötigt wird. Lediglich 14- und 15-gliedrige Makrolide haben sich als

wirksame Induktoren für die Expression der bei Staphylococcen vorkommenden Gene *erm(A)* und *erm(C)* erwiesen, während für das bei Streptococcen häufig nachweisbare Gen *erm(B)* auch Lincosamide und Streptogramin-B-Antibiotika die Genexpression induzieren können (Leclerq *et al.*, 1991; Leclerq *et al.*, 1991; Roberts *et al.*, 1999).

a) *erm(A)*

Das *erm(A)*-Gen wurde auf dem 6,7 kb großen, nichtkonjugativen Transposon Tn554 aus *S. aureus* identifiziert (Murphy *et al.*, 1985). Da Tn554 bevorzugt an einer bestimmten Stelle, *att554*, in der chromosomalen DNA von *S. aureus* integriert, findet sich *erm(A)* bevorzugt in chromosomaler Lokalisation (Murphy *et al.*, 1985). Ist diese Integrationsstelle besetzt oder deletiert, so findet man Tn554 auch an sekundären Integrationsstellen, die mitunter auf Plasmiden lokalisiert sind. Plasmidäre Tn554-Integrate wurden kürzlich auch bei *S. intermedius*, *S. sciuri* und *S. haemolyticus* von Tauben nachgewiesen (Werckenthin *et al.*, 1997; Werckenthin *et al.*, 2000; Werckenthin *et al.*, 1997). Die Expression des *erm(A)*-Gens kann induziert mittels attenuierter Translation (Murphy *et al.*, 1985) oder konstitutiv erfolgen. Der *erm(A)*-spezifische Translationsattenuator weist drei Paare umgekehrt komplementärer Sequenzen und zwei Leserahmen für Peptide von 15 bzw. 19 Aminosäuren auf. Bei konstitutiv exprimiertem *erm(A)* bei *S. aureus*- und *S. intermedius*-Isolaten von Menschen und Tieren wurden im Translationsattenuator bislang Punktmutationen (Werckenthin *et al.*, 2000), aber auch Deletionen unterschiedlichen Ausmaßes und eine Tandemduplikation identifiziert. Das bei *Streptococcus pyogenes* (Seppälä *et al.*, 1998) und *Streptococcus pneumoniae* (Syrogiannopoulos *et al.*, 2001) nachgewiesene *erm(TR)*-Gen zählt gemäß der neuesten Nomenklatur ebenfalls zur Klasse A und besitzt eine dem *erm(A)*-Gen von Tn554 ähnliche Regulatorregion (Roberts *et al.*, 1999).

b) *erm(B)*

erm(B) wurde zuerst auf dem 5,3 kb großen, nichtkonjugativen Transposon Tn917 aus *Enterococcus faecalis* nachgewiesen (Shaw *et al.*, 1985). Ein weitgehend analoges

Transposon, Tn551, ist von *S. aureus* bekannt. Im Gegensatz zu Tn554 zeigen die *erm*(B)-tragenden Transposons keine Spezifität hinsichtlich ihrer Integrationsorte. *erm*(B) wird auch auf konjugativen Multiresistenztransposons, wie Tn1545 aus *Streptococcus pneumoniae* (Trieu-Cout *et al.*, 1990), und konjugativen Resistenzplasmiden, wie pIP501 aus *S. agalactiae*, gefunden. Als Bestandteil konjugativer Transposons und Plasmide hat *erm*(B) eine weite, über Spezies- und Genusgrenzen hinausreichende Verbreitung erfahren. Gene, deren Genprodukte in ihrer Aminosäuresequenz nur geringfügig von der *erm*(B)-kodierte Methylase von Tn917 abweichen, wurden als Integrate an unterschiedlichen Stellen in Plasmiden und in der chromosomalen DNA diverser gram-positiver und gram-negativer Bakterien nachgewiesen (Roberts *et al.*, 1999). Integrationen *erm*(B)-kodierender Transposons in kleine Plasmide wurden bislang nur selten beobachtet. Das Plasmid pSES20 aus *Staphylococcus lentus* ist das bisher einzige Beispiel für einen derartigen Integrationsprozess bei Staphylococcen (Werckenthin *et al.*, 1996). Analysen dieses Plasmids ergaben, dass pSES20 nur über den Teil eines Tn917-analogen Transposons verfügt, welcher das Resistenzgen inklusive seiner flankierenden Regionen enthält. Das pSES20-kodierte *erm*(B)-Gen wird im Vergleich zum Tn917-kodierten Gen konstitutiv exprimiert. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in der Verkürzung des regulatorischen Peptids infolge eines auf einer 4 bp großen Sequenzduplikation basierenden vorzeitigen Stopcodons (Werckenthin *et al.*, 1996). Die nach der neuesten Nomenklatur zur Klasse B gezählten *erm*-Gene sind in der älteren Literatur noch unter den Bezeichnungen *erm*, *erm*(AM), *erm*(AMR), *erm*(B), *erm*(BC), *erm*(BP), *erm*(IP), *erm*(P), *erm*(Z), *erm*(BZ1), *erm*(BZ2) und *erm*(2) zu finden (Roberts *et al.*, 1999).

c) *erm*(C)

Das *erm*(C)-Gen ist meist Bestandteil kleiner, strukturell eng verwandter Multicopy-Plasmide von 2,3 - 4,0 kb Größe, die bislang bei verschiedenen Staphylococcenarten von Menschen und Tieren nachgewiesen wurden (Lodder *et al.*, 1997; Lyon *et al.*, 1987). Das *erm*(C)-Gen des 3,7 kb großen Plasmids pE194 aus *S. aureus* gilt als Referenzgen für *erm*(C)-Gene (Horinouchi *et al.*, 1982). Die kleinen

erm(C)-tragenden Plasmide verfügen über keine zusätzlichen Resistenzgene und sind in der Regel zur Replikation in *Bacillus*-Arten in der Lage, nicht aber in *Streptococcus*. In seltenen Fällen wurden *erm(C)*-Gene auch auf größeren Plasmiden, die mitunter weitere Resistenzgene enthielten, nachgewiesen (Schwarz *et al.*, 2000). Alle bislang sequenzierten *erm(C)*-Gene sind eng verwandt. Vergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigten 4 - 16 Aminosäureaustausche im Vergleich zur pE194-kodierten ErmC-Methylase (Schwarz *et al.*, 1998). Transduktion und Mobilisierung durch konjugative Plasmide oder konjugative Transposons werden als mögliche Wege für die Verbreitung der kleinen *erm(C)*-tragenden Plasmide diskutiert. Die *erm(C)*-Gene können sowohl induzierbar mittels attenuierter Translation als auch konstitutiv exprimiert werden. Der *erm(C)*-spezifische Translationsattenuator besteht aus zwei Paaren umgekehrt komplementärer Sequenzen und einem Leserahmen für ein regulatorisches Peptid von 19 Aminosäuren (Weisblum, 1997; Weisblum, 1995; Weisblum, 1998). Bei konstitutiv exprimierten *erm(C)*-Genen wurden mannigfaltige strukturelle Veränderungen im Translationsattenuator beobachtet (Werckenthin *et al.*, 1999). Die bei epidemiologisch unverwandten *erm(C)*-Genen beobachteten, an diskreten Stellen im Translationsattenuator auftretenden Deletionen sind das Ergebnis von Rekombinationsereignissen, die unter wesentlicher Mitwirkung der Rekombinationssysteme der *Staphylococcus*-Zelle erfolgen (Werckenthin *et al.*, 1999). Die mittlerweile zur Hybridisierungsklasse C gezählten *erm*-Gene sind in Publikationen meist unter der Bezeichnung *erm(C)*, gelegentlich aber auch unter den Bezeichnungen *erm(M)* oder *erm(IM)* zu finden (Roberts *et al.*, 1999).

1.4.2.2 Ausschleusung der Wirkstoffe

Am Efflux von Makroliden und Streptograminen sind zwei Gruppen von Proteinen beteiligt, die entweder zur Gruppe der „Major facilitator“ oder zur Gruppe der „ABC-Transporter“ gezählt werden. „Major facilitator“-Proteine bestehen aus meist 12-14 transmembranalen Segmenten und besitzen keine nukleotidbindenden Domänen. Sie funktionieren meist als Antiporter; ihre Energie beziehen sie aus dem H^+ -Gradienten der Membran (Clancy *et al.*, 1996;

Tait-Kamradt *et al.*, 2000). ABC-Transporter dagegen besitzen meist zwei nukleotidbindende Domänen, an denen das als Energiequelle verwendete ATP bindet (Ross *et al.*, 1990).

a) „Major facilitator“-Gruppe

Bislang sind zwei Gene bekannt, *mef(A)* (Clancy *et al.*, 1996) und *mef(E)* (Tait-Kamradt *et al.*, 2000; Tait-Kamradt *et al.*, 1997; Nishijima *et al.*, 1999; Sutcliffe *et al.*, 1996), deren Genprodukte membranständige Proteine darstellen, die in die „Major facilitator“-Gruppe eingeordnet werden. Das Substratspektrum dieser Effluxsysteme umfasst lediglich Makrolide (M-Phänotyp) (Sutcliffe *et al.*, 1996; Widdowson *et al.*, 1998). Das Gen *mef(A)* wurde erstmals bei *Streptococcus pyogenes* und später auch bei Streptococcen der Lancefieldgruppen C und G nachgewiesen. Das *mef(E)*-Gen wurde bei *Streptococcus pneumoniae* identifiziert (Tait-Kamradt *et al.*, 1997). Da beide Gene 90%ige Übereinstimmung in ihren Nukleotidsequenzen aufwiesen, wurden sie unter der gemeinsamen Bezeichnung *mef(A)* zusammengefasst (Roberts *et al.*, 1999). Untersuchungen von Luna *et al.* (1999) zeigten, dass *mef*-Gene innerhalb grampositiver Bakterien weit verbreitet sind. So wurden *mef*-Gene bei Streptokokken, Enterococcen, Micrococcen und Corynebakterien nachgewiesen. Kürzlich wurde das *mef(A)*-Gen bei *Streptococcus pneumoniae* als Bestandteil eines 7244 bp großes Elementes nachgewiesen, das sich zwar mittels Transformation, nicht aber mittels Konjugation übertragen ließ (Santagani *et al.*, 2000).

b) „ABC-Transporter“-Gruppe

Zwei Gruppen von Genen, die innerhalb der gram-positiven Kokken bislang nur bei Staphylokokken nachgewiesen wurden, kodieren Proteine, die zur Gruppe der „ABC-Transporter“ gezählt werden.

Die erste Gruppe umfasst das Gen *msr(A)* (Ross *et al.*, 1990) und die mit ihm eng verwandten Gene *msr(SA)*, *msr(SA)* und *msr(B)*. Aufgrund einer 98%igen Übereinstimmung in ihren Nukleotidsequenzen gilt für alle Gene dieser Gruppe gemäß der neuen Nomenklatur die Bezeichnung *msr(A)* (Roberts *et al.*, 1999).

Diese Gene finden sich in der Mehrzahl der Fälle auf Plasmiden. Im Gegensatz zu den Mef-Proteinen vermitteln die Msr(A)-Proteine die Ausschleusung von 14-gliedrigen Makroliden und B-Komponenten der Streptogramine (M₁₄S_B-Phänotyp). Die zweite Gruppe wird durch die meist auf Plasmiden lokalisierten Gene *vga(A)* und *vga(B)* repräsentiert, deren Genprodukte für ATP-bindende Transportproteine kodieren, die an der Ausschleusung von A-Komponenten der Streptogramine (S_A-Phänotyp) beteiligt sind (Allignet *et al.*, 1992). Die Msr(A)-, Vga(A)- und Vga(B)-Proteine verfügen über je zwei ATP-bindende Domänen, weisen aber keine transmembranalen Segmente auf (Allignet *et al.*, 1992; Ross *et al.*, 1990). Demzufolge wird angenommen, dass diese Proteine bei der Ausschleusung der Wirkstoffe mit membranständigen Effluxsystemen interagieren; bislang wurde ein solches chromosomal kodiertes Effluxsystem identifiziert (Ross *et al.*, 1995).

1.4.2.3 Inaktivierung der Wirkstoffe

Die Inaktivierung von Makroliden, Lincosamiden oder Streptograminen basiert auf der Aktivität von Laktonhydrolasen, Nukleotidyltransferasen, Acetyltransferasen, Esterasen oder Phosphorylasen. Alle diese Enzyme besitzen ein auf jeweils nur eine Substanzklasse beschränktes Substratspektrum.

a) Laktonhydrolasen

Zwei Typen von Laktonhydrolasen, kodiert von den Genen *vgb(A)* (Allignet *et al.*, 1988) und *vgb(B)* (Allignet *et al.*, 1998), sind bekannt. Beide Laktonhydrolasen vermitteln ausschließlich Resistenz gegenüber den B-Komponenten der Streptogramine. Beide Proteine weisen eine 67%ige Übereinstimmung in ihren Aminosäuresequenzen auf. Das Gen *vgb(A)* wurde bislang bei Staphylococcen und Enterococcen, *vgb(B)* dagegen nur bei Staphylococcen nachgewiesen (Roberts *et al.*, 1999).

b) Nukleotidyltransferasen

Nukleotidyltransferasen, die eine Resistenz gegenüber Lincosamiden vermitteln (L-Phänotyp), entsprechen einem der beiden Typen Lnu(A) oder Lnu(B). Die entsprechenden Gene werden als *lnu(A)* und *lnu(B)* bezeichnet (Roberts *et al.*, 1999). Das Gen *lnu(A)* wurde früher mit *lin(A)* oder *lin(A')* bezeichnet und war nur bei Staphylococcen zu finden (Brisson-Noel *et al.*, 1986; Brisson-Noel *et al.*, 1988). Das Lnu(A)-Protein besteht aus 161 Aminosäuren. Das Gen *lnu(B)* – ehemals mit *lin(B)* bezeichnet – wurde hingegen bei *Enterococcus faecium* nachgewiesen (Bozdogan *et al.*, 1999). Signifikante Sequenzhomologien zwischen Lnu(A) und Lnu(B) bestehen nicht.

c) Acetyltransferasen

Bislang sind fünf verschiedene Typen von Acetyltransferasen bekannt, die Resistenz gegenüber den A-Komponenten der Streptogramine bewirken und die Bezeichnungen Vat(A-E) tragen (Roberts *et al.*, 1999). Die Größen der Acetyltransferasen variieren in einem engen Bereich: Vat(A) aus *Staphylococcus aureus* 219 Aminosäuren (Allignet *et al.*, 1993), Vat(B) aus *Staphylococcus aureus* 212 Aminosäuren (Allignet *et al.*, 1995), Vat(C) aus *Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii* 212 Aminosäuren (Allignet *et al.*, 1998), Vat(D) aus *Enterococcus faecium* 209 Aminosäuren (Rende-Fournier *et al.*, 1993) und Vat(E) aus *Enterococcus faecium* 214 Aminosäuren (Werner *et al.*, 1999). Vat(A), Vat(B) und Vat(C) kommen bei Staphylococcen vor; Vat(D) und Vat(E) sind bei *Enterococcus faecium*-Isolaten weit verbreitet, bei Staphylococcen dagegen wurden sie bislang noch nicht nachgewiesen (Haroche *et al.*, 2000). Das Gen *vat(E)* mit dem Gen *erm(B)* verknüpft wurde bei *Enterococcus faecium* nachgewiesen (Jensen *et al.*, 2000). Die Vat-Proteine zeigen eine weniger als 70%ige Übereinstimmung in ihren Aminosäuresequenzen. Eine nahezu 40%ige Aminosäureidentität besteht jedoch zwischen den Vat-Proteinen und den Chloramphenicolresistenz vermittelnden Acetyltransferasen vom Typ CatB, was auf eine divergente Entwicklung aus einem gemeinsamen Vorläufer hindeutet (Murray *et al.*, 1997).

d) Esterasen

Zwei Esterasen, Ere(A) und Ere(B), die 14- und 15-gliedrige Makrolide inaktivieren, sind bei *Escherichia coli* beschrieben. Ere(A) stellt ein Protein von 343 Aminosäuren dar (Ounissi *et al.*, 1985), Ere(B) ein Protein von 418 Aminosäuren (Arthur *et al.*, 1986). Die entsprechenden Gene sind in beiden Fällen auf Plasmiden lokalisiert. Die Inaktivierung von 14- und 16-gliedrigen Makroliden durch eine vermeintliche Esterase wurde bei *Staphylococcus aureus* beschrieben, wobei die Sequenz dieser in ihrem Substratspektrum von Ere(A) und Ere(B) abweichenden Esterase jedoch nicht bestimmt wurde (Wondrack *et al.*, 1996).

e) Phosphorylasen

Die Inaktivierung von Makroliden mittels Phosphorylierung wurde bei *Staphylococcus aureus* beschrieben. Zwei nahezu identische Phosphorylasegene des Typs *mph(C)* wurden auf den Plasmiden pMS97 (Matsuoka *et al.*, 1998) und pSR1 (Sutcliffe *et al.*, 1999) nachgewiesen. In beiden Plasmiden ist stromaufwärts von *mph(C)* ein zusätzliches *msr(A)*-Gen zu finden. Plasmid pMS97 verfügt außerdem noch über ein *erm*-Gen.

1.4.2.4 Resistenzvermittelnde Mutationen in den ribosomalen Proteinen L4 und L22 sowie in der 23S-RNA

Die ribosomalen Proteine L4 und L22 binden primär an die Domäne I in der 23S-rRNA. Mutationen in diesen Proteinen können jedoch auch die Konformation in den Domänen II, III und V nachhaltig stören und somit die Wirkung von Antibiotika, die mit den Nukleotiden im Peptidyltransferasezentrum der Domäne V interagieren nachteilig beeinflussen (Gregory *et al.*, 1999; Vester *et al.*, 2001). Bei 16 *S. pneumoniae*-Isolaten aus Osteuropa und Nordamerika, die einen MS_B-Phänotyp aufwiesen, war die gleiche, drei Aminosäuren umfassende Mutation in einer konservierten Region des L4-Proteins nachweisbar: 69-GTG-71 zu 69-TPS-71. Ein weiteres Isolat verfügte über eine 6 Aminosäuren große Insertion in dieser konservierten Region: 69-GTGRAR-74 zu 69-GTGREKGTGRAR-80 (Tait-Kamradt

et al., 2000). Weitere bei *S. pneumoniae* nachgewiesene Mutationen umfassen einen singulären Aminosäureaustausch, Gly69Cys, sowie die Insertion von zwei Aminosäuren, wodurch sich die Sequenz 67-QK-68 zu 67-QSQK-70 veränderte (Tait-Kamradt et al., 2000). Bei *S. pneumoniae* wurden nach in-vitro-Passagen in Gegenwart von Azithromycin auch resistenzvermittelnde Mutationen in der 23S rRNA beobachtet: Cys2611Ala, Cys2611Gly, Ala2058Gly und Ala2059Gly (Tait-Kamradt et al., 2000). Alle diese Mutationen bewirkten Resistenz gegenüber 14-, 15- und 16-gliedrigen Makroliden. Resistenz gegenüber den B-Komponenten der Streptogramine wurde bei den Mutationen Cys2611Ala, Cys2611Gly, Ala2058Gly, Resistenz gegenüber Clindamycin bei den Mutationen Ala2058Gly und Ala2059Gly beobachtet. Hierbei ist zu beachten, dass nicht alle der 4 bei *S. pneumoniae* vorliegenden 23S rRNA Allele zur Ausbildung der Resistenz mutiert sein müssen. Das Resistenzniveau steigt jedoch mit der Anzahl mutierter Allele (Tait-Kamradt et al., 2000; Tait-Kamradt et al., 2000). Depardieu und Courvalin (Depardieu et al., 2001) identifizierten bei *S. pneumoniae* eine weitere Mutation, Ala2062Cys, die Resistenz gegenüber 16-gliedrigen Makroliden und Streptograminen bewirkte. Eine Übersicht über die derzeit bekannten mit Resistenzen gegenüber Vertretern der Makrolide, Lincosamide und Streptogramine assoziierten Mutationen in der 23S rRNA findet sich bei Vester und Douthwaite (Vester et al., 2001). Abbildung 9 zeigt die Positionen der wichtigsten Mutationen.

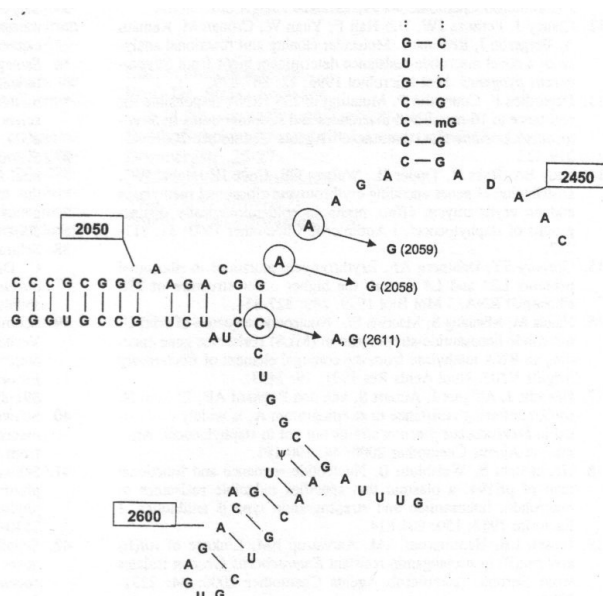


Abbildung 9. Darstellung eines Ausschnittes aus dem Peptidyltransferase-Zentrum der Domäne V der 23s rRNA. Austausche der Basen an Positionen 2058 (A→G), 2059 (A→G) und 2611 (C→A/G) wurden bei *S. pneumoniae* im Zusammenhang mit Resistenz gegenüber Makroliden (2059, 2611) bzw. Makroliden, Linkosamiden und Streptogramin b-Antibiotika (2058) nachgewiesen (Vester et al., 2001).

1.5 Desinfektionsmittel

Ein großes Problem in Kliniken ist eine verminderte Empfindlichkeit wichtiger Erreger gegenüber gebräuchlichen Desinfektionsmitteln. Werden dadurch und durch nicht korrekt durchgeführte Desinfektion (z.B. zu kurze Einwirkdauer der Mittel, zu geringe Konzentrationen) Keime nicht abgetötet, so trägt dies zu einer Verbreitung multiresistenter Keime bei. Gerade in den Intensivstationen der Krankenhäuser entsteht dadurch eine Gefährdung der Patienten. Eine potentielle Desinfektionsmittelunempfindlichkeit bei *S. aureus* kann durch die Effluxproteine QacA, QacB und QacC vermittelt werden.

1.5.1 QacA und B

QacA und QacB sind Effluxproteine vom Typ der „major facilitator superfamily“ (Paulsen *et al.*, 1993). Sie befinden sich in der Zellmembran (14 Transmembrandomänen) und befördern protonengradientenabhängig verschiedene Substanzen aus der Bakterienzelle (Lyon *et al.*, 1987; Littlejohn *et al.*, 1991; Paulsen *et al.*, 1996). Beide *qac*- Gene unterscheiden sich voneinander nur in 7 Basen, die über das ganze Gen verteilt sind. Die Folge ist nur ein Aminosäureaustausch an Position 323 (Paulsen *et al.*, 1996). Dieser Aminosäureaustausch führt aber zu einem unterschiedlichen Phänotyp: während QacA sowohl monovalente Substanzen, wie z.B. quaternäre Ammoniumverbindungen (z.B. Cetrimid) und interkalierende Substanzen (z.B. Ethidiumbromid), als auch divalente Kationen (z.B. Chlorhexidin und Pentamidin) transportiert (Littlejohn *et al.*, 1991; Tennent *et al.*, 1985), werden durch QacB hauptsächlich monovalente Kationen befördert (Mitchell *et al.*, 1998). Tabelle 3 zeigt eine Auflistung der MHK Werte eines QacA oder QacB tragenden Stammes gegen einige desinfizierende Substanzen.

Tabelle 3: Resistenz gegen Diamine, Biguanide and Guanylhydrazone

Substanz	MHK (µg/ml)		
	QacA	QacB	Kontrolle
Biguanide			
Alexidin	6	4	4
Chlorguanid	250	250	250
Chlorhexidin	12	6	1
Diamine			
Amicarbalid	1200	400	200
Diaminodiphenylamin	250	50	50
Dibromopropamidin	10	1	1
Diminazen	400	200	500
Dexamidin	300	200	100
Pentamidin	350	200	100
Phenamidin	1800	200	200
Propamidin	300	100	100
Stilbamidin	400	200	100
Guanylhydrazone			
1I-39/JC-1-134	> 2000	1600	100
1a-62/JC-1-127	1600	1600	500
Methylglyoxal-bisguanylhydrazon	1200	1200	1200

Tabelle nach Mitchell *et al.* (1998); die MHKs wurden mit einem *E. coli* K 12 Stamm mit den Plasmiden pSK4219 (*qacA*) und pSK4270 (*qacB*) und dem Vektor pBluescript (Kontrolle) ermittelt.

Für den Transport der divalenten Kationen ist ein Säurerest an Position 323 des Proteins notwendig, wobei dieser mit einem positiv geladenen Rest der divalenten Kationen interagiert (Mitchell *et al.*, 1998). Für QacA wurde ein Repressorprotein (QacR) identifiziert (Grkovic *et al.*, 1998).

qacA ist sowohl in *S. aureus* als auch in Koagulase-negativen Staphylokokken auf Plasmiden, z.B. denen der pSK1-Familie, lokalisiert (Littlejohn *et al.*, 1991; Leelaporn *et al.*, 1994; Leelaporn *et al.*, 1995). Es wurde auch schon auf dem Bakterienchromosom detektiert, was möglicherweise durch Integration eines pSK1-Plasmids erklärt werden kann (Gillespie *et al.*, 1989). Die Plasmide der pSK1-Familie tragen häufig auch andere Resistenzgene, die z.B. Resistenzen gegen Aminoglykoside (*aacA-aphD*), Penicillin (*blaZ*) und Trimethoprim (*dfrA*) vermitteln. *QacB* findet sich z.B. auf β -Laktamase- und

Schwermetallresistenzplasmiden wie pSK23 (Lyon *et al.*, 1987). Abbildung 10 zeigt die Struktur von QacA.

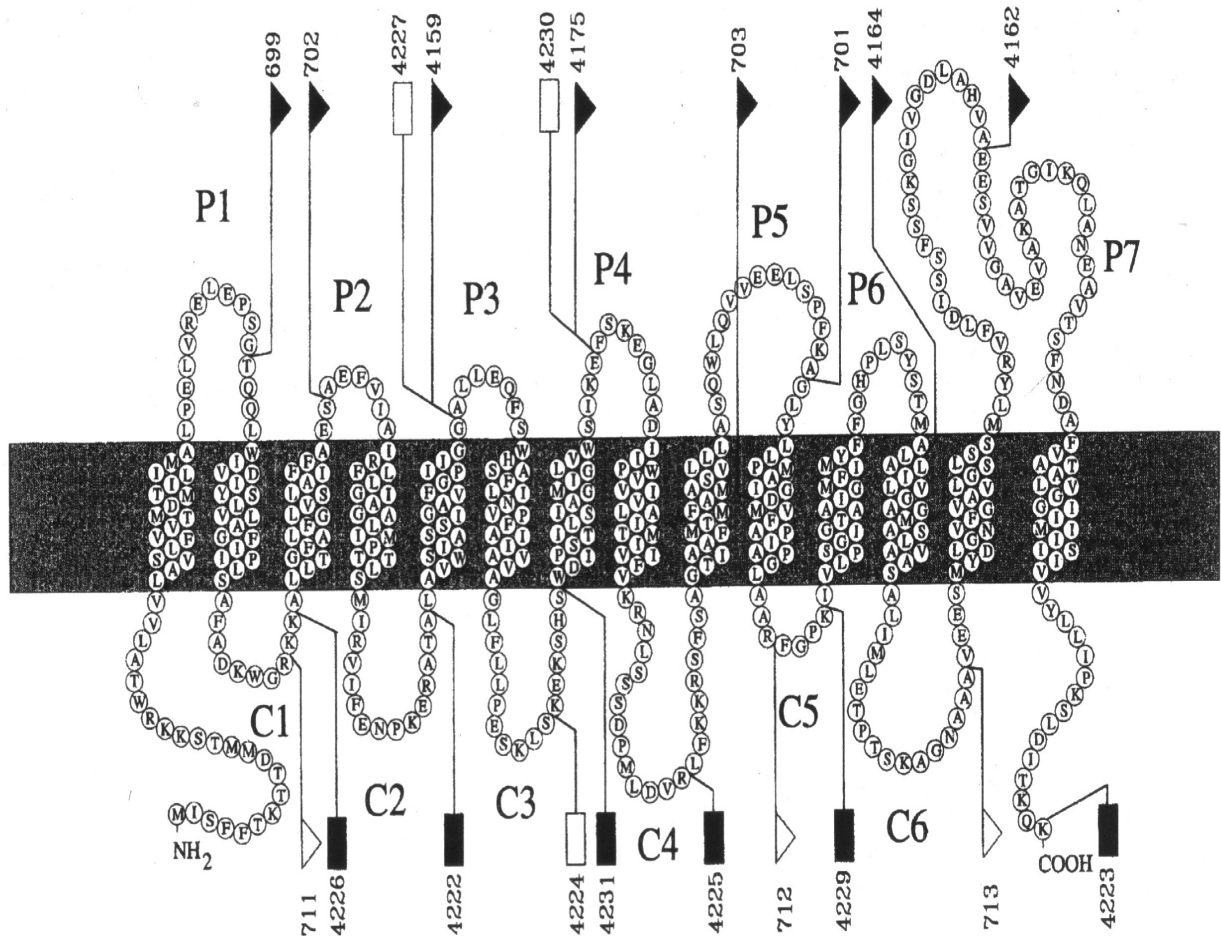


Abbildung 10. Das Effluxprotein QacA mit seinen Transmembrandomänen (Paulsen *et al.*, 1993).

1.5.2 QacC

QacC, auch unter dem Namen QacD, Smr (Grinius *et al.*, 1992) oder Ebr (Sasatsu *et al.*, 1989) bekannt, ist ein viel kleineres Membranprotein (4 Transmembrandomänen), welches ebenfalls H⁺-abhängig quaternäre Ammoniumverbindungen und einige Interkalantien aus der Zelle transportiert (Littlejohn *et al.*, 1991; Paulsen *et al.*, 1995; Grinius *et al.*, 1994). Es ist mit anderen „multidrug“-Effluxproteinen der SMR-Familie verwandt (Grinius *et al.*, 1992; Paulsen *et al.*, 1995).

Das *qacC*- Gen ist auf kleinen Plasmiden der Klasse 1 wie z.B. pSK 89 oder pSK108 in *S. aureus* und Koagulase-negativen Staphylokokken, oder auf konjugativen

Plasmiden wie z.B. pSK 41 lokalisiert (Littlejohn *et al.*, 1991; Leelaporn *et al.*, 1994; Emslie *et al.*, 1986; Goering *et al.*, 1983; Paulsen *et al.*, 1998). Auf den letzteren findet man außerdem Resistenzgene gegen Aminoglykoside (*aacA-aphD* und *aadA*), Penicilline und Trimethoprim. Abbildung 11 zeigt die Struktur des QacC-Proteins.

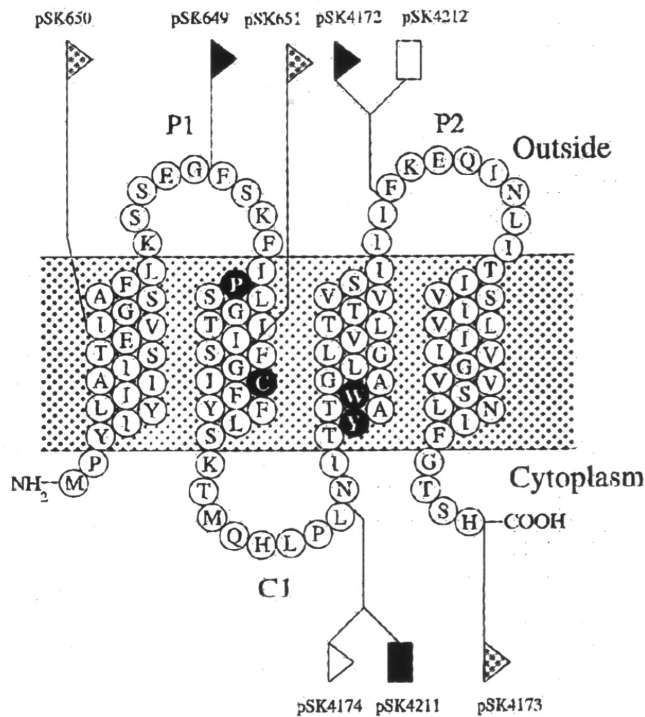


Abbildung 11. Das Effluxprotein QacC und seine Transmembrandomänen (Paulsen *et al.*, 1995).

2. Zielsetzung

Wie anfangs erwähnt, nimmt die Antibiotikaresistenz bei wichtigen Erregern immer mehr zu. In dieser Arbeit soll deshalb die Epidemiologie der Resistenz und der Resistenzmechanismen bei wichtigen Antibiotikaklassen gründlich aufgeklärt werden. Diese Arbeit will außerdem einen Überblick über die zugrundeliegenden Resistenzmechanismen und die *in-vitro* Aktivitäten verschiedener Substanzen bei klinischen Pneumococcen- und *S. aureus*-Isolaten geben. Die vorliegende Studie umfasste Isolate aus 24 europäischen Universitätskliniken, die im Rahmen des SENTRY-Überwachungsprogramms gesammelt wurden.

Es sollten die Aktivitäten einzelner Fluorochinolone verglichen werden, um herauszufinden, welche Antibiotika bei einer *S. aureus*-Therapie am wirkungsvollsten einzusetzen sind, auch im Hinblick auf die schnelle Resistenzausbreitung. Gleichfalls war es wichtig, die Häufigkeit auftretender Resistenzen zu ermitteln und die Epidemiologie der Resistenzmutationen zu untersuchen. Außerdem wurde der Einfluss von Effluxpumpensystemen auf die Chinolonresistenz geprüft. Bei den Staphylococcen sollte insbesondere auch die Verteilung der Resistenzen innerhalb Europas näher untersucht werden. Die Resistenz ist bei Pneumococcen noch nicht so stark ausgeprägt. Deshalb sollte hier zunächst die Häufigkeit resistenter Keime innerhalb Europas festgestellt werden. Molekulargenetische Untersuchungen wurden angeschlossen, um die auftretenden Mutationen in den QRDR der Gene für Gyrase und Topoisomerase IV näher zu charakterisieren, ihre Häufigkeit und Kombinationen zu ermitteln und die resultierenden MHK-Werte in europäischen Isolaten zu erfahren.

Die Untersuchungen mit BMS hatten die Analyse der *in-vitro*-Aktivität bei *S. aureus*-Stämmen mit definierten Mutationen in den QRDR von *gyrA*, *gyrB* und *grlA* und mit unterschiedlichen Resistenzphänotypen (hetero-Vancomycin-intermediär resistente *S. aureus* bzw. „hetero-VISA“); die Analyse der *in-vitro*-Aktivität bei *S. pneumoniae*-Stämmen mit definierten Mutationen in den QRDR von *gyrA* und *parC* und mit unterschiedlichen Resistenzphänotypen sowie die Analyse des Reserpineffekts auf die MHK-Werte und damit die Klärung der Frage, ob ein Effluxpumpensystem mit verantwortlich für eine Resistenz sein könnte, zum Ziel. Um Aussagen zur Prävalenz verschiedener Makrolid-Resistenzgene (*erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *mef(E)*, *msr(A)/msr(B)*, *ere(A)* sowie *ere(B)*) bei Makrolid-resistenten *S. aureus*- und *S. pneumoniae*-Isolaten machen zu können, wurden klinische Isolate mittels PCR auf das Vorhandensein der entsprechenden Gene untersucht. Gleichzeitig sollten verschiedene Substanzen, insbesondere Synercid, in ihrer antibakteriellen Aktivität geprüft werden. Die Strukturänderungen im Translationsattenuator, die bei *erm(C)* zur konstitutiven Genexpression führen, sind gut beschrieben. Bei *erm(A)* gibt es bislang nur Studien über *in-vitro* selektierte Stämme. In dieser Arbeit sollten die Translationsattenuatoren von klinischen *S. aureus*-Isolaten mit konstitutiver *erm(A)*-Expression näher untersucht werden. Weiterhin sollte ein genetisch definierter *S. aureus*-Stamm, SA1, mit induzierbarer *erm(A)*-Expression in der Anwesenheit nicht-induzierender Substanzen kultiviert werden, insbesondere der neuen Ketolide, um deren

Einfluss auf die Ausbildung einer konstitutiven Resistenz zu untersuchen, sowie die resultierenden Änderungen im Translationsattenuator zu ermitteln.

Da besonders *S. aureus* in der Krankenhaushygiene Probleme bereitet, ist es wichtig zu wissen, wie wirkungsvoll gängige Desinfektionsmittel sind, gerade, wenn man bedenkt, dass manche zu desinfizierenden Stellen nur schwer erreichbar sind, so dass nur dort relativ geringe Konzentrationen der Desinfektionsmittel zur Wirkung gelangen können. Die hier beschriebene Studie sollte aufklären, ob und wie häufig die Qac-Proteine in europäischen *S. aureus* Isolaten gefunden werden können und ob es einen Unterschied zwischen Methicillin-sensiblen (MSSA) und Methicillin-resistenten (MRSA) *S. aureus* Isolaten gibt.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in p.a.-Reinheit verwendet.

3.1.1.1 Lösungen und Feststoffe

1 kb-Marker	GibcoBRL
Agar	Fluka
Agarose Ultra Pure	GibcoBRL
DNase-Agarplatten	Unipath
EDTA	Sigma
Essigsäure	Merck
Ethanol	Riedel de Häen
Ethidiumbromid	BioRad
HCl	Merck
Koagulasetestlösung	Pharmacia
Mineralöl	Sigma
NaCl	Merck
Natriumacetat	Merck
Reserpin	Sigma
Tris/HCl	Merck
Triton X-100	Sigma

3.1.1.2 Antibiotika

ABT-773	Abbot
Azitromycin	Aventis
BMS 294756	Bristol Meyer Squibb
Ciprofloxacin	Bayer
Clarithromycin	Pfizer
Clinafloxacin	Parke-Davies
Clindamycin	Sigma
Dalfopristin	Rhône-Poulanc Rorer
Erythromycin	Sigma
Gatifloxacin	Grünenthal
Gemifloxacin	Smith Kline Beecham
Levofloxacin	Hoechst
Moxifloxacin	Bayer
Quinupristin	Rhône-Poulanc Rorer
Sparfloxacin	Rhone Poulence Rorer
Synercid	Rhône-Poulanc Rorer
Telithromycin	Aventis
Trovafoxacin	Pfizer
Vancomycin	ICN

Antibiotikatestblättchen SensiDisc

Becton Dickinson

3.1.1.3 Fertig-Kits

PCR-Purification-Kit

Qiagen

Expand High Fidelity PCR System

Roche

PCR Nucleotide-Mix

Roche

Terminator Ready Rxn-Mix

Perkin-Elmer

(Sequenziermix)

ABI PRISM™ Ready-Reaction-Dye-Terminator-Cycle-Sequencing-Kit

Perkin Elmer

ABI PRISM™ Ready-Reaction-dRhodamine-Terminator-Cycle-Sequencing-Kit

Perkin Elmer

Bactident-Coagulase-Test

Merck

Mikrobank

ProLab

3.1.1.4 Primer

Für die PCR-Experimente und Sequenzierungen wurden die in der Liste aufgeführten Oligonukleotide von der Firma Pharmacia Biotech verwendet.

S. aureus

GrlA FW 5'-ACTTGAAGATGTTTTAGGTGAT

REV 5'-TTAGGAAATCTTGATGGCAA

GrlB FW 5'-CGATTAAAGCACAACAAGCAAGG

REV 5'-CATCAGTCATAATAATTACAC

GyrA FW 5'-AATGAACAAGGTATGACACC

REV 5'-TACGCGCTTCAGTATAACGC

S. pneumoniae

GyrA FW 5'-CCGTCGCATTCTCTATGGAATGAA

REV 5'-AGTTGCTCCATTGACCAAAAGGTT

GyrB FW 5'-AGATTGCCAAACGTATCGTAGA

REV 5'-TGGGCTCCATCGACATCGGC

ParC FW 5'-AAGGATAGCAATACTTTTGAC

REV 5'-GTTGGTTCTTTCTCGGTATCG

ParE FW 5'-AAGGCGCGTGATGAGAGC

REV 5'-TCTGCTCCAACACCCGCA

Makrolide

ErmA FW 5'-TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA

REV 5'-CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT

ErmB FW 5'-GAAAAGGTACTCAACCAAATA

REV 5'-AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC

ErmC FW 5'-GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT

REV 5'-TCAAAACATAATATAGATAAA

EreA FW 5'-AACACCCTGAACCCAAGGGACG

REV 5'-CTTCACATCCGGATTCGCTCGA

EreB FW 5'-AGAAATGGAGGTTTCATACTTACCA

REV 5'-CATATAATCATCACCAATGGC
MsrA/B FW 5'-GCAAATGGTGTAGGTAAGACAAC
REV 5'-ATCATGTGATGTAAACAAAAT
MefE FW 5'-AGTATCATTAATCACTAGTGC
REV 5'-TTCTTCTGGTACTAAAAGTGC
Regulatorregion ermA:
FW 5'-CGTTGGGGATAAACTTCCC
REV 5'-CTAGCTCTTTGGGTAAAATGTCC

Desinfektionsmittel

QacA FW 5'-CTATGGCAATAGGAGATATGGTGT
REV 5'-CCACTACAGATTCTTGAGCTACATG
QacC FW 5'-AAACAATGCAACACCTACCACT
REV 5'-AACGAAACTACGCCGACTATG

3.1.2 Geräte

Autoklav	Westima-Sauter
Spektralphotometer	Dr. Lange
Elektrophoresekammern (und Zubehör)	BioRad
Spannungsgerät	BioRad
Mikrotiter-Photometer	Microscan
Analysenwaage und Grobwaage	Sartorius
Thermocycler	Perkin-Elmer
Tischzentrifugen	Heraeus
Thermoschüttler	Eppendorf
DNA-Sequenzier 377	ABI Prism
Vortexer	Witeg elektrik
Sterilbank	Bio Gardhood
Pipetten	Eppendorf, Gillson, Finn
Mehrkanalpipetten	BioHit ProLine, Finn
Multipetten	Eppendorf, Gillson
Glasgeräte	Schott
Petrischalen	Greiner
Mikrotiterplatten (96-Loch-Platten, gerade Bodenform)	Greiner
Mikrobank	Pro-Lab

3.1.3 Plastik- und Einwegartikel

Plastikartikel, Reaktionsgefäße und Mikrotiterplatten stammten von den Firmen Greiner, Biozym, Eppendorf und Perkin Elmer

3.1.4 Bakterienstämme

Alle Bakterienstämme stammten aus der SENTRY-Studie (Schmitz, 1998). Das SENTRY-Programm ist eine langfristig angelegte Surveillance Studie zum Monitoring der am häufigsten auftretenden Krankheitserreger sowie der sich entwickelnden Resistenzen gegenüber 26 verschiedenen Antibiotika. Nur jeweils ein Isolat pro Patient, das hinsichtlich der vorgegebenen Kriterien als klinisch signifikant einzustufen war, wurde analysiert. Bei den resistenten Isolaten wurden die klinisch wichtigsten Resistenzmechanismen molekular-epidemiologisch untersucht. Das Referenzzentrum dieser Studie ist in Utrecht in den Niederlanden. Die Isolate stammen aus folgenden Universitätskliniken:

- ❖ Krankenhaus der Elisabethinen, Linz, Österreich
- ❖ Hopital Erasme, Brüssel, Belgien
- ❖ Hopital St. Joseph, Paris, Frankreich
- ❖ Hopital de la Pitie-Salperiere, Paris, Frankreich
- ❖ Hopital Eduard Herriot, Lyon, Frankreich
- ❖ A. Calmette Hopital, Lille, Frankreich
- ❖ Universitätskliniken Freiburg, Deutschland
- ❖ Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland
- ❖ National University of Athen, Griechenland
- ❖ University of Genoa, Italien
- ❖ University of Rome, Italien
- ❖ University Hospital Utrecht, Niederlande
- ❖ Sera and Vaccines Research Laboratory, Warsaw, Polen
- ❖ Jagiellonian University, Krakow, Polen
- ❖ University Hospital of Coimbra, Portugal
- ❖ University Hospital of Sevilla, Spanien
- ❖ Hopital Ramon Y Cajal, Madrid, Spanien
- ❖ Hospital de Bellvitge, Barcelona, Spanien
- ❖ CHUV, Lausanne, Schweiz
- ❖ St. Thomas' Hospital Medical School, London, Großbritannien

Des weiteren wurden die Laborstämme ATCC 29213 (*S. aureus*) und ATCC 49616 (*S. pneumoniae*) verwendet.

3.1.5 Nährmedien

- Mueller-Hinton-Bouillon und Mueller-Hinton- Agar; mit oder ohne Blutzusatz

Die Bouillon wurde verwendet, um Übernachtskulturen und MHK-Tests bei Staphylococcen durchzuführen. Für den MHK-Test selber wurde die Bouillon in doppelter Konzentration verwendet. Auf den bluthaltigen Agarplatten wurden Pneumococcen und Staphylococcen herangezogen. Für Agardiffusionstests bei Staphylococcen wurden Agarplatten ohne Blut verwendet.

Zusammensetzung:

Rindfleisch, getrocknete Infusion aus 300g:	2,0 g/l
Caseinhydrolysat:	17,5 g/l
Stärke:	1,5 g/l

für den Agar:

Agar: 17,0 g/l

evt. Zusatz von Schafserythrozyten

pH-Wert: 7,4

- Trypton-Soja-Bouillon

Dieses Nährmedium wurde für Flüssigkulturen von Pneumococcen und zur MHK-Bestimmung bei Pneumococcen verwendet. Für die MHK-Bestimmung wurde die Bouillon in doppelter Konzentration angesetzt.

Zusammensetzung:

Trypton: 17,0 g/l

Sojamehlpepton: 3,0 g/l

D-Glucose: 2,5 g/l

Dikaliumhydrogenphosphat: 2,5 g/l

pH-Wert: 7,4

3.2 Methoden

3.2.1 Mikrobiologische Methoden

3.2.1.1 Anzucht von Bakterien

Die entsprechenden Kulturmedien wurden mit einer von der Stammplatte stammenden Einzelkolonie beimpft und bei 37°C über Nacht kultiviert. Zur Aufbewahrung der Stämme wurden diese als Reinkultur auf MH- oder Blutagarplatten bei 30-37°C für 24-48h angezogen und bei 4°C bis zu drei Wochen aufbewahrt.

3.2.1.2 Stammhaltung

Zur längeren Konservierung der Bakterienstämme wurde eine Mikrobank (ProLab) nach Vorschrift des Herstellers angelegt. Die sterilen Kryogegefäße enthielten säurebehandelte Kügelchen mit poröser Oberfläche, an die die Bakterien binden, und ein spezielles Medium. Die Kulturen wurden bei -70°C gelagert.

3.2.1.3 Wachstumsmessung

Das Wachstum von Bakterienkulturen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 535 nm mit einem Spektralphotometer ermittelt. Als Referenz diente jeweils das entsprechende unbeimpfte Medium.

3.2.1.4 Messung der optischen Dichte

Durch die Messung der optischen Dichte konnte die ungefähre Zellkonzentration einer Bakteriensuspension ermittelt werden. Die Zellsuspension wurde in eine Küvette (Schichtdicke 1 cm) gegeben und in das Photometer gestellt. Der Lichtstrahl, der durch die Küvette trat, wurde gestreut. Bei konstanter Zellgröße ist dann die Extinktion proportional zur Zellkonzentration; sie folgt dem Lambert-Beerschen Gesetz:

$$E = -\lg \frac{I}{I_0} = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

E = Extinktion

I_0 = Eingangslichtstärke

I = Ausgangslichtstärke

ε = molarer Extinktionskoeffizient (1/g*cm)

c = Konzentration

d = Schichtdicke

Als Referenz wurde das Medium, in dem sich die Probe befindet, eingesetzt. Die Messung erfolgte bei 535 nm.

3.2.1.5 Bestimmung der Lebendkeimzahl

Eine Bakteriensuspension wurde in einzelnen Zehnerschritten bis 10^{-9} verdünnt. Von den Verdünnungsstufen 10^{-4} bis 10^{-9} wurden je 0,1 ml auf einer Agarplatte ausgestrichen.

Die Platten wurden 24 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten ausgezählt. Die Anzahl der gewachsenen Kolonien auf einer Platte, multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor und 10 (da ja nur 0,1 mL ausgestrichen worden sind), ergab die Anzahl der kolonienbildenden Einheiten (KBE) pro ml. Dies entsprach der Menge der Lebendkeime in der Suspension.

3.2.1.6 Sterilisation

Alle verwendeten Pipettenspitzen und Eppendorfcups, alle Medien, destilliertes Wasser sowie infektiöse Abfälle wie Mediumreste oder bewachsene Agarplatten wurden im Autoklaven bei 120°C und 1,2 bar Überdruck bei einer Haltezeit von 20 min sterilisiert. Thermolabile Zusätze wie Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren sterilfiltriert und zugesetzt.

Glasgeräte wurden nach dem Spülen bei 160°C für 8 Stunden im Trockenschrank erhitzt.

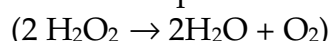
3.2.1.7 Methoden zur Identifizierung von Bakterien

Eine Voridentifizierung erfolgt nach dem Aussehen der Kolonien auf einer MH-Blut-Platte und nach dem mikroskopischen Bild.

a) *S. aureus*

Katalase-Test

Für den Katalase-Test wurden Bakterienkolonien in Wasserstoffperoxid verrieben. Bei Katalase-positiven Bakterien sollten Gasblasen aufsteigen, da Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff reduziert wird.



Nuclease-Test (DNase)

Der Nachweis der DNase wurde mit Hilfe des DNase-Agars (Oxoid) durchgeführt. Der Test beruht auf der Hydrolyse der im Nährmedium enthaltenen DNA, durch die gebildete DNase der Bakterien zu kurzkettigen Polynucleotiden: Eine Kolonie der zu untersuchenden Isolate wurde zusammen

mit einer Positiv- und einer Negativkontrolle auf einer DNA-haltigen Agarplatte ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurde der Nährboden mit 1m HCl überschwemmt, so dass ungespaltene DNA durch Präzipitation als Trübung des Mediums sichtbar wurde. Bei DNase-positiven Stämmen blieb diese Trübung aus.

Röhrchen-Koagulase-Test

Mit diesem Test ist sowohl die freie als auch die an die Zelloberfläche gebundene Koagulase nachweisbar.

Es wurde der Bactident-Coagulase-Test® (Merck) eingesetzt und entsprechend den Vorschriften des Herstellers durchgeführt. Der Test wurde als positiv beurteilt, wenn eine Agglutination auftrat.

b) *S. pneumoniae*

Optochin-Test

Pneumococcen reagieren im Gegensatz zu oralen Streptococcen, die auf der Agarplatte ähnlich aussehen, empfindlich auf das Gallensalz Optochin. Um diese Empfindlichkeit nachzuweisen, wurde von einer frischen Agarplatte eine Kolonie entnommen und in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. Von dieser Lösung wurden 0,5 mL auf einer Blutagarplatte ausgestrichen; nach 5 min Trockenzeit wurde ein Optochintestplättchen (Sigma) aufgelegt. Diese Platte wurde über Nacht bei 37°C und 5% CO₂-Partialdruck kultiviert. Bei einer Optochinempfindlichkeit war um das Testplättchen herum ein deutlicher Hemmhof (mind. 10 mm) sichtbar.

3.2.1.8 Resistenztestungen

a) Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Die MHK eines Antibiotikums gibt an, ab welcher Mindestkonzentration alle Bakterien abgetötet werden. Sie ist eine stammspezifische Größe, das heißt, für jeden Bakterienstamm gilt eine andere MHK. Es wurde die Methode der Mikrodilution gewählt: Zur Bestimmung der MHK wurde in einer 96-Well-Mikrotiterplatte in Nährmedium eine Antibiotika-Verdünnungsreihe in Zweierpotenzstufen hergestellt, wobei sich in jedem Well 0,1 ml Lösung befanden. Jedes „Well“ wurde mit 0,1 ml einer frischen Übernachtskultur beimpft; dabei war diese Endverdünnung der Antibiotikallösung beim Ansetzen der Verdünnungsreihe zu berücksichtigen. Zur Verwendung im Test wurde die Übernachtskultur wie folgt verdünnt: Die Suspension wurde auf eine optische Dichte von 0,1 eingestellt. Von dieser Konzentration ausgehend wurde die Kultur nochmals mit Nährmedium 1:300 verdünnt. So erreichte man eine für den Test ausreichend geringe Zelldichte. Nach 12-24-stündiger Inkubation bei 37°C wurde die MHK optisch als die niedrigste Antibiotikakonzentration bestimmt, bei der kein Wachstum mehr sichtbar war. Als Wachstumskontrolle wurde eine Reihe der Mikrotiterplatte ohne Antibiotikallösung beimpft.

In manchen Fällen wurde von einem Stammkollektiv die MHK₉₀ oder die MHK₅₀ bestimmt. Diese Größen beziehen sich immer auf eine Gruppe von Isolaten und

geben an, bei welcher MHK 90% bzw. 50% aller untersuchten Isolate inhibiert wurden.

b) Reserpin-Test

Zur Überprüfung eines Efflux-Pumpeneinflusses auf MHK-Werte wurde der Effluxhemmer Reserpin eingesetzt.

Die Versuchsdurchführung entsprach der des MHK-Tests, wobei Reserpin in einer Konzentration von 20mg/ml hinzugefügt wurde. Parallel wurde die MHK ohne Reserpin bestimmt. Ein Effluxeinfluss lag vor, wenn die MHK unter Reserpin mindestens um zwei Stufen abnahm.

c) Der Agar-Diffusionstest

Dieser Test diente dazu, eine rein qualitative Aussage über die Resistenz, intermediäre Resistenz oder die Sensibilität eines Stammes gegenüber einem bestimmten Bakterium zu machen. Für den Test wurde eine Kolonie des entsprechenden Stammes in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. Von der Suspension wurden 0,5 ml auf einer Mueller-Hinton-Platte ausgestrichen. Nachdem die Platte etwas getrocknet war, wurde für jedes Antibiotikum ein Testblättchen aufgelegt und leicht angedrückt. Dieses Blättchen besteht aus Filterpapier, an das das Antibiotikum adsorbiert ist (wobei die Menge je nach Blättchen und Antibiotikum unterschiedlich ist; sie bewegt sich zwischen 5 µg und 200 µg). Auf eine Agar-Platte passen 7 Plättchen: eines in die Mitte und sechs im Kreis darum herum.

Die Platten wurden eine Nacht lang bei 37°C bebrütet. Während dieser Zeit diffundierte das Antibiotikum aus dem Testblättchen in den Agar. Deshalb bildete sich um das Blättchen herum ein Hemmhof, in dem keine Bakterien wuchsen. Der Durchmesser des Hemmhofes gab Aufschluss darüber, ob der getestete Stamm resistent, intermediär resistent oder sensibel war. Die genauen Werte können aus Tabellen, die zu den jeweiligen Testblättchen vom Hersteller herausgegeben werden, abgelesen werden.

d) Die Bestimmung der spontanen Mutationsrate

Bakterien sind in der Lage unter Antibiotikaeinfluss Resistenzen zu entwickeln. Zur Ermittlung der spontanen Mutationsrate wurde folgender in-vitro-Versuch durchgeführt:

0,1 ml einer Übernachtskultur wurden auf einer antibiotikahaltigen Agarplatte ausgestrichen. Insgesamt wurden 50 Platten beimpft. Parallel dazu wurde von der gleichen Übernachtskultur eine Lebendkeimzahlbestimmung durchgeführt.

Die Platten wurden bei 37°C inkubiert und die Anzahl der Kolonien auf den Antibiotikaplatten wurde bestimmt. Die spontane Mutationsrate bei dem jeweiligen Antibiotikum entspricht dem Quotienten aus der Gesamtzahl der ausplattierten Kolonien und der Anzahl der resistenten Kolonien.

Zur Verifizierung der Ergebnisse wurde eine MHK-Bestimmung derjenigen Kolonien durchgeführt, mit denen weitergearbeitet wurde.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifizierung von DNA von Mullis und Fallona (1987) wurde in einem Thermocycler der Firma Perkin-Elmer durchgeführt. Die gewählten Bedingungen wurden jeweils den Primern und den erwarteten Amplifikaten angepasst. Nachfolgend sind diese Bedingungen sowie der verwendete Versuchsansatz aufgeführt. Der 10xPuffer, die Taq-Polymerase und die MgCl₂-Lösung stammten aus dem High-Fidelity-Taq-System von Roche.

Versuchsansatz:

H ₂ O	33,4 µl
MgCl ₂	5 µl
(c = 25mmol/l)	
10xPuffer	5 µl
dNTP-Mix	2 µl
(c = 10 µmol/l)	
je Primer	2 µl
(c = 10 µmol/l pro dNTP)	
Taq	0,6 µl

0,6 µL Taq entsprechen 2,1 Units.

Von dem PCR- Produkt wurden je 8µl auf ein 1%iges Agarosegel mit Ethidiumbromidzusatz aufgetragen. Das fertige Gel wurde anschließend photographiert.

PCR-Bedingungen

Die verschiedenen PCRs wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

QRDR von GyrA, GyrB, ParC/GrlA und ParE/GrlB

- Denaturierung 96°C 7 min
- Denaturierung 96°C 5 5sec
- Annealing 55°C 1 min 5 sec
- Elongation 72°C 1 min 10 sec
- Zyklenzahl 30
- Elongation 72°C 10 min

Makrolidresistenzgene

- Denaturierung 96°C 7 min
- Denaturierung 96°C 1 min
- Annealing 52°C 1 min
- Elongation 72°C 2 min
- Zyklenzahl 32
- Elongation 72°C 10 min

Regulatorregion ErmA

- Denaturierung 94°C 7 min
- Denaturierung 94°C 1 min
- Annealing 53°C 1 min
- Elongation 72°C 4 min
- Zyklenzahl 30
- Elongation 72°C 10 min

Desinfektionsmittelresistenzgene

- Denaturierung 96°C 7 min
- Denaturierung 96°C 55 sec
- Annealing 47°C 1 min 5 sec
- Elongation 72°C 1 min 10 sec
- Zyklenzahl 30
- Elongation 72°C 10 min

3.2.2.2 Lysatherstellung

S. aureus-Stämme mussten für den Einsatz in der PCR lysiert werden. Dazu wurde von einer frischen Platte eine Kolonie abgeimpft und in 0,1ml TE-Puffer (10mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 8) resuspendiert. Es wurden 1,5 µl Lysostaphin (= 3 U) zugegeben. Der Ansatz wurde gründlich gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Von dem Lysat wurden der PCR 0,6 µl zugegeben.

Bei den Pneumococcen war es nicht nötig, ein Lysat herzustellen. Hier wurde einfach eine Kolonie einer frischen Agarplatte in den PCR-Ansatz gegeben.

3.2.2.3 Agarosegelelektrophorese

Unter Anlegen einer elektrischen Spannung werden Moleküle in einer Elektrolytlösung nach Ladung und Größe getrennt. Diese Methode wurde angewandt, um amplifizierte DNA-Fragmente aufzutrennen, sichtbar zu machen und so nachzuweisen, ob eine PCR oder Aufreinigung erfolgreich war.

Dazu wurden Agarosegele von 1% bis 1,5% verwendet, je nach Größe der DNA-Fragmente. Die Fragmente sind negativ geladen, daher wandern sie zur Anode. Die Zeit, die die Trennung dauerte, richtete sich nach der Prozentigkeit des Gels, der Größe der Fragmente und der angelegten Spannung. Für den PCR-Nachweis wurden vor dem Gießen 10 µl Ethidiumbromidlösung zur Agarose gegeben. Als Laufpuffer diente TBE-Puffer (0,37%(w/v)EDTA, 2,7%(w/v) Borsäure, 5,4%(w/v) Tris-HCl in Wasser). Vom 10xGelladepuffer (50% (w/v) Glycerin; 0,05% (w/v) Bromphenolblau; 0,1M EDTA, pH 7,8) wurden 4 µl je Probe verwendet. Die DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht.

3.2.2.4 Die Sequenzierung

Vor der eigentlichen Sequenzierung wurden die entsprechenden Genloci zunächst in einer PCR amplifiziert. Nach der PCR wurde das Amplifikat aufgereinigt, um es von Primern, Öl, Nucleotiden, Salzen und Taq zu befreien. Dazu wurde das PCR-Purification-Kit von QIAGEN verwendet und die Aufreinigung nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die aufgereinigte DNA kann eingefroren

längere Zeit aufbewahrt werden. Der Nachweis des Erfolgs der Aufreinigung wurde durch Auftrennung im Agarosegel erbracht. Dabei ließ man drei Marker in unterschiedlichen Konzentrationen mitlaufen. Die entstehenden DNA-Banden wurden mit der 1018-bp-Bande der Marker in ihrer Helligkeit verglichen. Diese Bande entsprach bei dem am stärksten konzentrierten Marker einer DNA-Menge von 50 ng, beim mittleren sind es 25 ng und beim schwächsten waren es 15 ng. An die Aufreinigung schloss sich die Sequenzierreaktion an. Diese ist mit einer PCR vergleichbar, jedoch wird hier nur ein Strang der DNA amplifiziert. In die Sequenzierreaktion wurden idealerweise 50 ng DNA eingesetzt. Wie viel dafür von dem Aufreinigungsprodukt nötig war, ließ sich aus dem Vergleich der Gelbanden leicht ermitteln.

Der Ansatz für die Sequenzierreaktion enthielt:

- die entsprechende Menge Aufreinigungsprodukt
- 1 µl von einem der beiden Primer, die zu dem Gen gehören
- 3 µl Sequenziermix

Der Ansatz wurde mit destilliertem Wasser auf 15 µl oder, wenn das nicht möglich war, weil zuviel Aufreinigungsprodukt eingesetzt wurde, auf 20 µl aufgefüllt. Der Sequenziermix enthält das nötige Puffersystem aus Tris-Puffer und MgCl₂-Lösung, die Taq-Polymerase und farbig markierte dNTP. Jedes dNTP trug einen anderen Rhodaminmarker.

Das Temperaturprogramm für die Sequenzierreaktion lautete:

- Denaturierung 96°C 5 min
- Denaturierung 96°C 30 sec
- Annealing 50°C 15 sec
- Elongation 60°C 4 min

Die Reaktion lief über 25 Zyklen.

Nach der Sequenzierreaktion wurde die DNA aus dem Reaktionsgemisch in Aqua dest aufgenommen und mit 96% Ethanol und 3M Natriumacetatlösung ausgefällt. Nach einer Umkristallisierung in 70% Ethanol wurde das Reaktionsprodukt getrocknet. In diesem Zustand kann es tiefgeköhlt einige Zeit aufbewahrt werden. Die Sequenzierung wurde nach der Didesoxy-Terminationsmethode mit dem ABI Prism™ 373A bzw. 377 DNA-Sequencer durch das Biologisch-Medizinische Forschungsinstitut (BMFZ) durchgeführt. Die nicht-radioaktive Markierungsreaktion erfolgte mit dem ABI Prism™ Ready-Reaction-Dye-Terminator-Cycle-Sequencing-Kit (Perkin Elmer) nach den Angaben des Herstellers. Hierbei führte der statistische Einbau von ddNTPs, die mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren, zum Kettenabbruch. Die Sequenzreaktion erfolgte mit spezifischen Primern aus den jeweiligen Gensequenzen.

3.2.2.5 Pulsfeldgelelektrophorese

Mit der Technik der PFGE können DNA-Fragmente zwischen 200 und 12000 kb aufgetrennt werden. Bei der PFGE wurde ein multidirektionelles Feld mit wechselnden Polen und Pulsen unterschiedlicher Dauer eingesetzt. Die DNA-Fragmente orientierten sich nach der Richtung des Feldes und wanderten in einer ausgestreckten mobilen Konformation. Gerichtetes Umschalten der elektrischen Felder, die in einem Winkel von 120° zueinander standen, bedingte, dass die DNA-Moleküle im Gel ihre Richtung änderten. Durch die wechselnde Stromrichtung orientierte sich das DNA-Molekül im elektrischen Feld ständig neu, um wieder eine mobile Konformation annehmen zu können. So wurde die Wanderung auch großer DNA-Moleküle durch das Agarosegel ermöglicht. Große Moleküle brauchten für die durch das Wechselfeld induzierten Konformationsänderungen mehr Zeit als kleine Moleküle um sich in Feldrichtung zu orientieren. Wenn die Reorientierung kürzer als die Pulszeit war, kam es zu einer Vorwärtsbewegung. Demnach verblieb mit zunehmender Größe der Moleküle immer weniger Zeit zur Wanderung in Feldrichtung; daraus folgte die bei der PFGE zu beobachtende Auftrennung nach dem Molekulargewicht der linearen DNA-Moleküle. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Makrorestriktionsverdaus wird vom elektrischen Feld, von der Pulszeit, vom Winkel und von der Konfiguration des elektrischen Feldes, der Temperatur und Ionenstärke des Gels und des Puffers sowie von der Spezifikation und Konzentration der Agarose bestimmt. Die in dieser Arbeit eingesetzte Pulstechnik wird als Contour-Clamped-Homogenous-Electric-Field-Electrophoresis bezeichnet. In diesem System waren 24 Elektroden horizontal auf einem hexagonalen Rahmen in der Elektrophoresekammer angeordnet. Die separate Ansteuerung der Elektroden ermöglichte graduell abfallende Potentiale, durch die ein homogenes elektrisches Feld in der Kammer aufgebaut wurde. Alle genannten Parameter sind beim GenePath-Strain-Typing_System^(R) (BioRad) standardisiert vorgegeben. Der genaue Arbeitsablauf und die Reaktionsbedingungen sowie die visuelle Auswertung der entstandenen Bandenmuster wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Auswertung der Gele erfolgte mit Hilfe des GelCompar[®] (UPGMA).

4. Ergebnisse

S. aureus und *S. pneumoniae* treten häufig als Erreger auch gefährlicher Krankheiten auf. Die klassische Behandlung solcher Infektionen mit Antibiotika wird dabei zunehmend durch Ausbildung und Verbreitung resistenter Stämme eingeschränkt. Eine besondere Rolle spielen dabei Methicillin-resistente *S. aureus* sowie Penicillin-resistente Pneumococcen, da verbunden mit diesen Resistenztypen häufig zahlreiche Multiresistenzen auftreten (Schmitz, 1998; Tomasz, 1997). Da die Antibiotikagruppen der Chinolone und der MLS-Antibiotika neben den β -Laktamen in der Therapie dieser beiden Erreger eine große Rolle spielen, ist es wichtig, möglichst viel über Ausbreitung und die Mechanismen der Resistenzen zu erfahren, damit Therapeuten entsprechend reagieren können. Deshalb soll in dieser Arbeit ein Überblick über die Resistenzausbreitung, die Aktivitäten von Chinolonen und MLS-Antibiotika und die häufigsten Resistenzmechanismen gegeben werden. Da auch die Unempfindlichkeit gegenüber gängigen Desinfektionsmitteln zur Ausbreitung resistenter Stämme gerade in Kliniken führen kann, wird außerdem die Ausbreitung der entsprechenden Gene, *qacA/B* (Paulsen *et al.*, 1996) und *qacC* (Paulsen *et al.*, 1994) bei *S. aureus*, einem häufigen Erreger nosokomialer Infektionen untersucht.

4.1 Fluorochinolone und BMS 294756

Chinolonantibiotika werden seit der Einführung eines Fluorliganden an C-Atom 6 (Wolfson *et al.*, 1985) verstärkt auch gegen gram-positive Erreger eingesetzt. Doch auch hier schränkt die Ausbreitung resistenter Stämme die therapeutischen Möglichkeiten ein. Für die Resistenz gegenüber Chinolonen werden hauptsächlich Mutationen in den Genen der Chinolonzielstrukturen, der Gyrase und der Topoisomerase IV, verantwortlich gemacht. Diese Resistenzen liegen in den QRDR der Gene *gyrA*, *gyrB*, *parC(graI)* und *parE(graII)* an den sogenannten „hot spots“ um Codon 80 (Heisig, 1997). Verstärkend weisen einige Stämme eine

gesteigerte Expression von Effluxpumpen, NorA bei Staphylococcen und Pmr bei Pneumococcen, auf, die in der Lage sind, Chinolone aus der Bakterienzelle hinaus zu transportieren (Kaatz *et al.*, 1993; Gill *et al.*, 1999). Dies steigert die Unempfindlichkeit der Stämme. Im ersten Teil der Arbeit sollte deshalb ein Überblick über die Verbreitung resistenter Stämme gegeben werden sowie ein Vergleich verschiedener Fluorochinolone und dem neuen Disfluorochinolon BMS 294756 in Hinblick auf Aktivität und Einfluss der Resistenzmutationen erstellt werden.

4.1.1 Epidemiologische Verteilung der Resistenzen

Zu den zahlreichen Multiresistenzen, die im Zusammenhang mit der Methicillin- und der Penicillinresistenz bei Staphylococcen und Pneumococcen auftreten, gehört die Chinolonresistenz. Aus diesem Grunde wurde die Ausbreitung und Verteilung resistenter Stämme bestimmt und mehrere Chinolonantibiotika in ihrer in-vitro Aktivität verglichen. Dazu wurden bei großen Stammkollektiven die MHK-Werte verschiedener Chinolonantibiotika mittels Mikrodilution ermittelt.

4.1.1.1 *S. aureus*

Bei 1548 *S. aureus*-Stämmen, davon 369 Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) aus verschiedenen Universitätskliniken in ganz Europa wurden die MHK-Werte von Trovafloxacin, Gatifloxacin und Ciprofloxacin. Dazu wurde das in Kapitel 3.2.1.8 a) beschriebene Mikrodilutionsverfahren benutzt.

Abbildung 12 zeigt beispielhaft eine Mikrotiterplatte, wie sie bei den MHK-Messungen verwendet wurde..

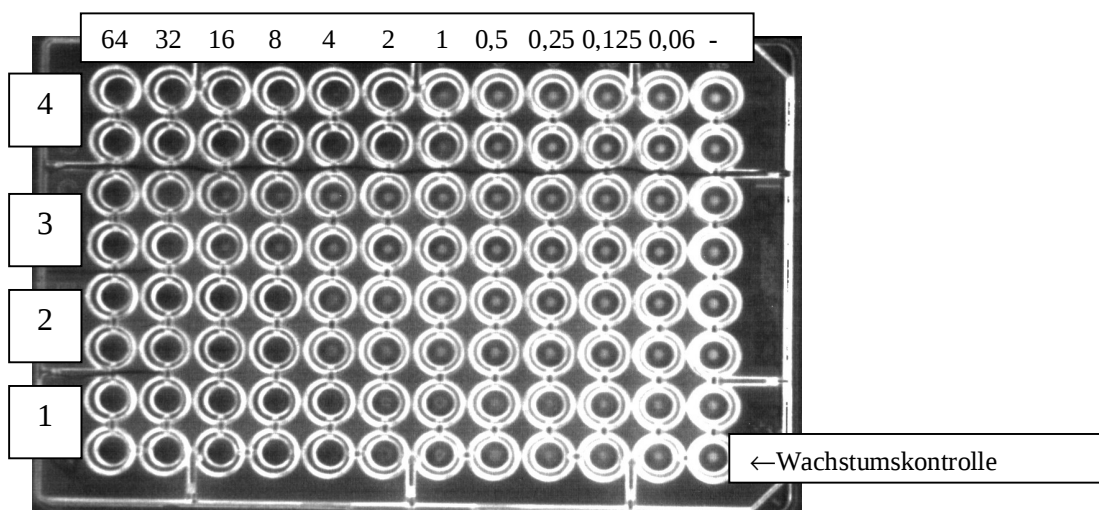


Abbildung 12. Mikrotiterplatte, mit einer Verdünnungsreihe für Ciprofloxacin von 64 mg/l – 0,06 mg/l. Hier wurden die MHK-Werte von 4 *S. aureus*-Isolaten gemessen. Die Reihe rechts ist die Wachstumskontrolle. Bakterienwachstum manifestierte sich als weißer Punkt am Boden der „Wells“. Hier ergeben sich folgende MHK-Werte: Stamm 1: 2 mg/l; Stamm 2: 8 mg/l; Stamm 3: 32 mg/l; Stamm 4: 2 mg/l

Anschließend wurden die MHK90- und MHK50-Werte errechnet, also die MHK-Werte, bei denen 50% bzw. 90% aller Isolate abgetötet wurden. Auf diese Weise sollten Unterschiede in den Resistenzraten der einzelnen Länder untersucht werden. 369 dieser Stämme waren Methicillin-resistent. Bei diesen waren lediglich 10% empfindlich gegenüber Ciprofloxacin, so dass hier kein Unterschied in der Resistenzrate zwischen den einzelnen Ländern festgestellt werden konnte.

Von den 1179 Methicillin-sensiblen Isolaten waren 87% empfindlich gegenüber Ciprofloxacin. Gatifloxacin und Trovafloxacin wiesen vergleichbare Aktivitäten auf mit einem MHK90-Wert von 1 mg/L, während Ciprofloxacin mit einer MHK90 von 2 mg/L weniger aktiv war.

Ein hohes Aufkommen chinolonresistenter *S. aureus*-Stämme zeigte sich in den Kliniken in Frankreich, Italien, Portugal, Großbritannien und teilweise in Spanien. Die Unterschiede in der Aktivität zwischen den einzelnen Chinolonen war jedoch in jedem Land gleich.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4 dargestellt. Abbildung 13 stellt den Zusammenhang zwischen Herkunft und den MHK90-Werten dar.

Tabelle 4:
MHK₉₀-Werte verschiedener Fluorochinolone bei europäischen Methicillin-sensiblen *S. aureus*-Isolaten

Klinikum	Anzahl Isolate	%S ^a	C ^b	T ^c	G ^d
Österreich	57	96,5	0,5	0,125	0,125
Belgien	15	93,3	0,5	0,125	0,25
Frankreich1	65	78,5	4	1	4
Frankreich2	96	83,3	8	2	2
Frankreich3	93	80,7	4	1	2
Frankreich4	78	80,7	4	1	2
Deutschland1	65	98,5	0,25	0,06	0,125
Deutschland2	110	94,6	0,5	0,06	0,125
Griechenland	57	91,2	1	0,125	0,25
Italien1	47	80,9	4	1	2
Italien2	26	80,8	8	2	2
Niederlande	42	100	0,25	0,06	0,125
Polen1	21	95,2	0,25	0,06	0,06
Polen2	44	97,7	0,25	0,125	0,125
Portugal	68	88,2	4	1	2
Spanien1	52	57,7	16	4	4
Spanien2	55	92,7	0,25	0,06	0,125
Spanien3	49	89,8	2	0,25	0,25
Schweiz	54	90,7	0,5	0,125	0,125
UK	85	84,7	4	1	2
Gesamt	1179	86,7	4	1	1

^aAnteil Ciprofloxacin-sensibler Isolate

^b MHK₉₀-Werte für Ciprofloxacin

^c MHK₉₀-Werte für Trovafloxacin

^d MHK₉₀-Werte für Gatifloxacin

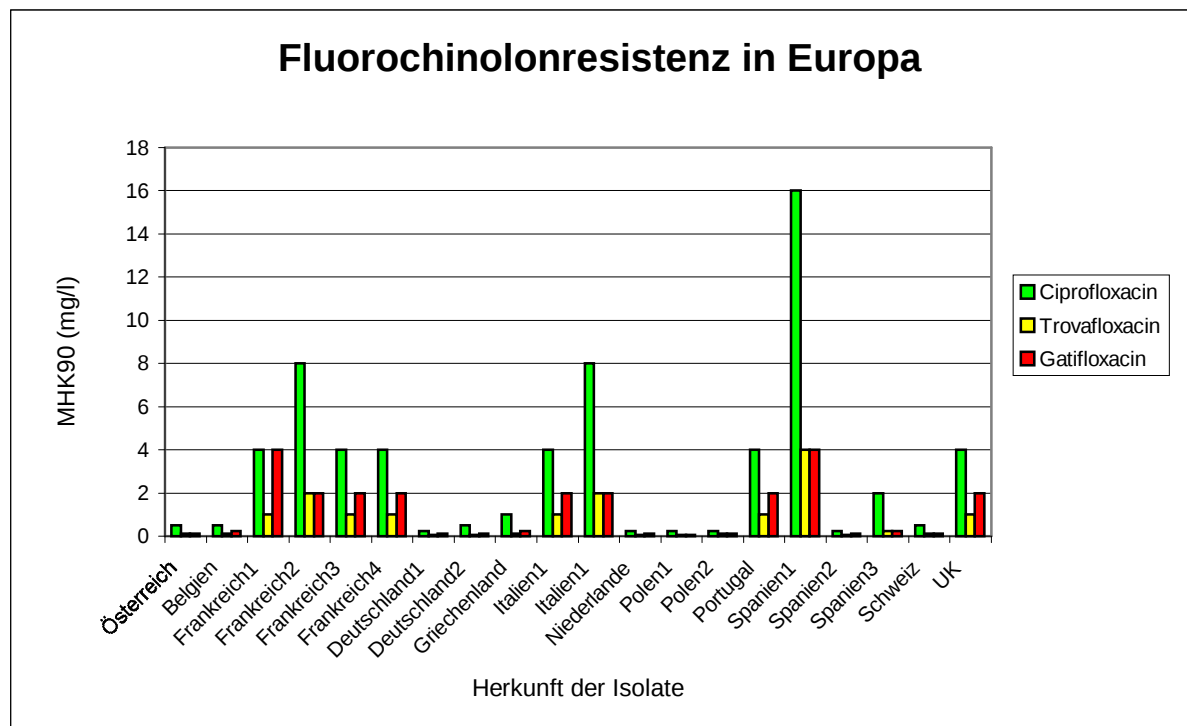


Abbildung 13. Zusammenhang zwischen Fluorochinolonresistenz und Herkunft eines Isolates. Hier wird der Zusammenhang zwischen Fluorochinolonresistenz und der Herkunft der Isolate besonders deutlich, wenn man die MHK90-Werte miteinander vergleicht. Als MHK90 bezeichnet man die MHK, bei der 90% aller Isolate einer Gruppe inhibiert werden.

Das hohe Aufkommen Ciprofloxacin-resistenter MRSA unterstreicht noch einmal, dass die Chinolonresistenz als Multiresistenz zur Methicillin-Resistenz (das heißt, sie tritt häufig zusammen mit der Methicillin-Resistenz auf) ein ernstzunehmendes Problem für die MRSA-Therapie darstellt. Unterschiede in den Resistenzraten einzelner Länder waren deutlich festzustellen. Gründe hierfür können im unterschiedlichen Gebrauch dieser Antibiotika in den verschiedenen Ländern und in der raschen klonalen Ausbreitung eines MRSA nach dessen Auftreten in einer Klinik liegen. Die Resistenzrate gegenüber Chinolonen ist zwar in den meisten überprüften Kliniken bei MSSA noch relativ gering, doch in Einzelfällen werden Resistenzraten bis fast 20% erreicht. Auch dies gibt Anlass zur Sorge.

4.1.1.2 *S. pneumoniae*

Die Resistenz gegenüber Chinolonen ist bei Pneumococcen noch nicht so weit verbreitet wie bei Staphylococcen. Um den aktuellen Stand der Resistenzlage zu

ermitteln, wurden von 1191 Pneumococcenisolaten die MHK-Werte für Ciprofloxacin, Levofloxacin, Sparfloxacin, Trovafloxacin und Grepafloxacin bestimmt. Abbildung 14 zeigt exemplarisch eine Mikrotiterplatte einer MHK-Bestimmung bei Pneumococcen..

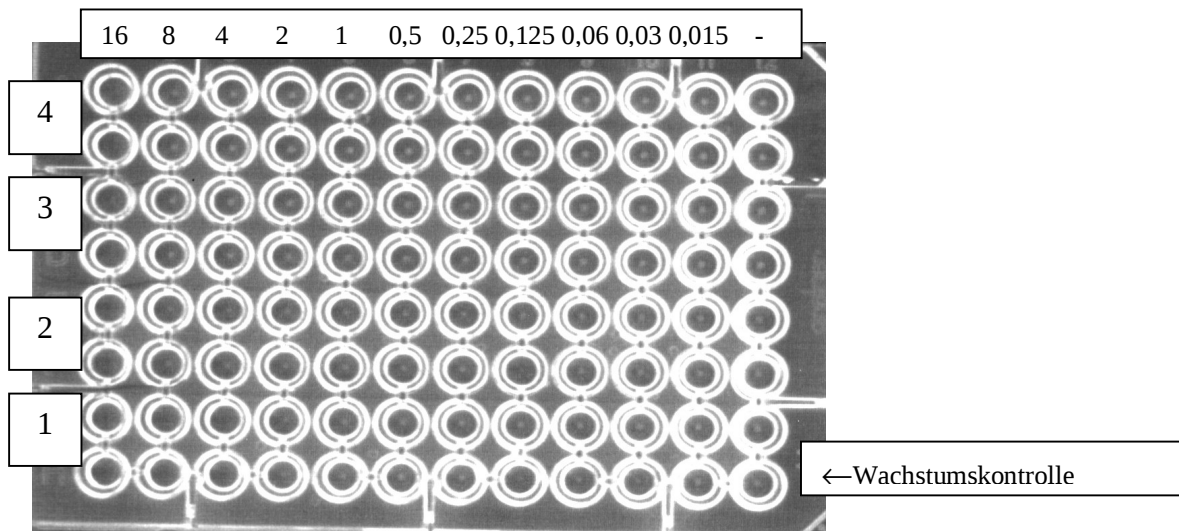


Abbildung 14 .Mikrotiterplatte, mit einer Verdünnungsreihe für Ciprofloxacin von 16 mg/l – 0,015 mg/l. Hier wurden die MHK-Werte von 4 *S. pneumoniae*-Isolaten gemessen. Die Reihe rechts ist die Wachstumskontrolle. Bakterienwachstum manifestierte sich als weißer Punkt am Boden der „Wells“. Hier ergeben sich folgende MHK-Werte: Stamm 1: 1 mg/l; Stamm 2: 4 mg/l; Stamm 3: 16 mg/l; Stamm 4: 16 mg/l

Wenn man den von Chen *et al.* (1999) festgelegten Grenzwert von $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ für Ciprofloxacin zugrundelegt, zeigten bei MHK- Bestimmung 1,8 % (21/1191) der Isolate eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber Ciprofloxacin. Tabelle 5 zeigt die Verteilung der MHK- Werte. Die MHK90-Werte werden in Abbildung 15 zusammengefasst.

Tabelle 5

Verteilung der MHK-Werte verschiedener Fluorochinolone bei Pneumococcen

MHK (mg/l)	Anzahl Isolate mit MHK X	Prozent Isolate mit MHK X	kumulativer Prozentsatz
Ciprofloxacin	Grenzwert für resistente Erreger: ≥ 4 mg/l		
$\leq 0,05$	3	0,3	0,3
0,03	1	0,1	0,4
0,06	2	0,2	0,6
0,125	10	0,8	1,4
0,25	39	3,3	4,7
0,5	417	35,0	39,7
1	574	48,2	87,9
2	124	10,4	98,3
> 2	21	1,8	100
Levofloxacin	Grenzwert für resistente Erreger: ≥ 8 mg/l		
$\leq 0,5$	440	36,9	36,9
1	696	58,4	95,3
2	51	4,3	99,6
4	3	0,3	99,9
> 4	1	0,1	100
Sparfloxacin (469 Isolate)			
$\leq 0,125$	82	17,5	17,5
0,25	202	43,1	60,6
0,5	176	37,5	98,1
1	9	1,9	100
Gatifloxacin	Grenzwert für resistente Erreger: ≥ 4 mg/l		
$\leq 0,03$	11	0,9	0,9
0,06	10	1,6	2,5
0,125	327	27,5	30,0
0,25	703	59,0	88,9
0,5	126	10,6	99,5
1	3	0,3	99,8
2	1	0,1	99,9
4	0	0,0	99,9
> 4	1	0,1	100
Trovafloxacin			
$\leq 0,03$	45	3,8	3,8
0,06	260	21,8	25,6
0,125	455	38,2	63,8
0,25	328	27,5	91,3
0,5	101	8,5	99,8
1	1	0,1	99,9
2	0	0,0	99,9
4	1	0,1	100
Grepafloxacin (722 Isolate)			
$\leq 0,125$	442	61,2	61,2
0,25	248	34,3	95,5
0,5	25	3,5	99,0
1	5	0,7	99,7
> 1	2	0,3	100

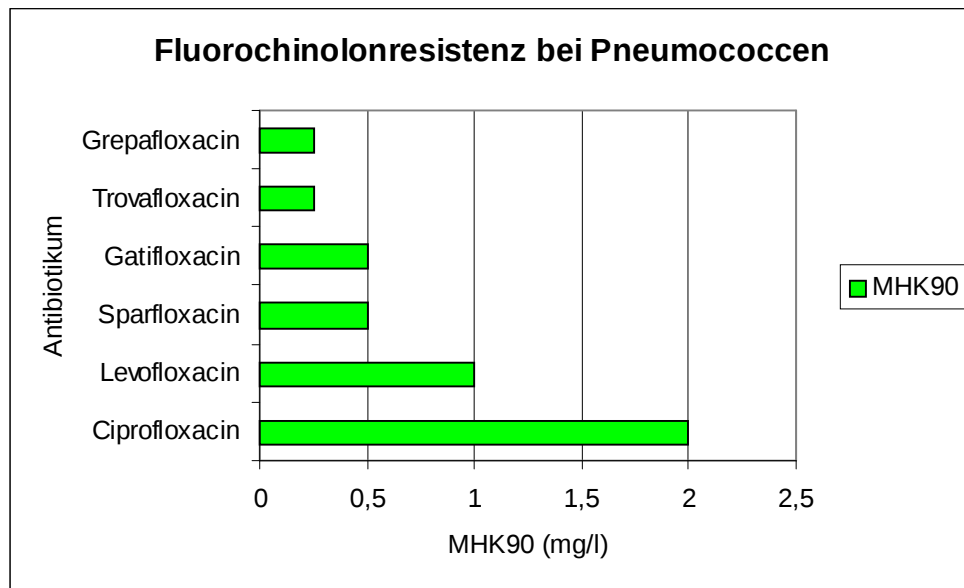


Abbildung 15. Vergleich der MHK90-Werte der untersuchten Fluorochinolonantibiotika. Die MHK90 ist der MHK-Wert, bei dem 90% aller Isolate gehemmt wurden.

Tatsächlich erweist sich die Anzahl Ciprofloxacin-resistenter Isolate unter den Pneumococcen als noch gering. Die Resistenzrate ist bei den anderen Chinolonen noch niedriger, so dass noch ein guter therapeutischer Spielraum gegeben ist. Ein Grund dafür könnte sein, dass im Allgemeinen Pneumococceninfektionen ambulant erworben sind. Die Resistenzausbreitung in Kliniken verläuft schneller als außerhalb.

4.1.2 Epidemiologie der Resistenzmutationen

Da nicht alle Chinolone in gleicher Weise von den verschiedenen Resistenzmutationen betroffen sind, sollten verschiedene Fluorochinolone, besonders die neuesten, in ihrer Aktivität verglichen werden. So zeigt sich, welche Chinolone als wirksame Therapeutika noch am ehesten zur Verfügung stehen. Um die Beteiligung der bekannten Resistenzmutationen an der Ausbreitung der Resistenz zu bestimmen, wurden die „Quinolone-resistance-determining region“ (QRDR) Ciprofloxacin-resistenter Isolate sequenziert. Außerdem wurde durch Bestimmung der MHK unter Reserpin-Einfluss der Anteil von Effluxpumpen an der Resistenzausbildung bestimmt.

4.1.2.1 *S. aureus*

Bei 434 Methicillin-sensiblen (MSSA) und 457 Methicillin-resistenten (MRSA) *S. aureus*-Isolaten wurden die MHK-Werte von 7 Fluorochinolonen, nämlich Ciprofloxacin, Levofloxacin, Trovafloxacin, Gatifloxacin, Moxifloxacin, Sitafloxacin und Clinafloxacin, gemessen. Die MHK₉₀-Werte wurden bestimmt. Bei Ciprofloxacin-resistenten Keimen wurde die Ciprofloxacin-MHK außerdem mit Reserpin ermittelt, um den Einfluss der Effluxpumpe zu untersuchen. Die Messungen wurden dreimal wiederholt. Bei allen Ciprofloxacin-resistenten Isolaten wurden weiterhin die QRDR von *gyrA* und *grrA*, den Genen für die Untereinheiten A der Gyrase und der Topoisomerase IV, sequenziert.

Es war zu beobachten, dass die Unterschiede in der in-vitro-Aktivität zwischen den einzelnen Fluorochinolonen bei den MSSA weniger ausgeprägt waren als bei den MRSA. Basierend auf den MHK-Werten für die MSSA, zeigten Sitafloxacin, Clinafloxacin und Trovafloxacin das beste in-vitro-Potential mit einer MHK₉₀ von 0,03 mg/l, gefolgt von Moxifloxacin mit einer MHK₉₀ von 0,06 mg/l, Gatifloxacin mit 0,125 mg/l, Levofloxacin mit 0,25 mg/l und zuletzt Ciprofloxacin als am wenigsten aktive Substanz mit einer MHK₉₀ von 0,5 mg/l. Während 99,8% aller MSSA von 1 mg/l Sitafloxacin abgetötet wurden, sank dieser Wert auf 96,3% bei Ciprofloxacin. Sitafloxacin war auch bei den MRSA die aktivste Substanz. Es war doppelt so aktiv wie Clinafloxacin und mindestens achtmal so aktiv wie die anderen Fluorochinolone.

Die MHK₉₀-Werte für Sitafloxacin, Clinafloxacin, Moxifloxacin, Gatifloxacin, Trovafloxacin, Levofloxacin und Ciprofloxacin bei MRSA waren 0,5 mg/l, 1 mg/l, 4 mg/l, 4 mg/l, 8 mg/l, 16 mg/l und > 16 mg/l. Von den 457 getesteten MRSA waren 95,7% resistent gegenüber Ciprofloxacin, 55,4% gegenüber Levofloxacin, 44,4% gegenüber Gatifloxacin und Trovafloxacin und 27,1% gegenüber Moxifloxacin, während nur 0,4% resistent waren gegenüber Clinafloxacin und 0,2% gegenüber Sitafloxacin. Der Grenzwert lag bei 4 mg/l.

Insgesamt waren also 433 Isolate resistent gegenüber Ciprofloxacin, nämlich 420 Methicillin-resistente (MRSA) und 13 Methicillin-sensible (MSSA). Der Einsatz von Reserpin resultierte in 139 (30,3%) von diesen Isolaten in bis zu vierfach

niedrigeren MHK-Werten für Ciprofloxacin. In den restlichen Isolaten hatte Reserpin keinen Einfluss. Man kann also in 30,3% der Fälle einen Einfluss der Effluxpumpe NorA auf die MHK annehmen.

Diese 433 Isolate wurden außerdem auf ihre „Quinolone-determining regions“ (QRDRs) in *gyrA* und *grrA* hin sequenziert. Die Bedingungen und Primer sind im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben. Bei der der Sequenzierung vorangehenden PCR-Amplifikation wurden folgende Amplifikatlängen erwartet: *gyrA*:222 bp; *grrA*: 458 bp.

Abbildung 16 zeigt ein Agarosegel einer *gyrA*- und *grrA*-PCR.

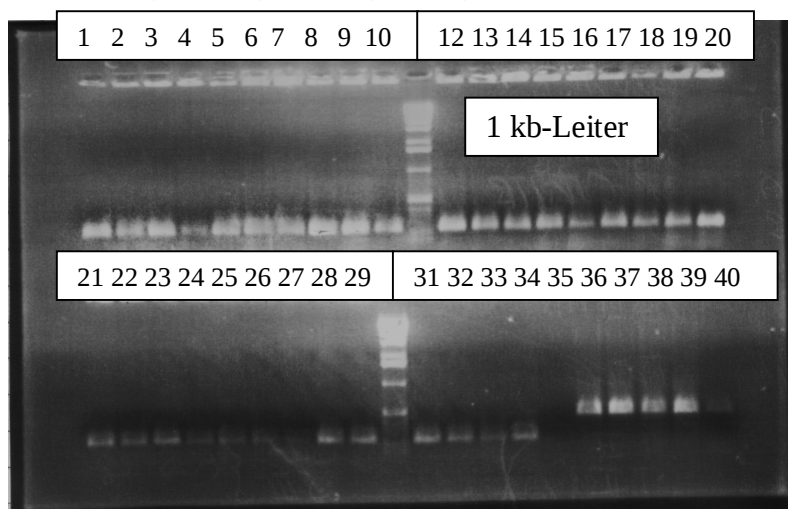


Abbildung 16. PCR-Produkte der Amplifikation der QRDRs von *gyrA* und *grrA*. Die PCR wurde unter den in Kapitel 3.2.2.1 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Gezeigt sind die PCR-Produkte der *S. aureus*-Isolate MRSA 432-457 („slot“ 1-34) für *gyrA* sowie MSSA 1-4 („slot“ 36-39) für *grrA*. Die „slots“ 35 und 40 sind Negativkontrollen. Es wurde jeweils 8 µl des PCR-Produktes mit 4 µl Gelladepuffer aufgetragen. Die DNA-Fragmente wiesen die erwarteten Längen auf.

Der Amplifikation folgte die Aufreinigung der PCR-Fragmente mit den PCR-Purification-Kit von QIAGEN. Abbildung 17 zeigt ein Agarosegel zur Kontrolle der Aufreinigung.

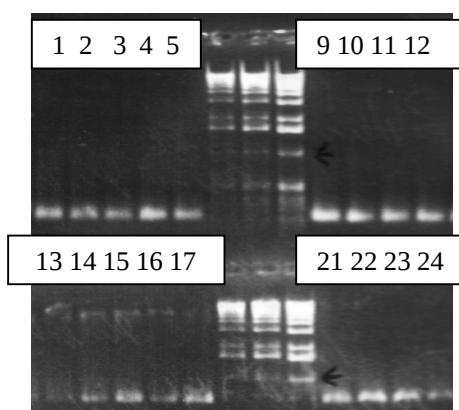


Abbildung 17 Agarosegel zur Kontrolle der Aufreinigung der PCR-Fragmente der Isolate MRSA 1-9 für *gyrA* und *grrA*. aufgetragen sind je 4 µl des aufgereinigten PCR-Produktes mit 4 µl Gelladepuffer. Die kb-Marker in unterschiedlichen Konzentrationen dienen der Mengenbestimmung der DNA in der Aufreinigung (siehe Kapitel 3.2.2.4). Dabei wurde mit der 1018-bp-Bande (Pfeil) die Helligkeit verglichen. Obere Reihe („slots“ 1-12): *gyrA* Untere Reihe („slots“ 13-24): *grrA*

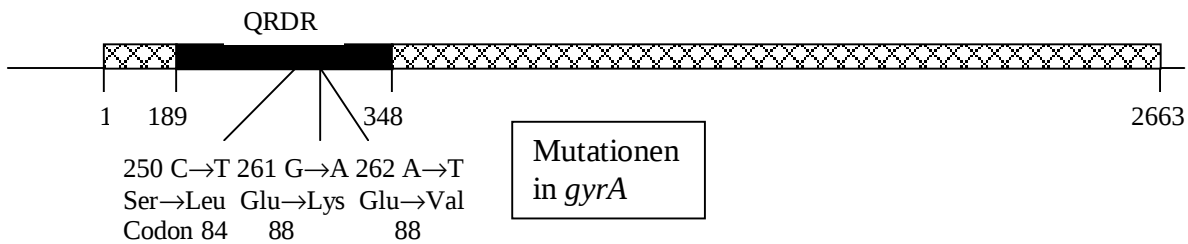
In GrlA wurden sechs verschiedene einzelne oder kombinierte Mutationen gefunden: Ser80Phe, Ser80Tyr, Glu84Lys, Ala116Glu, Ala116Pro und die Kombination von Ser80Phe mit Glu84Val. In GyrA wurden 4 einzelne Mutationen gefunden: Ser84Leu, Ser 84Lys, Glu88Lys und Glu88Val.

Tabelle 7 dokumentiert die gefundenen Mutationskombinationen in *gyrA* und *grlA* und deren Häufigkeit. Die Lage der Mutationen im Gen wird in Abbildung 18 dargestellt.

GrlA	GyrA	Häufigkeit (in %)
Ser80Phe	Ser84Leu	56
Ser80Phe	Glu88Lys	21
Ser80Tyr	Ser84Leu	6
Ser80Tyr	Glu88Lys	6
Glu84Lys	Ser84Leu	1
Glu84Lys	Glu88Lys	5
Ala116Glu	Ser84Lys	1
Ala116Pro	Glu88Val	1
Ser80Phe	Ser84Leu	2
Glu84Val	-	1

Abbildung 18

a) Mutationen im Gen *gyrA* (Gyrase Untereinheit A)



QRDR:

159

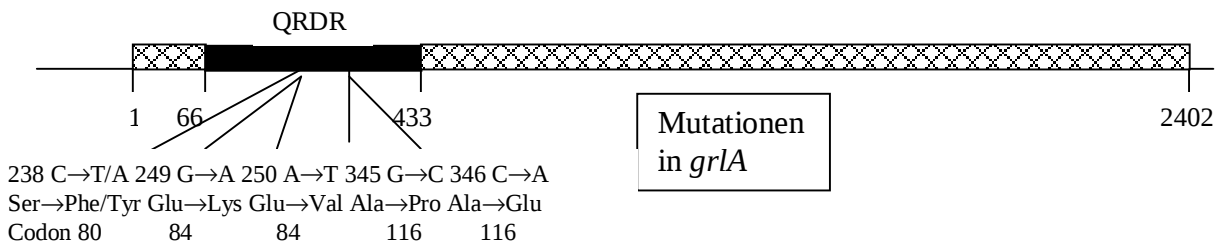
aat gaa caa ggt atg aca ccg gat aaa tca **at** aaa aaa tca gca cgt atc gtt ggt gac gta atg ggt aaa tat
N E Q G M T P D K S Y K K S A R I V G D V M G K Y
cac cct cat ggt gac **tca** tct att tat **gaa** gca atg gta cgt atg gct caa gat ttc agt tat cgt tat ccg ctt gtt
H P H G D **S** S I Y **E** A M V R M A Q D F S Y R Y P L V
gat ggc caa ggt aac ttt ggt tca atg gat gga ga **ggc** gca gca gca atg **cgt tat act gaa gcg cgt a**
D G Q G N F G S M D G D G A A A M R Y T E A R
381

Primer

Mutationsorte

Beginn / Ende QRDR

b) Mutationen im Gen *grlA* (Topoisomerase IV-Untereinheit A)



QRDR:

26

a ctt gaa gat gtt tta ggt gat cgc ttt gga aga tat agt **aaa** tat att att caa gag cgt gca ttg cca gat gtt
L E D V L G D R F G R Y S K Y I I Q E R A L P D V
cgt gat ggt tta aaa cca gta caa cgt cgt att tta tat gca atg tat tca agt ggt aat aca cac gat aaa aat ttc
R D G L K P V Q R R I L Y A M Y S S G N T H D K N F
cgt aaa agt gcg aaa aca gtc ggt gat gtt att ggt caa tat cat cca cat gga gac **tcc** tca gtg tac **gaa** gca
R K S A K T V G D V I G Q Y H P H G D **S** S V Y **E** A
atg gtc cgt tta agt caa gac tgg aag tta cga cat gtc tta ata gaa atg cat ggt aat aat ggt agt atc gat
M V R L S Q D W K L R H V L I E M H G N N G S I D
aat gat ccg cca gcg **gca** atg cgt tac act gaa gct aag tta agc tta cta gct gaa gag tta tta cgt gat att
N D P P A **A** M R Y T E A K L S L L A E E L L R D I
aat aaa gag aca gtt tct ttc att cca aac **tat** gat gat acg aca ctc gaa cca atg gta **ttg cca tca aga ttt**
N K E T V S F I P N Y D D T T L E P M V L P S R F
cct aa
P
484

Abbildung 18. Lage der QRDR im Gen und Lage der Mutationen in den QRDR von *gyrA* und *grlA*.

Die weitaus häufigste Mutationskombination ist also Ser80Phe in *grrA* mit Ser84Leu in *gyrA*, gefolgt von Ser80Phe in *grrA* mit Glu88Lys in *gyrA*.

Es zeigte sich also, dass die neueren Fluorochinolone gegenüber Staphylococcen wesentlich aktiver waren als die Älteren. Dies traf auch auf Ciprifloxacin-resistente Isolate zu, so dass angenommen werden kann, dass die neueren Fluorochinolone von bestehenden Resistenzmutationen weniger beeinflusst wurden. Die geringe Varianz auftretender Mutationen spricht dafür, dass es zu einer steigenden Resistenz eher durch klonale Ausbreitung resistenter Stämme als durch die Neuentstehung resistenter Stämme kommt.

4.1.2.2 *S. pneumoniae*

Von 427 Pneumococcenisolaten wurden die MHK-Werte für Ciprofloxacin, Clinafloxacin, Gatifloxacin, Gemifloxacin, Levofloxacin, Moxifloxacin, Sitafloxacin und Trovafloxacin bestimmt. Um den Einfluss einer Effluxpumpe zu ermitteln, wurden alle Ciprofloxacin-MHKs außerdem in Anwesenheit von Reserpin bestimmt. Die Bestimmungen wurden dreimal wiederholt. Alle Isolate, die eine erhöhte MHK für Ciprofloxacin (≥ 4 mg/l) aufwiesen, wurden auf Mutationen in den QRDR von *gyrA*, *gyrB*, *parC* und *parE* untersucht. 25 Isolate erfüllten dieses Kriterium. Die QRDR dieser Isolate wurden zunächst mit einer PCR amplifiziert. Die erwarteten Produktlängen betrugen: *gyrA*: 381 bp; *gyrB*: 414 bp; *parC*: 310 bp; *parE*: 289 bp. Abbildung 19 zeigt eine Agarosegel einer solchen PCR.

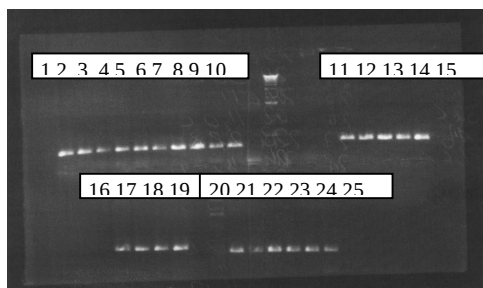


Abbildung 19. PCR-Produkte der QRDR der Stämme 1-10 für *gyrA* (Banden 1-10) und 1-6 für *parE* (Banden 20-25) sowie der Stämme 1-7 für *gyrB* (Banden 11-15) und 1-4 für *parC* (Banden 16-19). Die Produkte wiesen die erwarteten Längen auf. Die PCR wurde unter den in Kapitel 3.2.2.1 beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

Es folgte die Aufreinigung der PCR-Produkte. Ein Aufreinigungsgel ist in Abbildung 20 dargestellt.

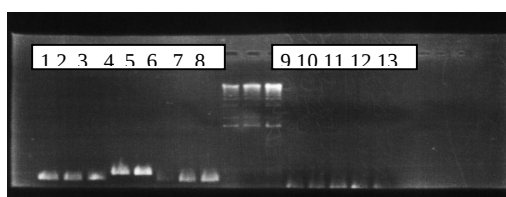


Abbildung 20. Agarosegel zur Kontrolle der Aufreinigung der PCR-Produkte.
Proben 1-3: Isolat 1-3, *gyrA*
Proben 4-5: Isolat 1-2, *gyrB*
Proben 6-8: Isolat 1-3, *parC*
Proben 9-13: Isolat 1-5, *parE*

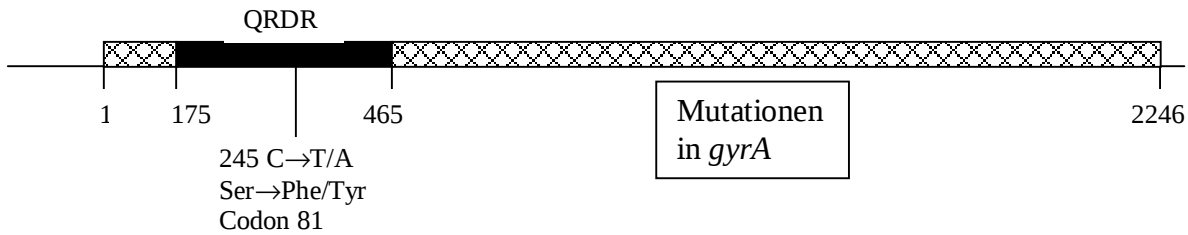
Die gefundenen Mutationen sind in der Tabelle 8 dargestellt. Mutationen zeigt Abbildung 21.

Tabelle 8

Nr	CIP	CIP+ RES	LEV	TRO	CLIN	GAT	MOX	SIT	GEM	GyrA	ParC	GyrB	ParE
1	4	1	2	0.25	0.125	0.5	0.25	0.06	0.06	-	-	-	Ile460Val
2	4	4	1	0.125	0.125	0.5	0.125	0.06	0.125	-	-	-	Ile460Val
3	4	1	2	0.5	0.125	0.5	0.25	0.06	0.125	-	-	-	-
4	4	2	2	0.25	0.125	0.5	0.25	0.06	0.06	-	-	-	Ile460Val
5	4	4	1	0.25	0.06	1	0.25	0.06	0.06	-	-	-	-
6	4	2	4	1	0.25	2	1	0.125	0.125	Ser81Phe	Ser79Phe	-	Ile460Val
7	4	1	2	1	0.125	0.5	0.25	0.06	0.125	-	-	-	Ile460Val
8	4	2	2	0.125	0.125	0.25	0.25	0.06	0.125	-	-	-	Ile460Val
9	4	4	4	1	0.25	2	1	0.125	0.125	Ser81Tyrr	Ser79Phe	-	Ile460Val
10	4	1	4	0.25	0.25	2	1	0.125	0.25	Ser81Phe	Asp83Asn	-	-
11	4	2	8	0.5	0.5	4	2	0.25	0.5	Ser81Tyrr	Asp83Asn	-	Ile460Val
12	4	4	2	0.25	0.125	0.5	0.5	0.25	0.25	-	-	-	Ile460Val
13	4	4	1	0.125	0.125	0.5	0.25	0.125	0.125	-	-	-	-
14	8	1	8	4	0.5	4	2	0.125	0.25	Ser81Phe	Ser79Phe	-	Ile460Val
15	8	2	4	0.5	0.25	2	1	0.25	0.25	Ser81Phe	Ser79Phe	-	Ile460Val
16	16	4	8	4	0.5	4	2	0.25	0.5	Ser81Tyrr	Asp83Asn	-	Ile460Val
17	16	8	8	4	0.5	4	2	0.25	0.25	Ser81Phe	Ser79Phe	-	-
18	16	8	16	8	0.5	8	4	0.5	0.5	Ser81Tyrr	Asp83Asn	-	Ile460Val
19	16	4	16	8	1	8	4	0.5	0.5	Ser81Phe	Asp83Asn	-	Ile460Val
20	16	2	16	4	0.5	4	2	0.25	0.25	Ser81Tyrr	Ser79Phe	-	-
21	16	4	8	2	1	4	2	0.5	0.5	Ser81Phe	Ser79Phe	-	-
22	16	8	8	4	0.5	4	2	0.25	0.2	Ser81Phe	Ser79Phe	-	Ile460Val
23	32	16	8	4	0.5	4	2	0.25	0.5	Ser81Tyrr	Ser79Phe	-	Ile460Val
24	32	8	8	2	0.5	2	2	0.25	0.25	Ser81Phe	Ser79Phe	-	Ile460Val
25	32	2	8	4	0.5	4	2	0.25	0.5	Ser81Tyrr	Asp83Asn	-	Ile460Val

Tabelle 8. Mutationen und MHK-Werte bei Pneumococcen mit Ciprofloxacinresistenz. Die Abkürzungen bedeuten: CIP: Ciprofloxacin; CIP+RES: Ciprofloxacin-MHK in Anwesenheit von Reserpin; TRO: Trovafloxacin; GAT: Gatifloxacin; MOX: Moxifloxacin; SIT: Sitafoxacin; Gem: Gemifloxacin; GyrA: Untereinheit A der Gyrase; GyrB: Untereinheit B der Gyrase; ParC: Untereinheit A der Topoisomerase IV; ParE: Untereinheit B der Topoisomerase IV

Abbildung 21. a) Mutationen im Gen *gyrA* (Untereinheit A der Gyrase)



QRDR:

129

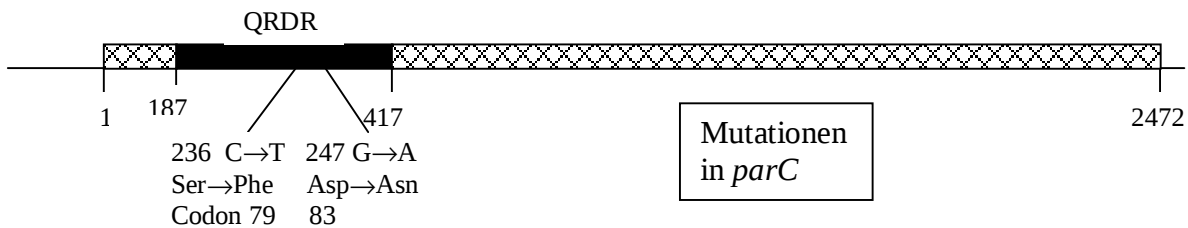
c cgt cgg att ctc tat gga atg aat gaa ttg ggt gtt act cca gac aac ccc cat aaa aaa tct gct cgt att aca
R R I L Y G M N E L G V T P D K P H K K S A R I T
ggg gac gtc atg ggt aaa tac cac cca cac ggg gat tac tct atc tat gaa gcc atg gtc cgc atg gct caa
G D V M G K Y H P H G D Y S I Y E A M V R M A Q
tgg tgg agc tac cgt tac atg ctt gta gat ggg cat gga aac ttt ggt tcc atg gat gga gat ggt gct gcc gcc
W W S Y R Y M L V D G H G N F G S M D G D G A A A
caa cgt tat act gag gca cgt atg agc aag att gct ttg gaa atg ctt cgt gat atc aat aag aat acg gtt gat
Q R Y T E A R M S K I A L E M L R D I N K N T V D
ttc gtt gat aac tat gat gcc aat gaa cgg gaa ccc tta gtc ttg cca gct cgt ttt cca aac ctt ttg gtc aat gga
F V D N Y D A N E R E P L V L P A R F P N L L V N G
gca act
A T
510

Primer

Mutationsorte

Beginn / Ende QRDR

b) Mutationen im Gen *parC* (Untereinheit A der Topoisomerase IV)

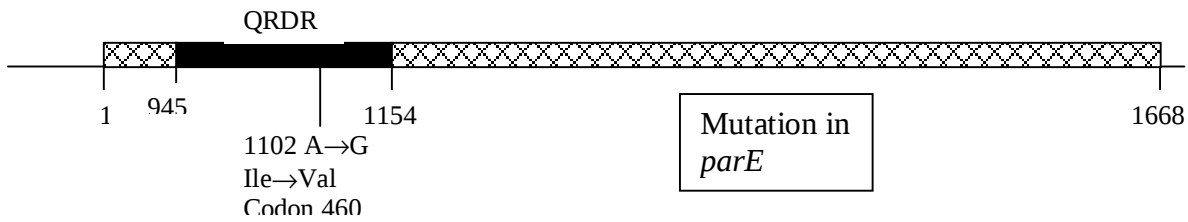


QRDR:

148

aag gat agc aat act ttt gac aag agc tac cgt aag tcg gcc aag tca gtc ggg aac atc atg ggg aat ttc cac
K D S N T F D K S Y R K S A K S V G N I M G N F H
cca cac ggg gat tct tct atc tat gat gcc atg gtt cgt atg tca cag gac tgg aaa aac cgt gag att ttg gtc
P H G D S S I Y D A M V R M S Q D W K N R E I L V
gaa atg cac ggt aac aac ggc tca atg gac gga gat cca cct gcg gct atg cgt tat act gag gcg cgt ttg tct
E M H G N N G S M D G D P P A A M R Y T E A R L S
gag att gct ggc tac ctt ctt caa gac atc gag aaa aag acc gtc cct ttt gct tgg aac ttt gac gat acc gag
E I A G Y L L Q D I E K K T V P F A W N F D D T E
aaa gaa cca ac
K E P
468

c) Mutationen im Gen *parE* (Untereinheit B der Topoisomerase IV)



QRDR:

904

```

aag gcg cgt gat gag agc cga aat ggg aag aaa aac aag aaa gat aag ggc ttg ttg tct ggg aaa ttg acc
K A R D E S R N G K K N K K D K G L L S G K L T
cca gcc caa tct aag aat cct gct aag aat gaa ctc tat cta gtt gag ggg gac tct gcc ggt ggt tct gcc aaa
P A Q S K N P A K N E L Y L V E G D S A G G S A K
caa ggt cgt gac cgc aag ttc cag gct att cta cct ctt cgt ggt aag gtt atc aat aca gcc aag gcc aag atg
Q G R D R K F Q A I L P L R G K V I N T A K A K M
gcg gat atc ctc aaa aat gaa gag atc aa acc atg att tat acc att ggt gcg ggt gtt gga gca ga
A D I L K N E E I N T M I Y T I G A G V G A

```

1193

Primer

Mutationsorte

Beginn / Ende QRDR

Abbildung 21 . Lage der QRDR im Gen und Lage der Mutationen in den QRDR von *gyrA*, *parC* und *parE*.

10 der 16 Isolate mit einer MHK ≥ 4 mg/l für Levofloxacin zeigten die Mutation in *parC* Ser79Phe und 6 die Mutation Asp83Asn. Alle 16 Isolate trugen in *gyrA* entweder die Mutation Ser81Phe oder Ser81Tyr. In den neun Isolaten, die eine MHK <4 mg/l für Levofloxacin, aber ≥ 4 mg/l für Ciprofloxacin aufwiesen, wurde keine dieser Mutationen gefunden. Von den 25 Ciprofloxacin-resistenten Isolaten wurde in 18 Fällen eine Mutation in *parE*, nämlich Ile460Val, gefunden. In *gyrB* wurden keine Mutationen gefunden.

Reserpin verringerte die MHK in 20 der ciprofloxacinresistenten Pneumococcen. Daher ist anzunehmen, dass ein Effluxpumpensystem in den meisten Fällen zur Resistenz beitrug.

Bei allen Isolaten, gleich welche Mutationen sie trugen, waren Gemifloxacin, Sitafloracin und Clinafloracin am aktivsten, während Ciprofloxacin am wenigsten aktiv war. Besonders Gemifloxacin und Sitafloracin zeigten niedrige MHK-Werte; der höchste lag bei 0,5 mg/l und damit unter dem Grenzwert für Resistenz (1 mg/l).

Von den 25 Ciprofloxacin-resistenten Isolaten wurden Resistenztestungen mittels Agardiffusionstest (siehe Kapitel 3.2.1.8c) für Penicillin und Erythromycin vorgenommen. Verminderte Ciprofloxacin-Sensibilität war häufig mit erhöhter Penicillin- und Erythromycin-Resistenz verbunden. 8 der 25 Pneumococcen waren hochresistent gegenüber Penicillin und 5 immerhin intermediär resistent, 11 Isolate waren hochresistent gegenüber Erythromycin und 1 intermediär resistent. Hier zeigt sich nochmals, dass Resistenz gegenüber Chinolonen häufig als Multiresistenz, also in Kombination mit der Penicillin-Resistenz auftritt. Bemerkenswert ist außerdem der deutlich geringere Einfluss von Resistenzmutationen auf neuere Fluorochinolone.

4.1.3 Das Disfluorochinolon BMS 294756

BMS 294756 ist die neueste Entwicklung unter den Chinolonen. Es trägt im Gegensatz zu den Fluorochinolonen keinen Fluor-Liganden an C-Atom 6. Damit einhergehen sollen geringere Nebenwirkungen. Es ist allerdings wichtig zu wissen, wie die in-vitro Aktivität dieser neuen Substanz im Vergleich mit den Fluorochinolonen aussieht, wie der Einfluss klassischer Resistenzmutationen ist und ob BMS ein Substrat für Effluxpumpen darstellt. Bei Pneumococcen sind außerdem verschiedene, problematische Resistenzphänotypen bekannt. Es wurde untersucht, wie BMS auf Vertreter dieser Phänotypen wirkt.

Dazu wurden die MHK-Werte für BMS und drei weitere Chinolone, die Fluorochinolone Ciprofloxacin, Gatifloxacin und Moxifloxacin gemessen. Die BMS-MHK-Werte wurden mit den beiden vermarkteten C-8-methoxy-Fluorochinolonen Moxifloxacin und Gatifloxacin und mit dem gebräuchlichsten Fluorochinolon, Ciprofloxacin, verglichen. Zusätzlich wurde bei einer großen Anzahl an Stämmen die QRDR von *gyrA*, *parC/grlA* (Gyraseuntereinheit A und Topoisomerase IV-Untereinheit A) und, bei Staphylococcen, *grlB* (Topoisomerase IV-Untereinheit B) sequenziert. Abbildung 22 zeigt ein Agarosegel einer PCR der Quinolone-determining region (QRDR).

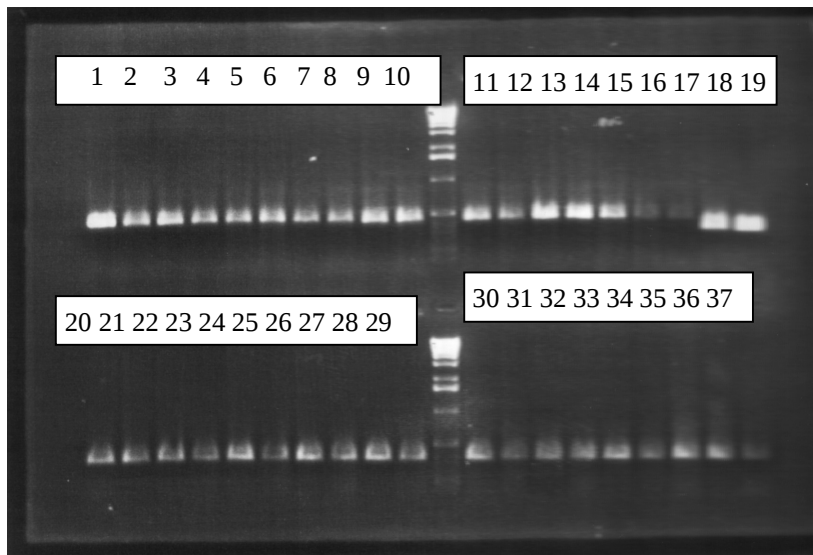


Abbildung 22. Gezeigt sind die PCR-Fragmente der QRDR von *grlA* (1-17) und *grlB* (18-37). Die Produkte wiesen die erwarteten Längen auf: 458 bp für *grlA* und 384 bp für *grlB*. Die PCR wurde unter den beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

Es stellte sich bei *S. aureus* heraus, dass BMS die aktivste Substanz war, gefolgt von Moxifloxacin und Gatifloxacin. Ciprofloxacin war am wenigsten aktiv.

Bei ciprofloxacinresistenten *S. aureus*-Stämmen war die in-vitro-Aktivität von BMS zwei- bis viermal größer als die von Moxifloxacin und vier- bis achtmal größer als die von Gatifloxacin. Ciprofloxacinresistente *S. aureus*-Isolate wurden von BMS in Konzentrationen von 0,06 – 0,5 mg/l inhibiert. Die Unterschiede in der in-vitro-Aktivität waren bei den ciprofloxacinsensiblen Stämmen geringer. Auch hier war BMS die potenteste Substanz mit MHK-Werten zwischen $\leq 0,015$ und 0,06 mg/l.

Isolate ohne die GrlA-Mutation Ser80Phe waren ciprofloxacinsensibel und hatten BMS-MHK-Werte von $\leq 0,06$ mg/l, die MHK-Werte für Moxifloxacin und Gatifloxacin lagen bei 0,12 und 0,5 mg/l.

Alle ciprofloxacinresistenten Stämme trugen eine Veränderung in GrlA (Ser80Phe) in Kombination mit einer Veränderung in GyrA, entweder Ser84Leu oder Glu88Lys. Die MHK-Werte für BMS betrugen 0,06 - 0,5 mg/l, 0,5 – 2 mg/l für Moxifloxacin und 1 – 8 mg/l für Gatifloxacin. Insgesamt war also Ciprofloxacin die am wenigsten aktive Substanz, gefolgt von Gatifloxacin und Moxifloxacin. BMS war bei allen gefundenen Mutationen und Mutationskombinationen die aktivste Substanz.

1998 waren in der Düsseldorfer Region erstmalig hetero-Vancomycin-intermediär resistente *S. Aureus* (VISA)-Stämme beschrieben worden (Geisel *et al.*, 1998). Diese sieben deutschen hetero-VISA-Stämme zeigten MHK-Werte von 128, 4, 2 und 0,5

mg/l für Ciprofloxacin, Gatifloxacin, Moxifloxacin und BMS. Es zeigte sich, dass auch hier BMS die höchste in-vitro-Aktivität aufwies.

Auch bei *S. pneumoniae* stellte sich heraus, dass BMS die Substanz mit der höchsten in-vitro-Aktivität war. *S. pneumoniae*-Isolate ohne Mutationen in GyrA und ParC (n=29) wiesen MHK-Werte für Ciprofloxacin von 0,25 – 4 mg/l und von $\leq 0,06$ – 0,12 mg/l für BMS auf.

Zehn Isolate mit einer einzelnen Veränderung in *parC* zeigten MHK-Werte von 0,5 – 4 mg/l für Ciprofloxacin und Werte $\leq 0,12$ mg/l für BMS.

Fünf Stämme mit einer Einzelmutation in *gyrA* hatten Ciprofloxacin-MHK-Werte von 2 – 16 mg/l und BMS-Werte von $\leq 0,12$ – 0,5 mg/l.

Es gab 26 Stämme mit kombinierten Mutationen. Isolate mit einer Ser81Phe – Mutation in GyrA und einer Ser79Phe – Mutation in ParC wiesen die höchsten MHK-Werte auf und zwar für Ciprofloxacin von 8 – 64 mg/l und für BMS von 0,25 – 1 mg/l.

Obwohl also einige Mutationskombinationen die MHK-Werte aller Chinolone anhoben, blieb BMS extrem aktiv, mit dem höchsten MHK-Wert bei 1mg/l.

BMS ist also wirksam bei Pneumococcen, auch bei solchen mit erhöhten Ciprofloxacin-MHK-Werten.

Die Tabellen 9 und 10 zeigen die Verteilung der MHK-Werte der vier Antibiotika bei den jeweiligen Mutationen.

Tabelle 9. Mutationen und resultierende Aminosäurenaustausche in *grlA*, *grlB* und *gyrA* und korrelierende MHKs(*S. aureus*)

Mutationen und resultierende Aminosäurenaustausche				Anzahl der Isolate mit MHK (mg/L)													
				0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128 256
-	-	-	ciprofloxacin				11	15	6	3	1						
			gatifloxacin														
			moxifloxacin	2	4	28	2										
			BMS-284756	2	22	12											
-	-	Ser112Arg	ciprofloxacin					1									
			gatifloxacin														
			moxifloxacin			1											
			BMS-284756		1												
-	Glu422Asp	Glu88Lys	ciprofloxacin							1							
			gatifloxacin														
			moxifloxacin				1										
			BMS-284756			1											
Ile45Met	Glu422Asp	-	ciprofloxacin						2								
			gatifloxacin														
			moxifloxacin			1	1										
			BMS-284756	1	1												
Pro144Ser	-	-	ciprofloxacin					1									
			gatifloxacin														
			moxifloxacin			1											
			BMS-284756		1												
Pro144Ser	Glu422Asp	-	ciprofloxacin					1	2								
			gatifloxacin				2	1									
			moxifloxacin			3											
			BMS-284756		3												
Ser80Phe	-	-	ciprofloxacin								1						
			gatifloxacin														
			moxifloxacin			1											
			BMS-284756			1											
Ser80Phe	-	Ser84Leu	ciprofloxacin										4	22	13	7	1
			gatifloxacin														
			moxifloxacin						14	32	1						

BMS-284756				4 30 13														
Mutationen und resultierende Aminosäureaustausche				Anzahl der Isolate mit MHK (mg/L)														
<i>grlA</i>	<i>grlB</i>	<i>gyrA</i>	Antibiotikum	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
Ser80Phe	-	Glu88Lys	ciprofloxacin										1	9	2			
			gatifloxacin															
			moxifloxacin						3	9								
			BMS-284756				3	3	6									
Ser80Phe	-	Ser84Leu	ciprofloxacin												1			
Gly106Asp			gatifloxacin															
			moxifloxacin							1								
			BMS-284756						1									
Ser80Phe	Asp432Gly	Ser84Leu	ciprofloxacin												1			
			gatifloxacin															
			moxifloxacin							1								
			BMS-284756						1									
Ser80Phe	-	Glu88Lys	ciprofloxacin													1	2	1
Glu84Val			gatifloxacin															
			moxifloxacin							3	1							
			BMS-284756					3	1									
Ser80Phe	-	Ser84Leu	ciprofloxacin													2		1
Ala48Thr			gatifloxacin															
			moxifloxacin							3								
			BMS-284756					2	1									
Ser80Phe	Pro451Ser	Ser84Leu	ciprofloxacin															1
Ala48Thr			gatifloxacin															
			moxifloxacin							1								
			BMS-284756					1										
Ser80Phe	Glu422Asp	-	ciprofloxacin															
Ile45Met			gatifloxacin															
			moxifloxacin				1											
			BMS-284756			1												
Ser80Phe	Glu422Asp	Ser84Leu	ciprofloxacin													1		
Val41Gly			gatifloxacin															
Ile45Met			moxifloxacin															

Tabelle 10. Mutationen und resultierende Aminosäureaustausche in *parC* und *gyrA* und korrelierende MHKs (*S. pneumoniae*)

Aminosäureaustausche		Antibiotikum	Anzahl der Isolate mit MHK (mg/L)										
<i>parC</i>	<i>gyrA</i>		≤0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	≥64
-	-	ciprofloxacin			1	6	14	7	1				
		gatifloxacin	1	3	19	6							
		moxifloxacin	2	17	8	2							
		BMS-284756	18	11									
Arg95Cys	-	ciprofloxacin				1		1					
		gatifloxacin				2							
		moxifloxacin		2									
		BMS-284756	1	1									
Lys137Asn	-	ciprofloxacin				1	3	2					
		gatifloxacin			6								
		moxifloxacin		6									
		BMS-284756	3	3									
Ser79Phe	-	ciprofloxacin						1	1				
		gatifloxacin				1	1						
		moxifloxacin			2								
		BMS-284756		2									
-	Ser81Phe	ciprofloxacin								1	1		
		gatifloxacin						1	1				
		moxifloxacin					1	1					
		BMS-284756			1	1							
-	Ser81Tyr	ciprofloxacin						1	1	1			
		gatifloxacin				1	1	1					
		moxifloxacin		1	2								
		BMS-284756		2	1								
Asp78Asn	Ser81Phe	ciprofloxacin							1				
		gatifloxacin						1					
		moxifloxacin					1						
		BMS-284756			1								

Ser79Phe	Ser81Phe	ciprofloxacin									4	6	3	3
		gatifloxacin						3	8	5				
		moxifloxacin					5	9	2					
		BMS-284756		3	9	4								
Aminosäureaustausche			Anzahl der Isolate mit MHK (mg/L)											
<i>parC</i>	<i>gyrA</i>	Drug	≤0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	≥64	
Ser79Phe	Ser81Phe	ciprofloxacin								2	2			
Lys137Asn		gatifloxacin								2	2			
		moxifloxacin						3	1					
		BMS-284756				2	2							
Asp83Asn	Ser81Phe	ciprofloxacin							2					
Lys137Asn		gatifloxacin						2						
		moxifloxacin				1	1							
		BMS-284756			2									
Asp78Asn	Ser81Phe	ciprofloxacin							1					
Arg95Cys		gatifloxacin						1						
		moxifloxacin					1							
		BMS-284756				1								
Asp78Asn	Ser81Phe	ciprofloxacin									1			
Lys137Asn		gatifloxacin							1					
		moxifloxacin						1						
		BMS-284756					1							

Es wurden außerdem 593 *S. pneumoniae*-Stämme untersucht, die an Atemwegs-, Haut- oder Schleimhaut- und Blutinfektionen beteiligt waren und im Rahmen von Surveillance-Studien zwischen 1997 und 2000 in ganz Europa gesammelt wurden.

Diese Isolate wurden in sechs resistenzphänotypische Gruppen aufgeteilt:

1. absolut sensibel gegenüber Penicillin, Erythromycin, Clindamycin, Tetracyclin, Trimethoprim/Sulfomethoxacol (Cotrimoxacol) und Ciprofloxacin (n=100)
2. resistent gegenüber Erythromycin und Clindamycin (*erm(B)*-Genotyp; n=157)
3. resistent gegenüber Erythromycin, aber sensibel gegenüber Clindamycin (*mef(E)*-Genotyp; n=58)
4. resistent gegenüber Tetracyclin (n=200)
5. resistent gegenüber Trimethoprim/Sulfomethoxacol (n=50)
6. verminderte Empfindlichkeit gegenüber Ciprofloxacin bei MHK-Werten $\geq 4\text{mg/L}$ (bekannte Mutationen in den QRDR von *gyrA* und *parC*: 24 Isolate mit Ser81Phe , 4 mit Ser81Tyr in *gyrA* sowie 20 Isolate mit Ser79Phe, 6 mit Asp83Asn und 2 mit Asp78Asn in *parC*; n=28)

Bei den Pneumococcen der Gruppen 1-5 zeigte BMS eine gute in-vitro-Aktivität mit MHK-Spannweiten von $\leq 0,015\text{-}0,125\text{ mg/l}$ für alle vier Gruppen. Lediglich in Gruppe 6 waren die BMS-MHK-Werte erhöht; es zeigte sich eine Spannweite von $0,125\text{-}1\text{ mg/l}$.

Reserpin zeigte in keinem Fall einen Einfluss auf die BMS-MHK-Werte, obwohl die Testungen mit Ciprofloxacin und Reserpin zeigten, dass einige der getesteten Stämme über ein Effluxpumpensystem verfügten. Tabelle 11 zeigt die MHK-Werte Verteilung bei den unterschiedlichen Pneumococcengruppen. (MHK in mg/l). Abbildung 32 stellt zum Vergleich die MHK₉₀-Werte dar.

Tabelle 11

Gruppe	Antibiotikum	MHK-Werte	MHK50	MHK90
1	Ciprofloxacin	0,03-2	1	2
	Gatifloxacin	$\leq 0,015-0,5$	0,25	0,5
	Moxifloxacin	$\leq 0,015-0,25$	0,125	0,25
	BMS	$\leq 0,015-0,125$	0,06	0,125
2	Ciprofloxacin	0,06-2	1	2
	Gatifloxacin	$\leq 0,015-0,5$	0,25	0,5
	Moxifloxacin	$\leq 0,015-0,25$	0,25	0,25
	BMS	$\leq 0,015-0,125$	0,06	0,125
3	Ciprofloxacin	0,03-2	1	2
	Gatifloxacin	$\leq 0,015-0,5$	0,25	0,5
	Moxifloxacin	$\leq 0,015-0,25$	0,125	0,25
	BMS	$\leq 0,015-0,125$	0,06	0,125
4	Ciprofloxacin	0,03-2	1	2
	Gatifloxacin	$\leq 0,015-0,5$	0,5	0,5
	Moxifloxacin	$\leq 0,015-0,25$	0,25	0,5
	BMS	$\leq 0,015-0,125$	0,06	0,125
5	Ciprofloxacin	0,03-2	1	1
	Gatifloxacin	$\leq 0,015-0,5$	0,25	0,5
	Moxifloxacin	$\leq 0,015-0,25$	0,25	0,25
	BMS	$\leq 0,015-0,125$	0,06	0,125
6	Ciprofloxacin	4-64	8	32
	Gatifloxacin	1-8	2	4
	Moxifloxacin	0,25-4	1	2
	BMS	0,125-1	0,25	0,5

Tabelle 11. Fluorochinolonaktivitäten bei Pneumococcen mit verschiedenen Resistenzphänotypen. MHK, MHK90 und MHK50 in mg/l. MHK90 ist derjenige MHK-Wert, bei dem 90% aller Isolate inhibiert wurden. Analog dazu ist MHK50 derjenige MHK-Wert, bei dem 50% aller Isolate inhibiert wurden.

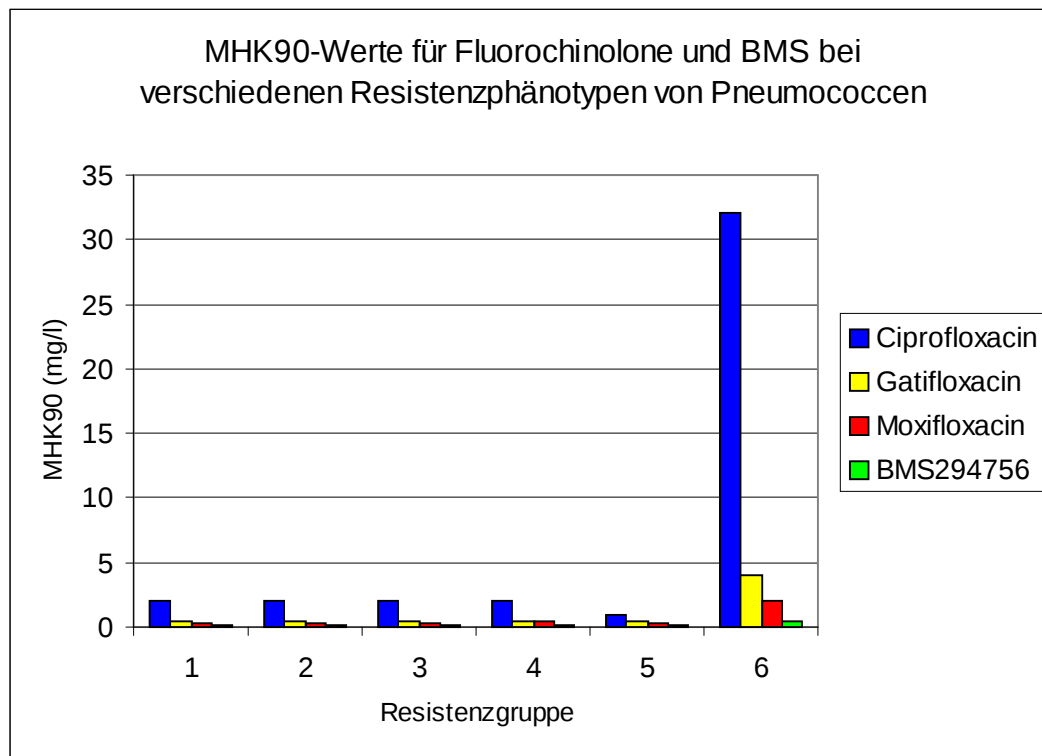


Abbildung 23. MHK90-Werte für verschiedene Chinolone bei den einzelnen Resistenzgruppen bei Pneumococci. Der Vergleich der MHK90-Werte zeigt deutlich die größere Aktivität von BMS gegenüber den anderen Chinolonen bei den verschiedenen Pneumococcengruppen. Dies wird besonders deutlich in Gruppe 6, Ciprofloxacin-resistente Pneumococci.

BMS 294756 zeigt also in allen Bereichen eine gute in-vitro Aktivität, besonders im Vergleich mit älteren Fluorochinolonen wie Ciprofloxacin und bei problematischen Resistenzphänotypen. Es ist deutlich zu sehen, dass die klassischen Resistenzmutationen auf BMS einen wesentlich geringeren Einfluss haben als auf die älteren Fluorochinolone.

Da BMS auch kein Substrat für Effluxpumpen darzustellen scheint, ist seine Wirksamkeit von den klassischen Resistenzmechanismen gegenüber Chinolonen weitgehend ungestört.

4.2 MLS-Antibiotika

MLS-Antibiotika zielen auf die Proteinbiosynthese, indem sie an verschiedene Strukturen der bakteriellen Ribosomen binden. Es gibt verschiedene Resistenzmechanismen gegenüber MLS-Antibiotika, und zwar Veränderungen der Zielstrukturen durch Methylasen oder Mutationen in den entsprechenden Genen, Effluxtransport der Antibiotika aus der Zelle und Veränderungen der Antibiotika durch eine Vielzahl recht spezifischer Enzyme (Roberts *et al.*, 1999). Die vorgenommenen Untersuchungen dienten auch hier der Ermittlung der aktuellen Resistenzlage sowie der Verteilung und dem Auftreten der wichtigsten Resistenzgene *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)* (rRNA-Methylasen), *ere(A)*, *ere(B)* (Erythromycin-Esterasen), *msr(A/B)* (ABC-Transporter) und *mef(A)* (Effluxpumpe). *erm(A)* und *erm(C)* können sowohl induziert als auch konstitutiv exprimiert werden, wofür Unterschiede im Translationsattenuator verantwortlich sind. Diese Strukturen sind bei *erm(C)* recht gut bekannt. Bei *erm(A)* gab es bislang noch keine Studien an klinischen Isolaten. Deshalb wurden die Translationsattenuatoren verschiedener klinischer Isolate mit konstitutiver *erm(A)*-Expression sequenziert. Eine neue, ebenfalls zu den MLS-Antibiotika zählende Substanzgruppe sind die Ketolide. Sie gelten als nicht-Induzierer; es sollte aber untersucht werden, ob diese Substanzen in der Lage wären, trotzdem Mutanten mit konstitutiver *erm(A)*-Expression zu selektionieren.

4.2.1 Epidemiologische Verteilung der Resistenzen

Um die aktuelle Resistenzlage zu untersuchen, wurden bei großen Stammkollektiven die MHK-Werte von Vertretern aller MLS-Antibiotikagruppen gemessen. Besonders interessant war dabei das Kombinationspräparat Synercid aus einem Streptogramin A und einem Streptogramin B. Dabei sollte insbesondere auch der Vergleich zwischen MRSA und MSSA gezogen werden.

4.2.1.1 *S. aureus*

Besonders problematisch unter den Staphylococcen sind die MRSA. Um vergleichen zu können, wie wirksam die MLS-Antibiotika im Vergleich MRSA-MSSA sind, wurden 764 MRSA und 2287 MSSA auf ihre MHK-Werte für Erythromycin (als Makrolid), Clindamycin (als Lincosamid) und Synercid (als Streptograminpräparat) untersucht.

Abbildung 24 zeigt exemplarisch eine MHK-Mikrotiterplatte.

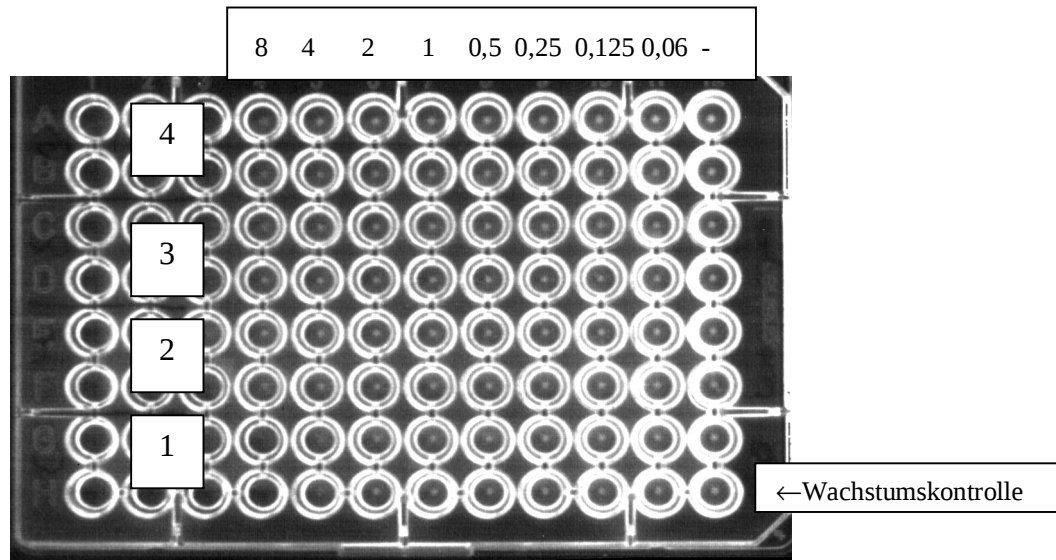


Abbildung 24. Mikrotiterplatte, mit einer Verdünnungsreihe für Erythromycin von 8 mg/l –0,06 mg/l. Hier wurden die MHK-Werte von 4 *S. aureus*-Isolaten gemessen. Die Reihe rechts ist die Wachstumskontrolle. Bakterienwachstum manifestierte sich als weißer Punkt am Boden der „Wells“. Hier ergeben sich folgende MHK-Werte: Stamm 1: 4 mg/l; Stamm 2: >8 mg/l; Stamm 3: >8mg/l; Stamm 4: >8mg/l

Von den MRSA waren 84,5% resistent gegenüber Erythromycin, 76% resistent gegenüber Clindamycin und nur 2,8% resistent gegenüber Synercid, einem Kombinationspräparat aus einem Streptogramin A und einem Streptogramin B (Quinopristin/ Dalfopristin). Von den MSSA waren 16,8% resistent gegenüber Erythromycin, 6,0% resistent gegenüber Clindamycin und 0,6% resistent gegenüber Synercid.

Man sieht also deutlich, dass die Methicillin-Resistenz signifikant häufiger mit einer Erythromycin- und Clindamycin-Resistenz einhergeht. Insgesamt wiesen 0,9% alle Isolate eine Synercidresistenz auf. Tabelle 12 zeigt die Verteilung der MHK-Werte.

Tabelle 12. a) Methicillin-resistente *S. aureus*

MHK (mg/l)	Anzahl Isolate mit MHK X	Prozent Isolate mit MHK X	kumulativer Prozentsatz
Erythromycin			
≤0,06	0	0	0
0,125	7	0,9	0,9
0,25	28	3,7	4,6
0,5	40	5,2	9,8
1	12	1,6	11,4
2	17	2,2	13,6
4	7	0,4	14,5
8	8	1,0	15,5
>8	645	84,4	100
Clindamycin			
≤0,06	16	2,1	2,1
0,125	97	12,7	14,8
0,25	60	7,9	22,7
0,5	5	0,7	23,4
1	4	0,5	23,9
2	1	0,1	24,0
4	2	0,3	24,3
8	7	0,9	25,2
>8	572	74,9	100
Synercid			
≤0,06	1	0,1	0,1
0,125	23	3,0	3,1
0,25	167	21,9	25,0
0,5	427	55,9	80,9
1	111	14,5	95,4
2	14	1,8	97,2
4	3	0,4	97,6
8	12	1,6	99,2
>8	6	0,8	100

Tabelle 12a). Minimale Hemmkonzentrationen für Methicillin-resistente *S. aureus* Isolate (N=764). Dargestellt sind für verschiedene Antibiotika die Anzahl N der Isolate mit dem jeweiligen MHK-Wert, der prozentuale Anteil dieser Isolate sowie der kumulative Prozentsatz der Hemmung beim MHK-Wert.

Tabelle 12. b) Methicillin-sensible *S. aureus*

MHK (mg/l)	Anzahl Isolate mit MHK X	Prozent Isolate mit MHK X	kumulativer Prozentsatz
Erythromycin			
≤0,06	2	0,1	0,1
0,125	19	0,8	0,9
0,25	716	31,3	32,2
0,5	1011	44,2	76,4
1	149	6,5	82,9
2	6	0,3	83,2
4	13	0,6	83,8
8	10	0,4	84,2
>8	361	15,8	100
Clindamycin			
≤0,06	82	3,6	3,6
0,125	1579	69,0	72,6
0,25	460	20,1	92,7
0,5	20	0,8	93,5
1	6	0,3	93,8
2	2	0,1	93,9
4	0	0	93,9
8	0	0	93,9
>8	138	6,0	100
Synercid			
≤0,06	7	0,3	0,3
0,125	178	7,8	8,1
0,25	1372	60,0	68,1
0,5	656	28,7	96,8
1	61	2,7	99,5
2	7	0,3	99,8
4	0	0	99,8
8	6	0,3	100

Tabelle 12b). Minimale Hemmkonzentrationen für Methicillin-sensible *S. aureus*-Isolate (N=2287). Dargestellt sind für verschiedene Antibiotika die Anzahl N der Isolate mit dem jeweiligen MHK-Wert, der prozentuale Anteil dieser Isolate sowie der kumulative Prozentsatz der Hemmung beim MHK-Wert.

Der Zusammenhang zwischen Erythromycin-Resistenz und Methicillin-Resistenz wird in Abbildung 25 deutlich:

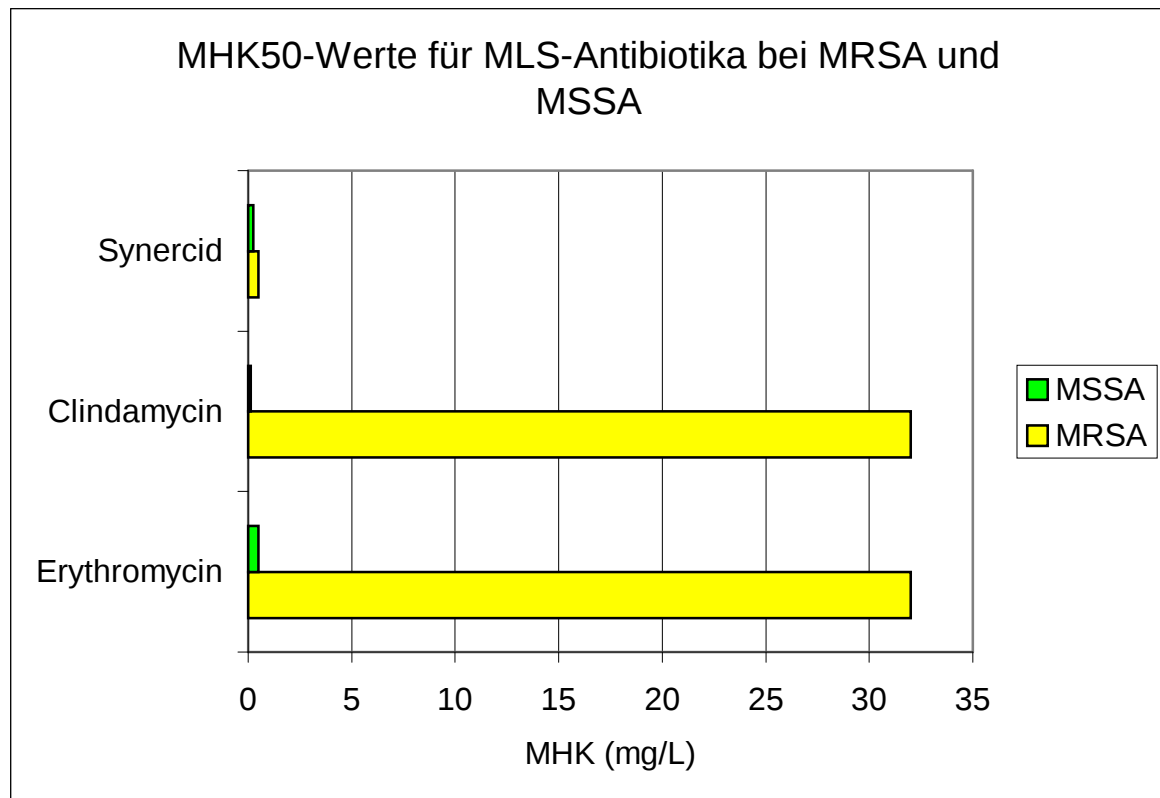


Abbildung 25. MHK50-Werte für Methicillin-resistente (MRSA) und –sensible (MSSA) *S. aureus*. MHK50 ist der MHK-Wert, bei dem 50% aller Isolate inhibiert wurden. Hier wird der Zusammenhang zwischen MLS- und Methicillin-Resistenz deutlich.

Man kann also deutlich erkennen, dass MRSA im Allgemeinen gegenüber MLS-Antibiotika wesentlich unempfindlicher sind. Dies bestätigt noch einmal die Tatsache, dass auch die MLS-Resistenz zu den zahlreichen Multiresistenzen der Methicillin-Resistenz gehört. Multiresistenz bedeutet, dass Resistenzen gegen die einzelnen Antibiotikaklassen häufig zusammen auftreten, wobei die Resistenz aber jeweils durch unterschiedliche Mechanismen vermittelt wird. Synercid ist dabei deutlich aktiver als die anderen Substanzen. Obwohl aber hier die meisten Isolate bei den MRSA MHK-Werte im unteren Bereich aufweisen, sind auch Isolate mit stark erhöhten MHK-Werten zu finden. In Zukunft muss deshalb wohl mit einer verstärkten Resistenzzunahme auch bei Synercid gerechnet werden.

4.2.1.2 *S. pneumoniae*

1191 klinische Pneumococccen-Isolate wurden auf ihre MHK-Werte für verschiedene MLS-Antibiotika untersucht, um die Ausbreitung resistenter Isolate festzustellen. Vertreter der Klasse der Makrolid-bzw. Lincosamidantibiotika waren Erythromycin, Azithromycin, Clarithromycin und Clindamycin. Außerdem wurde das Streptograminkombinat Synercid untersucht. 19,4 % der Isolate zeigten eine Resistenz gegenüber Erythromycin und 14,3 % gegenüber Clindamycin. Es konnten keine Synercid-resistenten Pneumococccen entdeckt werden. Tabelle 13 zeigt die Verteilung der MHK-Werte unter den Isolaten.

Eine Mikrotiterplatte wird beispielhaft in Abbildung 26 gezeigt. Tabelle 13 zeigt die MHK-Werte für die einzelnen Makrolid-Lincosamid-Streptogramin-Antibiotika (MLS-Antibiotika). Die MLS-Resistenz ist also bei Pneumococccen noch nicht so weit verbreitet. Dies wird in Abbildung 27 verdeutlicht.

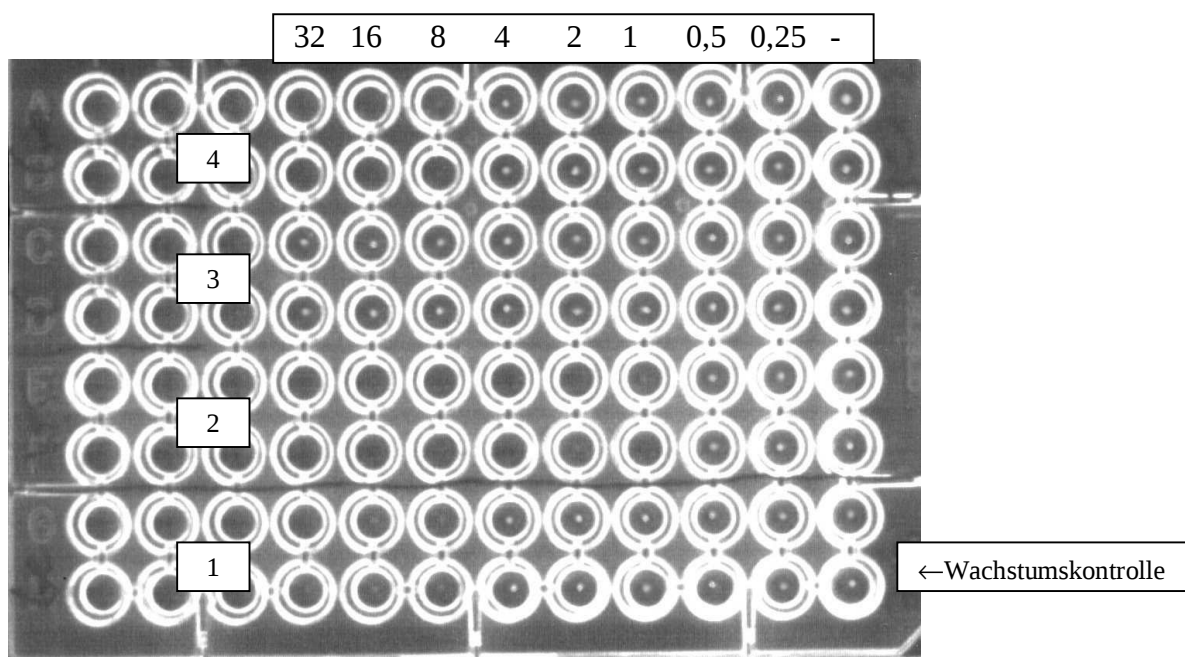


Abbildung 26 .Mikrotiterplatte, mit einer Verdünnungsreihe für Erythromycin von 32 mg/l –0,25 mg/l. Hier wurden die MHK-Werte von 4 *S. pneumoniae* -Isolaten gemessen. Die Reihe rechts ist die Wachstumskontrolle. Bakterienwachstum manifestierte sich als weißer Punkt am Boden der „Wells“. Hier ergeben sich folgende MHK-Werte: Stamm 1: 8 mg/l; Stamm 2: 1 mg/l; Stamm 3: >32mg/l; Stamm 4: 8mg/l

Tabelle 13. MHK-Werte für MLS-Antibiotika bei Pneumococcen

MHK (mg/l)	Anzahl Isolate mit MHK X	Prozent Isolate mit MHK X	kumulativer Prozentsatz
Erythromycin	Grenzwert für resistente Erreger: ≥ 1 mg/l		
$\leq 0,25$	928	77,9	77,9
0,5	32	2,7	80,6
1	29	2,4	83,0
2	18	1,5	84,5
4	15	1,3	85,8
8	5	0,4	86,2
16	7	0,6	86,8
32	15	1,3	88,1
>32	142	11,9	100
Clindamycin	Grenzwert für resistente Erreger: ≥ 1 mg/l		
$\leq 0,06$	972	81,6	81,6
0,125	36	3,0	84,6
0,25	8	0,7	85,3
0,5	5	0,4	85,7
1	5	0,4	86,1
2	2	0,2	86,3
4	9	0,8	87,1
8	14	1,2	88,3
>8	140	11,8	100
Azithromycin	Grenzwert für resistente Erreger: ≥ 2 mg/l		
$\leq 0,125$	918	77,1	77,1
0,25	22	1,8	78,9
0,5	18	1,5	80,4
1	20	1,7	82,1
2	18	1,5	83,6
4	12	1,0	84,6
8	5	0,4	85,0
16	15	1,3	86,3
>16	163	13,7	100
Clarithromycin	Grenzwert für resistente Erreger: ≥ 2 mg/l		
$\leq 0,25$	953	80,0	80,0
0,5	20	1,7	81,7
1	29	2,4	84,1
2	10	0,8	84,9
4	8	0,7	85,6
8	7	0,6	86,2
16	8	0,7	86,9
32	11	0,9	87,8
>32	145	12,2	100
Synercid			
$\leq 0,06$	30	2,5	2,5
0,125	82	6,9	9,4
0,25	369	31,0	40,4
0,5	473	39,7	80,1
1	206	17,3	97,4
2	31	2,6	100

Tabelle 13. Minimale Hemmkonzentrationen für Pneumococcen bei MLS-Antibiotika. Dargestellt sind für verschiedene Antibiotika die Anzahl N der Isolate mit dem jeweiligen MHK-Wert, der prozentuale Anteil dieser Isolate sowie der kumulative Prozentsatz der Hemmung beim MHK-Wert.

Abbildung 27

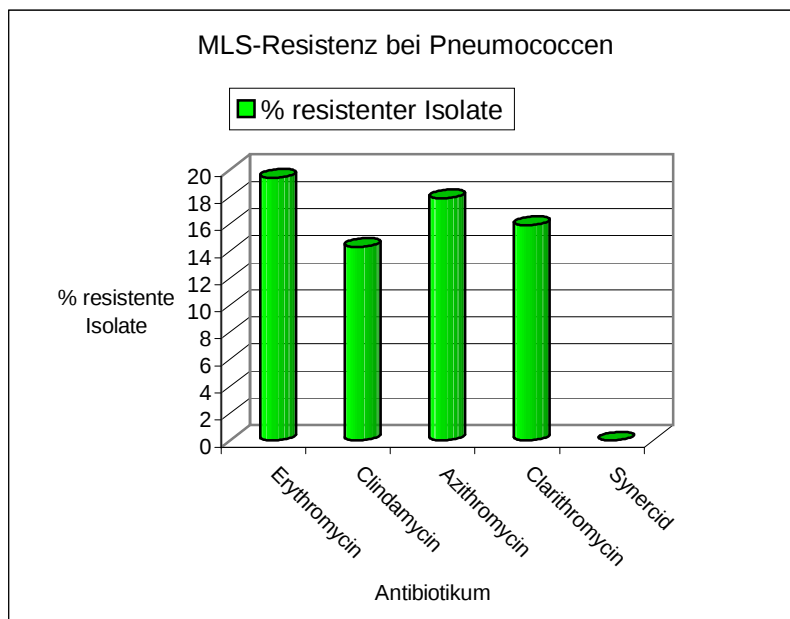


Abbildung 27. Resistenz gegenüber MLS-Antibiotika bei Pneumococcen. Die Resistenzraten für die einzelnen Pneumococcen bei den untersuchten MLS-Antibiotika sind noch nicht so hoch wie bei Staphylococcen. Für Synercid wurden keine resistenten Isolate gefunden.

Besonders Synercid erwies sich als potente Substanz, da hier kein einziges resistentes Isolat gefunden werden konnte. Trotzdem ist zu befürchten, dass die Resistenzrate eher steigen wird.

4.2.2 Epidemiologische Verteilung der Makrolidresistenzgene

Es gibt eine Vielzahl an Enzymen, die eine Resistenz gegen MLS-Antibiotika vermitteln. Die Wichtigsten bei Staphylococcen und Pneumococcen werden durch die Gene *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)* (rRNA-Methylasen), *ere(A)*, *ere(B)* (Erythromycin-Esterasen), *msr(A/B)* (ABC-Transporter) und (bei Pneumococcen) *mef(E)* (Effluxpumpe) kodiert. Es sollte untersucht werden, welche dieser Gene in den europäischen Kollektiven von Staphylococcen und Pneumococcen bevorzugt auftreten. Da die Gene *erm(A)* und *erm(C)* bei *S. aureus* konstitutiv oder induziert exprimiert werden, wurde auch untersucht, welches der beiden Gene bevorzugt bei konstitutiver Expression zu finden war. Konstitutive Expression manifestiert sich phänotypisch dadurch, dass sowohl eine Resistenz gegen Erythromycin als auch gegen Clindamycin besteht, während bei induzierter Expression nur Resistenz gegen den Induzierer Erythromycin ausgebildet wird. Auch hier sollte der Unterschied im Genbesatz zwischen MRSA und MSSA sowie zwischen

Penicillin-resistenten und –sensiblen Pneumococcen untersucht werden. Dazu wurden bei den einzelnen Isolaten Fragmente der entsprechenden Gene mittels PCR amplifiziert und im Agarosegel nachgewiesen.

4.2.2.1 *S. aureus*

493 MRSA und 358 MSSA wurden auf das Vorhandensein der verschiedenen Resistenzgene mittels PCR untersucht, um das Auftreten der Resistenzgene in den einzelnen Isolatgruppen zu ermitteln. Die PCR-Bedingungen sind im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben. Die Amplifikate hatten folgende Längen:

erm(A): 644 bp

erm(B): 638 bp

erm(C): 641 bp

ere(A): 425 bp

ere(B): 558 bp

msr(A/B): 398 bp

Abbildung 28 zeigt die Agarosegele von PCRs für alle gefundenen Gene.

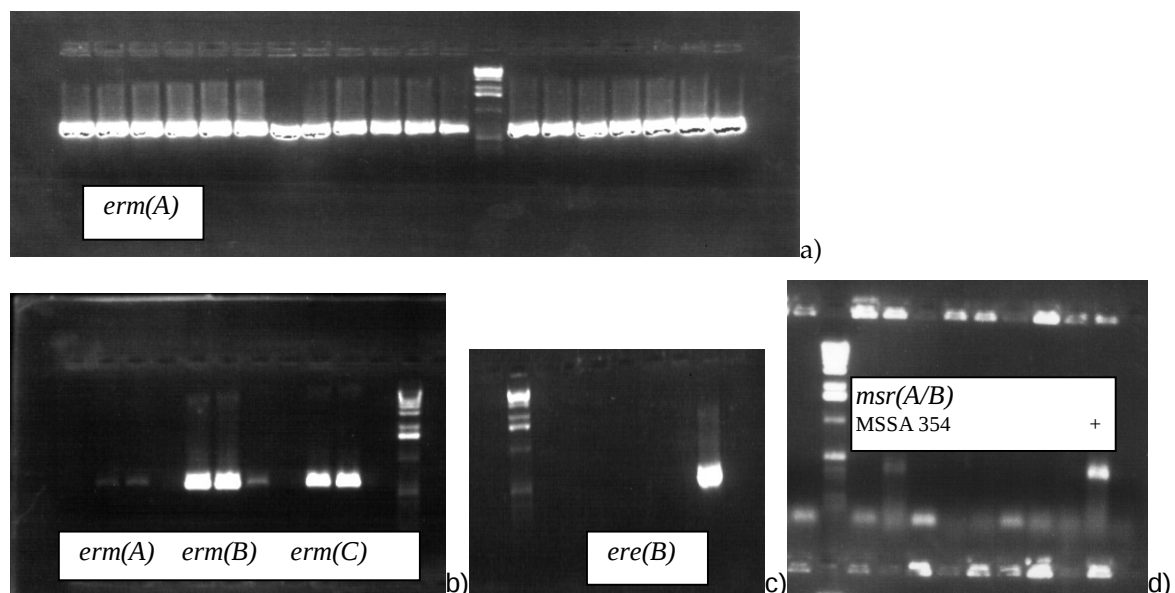


Abbildung 28. PCR-Amplifikation von Fragmenten der MLS-Resistenzgene. Gezeigt sind die PCR-Produkte der MLS-Resistenzgene der Stämme MRSA 1-21 für *erm(A)* (Bild a und Bild b), MSSA 298 und MRSA 51 für *erm(B)* (Bild b), MSSA 20-21 für *erm(C)* (Bild b), MRSA 427 für *ere(B)* (Bild c) und MSSA 354 + Positivkontrolle für *msr(A/B)* (Bild d). Die Produkte wiesen die erwarteten Längen auf. Die PCR wurde unter den in Kapitel 3.2.2.1 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Das Gel wurde wie in Kapitel 3.2.2.3 beschrieben gefahren.

Der prozentuale Anteil Erythromycin-resistenter MRSA lag mit 84,5% 5,3-fach höher als bei MSSA-Isolaten (15,8%). Insgesamt 93% der Erythromycin-resistenten MRSA-Isolate, aber nur lediglich 44% der genetisch analysierten Erythromycin-resistenten MSSA wiesen phänotypisch eine konstitutive MLS_B-Resistenz auf. Das bedeutet, sie waren sowohl resistent gegenüber Erythromycin als auch gegenüber Clindamycin als auch gegenüber Streptogramin B. Die restlichen Erythromycin-resistenten *S. aureus*-Isolate zeigten den induzierbaren MLS_B-Resistenz-Phänotyp, was heißt, dass sie nur gegenüber Erythromycin resistent waren..

Die Ergebnisse der PCR-Untersuchungen sind in Tabelle 14 zusammengefasst. Abbildung 29 verdeutlicht die Zusammenhänge zwischen dem Auftreten bestimmter Gene und der Art des Isolates.

Tabelle 14

Gen	MRSA (n=493)		MSSA (n=358)	
	konstitutiv (n=458;93%)	induziert (n=35; 7%)	konstitutiv (n=158; 44%)	induziert (n=200; 56%)
<i>erm(A)</i>	397 (86,7%)	26 (74,2%)	92 (58,2%)	30 (15%)
<i>erm(B)</i>	2 (0,4%)	0	0	3 (1,5%)
<i>erm(C)</i>	9 (2,0%)	3 (8,6%)	34 (21,5%)	120 (60%)
<i>erm(A)+erm(C)</i>	9 (2,0%)	3 (8,6%)	11 (7,0%)	3 (1,5%)
<i>ere(B)</i>	5 (1,1%)	0	0	0
<i>msr(A)/msr(B)</i>	0	0	13 (8,2%)	35 (17,5%)
kein Gen	36 (7,9%)	3 (8,6%)	8 (5,1%)	9 (4,5%)

Tabelle 14. Gen verteilung der MLS-Resistenzgene bei Methicillin-resistenten und –sensiblen *S. aureus*-Isolaten. Gezeigt ist in absoluten Zahlen und in Prozent, wieviele der untersuchten Isolate über ein bestimmtes Gen verfügten.

Abbildung 29

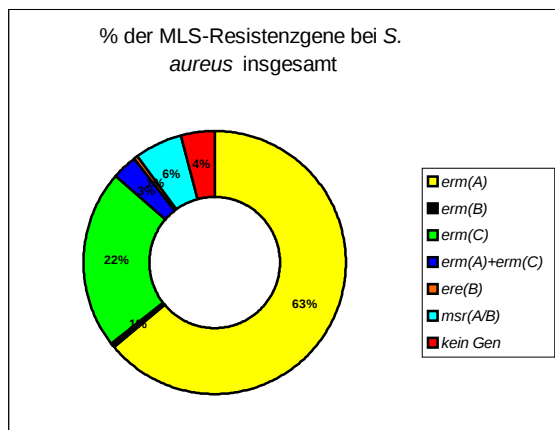
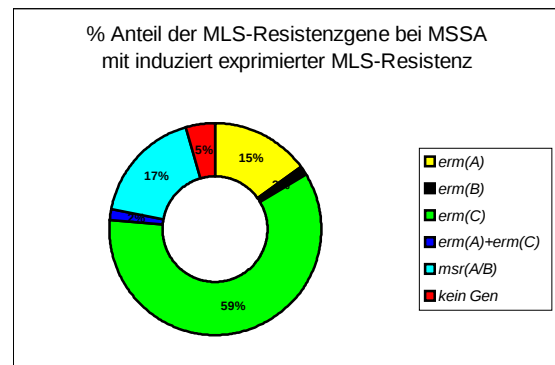
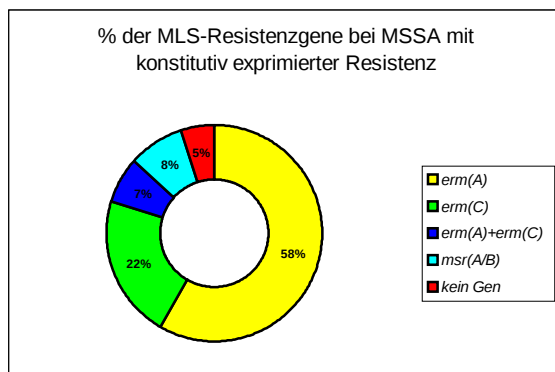
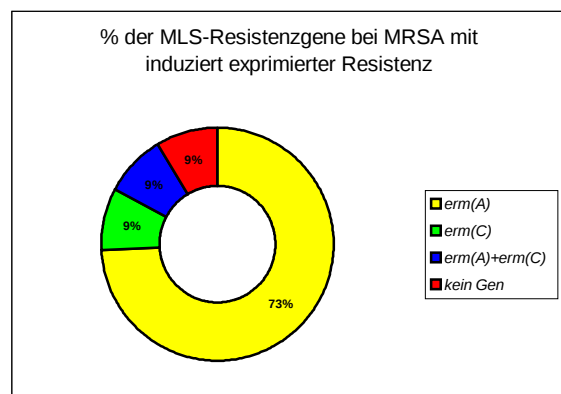
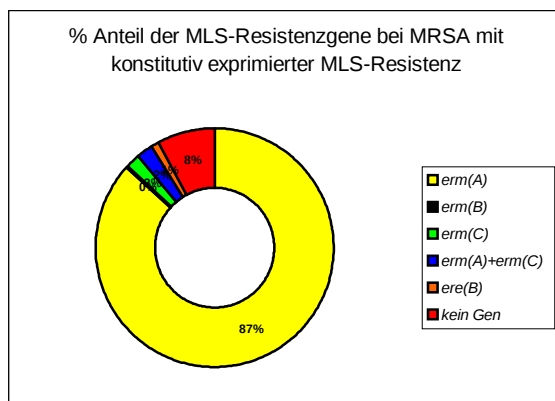


Abbildung 29. Zusammenhang zwischen MLS-Resistenzgenen und der Art des Isolates. Besonders groß ist der Unterschied zwischen MRSA mit konstitutiv exprimierter MLS-Resistenz und MSSA mit induziert exprimierter MLS-Resistenz. Außerdem ist auffällig, dass *erm(A)*, das meist konstitutiv exprimiert auftrat, überwiegend bei MRSA zu finden war.



Mit 67% (571/851) war *erm(A)* das bei *S. aureus*-Isolaten am häufigsten nachzuweisende Makrolid-Resistenzgen, gefolgt von *erm(C)* (192/851; 23%) und *msr(A)/msr(B)* (48/851; 6%). Am seltensten traten *erm(B)* und *ere(B)* mit jeweils 0,6% bei den Erythromycin-resistenten Isolaten auf. Das Gen *ere(A)* war in keinem der untersuchten Isolate detektierbar.

Mit 88% war das *erm(A)*-Gen häufiger bei MRSA-Isolaten als bei MSSA-Isolaten (38%) vertreten. Genau umgekehrt hierzu verhielt es sich mit dem Gen *erm(C)*, das mit 47% vornehmlich bei MSSA detektierbar war (5% bei MRSA). Innerhalb des

S. aureus-Kollektivs trat *erm(A)* vorrangig bei MLS_B-konstitutiv-resistenten Isolaten auf, während *erm(C)* bei MSSA mit induzierbarem MLS_B-Phänotyp am stärksten vertreten war. In 716 von 851 *S. aureus*-Isolaten (84%) war ein einzelnes *erm*-Gen nachzuweisen, dagegen fand sich die Kombination von *erm(A)* und *erm(C)* lediglich in 3% der Isolate (26 von 851). Das *ere(B)*-Gen konnte lediglich in MRSA mit konstitutiver MLS_B Expression (5/458; 1%) nachgewiesen werden. Ein Zusammenhang zwischen *ere(B)* und einem anderen Makrolid-Resistenzgen war nicht nachweisbar. Die *msr(A)/msr(B)*-Gene konnten bei 13% (14/358) der MSSA-Isolate nachgewiesen werden. Kein untersuchter MRSA enthielt diese Gene. Sie wurden nicht im Zusammenhang mit anderen Resistenzgenen gefunden. Bei 4,5%-8,6% (je nach untersuchter Gruppe) der Erythromycin-resistenten Isolate konnte überhaupt kein Resistenzgen gefunden werden. Deutlich trat auch wieder der Unterschied in der Resistenzrate zwischen MRSA und MSSA zu Tage.

4.2.2.2 *S. pneumoniae*

Um das Auftreten der MLS-Resistenzen bei Penicillin-sensiblen und- resistenten Pneumococcen zu untersuchen, wurden 1191 Isolate mit der Abtibiokaplättchenmethode überprüft. Bei einer großen Anzahl der dabei als resistent getesteten Isolate wurde mittels PCR nach den zugrundeliegenden Genen gefahndet. Insgesamt wiesen 19,4% aller getesteten *S. pneumoniae*-Isolate aus der SENTRY-Studie eine Makrolid- und 13,9% eine Clindamycin-Resistenz auf. Es zeigte sich ein eindeutiger Zusammenhang mit der Penicillin-Empfindlichkeit. Bei den Penicillin-sensiblen Isolaten (868/1191; 72,8%) waren nur 10,4% der Isolate resistent gegenüber Erythromycin, dieser Prozentsatz stieg bei den Penicillin-intermediär sensiblen Isolaten (237/1191; 19,9%) auf 38,8% und schließlich bei den Penicillin-resistenten Isolaten (86/1191; 7,3%) auf 55,2%. In analoger Weise stieg die Resistenz gegenüber Clindamycin von 6,5% bei den Penicillin-sensiblen Isolaten über 30,6% auf 49,4% bei den Penicillin-resistenten Isolaten.

Diesen Zusammenhang zwischen der MLS-Resistenz und der Art des Isolates zeigt Abbildung 30.

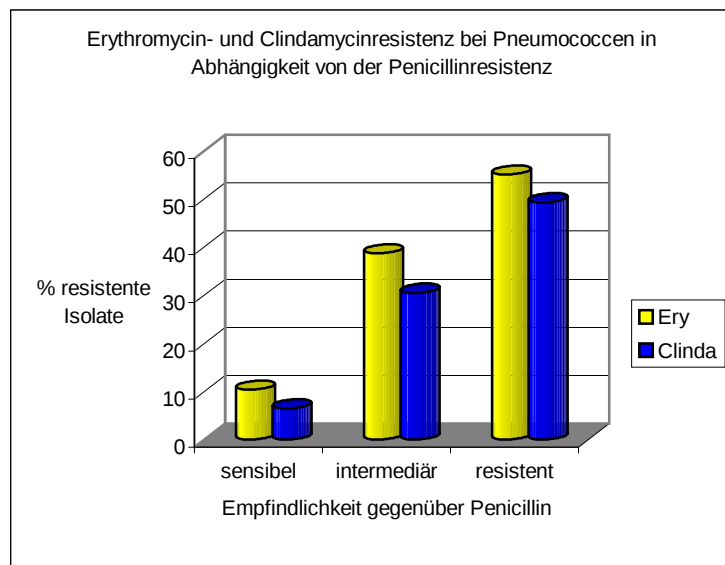


Abbildung.30. Dieses Diagramm zeigt den Zusammenhang zwischen der MLS-Resistenz und der Penicillin-Resistenz bei Pneumococcen.

Die ersten 215 Erythromycin-resistenten *S. pneumoniae*-Isolate wurden für das genetische Screening der Resistenzgene eingesetzt. Dazu wurden Fragmente der gesuchten MLS-Resistenzgene in einer PCR amplifiziert. Es wurden folgende Produktlängen erwartet:

erm(B): 638 bp

mef(E): 346 bp

Abbildung 31 zeigt die Agarosegele von 2 PCRs. Das *erm(B)*-Gen konnte bei 157 (73%) und das *mef(E)*- Gen bei den restlichen 58 (27%) Isolaten nachgewiesen werden. Dies zeigt Abbildung 32.

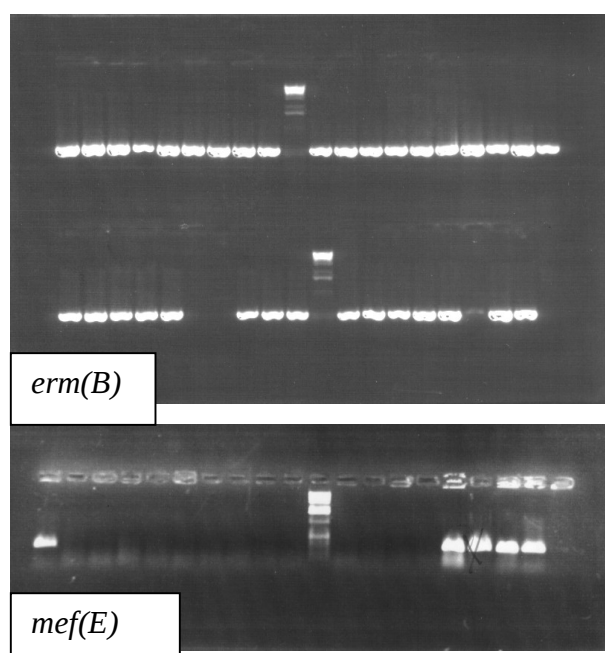


Abbildung 31. PCR-Produkte der MLS-Resistenzgene der Stämme 1-38 für *erm(B)* und 50-68 für *mef(E)*. Die Produkte wiesen die erwarteten Längen auf. Die PCR wurde unter den beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

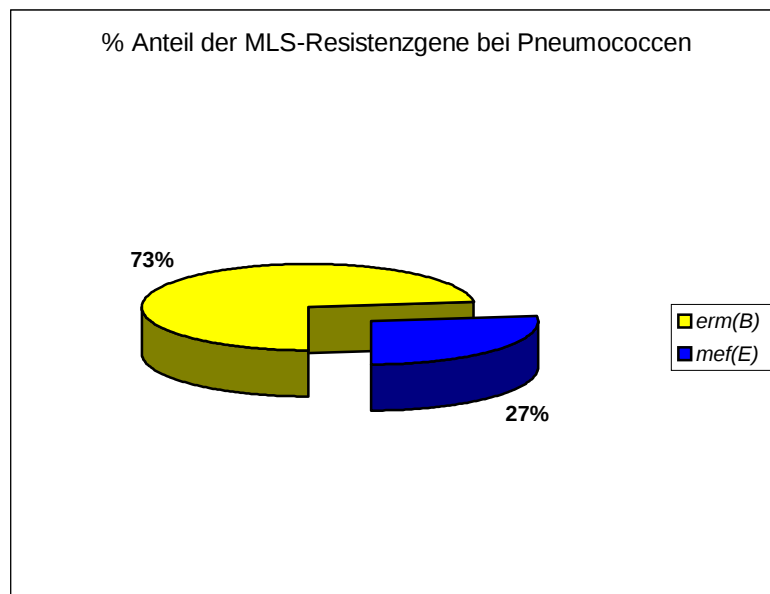


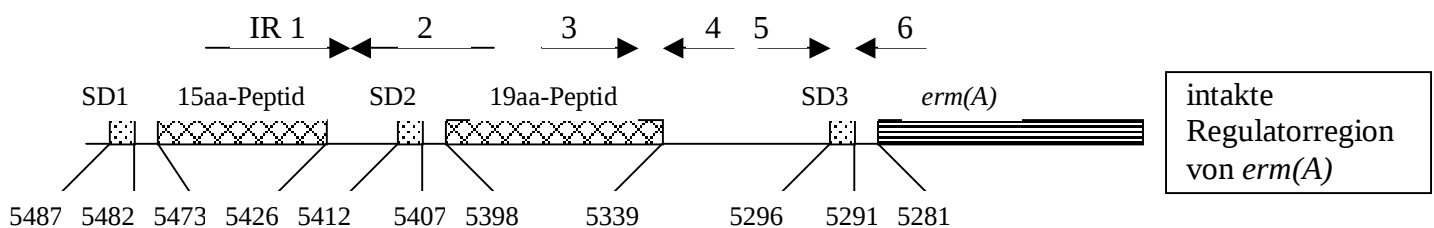
Abbildung 32. Verteilung der MLS-Resistenzgene bei den hier untersuchten Pneumococcenisolaten.

Wie schon in Kapitel 1.4.2 beschrieben, vermittelt das *erm(B)*-Gen eine MLS_B-Resistenz gegenüber Erythromycin und Clindamycin, während *mef(E)* via Efflux nur eine Resistenz gegenüber Erythromycin verursacht, Clindamycin aber weiterhin als therapeutische Option zur Verfügung steht (M-Phänotyp). Auch hier ist die MLS-Resistenz deutlich mit der Penicillin-Resistenz assoziiert. Auffällig ist, dass eine wesentlich schmalere Bandbreite unterschiedlicher Gene für die MLS-Resistenz bei Pneumococcen verantwortlich ist als bei *S. aureus*.

4.2.3 Strukturelle Veränderungen in der Regulatorregion von *erm(A)*

Der Unterschied zwischen konstitutiv und induziert exprimierter MLS-Resistenz besteht in Abweichungen in der Regulatorregion, woraufhin Sekundärstrukturen in der RNA verschiedentlich ausgebildet werden (siehe Einleitung, Kapitel 1.4.2.1). Diese Art Veränderungen sind bei *erm(C)* gut untersucht. Bei *erm(A)* jedoch gibt es bislang noch keine Aussagen über klinische Isolate. Bei 64 klinischen *S. aureus*-Isolaten, 40 MRSA und 24 MSSA, wurden diese Veränderungen deshalb mittels PCR und anschließender Sequenzierung näher untersucht. Alle Stämme trugen das *erm(A)*-Gen chromosomenkodiert und waren resistent gegenüber 14-, 15- und 16-gliedrigen Makroliden und gegenüber Lincosamiden, was mittels Agardiffusionstest nachgeprüft wurde. Sie wiesen also eine konstitutiv exprimierte Resistenz auf.

Abbildung 34



Die PCR-Amplifikate wurden sequenziert. In den Regulatorregionen der konstitutiv exprimierten Gene wurden bei den 64 untersuchten Isolaten fünf neue strukturelle Veränderungen gefunden. Diese waren drei Deletionen, 83, 121 und 123 bp lang, sowie zwei eng verwandte, je 25 bp lange Tandem-Duplikationen. Die 83 bp-Deletion wurde in zwei Isolaten gefunden und umfasste den gesamten ORF des 19 aa-Peptides inklusive IR2 und 3. Sie ist in Abbildung 35 dargestellt. Die 121 bp-Deletion wurde in 9 Isolaten gefunden und die 123 bp-Deletion in einem. Diese beiden Deletionen waren eng verwandt und umfassten den gesamten ORF des 19 aa-Peptides sowie den Teil downstream davon, der die IR4- und IR5-Sequenzen enthält. Beide Strukturen sind in Abbildung 36 dargestellt.

Abbildung 35

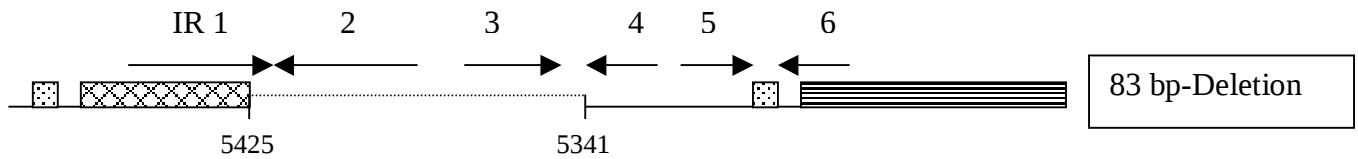


Abbildung 35. 83 bp große Deletion zwischen Position 5425 und 5341.

Abbildung 36

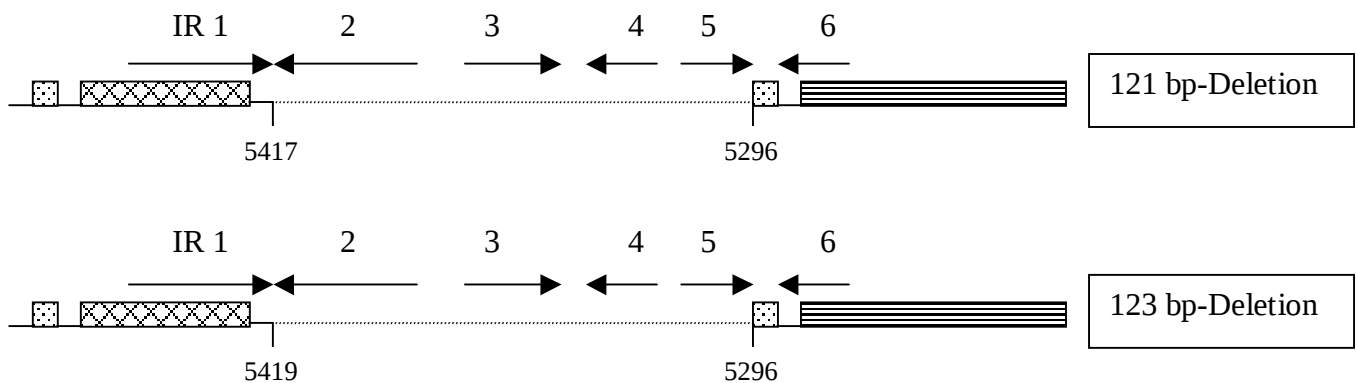


Abbildung 36. 121 bp große Deletion zwischen 5417 und 5296 und 123 bp große Deletion zwischen 5419 und 5296.

Die zwei Tandem-Duplikationen wiesen folgende Strukturen auf:

Duplikation 1:

5'-TAAGGAGAAGGTTATAATGAACCAG

Duplikation 2:

5'-GGAGAAGGTTATAATGAACCAGAAA

Diese Duplikationen waren fast an der gleichen Stelle der Regulatorregion lokalisiert wie die anderen Veränderungen und beinhalteten die *erm(A)*-assoziierte Ribosomen-Bindesequenz (AGAAGG) sowie die IR6-Sequenz (GGTTATAATGAAC). Dadurch waren zwei IR6-Sequenzen in der Regulatorregion anwesend, IR6 und IR6a. Dies zeigt Abbildung 37.

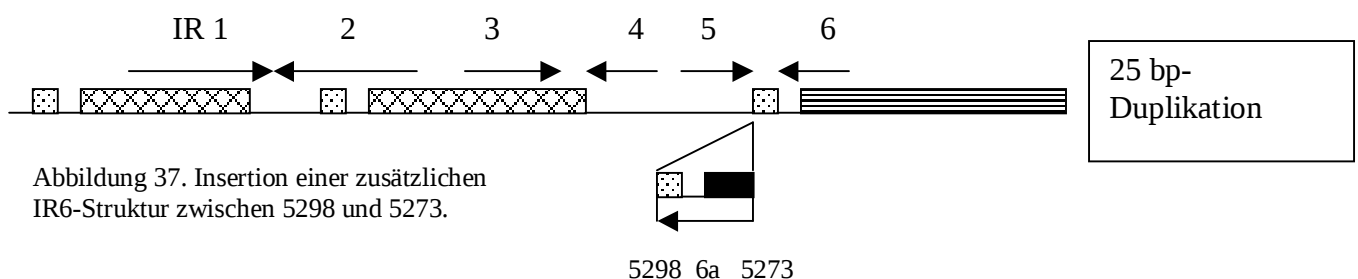


Abbildung 37. Insertion einer zusätzlichen IR6-Struktur zwischen 5298 und 5273.

Duplikation 1 wurde in einem Isolat gefunden und Duplikation 2 in 51 Isolaten; Duplikation 2 war also in den untersuchten Isolaten bei weitem die häufigste strukturelle Veränderung, die zu einer konstitutiven Expression führte. Es konnten also eine Reihe Veränderungen gefunden werden, die den schon bekannten in *erm(C)* ähnlich sind. Das allerdings ein Änderungstyp bei einem überwiegenden Teil der untersuchten Isolate auftrat, während alle anderen Änderungstypen nur vereinzelt gefunden wurden, spricht wieder für die schnelle klonale Ausbreitung resistenter Stämme im Gegensatz zu einer Neumutation zu resistenten Stämmen hin.

4.2.4 Charakterisierung von in-vitro erzeugten Ketolid-resistenten Mutanten

Es sollte untersucht werden, ob induzierbar resistente *S. aureus*-Isolate in der Lage sind, unter inhibitorischen Konzentrationen von Nicht-Induzierern resistente Mutanten gegen diese Substanzen auszubilden. Besonders die neuen Ketolide waren in diesem Zusammenhang interessant. Wären die Stämme in Anwesenheit von Nicht-Induzierern in der Lage, konstitutiv exprimierende Mutanten auszubilden, wäre das für die Therapie von einiger Bedeutung, da mit der konstitutiven Expression auch eine Resistenz gegenüber einigen Nicht-Induzierern einhergehen würde. Die Translationsattenuatoren der erhaltenen Mutanten wurden in einem zweiten Schritt in einer PCR amplifiziert und anschließend sequenziert, um die zugrundeliegenden strukturellen Veränderungen zu untersuchen. Als Stamm wurde der genetisch definierte SA1-Stamm mit induziert exprimiertem *erm(A)* gewählt. Als Antibiotika wurden die Ketolide Telithromycin und ABT-773, das Lincosamid Clindamycin, die Streptogramine Dalfopristin und Quinopristin sowie das Kombinationspräparat Synercid ausgewählt. Die MHK-Werte dieser Antibiotika für den genetisch definierten Stamm SA1 (er trug eine chromosomal kodierte Kopie von induzierbar exprimiertem *erm(A)*) wurden gemessen. Der Stamm wurde anschließend auf Platten kultiviert, die entweder 1 mg/L Clindamycin, 2 mg/L Dalfopristin, 1 mg/L Quinupristin, 0,5 mg/L Synercid, 0,5 mg/L Telithromycin oder 0,25 mg/L ABT-773 enthielten. Diese Konzentrationen entsprachen der vierfachen

MHK des Stammes SA1. Die Mutationsrate wurde bestimmt. Diese Selektion wurde zweimal wiederholt.

Ausgewählte Mutanten wurden mittels PFGE analysiert, um ihre klonale Identität mit dem Ursprungstamm nachzuweisen. Die Regulatorregion von *erm(A)* dieser Mutanten wurde amplifiziert und sequenziert.

Die Ausgangs-MHK-Werte des Stamme SA1 waren:

Clindamycin	0,25 mg/L
Dalfopristin	0,5 mg/L
Quinupristin	0,25 mg/L
Synercid	0,125 mg/L
Telithromycin	0,125 mg/L
ABT-773	0,06 mg/L

Die in-vitro-Selektion mit Dalfopristin und Synercid brachte in wiederholten Experimenten keine resistenten Mutanten hervor. Die Mutationsraten für die anderen vier Substanzen waren:

Clindamycin	$10^{-6} - 10^{-8}$
Quinupristin	$10^{-7} - 10^{-8}$
Telithromycin	$10^{-6} - 10^{-8}$
ABT-773	$10^{-7} - 10^{-8}$

Insgesamt wurden 146 Mutanten von SA1 (bestätigt durch die PFGE-Analyse) zur weiteren Untersuchung ausgewählt. Darunter waren 59 Mutanten aus der Clindamycin-Selektion, 51 aus der Telithromycin-Selektion, 26 aus der ABT-Selektion und 10 aus der Quinopristin-Selektion. Alle diese Mutanten hatten ungewöhnlich hohe MHK-Werte: >1024 mg/L für Clindamycin, >64 mg/L für Quinupristin, >512 mg/L für Telithromycin und >256 mg/L für ABT-773. Alle erhaltenen Mutanten zeigten also eine Multiresistenz gegenüber allen vier Antibiotika. Dies weist darauf hin, dass aus der induzierbaren Resistenz während des Selektionsprozesses eine konstitutive Resistenz geworden war. Da eine Änderung von der induzierbaren Resistenz zur konstitutiven Resistenz üblicherweise mit Strukturänderungen in der Regulatorregion des entsprechenden Gens, hier *erm(A)*, verbunden ist, wurden molekulare Untersuchungen dieser

Regulatorregion angeschlossen. Die PCR-Amplifikation der *erm(A)*-Regulatorregion von 94 (64,4%) der 146 untersuchten Mutanten ergab Amplifikate, die etwas kleiner oder größer waren als das 593 bp-Amplifikat bei dem nicht mutierten Ausgangsstamm SA1. Weitere 49 Mutanten hatten Amplifikate, die mit ca. 1,9 kb deutlich größer waren. Die Amplifikate der restlichen drei Mutanten zeigten keinen erkennbaren Größenunterschied zu den 593 bp von SA1. Abbildung 38 zeigt die unterschiedlichen PCR-Produkte.

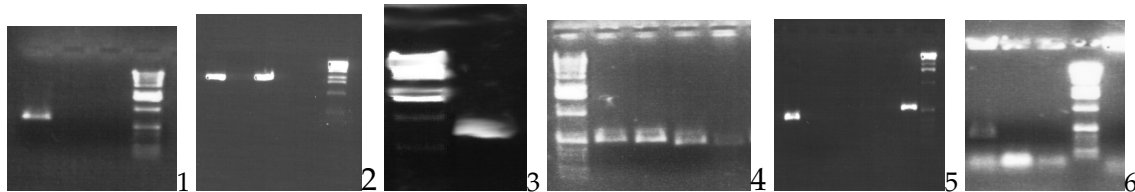


Abbildung 38. PCR-Produkte unterschiedlicher Veränderungen der Regulatorregion. 1: intakte Region; 2: Insertion von IS256; 3: 26 bp Duplikation; 4: 83bp- und 121bp-Deletion; 5: 14bp- und 131bp-Deletion; 6: 147bp-Deletion

Die Sequenzanalysen zeigten vier verschiedene Typen von strukturellen Veränderungen im Translationsattenuator von *erm(A)*: Deletionen, Tandemduplikationen, Punktmutationen und Disruption des Attenuators durch die Integration der Insertionssequenz IS256.

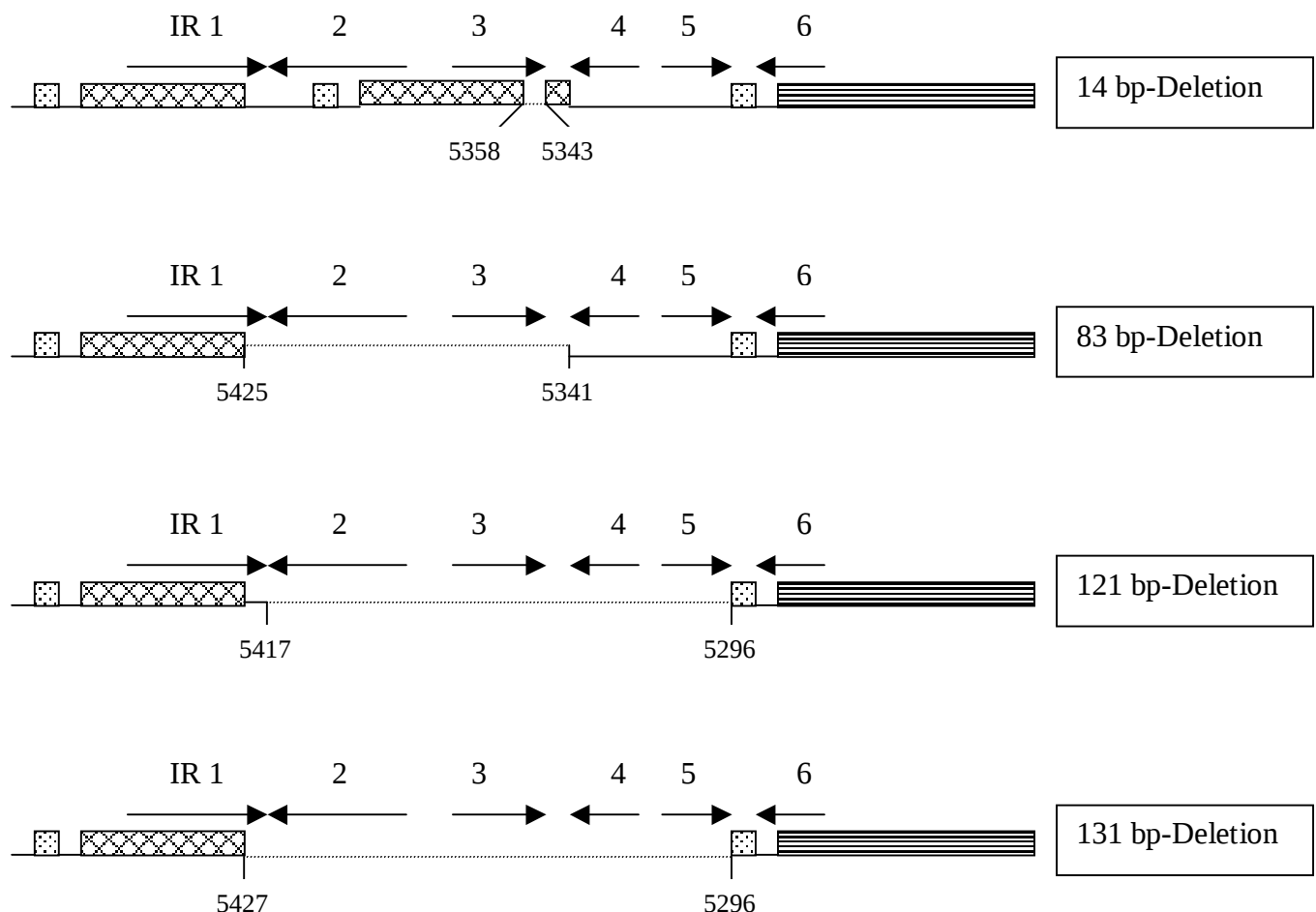
Sechs verschiedene Deletionen von 14 – 157 bp Länge wurden gefunden:

- ❖ Die 14 bp-Deletion beinhaltetete einen Teil des ORF für das 19 aa-Peptid und einen Teil der Sequenz von inverted Repeat (IR) 3. Dieses verstümmelte IR3 ist nicht in der Lage, eine stabile Paarung mit IR4 einzugehen, paart IR4 mit IR5 und lässt IR6 frei, woraus eine konstitutive Expression von *erm(A)* resultiert.
- ❖ Die 83 bp-Deletion umfasste den gesamten ORF von 19 aa inklusive Ribosomenbindungsstelle SD2 und die IR2- und IR3-Sequenzen.
- ❖ Bei Stämmen mit der 147 bp-Deletion waren noch die Sequenzen IR4 – IR6 vorhanden, aber der gesamte upstream-Bereich mit den ORF für das 15 aa- und das 19 aa-Peptid sowie den Sequenzen IR1 – IR3 waren verloren. In diesen Fällen konnten wiederum stabile mRNA-Sekundärstrukturen durch die Bindung IR4:IR5 gebildet werden und IR6 blieb frei.

- ❖ Die 121 bp- und die 131 bp-Deletionen waren eng verwandt und beinhalteten neben dem ORF für das 19 aa-Peptid und den IR2 und IR3-Sequenzen auch die IR4- und IR5-Sequenzen.
- ❖ Die 157 bp-Deletion war durch einen stark verstümmelten Attenuator charakterisiert, in dem nur noch das 5'-Ende des ORF für das 15 aa-Peptid inklusive SD1 präsent war.

Die drei letztgenannten Strukturen erlaubten keine Ausbildung einer stabilen mRNA-Sekundärstruktur. Keine der sechs Deletionen betraf die *erm(A)*-assoziierte Ribosomenbindungsstelle SD3 und das Strukturgen. Die 14 bp-Deletion erwies sich als die häufigste bei Mutanten, die mit Clindamycin und Telithromycin selektiert worden waren, und als die einzige strukturelle Änderung, die bei ABT-selektierten Mutanten auftrat. Der Grund für dieses bevorzugte Auftreten ist unbekannt. Alle anderen Deletionen wurden in mindestens zwei unabhängigen Mutanten aus der Selektion mit Clindamycin, Quinupristin oder Telithromycin beobachtet.

Abbildung 39 zeigt schematisch die gefundenen Deletionen.



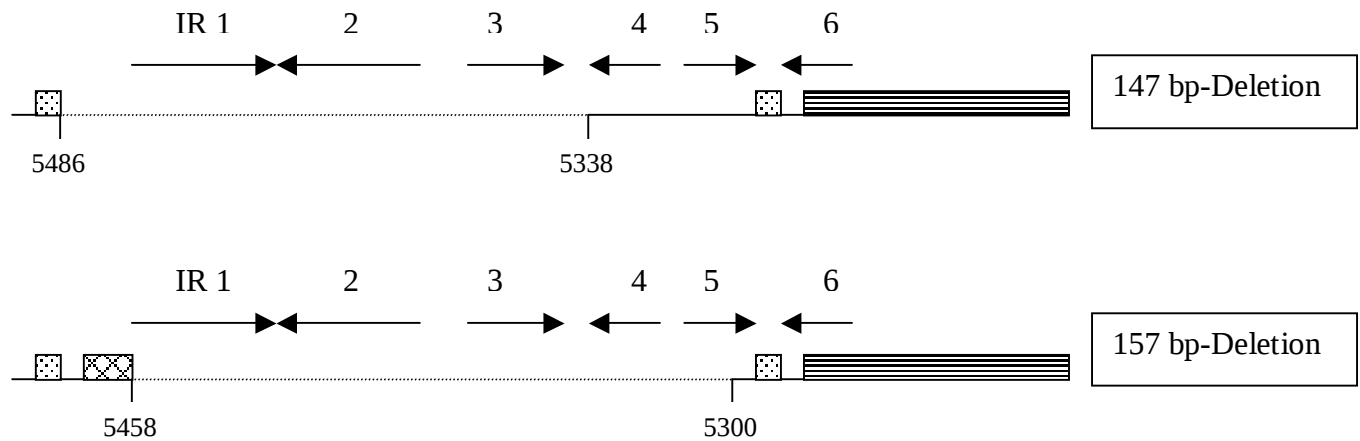


Abbildung 39. Sechs verschiedene Deletionen wurden im Translationsattenuator von *erm(A)* gefunden.

Drei verschiedene Typen von Tandemduplikationen (Längen: 23 bp, 25 bp und 26 bp) wurden bei Mutanten gefunden, die entweder in Anwesenheit von Clindamycin oder Quinupristin selektiert wurden:

- ❖ Die 25 bp-Duplikation wurde in 20 Mutanten aus der Clindamycin-Selektion gefunden und enthielt die Ribosomenbindungsstelle SD3, das 5'-Ende des strukturellen *erm(A)*-Gens und die IR6-Sequenz.
- ❖ Die 26 bp-Duplikation war dieser sehr ähnlich und wurde in einer einzigen Mutante gefunden, die in Anwesenheit von Quinupristin selektiert worden war. Im Gegensatz zur 25 bp-Duplikation war allerdings die SD3-Sequenz nur teilweise dupliziert. IR6 war auch hier dupliziert. Diese beiden Duplikationen könnten in einer mRNA-Sekundärstruktur IR5:IR6a resultieren, während IR6b, das den Anfang der *erm(A)*-Sequenz beinhaltet, für Ribosomen permanent erreichbar bleibt.
- ❖ Die dritte Duplikation, die 23 bp-Deletion, wurde ebenfalls nur in einem Isolat gefunden, welches mit Quinupristin selektiert worden war. Es beinhaltete die unvollständige Duplikation von SD3 und Teile von IR5 und IR6. In diesem Fall verhinderten die unvollständigen, duplizierten Sequenzen von IR5 und IR6 – Δ IR5 und Δ IR6 - die Ausbildung einer stabilen IR5:IR6-Paarung. Abbildung 40 zeigt die gefundenen Duplikationen.

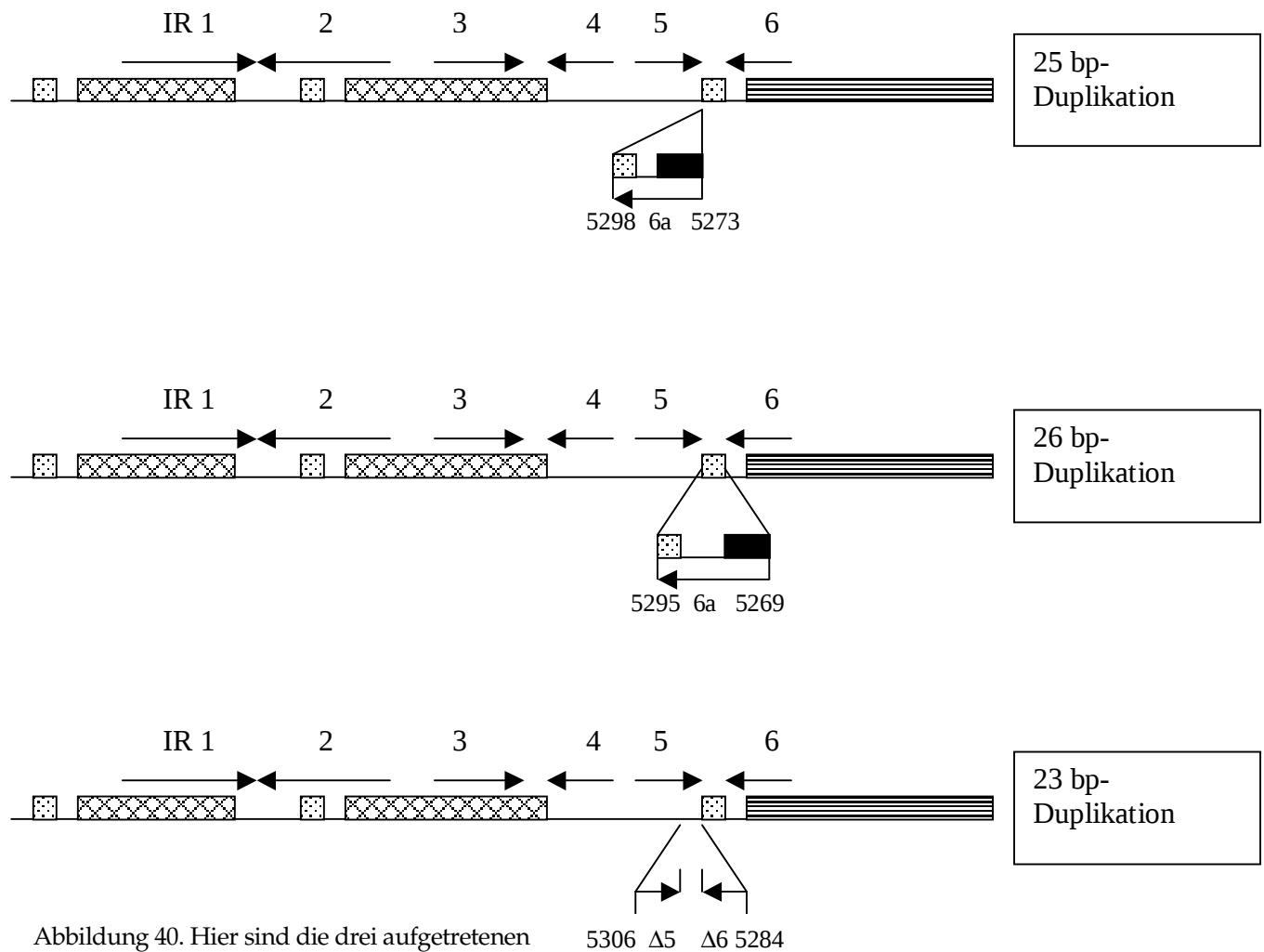


Abbildung 40. Hier sind die drei aufgetretenen Duplikationen dargestellt.

Zwei verschiedene Punktmutationen wurden in den Amplifikaten dreier Mutanten gefunden, deren Größe sich nicht von dem Amplifikat des Ausgangsstammes SA1 unterscheiden ließen. Die erste Mutation wurde in Mutanten aus der Clindamycin- und Telithromycin-Selektion gefunden und war durch einen einzigen Basenaustausch C → G in IR3 an Position 5363 in der Tn554-Sequenz charakterisiert. Dadurch wurde die Stabilität der Paarung IR3:IR4 herabgesetzt, so dass sich bevorzugt die stabilere Paarung IR4:IR5 bildete. IR6 blieb somit frei.

Der zweite Mutationstyp wurde in einer einzigen Mutante aus der Telithromycin-Selektion gefunden. Es handelte sich um die schon erwähnte Mutation C → G in IR3 und eine weitere Mutation 5329A → C in IR4 und um drei weitere Änderungen in IR5. Diese waren der Austausch von 5311T → AC und die Insertion eines einzelnen C zwischen 5305A und 5304T sowie zwischen 5303A und 5302A. Diese Änderungen

in IR3 und IR5 destabilisierten die mRNA-Sekundärstrukturen IR3:IR4 und IR5:IR6. Die Ausbildung dieser Strukturen ist unwahrscheinlich. Somit bleibt IR6 frei. Die Lage der gefundenen Mutationen ist in Abbildung 41 dargestellt.

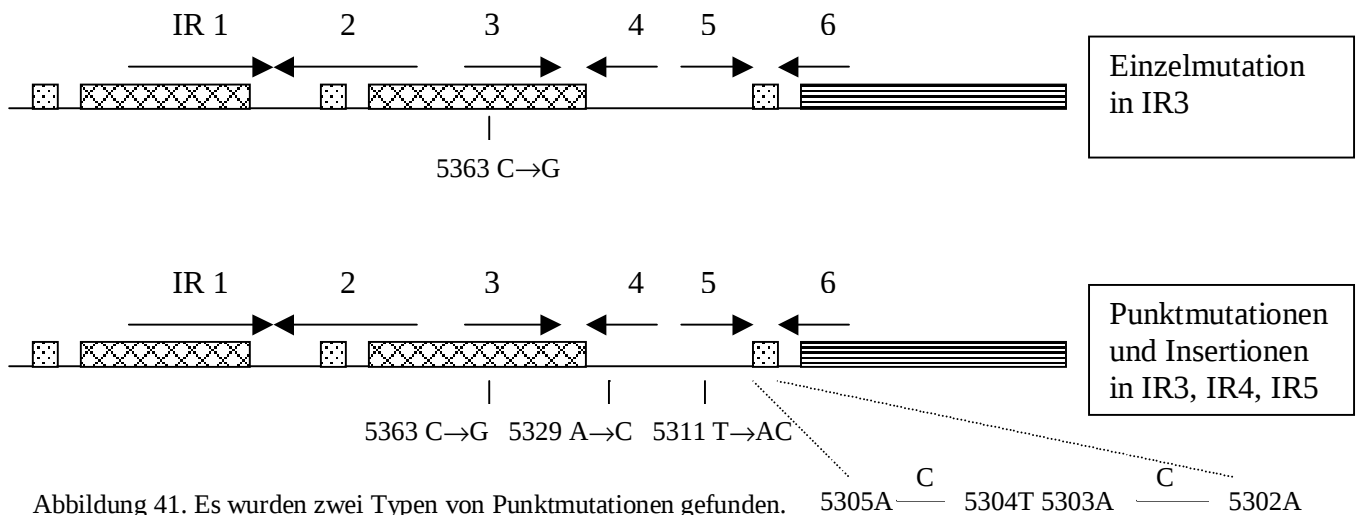


Abbildung 41. Es wurden zwei Typen von Punktmutationen gefunden.

Der letzte Typ struktureller Änderungen im Translationsattenuator von *erm(A)* wurde in 49 (33,6%) der selektierten Mutanten gesehen, die alle das 1,9 kb-Amplifikat aufwiesen. Die Sequenzanalysen zeigten, dass dieses Amplifikat aus der kompletten Sequenz des Attenuators bestand, in die eine Kopie des Insertionselements IS256 integriert worden war. Die Orientierung dieses Elementes und der Ort seiner Integration war in allen 49 Fällen gleich. Die Integrationsstelle lag direkt downstream vom ORF für das 19 aa-Peptid und upstream von IR4. Die Analyse der Regionen, die zur Integrationsstelle benachbart waren, zeigten die Präsenz eines direkten 8 bp-Repeats der Sequenz TCAAAATT. Die Insertion von IS256 zeigt Abbildung 42.

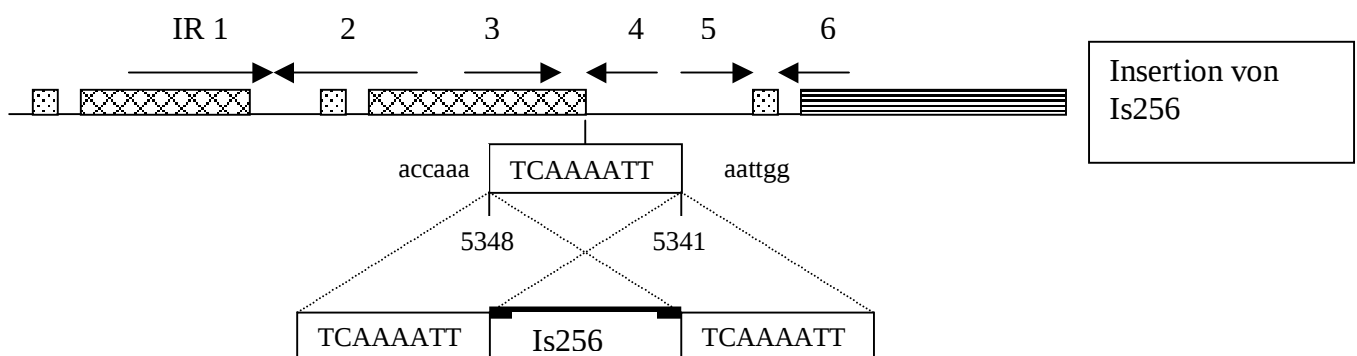


Abbildung 42. Insertion von IS256 in den Translationsattenuator von *erm(A)*

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen also, dass *S. aureus*-Stämme mit induzierbarer MLS-Resistenz bei Anwesenheit verschiedener Nicht-Induzierer sehr wohl in der Lage sind, Mutanten zu selektionieren, die eine konstitutive *erm(A)*-Expression aufweisen. Dies macht den Gebrauch der entsprechenden Antibiotika problematisch. Die gefundenen strukturellen Veränderungen im Translationsattenuator entsprachen schon vorher gefundenen, neu war allerdings die Insertion von IS256.

4.3 Desinfektionsmittel

Desinfektionsmittelresistenz spielt bei der klonalen Ausbreitung Antibiotika-resistenter Stämme eine verstärkende Rolle. Für die erfolgreiche Bekämpfung dieser Ausbreitung durch geeignete hygienische Maßnahmen ist es daher von Bedeutung zu erfahren, wie verbreitet eine Unempfindlichkeit gegen die gängigen Desinfektionsmittel ist. Dies ist besonders für *S. aureus* von Interesse, da dieses Bakterium sich als häufiger Erreger nosokomialer Infektionen viel in Krankenhäusern ausbreitet.

Die Desinfektionsmittelresistenz wurde bei 497 klinischen Isolaten, die der SENTRY-Studie entstammten, untersucht. Von diesen 497 Isolaten waren 297 Methicillin-resistent (MRSA) und 200 Methicillin-sensibel (MSSA). Um den Anteil der *qac*-Gene zu bestimmen, wurden Fragmente der Gene in einer PCR amplifiziert und im Agarosegel nachgewiesen. Die PCR-Bedingungen sind im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben. Die Produktlängen betrugen:

qacA/B: 516 bp

qacC: 156 bp

Abbildung 43 zeigt die Agarosegele eine *qacA/B*- und einer *qacC*- PCR.

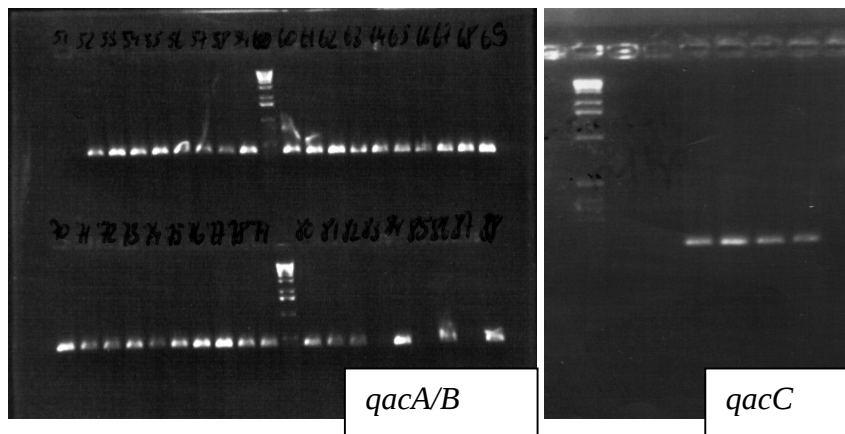


Abbildung 43. PCR-Produkte der MLS-Resistenzgene der Stämme MRSA 51-88 für *qacA/B*, und MRSA 24, 63, 101 und 256 für *qacC*. Die Produkte wiesen die erwarteten Längen auf. Die PCR wurde unter den beschriebenen

Die Stämme waren klonal nicht identisch. Das *qacA /qacB* Gen konnte in 210 der 497 Isolate (42%) nachgewiesen werden. Dabei trugen 186 der 297 MRSA (63%) und nur 24 der 200 MSSA (12%) die *qacA/B* Resistenzgene. Das *qacC* Gen wurde nur in 29 der 497 getesteten Isolate (5,8%) detektiert. Davon trugen 19 der 297 MRSA (6,4%) und 10 der 200 MSSA (5%) *qacC*, so dass kein signifikanter Unterschied zwischen MRSA und MSSA festzustellen war. 5 Isolate (1%) trugen sowohl das *qacA/B*- als auch das *qacC*-Gen; dabei handelte es sich ausschließlich um MRSA. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 dargestellt. Abbildung 44 zeigt die Verteilung der Gene in Abhängigkeit von der Art des Isolates.

Tabelle 15

	MRSA (297)	MSSA (200)	gesamt (497)
<i>qacA/B</i>	186 (63%)	24 (12%)	210 (42%)
<i>qacC</i>	19 (6,4%)	10 (5%)	29 (5,8%)
<i>qacA/B + qacC</i>	5 (1,7%)	0	5 (1%)

Tabelle 15. Gen verteilung der *qac*-Gene bei Methicillin-resistenten und –sensiblen *S. aureus*-Isolaten. Gezeigt ist in absoluten Zahlen und in Prozent, wieviele der untersuchten Isolate über ein bestimmtes Gen verfügten.

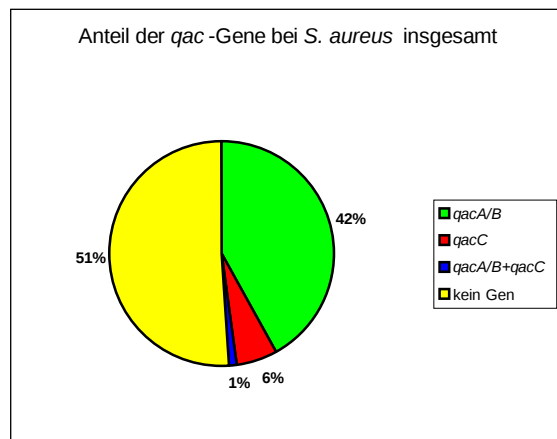
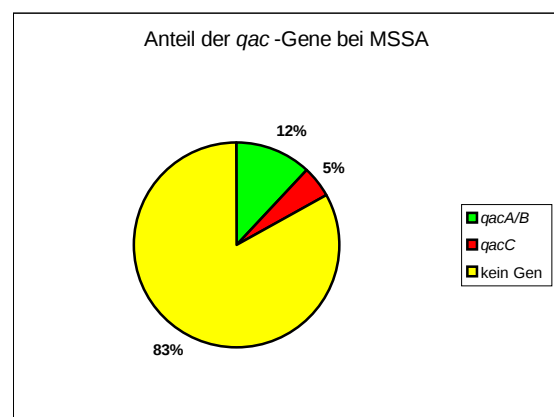
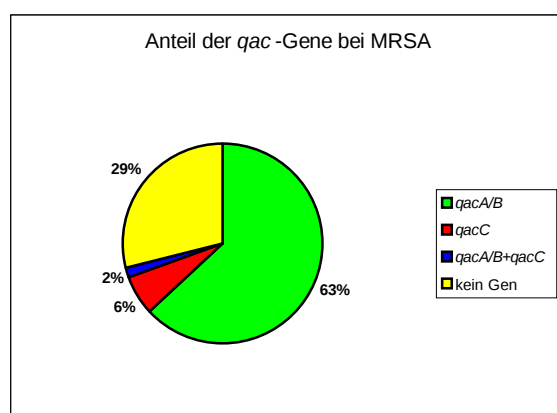


Abbildung 44. *Qac*-Gene und *S. aureus*. Hier ist die Verteilung der *qac*-Gene in Abhängigkeit von der Methicillin-Resistenz bei *S. aureus* dargestellt.



Auch die Desinfektionsmittelresistenz scheint also signifikant mit der Methicillin-Resistenz bei *S. aureus* assoziiert zu sein und ist bei dieser Isolate häufig zu finden. MSSA sind im Allgemeinen absolut sensibel. Neu ist das Auftreten beider Resistenzgenen in einem Isolat. Dies wurde bei *S. aureus* bis jetzt noch nicht beschrieben.

5. Diskussion und Ausblick

Zunehmende Antibiotikaresistenz ist ein großes Problem der Therapie von Infektionskrankheiten. Besonders dramatisch ist dies, wenn bei einer schwerverlaufenden Erkrankung kein Antibiotikum wirksam ist. *S. aureus* und *S. pneumoniae* treten häufig als Erreger auch gefährlicher Krankheiten auf. Die klassische Behandlung solcher Infektionen mit Antibiotika wird dabei zunehmend durch Ausbildung und Verbreitung resistenter Stämme eingeschränkt. Eine besondere Rolle spielen Methicillin-resistente *S. aureus* sowie Penicillin-resistente Pneumococcen, da verbunden mit diesen Resistenztypen häufig zahlreiche Multiresistenzen auftreten (Schmitz, 1998; Tomasz, 1997). In diesem Fall bedeutet Multiresistenz, dass die Resistenz gegen die einzelnen Antibiotikaklassen häufig in Kombination auftritt, wobei aber unterschiedliche Resistenzmechanismen eine Rolle spielen können. Da die Antibiotikagruppen der Chinolone und der MLS-Antibiotika neben den β -Laktamen in der Therapie dieser beiden Erreger eine große Rolle spielen, wurde versucht, einen möglichst aktuellen Überblick über die Resistenzlage zu schaffen und die Verbreitung der zugrundeliegenden Resistenzmechanismen aufzuklären. Da auch die Unempfindlichkeit gegenüber gängigen Desinfektionsmitteln zur Ausbreitung resistenter Stämme gerade in Kliniken führen kann, wurde außerdem die Ausbreitung der entsprechenden Gene, *qacA/B* (Paulsen *et al.*, 1996) und *qacC* (Paulsen *et al.*, 1994) bei *S. aureus*, einem häufigen Erreger nosokomialer Infektionen untersucht. Die Untersuchungen bestätigten, dass die Chinolon- und MLS-Resistenz häufig mit den problematischen Resistenzphänotypen MRSA sowie Penicillin-resistenter Pneumococcen-Stamm assoziiert war. Die Ausbreitung resistenter Stämme, obwohl bei Pneumococcen noch nicht so ausgeprägt, nimmt zu und gibt damit Anlass zur Sorge. Deshalb ist auch weiterhin eine genaue Überwachung der Resistenzausbreitung nötig. Damit einhergehen müssen geeignete Maßnahmen zur Bekämpfung einer Verbreitung resistenter Stämme.

5.1 Fluorochinolone und BMS 294756

Die Hauptangriffsziele der Chinolone sind die bakteriellen Enzyme Gyrase und Topoisomerase IV. Resistenz wird durch Mutationen in den QRDR, den quinolone-resistance-determining regions, der entsprechenden Gene vermittelt. Dabei spielen Mutationen in den Genen für die A-Untereinheiten der Enzyme die entscheidende Rolle. Die Mutationen liegen bei allen bisher untersuchten Spezies an vergleichbaren Stellen im Gen, den sogenannten hot spots in der Nähe von Codon 80. Verstärkend kommt ein Transport hydrophiler Chinolone aus der Bakterienzelle durch Effluxpumpensysteme hinzu. Das Ziel des ersten Teils der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Verbreitung Chinolon-resistenter *S. aureus*-Stämme und Pneumococcen zu untersuchen und aufzuklären, welche Mutationen in welchem Maße beteiligt waren. Außerdem sollte ein Aktivitätsvergleich zwischen verschiedenen Fluorochinolonen sowie dem Disfluorochinolon BMS294756 gemacht werden sowie der Einfluss der Effluxpumpe ermittelt werden.

5.1.1 Epidemiologische Verteilung der Resistenzen

In diesem Teil der Arbeit ging es zunächst darum, den aktuellen Stand der Resistenzausbreitung gegenüber Fluorochinolonen zu untersuchen. Dazu wurden bei großen Kollektiven von klinischen *S. aureus* – und Pneumococccenisolaten die MHK-Werte verschiedener Fluorochinolonantibiotika gemessen und die erhaltenen Werte analysiert.

5.1.1.1 *S. aureus*

Bei 1548 *S. aureus*-Stämmen, 369 MRSA und 1179 MSSA aus ganz Europa, wurden die MHK-Werte für Trovafloxacin, Gatifloxacin und Ciprofloxacin gemessen und die MHK50- und MHK90-Werte wurden berechnet. Die MRSA waren zum allergrößten Teil resistent gegenüber den untersuchten Chinolonen, so dass hier keine regionalen Unterschiede festzustellen waren. Bei den MSSA zeigten sich

Resistenzraten zwischen 0% und 19,3%, wobei regionale Unterschiede beobachtet werden konnten. Besonders hohe Resistenzraten zeigten sich in Frankreich, Italien, Portugal, Großbritannien und zum Teil in Spanien. Wenn man die Untersuchungsergebnisse analysiert, kann man zusammenfassend sagen, dass Gatifloxacin und Trovafloxacin eine bessere in-vitro-Aktivität gegenüber *S. aureus* hatten als Ciprofloxacin. Obwohl es deutliche Unterschiede in der Häufigkeit resistenter Stämme in den einzelnen Ländern gab, war die relative Aktivität der einzelnen Fluorochinolone in allen teilnehmenden Kliniken gleich. Dies spiegelt das Problem der Multiresistenzen zwischen den einzelnen Chinolonen innerhalb einer Bakterienspezies wieder. Im Allgemeinen war eine Ciprofloxacinresistenz auch mit erhöhten MHK-Werten bei neueren Fluorochinolonen assoziiert, was eine geringere Effektivität dieser neuen Substanzen bei den resistenten Isolaten bedeutet.

Für die beobachteten regionalen Unterschiede gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Ein möglicher Grund ist der intensivere Einsatz von Antibiotika in manchen Ländern und Regionen, wodurch auf die Bakterien ein höherer Selektionsdruck ausgeübt wird. In einigen Studien wird behauptet, dass die Häufigkeit fluorchinolon-resistenter Bakterien mit dem vermehrten Einsatz dieser Antibiotika korreliert werden kann. In Fallstudien war die vorangegangene Behandlung mit Ciprofloxacin ein Hauptrisikofaktor für die Isolation ciprofloxacinresistenter Keime (Pena *et al.*, 1995). Häufig ist jedoch das Auftreten resistenter Keime nicht nur ein Phänomen vermehrten Antibiotikaeinsatzes, sondern es wird außerdem auch häufig in bestimmten Kliniken oder Stationen gefunden. Trat einmal ein resistenter Klon irgendwo auf, stieg die Rate der Resistenzen in diesem Klinikum oder auf diesen Stationen aufgrund klonaler Verbreitung rapide an (Dalhoff, 1994). Die klonale Verbreitung könnte zusätzlich zum hohen Antibiotikagebrauch in manchen Ländern die Unterschiede im Auftreten ciprofloxacinresistenter *S. aureus*-Stämme in den einzelnen Kliniken und Ländern erklären.

5.1.1.2 *S. pneumoniae*

Von 1191 Pneumococcenisolaten wurden die MHK-Werte für Ciprofloxacin, Levofloxacin, Sparfloxacin, Trovafloxacin und Grepafloxacin bestimmt. 1,8% der Isolate zeigten eine verminderte Resistenz gegenüber Ciprofloxacin. Diese Rate war bei den anderen Chinolonen noch niedriger. Generell ist die Resistenz gegen Fluorochinolone bei Pneumococcen in Europa noch relativ selten (Marchese *et al.*, 2000; Milatovic *et al.*, 2000), während aber in anderen Regionen ein Zunehmen der Resistenz beobachtet wurde (Bacquero *et al.*, 1999; Bacquero *et al.*, 1996). Für die noch geringe Verbreitung Chinolon-resistenter Pneumococcen könnte die Tatsache verantwortlich sein, dass Pneumococceninfektionen häufig ambulant erworben sind. Die klonale Ausbreitung resistenter Stämme ereignet sich aber aus verschiedenen Gründen in Kliniken schneller. Dazu gehören der enge Kontakt zwischen Pflegern und Patienten und die räumliche Enge. Trotz der bis jetzt eher geringen Resistenzrate bei Pneumococcen ist die Chinolonresistenz auch hier ein Phänomen, das sorgfältig beobachtet und mit geeigneten Mitteln bekämpft werden muss, besonders, da die Chinolone in der Pneumococcentherapie eine noch größere Rolle spielen als bei *S. aureus*.

5.1.2 Epidemiologie der Resistenzmutationen

Verschiedene Fluorochinolone wurden in ihrer Aktivität im Hinblick darauf verglichen, welchen Einfluss Resistenzmutationen auf ihre Wirksamkeit haben. Gleichzeitig wurde die Häufigkeit zugrundeliegender Resistenzmechanismen, also Resistenzmutationen und Effluxpumpe, untersucht.

5.1.2.1 *S. aureus*

Von insgesamt 891 klinischen *S. aureus*-Isolaten, 434 MSSA und 457 MRSA, wurden die MHK-Werte von Ciprofloxacin, Levofloxacin, Trovafloxacin, Gatifloxacin, Moxifloxacin, Clinafloxacin und Sitafoxacin gemessen. Bei allen Ciprofloxacin-resistenten Isolaten wurden die Ciprofloxacin-MHK-Werte in Gegenwart von Reserpin bestimmt und es wurden die QRDR von *gyrA* und *parC*

sequenziert. Reserpin ist ein Hemmer der Effluxpumpe und verhindert somit die Ausbildung einer Resistenz wegen erhöhtem Efflux der Antibiotika aus der Zelle. Insgesamt zeigten Sitafloracin und Clinafloracin die beste Aktivität bei MSSA und MRSA mit MHK-Werten zwischen $\leq 0,008$ und 8 mg/L beziehungsweise zwischen $\leq 0,008$ und 4 mg/L. Diese beiden Antibiotika sind also vielversprechende neue Substanzen mit einer guten Aktivität gegen Staphylococci. Die vorliegende Untersuchung bestätigt frühere Studien (Schmitz *et al.*, 1998) und vorangegangene Analysen.

Für die gegenüber den Pneumococci geringe Anzahl der Stämme, deren MHK durch Reserpin beeinflusst wird, gibt es mehrere denkbare Erklärungen. Möglicherweise beeinflusst Reserpin verschiedene Stämme unterschiedlich stark aufgrund einer Reserpinresistenz, wie sie für Bmr, einen verwandten Efflux-Transporter aus *Bacillus subtilis*, beschrieben wurde (Ahmed *et al.*, 1993). Außerdem könnte die Expression von NorA (oder anderen, bis jetzt unbekannten Effluxpumpen) variieren aufgrund von regulierenden Mutationen in der Region 5' von *norA*, wie kürzlich von einer induzierbaren Mutante berichtet wurde (Kaatz *et al.*, 1995).

Der Effekt von Reserpin und die Reduktion der Resistenz korreliert nicht mit der gefundenen MHK oder mit Resistenzmutationen, wie gezeigt werden konnte (Schmitz *et al.*, 1998). Der Efflux-inhibierende Effekt hängt nicht davon ab, ob ein Stamm Chinolonen gegenüber resistent oder sensibel ist.

Reserpin als Inhibitor von Multi-drug-Effluxpumpen scheint also die intrazelluläre Konzentration von Ciprofloracin in circa einem Drittel bis zu einem Viertel aller Isolate anzuheben. Dies könnte therapeutische Konsequenzen haben, wenn bei der Therapie ein Efflux-Hemmer mit einem Fluorochinolon kombiniert würde. Allerdings ist Reserpin in den benötigten Konzentrationen für Menschen toxisch. Es müssten also für die Therapie andere Effluxhemmer gefunden werden. Bei den gefundenen Mutationen war auffällig, dass bei den weitaus meisten Isolaten lediglich zwei verschiedene Mutationskombinationen auftraten: Ser80Phe(*griA*) mit Ser84Leu(*gyrA*) in 56 der Isolate und Ser80Phe(*griA*) mit Glu88Lys(*gyrA*) in 21% der Fälle. Dabei trat in *griA* immer die gleiche Mutation

auf. Das zeigt, dass innerhalb Europas nur eine kleine Zahl von Mutationen wirklich eine Rolle in der Resistenzvermittlung gegenüber Fluorochinolonen spielt. Diese Untersuchungen bestätigen so frühere Studien an kleineren Populationen (Ferrero *et al.*, 1995; Schmitz *et al.*, 1998; Ito *et al.*, 1994; Takahata *et al.*, 1996; Takenouchi *et al.*, 1995; Yamagishi *et al.*, 1996).

5.1.2.2 *S. pneumoniae*

Bei 427 klinischen Pneumococcenisolaten wurden die MHK-Werte von Ciprofloxacin, Clinafloxacin, Gatifloxacin, Gemifloxacin, Levofloxacin, Moxifloxacin, Sitafloxacin und Trovafloxacin bestimmt. Die MHK-Werte wurden in Anwesenheit des Effluxhemmers wiederholt, um den Einfluss von Effluxpumpen zu ermitteln. 25 Isolate wiesen eine Ciprofloxacin-MHK von >2 mg/L auf. Bei diesen Stämmen wurden die QRDR von *gyrA*, *gyrB*, *parC* und *parE* durch PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Üblicherweise sind die Alterationen in *S. pneumoniae* an Codon-Position 81 in *gyrA* und an den Positionen 79 und 83 in *parC* zu finden. Resistenzmutationen in *gyrB* und *parE* wurden ebenfalls beschrieben, haben offenbar aber klinisch keine große Bedeutung (Bast *et al.*, 2000; Fukuda *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2000; Jorgensen *et al.*, 1999; Pestova *et al.*, 1999). Dies wird auch in dieser Arbeit deutlich, da keine Mutation in *gyrB* und nur eine Mutation in *parE* (Ile460Val) entdeckt wurde, die jedoch einen geringeren Effekt auf die MHK hatte, als entsprechende Veränderungen in *gyrA* oder *parC*. In der vorliegenden Studie wurden Isolate mit verminderter Ciprofloxacinempfindlichkeit mittels PCR amplifiziert (Jones *et al.*, 2000) und sequenziert und die klassischen Alterationen an den „hot spots“ gefunden, nämlich Ser81Phe oder Tyr in GyrA und Ser79Phe und Asp83Asn in ParC.

Die Ergebnisse zeigen die vorherrschenden Mutationen und Mutationskombinationen in den QRDR für klinische Pneumococcenisolate. Sie stimmen überein mit früheren Studien zu solchen Keimen (Jorgensen *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2000; Janoir *et al.*, 1996; Davies *et al.*, 2000; Gonzalez *et al.*, 1998; Janoir *et al.*, 1999). Nur die klassischen, bereits bekannten Mutationen in *gyrA* und *parC* scheinen eine signifikante Rolle bei der Vermittlung der Chinolonresistenz zu

spielen. Mutationen in *gyrB* und *parE* sind scheinbar in der Resistenzvermittlung weniger bedeutsam. Resistenzuntersuchungen zeigen auch hier deutlich den Zusammenhang zwischen Chinolon- und Penicillin-resistenz.

Kürzlich veröffentlichte Studien zeigten einen in-vitro-Transfer von Fluorochinolon-Resistenzdeterminanten von klinischen Isolaten von Viridansstreptococcen zu Pneumococcen (Janoir *et al.*, 1999). Es wäre interessant, den Effekt selektiven Drucks auf diese genetischen Systeme durch neuere Fluorochinolone zu beobachten. Viele dieser Antibiotika bewahren eine hohe in-vitro-Aktivität, auch wenn die MHK durch Mutationen gegenüber Stämmen ohne Mutationen deutlich erhöht ist.

5.1.3 BMS 294756

BMS trägt, im Gegensatz zu den Fluorochinolonen, keinen Fluorliganden an C-Atom 6. Dies stellt zur Zeit die neueste Entwicklung bei den Chinolon-Antibiotika dar. Daher sollte diese neue Substanz in ihrer Aktivität vor allem gegenüber MRSA und anderen Erregern mit problematischen Resistenzphänotypen ermittelt werden. Außerdem wurde untersucht, ob BMS ein Substrat für Effluxpumpen ist. Dazu wurde bei klinischen *S. aureus*- und Pneumococcen-Stämmen die MHK-Werte für Ciprofloxacin, Gatifloxacin, Moxifloxacin und BMS gemessen und verglichen. Außerdem wurden Pneumococcenisolate mit bekannten, schwierigen Resistenzphänotypen auf ihre Empfindlichkeit gegenüber BMS untersucht. Bei diesen Stämmen wurden außerdem die BMS-MHKs in Anwesenheit von Reserpin wiederholt und die QRDR der Resistenzgene amplifiziert und sequenziert. Für beide getesteten Spezies, *S. aureus* und *S. pneumoniae*, zeigte sich, dass BMS, dem im Gegensatz zu älteren Chinolonen der Fluor-Ligand am C6-Atom fehlt, von allen geprüften Substanzen die höchste in-vitro-Aktivität aufwies. Mutationen, die bei anderen Chinolonen zu klinischer Resistenz führten, erhöhten zwar auch die MHK-Werte für BMS, dieses blieb jedoch weiterhin wirksam.

Die Substanz BMS wurde auch an hetero-VISA-Stämmen (Geisel *et al.*, 1999) von *S. aureus* erprobt. In dieser Versuchsreihe, deren sieben Stämme alle dem gleichen

klonalen Typ, dem norddeutschen Epidemiestamm, angehörten, zeigte sich, dass die MHK-Werte für Ciprofloxacin bei 128 mg/l, also extrem hoch, waren. Die Werte für Moxifloxacin und Gatifloxacin waren 2 und 4mg/l. Auch hier blieb BMS mit einer MHK von 0,5mg/l wirksam, bei einem angenommenen Grenzwert für klinische Resistenz bei >1mg/l. Dies belegt, dass BMS auch gegen die äußerst schwer zu therapierenden hetero-VISA eine gute in-vitro-Aktivität hat. Hier könnte eine Behandlungsalternative entstehen.

Insgesamt waren alle getesteten *S. aureus*-Stämme sensibel gegenüber BMS. Im Vergleich zu anderen Fluorochinolonen wurde BMS durch Mutationen in den QRDR von *gyrA*, *gyrB* und *grlA*, die mit einer Chinolonresistenz verbunden sind, weniger berührt (Schmitz *et al.*, 1998).

Auch alle *S. pneumoniae*-Isolate waren gegenüber BMS sensibel und auch hier fielen bekannte Resistenzmutationen weniger stark ins Gewicht als bei den anderen Substanzen. Die gute Wirksamkeit von BMS zeigte sich auch in Stämmen mit verminderter Empfindlichkeit gegenüber den Antibiotika, die häufig in der Pneumococcentherapie eingesetzt werden wie den Makroliden und Tetracyclinen. Das neue Chinolon BMS scheint also auch eine vielversprechende Substanz in der anti-Pneumococcen-Therapie zu sein. Die Versuche mit Reserpin zeigten, dass BMS kein Substrat für die Effluxpumpen NorA in *S. aureus* und PmrA in *S. pneumoniae* ist. Auch das bietet einen großen Vorteil in der Therapie. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass BMS-294756 im Vergleich mit den anderen sich zur Zeit auf dem Markt befindenden Fluorochinolonen (Ciprofloxacin, Gatifloxacin, Moxifloxacin) eine deutlich erhöhte in-vitro-Aktivität aufweist.

5.2 Makrolide

MLS-Antibiotika kommen bei Infektionen des Respirationstraktes, wie sie von Pneumococcen und Staphylococcen verursacht werden, häufig zum Einsatz. Die MLS-Antibiotika inhibieren die Proteinbiosynthese, indem sie an Strukturen der bakteriellen Ribosomen binden. Resistenzvermittelnde Enzyme werden durch

eine Vielzahl Gene kodiert, von denen die wichtigsten *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *ere(A)*, *ere(B)*, *msr(A/B)* und *mef(A)* sind. Die Erm-Proteine sind Methylasen, die die rRNA methylieren und somit vor MLS-Antibiotika schützen, die Ere-Proteine sind Esterasen, die Makrolide inaktivieren, und Msr und Mef sind Effluxpumpen. Auch in diesem Teil der Arbeit sollte wieder ein Überblick über die Resistenzlage gegenüber MLS-Antibiotika gegeben werden. Es wurde außerdem die Verteilung der einzelnen Resistenzgene analysiert.

Erm(A) und *erm(C)* können sowohl induziert oder konstitutiv exprimiert werden. Als Induzierer gelten nur bestimmte Makrolide. Der Unterschied liegt in strukturellen Veränderungen der Translationsattenuatoren der beiden Gene. Diese Veränderungen sind bei *erm(C)* gut untersucht. Bei *erm(A)* gab es allerdings noch keine Untersuchungen bei klinischen Isolaten. Dies wurde hier getan. Außerdem sollte aufgeklärt werden, ob *S. aureus*-Stämme mit induzierbarer MLS-Resistenz in Anwesenheit von Nicht-Induzierern, besonders den neuen Ketoliden, in der Lage sind, Mutanten mit konstitutiver *erm(A)*-Expression zu selektionieren und welche strukturellen Veränderungen bei solchen Mutanten auftreten.

5.2.1 Epidemiologische Verteilung der Resistenzen

In diesem Teil der Untersuchungen ging es darum, zu ermitteln, wie weit die MLS-Resistenz unter klinischen *S. aureus*- und Pneumococcen-Stämmen verbreitet ist. Dazu wurden bei großen Stammkollektiven die MHK-Werte wichtiger Vertreter der MLS-Antibiotika gemessen und die Ergebnisse analysiert.

5.2.1.1 *S. aureus*

764 MRSA und 2287 MSSA wurden auf ihre MHK-Werte gegen Erythromycin, Clindamycin und Synercid untersucht. Die Resistenzraten bei den MRSA betrugen 84,5% bei Erythromycin, 76% bei Clindamycin und 2,8% bei Synercid. Bei den MSSA waren dies 16,8% bei Erythromycin, 6,0% bei Clindamycin und 0,6% bei Synercid. Besonders auffällig ist der große Unterschied in den Resistenzraten bei MRSA und MSSA. Hier wird wieder gezeigt, dass viele Multiresistenzen mit der

Methicillinresistenz einhergehen. Multiresistenz bedeutet hier, dass die Resistenzen in Kombination auftreten, ohne dass dieselben Mechanismen zum Tragen kommen. Dies liegt an der Lokalisierung des *mecA*-Genes auf verbreiteten Resistenzplasmiden, die auch eine Vielzahl anderer Resistenzgene tragen können, wie Gene zur Ausbildung von Makrolid-, Aminoglycosid- und Schwermetallresistenz sowie von Desinfektionsmittelunempfindlichkeit. Für den Therapeuten bedeutet dies, dass er MLS-Antibiotika zur Therapie von MRSA nicht einsetzen kann.

Da der Einsatz von Synercid (Quinupristin/Dalfopristin) sich aufgrund des bisherigen Datenmaterials und der initialen klinischen Erfahrung als erfolgversprechende Möglichkeit darstellt (Bouanchaud, 1997; Mulazimoglu *et al.*, 1996; Thal *et al.*, 1998; Trautmann *et al.*, 1999), die sich vor dem Hintergrund einer zunehmenden Resistenz bei grampositiven Kokken in Zukunft als Alternativen zu den Glycopeptid-Antibiotika anbieten dürfte, sind neben den klassischen ML-Antibiotika Erythromycin und Clindamycin auch die MHK-Werte grampositiver Kokken gegenüber dieser neuen Substanz gemessen worden. Auch die hier erzielten Ergebnisse erwiesen sich als sehr vielversprechend.

Die hier aufgeführten Ergebnisse über die Multiresistenz zwischen Methicillinresistenz und ML-Resistenz stimmen mit denen anderer publizierter Studien überein (Pfaller *et al.*, 1997). Die extensive Benutzung älterer Makrolide hat zu einer ausgebreiteten Resistenzentwicklung geführt (Schmitz *et al.*, 1997). Fast alle MRSA sind resistent gegenüber Erythromycin und den neueren 14- und 15-gliedrigen Makroliden. Die 16-gliedrigen Makrolide sind andererseits aktiv gegen Isolate, die eine induzierbare Erythromycin-Resistenz aufweisen. Ob dies klinische Konsequenzen hat, ist noch unklar. Zur Zeit können Makrolide jedenfalls nicht als effektive Antibiotika bei MRSA-Infektionen eingesetzt werden. Die Resistenz und die Entwicklung einer Resistenz während der Therapie gegenüber Clindamycin ist weit verbreitet, besonders, wenn ein Stamm schon resistent gegenüber Erythromycin ist. Dieses Antibiotikum wurde erfolgreich bei Knocheninfektionen eingesetzt, aber wegen der schnellen Resistenzentwicklung ist es niemals die Substanz erster Wahl, auch nicht bei empfindlichen Isolaten.

Synercid wies eine gute Aktivität gegen Staphylococcen auf. Kein Isolat hatte eine MHK > 4 mg/l. Die in-vitro-Aktivität könnte allerdings durch eine Makrolidresistenz beeinflusst werden. Dafür könnten Unterschiede in den Absterbekinetiken für Synercid sprechen (Low *et al.*, 1997). MRSA scheinen weniger empfindlich gegenüber Synercid zu sein als MSSA. Allerdings könnte Synercid eine vielversprechende Alternative zu Vancomycin in der MRSA-Therapie darstellen. Um dies zu überprüfen, werden aber noch weitere pharmakokinetische Studien benötigt, besonders auch hinsichtlich der Resistenzentwicklung während der Therapie. Zusätzlich müssen mögliche Resistenzdeterminanten in-vitro und in vivo untersucht werden.

5.2.1.2 *S. pneumoniae*

Bei 1191 klinischen Pneumococcenisolaten wurden die MHK-Werte von Erythromycin, Clarithromycin, Azithromycin, Clindamycin und Synercid gemessen. 19,4% der Isolate zeigten eine Resistenz gegenüber Erythromycin und 14,3% gegenüber Clindamycin. Synercid-resistente Isolate konnten nicht gefunden werden. Bis in die siebziger Jahre des vorigen Jahrhunderts wurden Pneumococcen erfolgreich mit β -Lactamen behandelt. Seitdem wurde eine weltweite Zunahme der Penicillinresistenz beobachtet. Damit traten auch vermehrt multiresistente Pneumococcen auf. MLS-Resistenz ist bei Pneumococcen zwar noch nicht so weit verbreitet wie bei MRSA, aber vermutlich wird die Resistenzrate steigen, analog zu Beobachtungen, die man bei anderen Bakterienspezies gemacht hat. Synercid scheint eine gute in-vitro-Aktivität gegenüber Pneumococcen zu haben. Die MHK-Spannweite war sehr gering; kein Isolat wies eine höhere MHK als 4 mg/L auf.

5.2.2 Epidemiologische Verteilung der Resistenzgene

Die Verbreitung und Häufigkeit der einzelnen Resistenzgene innerhalb der *S. aureus*- und Pneumococcenpopulation sollte ermittelt werden. Dabei war auch interessant, ob sich Unterschiede zwischen MRSA und MSSA ergeben würden.

Eine Vielzahl klinischer Isolate wurden mittels Amplifizierung durch PCR auf das Vorhandensein der Gene *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *ere(A)*, *ere(B)*, *msr(A/B)* und *mef(A)* untersucht.

5.2.2.1 *S. aureus*

439 MRSA und 358 MSSA wurden auf das Vorhandensein der wichtigsten MLS-Resistenzgene untersucht, indem Fragmente dieser Gene mit einer PCR amplifiziert wurden und anschließend im Agarosegel nachgewiesen wurden. Dabei zeigte sich, dass bei den MRSA weitaus am häufigsten *erm(A)* mit konstitutiver Genexpression zu finden war, während bei den MSSA *erm(C)* ist induzierbarer Genexpression auftrat. In 3% der Fälle wurden beide *erm*-Gene gleichzeitig gefunden. Die anderen Gene traten wesentlich seltener auf. Die Beobachtungen der vorliegenden Untersuchung stimmen mit den Ergebnissen von Lina *et al.* überein (Lina *et al.*, 1999). Diese Autoren untersuchten 144 MLS_B-resistente *S. aureus*-Stämme aus dem Jahre 1995 aus französischen Kliniken. Auch sie fanden, dass das *erm(A)*-Gen mit 58% häufiger bei MRSA-Isolaten, insbesondere bei Isolaten mit konstitutiver MLS_B-Expression auftrat, als bei MSSA-Isolaten (6%). Demgegenüber war *erm(C)* mit 20% wesentlich häufiger bei MSSA, insbesondere bei solchen mit induzierbarer MLS_B-Expression, als bei MRSA (5 %) zu beobachten. Von 428 Erythromycin-resistenten *S. aureus*-Stämmen aus Dänemark, die zwischen 1959 und 1988 getestet wurden, wiesen 98% die Gene *erm(A)* und/oder *erm(C)* auf (Westh *et al.*, 1995). Interessanterweise war *erm(A)* nur bis 1971 eindeutig vorherrschend, zwischen 1984 und 1988 gewann dann *erm(C)* zunehmend an Bedeutung. Das Gen *erm(A)* ist als Teil des Transposons *Tn554* primär im Chromosom lokalisiert (Tillotson *et al.*, 1989), wogegen *erm(C)* primär auf Plasmiden gefunden wurde (Thakker-Varia *et al.*, 1987). In Übereinstimmung mit den Beobachtungen aus Dänemark konnten Nicola *et al.* (1998) das *erm(A)*-Gen in 15 von 16 Erythromycin-resistenten *S. aureus*-Isolaten nachweisen, die zwischen 1958 und 1969 in den Vereinigten Staaten gesammelt worden waren. Das *erm(C)*-Gen scheint sich erst zu einem späteren Zeitpunkt innerhalb der *S. aureus*-Population ausgebreitet zu haben. Bezüglich der geringen Prävalenz von

erm(B) stimmen die vorliegenden Ergebnisse mit denen früherer Studien überein (Lina *et al.*, 1999; Nicola *et al.*, 1998). Das Gen *erm(B)* ließ sich jeweils nur bei einer sehr geringen Anzahl von Stämmen nachweisen und war früher sogar ausschließlich in Isolaten tierischer Herkunft detektierbar (Eady *et al.*, 1993). Im Gegensatz zu Lina *et al.* und Nicola *et al.* wurden bei dieser Untersuchung bei den *S. aureus*-Isolaten auch ein gemeinsames Auftreten unterschiedlicher *erm* Gene gefunden.

Das *ere(B)*-Gen konnte lediglich in MRSA mit konstitutiver MLS_B Expression (5/458; 1%) nachgewiesen werden. Ein Zusammenhang zwischen *ere(B)* und einem anderen Makrolid-Resistenzgen war nicht nachweisbar. Uns ist keine vergleichbare Untersuchung bekannt, die die Prävalenz von *ere(A)* und *ere(B)* in einem Kollektiv Erythromycin-resistenter *S. aureus*-Isolate beschreibt.

Die *msr(A)/msr(B)*-Gene konnten immerhin bei 13% (14/358) der MSSA-Isolate nachgewiesen werden. Die hier gemachten Beobachtungen unterscheiden sich in dieser Hinsicht von denen Lina *et al.* (1999). Diese fanden das *msr(A)/msr(B)*-Gen nämlich nicht nur bei MSSA, sondern auch bei MRSA. Die Prävalenz, mit der das Gen innerhalb der getesteten 144 *S. aureus*-Isolate auftrat, lag mit 2,1% ebenfalls deutlich unter dem Befund der vorliegenden Untersuchung. Dagegen deckten sich die Beobachtungen in Bezug darauf, dass offensichtlich keine Verbindung zwischen *msr(A)/msr(B)* und dem Auftreten anderer Makrolid-Resistenzgene besteht. Bis heute wurden lediglich drei *S. aureus*-Isolate beschrieben, bei denen sowohl eine Esteraseaktivität als auch ein Makrolid-Effluxsystem nachweisbar waren (Matsuoka *et al.*, 1997; Wondrack *et al.*, 1996).

Die Häufigkeit derjenigen Isolate, die eine Erythromycin-Resistenz aufwiesen, allerdings ohne Nachweis eines der sechs getesteten Resistenzgene, bewegte sich je nach der untersuchten Gruppe zwischen 4,5% und 8,6%. Dies legt den Schluss nahe, dass noch weitere, bis heute unerkannte Resistenzmechanismen bzw. Resistenzgene für die Ausbildung einer Makrolid-Resistenz bei *S. aureus* vorhanden sein müssen.

5.2.2.2 *S. pneumoniae*

215 Pneumococccenisolate wurden auf das Vorhandensein der MLS-Resistenzgene mittels PCR untersucht. Nur zwei Gene konnten in allen Isolaten gefunden werden: *erm(B)* in 73% der Fälle und *mef(E)*, das nur Resistenz gegenüber Makroliden vermittelt (M-Phänotyp) in 27% der Fälle. Während der M-Phänotyp mit über 50% Vorkommen die dominierende Form der Makrolid-Resistenz in den USA und Kanada (Johnston *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1996; Shortridge *et al.*, 1999; Shortridge *et al.*, 1996) darstellt, ist in Europa, Japan und Südafrika primär die über das *erm(B)*-Gen vermittelte MLS_B-Resistenz in 60-90% der Isolate zu beobachten (Latini *et al.*, 1999; Marchese *et al.*, 1999; Nishijima *et al.*, 1999; Widdowson *et al.*, 1998).

Bei der Untersuchung aller Erythromycin-resistenten *S. pneumoniae*-Isolate aus der SENTRY-Kollektion auf resistenzvermittelnde Mutationen in den ribosomalen Proteinen L4 und L22 sowie in der 23S-rRNA ließen sich nicht die Veränderungen finden, die vor kurzem beschrieben wurden (Depardieu *et al.*, 2001; Tait-Kamradt *et al.*, 2000; Tait-Kamradt *et al.*, 2000). Das häufigere Vorkommen des *erm(B)* Gens in europäischen Isolaten wurde schon von anderen Autoren beschrieben (Fitoussi *et al.*, 2001; Lagrou *et al.*, 2000; Latini *et al.*, 1999; Marchese *et al.*, 1999; Oster *et al.*, 1999). Eine andere „Surveillance-Studie“ beschrieb die Anzahl der *erm(B)* und *mef(A)* negativen Isolate mit 2,2 % bezogen auf die Erythromycin-resistenten Stämme (Di Modugno *et al.*, 2000). In der vorliegenden Untersuchung wiesen alle resistenten Isolate eines der beiden Resistenzgene auf.

Für andere Streptokokken-Spezies wurden auch vergleichbare Prävalenz-Studien durchgeführt (Kataja *et al.*, 1998; Kataja *et al.*, 1998; Roberts *et al.*, 1994).

5.2.3 Strukturelle Veränderungen in der Regulatorregion von *erm(A)*

Um die Veränderungen im Translationsattenuator zu untersuchen, die bei klinischen *S. aureus*-Isolaten zu einer konstitutiven *erm(A)*-Expression führen, wurden diese Regulatorregionen bei 40 MRSA und 24 MSSA mit einer PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Die Sequenzen wurden mit der

Sequenz eines induziert exprimierten *erm(A)* verglichen. In der Regulatorregion von *erm(A)* wurden fünf neue strukturelle Veränderungen gefunden. Diese waren: drei Deletionen, 83, 121 und 123 bp lang, und zwei 25 bp lange Duplikationen. Die 83 bp-Deletion umfasst das gesamte 19 aa-Peptid und IR2 und 3. Als Konsequenz dieser Deletion wird die stabilste mRNA-Struktur nun durch die Paarung von IR4 und IR5 gebildet. Dadurch liegt IR 6 frei. Das Gen wird konstitutiv exprimiert. Diese Deletion ist vergleichbar mit der 58 bp- und der 59 bp-Deletion, die kürzlich für die Regulatorregion von *erm(C)* beschrieben wurde (Werckenthin *et al.*, 1999).

Die eng verwandten 121 bp- und 123 bp-Deletionen umfassen ebenfalls das 19 aa-Peptid mit I42 und IR5. IR1 und IR6 bleiben also als einziges regulatorisches Element erhalten. Die Ausbildung von Sekundärstrukturen ist nicht möglich. Damit ist IR6 immer frei, so dass eine konstitutive Expression von *erm(A)* möglich ist. Diese Deletionen sind funktionell mit den 107 bp- und 111 bp-Deletionen in *erm(C)* vergleichbar (Werckenthin *et al.*, 1999).

Die beiden Duplikationen bewirken, dass zwei IR6-Strukturen in der Regulatorregion auftauchen, IR6 und IR6a. In der Abwesenheit eines induzierenden Antibiotikums bilden sich Sekundärstrukturen durch die Paarungen IR3:IR4 und IR5:IR6a. IR6 bleibt frei. In Anwesenheit einer induzierenden Substanz paaren sich IR4:IR5 und IR6 sowie IR6a bleiben frei. Diese Strukturen sind verwandt mit der 23 bp-Duplikation in *erm(C)* (Werckenthin *et al.*, 1999).

Das Modell, das das Auftreten identischer Deletionen in der Regulatorregion von *erm(C)* mit homologer Rekombination an einzelnen Sequenzabschnitten erklärt, scheint auch auf den eng verwandten Translationsattenuator von *erm(A)* anwendbar zu sein. Die Region up- und downstream der 83 bp, 121 bp- und 123 bp-Deletion zeigt Bereiche von 10 oder 11 bp mit 73% -80% Übereinstimmung. Die Größen der mutmaßlichen Rekombinationsorte und ihre Sequenzübereinstimmungen sind vergleichbar mit denen, die in der Regulatorregion von *erm(C)* identifiziert wurden (Werckenthin *et al.*, 1999).

Im Gegensatz zu den Deletionen werden die Tandemduplikationen als einzigartige strukturelle Veränderungen angesehen, die entweder durch Replikationsfehler oder durch fehlerhafte Rekombination zustande gekommen sein könnten (Werckenthin *et al.*, 1999). Die Beobachtung, dass dieselbe 25 bp-Duplikation in 51 nicht verwandten Isolaten gefunden wurde, unterscheidet sich von der Situation in *erm(C)*, wo alle bisher bekannten Duplikationen nur in einzelnen Isolaten entdeckt wurden (Werckenthin *et al.*, 1999).

Eine mögliche Erklärung für das verbreitete Auftreten dieser Duplikation könnte die Verbreitung eines Tn554-Elementes sein, das ein solcherart mutiertes *erm(A)* trägt. Dies ist wahrscheinlicher als die unabhängige Entwicklung einer solchen Struktur in 51 verschiedenen Stämmen.

Die hier vorliegenden Untersuchungen zeigten zum ersten Mal, dass Duplikationen und Deletionen für die konstitutive Expression in klinischen *S. aureus*-Isolaten verantwortlich sind. Allerdings wurden schon Deletionen von 90 – 130 bp, eine 12 bp-Tandemduplikation und eine Punktmutation, die alle konstitutive Expression verursachten, gefunden bei Stämmen, die *in vitro* unter dem Einfluss einer induzierenden Substanz selektiert wurden (Murphy *et al.*, 1985). Diese Daten über *in-vivo* aufgetretene Mutationen sind eine schöne Ergänzung zu den *in vitro* erhaltenen Mutationen (Murphy *et al.*, 1985) ebenso wie zu einer Mutation, die in einem Tierisolat gefunden wurde (Werckenthin *et al.*, 2000) und zeigen, dass ähnliche Mutationen unter natürlichen Bedingungen entstehen. Die *erm(A)*-Mutation ist ein schneller und nicht reversibler Prozess. Unter *in-vitro* Bedingungen sind konstitutive Mutanten sogar in Anwesenheit von nicht-Induzierern anzufinden (Murphy *et al.*, 1985; Weisblum *et al.*, 1995; Werckenthin *et al.*, 1999). Die Reversion zum induzierbaren Keim wurde bisher in keiner dieser Mutanten beobachtet. Daher sollten nicht-induzierende Antibiotika, wie Streptogramine und Linkosamide nicht für die Therapie bei Staphylococcen eingesetzt werden, die eine induzierbare MLS_B-Resistenz tragen.

5.2.4 Molekulare Charakterisierung von in-vitro erzeugten ketolidresistenten Mutanten

Frühere Studien haben gezeigt, dass induzierbare *erm(A)*-Expression durch Kultivierung von Staphylococcen in der Anwesenheit bestimmter nicht-Induzierer, wie Tylosin oder Lincosamiden, in konstitutive Expression umgewandelt werden kann (Murphy *et al.*, 1985; Sandler *et al.*, 1988). Der Translationsattenuator, der essentiell ist für die induzierbare Expression, wurde in allen solchen Isolaten entweder durch Deletionen, Tandemduplikationen oder Punktmutationen an Schlüsselstellen verändert (Murphy *et al.*, 1985; Sandler *et al.*, 1988). Seit der Mitte der 1980er Jahre ist es daher eine allgemein akzeptierte Tatsache, dass Stämme in Anwesenheit bestimmter nicht-Induzierer in der Lage sind, Mutanten zu entwickeln mit gewissen strukturellen Veränderungen, die die Art der *erm(A)*-Expression ändern. Dadurch wird auch das Spektrum derjenigen MLS_B- Antibiotika erhöht, die gegen einen solchen Stamm nicht mehr wirksam sind. Einige Jahre hindurch wurde versucht, eine neue Klasse von Antibiotika zu entwickeln, die in der Lage sind, die MLS_B-Resistenz durch Ribosomen-Methylierung zu überwinden. Diese neu entwickelte Klasse umfasst die Ketolide. Ketolide, wie Telithromycin und ABT-773, sind auch bei methylierten Ribosomen wirksam und ihre Aktivität wurde bei vielen Gattungen der gram-positiven Bakterien als sehr gut eingestuft (Schülin *et al.*, 1998; Andrews *et al.*, 2000; Hamilton-Miller *et al.*, 2000; Hamilton-Miller *et al.*, 1998; Malathum *et al.*, 1999; Mitten *et al.*, 2001). Die Beobachtung, dass Ketolide nicht in der Lage sind, *erm*-Expression zu induzieren (Bonney *et al.*, 1997), warf zwei Fragen auf:

- Sind *S. aureus*-Stämme in der Lage, in Anwesenheit von Ketoliden und anderen Antibiotika wie Dalfopristin, Quinopristin und Synercid, Mutanten mit konstitutiver Genexpression auszubilden?
- Falls ja, welche strukturellen Änderungen im Translationsattenuator wären zu finden?

Um die erste Frage zu beantworten, wurden in-vitro-Selektionsversuche mit den genannten Antibiotika unternommen. Da *erm(A)* nicht in der Lage ist, auch bei

konstitutiver Expression nicht, Resistenz gegenüber Synercid oder Dalfopristin zu vermitteln, wurden in Selektionsversuchen mit diesen Antibiotika auch keine Mutanten mit konstitutiver Expression gefunden. Jede einzelne der übrigen vier getesteten Substanzen führte sehr wohl dazu, Mutanten mit konstitutiver Expression selektiert wurden, obwohl Unterschiede in den Mutationen und in der Mutationsrate gefunden wurden. Um die zweite Frage zu beantworten, wurden die Translationsattenuatoren der erhaltenen Mutanten amplifiziert und sequenziert. Punktmutationen waren die seltensten Mutationen, die gefunden wurden, und tauchten nur in drei von 146 Mutanten auf. Die 5363C → G-Mutation erschien in allen drei Mutanten und erwies sich als identisch mit der lin-71 Mutation, die schon von Murphy *et al.* (1985) als Grund für konstitutive *erm(A)*-Expression beschrieben wurde. Diese Mutation destabilisiert die mRNA-Sekundärstrukturen, in die IR3 eingebunden sind. Die zusätzlichen Basentausche und Insertionen, die in einer Mutante in IR4 und IR5 beobachtet wurden, scheinen diesen Effekt zu verstärken, indem sie die Ausbildung stabiler Sekundärstrukturen verhindern, an denen IR3, IR4 und IR5 beteiligt sind. Wie aus in-vitro Studien (Murphy *et al.*, 1985; Sandler *et al.*, 1988) und aus der Analyse natürlicher Mutanten mit konstitutiver Expression (s.o.) bekannt ist, erschienen Tandemduplikationen nur selten, möglicherweise als Konsequenz von Fehlern bei der Replikation oder Rekombination. Die gefundenen 25 bp- und 26 bp-Duplikationen waren eng mit den oben beschriebenen 25 bp-Duplikationen verwandt. Der dritte Duplikationstyp, bei dem ein Segment mit Teilen von IR5 und IR6 in die originale IR5-Sequenz inseriert wurde, wurde hier zum ersten Mal beschrieben.

Die Insertion von IS256 in den Translationsattenuator von *erm(A)* ist eine neue Beobachtung. Dieser Typ struktureller Änderung ist auf solche Stämme beschränkt, die die IS256-Sequenz beherbergen. IS256 ist für gewöhnlich mit dem Gentamycin-Tobramycin-Kanamycin-Resistenz-Transposon Tn4001 assoziiert (Byrne *et al.*, 1990), aber auch unabhängige IS256-Sequenzen wurden in Staphylococcen schon gefunden (Dyke *et al.*, 1992). Für IS256 oder Tn4001 sind keine spezifischen Integrationsstellen beschrieben, aber die Analyse der bis jetzt

bekannten Integrationen könnte darauf schließen lassen, dass AT-reiche Regionen bevorzugt werden (Dyke *et al.*, 1992). Die Integrationsstelle im Attenuator von *erm(A)* besteht hauptsächlich aus A und T. Die Integration von IS256 trennte die Promotorregion vom Strukturgen um mehr als 1,3 bp. Es existieren zwei mögliche Wege, wie die Transkription von *erm(A)* erreicht werden könnte. Da kein Transkriptionsterminator im terminalen Teil von IS256 aufzufinden ist, ist die Transkription einer mRNA des Transposase-Gens von IS256 und dem downstream verbundenen *erm(A)* vielleicht möglich. In diesem Falle wird angenommen, dass die Ausbildung von Sekundärstrukturen upstream vom Strukturgen zwischen IR4 und IR5 stattfindet, so dass IR6 frei bleibt und somit eine konstitutive Expression möglich ist. Es muss aber auch die Möglichkeit der Generierung eines neuen Promotors durch die Integration von IS256 beachtet werden. Die terminalen sechs Basen von IS256, TTGACT, weisen eine signifikante Ähnlichkeit mit der *Bacillus subtilis* -35-Region auf (TTGACA). Weitere 15 Basen downstream (8 Basen aus der Zielstellenduplikation und 7 Basen aus der originalen Attenuatorsequenz von *erm(A)*) wurde die Sequenz TATAAT gefunden, die exakt mit der Konsensus-Sequenz der -10-Region von *B. subtilis* übereinstimmt. In diesem Fall könnte die Transkription zwischen IR4 und IR5 beginnen und das 5'-Ende dieses Transkriptes könnte eine Paarung mit Teilen der IR5-Sequenz bilden, so dass IR6 erreichbar bleibt. Diese Beobachtung könnte auch eine Erklärung dafür liefern, warum die Integration in allen 49 Isolaten in der selben Orientierung und an der selben Stelle stattfand, obwohl die Mutanten unabhängig voneinander und mit drei verschiedenen Antibiotika selektioniert wurden.

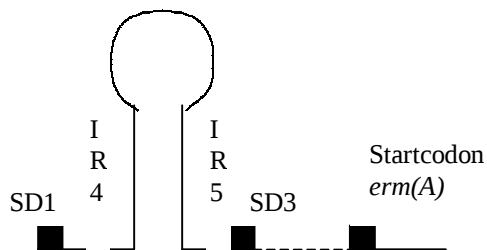
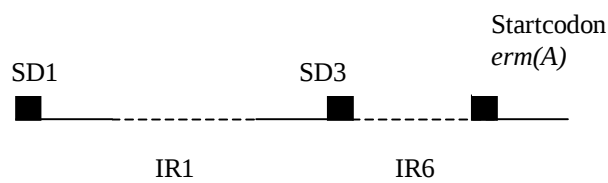
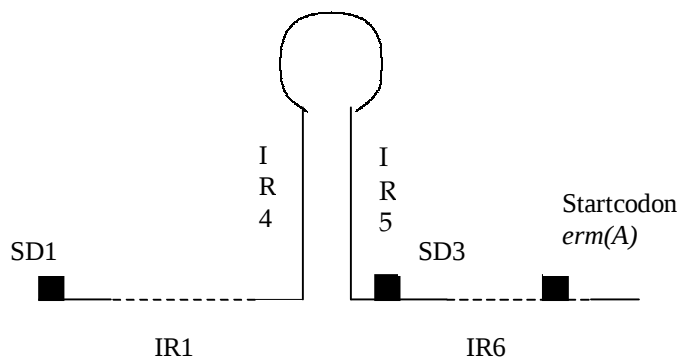
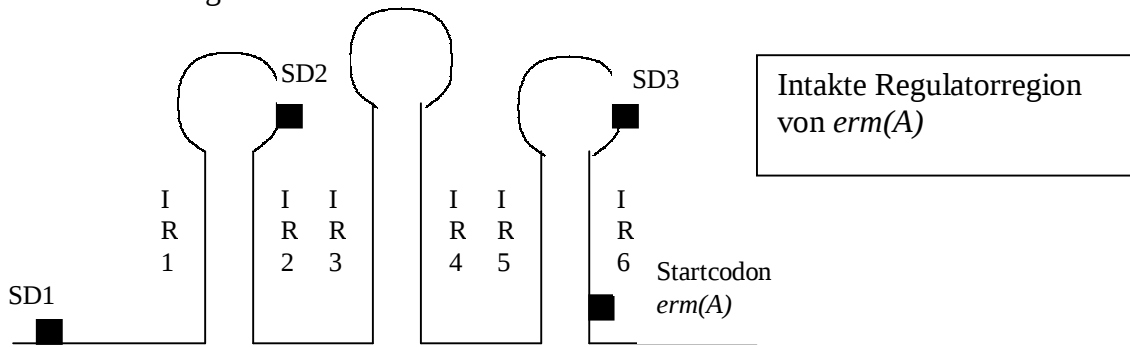
Alle sechs Arten von Deletionen, die gefunden wurden, verhinderten entweder ganz die Bildung von Sekundärstrukturen (121bp-, 131 bp- und 157 bp-Deletion) oder begünstigten die Bildung solcher Strukturen, die nicht IR6 beinhalteten (14 bp-, 83 bp- und 147 bp-Deletion). So wurde die Translation von *erm(A)* unabhängig von der Anwesenheit von Induzieren. Zwei der Deletionen, die 83 bp- und die 121 bp-Deletion, sind identisch zu denen, die in den klinischen Isolaten gefunden wurden. Darüber hinaus wurden alle Deletionen mindestens in zwei

unterschiedlichen Mutanten gefunden. Das Auftreten unabhängiger Deletionen in der Regulatorregion von *erm(C)* in nicht verwandten Staphylococcen wurde schon beschrieben (Werckenthin *et al.*, 1999). Von einem Mechanismus, der das *recA*-abhängige Rekombinationssystem der Wirtszelle benutzt, wurde experimentell bestätigt, dass er die Bildung von Deletionen an wichtigen Stellen des Translationsattenuators begünstigt (Werckenthin *et al.*, 1999). Da die Translationsattenuatoren von *erm(A)* und *erm(C)* eng verwandt sind, könnte illegitime Rekombination zwischen Teilen des Attenuators, die eine gewisse Sequenzidentität aufweisen, auch eine Erklärung sein für die hier gefundenen Deletionen. Die Regionen upstream und downstream aller Deletionen zeigen Bereiche von 10 – 17 Basen mit 60 – 80% Übereinstimmung. Die Größen der potentiellen Rekombinationsorte und die sequentielle Übereinstimmung sind vergleichbar mit denen, die für *erm(C)* identifiziert wurden (Werckenthin *et al.*, 1999).

Zusammenfassend kann man sagen, dass vier nicht-Induzierer, Clindamycin, Quinupristin, Telithromycin und ABT-773 dazu führten, dass Mutanten mit konstitutiver *erm(A)*-Expression selektiert wurden. Alle Mutanten zeigten strukturelle Änderungen im Translationsattenuator. Unabhängig vom Typ der Änderung resultierten aus den einzelnen Mutationen sehr hohe MHK-Werte für alle getesteten Antibiotika. Im Gegensatz zu Deletionen, Duplikationen und Punktmutationen ist die Integration von IS256 eine neue Beobachtung. Die Tatsache, dass Mutanten mit konstitutiver Expression auch resistent waren gegenüber den neuen Ketoliden und dass solche Mutanten nach Übernachtkultivierung mit Ketoliden selektioniert werden konnten, zeigt, dass der Einsatz von Ketoliden zur Behandlung von Infektionen mit konstitutiv resistenten *S. aureus* nicht empfehlenswert ist.

Abbildung 45 zeigt die strukturellen Konsequenzen der in dieser Arbeit gefundenen und in den Kapiteln 4.2.3 und 4.2.4 beschriebenen Änderungen der Regulatorregion.

Abbildung 45



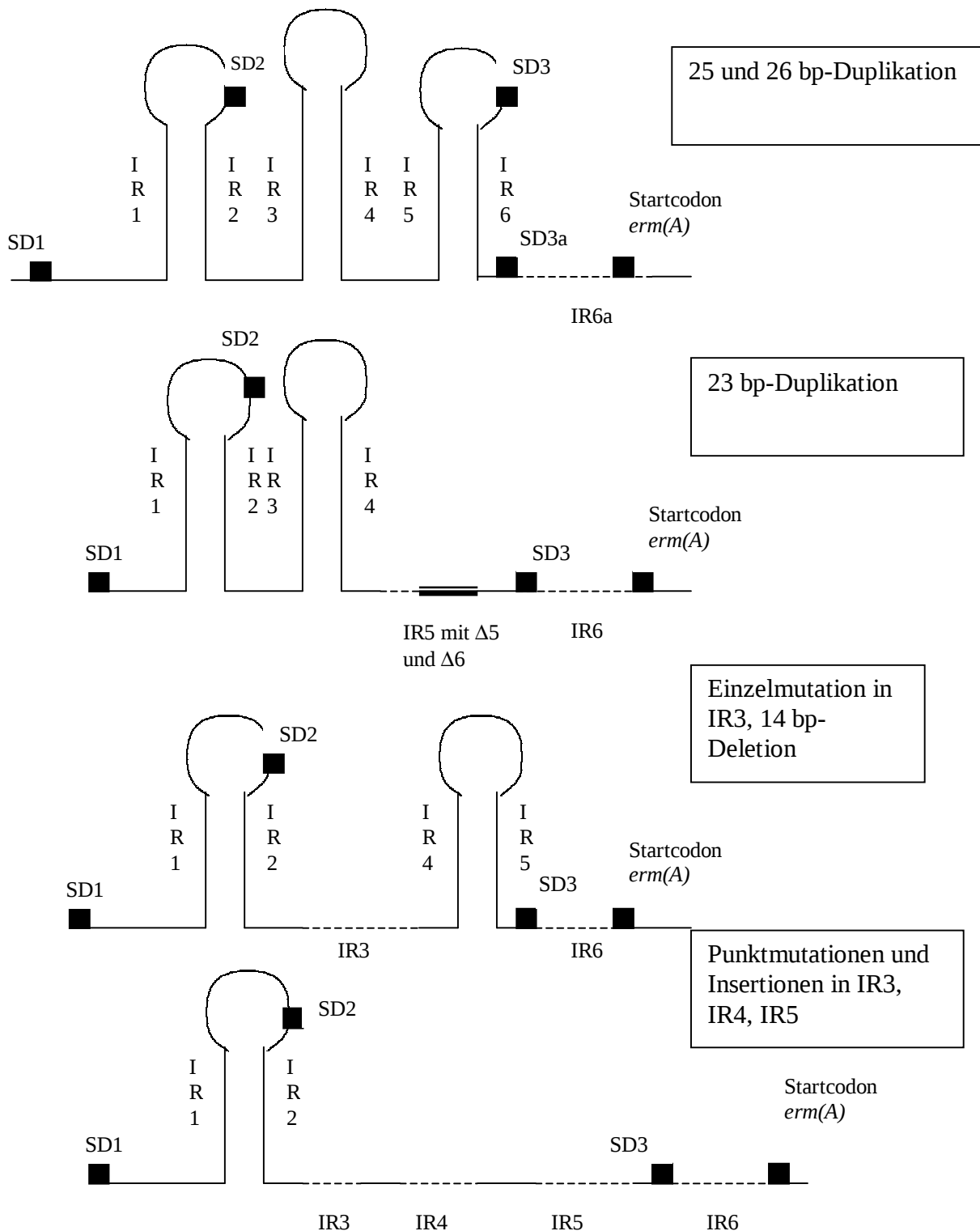


Abbildung 45 . Strukturelle Konsequenzen der gefundenen Änderungen im Translationsattenuator von *erm(A)*. Hier sind schematisch die strukturellen Änderungen in der RNA als Konsequenz der in dieser Arbeit beschriebenen Änderungen der Regulatorregion gezeigt. In der intakten Regulatorregion bilden sich aufgrund der „inverted repeats“ (IR) 1-6 Sekundärstrukturen aus, die eine Translation verhindern. Bei allen Änderungen wurden diese Sekundärstrukturen so modifiziert, dass die Translation möglich wurde. Die Insertion von Is256 verhinderte jegliche Ausbildung von Sekundärstrukturen. Die Abkürzungen bedeuten: IR: inverted repeats; SD: Ribosomenbindungsstelle

5.3 Desinfektionsmittel

Gegen gängige Desinfektionsmittel wird eine Unempfindlichkeit durch die Effluxpumpen QacA, QacB und QacC vermittelt. Dies kann zum Problem werden, wenn dadurch resistente Keime schneller verbreitet werden können. Daher wurde das Vorhandensein der Gene, die für die QacA/QacB-Proteine kodieren, durch PCR-Amplifikation von Gen-Fragmenten und Nachweis im Agarosegel bei 297 MRSA und 200 MSSA untersucht. Es wurde festgestellt, dass sie wesentlich häufiger bei MRSA als bei MSSA auftraten. Dieser große Unterschied zwischen MRSA und MSSA könnte einerseits eine Folge des Selektionsdrucks durch den ausgeprägteren Desinfektionsmitteleinsatz in Kliniken sein. Andererseits sind die Effluxproteine bei fachgerechter Anwendung der desinfizierenden Substanzen nicht in der Lage, die Bakterien vor den hochkonzentrierten Desinfektionsmitteln zu schützen. Sie können die MHK-Werte der Bakterien gegen bestimmte desinfizierende Substanzen zwar erhöhen, aber normalerweise ist deren angewendete Konzentration noch um vieles höher, so dass es zu einer sicheren Abtötung der Bakterien kommt. Zudem werden Desinfektionsmittel häufig in Form von Kombinationspräparaten eingesetzt.

Es ist aber vorstellbar, dass z.B. Befall an schwer zugänglichen Orten oder eine nicht fachgerechte Anwendung dazu führen könnten, dass durch eine erniedrigte Desinfektionsmittelkonzentration Keime, die diese Effluxpumpen tragen, selektiert werden. Auf der anderen Seite finden sich *qacA* und *qacB*, wie in Kapitel 1.5 beschrieben, auf weitverbreiteten Plasmiden, auf denen noch weitere Resistenzgene gegen Antibiotika wie Aminoglycoside, Penicillin und Trimethoprim und gegen Schwermetalle vorhanden sind. Bekanntermaßen sind MRSA multiresistent, was teilweise über Resistenzplasmide vermittelt wird. Durch Selektion der multiresistenten MRSA durch Antibiotika würden also ebenfalls die *qacA/B* Gene mitselektioniert. Als erwiesen gilt auch, dass sich MRSA, insbesondere in Kliniken, häufig klonal ausbreiten.

Das *qacC*-Gen wurde nur in 5,8% der getesteten Isolate detektiert. Davon trugen 6,4% der MRSA und 5% der MSSA *qacC*. Dieser geringe Unterschied kann nicht

als signifikant gelten. Allerdings war möglicherweise aufgrund der nur geringen Anzahl *qacC*-tragender Stämme kein signifikanter Unterschied festzustellen.

Bisher wurden nur bei Koagulase-negativen Staphylococceen Stämme, die beide Qac-Resistenzengruppen tragen, beschrieben. Hier wurden erstmals beide Gene zusammen in *S. aureus*-Isolaten nachgewiesen. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die *qacA/B* Gene bei 42% der *S. aureus* Isolate vorhanden waren, wobei weitaus mehr MRSA als MSSA diese Resistenzgene trugen (63 bzw. 12%). *QacC* wurde nur in 5,8% der *S. aureus* Isolate entdeckt, ein signifikanter Unterschied zwischen MRSA und MSSA war nicht festzustellen. Die hohe Prävalenz von *qacA/B* in MRSA kann möglicherweise entweder über Selektion durch den Desinfektionsmittel-Gebrauch in Kliniken oder über Mitverbreitung der Desinfektionsmittelresistenzgene über gängige Resistenzplasmide in MRSA erklärt werden. Des Weiteren muss die klonale Verbreitung der MRSA berücksichtigt werden.

5.4 Ausblick

Es ist auf jeden Fall wichtig, die weitere Resistenzentwicklung relevanter Krankheitserregerfortlaufend zu untersuchen. Dies reicht meines Erachtens jedoch nicht aus.

Durch die rasche Ausbreitung resistenter Stämme wird der Einsatz von Antibiotika zur Therapie nicht immer erfolgreich sein. In Zukunft ist es daher wichtig, nach alternativen Behandlungsmethoden zu suchen. Die Entwicklung von immer neuen Antibiotika reicht dabei nur bedingt aus, da die Gefahr der Entwicklung von Multiresistenzen recht groß ist. Es kann daher nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass ein neues Antibiotikum vor der Resistenzentwicklung zunächst geschützt ist. Außerdem ist die Menge der nicht-toxischen Antibiotika begrenzt; so können nicht als Antwort auf eine steigende Resistenzentwicklung unbegrenzt neue Antibiotika entwickelt werden.

Daher scheint es sinnvoll zu sein, den Einsatz von Antibiotika weitestgehend einzuschränken, um der Resistenzentwicklung und -Ausbreitung vorzubeugen.

Dies betrifft vor allem den Antibiotikaeinsatz in Gebieten, wo es nicht primär um die Bekämpfung von Krankheiten geht. Es ist zum Beispiel fraglich, ob der Nutzen von Antibiotikazusätzen zum Tierfutter zur Keimabtötung so groß ist, dass das hohe Risiko einer Resistenzentwicklung in Kauf genommen werden kann. Aber auch der Einsatz von Antibiotika bei leichten Erkrankungen wie zum Beispiel bei grippalen Infekten (die sogar meist auf Viren und nicht auf Bakterien zurückzuführen sind) erscheint oft als nicht sinnvoll. Der Nutzen, dass die Symptome schneller abklingen als mit herkömmlichen Behandlungsmethoden steht in keiner Relation zum Risiko der Resistenzentwicklung. Außerdem behindert der übermäßige Einsatz von Antibiotika die Bildung körpereigener Abwehrkräfte.

Da das Risiko einer Resistenzentwicklung umso höher ist, je häufiger Antibiotika eingesetzt werden, ist es sinnvoller, die Antibiotika nur bei dringenden Indikationen einzusetzen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Resistenzen bei *S. aureus* und Pneumococcen gegenüber verschiedenen Antibiotika schon weit verbreitet sind. Wenn man bedenkt, wie bedrohlich Infektionen mit diesen Erregern ablaufen können, ist dies besorgniserregend.

Dieser Entwicklung kann dadurch entgegengewirkt werden, dass man den Einsatz von Antibiotika genau überprüft und abwägt. Ebenfalls ist es wichtig, die hygienischen Vorschriften in Krankenhäusern genauer einzuhalten, um die Ausbreitung resistenter Keime zu unterbinden. Es hat sich gezeigt, dass sich gerade in Krankenhäusern resistente Erreger durch den Kontakt zwischen Patienten und Pfleger und durch kontaminierte Geräte schnell ausbreiten können. Das Einhalten strikter Hygienevorschriften ist besonders bei Pneumococcen, aber auch bei *S. aureus* wichtig, da Erkrankungen mit diesen Erregern lebensbedrohlich verlaufen können, besonders bei immunsuprimierten Patienten, die es in Krankenhäusern gibt. Durch Resistenzausbreitung wird der therapeutische Spielraum dann immer weiter eingeschränkt.

Es ist also nötig, die Resistenzausbreitung sorgfältig zu beobachten und weitgehend durch geeignete Maßnahmen, wie geeignete Hygienemaßnahmen und die Einschränkung des Antibiotikagebrauchs, zu verhindern.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass Resistenzentwicklung und Resistenzausbreitung ein schneller, größtenteils irreversibler Prozess sein kann. Angesichts aufwändiger Testreihen und großer Zeiträume, die nötig sind, um neue Antibiotika auf den Markt zu bringen, ist anzunehmen, dass es der Industrie langfristig schwer fallen dürfte, mit dieser Entwicklung Schritt zu halten. Umso wichtiger ist es, mit den zur Verfügung stehenden Antibiotika verantwortungsvoll umzugehen.

6. Zusammenfassung

Staphylococcus aureus und *Streptococcus pneumoniae* sind wichtige humanpathogene Erreger. Vor allem die sogenannten MRSA, Methicillin-resistente *S. aureus*, und Penicillin-resistente *S. pneumoniae* bereiten Probleme. Diese Erreger sind nicht nur gegen alle β -Lactam-Antibiotika resistent, sondern es treten auch Multiresistenzen gegen verschiedensten Antibiotikaklassen auf. Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind die Analyse der Resistenzepidemiologie und der Resistenzmechanismen dieser beiden Spezies in Bezug auf zwei wichtige Antibiotikaklassen, die Fluorochinolone und die Makrolid-Linkosamid-Streptogramin (MLS)-Antibiotika, sowie das Resistenzverhalten von *S. aureus* gegenüber gängigen Desinfektionsmitteln. Chinolone binden an die Enzymw Gyrase und Topoisomerase IV und inhibieren die DNA-Replikation. Resistenz wird durch Mutationen in den QRDR (quinolone-resistance determining region) der Gene von Gyrase und Topoisomerase IV sowie durch ein Effluxpumpensystem (NorA bei *S. aureus* und PmrA bei *S. pneumoniae*) vermittelt. MLS-Antibiotika greifen in die Proteinbiosynthese ein. Resistenz wird durch Veränderung der Targetstrukturen, der Ribosomen, durch Inaktivierung der Antibiotika vermittelt sowie durch Effluxpumpensysteme. Für diese Arbeit waren besonders die Gene *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *ere(A)*, *ere(B)*, *msr(A/B)* und *mef(E)* wichtig. Die Erm-Proteine methylieren die rRNA, die Ere-Proteine modifizieren das Antibiotikum und die letzten beiden Gene kodieren für Effluxpumpen. Die Gene *erm(A)* und *erm(C)* können sowohl konstitutiv als auch induziert exprimiert werden, wobei nur Makrolide induzierend wirken. Resistenz gegen Desinfektionsmittel wird durch Effluxpumpen vermittelt, die durch die Gene *qacB* und *qacC* vermittelt werden. Chinolonresistenz war bei MRSA und penicillinresistenten Pneumococcen besonders verbreitet. Insgesamt konnte festgestellt werden, dass Chinolon-resistente Staphylococcen besonders in Frankreich, Italien, Portugal, Großbritannien und in Spanien auftraten. Die Effluxpumpen spielten bei ca. 30% der Staphylococcen und bei ca. 50% der Pneumococcen eine Rolle. In klinischen Isolaten wurden die klassischen Mutationen in GyrA und GrlA/ParC gefunden, wobei nur identische Mutationen bei sehr vielen Stämmen gefunden wurden. Dies spricht für eine klonale, nosokomiale Ausbreitung resistenter Stämme. Durchgehend zeigte sich, dass neuere Fluorochinolone wie Moxifloxacin wesentlich aktiver waren und durch Resistenzmutationen nicht so sehr beeinflusst wurden. BMS 294756, das neueste Chinolon, welches keinen Fluor-Liganden an Position 6 trägt, ist kein Substrat für Effluxpumpen zu sein und zeigte hervorragende in-vitro Aktivitäten selbst bei Isolaten mit Alterationen in GyrA und GrlA/ParC. Auch bei den MLS-Antibiotika fiel auf, dass Resistenzen sehr häufig bei MRSA und Penicillin-resistenten Pneumococcen auftraten. Die neue Substanz Synercid, ein Kombinationspräparat aus einem Streptogramin A und einem Streptogramin B, zeigte jedoch durchgehend gute in-vitro Aktivitäten. Bei den Staphylococcen spielen vor allem die Gene *erm(A)* und *erm(C)* eine wichtige Rolle, wobei *erm(A)* meist konstitutiv exprimiert wurde. *Erm(A)* wurde häufiger bei MRSA gefunden, *erm(C)* hingegen eher bei MSSA. Die Gene *ermB* und *ere(B)* waren selten und wurden nur bei MRSA gefunden, *msr(A/B)* hingegen nur bei MSSA. Bei Pneumococcen traten nur *erm(B)* und *mef(E)* auf; vorwiegend ersteres. 64 *S. aureus*-Isolate (40 MRSA, 24 MSSA), die *erm(A)* konstitutiv exprimierten, wurden auf strukturelle Änderungen im Translationsattenuator untersucht. Fünf bis dahin unbekannte Änderungen wurden gefunden: Drei Deletionen und zwei Tandemduplikationen. Diese Änderungen führten alle zur Neustrukturierung des Translationsattenuators, so dass eine konstitutive Expression möglich wurde. Bei künstlich erzeugten Mutanten mit konstitutiver Expression wurden sechs Deletionen, drei Tandemduplikationen, zwei Punktmutationen und die Insertion von IS256 als strukturelle Veränderungen gefunden, die alle die oben beschriebene Wirkung hatten. Die Mutanten wurden durch Selektion auf antibiotikahaltigen Nährböden mit sechs verschiedenen MLS-Antibiotika erzeugt, die alle keine Induzierer waren. Bei 497 *S. aureus*-Isolaten wurde nach den Desinfektionsmittelresistenzgenen *qacA/B* und *qacC* gesucht. Bei MRSA war das Auftreten von *qacA/B* deutlich höher als bei den MSSA. *qacC* war generell selten. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen MRSA und MSSA festgestellt werden. Erstmals wurden fünf Isolate gefunden, die beide Gene aufwiesen. Dabei handelte es sich immer um MRSA. Zusammenfassend wurden die Resistenzepidemiologie und die Resistenzmechanismen bei europäischen humanpathogenen Erregerisolaten im Detail analysiert und neue Therapieoptionen evaluiert.

7. Literatur

- Ahmed, M., C. M. Borsch, A. A. Neyfakh, and S. Schuldiner.** 1993. Mutants of the *Bacillus subtilis* multidrug transporter Bmr with altered sensitivity to the antihypertensive alkaloid reserpine. *J. Biol. Chem.* **268**:11086-11089.
- Allignet, J., and N. El Solh.** 1995. Diversity among the gram-positive acetyltransferases inactivating streptogramin A and structurally related compounds and characterization of a new staphylococcal determinant, *vatB*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:2027-2036.
- Allignet, J., N. Liassine, and N. El Solh.** 1998. Characterization of a staphylococcal plasmid related to pUB110 and carrying two novel genes, *vatC* and *vgbB*, encoding resistance to streptogramins A and B and similar antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:1794-1798.
- Allignet, J., V. Loncle, and N. El Solh.** 1992. Sequence of a staphylococcal plasmid gene, *vga*, encoding a putative ATP-binding protein involved in resistance to virginiamycin A-like antibiotics. *Gene* **117**:45-51.
- Allignet, J., V. Loncle, P. Mazodier, and N. El Solh.** 1988. Nucleotide sequence of a staphylococcal plasmid gene, *vgb*, encoding a hydrolase inactivating the B components of virginiamycin-like antibiotics. *Plasmid* **20**:271-275.
- Allignet, J., V. Loncle, C. Simenel, M. Delepierre, and N. El Solh.** 1993. Sequence of a staphylococcal gene, *vat*, encoding an acetyltransferase inactivating the A-type compounds of virginiamycin-like antibiotics. *Gene* **130**:91-98.
- Andrews, J. M., T. M. Weller, J. P. Ashby, R. M. Walker, and R. Wise.** 2000. The in-vitro activity of ABT-773, a new ketolide antimicrobial agent. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**:1017-1022.
- Anthony, B. F., and H. R. Hill.** 1988. Gram-positive bacteria: an overview and summary of session. *Rev. Infect. Dis.* **10, Suppl. 2**:45-50.
- Archer, G. L.** 1998. *Staphylococcus aureus* : a well-armed pathogen. *Clin. Infect. Dis.* **26**:1179-1181.
- Archer, G. L.** 1988. Molecular epidemiology of multiresistant *Staphylococcus epidermidis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2, Suppl. C**:133-138.
- Archer, G. L., and B. C. Armstrong.** 1983. Alteration of staphylococcal flora in cardiac surgery patients receiving antibiotic prophylaxis. *J. Infect. Dis.* **147**:642-649.
- Archer, G. L., J. P. Coughter, and J. L. Johnston.** 1986. Plasmid-encoded trimethoprim resistance in staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**:733-740.
- Arthur, M., D. Autissier, and P. Courvalin.** 1986. Analysis of the nucleotide sequence of the *ereB* gene encoding the erythromycin esterase type II. *Nucleic. Acids. Res.* **14**:4987-4999.
- Austrian, R.** 1981. Pneumococcus: the first hundred years. *Rev. Infect. Dis.* **3**:183-189.
- Bacquero, F., J. A. Garcia-Rodriguez, J. Garcia De Lomas, L. Aguilar, and The Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens.** 1999. Antimicrobial resistance of 1,113 *Streptococcus pneumoniae* isolates from patients with respiratory tract infections in Spain: results of a 1-year (1996-1997) multicenter surveillance study. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:357-359.
- Baquero, F.** 1996. Epidemiology and management of penicillin resistant pneumococci. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **9**:372-379.

- Bast, D. J., D. E. Low, C. L. Duncan, L. Kilburn, L. A. Mandell, R. J. Davidson, and J. C. S. De Azavedo.** 2000. Fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*: contributions of type II topoisomerase mutations and efflux to levels of resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:3049-3054.
- Beck, W. D., B. Berger-Bächi, and F. H. Kayser.** 1986. Additional DNA in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and molecular cloning of *mec*-specific DNA. *J. Bacteriol.* **165**:373-378.
- Berryman, D. I., M. Lyrstis, and J. I. Rood.** 1994. Cloning and sequence analysis of *ermQ*, the predominant macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance gene in *Clostridium perfringens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:1041-1046.
- Betley, M. J., D. W. Borst, and L. B. Regassa.** 1992. Staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin and streptococcal pyrogenic exotoxins: a comparative study of their molecular biology. *Chem. Immunol.* **55**:1-35.
- Bhakdi, S., and J. Tranum-Jensen.** 1991. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Rev.* **55**:733-751.
- Bonnefoy, A., A. M. Girard, C. Agouridas, and J. F. Chantot.** 1997. Ketolides lack inducibility properties of MLS(B) resistance phenotype. *J. Antimicrob. Chemother.* **40**:85-90.
- Bouanchaud, D. H.** 1997. In-vitro and in-vivo antibacterial activity of quinupristin/dalfopristin. *J. Antimicrob. Chemother.* **39 Suppl A**:15-21.
- Bozdogan, B., L. Berrezouga, M. S. Kuo, D. A. Yurek, K. A. Farley, B. J. Stockman, and R. Leclercq.** 1999. A new resistance gene, *linB*, conferring resistance to lincosamides by nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:925-929.
- Bradley, S. F.** 1992. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin. Geriatr. Med.* **8**:853-868.
- Brisson-Noel, A., and P. Courvalin.** 1986. Nucleotide sequence of gene *linA* encoding resistance to lincosamides in *Staphylococcus haemolyticus*. *Gene* **43**:247-253.
- Brisson-Noel, A., P. Delrieu, D. Samain, and P. Courvalin.** 1988. Inactivation of lincosaminide antibiotics in *Staphylococcus*. Identification of lincosaminide O-nucleotidyltransferases and comparison of the corresponding resistance genes. *J. Biol. Chem.* **263**:15880-15887.
- Byrne, M. E., M. T. Gillespie, and R. A. Skurray.** 1990. Molecular analysis of a gentamicin resistance transposonlike element on plasmids isolated from North American *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:2106-2113.
- Chen, C. R., M. Malik, M. Snyder, and K. Drlica.** 1996. DNA Gyrase and Topoisomerase IV on the Bacterial Chromosome: Quinolone-induced DNA Cleavage. *J. Mol. Biol.* **258**:627-637.
- Chung, W. O., C. Werckenthin, S. Schwarz, and M. C. Roberts.** 1999. Host range of the *ermF* rRNA methylase gene in human and animal bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**:5-14.
- Clancy, J., J. W. Petitpas, F. Dib-Hajj, W. Yuan, M. Cronan, A. Kamath, J. Bergeron, and J. Retsema.** 1996. Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant *mefA* from *Streptococcus pyogenes*. *Mol. Microbiol.* **22**:867-879.
- Dalhoff, A.** 1994. Quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Development during therapy and clinical significance. *Infection* **22 Suppl. 2**:111-121.

- Davies, T. A., L. M. Kelly, G. A. Pankuch, K. L. Credito, M. R. Jacobs, and P. C. Appelbaum.** 2000. Antipneumococcal activities of gemifloxacin compared to those of nine other agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:304-310.
- de Lencastre, H. M., A. M. Sa Figueiredo, C. Urban, J. Rahal, and A. Tomasz.** 1991. Multiple mechanisms of methicillin-resistance and improved methods for detection in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:632-639.
- de Lencastre, H. M., and A. Tomasz.** 1994. Reassessment of the number of auxiliary genes essential for expression of high level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:2590-2598.
- Depardieu, F., and P. Courvalin.** 2001. Mutation in 23S rRNA responsible for resistance to 16-membered macrolides and streptogramins in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:319-323.
- Dinges, M. M., P. M. Orwin, and P. M. Schlievert.** 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**:16-34.
- Douthwaite, S.** 2001. Structure-activity relationships of ketolides versus macrolides. *Clin. Microbiol. Infect.* **7, Suppl.** **3**:11-17.
- Douthwaite, S., and W. S. Champney.** 2001. Structures of ketolides and macrolides determine their mode of interaction with the ribosomal target site. *J. Antimicrob. Chemother.* **48, Suppl.** **T1**:1-8.
- Dowson, C. G., A. P. Johnson, E. Cercenado, and R. C. George.** 1994. Genetics of oxacillin resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* that are oxacillin resistant and penicillin susceptible. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:49-53.
- Drlica, K., and X. Zhao.** 1997. DNA Gyrase, Topoisomerase IV and the 4-Quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:377-392.
- Dyke, K. G., S. Aubert, and N. El Solh.** 1992. Multiple copies of IS256 in staphylococci. *Plasmid* **28**:235-246.
- Eady, E. A., J. I. Ross, J. L. Tipper, C. E. Walters, J. H. Cove, and W. C. Noble.** 1993. Distribution of genes encoding erythromycin ribosomal methylases and an erythromycin efflux pump in epidemiologically distinct groups of staphylococci. *J. Antimicrob. Chemother.* **31**:211-217.
- Emori, T. G., and R. P. Gaynes.** 1993. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**:428-442.
- Emslie, K. R., D. E. Townsend, W. B. Grubb.** 1986. Isolation and characterization of a family of small plasmids encoding resistance to nucleic acid-binding compounds in *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* **22**:9-15.
- Faden, H.** 2001. The microbiologic and immunologic basis for the recurrent otitis media in children. *Eur. J. Pediatr.* **160**:407-413.
- Ferrero, L., C. Cameron, and J. Crouzet.** 1995. Analysis of *gyrA* and *gylA* mutations in stepwise-selected ciprofloxacin-resistant mutants of *S. aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1554-1558.
- Fitoussi, F., C. Doit, P. Geslin, N. Brahimi, and E. Bingen.** 2001. Mechanisms of macrolide resistance in clinical pneumococcal isolates in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:636-638.

- Foster, T. J., M. O'Reilly, A. H. Patel, and A. J. Bramley.** 1988. Genetic studies of *Staphylococcus aureus* virulence factors. *Ant. Leeuw.* **54**:475-482.
- Fukuda, H., and K. Hiramatsu.** 1999. Primary targets of fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:410-412.
- Fung-Tomc, J. C., B. Minassian, B. Kolek, E. Huczko, L. Aleksunes, and T. Stickle.** 2000. Antibacterial spectrum of a novel des-fluoro(6) quinolone, BMS-284756. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:3351-3356.
- Garcia, E., and R. Lopez.** 1997. Molecular biology of the capsular genes of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **149**:1-10.
- Geisel, R., F. J. Schmitz, L. Thomas, G. Berns, O. Zetsche, U. Ulrich, A. C. Fluit, H. Labischinsky, and W. Witte.** 1999. Emergence of heterogeneous intermediate vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates in the Düsseldorf area. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**:846-848.
- Gellert, M., K. Mizuuchi, M. H. O'Dea, and H. A. Nash.** 1976. DNA gyrase: an Enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **73**:38723-3876.
- Gill, M. J., N. P. Brenwald, and R. Wise.** 1999. Identification of an efflux pump gene, *pmrA*, associated with fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:187-189.
- Gillespie, M. T., B. R. Lyon, and R. A. Skurray.** 1989. Gentamicin and antiseptic resistance in epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **1**:503.
- Gillespie, M. T., B. R. Lyon, L. S. L. Loo, P. R. Matthews, P. R. Stewart, and R. A. Skurray.** 1987. Homologous direct repeat sequences associated with mercury, methicillin, tetracycline and trimethoprim resistance determinants in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **43**:165-171.
- Goering, R. V., and E. A. Ruff.** 1983. Comparative analysis of conjugative plasmids mediating gentamicin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **24**:450-452.
- Gonzalez, I., M. Georgiou, F. Alcaide, D. Balas, J. Linares, and A. de la Campa.** 1998. Fluoroquinolone resistance mutations in the *parC*, *parE*, and *gyrA* genes of clinical isolates of viridans group streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2792-2798.
- Grebe, T., and R. Hagenbeck.** 1996. Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of β -lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:829-834.
- Gregory, S. T., and A. E. Dahlberg.** 1999. Erythromycin mutations in ribosomal proteins L22 and L4 perturb the higher order structure of 23S ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.* **289**:827-834.
- Grinius, L., G. Dreguene, E. B. Goldberg, C. H. Liao, and S. J. Projan.** 1992. A staphylococcal multidrug resistance gene is a member of a new protein family. *Plasmid* **27**:119-129.
- Grinius, L., and E. B. Goldberg.** 1994. Bacterial multidrug resistance is due to a single membrane protein which functions as a drug pump. *J. Biol. Chem.* **269**:29998-30004.
- Grkovic, S., H. B. Brown, N. J. Roberts, I. A. Paulsen, and R. A. Skurray.** 1998. QacR is a repressor protein that regulates expression of the *Staphylococcus aureus* multidrug efflux protein. *J. Biol. Chem.* **273**:18665-18673.
- Hagenbeck, R.** 1998. Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Chemother. J.* **7**:43-49.

- Halula, M., S. Manning, and F. L. Macrina.** 1991. Nucleotide sequence of *erm*FU, macrolide-lincosamide-streptogramin (MLS) resistance gene encoding an RNA methylase from the conjugal element of *Bacteroides fragilis* V503. Nucl. Acids Res. **19**:3453.
- Hamilton-Miller, J. M., and S. Shah.** 1998. Comparative in-vitro activity of ketolide HMR 3647 and four macrolides against Gram-positive cocci of known erythromycin susceptibility status. J. Antimicrob. Chemother. **41**:649-653.
- Hamilton-Miller, J. M., and S. Shah.** 2000. Patterns of phenotypic resistance to the macrolide-lincosamide-ketolide-streptogramin group of antibiotics in staphylococci. J. Antimicrob. Chemother. **46**:941-949.
- Haroche, J., J. Allignet, S. Aubert, A. E. van den Bogaard, and N. El Solh.** 2000. *satG*, conferring resistance to streptogramin A, is widely distributed in *Enterococcus faecium* strains but not in staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother. **44**:190-191.
- Heisig, P.** 1997. Fluorchinolonecarbonsäuren. Arzneimitteltherapie **15**:14-23.
- Heisig, P.** 1996. Genetic evidence for a role of *parC* mutations in development of high level Fluoroquinolone resistance in *E. coli*. Antimicrob. Agents Chemother. **40**:879-885.
- Heisig, P.** 1994. Mechanismen bakterieller Resistenz gegen Antibiotika. Arzneimitteltherapie **12**:203-218.
- Hiasa, H., D. Yousefs, and K. J. Mariani.** 1996. DNA strand cleavage is required for replikation fork arrest by a frozen topoisomerase-quinolone ternary complex. J. Biol. Chem. **271**:26424-26429.
- Holm, S. E.** 1982. Gram-positive microorganisms in sepsis. Scand. J. Infect. Dis. Suppl. **31**:68-77.
- Horinouchi, S., and B. Weisblum.** 1982. Nucleotide sequence and functional map of pE194, a plasmid that specifies inducible resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin type B antibiotics. J. Bacteriol. **150**:804-814.
- Ito, H., H. Yoshida, M. Bogaki-Shonnai, T. Niga, H. Hattori, and S. Nakamura.** 1994. Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase *gyrA* and *gyrB* genes of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **38**:2014-2023.
- Jain, N., R. Lodha, and S. K. Kabra.** 2001. Upper respiratory tract infections. Indian J. Pediatr. **68**:1135-1138.
- Janoir, C., I. Podglajen, M. D. Kitzis, C. Poyart, and L. Gutmann.** 1999. In vitro exchange of fluoroquinolone resistance determinants between *Streptococcus pneumoniae* and viridans streptococci and genomic organization of the *parE-parC* region in *Streptococcus mitis*. J. Infect. Dis. **180**:555-558.
- Janoir, C., V. Zeller, M. D. Kitzis, N. J. Moreau, and L. Gutmann.** 1996. High-level fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* requires mutations in *parC* and *gyrA*. Antimicrob. Agents Chemother. **40**:2760-2764.
- Jedrzejewski, M. J.** 2001. Pneumococcal virulence factors: structure and function. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **65**:187-207.
- Jensen, L. B., A. M. Hammerum, and F. M. Aarestrup.** 2000. Linkage of *vat(E)* and *erm(B)* in streptogramin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Europe. Antimicrob. Agents Chemother. **44**:2231-2232.

- Johnston, N. J., J. C. de Azavedo, J. D. Kellner, and D. E. Low.** 1998. Prevalence and characterization of the mechanisms of macrolide, lincosamide, and streptogramin resistance in isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2425-2426.
- Jones, M. E., D. F. Sahm, N. Martin, S. Scheuring, P. Heisig, C. Thornsberry, K. Köhrer, and F. J. Schmitz.** 2000. Prevalence of *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* mutations in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with decreased susceptibilities to different quinolones and originating from worldwide surveillance studies during the 1997-1998 respiratory season. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:462-466.
- Jones, R. N., M. G. Cormican, and A. Wanger.** 1996. Clindamycin resistance among erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **25**:201-204.
- Jorgensen, J. H., L. M. Weigel, M. J. Ferraro, J. M. Swenson, and F. C. Tenover.** 1999. Activities of newer fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates including those with mutations in the *gyrA*, *parC* and *parE* loci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:329-334.
- Kaatz, G. W., S. M. Seo, and C. A. Ruble.** 1993. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *S. aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:1086-1094.
- Kaatz, G. W., S. M. Seo.** 1995. Inducible *norA*-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:2650-2655.
- Kataja, J., P. Huovinen, M. Skurnik, the Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance, and H. Seppälä.** 1999. Erythromycin resistance genes in group A streptococci in Finland. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:48-52.
- Kataja, J., H. Seppälä, M. Skurnik, H. Sarkkinen, and P. Huovinen.** 1998. Different erythromycin resistance mechanisms in group C and group G streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:1493-1494.
- Khodursky, A. B., E. L. Zechiedrich, and N. R. Cozarelli.** 1995. Topoisomerase IV is a target of quinolones in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:11801-11805.
- Lagrou, K., W. E. Peetermans, J. Verhaegen, S. van Lierde, L. Verbist, and J. van Eldere.** 2000. Macrolide resistance in Belgian *Streptococcus pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**:119-121.
- Latini, L., M. P. Ronchetti, R. Merolla, F. Guglielmi, S. Bajaksouzian, M. P. Villa, M. R. Jacobs, and R. Ronchetti.** 1999. Prevalence of *mefE*, *erm* and *tet(M)* genes in *Streptococcus pneumoniae* strains from Central Italy. *Int. J. Antimicrob. Agents* **13**:29-33.
- Lawrence, L. E.** 2001. ABT-773 (Abbott Laboratories). *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2**:766-772.
- Leclercq, R.** 2001. Overcoming antimicrobial resistance: profile of a new ketolide antibacterial, telithromycin. *J. Antimicrob. Chemother.* **48**, Suppl. T1:9-23.
- Leclercq, R., and P. Courvalin.** 1991. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:1267-1272.
- Leclercq, R., and P. Courvalin.** 1991. Intrinsic and unusual resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:1273-1276.
- Leelaporn, A., N. Firth, I. T. Paulsen, A. Helliarchi, and R. A. Skurray.** 1995. Multidrug resistance plasmid pSK108 from coagulase-negative staphylococci; relationship to *Staphylococcus aureus* *qacC* plasmids. *Plasmid* **34**:62-67.

- Leelaporn, A., I. T. Paulsen, J. M. Tennent, T. G. Littlejohn, and R. A. Skurray.** 1994. Multidrug resistance to antiseptics and disinfectants in coagulase-negative staphylococci. *J. Med. Microbiol.* **40**:214-220.
- Lina, G., A. Quaglia, M. E. Reverdy, R. Leclercq, F. Vandenesch, and J. Etienne.** 1999. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1062-1066.
- Littlejohn, T. G., D. DiBerardino, L. J. Messerotti, S. J. Spiers, and R. A. Skurray.** 1991. Structure and evolution of a family of genes encoding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *Gene* **101**:59-66.
- Lodder, G., C. Werckenthin, S. Schwarz, and K. G. H. Dyke.** 1997. Molecular analysis of naturally occurring *ermC*-encoding plasmids in staphylococci isolated from animals with and without previous contact with macrolide/lincosamide antibiotics. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **18**:7-15.
- Low, D. E., and H. L. Nadler.** 1997. A review of in vitro antibacterial activity of quinupristin/dalfopristin against methicillin susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **39, Suppl. A**:53-58.
- Luna, V. A., P. Coates, E. A. Eady, J. Cove, T. H. Nguyen, and M. C. Roberts.** 1999. A variety of Gram-positive bacteria carry mobile *mef* genes. *J. Antimicrob. Chemother.* **44**:19-25.
- Lyon, B. R., and R. A. Skurray.** 1987. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiol. Rev.* **51**:88-134.
- Macrina, F. L., and G. L. Archer.** 1993. Conjugation and broad host range plasmids in streptococci and staphylococci. *Bacterial conjugation* 1:313-330.
- Malathum, K., T. M. Coque, K. V. Singh, and B. E. Murray.** 1999. In-vitro activities of two ketolides, HMR3647 and HMR 3004, against gram-positive bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:930-936.
- Marchese, A., E. A. Debbia, and G. C. Schito.** 2000. Comparative in vitro potency of gemifloxacin against European respiratory tract pathogens isolated in the Alexander Project. *J. Antimicrob. Chemother.* **46, Suppl T1**:11-15.
- Marchese, A., E. Tonoli, E. A. Debbia, and G. C. Schito.** 1999. Macrolide resistance mechanisms and expression of phenotypes among *Streptococcus pneumoniae* circulating in Italy. *J. Antimicrob. Chemother.* **44**:461-464.
- Markham, P., and A. A. Neyfakh.** 1996. Inhibition of the multidrug transporter NorA prevents emergence of Norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:2673-2674.
- Markham, P.** 1999. Inhibition of the emergence of ciprofloxacin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by the multidrug efflux inhibitor reserpine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:988-989.
- Martone, W. J., W. R. Jarvis, D. H. Culver, and R. W. Haley.** 1992. Incidence and nature of endemic and epidemic nosocomial infections. *Hosp. Infect.* **3**:577-596.
- Matsuoka, M., K. Endou, H. Kobayashi, M. Inoue, and Y. Nakajima.** 1997. A dynamic plasmid that shows MLS and PMS resistance in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **148**:91-96.

- Matsuoka, M., K. Endou, H. Kobayashi, M. Inoue, and Y. Nakajima.** 1998. A plasmid that encodes three genes for resistance to macrolide antibiotics in *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol. Lett. **167**:221-227.
- McCormick, J. K., J. M. Yarwood, and P. M. Schlievert.** 2001. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. Annu. Rev. Microbiol. **55**:77-104.
- McCullers, J. A., and E. I. Tuomanen.** Molecular pathogenesis of pneumococcal pneumonia. Front. Biosci. **6**:877-889.
- Milatovic, D., F. J. Schmitz, S. Brisse, J. Verhoef, and A. C. Fluit.** 2000. In vitro activities of sitafloxacin (DU-6859a) and six other fluoroquinolones against 8796 clinical bacterial isolates. Antimicrob. Agents Chemother. **44**:1102-1107.
- Mitchell, B. A., M. H. Brown, and R. A. Skurray.** 1998. QacA multidrug efflux pump from *Staphylococcus aureus*: comparative analysis of resistance to diamines, biguanides, and guanylhydrazones. Antimicrob. Agents Chemother. **42**:475-477.
- Mitchell, T. J.** 2000. Virulence factors and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. Res Microbiol. **151**: 413-419.
- Mitten, M. J., J. Meulbroek, M. Nukkala, L. Paige, K. Jarvis, A. Oleksijew, A. Tovcimak, Z. L. Hernandez, J. D. Adler, P. Ewing, Y. S. Or, Z. Ma, A. M. Nilius, K. Mollison, and R. K. Flamm.** 2001. Efficacies of ABT-773, a new ketolide, against experimental bacterial infections. Antimicrob. Agents Chemother **45**:2585-2593.
- Mulazimoglu, L., S. D. Drenning, and V. L. Yu.** 1996. In vitro activities of two novel oxazolidinones (U100592 and U100766), a new fluoroquinolone (trovafloxacin), and dalbapristin-quinupristin against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob. Agents Chemother. **40**:2428-2430.
- Mulligan, M. E., K. A. Murray, B. S. Ribner, H. C. Standiford, J. F. John, J. A. Korvick, C. A. Kaufmann, and V. L. Yu.** 1993. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* : A consensus review of the microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications of prevention and management. Am. J. Med. **43**:313-328.
- Mullis, K. B., and F. A. Fallona.** 1987: Specific Synthesis of DNA in vitro via polymerase catalysed chain reaction. Meth. Enzymol. **155**:335-350
- Munoz, R., and A. G. de la Campa.** 1996. *ParC* subunit of DNA topoisomerase IV of *S. pneumoniae* is a primary target of fluoroquinolones and cooperates with DNA gyrase A subunit in forming resistance phenotype . Antimicrob. Agents Chemother. **40**:2252-2257.
- Murphy, E.** 1985. Nucleotide sequence of *ermA*, a macrolide-lincosamide-streptogramin B determinant in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **162**:633-640.
- Murray, I. A., and W. V. Shaw.** 1997. O-acetyltransferases for chloramphenicol and other natural products. Antimicrob. Agents Chemother. **41**:1-6.
- Neyfakh, A. A., C. M. Borsch, and G. W. Kaatz.** 1993. Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. Antimicrob. Agents Chemother. **37**:128-129.
- Ng, E. Y., M. Trucksis, and D. C. Hooper.** 1996. Quinolone resistance mutations in topoisomerase IV : relationship to the *flqA* locus and genetic evidence that topoisomerase IV is the primary target

and DNA gyrase is the secondary target of Fluoroquinolones in *S. aureus* . Antimicrob. Agents Chemother. **40**:1881-1888.

Nicola, F. G., L. K. McDougal, J. W. Biddle, and F. C. Tenover. 1998. Characterization of erythromycin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus* recovered in the United States from 1985 through 1996. Antimicrob. Agents Chemother. **42**:3024-3027.

Nilius, A. M., M. H. Bui, L. Almer, D. Hensey-Rudloff, J. Beyer, Z. Mal, Y. S. Or, and R. K. Flamm. 2001. Comparative in-vitro activity of ABT-773, a novel antibacterial ketolide. Antimicrob. Agents Chemother. **45**:2163-2168

Nishijima, T., Y. Saito, A. Aoki, M. Toriya, Y. Toyonaga, and R. Fujii. 1999. Distribution of *mefE* and *ermB* genes in macrolide-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* and their variable susceptibility to various antibiotics. J. Antimicrob. Chemother. **43**:637-643.

Obaro, S., and R. Adegbola. 2002. The pneumococcus: carriage, disease and conjugate vaccines. J. Med. Microbiol. **51**:98-104.

Oster, P., A. Zanchi, S. Cresti, M. Lattanzi, F. Montagnini, C. Cellesi, and G. M. Rossolini. 1999. Patterns of macrolide resistance determinants among community-acquired *Streptococcus pneumoniae* isolates over a 5-year period of decreased macrolide susceptibility rates. Antimicrob. Agents Chemother. **43**:2510-2512.

Ounissi, H., and P. Courvalin. 1985. Nucleotide sequence of the gene *ereA* encoding the erythromycin esterase in *Escherichia coli*. Gene **35**:271-278.

Pan, X. S., and L. M. Fisher. 1997. Targeting of DNA Gyrase bei Sparfloxacin: selective targeting of Gyrase or Topoisomerase IV by Quinolones . Antimicrob. Agents Chemother. **41**:471-474.

Pan, X. S., and L. M. Fisher. 1996. Cloning and characterization of the *parC* and *parE* genes of *S. pneumoniae* encoding DNA topoisomerase IV: role in fluoroquinolone resistance. J. Bacteriol. **178**:4060-4069.

Pan, X. S., and L. M. Fisher. 1999. Streptococcus pneumoniae DNA Gyrase and Topoisomerase IV: overexpression, purification, and differential inhibition by fluoroquinolones. Antimicrob. Agents Chemother. **43**:1129-1136.

Paradisi, F., G. Corti, and D. Messeri. 2001. Antistaphylococcal (MSSA, MRSA, MSSE, MRSE) antibiotics. Med. Clin. North Am. **85**:1-17.

Paulsen, I. T., M. H. Brown, and R. A. Skurray. 1998. Characterization of the earliest known *Staphylococcus aureus* plasmid encoding a multidrug efflux system. J. Bacteriol. **180**:3477-3479.

Paulsen, I. Tt., M. H. Brown, T. G. Littlejohn, B. A. Mitchell, and R. A. Skurray. 1996. Molecular characterisation of the multidrug resistance proteins QacA and QacB: membrane topology and identification of residues involved in specificity for divalent cations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**:3630-3635.

Paulsen, I. T., M. H. Brown, R. A. Dunstan, and R. A. Skurray. 1995. Molecular characterization of the staphylococcal multidrug resistance export protein QacC. J. Bacteriol. **177**:2827-2833.

Paulsen, I. T., and R. A. Skurray. 1993. Topology, structure and evolution of two families of proteins involved in antibiotic and antiseptic resistance in eukaryotes and prokaryotes – an analysis. Gene **124**:1-11.

- Pena, C., J. M. Albareda, R. Pallares, M. Pujol, F. Tubau, and J. Ariza.** 1995. Relationship between quinolone use and emergence of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in bloodstream infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:520-524.
- Pestova, E., R. Beyer, N. P. Cianciotto, G. A. Noskin, and L. R. Peterson.** 1999. Contribution of topoisomerase IV and DNA gyrase mutations in *Streptococcus pneumoniae* to resistance to novel fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:2000-2004.
- Pfaller, M. A., R. N. Jones, G. V. Doern, K. Kugler, and the SENTRY participants group.** 1998. Bacterial pathogens isolated from patients with blood stream infection: frequencies of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial surveillance program (United States and Canada, 1997). *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:1762-1770.
- Phillips, I., E. Culebras, F. Moreno, and F. Baquero.** 1987. Induction of the SOS-response by new 4-quinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* **20**:631-638.
- Rasmussen, J. L., D. A. Odelson, and F. L. Macrina.** 1986. Complete nucleotide sequence and transcription of *ermF*, a macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinant from *Bacteroides fragilis*. *J. Bacteriol.* **168**:523-533.
- Rende-Fournier, R., R. Leclercq, M. Galimand, J. Duval, and P. Courvalin.** 1993. Identification of the *satA* gene encoding a streptogramin A acetyltransferase in *Enterococcus faecium* BM4145. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:2119-2125.
- Retsema, J., and W. Fu.** 2001. Macrolides: structures and microbial targets. *Int. J. Antimicrob. Agents* **18**, Suppl. 1 : 89-91.
- Roberts, M. C., and M. B. Brown.** 1994. Macrolide-lincosamide resistance determinants in streptococcal species isolated from the bovine mammary gland. *Vet. Microbiol.* **40**:253-261.
- Roberts, M. C., J. Sutcliffe, P. Courvalin, L. B. Jensen, J. Rood, and H. Seppälä.** 1999. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:2823-2830.
- Ross, J. I., E. A. Eady, J. H. Cove, and S. Baumberg.** 1995. Identification of a chromosomally encoded ABC-transporter system with which the staphylococcal erythromycin exporter MsrA may interact. *Gene* **153**:93-98.
- Ross, J. I., E. A. Eady, J. H. Cove, W. J. Cunliffe, and S. Baumberg.** 1990. Inducible erythromycin-resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. *Mol. Microbiol.* **4**:1207-1214.
- Ruiz, N. M., and C. H. Ramirez-Ronda.** 1990. Tetracyclines, macrolides, lincosamides & chloramphenicol. *Bol. Asoc. Med. PR* **82**:8-17.
- Salyers, A.A., N. B. Shoemaker, A. M. Stevens, and L. Y. Li.** 1995. Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiol. Rev.* **59**:579-590.
- Sandler, P., and B. Weisblum.** 1988. Erythromycin-induced stabilization of *ermA* messenger RNA in *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* **203**:905-915.
- Santagati, M., F. Iannelli, M. R. Oggioni, S. Stefani, and P. Pozzi.** 2000. Characterization of a genetic element carrying the macrolide efflux gene *mef(A)* in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2585-2587.

- Sasatsu, M., K. Shima, Y. Shibata, and M. Kono.** 1989. Nucleotide sequence of a gene that encodes resistance to ethidiumbromide from a transferable plasmid in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res.* **17**:10103.
- Schmitz, F. J.** 1998. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* – detection, typing, epidemiology, virulence and therapy. Proefschrift Universiteit Utrecht.
- Schmitz, F. J., B. Hertel, B. Hofmann, S. Scheuring, J. Verhoef, A. C. Fluit, H. P. Heinz, K. Köhrer, and M. E. Jones.** 1998. Relationship between mutations in the coding and promotor region of the *nor A* genes in 42 unrelated clinical isolates of *S.aureus* and the MICs of norfloxacin for these strains. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**:561-563.
- Schmitz, F. J., A. C. Fluit, M. Lückefahr, B. Engler, B. Hofmann, J. Verhoef, H. P. Heinz, U. Hadding, and M. E. Jones.** 1998. The effect of reserpine, an inhibitor of multi-drug efflux pumps, on the in-vitro activities of ciprofloxacin, sparfloxacin and moxifloxacin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**:807-810.
- Schmitz, F. J., K. E. Veldkamp, K. P. M. Van Kessel, J. Verhoef, and J. A. G. Van Strijp.** 1997. Delta-Toxin from *Staphylococcus aureus* as a costimulator of human neutrophil oxidative burst. *J. Infect. Dis.* **176**:1531-1537.
- Schmitz, F. J., and H. P. Heinz.** 1996. Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme, Vorkommen und Detektionsverfahren. *MTA* **11**:774-780.
- Schmitz, F. J., B. Hofmann, B. Hansen, S. Scheuring, M. Lückefahr, M. Klootwijk, J. Verhoef, A. C. Fluit, H. P. Heinz, K. Köhrer, and M. E. Jones.** 1998. Relationship between ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin, sparfloxacin and moxifloxacin (BAY 12-8039) MICs and mutations in *grrA*, *grrB*, *gyrA* and *gyrB* in 116 unrelated clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **41**:481-484.
- Schmitz, F. J., and M. E. Jones.** 1997. Antibiotics for treatment of infections caused by MRSA and elimination of MRSA carriage. What are the choices? *Int. J. Antimicrob. Agents* **9**:1-19.
- Schülin, T., C. B. Wennersten, R. C. Moellering Jr., and G. M. Eliopoulos.** 1998. In-vitro activity of the new ketolide antibiotic HMR3647 against Gram-positive bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**:297-301.
- Schwarz, S., C. Lange, and C. Werckenthin.** 1998. Molecular analysis of the macrolide-lincosamide resistance gene region of a novel plasmid from *Staphylococcus hyicus*. *J. Med. Microbiol.* **47**:63-70.
- Schwarz, S., C. Werckenthin, and C. Kehrenberg.** 2000. Identification of a plasmid-borne chloramphenicol/florfenicol resistance gene in *Staphylococcus sciuri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2530-2533.
- Seppälä, H., M. Skurnik, H. Soini, M. C. Roberts, and P. Huovinen.** 1998. A novel erythromycin resistance methylase gene (*ermTR*) in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:257-262.
- Shaw, J. H., and D. B. Clewell.** 1985. Complete nucleotide sequence of macrolide-lincosamide-streptogramin B-resistance transposon Tn917 in *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **164**:782-796.
- Sheagren, J. N.** 1985. Staphylococcal infections of the skin and skin structures. *Cutis* **36**:2-6.
- Shen, L. L., L. A. Mitcher, P. N. Sharma, T. J. O'Donnel, D. W. Chen, C. S. Cooper, T. Rosen, and A. G. Pernet.** 1989. Mechanism of inhibition of DNA Gyrase by quinolone antibacterials: a cooperative drug-DNA binding model. *Biochemistry* **28**:3886-3894.

- Shortridge, V. D., G. V. Doern, A. B. Brueggemann, J. M. Beyer, and R. K. Flamm.** 1999. Prevalence of macrolide resistance mechanisms in *Streptococcus pneumoniae* isolates from a multicenter antibiotic resistance surveillance study conducted in the United States in 1994-1995. *Clin. Inf. Dis.* **29**:1186-1188.
- Shortridge, V. D., R. K. Flamm, N. Ramer, J. M. Beyer, and S. K. Tanaka.** 1996. Novel mechanism of macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **26**:73-78.
- Smith, C. J.** 1987. Nucleotide sequence analysis of Tn4551: use of *ermFS* operon fusions to detect promoter activity in *Bacteroides fragilis*. *J. Bacteriol.* **169**:4589-4596.
- Sutcliffe, J., T. Grebe, L. Wondrack, P. Courvalin, and J. Cheng.** 1999. GenBank accession no. AF167161
- Sutcliffe, J., A. Tait-Kamradt, and L. Wondrack.** 1996. *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:1817-1824.
- Syrogianopoulos, G. A., I. N. Grivea, A. Tait-Kamradt, G. D. Katopodis, N. G. Beratis, J. Sutcliffe, P. C. Appelbaum, and T. A. Davies.** 2001. Identification of an *erm(A)* erythromycin resistance methylase gene in *Streptococcus pneumoniae* isolated in Greece. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:342-344.
- Tait-Kamradt, A., J. Clancy, M. Cronan, F. Dib-Hajj, L. Wondrack, W. Yuan, and J. Sutcliffe.** 1997. *mefE* is necessary for the erythromycin-resistant M phenotype in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2251-2255.
- Tait-Kamradt, A., T. A. Davies, P. C. Appelbaum, F. Depardieu, P. Courvalin, J. Petitpas, L. Wondrack, A. Walker, M. R. Jacobs, and J. Sutcliffe.** 2000. Two new mechanisms of macrolide resistance in clinical strains of *Streptococcus pneumoniae* from Eastern Europe and North America. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:3395-3401.
- Tait-Kamradt, A., T. A. Davies, M. Cronan, M. R. Jacobs, P. C. Appelbaum, and J. Sutcliffe.** 2000. Mutations in 23S rRNA and ribosomal protein L4 account for resistance in pneumococcal strains selected in vitro by macrolide passage. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2118-2125.
- Takahata, M., M. Yonezawa, S. Kurose, N. Futakucki, N. Matsubara, Y. Watanabe, and H. Narita.** 1996. Mutations in the *gyrA* and *grlA* genes of quinolone-resistant clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **38**:543-546.
- Takahata, M., J. Mitsuyama, Y. Yamashiro, M. Yonezawa, H. Araki, Y. Todo, S. Minari, Y. Watanabe, and H. Narita.** 1999. In vitro and in vivo antimicrobial activities of T-3811ME, a novel des-F(6)-quinolone. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1077-1084.
- Takenouchi, T., C. Ishii, M. Sugawara, Y. Tokue, and S. Ohya.** 1995. Incidence of various *gyrA* mutations in 451 *Staphylococcus aureus* strains isolated in Japan and their susceptibilities to 10 fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1414-1418.
- Tennent, J. M., B. R. Lyon, M. T. Gillespie, J. W. May, and R. A. Skurray.** 1985. Cloning and expression of *Staphylococcus aureus* plasmid-mediated quaternary ammonium resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**:79-83.
- Thakker-Varia, S., W. D. Jenssen, L. Moon-McDermott, M. P. Weinstein, and D. T. Dubin.** 1987. Molecular epidemiology of macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**:735-743.

- Thal, L. A., and M. J. Zervos.** 1998. Occurrence and epidemiology of resistance to virginiamycin and streptogramins. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**:171-176.
- Tillotson, L. E., W. D. Jenssen, L. Moon-McDermott, and D. T. Dubin.** 1989. Characterization of a novel insertion of the macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance transposon Tn554 in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:541-550.
- Tomasz, A.** 1997. Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Clin. Infect. Dis.* **24**, Suppl 1:85-88.
- Townsend, D. E., N. Ashdown, S. Bolton, J. Bradley, G. Duckworth, E. C. Morehouse, and W. B. Grubb.** 1987. The international spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Hosp. Infect.* **9**:60-71.
- Trautmann, M., M. Ruhnke, M. Kresken, J. Brauers, M. Springsklee, and R. Marre.** 1999. Quinupristin/Dalfopristin (RP 59500, Synercid) Mikrobiologisches und klinisches Profil der ersten parenteralen Substanzkombination aus der Gruppe der Streptogramine. *Chemother. J.* **1**:31-42.
- Trieu-Cuot, P., C. Poyart-Salmeron, C. Carlier, and P. Courvalin.** 1990. Nucleotide sequence of the erythromycin resistance gene of the conjugative transposon Tn1545. *Nucl. Acids Res.* **18**:3660.
- Tuomanen, E.** 1999. Molecular and cellular biology of pneumococcal infection. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:35-39.
- Varon, E., C. Janoir, M. D. Kitzis, and L. Gutmann.** 1999. *ParC* and *gyrA* may be interchangeable initial targets of some fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:302-306.
- Vester, B., and S. Douthwaite.** 2001. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1-12.
- Watson, D. A., D. M. Musher, and J. Verhoef.** 1995. Pneumococcal virulence factors and host immune responses to them. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **14**:479-490.
- Weisblum, B.** 1995. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:577-585.
- Weisblum, B.** 1995. Insights into erythromycin action from studies of its activity as inducer of resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:797-805.
- Weisblum, B.** 1998. Macrolide resistance. *Drug. Resist. Update* **1**:29-41.
- Werckenthin, C., G. Lodder, and S. Schwarz.** 1997. Resistenzen gegenüber Makroliden, Lincosamiden und Streptograminen bei Staphylokokken von Menschen und Tieren. *Chemother. J.* **6**:103-109.
- Werckenthin, C., S. Schwarz, and K. Dyke.** 1996. Macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance in *Staphylococcus lentus* results from the integration of part of a transposon into a small plasmid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:2224-2225.
- Werckenthin, C., S. Schwarz, and H. Westh.** 1999. Structural alterations in the translational attenuator of constitutively expressed *ermC* genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1681-1685.

- Werckenthin, C., and S. Schwarz.** 2000. Molecular analysis of the translational attenuator of a constitutively expressed *erm(A)* gene from *Staphylococcus intermedius*. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**:785-788.
- Werckenthin, C.** 1997. Molekularbiologische Untersuchungen zur Verbreitung antibiotischer Resistenzgene bei Staphylokokken unter besonderer Berücksichtigung der Bedeutung resistenzvermittelnder Plasmide und Transposons. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Werner, G., and W. Witte.** 1999. Characterization of a new enterococcal gene, *satG*, encoding a putative acetyltransferase conferring resistance to streptogramin A compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1813-1814.
- Westh, H., D. M. Hougaard, J. Vuust, and V. T. Rosdahl.** 1995. Prevalence of *erm* gene classes in erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated between 1959 and 1988. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:369-373.
- Westh, H., D. M. Hougaard, J. Vuust, and V. T. Rosdahl.** 1995. *erm* gene classes in erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *APMIS* **103**:225-232.
- Widdowson, C. A., and K. P. Klugman.** 1998. Emergence of the M phenotype of erythromycin-resistant pneumococci in South Africa. *Emerg. Infect. Dis.* **4**:277-281.
- Wiedemann, B., and P. Heisig.** 1999. Bakterielle Resistenz gegenüber Chinolonen. *Chemother. J.* **8**:99-107.
- Witte, W.** 1998. Fluorchinolone mit verbesserter Wirksamkeit gegen grampositive Bakterien-vergleichende Erörterung der in-vitro-Daten. *Mikrobiol.* **8**:22-30.
- Wolfson, J. S., and D. C. Hooper.** 1985. The Fluoroquinolones. Structures, Mechanisms of Action and Resistance, and Spectra of Activity in Vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **28**:581-586.
- Wondrack, L., M. Massa, B. V. Yang, and J. Sutcliffe.** 1996. Clinical strain of *Staphylococcus aureus* inactivates and causes efflux of macrolides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:992-998.
- Yamagishi, J. I., T. Kojima, Y. Oyamada, K. Fujimoto, H. Hattori, S. Nakumara, and M. Inoue.** 1996. Alterations in the DNA topoisomerase IV *grlA* gene responsible for quinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:1157-1163.
- Zechiedrich, L., A. B. Khodursky, and N. Cozarelli.** 1997. Topoisomerase IV, not gyrase decatenates products of sidespecific recombination in *E. coli*. *Genes Dev.* **11**:2580-2592.
- Zeller, V., C. Janoir, M. D. Kitzis, L. Gutmann, and N. J. Moreau.** 1997. Active efflux as a mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:1973-7978.