Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie
der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
Direktor: Univ. Prof. Dr. med. U. Hadding

Molekularbiologische Analysen der Resistenzmechanismen Makrolid-resistenter *Staphylococcus aureus* Isolate

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Jasmina Petridu
2002

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:	Prof. Dr. med. Dr. phil. Alfons Labisch M.A. Dekan
Referent:	Prof. Dr. Schmitz
Koreferent:	Univ.-Prof. Dr. Idel

Ich bedanke mich bei

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

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

dem Institut für medizinische Mikrobiologie und Virologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, insbesondere Prof. Dr. Hadding,

meinen Kollegen, die immer hilfsbereit waren

meinem Mann und meinen Sohn, die mich immer verständnisvoll unterstützten

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

der gesamten mikrobiologischen Diagnostik für das gute Arbeitsklima

und

bei Frau Prof. Dr. Idel für die Übernahme des Koreferats

Ich versichere hiermit, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt zu haben.

Petridou Jasmina

Juli 2002

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Einleitung 1

1.1 *Staphylococcus aureus* 1

1.1.1 Morphologie 2

1.1.2 Aufbau und Pathogenitätsfaktoren 3

1.2 Antibiotika zur Bekämpfung von *S. aureus* 6

1.3 Makrolide, Lincosamide und Streptogramine 9

1.3.1 Makrolide 9

1.3.2 Lincosamide 10

1.3.3 Ketolide 11

1.3.4 Streptogramine 12

1.3.5 Genetische Grundlagen der Resistenz gegenüber Makroliden, Lincosamiden und Streptograminen 13

1.3.5.1 Modifizierung der zellulären Angriffsstelle 13

a) *erm* (A) 17

b) *erm* (B) 18

c) *erm* (C) 19

d) *erm (*F), *erm* (Q), *erm* (Y) 20

1.3.5.2 Ausschleusung der Wirkstoffe 20

a) „Major facilitator“-Gruppe 21

b) „ABC-Transporter“-Gruppe 21

1.3.5.3 Inaktivierung der Wirkstoffe 22

a) Laktonhydrolasen 22

b) Nukleotidyltransferasen 22

c) Acetyltransferasen 23

d) Esterasen 23

e) Phosphorylasen 24

1.3.5.4 Resistenzvermittelnde Mutationen in den ribosomalen Proteinen L4 und L22 sowie in der 23S-rRNA 24

2. Ziel der Arbeit 26

3. Material und Methoden 27
3.1 Materialien 27
3.1.1 Geräte 27
3.1.2 Feststoffe, Puffer, Lösungen 27
3.1.3 Antibiotika 28
3.1.4 Bakterien 28
3.1.5 Nährmedien 30
3.2 Methoden 30
3.2.1 Sterilisation 30
3.2.2 Stammhaltung 31
3.2.3 Methoden zur Identifizierung von *S. aureus* 31
3.2.4 Resistenztestungen 32
a) Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration 32
b) Der Agar-Diffusionstest 34
3.2.5 Keimzahlbestimmung 35
3.2.6 Zellyse 35
3.2.7 Agarosegelelektrophorese 36
3.2.8 Molekularbiologische Methoden 37
3.2.8.1 PCR und Sequenzier Reagentien 37
3.2.8.2 Die Polymerase-Kettenreaktion 37
3.2.8.3 Primer 41
3.2.8.4 Aufreinigung des PCR-Produktes 42
3.2.8.5 Die Sequenzierung 43
3.2.8.6 Fällung der DNA 43
3.2.9 Methoden zur Induktion der Lincosamid- und Ketolidresistenz durch die Veränderungen in der erm(A)- und erm(C)-Regulatorregion 45

3.2.9.1 Resistenzentwicklung durch Clindamicin und Telithromycin im flüssigen Medium 45

3.2.8.2 Resistenzentwicklung durch Clindamicin und Telithromycin auf einem festen Medium 46

4 Ergebnisse 48
4.1 Epidemiologische Verteilung der Makrolid-Resistenzgene bei *S. aureus* 48
4.2 Strukturelle Veränderungen in der Regulatorregion von *erm*(A) 51
4.3 Charakterisierung von in-vitro erzeugten ketolidresistenten Mutanten 56
4.3.1 *erm* (A) 56
4.3.2 *erm* (C) 65
4.4 Charakterisierung der regulatorischen Region bei 20 Methicillin und Quinupristin/Dalfpristin resistenten *S. aureus* Isolaten mit reduzierter Empfindlichkeit gegenüber Glycopeptiden 74
4.5 In-vitro Aktivität der neuen Ketoliden gegen Makrolid-empfindliche und resistente *S. aureus* Isolaten 76
5. Diskussion 79
5.1. Makrolide 79
5.2. Epidemiologische Verteilung der Resistenzen 80
5.3. Strukturelle Veränderungen in der Regulatorregion von *erm*(A) 82
5.4. Molekulare Charakterisierung von in-vitro erzeugten Ketolid-resistenten Mutanten 85
a) *erm (*A) 85
b) *erm* (C) 91
5.5. In-vitro Aktivität der neuen Ketoliden gegen Makrolid-empfindliche und -resistente *S. aureus* Isolaten 94

6. Ausblick 95
7. Zusammenfassung 97
8. Literatur 100

1. Einleitung

Die therapeutische Behandlung von Infektionskrankheiten, die durch Bakterien ausgelöst wurden, wird in zunehmendem Maße durch Antibiotikaresistenzen erschwert. Für den Arzt ist es daher wichtig zu wissen, welche Antibiotika noch bedenkenlos einzusetzen sind. In der vorliegenden Arbeit werden die Resistenzmechanismen von Makroliden für *Staphylococcus aureus* näher untersucht.

1.1 *Staphylococcus aureus*

In Jahr 1847 endeckte der ungarische Arzt Ignaz Semmelweis einen verblüffenden Unterschied in der Häufigkeit des Kinderbettfiebers auf zwei geburtshilflichen Stationen, den er als Folge eines Miasmas erklärte, das die Medizinstudenten von der gerade obduzierten Leichen auf die Mütter unter Geburt übertrugen. Er ahnte nicht, dass seine Erstbeschreibung einer nosokomialen Infektion später beständig erweitert werden würde. Doch seine Erkenntnisse wurden ignoriert und vespottet. Erst die Arbeiten von Koch 1878 und Pasteur 1880 rehabilitierten Semmelweis. 1881 entdeckte Ogston Bakterien, welche in Trauben ähnlichen Haufen beisammen liegen und banannte sie daher als „Staphylococcus“ (staphyle=Traube) (Ogston, 1881). Drei Jahre später wurden sie von Rosenbach isoliert und kultiviert. Aufgrund der besonderes intensiven gelb-orangen Farbe fügte er die Zusatzbezeichnung „aureus“ dazu (Resenbach, 1884).

1.1.1 Morphologie und klinische Eigenschaften

S. aureus gehört zur Gattung der Staphylokokken und damit zusammen mit den Planokokken, Stomatokokken und Mikrokokken zur Familie der *Micrococceae*, welche zur Gruppe der gram-positiven Kokken gehört. Staphylokokken können auf gewöhnlichen Nährböden

sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen herangezüchtet werden (Staphylokokken sind fakultativ anaerob). Sie wachsen haufen- oder traubenförmig. Die einzelnen Zellen sind kugelförmig bis oval, ca. 1 μm groß und unbeweglich. Kolonien sind 2 –3 mm groß und gelb glänzend. *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).

S. aureus besiedelt häufig die Haut und die Schleimhäute. Besonders hohe Keimträgerraten sind in Krankenhäusern zu beobachten: bis zu 80% der Patienten und des Pflegepersonals sind betroffen. Bei letzteren ist häufig die Schleimhaut des vorderen Nasenbereiches besiedelt. Von dort aus wird das Bakterium über die Hände, seltener über Staub, auf andere Personen übertragen. Dadurch wird *S. aureus* zu einem häufigen 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. Die wichtigste prophylaktische Maßnahme im Krankenhaus ist die strenge Einhaltung von Hygienevorschriften. Eine Sanierung von Keimträgern kann mit der Applikation von Antibiotika (meist Mupirocin) in die Nase durchgeführt werden (Archer et al, 1998).

Die durch *S. aureus* hervorgerufenen Krankheiten lassen sich in drei Gruppen aufteilen:

Invasive Infektionen

Hierbei verbleibt der Erreger am Ort des Eindringens (Haut oder Schleimhaut) und verursacht unter Eiterbildung lokale Infekte. Dazu gehören vor allem Furunkel und Karbunkel, aber auch andere Wundinfekte, Sinusitis, Otitis media und Mastitis puerperalis (Sheagren, 1985; Jain et al, 2001). Seltener auftretende invasive Infekte sind die postoperative oder posttraumatische Ostitis oder Osteomyelitis, die postoperative Endokarditis, die Pneumonie nach einer Erkältung und die Sepsis bei immungeschwächten Patienten

(Holm, 1982). Des weiteren ist *S. aureus* in der Lage, auf Fremdkörpern wie z.B. Kathetern einen Biofilm zu bilden und damit für fremdkörperassoziierte Infektionen zu sorgen (Sheagren, 1985).

Toxikosen

S. aureus produziert Enterotoxine, die für eine Lebensmittelvergiftung verantwortlich sein können. Diese äußert sich in Übelkeit, Erbrechen und starker Diarrhöe (Dinges et al, 2000).

Mischformen

Hier geht der Toxikose eine Infektion durch *S.aureus* voraus. Zu diesen Krankheitsbildern gehört die Dermatitis exfoliativa, der Pemphigus neonatorum und die bullöse Impetigo. Sie werden durch exfoliatinproduzierende Stämme hervorgerufen, die oberflächlich die Haut infizieren (Sheagren 1985). Außerdem gibt es Stämme, die das Toxic-Schock-Syndrom-Toxin 1 (TSST 1) produzieren und somit in der Lage sind, das Toxic-Schock-Syndrom hervorzurufen, nachdem eine Infektion der Schleimhäute erfolgt ist (Dinges et al, 2000; McCormick et al, 2001).

1.1.2 Aufbau und Pathogenitätsfaktoren

Die Zellwand von *S. aureus* besteht aus dickem, vielschichtigem Murein, an dessen Polysaccharid lineare Teichonsäuren und andere Polysaccharide kovalent gebunden sind. Außerdem sind in der Zellwand Lipoteichonsäuren verankert, die die ganze Mureinschicht durchziehen und über sie hinausragen. Die Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren können Makrophagen zur Sekretion von Zytokinen anregen (Dinges et al, 2000). Die Mureinschichten der Zellwand sind untereinander durch Peptidoglycinbrücken vernetzt, die durch das Enzym Lysostaphin gelöst werden können. Über Peptidbindungen an den Peptidanteil des Mureins gebunden sind zellwandassoziierte Proteine. Dazu gehören der „Clumping factor“, das Fibronektin-Bindeprotein, das Kollagen-Bindeprotein und das Protein A. Einige *S.*

aureus-Stämme sind außerdem in der Lage, eine Polysaccharidkapsel zu bilden (Foster et al, 1988; Anthony et al, 1988).

S. aureus ist in der Lage, eine Vielzahl von Pathogenitätsfaktoren zu bilden. Dazu gehören Plasmakoagulase, Enterotoxine, TSST 1, Hämolysine, Exfoliativtoxine, Lipasen und Proteasen.

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. Es entsteht ein Staphylothrombin-Komplex, der Fibrin in Fibrinogen umwandelt. Dadurch setzt die Plasmagerinnung ein. Von der Plasmakoagulase existieren acht verschiedene Serovariätäten, wovon bis zu vier in einem Stamm auftreten können. Die verschiedenen Serovariätäten 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, da sie dazu beitragen, dass sich die Bakterien am Infektionsherd einkapseln können (Foster et al, 1988).

Protein A

Protein A kommt bei 95% der S. aureus-Stämme vor. Es 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, wobei die Serotypen fünf und acht am häufigsten vorkommen. Es ist auffällig, dass 86% aller Stämme, die

gegen Methicillin resistent sind, eine Kapsel des Typs 5 besitzen. 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 Bindung an konstante Teile der Vα- und Vβ-Ketten der T-Zellen. Diese Bindung ist recht unspezifisch. Die stimulierten T-Zellen produzieren überschießende Mengen an Zytokinen, wodurch es letztendlich zur Immunsupression kommt. Man unterscheidet endogene Superantigene, die Bestandteile endogener Retroviren sind, und exogene Superantigene. Dies sind vor allem bakterielle Toxine, aber auch Toxine bestimmter Retroviren (McCormick et al, 2001). 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 Staphylokokken-Lebensmittelvergiftung. Die Gene sind entweder Plasmid-, Phagen- oder Chromosomen-assoziiert. Das Exfoliativtoxin sorgt für eine Epidermolyse (Dinges et al, 2000). Das TSST 1 wird von etwa 1% der Stämme produziert. Es ist für das oben beschriebene 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 werden im Allgemeinen in der postexponentiellen Wachstumsphase gebildet und 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).

Hämolysine

S. aureus bildet vier verschiedene Hämolysine, 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, indem es eine in die Membran integrierte amphiphatische Heptamerpore bildet. Die Bindung erfolgt unspezifisch bei hohen Toxinkonzentrationen (Dinges et al, 2000; Bhakdi et al, 1991). Das δ-Toxin ist in der Lage, verschiedene Gewebszellen und intrazelluläre Organellen unspezifisch zu lysieren, indem es durch Interaktion mit dem Phospholipidmonolayer Ionenkanäle bildet. 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. Antibiotika zur Bekämpfung von *Staphylococcus aureus*

Der Erkenntnis, dass Krankheitskeime durch medizinisches Personal von einem Patient auf den anderen übertragen werden können, folgte die Entdeckung der ersten Antibiotika. 1928 entdeckte Fleming den Antagonismus zwischen Bakterien- und Pilzwachstum (Fleming, 1929), welcher lange Zeit in seiner Tragweite unerkannt bleibt und daher erst Jahr später intensive Forschungen über Penicillin einleitete. 1941 wurden die ersten klinische Studien darüber publiziert (Abraham et al, 1941). In den fünfziger Jahren wurden weiter Antibiotika entdeckt: Tetracycline und Makrolide. Die anfängliche Euphorie über die neu gewonnenen Therapie- Möglichkeiten wurde durch erste Beschreibungen von resistenten Bakterien gebremst. Seit 1944 nahm der Anteil der penicillinasebildenden Staphylokokken kontinuierlich zu, so dass bereits 1950 ihr Anteil bei nosokomialen Infektionen auf ca. 80% geschätzt wurde. 1960 entdeckten Rolinson und Stevens ein neues Breitspektrumantibiotikum (BRL 1241, heute Methicillin genannt). Dieses Penicillin ist ein Derivat der 6-Aminopenicillinsäure, ein Zwischenprodukt beim Abbau von Penicillin. Dieses synthetische

Penicillin war wirksam gegen Penicillin-resistente Staphylokokken. Es folgte die Entwicklung weiterer semisynthetischer Penicilline (Oxacillin, Flucloxacillin).

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 (Archer et al, 1998; Schmitz, 1998). Methicillin ist ein semisynthetisches, Penicillinase-festes β-Laktam-Antibiotikum, welches 1960 auf dem Markt eingeführt wurde. Danach kam es innerhalb von zwei Jahren zu einer Resistenzentwicklung bei *S. aureus*-Stämmen. Diese resistenten Stämme breiteten sich während der folgenden 30 Jahre weltweit aus. Besonders problematisch ist, dass neben der Methicillinresistenz zahlreiche Kreuzresistenzen 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-Laktamstruktur. 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). Durch diese vielen Kreuzresistenzen ist ein Arzt, der eine MRSA-Infektion behandelt, in der Wahl der antibakteriellen Mittel stark eingeschränkt. Häufig stehen ihm nur noch die beiden Glycopeptide Teicoplanin und Vancomycin zur Verfügung. 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 resistentere 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).

Es gibt zwei verschiedene Mechanismen, die für die Resistenz von *S. aureus* gegen β-Laktam-Antibiotika verantwortlich sind: β-Laktamasen und ein zusätzliches, Penicillin-bindendes Protein (PBP). β-Laktamasen oder Penicillinasen zerstören enzymatisch den Laktamring der β-Laktam-Antibiotika. Diesem Resistenzmechanismus wurde durch die Entwicklung penicillinasefester Penicilline wie Methicillin und Oxacillin begegnet. Der zweite Resistenzmechanismus ist auch gegen penicillinasefeste Antibiotika wirksam und ist damit entscheidend für die Ausbildung einer Methicillinresistenz (Mulligan et al, 1993). Dieser Resistenz liegt molekulargenetisch die Synthese eines neuen, zusätzlichen penicillinbindenden Proteins, des sogenannte PBP2a, zugrunde. 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 kann aufgrund einer wesentlich geringeren Affinität zu den β-Laktam-Antibiotika die Funktion der übrigen, durch β-Laktam-Antibiotika gehemmten PBP bei der Zellwandsynthese übernehmen. So entsteht ein alternativer Stoffwechselweg zur Bildung einer intakten Zellwand, der von β-Laktam-Antibiotika nicht mehr gehemmt werden kann. 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.

1.3. Makrolide, Lincosamide, Streptogramine

1.3.1. Wirkungsmechanismus von Makroliden

In der Humanmedizin werden häufig Makrolide eingesetzt zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten. Sie stellen eine heterogene Gruppe von Proteinsyntheseinhibitoren bei grampositven und wenigen gramnegativen Bakterien dar. Makrolide bestehen aus 12- bis 16-gliedrigen Lactonringen, an die ein oder zwei Aminozucker oder aber ein Desoxyzucker glycosidisch gebunden sind. Makrolide enthalten ihre inhibitorische Wirkung an den 23S-Untereinheiten der Ribosomen. Dort binden sie an das L15 Protein in der Peptidyltransferaseregion und stimulieren die vorzeitige Ablösung der Peptidyl-t-RNA im Rahmen der Translokation des Ribosoms, in dem sie die korrekte Positionierung der Petidyl-t-RNA beim Transfer von der Aminoacylbindungsstelle auf die Peptidyl-bindungsstelle sterisch behindert. Einige Makrolide, wie Erythromycin (Abb.1) und Azithromycin verhindern auch das korrekte Zusammensetzen der 23S-Untereinheit der Ribosomen.

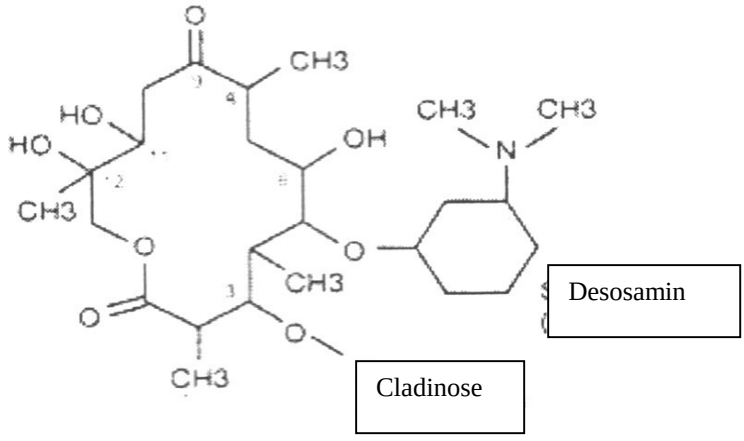


Abbildung 1: Molekularstruktur des Erythromycin

1.3.2. Wirkungsmechanismus der Lincosamide

Die Gruppe Lincosamide umfaßt im wesentlichen zwei Substanzen:

1) Lincomycin, das aus der Aminosäure trans-1-Methyl-4-Propyl-L-Prolin und dem alpha Methylthioglycosid der Aminooctose Lincosamin zusammengesetzt ist, und

2) Clindamycin, welches ein 7-Chlor-7-Desoxy-Lincomycin darstellt (Abb. 2).

Lincosamide wirken ähnlich wie Makrolide. Durch eine Bindung an die 23S-Untereinheit der Ribosomen wird die Peptidyl-transferasereaktion inhibiert. Die fehlerhafte Positionierung der t-RNA an der Aminoacylbindungsstelle verhindert eine Verknüpfung der Peptide, so dass es zu einem Elongationsabbruch kommt. Die Lincosamide wirken auf grampositive Bakterien, aber auch auf einige gramnegative Anaerobier.

Clindamycin

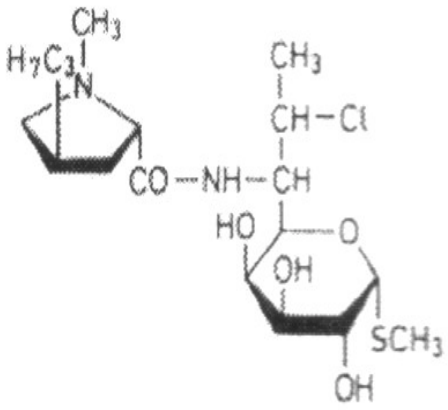


Abbildung 2: Struktur des Clindamycin

1.3.3. Wirkungsmechanismus der Ketolide

Ketolide sind eine vollkommen neu entwickelte Antibiotikaklasse. Sie basieren auf einem 14-gliedrigen Macrolactonring. Sie wirken gegen grampositive Bakterien wie z.B. *Staphylococcus*, *Streptococcus* und einige Bacillus-Arten, aber auch gegen gramnegative Bakterien wie *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* und *Bordetella pertussis*. Telithromycin unterscheidet sich durch zwei Schlüsselstrukturen von den Makroliden (Abb. 3). An der dritten Position des Lactonringes befindet sich eine Ketofunktion, ein weiterer Lactonring ist glycosidisch mit dem Hauptring verknüpft. Die zweite Schlüsselstruktur ist eine Seitenkette, an die zwei Lactamringe gebunden sind. Diese befindet sich an Position elf des Macrolactonringes. Da Ketolide ähnlich aufgebaut sind wie Makrolide, gibt es in ihrem Wirkungsmechanismus kaum Unterschiede. Ketolide wirken ebenfalls als Proteinsynthese-inhibitoren. Sie lagern sich an der 23S rRNA an und blockieren die Elongation der Peptidkette. Die genaue Angriffspunkt sind die Adeninreste A2058 und A2059, welche sich in der Domäne V der 23S rRNA befinden.

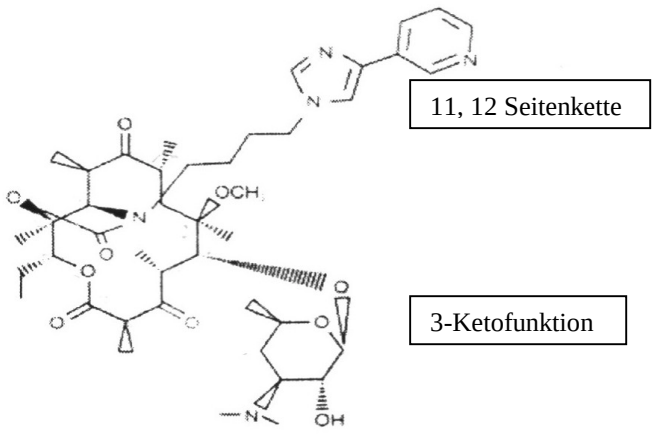


Abbildung 3. Struktur des Telithromycin

1.3.4. Wirkungsmechanismus der Streptogramine

Die Struktur und Wirkung der Streptogramine ist der der übrigen MLS_B-Antibiotika sehr ähnlich (Paradisi et al, 2001). Zu den Streptograminen gehört das Synercid. Synercid besteht in einem 30:70 Verhältnis aus dem Hexadepsipeptid Quinupristin und dem zyklischen Makrolidlacton Dalfopristin. Ort der Wirkung in der Bakterienzelle ist die 50S-Untereinheiten des Ribosoms. Beide Einzelkomponenten beeinträchtigen durch Bindung an spezifische Proteine des Extrusionskanals die Proteinbiosynthese, ohne allerdings als Einzelsubstanzen eine nachhaltige Hemmung der Proteinsynthese mit der Folge eines bakteriziden Effektes auszulösen. Erst durch die Kombination der einzelnen Komponenten werden die Bindungsverhältnisse am Ribosom so nachhaltig verändert, dass eine bakterizide Wirkung resultiert.

Das antimikrobielle Spektrum von Synercid umfasst sowohl *S. aureus* als auch die verschiedenen Spezies der koagulasenegativen Staphylokokken (KNS) einschließlich Methicillin- und/oder MLS_B – resistenter Stämme. Darüber hinaus besitzt Synercid eine hohe Aktivität gegenüber Streptokokken, inklusive Penicillin- und Makrolid-resistenter Pneumokkoken. Während *Enterococcus faecalis* eine intrinsische Resistenz gegenüber Dalfopristin aufweist und damit nur bedingt im Wirkungsbereich der Streptograminkombination liegt, sind *Enterococcus faecium*-Stämme üblicherweise empfindlich gegenüber Synercid.

1.3.5. Genetische Grundlagen der Resistenz gegenüber Makroliden, Lincosamiden und Streptograminen

Die Resistenz gegenüber MLS_B Antibiotika beruht bei *Staphylococcus*, *Pneumococcus* und *Enterococcus* auf vier verschiedene Resistenzmechanismen. Diese Resistenzmechanismen sind:

- die chemische Modifikation der zellulären Angriffs-stellen der Wirkstoffe
- die Ausschleusung der Wirkstoffe aus der Zelle
- die enzymatische Inaktivierung der Wirkstoffe
- Mutationen in den ribosomalen Proteinen L4 und L22 sowie in der 23S rRNA (Depardieu et al, 2001)

Die drei erstgenannten Mechanismen werden dabei von mehreren unterschiedlichen Genen repräsentiert, deren Genprodukte – zum Teil auch in Abhängigkeit vom Expresionstyp – unterschiedliche Resistenzphänotypen vermitteln. Das Vorkommen der verschiedenen Resistenzgene bei Staphylokokken, Streptokokken und Enterokokken ist in Tabelle 1 dargestellt.

1.3.5.1. Modifizierung der zellulären Angriffsstellen durch eine *erm*-Methylase

Dieser Resistenzmechanismus wird durch eine Adenin-N6-Methylase vermittelt. Diese Methylase überträgt eine oder zwei Methylgruppen auf den Adeninrest an der Position 2058 in der 23S rRNA. Durch diesen Methylierungsvorgang wird ein Anheften der Makrolide, aber auch der Lincosamide und B-Komponenten der Streptogramine verhindert. Daraus ergeben sich die in Tabelle 1 dargestellten $M_{I4-I6}LS_B$-Resistenzphänotypen. Bei Staphylokokken, Streptokokken und Enterokokken sind bislang sechs verschiedene Methylasegene *erm*(A), *erm*(B), *erm*(C), *erm*(F), *erm*(Q) und *erm*(Y) bekannt (Roberts et al, 1999). Untersuchungen zur Verteilung der erm-Gene

bei *Staphylococcus spp*. zeigten, dass in Abhängigkeit vom jeweiligen Testkollektiv Gene vom Typ *erm*(C) in mehr als 50% bzw.

Mechanismus	Gen	Resistenz-phänotyp	Vorkommen bei		
			Staphylo-coccus	Strepto-coccus	Entero-coccus
rRNA-Methylase	erm (A)	$M_{14-16}LS_B$	+	+	-
	erm (B)	$M_{14-16}LS_B$	+	+	+
	erm (C)	$M_{14-16}LS_B$	+	+	-
	erm (F)	$M_{14-16}LS_B$	+	+	-
	erm (Q)	$M_{14-16}LS_B$	-	+	-
	erm (Y)	$M_{14-16}LS_B$	+	-	-
ATP-bindende Transporter	msr (A)	$M_{14}S_B$	+	-	-
	vga (A)	S_A	+	-	-
	vga (B)	S_A	+	-	-
„Major facilitator“	mef (A)	M_{14}	+	+	+
Esterase	ere (A)	$M_{14,15}$	+	-	-
	ere (B)	$M_{14,15}$	+	-	-
Hydrolase	vgb (A)	S_B	+	-	+
	vgb (B)	S_B	+	-	-
Nukleotidyltransferase	lnu (A)	L	+	-	-
	lnu (B)	L	-	-	+
Acetyltransferase	vat (A)	S_A	+	-	-
	vat (B)	S_A	+	-	-
	vat (C)	S_A	+	-	-
	vat (D)	S_A	-	-	+
	vat (E)	S_A	-	-	+
Phosphorylase	mph (C)	M_{14-16}	+	-	-

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

Tabelle 1. MLS-Resistenzgene bei Bakterien der Spezies *Staphylococcus, Streptococcus* und *Enterococcus*

70% der untersuchten Isolate zu finden sind. *Erm*(A), sowie *erm*(B)-Gene befinden sich nur in 10% der getesteten resistenten Stämme (Schaw et al, 1985; Westh et al, 1995, Macrina et al, 1993). Weiterhin konnte durch verschiedene Studien eine zeitliche Variabilität in der Dominanz bestimmter *erm*-Gene festgestellt werden. So kamen bei z.B. *S. aureus*-Isolaten aus den Jahren 1959-1971 hauptsächlich *erm*(A)-Gene vor, während sich seit Anfang der 80er Jahre bevorzugt *erm*(C)-Gene nachweisen ließen (Westh et al, 1995). Die bei Streptokokken und Enterokokken in erster Linie vorkommenden *erm*-Gene gehören der Klasse B an.

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-assozierte Ribosomenbindungsstelle und der Start des Methylasegens in der mRNA-Sekundärstruktur verborgen sind und somit eine effiziente Translation der Transkripte verhindert wird (Leclerq et al, 1991). Zur

Abbildung 4. Inaktive Konformation der *erm(C)* mRNA im nicht-induzierten Zustand in Abwesenheit von 14- und 15-gliedrigen Makroliden.

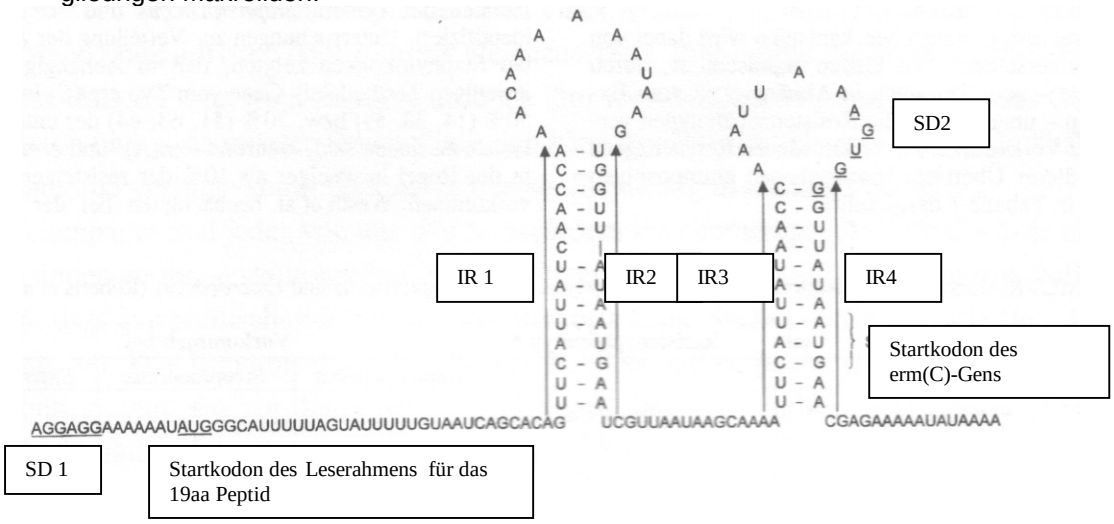
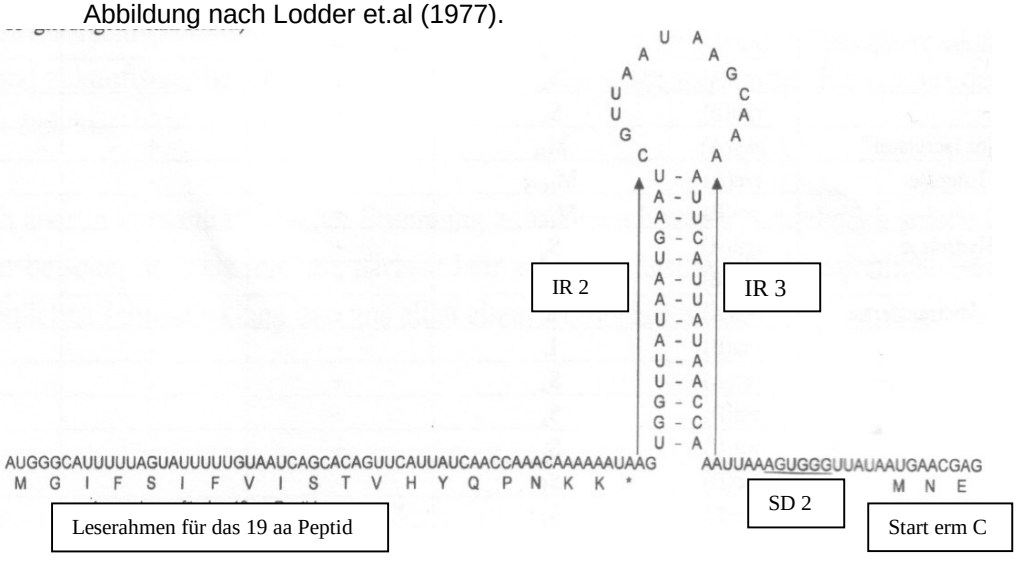


Abbildung 5: Aktive Konformation der *erm(C)* mRNA im induzierten Zustand in Gegenwart von 14- und 15-gliedrigen Makroliden.
Abbildung nach Lodder et.al (1977).



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 4 zeigt den Translationsattenuator von *erm(C)* in induzierter und nicht induzierter Formation.

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 Staphylokokken vorkommenden Gene *erm*A und *erm*C erwiesen, während für das bei Streptokokken 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)-Gene

Das erm(A)-Gen wurde auf einem 6,7 kBp großen nicht konjugativen Transposon *Tn*554 aus *S.aureus* Identifiziert (Murphy et al, 1985). Diese Transposon integriert sich vorwiegend an der Stelle att554 in die chromosomale DNA. Ist diese lntegrationsstelle besetzt oder deletiert, so kann Tn554 auch an sekundären lntegrationsstellen, auf Plasmiden eingebaut werden. Plasmidäre *Tn*554-lntegrate wurden kürzlich auch bei *S. intermedlus*, *S. sciuri* und *S. haemolyticus* von Tauben nachgewiesen (Lecklercq et al, 1991). Die Expression des *erm*(A)-Gens kann induzierbar, mittels attenuierter Translation, oder konstitutiv erfolgen . Der *erm*(A)-spezifische Transiationsattenuator weist drei Paare umgekehrt komplementärer Sequenzen und zwei Leserahmen für Peptide von 15 bzw. 19 Aminosäuren auf. Bei konstitutiv expremierten *erm*(A)-Genen natürlich vorkommender *S.*

aureus- und *S. intermedius*-Isolaten von Menschen und Tieren wurden im Translationsattenuator bislang Punktmutationen, aber auch Deletionen unterschiedlichen Ausmaßes identifiziert (Werckenthin et al, 1999).

b) *erm*(B)-Gene

Das Prototypen-Gen der Hybridisierungsklasse B wurde auf dem, 3kBp großen, nichtkonjugativen Transposon *Tn*917 aus *Enterococcus faecalis* nachgewiesen (Schaw et al, 1985). Ein weitgehend analoges Transposon *Tn*551 ist von *S.aureus* bekannt. Im Gegenteil zu *Tn*554, zeigen die *erm*(B)- tragenden Transposons keine Spezifität hinsichtlich ihrer Integrationsorte. Gene vom Typ *erm*(B) werden auch auf konjugativen Multiresistenztransposons, wie Tn1545 aus *Streptpcoccus pneumoniae*, und konjugativen Resistenzplasmiden, wie p1501 aus *S. agalactiae* gefunden (Macrina et al, 1993). Als Bestandteil konjugativer Transposons und Plasmide haben *erm*(B)-Gene eine weitreichende Verbreitung erfahren. Gene, deren Genprodukte in ihrer Aminosäuresequenz nur geringfügig von der *erm*(B)-kodierten Methylase von *Tn*917 abweichen, wurden als Integrate an unterschiedlichen Stellen in Plasmiden und in der chromosomalen DNA diverser grampositiver und gramnegativer Bakterien nachgewiesen (Schaw et al, 1985). Integrationen *erm*(B)-kodierender Transposons in kleine Plasmide wurden bislang nur selten beobachtet. Das Plasmid pSES2O aus *Staphylococcus lentus* ist das bisher einzige Beispiel für derartige Integrationsprozesse bei Staphylococcus (Sayers et al 1995). Analysen dieses Plasmids ergaben, dass pSES2O nur über den Teil eines *Tn*917-analogen Transposons verfügt, welcher das Resistenzgen inklusive seiner flankierenden Regionen enthält. Das pSES2O-kodierte *erm*(B)-Gen wird im Vergleich zum *Tn*917-kodierten Gen konstitutiv exprimiert. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in der Verkürzung des regulatorischen Peptides infolge einer 4 bp große(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)-Gene

Das erm(C)-Gen ist meist Bestandteil kleiner, strukturell eng verwandter Multicopy-Plasmide von 2,3 - 4,0 kbp Größe, die bislang bei diversen *Staphylococcus* Spezies nachgewiesen wurden (Lyon et al, 1987, Lodder et al, 1997). Das *erm*(C)-Gen des 3,7 kbp großen Plasmids pE194 aus *S.aureus* gilt als Referenzgen für *erm*(C)-Gene. Kleine Plasmide, die ein *erm*(C)-Gen tragen, beinhalten keine zusätzlichen Resistenzgene. Die Plasmide sind in der Regel zur Replikation in *Bacillus* Spezies, nicht aber in Streptococcus- und Enterococcus-Arten befähigt. Selten wurde das *erm*(C)-Gen auch auf größeren Plasmiden festgestellt, die noch weitere Resistenzgene enthielten (Schwarz et al, 2000). Die bisher sequenzierten *erm*(C)-Gene sind eng verwandt. Vergleiche der abgeleiteten Aminosäure-sequenzen zeigten 4-16 Amino-säureaustausche im Gegensatz zur pE194-kodierten *erm*(C)-Methylase (Ounissi et al, 1985). 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 expremiert werden. Der Translationsattenuator des *erm*(C)-Gens besteht aus zwei Paaren umgekehrt komplementärer Sequenzen und einem Leserahmen für ein regulatorisches Peptid von 19 Aminosäuren (Weisblum et al, 1995, 1998, Werckenthin et al, 1997). Bei konstitutiv expremierten *erm*(C)-Genen wurden vielfältigen strukturelle Veränderungen im Translationsattenuator beobachtet. Hierbei handelt es sich um Sequenzdeletionen, Duplikation oder Punktmutationen (Jensen et al, 2000). Die mittlerweile zur Hybridisierungsklasse C gezählten *erm*-

Gene sind in Publikationen meist unter der Bezeichnung *erm*(C), gelegentlich aber auch unter den Bezeichnung *erm*(M) oder *erm*(IM) zu finden (Roberts et al, 1999).

d) *erm*(F)- *erm*(Q)- und *erm*(Y)-Gene

Das Gen *erm*(F) wurde zusammen mit dem Tetracyclineresistenzgen tet(Q) auf konjugativen Transposons aber auch alleinig auf kleinen zusammengesetzten Transposons, wie *Tn*4551*, Tn*4351 oder *Tn*4000 bei Bakterien des Genus *Bacteroides* gefunden (Roberts et al, 1999, Ross et al, 1995). Konjugative Transposons besitzen ein weites Wirtsspektrum (Ross et al, 1990). Die Gene *erm*(FU), *erm*(FS) und *erm*(F) wurden aufgrund ihrer engen Verwandtschaft zur Hybridisierungsklasse F zusammen gefasst (Roberts et al, 1999). Das erm(Q)-Gen wurde erstmalig in der chromosomalen DNA bei *Clostridium perfingens* gefunden. Bei Vertretern dieser Spezies stellt es das häufigste Makrolidresistenzgen dar (Sayers et al 1995). Weiterhin befindet sich das *erm*(Q)-Gen in *Actinobacillus* und *Streptococcus*. Uber die Assoziation des *erm*(Q)-Gens mit Transposons liegen keine Angaben vor. Das *erm*(Y)-Gen, ursprünglich als *erm*(GM) bezeichnet, wurde zusammen mit zwei weiteren Makrolidresistenzgenen, *msr*(A) und *mph*(C) auf dem Plasmid pMS97 von *S. aureus* nachgewiesen (Santgati et al, 2000).

1.3.5.2. Ausschleusung der Wirkstoffe

Das Ausschleusen der Wirkstoffe erfolgt durch eine Efflux-pumpe. 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 12-14 transmembralen Segmenten und besitzen keine nukleotidbindenden Domänen. Ihre Energie beziehen sie aus dem H^+-Gradienten der Membran. ABC-Transporter dagegen besitzenzwei ATP-bindende Domänen.

a) Major facilitator-Gruppe

Der Major facilitator-Gruppe gehören das *mef*(A)-Gen bzw. das *mef*(E)-Gen an (Tait-Kamradt et al, 2000; Tait-Kamradt et al, 1997; Nishijima et al, 1999; Sutcliffe et al, 1996). Das Genprodukt ist ein membran-gebundenes Protein. Dieses Effluxsystem ist lediglich in der Lage Makrolide auszuschleusen (M-Phänotyp) (Sutcliffe et al, 1996). Das Gen *mef*(A) wurde erstmals bei *Streptococcus pyogenes* nachgewiesen. Das *mef*(E)-Gen wurde bei *Streptococcus pneumoniae* identifiziert. Da beide Gene eine 90%ige Übereinstimmung in ihren Nukleotid- sequenzen aufweisen, wurden sie unter der gemeinsamen Bezeichnung *mef*(A) zusammengefaßt, Untersuchungen zeigten, dass mef-Gene innerhalb grampositiver Bakterien weit verbreitet sind (Lina et al, 1999, Weisblum et al 1998). So wurden *mef*-Gene bei *Streptococcus, Micrococcus, Corynebacterium* und *Enterococcus* Spezien nachgewiesen. Das *mef*(A)-Gen konnte kürzlich als Bestandteil eines 7244 bp großen Elementes, bei *Streptococcus pneumoniae*, nachgewiesen werden. Diese Element ließ sich mittels Transformation, aber nicht mittels Konjugation übertragen (Santgati et al, 2000).

b) „ABC-Transporter“-Gruppe

Bislang wurden bei *Staphylococcus* zwei ABC-Transporter-Gene nachgewiesen.Die kodieren Proteine, die zur Gruppe der „ABC-Transporter“ gezählt werden. In die ersten Gruppe werden *msr*(A), *msr*(SA), *msr*(SA) und *msr*(B) zusammengefaßt, die alle eine hohe Ubereinstimmung der Nukleotidsequenzen aufweisen (Ross et al, 1990, Roberts et al, 1999). Diese Gene befinden sich häufig auf Plasmiden. Gemäß der neuen Nomenklatur haben alle die Bezeichnung *mrs*(A). Die Msr(A)-Proteine sind in der Lage nicht nur 14-gliedrige Makrolide, sondern auch Streptogramine auszuschleusen ($M_{14}S_B$-Phänotyp). Die zweite Gruppe wird durch die ebenfalls häufig auf Plasmiden lokalisierten Gene *vga*(A) und *vga*(B)

repräsentiert. Sie kodieren ATP-bindende Transporterproteine, die die A-Komponenten der Streptogramine ausschleusen (S_A-Phänotyp) (Ross et al, 1990). Es wird angenommen, dass diese Proteine bei der Ausschleusung der Wirkstoffe mit membranständigen Effluxsystemen interagieren; ein solches chromosomal kodiertes Effluxsystem wurde kürzlich identifiziert (Ross et al, 1995).

1.3.5.3. Inaktivierung der Antibotika

Eine Inaktivierung von Makroliden, Lincosamiden oder Streptograminen ist möglich, wenn der Organismus entweder Laktonhydrolasen, Nukleotidtransferasen, Acetyltransferasen, Esterasen oder Phosphorylasen exprimieren kann.

a) Laktonhydrolase

Laktonhydrolasen werden durch das *vgb*(A)-Gen und das *vgb*(B)-Gen kodiert (Allignet et al, 1995, 1998). Sie vermitteln ausschließlich eine Resistenz gegenüber den B-Komponenten der Streptogramine. Diese auf Plasmiden zufindenden Gene kodieren zwei verschiedene Proteine. Das Genprodukt des *vgb*(A)- Gens umfaßt ein Protein mit 299 Aminosäuren, während *vgb*(B) ein geringfühgig kleineres Protein mit 295 Aminosäuren produziert. Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen beläuft sich auf 67%. Das *vgb*(A) wurde bislang bei *Staphylococcus* und *Enterococcus*, *vgb*(B) dagegen nur bei *Staphylococcus* nachgeweisen (Roberts et al, 1999).

b) Nukleotidtransferasen

Nukleotidtransferasen vermitteln eine Resistenz gegenüber Lincosamiden (L-Phänotyp). Die 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`) benannt , z. B. wurde bei *Staphylococcus haemolyticus*, dieses Gen auf einem kleinen Plasmid von 2,5 kb nachgewiesen (Brinson et al, 1988). Das Lnu(A)-Protein besteht aus 161 Aminosäuren. Das Gen *lnu*(B), ehemals bezeichnet als *lin*(B), konnte bei *Entrococcus faecium* nachgewiesen werden (Schwarz et

al, 2000). Diese Gen ist lokalisiert auf einem großen konjugativen Plasmid von ca. 240 kb, das auch Resistenzen gegenüber Erythromycin, Gentamicin und Streptomycin vermittelt. Das von *lnu*(B) kodierte Protein umfaßt eine Größe von 267 Aminosäuren. Signifikante Sequenzhomologien zwischen Lnu(A) und Lnu(B) bestehen nicht. (Bozdogan et al, 1999)

c) Acetyltransferasen

Es sind bisher fünf verschiedene Typen von Acetyltransferasen bekannt. Diese vermitteln eine Resistenz gegenüber den A-Komponenten der Streptogramine und tragen die Bezeichnung Vat(A-E) (Roberts et al, 1999). Bei *S. aureus* sowie *Enterococcus faecium* konnten diese Gene nachgewiesen werden. Die Größen der Acetyitransferasen variieren in einem engen Bereich: Vat(A) 219 Aminosäuren, Vat(B) 212 Aminosäuren, Vat(C) 212 Aminosäuren, Vat(D) 209 Aminosäuren und Vat(E) 214 Aminosäuren (Allignet et al, 1993, 1995, 1998, Rende-Fournier et al, 1993). Die Gene *vat(*A) und *vat(*B) sind meist auf konjugativen Plasmiden zu finden. Während das *vat*(C)-Gen zusammen mit dem Laktonhydrolasegen vgb(B) auf einem 5kb großen Plasmid gefunden wurde. Diese drei Gene konnten nur bei Staphylococcus, nicht aber bei Enterococcus nachgewiesen werden. Vat(D)- und Vat(E)-Gene sind bei *Enterococcus faecium*-Isolaten weitverbreitet, bei S*taphylococcus* hingegen wurden sie bislang nicht entdeckt (Lodder et al, 1996). Die vat-Proteine zeigen eine weniger als 70%ige Ubereinstimmung in ihren Aminosäuresequenzen.

d) Esterasen

Zwei Esterasen, *ere*(A) und *ere*(B), die 14- und 15-gliedrige Makrolide inaktivieren, sind bei *Eschericha coli* beschrieben (Ounissi et al, 1985). *Ere*(A) stellt ein Protein von 343 Aminosäuren dar, ere(B) ein Protein von 418 Aminosäuren. Die entsprechenden Gene sind in beiden Fällen auf Plasmiden zu finden. Bei *Staphylococcus aureus*-Isolaten treten die Gene *ere*(A) und *ere*(B) wenig in Erscheinung (Wondrack et al, 1996).

e) Phosphorylasen

Inaktivierung von Makroliden mittels Phosphorylierung wurde bei *Staphylococcus aureus* beschrieben. Es gibt zwei nahezu identische Phosphorylasegene des Typs *mph*(C). Diese wurden auf den Plasmiden pMS97 und pSR1 lokalisiert (Suttcliffe et al, 1999). In beiden Plasmiden ist stromaufwärts von *mph*(C) ein zusätzliches *msr*(A)- Gen zu finden.

1.3.5.4. Resistenzvermittelnde Mutationen in den ribosomalen Proteinen L4 und L22 sowie in der 23S rRNA

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 6 zeigt die Positionen der wichtigsten Mutationen.

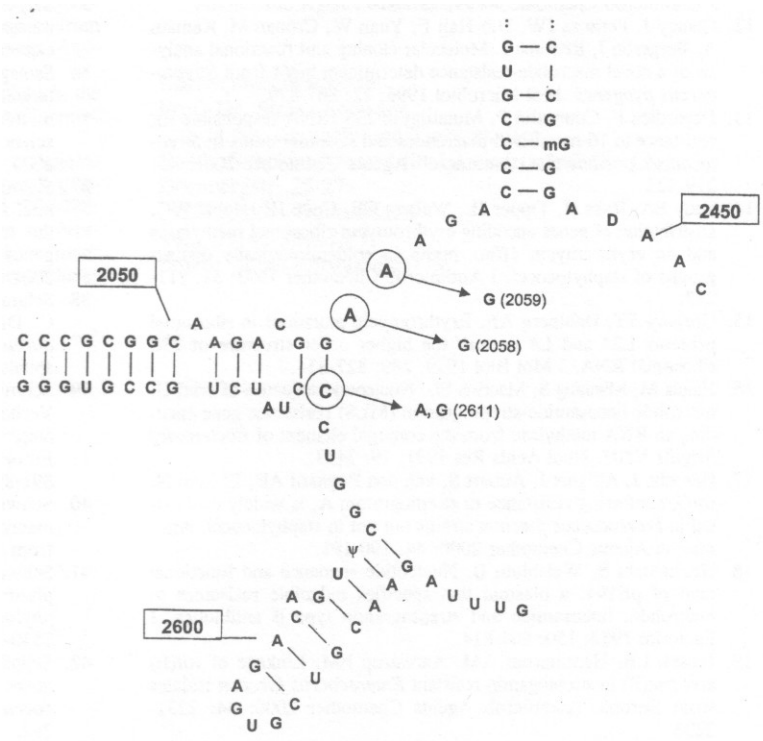


Abbildung 6. Darstellung eines Ausschnittes aus dem Peptidyltransferase-Zentrum der Domäne V der 23s rRNA. Austausche der Basen an Positionen 2058 (A→G), 2059 (A→G) und 2611 (C→A/G) wurden bei *S. pneumoniae* im Zusammenhang mit Resistenz gegenüber Makroliden (2059, 2611) bzw. Makroliden, Linkosamiden und Streptogramin b-Antibiotika (2058) nachgewieswen (Vester et al, 2001).

2 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit zu Makrolidresistenzmechanismen bei *Staphylococcus aureus* gliedert sich in 5 Teile:

Im ersten Teil sollte die Epidemiologie der Resistenzmechanismen untersucht werden, d.h. die Verbreitung und Häufigkeit der einzelnen Makrolidresistenzgene von *S. aureus* . Eine der essentiellen Fragen lautete dabei: gibt es Unterschiede zwischen MRSA und MSSA?

Im zweiten Teil sollte der Frage nachgegangen werden, welche strukturellen Veränderungen in der regulatorischen Region (Translations Attenuator) des *erm*(A) Gens für eine konstitutive Genexpression verantwortlich sind.

Aus der Beantwortung des obengenannten Fragenkomplexes stellt sich in dem dritten Teil der Arbeit die Frage, ob bestimmte Antibiotika, insbesondere die neuen Ketolide Telithromycin und ABT-773, in der Lage sind Mutanten mit konstituver *erm*(A)und *erm*(C)-Genexpression zu selektionieren und welche strukturellen Veränderungen bei solchen Mutanten auftreten.

In vierten 4 der vorliegenden Arbeit wurde analysiert welche strukturelle Veränderungen im *erm*(A)und *erm*(C) Translationsattenuator bei *S. aureus*-Stämmen, die eine Oxacillin und gleichzeitig eine Quinupristin/Dalfpristin Resistenz und überdies noch eine herabgesetzte Empfindlichkeit gegenüber Glykopeptiden (GISA-Stämme) besitzen, auftreten.

Abschließend sollte die in-vitro Aktivität der neuen Ketolide, Telithromicin und ABT-773 gegen Makrolid-sensibelen und -resistente *Staphylococcus aureus* Isolaten mit definiertem Genstatus untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1 Materialen

3.1.1 Geräte

Die folgenden Geräte wurden benutzt:

Autoklav	Westima-Sauter
Elektrophoresekammer (und Zubehör)	BioRad
Spannungsgerät	BioRad
Thermocycler	Perkin-Elmer
DNA-Sequenzer	377 ABI Prism
Tischzentrifuge	Heraeus
Thermomixer	Eppendorf
Sterilbank	Bio Gard hood
Vortexer	Witeg elektrik
MuItichannelpipetten	Finn, Eppendorf
Pipetten	Eppendorf, Gillson
Petrischalen	Greiner
Mikrotiterplatten	Greiner
Glasgeräte	Schott
Gewebekulturröhrchen	Greiner
Mikrobank	Mast-Diagnostica
Pipetus	Hirschmann

3.1.2 Feststoffe, Puffer, Lösungen

Die folgende Chemikalien wurden eingesetzt:

Ethidiumbromidlösung (Konzentration: 10 mg/ml)	BioRad
Agarose	Sigma
Ethanol	Riedel de Häen
EDTA	Sigma
Borsäure	ICN Biomedicals INC

10 mM Tris-Cl (pH 8,5)(Merck)(Hydroxymethyl-aminoethan)

NaCl (Merck)

Glucose (Merck)

Lysostaphin (Enzym) (Sigma)

Bluemarker (Gibco BGL)

Bromphenolblau (0,25% w/v)

Xylenecyanole FF (0,25% w/v)

Sucrose (40% w/v)

Mit Glycerin 1:1 verdünnt

TBE-Puffer

(55 g/ L Borsäure, 108 g/ L Tris-HCl und 40 mL/ L EDTA)

Zellysepuffer

(500 µL Glucose, 200 µL EDTA pH 8 und 250 µL Tris-HCl in 10 mL Wasser)

1 kB-Marker Life Technologies

(100 µL/ mL Marker, 150µL/ mL Bluemarker, 750 µL/ mL Wasser)

3.1.3. Antibiotika

Folgende Antibiotika wurden verwendet:

Clindamycin (Sigma)

Telithromicin (Hoechst)

Linezolid (Pharmacia)

Erythromycin (Sigma)

ABT 773 (Abbott Laboratories)

Antibiotikatestblättchen (Becton Dickinson)

Clindamycin 10 µg pro Blättchen

Erythromycin 15 µg pro Blättchen

3.1.4 Bakterien

- Epidemiologische Verteilung der Makrolid-Resistenzgene bei *Staphylococcus aureus*

Die Bakterien-Isolaten stammen aus 15 unterschiedlichen deutschen Universitätkliniken und werden im Rahmen des M.A.R.S.-Programms

eingesandt worden sind. Die vorliegende Studie umfasst klinische Isolate ab September 1996 bis Januar 1999. Das M.A.R.S - Programm ist eine Surveillance Studie zum Monitoring gram-positiver Krankheitserreger sowie der sich entwickelden Resistenzen gegenüber verschiedenen Antibiotika. Nur jeweils ein Blutkultur-Isolat pro Patient, der Zeichen einer Sepsis hattte, wurde analysiert. Um Aussagen zu Prävalenz verschiedener Makrolid-Resistenzgene *erm*(A), *erm*(B), *erm*(C), *msr*(A/B), *ere*(A) und *ere*(B) bei Makrolid-resistenten *S. aureus*-Isolaten machen zu können, wurden 134 klinische Isolate mittels PCR auf das Vorhandensein der entsprechenden Gene untersucht.

- Alternationen in Regulatorischem Region *erm*(A)-Gens bei Konstitutiv resistenten *Staphylococcus aureus* Stämmen

Für den zweiten Teil des Arbeit stammten die Bakterien-Isolate aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Utrecht. Alle verwendeten *Staphylococcus aures*-Isolate wiesen bereits eine Methicilinresistenz auf. 64 Isolaten waren sowohl gegen Erythromycin als auch gegen Clindamycin resistent. Die restlichen Stämme waren Erythromycin resistent, jedoch Clindamycin sensibel, wiesen somit den induzierbaren MLS_B-Phänotyp auf und waren für Resistenzselektionsversuche geeignet. 64 *Staphylococcus aureus* Isolaten, die in diese Studie untersucht worden sind, besitzen *erm*A Gen und eine konstitutive Resistenz gegen MLS_B Antibiotika. Mittels PCR und Sequenzierung sind verschiedene Mutationen in regulatorischen Region festgestellt werden

- Charakterisierung von regulatorischen Region bei 20 Meticillin und Quinupristin-Dalfpristin resistenten *Staphylococcus aureus* Isolaten mit reduzierter Glycopeptid Sensibilität

Für diesen Teil der Studie sind die *Staphylococcus aureus* Stämme im Rahmen des SENTRY-Programs gesammelt worden. Die vorliegende Studie umfaßt klinische Isolate der Jahre 1997-1999. Das SENTRY Programm ist eine langfristig angelegte Survelience Studie zum Monitoring der am häufigsen auftreteden

Krankheitserreger sowie der sich entwickelnden Resistenzen gegenüber 26 verschiedenen Antibiotika. Nur ein Isolat pro Patient, das hinsichtlich der vorgegebenen Kriterien als klinisch signifikant einzustufen war, wurde analysiert. Alle 35 Isolate, die in dieser Untersuchung weiter analysiert werden, stammen aus Frankreich.

3.1.5 Nährmedien

Folgende Nährmedien wurden eingesetzt:

a) Mueller-Hinton-Bouillon und -Agar

Zusammensetzung

Stärke: 1,5 gIL

Gaseinhydrolysat: 17,5 g/ L

Rindfleisch : 2,0 g/ L

getrocknete Infusion aus 300g

Agar 17,0 g/ L

Blutagar setzt sich zusammen aus Mueller-Hinton-Agar und einem Zusatz von Schafserithrozyten.

b) Trypton-Soja-Bouillon

Zusammensetzung

Trypton: 17,OgIL

Sojamehlpepton: 3,0 g/ L

D-Glucose: 2,5 gIL

3.2. Methoden

3.2.1. Sterilisation

Alle verwendeten Hilfsmittel wie z. B. Pipettenspitzen, Eppendorfcups, Nährmedien und deionisiertes Wasser wurden bei 120° C und 1,2 bar Überdruck für eine Zeit von 20 min sterilisiert. Alle mit Mikroorganismen in Kontakt gekommenen Mediumreste, bewachsenen Agarplatten und gebrauchte Pipettenspitzen wurden

ebenfalls autoklaviert. Thermolabile Antibiotika wurden durch eine Membranfiltration sterilisiert.

3.2.2 Stammhaltug

Nach der Anzucht von einer ausreichenden Menge an Mikroorganismen wird eine Stammkultur beimpft (Mikrobank, Mast diagnostika).
Ein Mikrobankröhrchen enthält 25 Keramik-Perlen in Einfriermedium. Die Beimpfung eines Mikrobank-Röhrchens erfolgt mit einer Reinkultur mittels einer sterilen Öse bzw. mit einem Aliquot einer Flüssigkultur (entsprechend McFarland-Standard 3-4). Das Röhrchen wird fest verschlossen und der Inhalt durch vorsichtiges Schütteln vermischt (nicht vortexen). Die überschüssige Suspension wird sorgfältig mit einer Pipette entfernt, so dass die Kügelchen soweit wie möglich von der Flüssigkeit befreit sind. Die Lagerung der Mikrobank erfolgte bei –20°C. Zur Beimpfung wird eine Perle in flüssigen sowie auf festen Medien beimpft und die Medium 18-24 Std. aerob bei 36°C bebrütet.

3.2.3. Methoden zur Identifizierung von *S. aureus*

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

a) Katalase-Test

Für den Katalase-Test werden Bakterienkolonien in Wasserstoffperoxid verrieben. Bei Katalase-positiven Bakterien sollten Gasblasen aufsteigen, da Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff reduziert wird. ($2\ H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$)

b) Nuclease-Test (DNase)

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

c) 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.

3.2.4. Resistenztestungen

a) 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 wird in einer 96-Well-Mikrotiterplatte in Nährmedium eine Antibiotika-Verdünnungsreihe in Zweierpotenzstufen hergestellt, wobei sich in jedem Well 0,1 mL Lösung befinden. Jedes Well wid mit 0,1 mL einer frischen Übernachtkultur beimpft; dabei ist diese Endverdünnung der Antibiotikalösung beim Ansetzten der Verdünnungsreihe zu berücksichtigen. Zur Verwendung im Test wird die Übernachtkultur wie folgt verdünnt: Die Suspension wird auf eine optische Dichte von 0,1 eingestellt. Von dieser Konzentration ausgehend wird die Kultur nochmals mit Nährmedium 1:300 verdünnt. So erreicht man eine für den Test ausreichend geringe Zelldichte. Nach 12-24-stündiger Inkubation bei 37°C wird die MHK optisch als die niedrigste Antibiotikakonzentration bestimmt, bei der kein Wachstum mehr

sichtbar ist. Als Wachstumskontrolle wird eine Reihe der Mikrotiterplatte ohne Antibiotikalösung beimpft.

Arbeitsschema:

- Eine Übernachtflüssigkultur des zu testenden Bakterienstammes, wie unter der Keimzahlbestimmung beschrieben, des Stammes vorbereiten und bei 36°C für 18-24 Std. inkubieren.
    - Die Antibiotikumslösung in 4-fach konzentrierter Form ansetzen, da die Verdünnung innerhalb der Mikrotiterpiatte mit berücksichtigt werden muss.
    - 10 µL der Vorkultur des Testkeimes in 5 mL Mueller-Hinton-Bouilion geben.
    - Jede Vertiefung der Mikrotiterpiatten mit je 100 µL Mueller-Hinton-Bouillon befüllen.
    - 100 µL der Antibiotikumslösung in die Löcher der erste Reihe der Mikrotiterpiatte pipettieren.
    - Mischen der Lösungen durch mehrmaliges rauf- und runterziehen mit einer Multichannelpipette.
    - 100 µL des Antibiotikums-Mueller-Hinton-Gemisches von der ersten Reihe in die Zweite geben (1:2 Verdünnung).
    - Eine Wiederholung dieses Vorgangs fand so lange statt, bis die niedrigste zu testende Antibiotikakonzentration ereicht werde. Die letzten beiden Arbeitsschritte bis zur vorletzten Reihe wiederholen (Letzte Reihe dient als Wachstumskontrolle).
    - Jeweils 100 µL Mueller-Hinton-Bakteriengemisch entnehmen und in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettieren.
    - Mikrotiterplatten bei 36 °C für 18-24 Std. bebrüten.

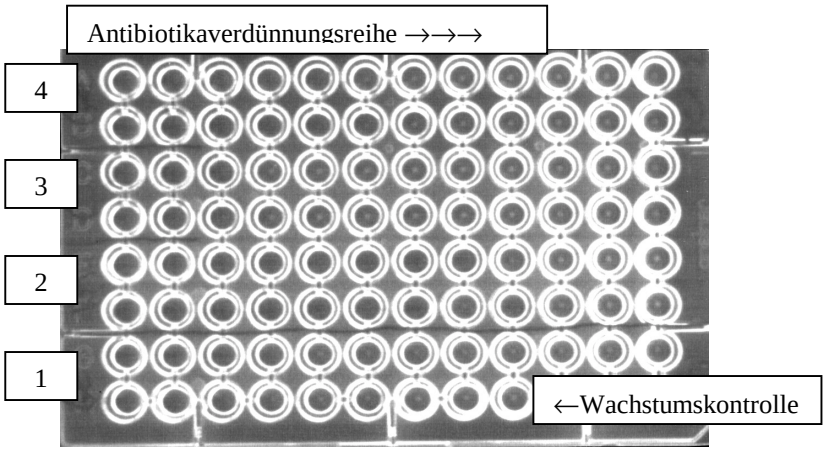


Abbildung 7: .Mikrotiterplatte, mit einer Verdünnungsreihe für Erythromycin von 32 mg/L –0,25 mg/L. Die Reihe rechts ist die Wachstumskontrolle. Hier ergeben sich folgende MHK-Werte: Stamm 1: 8 mg/L; Stamm 2:1 mg/L; Stamm 3: >32mg/L; Stamm 4: 8mg/L

Auswertung:

Die Auswertung erfolgte visuell. Die MHK entspricht derjenigen Konzentration bei der kein Wachstum mehr festzustellen war.

b) Agardiffusionstest

Die Bakterieneinsaat: Zur Herstellung der Keimsuspension werden 3-5 Kolonien in 10 ml 0,9%iger Kochsalz Lößung eingerieben und suspendiert (Vortex). Von dieser Keimsuspension werden 2-3 ml auf die Platte dekantiert und der Überstand wird abgesaugt. Platte zum Trocken für 15-20 min bei Raumtemperatur stehen lassen. Nach dem Trocknen die Testblättchen auflegen und noch 30 min. bei Raumtemperatur stehen lassen (Prädiffusion des Antibiotikum). Die Ablesung erfolgt nach 18-24 Std.-ige Bebrütung bei 36° C. Die sichtbare Hemmhöfe stellen das Maß für die Empfindlichkeit dar. Die Messung des Hemmhofdurchmessers erfolgt in mm.

Auswertung:

Antibiotikum	Hemmhof (mm)	Bewertung
Clindamycin 10 µg	>24	S*
	<18	R**
Erythromycin 15 µg	>21	S
	<16	R

* = sensibel
**= resistent

3.2.5. Keimzahlbestimmung

Um die spontane Mutationsrate zu berechnen, wurde eine Keimzahlbestimmung durchgeführt.

Arbeitsschema:

- 3 mL Mueller-Hinton-Bouillon in eine Reagenzglas geben und eine Mirkobankkugel zufügen bei 36 °C 18-24 Std inkubieren um eine Bakteriensupension zu erzeugen.
- Von der Bakteriensuspension in Zehnerschritten eine Verdünnungsreihe herstellen.
- 100 µL der 10^6 bis 10^{10} Verdünnungen auf die Blutagarplatte bringen und mittels Drigalski-Spatel verteilen.
- Inkubation bei 36°C für 18-24 Std.

Auswertung:

Die Berechnung der Keimzahl/ml erfolgte mit folgender Formel:

Keimzahl pro mL = ausgezählte Kolonien x Verdünnungstufe x 10

3.2.6. Zellyse

Zelllysen sind notwendig, um die in den Bakterien enthaltene DNA freizusetzen. Ein wichtiges Hilfsmittel dabei sind Enzyme wie z.B. Lysostaphin, die in der Lage sind, Zellwände zu zerstören.

Arbeitssschema:

- Den Testorganismus in ein mit 2 mL mit destiliertes Wasser gefüllten Ependorf-Cup suspendieren.
- Das Eppendorf-Cup für 10 min bei 13000 Umdrehungen zentrifugieren.
- Den Uberstand absaugen.
- 100 µL des Lysepuffer auf das Pellet geben.
- 2 µL Lysostaphin dazu pipettieren
- Das Peilet resuspendieren und bei 36 °C im Thermomixer 60 min inkubieren.

Die Lysate werden eingefroren und wiederholt genutzt werden.

3.2.7. Agarosegelelektrophorese

Diese Methode wurde angewandt um:

- amplifizierte DNA-Fragmente aufzutrennen und sichtbar zu machen, um so nachzuweisen, ob eine PCR erfolgreich war
- die Große des PCR-Produkt für die Sequenzierungsreaktion festzustellen

Das Prinzip der Gelelektrophorese bestand darin, dass durch das Anlegen einer elektrische Spannung (Gleichstrom) auf einem Gel aufgetragene geladene Teilchen in einer Pufferlösung entsprechend ihrer Ladung und Größe wanderten und somit eine Trennung der Teilchen eintrat. Je weiter sie auf dem Gel wandern, desto kürzer bzw. leichter sind die Fragmente. Die Dauer der Auftrennung richtete sich nach der Konzentration des Gels, der Fragmentgröße und der Höhe der angelegten Spannung. Für die PCR-Nachweis werde 10 µL Ethidiumbromidlösung zur Agarose gegeben. Das Ethidiumbromid lagert sich zwischen den Basenpaaren der DNA-Fragmente ein, so dass diese später unter UV-Licht sichtbar gemacht werden können.

Arbeitschema:

- 1 g bzw 2 g der Agarose in einem Erlmeyerkolben einwiegen und mit 100 mL 1 x TBE-Puffer versetzen.
- Die Agarose kurz in der Mikrowelle aufkochen, bis sie vollkommen gelöst ist, anschließend 10 µL Ethidiumbromid zugeben und kurz umschwenken.
- Den Gelschlitten in die Gießvorrichtung einspannen und mit zwei 20-SIot-Kämmern versehen.
- Das Gel gießen (es ist darauf zu achten, dass sich keine Blasen bilden) und erkalten lassen.
- Den Gelschlitten entnehmen in die Elektrophoresekammer setzen und TBE- Puffer zufügen (das Gel muss vollkommen bedeckt sein).
- Das PCR-Produkte (8 µL) oder die aufgereinigte DNA (4 µL) mit jeweils 4 µL Bluemarker in einem Eppendorfcup mischen.

- Das Eppendorfcup eine Minute bei 13000 Umdrehungen zentrifugieren.
- Die Proben in die Gelslots füllen und eine Spannung von 80 V anlegen.

Der Bluemarker besteht aus:

- Bromphenolblau, das im elektrischen Feld mitwandert und so den Fortschritt der Elektrophorese anzeigt und
- Glycerin, welches dafür sorgt, das die Proben in den Solts verbleiben.

Ein Molekulargewichtsstandard muss bei jeder Elektrophorese mitlaufen, um die Menge und Fragmentgröße abschätzen zu können.

3.2.8.Molekularbiologische Methoden

3.2.8.1. PCR und Sequenzier Reagentien

Die folgenden Reagentien wurden verwendet:
Expand High Fidelity-PCR System (Boehringer-Mannheimer)
PCR Nukleotid-Mix (Boehringer-Mannheimer)
PCR-Purification-Kit (Qiagen)
Terminator Ready Rxn-Mix (Sequenziermix) (Perkin-Elmer)

3.2.8.2. Polymerase-Kettenreaktion

Mit der PCR könen Gene oder Genabschnitte amplifiziert werden. Das Prinzip entspricht dabei der in-vivo-DNA-Replikation: An einem vorhandenen DNA-Strang wird mit Hilfe einer DNA- Polymerase ein neuer Strang synthetisiert. Die verwendete DNA-Taq-Polymerase stammt aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* und ist so thermostabil, dass sich ein erneutes Zugeben nach jedem Denaturierungsschritt erübrigte. Die Polymerase braucht dazu kurze Nukleotidsequenzen, die Teilen der Matrize entsprechen, als Startermoleküle. Diese nennt man Primer. Für einen PCR-Ansatz braucht man zwei Primer. Die Primer binden an den zu

amplifizierenden DNA-Strang und schaffen somit der Polymerase einen Zugang. Weiterhin befindet sich im Reaktionsgemisch ein Nucleotid-Mix aus Adenintriphosphat, Thymintriphosphat, Cytosintriphosphat und Guanintriphosphat ohne die eine Synthese des komplementären Stranges nicht möglich wäre. Der PCR-Ansatz beinhaltet außerdem noch ein geeignetes Puffersystem, in dem die Magnesiumchloridkonzentration eine wichtige Rolle für den Erfolg spielt.

Die PCR- Reaktion läuft in drei ineinanderübergehenden Schritten ab:

1) Denaturierung der DNA

Bei der Danturierung erfolgt eien Trennung der DNA-Doppelhelix in ihre Einzelnstrenge

2) Amplifizierungszyklus

Der Ampilifizierungszyklus ist ebenfalls in drei Schritte unterteilt. Der erste Schritt des Zyklus besteht wieder aus einer Denaturierungsphase von etwa 20 sec Länge. Im zweiten Schritt, dem Annealing, hybridisieren die Primer an die Matrizenstränge. Das Annealing läuft bei 50°C-60°C ab und dauert zwischen 20 und 60 sec. Bei der Polymerisation, dem dritten Schritt, synthetisiert die Polymerase bei 72°C die neuen DNA-Stränge. Dies dauert etwa eine Minute.

3) Polymerisation

Hier werden alle eventuell noch unvollständig synthetisierten Stränge vollendet. Es läuft bei 72°C ab und dauert 5-10 Min.

Die Anzahl der Wiederholungen des Amplifizierungszyklus beträgt 30-35.

Arbeitsschema:

	Aqua bidest.	33,8 µL
	$MgCl_2$ stock solution: ($25mM\ MgCl_2$)	4 µL
PCR-Protokol	Puffer	5 µL
(für einen Ansatz)	dNTP**	2 µL
	Primer 1	2 µL
	Primer 2	2 µL
	DNA-Taq-Polymerase*	0,6 µL
	Bakterienlysat	0,6 µL

*(0,6 µL Taq-Polymerase entsprechen 2,1 Units).

** PCR Nukleotide Mix

Nach dem Befüllen der Reaktionscups konnten die einzelnen Ansätze mit 1 bis 2 Tropfen Öl überschichtet werden. Eine Negativekontrolle (PCR-Ansatz ohne Bakterienlysat) sollte stets mitgeführt werden, um eventuelle Verunreinigungen auszuschließen.

Die verwendeten Expand-High-Fidelity PCR-Systems stammten von Boehringer-Mannheimer.

Die Reaktion läuft in einem Thermocycier ab. Die Dauer einer PCR liegt zwischen 2 und 3 Stunden, da sie von der Zyklenzahl abhängig ist. Das Amplifikat wurde mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht. Hierdurch war bei bekanter geforderter Länge des DNA-Produktes ein Vergleich mit der entsprechenden Banden des Molekülgewichtsmarkers zur Erfolgskontrolle der PCR möglich.

Auswertung:

Aus dem PCR-Ansatz wurden je 8 µL abpipettiert, auf ein 1% Gel aufgetragen und anschließend photographiert.

PCR-Program: s. Tabelle 2

	Denaturierung		Amplifikations Zyclus						Polymerisation		Zyklenzahl
	T°C	Zeit (min)	Denaturierung		Annealing		Polymerisa-tion		T°C	Zeit (min)	
			T°C	Zeit (min)	T°C	Zeit (min)	T°C	Zeit (min)			
***erm*(A)**	**93**	**3**	**93**	**1**	**52**	**1**	**72**	**1**	**72**		**35**
***erm*(B)**	**93**	**3**	**93**	**1**	**52**	**1**	**72**	**1**	**72**		**35**
***erm*(C)**	**93**	**3**	**93**	**1**	**52**	**1**	**72**	**1**	**72**		**35**
***ere*(A)**	**93**	**3**	**93**	**1**	**52**	**1**	**72**	**1**	**72**		**35**
***ere(*B)**	**93**	**3**	**93**	**1**	**52**	**1**	**72**	**1**	**72**		**35**
***msr*(A)/(B)**	**93**	**3**	**93**	**1**	**52**	**1**	**72**	**1**	**72**		**35**
***erm*(A) Regulator)**	**94**	**3**	**96**	**1**	**60**	**2**	**72**	**3**	**72**	**5**	**30**
***erm*(C) Regulator**	**95**	**5**	**95**	**1**	**50**	**1**	**70**	**1**	**70**	**5**	**25**

Tabelle 2: PCR-Program

3.1.8.3. Primer

Die eingesetzte Primer-Paare für *erm*(A), *erm*(B), *erm*(B)), *msr*(A/B), *ere*(A) und *ere*(B) entsprechen den von Sutcliffe et al (1996) publizierten Primern. Sutcliffe et al wählten für *msr*(A)/*msr*(B), ein Primerpaar aus, welches spezifisch sowohl für die zweite ATP-Bindungskasettenregon vor *msr*(B).

Primersequenzen der *erm*(A) PCR

forward: 5`- TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA -3`

reverse: 5`- CTTCGATAGTTTATTAATATTA -3`

Primersequenzen der *erm*(B)-PCR

forward: 5`- GAAAAGGTACTCAACCAAATAC -3`

reverse: 5`- AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC -3`

Primersequenzen der *erm*(C)-PCR:

forward: 5`- TCAAAACATAATATAGATAAA -3`

reverse: 5`- GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT -3`

Primersequenzen der *ere*(A)-PCR:

forward: 5`- AACACCCTGAACCCAAGGGACG -3`

reverse: 5`- CTTCACATCCGGATTCGCTCGA -3`

Primersequenzen der *ere*(B)-PCR

forward: 5`- AGAAATGGAGGTTCATACTTACCA -3`

reverse: 5`- CATATAATCATCACCAATGGCA -3`

Primersequenzen der *msr*(A)/*msr*(B)-PCR:

forward: 5`- GCAAATGGTGTAGGTAAGACAACT -3`

reverse: 5`- ATCATGTGATGTAAACAAAAT -3`

Primersequenzen der *erm*(A)-Regulatorgen-PCR:

forward: 5`- CGTTGGGGATAAAACTTCCC -3`

reverse: 5`- CTAGCTCTTTGGTAAAATGTCC -3`

Primersequenzen der *erm*(C)-Regulatorgen-PCR:

forward: 5`- TATCAGAGCTCGTGC -3`

reverse: 5`- GGCCTTTTCCTGAGCCG -3`

2.2.8.4. Aufreinigung des PCR-Produktes

Eine Aufreinigung ist nötigt, um das gewonnene Produkt von den in der PCR hinzugefügten Substanzen wie Primer, Nukleotide, Salze, Taq-Polymerase und Öl zu befreien. Das Amplifikat wurde mit dem PCR-Purifications-Kit der Firma Qiagen gereinigt.

- PCR-Ansatz in 300 pL PB-Puffer aufnehmen und auf die Aufreinigungssäule pipettieren. Es wurden jeweilis zwei PCR-Ansätze des gleichen Stammes in eine Säule gegeben. Es folgt eine Entfernung des Öles unterhalb.
- Das Sammelgefäß mit der Säule zwei min bei 13000 Umdrehungen zentrifugieren (Die DNA bindet an die Säule, Verunreinigungen werden eluiert).
- Das Eluat verwerfen.
- 700 µL PE-Puffer (Waschpuffer) in die Säule pipettieren.
- Nochmalige zweiminütige Zentrifugation bei 13000 Umdrehungen.
- Das Sammelgefäß durch Eppendorfcup ersetzen.
- 50µL des Eluationspuffer (10mM Tris-Cl) in die Säule pipettieren und 5 min einwirken lassen.
- Das Eppendorf-Cup mit der Säule zentrifugieren für 2 min bei 13000 Umdrehungen (DNA wird von der Säule eluiert).
- Die Säule verwerfen.
- Die aufgereinigte DNA kann eingefroren und somit für längere Zeit aufbewahrt werden.
- Mittels Agargelelektrophorese wurde die Konzentration des aufgereinigten PCR-Produktes bestimmt. Ein Mitauftragen von jeweils 5µL dreier Molekulargewichtsmarker, die sich in ihrer Konzentration und somit auch in ihrem DNA-Gehalt voneinander unterscheiden, gewährleistete nach dem Ablauf der Elektrophorese einen Vergleich der entstandenen Banden. Dieser Vergleich zeigte anhand des Helligkeitsvergleiches mit der 1,6 Kb-Bande, in welcher Konzentration das PCR-Produkt vorlag. Diese Bande weis bei dem am stärksten konzentrierten Marker einen Gehalt von 50 ng, bei

einem mittelstark konzentrierten Marker einen Gehalt von 25 ng und bei einem schwach konzentrierten Marker einen Gehalt von 15 ng auf. (Gelbild im Abbildung 8)

3.2.8.5. Sequenzierung

Nach der Aufreinigung folgt die Sequenzierung des PCR-Produktes. Hierbei wird durch eine weitere PCR ein DNA-Strang amplifiziert. Die Methode ist 1990 von der Fa. Applied Biosystems Inc. (ABI PRISM) eingeführt worden. Das Verfahren ermöglichte durch die Anwendung der thermostabilen Taq-Polymerase eine automatische DNA-Sequenzierung in einem Thermocycler. Der Thermocycler steuert automatisch den Wechsel zwischen den einzelne Themperaturen und den Haltezeiten.

Arbeitschema:

Der Sequenzierungsansatz enthält:

- Die entsprechende Menge des Aufreinigungsproduktes (je nach der Konzentration des PCR-Produkt, 6µl, 12µl oder 15µl)
- 1 µL des Forward Primers
- 3 µL bzw. 4 µL Sequnzier-Mix
- sowie 3 µL bzw. 5 µL Wasser (Dies ist abhängig von der eingesetzten Menge des Aufreinigungsproduktes).
- Der Sequnzier-Mix enthält das nötige Puffersystem aus Tris Puffer, Magnesiumchloridlösung, Taq-Polymerase und farbig markierten dNTP`s.

	Denaturierung	96 °C 5 min
Sequenzierungs Programm	Denaturierung	96 °C 30 sec
	Annealing	50°C 15 sec
	Polymerisation	60 °C 4 min

Die Reaktion läuft über 25 Zyklen.

Nach der Fällung folgt die eigentliche Sequenzierung, mit dem DNA-Sequenzer 377 von ABI Prism. Dazu werden die Proben resuspendiert, denaturiert und in eine Gelelektrophorese aufgetrennt. Da die einzelnen dNTP`s mit verschiedenen Rhodaminmarkern gegengezeichnet sind, kann die Sequenz ermittelt werden.

3.2.8.6. Fällung der DNA

Nach der PCR zur Sequenzierung folgt eine Fällung der DNA, die eine Aufbereitung der Proben für die Sequenzierung im Sequenzer beinhaltet.

Arbeitsschema:

- 250 µL 96 % Ethanol und 10 µL Natriumacetatlösung in ein Eppendorfcup pipettieren.
- Der Sequenzierungsansatz mit 80 µL bzw. 85 µl dest. Wasser, in das Eppendorfcup pipettieren und kurz mischen.
- Das Gemisch 30 min bei 13000 Umdrehungen zentrifugieren.
- Den Überstand dekantieren.
- 300 µL 70% Ethanol in das Eppendorfcup pipettieren (Umkristallisierungsschritt zur Reinigung der DNA).
- Nochmalige Zentrifugation bei 13000 Umdrehungen für 15min.
- Den Überstand dekantieren.
- Das Eppendorfcup offen stehen lassen, so dass das Pellet trocknet.

Die Fällungen können für längere Zeit eingefroren werden

3.2.9. Methoden zur Induktion der Lincosamid- und Ketolidresistenz durch die Veränderungen in der *erm*(A)- und *erm*(C)-Regulatorregion

3.2.9.1. Resistenentwicklung durch Clindamycin und Telithromycin im flüssigen Medium

Dieser Versuch, auch allgemein als 7-Tageversuch bezeichnet, dient dazu Mutanten in einem Antibiotikumshaltigen Medium zu selektieren. Die Selektion erfolgte in TSB-Bouillon. Das eingesetzten *Staphylococcus aureus*-Isolate waren vor der Behandlung Clindamycin und Telithromycin sensibel.

Arbeitsschema:

- Eine Vorkultur des sensitiven *Stapyhlococcus aureus* – Isolat mit TSB- Bouillon ansetzen und bei 36 °C für 18-24 Std. inkubieren.
- Antibiotikalösung (1 mg/ ml) herstellen und sterilfiltrieren
- In sieben Reagenzgläser mit 9,9 mL antibiotikahaltige TSB-Bouillon werden jeweilis 100 µL der Testkeimlösung pipettiert.
- Die Antibiotikakonzentrationen werde wie folgt gewählt. Das Reagenzglas in der Mitte enthält die ermittelte MHK-Konzentration (in µL) des Stammes (Diese Konzentration gilt als Nullwert für den ersten Tag).
- In die links vom Nullwert stehenden Reagenzgläser wird die Antibiotikakonzentration um die Hälfte erniedrigt und in den rechts stehenden verdoppelt.
- Nach 18-24 Stundige Inkubation bei 36 °C wird das letztes Reagenzglas, welches ein gutes Wachstum zeigt, herausgenommen und die restlichen verworfen (Die in dem Röhrchen vorliegende Antibiotikakonzentration dient jetzt als Nullwert).
- 7 weitere Reagenzgläser bereitstellen und mit den entsprechenden Antibiotikakonzentrationen, ausgehend vom neuen Nullwert, befüllen.

- Aus dem gut bewachsenen Röhrchen 100 µL Bakterien-Suspension entnehmen und in die bereitgestellten Reagenzgläser pipettieren.
- Diese Schritte so lange wiederholen, bis der Stamm eine Resistenz ausgebildet hat.
- Aus dem bewachsenen Ansatz mit einem sterilen Watte-stäbchen eine Blutagarplatte beimpfen, Platte übernacht bei 36°C bebrüten um die resistente Keime zu isolieren.

Auswertung:
Die MHK der Mutanten wurden bestimmt, Zellysate gemacht und die *erm*(A)- bzw. *erm*(C)-Regulatorregion amplifiziert und sequenziert.

3.2.9.2 Resistenzentwicklung durch Induktion mit Clindamycin und Telithromycin auf einem festen Medium

In diesem Versuch wird die spontane Mutationsrate bestimmt. Die spontane Mutationsrate wird bestimmt, indem eine Bakteriensuspension auf antibiotikumhaltigen Platten ausgestrichen wird, wobei die Antibiotikumkonzentration der Platten ein Vielfaches (2, 4, 8,16, 32) der MHK des getesteten Stammes ist. Durch hohen Antibiotikumkonzentration werden resistente Bakterien mit unterschiedliche Mutationen selektiert (im Gegenteil zum 7-Tageversuch). Um dies festzustellen werden mehrere Bakterienkolonien von einer Agarplatte isoliert und subkultiviert.

Arbeitsschema:

- Die Vorkultur des Testkeims ansetzen und bei 36 °C für 18-24 Std. inkubieren.
- Antibiotikumslösung (1 mg/ ml) herstellen.
- Pro Stamm und Konzentration werden 20 Antibiotikahaltige Mueller-Hinton-Agarplatten (Blutfrei) hergestellt und mit 100µl Bakteriensuspension beimpft:

- Der Nähragar enthält folgende Antibiotikakonzentrationen: die 2-fache, 4-fache, 8-fache, 16-fache und 32-fache MHK des betreffenden Stammes.
- Die Platten bei 36 °C für zwei Tage bebrüten..

4. Ergebnisse

4.1 (Teil 1) Epidemiologische Verteilung der Makrolid-Resistenzgene bei *Staphylococcus aureus*

Die Bakterien-Isolaten stammen aus 15 unterschiedlichen deutschen Universitätskliniken, die im Rahmen des M.A.R.S.-Programms eingesandt worden sind. Die vorliegende Studie umfasst klinische Isolate ab September 1996 bis Januar 1999. Das M.A.R.S - Programm ist eine Surveillance Studie zum Monitorring gram-positiver Krankheitserreger sowie der sich entwickelnden Resistenzen gegenüber verschiedenen Antibiotika. Nur jeweils ein Blutkultur-Isolat pro Patient, mit Sepsis Zeichen, wurde analysiert. Um Aussagen zu Prävalenz verschiedener Makrolid-Resistenzgene *erm*(A), *erm*(B), *erm*(C), *msr*(A/B), *ere*(A) und *ere*(B) bei Makrolid-resistenten *S. aureus*-Isolaten machen zu können, wurden klinische Isolate mittels PCR auf das Vorhandensein der entsprechenden Gene untersucht. Ingesamt wurden 134 Erythromycin-resistente *S. aureus*-Isolate untersucht. Davon waren 67 Oxacillín empfindlich (MSSA) und 67 Oxacillin resistent (MRSA).

Als Positiv-Kontrolle dienten folgende Referenzstämme:

erm(A): *Staphylococcus aureus* RN1389,
erm(B): *Streptococcus pyogenes* AC1/$_{p}$AC1
erm(C): *Staphylococcus aureus* RN4220/ pE194
msr(A): *Staphylococcus aureus* RN4220/ pAT10
ere(A): *Escherichia coli* pIP1100
ere(B): *Escherichia coli* pAT72

Die Referenzstämmen sind von J. Sutcliffe bzw. P. Courvalin zur Verfügung gestellt worden.

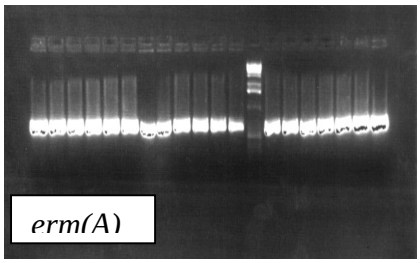
67 MRSA und 67 MSSA wurden auf das Vorhandensein der verschiedenen Resistenzgene mittels PCR untersucht, um das Auftreten der Resistenzgene in den einzelnen Isolatgruppen zu ermitteln. Die PCR-Bedingungen sind im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben. Die Amplifikate hatten folgende Längen:

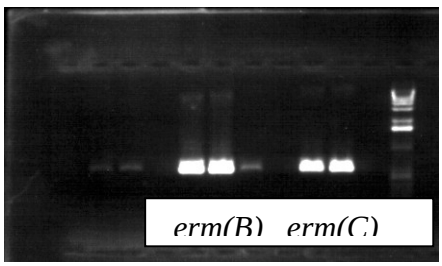
erm(A): 644 bp
erm(B): 638 bp
erm(C): 641 bp
ere(A): 425 bp
ere(B): 558 bp
msr(A/B): 394 bp

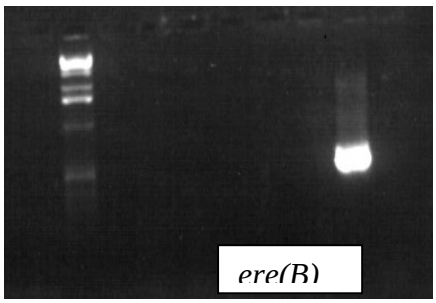
Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

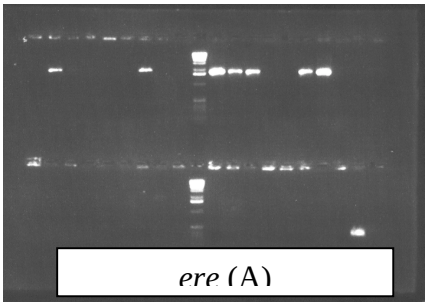
Mit 50,7% (68/134) war *erm*(C) das bei *S. aureus*-Isolaten am häufigsten nachzuweisende Makrolid-Resistenzgen, gefolgt von *erm*(A) (52/134; 38,8%), *ere*(B) (10/134; 7,5%), *ms*r(A)/msr(B) (4/134; 2,2%) und *ere(*A) (1/134; 0,7%). .

Mit 40,3% war das *erm*(A)-Gen häufiger bei MRSA-Isolaten als bei MSSA-Isolaten (20,9%) vertreten. Genau umgekehrt hierzu verteilt









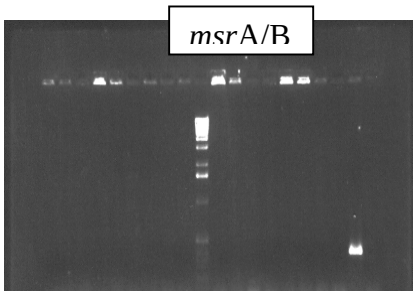


Abbildung 8. PCR-Produkte der MLS-Resistenzgene der *S aureus* Stämme für *erm(A)*, für *erm(B)*, für *erm(C)*, MRSA *ere(B)* und *msr(A/B)*. Die Produkte wiesen die erwarteten Längen auf. Die PCR wurde unter den beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 3: Prävalenz der Makrolid-Resistenzgene in Erythromycin resistenten *Staphylococcus aureus*

Einzelne Gene oder Genkombinationen	Ery-R MSSA (n_1=67)		Ery-R MRSA (n_2=67)	
	konstitutiv (8; 13%)	induzierbar (59; 87%)	konstitutiv (61; 91%)	induzierbar (6; 9%)
***erm*(A)**	2 (25%)	12 (21%)	24 (39%)	3 (50%)
***erm*(B)**	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
***erm*(C)**	3 (37%)	28 (48%)	23 (38%)	1 (17%)
***ere* (A)**	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
***ere*(B)**	1 (13%)	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)
***msr*(A/B)**	1 (13%)	1 (2%)	0 (0%)	1 (17%)
***erm*(A)+*ere*(B)**	0 (0%)	1 (2%)	1 (2%)	0 (0%)
***msr*(A/B)+*ere*(B)**	0 (0%)	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)
***erm*(C)+*ere*(B)**	0 (0%)	6 (10%)	0 (0%)	0 (0%)
***erm*(A)+ *erm*(C)**	0 (0%)	1 (2%)	4 (6%)	0 (0%)
***erm*(A)+ *erm*(B)**	0 (0%)	0 (0%)	1 (2%)	0 (0%)
***erm*(A,C)+*ere*(A)**	0 (0%)	0 (0%)	1 (2%)	0 (0%)
***erm*(A,B,C)**	0 (0%)	0 (0%)	1 (2%)	0 (0%)
kein Gen nachweisbar	1 (13%)	7 (12%)	6 (10%)	1 (17%)

es sich mit dem Gen *erm*(C), das mit 46,5% vornehmlich bei MSSA detektierbar war (35,8% bei MRSA). Innerhalb des *S. aureus*-

Kollektivs trat *erm*(A) vorrangig bei MRSA-MLS_B-konstitutiv resistenten (24 MRSA und 2 MSSA) Isolaten auf, während *erm*(C) bei MSSA mit induzierbarem MLS_B-Phänotyp am stärksten vertreten war (28 MSSA und 1 MRSA). In 96 von 134 *S. aureus*-Isolaten (71%) war ein einzelnes *erm*-Gen nachzuweisen, dagegen fand sich die Kombination von *erm*(A) und *erm*(C) und *erm*(A) und *erm*(B) lediglich in 4,3% der Isolate (6 von 134).

4.2 (Teil 2) 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 DNA verschiedentlich ausgebildet werden. 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 im Chromosom und waren resistent gegenüber 14-, 15- und 16-gliedrigen Makroliden und gegenüber Lincosamiden. Sie wiesen also eine konstitutiv exprimierte Resistenz auf.
Mit Hilfe PCR wurde die gesamte Regulatorregion inklusive 200 bp upstream sowie etwa 150 bp vom 5´-Ende des Gens amplifiziert. Die Regulatorregion eines induziert exprimierten Gens wurde als Kontrolle ebenfalls amplifiziert. Das Produkt dieser PCR war 593 bp lang.

Abbildung 9 zeigt schematisch die Regulatorregion eines induziert exprimierten *erm*(A)

intakte Regulatorregion von *erm(A)*

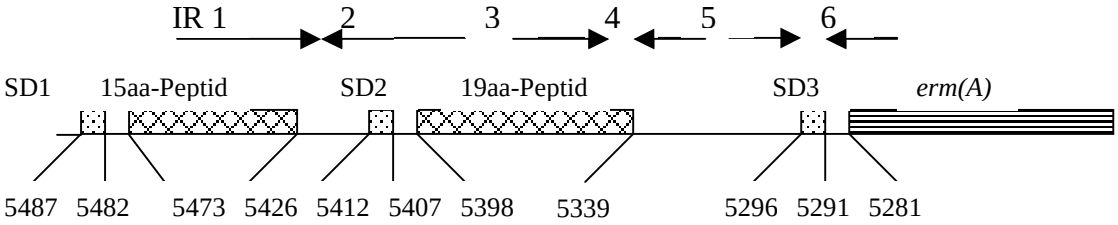


Abbildung 9: Regulatorregion von *erm(A)* mit induzierbarer Expression

In den Regulatorregionen der konstitutiv exprimierten Gene wurden bei den 64 untersuchten Isolaten fünf neue strukturelle Veränderungen gefunden.
Dies waren drei Deletionen mit 83, 121 und 123 bp Länge, sowie zwei eng verwandte, je 25 bp lange Tandem-Duplikationen.

Anzahl der S. aureus-Isolate	Genetische Veränderungen im Translationsattenuator
1	**25 bp Duplikation**
51	**25 bp Duplikation**
2	**83 bp Deletion**
9	**121 bp Deletion**
1	**123 bp Deletion**

Tabelle 4: Verteilung der genetischen Veränderungen im Translationsattenuator

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 10 dargestellt.

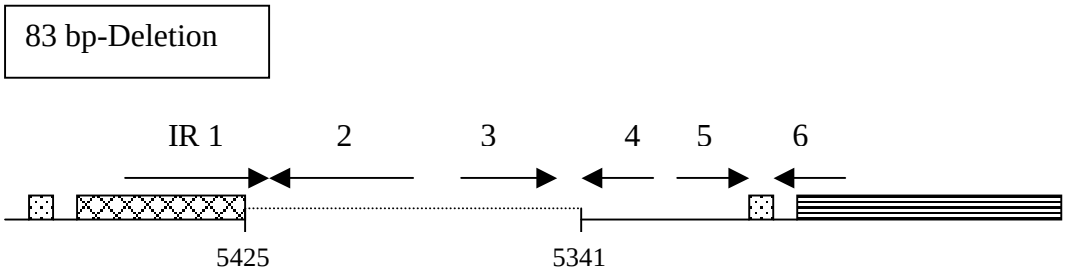


Abbildung 10: 83 bp große Deletion zwischen Position 5425 und 5341.

Die Deletion von 83 bp umfasst das l9aa Peptid und die IR 1 Region. Dadurch ergibt sich eine Paarung der IR 4 und IR 5 Regionen. Die IR 6 Region liegt somit frei, Ribosomen können angelagert werden. Die Expression des Gens erfolgt nun konstitutiv.

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 11 dargestellt.

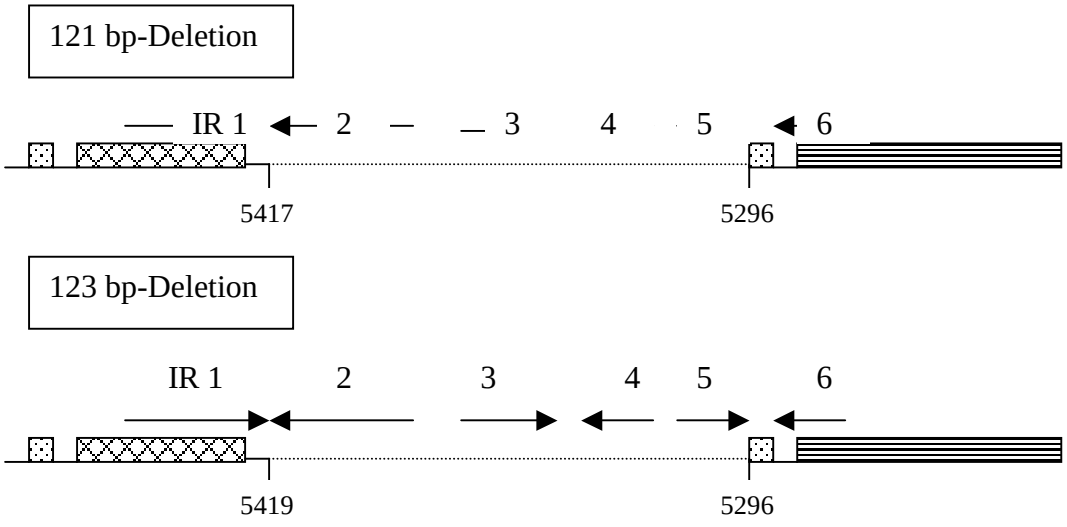


Abbildung 11: 121 bp große Deletion zwischen 5417 und 5296 und 123 bp große Deletion zwischen 5419 und 5296.

Die Deletionen von 121 bp und 123 bp liegen an der gleichen Position. Diese Deletionen beinhalten das l9aa Peptid genauso wie die Strang abwärts liegenden IR3, IR4 und IR5 Regionen. In diesem Fall ist die IR6 Region als einziges regulatorisches Element zurückgeblieben, ein konstitutives Ablesen des Gens ist somit gewährleistet.

Diese strukturellen Veränderungen innerhalb des Translations-attenuators führten zu einer Konformationsänderung der sekundären mRNA-Struktur, wodurch eine Ablesung des *erm*(A)-Gens möglich wird

Es wurden zwei verschiedenen 25 bp große Tandem-Duplikationen des IR6 gefunden. Sie unterscheiden sich nur durch den Ort der Insertion, der um 3 bp verschoben ist. 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 12.

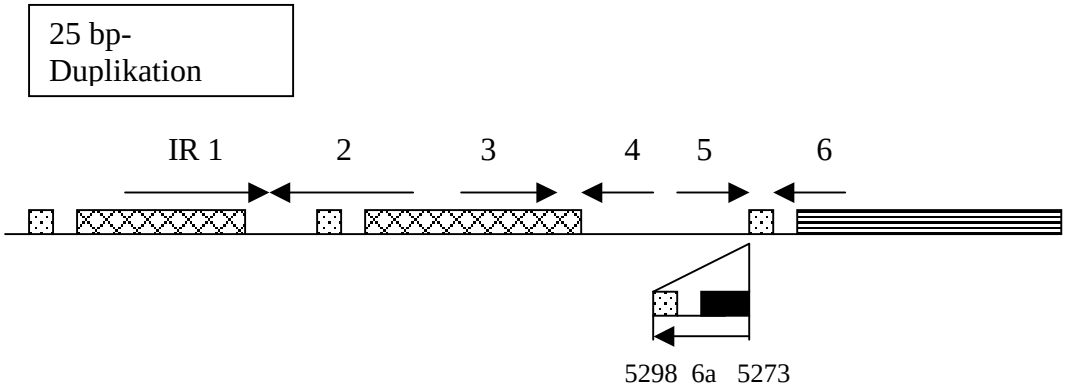


Abbildung 12: Insertion einer zusätzlichen IR6-Struktur zwischen 5298 und 5273.

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 von Veränderungen gefunden werden, die den schon in *erm(C)* bekannten ähnlich sind. Das allerdings eine Veränderung bei einem überwiegenden Teil der untersuchten Isolate auftrat, während alle anderen Veränderungen nur vereinzelt gefunden wurden, spricht wieder für die schnelle klonale Ausbreitung resistenter Stämme im Gegensatz zu einer Neumutation zu resistenten Stämmen hin.

Die Duplikation befindet sich im IR6, welches das *erm*(A)-Startkodon umfasst. Es gibt also durch die Duplikation zwei IR 6 Sequenzen, IR 6a und IR 6b. Bei einem Start mit dem ATG im IR 6a folgt bereits nach den ersten 3 Kodons ein Stopkodon . Es wird daher das Startkodon im IR 6b für die Translation benutzt. Die IR6b Sequenz ist immer zugänglich für die Ribosomen unabhängig davon, weiche mRNA Sekundärstruktur in dem Strang aufwärts liegenden Bereich ausgebildet wird.

4.3. (Teil 3) Charakterisierung von in-vitro erzeugten Ketolid-resistenten Mutanten-

Es sollte untersucht werden, ob induzierbar resistente *S. aureus*-Isolate in der Lage sind, unter suprainhibitorischen Konzentrationen von nicht-induzierender Substanzen eine Resistenz gegen diese Substanzen auszubilden. Besonders die neuen Ketolide waren in diesem Zusammenhang interessant. Wären Nicht-induzierer in der Lage, während der Therapie konstitv exprimierende Mutanten zu selektionieren, wäre das für die Therapie von einniger Bedeutung, da mit der konstitutiven Expression auch eine Resistenz gegenüber einnigen Nicht-Induzierern einhergehen würde. Die Translationsattenuatoren der erhaltenen Mutanten wurden in einem zweiten Schritt in einer PCR amplifiziert und ancushließend sequenziert, um die zugrundeliegenden strukturellen Veränderungen zu untersuchen.

4.3.1. *erm*(A)

Als Stamm wurde der genetisch definierte *Staphylococcus aureus* SA1 mit induziert exprimiertem *erm(A)* gewählt. Als Antibiotika wurden die Ketolide Telithromycin und ABT-773, das Lincosamid Clindamycin, die Streptogramine Dalfopristin und Quinupristin sowie das Kombinationspräparat Synercid ausgewählt. Die MHK-Werte dieser Antibiotika für den genetisch definierten Stamm SA1 wurden gemessen. Er trug eine chromosomal kodierte Kopie von induzierbar exprimiertem *erm(A)*-Gen. 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 Ursprungsstamm 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	$10^{-7} – 10^{-8}$

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.

Insgesamt wurden 146 Mutanten von SA1 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 Quinupristin-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 Kreuzresistenz gegenüber allen vier Antibiotika. Dies weist darauf hin,

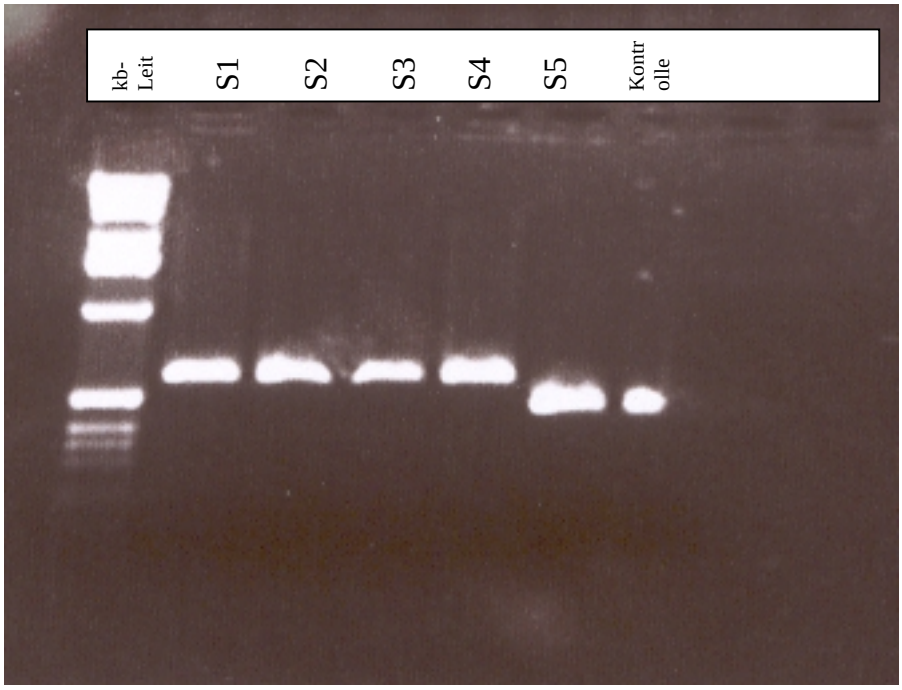
Strukturelle Veränderungen	Selektion mit			
	Clindamycin	Quinupristin	Telithromycin	ABT-773
Deletion 14bp	9	-	25	26
83bp	2	-	-	-
121bp	2	-	-	-
131bp	2	-	-	-
147bp	-	4	-	-
157bp	-	-	2	-
Duplikation 23bp		1	-	-
25bp	20	-	-	-
26bp	-	1	-	-
IS256 Insertion	23	4	22	-
Punktmutation in IR3	1	-	1	-
Punktmutation in IR5	-	-	1	-

Tab. 5: Strukturelle Veränderungen in der *erm*(A)-Regulator

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 13. zeigt die Unterschiedlichen PCR-Produkte.



Die 14 bp-Deletion beinhaltete 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.

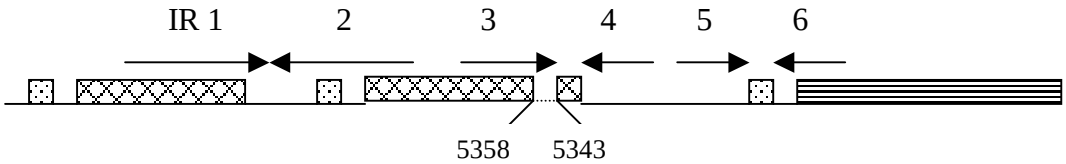
Die 83 bp-Deletion umfasste den gesamten ORF von 19 aa inklusive Ribosomenbindungsstelle SD2 und die IR2- und IR3-Sequenzen.

Bei Stämmen mit der 147 bp Deletion waren noch die Sequenzen IR4 – IR6 vorhanden, aber der gesamte upstream-Bereich mit den ORF für das 15aa- und das 19aa-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 19aa-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 15aa-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 der 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 14 zeigt schematisch die gefundenen Deletionen.

14 bp-Deletion



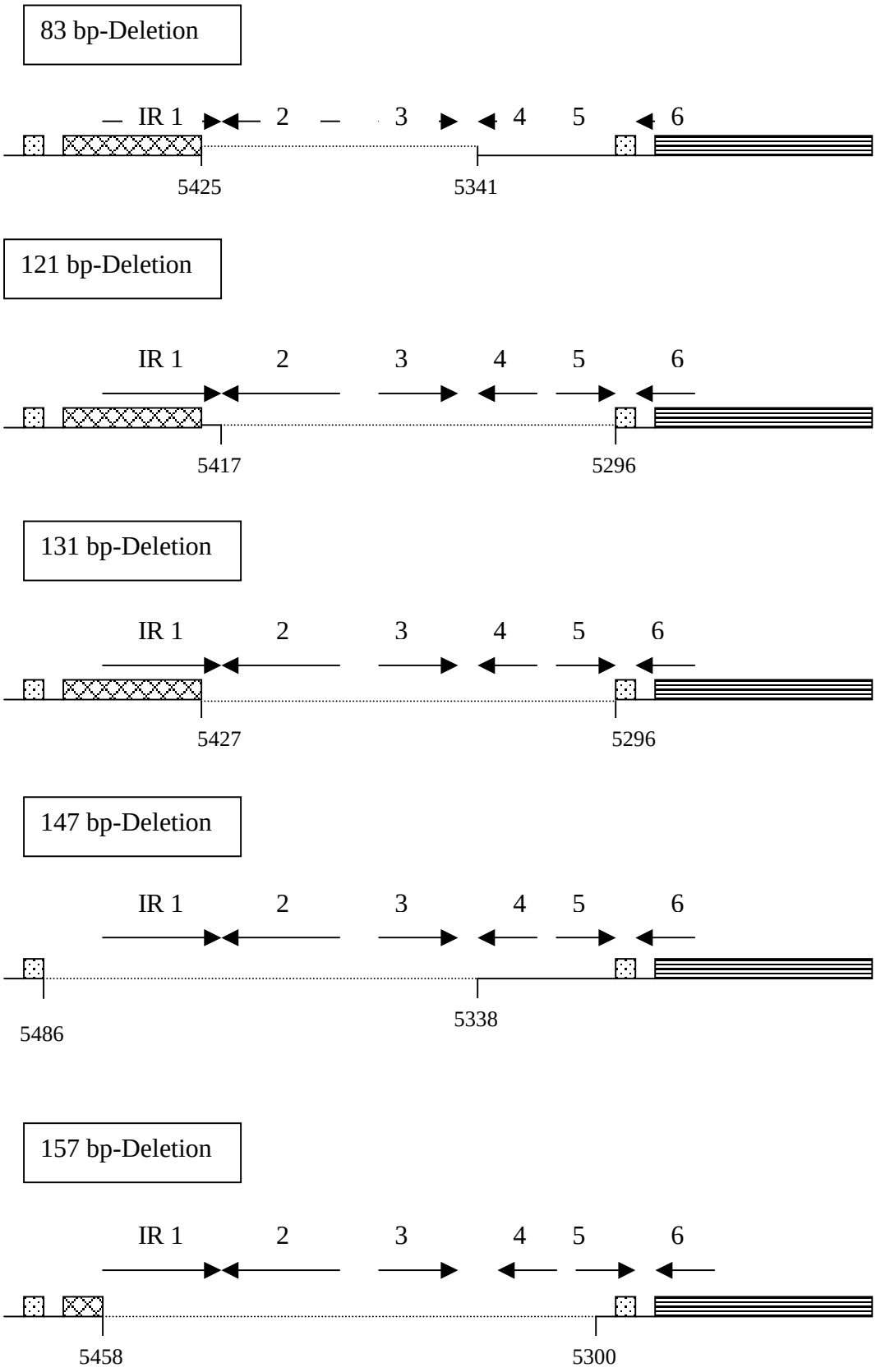
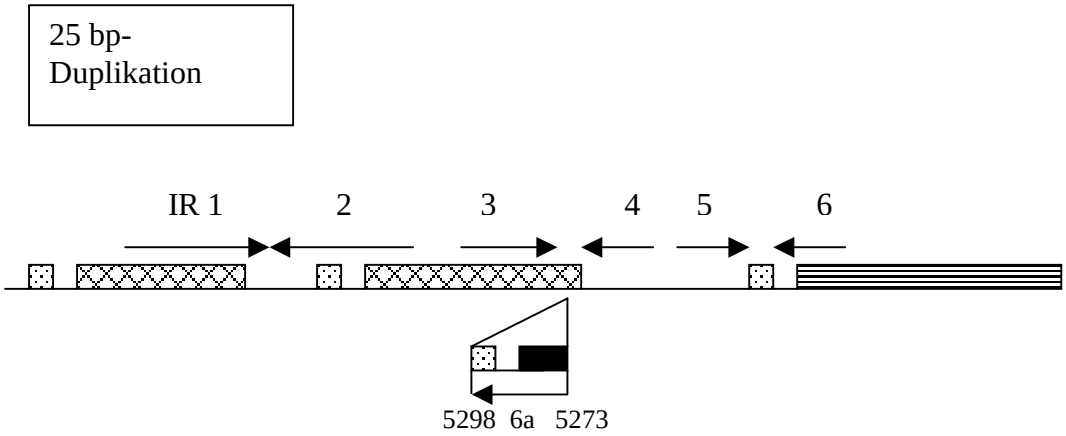


Abbildung 14: Sechs verschiedene Deletionen wurden im Translationsattenuator von *erm(A)* gefunden.

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-Duplikation, 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 – ΔIR5 und ΔIR6 - die Ausbildung einer stabilen IR5:IR6-Paarung. Abbildung 15 zeigt die gefundenen Duplikationen.



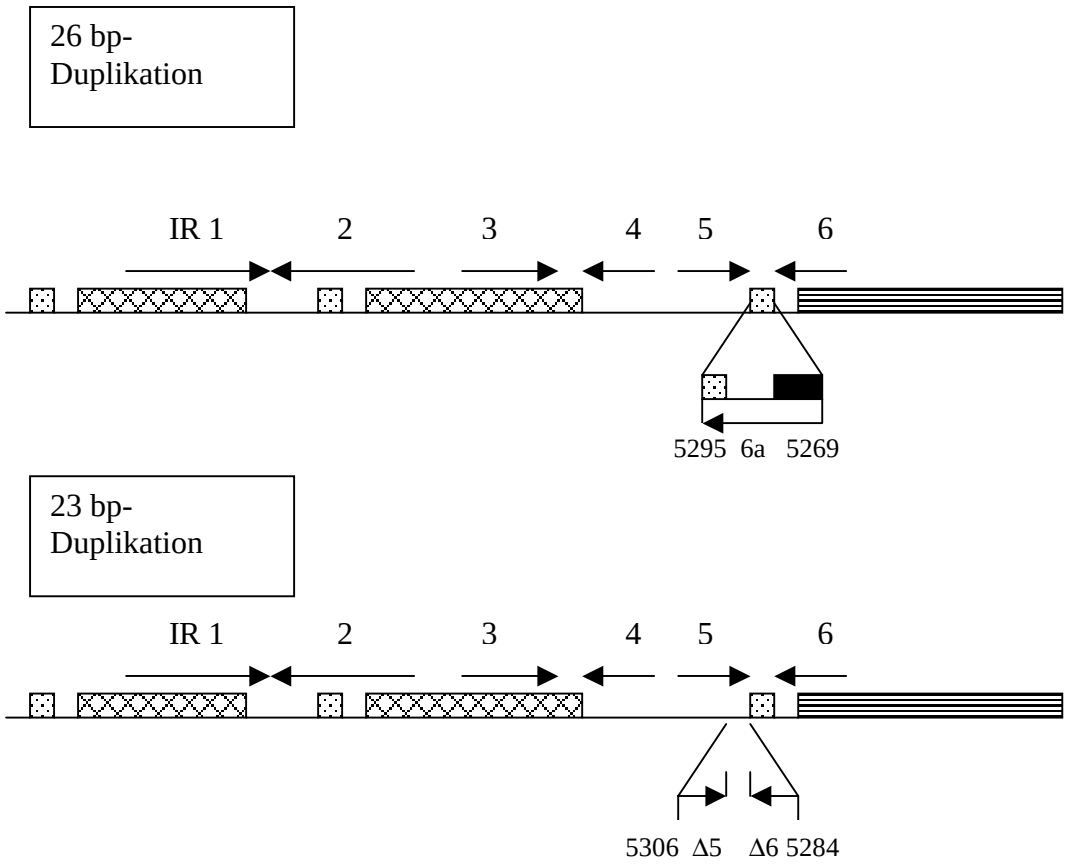


Abbildung 15: Hier sind die drei aufgetretenen Duplikationen dargestellt.

Zwei verschiedene Punktmutationen wurden in den Amplifikaten dreier Mutanten gefunden, deren Größe sich nicht von dem Amplifikat des Ausgangsstammes SA1 unterscheiden läßt. 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 16 dargestellt.

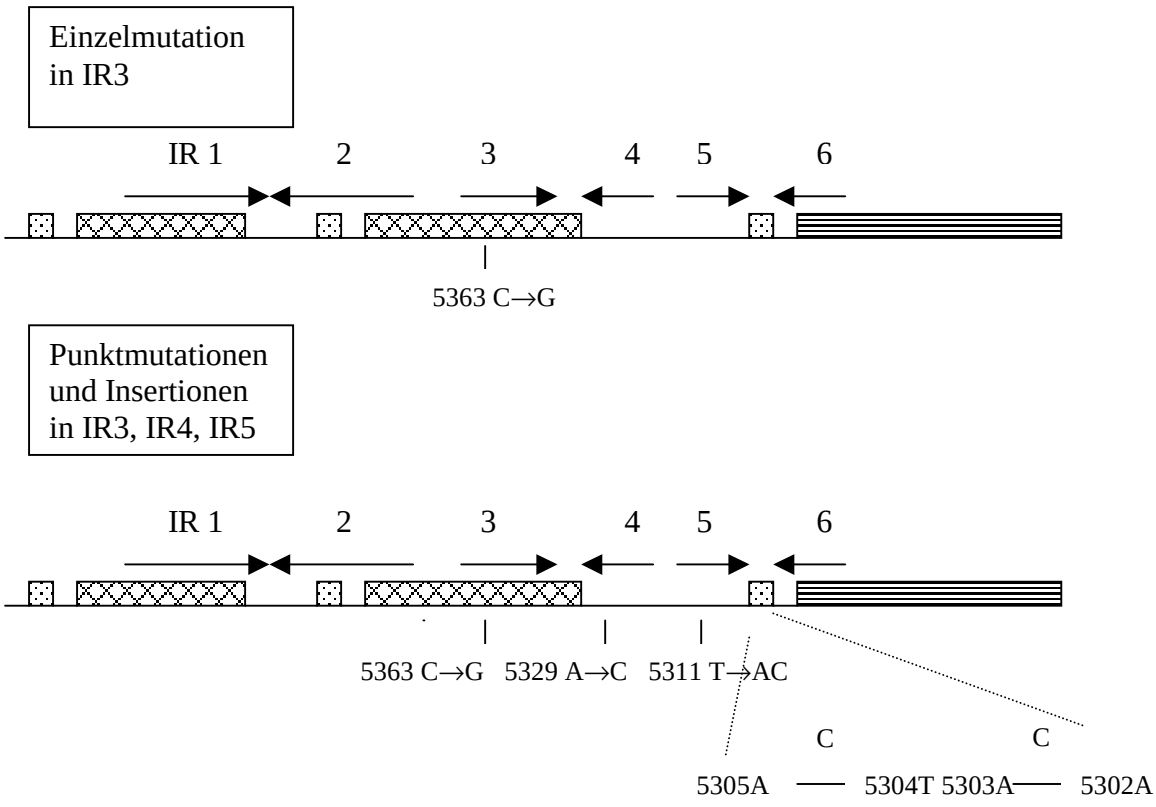


Abbildung 16: Es wurden zwei Typen von Punktmutationen gefunden.

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 17.

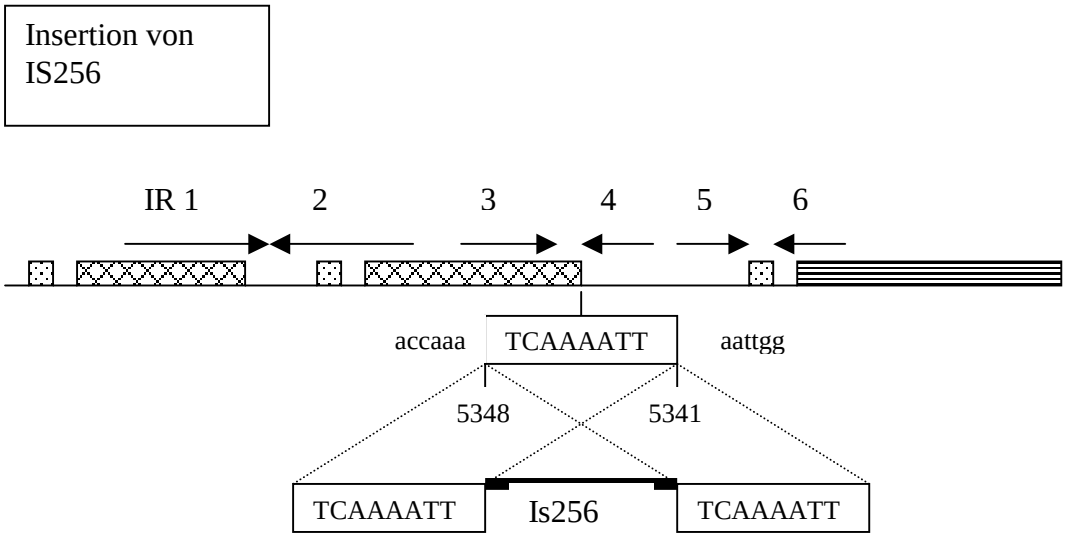


Abbildung 17: Insertion von IS256 in den Translationsattenuator von *erm(A)*

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen also, dass verschiedene 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.

4.3.2. *erm*(C)

Als Stamm wurde der genetisch deffinierte A214 aus SENTRY Studie mit induziert exprimiertem, Plasmid kodiertem *erm(C)* gewählt. Als Antibiotika wurden die Ketolide (Telithromycin und ABT-773), das Lincosamid (Clindamycin), die Streptogramine (Dalfopristin und Quinupristin) sowie das Kombinationspräparat Synercid ausgewählt. Die MHK-Werte dieser Antibiotika wurden gemessen. Der Stamm wurde anschließend auf Platten kultiviert, die entweder 1 mg/L Quinupristin, 0,5 mg/L Telithromycin oder 0,25 mg/L ABT-773

enthielten. Diese Konzentrationen entsprachen der vierfachen MHK des Stammes A214. Die Mutationsrate wurde bestimmt. Diese Selektion wurde zweimal wiederholt.

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

Die Ausgangs-MHK-Werte des Stamme A214 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

Insgesamt wurden 78 Mutanten von A214 zur weiteren Untersuchung ausgewählt. Darunter waren 22 Mutanten aus der Quinupristin-Selektion, 25 aus der Telithromycin-Selektion und 31 aus der ABT-Selektion. Alle diese Mutanten hatten ungewöhnlich hohe MHK-Werte: >1024 mg/L für Clindamycin, >64 mg/L für Quinupristin, >64 mg/L für Telithromycin > 512 mg/L und >256 mg/L für ABT-773. Alle erhaltenen Mutanten zeigten also eine Kreuzresistenz 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*(C), verbunden ist, wurden molekulare Untersuchungen dieser Regulatorregion angeschlossen.

Die Sequenzanalysen zeigten zwei verschiedene Typen von strukturellen Veränderungen im Translationsattenuator des *erm*(C): Deletionen und Tandemduplikationen.

Insgesamt sind 17 Deletionen (5 bp – 121 bp) und 9 Tandem-duplikationen (11 bp – 100 bp) Identifiziert worden.

Strukturelle Veränderungen	Position	Typ	Selektion mit		
			Quinu-pristin	Telithro-mycin	ABT-773
Deletion					
5 bp	**1746-1742**	**a**	**-**	**2**	**-**
6 bp	**1745-1740**	**b**	**-**	**1**	**-**
16 bp	**1757-1742**	**c**	**-**	**3**	**-**
54 bp	**1785-1732**	**d**	**2**	**1**	**3**
57 bp	**1843-1787**	**e**	**-**	**1**	**-**
58 bp	**1840-1783**	**f**	**-**	**1**	**1**
58 bp	**1841-1784**	**g**	**6**	**-**	**9**
58+16 bp	**1841-1784;1757-1742**	**h**	**-**	**-**	**1**
60 bp	**1842-1783**	**i**	**5**	**-**	**9**
61 bp	**1843-1783**	**j**	**-**	**1**	**-**
71 bp	**1852-1782**	**k**	**-**	**1**	**-**
71 bp	**1856-1786**	**l**	**-**	**-**	**1**
74 bp	**1856-1783**	**m**	**-**	**1**	**-**
74 bp	**1862-1789**	**n**	**-**	**1**	**-**
108 bp	**1843-1736**	**o**	**9**	**-**	**7**
112 bp	**1843-1732**	**p**	**-**	**1**	**-**
121 bp	**1857-1737**	**q**	**-**	**1**	**-**
Duplikation					
17+2 bp	**1789-1773; 1760-1759**	**r**	**-**	**1**	**-**
20 bp	**1790-1771**	**s**	**-**	**1**	**-**
13+16 bp	**1782-1779; 1792-1782**	**t**	**-**	**1**	**-**
77 bp	**1783-1707**	**u**	**-**	**1**	**-**
77 bp	**1790-1714**	**v**	**-**	**2**	**-**
78 bp	**1726-1649**	**w**	**-**	**1**	**-**
97 bp	**1735-1639**	**x**	**-**	**1**	**-**
98 bp	**1735-1638**	**y**	**-**	**1**	**-**
100 bp	**1732-1631**	**z**	**-**	**1**	

Tabelle 6

Die gefundene Mutationen sind in die Tabelle 6 aufgelistet und im Abbildung 18 Schematisch dargestellt.

Deletionen:

Die Deletionen, die in vorliegenden Studie beobachtet wurden, können in vier verschiedene Klasse eingeteilt werden.

1. Die Klasse 1 ist gekennzeichnet durch eine 5 bp- 6 bp- und 16 bp-Deletion (Tabelle 6, Typen a-c). Bei diesen fehlt die IR3-Sequenz in Teilen oder insgesamt. Durch das Fehlen dieser Sequenzabschnitte können keine stabile mRNA Sekundärstrukturen, bei welchen IR3 beteiligt ist (wie IR2:IR3 oder IR3:IR4), gebildet werden.

2. In der Klasse 2 findet sich findet sich eine 54 bp-Deletion (Abb.18, Tabelle 6, Typ d) in der das 3`-Ende eines offenen Leserahmens (ORF19) eines 19-Aminosäure-Peptids sowie der abwärts gelegenen Nukleotidsequenz deletiert vorliegt. Dieser Sequenzenbereich umfasst nicht nur IR2 und IR3, sondern auch einer Teil der *erm*(C)-assozierten Schine-Dalgarno-Sequenz SD2. Als Folge dieser Deletion liegt eine Fusion des ORF19 und des *erm*(C)-Gens in dem gleiche Leseraster vor. Dieses Fusionsprodukt vermittelt eine Resistenz gegenüber MLS_B-Antibiotika und Ketoliden.

3. Die Klasse 3 umfasst Deletionen von 57 bis 74 bp (Tabelle 6, Typen e-n). Alle diese Deletionen schließen den Verlust der IR1-Sequenz in Kombination entweder mit einer kompletten Deletion des ORF19 (Tabelle 6, Typen f-k und m) oder einer kompletten Deletion des ORF19 (Tabelle 6, Typen e, l, und n) ein. Bei einigen dieser Deletions-Typen fehlte die Schine-Dalgarno-Sequenz SD1 entweder komplett (Tabb. 6, Typen l-n) oder in Teilen (Tabb. 6, Typ k). Ein einziges Plasmid (Tabb. 6, Typ h) weis zwei verschiedene Deletionen im Bereich des *erm*(C)-Translations Attenuators: eine 58 bp Deletion, welche ORF19 einschließlich IR1 umfasst, und eine 16 bp Deletion, die die

gesamte IR3-Sequenz betrifft. In einem der Plasmide, das die 58 bp Deletion aufweist (Tab. 6, Typ g), wurde ein singulärer Basenaustausch in der IR3-Sequenz (1745T→1745C) festgestellt. Dieser Basenaustausch ist verantwortlich für Destabilisierung der mRNA-Sekundär-Strukturen, an denen IR3 beteiligt ist.

4. Die vierte Klasse schließt Deletionen von 108 bis 121 Basenpaaren ein (Tab. 6, Typen o-q). Diese erweiterten Deletionen betreffen ORF19 einschließlich des IR1 wie auch abwärts gelegenen Sequenzen von IR2 und IR3. Hieraus resultiert, dass keine stabile mRNA-Sekundärstruktur in diesem Bereich gebildet werden kann. So besteht eine permanente Zugänglichkeit für die Ribosomen an die SD2-Sequenz und das 5`-Ende des *erm*(C) Gens.

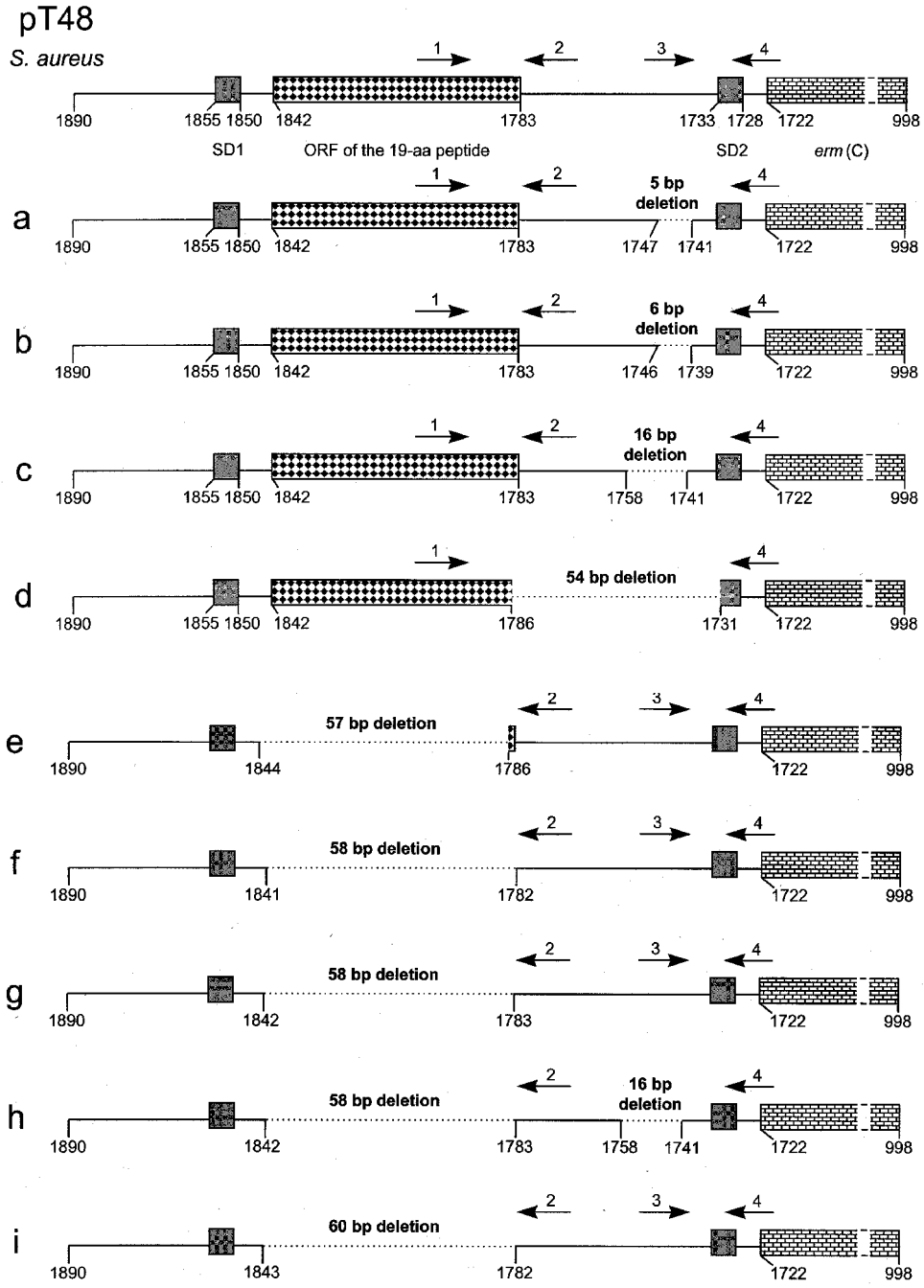
Tandem Duplikation

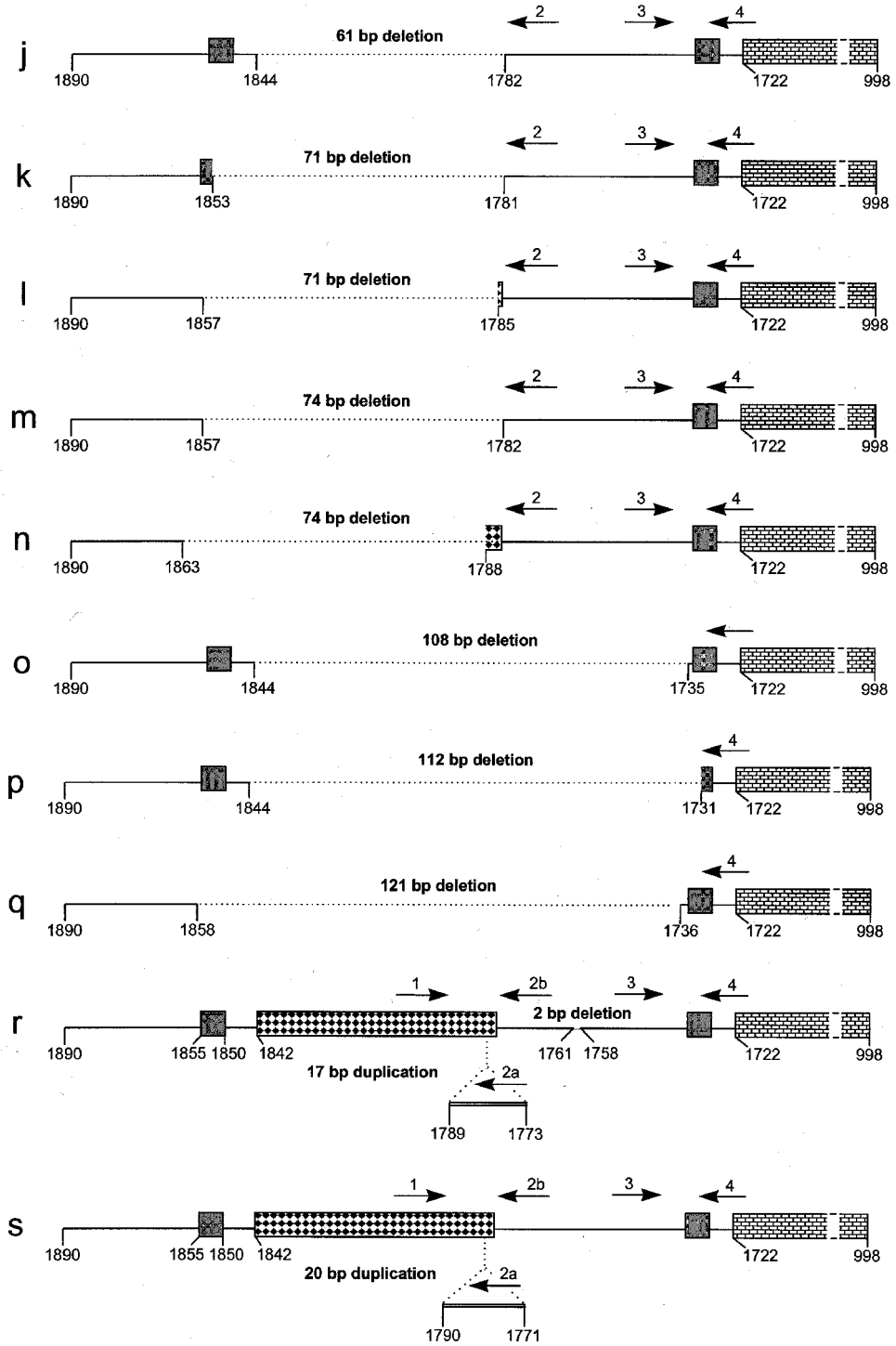
Mit der Ausnahme der 98 bp Duplikation stellen alle anderen Sequenz-Duplikationen eine echt Tandemduplikation dar. Trotz der unterschiedlichen Größe führen alle diese Duplikationen zur Ausbildung einer veränderten mRNA-Sekundärstruktur, so dass die *erm*(C)-assozierte Schine-Dalgarno-Sequenz SD2 und das 5`-Ende des *erm*(C) Gens für die Ribosomen andauernd zugänglich ist. So ist es möglich, dass die Translation des entsprechenden Transkriptes erreicht wurde. Die Tandem-Duplikation von 17, 20 und 13+11 Basenpaaren (Tabb. 6, Typen r-t) weisen eine Duplikation der IR2-Sequenz auf. Dem zu Folge waren zwei IR2 Sequenzen (IR2a und IR2b) verfügbar und könnten mit den IR1- und IR3 Sequenzen integrieren., indem die mRNA-Sekundärstrukturen IR1:IR2a und IR2b:IR3 in der Abwesenheit von induzierenden Faktoren und IR2b:IR3 in der Anwesenheit von diesen Faktoren gebildet werden. Unabhängig davon welche mRNA-Sekundärstruktur gebildet wird, wird die IR4-Sequenz nicht in diese mRNA-Sekundärstruktur

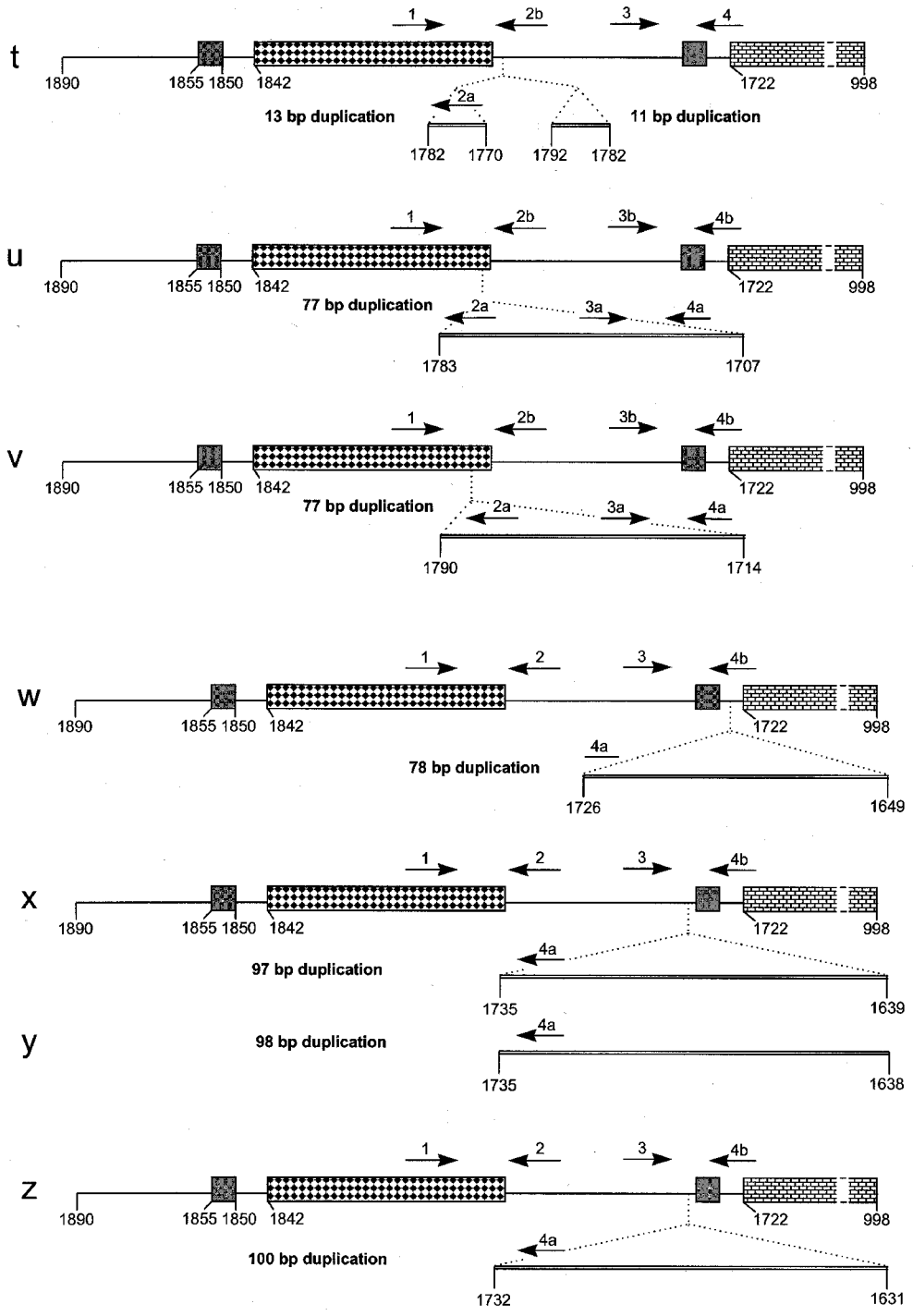
einbezogen und die SD2-Sequenz, wie auch der Anfang der *erm*(C) Gen, welche beide in IR4 lokalisiert sind, wären andauern für die Ribosomen zugänglich. Zwei nahe verwandte Duplikationen, jeweils der Größe von 77 bp, (Tabb. 6, Typen u und v) weisen eine Duplikation des Teils des *erm*(C) Translations Attenuators auf, der das 3`-Ende des ORF19, IR2,IR3, IR4 und das 5`-Ende von *erm*(C) enthält. In beiden Fällen wäre zu erwarten, dass die Formierung der mRNA-Sekundärstruktur IR1:IR2a, IR3a:IR4a und IR2b:IR3b in Abwesenheit von induzierenden Faktoren auftritt, während die Sekundärstrukturen IR2a:IR3a und IR2b:IR3b am ehesten in der Anwesenheit von induzierenden Faktoren gebildet werden. Zusammenfassend hat keine dieser mRNA-Sekundärstrukturen einen Einfluss auf die Translation des *erm*(C)-Transkriptes. Es sollte beachtet werden, dass in beiden Fällen der *erm*(C) Leserahmen in dem duplizierten Teil nach 9 Kodonen an dem Stop-Kodon TAA der IR2b-Sequenz endet. Die vier längsten Duplikationen der Größe 78-100 bp (Tab. 6, Typen w-z) betreffen das 5`-Ende des *erm*(C)-Gens einschließlich entweder der IR4-Sequenz in Teilen (Typ w) oder im gesamten (Typen x-z). Die 78 bp Duplikation ist von besonderem Interesse, da diese nicht die SD2-Sequenz mit einschließt. Die Analyse des Leserahmens erbrachte eine Fusion des *erm*(C) –Leserahmens mit dem des erhaltenen *erm*(C) –Gens. Hieraus könnte resultieren dass eine Methylase produziert wird, die eine 26-Aminosäure-Extensio am amino-terminalen Ende des Proteins aufweist. Das Plasmid, welches diese 78 bp Tandem-Duplikation beinhaltet, vermittelt ebenso eine „high-level“ Resistenz gegenüber MLS_B.Antibiotika und Ketoliden. Dieser Phänotyp legt die Vermutung nähe, dass die amino-terminale Extension die Aktivität der Methylase nicht negativ beeinflusst. Von den übrigen Duplikationen wird angenommen, dass sie eine Formierung der mRNA-Sekundär-strukturen IR1:IR2 und IR3:IR4 bei Abwesenheit von induzierenden Faktoren und IR2:IR3 in dere Anwesenheit zulassen. In beiden Fällen ist die IR4b-Sequenz, welche dem intakten *erm*(C)-Gen

vorausgeht, für die Ribosomen frei zugänglich. Der *erm*(C)-Leserahmen, der mit dem duplizierten Bereich beginnt, endet nach 18 Kodonen (98 bp Duplikation) oder nach 51 Kodonen (100 bp Duplikation).

Abbildung 18: Schematische Darstellung der strukturellen Veränderungen in der *erm*(C) Regulatorregion




j
61 bp deletion
2
3
4
1890
1844
1782
1722
998
k
71 bp deletion
1890
1853
1781
1722
998
l
71 bp deletion
1890
1857
1785
1722
998
m
74 bp deletion
1890
1857
1782
1722
998
n
74 bp deletion
1890
1863
1788
1722
998
o
108 bp deletion
1890
1844
1735
1722
998
p
112 bp deletion
1890
1844
1731
1722
998
q
121 bp deletion
1890
1858
1736
1722
998
r
1
2b
3
4
2 bp deletion
1890
1855 1850
1842
1761 1758
1722
998
17 bp duplication
2a
1789
1773
s
1
2b
3
4
1890
1855 1850
1842
1722
998
20 bp duplication
2a
1790
1771



Die vorliegenden Ergebnisse zeigen also, dass verschiedene Nicht-Iduzierer sehr wohl in der Lage sind, Mutanten zu selektionieren, die eine konstitutive *erm*(C)-Genexpression aufweisen. Dies macht den Gebrauch der entsprechenden Antibiotika problematisch.

4.4. Charakterisierung der regulatorischen Region bei 20 Methicillin und Quinupristin/Dalfopristin resistenten *Staphylococcus aureus*-Isolaten mit reduzierter Empfindlichkeit gegenüber Glycopeptiden

Im Rahmen der SENTRY-Studie mit der Analyse von 3051 *Staphylococcus aureus* Isolaten ist bei 35 eine Resistenz gegenüber Quinupristin/Dalfopristin nachgewiesen worden (MIC> 2 mg/L). Alle Isolaten stammen aus Frankreich. Davon ist bei 22 Isolaten (Krankenhaus in Lille) ist die Resistenz gegen Streptogramin A durch die Gene *vat*B/*vga*B kodiert und alle Isolaten besitzen konstitutiv expremierte *erm*(A) oder *erm*(C) Gene (MLS_B Resistenz). 20 Isolate haben zusätzlich eine herabgesetzte Empfindlichkeit gegen Vankomycin aufgegezeigen (GISA).

Ziel diese Studie war zu analysieren welche strukturelle Veränderungen im Translationsattenuator verantwortlich für die konstitutive Genexpression bei GISA *Staphylococcus aureus* Stämmen sind.

Mit Hilfe PCR wurde die gesamte *erm*(A) und *erm*(C) Regulatorregion amplifiziert. Bei 12 *S. aureus* Isolaten konnte ein Konstitutiv exprimiertes *erm*(A)- und bei 8 Isolaten *erm*(C)-Gen nachgewiesen werden.

Die Sequenzanalysen zeigten zwei verschiedene Typen von strukturellen Veränderungen im Translationsattenuator des *erm*(C) und *erm*(A):

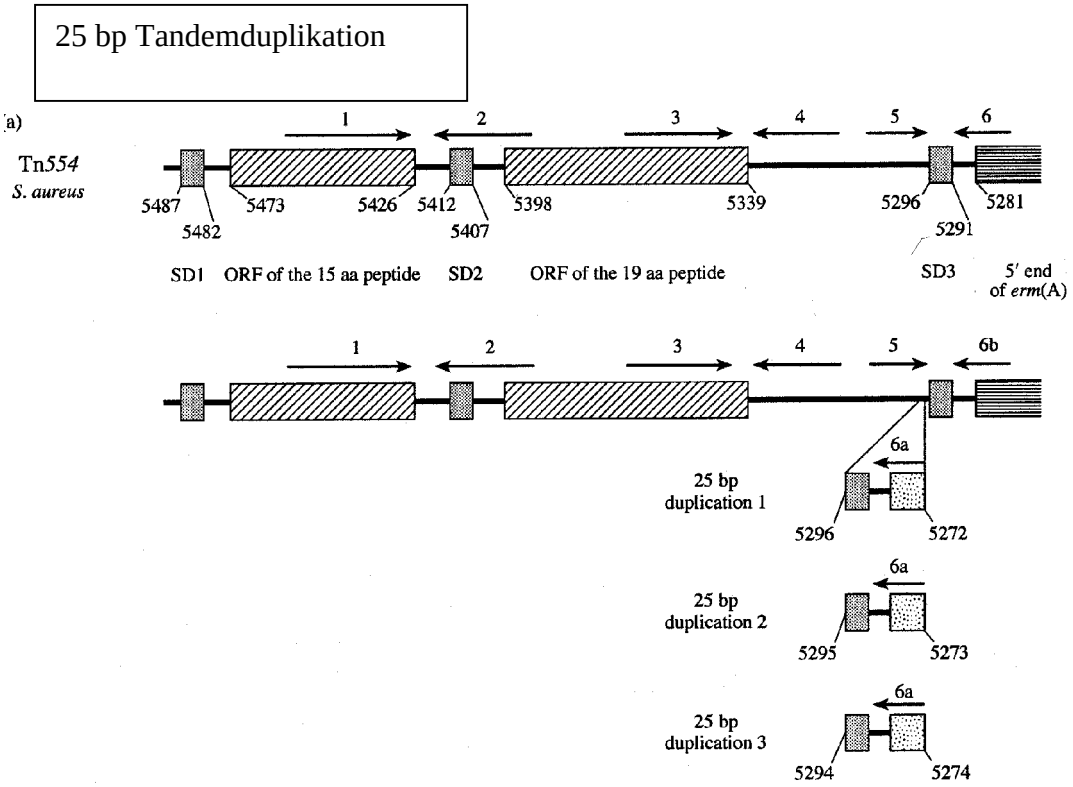
- Alle 12 *erm*(A) Isolaten haben eine Tandemduplikation von 25 bp (Typ 1 in 10 Isolaten, Typ 2 und Typ 3 bei je einem Isolat)

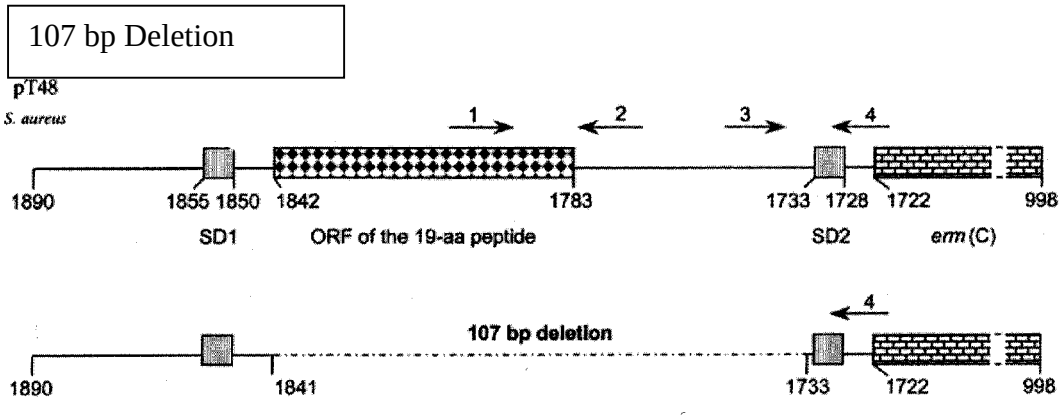
- Bei allen *erm*(C)-Isolaten ist eine Deletion von 107 bp festgestellt worden

Die Tandemduplikation erfasst die Ribosomenbindingsstelle SD3 (AGAAGG) und die IR6-Sequenz (GGTTATAATGAAC). Dadurch kommt es auch in Abwesenheit von induzierenden Faktoren zur Paarung IR3:IR4 und IR5:IR6a, wobei IR6b mit dem kompletten *erm*(A) Gen für Ribosomen zugänglich wird.

Bei der Deletion von 107 bp ist die Ribosomenbindungsstelle zusammen mit IR1-IR4 deletiert. Das ist exakt die klassische pNE131-Deletion, die Lampson und Parisi 1986 beschrieben haben. Es ist die bei natürlich vorkommenden Staphylokokken von Menschen und Tieren am häufigsten zu findende Deletion im *erm*(C)-Translationsattenuator.

Die Lokation ist im **Abbildung 19** gezeigt.





Diese Studie ist die erste Analyse in die die Veränderungen in Translationsattenuator bei MRSA Stämmen mit einer konstitutiven *erm*(A)/*erm*(C) Genexpression und gleichzeitiger Resistenz gegenüber Quinupristin/Dalfopristin und herabgesetzte Empfindlichkeit gegenüber Vancomycin beschreiben worden sind.

4.5. In-vitro Aktivität der neuen Ketoliden (Telithromycin und ATB-773) gegen Makrolid-empfindliche und –resistente *S. aureus* Isolaten mit definiertem Genstatus

In diesem Teil der Untersuchungen ging es darum zu ermitteln, welche In-vitro Aktivität die neuen Ketolide bei klinischen *S. aureus* Isolaten besitzen. Dazu wurden in großen Stammkollektiven die MHK-werte gemessen.

Bei den *S. aureus*-Stämmen mit definiertem Genstatus ist eine MHK-Bestimmung für Erythromycin, Clindamycin, Telithromycin und ABT-773 durchgeführt worden. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 7 aufgeführt.

Tabelle 7

Resistenz-Phenotyp	Resistenz-Gen	n[a]	Antibiotik	MIC(mg/L)		
				MIC_{50}	MIC_{90}	Range
Sensibel	Kein Gen nachweisbar	100	Erythromycin	0,25	0,5	0,06-0,5
			Clindamycin	0,12	0,12	0,06-0,12
			Telithromycin	0,06	0,12	<0,015-0,25
			ABT-773	0,03	0,06	<0,015-0,06
$M_{14-16}LS_B$ induzierbar	*erm*(A)	56	Erythromycin	>128	>128	2->128
			Clindamycin	0,12	0,12	0,06-0,12
			Telithromycin	0,12	0,25	0,06-0,5
			ABT-773	0,03	0,25	<0,015-0,25
	erm(C)	123	Erythromycin	>128	>128	1->128
			Clindamycin	0,12	0,12	0,06-0,12
			Telithromycin	0,12	0,25	0,06-0,5
			ABT-773	0,03	0,12	<0,015-0,12
	erm(A)+ *erm*(C)	6	Erythromycin	>128	>128	4->128
			Clindamycin	0,12	0,12	0,12
			Telithromycin	0,12	0,25	0,06-0,5
			ABT-773	0,06	0,25	<0,03-0,25
$M_{14-16}LS_B$ konstitutiv	*erm*(A)	489	Erythromycin	>128	>128	>128
			Clindamycin	>128	>128	>128
			Telithromycin	>128	>128	>128
			ABT-773	>128	>128	>128
	erm(C)	43	Erythromycin	>128	>128	>128
			Clindamycin	>128	>128	>128
			Telithromycin	>128	>128	>128
			ABT-773	>128	>128	>128
	erm(A)+ *erm*(C)	20	Erythromycin	>128	>128	>128
			Clindamycin	>128	>128	>128
			Telithromycin	>128	>128	>128
			ABT-773	>128	>128	>128
$M_{14}S_B$	*msr*(A)	30	Erythromycin	>128	>128	1->128
			Clindamycin	0,12	0,12	0,12
			Telithromycin	0,06	O,12	<0,015-0,25
			ABT-773	0,03	0,06	<0,015-0,06
M_{14-16}	*ere*(B)	5	Erythromycin	>128	>128	2->128
			Clindamycin	0,12	0,12	0,12
			Telithromycin	0,06	0,12	0,06-0,12
			ABT-773	0,03	0,06	0,03-0,06

Die beiden Ketolide zeigen eine gute Aktivität gegenüber *S. aureus*-Isolaten, die sensibel gegenüber Erythromycin und Clindamycin oder resistent gegenüber Erythromycin und sensibel gegen

Clindamycin sind. Die *S. aureus* Isolate mit einer Induzirbare Resistenz gegenüber $M_{14\text{-}16}LS_B$ Antibiotika zeigen eine MHK 0,25 mg/L für Telithromycin und 0,12-0,25 mg/L für ABT-773. Demgegenüber sind die Stämme mit einer Konstitutiv exprimierten Genexpression gegenüber beiden Ketolid-Antibiotika resistent.

5. Diskussion

5.1. Makrolide

MLS-Antibiotika kommen bei Infektionen des Respirationstraktes, wie sie von Pneumokokken und Staphylokokken 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. In erstem Teil der vorliegenden 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 strukurellen Veränderungen der Translationsatteunatoren 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 bestimmte Nicht-Induzierende Substanzen, besonders die neuen Ketolide, in der Lage sind, Mutanten mit konstitutiver *erm(A)*-Expression zu selektionieren und welche strukturellen Veränderungen bei solchen Mutanten auftreten.

Die Benutzung älterer Makrolide hat zu einer ausgedehnten 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.

5.2. Epidemiologische Verteilung der Resistenzgene

Die Verbreitung und Häufigkeit der einzelnen Resistenzgene innerhalb der *S. aureus*-Isolate 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) und msr(A/B)* untersucht.

67 MRSA und 67 MSSA wurden auf das Vorhandensein der wichtigsten MLS-Resistenzgene untersucht, indem Fragmente dieser Gene mit einer PCR amplifiziert und anschließend im Agarosegel nachgewiesen wurden.

Mit 50,7% (68/134) war *erm*(C) das bei *S. aureus*-Isolaten am häufigsten nachzuweisende Makrolid-Resistenzgen, gefolgt von *erm*(A) (52/134; 38,8%), *ere*(B) (10/134; 7,5%), *ms*r(A)/msr(B) (4/134; 2,2%) und *ere*A (1/134; 0,7%). .

Mit 40,3% war das *erm*(A)-Gen häufiger bei MRSA-Isolaten als bei MSSA-Isolaten (20,9%) vertreten. Genau umgekehert hierzu verteilt

Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen von Lina et al. nicht überein(Lina et al, 1999). Diese Autoren untersuchten 144 MLS_B-resistenten *S. aureus*-Stämme von 1995 aus französischen Kliniken. Sie fanden, dass das *erm*(A)-Gen mit 58% häufiger bei MRSA-Isolaten, insbesondere bei Isolaten mit konstitutiver MLS_B-Expresion auftrat, als bei MSSA-Isolaten (6%). Demgegenüber war *erm*(C) mit 20% wesentlich häufiger bei MSSA, insbesondere bei solchen mit induzierbarer MLS_B-Expresion, 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). Interesssanterweise 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 *Tn*554 primär im Chromosom lokalisiert (Tillotson et al, 1989), wogegen *erm*(C) primär auf Plasmiden gefunden wurde (Thakker 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 vorliegende 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 nachzuweisen. Früher war es sogar ausschließlich in Isolaten animaler Herkunft detektierbar (Eady et al, 1993).
Im Gegensatz zu Lina et al. und Nicola et al. haben wir bei den Isolaten auch ein gemeinsames Auftreten unterschiedlicher *erm* Gene gefunden. Des *ere*(B)-Gen konnte lediglich in 4 MRSA Isolaten mit konstitutive MLS_B-Expresion (10/134; 7,5%) nachgewiesen

werden. Die *msr*(A)/*msr*(B)-Gene konnten immerhin bei 1,6% (4/164; 2 MSSA und 1 bei MRSA) der *S. aureus*-Isolate nachgewiesen werden. Die vorliegende Ergebnisse unterscheiden sich nicht in dieser Hinsicht von denen Lina`s 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 in der Nähe unseres Befundes. Dagegen deckten sich ihre und unsere 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 (Wondracj et al, 1996).
Die Häufigkeit derjenigen Isolate, die eine Erythromycin-Resistenz aufweisen, allerdings ohne Nachweis eines der sechs getesteten Resistenzgene, bewegte sich je nach der untersuchten Gruppe immerhin zwischen 10,4% bei MRSA- und 12% bei MSSA-Isolaten. Dies liegt den Schluß nahe, dass noch weitere, bis heute unnerkante Resistenzmehanismen bzw. Resistenzgene für die Ausbildung einer Makrolid-Resistenz bei *S.aureus* vorhanden sein müssen (Matsuoka et al,2000).

5.3. 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)*-Gens 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 23 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 (Werkenthin 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 *Tn*554-Elementes sein, das ein solcherart mutiertes *erm(A)* trägt. Dies ist wahrscheinlicher als die unabhängige Entwicklung einer solchen Struktur in 51 verschieden Stämmen.

Die hier vorliegenden Untersuchungen zeigten zum ersten Mal, dass Duplikationen als auch 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 Expressionen 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 Staphylokokken eingesetzt werden, die eine induzierbare MLS_B-Resistenz tragen.

5.4. Molekulare Charakterisierung von in-vitro erzeugten ketolidresisteneten Mutanten

erm(A)

Frühere Studien haben gezeigt, dass eine induzierbare *erm(A)*-Expression durch Kultivierung von Staphylokokken 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 bestimmte nicht-Induzierer in der Lage sind, die Entwicklung gewisser struktureller Veränderungen zu katalysieren, welche 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-Reistenz 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 (Bonnefoy et al, 1997), warf zwei Fragen auf:

- Sind Ketolide und andere Antibiotika wie Dalfopristin, Quinupristin und Synercid in der Lage, konstitutive Genxpression zu induzieren?

- Falls ja, sind die zu beobachtenden strukturellen Änderungen im Translationsattenuator gleichen oder ähnlich wie die, die bei der Selektion mit Clindamycin gefunden werden, oder wie die, welche in natürlich vorkommenden Isolaten auftauchen?

  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 eine 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 war sehr wohl in der Lage, Mutanten mit konstitutiver Expression zu selektieren, 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 $\rightarrow$ 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

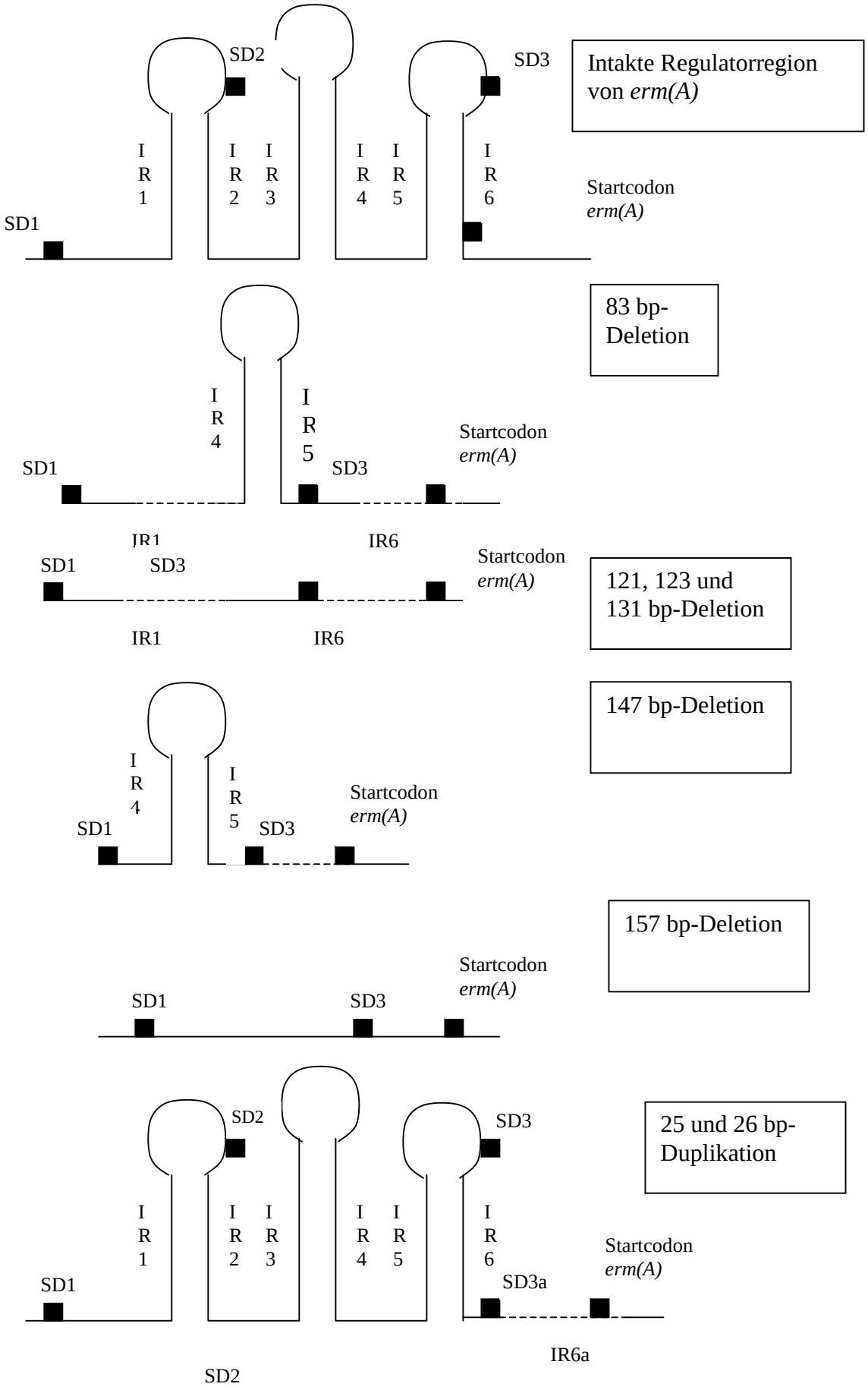
Segment mit Teilen von IR5 und IR6 in die originale IR5-Sequenz inseriert wurde, wurde hier zum ersten Mal beschrieben.

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 Gentamicin-Tobramicin-Kanamycin-Resistenz-Transposon *Tn*4001 assoziiert (Byrne et al, 1990), aber auch unabhängige IS256-Sequenzen wurden in Staphylokokken 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 (121 bp-, 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 Staphylokokken 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, könnten 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).

Abbildung 20 zeigt die strukturellen Konsequenze der in dieser Arbeit gefundenen und im Kapitel 4.2. und 4.3.beschriebenen Anderungen der Regulatorregion.


SD2
SD3
Intakte Regulatorregion von *erm(A)*
IR1
IR2
IR3
IR4
IR5
IR6
Startcodon *erm(A)*
SD1
83 bp-Deletion
IR4
IR5
Startcodon *erm(A)*
SD1
SD3
IR1
IR6
SD1
SD3
Startcodon *erm(A)*
121, 123 und 131 bp-Deletion
IR1
IR6
147 bp-Deletion
IR4
IR5
SD1
SD3
Startcodon *erm(A)*
157 bp-Deletion
Startcodon *erm(A)*
SD1
SD3
SD2
SD3
25 und 26 bp-Duplikation
IR1
IR2
IR3
IR4
IR5
IR6
Startcodon *erm(A)*
SD1
SD3a
IR6a
SD2

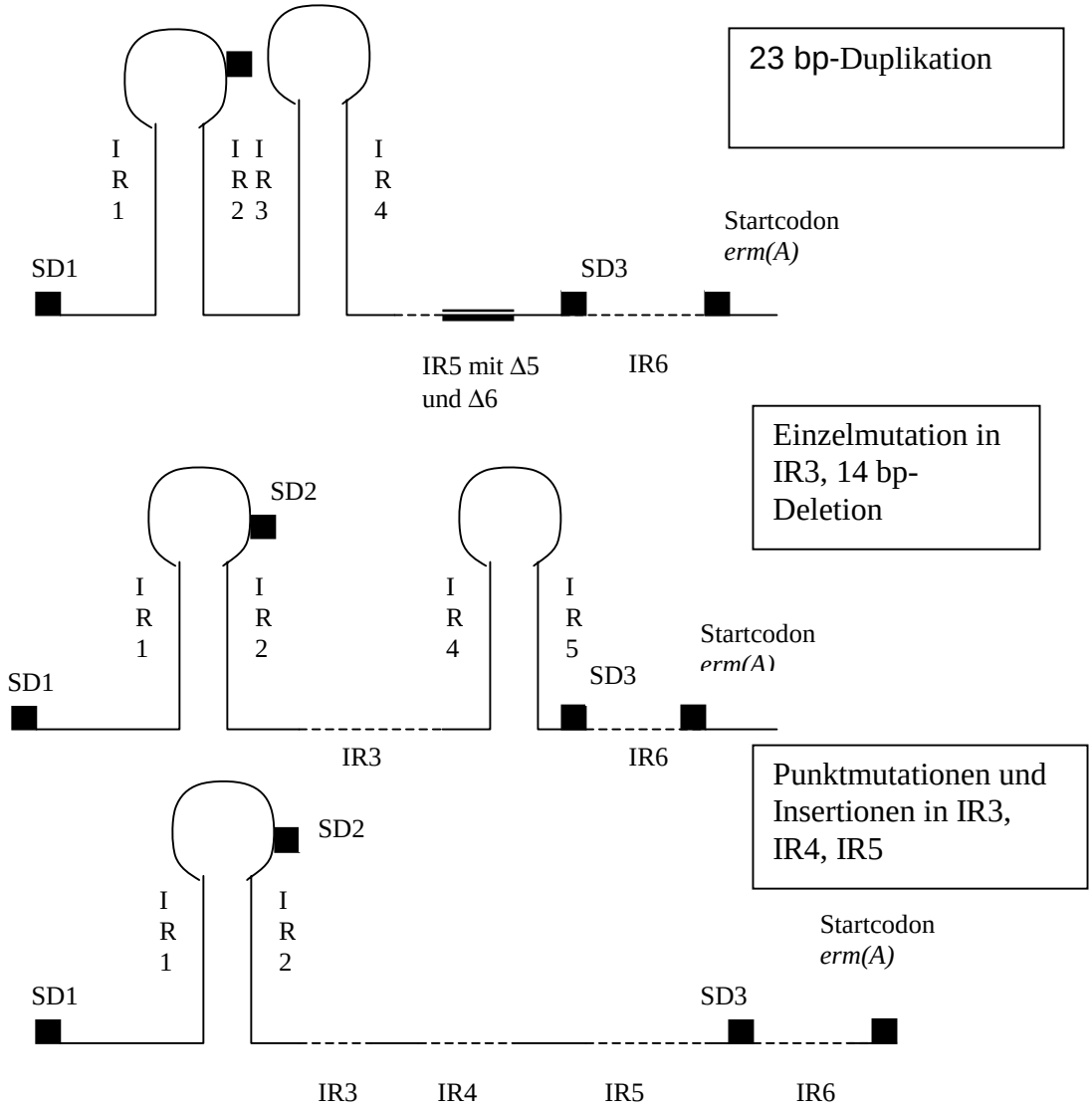


Abbildung 20. Strukturelle Konsequenzen der gefundenen Änderungen im Translationsattenuator von *erm(A)*. Hier sind schematisch die strukturellen Änderungen in der RNA als Konsequenz der in dieser Arbeit beschriebenen Änderungen der Regulatorregion gezeigt. In der intakten Regulatorregion bilden sich 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

***erm*(C)**

Um die selbe Fragen zu beantworten sind die entsprechen ähnliche Experimente bei *S. aureus* Stämme mit induzierbar exprimiertem *erm*(C) Gen durchgeführt worden.

In Gegensatz zu *erm*(A), bei *erm*(C) haltige *S. auerus* Isolaten bei Selektion mit Quinupristin sind 22 Mutanten erzeugt: 2 Mutanten haben eine 54 bp Deletion, 6 Mutanten eine 58 bp Deletion, 5 Mutanten eine 60 bp Deletion und 9 Mutanten eine 108 bp Deletion. Bei dieser Selektion wurden keine Duplikationen gefunden.

Bei Selektion mit Telithromycin sind bei 15 Mutanten Deletionen zwischen 5 bp und 121 bp und Duplikationen zwischen 17 bp und 100 bp bei 9 Isolaten gefunden worden. Bei dem Selektionversuch mit ABT-773 sind Deletionen zwischen 54 bp und 108 bp gefunden worden.

Die beobachteten Deletionen kann man in vier verschiedene Klassen einteilen. Bei Klasse 1 (5, 6 und 16 bp) fehlt die IR3-Sequenz in Teilen oder insgesamt. Durch dieses Fehlen können keine stabile mRNA Sekundärstrukturen gebildet werden. In der Klasse 2 findet sich eine 54 bp Deletion, in der das 3`-Ende eines offenen Leserahmens eines 19aa Peptid (ORF19) sowie die abwärts gelegene Nukleotidsequenz SD2 liegt. Als Folge dieser Deletion liegt eine Fusion des ORF19 und des *erm*(C) Gens in dem gleiche Leseraster vor. Diese Fusionsprodukt vermittelt eine Resistenz gegenüber MLS_B-Antibiotika und Ketoliden. Die Klasse 3 umfasst Deletionen von 57-74 bp. Alle diese Deletionen schließen der Verlust der IR 1-Sequenz in Kombination mit einer kompletten Deletion des ORF19 oder einer kompletten Deletion des ORF19 ein. Die vierte Klasse schließt Deletionen von 108-121 bp ein. Diese erweiterten Deletionen betreffen ORF19 einschließlich des IR1 wie auch abwärts gelegene Sequenzen von IR2 und IR3. Hieraus resultiert, dass keine stabile mRNA-Struktur in diesem Bereich gebildet werden kann. So

besteht eine permanenten Zugänglichkeit für die Ribosomen an die SD2-Sequenz und das 5`-Ende der *erm*(C) Gens.

Mit der Ausnahme der 98 bp Duplikation stellen alle anderen Sequenz-Duplikationen eine echt Tandemduplikation dar. Trotz der unterschiedlichen Größe führen alle diese Duplikationen zur Ausbildung einer veränderten mRNA-Sekundärstruktur, so dass die *erm*(C)-assozierte Schine-Dalgarno-Sequenz SD2 und das 5`-Ende des *erm*(C) Gens für die Ribosomen andauernd zugänglich ist. So ist es möglich, dass die Translation des entsprechenden Transkriptes erreicht wurde. Die Tandem-Duplikation von 17, 20 und 13+11 Basenpaaren weisen eine Duplikation der IR2-Sequenz auf. Dem zu Folge waren zwei IR2 Sequenzen (IR2a und IR2b) verfügbar und könnten mit den IR1- und IR3 Sequenzen integrieren., indem die mRNA-Sekundärstrukturen IR1:IR2a und IR2b:IR3 in der Abwesenheit von induzierenden Faktoren und IR2b:IR3 in der Anwesenheit von diesen Faktoren gebildet werden. Unabhängig davon welche mRNA-Sekundärstruktur gebildet wird, wird die IR4-Sequenz nicht in diese mRNA-Sekundärstruktur einbezogen und die SD2-Sequenz, wie auch der Anfang der *erm*(C) Gen, welche beide in IR4 lokalisiert sind, wären andauern für die Ribosomen zugänglich. Zwei nahe verwandte Duplikationen, jeweils der Größe von 77 bp, weisen eine Duplikation des Teils des *erm*(C) Translations Attenuators auf, der das 3`-Ende des ORF19, IR2,IR3, IR4 und das 5`-Ende von *erm*(C) enthält. In beiden Fällen wäre zu erwarten, dass die Formierung der mRNA-Sekundärstruktur IR1:IR2a, IR3a:IR4a und IR2b:IR3b in Abwesenheit von induzierenden Faktoren auftritt, während die Sekundärstrukturen IR2a:IR3a und IR2b:IR3b am ehesten in der Anwesenheit von induzierenden Faktoren gebildet werden. Zusammenfassend hat keine dieser mRNA-Sekundärstrukturen einen Einfluss auf die Translation des *erm*(C)-Transkriptes. Es sollte beachtet werden, dass in beiden Fällen der *erm*(C) Leserahmen in dem duplizierten Teil nach 9 Kodonen an dem Stop-Kodon TAA der IR2b-Sequenz endet. Die vier längsten

Duplikationen der Größe 78-100 bp betreffen das 5`-Ende des *erm*(C)-Gens einschließlich entweder der IR4-Sequenz in Teilen (Typ w) oder im gesamten (Typen x-z). Die 78 bp Duplikation ist von besonderem Interesse, da diese nicht die SD2-Sequenz mit einschließt. Die Analyse des Leserahmens erbrachte eine Fusion des *erm*(C) –Leserahmens mit dem des erhaltenen *erm*(C) –Gens. Hieraus könnte resultieren dass eine Methylase produziert wird, die eine 26-Aminosäure-Extensio am amino-terminalen Ende des Proteins aufweist. Das Plasmid, welches diese 78 bp Tandem-Duplikation beinhaltet, vermittelt ebenso eine „high-level“ Resistenz gegenüber MLS_B.Antibiotika und Ketoliden. Dieser Phänotyp legt die Vermutung nähe, dass die amino-terminale Extension die Aktivität der Methylase nicht negativ beeinflusst. Von den übrigen Duplikationen wird angenommen, dass sie eine Formierung der mRNA-Sekundär-strukturen IR1:IR2 und IR3:IR4 bei Abwesenheit von induzierenden Faktoren und IR2:IR3 in dere Anwesenheit zulassen. In beiden Fällen ist die IR4b-Sequenz, welche dem intakten *erm*(C)-Gen vorausgeht, für die Ribosomen frei zugänglich. Der *erm*(C)-Leserahmen, der mit dem duplizierten Bereich beginnt, endet nach 18 Kodonen (98 bp Duplikation) oder nach 51 Kodonen (100 bp Duplikation).

Zusammenfassend kann man sagen, dass vier nicht-induzierende Substanze, Clindamycin, Quinupristin, Telithromycin und ABT-773, in der Lage sind Mutanten mit konstitutiver *erm(A)*- und *erm*(C)-Expression zu selektieren. 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 induzierbar und konstitutiv resistenten *S. aureus* nicht empfehlenswert ist.

5.5. In-vitro Aktivität der neuen Ketoliden (Telithromycin und ATB-773) gegen Makrolid-empfindliche und –resistente *S. aureus* Isolaten mit definiertem Genstatus

Die MHK-Ergebnisse für Telithromycin entsprechen den Resultaten die in einer Studie von Hamilton-Miller&Schah publiziert worden sind. In dieser Studie haben die konstitutiv resistenten *Staphylococcus*-Stämme eine MHK für Telithromycin von >128mg/L. Die MHK für *S. aureus* Isolaten mit induziert exprimiertem Gen waren allerdings 4 mal größer als in dem vorliegendem Untersuchung, was kann mit dem Unterschied im untersuchtem Kollektiv erklärt werden könnte.

Zusammengefasst, zeigen die neuen Ketolide eine gute Wirksamkeit gegen Erythromycin-empfindlich genauso wie gegen Erythromycin-resistente *S. aureus* Isolate bei denen zur Resistenz eine Efflux Pumpe oder die enzymattische Inaktivierung der Wirkstoffen führt. ABT-773 hat eine 2-4 mal höhere in-vitro Aktivität als Telithromycin. Dagegen waren beide Ketoliden gegen die $M_{14\text{-}16}LS_B$ Resistenten *Staphylococcus aureus* Isolate mit einem konstitutiv exprimierten *erm*(A) und/oder *erm*(C) Gen inaktiv.

6. 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 Kreuzresistenzen 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.

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* 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 Pflegepersonal und durch kontaminierte Geräte schnell ausbreiten können.
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 lange 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.

7. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit zur molekularbiologischen Analyse der Resistenzmechanismen Makrolidresistenter *Staphylococcus aureus* Isolaten gliedert sich in 5 Teile:

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Epidemiologie der Resistenzmechanismen untersucht, d.h. die Verbreitung und Häufigkeit der einzelnen Makrolidresistenzgene von *S. aureus.* Das am häufigsten nachzuweisende Resistenzgen war *erm*(C) mit 50,7%, gefolgt von *erm*(A) mit 38,8% und *ere*(B) mit 7,5%. Mit 40,3% war das *erm*(A)-Gen häufiger bei Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA) als bei Methicillin-sensibelen *S. aureus* (MSSA)-Isolaten (20,9%) vertreten. Genau umgekehert hierzu verteilt es sich beim *erm*(C) Gen mit 46,5% bei MSSA und 35,8% bei MRSA.

Im zweiten Teil wurde der Frage nachgegangen werden, welche strukturellen Veränderungen in der regulatorischen Region des *erm*(A) Gens für eine konstitutive Genexpression verantwortlich sind. Mit Hilfe der PCR wurde die gesamte Regulatorregion amplifiziert und sequenziert. Bei 64 *S. aureus* Isolaten wurden 5 strukturelle Veränderungen nachgewiesen : zwei verschiedene 25bp Duplikationen, und drei Deletionen von 83bp, 121bp und 123bp. Diese strukturellen Veränderungen innerhalb der regulatorischen Region führten zu einer Konfirmationsänderung der sekundären mRNA-Struktur, wodurch eine Ablesung des *erm*(A)-Gens möglich wird.

Aus der Beantwortung des obengenannten Fragenkomplexes stellt sich im dritten Teil der Arbeit die Frage, ob bestimmte Antibiotika, insbesondere die neuen Ketolide Telithromycin und ABT-773, in der Lage sind, Mutanten mit konstitutiver *erm*(A)und *erm*(C)-Genexpression zu selektionieren und welche strukturellen Veränderungen bei solchen Mutanten auftreten. Stämme, die ein *erm*(A)-Gen mit einer induzierbaren Expression besitzen, wurden hierzu mit suprainhibitorischen Konzentrationen von Clindamycin,

Quinupristin, Telithromycin und ABT-773 kultiviert. Bei isolierten Mutanten wurden folgende Mutationen gefunden: Deletionen (14bp-157bp), Duplikationen (23-26bp), eine Plasmidinsertion (IS256) und Punktmutationen. Bei den *erm*(C)-haltigen Stämmen sind nach Kultivierung unter suprainhibitorischen Konzentrationen von Quinupristin, Telithromycin, und ABT-773 Deletionen (5bp-121bp) und Duplikationen (17-100bp) gefunden worden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen also, daß verschiedene nichtiduzierende Substanzen, wie unter anderen auch die neuen Ketolide, sehr wohl in der Lage sind, Mutanten zu selektionieren, die eine konstitutive *erm*(A) und *erm*(C) Genexpression aufweisen.

In vierten Teil der vorliegenden Arbeit wurde analysiert, welche strukturelle Veränderungen im *erm*(A) und *erm*(C) Translationsattenuator bei *S. aureus*-Stämmen, die eine Oxacillin und gleichzeitig eine Quinupristin/Dalfopristin Resistenz und überdies noch eine herabgesetzte Empfindlichkeit gegenüber Glykopeptiden (GISA-Stämme) besitzen, auftreten. Alle *erm*(A) Isolaten besitzen eine Tandemduplikation von 25bp und bei allem *erm*(C) *S. aureus*-Isolaten ist eine Deletion von 107bp nachzuweisen. Diese Studie ist die erste Analyse in der die Veränderungen in Translationsattenuator bei MRSA-Stämmen mit einer konstitutiven *erm*(A)/*erm*(C) Genexpression und gleichzeitiger Resistenz gegenüber Quinupristin/Dalfopristin und zusätzlich noch herabgesetzter Emfindlichkeit gegenüber Glykopeptiden beschrieben wurden.

Abschließend wurde die in-vitro Aktivität der neuen Ketolide, Telithromycin und ABT-773 gegenüber Makrolid-sensibelen und -resistenten *Staphylococcus aureus* Isolaten mit definiertem Genstatus untersucht werden. Bei den charakterisierten *S. aureus* Stämmen wurde eine MHK-Bestimmung für Erythromycin, Clindamycin, Telithromycin und ABT-773 durchgeführt worden. Beide Ketolide zeigten eine gute Aktivität gegenüber *S. aureus*-Isolaten, die sensibel gegenüber Erythromycin und Clindamycin oder aber resistent gegenüber Erythromycin und sensibel gegen Clindamycin

sind. Die Stämme mit einer Konstitutiv exprimierten Genexpression waren gegenüber beiden Ketolid-Antibiotika resistent. Aufgrund der Selektion von Mutanten mit konstitutiver Genexpression sollten die neuen Ketolide bei Staphylokokken-Infektionen aber auch bei allen anderen Staphylokokken-Isolaten nur sehr zurückhaltend eingesetzt werden.

8. Literatur:

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 virginianmycin 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. *Staphylococcus aureus* : a well-armed pathogen. Clin. Infect. Dis. **26:**1179-1181.

Arthur, M., D. Autissier, and P. Courvalin. 1986. Analysis of the nucleotide sequence of the *ere*B gene encoding the erythromycin esterase type II. Nucleic. Acids. Res. **14:**4987-4999.

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. Opinion. Infect. Dis. **9:**372-379.

Berryman, D. I., M. Lyristis, and J. I.Rood. 1994. Cloning and sequence analysis of *erm*Q, 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.

Bruyn, G. A., B. J. Zegers, and R. van Furth. 1992. Mechanisms of host defense against infection with *Streptococcus pneumoniae*. Clin. Infect. Dis. **14:**251-262.

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.

Chung, W. O., C. Werckenthin, S. Schwarz, and M. C. Roberts. 1999. Host range of the *erm*F 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 clinikal 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 IS*256* 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 overwiew 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.

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.

Fleming A. 1929. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to the IR use in the isolation of B. influenzae: Brit J Exp Path; **10:** 226-236

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.

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.

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.

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. Dreguiene, 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. **47:**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-resistente *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. Fluorchinoloncarbonsäuren. Arzneimitteltherapie **15:**14-23.

Heisig, P. 1996. Genetic evidence for al role of *parC* mutations in development of high level Fluoroquinoloe resistance in *E. coli.* Antimicrob. Agents Chemother. **40:**879-885.

Heisig, P. 1994. Mechanismen bakterieller Resistenz gegen Antibiotika. Arzneimitteltherapie **12:**203-218.

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.

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 *par*E-*par*C 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 *par*C and *gyr*A. Antimicrob. Agents Chemother. **40:**2760-2764.

Jedrzejas, 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 streptogamin-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, 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 *gyr*A, *par*C and parE loci. Antimicrob. Agents Chemother. 43:329-334.

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.

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 *mef*E, *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 *erm*C-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 areus*: 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 multidruag transporter NorA prevents emergence of Norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 40:2673-2674.

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.

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 dalfopristin-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 *Stapphylococcus 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 *erm*A, 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.

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.

Ogston A. 1881. Report upon microorganisms in surgical diseases. **Br Med J**. **1**. 369-375

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 *ere*A encoding the erythromycin esterase in *Escherichia coli*. Gene **35:**271-278.

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

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. 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.

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.

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.

Rosenbach FJ. 1884. Mikro-Organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen: Wiesbaden. JF Bergmann's Verlag

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., 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 *Stapphylococcus aureus*-Stämme, Vorkommen und Detektionsverfahren. MTA **11:**774-780.

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 (*erm*TR) 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 Tn*917* in *Streptococcus faecalis*. J. Bacteriol. **164:**782-796.

Sheagren, J. N. 1985. Staphylococcal infections of the skin and skin structures. Cutis **36:**2-6.

Shortridge, V. D., G. V. Doern, A. B. Brueggemann, J. M. Beyer, and R. K. Flamm. 1999. Prevalence of macrolide resistance mechanisms in S*treptococcus 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 Tn*4551*: use of *erm*FS 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.

Syrogiannopoulos, 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, 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.

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. Occurence and epidemiology of resistence to virginiamycinand 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 Tn*554* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother. **33:**541-550.

Trieu-Cuot, P., C. Poyart-Salmeron, C. Carlier, and P. Courvalin. 1990. Nucleotide sequence of the erythromycin resistance gene of the conjugative transposon Tn*1545*. Nucl. Acids Res. **18:**3660.

Vester, B., and S. Douthwaite. 2001. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. Antimicrob. Agents Chemother. **45:**1-12.

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 *erm*C 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.

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.

LEBENSLAUF

Persönliche Daten:

Name:	Jasmina Petridou
Geburtsdatum:	29.05.62
Geburtsort:	Krusevac, Jugoslawien
Familienstand:	verheiratet, ein Kind
Staatsangehörigkeit:	jugoslawisch

Schulbildung:

1968 - 1976	Grundschule
1976 - 1980	Gymnasium

Studium:

1980 - 1986	Universität in Belgrad, Jugoslawien Medizinische Fakultät

Ärztliche Tätigkeit:

05.01.87-04.01.88.	Arzt im Praktikum Medizinisches Zentrum Krusevac
05.01.88-17.08.88	Tätigkeit als Ärztin für Allgemeine Medizin in der Poliklinik des Medizinischen Zentrums in Krusevac
27.04.88	Staatexamen
17.08.88-13.06.91	Fachärztliche Weiterbildung im Gebiet Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Parasitologie im Institut für Gesundheitsschutz in Krusevac, Jugoslawien
13.06.91	Facharztprüfung
14.06.91-30.06.93	Tätigkeit als Fachärztin für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Parasitologie im Institut für Gesundheits-schutz in Krusevac, Jugoslawien
01.07.93.	Einreise in Bundesrepublik Deutschland

01.11.94-31.08.97	Tätigkeit im Laborpraxis Fr. Dr. Riedelsheimer, Düsseldorf
01.01.96-31.08.97	Tätigkeit als Gastärztin im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf
seit 01.09.97	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in Weiterbildung im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf

Velbert, 21.11.02

Dr. (YU) Jasmina Petridou