

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ. Prof. Dr. Klaus Pfeffer

**Molekularbiologische Resistenzmechanismen
und Therapieoptionen bei europäischen
Staphylococcus aureus Isolaten**

Dissertation

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

vorgelegt von

Angela Krey

(2004)

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan

Referent: Prof. Dr. Schmitz
Korreferentin: Univ.-Prof. Dr. Idel

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
1.1	Der <i>Staphylococcus aureus</i>	6
1.1.1	Die Gattung <i>Staphylococcus</i>	6
1.1.2	Eigenschaften von <i>Staphylococcus aureus</i>	6
1.1.3	Methicillin-resistente <i>S.aureus</i> -Stämme (MRSA).....	8
1.1.3.1	Der genetische Hintergrund der Methicillin-Resistenz bei <i>S.aureus</i>	8
1.1.3.2	Epidemiologie Methicillin-resistenter <i>S.aureus</i> (MRSA)	9
1.2	Antibiotika und Antibiotikaresistenzen	10
1.2.1	Allgemeine Antibiotika- Resistenzmechanismen bei Staphylokokken.....	10
1.2.2	MLS-(Makrolid-, Lincosamin-, Streptogramin-)Antibiotika	11
1.2.2.1	Makrolid-Antibiotika.....	11
1.2.2.2	Lincosamide.....	12
1.2.2.3	Streptogramine.....	13
1.2.2.4	Mechanismus der Makrolid-Resistenz und Makrolid-Lincosamid- Streptogramin-Resistenz (MLS _B -Resistenz)	15
1.2.3	Tetracycline	17
1.2.3.1	Wirkmechanismen und Wirkspektrum der Tetracycline.....	17
1.2.3.2	Mechanismus der Tetracyclin-Resistenz	18
1.2.4	Rifampicin	19
1.2.4.1	Wirkmechanismen und Wirkspektrum von Rifampicin.....	19
1.2.4.2	Mechanismus der Rifampicin-Resistenz	20
1.2.5	Reserveantibiotika und Alternativtherapeutika	20
1.2.5.1	Glycopeptid-Antibiotika.....	21
1.2.5.2	Fosfomycin	22
1.2.5.3	Fusidinsäure.....	23
1.2.5.4	Mupirocin	23
1.2.6	Neue Alternativ-Therapeutika	23
1.2.6.1	Quinupristin/Dalfopristin (RP 59500, Synercid®).....	23
1.2.6.2	Linezolid® (PNU 100766)	25
2	Ziele der Arbeit	28
3	Material und Methoden	30

3.1	Material	30
3.1.1	Bakterienisolate	30
3.1.2	Reagenzien/Chemikalien	31
3.1.2.1	Flüssigstoffe und pulverförmige Substanzen	31
3.1.2.2	Mikrobiologische und molekularbiologische Kits	32
3.1.2.3	Antibiotika	33
3.1.2.4	Nährmedien	34
3.1.3	Oligonucleotidprimer.....	35
3.1.4	Apparaturen	36
3.2	Methoden	37
3.2.1	Mikrobiologische Methoden.....	37
3.2.1.1	Anzucht von Bakterien	37
3.2.1.2	Bakterienkonservierung.....	37
3.2.1.3	Messung des Bakterienwachstums	37
3.2.1.4	Identifizierung von <i>S.aureus</i>	37
3.2.1.5	Antibiotika-Resistenztestung.....	38
3.2.1.6	Spontane Mutationsrate	42
3.2.1.7	Herstellung von „multistep“-Mutationen	42
3.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	43
3.2.2.1	Nucleinsäurechromatographie	43
3.2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR).....	46
3.2.2.3	Aufreinigung.....	48
3.2.2.4	Sequenzierreaktion	49
3.2.2.5	Fällung.....	50
3.2.2.6	Sequenzierung	50
4	Ergebnisse.....	52
4.1	Methicillin-Resistenz im ersten und zweiten Jahr des ENARE-Programmes	52
4.2	Sensibilität gegenüber klassischen Antibiotika	53
4.3	Detektion von MLS-Resistenzgenen	54
4.4	Detektion von Tetracyclin-Resistenzgen	57
4.4.1	Sequenzierung der Tetracyclin-Resistenzdeterminante tetM	59
4.5	Rifampicin-Resistenz	60

4.6	Sensibilität von MRSA gegenüber alternativen Therapeutika.....	63
4.7	Quinupristin/Dalfopristin Resistenz bei <i>S.aureus</i>	65
5	Diskussion	68
5.1	Methicillin-Resistenz im ersten und zweiten Jahr des ENARE-Programmes	68
5.2	Sensibilität gegenüber klassischen Antibiotika	69
5.3	Detektion von MLS-Resistenzgenen	71
5.4	Detektion von Tetracyclin-Resistenzgenen	74
5.4.1	Sequenzierung der Tetracyclin-Resistenzdeterminante tetM	77
5.5	Rifampicin-Resistenz	77
5.6	Sensibilität von MRSA gegenüber alternativen Therapeutika.....	79
5.7	Quinupristin/Dalfopristin (Synercid®)-Resistenz bei <i>S.aureus</i>	84
6	Zusammenfassung	87
7	Literaturverzeichnis	90
8	Abkürzungsverzeichnis	109
8.1	Buchstaben Code der Aminosäuren.....	110
	Danksagung.....	111
	Lebenslauf	112

1 EINLEITUNG

1.1 Der *Staphylococcus aureus*

1.1.1 Die Gattung *Staphylococcus*

Staphylokokken gehören zu der Familie der *Micrococcae*, die in der Gruppe der gram-positiven Kokken zusammengefaßt werden. Es handelt sich um Katalase bildende, kleine (0,8-1,2µm), unbewegliche, kugelige bis ovale Zellen, die sich in Haufen bzw. Trauben anordnen. Von den über 30 bekannten *Staphylococcus* Spezies und Subspezies spielen 17 beim Menschen eine Rolle, wobei von diesen nur wenige pathogen sind. Die verschiedenen Staphylokokken Spezies werden aus Gründen der klinischen Relevanz und Praktikabilität gewöhnlich in plasmakoagulase-positive und -negative Arten unterteilt, obgleich diese Unterteilung weder molekulargenetisch untermauert ist noch eine Differenzierung in pathogene und a-pathogene Spezies zuläßt.

Die größte humanpathogene und damit klinisch-bakteriologische Bedeutung kommt der Koagulase-positiven Spezies *S.aureus* zu. Bei den Koagulase-negativen Staphylokokken (KNS) sind vor allem *S.epidermidis* und *S.saprophyticus* von Bedeutung, die jedoch gegenüber *S.aureus* deutlich weniger Virulenzfaktoren aufweisen und zu den klassischen Erregern opportunistischer Infektionen zählen.

1.1.2 Eigenschaften von *Staphylococcus aureus*

Bei der Koagulase-positiven Spezies *S.aureus* handelt es sich um ein fakultativ anaerobes Bakterium, welches sich auf gewöhnlichen Nährböden bei 37°C leicht kultivieren läßt. Nach 24-stündiger Bebrütung entwickeln sich porzellanartig aussehende, konvex gewölbte Kolonien, die häufig gelblich pigmentiert sind. Bei Kultivierung auf bluthaltigen Nährmedien finden sich oft Hämolysezonen um die Kolonien.

Die Zellwand von *S.aureus* besteht aus einem vielschichtigen Peptidoglykan (Murein), mit welchem lineare Teichonsäuren und Polysaccharide kovalent verbunden sind. Weiterhin sind in der Zellwand Lipoteichonsäuren verankert, die sich durch die gesamte Mureinschicht ziehen und über diese nach außen ragen. Die Quervernetzung der Mureinstränge erfolgt durch Peptidoglycinbrücken, die durch das Enzym Lysostaphin aufgelöst werden können. Über diese Peptidbindungen sind zellwandassoziierte Proteine wie der Clumpingfaktor und das Protein A, welches bei Adhärenz, Kolonisierung und Infektion eine Rolle spielt, an den

Peptidanteil des Mureins gebunden [117]. Außerdem besitzen etwa 90% aller *S.aureus*-Stämme eine antiphagozytär wirkende Polysaccharidkapsel. Insgesamt wurden bei *S.aureus* elf verschiedene Kapselpolysaccharide beschrieben [80, 125], wobei in 80% der Fälle die Serotypen 5 und 8 prävalent sind [5, 69, 134]. Weiterhin wurde beobachtet, dass die Kapseltypen im Zusammenhang mit der Methicillin-Resistenz stehen, da 86% der Methicillin-resistenten *S.aureus* (MRSA)-Stämme den Kapseltyp 5 und 8% den Kapseltyp 8 besitzen [54].

Neben den durch den feinstrukturellen Zellwandaufbau bedingten Pathogenitätsdeterminanten sind für die Infektpathogenese bei *S.aureus* zahlreiche sezernierte Enzyme und Toxine, wie Plasmakoagulase, Enterotoxine, Toxic Shock Syndrom Toxin-1 (TSST-1), Hämolysine, Exfoliativtoxine, Lipasen und Proteasen, von Bedeutung. Die Virulenz eines Staphylokokken-Stammes wird dabei durch die Summe dieser biologischen Aktivitäten festgelegt und ist nicht auf eine einzelne extrazelluläre Substanz zurückzuführen [12, 70]. Mitverantwortlich für die klinische Relevanz des Erregers ist aber insbesondere seine relative Resistenz gegenüber UV-Strahlen, Hitze und Austrocknung.

Bei den durch *S.aureus* verursachten Erkrankungen unterscheidet man zwischen invasiven Prozessen, Toxin-vermittelten Erkrankungen und Mischformen. Bei den invasiven Infektionen findet man lokale, mit Eiterbildung einhergehende Infekte wie Furunkel, Karbunkel, Wundinfekte, Sinusitiden, Otitis media und Mastitis puerperalis. Desweiteren kommen invasive Infekte wie postoperative oder posttraumatische Ostitiden oder Osteomyelotitiden, Endokarditiden, Pneumonien und Meningitiden vor. Außerdem werden etwa die Hälfte aller Sepsen bei hospitalisierten Patienten durch *S.aureus* hervorgerufen. Reine Toxikosen kommen durch die orale Aufnahme von mit Enterotoxinen kontaminierten Speisen im Sinne einer Lebensmittelvergiftung vor. Bei den Mischformen wird das Krankheitsbild bei Befall des Organismus durch die Toxinwirkung des Bakteriums hervorgerufen. Zu nennen sind hierbei die durch exfoliativtoxinproduzierende Stämme hervorgerufenen Erkrankungen Dermatitis exfoliativa (staphylococcal scaled skin syndrome, Ritter-Erkrankung), Pemphigus neonatorum und bullöse Impetigo. Das Toxischer-Schock-Syndrom (TSS) wird durch *S.aureus*-Stämme verursacht, die das TSST-1 Toxin bilden.

S.aureus kann auch als normale Mikroflora verschiedene Stellen des Körpers besiedeln, bevorzugt jedoch Nasenschleimhaut und Perineum. Der persistierende *S.aureus*-Keimträger kann zum Dauerausscheider werden und damit für eine Weiterverbreitung verantwortlich sein, wobei die Ausbreitungsfähigkeit, Virulenz und Epidemietendenz von *S.aureus* stamm-spezifische Unterschiede aufweist [47].

1.1.3 Methicillin-resistente *S.aureus*-Stämme (MRSA)

Die gängige Abkürzung MRSA steht für „Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*“, wobei definitionsgemäß eine Resistenz gegenüber allen Antibiotika mit β -Lactam-Struktur wie Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme und Monobaktame besteht.

Sind neben den β -Lactam-Antibiotika noch weitere Antibiotikaklassen betroffen, so spricht man von einer Multiresistenz, welche zu einer drastischen Reduktion der therapeutischen Möglichkeiten führt. Einige MRSA sind mittlerweile resistent gegenüber mehr als 20 verschiedenen Antibiotika, wobei in vielen Fällen Vancomycin oder andere verwandte Glycopeptide als einzige wirksame Therapeutika verbleiben [149]. Das Auftreten von multiresistenten *S.aureus*-Stämmen stellt eine konsequente Antwort auf den durch die antimikrobielle Chemotherapie ausgelösten Selektionsdruck dar.

1.1.3.1 Der genetische Hintergrund der Methicillin-Resistenz bei *S.aureus*

Penicillin und andere β -Lactam-Antibiotika wirken durch Hemmung der Transpeptidase-Reaktion, welche die Kreuzvernetzung des Peptidoglykans katalysiert, bakterizid auf proliferierende Keime. Penicillin fungiert dabei als Substratanalogon, da es den D-Ala-D-Ala-Rest des Murein-Vorläufermoleküls nachahmt und somit eine kovalente Bindung mit dem Serin-Rest im aktiven Zentrum des Penicillinbindeproteins (PBP) eingeht, wodurch dessen Transpeptidase-Eigenschaft irreversibel gehemmt wird [156]. Für *S.aureus* wurden bisher fünf verschiedene PBPs (1, 2, 3, 3', 4) beschrieben, die als Transpeptidasen, Endopeptidasen und Carboxypeptidasen agieren können [163]. Die PBP polymerisieren das Vorläufermolekül Disaccharid-Pentapeptid zum Zellwandpeptidoglykan, wobei die spezifische Funktion von einigen PBP nur teilweise bekannt ist.

Bislang sind drei Wirkmechanismen bekannt, die mit einer phänotypischen Methicillin-Resistenz assoziiert sind. Die Produktion eines zusätzlichen Penicillinbindeproteins (PBP2a), eine Überproduktion von β -Lactamasen und die Modifizierung oder Überproduktion der normalen PBP [37, 147].

Das PBP2a kommt bei 90% aller MRSA-Stämme vor, ist membrangebunden und zeigt im Vergleich zum normalen PBP nur eine geringe Bindungsaffinität zu β -Lactam-Antibiotika [62, 83]. Es besitzt ein Molekulargewicht von 75kDa und wird durch das 2130bp lange, in allen MRSA hochkonservierte *mecA*-Gen kodiert [71, 96]. Bei der PBP2a-vermittelten Resistenz spricht man von einer sog. intrinsischen Resistenz.

Die anderen genannten Resistenzmechanismen sind von der intrinsischen Resistenz vollkommen unabhängig und führen zu sog. „Borderline Oxacillin resistenten *S.aureus*“

(BORSA)-Stämmen, die MHK-Werte von 1 bis 2 µg/ml besitzen [23]. Bei einer Überproduktion von β -Lactamasen kann in der Regel noch mit penicillinasefesten Antibiotika wie Methicillin oder β -Lactam-Inhibitoren wie Sulbactam oder Clavulansäure entgegengewirkt werden [37]. Weiterhin können noch die normalen PBP2 und PBP4 eine veränderte Bindungsfähigkeit aufweisen, was sich in einem verlangsamten Zellwachstum äußert [13] oder PBP4 kann überexprimiert vorliegen [64, 98].

1.1.3.2 Epidemiologie Methicillin-resistenter *S.aureus* (MRSA)

In den 40er Jahren wurde zur Bekämpfung von Staphylokokken-Infektionen Penicillin G eingesetzt, wodurch die Morbidität und Mortalität dieser Erkrankungen deutlich zurückging. Anfang der 50er Jahre kam es jedoch durch den kontinuierlichen Gebrauch dieses Antibiotikums zur Selektion resistenter, Penicillinase produzierender Stämme [9]. Alternative Behandlungen erfolgten mit Tetracyclinen, Streptomycin und Makroliden, deren therapeutische Sicherheit allerdings ebenfalls schnell durch Resistenzentwicklungen eingeschränkt wurde. 1960 erschien dann das semisynthetische, penicillinasefeste β -Lactam Methicillin zur Behandlung von *S.aureus* Infektionen auf dem Markt, wobei jedoch bereits 1961 die ersten Methicillin-resistenten *S.aureus* Stämme in Großbritannien identifiziert wurden [74]. Später wurden auch in anderen Ländern MRSA nachgewiesen. In Kliniken in den USA beispielsweise stieg der prozentuale Anteil von MRSA an nosokomialen Infektionen um mehr als das 10fache von 2,4% (1974) auf 29% (1991) an, wobei die höchsten Anstiege erwartungsgemäß in den größten Krankenhäusern zu verzeichnen waren [113]. Heute ist die Methicillin-Resistenz bei *S.aureus* weltweit verbreitet und die Häufigkeit von Infektionen und Krankheitsausbrüchen nimmt stetig zu. Jüngste Daten aus dem US SENTRY-Programm (1998) und dem SCOPE-Projekt (1998) zeigen, dass 26%, bzw. 29% der *S.aureus*, welche im Zusammenhang mit Septikämien isoliert wurden, Methicillin-resistent waren [95, 115]. Es ist wichtig festzustellen, dass die Prävalenz von MRSA nicht nur zwischen verschiedenen geographischen Regionen, sondern auch zwischen unterschiedlichen Institutionen innerhalb desselben Gebietes variiert [152].

Nosokomiale Infektionen mit MRSA sind potentiell lebensbedrohlich, behindern die normale Behandlung, verlängern den Krankenhausaufenthalt und erhöhen die Behandlungskosten. Aufgrund der relativ hohen Umweltresistenz, der oftmals multiresistenten Natur und der Fähigkeit zu einer Erhöhung der gesamten nosokomialen Infektionsrate [137], gehören MRSA heute zu den am meisten gefürchteten Krankenhauserregern. Problematisch sind in diesem Zusammenhang besonders symptomfreie Keimträger unter Patienten und Krankenhausperso-

nal, wobei bei *S.aureus* der Nasen-Rachenraum als bevorzugtes Keimreservoir gilt. Aus krankenhaushygienischer Sicht ist die schnelle Identifikation solcher Keimträger und die umgehend eingeleitete Eradikationstherapie essentiell zur Prophylaxe einer weiteren Verbreitung von MRSA.

1.2 Antibiotika und Antibiotikaresistenzen

1.2.1 Allgemeine Antibiotika- Resistenzmechanismen bei Staphylokokken

Resistenzen gegen zahlreiche Antibiotika sind bei Staphylokokken weit verbreitet. Es wurde bereits eine Vielzahl von Determinanten entdeckt, die Resistenzen durch verschiedene biochemische Mechanismen vermitteln können. Diese Mechanismen können in die folgenden Klassen eingeteilt werden:

Inaktivierende Mechanismen. Das antimikrobielle Agens wird durch chemische Modifikation mittels intra-oder extrazellulärer detoxifizierender Enzyme in seiner Struktur verändert und dadurch inaktiviert. Ein Beispiel hierfür ist die Inaktivierung von Chloramphenicol mittels Chloramphenicol-Acetyltransferase [132].

Bypass Mechanismen. Der Effekt des Antibiotikums wird dadurch umgangen, dass entweder ein alternativer Stoffwechselweg beschritten wird, oder auch nur die inhibierten Enzyme durch neue, wirkungsgleiche Enzyme mit fehlender Affinität zum Antibiotikum ersetzt werden. Als Beispiel kann die Resistenz gegen Trimethoprim mittels Synthese eines alternativen, Trimethoprim-unsensiblen Dihydrofolat-Reduktase Enzyms genannt werden [165].

Target Modifikationen. Hierbei kommt es zu einer strukturellen Veränderung des Angriffziels (target) mit der Folge einer deutlich verminderten Affinität zum Antibiotikum. Eine solche Target Modifikation wird beispielsweise bei der Resistenz gegen Makrolid-, Lincosamid- und Streptogramin Typ B-(MLS) Antibiotika beobachtet, wobei die strukturelle Modifikation in der Methylierung eines Adeninrestes an der 23S rRNA besteht (s. 1.2.2.4) [158].

Efflux-Mechanismen. Das antimikrobielle Agens wird hierbei durch aktiven Transport mittels sog. Efflux-Pumpen aus der Zelle herausbefördert. Beispielfhaft kann der aktive Transport von toxischen organischen Kationen, die als klinische Antiseptika zur Anwendung kommen, angeführt werden [91, 143].

Sequestration. Das Antibiotikum wird spezifisch und stöchiometrisch an ein zelluläres Protein gebunden, so dass seine antimikrobielle Wirkung blockiert wird. Ein Beispiel hierfür ist die Bindung und Sequestration von Bleomycin, einem Glycopeptid, welches jedoch wegen seiner

auch auf eukaryotische Zellen wirkenden Toxizität nicht als Antibiotikum, sondern als Chemotherapeutikum eingesetzt wird [129].

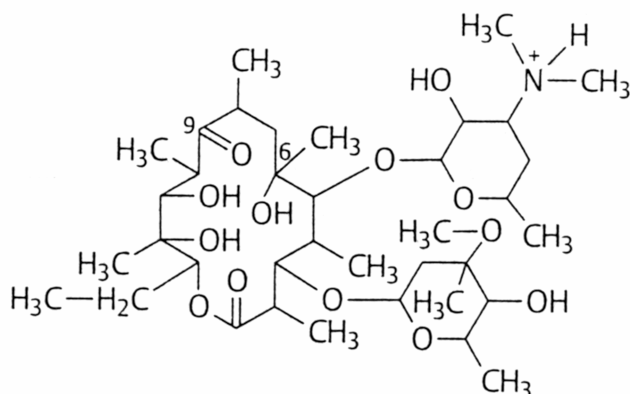
1.2.2 MLS-(Makrolid-, Lincosamin-, Streptogramin-)Antibiotika

1.2.2.1 Makrolid-Antibiotika

Die Gruppe der Makrolid-(Makrozyclischen Lakton-) Antibiotika umfaßt mehr als 160 Verbindungen, von denen jedoch in Deutschland nur einige wenige therapeutisch eingesetzt werden. Es handelt es sich um basische, mit Zuckern und/oder Aminoazuckern substituierte Lactone, die entweder aus *Streptomyces*-Arten gewonnen oder synthetisch hergestellt werden. Die einzelnen Makrolide unterscheiden sich in der Größe des Zyklus, dem Grundgerüst sowie der Natur der Zucker, wobei der zugrundeliegende Laktonring 14, 15 oder 16 Glieder enthalten kann.

Das Leitantibiotikum in der Gruppe der Makrolide ist das 1952 aus Stoffwechselprodukten von *Streptomyces erythreus* isolierte Erythromycin, welches aus einem mit zwei Desoxyzuckern (Cladinose und Desosamin) substituierten 14gliedrigen Lakton-Ring besteht (Abbildung 1). Weiterhin von besonderer therapeutischer Relevanz sind die neueren synthetisch hergestellten Verbindungen Clarithromycin, Roxithromycin und Azithromycin, die gegenüber Erythromycin eine verbesserte Säurestabilität sowie eine längere Eliminationshalbwertszeit aufweisen.

Abbildung 1: Erythromycin



Wirkungsmechanismen und Wirkspektrum der Makrolide

Der Ansatzpunkt der antibakteriellen Wirkung der Makrolid-Antibiotika sind die 50 S-Untereinheiten der bakteriellen 70 S-Ribosomen, wobei eine Inhibition der Proteinbiosynthese-

se während der Elongationsphase der Polypeptidkette am Ribosom stattfindet. Die Wirkungsweise der Makrolide ist dabei in der Regel bakteriostatisch.

Es wurde postuliert, dass die Makrolide die Dissoziation der Peptidyl-tRNA vom Ribosom stimulieren [35, 99, 100] und so zu einer Arretierung der Proteinsynthese führen. Dies konnte bewiesen werden, da Erythromycin in Stämmen, die mutationsbedingt keine Peptidyl-tRNA-Hydrolyse enthalten, eine Ansammlung von freier Peptidyl-tRNA verursachte [31].

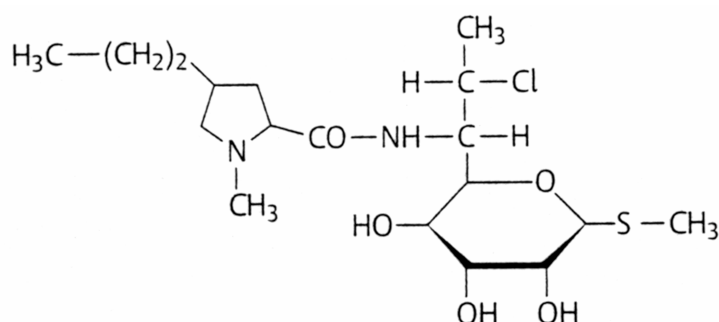
Eine andere mögliche Erklärung für die Wirkungsweise der Makrolide ist, dass Erythromycin die Freisetzung des entstandenen Proteins verhindert, indem es den Eingang des Tunnels blockiert, durch welchen das fertiggestellte Protein gewöhnlich das Peptidyltransferasezentrum verläßt [32].

Das Wirkspektrum der Makrolid-Antibiotika umfasst vor allem gram-positive Keime, gram-negative Bakterien der Gattungen *Neisseria*, *Haemophilus*, *Bordetella*, *Legionella*, *Brucella* und Anaerobier, sowie Zellwandlose (Mycoplasmen, Chlamydien, Rickettsien) und schraubenförmige Bakterien (Treponemen, Borrelien, Campylobacter).

1.2.2.2 Lincosamide

Zu den Lincosamiden gehören das aus *Streptomyces lincolensis* gewonnene Lincomycin und dessen 2- bis 10fach stärker wirksames partialsynthetisches Abwandlungsprodukt Clindamycin (7-Chlor-Lincomycin, Abbildung 2). Beide Substanzen bestehen aus zwei Heterocyclen: aus der substituierten heterocyclischen Aminosäure Prolin (5-Ring) und dem substituierten, schwefelhaltigen Aminozucker Galacto-Octapyranose (6-Ring), die als Säureamid verbunden sind.

Abbildung 2: Clindamycin



Wirkmechanismen und Wirkspektrum der Lincosamide

Die Lincosamide inhibieren die Proteinbiosynthese, ähnlich den Makroliden, durch Bindung an die 50 S-Ribosomenuntereinheit und Blockade der Reaktion der Aminoacyl-tRNA mit

dem Peptidyltransferasezentrum, woraus in der Regel ein bakteriostatischer Effekt resultiert. Bei sehr empfindlichen Stämmen und hohen Wirkstoffkonzentrationen entstehen auch deletäre Stoffwechselstörungen mit bakteriziden Effekten.

Lincosamide sind Reserveantibiotika mit Wirksamkeit gegen gram-positive Bakterien, insbesondere Staphylokokken, sowie gegen Anaerobier.

1.2.2.3 Streptogramine

Die Streptogramine sind eine Klasse von Antibiotika mit bemerkenswerter antibakterieller Aktivität und einem einzigartigen Wirkmechanismus.

Es handelt sich um natürlich vorkommende Substanzen, die durch Fermentation in erster Linie von *Streptomyces* Arten produziert werden [10, 11]. Die Familie der Streptogramine umfasst zahlreiche ähnliche Antibiotika, wie z.B. Mikamycin, Osteomycin oder das aus *Streptomyces pristinaspiralis* isolierte Pristinamycin und das von *Streptomyces virginiae* synthetisierte Virginamycin [11, 27].

Eine Besonderheit der Streptogramine, die sie von allen anderen derzeit bekannten Antibiotika unterscheidet, ist die Tatsache, dass die natürlich vorkommenden Substanzen aus zwei strukturell verschiedenen Komponenten, den Gruppe B-Molekülen (z.B. Pristinamycin I und Virginiamycin S) und den Gruppe A Molekülen (z.B. Pristinamycin II und Virginiamycin M) bestehen. Eine Bakterienspezies kann dabei mehrere unterschiedliche Moleküle der beiden Gruppen synthetisieren. So produziert beispielsweise *Streptomyces pristinaspiralis* 90-95% seiner Gruppe B Moleküle als Pristinamycin I_A und 3-10% als Pristinamycin I_B, während andere Gruppe B Moleküle nur in vernachlässigbaren Mengen nachweisbar sind. Die von dieser Spezies produzierten Gruppe A Moleküle liegen ebenfalls in einer Mischung vor, wobei Pristinamycin II_A die führende Komponente darstellt [11].

Bei den Gruppe B Streptograminen handelt es sich um cyclische Hexadepsipeptide, welche ein charakteristisches exocyclisches 3-Hydroxy Picoliny-Fragment enthalten. Neben den typischen Vertretern dieser Gruppe, Pristinamycin I_A und I_B sowie Virginiamycin S₁ wurden zahlreiche weitere Wirkstoffe mit nur geringfügigen strukturellen Modifikationen aus natürlichen Quellen isoliert [11].

Die Gruppe A Streptogramine sind mehrfach ungesättigte Marolaktone, die einen ungewöhnlichen Oxazol-Ring und ein Dienyl-Amid-Fragment enthalten. Zahlreiche dieser Wirkstoffe wurden unabhängig aus verschiedenen Bakterienspezies isoliert, sind jedoch in ihrer Struktur identisch, so z.B. Pristinamycin II_A und Virginiamycin M₁ [11].

Das natürlich vorkommende Pristinamycin ist seit 30 Jahren als orales Therapeutikum unter dem Namen Pyostacine® in Frankreich sowie anderen europäischen Ländern, jedoch nicht in der Bundesrepublik Deutschland auf dem Markt. Es besteht aus einer Mixtur von Pristinamycin I_A und Pristinamycin II_A im Verhältnis 30/70 (w/w) und wurde vor allem zur Behandlung von Staphylokokken Infektionen eingesetzt. [10, 11].

Generell ist jedoch das therapeutische Potential der natürlichen Streptogramine durch eine mangelnde Wasserlöslichkeit limitiert, die eine Anwendung in der bei schwerer Infektionen unerlässliche intravenöse Therapie unmöglich macht. Neue, derzeit in der klinischen Erprobung befindliche semisynthetische Präparate mit verbesserter Wasserlöslichkeit, allen voran das zur intravenösen Therapie geeignete Streptogramin-Mischpräparat Quinupristin/Dalfopristin (Synercid®) (s. 1.2.6.1), eröffnen unter Umständen neue Möglichkeiten in der Therapie schwerer, durch multiresistente Erreger hervorgerufener Infektionen [10].

Wirkmechanismen und Wirkspektrum der Streptogramine

Die Streptogramine hemmen die prokaryotische Proteinbiosynthese durch Störung der Translation der mRNA in das Protein, wobei nur die Elongationsphase von der Streptogramin-Wirkung betroffen ist [34]. Dabei unterscheidet sich der Wirkmechanismus der Gruppe B Moleküle signifikant von dem der Gruppe A Moleküle, während sich eine Mischung aus beiden Komponenten wiederum anders verhält als die Einzelsubstanzen alleine (s. 1.2.6.1) [32].

Die Typ B Streptogramine binden an die Peptidyltransferase-Domäne der 50S-Untereinheit des bakteriellen Ribosoms. Die Bindungsstelle der Gruppe B Moleküle überlappt mit der Bindungsstelle der Makrolide [33, 39, 94], so dass die Bindung eines Types von Molekülen die Bindung des andern ausschließt [41, 53]. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da die Makrolide ebenfalls an die Peptidyltransferase Region des Ribosoms binden und ihr Wirkmechanismus dem der Gruppe B-Moleküle sehr ähnlich ist (s. 1.2.2.1). Die Bindungsstelle der Lincosamide überlappt allerdings nicht mit derjenigen der Typ B Moleküle [40].

Es wird angenommen, dass die Typ B Streptogramine wie die Makrolide die Dissoziation der Peptidyl-tRNA vom Ribosom stimulieren [31]. Außerdem wird ebenso wie bei den Makroliden auch eine Blockade des "Tunnels" durch welchen das fertiggestellte Protein das Peptidyltransferasezentrum verlassen soll als Wirkmechanismus diskutiert [11].

Die Typ A Streptogramine binden wie die Typ B Moleküle an die 50 S-Untereinheit des prokaryotischen Ribosoms. Anders als diese inhibieren sie jedoch die Bindung der Aminocyl-tRNA an die Acceptorstelle des Ribosoms und verhindern die Ausbildung von Peptid-Bindungen [28, 29]. Genaugenommen inhibieren die Typ A Moleküle die Bindung des drei-

faltigen Komplexes aus Aminoacyl-tRNA, Elongationsfaktor TU und GTP durch die Blockade eines Schrittes, welcher der Codon-Anti-Codon Interaktion der Aminoacyl-tRNA mit der mRNA folgt. Wahrscheinlich handelt es sich bei diesem Schritt um das feste Andocken des Aminoacyl-Restes der ankommenden Aminoacyl-tRNA an das Peptidyltransferasezentrum der 50 S-Untereinheit [30].

Bei Mischpräparaten, wie Synercid® (s. 1.2.6.1), welche sowohl die Typ A als auch die Typ B Komponenten enthalten, resultiert eine synergistische Aktivität, die sich auf der Interaktion mit dem bakteriellen Ribosom begründet. Offensichtlich induziert das Gruppe A Molekül eine Konformationsänderung im Ribosom, die zu einer höheren Affinität zum Gruppe B Molekül führt. Die durch das Gruppe A Molekül bedingte Konformationsänderung im Ribosom beeinflusst ebenfalls die Bindung von Erythromycin. Bereits gebundenes Erythromycin kann durch ein Gruppe A Molekül verdrängt werden [40], während in Abwesenheit des Gruppe A Moleküls Erythromycin seinerseits Gruppe B Moleküle vom Ribosom verdrängt. In der Tat scheint das Ribosom in der Lage zu sein, zwei verschiedene Konformationen anzunehmen, eine mit hoher Affinität zu Makroliden (in Abwesenheit von Gruppe A Molekülen) und eine mit hoher Affinität zu Typ B Streptograminen (in Anwesenheit von Gruppe A Molekülen).

Mischpräparate aus Gruppe A und Gruppe B Streptograminen sind aufgrund des Synergieeffektes potentere antimikrobielle Wirkstoffe als die Einzelsubstanzen. Während der Typ A bzw. Typ B Wirkstoff alleine *in vitro* und in Infektionsmodellen an Tieren nur eine moderate bakteriostatische Aktivität aufweist, zeigt die Kombination aus beiden eine starke bakteriostatische und oftmals auch eine bakterizide Wirkung [11].

1.2.2.4 Mechanismus der Makrolid-Resistenz und Makrolid-Lincosamid-Streptogramin-Resistenz (MLS_B-Resistenz)

Zur Zeit sind bei den Makroliden drei verschiedene Mechanismen bekannt, die eine Resistenz hervorrufen können: die Target Modifikation, die enzymale Inaktivierung des Antibiotikums und die aktive Ausschleusung des Medikamentes mittels Efflux (s. 1.2.1) ([87, 126, 128, 138]. Dabei stellt die durch eines oder mehrere der sog. *erm*-Gene vermittelte Target Modifikation den prädominanten Resistenz Mechanismus dar. Bei *S.aureus* wurden drei homologe *erm*-(*erythromycin ribosome methylation*)-Gene, *ermA*, *ermB* und *ermC* identifiziert, welche alle für eine 23S rRNA Methylase kodieren [87, 126, 159, 160].

Die erstmals im Jahre 1969 beschriebene Determinante *ermA* ist auf dem Transposon Tn554 kodiert, welches bevorzugt an einer spezifischen Position (*att554*) in das *S.aureus* Chromo-

soms eingefügt ist, wobei es jedoch auch in anderen chromosomalen Regionen, inclusive der *mec* Region, gefunden wurde. *ErmB* hingegen wurde 1963 in Japan auf dem großen Plasmid pI258 entdeckt und später außerdem noch auf dem Transposon Tn551 gefunden. Bei *ErmC* schließlich handelt es sich ebenfalls um ein plasmidkodiertes Gen, welches auf kleinen 2,5 bis 5kb umfassenden Plasmiden gefunden wurde. Der Prototyp war das 1976 von Iordanescu isolierte 3,7kb Plasmid pE194, wobei *ermC* jedoch mittlerweile regelmäßig auf noch kleineren Plasmiden mit 2,4 bis 2,9kb Länge gefunden wird [160].

Die durch die *erm*-Gene kodierte adenin-spezifische *N*-Methyltransferase (Methylase) katalysiert das Hinzufügen von zwei Methyl-Resten zu einem hoch konservierten Adenin-Rest in der Domäne V, dem Peptidyltransferase-Zentrum der 23 S rRNA. Diese Modifikation bewirkt eine Konformationsänderung des Ribosoms, welche den betroffenen *S.aureus* Stamm resistent gegenüber den meisten Makroliden, Lincosamiden und Streptogramin Typ B Präparaten macht [87, 126]. Dieser als MLS_B-Resistenz bezeichnete Phenotyp wurde von Chabbert bereits kurz nach der Einführung von Erythromycin in die klinische Praxis im Jahre 1956 beschrieben [160].

Die Expression einer MLS_B-Resistenz kann unabhängig von der Klasse der *erm* Determinanten konstitutiv oder induzierbar sein, was bedeutet, dass zwei unterschiedliche Arten der Regulation der Methylase-Synthese vorkommen. Entweder erfolgt die Synthese konstitutiv oder erst nach entsprechender Induktion [11]. Ist die Expression einer MLS_B-Resistenz in Staphylokokken konstitutiv, so sind die Stämme resistent gegenüber allen Makroliden, Lincosamiden und Streptogramin B-Typ Antibiotika. Ist die Expression hingegen induzierbar, so besteht bei den entsprechenden Stämmen ausschließlich eine Resistenz gegen 14-gliedrige Makrolide, wie Erythromycin und Roxithromycin, sowie gegen 15-gliedrige Makrolide, wie z.B. Azithromycin. Die 16-gliedrigen Makrolide, die kommerziell erwerbbaren Lincosamide und die Streptogramin Typ B Antibiotika, bleiben weiterhin aktiv. Diese gesplante Resistenz ist auf Unterschiede in der Induktionsfähigkeit der MLS-Antibiotika zurückzuführen, da nur 14- und 15-gliedrige Makrolide effektive Induktoren der Methylase-Synthese sind [87, 126].

Ein seltenerer Mechanismus der Makrolid-Resistenz ist das aktive Hinausschleusen des Antibiotikums mittels eines Efflux-Systems, wobei in Staphylokokken als Determinanten solcher Makrolid-Effluxpumpen zwei sogenannte *msr*-(macrolid streptogramin resistance)-Gene beschrieben wurden. Das *msrA*-Gen, welches zuerst in *S.epidermidis* identifiziert wurde, verleiht den MS-Phänotyp. Hierbei handelt es sich um eine induzierbare Resistenz gegenüber 14- und 15-gliedrigen Makroliden und Streptogramin Typ B-Antibiotika nach Induktion durch Erythromycin. *MsrA* kodiert für das ATP-Bindungsprotein MsrA, welches mit den „Multi-

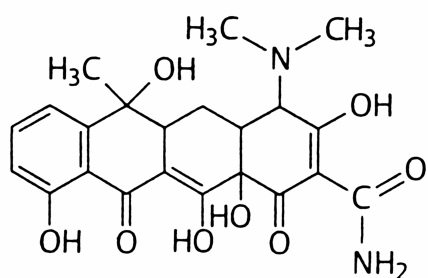
Component ATP-Bindungs-Kassetten (ABC)-Transportern“ verwandt ist, die charakteristischerweise auch Membran-Brücken-Domänen enthalten [85, 121, 122]. Das dem *msrA*-Gen verwandte *msrB*-Gen wurde in *S.xylosus* beschrieben [102].

Ein ebenfalls seltener Mechanismus einer Makrolid-Resistenz ist die Inaktivierung des Wirkstoffes durch detoxifizierende Enzyme [139]. Für *Enterobacteriaceae* und zuletzt auch für *S.aureus* wurden zwei Resistenzdeterminanten, das *ereA* und das *ereB*-(erythromycin resistance esterase)-Gen beschrieben, welche für Esterasen kodieren, die den Lactonring des makrozyklischen Nucleolus hydrolysieren. Eine weitere Form der enzymatischen Inaktivierung ist die Einführung eines Phosphatringes in die 2'-Hydroxylgruppe des Aminozuckers durch sogenannte Makrolid 2'-Phosphotransferasen [85, 162].

1.2.3 Tetracycline

Die aus verschiedenen Streptomyces-Arten isolierten Breitband-Antibiotika der Tetracyclin-Gruppe, Tetracyclin (Abbildung 3), Oxytetracyclin und Demeclocyclin, sowie ihre partialsynthetisch gewonnenen Derivate Doxycyclin, Minocyclin und Rolitetracyclin besitzen ein gemeinsames Grundgerüst aus vier annelierten Sechsringen und unterscheiden sich in ihrer chemischen Struktur nur durch verschiedene Substituenten an den Ringpositionen 5, 6 und 7, bzw. an Position 2 bei Rolitetracyclin.

Abbildung 3: Tetracyclin



1.2.3.1 Wirkmechanismen und Wirkspektrum der Tetracycline

Primär und vorrangig hemmen Tetracycline die Proteinbiosynthese in Bakterien, indem sie mit der Bindung der Aminoacyl-tRNA an der Akzeptorseite der Ribosomen interferieren. Tetracyclinmoleküle binden sich dabei besonders fest an der Interphase zwischen der großen und kleinen Untereinheit der bakteriellen 70 S-Ribosomen, während sie mit anderen ribosomalen Stellen und anderen Mediatoren der Proteinsynthese weniger bedeutende Bindungen eingehen. Zu den 80 S-Ribosomen von Eukaryonten besitzen Tetracycline eine geringere Af-

finität, bei Überdosierung werden jedoch auch menschliche Zellen beeinträchtigt, woraus sich eine vergleichsweise geringe therapeutische Breite ergibt.

Die Tetracycline gehören zu den "klassischen Breitband-Antibiotika" mit einer bakteriostatischen Wirkung auf zahlreiche gram-positive, gram-negative und nach Gram nicht färbbare Bakterien, sowie auf die Zellwandlosen Mycoplasmen, Chlamydien und Rickettsien und auf einige Protozoenarten. Im allgemeinen kann bei den verschiedenen Derivaten eine Parallelresistenz angenommen werden, nur Minocyclin bleibt gegen einzelne Tetracyclin-resistente Stämme aktiv.

1.2.3.2 Mechanismus der Tetracyclin-Resistenz

Es wurden bislang zwei Mechanismen der Tetracyclin-Resistenz in *Staphylococcus* Spezies identifiziert:

Zum einen die sog. ribosomale Protektion und zum anderen der aktive Efflux. Eine Tetracyclin-Resistenz aufgrund von ribosomaler Protektion wird durch die beiden sowohl chromosomal als auch auf einem Transposon codierten Determinanten *tetM* und *tetO* vermittelt [15, 154]. Hierbei scheint nach bisheriger Erkenntnis in *Staphylococcus aureus* das *tetM*-Gen prädominant zu sein, während die Determinante *tetO* in diesem Keim bislang noch nicht nachgewiesen werden konnte. Von dem *tetM*-Gen glaubt man, dass es eine Resistenz gegenüber allen Medikamenten der Tetracyclingruppe, inklusive der semisynthetischen Analoga wie Minozycilin vermittelt [15, 148, 154]. Dabei scheint seine Expression in *S.aureus* durch die Anwesenheit von Tetracyclin induziert zu werden [108]. Die genaue biochemische Basis der durch *tetM* vermittelten ribosomalen Protektion ist bislang noch unklar, eine favorisierte Möglichkeit ist eine Stabilisierung der Interaktion von Ribosom und tRNA in Anwesenheit des Antibiotikums Tetracyclin. Dabei scheint eine tRNA-modifizierende Aktivität für die *tetM* vermittelte Tetracyclin-Resistenz notwendig zu sein [19].

Der zweite Tetracyclin-Resistenzmechanismus bei Staphylokokken, der aktive Efflux, wird durch die beiden plasmidkodierten Gene *tetK* und *tetL* vermittelt. Beide Determinanten bedingen eine induzierbare Resistenz gegenüber Tetracyclin bei jedoch erhaltener Sensibilität gegenüber semisynthetischen Analoga wie Minocyclin. Sowohl *tetK* als auch *tetL* scheinen mittels einer Translations Verminderung reguliert zu werden, ähnlich der Regulation der Expression der beiden Determinanten *ermA* und *ermC*.

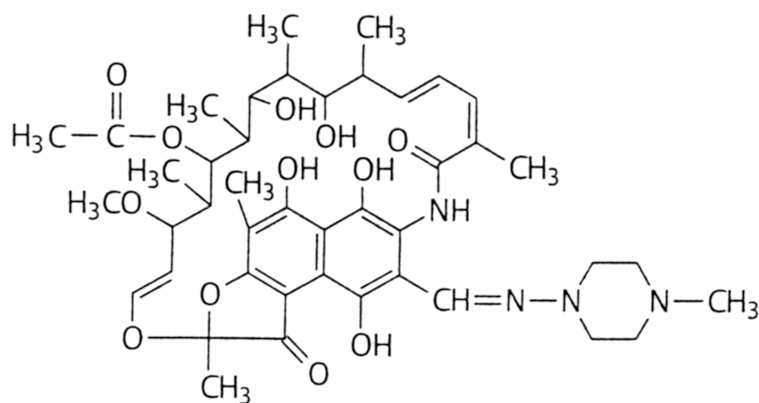
Die Produkte der beiden Gene *tetK* und *tetL* sind homolog zueinander, sowie zu einer Gruppe von Medikamenten-Efflux-Proteinen welche der der sog. „major faciliator superfamily“ angehören. Bei den durch *tetK* und *tetL*-kodierten Proteinen soll es sich um Membran-Proteine

mit 14 transmembranösen Segmenten handeln (TMS) [59, 88, 114]. Wie andere Mitglieder der „major facillity superfamily“ bedingen die Proteine TetK und TetL einen Medikamenten-Efflux mehr durch die Protonen bewegende Kraft (protone motive force, pmf) des transmembranösen elektrochemischen Protonengradienten als durch eine Hydrolyse von ATP [60, 164].

1.2.4 Rifampicin

Bei dem seit 1965 therapeutisch eingesetzten Ansamycin-Antibiotikum Rifampicin handelt es sich um ein partialsynthetisches Abwandlungsprodukt des aus Kulturen von *Streptomyces mediterranei* gewonnenen Rifampicins SV (Abbildung 4).

Abbildung 4: Rifampicin



1.2.4.1 Wirkmechanismen und Wirkspektrum von Rifampicin

Rifampicin wirkt durch eine Behinderung der bakteriellen RNA- und Eiweißsynthese bakterizid auf proliferierende Keime. Als Wirkmechanismus wurde eine Hemmung der Initiationsphase der Transkription durch eine spezifische Interaktion des Antibiotikums mit der β -Untereinheit der bakteriellen DNA-abhängigen RNA-Polymerase, ermittelt [1]. Durch die Bindung des Rifampicin Moleküls resultiert ein RNA-Polymerase-Rifampicin Komplex mit gestörter katalytischer Funktion, welcher beständig auf dem Promoter verankert bleibt. Dies führt zu einer erfolglosen Initiations-Reaktion mit der Synthese kurzer Oligoribonucleotide, welche schnell aus dem aktiven Zentrum des Enzymes diffundieren. Es existieren zwei Erklärungsansätze für den genauen Wirkmechanismus des Rifampicins an der β -Untereinheit der RNA Polymerase. Zum einen das Bewirken einer verminderten Affinität des aktiven Zentrums zu kurzen RNA-Ketten und zum anderen eine sterische Behinderung der Translokation des RNA-Produktes. Eine Kombination beider Mechanismen wird ebenfalls diskutiert [131].

Dem Rifampicin kommt als dem Antibiotikum mit der stärksten antimykobakteriellen Aktivität die größte Bedeutung in der antituberkulösen Therapie zu. Es zeigt jedoch ein breites Wirkspektrum, das neben Tuberkelbakterien auch einige atypische Mycobakterien und *M. leprae* sowie zahlreiche gram-positive und gram-negative Erreger umfaßt.

1.2.4.2 Mechanismus der Rifampicin-Resistenz

Rifampicin wird therapeutisch meist in Kombinationsschemata eingesetzt, da bei Einzeltherapien mit diesem Antibiotikum bei Staphylokokken sehr schnell Resistenzen durch sogenannte one-step Mutationen auftreten können.

Die Resistenz beruht dabei auf einer Target Modifikation in der β -Untereinheit der bakteriellen DNA-abhängigen RNA-Polymerase [8, 161]. Dabei führen Mutationen in dem chromosomalen *rpoB*-Rif-Gen, welches für die β -Untereinheit kodiert zu einer verminderten Affinität des Enzyms zum Rifampicin [8]. Bei *S. aureus* sind bereits mehrere Mutationen an unterschiedlichen Positionen in dem *rpoB*-Gen bekannt, die je nach resultierendem Aminosäureaustausch entweder allein (one-step Mutation), oder aber in Kombination mit weiteren Mutationen (two-step Mutation) eine Resistenz bewirken können. Dabei wird zwischen einer Low-Level und einer High-Level Resistenz unterschieden, wobei eine High-Level Resistenz sowohl Folge des additiven Effektes mehrerer Mutationen als auch Folge bestimmter Einzelmutationen sein kann [8, 161].

1.2.5 Reserveantibiotika und Alternativtherapeutika

Als Reservetherapeutika bezeichnet man Antibiotika, die der Therapie schwerster und lebensbedrohlicher Infektionen durch multiresistente Keime vorbehalten bleiben sollen. Bei den gram-positiven Keimen, wie *Staphylococcus aureus*, gehören zu dieser Antibiotikagruppe v.a. die Glycopeptid-Antibiotika, aber auch Fosfomycin, Fusidinsäure und das topische Therapeutikum Mupirocin.

Als Alternativtherapeutika sollen hier neue, zur Zeit in der klinischen Erprobung befindliche Substanzen mit potentiell großer Bedeutung in der Therapie multiresistenter Staphylokokken, bezeichnet werden. Hierzu gehört das neue semisynthetische Streptogramin-Mischpräparat Quinupristin/Dalfopristin (Synercid®), sowie die fluorinierten Oxazolidinone Linezolid und Eperezolid.

1.2.5.1 Glycopeptid-Antibiotika

Zu den Glycopeptid-Antibiotika gehören das aus Kulturfiltrat von *Streptomyces orientalis* isolierte Vancomycin, sowie das aus der Actinomyces-Art *Actinoplanes teichomyceticus* gewonnene Teicoplanin.

Obleich Vancomycin bereits seit den 50er Jahren bekannt ist, wurde die chemische Struktur dieses großmolekularen Wirkstoffes erst um 1980 aufgeklärt, als die Vancomycin-Forschung im Zusammenhang mit dem dringenden Bedarf alternativer MRSA-wirksamer Antibiotika eine Renaissance erlebte. Das komplexe tricyclische Vancomycin-Molekül enthält mehrere funktionelle Gruppen (1 Carboxyl-, 2 Amino- und 3 Phenol-Gruppen) und damit die Voraussetzungen zur Chelatbildung mit Metallionen. Die Vancomycin-Base (pI=8) ist als Hydrochlorid im Handel.

Wirkmechanismen und Wirkspektrum der Glycopeptide

Vancomycin und Teicoplanin wirken auf gleiche Weise durch eine Hemmung der Bakterienzellwandsynthese bakterizid auf proliferierende Erreger. Dabei erfolgt eine Inhibition des Mureinaufbaus durch Bindung der Glycopeptide an die freien C-terminalen D-Alanyl-D-alanin-Gruppen der Pentapeptidseitenketten vor ihrer enzymatischen Quervernetzung zum Peptidoglykangerüst. Im Gegensatz zu den β -Laktam-Antibiotika, welche die quervernetzenden Enzyme inhibieren, blockieren die Glycopeptide demnach die Bausteine für die Quervernetzung, was den Vorteil mit sich bringt, dass zum einen keine Parallelresistenzen zu anderen Antibiotika bestehen und, dass sich zum anderen nur schwer Mutanten mit andersartigen Peptidoglykanbausteinen ausbilden.

Das Wirkspektrum umfaßt aerobe und anaerobe gram-positive Keime, wobei die Wirkung gegen Staphylokokken und *Clostridium difficile* von besonderer Bedeutung ist. Gram-negative Erreger hingegen zeigen eine natürliche Glycopeptid-Resistenz, da der Aufbau ihrer Zellwand kein Durchdringen der Wirkstoffe zum Zielort, den D-Alanyl-D-alanin Gruppen, zuläßt.

Reduzierte Vancomycin-Sensibilität

Derzeit kommt den Glycopeptid-Antibiotika bei lebensbedrohlichen MRSA-Infektionen der höchste Stellenwert zu, da sie nicht selten die letzte verfügbare therapeutische Reserve darstellen [24, 127].

Das Auftreten einer reduzierten Vancomycin-Sensibilität bei Methicillin-resistenten *S.aureus* hat sowohl die Krankenhaushygiene als auch die antibiotische Chemotherapie neu unter

Druck gesetzt. Hiramatsu *et al.* haben kürzlich das Auftreten von *S.aureus*-Isolaten mit reduzierter Vancomycin-Sensibilität in japanischen Hospitälern beschrieben [61, 66, 67]. Die Prävalenz der Hetero-Vancomycin-Intermediär-Resistenz (Hetero-VISA) betrug 20% im Juntendo University Hospital, sowie 9.3% bei Isolaten aus sieben anderen Universitätskliniken und 1.3% in Kliniken, die nicht einer Universität angeschlossen waren [66, 67]. Außerdem wurden bereits homogen exprimierte VISAs in den USA und Japan isoliert [21, 61]. In diesen Fällen schienen die VISA-Stämme eine Resistenz während einer prolongierten Vancomycin-Therapie entwickelt zu haben. Das Auftreten von Hetero-VISA und homogen exprimierten VISAs stellt den Wert von routinemäßigen Antibiotika-Sensibilitätstests als Methode zur Voraussage der klinischen Effektivität einer Vancomycin Therapie in Frage.

Gemäß den NCCLS Richtlinien [107] weisen Vancomycin-sensible *S.aureus*-Isolate einen MHK-Wert von $\leq 4\text{mg/l}$ und Vancomycin-intermediär-resistente *S.aureus* (VISA) einen MHK-Wert von 8-16mg/l auf, während Vancomycin-resistente *S.aureus* MHKs von $\geq 32\text{mg/l}$ zeigen.

Als heterogen Vancomycin-resistenter Stamm, wurde von Hiramatsu *et al.* [61, 66, 67] ein *S.aureus*-Stamm definiert, der MHKs von $\leq 4\text{mg/l}$ aufweist, aber innerhalb der Population mit einer Frequenz von 10^{-6} Kolonien oder mehr, Isolate mit MHK-Werten von $\geq 8\text{mg/l}$ bildet. Wie Hiramatsu *et al.* nahelegten [61, 66, 67], könnten die Hetero-VISAs und die homogen exprimierten VISAs zum Therapieversagen führen, beziehungsweise Vorläufer Vancomycin-resistenter *S.aureus*-Stämme sein. Daher ist es sehr wichtig die Prävalenz von hetero-VISAs und VISAs innerhalb der *S.aureus* Population genaustens zu überwachen. Dies gilt im besonderen Maße innerhalb der MRSA-Populationen.

1.2.5.2 Fosfomycin

Das ursprünglich aus Streptomyces-Arten gewonnene, mittlerweile jedoch chemisch-synthetisch hergestellte, Fosfomycin ist als einfaches Phosphonsäure-Epoxid das Chemotherapeutikum mit der niedrigsten Molekülmasse und unterscheidet sich in seiner chemischen Struktur grundlegend von allen anderen Antibiotika.

Fosfomycin wirkt durch eine Störung der Zellwandbiosynthese bakterizid auf proliferierende Keime. Dort bindet es als sterisches Analogon des Phosphoenolpyruvates irreversibel an einen Cystinrest im aktiven Zentrum der Pyruvyltransferase, welche die Synthese von N-Acetylmuraminsäure katalysiert. Fosfomycin wirkt jedoch nur in einem Glucose-6-phosphathaltigen Milieu, da Glucose-6-Phosphat das Transportsystem induziert, über welches Fosfomycin aktiv in die Zelle aufgenommen wird. Infolge von Hämolyse kann genügend

Glucose-6-Phosphat am Entzündungsort vorhanden sein, wobei dies aber nicht immer und in jedem Entzündungsherd gesichert ist. Daher ist die im Antibiogramm *in vitro* stets mit Glucose-6-Phosphat gemessene Fosfomycinaktivität *in vivo* nicht immer zu erwarten. Das Wirkungsspektrum umfaßt hauptsächlich Staphylokokken, daneben Streptokokken und einige gram-negative Keime, wobei *Staphylococcus aureus* sowohl *in vitro* als auch *in vivo* der empfindlichste Erreger ist.

1.2.5.3 Fusidinsäure

Die aus *Fusidium coccineum* gewonnene Fusidinsäure ist der einzige therapeutisch genutzte Vertreter aus der Gruppe der Steroid-Antibiotika. Sie wirkt bakteriostatisch durch eine Inhibition der Proteinbiosynthese in einem späten Stadium am Ribosom. Staphylokokken sind deutlich empfindlicher gegenüber Fusidinsäure als Streptokokken und andere gram-positive Bakterienarten, während gram-negative Erreger eine generelle Unempfindlichkeit aufweisen.

1.2.5.4 Mupirocin

Mupirocin ist eine von *Pseudomonas fluorescens* gebildete Säure, die Pseudomoninsäure A, welche durch eine Hemmung der Proteinbiosynthese bakteriostatisch vorwiegend gegen Staphylokokken und Streptokokken wirkt. Der einzigartige Wirkmechanismus besteht in einer kompetitiven Hemmung der Isoleucin-tRNA-Synthetase. Dadurch entfällt die Verknüpfung von Isoleucin mit der tRNA, womit diese Aminosäure nicht mehr für die Proteinbiosynthese verfügbar ist. Wegen eines raschen Abbaus durch Esterspaltung ist Mupirocin nicht für die systemische Gabe geeignet, sondern wird nur zur Lokalthherapie verabreicht. Seit seiner Einführung in die klinische Praxis in Großbritannien 1985 erfreute sich das Mupirocin aufgrund seiner hohen Effektivität immer größerer Beliebtheit, so dass es mittlerweile in über 90 Ländern der Welt zum Gebrauch zugelassen ist [36]. Derzeit ist es das Mittel der Wahl zur topischen Erradikation von MRSA bei persistierendem nasalen Trägerstatus und wird außerdem erfolgreich bei Hautinfektionen durch MRSA eingesetzt.

1.2.6 Neue Alternativ-Therapeutika

1.2.6.1 Quinupristin/Dalfopristin (RP 59500, Synercid®)

Quinupristin/Dalfopristin (RP 59500, Synercid®) ist ein neues, derzeit in der klinischen Erprobung befindliches Streptogramin-Antibiotikum (s. 1.2.2.3), welches von der französischen Firma Rhône-Poulenc Rorer entwickelt wurde.

Zur Zeit besteht für das intravenös applizierbare Präparat in den USA und Europa eine Registrierung für die Behandlung schwerer Infektionen mit gram-positiven Kokken, bei denen The-

rapieversuche mit Vancomycin scheitern oder eine Intoleranz gegenüber Vancomycin vorliegt [120]. Generell scheint Synercid® mit Ausnahme von venösen Irritationen eine recht gute Verträglichkeit aufzuweisen, wobei in Phase I Studien bei einigen Probanden systemische Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen und intestinale Beschwerden auftraten [48], während in Studien der Phase II und III bei wenigen Patienten auch Arthralgien, Myalgien und Transaminasenanstiege beschrieben wurden, die sogar in seltenen Fällen einen Abbruch der Behandlung nötig machten [18].

Die Therapiesubstanz RP 59500 besteht aus einer Mixtur der wasserlöslichen, semisynthetischen Komponenten Quinupristin und Dalfopristin im Verhältnis 30/70 (w/w), wobei die Streptogramin B Komponente Quinupristin (RP 57669) durch eine chemische Modifikation des natürlich vorkommenden Pristinamycin I_A gewonnen wird, während die Synthese der Streptogramin A Komponente Dalfopristin (RP 54476) durch eine Modifikation der Natursubstanz Pristinamycin II_A erfolgt [11].

Der Wirkungsmechanismus von RP 59500 ist durch den für die Strepogramin-Mischpräparate charakteristischen synergistischen Effekt der Einzelkomponenten gekennzeichnet (s. 1.2.2.3). Die Bindung von Dalfopristin bewirkt eine Konformationsänderung des Ribosoms mit der Folge einer erhöhten Affinität zu Quinupristin, woraus die Formierung eines stabilen dreifaltigen Dalfopristin-Ribosom-Quinupristin-Komplexes resultiert. Dies führt zu einer irreversiblen Hemmung der bakteriellen Proteinbiosynthese mit konsekutivem Zelltod [50].

Die oben beschriebene Konformationsänderung erklärt die Beobachtung, dass RP 59500 in der Regel auch bei MLS_B-resistenten Bakterienstämmen (s. 1.2.2.3) wirksam ist, seinerseits wegen nur schwacher Induktion der Methylase-Gene (*erm*) keine MLS_B Resistenz induziert [86] und keine Kreuzresistenz zu Makroliden, bzw. Lincosamiden aufweist. Offensichtlich ist die Typ A Komponente Dalfopristin bei bestehender MLS_B-Resistenz in der Lage, durch die Induktion der ribosomalen Konformationsänderung die Affinität des Ribosoms zu der Typ B Komponente Quinupristin soweit zu erhöhen, dass der durch die Modifikation der 23 S rRNA resultierende Affinitätsverlust für die Typ B Komponente suffizient ausgeglichen werden kann [11].

RP 59500 zeigt *in vitro* eine starke bakteriostatische Wirkung sowohl auf die meisten aeroben gram-positiven Keime, als auch auf zahlreiche Anaerobier, einige gram-negative Bakterien und bestimmte anspruchsvolle Keime, wobei die gram-positiven Kokken, mit Ausnahme des kaum sensiblen *Enterococcus faecalis* die primäre Zielgruppe des Antibiotikums darstellen. Das Präparat hat auch eine gute Aktivität gegen gram-positive Problemkeime, wie Methicil-

lin- und/oder MLS_B-resistente *S.aureus* und *S.epidermidis* Stämme, Penicillin-resistente Pneumokokken und Vancomycin-resistente *E.faecium* Isolate [11, 18].

Im Gegensatz zu den meisten die Proteinbiosynthese inhibierenden Antibiotika, wirkt das Streptogramin-Mischpräparat Quinupristin/Dalfopristin *in vitro* auch bakterizid auf gram-positive Erreger, wie *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.pyogenes* und *S.pneumoniae*, nicht jedoch auf Enterokokken [50, 68]. Dabei liegt bei den genannten gram-positiven Organismen die minimale bakterizide Konzentration (MBK) von RP 59500 zumeist innerhalb des 1-4fachen Wertes der minimalen Hemmkonzentration (MHK) [11, 17, 49, 68]. Obgleich, wie oben beschrieben, bei einer MLS_B-Resistenz die Synergie zwischen den Gruppe A und Gruppe B Komponenten generell konserviert ist, kann die bakterizide Wirkung von Quinupristin/Dalfopristin jedoch in einigen Stämmen herabgesetzt sein [22, 86]. Die *in vitro* nachgewiesene bakterizide Aktivität von RP 59500 konnte in *in vivo* Modellen bestätigt werden [11].

Durch den Aufbau aus zwei synergistisch wirkenden, strukturell verschiedenen Einzelkomponenten, für die jeweils voneinander unabhängige Resistenzmechanismen existieren, wird bei RP 59500 eine Resistenzentwicklung deutlich erschwert, da es vergleichsweise unwahrscheinlich ist, dass in demselben Bakterienstamm gleichzeitig eine Resistenz gegen die Typ A Komponente und gegen die Typ B Komponente vorliegt [27].

1.2.6.2 Linezolid® (PNU 100766)

Linezolid gehört zu einer neuen Klasse vollständig synthetischer antibakterieller Wirkstoffe, den Oxazolidinonen, die erstmals 1987 mit der Entdeckung von DuP 721 und DuP 105 durch Wissenschaftler in E.I. du Pont de Nemours & Co Inc beschrieben wurden. Seinerzeit erreichten diese beiden zur Gruppe der (5S)-(acetamidomethyl)-3-aryl-2-Oxazolidinone gehörenden Substanzen die Phase I der klinischen Untersuchungen, welche jedoch kurze Zeit später wegen toxikologischer Bedenken eingestellt werden mußten [16, 42]. Erst durch die Synthese zweier fluorinierter Analoga, U-100766 und U-100592, durch Brickner *et al.* Mitte der 90er Jahre kam erneutes Interesse an den Oxazolidinonen auf. Diese beiden, von der Firma Pharmacia & Upjohn Inc (Kalamazoo, Michigan) unter den Namen Linezolid (PNU 100766, ehemals U-100766) und Eperezolid (PNU 100592, ehemals U-100592) patentierten Substanzen, vereinen die vielversprechenden Eigenschaften ihrer Vorgängersubstanzen mit einem guten Sicherheitsprofil. Zu diesen bemerkenswerten Eigenschaften zählen die parenterale und orale Bioverfügbarkeit, die gute *in vitro* Aktivität gegen zahlreiche wichtige Pathogene, die einzigartige chemische Struktur und das durch einen vollkommen neuartigen Wirkmechanismus

bedingte Fehlen jeglicher Kreuzresistenzen mit bisher auf dem Markt befindlichen Antibiotika [16, 42, 52, 76, 78, 167].

Linezolid (PNU 100766) durchläuft derzeit die Phase III der klinischen Erprobung, bei der es sich sowohl oral als auch intravenös durch gute Verträglichkeit auszeichnet. Als häufigste Nebenwirkungen wurden bräunliche Zungenverfärbungen und minderschwere follikulitisartige Hautreaktionen beschrieben; während bisher in keiner Studie Anhaltspunkte für kardiale, respiratorische, hämatologische oder biochemische Abnormalitäten gefunden wurden [42].

Chemisch gesehen handelt es sich bei dem Oxazolidinon Linezolid um ein fluoriniertes Morpholin-Derivat der Piperazin-Subklasse, bzw. genauer genommen um (S)-N-[[3-(3-Fluoro-4-morpholinylphenyl)-2-oxo-5-oxazolidinyl]-methyl]-acetamid. Die antibakterielle Aktivität des Wirkstoffes wird durch den Hydroxyacetyl-Anhang an das heterozyklische Nitrogen deutlich gesteigert. Darüber hinaus führt die fluorine Substitution an der Phenyl 3 Position zu einer erhöhten *in vitro* und *in vivo* Potenz des Antibiotikums. Bemerkenswert ist weiterhin, dass nur das Oxazolidinon Enantiomer mit der (5S)-Acetamidomethyl-Konfiguration antibakterielle Aktivität besitzt [16].

Wie zahlreiche andere Antibiotika wirken die Oxazolidinone durch eine Inhibition der prokaryotischen Proteinbiosynthese bakteriostatisch. Dabei ist der Wirkmechanismus der Oxazolidinone jedoch vollkommen neu und unterscheidet sich grundlegend von allen bislang bekannten antibakteriellen Wirkprinzipien, so dass er zur Zeit Gegenstand zahlreicher Untersuchungen ist. Es hat sich gezeigt, dass die Oxazolidinone bevorzugt an die 50S-Untereinheit des bakteriellen Ribosomes binden und dort die Bindung von Chloramphenicol und Lincomycin kompetitiv hemmen. Dabei zeigen sie jedoch im Unterschied zu diesen beiden Substanzen weder einen Effekt auf die Elongation noch auf die Termination, sondern entfalten ihre Wirkung ausschließlich während einer früheren Phase der Translation [89]. Diese sogenannte Initiationsphase beinhaltet die Synthese des für die Elongation benötigten 70S-Ribosomenkomplexes. Hierfür wird zunächst aus der 30S-Ribosomenuntereinheit, der mRNA und der Initiator-tRNA (N-Formylmethionyl-tRNA, fMet-tRNA) unter Einwirkung dreier Initiationsfaktoren ein 30S-Initiationskomplex gebildet, der anschließend durch die Verbindung mit der 50S-Ribosomenuntereinheit zum fertigen 70S-Ribosomenkomplex wird. In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass weder die Synthese der N-Formylmethionyl-tRNA, noch die Bildung des binären Komplexes aus IF2 und dieser fMet-tRNA, noch die unabhängige Bindung der mRNA oder der Initiator-tRNA zur 30S-Untereinheit durch die Anwesenheit von Oxazolidinonen gehemmt wird [133, 140]. Vielmehr scheinen die Oxazolidinone die Bildung des dreifaltigen Komplexes aus N-Formylmethionyl-tRNA, mRNA und 70S- oder

30S-Ribosomenuntereinheit zu verhindern [140]. Swaney *et al.* konnten zeigen, dass Linezolid die Formation des 30S-Initiations-Komplexes bei *E.coli* und des 70S-Initiations-Komplexes sowohl bei *E.coli* als auch bei *S.aureus* hemmt [140]. Die Bindungsstelle der Oxazolidinone liegt dabei vermutlich in der Nähe der Schnittstelle der 50S-Untereinheit mit der 30S-Untereinheit, wobei angenommen wird, dass die Bindung des Medikamentes eine Verziehung dieser Stelle bewirkt [89]. Obgleich die Bindungsstelle letztlich noch nicht bekannt ist, postulierten Swaney *et al.*, dass die Oxazolidinone möglicherweise die Bindungsstelle der Initiator tRNA, welche beide ribosomalen Untereinheiten überlappt, verzerren könnten [140]. Die Oxazolidinone wirken bakteriostatisch auf ein weites Spektrum gram-positiver Organismen, inklusive problematischer Pathogene wie Methicillin-resistente *S.aureus*, Penicillin-resistente *S.pneumoniae* und Vancomycin-resistente Enterokokken. Darüber hinaus zeigen sie auch eine Aktivität gegen Mykobakterien und einige Anaerobier, während gram-negative Keime keine, oder nur marginale Sensibilität aufweisen [42, 76, 78, 167]. Dies ist jedoch nicht in einer Differenz zwischen gram-positiven und gram-negativen Organismen auf ribosomaler Ebene begründet, sondern ist vielmehr eine Folge der geringen Permeabilität der gram-negativen Zellwand für die Wirkstoffgruppe der Oxazolidinone [51]. Beweisend hierfür ist die gute Aktivität der Antibiotika gegen *E.coli*-Stämme, deren Zellwand zuvor mittels Mutagenese permeabel gemacht wurde bei gleichzeitiger Inaktivität gegen klinische Isolate von *E.coli* [51, 133]. Linezolid und Eperezolid zeigen *in vitro* und *in vivo* Aktivitätslevel, die denen des bakteriziden Vancomycins entweder annähernd äquivalent oder aber unterlegen sind, wobei Eperezolid in einigen Fällen eine noch bessere Aktivität aufweist als Linezolid [42].

2 ZIELE DER ARBEIT

Das Auftreten Methicillin-resistenter *S.aureus* stellt im klinischen Alltag sowohl ein wichtiges therapeutisches als auch hygienetechnisches Problem dar. Durch die multiresistente Natur der meisten MRSA wird der therapeutische Spielraum zunehmend eingeengt und die Sicherheit gängiger, kommerziell verfügbarer Antibiotika muß in Frage gestellt werden. Nur durch eine genaue Überwachung der fortschreitenden Resistenzentwicklung, durch Untersuchungen der zugrundeliegenden Resistenzmechanismen, sowie durch eine Aufdeckung der epidemiologischen Verbreitungswege von MRSA, wird es in Zukunft möglich sein, adäquate Gegenmaßnahmen zu ihrer Eindämmung einzuleiten, die Kliniker über aktuelle Therapieoptionen zu informieren und die Forschung nach neuen Alternativtherapeutika voranzutreiben.

Um möglichst zuverlässige Aussagen über Resistenzraten, Resistenzentwicklungen, Resistenzmechanismen und Epidemiologie in Europa erzielen zu können, wurde ein sehr umfangreiches Kollektiv europaweit zusammengetragener klinischer *S.aureus*-Isolate als Untersuchungsmaterial gewählt.

Da ein Zusammenhang zwischen Methicillin-Resistenz und Resistenz gegenüber anderen Antibiotika bereits mehrfach beschrieben wurde, mußte zunächst der Anteil der bereits Methicillin-resistenten *S.aureus* am europäischen Gesamtkollektiv ermittelt, und die Entwicklung der Resistenzrate unter Berücksichtigung geographischer und fachrichtungsspezifischer Verteilungsmuster über den Zeitraum von einem Jahr beobachtet werden, um aktuelle und zukünftige Gefahren durch MRSA in Europa abschätzen zu können. Auf dieser Grundlage war es dann möglich Resistenzraten europäischer *S.aureus* gegenüber klassischen, therapeutisch häufig eingesetzten Antibiotika, wie Makroliden, Lincosamiden, Tetracyclinen und dem Rifampicin zu ermitteln und zu einer Methicillin-Resistenz in Relation zu setzen, um die Zuverlässigkeit dieser Antibiotika für MSSA und MRSA getrennt einschätzen zu können.

Während aus klinischer Sicht die Einsetzbarkeit der bekannten Therapeutika im Vordergrund steht, ist aus wissenschaftlicher Sicht das Verständnis der genetischen Grundlagen der Resistenz essentiell. Es stellte sich bei den klassischen Therapeutika die Frage ob den unterschiedlichen phänotypischen Resistenzmustern bei MSSA und MRSA auch differente genotypische Ausstattungen zugrunde liegen. Es wurde daher bei MLS_B-bzw. Tetracyclin-resistenten *S.aureus* die Prävalenz bekannter Resistenzdeterminanten (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA/msrB*, *ereA*, *ereB*, bzw. *tetK*, *tetM*, *tetL*, *tetO*) untersucht und anschließend die genetische Ausstattung von MSSA und MRSA verglichen. Ferner erfolgten Korrelationen mit MHK-Werten um die Auswirkungen der einzeln oder kombiniert auftretenden Resistenzdeterminanten auf

den Resistenz-Phänotyp quantifizieren zu können; aber auch um mögliche interindividuelle MHK-Wert-Variabilitäten bei identischer Gen-Ausstattung nachzuweisen. Bei Rifampicin-resistenten *S.aureus* Isolaten wurde das *rpoB*-Rif-Gen sequenziert, da einer Rifampicin-Resistenz nach heutigem Kenntnisstand Mutationen im Bereich dieses Genes zugrunde liegen. Es ist ferner bekannt, dass sich unter Rifampicin-Selektionsdruck *in vitro* rasch resistente Mutanten erzeugen lassen. Daher erfolgten neben den Analysen an Rifampicin-resistenten klinischen Isolaten auch Untersuchungen an *in vitro* gezüchteten Mutanten. So konnten zum einen Rifampicin-resistente MSSA und MRSA hinsichtlich etwaiger quantitativer und qualitativer Unterschiede ihrer Mutationen verglichen werden und zum anderen der Einfluß der Methicillin-Resistenz auf die spontane Mutationsrate und die Geschwindigkeit der Resistenzentwicklung untersucht werden.

Wegen zunehmender Resistenzen muß heute bei der Therapie von MRSA-Infektionen immer häufiger auf sogenannte Reservetherapeutika wie Aminoglykoside, Cotrimoxazol, Fosfomycin, Fusidinsäure und Vancomycin zurückgegriffen werden. Insbesondere das Vancomycin galt lange Jahre als letzte sichere therapeutische Option bei lebensbedrohlichen MRSA-Infektionen. Nach jüngsten Berichten von Vancomycin-intermediär-sensiblen *S.aureus* (VISA) in den USA und Japan muß nun aber auch die Sicherheit dieses Antibiotikums in Frage gestellt werden. Zur Beurteilung der Zuverlässigkeit der Reserve-Therapeutika bei MRSA-Infektionen in Europa erfolgten Resistenztestungen, welche bei Vancomycin auch ein Screening auf homogen und heterogen exprimierte VISAs umfaßten.

Als topisches Mittel der Wahl zur Eradikation von MRSA bei nasalem Trägerstatus gilt Mupirocin. Ziel war es auch hier die Zuverlässigkeit des Präparates in Europa zu überprüfen. Da zwei Resistenz-Phänotypen, eine harmlosere Low-level-Mupirocin-Resistenz und eine problematischere High-level-Mupirocin-Resistenz unterschieden werden, erfolgten hier separate Testungen auf beide Phänotypen mit anschließender Typisierung High-level-resistenter Isolate zur Aufdeckung epidemischer Verbreitungen.

Das Streptogramin-Mischpräparat Quinupristin/Dalfopristin (Synercid®) und das Oxazolidinon Linezolid könnten in der Zukunft wichtige Alternativtherapeutika in der MRSA-Therapie werden. Ziel war es somit noch vor ersten weitverbreiteten therapeutischen Einsätzen dieser neuen Präparate etwaige Resistenzen in Europa aufzudecken. Es wurden daher in zwei aufeinanderfolgenden Jahren umfassende Resistenztestungen durchgeführt. Nach dem Auftreten erster Synercid®-resistenter Stämme wurden diese hinsichtlich ihres Resistenz-Phänotyps näher analysiert und anschließend typisiert um klonale Verwandtschaften nachzuweisen und epidemische Verbreitungswege aufzudecken.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Bakterienisolate

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien-Isolate wurden in verschiedenen, am sogenannten ENARE (European Network of Antimicrobial Resistance and Epidemiology) Programm partizipierenden europäischen Universitätskliniken (Center) isoliert und gesammelt. Bei dem Anfang 1997 ins Leben gerufenen ENARE-Programm handelt es sich um eine longitudinale Studie zur europaweiten Überwachung prädominanter Pathogene und Resistenzmuster bei nosokomialen und ambulant erworbenen Infektionen. Die partizipierenden Universitätskliniken sammeln klinisch auffällige Bakterien-Isolate, spezifizieren sie nach den jeweils üblichen Routinemethoden und senden die Isolate dann monatlich zur weiteren Untersuchung an das Eijkman-Winkler-Institut der Universitätsklinik Utrecht. Während das ENARE-Programm im ersten Jahr (bis Februar 1998) nur 20 Universitätskliniken umfaßte, nahmen im zweiten Jahr (bis Januar 1999) bereits 25 Universitätskliniken in 15 verschiedenen europäischen Ländern an der Studie Teil (Tabelle 1).

Alle isolierten Keime stammten aus den Entnahmeorten Blut (A), Respirationstrakt (B), Lunge (C), Wundsekret (D) und Harntrakt (E), wobei jedoch nur ein Isolat pro Patient zugelassen wurde. Nach einer genauen Charakterisierung wurden die Keime im Eijkman-Winkler-Institut mit einer ID-Nummer versehen, archiviert und in Mikrobanken gelagert. Die ID-Nummer setzt sich aus drei Einzelkomponenten zusammen: einer zweistelligen Ziffer für die Kodierung des einsendenden Centers (Tabelle 1), einem Großbuchstaben für den Entnahmeort und einer dreistelligen laufenden Nummer (z.B. 01A511 = Linz, Blut, Lfd. Nr. 511).

Die Zahl der im Rahmen des ENARE-Programmes archivierten Bakterien-Isolate vergrößert sich fortwährend durch die monatlichen Einsendungen neuer Keime sowie das Aufnehmen neuer Center in die Studie. Da sich die verschiedenen Einzelstudien dieser Arbeit über einen Zeitraum von anderthalb Jahren erstreckten und bei jeder Untersuchung jeweils die größtmögliche Anzahl verfügbarer Bakterien, welche die erforderlichen Kriterien erfüllten, verwendet werden sollte, ergaben sich zwangsläufig je nach Zeitpunkt des Studienbeginns Unterschiede in der Gesamtzahl der Isolate.

Tabelle 1: An der ENARE Studie teilnehmende Universitätskliniken (Center)

Code	Namen	Stadt	Land
01	Krankenhaus der Elisabethinen	Linz	Österreich
02	Hôpital Erasme	Brüssel	Belgien
03	Hôpital St. Joseph	Paris	Frankreich
04	Hôpital de la Pitié-Salpêtrière	Paris	Frankreich
05	Hôpital Edouard Herriot	Lyon	Frankreich
06	A. Calmette Hôpital	Lille	Frankreich
07	Universitätskliniken Freiburg	Freiburg	Deutschland
08	Heinrich-Heine-Universität	Düsseldorf	Deutschland
09	National University of Athens	Athen	Griechenland
10	University of Genoa	Genova	Italien
11	University of Rome	Rom	Italien
12	University Hospital Utrecht	Utrecht	Niederlande
13	Sera and Vaccines Research Laboratory	Warschau	Polen
14	Jagiellonian University	Krakau	Polen
15	University Hospital of Coimbra	Coimbra	Portugal
16	University Hospital of Sevilla	Sevilla	Spanien
17	Hospital Ramón Y Cajal	Madrid	Spanien
18	Hospital de Bellvitge	Barcelona	Spanien
19	CHUV	Lausanne	Schweiz
20	St. Thomas Hospital Medical School	London	Großbritannien
21	University of Tirana	Tirana	Albanien
22	University of Ankara	Ankara	Türkei
23	University Hospital of Ankara	Ankara	Türkei
24	University Hospital of Istanbul	Istanbul	Türkei
25	University of Jerusalem	Jerusalem	Israel

Die Abfolge der Einzeluntersuchungen entsprach aus labortechnischen Gründen nicht unbedingt der chronologischen Abfolge der Darstellung in der Gesamtarbeit. Daher wird im weiteren auf den jeweiligen Untersuchungsbeginn, die Anzahl der zu dieser Zeit beteiligten Center, sowie auf die Größe des verwendeten Bakterienkollektives hingewiesen.

3.1.2 Reagenzien/Chemikalien

3.1.2.1 Flüssigstoffe und pulverförmige Substanzen

- Dextranblau/EDTA: 25mM EDTA pH 8,0; 50mg/ml DB
- Formamid (Verhältnis Formamid:DB/EDTA 5:1) (Amresco)

- Acrylamidgel (29:1): 40% ige Mischung aus Acrylamid und Bisacrylamid (29:1) in Aqua bidest. (29g Acrylamid, 1g Biusacrylamid) (Sigma)
- 10%ige Ammoniumpersulfat-Lösung = APS (Ambresco)
 - 1,0g Ammoniumpersulfat
 - 10,0ml H₂O
- 10 x conc. TBE-Puffer (für 1l)
 - 108,0g 890mM Tris Base
 - 55,0g 890mM Borsäure
 - 7,4g 20mM Na₂EDTA
- TEMED = N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (Ambresco)
- Bluemarker (6 x conc. Gelladungspuffer) (Gibco BGL)
 - Bromphenolblau (0,25% w/v) = BPB
 - Xylenecyanole FF (0,25% w/v)
 - Sucrose (40% w/v)
 - Mit Glycerin 1:1 verdünnt
- 1Kb DNA Molekulargewichtsmarker (10µl Aliquots mit 1µg Marker) (Gibco BGL)
 - 1,0µl Marker
 - 7,5µl Aqua bidest.
 - 1,5µl 6xBPB
- Ethidiumbromidlösung (10mg/ml) (BioRad)
- 10mM Tris-Cl (pH 8,5) (Merck)
- Salzsäure (Merck)
- Kaninchenvollblut und Schafsvollblut in EDTA (Charles River Wiga)
- Sphingomyelinase (Sigma)
- Mikrobank mit Kryolösung und porösen Keramik-Kügelchen (Pro-Lab)
- Post. BP-Kombo-Platte Typ 4E nach DIN (DADE Microcan)

3.1.2.2 Mikrobiologische und molekularbiologische Kits

Mikrobiologische Kits

- api-Staph® (bioMérieux)
- Bactident-Coagulase-Test® (Merck)
- Etest (AB BIODISK)

Kits für PCR und Sequenzierung

- Expand™ High Fidelity PCR System (Boehringer Mannheim)
 - Enzyme mix, high fidelity (Taq-Polymerase)
 - Expand HF buffer, 10 x conc. Without MgCl₂
 - MgCl₂ stock solution: 25mM MgCl₂
- PCR Nucleotide Mix (Boehringer Mannheim)
- Quiaquick PCR-Purification-Kit (Qiagen)
- ABI PRISM™ dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Premix) (Perkin Elmer)

PFGE-Kit

- GenePath Typing System® (Bio-Rad, Hercules, USA), Enzym Modul Kit Nr.1
 - Lyse-Puffer 1
 - Lysozyme/Lysostaphin (25mg/mL; 25mg/mL)
 - *Sma*1-Puffer
 - Restriktionsenzym *Sma*1 (5U/μL)

3.1.2.3 Antibiotika

Tabelle 2: Antibiotika als Festsubstanz

Antibiotika	Bezugsquelle
Ciprofloxacin	Bayer
Gentamicin	Sigma
Linezolid	DuPont
Moxifloxacin	Bayer
Mupirocin	SmithKline Beecham
Oxacillin	Fluka
Penicillin	Merck
Rifampicin	Fluka
RP59500 (Synercid;Quinupristin/Dalfopristin)	Rhône-Poulanc Rorer
Unacid (Ampicillin/Sulbactam)	Pfizer
Vancomycin	ICN

Tabelle 3: Antibiotikatestplättchen

Antibiotika	Bezugsquelle
Amikacin	Becton Dickinson
Clindamycin	Becton Dickinson
Erythromycin	Becton Dickinson
Fosfomycin	Becton Dickinson
Fusidinsäure	Oxoid
Gentamicin	Becton Dickinson
Mupirocin	Oxoid
5µg Plättchen (Low-Level-Resistenztestung)	
200µg Plättchen (High-Level-Resistenztestung)	
Oxacillin	Becton Dickinson
Rifampicin	bio Mérieux
Rp 59500 (Synercid®)	Rhône-Poulenc-Rorer
Tetracyclin	Becton Dickinson
Trimethoprim/Sulfamethoxazol	Becton Dickinson

3.1.2.4 Nährmedien

Die Angaben beziehen sich auf die Zusammensetzung in einem Liter destilliertem Wasser. Die Nährmedien wurden, wenn nicht anders beschrieben, 20min bei 121°C und 1,2bar autoklaviert.

Mueller-Hinton-Bouillon	Difco (Augsburg)
Rindfleisch, getrockneter Extrakt aus 300g	2,0g
Caseinhydrolysat:	17,5g
Stärke:	1,5g
pH:	7,4 ± 0,2
Mueller-Hinton-Agar	Difco (Augsburg)
Rindfleisch, getrockneter Extrakt aus 300g	2,0g
Caseinhydrolysat:	17,5g
Stärke:	1,5g
Agar:	12,0g
pH:	7,4 ± 0,2

Für die Methicillin-Resistenzbestimmung wurde dem Grundmedium 4% Na/Cl hinzugefügt. Zur Kultivierung der *S.aureus*-Stämme erfolgte der Zusatz von 100ml Schafsblut zum Grundmedium zur Herstellung eines Blutagars.

DNase-Agar	Oxoid (Hampshire, UK)
Tryptose:	20,0g
Desoxyribonucleinsäure:	2,0g
Natriumchlorid:	5,0g
Agar:	12,0g
pH:	7,3 ± 0,2
Brain-Heart-Infusion-Medium (BHI)	Difco (Augsburg)
37g des Extraktes enthalten:	
Kalbshirn, getrockneter Extrakt aus 200g	
Rinderherz, getrockneter Extrakt aus 250g	
Proteosepton	10,0g
D-Glucose	2,0g
Natriumchlorid	5,0g
Dinatriumhydrogenphosphat	2,5g

3.1.3 Oligonucleotidprimer

Die Auswahl der spezifischen Primersequenzen erfolgte anhand von Literaturangaben mit Modifizierung entsprechend der in der Genbank veröffentlichten Sequenzen. Alle Primer wurden nach den entsprechenden Vorgaben von den Firmen Interactiva Biotechnologie GmbH und GibcoBGL hergestellt. Referenzstämme wurden nach den Literatur-Vorgaben bestellt, oder mittels PCR und Sequenzierung selbst etabliert (*).

Methicillin-Resistenz

mecA

Referenz- *S.aureus* RN4221/pAT18
 5'Primer: 5' - GTT GTA GTA GTT GTC GGG TTT GG - 3'
 3'Primer: 5' - CTT CCA CAT ACC ATC TTC TTT AAC - 3'

coa

Referenz- *
 5'Primer: 5' - GCT TCT CAA TAT GGT CCG AG - 3'
 3'Primer: 5' - AGG AGG TGA TCC AAC CGC A - 3'

MLS-Resistenzgene

ermA

Referenz- *S.aureus* 1389
 5'Primer: 5' - TCT AAA AAG CAT GTA AAA GAA - 3'
 3'Primer: 5' - CTT CGA TAG TTT ATT AAT ATT AGT - 3'

ermB

Referenz- *Streptococcus pyogenes* 02C1061
 5'Primer: 5' - GAA AAG GTA CTC AAC CAA ATA - 3'
 3'Primer: 5' - AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC - 3'

ermC

Referenz- *S.aureus* RN4220/pE194
 5'Primer: 5' - TCA AAA CAT AAT ATA GAT AAA - 3'
 3'Primer: 5' - GCT AAT ATT GTT TAA ATC GTC AAT - 3'

msrA/msrB

Referenz- *S.aureus* RN4220/pAT10
 5'Primer: 5' - GCA AAT GGT GTA GGT AAG ACA ACT - 3'
 3'Primer: 5' - ATC ATG TGA TGT AAA CAA AAT - 3'

ereA

Referenz- *E.coli* von Plasmid piP1100
 5'Primer: 5' - AAC ACC CTG AAC CCA AGG GAC G - 3'
 3'Primer: 5' - CTT CAC ATC CGG ATT CGC TCG A - 3'

ereB

Referenz- *E.coli* DB10 von Plasmid pAT72
 5'Primer: 5' - AGA AAT GGA GGT TCA TAC TTA CCA - 3'
 3'Primer: 5' - CAT ATA ATC ATC ACC AAT GGC A - 3'

Tetracyclin-Resistenzgene

tetK

Referenz- *
 5'Primer: 5' - AGT ATA TGG AAA ATT ATC TG - 3'
 3'Primer: 5' - ACC CTT CAC CTA AAG CTA C - 3'

tetL

Referenz- *
 5'Primer: 5' - GAT ACT TGT TGA TAG AAG A - 3'
 3'Primer: 5' - GAT CAA TTT TGA ACT CTC TC - 3'

tetM

Referenz- *E.faecalis* JH2-2
 5'Primer: 5' - GAG CGA TTA CAG AAT TAG G - 3'
 3'Primer: 5' - CAG TTC TAC CTT CTG TTT G - 3'

tetO

Referenz- *E.coli* HB101 von Plasmid pAT121
 5'Primer: 5' - CAG TGA CAT CTT TTC AGT G - 3'
 3'Primer: 5' - CGT TCC GTT TTG GAA TCT C - 3'

Rifampicin-Resistenz

rpoB

Referenz *S.aureus* RN4220
 5'Primer: 5' - AGT CTA TCA CAC CTC AAC AA - 3'
 3'Primer: 5' - TAA TAG CCG CAC CAG AAT CA - 3'

3.1.4 Apparaturen

- PE Cetus DNA Thermocycler (Perkin Elmer)
- DNA-Sequenzer 377 (ABI-Prism)
- Elektrophoresekammer, Steuergerät, Kühlmodul und Pumpe für PFGE (GenePath®-System) (Bio-Rad)
- Prompt Inokulationssystem = DADE (MicroScan®)
- ELISA-Reader (Labsystem)
- Spektralphotometer (LKB, Pharmacia, Riele)

3.2 Methoden

3.2.1 Mikrobiologische Methoden

3.2.1.1 Anzucht von Bakterien

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

3.2.1.2 Bakterienkonservierung

Zur Gewährleistung einer sicheren Konservierung der Bakterien wurden einzelne Kolonien der Stämme steril auf eine Mikrobank (ProLab) überführt und nach Vorschrift des Herstellers gelagert. Die sterilen Kryogefäße enthalten ein spezielles Medium sowie säurebehandelte Kügelchen mit poröser Oberfläche, an welche Bakterien vollständig binden. Die Lagerung der Kulturen erfolgte bei -70°C. Bei der Anzüchtung der Bakterien in Flüssigmedium und dem Ausstreichen auf Agarplatten kamen die aufgetauten Kügelchen zur Anwendung.

3.2.1.3 Messung des Bakterienwachstums

Das Wachstum von Bakterienstämmen wurde bei einer optischen Dichte von 623nm mit einem Spektralphotometer, oder alternativ mit dem ELISA-Reader, ermittelt. Als Referenz diente jeweils das entsprechende unbeimpfte Medium.

3.2.1.4 Identifizierung von *S.aureus*

Obwohl alle über die ENARE-Studie bezogenen Bakterienisolate bereits von den einsendenden Kliniken identifiziert und charakterisiert wurden, wurde bei allen in dieser Arbeit verwendeten Isolaten noch einmal eine Bestätigung der Speziesdiagnose mittels dreier verschiedener Verfahren durchgeführt.

Katalase-Test

Für den Katalase-Test wurden Bakterien des zu identifizierenden Isolates in Wasserstoffperoxid verrieben. Bei Katalase-positiven Bakterien sollten Gasblasen aufsteigen, da Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff reduziert wird ($2 \text{ H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{ H}_2\text{O} + \text{O}_2$).

Nuclease-Test (DNase-Test)

Der Nachweis der Nuclease wurde mit Hilfe des DNase-Agars durchgeführt. Der Test beruht auf der Hydrolyse der im MH-Nährmedium enthaltenen DNA in kurzkettige Polynucleotide, welche durch die von *S.aureus* gebildete DNase katalysiert wird. Eine Kolonie der zu untersuchenden Isolate wurde zusammen mit einer Positiv- und Negativkontrolle auf eine DNA-haltige Agarplatte mit der Impföse ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurde der Nährboden mit 1M HCL überschwemmt, so dass ungespaltene DNA durch Präzipitation als Trübung des Mediums sichtbar wurde. Bei DNase-positiven *S.aureus*-Stämmen blieb diese Trübung aus.

Biochemische Nachweismethode

Die Isolate wurden mit Hilfe des api® Staph-System (bioMérieux), bei dem es sich um ein miniaturisiertes System zur biochemischen Keimidentifizierung handelt, nach Anleitung des Herstellers charakterisiert.

3.2.1.5 Antibiotika-Resistenztestung

Agar-Diffusionstest

Die Resistenzuntersuchungen der aufgeführten Antibiotika wurden nach DIN 58940 bzw. z.T. auch nach NCCLS-Richtlinien durchgeführt.

Eine Kolonie des zu testenden Bakteriums wurde in 10ml 0.9%iger NaCl-Lösung suspendiert und 0,5ml dieser Suspension auf einer MH-Agarplatte ausplattiert. Anschließend wurde ein entsprechendes Antibiotika-Testplättchen aufgelegt und die Platte bei 37°C für 24h inkubiert. Anhand der sich durch die Diffusion des Antibiotikums in dem Agar ausbildenden Hemmhöfe und der Grenzwertdichte aus der DIN-Vorschrift konnten Aussagen über die Resistenzlage des Bakteriums gegenüber dem getesteten Antibiotikum gemacht werden. Es erfolgte eine Einteilung in „sensibel“ (S), „intermediär“ (I) oder „resistent“ (R).

Die Resistenztestung gegenüber Oxacillin erfolgte auf separaten MH-Agarplatten, um eine Beeinträchtigung der Ergebnisse anderer Antibiotikatestungen durch die speziellen, für die Detektion von MRSA gewählten, Bedingungen auszuschließen. Um auch Subpopulationen innerhalb sensibler Stämme detektieren zu können erfolgte die Bebrütung bei 30°C über einen Zeitraum von 48h um dem langsameren Wachstum der resistenten Kolonien Rechnung zu tragen. Desweiteren wurde dem Nährmedium zur Erhöhung des osmotischen Druckes und damit zur Förderung der Expression einer Resistenz 4% NaCl zugefügt. Der pH Wert betrug über 5,2, da unterhalb dieses Wertes eine Resistenz unterdrückt wird. Schließlich wurde noch

die Inokulummenge sehr hoch gewählt, um die Wahrscheinlichkeit der Detektion resistenter Subpopulationen zu erhöhen.

Eine weitere Besonderheit stellte die Bestimmung der Mupirocin-Resistenz mittels Agar-Diffusionstest dar, weil hierbei zwischen einer Low-Level- und einer High-Level-Mupirocin-Resistenz unterschieden werden musste. Es kamen demnach zwei verschiedene Arten von Testplättchen mit unterschiedlichen Mupirocin-Konzentrationen (5µg und 200µg Mupirocin pro Plättchen) zur Anwendung. Zur Testung hinsichtlich einer Low-Level-Mupirocin-Resistenz wurde ein 5µg Mupirocin-Plättchen aufgelegt. Hemmhof-Grenzwerte wurden nach der Empfehlung von Finley *et al.* für sensibel bei $\geq 14\text{mm}$, und für resistent bei $\leq 13\text{mm}$ festgesetzt. Bei Isolaten mit einem Hemmhof von $\leq 13\text{mm}$ wurden MHK-Testungen mittels Mikrodilutions-Methode durchgeführt, wobei Doppelansätze mit Mupirocin-Dilutionen von 1 bis 2048µg/ml benutzt wurden. Eine High-level-Mupirocin-Resistenz wurde durch Verwendung eines 200µg Mupirocin-Plättchens bestätigt. Es kamen durchweg DIN-Richtlinien mit entsprechenden Hemmhof -Grenzwerten zur Anwendung.

Bestimmung der Minimalen-Hemmkonzentration (MHK)

Der MHK-Wert gibt die Antibiotikakonzentration an, bei der kein sichtbares Bakterienwachstum im Nährmedium mehr vorhanden ist. Jeder einzelne Bakterienstamm besitzt einen, für ihn spezifischen, MHK-Wert. Die MHK-Werte wurden mit Hilfe des Mikrodilutionsverfahrens in Zweierpotenzschritten bestimmt und in mg/l angegeben. Eine mit einer 24h alten Bakterienkolonie beimpfte Übernachtskultur in MH-Bouillon wurde unter photometrischer Messung bei 535nm durch Verdünnung auf eine optische Dichte von 0,1 eingestellt. Von dieser Konzentration ausgehend erfolgte eine weitere 1:300 Verdünnung mit doppelt konzentrierter MH-Bouillon. Von den verwendeten Antibiotika wurde eine Stammlösung in den entsprechenden Lösungsmitteln angesetzt, welche das vierfache der höchsten zu testenden Antibiotikakonzentration enthielt.

Der Versuchsansatz erfolgte in 96-Well-Mikrotiterplatten (8 x 12 Löcher) mit F-Bodenform, wobei zunächst 100µl steriles bidest. H₂O in jedes Loch gegeben wurden. Die sich anschließende Antibiotikaverdünnungsreihe wurde erstellt, indem 100µl der Antibiotika-Stammlösung in das Loch der obersten 12er-Reihe eingefüllt, und mit dem vorgelegten H₂O durchmischt wurden (Verdünnung 1:2). Das Entnehmen von 100µl aus diesem Loch und Einfüllen in das nächsttiefere Loch gewährleistete eine 1:2 Verdünnung der höchsten Testkonzentration. Dieser Verdünnungsvorgang wurde wiederholt, bis die niedrigste zu testende Antibiotikakonzentration erreicht war. Nach Beendigung aller Antibiotikaverdünnungsreihen

wurde jedes Loch mit 100µl der verdünnten Bakteriensuspension beimpft (nochmalige 1:2 Verdünnung). Die Endkonzentration der Bakterien pro Ansatz betrug schließlich ca. $1-3 \times 10^4$ Kolonien pro ml.

Zur Qualitätskontrolle des Tests wurde jeweils ein Ansatz ohne Antibiotikum sowie ein Referenzstamm mit bekanntem MHK-Wert für das entsprechende Antibiotikum mitgeführt. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Nach 16-24h Inkubation der Ansätze bei 37°C wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 535nm im ELISA-Reader (Labsystem) gemessen und der MHK-Wert bestimmt.

MicroScan Walk Away 96 System (= DADE)

Hierbei handelt es sich um einen Computer-gestützten Vollautomaten zur Inkubation von Mikrotiterplatten, welcher die Ergebnisse der biochemischen Identifikation und Resistenzbestimmung von Mikroorganismen selbstständig durch eine photometrische bzw. fluorometrische Messung auswertet. Es kamen gebrauchsfertige konventionelle gram-positive Platten (Pos BP-Kombo 4E) zur Anwendung. Die Mikrotiterplatten beinhalten Testfelder, die mit spezifischen Substanzen gefüllt sind. Die Summe der Reaktionen dieser Substanzen mit den zu untersuchenden Bakterien geben Aufschluss über die Bakterienspezies und führen zu einer biochemischen Identifizierung. Ferner enthalten die Platten Testfelder zur Antibiotika-Resistenztestung im Sinne einer MHK-Wert Bestimmung, wobei im Kontext dieser Arbeit vor allem die Ermittlung des MHK-Wertes für Vancomycin und für Teicoplanin von Bedeutung war. Somit war zum einen eine Bestätigung der Identität des entsprechenden Keimes als *S.aureus* und zum anderen die Vancomycin-Resistenzbestimmung mit Bestimmung des MHK-Wertes möglich. Bei den gram-positiven Bakterien erfolgte die Bestimmung anhand des Mikrodilutionsverfahrens, wobei die Testfelder einer Mikrotiterplatte mit einer standardisierten Keimsuspension der zu untersuchenden Bakterien beimpft, bei 35°C bebrütet, und hierbei einer qualitativen Empfindlichkeitsbestimmung unterzogen wurden. Die Bebrütung dauerte 16 bis 42 Stunden. Anschließend wurden die Abweichungen der Resultate der Resistenzbestimmung von den vorgegebenen Normalwerten berechnet.

Etest

Der Etest® ist ein quantitatives Testsystem der Firma AB Biodisk zur Antibiotika-Sensibilitäts-Bestimmung bei zahlreichen gram-negativen und gram-positiven Bakterien. Das System liefert gut reproduzierbare MHK-Wertbestimmungen unter Ausnutzung einer Kombination der beiden Konzepte von Dilutions- und Diffusionstests.

Der Etest besteht aus einem 5mm breiten und 60mm langen dünnen, inerten, nicht porösen Plastikstreifen, welcher auf der einen Seite mit einer MHK-Skalierung und einem Kürzel des jeweiligen Test-Antibiotikums versehen ist und auf der anderen Seite einen vordefinierten, stabilen Antibiotikakonzentrationsgradienten enthält. Bei Aufbringen dieses Streifens auf eine beimpfte Agarplatte, wird das Antibiotikum sofort und effektiv in die Agar-Matrix freigesetzt und es entwickelt sich ein kontinuierlicher und exponentieller Antibiotikakonzentrationsgradient unter dem Streifen. Nachdem durch Bebrütung ein sichtbares Bakterienwachstum erreicht wird, zeigt sich, zentriert entlang des Streifens, eine symmetrische Inhibitions-Ellipse. Anhand des Schnittpunktes der Ellipsenspitze mit dem Streifen kann der MHK-Wert (in µg/ml) ermittelt werden.

Alle Antibiotika Sensibilitätstestungen mit dem Etest System wurden nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt.

Methicillin-Resistenztestung

Zur Detektion einer Methicillinresistenz können sowohl Methoden der klassischen Empfindlichkeitsprüfung als auch molekularbiologische Verfahren mit Nachweis des Resistenzgenes *mecA* (s. 3.2.2.2) zur Anwendung kommen.

Die klassischen mikrobiologischen Testverfahren (s. 3.2.1.5) umfassen den Agar-Diffusionstest, die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration mittels Mikrodilutionsverfahren und die Verwendung von Screeningplatten. Obgleich sich international der Terminus Methicillin-resistenter *S.aureus* eingebürgert hat, wird Methicillin heute in der Humanmedizin und im Labor aufgrund mangelnder Stabilität nicht mehr verwendet. Statt dessen kommt bei der Resistenzbestimmung das ebenfalls β -Lactamase-feste, aber stabilere Oxacillin zur Anwendung. Für das Screening auf eine Oxacillin-Resistenz wird eine Suspension des zu untersuchenden Bakteriums auf einer mit 5% NaCl und 6g/l Oxacillin supplementierten Agarplatten ausgestrichen und nach Bebrütung das Zellwachstum beurteilt. Werden dabei Kolonien sichtbar, so gilt der Stamm qua definitionem als resistent.

Vancomycin-Sensibilitätstestung

Neben der Mikrodilutionsmethode, dem Etest mit Vancomycin-Strips und dem MicroScan (Dade Behring)-System (s. 3.2.1.5), kam zur Vancomycinsensibilitätstestung noch eine von Hiramatsu *et al.* [67] beschriebenen Screening-Methode zur Testung auf einen Hetero-VISA-Status zur Anwendung.

Bei der von Hiramatsu *et al.* entwickelten Methode zum Screening auf einen Hetero-VISA-Status, erfolgte zunächst die Inokulation eines Aliquots auf eine BHI-Agar-Platte, welche Vancomycin in einer Konzentration von 4mg/l enthielt. Die Platte wurde bei 37°C für 48h inkubiert, wobei das Zellwachstum jeweils nach 24h und 48h beurteilt wurde. Konnte innerhalb von 48h kein Zellwachstum verzeichnet werden, wurde der Stamm als Vancomycin-sensibel bezeichnet. Als potentiell Vancomycin-resistenter *S.aureus* wurde ein Stamm mit konfluentem Zellwachstum nach 24h eingestuft. War innerhalb von 48h eine zählbare Anzahl an Kolonien vorhanden, wurde der Stamm als möglicher Hetero-VISA bezeichnet. Der Hetero-VISA-Status wurde als definitiv bezeichnet, wenn der Stamm unter Vancomycin-Selektionsdruck Subklone mit MHK-Werten von 8mg/l oder darüber bildete und außerdem im antibiotikafreien Medium eine Stabilität über 9 Tage zeigte.

3.2.1.6 Spontane Mutationsrate

Zur Ermittlung der spontanen Mutationsrate unter Rifampicin-Einfluss wurde 0,1ml einer 50ml Übernachtskultur in ISO-Sensitest-Bouillon auf ISO-Sensitest-Agarplatten, die jeweils Rifampicin mit einer 2-, 3- oder 4-fachen Konzentration des MHK-Wertes enthielten, ausplattiert.

Parallel dazu wurde zur Bestimmung der Lebendkeimzahl eine Verdünnungsreihe (9 Verdünnungsstufen, 1:10) von der Bakteriensuspension hergestellt und 0,1ml von jeder Verdünnung auf ISO-Sensitest-Agarplatten ohne Antibiotikazusatz ausgestrichen.

Die Platten wurden bei 37°C inkubiert und die Anzahl der Kolonien auf den ISO-Sensitest-Agarplatten bestimmt. Die spontane Mutationsrate entsprach dem Quotienten aus der Gesamtzahl der lebensfähigen Kolonien und der Anzahl der resistenten Kolonien. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden MHK-Bestimmungen durchgeführt.

3.2.1.7 Herstellung von „multistep“-Mutationen

Die Entwicklung einer Rifampicin-Resistenz durch „multistep“-Mutationen wurde durch 10-tägige Inkubation in Rifampicin-haltigem Medium untersucht.

Am ersten Tag wurden in sieben Reagenzgläsern je 9,5ml BHI-Medium, 0,1ml einer über Nacht kultivierten Bakteriensuspension ($OD_{623nm}=0,7$) und 0,5ml einer Rifampicinverdünnung eingefüllt. Die Rifampicin-Konzentrationen der Teströhrchen reichten vom 4-fachen MHK-Wert (1. Röhrchen) bis zum 0,125-fachen MHK-Wert (7. Röhrchen). Die Röhrchen wurden über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am zweiten Tag wurde das Bakterienwachstum mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 623nm bestimmt. Anschließend wurden je 0,1ml derjenigen Bakteriensuspension mit der höchsten Rifampicin-Konzentration,

die noch sichtbares Wachstum erlaubte, zur Beimpfung der nächsten Verdünnungsreihe verwendet. Dieser Vorgang wurde bis zum 10. Tag wiederholt.

Anschließend erfolgte eine Bestimmung der MHK-Werte und eine Sequenzierung der Resistenzdeterminante *rpoB*.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 Nucleinsäurechromatographie

Agarosegelelektrophorese

Dieses Verfahren dient der Überprüfung der Länge des PCR-Produkts und der Abschätzung der DNA-Menge nach der Sequenzierreaktion.

Das Prinzip der gelelektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten beruht auf der Tatsache, dass durch das Anlegen einer elektrischen Spannung (Gleichstrom) auf einem Gel aufgetragene, elektronegativ geladene DNA-Moleküle in einer Pufferlösung abhängig von ihrer Größe in unterschiedlicher Geschwindigkeit zur Anode wandern. Je kürzer bzw. leichter ein Fragment ist, um so weiter wandert es innerhalb einer bestimmten Zeit auf dem Gel. Neben der Fragmentgröße bestimmen auch die Stromstärke sowie die Konzentration der verwendeten Gele die Wanderungsgeschwindigkeit und damit die Dauer der Auftrennung.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte unter Verwendung von 1%-igen Agarosegelen in 1 x TBE Puffer bei einer Spannung von 80V. Um den Verlauf der Elektrophorese sichtbar zu machen, wurde den aufzutragenden Proben ein Bluemarker, bestehend aus Bromphenolblau, welches im elektrischen Feld mitwandert, und Glycerin beigelegt. Glycerin beschwerte die Proben und gewährleistet damit deren Verbleib in den vorgesehenen Bahnen. Außerdem wurde zur Bestimmung der Konzentration und der Größe der erhaltenen Fragmente ein synthetisch hergestellter Molekulargewichtsmarker (1 kb-Leiter, GibcoBRL), der sich in der Elektrophorese nach definierten Molekülgrößen auftrennte, als DNA-Längenstandard verwendet.

Die Herstellung des Elektrophorese-Gels bestand in einem Aufkochen von 100ml TBE-Puffer mit 1g Agarosepulver sowie anschließendem Hinzufügen von 40µl Ethidiumbromid und blasenfreiem Hineingießen in einen hierfür vorgesehenen Gelschlitten aus Plexiglas. Da Ethidiumbromid unter UV-Licht fluoresziert und gleichzeitig die Eigenschaft besitzt, DNA mittels Interkalation zu markieren, wurde somit eine Detektion der aufgetrennten DNA-Fragmente mittels UV-Durchleuchtung ermöglicht. Ein Versehen des Gels mit entsprechenden Kunststoffkämme führte zur Bildung von 2 x 20 Slots in welche später die Proben eingefüllt wer-

den konnten. Bei Inbetriebnahme der Elektrophorese lag das Gel auf einem Schlitten, der in ein Pufferreservoir hineinragte und vollständig von Pufferflüssigkeit bedeckt wurde.

Nach Ablauf der elektrophoretischen Auftrennung wurde die DNA zunächst unter dem UV-Transluminator bei 340nm sichtbar gemacht und das Ergebnis anschließend mittels Modul-Digit-Store Gerät (Intras) dokumentiert.

Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Die Puls-Feld-Gel-Elektrophorese ist ein Verfahren zur genotypischen Charakterisierung von Erregern, mit deren Hilfe Bakterienstämme hinsichtlich einer klonalen Verwandtschaft untersucht werden können. Unter Verwendung der konventionellen Agarose-Gelelektrophorese ist nur eine größenabhängige Auftrennung von DNA-Molekülen mit bis zu 40-50 Kilobasen möglich, da bei DNA-Fragmenten, die diese Größe überschreiten, das Phänomen der sog. "reptation" auftritt. Hierunter wird eine longitudinale Ausrichtung großer Moleküle verstanden, die auf der Tatsache beruht, dass die Porengröße im Agarosegel für eine rein horizontale Wanderung hin zur Anode zu klein ist. Mit der Technik der Pulsfeld-Gelelektrophorese hingegen ist es möglich, größere DNA-Fragmente, auch mit mehr als 1000 Kilobasen, aufzutrennen. Dies wird durch die Verwendung eines multidirektionalen elektrischen Feldes mit wechselnden Polen und elektrischen Pulsen unterschiedlicher Dauer erreicht. Da die DNA-Moleküle in einer ausgestreckten mobilen Konformation wandern, müssen sie ihre Ausrichtung im Gel ständig ändern, um sich in Feldrichtung neu zu orientieren. Große Moleküle benötigen mehr Zeit für die durch das Wechselfeld induzierte Lageänderung als kleinere Moleküle. Demnach verbleibt mit zunehmender Größe der Moleküle eine immer kürzere Zeitspanne für die Wanderung in Feldrichtung, woraus sich die bei der PFGE zu beobachtende Auftrennung nach dem Molekulargewicht der linearen DNA-Moleküle ergibt. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird außerdem von der Stärke des elektrischen Feldes, von der Pulszeit, von dem Winkel und der Konfiguration des elektrischen Feldes, von der Temperatur und Ionenstärke des Gels und des verwendeten Puffers, sowie von der Spezifikation und Konzentration der Agarose mitbestimmt. Dabei sind die Pulszeit und die Stärke des elektrischen Feldes die entscheidenden Parameter, welche den Molekulargewichtsbereich der auftrennbaren DNA-Fragmente festlegen. Somit ist es verständlich, dass bei einer Zunahme beider Parameter auch größere Moleküle getrennt werden können.

In dieser Arbeit wurde zur Puls-Feld-Gel-Elektrophorese das GenePath Strain Typing System® (BioRad) eingesetzt. Mit diesem Gerät ist laut Hersteller eine gut reproduzierbare PFGE möglich, da nur konfektionierte Reagentsätze zur Anwendung kommen und alle

Versuchsbedingungen standardisiert vorgegeben sind. Dabei sind die jeweils zu verwendenden optimierten, spezifischen und standardisierten PFGE-Programme für die einzelnen Bakterienspezies im Gerät eingespeichert.

Die mit Hilfe des GenePath Strain Typing System® zu analysierenden Proben wurden über Nacht auf Bultagar kultiviert. Anschließend erfolgte die Überimpfung einer Einzelkolonie in ein mit Brain-Heart-Medium gefülltes Kulturröhrchen und eine 16-20stündige Bebrütung in einem Schüttelinkubator. Das Zellwachstum wurde durch eine Bestimmung der optischen Dichte des Ansatzes photometrisch kontrolliert. Ca. 5×10^8 Zellen/ml wurden nun in ein Agarose-Blöckchen eingebettet und *in situ* mit Detergenzien, Proteasen und Lysozym lysiert und entproteinisiert. Die Agarosematrix gewährleistete einen Schutz des intakten Bakterienchromosomes vor Scherkräften, bei gleichzeitiger Permeabilität für alle verwendeten Reagentien, wodurch u.a. die Handhabung der Proben vereinfacht wurde. Vor der Elektrophorese konnten die DNA-Agaroseblöcke so leicht in die vorgesehenen Probenvertiefungen im Gel eingelegt werden.

Für das GenePath-Strain-Typing-System® wurden 4 spezielle Reagentsätze entwickelt, die für unterschiedliche Bakterien spezifische Restriktionsendonucleasen, optimierte Puffer und spezielle Proteinasen enthalten. Die im Test eingesetzten, selten schneidenden Restriktionsendonucleasen erzeugen 10-20 Fragmente je Bakterienchromosom. Bei den im Rahmen dieser Arbeit zu analysierenden Staphylokokken, die viele Adenin- und Thymin-Basen in ihrer DNA enthalten, wurde die Restriktionsendonuclease *SMAI* eingesetzt, die eine charakteristische DNA-Sequenz erkennt (CCCGGG) und entsprechend wenig (<20) DNA-Fragmente durch Restriktion herstellt. Die aus den Schnittstücken der Restriktionsenzyme resultierenden 10-20 Fragmente konnten nun mittels PFGE aufgetrennt werden, wobei die im Rahmen des GenePath-Strain-Typing-System® eingesetzte Pulstechnik als "Contour-Clamped-Homogenous-Electric-Field-Elektrophoresis" bezeichnet wird. In diesem System sind 24 Elektroden horizontal auf einem hexagonalen Rahmen in der Elektrophoresekammer angeordnet. Die separate Ansteuerung der Elektroden ermöglicht graduell abfallende Potentiale, durch die ein homogenes elektrisches Feld in der Kammer aufgebaut wird.

Nach Ablauf der Elektrophorese erfolgte eine Einfärbung des Gels mit Ethidiumbromid und die anschließende Auswertung mit Hilfe des GelCompar® (Applied Maths, Kortrijk, Belgien). Das resultierende Bandenmuster wurde für die genetische Identifikation der Erreger herangezogen, wobei eine Analyse der Verwandtschaftsgrade durch Korrelation der Bandenmuster in Dendrogrammen erfolgte. Dabei galten zwei Keime als klonal identisch, wenn 80% ihrer Bandenmuster miteinander übereinstimmten.

Die Gesamtdauer des Ansatzes, beginnend mit der Kultur und endend mit dem Dokumentationsfoto, betrug 58h, wobei dies die Maximalzeit darstellte, die zur besten Bandentrennung führte.

3.2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein hochempfindliches *in-vitro*-Verfahren zur enzymatischen Amplifikation von DNA-Fragmenten und aufgrund ihrer hohen Spezifität eine elegante Methode zum Nachweis bestimmter Nucleinsäureabschnitte in einem zu untersuchenden DNA-Template. Das Prinzip entspricht dabei der DNA-Replikation *in-vivo*.

Für die DNA-Amplifikation, wurden Doppelansätze aus dem Enzym DNA-Taq-Polymerase, einem Paar synthetischer DNA-Oligonukleotid-Primer, vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten (Adenin-, Guanin-, Cytosin- und Thymintriphosphat) sowie dem DNA-Material in Form von Lysaten der zu untersuchenden Bakterien nach einer Standardmethode gewählt. Zur Gewinnung der Bakterien-Lysate erfolgte das wiederholte Einfrieren und Auftauen einer zuvor hergestellten Suspension aus ca. 5 Bakterienkolonien in 100µl bidest. H₂O bei -20°C bzw. Raumtemperatur über mindestens 5 Zyklen.

Bei jeder PCR wurde zur Qualitätssicherung eine Negativkontrolle mit komplettem Reaktionsansatz jedoch ohne Bakterien-DNA mitgeführt.

Die verwendete thermostabile DNA- Polymerase aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* verknüpfte die einzeln angelagerten Nucleotide zu einem kontinuierlichen Strang und war somit für die eigentliche DNA-Neusynthese verantwortlich. Die Sequenzen der Primer wurden so gewählt, dass sie antiparallel zueinander an beide Stränge der DNA hybridisierten, so dass nur der gewünschte DNA-Abschnitt amplifiziert wurde. Um ein stabiles Gemisch mit optimalen Reaktionsbedingungen zu gewährleisten, wurden dem Ansatz zum einen eine geeignete Pufferlösung und zum anderen Magnesiumchlorid, welches von der Taq-Polymerase zur DNA-Strangverknüpfung benötigt wird, hinzugegeben. Schließlich wurde der Ansatz zum Schutz vor Verdunstung mit zwei Tropfen Mineralöl überschichtet.

Die Ansätze erfolgten nach Angaben aus der Literatur und nach eigener Optimierung.

Tabelle 4: PCR-Protokoll

Reagenzien (in µl)	<i>ermA, msrA, mefA/mefE, ereA, ereB, tetK, tetL, tetM tetO</i>	<i>ermB, ermC, mecA</i>	<i>coa, rpoB</i>
Wasser:	29,8	33,8	33,4
10X PCR-Puffer:	5,0	5,0	5,0
Magnesiumchlorid:	8,0 (2mM)	4,0 (2mM)	5,0 (2mM)
dNTP-Mix:	2,0 (10mM/dNTP)	2,0 (10mM/dNTP)	2,0 (10mM/dNTP)
3'Primer:	2,0 (10pmol/µl)	2,0 (10pmol/µl)	2,0 (10pmol/µl)
5'Primer:	2,0 (10pmol/µl)	2,0 (10pmol/µl)	2,0 (10pmol/µl)
Taq-DNA-Polym.:	0,6 (3,5Units/µl)	0,6 (3,5Units/µl)	0,6 (3,5Units/µl)
DNA-Zellysat:	0,6	0,6	0,6

Die eigentliche Polymerasekettenreaktion bestand aus drei ineinander übergehenden Schritten und lief automatisch im Thermocycler 4800 (PerkinElmer) ab, der für Temperaturenwechsel und Haltezeiten je nach Bedarf programmiert werden konnte. Auf den ersten Schritt, die Denaturierung, folgten der Amplifizierungszyklus als Phase der eigentlichen exponentiellen Vervielfältigung der DNA-Zielsequenz und schließlich als dritter Schritt die Polymerisation.

Während der Denaturierungsphase, die bei einer Temperatur von 96°C ablief, erfolgte eine Auftrennung der DNA-Doppelhelix in ihre Einzelstränge. Da keine reine isolierte DNA, sondern Lysate aus ganzen Bakterienkolonien verwendet wurden, betrug die Dauer dieses Schrittes 8 Minuten. Der sich nun anschließende Amplifizierungszyklus gliederte sich in drei Phasen, die insgesamt 28 mal wiederholt wurden. Nach einer erneuten Denaturierungsphase bei 96°C für 55sec, schloss sich der Schritt des Primer-Annealings an, wobei durch Abkühlung der Temperatur die Hybridisierung der Primer an die Matrizenstränge erfolgte. Die Temperatur und Dauer dieser Phase richteten sich nach den verwendeten Primern und stellten das Optimum für die Anlagerung der Primer dar. Die eigentlichen DNA-Synthese, mit dem Ziel einer Verdoppelung der Sequenz, erfolgte im letzten Schritt des Amplifizierungszyklus, der Polymerisation. Sie lief bei 72°C ab und dauerte 70sec. Die zeitliche Dauer dieses Schrittes hing von der Länge des DNA-Produktes ab und errechnete sich nach dem Verhältnis: 1Kb/min, wobei 30sec das Zeitminimum darstellten.

Durch mehrfache Wiederholung des Amplifizierungszyklus wurde eine exponentielle Vervielfältigung der Zielsequenz erreicht. Nach Ablauf aller 28 Zyklen schloß sich noch eine weiterer Polymerisation an, in der die Synthese noch unvollständig hergestellter DNA-Produkte nachträglich abgeschlossen werden konnte. Dieser zusätzliche Sicherheitsschritt lief

bei 72°C ab und dauerte 5min. Nach Abschluß der Polymerase-Kettenreaktion wurden die Ansätze im Thermocycler automatisch auf 4°C heruntergekühlt um weitere Reaktionen zu vermeiden.

Tabelle 5: PCR: Bedingungen

Denaturierung:	t = 8min	T = 96°C
30 Zyklen:	Denaturierung: t = 55s	T = 96°C
	Annealing: t = 65s	T = 52°C
	Extension: t = 70s	T = 72°C
Restextension:	t = 5min	T = 72°C
Kühlung:		T = 4°C

Anschließend erfolgte eine gelelektrophoretische Analyse (s. 3.2.2.1) der PCR-Produkte, wobei jeweils eine Mischung von 8µl der Proben mit 4µl Bluemarker sowie 5µl des 1Kb DNA-Molekulargewichtsmarkern in getrennten Bahnen auf ein Gel aufgetragen wurden. Durch den DNA-Marker war bei bekannter geforderter Länge des DNA-Produktes ein Vergleich mit der entsprechenden Bande des Molekülgewichtsmarkern zur Erfolgskontrolle der PCR möglich.

3.2.2.3 Aufreinigung

Sollten die während der Polymerase-Kettenreaktion amplifizierten DNA-Fragmente anschließend mittels Sequenzierung näher untersucht werden, mussten sie zunächst durch eine Aufreinigung von den in der PCR hinzugefügten Substanzen wie Primer, Nukleotide, Salze, Taq-Polymerase und Öl befreit werden.

Dies geschah mit Hilfe des PCR-Purification-Kit (Qiagen), wobei als erster Schritt eine Vermischung des PCR-Produktes inklusive des Mineralöls mit 300µl PB Puffer stattfand. Anschließend wurde das entstandene Gemisch in eine Aufreinigungssäule (Quiaquick spin column), die in einem 2ml großen Sammelgefäß (collection tube) stand, eingefüllt. Durch Zentrifugation bei 13000rpm über einen Zeitraum von 60sec wurde die DNA von den überschüssigen Substanzen befreit, indem sie an die Membran der Säule adsorbierte, während die übrigen Substanzen eluiert und durch das Sammelgefäß aufgefangen wurden.

Nach Verwerfen des Eluates wurde durch Einfüllen von 700µl Waschpuffer in die Aufreinigungssäule und durch erneutes Zentrifugieren für 60sec die Reinigung der DNA fortgesetzt. Die eluierten Substanzen wurden nun wiederum verworfen und eine weitere Zentrifugation von 60sec Dauer gewährleistete ein vollständiges Entfernen des Waschpuffers. Das sich nun anschließende Eintröpfeln von 50µl 10mM Tris-Cl (pH 8,5) in die Mitte der Membran der Säule gefolgt von einer letzten Zentrifugation für 60sec diente der Elution der DNA, wobei

die gereinigte DNA in einem 1,5ml Eppendorfcup aufgefangen wurde. Durch Einfrieren war eine Aufbewahrung der aufgereinigten DNA über einen längeren Zeitraum möglich.

Zur Erfolgskontrolle der PCR und zur Abschätzung der Konzentration des aufgereinigten PCR-Produktes schloß sich nun eine Agarosegelelektrophorese (s. 3.2.2.1) an, wobei zum einen eine Mischung aus 4µl des Eluats mit 4µl Bluemarker und zum anderen drei synthetisch hergestellte Molekulargewichtsmarker (jeweils 5µl) auf ein 1%-iges Gel aufgetragen wurden. Da sich die Molekulargewichtsmarker in ihrer Konzentration und somit auch in ihrem DNA-Gehalt voneinander unterschieden, war nach Ablauf der Elektrophorese ein Vergleich der entstandenen Banden möglich. Dieser Vergleich zeigte zum einen an der Höhe der Banden, ob das entstandene DNA-Produkt die geforderte Länge besaß und zum anderen, anhand des Helligkeitsvergleiches mit der 1,6Kb-Bande, in welcher Konzentration das aufgereinigte PCR-Produkt vorlag. Diese Bande wies bei dem am stärksten konzentrierten Marker einen Gehalt von 50ng, bei dem mittelstark konzentrierten Marker einen Gehalt von 25ng und bei dem schwach konzentrierten Marker einen Gehalt von 15ng auf.

3.2.2.4 Sequenzierreaktion

An die Aufreinigung schloß sich die Sequenzierreaktion, eine der PCR vergleichbare Amplifizierungsmethode jedoch mit dem Ziel der Vervielfältigung nur eines DNA-Stranges, an.

Verwendet wurde die von der Fa. Applied Biosystems Inc. (ABI PRISM) 1990 eingeführten Taq-Cycle-Sequenzierung-Methode. Das Verfahren ermöglichte durch die Anwendung der thermostabilen Taq-Polymerase eine automatische DNA-Sequenzierung in einem Thermocycler, mit Einbau von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden (Dye Terminatoren) anstelle der Nukleotidmonophosphate, und unmittelbaren Abbruch des DNA-Stranges hinter diesen (modifizierte Kettenabbruchmethode nach Sanger). Anschließend konnte mit Hilfe des DNA-Sequenzers 377 der Fa. ABI PRISM eine elektrophoretische Analyse der auf ein Gel aufgetragenen Proben vorgenommen werden.

Der Reaktionsansatz bestand für jede einzelne Probe aus 1µl Sequenzierprimer (Tag-Primer), 3-4µl Premix (je nach Ansatzmenge: bei 10µl und 15µl Gesamtansatz 3µl Premix, bei 20µl Gesamtansatz 4µl Premix), DNA-Template (die Menge, die 50ng DNA enthielt) und bi-dist. H₂O (je nach Ansatzmenge ad 10µl, ad 15µl oder ad 20µl).

Während der nun folgenden Abläufe im Thermocycler erfolgte die Markierung der DNA je nach Wahl des Primers vom 3'-Ende oder vom 5'-Ende, indem die Taq-Polymerase anstelle der Nukleotidmonophosphate die fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide einbaute und unmittelbar danach zum Abbruch des DNA-Stranges führte.

Tabelle 6: Thermocycler-Protokoll

Denaturierung	96°C	5min
Denaturierung	96°C	10sec
Annealing	50°C	5sec
Polymerisation	60°C	4min

Die Reaktion lief über 25 Zyklen ab, wobei eine End-Polymerisation nicht erforderlich war.

3.2.2.5 Fällung

Nach erfolgter Sequenzierreaktion wurde die DNA mit Ethanol gefällt, um die Proben für die Sequenzierung im Sequenzer aufzubereiten.

Hierzu wurden die Proben nach Zugabe von bidest. H₂O (ad 100µl) in Eppendorfcaps, welche bereits 250µl 100%-igen Ethanol und 10µl 3M Natriumacetat (pH 4,6) enthielten, überführt und mit dem Inhalt der Cups gut durchmischt. Durch die sich anschließende 30-minütige Zentrifugation bei 13000rpm präzipitierte die gefällte DNA und das Ethanol-Acetongemisch konnte abdekantiert und verworfen werden. Im nächsten Schritt erfolgte das Waschen des Pellets mit 300µl 70%-igem Ethanol und es schloß sich eine weitere Zentrifugation über einen Zeitraum von 15min bei 13000rpm an. Das Verwerfen des Alkoholüberstandes und das vollständige Trocknen (an der Luft oder 5min. im Speed-Vac) der Pellets im Eppendorfcup beendeten die Fällung.

3.2.2.6 Sequenzierung

An das Aufnehmen des getrockneten Ansatzes in 0,8µl einer Mischung aus Formamid und EDTA/Dextranblau (50mg/ml DB, 25mM EDTA pH 8,0), die als Ladungspuffer dienten und ein Verhältnis von Formamid zu EDTA/DB von 5:1 aufwiesen, schloß sich ein Erhitzen auf 95°C für eine Zeit von 5min zur Denaturierung an. Anschließend verblieben die Proben zur Abkühlung auf Eis. 0,7µl der DNA-Proben wurden anschließend mit einer Pipette auf das vorbereitete Gel im DNA-Sequenzer gegeben. Bei dem zwischen zwei ca. 25 x 40cm großen Glasplatten gegossenen Gel handelte es sich um ein ca. 0,4mm dickes Polyacrylamidgel. Das Ansetzen der Gellösung beinhaltete das Lösen von Harnstoff in einem Ansatz von 30%-iger Acrylamid-Lösung (Acrylamid und Bisacrylamid in einem Verhältnis von 29:1), TBE-Puffer (10%) sowie H₂O und das darauf folgende Filtrieren und Entgasen durch einen 0,2µm Filter. Es schloß sich ein Überführen in ein 150ml Becherglas sowie ein Vermischen mit 15µl Temed und 350µl 10%-iger APS-Lösung für die sofort beginnende Polymerisation des Gels an. Darauf folgte das Gießen zwischen die vorbereiteten Glasplatten und das Einsetzen eines

Kunststoffkammes zur Bildung der Probenschlitze. Die Polymerisation des Gels erstreckte sich über 1-1,5h in horizontaler Lage, bis das fertige Gel in den Sequenzer gestellt werden konnte. Nach dem Einfüllen der 10%-igen TBE-Pufferlösung in die Pufferkammern begann die Elektrophorese. Nach deren Beendigung erfolgte die Detektion mit Hilfe eines Argonlasers. Mehrere drehbare Spiegel richteten den Laserstrahl auf das Elektrophoresegel und einige Linsen fokussierten den Strahl. Ein Spiegel richtete den Laserstrahl mit einem 95°-Winkel auf das Gel. Mehrere Linsen sammelten die vorhandene Fluoreszenzanregung der Didesoxynukleotide und leiteten diese nach Filterung und nochmaliger Fokussierung zu einem Spektographen. Dieser trennte das Licht nach der Wellenlänge und leitete es zu einer Charge Coupled Device (CCD) Camera, welche die Lichtintensität untersuchte. Die Software des angeschlossenen Computers enthielt die Informationen über die verwendeten Dye-Terminatoren und ihre Emissionsmaxima, wandelte hierdurch das Lichtsignal in ein digitales Signal um und verarbeitete es. Durch unterschiedliche Absorptionsmaxima der Fluoreszenzfarbstoffe erschienen die vier Basen nach der graphischen Verarbeitung als grüne, blaue, rote und schwarze Wellenlinien, aus denen die Sequenz der untersuchten DNA abzulesen war. Didesoxy A erschien grün, Didesoxy C blau, Didesoxy G schwarz und Didesoxy T rot.

4 ERGEBNISSE

4.1 Methicillin-Resistenz im ersten und zweiten Jahr des ENARE-Programmes

Um einen Überblick über die Gesamtprävalenz der Methicillin-Resistenz in Europa sowie über die geographische Verteilung der Resistenzraten zwischen verschiedenen Universitätskliniken in unterschiedlichen Ländern zu erhalten, erfolgte eine Resistenztestung an allen im Verlauf des ENARE-Programmes zusammengetragenen *S.aureus*-Isolaten. Um im Rahmen der Längsschnittsstudie auch eine Aussage über die Entwicklung der Resistenzraten über einen gewissen Zeitraum machen zu können, wurde die Methicillin-Resistenz zunächst am Ende des ersten Jahres (Anfang 1998) und dann nochmals am Ende des zweiten Jahres (im Februar 1999) bestimmt. Dabei kamen zuerst Methoden der klassischen Oxacillin-Resistenzbestimmung (s. 3.2.1.5) zur Anwendung. Anschließend erfolgte durch die Detektion der Gene *mecA* und *coa* mittels einer PCR eine Bestätigung der Methicillin-Resistenz sowie der Identität als *S.aureus*.

Von den im Verlauf des ersten Jahres des ENARE-Programmes in den derzeit 20 partizipierenden Universitätskliniken gesammelten *S.aureus*-Isolaten zeigten 22% eine Methicillin-Resistenz.

Dabei konnte in nahezu 98% der Methicillin-resistenten Isolate das *mecA*-Gen, welches für PBP2a kodiert, detektiert werden. Es ergaben sich bezüglich der MRSA-Prävalenz deutliche geographische Variationen zwischen den untersuchten Universitäts-Kliniken, wobei im allgemeinen in Süd-Europa ein höherer MRSA-Anteil verzeichnet wurde als in den nördlicheren Staaten. Darüber hinaus variierte der Prozentsatz an MRSA teilweise auch zwischen den verschiedenen Kliniken innerhalb einzelner Länder erheblich. Insgesamt fanden sich die höchsten Prozent-Raten in Italien (44-57%) und in Portugal (55%). Mittlere Methicillin-Resistenzraten fanden sich in Griechenland (26%), Spanien (5-20%) und Frankreich (7-22%), aber auch in Polen (15-29%), Großbritannien (29%) und Belgien (30%). Im Gegensatz dazu wurden in Österreich (5%) und Deutschland (4-7%) niedrige MRSA-Raten beobachtet, während in den untersuchten Universitätskliniken in der Schweiz und in den Niederlanden keine Methicillin-resistenten *S.aureus*-Isolate detektiert wurden.

Bei der wiederholten Resistenztestung im Februar 1999, an den nunmehr über den Zeitraum von zwei Jahren gesammelten *S.aureus* Isolaten aus mittlerweile 25 Universitätskliniken,

wurde eine Methicillin-Resistenzrate von 25% ermittelt. Wie bereits bei den Untersuchungen Anfang 1998 konnte in fast allen MRSA (ca. 98%) das *mecA*-Gen detektiert werden. Der Prozentsatz an MRSA variierte weiterhin erheblich zwischen den unterschiedlichen Ländern, aber auch innerhalb einzelner Staaten, wobei wiederum ein deutliches Süd-Nord Gefälle zu verzeichnen war. Die höchsten Prozent-Raten fanden sich weiterhin in Italien (43-58%) und in Portugal (54%), während der MRSA-Anteil in der Schweiz und den Niederlanden (2%) am niedrigsten war.

Zusätzlich zu der geographischen Verteilung wurden noch die häufigsten Entnahmeorte von MRSA ermittelt, sowie die Alterspräferenz und die Verteilung innerhalb der verschiedenen medizinischen Disziplinen bei *S.aureus* allgemein untersucht.

Dabei fand sich der höchste MRSA-Anteil bei Isolaten aus nosokomialen Pneumonien (34,4%) und der niedrigste unter Isolaten welche mit Haut- und Weichteilinfektionen (22,4%) assoziiert waren.

Die meisten *S.aureus*-Isolate stammten von Stationen der Inneren Medizin (36,8%), von Intensivstationen (22,6%) und von chirurgischen Stationen (13,6%), während 27% der *S.aureus* Isolate von Stationen anderer medizinischer Disziplinen eingesandt wurden.

Die Methicillin-Resistenzrate betrug 33% auf Intensivstationen, 13% auf chirurgischen und 27% auf internistischen Stationen. Die niedrigste MRSA-Prävalenz zeigte sich bei Isolaten aus Notaufnahmen (0%) und Polikliniken (1%), wobei jedoch miteinbezogen werden muss, dass aus diesen Quellen nur 0,6% bzw. 1,9% des Gesamtkollektivs an *S.aureus*-Isolate stammten.

Die Verteilung über eine spezielle Altersgruppe ist für MSSA und MRSA ähnlich. Mit Ausnahme von Neugeborenen fanden sich Infektionen mit *S.aureus* häufiger mit steigendem Alter, nahmen jedoch nach dem 75. Lebensjahr wieder ab.

4.2 Sensibilität gegenüber klassischen Antibiotika

Nach der Bestimmung der Methicillin-Resistenz wurden die bis Februar 1999 gesammelten 3052 *S.aureus*-Isolate (2288 MSSA und 764 MRSA) bezüglich einer Resistenz gegenüber den sog. klassischen, therapeutisch häufig eingesetzten Antibiotika, den Makroliden, Lincosamiden, Tetracyclinen und dem Rifampicin untersucht. Dazu erfolgte eine Ermittlung der Resistenzraten mittels Agar-Diffusionstest, sowie eine Bestimmung des Aktivitätsspektrums (MHK_{50/90} in mg/l) der untersuchten Antibiotika mit Hilfe der Mikrodilutionsmethode (Tabelle 7).

Es zeigte sich ein eindeutiger Zusammenhang zwischen einer Methicillin-Resistenz und einer Resistenz gegenüber Makroliden, Lincosamiden, Tetracyclinen und Rifampicin., wobei für diese Antibiotika der Prozentsatz der resistenten Isolate signifikant mit wachsenden MHK-Werten für Methicillin anstieg.

Insgesamt waren 39,4% der getesteten *S.aureus*-Isolate Erythromycin-resistent. Dabei zeigten weniger als ein viertel (22,5%) der untersuchten MSSA eine Erythromycin-Resistenz, während ca. 90% der MRSA-Isolate keine Sensibilität gegenüber diesem Makrolid-Antibiotikum aufwiesen.

Eine Resistenz gegen das Lincosamid Clindamycin wurde bei 23,9% aller untersuchten Isolate festgestellt, wobei auch hier ein deutlicher Zusammenhang mit der Methicillin-Resistenz nachgewiesen werden konnte: etwa 77% der MRSA, jedoch nur ca. 6% der MSSA-Isolate wiesen eine Resistenz gegen Clindamycin auf.

22% aller getesteten *S.aureus* zeigten einen Tetracyclin-resistenten Phenotyp. Die Resistenz gegenüber dieser antibakteriellen Substanz lag bei ca.10% bei MSSA gegenüber etwa 57% bei MRSA. Bei den strukturell verwandten Präparaten Doxycyclin und Minocyclin war der Unterschied weit weniger deutlich. Im Durchschnitt zeigten noch etwa 90% der MRSA eine Sensibilität gegenüber diesen beiden Substanzen.

Eine Resistenz gegen das häufig in Kombinationsregimen verwendete Rifampicin bestand bei 15,4% der *S.aureus*, wobei ca. 54% der MRSA resistent waren, während fast alle untersuchten MSSA eine Sensibilität gegenüber diesem Antibiotikum zeigten.

Tabelle 7: Resistenzraten (in %) und Aktivitätsspektrum (MHK_{50/90} in mg/l) verschiedener Antibiotika gegen MSSA und MRSA

Antibiotikum	MRSA (n = 764)			MSSA (n = 2288)		
	MHK ₅₀	MHK ₉₀	% resistent	MHK ₅₀	MHK ₉₀	% resistent
Erythromycin	>8	>8	90,2	0,5	>8	22,5
Clindamycin	>8	>8	76,7	0,12	0,25	6,3
Tetracyclin	>8	>8	57,1	4	8	10,3
Doxycyclin	4	8	14,8	0,5	1	2,3
Minocyclin	2	4	7,7	0,25	0,5	1,9
Rifampicin	2	2	53,9	0,03	0,25	2,6

4.3 Detektion von MLS-Resistenzgenen

Um einen Überblick über die häufigsten Mechanismen der Makrolid- und MLS_B Resistenz zu erhalten wurden 851 Erythromycin-resistente *S.aureus*, welche innerhalb der ersten zwei Jah-

re des ENARE-Programmes zusammengetragen wurden, hinsichtlich der Prävalenz der Makrolid-Resistenzgene *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA/msrB*, *ereA*, und *ereB* untersucht.

Das Kollektiv von 851 Erythromycin-resistenten Isolaten umfaßte 358 Methicillin-sensible *S.aureus* (MSSA) und 493 Methicillin-resistente *S.aureus* (MRSA). Mit Hilfe des Agar-Diffusions-Tests erfolgte zunächst eine Einteilung der Isolate in konstitutiv MLS_B-resistente Stämme (Erythromycin-resistent und Clindamycin-resistent) und induzierbar MLS_B-resistente Stämme (Erythromycin-resistent jedoch Clindamycin-sensibel). Dabei zeigten 93% der Erythromycin-resistenten MRSA-Isolate, aber nur 44% der Erythromycin-resistenten MSSA-Isolate einen konstitutiven MLS_B-Resistenz-Phänotyp. Bei den übrigen Isolaten (7% der MRSA und 56% der MSSA) lag ein induzierbarer MLS_B-Resistenz-Phänotyp vor.

Zur Detektion der Makrolid-Resistenzdeterminanten kam die von Sutcliffe *et al.* [139] beschriebenen PCR zur Anwendung. Zusätzlich erfolgte zur Qualitätssicherung eine Testung von 40 randomisiert ausgewählten, gegenüber sämtlichen Makroliden vollständig sensiblen *S.aureus*-Isolaten, sowie eine randomisierte Sequenzierung der detektierten Gene um die Spezifität sicherzustellen. Obwohl die Primer von Sutcliffe *et al.* [139] so konstruiert wurden, dass sie für die Zielsequenzen spezifisch waren, wäre es dennoch möglich gewesen, dass eng verwandte Komponenten ebenfalls detektiert worden wären. Es konnten jedoch keine unspezifischen PCR-Produkte nachgewiesen werden. Desweiteren wurde in den 40 Erythromycin-sensiblen *S.aureus*-Isolate keines der getesteten, für eine Makrolid-Resistenz kodierenden Gene sowie kein unspezifisches PCR-Produkt gefunden.

Insgesamt waren die Gene *ermA* und *ermC* die Resistenzdeterminanten mit der höchsten Prävalenz unter allen getesteten Erythromycin-resistenten *S.aureus*-Isolaten. Dabei war das *ermA*-Gen, welches in 571 von 851 der untersuchten Stämme nachgewiesen wurde mit 67% deutlich häufiger vertreten, als das bei 23% (192/851) der Isolate detektierte *ermC*-Gen. Die dritthöchste Prävalenz zeigte das *msrA/msrB*-Gen, das in immerhin 6% (48/851) der getesteten *S.aureus* Stämme gefunden wurde. Am wenigsten vertreten waren das *ermB*-Gen und das *ereB*-Gen. Beide Resistenzdeterminanten wurden bei nur ca. 0,6% der Erythromycin-resistenten Isolate detektiert. Das ebenfalls für eine Esterase kodierende *ereA*-Gen konnte in keinem der zu analysierenden Isolate nachgewiesen werden.

Das *ermA*-Gen war am häufigsten in Methicillin-resistenten *S.aureus* vertreten. 88% der getesteten MRSA wiesen diese Resistenzdeterminante auf, während nur 37% der MSSA das Gen enthielten. Dagegen stellte *ermC* das prädominante Resistenzgen in Methicillin-sensiblen *S.aureus* dar, wobei es in 47% der untersuchten MSSA Stämme detektiert werden konnte. Bei den MRSA hingegen war *ermC* nur in 5% der analysierten Isolate nachweisbar.

Innerhalb des Erythromycin-resistenten *S.aureus*-Kollektivs war *ermA* prädominant in Stämmen, welche den MLS_B-konstitutiven-Phänotyp exprimierten, während *ermC* prädominant in MSSA mit induzierbarem MLS_B-Phänotyp war.

Ein Gen aus der Klasse der *erm*-Determinanten wurde in 716 von 851 *S.aureus* Isolaten (84%) detektiert, während eine Kombination von *ermA* und *ermC* nur in 26 von 851 Isolaten (3%) gefunden wurde. Eine Kombination der Gene *ermA* und *ermB* oder *ermC* und *ermB* konnte hingegen in keinem der getesteten Isolate detektiert werden.

Das *ereB*-Gen wurde ausschließlich in MRSA, welche den MLS_B-konstitutiven-Phänotyp exprimierten, gefunden (Tabelle 8). Von diesen 458 konstitutiv MLS_B-resistenten Stämmen wiesen jedoch nur 5 das Erythromycin-Esterase-Gen auf, was einem Prozentsatz von ca. 1% entsprach. Die verwandte Determinante *ereA* hingegen wurde in keinem der untersuchten Stämme gefunden. Darüberhinaus konnte keine Kombination von *ereB* mit einer anderen Makrolid-Resistenz-Determinante nachgewiesen werden.

Während das *ereB*-Gen ausschließlich in MRSA detektiert wurde, konnte das *msrA/msrB*-Gen nur in MSSA gefunden werden. Dabei wiesen 13% der Methicillin-sensiblen *S.aureus* (14/358) die für ein Efflux-System kodierende Determinante auf. Auch bei dem *msrA/msrB*-Gen konnte keine Kombination mit einem der übrigen Resistenz-Gene nachgewiesen werden. Die Häufigkeit des Auftretens von Isolaten, welche zwar eine Erythromycin-Resistenz zeigten, bei denen jedoch keines der sechs Resistenzgene detektiert werden konnte, lag insgesamt bei 7% (60/851). Dabei rangierte die Häufigkeit zwischen 4,5% und 8,6% in den vier verschiedenen Gruppen der analysierten Isolate.

Tabelle 8: Prävalenz von Makrolid-Resistenzgenen in Erythromycin-resistenten *S.aureus*

Resistenz-Gen	Methicillin-resistente <i>S.aureus</i> (n = 493)		Methicillin-sensible <i>S.aureus</i> (n = 358)	
	konstitutiver Phenotyp (n = 485; 93%)	induzierbarer Phenotyp (n = 35; 7%)	konstitutiver Phenotyp (n = 158; 44%)	induzierbarer Phenotyp (n = 200; 56%)
<i>ermA</i>	397 (86,7%)	26 (74,2%)	92 (58,2%)	30 (15%)
<i>ermB</i>	2 (0,4%)	0	0	3 (1,5%)
<i>ermC</i>	9 (2,0%)	3 (8,6%)	34 (21,5%)	120 (60%)
<i>ermA und ermB</i>	0	0	0	0
<i>ereB</i>	5 (1,1%)	0	0	0
<i>msrA/msrB</i>	0	0	13 (8,2%)	35 (17,5%)
kein bekanntes Gen detektierbar	36 (7,9%)	3 (8,6%)	8 (5,1%)	9 (4,5%)

4.4 Detektion von Tetracyclin-Resistenzgenen

Um einen Überblick über die Häufigkeits-Verteilung der Determinanten einer Tetracyclin-Resistenz zu erhalten, wurden 600 randomisiert ausgewählte Tetracyclin-resistente *S.aureus*-Isolate (400 MRSA und 200 MSSA), welche innerhalb der ersten 2 Jahre des ENARE-Programmes zusammengetragen wurden, hinsichtlich der Prävalenz der vier Tetracyclin-Resistenz-Gene *tetM*, *tetO*, *tetK* und *tetL* untersucht.

Zur Detektion der Resistenzdeterminanten kamen die von Warsa *et al.* und Trzinski *et al.* beschriebene PCR zur Anwendung [148, 154]. Desweiteren wurden 50 randomisiert ausgewählte Isolate (30 MRSA und 20 MSSA), welche vollständig sensibel gegenüber Tetracyclin waren, hinsichtlich der Präsenz der Tetracyclin-Resistenzgene gescreent. Zusätzlich wurden Primer, die spezifisch für die konservierten Regionen der 16S rRNA-Gene waren, als interne Kontrollen verwendet [58] und die PCR-Produkte wurden randomisiert sequenziert um die Spezifität des angewendeten Verfahrens sicherzustellen.

Obwohl die Primer so konstruiert wurden, dass sie für die Zielsequenzen spezifisch waren, ist die Detektion einer eng verwandten Determinante jedoch nie ganz auszuschließen. Während der gesamten Untersuchungen wurde jedoch in keinem unserer Tetracyclin-resistenten Isolate ein unspezifisches PCR-Produkt detektiert. Darüberhinaus wurde in keinem der getesteten 50 komplett Tetracyclin-sensiblen *S.aureus*-Isolaten unspezifische Genprodukte oder eines der für die Tetracyclinresistenz kodierenden Gene gefunden.

Insgesamt zeigten sich bei den Ergebnissen der Untersuchungen für MRSA und MSSA deutliche Unterschiede in der Verteilung der Resistenzgene, wobei das eine ribosomale Protektion vermittelnde *tetM* die Tetracyclin-Resistenz-Determinante mit der höchsten Prävalenz in MRSA-Isolaten war, während das für einen Efflux-Mechanismus kodierende *TetK*-Gen häufiger in MSSA vertreten war.

Bei den MRSA zeigte sich im Einzelnen, dass das *tetM*-Gen in 304 der 400 untersuchten Isolate nachgewiesen werden konnte, was einer relativen Häufigkeit von 76% entspricht, während in immerhin 73% (292/400) der Tetracyclin-resistenten Isolate das *tetK*-Gen detektiert wurde. Annähernd die Hälfte der MRSA-Isolate (202/400, 50,5%) trugen sowohl die Determinanten *tetK* als auch *tetM*. Das für einen Efflux-Mechanismus kodierende *TetL*-Gen hingegen wurde in nur 6 von 400 (1,5%) MRSA-Isolaten nachgewiesen.

Bei den MSSA hingegen trugen mit 96% (192/200) fast alle untersuchten Isolate das *tetK*-Gen während das *tetM*-Gen hier nur mit 10% (20/200) vertreten war. Dabei fand sich ein kombiniertes Auftreten der beiden Determinanten *tetK* und *tetM* bei 6% der Stämme. Das bei den MRSA nur zu einem sehr niedrigen Prozentsatz vertretene *tetL*-Gen konnte bei den untersuchten MSSA-Isolate nicht detektiert werden.

Das eine ribosomale Protektion vermittelnde *tetO*-Gen wurde in keinem der getesteten Isolate, gleich ob MRSA oder MSSA, gefunden.

Tabelle 9: Übersicht zur Prävalenz von Tetracyclin-Resistenzgenen in Tetracyclin-resistenten MRSA und MSSA

Resistenz-Gen	MRSA (n = 400)	MSSA (n = 200)
<i>TetM</i>	304 (76%)	20 (10%)
<i>TetK</i>	292 (73%)	192 (96%)
<i>TetM und TetK</i>	202 (50,5%)	12 (6%)
<i>TetL</i>	6 (1,5%)	0
<i>TetO</i>	0	0

Desweiteren wurde an allen Stämmen der Zusammenhang zwischen der Präsenz der verschiedenen Resistenz-Determinanten und der phänotypischen *in vitro* messbaren Resistenz gegenüber Tetracyclin und seinen semisynthetischen Derivaten untersucht.

Hierbei konnte festgestellt werden, dass alle Isolate, welche das *tetM*-Gen trugen, *in vitro* eine Resistenz gegenüber sowohl Tetracyclin als auch Minocyclin aufwiesen. Interessanterweise zeigten die Isolate, welche eine Kombination der beiden Determinanten *tetM* und *tetK* beinhalteten, höhere MHK-Werte als solche Isolate, die nur eine der beiden Determinanten besaßen.

Um quantitative Aussagen machen zu können wurden MHK-Wert Bestimmungen durchgeführt, wobei die jeweiligen MHK_{50}/MHK_{90} Werte (in mg/l) und die "geometric means" (in mg/l) für *tetK* und *tetM* enthaltende Isolate mittels der NCCLS-Richtlinien ermittelt wurden.

Tabelle 10: MHK_{50}/MHK_{90} Werte und die "geometric means" für *tetK* und *tetM*

Resistenzgene	mg/l	mg/l
<i>tetK</i>	Tetracycline 64/128 und 71	Minocyclin 0,25/0,25 und 0,20
<i>tetM</i>	Tetracyclin 64/128 und 68	Minocyclin 4/4 und 3,95
<i>tetK</i> und <i>tetM</i>	Tetracyclin 256 und 512	Minocyclin 8/8 und 6,5

4.4.1 Sequenzierung der Tetracyclin-Resistenzdeterminante *tetM*

Um ein Vorkommen repetitiver Sequenzen in der Promotorregion des *tetM*-Genes bei *S.aureus* aufzudecken und eine mögliche Auswirkung solcher Sequenzen auf die Resistenz zu bestimmen, wurde bei allen 324 *tetM*-tragenden Isolaten (304 MRSA und 20 MSSA) ein 398bp umfassendes DNA-Fragment sequenziert. Dieses von Position 540 bis 937 des *tetM*-Genes reichende Fragment entspricht bei *S.aureus* der Promoterregion. Detektierte Mutationen sollten dann mit den gefundenen MHK-Werten korreliert werden.

In allen 324 aufgeschlüsselten *TetM*-Promotorregionen zeigte sich jedoch eine identische Sequenz ohne repetitive Abschnitte oder andere Variabilitäten. Es fiel allerdings auf, dass sich die Sequenzprodukte, obwohl untereinander identisch, von der 1988 von Nesin *et al.* [109] für *S.aureus* beschriebenen Sequenz um eine konservierte Doppel-Mutation mit Aminosäureaustausch unterschieden. An Position 767 und 768 fand sich jeweils statt der Base Thymin die Base Guanin. An Stelle der durch das Codon TTC kodierten Aminosäure Phenylalanin ergab sich bei allen Isolaten an der entsprechenden Position die durch GGC kodierte Aminosäure Glycin.

Abbildung 5: Sequenz der 398bp umfassenden Promotorregion von *tetM*, identisch bei allen untersuchten *S.aureus* (mit konserviertem Basen- und Aminosäureaustausch*)

```

539  GGAGCGATTACAGAATTAGGAAGCGTGGACAAAGGTACAACGAGGACGGATAAT
      G  A  I  T  E  L  G  S  V  D  K  G  T  T  R  T  D  N
593  ACGCTTTTAGAACGTCAGAGAGGAATTACAATTCAGACAGGAATAACCTCTTTT
      T  L  L  E  R  Q  R  G  I  T  I  Q  T  G  I  T  S  F
647  CAGTGGGAAAATACGAAGGTGAACATCATAGACACGCCAGGACATATGGATTTC
      Q  W  E  N  T  K  V  N  I  I  D  T  P  G  H  M  D  F
701  TTAGCAGAAGTATATCGTTTCATTATCAGTTTTAGATGGGGCAATTCTACTGATT
      L  A  E  V  Y  R  S  L  S  V  L  D  G  A  I  L  L  I
755  TCTGCAAAAGATGGCGTACAAGCACAACTCGTATATTATTTTCATGCACTTAGG
      S  A  K  D  G* V  Q  A  Q  T  R  I  L  F  H  A  L  R
809  AAAATGGGGATTCCCACAATCTTTTTTATCAATAAGATTGACCAAAATGGAATT
      K  M  G  I  P  T  I  F  F  I  N  K  I  D  Q  N  G  I
863  GATTTATCAACGGTTTATCAGGATATTAAAGAGAACTTTCTGCCGAAATTGTA
      D  L  S  T  V  Y  Q  D  I  K  E  K  L  S  A  E  I  V
917  ATCAAACAGAAGGTAGAACTG
      I  K  Q  K  V  E  L

```

*TTC (F) → GGC (G)

4.5 Rifampicin-Resistenz

Wird Rifampicin als Monotherapie verabreicht entwickeln sich rasch Resistenzen, die nach heutiger Erkenntnis auf Mutationen im *rpoB*-Rif-Gen beruhen. Um Aussagen über die prädominanten Mutationen bei *S.aureus* und die Entwicklung der Rifampicin-Resistenz in MRSA und MSSA machen zu können, wurden 10 Rifampicin-sensible MRSA und 10 Rifampicin-sensible MSSA für 10 Tage mit Rifampicin inkubiert und anschließend sequenziert.

Nach zehntägiger Inkubation der 20 Test-Stämme mit Rifampicin fanden sich spontane Mutationsraten (MR) von 10^{-6} bis 10^{-8} . Dabei zeigten sich zwar deutliche Differenzen zwischen den einzelnen Stämmen, jedoch keine Unterschiede zwischen MRSA und MSSA, d.h. die Resistenz gegenüber Methicillin hatte keinen Einfluß auf die spontane Mutationsrate (Tabelle 11).

Mittels Sequenzierung konnten im *rpoB*-Rif-Gen der Test-Stämme zehn verschiedene Mutationen, mit nachfolgendem Aminosäureaustausch an fünf Positionen detektiert werden. Sie befanden sich an den Codons 468, 477, 481, 486, und 529 (*S.aureus* Koordinaten). Hierbei war das Codon 481 mit den beiden Mutationen [His-481→Tyr] und [His-481→Asn] am häufigsten betroffen. Interessanterweise führten sowohl Einzelmutationen, als auch multiple Mu-

tationen mit zwei- oder drei Aminosäureaustauschen, zur Rifampicin-Resistenz. Hierbei fiel auf, dass besonders die Stämme mit drei Aminosäureaustauschen sehr hohe MHK-Werte für Rifampicin von 1024 µg/ml und mehr aufwiesen. Bei den fünf Stämmen mit Einzelmutationen wurden immerhin mindestens MHK-Werte von 256 µg/ml erreicht.

Trotz dieser deutlichen Differenzen zwischen den einzelnen untersuchten Stämmen konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen MRSA und MSSA hinsichtlich Anzahl und Art der nachgewiesenen Mutationen festgestellt werden (Tabelle 11).

Um das Verteilungsmuster der Mutationen im *rpoB*-Rif-Gen bei diesen *in vitro* mutierten Stämmen mit dem Mutationsmuster klinischer Rifampicin-resistenten *S.aureus* Isolate in Europa vergleichen zu können, wurde eine weitere Untersuchung mit einem großen klinischen Kollektiv durchgeführt. Es wurden hierzu 300 Rifampicin-resistente *S.aureus*-Isolate (253 MRSA und 47 MSSA), die innerhalb der ersten 2 Jahre des ENARE-Programmes zusammengetragen wurden, sequenziert.

Es konnten nur wenig Unterschiede im Verteilungsmuster der Mutationen im *rpoB*-Rif-Gen zwischen den *in vitro* mutierten Stämmen und den klinischen Isolaten festgestellt werden. Es fanden sich die gleichen zehn Mutationen an den fünf Position 468, 477, 481, 486, und 529 wie bei den 20 untersuchten Mutanten. Prädominant waren Mutationen der Codons 468, 477 und 481, wobei wiederum die Mutationen [His-481→Tyr] und [His-481→Asn] am häufigsten waren. Zusätzlich fand sich noch in einigen wenigen Isolaten die Mutation [Asp-471→Tyr].

Insgesamt überwogen bei den klinischen Isolaten mit fast 85% die multiplen Mutationen (zwei oder drei Basenaustausche), während Einzelmutationen wie bei den *in vitro* Mutanten selten waren. Auch im klinischen Kollektiv fanden sich wieder deutliche Unterschiede hinsichtlich der Mutationsmuster einzelner Isolate, ohne dass jedoch signifikante Unterschiede zwischen MRSA und MSSA festgestellt werden konnten.

Tabelle 11: Effekt von Rifampicin auf die spontane Mutationsrate, MHK-Werte vor und nach 10 Passagen in Rifampicin-haltigem Medium und Akkumulation von Mutationen im rpoB-Gen nach 10 Passagen

Stamm	Inokulum (CFU/ml)	Spontane Muta- tionsrate (µg/ml)	MHK Mut- terstamm (µg/ml)	MHK nach 10 Passagen (µg/ml)	Mutationen im rpoB-Gen nach 10 Passagen
MSSA1	1,8 X 10 ¹⁰	4,8 x 10 ⁻⁷	0,03	512	His-481→Asn
MSSA2	4,3 x 10 ⁹	5,9 x 10 ⁻⁸	0,03	>1,024	Gln-468→Leu, Ala-477→Val, His-481→Tyr
MSSA3	6,4 x 10 ⁹	2,3 x 10 ⁻⁶	0,06	>1,024	Gln-468→Arg, His-481→Tyr
MSSA4	5,3 x 10 ⁹	4,8 x 10 ⁻⁷	0,015	>1,024	Gln-468→Lys, Ala-477→Thr, His-481→Asn
MSSA5	7,3 x 10 ⁹	8,2 x 10 ⁻⁷	0,03	512	Gln-468→Leu
MSSA6	2,4 x 10 ¹⁰	7,8 x 10 ⁻⁷	0,06	1,024	Ala-477→Asp, His-481→Asn
MSSA7	4,3 x 10 ¹⁰	4,9 x 10 ⁻⁷	0,03	512	Ser-486→Leu, Ser-529→Leu
MSSA8	3,2 x 10 ⁹	2,3 x 10 ⁻⁸	0,03	256	Gln-468→Arg, Ser-529→Leu
MSSA9	4,3 x 10 ⁹	5,6 x 10 ⁻⁷	0,015	1,024	Ala-477→Asp, His-481→Tyr
MSSA10	5,6 x 10 ⁹	5,9 x 10 ⁻⁶	0,03	1,024	Gln-468→Arg, His-481→Tyr
MRSA1	4,3 x 10 ¹⁰	7,3 x 10 ⁻⁷	0,06	>1,024	Ala-477→Asp, His-481→Asn, Arg, Ser-529→Leu
MRSA2	6,6 x 10 ⁹	6,6 x 10 ⁻⁸	0,03	1,024	Ala-477→Asp, His-481→Tyr
MRSA3	6,0 x 10 ⁹	7,3 x 10 ⁻⁷	0,015	256	Ser-529→Leu
MRSA4	5,1 x 10 ⁹	5,8 x 10 ⁻⁶	0,03	512	Gln-468→Leu, Ser-529→Leu
MRSA5	7,2 x 10 ⁹	4,2 x 10 ⁻⁷	0,015	>1,024	Gln-468→Arg, Ala-477→Asn, His-481→Tyr
MRSA6	4,3 x 10 ¹⁰	2,3 x 10 ⁻⁷	0,015	1,024	Ala-477→Thr, His-481→Asn, Ser-529→Leu
MRSA7	6,5 x 10 ⁹	3,9 x 10 ⁻⁸	0,03	512	His-481→Tyr
MRSA8	8,3 x 10 ⁹	7,9 x 10 ⁻⁷	0,03	1,024	Ala-477→Asp, His-481→Tyr
MRSA9	5,6 x 10 ⁹	6,5 x 10 ⁻⁸	0,015	512	His-481→Asn
MRSA10	4,0 x 10 ⁹	6,8 x 10 ⁻⁷	0,03	512	Gln-468→Lys, Ser-529→Leu

4.6 Sensibilität von MRSA gegenüber alternativen Therapeutika

Um die Wirksamkeit von Vancomycin und anderen zur Zeit verfügbarer Reserveantibiotika sowie neuer, in der Entwicklung befindlicher Präparate, zu untersuchen, wurden Sensibilitäts-Testungen an 302 im Verlauf des ersten Jahres des ENARE-Programmes zusammengetragenen MRSA-Isolaten aus 20 verschiedenen Universitätskliniken durchgeführt.

Zur Detektion von Staphylokokken-Isolaten mit reduzierter Glykopeptid-Sensibilität wurden die gemäß Tenover *et al.* [144] erwiesenermaßen effektivsten Verfahren, nämlich die Mikrodilutionsmethode mit Vancomycin-Bouillon bei 24-stündiger Inkubation, die Untersuchung mittels konventioneller MicroScan-Platten sowie der Etest eingesetzt.

Unter Verwendung dieser drei Verfahren wurden innerhalb der 302 europäischen MRSA-Isolate weder Vancomycin-resistente *S.aureus* Stämme, welche gemäß der DIN-Richtlinien MHK-Werte von $\geq 32\text{mg/l}$ aufweisen mußten, noch Vancomycin-intermediär-sensiblen *S.aureus* Isolate (VISAs), mit MHK-Werten von 8-16mg/l, gefunden. Alle untersuchten Stämme zeigten MHK-Werte von $\leq 4\text{mg/l}$ und waren somit sensibel gegenüber Vancomycin, wobei nur bei 9 von 302 Isolaten der höchste gemessene MHK-Wert von $4\mu\text{g/ml}$ ermittelt wurde. Der MHK_{50} -Wert (diejenige Antibiotikakonzentration bei der 50% der untersuchten Bakterienstämme durch ein bestimmtes Antibiotikum gehemmt werden) betrug $1\mu\text{g/ml}$, während der MHK_{90} -Wert bei $2\mu\text{g/ml}$ lag.

Nachdem keine VISAs mit homogener Expression detektiert werden konnten, wurden die 302 MRSA-Isolate noch mittels der von Hiramatsu *et al.* [67] beschriebenen Methode hinsichtlich des Vorhandenseins von heterogen Vancomycin-resistenten Stämmen (Hetero-VISAs) untersucht. Dabei wurde kein der Definition des Hetero-VISAs entsprechender *S.aureus* Stamm mit einem MHK-Wert von $\leq 4\text{mg/l}$, der innerhalb der Population mit einer Frequenz von 10^{-6} Kolonien oder mehr, Subkolonien mit MHK-Werten von $\geq 8\text{mg/l}$ bilden würde, detektiert. Somit konnte also bei den jüngsten europäischen MRSA-Isolaten kein Anhalt für eine reduzierte Vancomycin-Sensibilität (VISA/Hetero-VISA-Status) gefunden werden.

Bei den zur Therapie zugelassenen Reserveantibiotika erfolgte die Bestimmung der Sensibilitätsraten mit Hilfe des auch in der klinischen Diagnostik eingesetzten Agardiffusionstestes, während eine Untersuchung hinsichtlich einer reduzierten Vancomycin-Sensibilität gesondert durchgeführt wurde. *Staphylokokkus aureus* ATCC 29213 und *Staphylokokkus aureus* ATCC 25923 wurden zur Qualitätskontrolle an jedem Untersuchungstag jeweils mitgetestet.

Gegenüber den häufig eingesetzten Aminoglykosid-Antibiotika zeigten nur noch wenige der getesteten MRSA-Isolate eine ausreichende Empfindlichkeit. Dabei lagen die Sensibilitätsraten bei nur 15% für Gentamicin und bei 20% für Amicacin. Eine deutlich höhere Empfindlichkeit von 71% zeigte sich bei Co-Trimoxazol. Auch das Reserve-Breitspektrumantibiotikum Fosfomycin sowie das Reserveantibiotikum Fusidinsäure wiesen mit 72%, bzw. mit 75% günstigere Sensibilitätsraten auf. Obgleich die Multi-Resistenz geographisch sehr stark variierte, wurden dennoch von jeder der 18 Universitätskliniken in welchen MRSA isoliert wurden, Stämme mit Resistenz gegenüber Amikacin, Gentamicin, Trimethoprim/Sulfamethoxazol und Fusidinsäure eingesandt. Einige der Kliniken übermittelten jedoch nur Isolate, die vollständig sensibel gegenüber Fosfomycin waren.

Desweiteren wurden das Streptogramin-Mischpräparat Quinupristin/Dalfopristin (Synercid®) und das Oxazolidinon Linezolid, beides noch in der Entwicklung befindliche Präparate, mittels Mikrodilutionsmethode hinsichtlich ihrer *in vitro* Aktivität untersucht. Die Quinupristin/Dalfopristin Kombination Synercid® zeigte einen MHK₅₀-Wert von 1µg/ml und einen MHK₉₀-Wert von 2µg/ml, identisch zu den bei Vancomycin beschriebenen Werten. Außerdem ergab sich eine dem Vancomycin ebenfalls vergleichbare Bandbreite der aufgetragenen MHK-Werte (≤0.25-4µg/ml).

Das Oxazolidinon Linezolid zeigte klar eine *in vitro* Aktivität gegenüber MRSA, die mit der von Vancomycin gleichzusetzen war, wobei kein MRSA-Isolat MHK-Werte von mehr als 2µg/ml aufwies. Ebenso wie bei Vancomycin waren demnach alle untersuchten Isolate vollständig sensibel gegenüber Quinupristin/Dalfopristin und Linezolid.

Schließlich wurde mittels Agar-Diffusionstest die Wirksamkeit von Mupirocin überprüft, wobei zuerst alle Isolate bezüglich einer Low-Level-Resistenz gescreent wurden, bevor eine Untersuchung hinsichtlich einer High-Level Resistenz erfolgte. Nach der Testung der 302 MRSA-Isolate zeigte sich bei zehn (3.3%) aus Belgien, Spanien und Großbritannien stammenden Isolaten eine Low-Level-Mupirocin-Resistenz mit MHK-Werten von 16-128µg/ml, während acht Isolate (2.6%) aus den Herkunftsländern Polen, Spanien und Großbritannien eine High-Level-Mupirocin-Resistenz mit MHK-Werten von 512 bis >2048µg/ml zeigten.

Um eine klonale Verwandtschaft der acht High-Level Mupirocin-resistenten MRSA zu untersuchen und damit eine mögliche epidemische Verbreitung aufzudecken, erfolgte eine Typisierung der Isolate mittels Pulsfeld-Gel-Elektrophorese. Bei dieser Analyse zeigte sich, dass die High-Level Mupirocin-resistenten MRSA aus den drei verschiedenen Universitätskliniken nicht klonal identisch waren. Während aus der Universitätsklinik in Warschau nur ein High-Level Mupirocin-resistentes Isolat stammte, wurden aus den Universitätskliniken in Madrid

und London drei bzw. vier High-Level Mupirocin-resistente Isolate eingesandt. Diese drei bzw. vier Stämme wiesen jeweils einen klonalen Ursprung auf.

4.7 Quinupristin/Dalfopristin Resistenz bei *S.aureus*

Während alle 302 Methicillin-resistenten *S.aureus* Isolate, welche im ersten Jahr des ENARE-Programmes gesammelt wurden, sensibel gegenüber dem neuen Streptogramin-Präparat Quinupristin/Dalfopristin (Synercid®) waren, traten im Verlauf des zweiten Jahres der europäischen Längsschnittsstudie erstmals Synercid-resistente Isolate auf. Alle durch den Agar-Diffusionstests ermittelten resistenten Isolate wurden mit Hilfe der Mikrodilutionsmethode hinsichtlich ihrer MHK-Werte analysiert und anschließend mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese typisiert, um eine klonale Verwandtschaft innerhalb dieser Stämme aufzudecken.

Bis Ende 1998 wurden im Rahmen des ENARE-Programmes in den partizipierenden 24 Universitätskliniken insgesamt 2393 *S.aureus* Isolate gesammelt, von denen 574 Methicillin-resistent waren.

Von den getesteten 2393 *S.aureus* Stämmen zeigten 21 Isolate (0,9%) MHK-Werte von über 2mg/l für Quinupristin/Dalfopristin und damit keine Sensibilität gegenüber diesem Antibiotikum. Die 21 *S.aureus* Isolate umfaßten 18 Methicillin-resistente und 3 Methicillin-sensible Stämme, was einer Resistenzrate von 3,1% bei den MRSA und 0,2% bei den MSSA entsprach.

Alle 21 getesteten *S.aureus* Isolate zeigten einen konstitutiven MLS_B-Resistenz Phänotyp (Erythromycin-Resistent und Clindamycin-resistent) und waren darüber hinaus resistent gegenüber Penicillin und dem Chinolon Ciprofloxacin. Die 18 Synercid-resistenten MRSA Stämme legten zusätzlich eine Resistenz gegenüber dem Aminoglykosid Gentamicin an den Tag, wobei 16 Stämme eine High-Level-Gentamicin Resistenz aufwiesen. Außerdem zeigten 4 der 18 MRSA-Isolate MHK-Werte von 4mg/l für Vancomycin und standen damit direkt an der Schwelle zur intermediären Resistenz.

Sämtliche Quinupristin/Dalfopristin resistenten *S.aureus* Isolate waren vollständig sensibel gegenüber dem ebenfalls in der klinischen Erprobung befindlichen Oxazolidinon Linezolid®, wobei sich die MHK-Werte für dieses Antibiotikum zwischen 0,12 und 1mg/l bewegten.

Die meisten der resistenten Keime wurden bei Patienten mit Bakteriämie (16/21) isoliert, gefolgt von Wundinfektionen (3/21) und nosokomialen Pneumonien (2/21), wobei nur ein Isolat pro Patient zugelassen wurde.

16 der 21 Quinupristin/Dalfopristin resistenten Isolate wurden aus drei französischen Kliniken eingesandt, wobei wiederum 14 dieser 16 Stämme in der gleichen Klinik isoliert wurden. Mehr als 95% der MRSA Isolate aus dieser Universitätsklinik waren multiresistent, wobei diese Multiresistenz auch eine Resistenz gegenüber Quinupristin/Dalfopristin beinhaltete. Darüber hinaus stammte je ein Isolat aus Österreich und Großbritannien, während drei weitere Synercid-resistente Stämme aus Spanien eingeschickt wurden.

Die Typisierung aller 21 *S.aureus* Stämme mittels Pulsfeldgelelektrophorese zeigte, dass 12 der 14 Isolate aus einer französischen Klinik, sowie 2 Isolate aus einer spanischen Klinik einen klonalen Ursprung aufwiesen. Die restlichen Isolate aus Frankreich (4/16) sowie die anderen europäischen Isolate (3/5) waren nicht klonal identisch.

Tabelle 12: MHK-Werte für Quinupristin/Dalfopristin und andere Antibiotika für 21 *S.aureus*-Isolate mit reduzierter Quinupristin/Dalfopristin-Sensibilität.

Nr.	Ursprungsland	MHK-Werte (mg/L)										
		Penicillin	Oxacillin	Cipro- floxacin	Gentamicin	Ery- thromy- cin	Clinda- mycin	Quinu- pristin	Dalfo- pristin	Quinu-/ Dalfo- pristin	Teico- planin	Vanco- mycin
1	Österreich	>8	8	>8	>500	>32	>32	>32	16	>32	2	2
2	Frankreich	>8	>8	>8	>16 (>500)	>32	>32	4	>32	2	4	2
3	Frankreich	>8	>8	>8	>500	>32	>32	>32	>32	16	4	2
4	Frankreich	>8	>8	>8	>500	>32	>32	>32	>32	>32	4	2
5	Frankreich	>8	>8	>8	>500	>32	>32	>32	>32	8	4	2
6	Frankreich	>8	>8	>8	>500	>32	>32	>32	>32	>32	4	4
7	Frankreich	>8	>8	>8	>500	>32	>32	>32	>32	16	4	2
8	Frankreich	>8	>8	>8	>500	>32	>32	>32	>32	16	4	2
9	Frankreich	>8	>8	>8	>500	>32	>32	>32	>32	8	4	4
10	Frankreich	>8	>8	>8	>500	>32	>32	>32	>32	16	4	4
11	Frankreich	>8	>8	>8	>500	>32	>32	>32	>32	32	4	1
12	Frankreich	>8	>8	>8	>16 (>500)	>32	>32	>32	>32	16	4	2
13	Frankreich	>8	>8	>8	>500	>32	>32	>32	>32	>32	4	2
14	Frankreich	>8	>8	>8	>500	>32	>32	>32	>32	>32	4	4
15	Frankreich	>8	>8	>8	>500	>32	>32	>32	>32	>32	4	2
16	Frankreich	>8	>8	>8	>500	>32	>32	>32	>32	32	4	4
17	Frankreich	8	0,5	>8	>500	>32	>32	>32	>32	>32	4	2
18	Spanien	>8	0,5	4	4	>32	>32	32	32	4	1	1
19	Spanien	>8	0,5	>8	1	>32	>32	>32	>32	4	0,5	1
20	Spanien	>8	8	>8	>500	>32	>32	>32	8	8	1	2
21	Großbritannien	>8	>8	>8	>500	>32	>32	>32	>32	>32	2	2

5 DISKUSSION

5.1 Methicillin-Resistenz im ersten und zweiten Jahr des ENARE-Programmes

Methicillin-Resistenz bei *S.aureus* ist heutzutage weltweit verbreitet und die Häufigkeit von Infektionen und Krankheitsausbrüchen nimmt stetig zu. So hat sich die Prävalenz von MRSA in Hospitälern in den USA zwischen 1974 und 1991 mehr als verzehnfacht [113]. In der vorliegenden Studie stieg die MRSA Prävalenz in europäischen Universitätskliniken, die am ENARE-Programm teilnahmen, innerhalb nur eines Jahres um immerhin drei Prozentpunkte von ca. 22% (1998) auf ca. 25% (1999). Damit lag sie 1999 nur noch knapp unter der Prävalenzrate, die in jüngsten US-Studien gefunden wurde [95, 115], betrug allerdings erfreulicherweise weniger als die Hälfte des aus Japan berichteten Prozentsatzes [63].

1994 beschrieben Voss *et al.*, dass die Prävalenz von MRSA zwischen Hospitälern in Europa deutlich variierte [152]. Ähnliche Beobachtungen wurden in jüngsten MRSA-Prävalenzstudien aus den USA berichtet [113, 115]. Der restriktive Gebrauch von Antibiotika, in Kombination mit schneller Identifizierung und strikter Isolation von Patienten mit MRSA-Besiedlung oder –Infektion, könnte die Ursache für die niedrige MRSA-Prävalenz in einigen europäischen Universitätskliniken sein. In der Tat wurde bereits für Dänemark ein signifikanter Rückgang von MRSA-Infektionen durch konsequente ausgedehnte Hygieneprogramme und kontrollierten Antibiotikaeinsatz beschrieben [73].

Die geographische Verteilung in Europa zeigte, dass die MRSA-Prävalenz in Südeuropa am höchsten war, was mit Ergebnissen früherer Studien übereinstimmt [152]. Dennoch muss auch berücksichtigt werden, dass nur einige wenige Kliniken pro Land am europäischen ENARE-Programm partizipierten und außerdem auch große Differenzen innerhalb eines Landes auftraten, wie z.B. 1999 die MRSA-Prävalenz von 34% in einer Klinik in Sevilla zeigte, gegenüber nur 9% in Barcelona. In solchen Fällen hoher Resistenzraten in einzelnen Kliniken könnten weitere Untersuchungen zur klonalen Verwandtschaft der Isolate Aufschluß über etwaige Ursachen, wie z.B. mangelnde Hygienemaßnahmen, geben.

Europäische *S.aureus*-Stämme, die bei nosokomialen Pneumonien isoliert wurden, waren häufiger Methicillin-resistent, als Isolate aus anderen Entnahme-Quellen. Dies könnte durch die prolongierten Antibiotika-Therapien bei schwer kranken Patienten bedingt sein, welche generell länger im Krankenhaus verbleiben, wodurch wiederum eine Erhöhung des Selekti-

onsdruckes resultiert. In der Tat fanden sich im Rahmen der amerikanischen SENTRY-Studie bei *S.aureus*-Isolaten aus unterschiedlichen Entnahmeorten vergleichbare Resistenzmuster [115].

Innerhalb der Hospitäler kamen die meisten *S.aureus*-Isolate und auch die meisten MRSA von internistischen- und chirurgischen Stationen, sowie von Intensivstationen. Dies reflektiert zwar zum Teil nur die relative Größe mancher Fachrichtungen, andererseits aber auch die Tatsache, dass bestimmte Patienten, wie z.B. kritisch Kranke auf Intensivstationen in größerer Gefahr schweben, kolonisiert oder infiziert zu werden. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie bezüglich der MRSA-Prävalenz in verschiedenen fachlichen Abteilungen stimmen weitgehend mit den jüngsten Daten aus den USA überein. Allerdings konnten die in der EPIC Studie 1996 beschriebenen sehr hohen MRSA-Prävalenzen von über 60% auf Intensivstationen nicht bestätigt werden [150]. Die niedrigen MRSA Prävalenzen in Notaufnahmen und Polikliniken deuten darauf hin, dass die Rate von MRSA in der Bevölkerung immer noch deutlich niedriger ist, als in Krankenhäusern [65, 103]. Hierbei muß allerdings berücksichtigt werden, dass aus diesen Quellen nur maximal 2% des Gesamtkollektivs der untersuchten *S.aureus*-Isolate stammte.

Die Verteilung von sowohl MSSA als auch MRSA über verschiedene Altersgruppen war ähnlich. Dabei scheint Alter allein kein Risikofaktor für den Erwerb von MRSA zu sein. Die *S.aureus*-Verteilung in Korrelation mit den Altersgruppen reflektiert wahrscheinlich eher die Altersverteilung in den Krankenhäusern.

5.2 Sensibilität gegenüber klassischen Antibiotika

Das Auftreten zahlreicher Antibiotika-Resistenzen bei *S.aureus* stellt eine konsequente Antwort auf den jahrzehntelangen extensiven Gebrauch therapeutisch bewährter Antibiotika dar. So finden Makrolid-, Lincosamid-, und Streptogramin-Antibiotika (MLS) seit vielen Jahren weitreichend Anwendung bei der Behandlung von Infektionen durch *S.aureus* und zahlreiche andere Mikroorganismen. Resistenzen gegenüber Makroliden, wie Erythromycin oder Clarithromycin, und Lincosamiden, wie Lincomycin oder Clindamycin, sind unter Staphylokokken mittlerweile weltweit prävalent [26, 124, 145]. Resistenzen gegen Streptogramine hingegen, die aus zwei synergistisch wirkenden Komponenten bestehen, sind bislang sehr selten [92].

Von den 3052 untersuchten *S.aureus*-Isolaten waren annähernd 40% Erythromycin-resistent und ca. 24% Clindamycin-resistent. Erythromycin und andere Makrolide werden aufgrund

ihrer guten Verträglichkeit bei Kindern und Erwachsenen sowohl im ambulanten, als auch im stationären Bereich ständig eingesetzt. Es ist somit wenig verwunderlich, dass die Resistenzrate für dieses gängige Standardtherapeutikum deutlich höher liegt als die Resistenzrate für das Reservetherapeutikum Clindamycin, welches üblicherweise der Therapie schwerer Infektionen vorbehalten bleibt. Durch diesen restriktiven Gebrauch von Clindamycin wird offensichtlich ein signifikant niedrigerer Selektionsdruck ausgeübt als dies beim Erythromycin der Fall ist.

Interessanterweise bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen Methicillin-Resistenz und Erythromycin-Resistenz, wobei 90% der MRSA, aber weniger als ein Viertel der MSSA Erythromycin-resistent waren. Dies stimmt weitgehend mit früheren Ergebnissen aus Asien überein. 1995 stellten Chang *et al.* bei Taiwanesischen Isolaten fest, dass 80% der MRSA, aber nur 30% der MSSA Makrolid-resistent waren. Dabei bestand eine Kreuzresistenz zwischen allen Makroliden [26]. Aus Japan wurden für MRSA sogar schon Makrolid-Resistenzraten von 88-100% beschrieben [106, 72].

Zwischen Clindamycin- und Methicillin-Resistenz bestand ebenfalls ein deutlicher Zusammenhang. Hier stand einer Clindamycin-Resistenzrate von 77% bei MRSA, eine Resistenzrate von nur 6% bei MSSA gegenüber. Dabei scheint trotz des Status als Reservetherapeutikum die Clindamycin-Resistenz bei *S.aureus* in den letzten Jahren stark angestiegen zu sein. So wurden beispielsweise Anfang der 90er Jahre in Multicenterstudien aus England und Deutschland für MRSA noch Clindamycin-Resistenzraten von nur 29% bzw. 36% beschrieben, während sie unter MSSA noch vernachlässigbar waren [118, 153]. Diese Erkenntnisse lieferten den Anstoß zur vergleichenden Untersuchung der molekularen Grundlagen der MLS-Resistenz bei MSSA und MRSA innerhalb Europas (s. 5.3).

Ein weiterer wichtiger Vertreter der klassischen Antibiotika sind die Tetracycline. Sie werden aufgrund des breiten Aktivitätsspektrums, der relativen Sicherheit und der niedrigen Kosten weltweit umfangreich in Landwirtschaft, Human- und Veterinärmedizin eingesetzt und stehen im jährlichen Verbrauch nach Penicillin an zweiter Stelle [119]. Bei der Therapie von Staphylokokken-Infektionen kommt Tetracyclin selbst allerdings nicht so weitverbreitet zur Anwendung, während sein semisynthetisches Derivat Minocyclin in manchen Ländern zur Therapie multiresistenter Staphylokokkenstämme eingesetzt wird [149].

In den letzten Jahren musste der therapeutische Gebrauch von Tetracyclin und seinen zahlreichen Derivaten in der Humanmedizin allerdings deutlich eingeschränkt werden, da Resistenzen in vielen Gruppen klinisch bedeutender Bakterien immer häufiger wurden [136].

Sehr deutlich zeigte sich diese Entwicklung in einer asiatischen Studie von 1996. Warsa *et al.* screenen hier die Tetracyclin-Resistenzrate unter klinischen *S.aureus*-Isolaten, welche in Indonesien zwischen 1986 und 1993 gesammelt worden waren. Die Ergebnisse waren alarmierend! Insgesamt lagen bei allen *S.aureus*-Isolaten die Resistenzraten für Tetracyclin bei mehr als 60% und die für Minocyclin bei 30%. Allerdings waren nahezu alle MRSA-Stämme resistent gegenüber Tetracyclin und Minocyclin [155].

Die hier für ein sehr großes europäisches Kollektiv von 3052 *S.aureus*-Isolaten ermittelten Tetracyclin-Resistenzraten lagen mit 57% für MRSA und 10% für MSSA insgesamt niedriger, als die Werte der Indonesischen Studie. Insbesondere die Minocyclin-Resistenzraten waren mit ca. 8% für MRSA und 2% für MSSA deutlich niedriger. Wie schon bei den Makroliden war auch bei den Tetracyclinen die Beziehung zur Methicillinresistenz unübersehbar, so dass auch hier eine weitergehende molekulargenetische Untersuchung angeschlossen wurde (s. 5.4).

Auch Rifampicin wird seit über 35 Jahren therapeutisch genutzt. Obwohl die antituberkulöse Kombinationstherapie als das klassische Einsatzgebiet des Rifampicins gilt, stellt es aber auch einen wichtigen Kombinationspartner in der Therapie schwerer Staphylokokken-Infektionen dar. Wie bereits für Makrolide und Tetracycline beschrieben, bestand bei den hier untersuchten *S.aureus*-Isolaten auch ein signifikanter Zusammenhang zwischen Methicillin-Resistenz und Rifampicin-Resistenz, wobei einer vernachlässigbar geringen Resistenzrate bei MSSA eine sehr hohe Resistenzrate von 54% bei MRSA gegenüberstand. Auch bei diesem Antibiotikum wurden daher die molekulargenetischen Grundlagen von MSSA und MRSA weiter untersucht und verglichen (s. 5.5).

5.3 Detektion von MLS-Resistenzgenen

Makrolid-Resistenz bei *S.aureus* ist Teil des erstmals von Chabbert 1956 [160] beschriebenen Makrolid-Lincosamid-Streptogramin (MLS_B)-Resistenz-Phänotyps, der weiter eingeteilt wird in konstitutive MLS_B-Expression (Erythromycin-resistent und Clindamycin-resistent) und induzierbare MLS_B-Expression (Erythromycin-resistent und Clindamycin-sensibel).

In der hier vorliegenden Untersuchung fanden sich hinsichtlich dieses Resistenz-Phänotyps deutliche Differenzen zwischen MSSA und MRSA. Der induzierbare Phänotyp war prädominant in Methicillin-sensiblen *S.aureus* (MSSA, 56%), und der konstitutive Phänotyp war prädominant in Methicillin-resistenten *S.aureus* (MRSA, 93%). Dies stimmt weitgehend mit den Ergebnissen einer von Lina *et al.* Ende der 90er Jahre durchgeführten französischen Studie an

144 MLS_B-resistente *S.aureus*-Stämme überein, obwohl die Verteilung bei diesen Autoren noch deutlicher war. Hier zeigten 82% der MSSA einen induzierbaren- und 83% der MRSA einen konstitutiven Phänotyp [90].

Hinsichtlich der molekulargenetischen Grundlagen der MLS_B-Resistenz umfaßte die hier vorliegende Studie das größte Kollektiv neuester klinischer Erythromycin-resistenter *S.aureus*-Isolate, das bis jetzt auf die Prävalenz von Makrolid-Resistenzgenen hin untersucht wurde. Dabei war das *ermA*-Gen die Determinante mit der höchsten Prävalenz (67%), gefolgt von *ermC* (23%) und *msrA/msrB* (6%). Am wenigsten vertreten waren *ermB* und *ereB* (je ca. 0,6%), während *ereA* nicht detektiert wurde.

Eine MLS_B-Resistenz in *S.aureus* war somit überwiegend bedingt durch die Anwesenheit von zwei evolutionären Varianten der *erm*-Determinante (*ermA* und *ermC*), die für eine 23S rRNA Methylase kodieren und so indirekt über eine Konformationsänderung des Ribosoms eine Target-Modifikation vermitteln. Die Verteilung hing dabei jedoch vom Resistenzmuster des Stammes (Methicillin-resistent oder –sensibel) ab. Das *ermA*-Gen war häufiger in MRSA (88%) als in MSSA (38%) vertreten, vor allem in Stämmen mit einer konstitutiven MLS_B-Expression, während *ermC* prädominant in MSSA (47%) war, vor allem in Stämmen mit einer induzierbaren Expression und seltener in MRSA (5%) detektiert wurde. Diese Ergebnisse stimmen weitestgehend mit denen von Lina *et al.* überein [90]. Auch sie fanden in ihrer Studie heraus, dass das *ermA*-Gen häufiger in MRSA vertreten war (57,6% gegenüber 5,6% bei MSSA), während *ermC* prädominant in MSSA war (20,1% gegenüber 4,9% bei MRSA). Darüber hinaus stellten auch diese Autoren fest, dass das *ermA*-Gen prädominant in Stämmen mit konstitutivem MLS_B-Phänotyp war, während das *ermC*-Gen häufiger in Stämmen mit induzierbarem MLS_B-Phänotyp gefunden wurde.

Von Westh *et al.* [160] durchgeführte Analysen dänischer *S.aureus* Stämme, die zwischen 1959 und 1988 isoliert wurden, bestätigen die hier ermittelten Daten ebenfalls. In dieser Studie waren bei 98% der 428 untersuchten *S.aureus*-Isolaten die Determinanten *ermA* und das *ermC* für eine Erythromycin-Resistenz verantwortlich. Dabei war interessanterweise bis 1971 das *ermA*-Gen allein verantwortlich für die Erythromycin-Resistenz, während das *ermC*-Gen erst zwischen 1984 und 1988 dominant wurde. *ErmA* war dabei Teil des Transposons Tn554 im Chromosom, wohingegen *ermC* auf dem Plasmid gefunden wurde [145, 146]. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen aus Dänemark detektierten Nicola *et al.* das *ermA*-Gen in 15 von 16 aus den USA stammenden Erythromycin-resistenten *S.aureus*-Isolaten, die zwischen 1958 und 1969 gesammelt wurden [111]. Demnach scheint das *ermC*-Gen in der *S.aureus* Population erst seit einer begrenzten Zeit eine Rolle zu spielen.

Bezüglich der niedrigen Prävalenz von *ermB* stimmen die hier vorliegenden Resultate mit denen der vorangegangenen Studien überein [90, 111]. *ErmB* war nur in einer Minderheit der Stämme präsent und wurde vorher nur in Stämmen tierischer Herkunft gefunden [44, 145].

Im Gegensatz zu Lina *et al.* [90] und Nicola *et al.* [111], die keine Kombination verschiedener *erm*-Gene in einzelnen *S.aureus*-Isolaten feststellen konnten, wurde in dieser Studie zumindest in 3% der Isolate eine Kombination von *ermA* und *ermC* gefunden.

Das *ereB*-Gen kodiert für eine Esterase, die durch Hydrolysierung eine Inaktivierung von Makroliden bewirkt. Es wurde ausschließlich in MRSA gefunden, die den konstitutiven MLS_B-Phänotyp exprimierten. *EreB* und *ereA* finden sich üblicherweise in Stämmen von *Enterobacteriaceae* mit hochgradiger Erythromycinresistenz, vor allem in *Escherichia coli* [6]. Dabei tritt *ereB* in *E.coli* regelmäßig in Kombination mit *ermB* auf, wobei beide Gene synergistisch zu der hochgradigen Erythromycin-Resistenz beitragen [7]. In der vorliegenden Untersuchung trat in keinem der *ereB* tragenden *S.aureus*-Isolate, eine Kombination mit einer anderen Makrolid-Resistenz-Determinante auf. Für *S.aureus* hatten bislang Wondrack *et al.* die einzige Beschreibung eines Stammes, der die Esterase EreB produzierte [162]. Ansonsten ist keine andere Beobachtungsstudie bekannt, welche die Prävalenz von *ereA* oder *ereB* in Erythromycin-resistenten *S.aureus*-Stämmen beschreibt. Da auch in der vorliegenden Studie nur 5 Stämme die Determinante *ereB* aufwiesen, muss davon ausgegangen werden, dass sie für die MLS_B-Resistenz bei *S.aureus* zur Zeit nur eine untergeordnete Rolle spielt. Ähnlich wie bei *ermC* wäre es natürlich denkbar, dass auch die Prävalenz von *ereB* bei *S.aureus* in den nächsten Jahren, z.B. durch Gentransfer, zunehmen könnte. Eine solche Entwicklung könnte nur über die genaue Überwachung großer Staphylokokken-Kollektive aufgedeckt werden.

Das *msrA/msrB*-Gen kodiert für eine Makrolid-Resistenz durch aktiven Efflux. Es verleiht eine induzierbare Resistenz gegenüber 14- und 15-gliedrigen Makroliden und Streptogramin Typ-B Antibiotika (MS-Phänotyp) und wurde ursprünglich in Koagulase-negativen Staphylokokken (KNS) beschrieben. In der hier vorliegenden Studie wurde das *msrA/msrB*-Gen ausschließlich in MSSA gefunden (14/158; 13%). Diese Resultate stehen dabei im Gegensatz zu denen von Lina *et al.* [90], die das *msrA/msrB*-Gen sowohl in MSSA als auch in MRSA detektieren konnten, wobei sie jedoch nur eine Prävalenz von 2,1% in *S.aureus* feststellten. Bei den koagulasenegativen Staphylokokken konnten sie hingegen eine Prävalenz des *msrA/msrB*-Gens von 14,6% detektieren. Das Auftreten von ursprünglich in Koagulase-negativen Staphylokokken gefundenen Resistenzdeterminanten auch in *S.aureus* ist wenig verwunderlich, da schon vielfach verwandte oder identische Determinanten und Plasmide in beiden Organismen gefunden wurden, so dass davon ausgegangen werden muß, dass beide

sich einen gemeinsamen Gen-Pool teilen und den KNS eine wichtige Rolle bei der Resistenzentwicklung in *S.aureus* zukommt.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Lina *et. al.* [90] konnte auch in der vorliegenden Studie keine Kombination von *msrA/msrB* mit einer anderen Makrolid-Resistenz-Determinante gefunden werden. Bisher wurden nur drei *S.aureus* Stämme beschrieben, welche sowohl eine Esterase-Aktivität zur Hydrolysierung von Makroliden als auch ein Makrolid-Efflux-System zeigten [97, 162].

Die Häufigkeit des Auftretens von Isolaten, welche zwar phänotypisch eine Erythromycin-Resistenz zeigten, bei denen jedoch keines der sechs Resistenzgene detektiert werden konnte, rangierte immerhin zwischen 4,5% und 8,6%, in den vier Gruppen der analysierten Isolate. Dies impliziert, dass andere bisher undetektierte Resistenz-Mechanismen oder Gene zu einer Makrolid-Resistenz in *S.aureus* beitragen.

5.4 Detektion von Tetracyclin-Resistenzgenen

Insgesamt wurden bislang in gram-positiven Kokken (*Staphylococcus*, *Streptococcus* und *Enterococcus spp.*) fünf Klassen von Tetracyclin-Resistenzdeterminanten, *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetN* und *tetO*, unterschieden. Dabei scheint die Verteilung und Prädominanz der einzelnen Gene zwischen den verschiedenen Bakterienspezies zu variieren.

Trzinski *et al.* veröffentlichten im Jahre 2000 einen höchst interessanten Artikel, in welchem die Expression der Tetracyclin-Resistenz in 66 MRSA-Isolaten, überwiegend aus dem osteuropäischen Raum, analysiert wurde [148]. Hierbei wurde zunächst mittels PCR hinsichtlich der Präsenz der vier Tetracyclin-Resistenz-Determinanten, *tetK*, *tetL*, *tetM* und *tetO* gescreent und anschließend die MHK-Werte für Tetracyclin, Doxycyclin und Minocyclin, jeweils mit und ohne Präinkubation mit subinhibitorischen Konzentrationen von Tetracyclin oder Minocyclin, bestimmt. Bereits 1990 hatten Bismuth *et al.* 99 klinische *S.aureus* (64 MRSA und 35 MSSA) aus Paris mittels DNA-Hybridisierung hinsichtlich dieser vier Resistenzdeterminanten untersucht [15]. Darüber hinaus existiert eine umfangreiche Studie von Warsa *et al.* zur Verteilung von *tetK* und *tetM* bei *Staphylokokkus aureus* aus dem asiatischen Raum [154]. Trotz des phänotypisch signifikanten Zusammenhangs zwischen Methicillin-Resistenz und der Resistenz gegenüber Tetracyclin fehlten bislang für Europa neuere, großangelegte Studien zu den molekulargenetischen Grundlagen der Tetracyclinresistenz bei MRSA im Vergleich zu MSSA. Es wurden daher in der hier vorliegenden Studie 400 MRSA und 200 MSSA vergleichend nach den Vorgaben von Trzinski *et al.* [148] und Warsa *et al.* [154] untersucht. Damit

beinhaltet diese europaweite Studie zur Prävalenz von Tetracyclin-Resistenzgenen das größte bislang untersuchte Kollektiv von klinisch gesammelten *S.aureus*-Isolaten.

Von den 66, überwiegend osteuropäischen MRSA-Isolaten in der Studie von Trzcinski *et al.* zeigten 24 Stämme ausschließlich *tetM*, 21 wiesen nur *tetK* auf, und weitere 21 enthielten sowohl *tetK* als auch *tetM*. Alle Isolate waren *tetL*- und *tetO*-negativ [148]. Diese Ergebnisse für MRSA konnten in der hier vorliegenden Studie weitgehend bestätigt werden: auch hier war das *tetM*-Gen die Tetracyclin-Resistenz-Determinante mit der höchsten Prävalenz in MRSA Isolaten (76%), dicht gefolgt von der Determinante *tetK* (73%). Alle untersuchten MRSA- Stämme waren *tetO*-negativ und *tetL* konnte nur in 6 Isolaten detektiert werden. Hingegen war bei den zum Vergleich getesteten MSSA das *tetK*-Gen bei fast allen Stämmen (96%) für die Tetracyclinresistenz verantwortlich, *TetM* war selten und alle Stämme waren *tetL* und *tetO*-negativ. In der Tat konnten also signifikante Unterschiede in der Genausstattung von MRSA und MSSA nachgewiesen werden.

Insgesamt zeigen die hier vorliegenden Ergebnisse, dass das *tetM* und das *tetK*-Gen die beiden Determinanten mit der höchsten Prävalenz in MRSA und MSSA sind. Dies stimmt mit den Ergebnissen anderer Autoren überein [15, 148, 154] und zeigt die zentrale Rolle der beiden Gene für die Tetracyclin-Resistenz bei *S.aureus*.

Es bestand eine exzellente Korrelation zwischen den Resistenz-Phänotypen, gemessen am MHK-Wert und den durch die PCR nachgewiesenen Genotypen. Stämme, welche nur *tetK* enthielten, waren resistent gegen Tetracyclin, bei jedoch erhaltener Sensibilität gegenüber Minocyclin. Alle das *tetM* -Gen tragenden Isolate hingegen zeigten *in-vitro* eine Resistenz gegenüber sowohl Tetracyclin als auch Minocyclin. Die genauen biochemischen Zusammenhänge dieses Phänomens sind zwar noch ungeklärt, die Ursache liegt jedoch höchstwahrscheinlich in der Natur des jeweiligen Resistenzmechanismus. Die durch *tetM* vermittelte ribosomale Protektion scheint dabei die Tetracyclin-Zielregion an den bakteriellen 70S-Ribosomen komplett gegen jegliche Form von Tetracyclinen zu schützen, während der durch *tetK* vermittelte aktive Efflux offensichtlich weitgehend spezifisch für Tetracyclin ist und z.B. Minocyclin unberührt läßt.

Trzcinski *et al.* schlugen in ihrem Artikel bereits für die Praxis vor, dass alle Tetracyclin-resistenten *S.aureus*-Isolate ebenfalls als Doxycyclin-resistent, und alle *tetM*-positiven Isolate als resistent gegenüber allen Tetracyclinen behandelt werden müßten [148]. Vereinfacht gesehen müßten dann gemäß dem ermittelten Verteilungsmuster der Resistenzgene Tetracyclin-resistente MRSA per se als Minocyclin-resistent und Tetracyclin-resistente MSSA als höchstwahrscheinlich Minocyclin-sensibel eingestuft werden.

Interessant war auch das kombinierte Auftreten der beiden Gene *tetM* und *tetK*. Solche Kombinationen fanden sich annähernd 10mal häufiger in den Tetracyclin-resistenten MRSA als in den Tetracyclin-resistenten MSSA und alle Isolate, welche eine Kombination der Gene *tetK* und *tetM* beinhalteten zeigten zwei bis vierfach höhere MHK-Werte, als jene Stämme, welche nur eines der beiden Gene besaßen. Auch diese Beobachtung ähnelt der anderer Studien und lässt vermuten, dass diese beiden Gene sich in additiver Form verstärken [15, 148, 154].

Allerdings zeigte sich bei der Bestimmung der MHK-Werte der einzelnen Isolate auch, dass interindividuell durchaus Variabilitäten in der Höhe des MHK-Wertes bestanden, welche sich nicht durch Unterschiede in der Ausstattung mit verschiedenen Resistenzdeterminanten erklären ließen. So wiesen Stämme, welche nur die Determinante *tetM* enthielten, zum Teil unterschiedliche MHK-Werte auf, so dass sich die Frage stellte, ob sich diese Stämme möglicherweise durch Mutationen innerhalb des *tetM*-Genes unterscheiden (s. 5.4.1).

Die Resistenzdeterminanten *tetM* und *tetO* scheinen entwicklungsgeschichtlich gemeinsame Vorfahren zu haben [135]. *TetO* soll ebenso wie *tetM* durch ribosomale Protektion eine kombinierte Resistenz gegenüber Tetracyclin und Minocyclin vermitteln. Es ist typischerweise für die Tetracyclin-Resistenz in *Campylobacter spp.* verantwortlich und konnte auch in Streptokokken und Enterokokken nachgewiesen werden [135, 166]. Trotz des großen untersuchten Kollektivs von *S.aureus* konnte das *tetO*-Gen in der hier vorliegenden Untersuchung ebenso wenig nachgewiesen werden wie in den erwähnten, vorangegangenen Studien [15, 148]. Es muß also davon ausgegangen werden, dass diese Determinante bei *S.aureus* im Gegensatz zu anderen gram-positiven Kokken keine Bedeutung hat.

TetL vermittelt ebenso wie *tetK* eine selektive Resistenz gegenüber Tetracyclin durch aktiven Efflux. Die Produkte beider Gene sind homolog zueinander, Verteilung und Prädominanz beider Gene scheinen aber unter gram-positiven Kokken zu variieren, wobei *tetL* unter Streptokokken und Enterokokken weiter verbreitet sein soll als unter Staphylokokken [116, 166]. Wie bereits in einer Studie von Bismuth *et al.* 1990 konnte das *tetL*-Gen auch in der vorliegenden Untersuchung in einigen wenigen *S.aureus* Isolaten detektiert werden [15]. Im Gegensatz dazu konnten Trzcinski *et al.* [148] in ihrem kleineren Kollektiv dieses Gen nicht nachweisen. Es ist daher anzunehmen, dass der Determinante *tetL* bei der Tetracyclin-Resistenz in *S.aureus* nur eine untergeordnete Bedeutung zukommt. Immerhin bestätigt das Auftreten dieser bei Streptokokken und Enterokokken wichtigen Resistenzdeterminante in *S.aureus* das Vorhandensein eines genetischen Austausches zwischen gram-positiven Bakterien unter natürlichen Bedingungen.

5.4.1 Sequenzierung der Tetracyclin-Resistenzdeterminante *tetM*

S.aureus Stämme, die nur die Resistenzdeterminante *tetM* trugen, zeigten zum Teil deutlich differente MHK-Werte. Bei *E.coli* und Pneumokokken sind als Phänomen sogenannte repetitive Sequenzen in der Promoterregion von Tetracyclin-Resistenzgenen beschrieben worden, welche jedoch offensichtlich ohne Bedeutung für das Resistenzverhalten waren. Da die Promotorregion jedoch für die Regulation der Genexpression verantwortlich ist, könnten Veränderungen in diesem Bereich durchaus eine Rolle bei der Ausprägung des Resistenzphänotyps spielen.

Allerdings zeigte sich in allen 324 aufgeschlüsselten *TetM*-Promotorregionen eine identische Sequenz ohne repetitive Abschnitte oder andere Variabilitäten. Eine Mutation innerhalb dieses Abschnittes des *tetM*-Genes scheint somit bei *S.aureus* nicht die Ursache der interindividuellen MHK-Wert Variabilität zu sein. Vielmehr müssen andere, bislang unbekannte Faktoren für dieses Phänomen verantwortlich sein. Hier kämen unter anderem Mutationen in anderen Bereichen des *tetM*-Genes in Frage. Aber auch zusätzliche, bislang noch nicht detektierte Resistenzdeterminanten könnten durch Kombination mit *tetM* einzelnen Stämmen deutlich höhere MHK-Werte verleihen.

Die in dieser Untersuchung aufgeschlüsselte Sequenz stimmt mit Ausnahme eines Codons mit der Vorlage von Nensin *et al.* überein [109]. Da dieser Basenaustausch mit folgendem Aminosäureaustausch in allen untersuchten Stämmen konserviert war, scheint ihm jedoch keine Bedeutung für die Expression der Tetracyclin-Resistenz zuzukommen.

5.5 Rifampicin-Resistenz

Das klassischerweise in der antituberkulösen Kombinationstherapie eingesetzte Ansamycin-Antibiotikum Rifampicin stellt auch einen wichtigen Kombinationspartner in der Therapie schwerer Staphylokokken-Infektionen dar. Grundsätzlich ist das moderat bakterizide Reserveantibiotikum Vancomycin Mittel der Wahl gegen *S.aureus*, wenn β -Lactame ungeeignet sind. Eine Kombination mit Rifampicin, welches eine starke antibakterielle Aktivität mit einer guten Gewebegängigkeit vereinigt ist jedoch oftmals unerlässlich um schwerwiegende, tiefsitzende Infektionen zu erreichen [2, 55, 127]. Auch Fluorochinolone in Kombination mit Rifampicin sind eine therapeutische Alternative bei schweren MSSA-Infektionen.

Wie bereits beschrieben bestand bei den hier untersuchten *S.aureus*-Isolaten ein signifikanter Zusammenhang zwischen Methicillin-Resistenz und Resistenz gegenüber Rifampicin, wobei

einer vernachlässigbar geringen Resistenzrate bei MSSA eine sehr hohe Resistenzrate von 54% bei MRSA gegenüberstand.

Um eine Ursache für dieses bislang unklare Phänomen zu finden, wurden unter Antibiotikaselektionsdruck *in-vitro* Rifampicin-resistente Mutanten von MSSA und MRSA gezüchtet und hinsichtlich der Resistenzentwicklung vergleichend untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine Resistenz gegenüber Methicillin keinen Einfluß auf die spontane Mutationsrate und die Geschwindigkeit einer Resistenzentwicklung hatte.

Auffällig war jedoch die relative Leichtigkeit, mit der aus Rifampicin-sensiblen Stämmen resistente Mutanten *in vitro* erzeugt werden konnten, ganz gleich ob es sich um MSSA oder MRSA handelte. Dieses Phänomen wurde bereits von Aubry-Damon *et al.* 1998 beschrieben [8]. Diese Beobachtung bestätigt, dass Rifampicin nur im Rahmen von Kombinationsregimen und nicht als Einzeltherapeutikum verordnet werden sollte. Da außerdem das Auftreten von Mutanten *in vivo* auch unter Kombinationsschemata bekannt ist, sollte auch auf eine Interaktion zwischen Rifampicin und anderen Antibiotika geachtet werden [8].

Eine weitere mögliche Erklärung für die höheren Resistenzraten bei MRSA liegt in einem Phänomen, welches als Hypermutableität von Target-Genen bekannt ist und beispielsweise für *E.coli*, *Salmonellen* oder *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben wurde [84, 112]. Bei diesen Spezies haben die sogenannten Mutatorstämme ihre Mutationen typischerweise in Genen, die den DNA-Metabolismus kontrollieren [84, 112]. Es wurden daher alle *in vitro* gezüchteten Rifampicin-resistenten MSSA und MRSA-Mutanten mittels Sequenzierung bezüglich des Auftretens von Mutationen im *rpoB*-Gen vergleichend untersucht. Anschließend wurde noch ein großes Kollektiv klinischer Isolate auf dieselbe Weise untersucht, um den erhobenen *in vitro* Daten Ergebnisse von „Wildtyp“-Stämmen gegenüberstellen zu können. Erstaunlicherweise fanden sich auch hier weder bei den Mutanten, noch bei den klinischen Stämmen quantitative oder qualitative Unterschiede im Verteilungsmuster der Mutationen bei MSSA und MRSA. Die höheren Resistenzraten in MRSA sind demnach auch kein Ergebnis einer Hypermutableität von Target-Genen sondern sind möglicherweise eine reine Konsequenz einer klonalen Verbreitung von MRSA. Sollte sich dies als alleinige Ursache bestätigen, wäre der Hauptangriffspunkt in einer Verbesserung der Hygiene zur Eindämmung der Ausbreitung dieser Bakterien zu sehen. Insgesamt kämen Kombinationsregime mit Rifampicin somit in der Praxis nicht nur für Rifampicin-sensible MSSA sondern auch für Rifampicin-sensible MRSA in Frage.

Interessanterweise fanden sich bei der überwiegenden Mehrzahl aller Stämme, gleich ob Mutante, klinisches Isolat, MRSA oder MSSA multiple Mutationen innerhalb des *rpoB*-Genes,

während Einzelmutationen zwar vorkamen, insgesamt jedoch seltener waren und im Durchschnitt niedrigere MHK-Werte aufwiesen. Das Überwiegen solcher multiplen Mutationen wurde erstmals von Wichelhaus *et al.* 1999 für ein Kollektiv von 40 klinischen MRSA beschrieben [161]. Insgesamt könnten solche multiplen Mutationen bei klinischen Isolaten wiederum zum einen durch die epidemische Natur vieler MRSA-Stämme und zum anderen durch die ständige Exposition dieser Stämme gegenüber dem häufig eingesetzten Therapeutikum Rifampicin erklärt werden.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Untersuchung stimmen auch insofern mit denen von Wichelhaus *et al.* überein, als Stämme mit zwei oder drei Aminosäureaustauschen besonders hohe MHK-Werte aufwiesen [161]. Obgleich auch Einzelmutationen zu hohen MHK-Werten führen können, scheinen sich solche Mehrfachmutationen doch im Sinne einer mehrschrittigen Resistenzentwicklung verstärken zu können.

Bei der Betrachtung der detektierten Mutationen im einzelnen fällt zunächst auf, dass das Codon 481 mit den beiden Aminosäureaustauschen [His-481→Tyr] und [His-481→Asn] am häufigsten betroffen war. Diese Feststellung stimmt mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen überein [8, 161] und zeigt die zentrale Rolle dieser Position im *rpoB*-Gen für die Rifampicin-Resistenz bei *S.aureus* an.

Weiterhin ist bemerkenswert, dass von den insgesamt sechs nachweisbaren Lokalisationen von Mutationen im *rpoB*-Gen (Codon 468, 471, 477, 481, 486 und 529) immerhin vier innerhalb des Abschnittes 471-495 (*S.aureus* Koordinaten) lagen. Dieser Abschnitt entspricht nach Aubry-Damon *et al.* der Region 516-540 bei *Escherichia coli*. Es konnte gezeigt werden, dass bei *E.coli* eben diese Region Teil des Angriffsziels für Rifampicin ist [157] und zusammen mit den Resten 1065 und 1237 (*E.coli* Koordinaten) an der Formation der Initiations-Stelle, beim Einsetzen der β -Untereinheit in den RNA-Polymerase Komplex, beteiligt ist [130]. Neben dieser Übereinstimmung mit *E.coli* Koordinaten waren die detektierten Mutationen bei *S.aureus* außerdem größtenteils noch identisch zu, oder im gleichen Codon wie jene in anderen Eubacteriae, wie z.B. *N.meningitidis* und *M. tuberculosis* [8, 20, 142]. Dies legt nahe, dass die an der Interaktion mit Rifampicin beteiligten Regionen unter Prokaryonten größtenteils konserviert sind.

5.6 Sensibilität von MRSA gegenüber alternativen Therapeutika

Durch die meist mit der Methicillin-Resistenz bei *S.aureus* vergesellschaftete Multiresistenz verlieren die klassischen, klinisch häufig eingesetzten Antibiotika zunehmend an Bedeutung,

wobei derzeit in vielen Fällen die Glycopeptid-Antibiotika Vancomycin und Teicoplanin als letzte therapeutische Möglichkeit verbleiben.

Neuste Berichte aus den USA und Japan über das Auftreten von Methicillin-resistenten *S.aureus*-Stämmen mit reduzierter Empfindlichkeit gegenüber Vancomycin und anderen Glykopeptiden erschüttern nun auch diesen Grundpfeiler der MRSA-Therapie und setzen die Antibiotika-Therapie neu unter Druck [21, 61, 66, 67].

Im Gegensatz zu diesen alarmierenden Daten aus anderen Kontinenten waren aber alle im Rahmen der vorliegenden Studie untersuchten MRSA vollständig sensibel gegenüber Vancomycin. Nur 9 von 302 Isolaten standen mit einem MHK-Wert von 4µg/ml an der Schwelle zur intermediären Resistenz. Vancomycin-intermediär-resistente *S.aureus* Isolate (VISA) aus den USA und Japan wurden bei 8µg Vancomycin pro ml gehemmt, während weitere *S.aureus* - Isolate mit ähnlichen Pulsfeld Gel Elektrophorese Typen bei 2 bis 4µg/ml inhibiert wurden. Tenover *et. al.* [144] und Hiramatsu *et al.* [66] stellten die Hypothese auf, dass eine abnehmende Sensibilität gegenüber Vancomycin bei Staphylokokken möglicherweise auf einen allmählichen Selektionsprozeß unter dem Druck einer Vancomycin-Therapie zurück zu führen sei. Obgleich innerhalb des europäischen Kollektivs von MRSA keine VISAs oder Hetero-VISAs detektiert wurden, ist es wahrscheinlich, dass auch in Europa früher oder später Staphylokokken mit reduzierter Vancomycin-Empfindlichkeit auftreten werden. Daher werden dringend alternative Antibiotika mit Wirksamkeit gegen MRSA benötigt, deren Aktivitätspotential und Zuverlässigkeit dem des Vancomycins entspricht.

Bis neue Alternativtherapeutika klinisch genutzt werden können, müßte bei reduzierter Vancomycin-Sensibilität möglicherweise auf bereits etablierte Reserveantibiotika zurückgegriffen werden. Aminoglykoside beispielsweise sind stark bakterizid wirkende Breitspektrumantibiotika, welche häufig im Rahmen von Kombinationsregimen zur gezielten und ungezielten Therapie lebensbedrohlicher Infektionen eingesetzt werden. Nur 15% der 302 untersuchten MRSA waren noch gegen das Standardaminoglycosid Gentamicin sensibel und nur 20% zeigten noch eine Empfindlichkeit gegenüber Amicacin, welches eigentlich als Reserve-Aminoglycosid bei Resistenzen gegenüber Gentamicin dienen sollte. Damit muß der Nutzen von Aminoglycosiden in der MRSA-Therapie in Frage gestellt werden. Deutlich günstigere Sensibilitätsraten von jeweils über 70% zeigten sich für das Kombinationspräparat Co-Trimoxazol, das im klinischen Alltag bisher vorrangig bei der Therapie von Harnwegsinfekten zum Einsatz kommt, für das Reserveantibiotikum Fusidinsäure und für das meist bei Allergien gegen gängige Antibiotika eingesetzte Reservebreitspektrum-Antibiotikum Fosfomycin. Insgesamt korrespondieren die genannten Prozentzahlen weitgehend mit den

Ergebnissen anderer Untersuchungen für die entsprechenden Antibiotika [152]. Für die meisten der getesteten Reserve-Substanzen mit Ausnahme der Aminoglycoside ist jedoch die Rolle in der Therapie von MRSA-Infektionen weitgehend unklar, da bislang kaum Daten zur klinischen Effizienz dieser Antibiotika verfügbar sind [24, 127]. Die erhobenen *in vitro* Sensibilitätsraten zeigen jedoch, dass keines der getesteten Reserveantibiotika eine gleichwertige Alternative zum Vancomycin darstellt, da die multiresistente Natur der meisten MRSA die Zuverlässigkeit dieser Substanzen erheblich beeinträchtigt. Darüber hinaus variierte in der vorliegenden Studie die Multi-Resistenz geographisch sehr stark, so dass insgesamt ein therapeutischer Einsatz der getesteten Substanzen nur unter Durchführung von Sensibilitätstestungen empfohlen werden kann. Unter diesen Umständen bieten die Reserveantibiotika immer noch ein therapeutisch nutzbares Aktivitätspotential, welches besonders im Rahmen von Kombinationsregimen ausgeschöpft werden könnte. Leider sind derzeit für die getesteten Medikamente, wiederum mit Ausnahme der Aminoglycoside, keine brauchbaren Daten über mögliche Kombinationstherapien verfügbar. Insbesondere bleibt ungeklärt, welche Substanzen hinsichtlich einer synergistischen Wirkung sowie einer akzeptablen Verträglichkeit die besten Kombinationspartner im Rahmen einer solchen Therapie darstellen könnten [24, 127]. Da einige der partizipierenden Universitätskliniken nur Isolate mit vollständiger Sensibilität gegenüber Fosfomycin einsandten, scheint dieses bakterizid wirkende Breitspektrumantibiotikum zumindest in einigen geographischen Gebieten eine gute Zuverlässigkeit aufzuweisen. Somit könnten besonders Kombinationsregime mit diesem Medikament von hohem therapeutischem Nutzen sein, wobei jedoch auch hier leider noch keine Daten vorliegen, auf deren Grundlage man eine empirische Kombinations-Therapie empfehlen könnte.

Die Zukunft der alternativen MRSA-Therapie könnte vielmehr in Antibiotika liegen, die sich derzeit in der klinischen Erprobung befinden. Zu den vielversprechendsten Kandidaten zählen hierbei die neuen semisynthetischen Streptogramin-Mischpräparate mit der Leitsubstanz Quinupristin/Dalfopristin (Synercid®), sowie die neuen fluorinierten Oxazolidinone Linezolid und Eperezolid. Beide Substanzen haben sich bislang in klinischen Studien als effektiv und relativ gut verträglich erwiesen [18, 42].

Für das Streptogramin-Mischpräparat Quinupristin/Dalfopristin wurde bereits mehrfach eine Aktivität gegen *S.aureus*, inklusive MLS_B-resistenter Stämme, beschrieben [11, 49, 50, 68]. Alle 302 im Rahmen der vorliegenden Studie untersuchten MRSA waren vollständig sensibel gegenüber Quinupristin/Dalfopristin (Synercid®). Dieses Ergebnis beruhte vermutlich auf der Tatsache, dass der komplexe Aufbau des Wirkstoffes aus zwei synergistisch wirkenden, strukturell verschiedenen Komponenten, für die jeweils voneinander unabhängige Resistenzme-

chanismen existieren, eine Resistenzentwicklung deutlich erschwert [27]. Passend hierzu beobachteten Kang und Rybac 1995 [79] bei *in vitro* Untersuchungen zur Synercid®-Resistenzentwicklung bei MRSA sehr niedrige spontane Mutationsraten. Die klinische Bedeutung dieser niedrigen *in vitro* Resistenzentwicklung bleibt bei dem bislang limitierten Einsatz der Substanz unklar und muss in klinischen Studien weiter untersucht werden.

Insgesamt stimmten die $MHK_{50/90}$ -Werte und die Bandbreite der MHK-Werte ($\leq 0.25\text{--}4\mu\text{g/ml}$) von Quinupristin/Dalfopristin (Synercid®) mit denen von Vancomycin überein. Das Kombinationspräparat Synercid® zeichnet sich im Gegensatz zu seinen bakteriostatisch wirkenden Einzelkomponenten *in vitro* durch eine bacterizide Aktivität aus, die in *in vivo*-Modellen bestätigt werden konnte [11]. So konnte in einer früheren Studie *in vitro* und am Tier-Modell festgestellt werden, dass abhängig vom untersuchten MRSA-Stamm, die bacterizide Aktivität von Synercid® gleich hoch, bzw. nur geringfügig schwächer war, als die von Vancomycin [25]. Synercid® stellt somit eine vielversprechende Alternative zu Vancomycin in der MRSA-Therapie dar, vorausgesetzt, die pharmakokinetischen Parameter werden so eingestellt, dass prolongierte Wirkspiegel von beiden Bestandteile im Serum gewährleistet sind [24, 127].

Das Oxazolidinon Linezolid zeigte im Rahmen der vorliegenden Studie eine *in vitro* Aktivität gegenüber MRSA, die gleichzusetzen war mit der von Vancomycin, wobei kein MRSA-Isolat MHK-Werte von mehr als $2\mu\text{g/ml}$ aufwies. Zusätzlich zu seiner *in vitro*-Potenz besitzt Linezolid noch andere vielversprechende Eigenschaften, wie die orale und parenterale Bioverfügbarkeit und das durch den einzigartigen Wirkmechanismus bedingte Fehlen jeglicher Kreuzresistenzen mit anderen Antibiotika [16, 42, 52, 76, 78, 167]. Außerdem scheint die Rate der Spontanmutationen für eine Resistenz gegen Linezolid sehr gering zu sein, so dass man sich unter der Therapie mit diesem Antibiotikum keine oder nur geringe Resistenzentwicklungen erhofft [51, 123]. Insgesamt imponiert dieses neue Präparat also als eine besonders vielversprechende Alternative zum Vancomycin.

Das topische Mittel der Wahl zur Eradikation von MRSA bei nasalem Trägerstatus ist Mupirocin. 20% der normalen Bevölkerung sind nasale MRSA-Träger und stellen damit ein potentiell gefährliches Erregerreservoir dar. Darüber hinaus haben MRSA-Träger selbst ein erhöhtes Risiko für endogene *S.aureus* Infektionen insbesondere in Kombination mit immunkompromittierenden Erkrankungen. Es konnte nachgewiesen werden, dass die nasale Anwendung von Mupirocin bei Hämodialyse-Patienten zu einer signifikanten Reduktion von *S.aureus*-Bakteriämien führte und bei Patienten auf chirurgischen Intensivstationen die Inzidenz von bronchopulmonaler Kolonisation und Wundinfektionen senkte [82, 141].

Mupirocin wirkt über den einzigartigen Mechanismus einer Verlangsamung der bakteriellen Isoleucyl-tRNA Synthetase (IRS) hemmend auf die Proteinbiosynthese. Eine Mupirocin-Resistenz wird phänotypisch in zwei Gruppen eingeteilt, zum einen in eine Low-Level-Resistenz (mit MHKs von 4-256µg/ml) und zum anderen in eine High-Level Mupirocin-Resistenz (mit MHKs von $\geq 512\mu\text{g/ml}$). Nur 3,3% der 302 hier untersuchten europäischen MRSA-Isolate zeigten eine Low-Level-Mupirocin-Resistenz. Diese ist in den meisten Fällen wahrscheinlich auf eine Mutation in der Isoleucyl-tRNA Synthetase (IRS) des Wirtes zurückzuführen und hat vermutlich nur geringe Bedeutung für die klinische Mupirocintherapie [46, 127]. Eine High-level-Mupirocin-Resistenz wiesen nur 2,6% der untersuchten Stämme auf. Diese Resistenzform wird durch ein großes, transferierbares Plasmid vermittelt und kann zu Problemen bei der Elimination von MRSA führen [46]. Es hat sich gezeigt, dass Isolate die resistent gegenüber hohen Mupirocin-Spiegeln sind, zwei biochemisch verschiedene IRS Enzyme enthalten, und zwar das native, Mupirocin-sensible IRS sowie ein zusätzliches IRS Enzym, welches eine reduzierte Sensitivität gegenüber der Inhibition durch Mupirocin aufweist [46, 57, 127].

Bei der Typisierung der High-level-Mupirocin-resistenten MRSA fiel weiterhin auf, dass die Stämme aus verschiedenen Universitätskliniken nicht klonal identisch waren, während Stämme aus jeweils derselben Klinik einen klonalen Ursprung aufwiesen. Dies legt eine epidemische Verbreitung innerhalb der Klinik, in der sie isoliert wurden, nahe.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass der topische Wirkstoff Mupirocin bei europäischen MRSA noch als sehr wirksam einzustufen ist. Diese Beobachtung stimmt mit Ergebnissen anderer Untersuchungen überein [38, 104, 105]. Es wurde allerdings auch festgestellt, dass langandauernder Gebrauch von Mupirocin zu einer Selektion Mupirocin-resistenter MRSA-Stämme führt [81]. So wurde in einer kanadischen Klinik unter weitreichender Verwendung von Mupirocin-Salbe ein Anstieg der Mupirocin-Resistenz von 2,7% im Jahre 1990 auf 65% im Jahre 1993 verzeichnet [101]. Ähnliches zeigten Daten aus einer brasilianischen Studie von 1996. In einer Universitätsklinik mit extensivem topischem Gebrauch von Mupirocin lag die Resistenzrate bei 63% während sie in einer anderen Klinik mit restriktivem Mupirocingebrauch nur bei 6,1% lag [110].

Auch im Hinblick auf die eingangs beschriebene große klinische Bedeutung von Mupirocin ist es essentiell, die niedrigen europäischen Resistenzraten auch weiterhin zu erhalten. Es muß daher jeder unkritische Einsatz von Mupirocin vermieden, und die Anwendung auf definierte Infektionsprotokolle mit strengen Richtlinien beschränkt werden.

5.7 Quinupristin/Dalfopristin (Synercid®)-Resistenz bei *S.aureus*

Obwohl bei den im Rahmen der hier vorliegenden Studie untersuchten europäischen *S.aureus*-Isolaten die Rate der Quinupristin/Dalfopristin-Resistenz innerhalb eines Jahres von 0% auf 0,9% (Ende 1998) anstieg, kann die Resistenzrate insgesamt jedoch immer noch als sehr niedrig bezeichnet werden. Diese Ergebnisse befinden sich in Übereinstimmung mit den von Jones *et al.* publizierten Daten, welche in einer multizentrischen Untersuchung an *S.aureus* Isolaten aus 200 medizinischen Zentren in den USA und Kanada zeigten, dass 99% der Isolate sensibel gegenüber Quinupristin/Dalfopristin waren [75, 77]. Desweiteren wurde jüngst in einer deutschen Beobachtungsstudie unter 1358 Staphylokokken-Isolaten aus positiven Blutkulturen kein Quinupristin/Dalfopristin resistentes Isolat gefunden [151].

In der hier vorliegenden Studie bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen Methicillin-Resistenz und Resistenz gegenüber Quinupristin/Dalfopristin. 18 der 21 Synercid®-resistenten *S.aureus*-Isolate waren Methicillin-resistent. Alle 21 Isolate zeigten einen multiresistenten Phänotyp, wobei interessanterweise alle Isolate (MRSA und MSSA) den konstitutiven MLS_B-Resistenz Phänotyp zeigten, der wie bereits beschrieben überwiegend in Zusammenhang mit einer Methicillin-Resistenz gefunden wird (s. 5.3). Die genauen genetischen Zusammenhänge einer Synercid®-Resistenz sind derzeit Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Bekannterweise bleibt im allgemeinen die Wirksamkeit von Streptogramin-Kombinationspräparaten bei induzierbarer und auch bei konstitutiver MLS_B-Resistenz erhalten [11, 17, 86]. Dennoch bedingt eine konstitutive MLS_B-Resistenz immerhin eine Resistenz gegenüber der Typ-B-Komponente Quinupristin allein [18] und kann somit auch als Grundlage einer Resistenz gegenüber dem Kombinationspräparat aufgefaßt werden. Kommt zu diesem Resistenz-Phänotyp nun irgendeine Form einer Resistenz gegen die Typ-A-Komponente Dalfopristin hinzu, so wird der betroffene Stamm auch resistent gegenüber dem Kombinationspräparat [18]. Man kann also postulieren, dass der Typ-A-Komponente bei der Entwicklung einer Synercid®-Resistenz eine Schlüsselrolle zukommt, während die weitverbreitete MLS_B-Resistenz einen Risikofaktor darstellt. Offensichtlich ist sogar in manchen Fällen eine Resistenz gegen die Typ-A-Komponente alleine ausreichend um zumindest eine Low-level-Resistenz zu vermitteln [3]. Es wurden bislang einige Gene (z.B. *vga*, *vgaB*, *vat*, *vatB*) detektiert, die eine Resistenz gegen die Typ-A-Komponente vermitteln, dennoch gibt es noch immer resistente Stämme, die keine dieser Determinanten tragen, so dass Allignet *et al.* postulierten, dass weitere bislang unbekannte Determinanten existieren müssen [4]. Es sind also weitere Untersuchungen zu den Mechanismen der Resistenz gegen die Typ-A-

Komponenten erforderlich. Aufgrund der Schlüsselrolle, die die Resistenz gegen die Typ-A-Komponente einnimmt, schlugen Allignet *et al.* vor, dass zur Vermeidung von Therapieversagern die Sensibilität gegen die Typ-A-Komponente Dalfopristin getestet werden sollte [3].

Aufgrund der wichtigen Rolle die Synercid® in der parenteralen Therapie lebensbedrohlicher Staphylokokken-Infekte einnehmen könnte, erscheinen solche Maßnahmen dringend erforderlich. In der Tat waren in der vorliegenden Untersuchung die meisten der Quinupristin/Dalfopristin-resistenten *S.aureus*-Isolate mit einer Bakteriämie assoziiert und multiresistent, so dass ohne Sensibilitätskontrollen mit verlässlicher Prädiktion in der Zukunft mit Therapieversagen bei bedrohlichen systemischen Infektionen gerechnet werden müsste.

Erfreulicherweise waren aber trotz der Multiresistenz alle 21 getesteten *S.aureus*-Isolate sensibel gegenüber dem neuen Oxazolidinon Linezolid, was auf eine mögliche Rolle dieses einzigartigen, antimikrobiellen Präparates in der Behandlung von Patienten mit Infektionen durch multiresistente, inklusive Quinupristin/Dalfopristin resistente, Staphylokokken hindeutet.

Der insgesamt sehr niedrigen Resistenzrate in Europa stand nur in Frankreich ein höherer Prozentsatz Quinupristin/Dalfopristin-resistenter *S.aureus*-Isolate gegenüber. 16 der 21 resistenten Isolate stammten aus diesem Land. Es ist eine bekannte Tatsache, dass Streptograminpräparate in Frankreich in Human und Veterinärmedizin seit mehr als 25 Jahren eingesetzt werden. So ist das natürlich vorkommende Pristinamycin seit 30 Jahren als orales Therapeutikum unter dem Namen Pyostacine® als Mischung von Pristinamycin I_A und Pristinamycin II_A auf dem Markt und wurde vor allem zur Behandlung von Staphylokokken-Infektionen eingesetzt [10, 11]. Daher ist eine höhere Quinupristin/Dalfopristin Resistenz-Rate unter französischen Isolaten nicht überraschend. Während einer nationalen Studie im Jahre 1995 wurden 895 MRSA in 96 französischen Kliniken, die nicht einer Universität angeschlossen waren, gesammelt und untersucht. Nur 1,5% dieser Stämme zeigten MHK-Werte von mehr als 4mg/L für Quinupristin/Dalfopristin [56]. Desweiteren wurden im Rahmen einer 24-jährigen Langzeitstudie zwischen 1973 und 1996 am Pitie-Salpetriere Hospital, einem großen Lehrkrankenhaus, 37775 *S.aureus* Stämme isoliert und hinsichtlich einer Synercid®-Resistenz untersucht. Dabei blieb die Prävalenz der Quinupristin/Dalfopristin-Resistenz unter MSSA bei 1%, während sie unter MRSA immerhin 5% betrug [14].

Nun legten die Ergebnisse der Pulsfeldgelelektrophorese in der hier vorliegenden Studie aber nahe, dass der höhere Prozentsatz Synercid®-resistenter Isolate in Frankreich eher durch eine epidemische, nosokomiale Verbreitung eines klonal identischen MRSA-Stammes innerhalb einer einzelnen Klinik bedingt sein könnte. Immerhin stammten 14 der 16 französischen Iso-

late aus einer einzigen Klinik und 12 der Isolate aus dieser Klinik waren klonal identisch. Solche Fälle einer epidemischen Verbreitung multiresistenter Stämme sind durchaus bekannt. Im Jahre 1990 wurde in vier Intensivstationen eines Pariser Krankenhauses ein Anstieg der Pristinamycin-Resistenz unter Koagulase-negativen Staphylokokken von 1 auf 10% beobachtet, wobei keine Korrelation zu einem signifikant gesteigerten Pristinamycin-Verbrauch bestand. Vielmehr schien diese Epidemie durch die nosokomiale Verbreitung eines, das *vga*-Gen tragenden, *S.epidermidis*-Stammes verursacht gewesen zu sein [93]. Solche Epidemien stellen eine krankenhaushygienische Herausforderung dar und müssen von einer allgemeinen Resistenzzunahme unterschieden werden, da sie sonst landesweite Statistiken verfälschen können.

Insgesamt besteht natürlich, auch im Hinblick auf die höheren Resistenzraten in Frankreich, die Befürchtung, dass die Quinupristin/Dalfopristin-Resistenzraten ansteigen werden, sobald weitverbreitet Patienten mit Synercid® behandelt werden. Die meisten der getesteten Isolate wurden im Jahre 1998 isoliert. Da sich Synercid® zur Zeit noch in der klinischen Erprobung befindet, von einer künftigen weitreichenden Zulassung aber ausgegangen werden kann, ist eine weitere, kontinuierliche Überwachung der Entwicklung der Quinupristin/Dalfopristin Resistenz bei Staphylokokken dringend erforderlich und die von Allignet *et al.* [3] empfohlenen Resistenztestungen könnten dazu beitragen, Therapieversagen zu vermeiden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Auftreten Methicillin-resistenter *S.aureus* stellt im klinischen Alltag sowohl ein wichtiges therapeutisches als auch hygienetechnisches Problem dar. Nur durch eine genaue Überwachung der fortschreitenden Resistenzentwicklung, durch Untersuchungen der zugrundeliegenden Resistenzmechanismen sowie durch eine Aufdeckung der epidemiologischen Verbreitungswege von MRSA wird es in Zukunft möglich sein, adäquate Gegenmaßnahmen zu ihrer Eindämmung einzuleiten, die Kliniker über ihre aktuellen therapeutischen Möglichkeiten zu informieren und die Forschung nach neuen therapeutischen Alternativen voranzutreiben.

Um möglichst zuverlässige Aussagen über Resistenzraten, Resistenzentwicklungen, Resistenzmechanismen und Epidemiologie in Europa erzielen zu können, wurde ein im Rahmen einer Längsschnittstudie (ENARE-Programm) zusammengetragenes, sehr umfangreiches Kollektiv klinischer *S.aureus*-Isolate als Untersuchungsmaterial gewählt.

Als Grundlage aller weiteren Untersuchungen wurde zunächst der Anteil der Methicillin-resistenten *S.aureus* am europäischen Gesamtkollektiv ermittelt und die Entwicklung der Methicillin-Resistenzrate unter Berücksichtigung geographischer und fachrichtungsspezifischer Verteilungsmuster über den Zeitraum von einem Jahr beobachtet.

Insgesamt stellten MSSA den Großteil des *S.aureus*-Kollektivs in Europa, der Anteil der MRSA lag im ersten Jahr bei 22%, im zweiten Jahr bei 25%. Im Allgemeinen bestand ein Süd-Nord-Gefälle innerhalb Europas und Alter war kein Risikofaktor für den Erwerb einer Infektion mit MRSA. Die höchste MRSA-Prävalenz fand sich in Intensivstationen, internistischen und chirurgischen Stationen.

Bei einer Testung der *S.aureus* Isolate gegenüber den sog. klassischen, therapeutisch häufig eingesetzten Antibiotika, wie Makroliden, Lincosamiden, Tetracyclinen und dem Rifampicin zeigte sich ein eindeutiger Zusammenhang mit einer Methicillin-Resistenz. Der Prozentsatz der jeweils resistenten Isolate stieg bei den verschiedenen Stämmen deutlich mit wachsenden MHK-Werten für Methicillin an. Die oben genannten Antibiotika können somit bei MRSA nicht mehr als zuverlässig eingestuft werden.

Genetische Ursachen der Resistenz sind essentiell zum Verständnis von Resistenzentwicklungen. Um einen Überblick über die Resistenzmechanismen der MLS_B -Resistenz und der Tetracyclinresistenz bei *S.aureus* und ihre Verteilung unter MRSA und MSSA zu erhalten, wurden randomisiert ausgewählte Erythromycin-resistente und Tetracyclin-resistente *S.aureus*-Isolate hinsichtlich der Prävalenz von Resistenzgenen untersucht.

Zusammenfassend war eine Resistenz gegenüber Erythromycin in *S.aureus* hauptsächlich durch das Vorhandensein des *ermA* oder *ermC* Genes bedingt. Hierbei war das *ermA* Gen häufiger in MRSA vertreten, vor allem in Stämmen mit einer konstitutiven MLS_B-Expression, während *ermC* insbesondere in MSSA mit einer induzierbaren Expression prädominant war. Nur wenige der untersuchten Stämme zeigten die Gene *ereB* und *ermB*, während eine Makrolid-Resistenz auf Grund von Efflux durch das *msrA/msrB* Gen etwas häufiger detektiert wurde, interessanterweise jedoch nur in MSSA. Das *ereA* Gen konnte bei *S.aureus* nicht nachgewiesen werden.

Bei den Tetracyclin-Resistenzgenen war *tetK* die Determinante mit der höchsten Prävalenz in MSSA Isolaten, während das *tetM* Gen häufiger in MRSA vertreten war. Die Kombination *tetM/tetK* war annähernd 10-mal häufiger in den Tetracyclin-resistenten MRSA Isolaten nachweisbar als in den Tetracyclin-resistenten MSSA-Isolaten. Alle *tetM* tragenden Isolate zeigten *in vitro* eine Resistenz gegenüber sowohl Tetracyclin als auch Minocyclin. Ferner zeigten Stämme, welche eine Kombination der Gene *tetK* und *tetM* beinhalteten höhere MHK-Werte, als Stämme mit nur einem der beiden Gene. Auffällig war, dass *S.aureus*-Stämme, die nur die Resistenzdeterminante *tetM* trugen zum Teil deutlich differente MHK-Werte zeigten. Mutationen oder repetitive Sequenzen im Bereich der Promotor-Region des *tetM* Genes sind bei *S.aureus* allerdings nicht die Ursache dieser interindividuellen MHK-Wert Variabilitäten, möglicherweise liegen bei diesem Phänomen jedoch Mutationen in anderen Abschnitten des *tetM* Genes zugrunde.

Eine Resistenz gegenüber Rifampicin beruht nach heutiger Erkenntnis auf Mutationen im Bereich des *rpoB*-Rif-Genes, ein Zusammenhang zwischen Methicillin-Resistenz und Rifampicin-Resistenz wurde beschrieben. Es wurden Rifampicin-sensible MRSA und MSSA in antibiotikahaltigem Medium inkubiert und anschließend hinsichtlich Mutationen im *rpoB*-Rif-Gen untersucht. Ferner wurden klinische, Rifampicin-resistente Isolate untersucht. Insgesamt wurden 10 verschiedene Mutationen im *rpoB*-Rif-Gen bei *S.aureus* nachgewiesen, hierbei war das Codon 481 mit den beiden Mutationen [His-481→Tyr] und [His-481→Asn] am häufigsten betroffen. Stämme mit Mehrfachmutationen zeigten höhere MHK-Werte. Dabei wurden keine Unterschiede zwischen MRSA und MSSA gefunden, obgleich es beachtliche Variabilitäten zwischen den einzelnen klinischen Isolaten gab. Die höheren Resistenzraten unter MRSA sind demnach kein Resultat einer Hypermutableität von Targetgenen oder eines schnelleren Auftretens von verschiedenen Mutationen nach seriellen Passagen unter Antibiotika-Selektionsdruck sondern vielmehr eine Folge der klonalen Verbreitung von multiresistenten MRSA.

Da die klassischen Therapeutika bei der Therapie von MRSA-Infektionen nicht mehr sicher sind, ist die Zuverlässigkeit der derzeit verfügbaren Reserve-Therapeutika, insbesondere des Vancomycins, und neuer, in der klinischen Erprobung befindlicher Alternativtherapeutika, entscheidend.

Es wurden weder Vancomycin-resistente, noch Vancomycin-intermediär-sensible *S.aureus* (VISAs) oder Hetero-VISAs innerhalb der gesamten Sammlung europäischer MRSA gefunden, Vancomycin bleibt somit weiterhin Mittel der Wahl bei schweren Infektionen durch multiresistente Staphylokokken. Viele der anderen Reserve-Antibiotika wie Aminoglykoside, Fosfomycin, Fusidinsäure und Cotrimoxazol bieten immer noch ein gewisses Maß an Aktivität, insbesondere innerhalb von Kombinations-Regimen. Allerdings macht die multiresistente Natur der meisten MRSA auch diese Antibiotika unzuverlässig. Der topische Wirkstoff Mupirocin ist bei europäischen MRSA noch als sehr wirksam einzustufen und ist somit weiterhin Mittel der Wahl zur Eradikation von MRSA bei nasalem Trägerstatus.

Unter Berücksichtigung des möglichen Auftretes Vancomycin-therapierefraktärer *S.aureus*-Isolate, sind das Oxazolidinon Linezolid und das Streptogramin-Mischpräparat Quinupristin/Dalfopristin (Synercid®) besonders vielversprechende zukünftige Therapeutika. Für Linezolid wurden in Europa keine Resistenzen nachgewiesen, während im Verlauf des zweiten Jahres des ENARE-Programmes bereits vereinzelt Quinupristin/Dalfopristin-resistente Isolate registriert wurden. Diese waren jedoch immer noch sehr selten in europäischen Kliniken. Die meisten resistenten Isolate stammten aus Frankreich, wo Streptogramine bereits seit Jahren therapeutisch eingesetzt werden. Ferner waren sie überwiegend klonal identisch, mit einer Bakteriämie assoziiert und multiresistent. Dies könnte in der Zukunft zu Therapieproblemen führen. Die Ergebnisse aus Frankreich lassen befürchten, daß sich höhere Quinupristin/Dalfopristin Resistenzraten entwickeln werden, sobald man Patienten europaweit mit Synercid® behandelt.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Aboshkiwa M, Rowland G, Coleman G. Nucleotide sequence of the *Staphylococcus aureus* RNA polymerase *rpoB* gene and comparison of its predicted amino acid sequence with those of other bacteria. *Biochem. Biophys. Acta*, 1995, 1262:73-78
2. Ackerman BH, Vannier AM, Eudy EB. Analysis of vancomycin time-kill studies with *Staphylococcus* species by using a curve stripping program to describe the relationship between concentration and pharmacodynamic response. *Antimicrob Agents Chemother* (United States), Aug 1992, 36(8) p1766-9
3. Allignet J, Aubert S, Morvan A, et al. Distribution of genes encoding resistance to streptogramin A and related compounds among staphylococci resistant to these antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* (United States), Nov 1996, 40(11) p2523-8
4. Allignet J, el Solh N. Diversity among the gram-positive acetyltransferases inactivating streptogramin A and structurally related compounds and characterization of a new staphylococcal determinant, *vatB*. *Antimicrob Agents Chemother* (United States), Sep 1995, 39(9) p2027-36
5. Arbeit RD, Karakawa WW, Vann WF, et al. Predominance of two newly described capsular polysaccharide types among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* (United States), Apr 1984, 2(2) p85-91
6. Arthur M, Andremont A, Courvalin P. Distribution of erythromycin esterase and rRNA methylase genes in members of the family *Enterobacteriaceae* highly resistant to erythromycin. *Antimicrob Agents Chemother* (United States), Mar 1987, 31(3) p404-9
7. Arthur M, Courvalin P. Contribution of two different mechanisms to erythromycin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* (United States), Nov 1986, 30(5) p694-700
8. Aubry-Damon H, Soussy CJ, Courvalin P. Characterization of Mutations in the *rpoB* gene that confer Rifampicin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Oct. 1998, p. 2590-2594

9. Barber M. and Rozwadowska-Dowzenko M. Infection by penicillin-resistant staphylococci. *Lancet*, 1948, 2, 641-644
10. Barrière JC, Bouanchaud DH, Paris JM, Rolin O, Harris NV, Smith C, Antimicrobial activity against *staphylococcus aureus* of semisynthetic injectable streptogramins; RP 59500 and related compounds. *J. Antimicrob Chemother* 1992; 30 (suppl A):1-8
11. Barrière JC, Brethaud N, Beyer D, Dutka-Malen S, Paris JM, Desnottes JF, Recent Developments in Streptogramin Research, *Current Pharmaceutical Design* 1998,4,155-180
12. Bergdoll MS (1983) Enterotoxins. In Easmon, C.S.F. and Adlam, C. (eds.) *Staphylococci and Staphylococcus Infections*; Academic Press, London, pp. 559-598
13. Berger-Bachi B, Strassle A, Kayser FH. Natural methicillin resistance in comparison with that selected by in-vitro drug exposure in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* (England), Feb 1989, 23(2) p179-88
14. Bismuth R, Nguyen J, Truffort C et al. Macrolides, lincosamides and streptogramins resistance in *Staphylococcus aureus*: a 24 year survey in a large teaching hospital. In Program and Abstracts of the fourth International Conference on the macrolides, Azalides, Streptogramins and Ketolids, Barcelona, 1998. Poster 3.22.
15. Bismuth R., Zilhao R., Sakamoto H., Guesdon J.L. & Courvalin P. (1990). Gene heterogeneity for tetracycline resistance in *Staphylococcus* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **34**, 1611-14.
16. Brickner SJ, Hutchinson DK, Barbachyn MR, et al. Synthesis and antibacterial activity of U-100592 and U-100766, two oxazolidinone antibacterial agents for the potential treatment of multidrug-resistant gram-positive bacterial infections. *J Med Chem* 1996; 39:673-9.
17. Brumfitt W, Hamilton-Miller JMT, Shah S. *In-Vitro* activity of RP 59500, a new semi-synthetic streptogramin antibiotic, against gram-positive bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1992; 30(suppl A):29-37
18. Bryson HM, Spencer CM. Quinupristin-Dalfopristin, New Drug profile, *Drugs*, Sept. 1996; 52(3): 406-415

19. Burdett V. tRNA modification activity is necessary for Tet(M)-mediated tetracycline resistance. *J Bacteriol*, 1993, 175:7209
20. Carter PE, Abadi FJ, Yakubu DE, et al. Molecular characterization of rifampin-resistant *Neisseria meningitidis*. *Antimicrob Agents Chemother* (United States), Jun 1994, 38(6) p1256-61
21. CDC. (1997). Update: *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in the United States, 1997. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 46, 2064-8.
22. Chabbert YA, Courvalin P. Synergism of antibiotic components of the streptogramin group. *Pathol Biol (Paris)* (France), Jun-Jul 1971, 19(11) p613-9
23. Chambers HF, Archer G, Matsuhashi M. Low-level methicillin resistance in strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* (United States), Apr 1989, 33(4) p424-8
24. Chambers HF. Parenteral antibiotics for the treatment of bacteremia and other serious staphylococcal infections. In: *The staphylococci in human disease*. Crossley KB, Archer GL (eds.). Churchill Livingstone, New York 1997, 583-601.
25. Chambers HF. Studies of RP 59500 in vitro and in a rabbit model of aortic valve endocarditis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* (England), Jul 1992, 30 Suppl A p117-22
26. Chang SC, Chen YC, Luh KT, et al. Macrolides resistance of common bacteria isolated from Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis* (United States), Dec 1995, 23(4) p147-54
27. Chant C, Rybak MJ, Quinupristin/Dalfopristin (RP59500): A new streptogramin antibiotic, *Ann Pharmacother* 1995; 29: 1022-7
28. Chinali G, Di Giambattista M, Cocito C. Ribosome protection by tRNA derivatives against inactivation by virginiamycin M: evidence for two types of interaction of tRNA with the donor site of peptidyl transferase. *Biochemistry* (United States), Mar 24 1987, 26(6) p1592-7

29. Chinali G, Moureau P, Cocito CG. The action of virginiamycin M on the acceptor, donor, and catalytic sites of peptidyltransferase. *J Biol Chem (United States)*, Aug 10 1984, 259(15) p9563-8
30. Chinali G, Moureau P, Cocito CG. The mechanism of action of virginiamycin M on the binding of aminoacyl-tRNA to ribosomes directed by elongation factor Tu. *Eur J Biochem (Germany, West)*, Sep 1 1981, 118(3) p577-83
31. Chinali G, Nyssen E, Di Giambattista M, et al. Inhibition of polypeptide synthesis in cell-free systems by virginiamycin S and erythromycin. Evidence for a common mode of action of type B synergimycins and 14-membered macrolides. *Biochim Biophys Acta (Netherlands)*, Jan 25 1988, 949(1) p71-8
32. Chinali G, Vanlinden F, Cocito C. Action of virginiamycin M on the stability of different ribosomal complexes to ultracentrifugation. *Biochim Biophys Acta (Netherlands)*, May 6 1988, 950(1) p67-74
33. Chittum HS, Champney WS. Ribosomal protein gene sequence changes in erythromycin-resistant mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol (United States)*, Oct 1994, 176(20) p6192-8
34. Cocito C, Voorma HO, Bosch L. Interference of virginiamycin M with the initiation and the elongation of peptide chains in cell-free systems. *Biochim Biophys Acta (Netherlands)*, Mar 27 1974, 340(3) p285-98
35. Contreras A, Vazquez D. Cooperative and antagonistic interactions of peptidyl-tRNA and antibiotics with bacterial ribosomes. *Eur J Biochem (Germany, West)*, Apr 15 1977, 74(3) p539-47
36. Cookson BD. The emergence of mupirocin resistance: a challenge to infection control and antibiotic prescribing practice. *J Antimicrob Chemother* 1998 Jan;41(1):11-8
37. de Lencastre H, Figueiredo AM, Tomasz A. Genetic control of population structure in heterogeneous strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis (Germany)*, 1993, 12 Suppl 1 pS13-8

38. de Neeling AJ, van Leeuwen WJ, Schouls LM, et al. Resistance of staphylococci in The Netherlands: surveillance by an electronic network during 1989-1995. J Antimicrob Chemother (England), Jan 1998, 41(1) p93-101
39. Di Giambattista M, Chinali G, Cocito C. The molecular basis of the inhibitory activities of type A and type B synergimycins and related antibiotics on ribosomes. J Antimicrob Chemother (England), Oct 1989, 24(4) p485-507
40. Di Giambattista M, Engelborghs Y, Nyssen E, et al. Kinetics of binding of macrolides, lincosamides, and synergimycins to ribosomes. J Biol Chem (United States), Jun 25 1987, 262(18) p8591-7
41. Di Giambattista M, Vannuffel P, Sunazuka T, et al. Antagonistic interactions of macrolides and synergimycins on bacterial ribosomes. J Antimicrob Chemother (England), Sep 1986, 18(3) p307-15
42. Dresser LD, Rybak MJ. The Pharmacologic and Bacteriologic Properties of Oxazolidinones, a new Class of synthetic Antimicrobials. Pharmacotherapy 1998; 18(3):456-462
43. Duval J. Evolution and epidemiology of MLS resistance. J Antimicrob Chemother (England), Jul 1985, 16 Suppl A p137-49
44. Eady E.A., Ross J.I., Tipper L., Walters C.E.; Cove J.H. & Noble, W.C. (1993). Distribution of genes encoding erythromycin ribosomal methylases and an erythromycin efflux pump in epidemiologically distinct groups of staphylococci. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 37, 211-7.
45. Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, et al. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. Clin Infect Dis (United States), Aug 1999, 29(2) p239-44
46. Eltringham I . Mupirocin resistance and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). J Hosp Infect 1997 Jan;35(1):1-8
47. Emori TG, Gaynes RP. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. Clin Microbiol Rev (United States), Oct 1993, 6(4) p428-42

48. Etienne SD, Montay G, Le Liboux A, Frydman A, Garaud JJ. A Phase I, double blind, placebo-controlled study of the tolerance and pharmacokinetic behavior of RP 59500. *J Antimicrob Chemother* 1992; 30 (suppl A):101-6
49. Fass RJ. *In-Vitro* activity of RP 59500, a semisynthetic injectable pristinamycin, against staphylococci, streptococci, and enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1991; 35:553-9
50. Finch RG, Antibacterial Activity of Quinupristin/Dalfopristin, rational for Clinical Use, *Drugs* 1996, 51 Suppl. 1:31-37
51. Ford CW, Hamel JC, Stapert D, Moermann JK, et al. Oxazolidinones: New antibacterial Agents, *Trends in Microbiology*, May 1997, Vol 5 No.5, 196-200
52. Ford CW, Hamel JC, Wilson DM, et al., *In vivo* Activities of U-100592 and U-100766, Novel Oxazolidinone Antimicrobial Agents, against Experimental Bacterial Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1996; 40(6):1508-13
53. Fournet MP, Deforges L, Zini R, et al. Binding studies of macrolides, lincosamides and streptogramins to Streptococcus G group using [3H]-erythromycin. *Biochem Pharmacol* (England), Oct 15 1987, 36(20) p3495-500
54. Fournier JM, Bouvet A, Boutonnier A, et al. Predominance of capsular polysaccharide type 5 among oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* (United States), Oct 1987, 25(10) p1932-3
55. Fujii K, Tsuji A, Miyazaki S, et al. In vitro and in vivo antibacterial activities of KRM-1648 and KRM-1657, new rifamycin derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* (United States), May 1994, 38(5) p1118-22
56. Gazagne L, Gueudet P, Lecaillon E et al. *In vitro* activity of streptogramins against 45 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with decreased susceptibility to dalfopristin. In Program and Abstracts of the fourth International Conference on the macrolides, Azalides, Streptogramins and Ketolids, Barcelona, 1998. Poster 3.23.

57. Gilbert J, Perry CR, Slocombe B. High-level mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus*: evidence for two distinct isoleucyl-tRNA synthetases. *Antimicrob Agents Chemother* (United States), Jan 1993, 37(1) p32-8
58. Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, et al. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* (United States), Feb 1994, 32(2) p335-51
59. Guay GC, Khan SA, Rothstein DM. The *tet(K)* gene of plasmid pT181 of *Staphylococcus aureus* encodes an efflux protein that contains 14 transmembrane helices. *Plasmid*, 1993, 30: 163
60. Guffanti AA, Krulwich TA. Tetracycline/ H^+ antiport and Na^+/H^+ antiport catalyzed by the *Bacillus subtilis* TetA(L) transporter expressed in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1995, 177:4557
61. Hanaki H, Kuwahara A, Bovle-Vavra S, Daum RS, Labischinsky H. & Hiramatsu K. (1998) Activated cell wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 42, 199-209.
62. Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* (United States), May 1984, 158(2) p513-6
63. Hashimoto H, Inoue M, Hayashi I. A survey of *Staphylococcus aureus* for typing and drug-resistance in various areas of Japan during 1992 and 1993. *Jpn J Antibiot* (Japan), Jun 1994, 47(6) p618-26
64. Henze UU, Berger-Bachi B. Penicillin-binding protein 4 overproduction increases beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* (United States), Sep 1996, 40(9) p2121-5
65. Herold BC, Immergluck LC, Maranan MC, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. *JAMA* (United States), Feb 25 1998, 279(8) p593-8

66. Hiramatsu K., Aritaka N., Hanaki H., Kawasaki S., Hosoda Y., Hori S. et al. (1997). Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. Lancet 350, 1670-3.
67. Hiramatsu K., Hanaki H., Ino T., Yabuta K., Oguri T. & Tenover FC (1997). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 40, 135-6.
68. Hoban DJ, Weshnoweski B, Palatnik L, et al: *In-Vitro* activity of streptogramin RP 59500 against Staphylococci including bacterial kinetic studies. J Antimicrob Chemother 1992; 30 Suppl A:59-65.
69. Hochkeppel HK, Braun DG, Vischer W, et al. Serotyping and electron microscopy studies of *Staphylococcus aureus* clinical isolates with monoclonal antibodies to capsular polysaccharide types 5 and 8. J Clin Microbiol (United States), Mar 1987, 25(3) p526-30
70. Humphreys H, Keane CT, Hone R, et al. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolates from cases of septicaemia and from healthy carriers. J Med Microbiol (England), Mar 1989, 28(3) p163-72
71. Inglis B, Matthews PR, Stewart PR. The expression in *Staphylococcus aureus* of cloned DNA encoding methicillin resistance. J Gen Microbiol (England), Jun 1988, 134 (Pt 6) p1465-9
72. Inouye Y, Morifuji K, Masumi N, et al. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates to various antimicrobial agents. III. Novel, inducible resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLS) antibiotics. Hiroshima J Med Sci (Japan), Sep 1993, 42(3) p101-7
73. Jespen. The demise of the old methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Hosp. Infect., 7 Supp. A, 13-17
74. Jevons P. "Celbenin"-resistant Staphylococci. British Medical Journal, 1961, 14, 124-125

75. Jones RN, Ballow CH, Biedenbach DJ, et al. Antimicrobial activity of quinupristin-dalfopristin (RP 59500, Synercid) tested against over 28,000 recent clinical isolates from 200 medical centers in the United States and Canada. *Diagn Microbiol Infect Dis* (United States), Jul 1998, 31(3) p437-51
76. Jones RN, Johnson DM, Erwin ME. *In vitro* antimicrobial activities and spectra of U-100592 and U-100766, two novel fluorinated oxazolidinones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1996; 40(3):720-6.
77. Jones RN, Low DE, Pfaller MA. Epidemiologic trends in nosocomial and community-acquired infections due to antibiotic-resistant gram-positive bacteria: the role of streptogramins and other newer compounds. *Diagn Microbiol Infect Dis* (United States), Feb 1999, 33(2) p101-12
78. Jorgensen JH, McElmeel ML, Trippy CW. *In vitro* activities of the oxazolidinone antibiotics U-100592 and U-100766 against *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1997; 41(2):465-7
79. Kang SL, Rybak MJ. Pharmacodynamics of RP 59500 alone and in combination with vancomycin against *Staphylococcus aureus* in an in vitro-infected fibrin clot model. *Antimicrob Agents Chemother* (United States), Jul 1995, 39(7) p1505-11
80. Karakawa WW, Fournier JM, Vann WF, et al. Method for the serological typing of the capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* (United States), Sep 1985, 22(3) p445-7
81. Kauffman CA, Terpenning MS, He X, et al. Attempts to eradicate methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a long-term-care facility with the use of mupirocin ointment. *Am J Med* (United States), Apr 1993, 94(4) p371-8
82. Kluytmans JA; Manders MJ; van Bommel E; Verbrugh H. Elimination of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in hemodialysis patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996 Dec;17(12):793-7
83. Labischinski H. Consequences of the interaction of beta-lactam antibiotics with penicillin binding proteins from sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Med Microbiol Immunol* (Berl) (Germany), 1992, 181(5) p241-65

84. Le Clerc JE, Li B, Payne WL, et al. High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. *Science (United States)*, Nov 15 1996, 274(5290) p1208-11
85. Leclercq R, Courvalin P. Intrinsic and Unusual Resistance to Macrolide, Lincosamide, and streptogramin antibiotics in Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, July 1991, p. 1273-1276
86. Leclercq R, Nantas L, Sussy CJ, et al. Activity of RP 59500, a new parenteral semisynthetic streptogramin, against staphylococci with various mechanisms of resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1992; 30 Suppl. A: 67-75
87. Leclercq, R. & Courvalin, P. (1991). Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **35**, 1267-72.
88. Levy SB. Active Efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1992, 36:695
89. Lin AH, Murray RW, Vidmar TJ, Marotti KR. The oxazolidinone eperezolid binds to the 50S ribosomal subunit and competes with binding of chloramphenicol and lincomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(10):2127-31
90. Lina G., Quaglia A., Reverdy ME, Leclercq R., Vandenesch F. & Etienne J. (1999). Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 1062-6.
91. Littlejohn TG, Paulsen IT, Gillespie MT et al: Substrate specificity and energetics of anti-septic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 95:259, 1992
92. Lonce V, Casetta A, Buu-Hoi A et al. Analysis of pristinamycin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolates responsible for an outbreak in a Parisian hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**: 2159-2165

93. Loncle V, Casetta A, Buu-Hoi A, et al. Analysis of pristinamycin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolates responsible for an outbreak in a Parisian hospital. *Antimicrob Agents Chemother* (United States), Oct 1993, 37(10) p2159-65
94. Lotti M, Dabbs ER, Hasenbank R, et al. Characterisation of a mutant from *Escherichia coli* lacking protein L15 and localisation of protein L15 by immuno-electron microscopy. *Mol Gen Genet* (Germany, West), 1983, 192(3) p295-300
95. Marshall SA, Wilke WW, Pfaller MA, Jones RN. *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from blood stream infections: frequency and occurrence, antimicrobial susceptibility, and molecular (mecA) characterization of oxacillin resistance in the SCOPE program. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1998; 30: 205-14
96. Matsushashi M, Song MD, Ishino F, et al. Molecular cloning of the gene of a penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to beta-lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* (United States), Sep 1986, 167(3) p975-80
97. Matsuoka M., Endou K., Kobayashi H., Inoue M. & Nakajima Y. (1997). A dynamic plasmid that shows MLS and PMS resistance in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters* 148, 91-6.
98. McDougal LK, Thornsberry C. The role of beta-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. *J Clin Microbiol* (United States), May 1986, 23(5) p832-9
99. Menninger JR, Otto DP. Erythromycin, carbomycin, and spiramycin inhibit protein synthesis by stimulating the dissociation of peptidyl-tRNA from ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother* (United States), May 1982, 21(5) p811-8
100. Menninger JR. The accumulation as peptidyl-transfer RNA of isoaccepting transfer RNA families in *Escherichia coli* with temperature-sensitive peptidyl-transfer RNA hydrolase. *J Biol Chem* (United States), Oct 10 1978, 253(19) p6808-13
101. Miller MA, Dascal A, Portnoy J, et al. Development of mupirocin resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after widespread use of nasal mupirocin ointment. *Infect Control Hosp Epidemiol* (United States), Dec 1996, 17(12) p811-3

102. Milton ID, Hewitt CL, & Harwood CR (1992). Cloning and sequencing of a plasmid-mediated erythromycin resistance determinant from *Staphylococcus xylosus*. FEMS Microbiology Letters **97**, 141-8 .
103. Moreno F, Crisp C, Jorgensen JH, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a community organism. Clin Infect Dis (United States), Nov 1995, 21(5) p1308-12
104. Morgan M, Salmon R, Keppie N, et al. All Wales surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): the first year's results. J Hosp Infect (England), Mar 1999, 41(3) p173-9
105. Naguib MH, Naguib MT, Flournoy DJ. Mupirocin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a veterans hospital. Chemotherapy (Switzerland), Nov-Dec 1993, 39(6) p400-4
106. Nakamura A, Taniguchi K, Tsurubuchi K, et al. Resistance to macrolide antibiotics found in methicillin-resistant Japanese clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in 1996. Jpn J Antibiot (Japan), Jul 1998, 51(7) p494-500
107. National Committee for Clinical Laboratory Standards Methods for dilution antimicrobial tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A4. National Committee for Laboratory Standards (1997), Wayne, PA.
108. Nesin M, Svec P, Lupski JR et al. Cloning and nucleotide sequence of a chromosomally encoded tetracycline resistance determinant, *tetA(M)*, from a pathogenic, methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1990, 34:2273
109. Nesin M, Svec P, Lupski JR, et al. Cloning and nucleotide sequence of a chromosomally encoded tetracycline resistance determinant, *tetA(M)*, from a pathogenic, methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother (United States), Nov 1990, 34(11) p2273-6
110. Netto dos Santos KR; de Souza Fonseca L; Gontijo Filho PP. Emergence of high-level mupirocin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Brazilian university hospitals. Infect Control Hosp Epidemiol 1996 Dec;17(12):813-6

111. Nicola FG, McDougal LK, Biddle JW & Tenover FC (1998). Characterization of erythromycin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus* recovered in the United States from 1958 through 1969. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42, 3024-7.
112. Oliver A, Canton R, Campo P, et al. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science (United States)*, May 19 2000, 288(5469) p1251-4
113. Panilo AL, Culver DH, Gaynes RP et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. hospitals, 1975-1991. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 1992; 3:582-6.
114. Paulsen IT, Skurray RA. Topology, structure and evolution of two families of proteins involved in antibiotic and antiseptic resistance in eukaryotes and prokaryotes- an analysis. *Gene*, 1993, 124:1
115. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, et al. Bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infection: frequencies of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial surveillance program (United States and Canada, 1997). *Antimicrob Agents Chemother (United States)*, Jul 1998, 42(7) p1762-70
116. Polak J, Novick RP. Closely related plasmids from *Staphylococcus aureus* and soil bacilli. *Plasmid (United States)*, Mar 1982, 7(2) p152-62
117. Poston SM, Glancey GR, Wyatt JE, et al. Co-elimination of mec and spa genes in *Staphylococcus aureus* and the effect of agr and protein A production on bacterial adherence to cell monolayers. *J Med Microbiol (Scotland)*, Dec 1993, 39(6) p422-8
118. Reeves DS; Holt HA; Phillips I; King A; Miles RS; et al. Activity of clindamycin against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* from four UK centres. *J Antimicrob Chemother* 1991 Apr;27(4):469-74
119. Roberts MC. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol Rev (Netherlands)*, Oct 1996, 19(1) p1-24
120. Roberts RB. Report on the first 100 patients treated with Synercid® (RP59500) under emergency use program for the treatment of Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*

- (VREF) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections (abstract no. 0296).
Can J Infect Dis, Jul 1995 ; 6 Suppl. C 232
121. Ross JI, Eady EA, Cove JH & Baumberg S. (1995). Identification of a chromosomally encoded ABC-transporter system with which the staphylococcal erythromycin exporter MsrA may interact. *Gene* **153**, 93-8.
122. Ross JI, Eady EA, Cove JH, Cunliffe WJ & Baumberg S. (1990). Inducible erythromycin-resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. *Molecular Microbiology* **4**, 1207-14.
123. Rybak MJ, Cappelletty DM, Moldovan T, Aeschlimann JR, Kaatz GW. Comparative *In Vitro* Activities and postantibiotic Effects of the Oxazolidinone Compounds Eperezolid (PNU-100592) and Linezolid (PNU-100766) versus Vancomycin against *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative staphylococci, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1998; 43(3):721-4
124. Sanchez ML, Flint KK, Jones RN. Occurrence of macrolide-lincosamide-streptogramin resistances among staphylococcal clinical isolates at a university medical center. Is false susceptibility to new macrolides and clindamycin a contemporary clinical and in vitro testing problem? *Diagn Microbiol Infect Dis (United States)*, Mar-Apr 1993, 16(3) p205-13
125. Sau S, Lee CY. Cloning of type 8 capsule genes and analysis of gene clusters for the production of different capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol (United States)*, Apr 1996, 178(7) p2118-26
126. Schmitz FJ & Fluit AC (1999). Mechanisms of resistance. In: *Textbook of Infectious Diseases*, (eds. D. Armstrong, J. Cohen) Section 7, Anti-Infective Therapy, 2.1-2.14. Mosby International, Publishers.
127. Schmitz FJ, Jones ME. Antibiotics for treatment of infections caused by MRSA and elimination of MRSA carriage. What are the choices? *Int. J. Antimicrob Agents*, 1997, 9:1-19
128. Schmitz FJ, Verhoef J, Fluit AC & the SENTRY participants group (1999). Prevalence of resistance to MLS antibiotics in 20 European university hospitals participating in the

- European SENTRY surveillance program. Journal of Antimicrobial Chemotherapy **43**: 783-92 .
129. Semon D, Movva MR, Smith TF et al: Plasmid-determined bleomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Plasmid 17:46, 1987
 130. Severinov K, Mustaev A, Severinova E, et al. The beta subunit Rif-cluster I is only angstroms away from the active center of Escherichia coli RNA polymerase. J Biol Chem (United States), Dec 8 1995, 270(49) p29428-32
 131. Severinov K, Soushko M, Goldfarb A, Nikiforov V. Rifampicin Region Revisited: New Rifampicin-resistant and Streptolydigin-resistant Mutants in the β -Subunit of *Escherichia Coli* RNA Polymerase. Journal of Biological Chemistry, July 1993, pp. 14820-14825
 132. Shaw WV, Brenner DG, LeGrice SFJ et al.:Chloramphenicol acetyltransferase gene of staphylococcal plasmid pC221 FEBS Lett 1985, 179:101
 133. Shinabarger DL, Marotti KR, Murray RW, et al. Mechanism of action of oxazolidinones: effects of linezolid and eperezolid on translation reactions. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41(10):2132-6
 134. Sompolinsky D, Samra Z, Karakawa WW, et al. Encapsulation and capsular types in isolates of *Staphylococcus aureus* from different sources and relationship to phage types. J Clin Microbiol (United States), Nov 1985, 22(5) p828-34
 135. Sougakoff W, , Papadopoulou B, Nordmann P, Courvalin P. Nucleotide sequence and distribution of gene *tetO* encoding tetracycline resistance in *Campylobacter coli*. FEMS Microbiol. Lett., 1987, 44: 153-159
 136. Speer BS, Shoemaker NB, Salyers AA. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. Clin Microbiol Rev (United States), Oct 1992, 5(4) p387-99
 137. Stamm AM, Long MN, Belcher B. Higher overall nosocomial infection rate because of increased attack rate of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Am J Infect Control (United States), Apr 1993, 21(2) p70-4

138. Sutcliffe J, Tait-Kamradt A. & Wondrack L. *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* Resistant to Macrolides but Sensitive to Clindamycin: a Common Resistance Pattern Mediated by an Efflux System. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Aug. 1996, p. 1817-1824
139. Sutcliffe J., Grebe, T., Tait-Kamradt, A. & Wondrack, L. (1996). Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**, 2562-6.
140. Swaney SM, Aoki H, Ganoza MC, Shinabarger DL. The Oxazolidinone Linezolid inhibits Initiation of Protein Synthesis in Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Dec. 1998, p. 3251-3255
141. Talon D, Rouget C, Cailleaux V, et al. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and cross-contamination in a surgical intensive care unit: efficacy of mupirocin ointment. *J Hosp Infect (England)*, May 1995, 30(1) p39-49
142. Taniguchi H, Aramaki H, Nikaido Y, et al. Rifampicin resistance and mutation of the *rpoB* gene in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett (Netherlands)*, Oct 15 1996, 144(1) p103-8
143. Tennet JM, Lyon BR, Midley M et al: Physical and biochemical characterisation of the *qacA* gene encoding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Gen Microbiol* 135:1, 1989
144. Tenover FC, Lancaster MV, Hill BC, Steward CD, Stocker SA, Hancock GA, O'Hara CM, Clark NC, Hiramatsu K: Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. *Journal of Clinical Microbiology* 1998, 36: 1020-1027.
145. Thakker-Varia S, Jenssen WD, Moon-McDermott L, et al. Molecular epidemiology of macrolides-lincosamides-streptogramin B resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother (United States)*, May 1987, 31(5) p735-43
146. Tillotson LE, Jensen WD, Moon-McDermott L & Dubin DT (1989). Characterization of a novel insertion of the macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance transposon Tn554

- in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 33, 541-550.
147. Tomasz A, Drugeon HB, de Lencastre HM, et al. New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. Antimicrob Agents Chemother (United States), Nov 1989, 33(11) p1869-74
 148. Trzcinski K, Cooper BS, Hryniewicz W, et al. Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother (England), Jun 2000, 45(6) p763-70
 149. Turnidge J, Grayson ML. Optimum treatment of staphylococcal infections. Drugs (New Zealand), Mar 1993, 45(3) p353-66
 150. Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, et al. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. JAMA (United States), Aug 23-30 1995, 274(8) p639-44
 151. von Eiff C, Reinert RR, Peters G for the Study Group. Prevalence of antibiotic resistance in staphylococci from patients with bacteremia in German tertiary care hospitals. In Abstracts of the Ninth European Congress of clinical Microbiology and infectious diseases, Berlin 1999. Abstract 881. Clinical Microbiology and Infection 5, Suppl. 3, 321.
 152. Voss A, Milatovic D, Wallrauch-Schwarz C, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. Eur J Clin Microbiol Infect Dis (Germany), Jan 1994, 13(1) p50-5
 153. Voss A; Machka K; Lenz W; Milatovic D. Incidence, frequency and resistance characteristics of methicillin-oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* strains in Germany. Dtsch Med Wochenschr 1992 Dec 11;117(50):1907-12
 154. Warsa CU, Nonoyama, M., Ida, T., Okamoto, R., Okubo, T., Shimauchi, C. et al. (1996). Detection of *tet(K)* and *tet(M)* in *Staphylococcus aureus* of Asian countries by the polymerase chain reaction. Journal of Antibiotics **49**, 1127-32.

155. Warsa CU, Okubo T, Okamoto R. Antimicrobial susceptibilities and phage typing of *Staphylococcus aureus* clinical bacterial isolates in Indonesia. J Infect Chemother, 1996, 2:29-33
156. Waxman DJ, Strominger JL. Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics. Annu Rev Biochem (United States), 1983, 52 p825-69
157. Wehrli W. Rifampin: mechanisms of action and resistance. Rev Infect Dis (United States), Jul-Aug 1983, 5 Suppl 3 pS407-11
158. Weisblum B. Inducible resistance to macrolides, lincosamides and streptogramin type B antibiotics: the resistance phenotype, its biological diversity and structural elements that regulate expression-a review. J Antimicrob Chemother, suppl A. 63, 16:1985
159. Weisblum B. Minireview: Erythromycin Resistance by Ribosome Modification. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Mar. 1995, p. 577-585
160. Westh H, Hougaard DM, Vuust J, Rosdahl VT. Prevalence of *erm* Gene Classes in Erythromycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated between 1959 and 1988. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Feb.1995, p. 369-373
161. Wichelhaus TA, Schäfer V, Brade V, Böddinghaus B. Molecular Characterization of *rpoB* Mutations conferring Cross-resistance to Rifampicin on Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Nov 1999, p. 2813-2816
162. Wondrack L., Massa M., Yang B.V. & Sutcliffe J. (1996). Clinical strain of *Staphylococcus aureus* inactivates and causes efflux of macrolides. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **40**, 992-8.
163. Wyke AW Isolation of five penicillin-binding proteins from *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol.Lett., 1984, 22, 133-138
164. Yamaguchi A, Shiina Y, Fujihara E et al. The tetracycline efflux protein encoded by the *tet(K)* gene from *Staphylococcus aureus* is a metal-tetracycline/H⁺ antiporter. FEBS Lett, 1995, 365:193
165. Young H, Skurray RA, Amyes SGB: Plasmid-mediated trimethoprim-resistance in *Staphylococcus aureus*. Biochem J 1987, 243:309

166. Zilhao R, Papadopoulou B, Courvalin P. Occurrence of the Campylobacter resistance gene *tetO* in *Enterococcus* and *Streptococcus spp.* Antimicrob Agents Chemother (United States), Dec 1988, 32(12) p1793-6
167. Zurenko GE, Yagi BH, Schaadt RD, *et al.* *In vitro* activities of J-100592 and U-100766, novel oxazolidinone antibacterial agents. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1996; 40(4):839-45

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Agr.....	accessory-gene-regulator
BHI.....	Brain-Heart-Infusion
DIN.....	Deutsche Industrie Norm
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
Dnase.....	Desoxyribonuklease
EDTA.....	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA.....	Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay
ENARE.....	European Network of Antimicrobial Resistance
Ere.....	Erythromycin resistance esterase
Erm.....	Erythromycin ribosome methylation
IRS.....	Isoleucyl-tRNA-Synthetase
Kb.....	Kilobasen
KDa.....	Kilodalton
KNS.....	Koagulase-negative Staphylokokken
μ.....	Micro
M.....	Molar
MHC.....	major histocompatibility complex
MHK.....	Minimale Hemmkonzentration
MLS.....	Makrolid-,Lincosamid-,Streptogramin
M-RNA.....	Messenger-RNA
MRSA.....	Methicillin-resistente <i>S.aureus</i>
Msr.....	Macrolid Streptogramin Resistance
MSSA.....	Methicillin-sensible <i>S.aureus</i>
NCCLS.....	National Committee for Clinical Laboratory Standards
OD.....	optische Dichte
PBP.....	Penicillinbindepotein
PBS.....	Phosphatgepufferte Saline
PCR.....	Polymerase Kettenreaktion
PFGE.....	Pulsfeldgelelektrophorese
RNA.....	Ribonukleinsäure
RNAse.....	Ribonuclease
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylokokkus aureus</i>

Sar.....	staphylococcal-accessory-regulator
Spp.....	Spezies
Tris	Trichloressigsäure
t-RNA	Transfer-RNA
TTS.....	Toxic-Shock-Syndrom
TSST-1	Toxic-Shock Syndrom Toxin-1
VISA.....	Vancomycin intermediär sensibler <i>S.aureus</i>
W/v	Gewichtsanteil

8.1 Buchstaben Code der Aminosäuren

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

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. Franz-Josef Schmitz gilt mein herzlicher Dank für die Überlassung des Themas, seine freundliche und humorvolle Betreuung und die stets zuverlässige Unterstützung bei dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern der Medizinischen Mikrobiologie und Virologie, insbesondere den Doktoranden und Diplomanden, danke ich für die Hilfsbereitschaft, die nette Arbeitsatmosphäre, die gute Zusammenarbeit und die vielen Anregungen.

Den Mitarbeitern des BMFZ, insbesondere Frau Dr. rer. nat. Sybille Scheuring, gilt mein Dank für die freundliche und stets hilfsbereite Unterstützung bei den Sequenzierungsarbeiten.

Ebenfalls danke ich meinem Freund Michael Schimmel für mentalen Beistand und Hilfe in allen Computerfragen, sowie Annette Haas und meinen Eltern für Unterstützung und wichtige Anregungen.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Angela Krey
Geburtsdatum/-ort	19.05.1975 in Haan
Familienstand	ledig

Schulbildung

08/1981 – 06/1985	Grundschule in Wuppertal
08/1985 – 06/1994	Städt. Gymnasium Wuppertal Vohwinkel
	Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

04/1995 – 09/2000	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
03/1997	Ärztliche Vorprüfung
03/1998	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2000–10/2001	Praktisches Jahr am Städt. Klinikum Solingen
11/2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

AiP

03/2002 – 08/2003	Abteilung für Kardiologie und allgemeine Innere Medizin am Städt. Klinikum Solingen
-------------------	---

Assistenzärztin i.d. Weiterbildung

Seit 09/2003	Abteilung für Kardiologie und allgemeine Innere Medizin am Städt. Klinikum Solingen
--------------	---

Molekularbiologische Resistenzmechanismen und Therapieoptionen bei europäischen *Staphylococcus aureus*-Isolaten

vorgelegt von

Angela Krey

Das Auftreten von MRSA stellt im klinischen Alltag ein wichtiges therapeutisches und hygienetechnisches Problem dar.

In dieser Arbeit wurden im Rahmen einer europaweiten Längsschnittsstudie (ENARE-Programm) Methicillin-Resistenzraten, Resistenzen gegenüber klassischen Therapeutika und deren genetische Grundlagen, sowie Resistenzen gegenüber verschiedenen Reservetherapeutika und neuen Alternativtherapeutika an einem großen europäischen *S.aureus*-Kollektiv untersucht.

Die Methicillinresistenzrate in Europa lag im ersten Jahr des ENARE-Programmes bei 22%, im zweiten bei 25%.

Resistenzen gegenüber klassischen Therapeutika wie Makroliden, Lincosamiden, Tetracyclinen und dem Rifampicin zeigten einen eindeutigen Zusammenhang mit der Methicillin-Resistenz. Diese Antibiotika sind bei MRSA nicht mehr sicher einsetzbar. Eine MLS_B-Resistenz war bei *S. aureus* hauptsächlich durch das Vorhandensein des *ermA* Genes (prädominant in MRSA mit konstitutiver MLS_B-Expression) oder *ermC* Genes (prädominant in MSSA mit induzierbarer Expression) bedingt. Eine Tetracyclin-Resistenz wurde bei MRSA am häufigsten durch die Determinante *tetM*, bei MSSA durch die Determinante *tetK* vermittelt, wobei die Kombination *tetM/tetK* etwa 10 mal häufiger bei MRSA vorkam.

Eine Resistenz gegenüber Rifampicin beruht nach heutigem Kenntnisstand auf Mutationen im Bereich des *rpoB*-Rif-Genes. Es wurden 10 verschiedene Mutationen im *rpoB*-Rif-Gen bei *S.aureus* nachgewiesen. Hierbei war das Codon 481 mit den beiden Mutationen [His-481→Tyr] und [His-481→Asn] am häufigsten betroffen und Stämme mit Mehrfachmutationen zeigten höhere MHK-Werte. Unterschiede zwischen MRSA und MSSA bestanden hierbei jedoch nicht und eine Methicillin-Resistenz hatte keinen Einfluß auf die spontane Mutationsrate oder die Resistenzentwicklung unter Antibiotika-Selektionsdruck *in vitro*.

In dem gesamten europäischen MRSA-Kollektiv wurden keine Vancomycin-resistenten *S.aureus*, keine Vancomycin-intermediär-sensible *S.aureus* (VISAs) und auch keine Hetero-VISAs gefunden. Vancomycin bleibt somit weiterhin Mittel der Wahl bei schweren Infektionen durch multiresistente Staphylokokken. Andere Reserve-Antibiotika wie Aminoglykoside, Fosfomycin, Fusidinsäure und Cotrimoxazol zeigten immer noch ein gewisses Maß an Aktivität, können aber wegen der multiresistenten Natur der meisten MRSA nicht mehr als generell zuverlässig eingestuft werden. Der topische Wirkstoff Mupirocin war bei europäischen MRSA noch sehr gut wirksam und ist somit weiterhin Mittel der Wahl zur Eradikation von MRSA bei nasalem Trägerstatus.

Die Zukunft liegt möglicherweise in neuen, derzeit in der klinischen Erprobung befindlichen Alternativtherapeutika. Für das Oxazolidinon Linezolid wurden in Europa keine Resistenzen nachgewiesen. Im Verlauf des zweiten Jahres des Untersuchungs-Programmes traten jedoch, überwiegend in Frankreich, vereinzelte Resistenzen gegenüber dem neuen Streptogramin-Mischpräparat Quinopristin/Dalfopristin auf, wobei die meisten der betroffenen Isolate klonal identisch waren.

Düsseldorf, den 2. Februar 2004