

**Molekulare Grundlagen der Mechanismen und  
Epidemiologie von Resistenzen gegenüber neuen  
Antibiotika bei Gram-positiven klinischen Isolaten aus  
dem Norddeutschen Raum.**

**Dissertation**

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Björn Saager

aus Stade

Hamburg 2008



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom April 2004 bis März 2008 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Peter Heisig in der Abteilung für Pharmazeutische Biologie und Mikrobiologie am Institut für Pharmazie der Universität Hamburg angefertigt.

1. Gutacher: Prof. Dr. Peter Heisig
2. Gutacher: Prof. Dr. Bernward Bisping

Datum der Disputation: 18. September 2009

*für Dr. med. Hans Saager (1921-1999)*

## **Danksagungen**

Herrn Prof. Dr. Peter Heisig danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Zudem danke ich ihm für die Möglichkeit an der Teilnahme zahlreicher Kongresse.

Herrn Prof. Dr. Bernward Bisping danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Ich danke Frau Dr. Anke Heisig und Antje Schnasse für die Unterstützung bei der DNA-Sequenzierung sowie Tatjana Claussen für die Einführung in die Praxis der MHK-Bestimmung. Ich danke weiterhin Sabine Badziong für die kleinen Hilfen im Alltag und immer eine Tasse Kaffee.

Herrn Dr. Matthias Horstkotte und Herrn PD Dr. Holger Rohde danke ich für die sehr gute, unkomplizierte Zusammenarbeit während der Durchführung der Empfindlichkeits-Untersuchung am UKE und die erfolgreichen, gemeinsamen Veröffentlichungen sowie Präsentationen auf Kongressen.

Ich danke Herrn Dr. Christian Saager und Herrn Dr. Björn Timmerbeil für das schnelle Korrekturlesen des Manuskriptes. Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Christian Saager für die Unterstützung bei der Literatur-Recherche.

Besonders danke ich Herr Dr. Björn Timmerbeil für die freundschaftliche, gemeinsame Zeit im Labor U15 und die umfassende Einweisung in die Methode des Pyrosequencing<sup>TM</sup>. Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmazie für die angenehme Zusammenarbeit und die freundliche Atmosphäre.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Svenja Saager sowie meinen Eltern für die ständige Unterstützung während der Dissertation.



A	Einleitung .....	1
1	Antibiotika und Resistenzen.....	1
1.1	Einleitung .....	1
1.2	Einteilung von Antibiotika und Übertragung von Resistenz-Mechanismen.....	3
1.3	Antibiotika-Klassen und spezielle Resistenzmechanismen .....	5
1.3.1	Antibiotika mit Wirkung auf die Zellwand-Synthese .....	5
1.3.1.1	β-Lactam-Antibiotika.....	5
1.3.1.2	Glykopeptide und Lipoglykopeptide.....	11
1.3.2	Antibiotika mit Wirkung auf die Proteinsynthese.....	15
1.3.2.1	Aminoglykoside .....	15
1.3.2.2	Makrolide .....	18
1.3.2.3	Oxazolidinone .....	23
1.3.3	Antibiotika mit Wirkung auf die Nukleinsäuresynthese .....	26
1.3.3.1	Fluorchinolone .....	26
1.3.4	Antibiotika mit Einfluss das bakterielle Membran-Potential.....	31
1.3.4.1	Lipopetide.....	31
2	Ziel dieser Arbeit.....	35
B	Material .....	37
1	Bakterienstämme .....	37
1.1	Referenzstämme .....	55
2	Antibiotika.....	56
3	Laborchemikalien und andere Materialien.....	57
4	Puffer und Lösungen .....	59
5	Enzyme.....	62
6	Nährmedien und Nährböden .....	62
7	Nukleinsäuren.....	64
7.1	Oligonukleotide .....	64
7.2	Größenmarker.....	68
8	Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien .....	69
8.1	Laborgeräte.....	69
8.2	Verbrauchsmaterialien .....	71
9	Software .....	72

C	Methoden.....	73
1	Mikrobiologische Methoden .....	73
1.1	Herstellung einer Übernachtskultur .....	73
1.2	Anlegen einer Glycerin-Dauerkultur.....	73
1.3	Bestimmung der MHK nach der Mikrodilutionsmethode.....	73
1.3.1	Herstellung der Wirkstoffverdünnungen.....	73
1.3.2	Herstellung der MHK-Platten .....	74
1.3.3	Herstellung des Inokulums zur Beimpfung der MHK-Platten.....	74
1.3.4	Auswertung der MHK-Platten .....	74
1.4	Unterscheidung zwischen konstitutiven und induzierbarem Phänotyp der durch <i>erm</i> -codierte rRNA-Methyltransferasen vermittelten Makrolid-Resistenz bei <i>S. aureus</i> durch Double-Disc-Test .....	75
1.5	Induzierung der durch <i>erm</i> -codierte rRNA-Methyltransferasen vermittelten Makrolid-Resistenz bei <i>S. aureus</i> .....	76
1.6	Untersuchung des Einfluss von Effluxpumpen auf die verminderte Empfindlichkeit oder Resistenz von <i>S. aureus</i> gegenüber Fluorchinolonen .....	76
1.7	Bestimmung der Generationszeit .....	77
2	Molekularbiologische Methoden.....	78
2.1	Isolierung von chromosomaler DNA .....	78
2.2	Isolierung von Gesamt RNA .....	78
2.2.1	Photometrische Quantifizierung der isolierten RNA .....	80
2.2.2	Überprüfung der isolierten RNA auf Reinheit .....	80
2.2.3	Überprüfung der isolierten RNA auf Unversehrtheit.....	80
2.3	Polymerase-Kettenreaktion .....	81
2.3.1	Detektion von Resistenz-Mechanismen mit Hilfe der PCR.....	82
2.3.1.1	Nachweis des Aminoglykosid-modifizierenden Enzyms AAC(6')-APH(2'') bei Gentamicin-hochresistenten <i>Enterococcus</i> spp. mit Hilfe der PCR .....	82
2.3.1.2	Nachweis der <i>vanA</i> -, <i>vanB</i> - und <i>vanC</i> -Gene bei Vancomycin-resistenten <i>Enterococcus</i> spp. mit Hilfe einer Multiplex-PCR .....	83
2.3.1.3	Nachweis des <i>mecA</i> -Gens bei Methicillin-resistenten <i>S. aureus</i> Isolate mit Hilfe der PCR .....	84
2.3.1.4	Nachweis der <i>ermA</i> - und <i>ermC</i> -Gene bei Erythromycin-resistenten <i>S. aureus</i> Isolaten mit Hilfe einer Duplex PCR .....	85

2.3.1.5	Nachweis des <i>msrA</i> -Gens bei Erythromycin-resistenten <i>S. aureus</i> Isolaten mit Hilfe der PCR.....	87
2.4	Reverse Transcriptase Reaktion.....	88
2.4.1	Primer-Extension.....	88
2.5	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren.....	90
2.5.1	Agarosegele.....	90
2.5.2	Polyacrylamid-Gele.....	91
2.6	Aufarbeitung von Nukleinsäuren.....	92
2.6.1	Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	92
2.6.2	Ethanol-Fällung von Nukleinsäuren.....	92
2.7	Sequenzierung von DNA.....	93
2.7.1	Cycle-Sequencing.....	93
2.7.1.1	Untersuchung der Gene der 23S rRNA bei <i>S. aureus</i> und <i>Enterococcus</i> spp. auf Punktmutationen, die zu einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber Linezolid führen können. ....	94
2.7.1.2	Untersuchung der Untereinheiten GyrA und ParC der Gyrase bei <i>S. aureus</i> auf Punktmutationen, die zu einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen führen können. ....	97
2.7.1.3	Untersuchung des Transposon Tn554 in <i>S. aureus</i> auf strukturelle Veränderung der <i>ermA</i> -Regulator-Region, die zu einer veränderten Expression des <i>ermA</i> -Gens führen können. ....	99
2.7.2	Pyrosequencing™.....	101
2.7.2.1	Detektion und Quantifizierung einer G → T Punktmutation an Position 2576 in den Genen der 23S rRNA bei <i>S. aureus</i> und <i>Enterococcus</i> spp., die zu einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber Linezolid führt.....	101
D	Ergebnisse.....	104
1	Empfindlichkeit Gram-positiver Isolate aus dem Routine-Labor.....	104
1.1	Sammlung Gram-positiver Isolate aus dem Routine-Labor.....	104
1.2	Bestimmung der MHK gegenüber ausgewählten Antibiotika.....	105
1.3	Kreuz- bzw. Parallelresistenzen.....	122
1.3.1	Ergebnisse der Auswertung für <i>S. aureus</i> .....	122
1.3.2	Ergebnisse der Auswertung für <i>Enterococcus</i> spp.....	123
1.4	Zeitliche Entwicklung der Resistenzen.....	123
2	Empfindlichkeit Vancomycin-resistenter <i>Enterococcus</i> spp.....	134

2.1	Sammlung von <i>Enterococcus</i> spp. Isolaten mit Vancomycin-Resistenz .....	134
2.2	Bestimmung der MHK gegenüber ausgewählten Antibiotika .....	134
3	Detektion von Resistenz-Mechanismen auf molekularer Ebene.....	141
3.1	Nachweis des Aminoglykosid-modifizierenden Enzyms AAC(6')-APH(2'') bei Gentamicin-hochresistenten <i>Enterococcus</i> spp. mit Hilfe der PCR .....	141
3.2	Nachweis der <i>vanA</i> -, <i>vanB</i> -und <i>vanC</i> -Gene bei Vancomycin-resistenten <i>Enterococcus</i> spp. mit Hilfe einer Multiplex-PCR .....	142
3.2.1	Gram-positive Isolate aus dem Routine-Labor .....	144
3.2.2	Vancomycin-resistente <i>Enterococcus</i> spp.....	144
3.3	Nachweis des <i>mecA</i> -Gens bei Methicillin-resistenten <i>S. aureus</i> Isolaten mit Hilfe der PCR.....	144
3.4	Nachweis des <i>ermA</i> - und <i>ermC</i> -Gens bei Erythromycin-resistenten <i>S. aureus</i> Isolaten mit Hilfe einer Duplex PCR .....	145
3.5	Nachweis des <i>msrA</i> -Gens bei Erythromycin-resistenten <i>S. aureus</i> Isolaten mit Hilfe der PCR.....	147
3.6	Detektion und Quantifizierung eines G2576T Single Nucleotide Polymorphism bei <i>Enterococcus</i> spp.....	148
3.6.1	Gram-positive Isolate aus dem Routine-Labor .....	151
3.6.2	Vancomycin-resistente <i>Enterococcus</i> spp.....	152
3.7	Untersuchung der Gene der 23S rRNA bei <i>Enterococcus</i> spp. auf Punktmutationen mittels Cycle-Sequencing, die zu einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber Linezolid führen können.....	153
3.8	Detektion von Punktmutationen in der bakteriellen Gyrase mittels Cycle-Sequencing bei <i>S. aureus</i> Isolaten mit verminderten Empfindlichkeit oder Resistenz gegenüber Fluorchinolonen .....	155
4	Phänotypische Charakterisierung von Resistenz-Mechanismen.....	157
4.1	Unterscheidung zwischen konstitutivem und induzierbarem Phänotyp der durch <i>erm</i> -codierte rRNA-Methyltransferasen vermittelten Makrolid-Resistenz bei <i>S. aureus</i> durch Double-Disc-Test .....	157
4.2	Nachweis eines möglichen Einflusses von Efflux-Pumpen auf die verminderte Empfindlichkeit oder Resistenz von <i>S. aureus</i> gegenüber Fluorchinolonen .....	158
5	Entwicklung eines Pyrosequencing <sup>TM</sup> -basierten Verfahrens zur Detektion der durch <i>erm</i> -codierte rRNA-Methyltransferasen bedingten Dimethylierung von rRNA in klinischen Isolaten von <i>S. aureus</i> .....	159

5.1	Charakterisierung klinischer <i>S. aureus</i> Isolate .....	161
5.2	Primer-Design .....	162
5.3	Überprüfung des Primer-Designs .....	165
5.4	Messung der während Primer-Extension-Reaktion gebildeten cDNA-Fragmente mit der Pyrosequencing <sup>TM</sup> -Technologie.....	175
6	Untersuchungen zu Alternativen eines Pyrosequencing <sup>TM</sup> -basierten Detektions-Verfahrens für durch <i>erm</i> -codierte rRNA-Methyltransferasen katalysierte Dimethylierung von rRNA in klinischen Isolaten von <i>S. aureus</i> .....	188
6.1	Nachweis durch Auftrennung in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel .....	188
6.2	Nachweis durch Auftrennung mit Hilfe der Kapillar-Elektrophorese .....	192
7	Empfindlichkeit von MRSA Isolate mit Linezolid-Resistenz.....	196
7.1	Isolierung von MRSA Isolaten mit Linezolid-Resistenz .....	196
E	Diskussion .....	202
1	Empfindlichkeit Gram-positiver Isolate aus dem Routine-Labor .....	202
1.1	<i>S. aureus</i> Isolate .....	202
1.2	<i>Enterococcus</i> spp. Isolate .....	210
2	Empfindlichkeit Vancomycin-resistenter <i>Enterococcus</i> spp. ....	214
3	Untersuchungen zur Entwicklung eines Pyrosequencing <sup>TM</sup> -basierten Nachweisverfahrens für die durch <i>erm</i> -codierte rRNA-Methyltransferasen katalysierte Dimethylierung des Adenins an Position 2058 der 23S rRNA in <i>S. aureus</i> .....	220
4	Untersuchung von MRSA Isolaten mit Linezolid-Resistenz .....	223
F	Ausblick .....	227
G	Zusammenfassung .....	230
H	Summary .....	232
I	Literaturverzeichnis.....	234
J	Abkürzungsverzeichnis .....	245
K	Gefahrstoffverzeichnis .....	250
L	Lebenslauf .....	252



## A Einleitung

### 1 Antibiotika und Resistenzen

#### 1.1 Einleitung

Durch eine verbesserte frühzeitige Erkennung und Behandlung von bakteriell verursachten Infektionskrankheiten konnte in den letzten 60 Jahren eine deutliche Reduktion der Sterblichkeit erzielt werden. Dies ist unter anderem auch auf eine verbesserte Einsicht in Vorgänge auf molekularer Ebene, aber auch auf die Entwicklung neuer antibakterieller Wirkstoffe zurückzuführen. Mit deren Hilfe ist es möglich, die Infektion zu bekämpfen und den Erreger gezielt zu eliminieren.

Das 1929 durch Sir Alexander Fleming (St. Mary's Hospital, London) entdeckte Penicillin G (1) und das 1935 von Gerhard Domagk (Bayer AG, Wuppertal) synthetisierte Sulfonamid Prontosil (2) waren die ersten verfügbaren antibakteriellen Wirkstoffe. Diese Wirkstoffe standen aufgrund beschränkter Produktionsmöglichkeiten und hoher Kosten für eine Therapie zunächst nicht unbegrenzt zur Verfügung. Deshalb wurden diese für die Behandlung von Wunden während des zweiten Weltkrieges reserviert. Durch die Entdeckung und Entwicklung neuer Antibiotika und die Vereinfachung von Produktionsprozessen wurde die antibakterielle Therapie erleichtert und die Anwendung konnte sich ausdehnen. Eine tragische Konsequenz daraus war die Behandlung von trivialen, häufig nicht bakteriell bedingten Infektionen mit Antibiotika (3).

Fleming selbst hatte in einem Interview in der Zeitschrift "*The New York Times*" schon im Jahr 1945 davor gewarnt, dass der unangemessene Gebrauch von Penicillin zu der Selektion resistenter "Mutanten" von *Staphylococcus aureus* führen könne. Er sollte mit seiner Behauptung recht behalten, denn wenige Jahre nach dem ausgedehnten Gebrauch von Penicillin waren mehr als 50 % aller *S. aureus* Isolate gegenüber Penicillin resistent und heute nahezu 90 % (4).

Die Situation hat sich in den letzten Jahren nicht verbessert, vielmehr wird immer häufiger beobachtet, dass zuvor empfindliche Bakterienarten Resistenzen gegenüber verschiedenen Antibiotikaklassen entwickeln. Eine weitere besorgniserregende Beobachtung ist die zunehmende Verbreitung von nosokomialen, also im Krankenhaus erworbenen Krankheitserregern auch in öffentlichen Bereichen. Diese verursachen in gesunden Patienten ohne erkennbare Risikofaktoren schwere Infektionen, die nur mit enormem Aufwand behandelt werden können (5). Zusätzlich hat sich der Schwerpunkt solcher Problemkeime in

der Klinik oder im ambulanten Bereich in den letzten Jahren verschoben. Waren es zu Beginn überwiegend Gram-negative Erreger, die mit nosokomialen Infektionen in Verbindung gebracht wurden, so liegt der Schwerpunkt heute bei Gram-positiven Erregern (6).

Die Liste der Bakterienstämme, welche im Laufe der Jahre Resistenzen erworben haben ist lang und beeindruckend. So ist die schon erwähnte Penicillin-Resistenz bei *S. aureus* zu nennen, sowie das Auftreten von  $\beta$ -Lactamase-produzierenden *Haemophilus influenzae* Stämmen und Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA) Isolaten. Besorgniserregend ist die Isolierung von Gram-negativen Erregern wie *Salmonella* sp. mit Fluorchinolon-Resistenz oder das Vorkommen von *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae* Isolaten, welche durch Expression von „Extended-Spectrum-Beta-Lactamases“ (ESBL) in der Lage sind Cephalosporine der dritten Generation zu hydrolysieren (4, 7). Mit der Isolierung von Enterokokken- und Staphylokokken Isolaten mit Resistenzen gegenüber den wichtigen Reserve-Antibiotika Vancomycin und Linezolid ergeben sich besonders große Schwierigkeiten in der Therapie solcher als „superbugs“ klassifizierter Krankheitserreger (8). Insbesondere der Erwerb multipler Resistenzen gegenüber verschiedenen Substanzklassen erschwert die erfolgreiche Therapie solcher Infektionen, die darüber hinaus häufig mit extrem erhöhten Kosten und auch einer höheren Sterblichkeitsrate verbunden sind.

Die Hoffnung vieler Mediziner Mitte des 20. Jahrhunderts, mit Hilfe von Antibiotika in der Lage zu sein, Infektionskrankheiten gänzlich ausrotten zu können, erfüllte sich nicht und wird es mit großer Wahrscheinlichkeit auch in der weiteren Zukunft der Antibiotikatherapie nicht tun (9).

Der explosionsartigen Entwicklung von Resistenzen gegenüber Antibiotika in den letzten Jahrzehnten steht eine ständig sinkende Zahl der Neuzulassungen von Antibiotika gegenüber (10). So erhielten in den Jahren 1998 bis 2003 nur neun Antibiotika durch die amerikanische Behörde FDA eine Zulassung, von denen jedoch nur zwei, Daptomycin und Linezolid wirklich neuartige Wirkmechanismen aufweisen konnten (4).

Die Zulassung und Entwicklung von Antibiotika mit neuartigem Wirkmechanismus wird jedoch die mit Resistenzen gegenüber Antibiotika verbundenen Probleme allein nicht lösen können. Vielmehr erscheint es außerdem nötig, das Auftreten und die Verbreitung von Infektionskrankheiten durch die Anwendung besserer diagnostischer Methoden bei einer gleichzeitig rationalen Verwendung von Antibiotika ausschließlich bei bakteriellen Infektionen zu vermeiden, um die Fehler aus den Anfängen der antibiotischen Ära nicht zu wiederholen.

## 1.2 Einteilung von Antibiotika und Übertragung von Resistenz-Mechanismen

Die für die Bekämpfung von bakteriellen Infektionen in der Therapie am häufigsten verwendeten Antibiotika können leicht durch ihren Wirkmechanismus eingeteilt werden, wodurch diese in vier große Klassen unterteilt werden können (Tabelle 1).

**Tabelle 1** Einteilung verschiedener Antibiotika bzgl. ihres Wirkmechanismus und ausgewählte Vertreter dieser Klassen modifiziert nach (4)

Störung der Zellwand-Synthese: $\beta$ -Lactam-Antibiotika, Glykopeptide, Lipoglykopeptide
Unterdrückung der Protein-Synthese: Aminoglykoside, Makrolide, Oxazolidinone
Störung der Nukleinsäure-Synthese: Fluorchinolone, Sulfonamide
Störung des bakteriellen Membran-Potentials: Lipopeptide

Einige Bakterienarten sind natürlicherweise gegenüber einer Klasse von Antibiotika resistent, da sich diese durch die Aneignung dieser Eigenschaft einen Vorteil gegenüber anderen Arten verschafft haben (natürliche Resistenz). Häufig sind diese Arten in der Lage selbst Antibiotika zu produzieren und schützen sich so vor dem von ihnen gebildeten Antibiotikum.

Von größerer Bedeutung ist jedoch die erworbene Resistenz, durch welche einzelne Vertreter einer Art, welche ursprünglich einem Antibiotikum gegenüber empfindlich waren, eine Unempfindlichkeit erlangen. Dadurch verschaffen sich einzelne Vertreter dieser Art gegenüber den restlichen Stämmen der Art einen Vorteil bei Vermehrung und Wachstum und können so bevorzugt wachsen.

Diese Unempfindlichkeit kann durch eine zufällige Mutation entstehen, welche dann dem Vertreter der Art unter Selektionsdruck während einer Therapie mit einem Antibiotikum einen Wachstumsvorteil verschafft. Diese genetischen Veränderungen können dann innerhalb dieser Mutanten von Mutterzelle zu Tochterzelle weitergegeben werden (Vertikale Evolution) oder sich durch Weitergabe der Resistenzdeterminanten innerhalb der gleichen Generation verbreiten (Horizontale Evolution).

Als wichtige biochemischen Mechanismen, die eine Resistenz dieser Zellen einer Art vermitteln können, sind dabei zu nennen:

- Inaktivierung des Antibiotikums durch Enzyme
- Verringerung der Antibiotikum-Konzentration in der Zelle durch vermehrte Expression von Efflux-Pumpen
- Veränderung der Zielstruktur zu einer neuen, gegenüber dem Antibiotikum unempfindlichen oder Aneignung einer gänzlich neuen Zielstruktur

Der horizontale Austausch der Genabschnitte für diese Mechanismen kann sowohl zwischen Zellen der gleichen Species als auch verschiedenen Species durch drei Mechanismen stattfinden:

- Transduktion
- Konjugation
- Transformation

Bei der Transduktion erfolgt der Austausch genetischer Informationen durch Bakteriophagen, welche die bakterielle Zelle infizieren. Dadurch wird deren genetisches Material inklusive der neuen genetischen Information für die Ausbildung einer Resistenz in die Zelle eingeschleust und in dessen Genom integriert. Häufig wird gleichzeitig die eigene virale DNA des Virus integriert, welche das Replikationssystem der bakteriellen Zelle übernimmt und somit die Zelle zu einer gesteigerten Produktion neuer Phagen zwingt, bis diese stirbt und bei der Autolyse die neu gebildeten Phagen freisetzt. Diese Form des Austausches genetischer Informationen beschränkt sich jedoch nur auf die Übertragung genetischer Informationen zwischen bestimmten Bakterien untereinander.

Eine wesentlich größere Rolle bei der Übertragung von Resistenzdeterminanten bei Gram-negativen Species spielt die Konjugation. Dabei wird der Transfer von Resistenz-Determinanten durch Plasmide vermittelt, welche die genetische Information für die Expression einer Resistenz extrachromosomal enthalten. Eine Möglichkeit des Transfers dieser Genabschnitte kann durch Ausbildung eines Pilus zwischen Bakterien erfolgen, welcher diese kurzfristig miteinander verbindet. Die entsprechenden Genabschnitte wurden zuvor aus dem Plasmid geschnitten und nach erfolgtem Transfer in die DNA der Wirtszelle integriert (semikonservativer Prozess).

Bei der Transformation erfolgt die Aufnahme „nackter“ DNA-Fragmente, welche zuvor von Bakterienzellen nach ihrem Tod freigesetzt worden waren, durch kompetente Bakterienzellen.

Durch das Vorhandensein mobiler, genetischer Elemente, so genannter Transposons auf Plasmiden oder der chromosomalen DNA, kann der Transfer von Genabschnitten für die Expression von Resistenzen leichter und schneller erfolgen. Die erwähnten Transposons enthalten bestimmte terminale Genabschnitte, welche für Transposasen und Rekombinasen codieren, diese wiederum den Ein- und Ausbau von Genabschnitten in spezifische Bereiche des Genoms erleichtern (11). Ein weiterer Mechanismus, der den Transfer von Genabschnitten für die Expression von Resistenzen erleichtert ist die Existenz von Integrons. Diese enthalten eine Ansammlung von Genen in so genannten Genkassetten, die durch das Protein (Integrase) klassifiziert werden, welches die Rekombination dieses Genabschnitts vermittelt (12). Diese Genkassetten haben die Möglichkeit sich stabil in Regionen anderer genomischer DNA zu integrieren, um so die Expression neuer Resistenzen zu ermöglichen.

Durch den erleichterten Austausch und Einbau genetischer Informationen durch die erwähnten Mechanismen können Bakterienzellen eine Unempfindlichkeit gegenüber verschiedenen Klassen von Antibiotika gleichzeitig erlangen und somit phänotypisch eine multiple Resistenz zeigen. Besitzt eine Bakterienspecies gegenüber drei oder mehr verschiedenen Antibiotikaklassen eine phänotypische Resistenz, so wird dies als Multiple-Antibiotika-Resistenz definiert („multiple-drug-resistance“ oder „mdr“) (5, 13).

### **1.3 Antibiotika-Klassen und spezielle Resistenzmechanismen**

Im Folgenden sollen die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antibiotikaklassen vorgestellt werden und die für die untersuchten Bakterienspecies relevanten Resistenzmechanismen gegenüber diesen Klassen erläutert werden.

#### **1.3.1 Antibiotika mit Wirkung auf die Zellwand-Synthese**

Die Wirkung der Vertreter dieser Antibiotikaklasse beruht auf der Hemmung der Zellwandsynthese. Als verwendete Klassen sind die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, die Glykopeptide und die Lipoglykopeptide zu nennen.

##### **1.3.1.1 $\beta$ -Lactam-Antibiotika**

Die Klasse der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika umfasst jene antibakteriell wirksamen Substanzen, die alle als ein gemeinsames Strukturmerkmal einen  $\beta$ -Lactam-Ring enthalten, welcher für die antibakterielle Aktivität dieser Gruppe essentiell ist. In der Gruppe der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika wird je nach strukturellen Modifikationen, die unterschiedliche Auswirkungen auf das antibakterielle Spektrum und die Pharmakokinetik haben, zwischen vier weiteren Untergruppen unterschieden:

- Penicilline
- Cephalosporine
- Carbapeneme
- Monobactame

Innerhalb dieser Gruppe kann wiederum durch chemische Modifikationen eine Veränderung der pharmakokinetischen Eigenschaften sowie des Wirkspektrums erlangt werden (14).

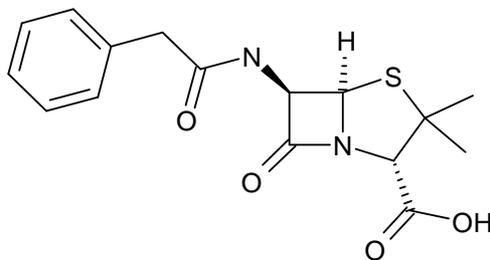
Der Schwerpunkt der weiteren Erläuterungen soll sich auf die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten  $\beta$ -Lactam-Antibiotika beschränken. Dazu gehören die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika Benzylpenicillin (Penicillin G), als Ursubstanz der Penicilline, Ampicillin als Vertreter der strukturellen Weiterentwicklung der Aminopenicilline und Oxacillin als Vertreter der penicillinasefesten Penicilline.

Allen drei verwendeten  $\beta$ -Lactam-Antibiotika ist der bicyclische Penam-Grundkörper gemeinsam, welcher sich biogenetisch aus der aus L-Cystein und D-Valin entstandenen 6-Amino-Penicilliansäure ableitet (Tabelle 2).

**Tabelle 2** Strukturformeln der verwendeten  $\beta$ -Lactam-Antibiotika und IUPAC-Bezeichnung

---

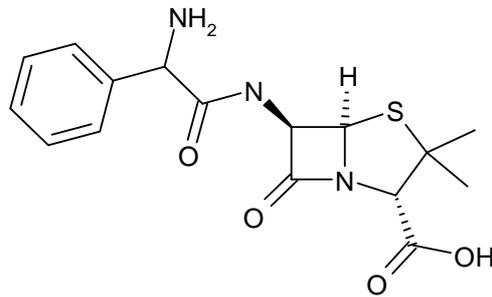
Benzylpenicillin (Penicillin G)



*(2S,5R,6R)-3,3-Dimethyl-7-oxo-6-(2-phenylacetamido)-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carbonsäure*

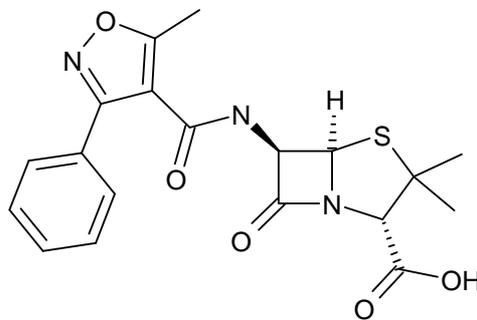
---

## Ampicillin



*(2S,5R,6R)-6-[(R)-2-Amino-2-phenylacetamido]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carbonsäure*

## Oxacillin



*(2S,5R,6R)-3,3-Dimethyl-6-(5-methyl-3-phenylisoxazol-4-ylcarboxamido)-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carbonsäure*

Das als erstes therapeutisch verwendete Benzylpenicillin (Penicillin G) weist eine sehr hohe Aktivität gegenüber Gram-positiven Kokken auf, kann jedoch aufgrund seiner Säureinstabilität nur parenteral verabreicht werden. Außerdem zeichnet es sich durch eine hohe Instabilität gegenüber  $\beta$ -Lactamasen aus.

Als strukturelle Weiterentwicklungen zeichnet sich Ampicillin mit einer erhöhten Aktivität gegenüber Enterokokken und Gram-negativen Enterobakterien aus, während es ein ähnliches bakterielles Spektrum und Instabilität gegenüber  $\beta$ -Lactamasen wie Benzylpenicillin aufweist. Die Verabreichung erfolgt wie beim Benzylpenicillin parenteral.

Durch Modifikationen mit einer Oxazol-Seitenkette erhält das oral verfügbare Oxacillin eine Stabilität gegenüber den von Staphylokokken gebildeten  $\beta$ -Lactamasen. Die Aktivität von Oxacillin ist im Vergleich zu Benzylpenicillin deutlich geringer (15).

Die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika entfalten ihre Wirkung durch die Hemmung der Zellwand-Synthese. Diese besteht aus quervernetzten Peptidoglycanschichten, welche durch den alternierenden Einbau von N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure entsteht. Diese

Schichten sind wiederum entweder direkt oder durch Peptidbrücken, wie z. B. durch Pentaglycin-Ketten bei *S. aureus* miteinander verknüpft. Die Quervernetzung erfolgt durch die Penicillin-Binde-Proteine (PBP) Transglycosidasen und Transpeptidasen, welche aktiv an der Zellwandsynthese beteiligt sind und so für die Ausbildung eines dreidimensionalen Netzes, dem Mureinsacculus, sorgen. Dieser gibt so der Zelle Formstabilität und Resistenz gegenüber wechselnden osmotischen Bedingungen, denen diese ausgesetzt ist. Weitere PBP sind Endopeptidasen, welche den Abbau nicht mehr benötigter Peptidoglycansträngen katalysieren und Carboxypeptidasen, die wiederum an der Regulation des Vernetzungsgrades von Peptidoglycan beteiligt sind (16).

Das Hauptziel der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika sind diese PBP. Durch die Bindung der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika an PBP werden diese am Ab- oder Aufbau der Zellwand beteiligten Enzyme gehemmt. Als Konsequenz der gehemmten Zellwandsynthese erfolgt eine Cytolyse durch den hohen osmotischen Druck, dem die Zelle durch die defekte Zellwand nicht mehr standhalten kann. Durch das Zellwandabbauende Enzym Lysozym wird die Cytolyse weiter beschleunigt. Diese Bindung kann erfolgen, da  $\beta$ -Lactam-Antibiotika eine strukturelle Ähnlichkeit mit dem endständigen D-Alanyl-D-Alanin-Restes des Peptides besitzen, welches an die N-Acetylmuraminsäure geknüpft vorliegt und somit diese als falsches Substrat von den PBP gebunden werden (16).

Gegenüber  $\beta$ -Lactam-Antibiotika bestehen bei Gram-positiven Erregern zwei hauptsächliche Resistenzmechanismen.

Zum einem kann es zur Bildung von  $\beta$ -Lactamasen kommen, die den  $\beta$ -Lactam-Ring hydrolysieren und somit das Antibiotikum inaktivieren. Dieser Resistenzmechanismus spielt vor allem bei Staphylokokken eine wichtige Rolle, da nahezu 90 % aller klinischen Isolate Produzenten von  $\beta$ -Lactamasen sind (8, 16). In *S. aureus* tragen diese einen Genabschnitt (*blaZ*), welcher für die Expression von  $\beta$ -Lactamasen codiert. Dieses Gen wird durch einen Repressor und einen Signal-Transduktor reguliert, welche durch die entsprechende *blaI*- und *blaRI*-Gene codiert werden. Insgesamt können vier verschiedene  $\beta$ -Lactamase Typen unterschieden werden (A, B, C, D). Die Typen A, C und D sind üblicherweise plasmidcodiert, während der Typ B chromosomal vorliegt. Die Induktion des *blaZ*-Gens erfolgt durch  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (17).

Ein weiterer Resistenzmechanismus ist die Expression von PBP mit geringerer Affinität zu  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. Dieser Mechanismus trägt sehr große Bedeutung bei der Resistenz gegenüber Methicillin bei *S. aureus*, welche durch das *mecA*-Gen determiniert wird (18, 19). Das *mecA*-Gen befindet sich dabei auf einem zusätzlichen mobilen genetischen Element

SCC*mec* (Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*), welches zur Expression des PBP2a führt. Dieses kann aufgrund seiner 1.000fachen geringeren Bindungsaffinität für  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, die Zellwandsynthese aufrechterhalten und somit eine Resistenz gegenüber Methicillin und allen anderen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika vermitteln (20, 21).

Neben dem *mecA*-Gen, besitzt das SCC*mec*-Element ein negativ- regulatorisches genetisches Element (*mecI-mecR1*) und eine Gen-Kassette für die Rekombination (*ccr*), welche für die Integration und Ausschneiden des SCC*mec*-Elements verantwortlich ist. Abhängig von der Größe des SCC*mec*-Elements können mindestens fünf verschiedene SCC*mec*-Elemente (Typ I-V SCC) charakterisiert werden (22, 23). Die Induktion des *mecA*-Gens erfolgt dabei durch  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, wobei Methicillin und Oxacillin nur sehr schwache Substrate für eine Induktion sind (8).

MRSA Isolate spielen in der Klinik eine wichtige Rolle, da sich diese Stämme sehr häufig durch eine phänotypisch multiple Resistenz auszeichnen, die wichtige Antibiotikaklassen wie Fluorchinolone, Makrolide, Aminoglykoside und Tetracycline umfassen und somit die therapeutischen Möglichkeiten sehr stark eingeschränkt sind (23). Die beobachtete multiple Resistenz erklärt sich durch das Vorhandensein der zuvor erwähnten verschiedenen Typen an SCC*mec*-Elementen. So beinhalten die Typen II und III im Gegensatz zu dem Typ I zusätzliche genetische Abschnitte für multiple Resistenzen gegenüber nicht  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (22).

Für einige Staphylokokken wird eine Resistenz oder Unempfindlichkeit bei einem niedrigen Wert der minimalen Hemmkonzentration (MHK) gegenüber Methicillin beobachtet, obwohl bei diesen Isolaten kein positiver Nachweis des *mecA*-Gen erbracht werden konnte. Diese Beobachtung beruht auf der Überexpression von  $\beta$ -Lactamasen oder Bildung von PBP mit Mutationen, welche so eine Resistenz oder Unempfindlichkeit vortäuschen können. Diese MRSA Isolate werden auch als „borderline-resistant staphylococci“ (BORSA) bezeichnet und spielen in der Klinik eine eher untergeordnete Rolle (21).

Von immer größerer Bedeutung dagegen ist die Beobachtung, dass zuvor nur in der Klinik isolierte MRSA auch außerhalb dieser Einrichtungen bei Patienten gefunden werden, die keine direkten Kontakt zu Patienten mit MRSA-Besiedlung hatten und bei denen keine nachweisbaren Risikofaktoren für Infektion mit diesen aufgezeigt werden konnten (24). Die als „community-acquired MRSA“ (ca-MRSA) bezeichneten Isolate, zeichnen sich gegenüber den in der Klinik isolierten „hospital-acquired MRSA“ (ha-MRSA) durch ein anderes, meist etwas günstigeres Resistenzprofil ohne multiple Resistenzen aus (z. B. gegenüber Fluorchinolonen). Diese Beobachtung erklärt sich durch das für ca-MRSA typische

Vorhandensein eines Typ IV SCC<sub>mec</sub>-Elements. Dieses besitzt im Gegensatz zu dem für ha-MRSA überwiegend charakteristischen Typen II und III keine zusätzlichen genetischen Abschnitte für multiple Resistenzen (25). Jedoch wird bei diesen ca-MRSA häufig ein Gen nachgewiesen, welches für die Expression von Panton-Valentin-Leukozidin verantwortlich ist (26). Dieses Cytotoxin kann Leukozyten-Schädigung und Gewebs-Nekrose hervorrufen, die in Verbindung mit Haut- und Weichteilinfektionen stehen (27). Gerade die vermehrte Isolierung von ca-MRSA bei Kindern in Tagesstätten, die häufig ein nicht vollständig aufgebautes Immunsystem besitzen, ist besorgniserregend (28). Darüber hinaus können wirkungsvolle Maßnahmen zur Eingrenzung einer Infektion mit MRSA, die in der Klinik Anwendung finden würden, nur schwer eingehalten werden, wie zum Beispiel Isolierung von Patienten und Desinfektionspläne bei einer Infektion mit ca-MRSA (23).

MRSA Isolate in der Klinik und in immer steigenden Maß auch ca-MRSA (29) sind weltweit verbreitet, jedoch ist deren Auftreten und Häufigkeit regional sehr uneinheitlich. So sind laut einer Studie aus dem Zeitraum von 1997 bis 1999 in den USA 34,2 % aller *S. aureus* Isolate als ha-MRSA identifiziert worden, während in Kanada die Rate nur 5,7 % beträgt. Gleichzeitig konnte in den Ländern Argentinien und Brasilien eine Häufigkeit von 42,7 % und 33,7 % festgestellt werden (30).

In Europa variiert die Rate ähnlich und es zeigt sich eine sehr hohe Prävalenz in den südeuropäischen Ländern. So sind nach einer Untersuchung, welche die Jahre 1997-1998 umfasst (30), 54,4 % aller *S. aureus* Isolate in Portugal als MRSA einzustufen. Eine ähnliche hohe Rate konnte in Italien mit 50,5 % beobachtet werden. Gleichzeitig konnte in den Niederlanden und in der Schweiz die geringste Prävalenz mit je 2,0 % und 1,8 % gezeigt werden. In Deutschland ist die MRSA-Rate mit 4,9 % noch deutlich geringer als in England (27,5 %) und Frankreich (21,4 %). Eine andere Studie aus den Jahren 2002 bis 2004 zeigt ähnliche Ergebnisse (31). Jedoch können diese Raten auch innerhalb der genannten Länder noch regional stark variieren.

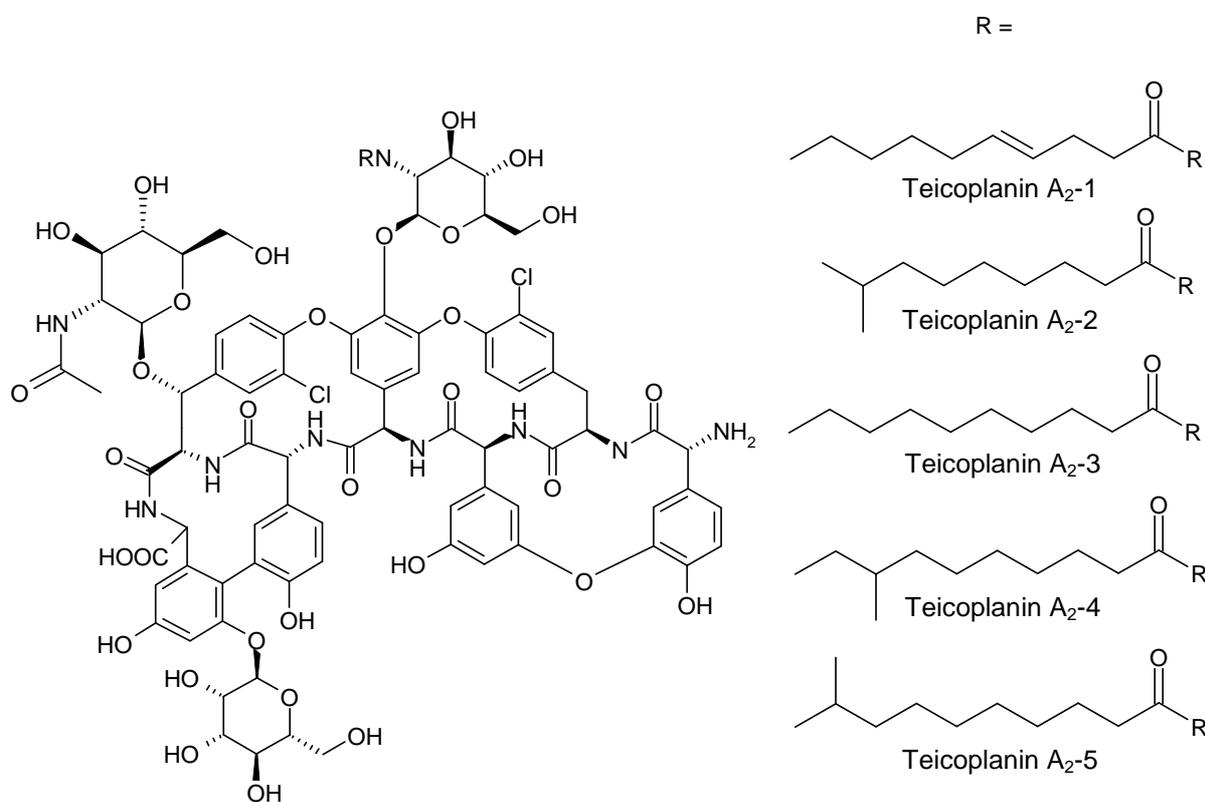
Enterokokken haben gegenüber  $\beta$ -Lactam-Antibiotika eine natürliche verminderte Empfindlichkeit durch Expression des chromosomal codierten PBP5 mit geringerer Affinität zu  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. Eine Unempfindlichkeit („High-level-resistance“) kann durch Punktmutationen und/oder Überexpression dieses PBP entstehen (16).

### 1.3.1.2 Glykopeptide und Lipoglykopeptide

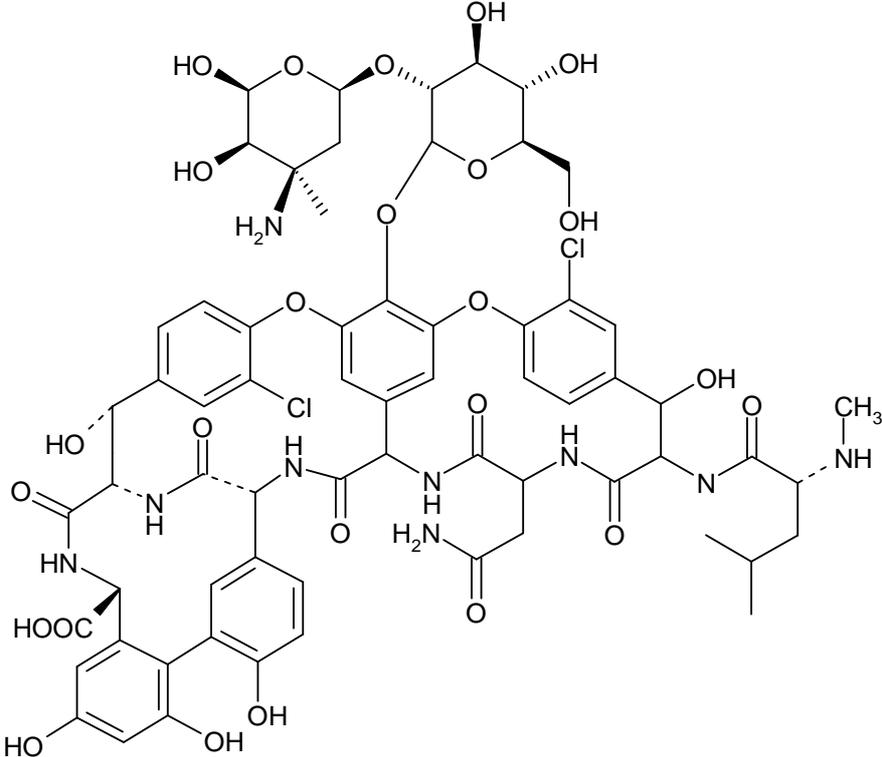
Glykopeptide und Lipoglykopeptide sind zyklische, komplexe und hochmolekulare Verbindungen. Als Vertreter der Glykopeptide sind Teicoplanin und Vancomycin (14, 15), sowie als semisynthetisches Lipoglykopeptid Dalbavancin zu nennen (Tabelle 3), welches sich zur Zeit in der Zulassung durch die FDA befindet (32, 33). Teicoplanin wird aus Kulturen von *Actinoplanes teichomyceticus* gewonnen, während Vancomycin aus Stämmen von *Streptomyces orientalis* isoliert wird.

**Tabelle 3** Strukturformeln der verwendeten Glykopeptide und Lipoglykopeptide

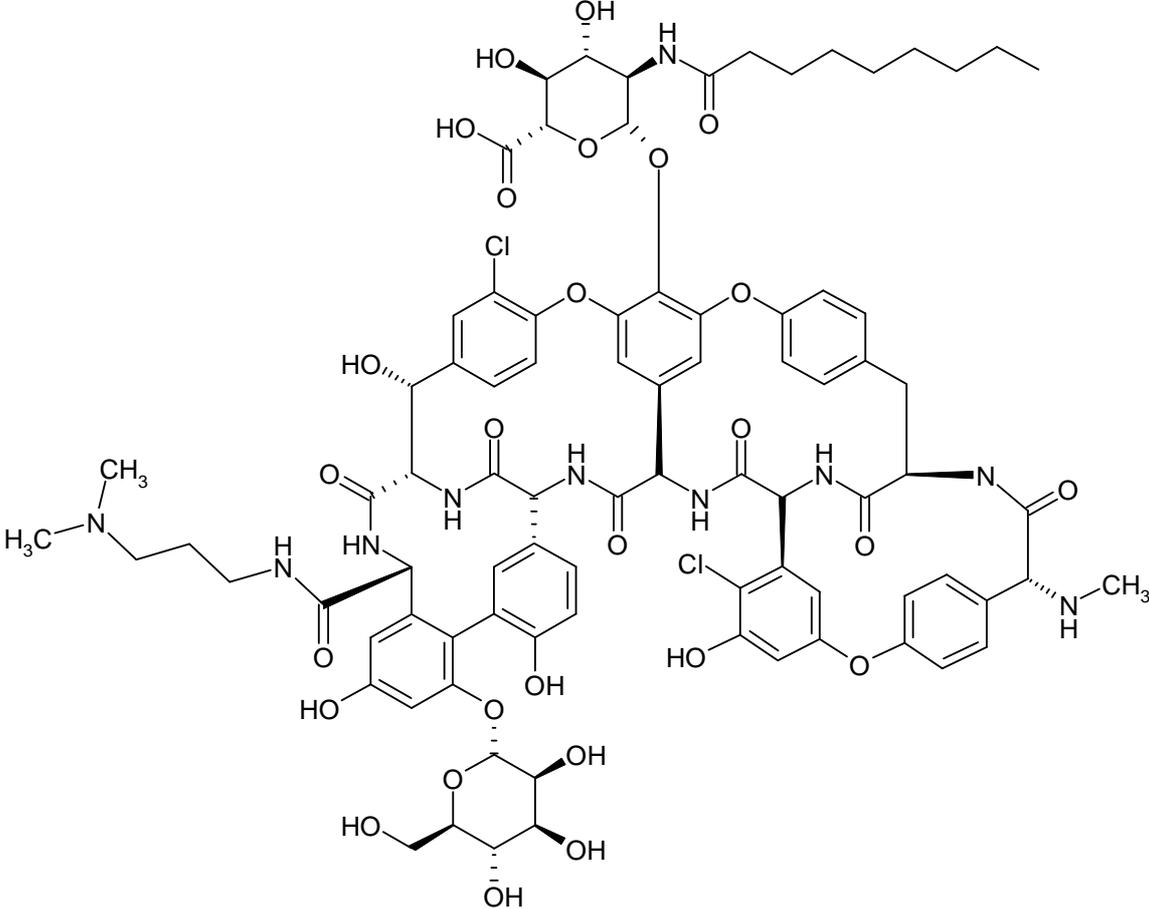
Teicoplanin



Vancomycin



Dalbavancin



Vancomycin besitzt gegenüber nahezu allen bedeutsamen Gram-positiven aeroben Erregern einschließlich MRSA Aktivität. Teicoplanin zeigt gegenüber empfindlichen Erregern zusätzlich eine etwas höhere Aktivität als Vancomycin. Teicoplanin und Dalbavancin können sich durch ihre apolare Seitenkette in der bakteriellen Membran „verankern“ und damit ihre Wirkung durch eine verlängerte Interaktionszeit verstärken (34, 35). Dalbavancin besitzt zusätzlich durch seine hohe Halbwertszeit von 170-210h die für die Klinik interessante Option einer nur einmaligen Verabreichung pro Woche (32). Durch ihre hohe Aktivität gegenüber klinisch relevanten Erregern gelten alle Vertreter dieser Antibiotikaklasse nicht als Mittel der Wahl bei Infektionen („first line“) sondern werden als Reserveantibiotika („last resort“) eingestuft.

Die Glykopeptide hemmen wie die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika die Zellwandsynthese. Durch Komplexbildung mit dem endständigen D-Alanyl-D-Alanyl Rest des Peptidoglykan-Vorläufers wird die durch Transpeptidasen und Transglykosylasen katalysierte Quervernetzung des Peptidoglykans verhindert (14, 15).

Resistenzen gegenüber Glykopeptiden bei Enterokokken können durch Erwerb eines *van* Gencluster mittels Konjugation entstehen. Durch die Expression von *van* Genen kommt es zu der Bildung eines D-Alanyl-D-Lactat Restes als Peptidoglykan-Vorläufer, welcher eine geringere Affinität zu Glykopeptiden aufweist. Von Bedeutung sind hierbei die Gene *vanA* und *vanB* bei *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* (8).

Verminderte Empfindlichkeit gegenüber Glykopeptiden kann bei in der Klinik selten auftretenden Enterokokkenspecies auch konstitutiv vorliegen. Durch Expression eines *vanC* Gens wird ein D-Alanyl-D-Serin Rest als Peptidoglykanvorläufer gebildet, der ebenfalls eine verringerte Affinität zu Glykopeptiden zeigt. Varianten des *vanC* Gens können speciesspezifisch zwischen *vanC1* bei *Enterococcus gallinarum*, *vanC2* bei *Enterococcus casseliflavus* und *vanC3* bei *Enterococcus flavescens* unterschieden werden.

Phänotypisch lassen sich die drei verschiedenen und klinisch interessanten Gen-Klassen bei Enterokokken durch ihre *in-vitro* Empfindlichkeit gegenüber Teicoplanin und Vancomycin charakterisieren (Tabelle 4).

**Tabelle 4** Phänotypische und genotypische Eigenschaften von VRE und deren Einteilung durch MHK-Werte gegenüber Teicoplanin und Vancomycin modifiziert nach (36)

Genotyp	MHK TEC [mg/L]	MHK VAN [mg/L]
<i>vanA</i>	16-512	64->1024
<i>vanB</i>	0,25-2	4-1024
<i>vanC</i>	0.12-2	2-32

TEC = Teicoplanin, VAN = Vancomycin

Infektionen in der Klinik mit Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) stellen genauso wie Infektionen mit MRSA ein stetig wachsendes Problem für die Therapie von Infektionskrankheiten dar, da für die erfolgreiche Behandlung dieser Erreger nur noch wenige Antibiotika zur Verfügung stehen.

Bei Staphylokokken ist es ratsam zwischen Stämmen mit verminderter Empfindlichkeit gegenüber Glykopeptiden (GISA = Glycopeptide intermediate Staphylococcus aureus) und Stämmen mit einer echten Glykopeptid-Resistenz (GRSA = Glycopeptide resistant Staphylococcus aureus) zu unterscheiden.

Der genaue genetische Mechanismus für die verminderte Empfindlichkeit bei GISA Isolaten ist noch nicht vollständig geklärt, aber eine Möglichkeit scheint die Synthese einer dickeren Zellwand und damit einem vermehrtem Maß an falschen Zielstrukturen für Glykopeptide in der Zellwandperipherie zu sein (37, 38). Gleichzeitig wird dies durch die Repression des PBP4 unterstützt, welches bei normaler Expression unverknüpfte D-Alanyl-D-Alanyl Reste abbaut (39). Durch diese beiden Mechanismen wird dem Glykopeptid die Möglichkeit entzogen, sein eigentliches Ziel auf der Zellmembran zu erreichen. Bei VRSA-Stämmen hingegen beruht der Resistenzmechanismus auf der horizontalen Übertragung eines *vanA*-Gens aus VRE.

Interessanterweise traten erst 30 Jahre (1987) nach dessen Entdeckung die ersten Fälle Vancomycin-resistenter Enterokokken (40) auf, während zunächst 1997 in Japan ein *S. aureus* Isolat mit verminderter Empfindlichkeit gegenüber Vancomycin beschrieben wurde (41). Im Jahr 2002 wurde dann der erste *S. aureus* Stamm mit einer echten Vancomycin-Resistenz in den USA isoliert (42, 43). Die Beobachtung der erst sehr späten Resistenz-Entwicklung könnte mit der restriktiven Verwendung von Vancomycin ausschließlich in der Klinik erklärt werden.

Wie MRSA Isolate ist das Auftreten von VRE weltweit verbreitet und zeigt eine ähnliche starke Variation der Prävalenz. So konnte in den USA in den Jahren 1997 bis 1999 ein Anstieg der VRE-Rate von 14 % auf 17 % beobachtet werden, während in Kanada sich die Rate von 2 % auf 0 % verringerte. Ein ähnlicher Trend konnte in Europa beobachtet werden wo sich die Prävalenz von 3 % auf 1 % reduzierte (44). Jedoch variiert auch die Prävalenz von VRE in Europa sehr stark und zeigt ein hohes Aufkommen in den südeuropäischen Ländern. So konnte in einer anderen Studie von 2002-2004 (31) ein sehr hohes Auftreten von VRE mit 19,4 % (Griechenland), 15,7 % (Italien) und 15,4 % (Israel) beobachtet werden. Interessanterweise wurde die höchste Rate mit 21,2 % in Irland gezeigt. In Deutschland konnten insgesamt 4,2 % aller isolierten *Enterococcus* spp. als VRE identifiziert werden. Die

niedrigste Rate mit 100 % Empfindlichkeit gegenüber Vancomycin wurde in der Schweiz beobachtet.

### **1.3.2 Antibiotika mit Wirkung auf die Proteinsynthese**

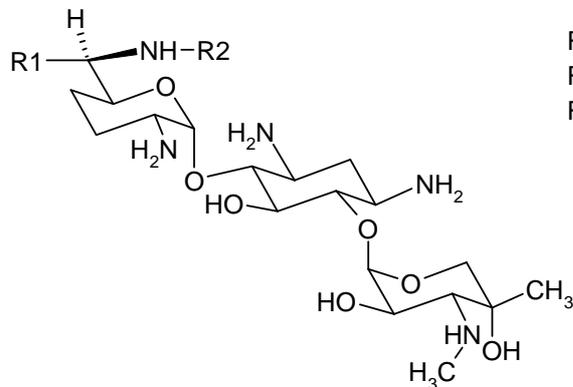
Die Vertreter dieser Antibiotikaklassen entfalten ihre Wirkung über die Hemmung der Proteinsynthese. Als wichtige im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Stoffklassen sind dabei die Aminoglykoside, die Makrolide und die Oxazolidinone zu nennen.

#### **1.3.2.1 Aminoglykoside**

Aminoglykoside sind cyclische Aminoalkohole, die mit zwei Aminozuckern O-glykosidisch verbunden sind. Die verschiedenen Aminoglykoside unterscheiden sich dabei durch die Zusammensetzung der Aminozucker. Aminoglykoside zeichnen sich durch ein breites Wirkungsspektrum gegenüber Gram-negativen- und positiven Erreger aus, besitzen als großen Nachteil jedoch eine sehr geringe therapeutische Breite. Als wichtigster Vertreter der Aminoglykoside zu Therapie nosokomialer und ambulanter Infektionen mit Gram-positiven Erregern ist das im Rahmen dieser Studie untersuchte Gentamicin zu nennen, welches sich aus einem Gemisch von Gentamicin C1, Gentamicin C1a und Gentamicin C2 zusammensetzt (14, 15) (Tabelle 5).

**Tabelle 5** Strukturformeln der verwendeten Aminoglykoside und IUPAC-Bezeichnung

Gentamicin



R1 = R2 = CH<sub>3</sub> : Gentamicin C1  
 R1 = CH<sub>3</sub>; R2 = H : Gentamicin C2  
 R1 = R2 = H : Gentamicin C1<sub>A</sub>

Gentamicin C1

*0-(2-Amino-2,3,4,6,7-pentadexoy-6-(methylamino)-alpha-D-riboheptopyranosyl)-(1-4)-0-3-deoxy-4-C-methyl-3-(methylamino)-beta-L-arabinopyranosyl-(1-6)-2desoxy-D-streptamin*

Gentamicin C1a

*0-3-Deoxy-4-C-methyl-3-(methylamino)-beta-L-arabinopyranosyl-(1-6)-0-2,6-diamino-2,3,4,6-tetraexoy-alpha-D-erythro-hexopyranosyl-(1-4)-2-deoxy-D-Streptamin*

Gentamicin C2

*0-3-Deoxy-4-C-methyl-3-(methylamino)-beta-L-arabinopyranosyl-(1-6)-0-2,6-diamino-2,3,4,6,7-pentadeoxy-alpha-D-ribo-heptopyranosyl-(1-4)-2-deoxy-D-Streptamin*

Gentamicin wird bei oraler Gabe nicht resorbiert, so dass die Anwendung in der Klinik parenteral erfolgt. In der ambulanten Therapie finden sehr häufig lokale Zubereitungen wie Augentropfen oder topische Applikationen in Form von Salben Verwendung.

Um an ihren Wirkort in der Zelle zu gelangen, benötigen sie einen aktiven ATP-abhängigen Transport durch die Membran in die Zelle. Dort binden sie an die 16S rRNA der ribosomalen 30S Untereinheit und verursachen über Interaktion mit dem Ribosom die Bildung von nicht funktionellen Proteinen durch ungenaues Ablesen („misreading“) der mRNA. Als eine Konsequenz entstehen fehlerhafte Strukturen in der Membran der Zellwand, die ein weiteres Eindringen der Aminoglykoside in die Zelle ermöglichen. Durch die so wachsende Konzentration des Antibiotikums in der Zelle verstärkt sich der Effekt des Antibiotikums und führt schließlich zum Zelltod (8).

Bei der Therapie von Infektionen mit Gram-positiven Erregern in der Klinik, wie z. B. Enterokokken wird häufig eine Kombination aus Gentamicin und anderen, die Zellwandsynthese blockierenden Antibiotika, wie z. B. Ampicillin eingesetzt, da diese beiden Antibiotika eine synergistische Wirkung besitzen. Das  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum Ampicillin erleichtert durch Störung der Zellwandsynthese das Eindringen des Gentamicins in die Zelle (14, 15).

Der häufigste Resistenzmechanismus bei Aminoglykosiden nicht nur gegenüber Gram-positiven klinischen Isolaten ist die strukturelle Veränderung der Aminoglykoside durch spezifische Enzyme, wodurch die Bindung zur Zielstruktur beeinträchtigt wird. Insgesamt wird zwischen drei Klassen von Aminoglykosid-modifizierenden Enzymen unterschieden.

- Aminoglykosid-Nukleotid-Transferasen (ANTs)
- Aminoglykosid-Acetyl-Transferasen (AACs)
- Aminoglykosid-Phospho-Transferasen (APHs)

Dabei erfolgt die Konjugation des Moleküls mit einer Adenyl-Gruppe (ANTs), einer Acetyl-Gruppe (AACs) und einer Phosphoryl-Gruppe (APHs). Die Übertragung erfolgt durch die Lokalisierung von Genabschnitten für diese Informationen auf Transposons sehr leicht mittels Konjugation. Enterokokken besitzen natürlicherweise eine intrinsische, verminderte Empfindlichkeit gegenüber Aminoglykosiden und erlangen durch Aneignung von Aminoglykosid-modifizierenden Enzymen hohe Unempfindlichkeit („High-Level-Aminoglycoside-resistance“) gegenüber diesen. Von großer Bedeutung für die Resistenz von Gentamicin gegenüber Enterokokken und Staphylokokken ist das Aminoglykosid-modifizierende Doppelenzym AAC(6′)-APH(2′′) mit gleichzeitiger 6′-N-Acetyl- und 2′′-O-Phosphotransferase Aktivität (8).

Durch das Vorhandensein von Aminoglykosid-modifizierenden Enzymen geht der gewünschte synergistische Effekt zwischen Aminoglykosiden und anderen die Zellwandsynthese inhibierenden Antibiotika verloren, wodurch die Therapie von Infektionen mit Enterokokken in der Klinik erheblich erschwert wird.

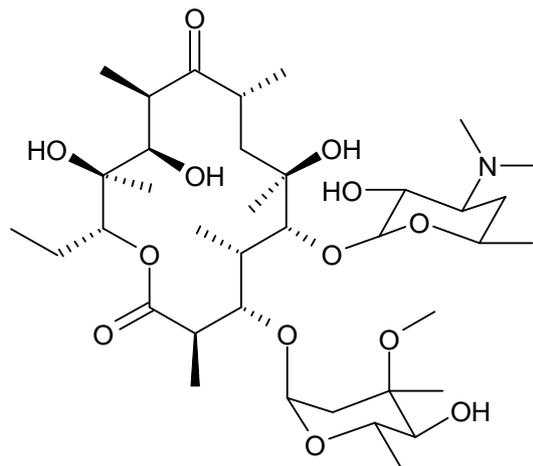
### 1.3.2.2 Makrolide

Makrolide sind antibakteriell wirksame Substanzen, welche als ein gemeinsames Struktur-Merkmal ein aus 14, 15, oder 16 C-Atomen bestehender Lacton-Ring vereint. Dieser ist glykosidisch mit mindestens zwei, häufig verschiedenen Zucker verbunden. Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Makrolid Erythromycin (Tabelle 6) besitzt gute biologische Eigenschaften und Aktivität im Gram-positiven Bereich gegen  $\alpha$ - und  $\beta$ -hämolyisierenden Streptokokken, *Streptococcus pneumoniae*, Mykoplasmen und Chlamydien, jedoch eingeschränkte Wirkung im Gram-negativen Bereich. Die Wirksamkeit von Erythromycin bei der Therapie von Infektionen mit Staphylokokken ist aufgrund des weit verbreiteten Auftretens von Resistenzen gegenüber Makroliden sehr stark eingeschränkt.

**Tabelle 6** Strukturformeln der verwendeten Makrolide und IUPAC-Bezeichnung

---

Erythromycin



*13 $\alpha$ -Ethyl-3 $\alpha$ -( $\alpha$ -L-cladinosyloxy)-6 $\beta$ ,11 $\alpha$ ,12 $\beta$ -trihydroxy-2 $\alpha$ ,4 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,10 $\beta$ ,12 $\alpha$ -hexamethyl-9-oxo-5 $\alpha$ -(3,4,6-tridesoxy-3-dimethylamino- $\beta$ -D-glycero-L-threo-hexopyranosyloxy)-13-tridecanolid*

---

Erythromycin besitzt aufgrund seiner oralen Verfügbarkeit als Alternative bei Unverträglichkeiten, z. B. gegenüber Penicillinen im ambulanten Bereich eine große Bedeutung. Die parenterale Verabreichung in der Klinik spielt besonders bei der Behandlung von Infektionen mit intrazellulären Erregern wie *Legionella* sp. oder *Chlamydia* sp. eine wichtige Rolle. Weiterhin ist die Anwendung von Erythromycin in der Schwangerschaft bei strenger Indikation ein wichtiger Aspekt (14, 15).

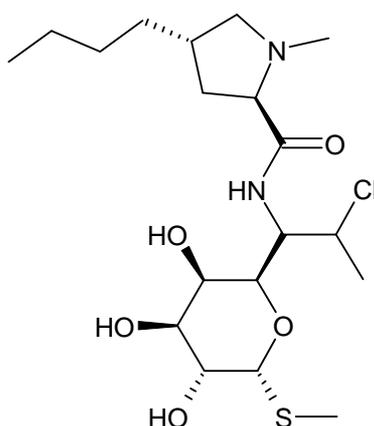
Makrolide könne ihre Wirkung durch eine reversible Bindung an die 50S Untereinheit des Ribosoms entfalten und so die bakterielle Proteinsynthese hemmen. Die Blockade des Austritts der wachsenden Peptid-Kette aus dem Ribosom erfolgt durch eine Interaktion der Makrolide mit der Domäne V in der 23S rRNA der 50S-Untereinheit im oberen Bereich des Peptid-Austrittskanals. Ein weiterer möglicher Wirkmechanismus könnte die sterische Behinderung der korrekten Positionierung der Peptidyl-tRNA beim Transfer von der Aminoacyl-Bindungsstelle sein. Dies hat eine vorzeitige Ablösung der Peptidyl-tRNA im Zuge der Translokation des Ribosoms zur Folge.

Weiterhin können einige Makrolide die korrekte Zusammensetzung der 50S-Untereinheit der Ribosomen verhindern, indem sie mit den Vorläufern der 50S-Untereinheit Wechselwirkungen eingehen und deren Abbau fördern (14).

Der Wirkmechanismus der Makrolide überlappt mit dem der strukturell unterschiedlichen Gruppe der Lincosamine, mit den Vertretern Clindamycin und Lincomycin und dem der Streptogramine der B-Gruppe (Tabelle 7). Somit müssen bei der Betrachtung von Resistenzen gegenüber Makroliden diese beiden Gruppen berücksichtigt werden (45, 46).

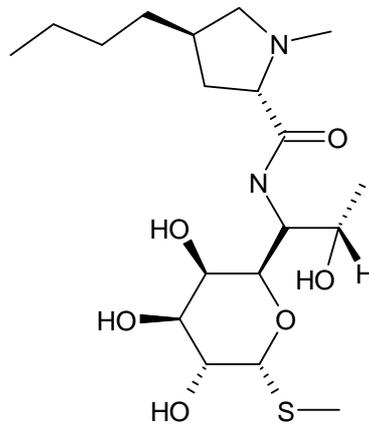
**Tabelle 7** Strukturformeln von wichtigen Lincosamiden und Streptogramine der B-Gruppe sowie deren IUPAC-Bezeichnung

Clindamycin



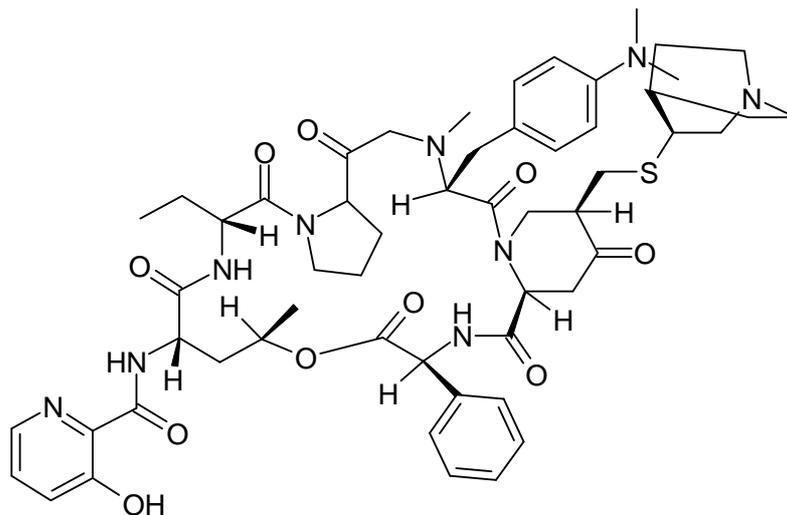
*7-chlor-6,7,8-tridesoxy-6-(trans-1-methyl-4-propyl-L-2-pyrrolidin-carboxamido)-1-thio-L-threo-α-D-galacto-octopyranosid*

Lincomycin



*N*-[2-hydroxy-1-(3,4,5-trihydroxy-6-methylsulfanyl-oxan-2-yl)propyl]-1-methyl-4-propyl-pyrrolidin-2-carboxamid

Quinupristin



*N*-[(6*R*,9*S*,10*R*,13*S*,15*aS*,18*R*,22*S*,24*aS*)-22-[*p*-(dimethylamino)benzyl]-6-ethyl-docosa-hydro-10,23-dimethyl-5,8,12,15,17,21,24-hepta-oxo-13-phenyl-18-[[*l*''(3*S*)-3-quinuclidinylthio]methyl]-12*H*-pyrido[2,1-*f*]pyrrolo-[2,1-*l*][1,4,7,10,13,16]oxapentaazacyclononadecin-9-yl]-3-hydroxypicolinamid

---

Resistenzen gegenüber Makroliden können durch unterschiedliche phänotypische Resistenz-Muster zwischen den einzelnen Klassen in folgende Gruppen unterteilt werden:

- Resistenz gegenüber den 14- und 15-gliedrigen Makroliden („M-Typ“)
- Resistenz gegenüber den 14- und 15-gliedrigen Makroliden und den Streptograminen Gruppe der B („MS<sub>B</sub>-Typ“)
- Resistenz gegenüber allen Makroliden, den Streptograminen der Gruppe B und Lincosamiden („MLS<sub>B</sub>-Typ“)

Diese können über eine Veränderung der Zielstruktur in der rRNA, einen Transport der Substanzen durch Effluxpumpen aus der Zelle oder durch die Expression von modifizierenden Enzymen erfolgen (47). Die Tabelle 8 gibt einen Überblick über die wichtigsten Mechanismen und deren Vorkommen bei den untersuchten Species.

**Tabelle 8** Vorkommen von Genen, die Makrolid-Resistenz vermitteln bei Staphylokokken und Enterokokken modifiziert nach (47)

Mechanismus	Gen	Resistentphänotyp	Vorkommen bei	
			Staphylokokken	Enterokokken
rRNA-Methyltransferase	<i>ermA</i>	MLS <sub>B</sub>	+	-
rRNA-Methyltransferase	<i>ermB</i>	MLS <sub>B</sub>	+	+
rRNA-Methyltransferase	<i>ermC</i>	MLS <sub>B</sub>	+	-
ATP-Transportersystem	<i>msrA</i>	MS	+	-
Esterase	<i>ereA</i>	M	+	-
Esterase	<i>ereB</i>	M	+	-
Phosphorylase	<i>mphC</i>	M	+	-

(+) = positiver Nachweis des Resistenz-Gens, (-) = negativer Nachweis des Resistenz-Gens

Ein weiterer in der Literatur beschriebener Mechanismus ist der Austausch eines Adenins in den Genen der 23S rRNA an der Position 2058 (*E. coli*-Nummerierung)<sup>1</sup> (48).

Der relevanteste Mechanismus für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Resistenz gegenüber Staphylokokken, ist die Modifikation der ribosomalen Bindungsstelle durch *erm*-codierte rRNA-Methyltransferasen (*ermA*, *ermB* und *ermC*). Dieser kann konstitutiv oder induzierbar vorliegen (49).

In Staphylokokken kann eine post-transkriptionale enzymatische Modifizierung des Adenins an Position 2058 durch spezifische Methyltransferasen erfolgen. Die daraus resultierende Dimethylierung an dem N<sup>6</sup> des Adenins hat eine verringerte Affinität der Ribosomen und damit hohe Resistenz gegenüber den Antibiotika der MLS<sub>B</sub>-Gruppe zur Folge, wobei die Namensgebung der Enzyme sich aus „erythromycin resistance methylase“ (*erm*) ergibt. Die Induktion dieses Mechanismus kann durch 14- und 15-gliedrige Makrolide erfolgen, während

<sup>1</sup> Alle weiteren Angaben zu Nukleotid-Positionen in der 23S rRNA beziehen sich stets auf die *E. coli*-Nummerierung.

die 16-gliedrigen Makrolide, Lincosamine, Streptogramine der Gruppe B und die strukturelle Weiterentwicklung der Makrolide, die Ketolide keine Induktion bewirken (45).

Die Induktion der Resistenz und die damit verbundene Expression der *ermA*- und *ermC*-Gene erfolgt bei Staphylokokken durch einen Mechanismus der translationalen Attenuation. Die Lokalisierung der Resistenzgene ist im Fall der durch eine *ermC*-codierte rRNA-Methyltransferasen vermittelten Resistenz häufig plasmidcodiert, während die genetischen Informationen einer *ermA*-codierten rRNA-Methyltransferase überwiegend chromosomal vorliegen.

Dabei unterscheidet sich der genaue Mechanismus der translationalen Attenuation beider Gene leicht. Beiden Mechanismen haben die Interaktion von Erythromycin als induzierende Substanz mit sensiblen Ribosomen gemeinsam.

In Abwesenheit von Erythromycin nimmt das Ribosom eine stabile Konformation ein, so dass die Translation des *ermC*-Gens mit geringer Effizienz geschieht, da die ersten beiden Codons des *ermC*-Gens AUG und AAU (f-Met und Asn) und die ribosomale Bindungsstelle durch die Ausbildung stabiler Sekundärstrukturen abgeschottet sind. Durch Bindung des Erythromycins an das Ribosom und den daraus verbundenen Konformationsänderungen kann die Translation eines Leader-Peptids unmittelbar genaufwärts des *ermC*-Gens in dessen Regulatorregion erfolgen.

Im Fall der Expression des induzierbaren *ermC*-Gens erfolgt dabei die Translation eines 19 Aminosäuren langen Peptids, welches durch eine 141 bp lange Nukleotidsequenz codiert wird. Durch einen stabilen Komplex aus Ribosom und Leader-Peptid kann nun die vermehrte Expression des *ermC*-Gens erfolgen (50, 51).

Die Expression des *ermA*-Gen erfolgt ähnlich, jedoch ist hier die Translation zweier Leader-Peptide entscheidend. Durch die Bindung von Erythromycin an das Ribosom kann die Translation der ersten 15 Aminosäuren langen Leader-Peptids erfolgen. Durch dessen Interaktion mit dem Ribosom kann die Translation des zweiten 19 Aminosäuren langen Leader-Peptid erfolgen, welches wiederum durch Interaktion mit dem Ribosom die Expression des *ermA*-Gens durch Ausbildung eines stabilen Komplexes ermöglicht (52).

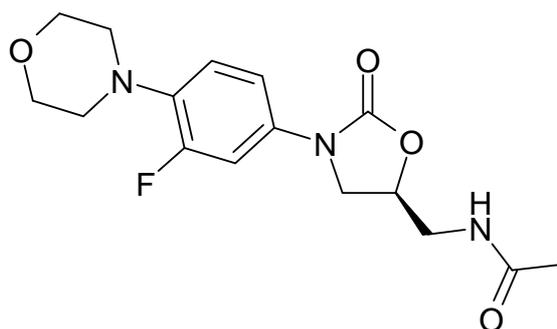
Die konstitutive Expression der *erm*-Gene wird durch strukturdestabilisierende Veränderungen in dem Bereich der Regulatorregion wie Deletionen, Duplikationen, Insertationen und Punkt-Mutationen erreicht (53, 54).

### 1.3.2.3 Oxazolidinone

Die Oxazolidinone als eine neue Substanzklasse synthetischer antibakterieller Wirkstoffe wurden 1987 erstmals beschrieben, die weiteren Forschungsarbeiten durch DuPont Pharmaceuticals wurden jedoch wegen zu geringer *in-vitro* Aktivität eingestellt (55). Erst Anfang der 90er Jahre wurden die Untersuchungen von der Firma Pharmacia Upjohn fortgesetzt und durch verbesserte Struktur-Aktivitäts Untersuchungen gelang die Synthese zweier Substanzen mit verbesserter antibakterieller Aktivität, Eperezolid und Linezolid (56). Weitere klinische Studien erfolgten wegen seiner besseren Pharmakokinetik zunächst nur für Linezolid (57). Die Zulassung durch die FDA für Linezolid erfolgte im Jahre 2000, während es durch die europäische Zulassungsbehörde EMEA kurze Zeit später, 2001, die Zulassung erhielt. Die Tabelle 9 zeigt die Strukturformel von Linezolid.

**Tabelle 9** Strukturformeln der verwendeten Oxazolidinone und IUPAC-Bezeichnung

Linezolid

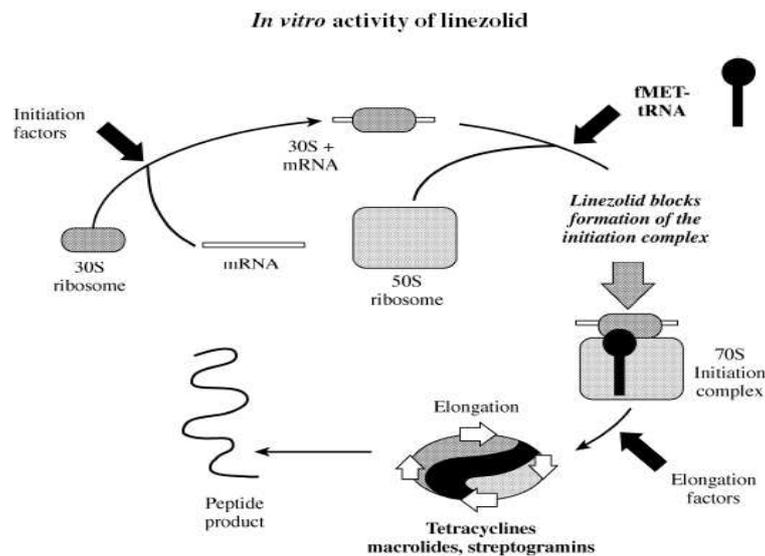


*(S)-N-[[3-(3-Fluor-4-morpholinophenyl)-2-oxooxazolidin-5-yl]methyl]acetamid*

Linezolid zeigt sehr gute antibakterielle Aktivität gegenüber Gram-positiven Erregern. Diese bleibt auch bei solchen Erregern erhalten, welche gegenüber anderen Substanzklassen Unempfindlichkeiten oder multiple Resistenzen aufweisen. So entfaltet es seine Wirkung gleichermaßen bei Methicillin-sensiblen *S. aureus* (MSSA), aber auch bei nosokomialen Krankheitserregern wie MRSA, VRE oder *S. pneumoniae* mit Penicillin oder Makrolid-Resistenz (6). Gegenüber Gram-negativen Erregern zeigt Linezolid eine natürliche Resistenz. Diese wird durch die gegenüber Gram-positiven im Aufbau unterschiedliche Zellwand, welcher eine ausreichende hohe Wirkstoffkonzentration von Linezolid in der Zelle verhindert, aber auch durch aktiven Efflux von Linezolid aus der Zelle heraus bedingt (58).

Der Wirkmechanismus von Linezolid hebt sich von dem anderer antibakterieller Wirkstoffe, welche die Proteinsynthese beeinträchtigen, durch einen völlig neuartigen Ansatz ab.

Linezolid bindet an die 50S Untereinheit des Ribosoms und verhindert so eine weitere Komplexbildung dieser mit der 30S Untereinheit des Ribosom, mRNA, Initiationsfaktoren und Formyl-Methionyl-tRNA. Diese Blockierung hatte die Ausbildung eines nicht funktionsfähigen Initiationskomplexes zur Folge, welcher für die Proteinsynthese durch Translation der mRNA essentiell ist (Abbildung 1) (59).



**Figure 2.** Mode of action of the oxazolidinones. Oxazolidinones combine with the 50S ribosomal subunit, preventing it from complexing with the 30S subunit, mRNA, initiation factors and formylmethionyl-tRNA. Consequently, no functional initiation complex is formed, and protein synthesis is halted. Most other protein synthesis inhibitors block peptide elongation. Adapted from Kloss *et al.*<sup>18</sup>

**Abbildung 1 Darstellung des Wirkmechanismus von Linezolid *in vitro* nach (59)**

Der Unterschied zu anderen die Proteinsynthese beeinträchtigenden antibakteriellen Wirkstoffen wie Chloramphenicol, Makroliden, Lincosamiden oder Tetracyclinen besteht darin, dass diese die Translation der mRNA zunächst beginnen lassen, jedoch dann zu einem späteren Zeitpunkt die Elongationsreaktion inhibieren, während Linezolid die Initiation der Translation der mRNA völlig unterbindet.

Durch diesen mechanistischen Unterschied besitzt Linezolid gegenüber den anderen Wirkstoffen zwei Vorteile. Zunächst scheint es möglich, dass die Therapie mit Linezolid eine Bildung von Virulenzfaktoren wie Koagulasen, Haemolysine und Protein A, welche durch Staphylokokken und Pneumokokken gebildet werden, durch diesen Wirkmechanismus verhindern kann. Viel wichtiger jedoch ist die Tatsache, dass Linezolid aufgrund seines Wirkmechanismus eine Zielstruktur besitzt, die mit keiner der bisher bekannten und verwendeten die Proteinsynthese inhibierenden antibakteriellen Wirkstoffe überlappt. So wird Linezolid in seiner Wirkung nicht durch die Expression von rRNA-Methyltransferasen wie im Fall der Makrolide, Lincosamine und Streptogramine der Gruppe B beeinträchtigt (59).

Resistenz oder Unempfindlichkeit gegenüber Linezolid konnte nach der Zulassung bisher nur sehr selten beobachtet werden, jedoch wurden schon 1999 während der Phase III der klinischen Zulassung Fälle von Linezolid-resistenten Erregern beobachtet (60). Die *in-vitro* Selektion resistenter Mutanten erfolgt nur sehr schwierig (56) mit einer geringen Rate für das Auftreten spontaner Mutationen ( $<1 \times 10^{-9}$ ) (61). Die Untersuchung dieser *in-vitro* selektierten Mutanten ergab einen Zusammenhang zwischen Punkt-Mutationen in der Domäne V der 23S rRNA und einer Unempfindlichkeit bzw. Resistenz gegenüber Linezolid. Die bei der Entwicklung von Resistenz in klinischen Isolaten ein zentrale Rolle spielende Veränderung ist dabei ein Austausch von Guanin zu Uracil an Position 2576, welche auch in den *in-vitro* selektierten Mutanten gezeigt werden konnte (62).

Erste klinische Fälle von Resistenz gegenüber Linezolid wurden für *S. aureus* und Enterokokken 2001 beobachtet (63, 64). Interessanterweise wird für Enterokokken ein vermehrtes Auftreten von Resistenz gegenüber Linezolid beobachtet als bei *S. aureus*. Dieses Phänomen wurde zunächst durch die Unterschiede in der Anzahl der Copy-Gene für die 23S rRNA erklärt, jedoch können sowohl Staphylokokken als auch *E. faecium* bis zu sieben Copy-Gene der 23S rRNA besitzen. Die häufigere Resistenzentwicklung gegenüber Linezolid bei Enterokokken könnte eher mit der Möglichkeit einer effizienteren homologen Rekombination bei Enterokokken erklärt werden. So kann bei Enterokokken die vorhandene Punktmutation auf nur einem Copy-Gen der 23S rRNA die Wild-Typ Sequenz auf den anderen Copy-Genen effizienter ersetzen und es so leichter zu einer Ausprägung einer Resistenz kommen (59).

Das Vorhandensein verschiedener Anzahlen von Gen-Kopien der 23S rRNA wird auch für die langsame Resistenzentwicklung *in-vivo* und *in-vitro* gegenüber Linezolid verantwortlich gemacht. So erschien es plausibel, dass eine Resistenz nur dann auftreten kann, wenn eine bestimmte Anzahl von Copy-Genen der 23S rRNA eine Punktmutation aufweist (62, 65, 66). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass durch das Vorhandensein einer Punktmutation auf nur einem Copy-Gen der 23S rRNA die Entwicklung einer Linezolid-Resistenz mit Hilfe homologer Rekombination beschleunigt werden kann (67). Andererseits wurde durch den gleichen Mechanismus eine Reversion zurück zu Linezolid-Empfindlichkeit beobachtet, nachdem die Therapie nach Auftreten Linezolid-resistenter Erreger mit einem anderen antibakteriellen Wirkstoffe fortgeführt wurde (68-70).

Grundsätzlich ist die Prävalenz von Resistenz gegenüber Linezolid in der Klinik noch sehr gering. So konnte 2006 im Rahmen einer Studie unter 4216 Gram-positiven Isolaten aus insgesamt 16 verschiedenen Ländern (ohne USA) nur fünf Isolate mit einer Linezolid-Unempfindlichkeit beobachtet werden, während in anderen Studien aus den Jahren 2004 und

2005 (71, 72) keine Isolate mit verminderter Empfindlichkeit gegenüber Linezolid nachgewiesen werden konnten. Davon wurden drei als *Staphylococcus epidermidis* Isolate und je eines als *E. faecium* (Deutschland) und als *E. faecalis* (China)-Isolat identifiziert. Eines der *Staphylococcus epidermidis* Isolate stammte aus Italien, während die übrigen beiden in Brasilien isoliert wurden.

Eine weitere Studie beobachtete den Verlauf der Empfindlichkeit gegenüber Linezolid bei Gram-positiven Erregern in den USA über den Zeitraum von 2004 bis 2006 (73) in 50 Krankenhäusern. Unter insgesamt 8806 getesteten *S. aureus* Isolaten über einen Zeitraum von drei Jahren stieg die Rate leicht von 0 % (2004) auf 0,03 % (2006). Bei den Enterokokken (1954 Isolate) hingegen zeigte sich ein dramatischer Anstieg, indem sich die Rate 2004 von 0,8 % nach einem leichten Rückgang 0,64 % (2005) um mehr als das Doppelte, auf 1,83 % im Jahr 2006 steigerte.

Durch die gute antibakterielle Aktivität gegenüber klinisch relevanten Gram-positiven Erregern wie MRSA und VRE, den bisher selten beobachteten Fälle von Resistenz und der langsamen Entwicklung dieser *in-vitro* und *in-vivo* stellt Linezolid als Vertreter einer neuen antibakterielle Wirkstoffklasse eine unverzichtbare Option für die Behandlung bakterieller Infektionen dar. Insbesondere die orale Verfügbarkeit stellt eine enorme Erleichterung dar, sollte jedoch trotzdem zu keinem leichtfertigen Einsatz in der Klinik führen.

### **1.3.3 Antibiotika mit Wirkung auf die Nukleinsäuresynthese**

Wirkstoffe mit Hemmung auf die Nukleinsäuresynthese haben einen Einfluss auf die Proliferation der DNA. Dieses Target ist von besonderem Interesse, da die Zielstrukturen sich bei Eukaryonten und Prokaryonten im Aufbau unterscheiden und somit das Prinzip der selektiven Toxizität erfüllt wird. Als wichtigste Vertreter dieser Substanzklasse sind die Fluorchinolone zu nennen.

#### **1.3.3.1 Fluorchinolone**

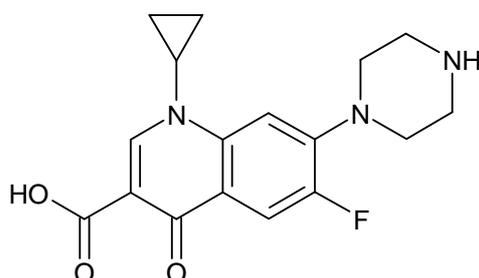
Aus der seit den 60er Jahren verfügbare Gruppe der Chinolone mit Nalidixinsäure als Prototyp wurde mit Hilfe von strukturellen Modifikationen des Grundkörpers durch Substitutionen mit Fluor- und Piperazin-Resten die Klasse der Fluorchinolone entwickelt. Diese zeichnen sich gegenüber den Chinolonen durch ihre erheblich verbesserte Aktivität mit erweitertem Wirkungsspektrum, einer guten oralen Verfügbarkeit und guter Verträglichkeit aus.

Fast allen klinisch relevanten Fluorchinolonen ist der Chinoloncarbonsäure-Grundkörper gemeinsam sowie einer Fluor-Substitution an der Ring-Position 6. Eine Ausnahme ist das

Garenoxacin, welche an dieser Position keine Fluor-Substitution aufweist. Wegen dieser ungewöhnlichen Substitution bei gleichzeitiger guter antibakterieller Aktivität wird Garenoxacin auch als 6-Desfluorochinolon bezeichnet. Durch Variationen mit Hilfe weitere Gruppen an verschiedenen Ring-Positionen können unterschiedliche antibakterielle Aktivitäten und Veränderungen in der Pharmakokinetik erlangt werden (14). Die Tabelle 10 gibt einen Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Fluorchinolone.

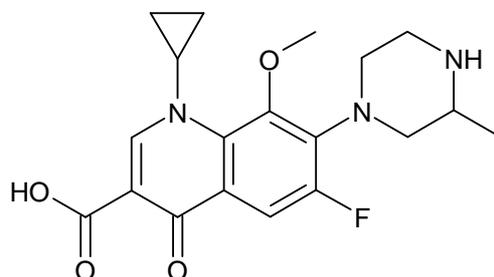
**Tabelle 10** Strukturformeln der verwendeten Fluorchinolone und IUPAC-Bezeichnung

Ciprofloxacin



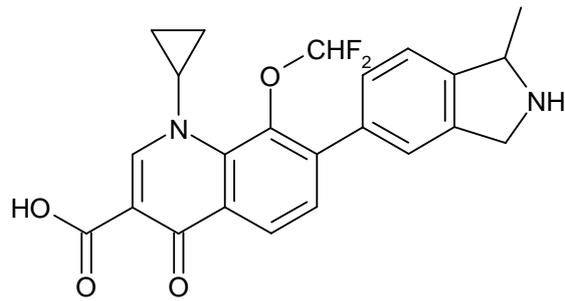
*1-Cyclopropyl-6-fluor-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-3-chinolincarbonsäure*

Gatifloxacin



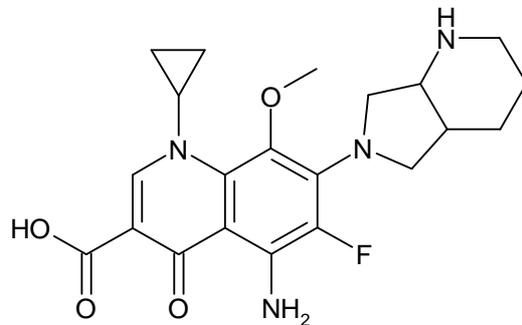
*1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-8-methoxy-7-(3-methyl-1-piperazinyl)-4-oxo-3-chinolincarbonsäure*

Garenoxacin



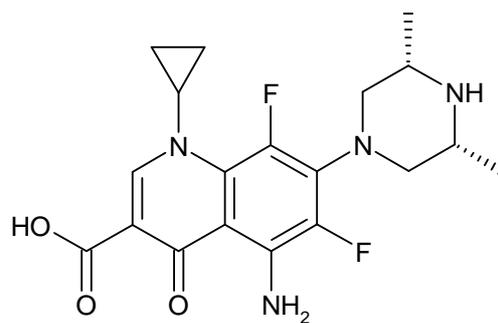
*1-cyclopropyl-8-(difluoromethoxy)-7-[(1R)-1-methyl-2,3-dihydro-1H-isoindol-5-yl]-4-oxo-3-chinolincarbonsäure*

Moxifloxacin



*1-Cyclopropyl-6-fluor-1,4-dihydro-8-methoxy-7-[(4aS,7aS)-octahydro-6H-pyrrolo[3,4-b]-pyridin-6-yl]-4-oxochinolin-3-carbonsäure*

Sparfloxacin



*5-Amino-1-cyclopropyl-7-(cis-3,5-dimethyl-1-piperazinyl)-6,8-difluoro-1,4-dihydro-4-oxo-3-chinolincarbonsäure*

---

Ciprofloxacin zeigt sehr gute Aktivität gegenüber *Enterobacteriaceae* wie *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp. sowie gute Aktivität gegenüber Gram-negativen Kokken (*Neisseria gonorrhoeae*, *H. influenzae*) jedoch nur mäßige Aktivität gegenüber Gram-positiven Kokken. Zusätzlich zeichnet sich Ciprofloxacin durch eine erhöhte Aktivität gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* aus.

Die Fluorchinolone Gatifloxacin, Moxifloxacin und Sparfloxacin besitzen eine ähnliche Aktivität wie Ciprofloxacin, weisen aber eine erhöhte Aktivität gegenüber Gram-positiven Kokken aus. Gatifloxacin und Sparfloxacin haben gleichzeitig eine gute Aktivität gegenüber Anaerobiern (14, 15).

Das sich zur in der Zulassung in der FDA befindliche Desfluorchinolon Garenoxacin, zeichnet sich ebenfalls durch gute Aktivität gegenüber Gram-positiven Kokken aus, besitzt gegenüber MRSA und Fluorchinolon- und Penicillin-resistenten *S. pneumoniae* eine deutlich bessere Aktivität (74). Enterokokken werden zu einem großen Teil auch erfasst.

Die Gruppe der Fluorchinolone zeigt ihre antibakterielle Aktivität durch Interaktion mit zwei bakteriellen Enzymen als Zielstrukturen, den Topoisomerasen II und IV. Diese Enzyme besitzen essentielle Funktionen bei der räumlichen Anordnung der DNA in der Zelle durch Komprimierung der DNA und bei der Trennung von Chromosomen nach der Replikation.

Die bakterielle Topoisomerase II, auch Gyrase genannt, die aus zwei Untereinheitenpaaren GyrA und GyrB besteht, katalysiert die Spaltung eines DNA-Doppelstranges und ist somit in der Lage ringförmig geschlossene DNA-Moleküle, wie z. B. Plasmide, unter Verbrauch von ATP aus einem energiearmen relaxierten in einen energiereichen negativ superspiralisierten Zustand zu versetzen

Aufgabe der Topoisomerase IV, bestehend aus den beiden Unterheiten ParC und ParE (GrlA und GrlB bei *S. aureus*), ist die Trennung (Decatenierung) der bei der Replikation entstandenen Tochterchromosomen sowie die Relaxierung von negativ superspiralisierter DNA (75).

Abhängig vom Antibiotikum ist bei manchen Species entweder die Gyrase oder die Topoisomerase IV primäres Ziel. So ist bei Staphylokokken die Topoisomerase IV das primäre Ziel der meisten Fluorchinolone (76).

Resistenzen gegenüber Fluorchinolonen bei Gram-positiven Erregern entstehen durch Punktmutationen in der „quinolone-resistance determing region“ (QRDR) der chromosomalen Gene welche für die Gyrase oder Topoisomerase IV kodieren oder durch aktiven Efflux mittels membranständiger Pumpen, welche die Substanzen aus der Zelle transportieren (77). Die plasmidvermittelte Inaktivierung von Fluorchinolonen durch Acetyl-Transferasen, wie sie in der Literatur für Gram-negative Species beschrieben wurden (78), ist für Gram- positive Species bislang nicht beschrieben. Jedoch scheint der Schutz der Gyrase durch Qnr-Proteine, wie in Gram-negativen Species berichtet (79), eine wichtige Rolle bei der intrinsischen Resistenz von Enterokokken gegenüber Fluorchinolonen zu spielen (80, 81).

Fluorchinolon-resistente Staphylokokken weisen bei verminderter Empfindlichkeit zunächst nur Punktmutationen in der QRDR der Topoisomerase IV auf, während durch die Kombination von Punktmutationen in der QRDR in der Topoisomerase IV und der Gyrase eine hohe Resistenz gegenüber Fluorchinolonen entsteht. Resistenz gegenüber Fluorchinolonen bei Enterokokken entsteht ähnlich wie bei Staphylokokken durch Punktmutationen in der QRDR der Topoisomerase IV, da bei Enterokokken die Topoisomerase IV primäres Ziel der Fluorchinolone zu sein scheint (8).

Die Tabelle 11 gibt einen Überblick über beobachtete Punkt-Mutationen in der QRDR in *S. aureus* und deren Auswirkung auf die Fluorchinolon-Empfindlichkeit.

**Tabelle 11** Auswirkungen von Punktmutationen in der QRDR auf die Fluorchinolon-Resistenz modifiziert nach (82)

<i>S. aureus</i>	Mutationen in der QRDR		MHK CIP [mg/L]
	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	
WT	-	-	0,25
Mutante	-	80 S→F	4
Mutante	-	80 S→Y	4
Mutante	-	84 E→K	4
Mutante	88 E→K	80 S→Y	128
Mutante	84 S→L	80 S→Y	256
Mutante	84 S→L	84 E→L	256

CIP = Ciprofloxacin

Neben diesem Resistenzmechanismus kann eine Überexpression von *NorA*, einer protonen-abhängigen Efflux-Pumpe zu Fluorchinolon-Resistenz in *S. aureus* führen. Diese Überexpression kann durch Punktmutationen in der Promoterregion von *NorA* entstehen, beschränkt sich jedoch auf den Efflux von hydrophilen Fluorchinolonen wie Norfloxacin und Sparfloxacin (83). Eine Überexpression von *NorA* äußert sich durch eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber diesen Fluorchinolonen, wird jedoch häufig durch gleichzeitig vorhandene Punktmutationen in der QRDR der primären Zielstrukturen verdeckt. Somit ist eine Detektion in der Routine häufig nicht möglich.

Im Krankenhaus isolierte MRSA sind gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika verschiedener Klassen resistent („multiple drug resistance“), unter anderem gegenüber den Fluorchinolonen. Es besteht eine enge Verknüpfung zwischen dem Auftreten von MRSA und Fluorchinolon-Resistenz, die sich vermutlich durch den vermehrten Einsatz von Ciprofloxacin bei der Therapie einer Infektion mit MRSA begründet. Bei seiner Einführung in den späten 80er Jahren war Ciprofloxacin lange Zeit das einzige oral verfügbare Antibiotikum mit einer guten Aktivität gegenüber MRSA. Ein Jahr nach der Zulassung von Ciprofloxacin wurde jedoch ein

dramatischer Anstieg der Fluorchinolon-Resistenz bei MRSA beobachtet (23). So waren 79 % aller MRSA Isolate von im Krankenhaus behandelten Patienten gegenüber Ciprofloxacin resistent, während im gleichen Zeitraum die Rate bei den MSSA Isolaten nur auf 13,6 % stieg (84). Es konnte so gezeigt werden, dass der Einsatz von Ciprofloxacin das Risiko für eine Infektion mit MRSA erhöht (85).

### **1.3.4 Antibiotika mit Einfluss das bakterielle Membran-Potential**

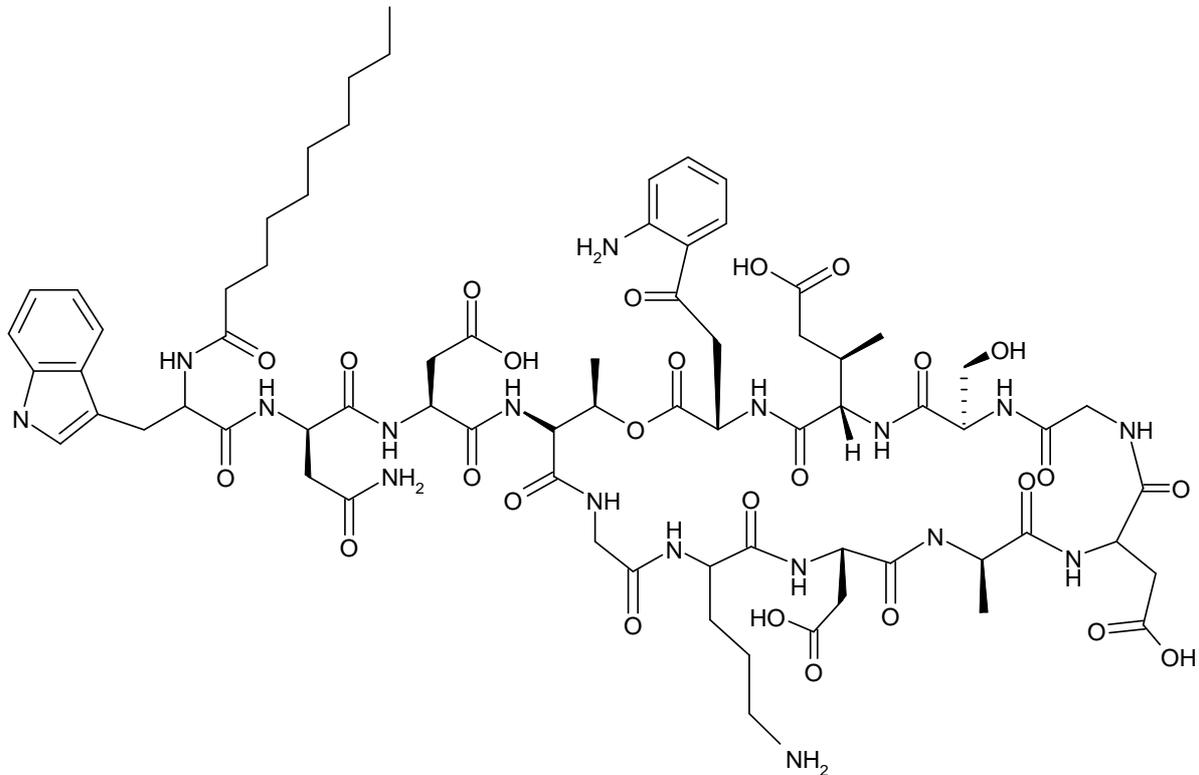
Diese neue Substanzklasse zeichnet sich durch einen völlig neuartigen Wirkmechanismus aus.

#### **1.3.4.1 Lipopetide**

Daptomycin ist der bisher einzige Vertreter der neuen Substanzklasse der Lipopeptide, welches sich durch seinen völlig neuartigen Wirkmechanismus auszeichnet. Dieser unterscheidet sich von denen aller anderen zur Therapie zugelassene Antibiotika grundlegend. Die einzigartige Struktur von Daptomycin besteht aus einem 13-gliedrigen cyclischen Lipopeptid mit einer Decanoyl-Seitenkette, aus der sich der neuartige Wirkmechanismus ergibt (Tabelle 12) (86).

**Tabelle 12** Strukturformeln von Daptomycin und IUPAC-Bezeichnung

Daptomycin



*N-Decanoyl-L-tryptophyl-L-asparaginyl-L-aspartyl-L-threonylglycyl-L-ornithyl-L-aspartyl-D-alanyl-L-aspartylglycyl-D-seryl-threo-3-methyl-L-glutamyl-3-anthraniloyl-L-alanin, ε-lacton*

Die Gewinnung erfolgt durch Fermentation von *Streptomyces roseosporus*. Daptomycin zeigt sehr gute Aktivität gegenüber Gram-positiven Erregern inklusive Stämmen mit multipler Antibiotika-Resistenz und ist durch die FDA und EMEA für die Therapie von komplizierten Haut- und Weichteilinfektionen verursacht durch *S. aureus* (MRSA und MSSA) und Vancomycin-empfindlichen *E. faecalis* Isolaten zugelassen. Es zeigt *in-vitro* eine gute Aktivität auch gegenüber Vancomycin-resistenten Enterokokken (87).

Daptomycin wird in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Zellmembran eingebaut, wobei die Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen die Integration des Moleküls auf zwei Wegen erleichtert. Durch Bindung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen mit zwei Aspartat-Resten des Daptomyocins ergibt sich eine Konformationsänderung des Moleküls, die den lipophilen Charakter erhöht und somit eine bessere Interaktion mit der Zellmembran ermöglicht. Weiterhin überbrücken die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen

die im Daptomycin enthaltenen negativ-geladenen Aminosäuren und die negativ-geladenen Phospholipide der Cytoplasma-Membran des Bakteriums und begünstigen so den tieferen Einbau in die Zellmembran (88).

Der weitere Einbau von Oligomeren in die Zellmembran führt zur Ausbildung von Kanälen, aus denen  $K^+$ -Ionen ausströmen können (Abbildung 2).

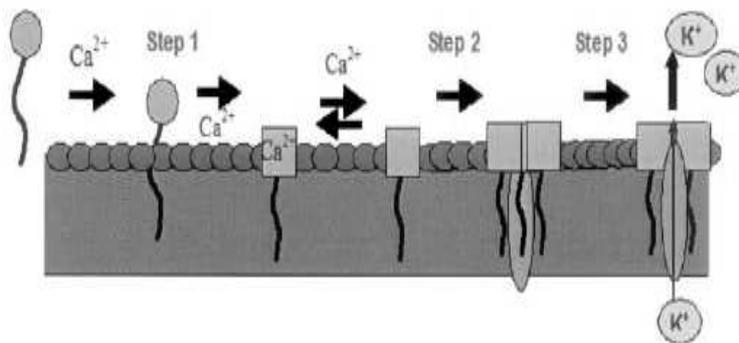


Figure 2. Daptomycin mechanism of action. Hypothetical steps: step 1, daptomycin binds to the cytoplasmic membrane in a calcium-dependent manner; step 2, daptomycin oligomerizes, disrupting the membrane; step 3, the release of intracellular ions and rapid cell death.

#### Abbildung 2 Wirkmechanismus von Daptomycin nach (86)

Dieser Ausstrom hat eine Depolarisation der Zellmembran zur Folge. Diese allein bewirkt noch keinen Zelltod, jedoch bewirkt das Fehlen des Zellmembranpotentials indirekt eine Inhibition von für die Zelle überlebenswichtigen Prozessen, wie z. B. DNA-, RNA- und Protein-Synthese, wodurch letztendlich der Zelltod ausgelöst wird (6, 86, 88).

Die genauen Mechanismen, die zum Absterben der Zelle führen, sind jedoch noch nicht vollständig geklärt.

Es konnte gezeigt werden, dass innerhalb einer Stunde 99,9 % alle MRSA und MSSA durch Daptomycin abgetötet werden. Interessanterweise kam es dabei zu keiner gleichzeitig rapiden Zell-Lysis der Bakterien, worin ein weiterer Vorteil des Daptomycins liegt (89, 90). Die fehlende Lysis der Bakterienzellen reduziert das Risiko für eine Sepsis und für Entzündungsreaktionen als Folge der Freisetzung von Molekülen aus dem Cytoplasma des Bakteriums, wie zum Beispiel Entzündungsmediatoren, Peptidoglykanbausteinen oder bakterieller DNA.

Weiterhin ist Daptomycin auch in der Lage nicht nur Bakterien abzutöten, welche sich in der Wachstumsphase befinden, sondern auch solche in der stationären Phase. Dadurch besitzt es gegenüber anderen Antibiotika erneut eine interessante Option, da gerade Infektionen in tiefer

gelegenen Geweberegionen wie z. B. eine Endocarditis oder Osteomyelitis behandelt werden könnten, die durch Bakterien verursacht werden, welche sich größtenteils in der stationären Phase befinden (88).

Berichte über Resistenzen von Staphylokokken und Enterokokken in klinischen Isolaten gegenüber Daptomycin wurden schon beschrieben, sind aber noch sehr selten (91-96). Während der Phase II und III der klinischen Zulassung lag die Gesamtrate Daptomycin-resistenter *S. aureus* Isolate unter 0,2 % bei über 1000 behandelten Patienten (97).

Der genaue Resistenzmechanismus ist noch nicht vollständig geklärt, so dass es sinnvoll erscheint von einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber Daptomycin zu sprechen. Ein Genom-Vergleich von *in-vitro* erzeugten *S. aureus* Isolaten mit verminderter Empfindlichkeit gegenüber Daptomycin und den Daptomycin-empfindlichen Ausgangsisolaten zeigte Punktmutationen auf, die zu einem Aminosäureaustausch in drei bestimmten Proteinen führte (98). Dabei wurden folgende Proteine identifiziert:

- MprF (Lysylphosphatidylglycerol-Synthetase)
- Yycg (Histidin-Kinase)
- RpoB und RpoC (b und b'-Untereinheit der RNA-Polymerase)

Für zwei dieser Proteine wurde auch in klinischen Isolaten mit verminderter Daptomycinempfindlichkeit nach einer Therapie Punktmutationen und Insertionen gefunden, so dass es möglich scheint, dass diese Proteine bei der verminderten Daptomycinempfindlichkeit eine Rolle spielen (Tabelle 13).

**Tabelle 13** Untersuchungen zu genetischen Veränderungen in *S. aureus*, die mit reduzierter Empfindlichkeit gegenüber Daptomycin korrelieren, modifiziert nach (98)

Basenaustausch	Aminosäureaustausch	Gen-Locus
C→T	295 S→L	<i>mprF</i>
C→T	826 L→F	<i>mprF</i>
Adenin-Insertion	Leserahmen-Verschiebung	<i>yycG</i>

Die Erzeugung von *in-vitro* selektierten Daptomycin-resistenten Mutanten erweist sich als ein schwieriger und aufwendiger Prozess und ergab eine niedrige Frequenz für das Auftreten spontaner Mutationen (97, 99). Die Gründe für diese Beobachtungen mögen zum einen in dem völlig neuartigen Wirkmechanismus mit der bakteriellen Zellmembran als Zielstruktur, sowie in der komplexen noch nicht völlig aufgeklärten nachgeschalteten Wirkung des

Antibiotikums liegen. Es bleibt zu hoffen, dass sich eine Resistenz gegen diese Substanzklasse langsamer entwickelt, als es bei anderen der Fall war. Weiterhin könnte der einzigartige Wirkmechanismus dazu beitragen, dass die Entstehung von Kreuz-Resistenzen ausbleibt.

## 2 Ziel dieser Arbeit

Die erfolgreiche Behandlung einer bakteriellen Infektionskrankheit wird in großem Ausmaß durch die Wahl des richtigen Antibiotikums bestimmt. Weiterhin ist die Kenntnis über den genauen molekularen Wirkmechanismus eines Antibiotikums, aber auch die schnelle Detektion des molekularen Resistenzmechanismus für einen bestimmten Erreger gegenüber diesem Antibiotikum ebenfalls von großer Bedeutung. So kann die Kenntnis des Wirkmechanismus Fehler in der Therapie verhindern sowie die schnelle Detektion des Resistenzmechanismus auf molekularer Ebene bei gleichzeitiger Kenntnis des Wirkmechanismus eine alternative Therapie ermöglichen.

Ebenso ist für die erfolgreiche Therapie einer Infektion das Vorhandensein einer Empfindlichkeitsprüfung sowie einer korrekten Species-Identifizierung Grundvoraussetzung. Liegen diese zum Beispiel im Fall einer lebensbedrohlichen Infektion nicht vor und die Therapie muss rasch erfolgen, so sollte nach den Leitlinien anerkannter Fachgesellschaften (100, 101) zunächst initial empirisch therapiert werden, bis der benötigte Befund vorhanden ist. Dann sollte die Therapie entsprechend fortgesetzt oder modifiziert werden. Dabei sollte, sofern dies möglich ist, auch die Möglichkeit einer Umstellung von intravenös applizierter Medikation zu peroraler Therapie erwogen werden.

Diese Leitlinien sollen den rationalen Einsatz von Antibiotika erleichtern. Dabei ergeben sich die Basis zur Formulierung dieser empirischen Therapieempfehlungen zusammen aus den gesammelten Befunden der lokalen Kleinraumepidemiologie (z. B. Keimspektrum in der eigenen Klinik) und überregional epidemiologisch erhobenen Befunden (Großraumepidemiologie).

An klinischen Isolaten aus dem Raum Hamburg sollen die Wirksamkeiten neuerer Antibiotika (Daptomycin und Linezolid) und eines in Deutschland noch nicht eingeführten Antibiotikums (Dalbavancin), im Vergleich zu Standard-Antibiotika (Ampicillin, Penicillin G, Oxacillin, Erythromycin, Gentamicin, Vancomycin, Teicoplanin, Ciprofloxacin, Gatifloxacin, Moxifloxacin und Sparfloxacin) gegenüber klinisch relevanten Gram-positiven Erregern (*S. aureus*, *E. faecalis*, *E. faecium*) *in-vitro* untersucht werden, um dabei Verbreitung und Häufigkeit von Resistenzen zu beobachten.

Anschließend soll für ausgewählte resistente Isolate die genetische Ursache ihrer Resistenz sowohl identifiziert als auch charakterisiert werden. Der Vorteil einer genetischen Analyse gerade bei schweren, lebensbedrohlichen Infektionen in der stationären Behandlung sind dabei die rasche Analysenzeit, das eindeutige Ergebnis und oft auch eine kostengünstige Analyse.

Dabei sind Erkenntnisse über Methicillin-Resistenz bei *S. aureus* (Detektion des *mecA*-Gens durch eine PCR) und Vancomycin-Resistenz bei *Enterococcus* spp. (Multiplex-PCR zur Detektion des Resistenz-Gens) von besonderem Interesse. Diese beiden klinisch relevanten pathogenen Keime werden mit Krankenhaus-bedingten Infektionen am häufigsten in Verbindung gebracht (102). Weiterhin soll die Linezolid-Resistenz bei *S. aureus* und *Enterococcus* spp. mit Hilfe der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Technologie detektiert und untersucht werden, um die Verbreitung und Entwicklung von Resistenzen gegenüber diesem Reserve-Antibiotikum schnell erfassen zu können. Ebenso ist die Hochresistenz gegenüber Gentamicin bei *Enterococcus* spp. von besonderem Interesse. Diese durch das *aac(6')aph(2'')*-Gen vermittelte Resistenz spielt bei der Therapie von schwere Enterokokken-Infektionen wie der Endocarditis eine wichtige Rolle, da durch die Expression dieses Gens bei *Enterococcus* spp. der Synergismus zwischen Aminoglykosiden und  $\beta$ -Lactam-Antibiotika verloren geht (103). Schließlich soll die Makrolid-Resistenz gegenüber *S. aureus* katalysiert durch spezifische *erm*-codierte rRNA-Methyltransferasen durch eine Multiplex-PCR zur Detektion des *ermA*-, *ermB*- und *ermC*-Gens und des *msrA*-Gens untersucht werden. Die charakterisierten *S. aureus* Isolate sollen bei der Etablierung eines neuen, Pyrosequencing<sup>TM</sup>-basierten Verfahrens verwendet werden, mit dessen Hilfe es möglich sein soll, die Dimethylierung des Adenins an Position 2058 der 23S rRNA in *S. aureus* katalysiert durch spezifische *erm*-codierte rRNA-Methyltransferasen zu detektieren und zu quantifizieren. Auf diesem Weg soll eine durch diese rRNA-Methyltransferasen vermittelte Makrolid-Resistenz in *S. aureus* genauer charakterisiert werden, unabhängig vom jeweiligen *erm*-Typ.

Außerdem ist die Untersuchung der Fluorchinolon-Resistenz bei *S. aureus* durch Sequenzierung des *gyrA*- und *parC*-Gens von Interesse. Dabei interessiert ebenso die Verbreitung von *mdr* verursacht durch eine erhöhte Expression von Effluxpumpen und deren mögliche Einwirkung auf Antibiotikaresistenzen. So soll eine MHK-Bestimmung in An- und Abwesenheit von Inhibitoren von *mdr*-Effluxpumpen erfolgen, um die Bedeutung von *mdr* bei Infektionen mit *S. aureus* zu untersuchen (104).

## B Material

### 1 Bakterienstämme

Die im Rahmen dieser Studie untersuchten klinischen Isolate sind in den Tabelle 14 bis Tabelle 17 aufgelistet.

**Tabelle 14** Auflistung der klinischen *S. aureus* Isolate aus dem Varia-Labor

Species	ID- Bezeichnung	Jahr	DK- Nr.	CIP [mg/L]	DAL [mg/L]	DAP [mg/L]	ERY [mg/L]	GAR [mg/L]	GEN [mg/L]	GTX [mg/L]	LZD [mg/L]	MXF [mg/L]	OXA [mg/L]	PEN [mg/L]	SPX [mg/L]	TEC [mg/L]	VAN [mg/L]	Resistenz-Determinante				
																		<i>mecA</i>	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	<i>msrA</i>
<i>S. aureus</i>	VA24655/04	2004	BJ0036	>32	n.d.	0,25	>64	n.d.	0,25	8	1	2	64	>32	8	0,5	0,5	+	-	-	+	-
<i>S. aureus</i>	VA24726/04	2004	BJ0037	0,25	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,5	0,125	2	0,125	0,25	0,03	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA24795/04	2004	BJ0093	>32	n.d.	0,25	1	n.d.	≤0,125	4	1	4	64	8	8	1	4	+	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	VA24801/04	2004	BJ0135	0,125	n.d.	0,25	2	n.d.	0,5	0,25	2	0,06	0,25	32	0,03	0,5	0,5	n.d.	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	VA24909/04	2004	BJ0038	0,5	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,25	0,125	2	0,06	16	>32	0,5	0,5	1	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA25051/04	2004	BJ0039	0,25	n.d.	0,125	0,5	n.d.	64	0,125	2	0,125	0,5	0,03	0,06	4	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA25145/04	2004	BJ0082	>32	n.d.	0,25	>64	n.d.	≤0,125	4	2	2	32	32	8	0,5	1	+	-	-	+	-
<i>S. aureus</i>	VA25157/04	2004	BJ0092	16	n.d.	0,25	>64	n.d.	32	4	2	2	64	32	8	1	0,5	+	+	-	-	-
<i>S. aureus</i>	VA25319/04	2004	BJ0098	>32	n.d.	0,5	>64	n.d.	≤0,125	4	4	4	64	>32	8	0,5	2	+	-	-	+	-
<i>S. aureus</i>	VA25401/04	2004	BJ0040	0,25	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,25	0,125	4	0,125	0,25	32	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA25405/04	2004	BJ0041	0,25	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,25	0,125	4	0,06	0,25	32	0,03	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA25407/04	2004	BJ0042	0,25	n.d.	0,5	0,5	n.d.	≤0,125	0,5	2	0,06	1	0,25	0,06	1	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA25408/04	2004	BJ0043	0,25	n.d.	0,5	0,5	n.d.	0,5	0,125	2	0,125	0,5	32	0,125	0,5	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA25409/04	2004	BJ0044	2	n.d.	0,125	0,5	n.d.	0,25	1	2	0,25	0,125	2	0,25	0,5	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA25410/04	2004	BJ0045	>32	n.d.	0,25	>64	n.d.	0,25	8	1	4	8	>32	8	0,5	0,5	+	-	-	+	-
<i>S. aureus</i>	VA25414/04	2004	BJ0046	0,5	n.d.	0,5	0,5	n.d.	≤0,125	0,125	2	0,125	2	0,03	0,06	0,5	0,5	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA25420/04	2004	BJ0047	0,25	n.d.	0,125	0,5	n.d.	0,25	0,06	2	0,06	0,5	>32	0,03	1	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA25423/04	2004	BJ0048	>32	n.d.	0,25	0,5	n.d.	≤0,125	4	1	8	0,06	16	4	0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA25434/04	2004	BJ0051	0,125	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,25	0,06	2	0,06	0,25	4	0,03	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA25441/04	2004	BJ0052	0,25	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,25	0,06	2	0,06	0,06	0,5	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA25443/04	2004	BJ0053	0,25	n.d.	0,25	>64	n.d.	≤0,125	0,06	2	0,03	0,5	>32	0,03	0,5	1	n.d.	-	-	+	-
<i>S. aureus</i>	VA25447/04	2004	BJ0054	0,125	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,25	0,06	2	0,06	0,06	32	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

## Material

**Tabelle 14 (Fortsetzung)** Auflistung der klinischen *S. aureus* Isolate aus dem Varia-Labor

Species	ID- Bezeichnung	Jahr	DK- Nr.	CIP [mg/L]	DAL [mg/L]	DAP [mg/L]	ERY [mg/L]	GAR [mg/L]	GEN [mg/L]	GTX [mg/L]	LZD [mg/L]	MXF [mg/L]	OXA [mg/L]	PEN [mg/L]	SPX [mg/L]	TEC [mg/L]	VAN [mg/L]	Resistenz-Determinante				
																		<i>mecA</i>	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	<i>msrA</i>
<i>S. aureus</i>	VA25491/04	2004	BJ0055	0,125	n.d.	0,5	1	n.d.	0,25	0,06	2	0,03	0,125	4	0,03	0,5	0,5	n.d.	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	VA25511/04	2004	BJ0056	0,5	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,25	0,25	2	0,125	0,25	>32	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA25538/04	2004	BJ0057	0,25	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,25	0,125	2	0,06	0,125	1	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA25567/04	2004	BJ0058	0,5	n.d.	0,25	>64	n.d.	0,25	0,125	2	0,125	0,125	>32	0,06	0,5	0,5	n.d.	+	-	-	-
<i>S. aureus</i>	VA20392/05	2005	BJ0245	0,125	n.d.	0,25	0,25	n.d.	≤0,125	0,06	0,5	≤0,03	0,125	0,5	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA20394/05	2005	BJ0246	32	n.d.	0,125	64	n.d.	0,5	4	0,5	2	16	8	8	0,5	0,5	+	-	-	+	-
<i>S. aureus</i>	VA20395/05	2005	BJ0247	0,125	n.d.	0,25	0,25	n.d.	≤0,125	0,06	0,5	≤0,03	0,125	0,5	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA20406/05	2005	BJ0248	>32	n.d.	0,25	0,25	n.d.	0,25	4	1	2	32	32	8	0,5	0,5	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA20435/05	2005	BJ0249	0,25	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,25	0,06	1	0,06	0,5	>32	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA20436/05	2005	BJ0250	32	n.d.	0,125	0,5	n.d.	0,25	4	0,5	1	0,25	16	8	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA20438/05	2005	BJ0251	0,125	n.d.	0,125	0,25	n.d.	0,5	0,06	1	0,03	0,125	2	≤0,03	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA20442/05	2005	BJ0252	0,125	n.d.	0,125	0,5	n.d.	0,5	0,06	1	≤0,03	0,125	2	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA20445/05	2005	BJ0253	0,06	n.d.	0,25	16	n.d.	0,25	0,06	1	≤0,03	0,25	32	≤0,03	1	0,5	n.d.	-	-	-	+
<i>S. aureus</i>	VA20481/05	2005	BJ0254	0,125	n.d.	0,25	4	n.d.	0,5	≤0,03	1	≤0,03	0,125	16	0,06	0,5	0,5	n.d.	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	VA20541/05	2005	BJ0256	0,125	n.d.	1	0,125	n.d.	≤0,125	0,06	1	0,06	0,125	≤0,03	0,06	0,5	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA20555/05	2005	BJ0257	0,25	n.d.	0,125	>64	n.d.	0,5	0,06	1	≤0,03	0,25	>32	≤0,03	0,5	0,5	n.d.	+	-	-	-
<i>S. aureus</i>	VA20576/05	2005	BJ0259	0,25	n.d.	0,125	2	n.d.	0,5	0,06	1	≤0,03	0,25	1	0,06	0,5	0,5	n.d.	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	VA20578/05	2005	BJ0260	0,125	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,5	0,5	1	≤0,03	0,125	1	≤0,03	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA21106/05	2005	BJ0262	0,125	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,5	0,06	0,5	≤0,03	0,125	32	≤0,03	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA21236/05	2005	BJ0264	8	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,5	2	2	1	0,25	2	8	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA21256/05	2005	BJ0265	0,25	n.d.	0,125	0,25	n.d.	0,5	0,125	1	≤0,03	0,125	16	0,125	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA21263/05	2005	BJ0268	0,25	n.d.	0,125	0,5	n.d.	0,25	0,125	1	0,06	0,5	1	0,125	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA21291/05	2005	BJ0269	8	n.d.	0,125	0,5	n.d.	0,5	2	1	1	0,125	2	8	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA21294/05	2005	BJ0270	0,125	n.d.	0,5	64	n.d.	0,5	0,06	0,5	≤0,03	0,125	4	0,06	1	1	n.d.	-	-	+	-
<i>S. aureus</i>	VA21546/05	2005	BJ0271	0,125	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,25	0,06	1	≤0,03	0,25	2	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA21554/05	2005	BJ0272	0,25	n.d.	0,125	0,25	n.d.	0,5	0,125	1	≤0,03	≤0,06	0,25	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA21750/05	2005	BJ0274	0,5	n.d.	0,125	0,25	n.d.	0,25	0,06	1	≤0,03	0,125	>32	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA21789/05	2005	BJ0275	0,5	n.d.	0,25	>64	n.d.	1	0,125	1	0,06	0,5	>32	0,125	≤0,25	0,5	n.d.	+	-	-	-
<i>S. aureus</i>	VA21835/05	2005	BJ0276	0,5	n.d.	0,125	0,25	n.d.	0,25	0,125	1	≤0,03	0,125	>32	0,125	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA21844/05	2005	BJ0277	0,125	n.d.	0,5	1	n.d.	0,5	0,06	1	0,06	0,25	16	0,125	0,5	0,5	n.d.	-	-	-	-

## Material

**Tabelle 14 (Fortsetzung)** Auflistung der klinischen *S. aureus* Isolate aus dem Varia-Labor

Species	ID- Bezeichnung	Jahr	DK- Nr.	CIP [mg/L]	DAL [mg/L]	DAP [mg/L]	ERY [mg/L]	GAR [mg/L]	GEN [mg/L]	GTX [mg/L]	LZD [mg/L]	MXF [mg/L]	OXA [mg/L]	PEN [mg/L]	SPX [mg/L]	TEC [mg/L]	VAN [mg/L]	Resistenz-Determinante				
																		<i>mecA</i>	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	<i>msrA</i>
<i>S. aureus</i>	VA21912/05	2005	BJ0279	1	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,25	0,125	2	≤0,03	0,25	≤0,03	0,125	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA21914/05	2005	BJ0280	0,5	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,5	0,06	1	≤0,03	≤0,06	≤0,03	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA21920/05	2005	BJ0281	0,125	n.d.	0,06	0,25	n.d.	0,25	≤0,03	1	≤0,03	0,25	>32	0,06	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2681/05	2005	BJ0098	16	n.d.	0,25	>64	n.d.	64	4	2	4	0,25	1	8	1	1	n.d.	-	-	+	-
<i>S. aureus</i>	VA3611/05	2005	BJ0100	0,25	n.d.	0,125	0,25	n.d.	0,5	0,06	2	0,06	0,25	32	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA3647/05	2005	BJ0101	0,25	n.d.	0,125	0,25	n.d.	0,5	≤0,03	2	≤0,03	0,125	>32	≤0,03	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA3649/05	2005	BJ0102	32	n.d.	1	>64	n.d.	1	4	2	2	4	32	8	0,5	≤0,25	+	-	-	+	-
<i>S. aureus</i>	VA3652/05	2005	BJ0103	32	n.d.	0,25	>64	n.d.	0,25	4	2	1	4	16	4	1	0,5	+	-	-	+	-
<i>S. aureus</i>	VA3686/05	2005	BJ0104	0,25	n.d.	0,125	0,25	n.d.	2	≤0,03	2	≤0,03	0,125	32	0,125	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA3694/05	2005	BJ0105	>32	n.d.	0,125	>64	n.d.	0,25	4	2	2	4	32	8	0,5	0,25	+	-	-	+	-
<i>S. aureus</i>	VA3712/05	2005	BJ0106	0,25	n.d.	0,125	0,25	n.d.	2	0,06	2	≤0,03	≤0,06	>32	≤0,03	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA3723/05	2005	BJ0107	0,25	n.d.	0,125	0,25	n.d.	0,25	0,06	2	0,06	≤0,06	>32	0,125	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA3727/05	2005	BJ0108	0,25	n.d.	0,25	0,25	n.d.	1	0,06	2	0,06	≤0,06	32	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA3731/05	2005	BJ0109	4	n.d.	0,125	0,25	n.d.	1	0,06	2	≤0,03	≤0,06	>32	1	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA3737/05	2005	BJ0110	0,25	n.d.	0,25	0,25	n.d.	0,25	0,03	2	≤0,03	≤0,06	>32	4	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA3738/05	2005	BJ0111	>32	n.d.	0,25	>64	n.d.	1	4	2	2	8	32	8	0,5	0,5	+	-	-	+	-
<i>S. aureus</i>	VA3742/05	2005	BJ0112	0,06	n.d.	0,25	0,25	n.d.	0,5	0,06	2	≤0,03	0,125	4	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA3758/05	2005	BJ0113	0,25	n.d.	0,06	0,25	n.d.	0,5	≤0,03	2	≤0,03	0,125	>32	0,03	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA3780/05	2005	BJ0114	0,25	n.d.	0,25	0,25	n.d.	0,5	0,06	2	≤0,03	0,5	32	0,06	0,5	0,5	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA3798/05	2005	BJ0115	>32	n.d.	0,25	>64	n.d.	1	8	2	4	32	>32	8	1	0,5	+	-	-	+	-
<i>S. aureus</i>	VA3805/05	2005	BJ0116	0,25	n.d.	0,125	>64	n.d.	0,5	≤0,03	2	0,06	0,25	16	0,06	0,5	0,5	n.d.	-	-	+	-
<i>S. aureus</i>	VA3831/05	2005	BJ0118	0,125	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,25	≤0,03	2	≤0,03	≤0,06	>32	0,06	0,5	≤0,25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA3836/05	2005	BJ0119	0,25	n.d.	0,5	0,25	n.d.	0,5	≤0,03	2	≤0,03	0,25	32	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA3853/05	2005	BJ0120	0,25	n.d.	0,25	0,5	n.d.	1	0,06	2	0,06	≤0,06	≤0,03	0,125	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA3874/05	2005	BJ0121	0,125	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,5	0,06	4	≤0,03	≤0,06	≤0,03	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA3885/05	2005	BJ0122	>32	n.d.	0,125	>64	n.d.	0,5	8	2	4	0,125	32	8	0,5	≤0,25	n.d.	-	-	+	-
<i>S. aureus</i>	VA3918/05	2005	BJ0123	0,25	n.d.	0,25	0,5	n.d.	1	0,06	2	≤0,03	0,25	>32	0,03	1	0,5	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA3933/05	2005	BJ0124	4	n.d.	0,5	0,5	n.d.	0,25	2	2	≤0,03	≤0,06	>32	0,125	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA4278/05	2005	BJ0125	8	n.d.	0,25	>64	n.d.	>128	4	0,25	4	64	>32	4	1	0,5	+	+	-	-	-
<i>S. aureus</i>	VA4309/05	2005	BJ0126	0,125	n.d.	0,25	0,25	n.d.	1	≤0,03	2	≤0,03	0,125	>32	0,125	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabelle 14 (Fortsetzung) Auflistung der klinischen *S. aureus* Isolate aus dem Varia-Labor

Species	ID- Bezeichnung	Jahr	DK- Nr.	CIP [mg/L]	DAL [mg/L]	DAP [mg/L]	ERY [mg/L]	GAR [mg/L]	GEN [mg/L]	GTX [mg/L]	LZD [mg/L]	MXF [mg/L]	OXA [mg/L]	PEN [mg/L]	SPX [mg/L]	TEC [mg/L]	VAN [mg/L]	Resistenz-Determinante				
																		<i>mecA</i>	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	<i>msrA</i>
<i>S. aureus</i>	VA1234/06	2006	BJ0312	0,25	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,25	0,06	2	≤0,03	0,5	8	0,06	0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1295/06	2006	BJ0313	0,25	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,25	0,125	2	0,06	0,25	>32	0,06	0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1297/06	2006	BJ0314	0,25	n.d.	0,125	0,5	n.d.	0,25	0,06	4	0,06	≤0,06	>32	0,06	0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1328/06	2006	BJ0315	0,25	n.d.	0,25	0,5	n.d.	≤0,125	0,125	2	≤0,03	0,125	>32	0,06	0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1356/06	2006	BJ0316	0,25	n.d.	0,125	>64	n.d.	0,25	0,125	2	0,06	0,25	32	0,125	0,25	0,5	n.d.	-	-	+	-
<i>S. aureus</i>	VA1357/06	2006	BJ0317	0,25	n.d.	0,25	>64	n.d.	0,25	0,06	4	≤0,03	0,125	≤0,03	0,06	0,5	1	n.d.	-	-	+	-
<i>S. aureus</i>	VA1370/06	2006	BJ0318	0,25	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,25	0,06	2	≤0,03	0,25	≤0,03	0,06	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1446/06	2006	BJ0319	0,06	n.d.	1	64	n.d.	≤0,125	0,125	1	≤0,03	0,125	2	0,06	0,5	0,5	n.d.	-	-	-	+
<i>S. aureus</i>	VA14684/06	2006	BJ0391	0,125	n.d.	0,25	0,25	0,016	0,5	0,06	2	≤0,03	4	8	≤0,03	0,5	0,5	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA14850/06	2006	BJ0380	0,25	n.d.	0,25	0,5	0,016	0,25	0,06	2	≤0,03	0,25	>32	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA14909/06	2006	BJ0384	0,06	n.d.	0,25	0,25	0,008	0,25	≤0,03	2	≤0,03	0,25	32	0,06	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA14939/06	2006	BJ0387	0,5	n.d.	0,25	0,25	0,03	0,25	0,06	2	≤0,03	0,25	16	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA14948/06	2006	BJ0388	16	n.d.	0,25	0,5	0,008	0,25	≤0,03	2	≤0,03	0,125	>32	≤0,03	≤0,25	≤0,25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
<i>S. aureus</i>	VA14959/06	2006	BJ0390	0,5	n.d.	0,25	0,25	0,03	0,25	0,06	2	≤0,03	0,25	16	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA14964/06	2006	BJ0392	0,25	n.d.	0,5	0,5	0,03	0,25	0,06	2	0,06	0,25	16	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA14965/06	2006	BJ0393	32	n.d.	1	0,125	0,5	0,5	2	0,25	1	4	16	4	1	0,5	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA14969/05	2006	BJ0394	0,5	n.d.	0,25	0,25	0,03	0,25	0,125	2	0,06	0,125	16	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA14978/05	2006	BJ0395	0,25	n.d.	0,25	0,25	0,016	0,25	0,06	2	≤0,03	0,25	>32	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA14979/06	2006	BJ0396	0,125	n.d.	0,25	>64	0,016	0,25	0,06	2	≤0,03	0,125	8	0,06	1	0,5	n.d.	+	-	-	-
<i>S. aureus</i>	VA14980/06	2006	BJ0397	0,25	n.d.	0,25	0,25	0,016	0,25	0,06	2	≤0,03	0,125	>32	≤0,03	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA14981/06	2006	BJ0398	0,125	n.d.	0,5	>64	0,03	0,25	0,06	2	≤0,03	0,125	0,03	0,06	1	0,5	n.d.	+	-	-	-
<i>S. aureus</i>	VA14989/06	2006	BJ0399	0,25	n.d.	0,5	>64	0,016	0,25	0,06	2	≤0,03	0,25	4	0,06	1	0,5	n.d.	-	-	+	-
<i>S. aureus</i>	VA14997/06	2006	BJ0401	0,25	n.d.	0,5	0,5	0,016	0,5	0,06	2	≤0,03	0,25	32	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA15002/06	2006	BJ0403	0,25	n.d.	0,25	0,5	0,016	0,25	0,06	2	≤0,03	≤0,06	>32	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA15005/06	2006	BJ0404	0,25	n.d.	0,5	0,5	0,03	0,25	0,06	2	0,06	0,125	32	0,125	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA15012/06	2006	BJ0405	0,25	n.d.	0,5	0,5	0,03	≤0,125	0,06	2	0,06	0,25	4	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA15013/06	2006	BJ0406	0,5	n.d.	0,25	>64	0,016	0,5	0,06	2	≤0,03	≤0,06	4	0,06	0,5	0,5	n.d.	+	-	-	-
<i>S. aureus</i>	VA15023/06	2006	BJ0407	0,125	n.d.	0,25	0,5	0,016	0,5	≤0,03	2	≤0,03	≤0,06	32	≤0,03	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA15060/06	2006	BJ0409	0,125	n.d.	0,25	0,5	0,016	0,5	≤0,03	2	≤0,03	≤0,06	32	≤0,03	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA15092/06	2006	BJ0411	0,5	n.d.	0,25	0,5	0,03	0,5	0,125	2	≤0,03	0,5	32	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabelle 14 (Fortsetzung) Auflistung der klinischen *S. aureus* Isolate aus dem Varia-Labor

Species	ID-Bezeichnung	Jahr	DK-Nr.	CIP [mg/L]	DAL [mg/L]	DAP [mg/L]	ERY [mg/L]	GAR [mg/L]	GEN [mg/L]	GTX [mg/L]	LZD [mg/L]	MXF [mg/L]	OXA [mg/L]	PEN [mg/L]	SPX [mg/L]	TEC [mg/L]	VAN [mg/L]	Resistenz-Determinante				
																		<i>mecA</i>	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	<i>msrA</i>
<i>S. aureus</i>	VA15095/06	2006	BJ0412	0,25	n.d.	0,5	0,5	0,03	0,25	0,125	2	≤0,03	≤0,06	8	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA15097/06	2006	BJ0413	0,25	n.d.	0,25	0,5	0,03	0,25	0,06	2	≤0,03	0,25	32	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA15106/06	2006	BJ0414	>32	n.d.	0,5	0,5	2	0,25	4	2	2	16	32	8	1	0,5	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA15115/06	2006	BJ0415	32	n.d.	0,5	0,5	2	0,25	4	2	1	8	32	8	0,5	0,5	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA15121/06	2006	BJ0416	0,25	n.d.	0,25	0,5	0,016	0,25	0,06	2	≤0,03	≤0,06	4	≤0,03	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA15129/06	2006	BJ0417	32	n.d.	0,5	>64	2	0,25	4	2	2	≤0,06	>32	8	0,5	1	n.d.	+	-	-	-
<i>S. aureus</i>	VA15141/06	2006	BJ0419	8	n.d.	1	>64	1	0,5	2	2	1	>64	32	4	1	0,5	+	+	-	-	-
<i>S. aureus</i>	VA15156/06	2006	BJ0421	1	n.d.	0,25	0,5	0,03	0,5	0,125	2	0,06	0,125	>32	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA15191/06	2006	BJ0422	0,25	n.d.	0,5	0,25	0,016	1	0,06	2	≤0,03	0,125	1	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA15408/06	2006	BJ0423	>32	n.d.	0,25	>64	1	0,25	4	2	2	0,25	16	8	≤0,25	0,5	n.d.	-	-	+	-
<i>S. aureus</i>	VA15493/06	2006	BJ0425	0,5	n.d.	0,25	16	0,016	≤0,125	0,06	2	0,06	0,125	>32	0,125	1	0,5	n.d.	+	-	-	-
<i>S. aureus</i>	VA15510/06	2006	BJ0426	0,25	n.d.	0,5	0,5	0,03	0,5	0,125	2	0,06	0,25	≤0,03	0,125	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA15541/06	2006	BJ0427	0,125	n.d.	0,5	0,5	0,03	0,25	0,125	2	≤0,03	0,125	4	0,06	1	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA15562/06	2006	BJ0440	>32	n.d.	0,5	0,5	>2	0,25	4	2	4	0,25	16	16	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA15617/06	2006	BJ0441	0,25	n.d.	0,5	0,5	0,016	0,5	0,06	2	≤0,03	0,25	8	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA15620/06	2006	BJ0428	0,5	n.d.	0,5	0,5	0,03	0,25	0,06	2	0,06	0,25	32	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA15630/06	2006	BJ0429	0,25	n.d.	0,5	0,5	0,016	0,25	0,06	2	≤0,03	0,25	4	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA15642/06	2006	BJ0430	>32	n.d.	0,25	>64	2	≤0,125	4	1	1	16	32	8	0,25	0,5	+	-	-	+	-
<i>S. aureus</i>	VA15702/06	2006	BJ0431	0,25	n.d.	0,5	0,25	0,016	0,25	0,125	2	≤0,03	0,25	32	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA15730/06	2006	BJ0442	0,5	n.d.	0,25	16	0,125	0,25	0,125	2	0,06	0,25	16	0,06	0,5	0,5	n.d.	-	-	-	+
<i>S. aureus</i>	VA15738/06	2006	BJ0432	0,06	n.d.	0,25	0,5	0,008	0,25	≤0,03	2	≤0,03	0,25	16	≤0,03	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA15773/06	2006	BJ0433	1	n.d.	0,25	0,25	0,03	0,5	0,125	2	0,06	0,125	>32	0,25	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA15791/06	2006	BJ0434	0,5	n.d.	0,5	0,25	0,03	0,25	0,125	2	0,06	0,125	32	0,125	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA15792/06	2006	BJ0435	0,5	n.d.	0,25	0,25	0,06	0,5	0,125	2	0,06	0,25	32	0,125	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA15793/06	2006	BJ0436	0,25	n.d.	0,5	0,5	0,016	≤0,125	≤0,03	2	≤0,03	0,125	2	≤0,03	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA15852/06	2006	BJ0443	0,25	n.d.	0,25	>64	0,03	≤0,125	0,125	2	≤0,03	0,125	≤0,03	0,06	0,5	0,5	n.d.	+	-	-	-
<i>S. aureus</i>	VA15867/06	2006	BJ0444	0,125	n.d.	0,25	0,5	0,016	0,25	0,06	2	≤0,03	0,25	16	≤0,03	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA16156/06	2006	BJ0445	0,25	n.d.	0,25	0,5	0,016	0,25	0,06	2	≤0,03	≤0,06	>32	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1616406	2006	BJ0446	0,25	n.d.	0,25	>64	0,03	0,125	0,06	2	≤0,03	0,25	4	0,06	0,5	0,5	n.d.	+	-	-	-
<i>S. aureus</i>	VA16167/06	2006	BJ0447	0,25	n.d.	0,25	0,25	0,03	≤0,125	0,06	2	≤0,03	0,125	≤0,03	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

**Tabelle 14 (Fortsetzung)** Auflistung der klinischen *S. aureus* Isolate aus dem Varia-Labor

Species	ID- Bezeichnung	Jahr	DK- Nr.	CIP [mg/L]	DAL [mg/L]	DAP [mg/L]	ERY [mg/L]	GAR [mg/L]	GEN [mg/L]	GTX [mg/L]	LZD [mg/L]	MXF [mg/L]	OXA [mg/L]	PEN [mg/L]	SPX [mg/L]	TEC [mg/L]	VAN [mg/L]	Resistenz-Determinante				
																		<i>mecA</i>	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	<i>msrA</i>
<i>S. aureus</i>	VA16178/06	2006	BJ0448	0,25	n.d.	0,25	0,5	0,016	≤0,125	0,06	2	≤0,03	≤0,06	>32	≤0,03	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA16188/06	2006	BJ0451	0,25	n.d.	0,25	0,5	0,016	≤0,125	0,06	2	≤0,03	0,25	32	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA16211/06	2006	BJ0452	0,25	n.d.	0,25	0,5	0,016	0,5	0,06	2	0,03	0,125	0,25	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA16224/06	2006	BJ0453	>32	n.d.	0,25	>64	>2	0,25	8	2	8	32	32	16	0,5	0,5	+	-	-	+	-
<i>S. aureus</i>	VA16267/06	2006	BJ0458	0,125	n.d.	0,25	0,25	0,016	0,25	0,06	2	0,06	0,25	16	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA16271/06	2006	BJ0459	>32	n.d.	0,5	0,5	2	128	4	2	4	0,25	8	8	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA16279/06	2006	BJ0460	>32	n.d.	0,5	>64	2	0,25	4	2	2	0,125	32	8	0,5	1	n.d.	+	-	-	-
<i>S. aureus</i>	VA1628/06	2006	BJ0320	0,25	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,25	0,06	2	≤0,03	1	>32	0,06	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA16285/06	2006	BJ0461	0,25	n.d.	0,5	0,5	0,03	0,25	0,125	2	0,06	≤0,06	2	0,125	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA16312/06	2006	BJ0462	0,125	n.d.	0,25	0,25	0,016	0,5	≤0,03	2	0,06	≤0,06	≤0,03	≤0,03	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA16317/06	2006	BJ0464	0,125	n.d.	0,5	>64	0,016	0,5	0,06	2	≤0,03	0,125	4	0,06	0,5	0,5	n.d.	+	-	-	-
<i>S. aureus</i>	VA16325/06	2006	BJ0465	32	n.d.	0,5	>64	2	≤0,125	4	1	2	64	32	8	0,5	0,5	+	-	-	+	-
<i>S. aureus</i>	VA16327/06	2006	BJ0466	>32	n.d.	0,25	>64	1	0,5	4	1	1	16	32	8	0,5	0,5	+	-	-	+	-
<i>S. aureus</i>	VA1633/06	2006	BJ0321	0,25	n.d.	0,125	0,25	n.d.	0,25	0,06	2	≤0,03	0,125	≤0,03	0,06	≤0,25	≤0,25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA16344/06	2006	BJ0467	>32	n.d.	0,25	0,25	2	0,5	4	2	2	32	32	8	0,5	0,5	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA16347/06	2006	BJ0468	0,5	n.d.	0,25	0,5	0,016	0,5	0,06	2	≤0,03	0,125	>32	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA16370/06	2006	BJ0470	0,5	n.d.	0,5	0,5	0,03	0,5	0,06	2	0,06	0,5	32	0,125	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA16371/06	2006	BJ0471	0,5	n.d.	0,5	0,5	0,03	0,25	0,06	2	≤0,03	≤0,06	2	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA16378/06	2006	BJ0472	>32	n.d.	0,5	0,5	1	0,25	4	2	2	4	16	8	0,5	1	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA16382/06	2006	BJ0473	>32	n.d.	0,25	>64	2	0,5	4	2	2	≤0,06	>32	8	1	1	n.d.	+	-	-	-
<i>S. aureus</i>	VA16391/06	2006	BJ0474	>32	n.d.	0,5	>64	2	0,25	4	2	2	0,25	>32	8	0,5	0,5	n.d.	+	-	-	-
<i>S. aureus</i>	VA1707/06	2006	BJ0322	0,125	n.d.	0,125	>64	n.d.	0,5	0,06	2	≤0,03	0,125	≤0,03	≤0,03	≤0,25	0,25	n.d.	-	-	+	-
<i>S. aureus</i>	VA1710/06	2006	BJ0323	0,25	n.d.	0,125	0,5	n.d.	0,25	0,125	2	0,06	0,125	8	0,06	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1725/06	2006	BJ0324	8	n.d.	0,25	64	n.d.	0,25	2	1	1	8	>32	4	≤0,25	0,5	+	-	-	-	+
<i>S. aureus</i>	VA1752/06	2006	BJ0325	0,25	n.d.	0,5	0,5	n.d.	0,25	0,125	2	0,06	0,25	>32	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1755/06	2006	BJ0326	0,125	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,25	0,06	2	≤0,03	0,25	>32	0,06	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1767/06	2006	BJ0327	0,06	n.d.	0,125	0,5	n.d.	0,25	≤0,03	1	≤0,03	≤0,06	2	≤0,03	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1769/06	2006	BJ0328	16	n.d.	0,125	0,5	n.d.	0,25	2	2	1	0,125	0,5	8	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1771/06	2006	BJ0329	0,125	n.d.	0,25	0,25	n.d.	≤0,125	0,125	2	0,06	0,06	2	0,06	1	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1782/06	2006	BJ0330	>32	n.d.	0,25	>64	n.d.	0,5	4	2	2	8	32	4	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabelle 14 (Fortsetzung) Auflistung der klinischen *S. aureus* Isolate aus dem Varia-Labor

Species	ID- Bezeichnung	Jahr	DK- Nr.	CIP [mg/L]	DAL [mg/L]	DAP [mg/L]	ERY [mg/L]	GAR [mg/L]	GEN [mg/L]	GTX [mg/L]	LZD [mg/L]	MXF [mg/L]	OXA [mg/L]	PEN [mg/L]	SPX [mg/L]	TEC [mg/L]	VAN [mg/L]	Resistenz-Determinante				
																		<i>mecA</i>	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	<i>msrA</i>
<i>S. aureus</i>	VA1784/06	2006	BJ0331	>32	n.d.	0,125	>64	n.d.	0,25	4	2	1	16	32	8	≤0,25	0,5	+	-	-	+	-
<i>S. aureus</i>	VA1870/06	2006	BJ0332	32	n.d.	0,125	0,5	n.d.	0,5	4	2	2	0,25	32	4	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1891/06	2006	BJ0333	0,125	n.d.	0,03	0,25	n.d.	0,5	≤0,03	1	≤0,03	≤0,06	2	0,125	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1901/06	2006	BJ0334	0,125	n.d.	0,03	0,5	n.d.	0,25	0,125	4	≤0,03	≤0,06	8	0,06	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1903/06	2006	BJ0335	0,125	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,5	0,06	2	≤0,03	0,125	≤0,03	0,06	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1904/06	2006	BJ0336	0,25	n.d.	0,25	0,5	n.d.	1	0,125	2	0,06	0,25	0,125	0,06	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1911/06	2006	BJ0337	0,25	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,5	0,06	2	≤0,03	0,125	≤0,03	0,06	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1913/06	2006	BJ0338	0,06	n.d.	0,125	0,5	n.d.	0,5	≤0,03	2	≤0,03	0,125	0,125	≤0,03	≤0,25	0,25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1914/06	2006	BJ0339	0,25	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,5	0,06	2	≤0,03	0,25	32	≤0,03	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1915/06	2006	BJ0340	0,25	n.d.	0,125	0,5	n.d.	1	0,125	1	0,06	0,25	>32	0,06	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1916/06	2006	BJ0341	32	n.d.	0,125	0,5	n.d.	0,25	0,06	2	≤0,03	0,25	>32	0,06	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1919/06	2006	BJ0342	0,25	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,5	0,125	2	≤0,03	0,25	>32	0,06	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1922/06	2006	BJ0343	0,25	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,125	0,125	2	0,06	0,25	1	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1926/06	2006	BJ0344	0,25	n.d.	0,125	0,5	n.d.	0,25	0,06	2	≤0,03	0,125	≤0,03	0,06	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1942/06	2006	BJ0345	0,25	n.d.	0,125	0,25	n.d.	≤0,125	0,06	2	≤0,03	0,125	≤0,03	≤0,03	1	≤0,25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1974/06	2006	BJ0346	0,25	n.d.	0,25	>64	n.d.	0,25	0,06	2	≤0,03	0,125	≤0,03	0,06	≤0,25	0,5	n.d.	-	-	+	-
<i>S. aureus</i>	VA1989/06	2006	BJ0347	0,25	n.d.	0,125	0,5	n.d.	0,25	0,06	2	0,06	0,125	4	0,06	≤0,25	0,25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA19949/06	2006	BJ0389	0,125	n.d.	0,25	2	0,016	≤0,125	≤0,03	2	≤0,03	0,125	32	≤0,03	0,5	0,5	n.d.	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	VA1997/06	2006	BJ0348	0,25	n.d.	0,125	>64	n.d.	≤0,125	0,125	2	0,06	0,125	>32	0,06	≤0,25	0,5	n.d.	+	-	-	-
<i>S. aureus</i>	VA2002/06	2006	BJ0349	8	n.d.	0,25	>64	n.d.	>128	4	1	1	>64	>32	8	0,5	0,5	+	+	-	-	-
<i>S. aureus</i>	VA2024/06	2006	BJ0350	0,25	n.d.	0,5	0,5	n.d.	1	0,125	2	≤0,03	≤0,06	0,5	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2034/06	2006	BJ0351	>32	n.d.	0,25	>64	n.d.	≤0,125	8	2	8	32	32	16	≤0,25	0,5	+	-	-	+	-
<i>S. aureus</i>	VA2062/06	2006	BJ0352	8	n.d.	0,125	64	n.d.	0,25	2	2	2	8	>32	8	≤0,25	≤0,25	+	-	-	-	+
<i>S. aureus</i>	VA2079/06	2006	BJ0353	0,125	n.d.	0,125	0,25	n.d.	0,25	0,06	2	≤0,03	0,25	32	≤0,03	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2101/06	2006	BJ0311	0,25	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,5	0,06	2	≤0,03	0,5	8	0,06	0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2211/06	2006	BJ0355	>32	n.d.	0,125	>64	n.d.	0,25	8	2	4	32	32	16	≤0,25	≤0,25	+	-	-	+	-
<i>S. aureus</i>	VA2220/06	2006	BJ0356	0,25	n.d.	0,125	0,25	n.d.	0,5	0,06	2	≤0,03	0,125	≤0,03	0,06	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2232/06	2006	BJ0357	0,25	n.d.	0,25	0,5	n.d.	≤0,125	0,125	2	0,06	0,5	32	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2240/06	2006	BJ0358	0,5	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,25	0,06	2	≤0,03	0,25	4	0,06	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2241/06	2006	BJ0359	0,25	n.d.	0,25	0,5	n.d.	≤0,125	0,06	2	≤0,03	0,25	16	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

# Material

**Tabelle 14 (Fortsetzung)** Auflistung der klinischen *S. aureus* Isolate aus dem Varia-Labor

Species	ID-Bezeichnung	Jahr	DK-Nr.	CIP [mg/L]	DAL [mg/L]	DAP [mg/L]	ERY [mg/L]	GAR [mg/L]	GEN [mg/L]	GTX [mg/L]	LZD [mg/L]	MXF [mg/L]	OXA [mg/L]	PEN [mg/L]	SPX [mg/L]	TEC [mg/L]	VAN [mg/L]	Resistenz-Determinante				
																		<i>mecA</i>	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	<i>msrA</i>
<i>S. aureus</i>	VA2254/06	2006	BJ0360	0,5	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,25	0,06	2	≤0,03	0,125	0,125	≤0,03	1	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2257/06	2006	BJ0361	0,25	n.d.	0,125	0,5	n.d.	≤0,125	0,06	2	≤0,03	≤0,06	>32	≤0,03	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2274/06	2006	BJ0362	0,25	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,25	0,125	2	0,06	0,5	>32	0,06	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2296/06	2006	BJ0363	0,25	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,25	0,125	2	0,06	0,125	8	0,06	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2306/06	2006	BJ0364	0,125	n.d.	0,25	>64	n.d.	0,25	0,06	2	≤0,03	≤0,06	0,06	≤0,03	≤0,25	0,25	n.d.	-	-	+	-
<i>S. aureus</i>	VA2312/06	2006	BJ0365	0,5	n.d.	0,125	0,5	n.d.	0,125	0,125	2	0,06	0,125	0,06	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2313/06	2006	BJ0366	8	n.d.	0,125	>64	n.d.	0,25	4	1	2	0,125	4	8	≤0,25	0,5	n.d.	-	-	+	-
<i>S. aureus</i>	VA2329/06	2006	BJ0367	0,5	n.d.	0,125	0,5	n.d.	0,25	0,06	2	≤0,03	0,125	>32	≤0,03	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2334/06	2006	BJ0368	0,25	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,5	0,125	2	0,06	0,25	>32	0,06	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2351/06	2006	BJ0369	0,25	n.d.	0,25	0,25	n.d.	0,25	0,06	2	≤0,03	0,25	>32	0,06	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2399/06	2006	BJ0370	8	n.d.	0,25	>64	n.d.	32	2	2	1	>64	32	4	0,5	0,5	+	+	-	-	-
<i>S. aureus</i>	VA2404/06	2006	BJ0371	0,5	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,5	0,125	2	0,06	0,25	8	0,125	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2475/06	2006	BJ0372	0,25	n.d.	0,25	0,5	n.d.	0,5	0,06	2	≤0,03	0,125	≤0,03	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2514/06	2006	BJ0374	0,125	n.d.	0,125	0,5	n.d.	0,5	0,06	2	≤0,03	0,25	0,25	0,06	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2520/06	2006	BJ0375	0,06	n.d.	0,06	0,5	n.d.	≤0,125	0,06	2	≤0,03	0,125	≤0,03	0,06	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2555/06	2006	BJ0376	0,125	n.d.	0,125	0,5	n.d.	≤0,125	0,06	2	≤0,03	0,25	0,25	0,06	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2558/06	2006	BJ0377	0,125	n.d.	0,25	0,5	n.d.	≤0,125	0,06	2	≤0,03	0,25	0,25	0,06	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2592/06	2006	BJ0378	0,125	n.d.	0,125	0,5	n.d.	≤0,125	0,06	2	≤0,03	0,125	0,5	≤0,03	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2645/06	2006	BJ0379	0,25	n.d.	0,125	0,5	n.d.	0,25	0,06	2	≤0,03	0,125	≤0,03	0,06	≤0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1453/07	2007	BJ0491	0,06	0,25	1	>64	0,03	0,25	0,06	2	≤0,03	0,25	4	0,06	1	0,5	n.d.	+	-	-	-
<i>S. aureus</i>	VA1475/07	2007	BJ0492	0,125	0,25	0,5	0,25	0,03	0,5	0,06	2	0,06	≤0,06	4	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1523/07	2007	BJ0493	0,125	0,5	0,5	0,5	0,03	0,5	0,06	2	≤0,03	0,25	32	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1524/07	2007	BJ0494	0,25	0,5	0,5	0,5	0,03	≤0,125	0,06	2	≤0,03	0,25	0,25	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1531/07	2007	BJ0495	0,125	0,5	0,5	0,5	0,004	0,25	≤0,03	2	≤0,03	0,125	2	≤0,03	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1546/07	2007	BJ0496	4	0,25	1	>64	1	0,25	2	1	1	0,25	2	8	0,5	0,5	n.d.	-	-	+	-
<i>S. aureus</i>	VA1549/07	2007	BJ0497	4	0,25	0,5	>64	1	0,125	2	1	1	0,125	2	4	1	0,5	n.d.	-	-	+	-
<i>S. aureus</i>	VA1551/07	2007	BJ0498	0,25	0,5	0,5	0,5	0,03	0,125	0,06	2	≤0,03	≤0,06	>32	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1591/07	2007	BJ0499	0,25	0,25	0,5	0,25	0,03	0,5	0,06	2	≤0,03	≤0,06	0,25	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1655/07	2007	BJ0501	0,125	0,5	0,5	0,5	0,016	0,25	0,06	2	≤0,03	≤0,06	8	≤0,03	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1670/07	2007	BJ0502	0,25	0,5	1	>64	0,03	0,25	0,06	2	≤0,03	0,25	4	0,06	1	0,5	n.d.	+	-	-	-

## Material

**Tabelle 14 (Fortsetzung)** Auflistung der klinischen *S. aureus* Isolate aus dem Varia-Labor

Species	ID- Bezeichnung	Jahr	DK- Nr.	CIP [mg/L]	DAL [mg/L]	DAP [mg/L]	ERY [mg/L]	GAR [mg/L]	GEN [mg/L]	GTX [mg/L]	LZD [mg/L]	MXF [mg/L]	OXA [mg/L]	PEN [mg/L]	SPX [mg/L]	TEC [mg/L]	VAN [mg/L]	Resistenz-Determinante				
																		<i>mecA</i>	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	<i>msrA</i>
<i>S. aureus</i>	VA1682/07	2007	BJ0503	0,06	0,25	0,5	0,5	0,016	0,25	≤0,03	2	≤0,03	0,25	32	≤0,03	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1709/07	2007	BJ0504	0,25	0,5	0,5	2	0,03	0,25	0,06	2	≤0,03	0,125	4	0,06	1	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1712/07	2007	BJ0505	0,5	0,5	0,5	0,5	0,016	0,25	0,125	2	0,06	≤0,06	≤0,03	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1736/07	2007	BJ0506	0,25	0,5	0,5	0,5	0,03	0,25	0,06	1	0,125	0,125	≤0,03	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1793/07	2007	BJ0507	0,25	0,25	0,5	0,5	0,03	0,25	0,06	2	0,06	≤0,06	32	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1800/07	2007	BJ0508	0,125	0,5	0,5	0,5	0,03	0,25	0,06	2	0,06	0,125	2	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1809/07	2007	BJ0509	0,25	0,5	0,5	0,5	0,03	≤0,125	0,06	2	≤0,03	0,25	≤0,03	0,06	0,5	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1881/07	2007	BJ0510	0,125	0,5	1	0,25	0,03	0,25	0,06	2	≤0,03	0,5	>32	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1895/07	2007	BJ0511	0,5	0,5	0,5	0,5	0,016	0,25	0,06	2	≤0,03	0,25	4	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1921/07	2007	BJ0513	0,25	0,5	0,5	0,5	0,03	0,125	0,06	2	≤0,03	0,5	2	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1928/07	2007	BJ0514	0,125	0,5	0,5	0,5	0,03	1	0,06	2	≤0,03	0,25	32	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1929/07	2007	BJ0515	0,125	0,5	0,5	0,5	0,03	0,25	0,06	2	0,06	0,25	2	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1931/07	2007	BJ0516	0,125	0,5	0,5	0,5	0,03	0,5	0,06	2	≤0,03	≤0,06	32	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1936/07	2007	BJ0517	0,25	0,5	0,5	0,5	0,03	0,25	0,125	2	0,06	≤0,06	≤0,03	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1966/07	2007	BJ0518	0,06	0,5	1	0,5	0,008	0,25	≤0,03	2	≤0,03	≤0,06	≤0,03	≤0,03	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1977/07	2007	BJ0519	0,125	0,5	0,5	0,5	0,03	≤0,125	0,06	2	0,06	≤0,06	0,125	0,06	1	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA1978/07	2007	BJ0520	0,125	0,5	0,5	0,5	0,03	0,25	0,06	2	≤0,03	≤0,06	0,125	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2011/07	2007	BJ0522	0,25	0,25	0,5	0,5	0,03	0,5	0,06	2	≤0,03	0,25	16	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2047/07	2007	BJ0523	0,125	0,25	0,5	0,5	0,03	0,25	0,06	2	≤0,03	0,5	2	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2065/07	2007	BJ0525	0,125	0,25	1	0,25	0,06	0,25	0,06	2	≤0,03	0,125	32	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2072/07	2007	BJ0526	0,25	0,25	0,5	0,25	0,016	0,25	0,06	2	≤0,03	0,125	4	≤0,03	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2081/07	2007	BJ0527	0,125	0,25	0,5	32	0,016	0,25	≤0,03	2	≤0,03	0,125	32	≤0,03	1	0,5	n.d.	-	-	-	+
<i>S. aureus</i>	VA2083/07	2007	BJ0528	0,25	0,5	0,5	0,5	0,03	0,25	0,06	2	0,06	0,5	32	0,06	1	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2091/07	2007	BJ0529	0,25	0,5	1	0,5	0,016	1	0,125	2	≤0,03	0,125	8	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2098/07	2007	BJ0530	0,25	0,5	0,5	0,5	0,016	0,25	0,125	2	≤0,03	0,25	8	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2104/07	2007	BJ0531	0,25	0,25	0,5	0,25	0,016	≤0,125	0,06	2	≤0,03	≤0,06	8	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2106/07	2007	BJ0532	0,5	0,25	0,5	>64	0,03	0,25	0,125	2	0,06	0,25	>32	0,06	0,5	0,5	n.d.	+	-	-	-
<i>S. aureus</i>	VA2111/07	2007	BJ0533	0,5	0,5	0,25	0,25	0,016	≤0,125	0,06	2	≤0,03	≤0,06	8	≤0,03	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2112/07	2007	BJ0534	0,125	0,5	0,5	0,5	0,03	≤0,125	0,06	2	≤0,03	0,125	0,5	0,06	1	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2143/07	2007	BJ0536	0,5	0,5	0,5	0,5	0,03	0,5	0,06	2	≤0,03	0,125	8	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

## Material

**Tabelle 14 (Fortsetzung)** Auflistung der klinischen *S. aureus* Isolate aus dem Varia-Labor

Species	ID-Bezeichnung	Jahr	DK-Nr.	CIP [mg/L]	DAL [mg/L]	DAP [mg/L]	ERY [mg/L]	GAR [mg/L]	GEN [mg/L]	GTX [mg/L]	LZD [mg/L]	MXF [mg/L]	OXA [mg/L]	PEN [mg/L]	SPX [mg/L]	TEC [mg/L]	VAN [mg/L]	Resistenz-Determinante				
																		<i>mecA</i>	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	<i>msrA</i>
<i>S. aureus</i>	VA2162/07	2007	BJ0537	0,25	0,5	1	0,5	0,03	0,25	0,06	2	≤0,03	0,25	1	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2172/07	2007	BJ0538	0,125	0,5	0,5	0,5	0,03	0,25	0,06	2	≤0,03	0,5	32	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2313/07	2007	BJ0561	0,125	0,5	0,5	0,5	0,016	0,25	0,06	2	≤0,03	≤0,06	≤0,03	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2325/07	2007	BJ0562	0,06	0,25	0,25	0,25	0,03	≤0,125	0,06	2	≤0,03	≤0,06	0,5	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2333/07	2007	BJ0563	0,5	0,5	0,5	0,5	0,016	0,25	≤0,03	2	≤0,03	0,125	>32	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2361/07	2007	BJ0566	0,06	0,25	0,5	>64	0,03	≤0,125	0,06	1	≤0,03	≤0,06	16	0,06	2	0,5	n.d.	+	-	-	-
<i>S. aureus</i>	VA2362/07	2007	BJ0567	0,25	0,25	0,5	0,5	0,06	≤0,125	0,06	2	≤0,03	0,25	≤0,03	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2393/07	2007	BJ0568	0,125	0,25	0,5	0,25	0,06	0,5	≤0,03	1	≤0,03	0,25	16	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2395/07	2007	BJ0569	0,125	0,25	0,5	0,5	0,016	0,25	0,06	2	≤0,03	0,125	0,06	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2396/07	2007	BJ0570	0,25	0,5	0,5	0,5	0,03	≤0,125	0,125	2	0,06	≤0,06	1	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2402/07	2007	BJ0571	0,125	0,5	0,5	0,5	0,03	0,25	0,06	2	0,06	0,25	32	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2403/07	2007	BJ0572	0,125	0,25	0,5	0,5	0,03	0,25	0,06	2	0,06	0,25	4	0,06	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2404/07	2007	BJ0572	0,125	0,25	0,5	0,5	0,016	0,25	0,06	2	≤0,03	0,25	>32	≤0,03	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2413/07	2007	BJ0574	0,25	0,5	0,5	>64	0,03	0,5	0,06	2	≤0,03	≤0,06	≤0,03	0,06	1	0,5	n.d.	-	-	+	-
<i>S. aureus</i>	VA2425/07	2007	BJ0575	0,25	0,5	0,5	0,5	0,016	0,25	≤0,03	2	≤0,03	0,25	>32	≤0,03	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2449/07	2007	BJ0576	0,125	0,5	0,5	0,25	0,016	0,5	0,06	2	≤0,03	0,125	16	≤0,03	1	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2459/07	2007	BJ0577	0,25	0,5	0,5	0,25	0,016	≤0,125	0,06	2	≤0,03	≤0,06	32	≤0,03	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2465/07	2007	BJ0578	0,25	0,5	0,5	0,5	0,016	0,25	0,06	2	≤0,03	≤0,06	≤0,03	≤0,03	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2483/07	2007	BJ0579	0,25	0,5	0,5	0,5	0,03	0,5	0,06	2	0,06	0,125	≤0,03	0,06	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2485/07	2007	BJ0580	0,125	0,5	0,5	0,5	0,016	≤0,125	0,06	2	≤0,03	0,125	16	≤0,03	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2564/07	2007	BJ0581	≤0,03	0,25	1	0,5	0,016	0,25	≤0,03	2	≤0,03	≤0,06	32	≤0,03	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2567/07	2007	BJ0582	0,125	0,5	0,5	0,5	0,016	≤0,125	0,06	2	≤0,03	≤0,06	4	≤0,03	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2568/07	2007	BJ0583	0,125	1	0,5	0,25	0,008	0,25	≤0,03	2	≤0,03	0,125	32	≤0,03	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2786/07	2007	BJ0585	0,125	0,25	0,5	0,5	0,016	0,25	≤0,03	2	≤0,03	0,125	32	≤0,03	1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	VA2799/07	2007	BJ0587	0,25	0,25	1	>64	0,008	0,5	≤0,03	2	≤0,03	0,125	4	≤0,03	0,5	0,5	n.d.	+	-	-	-

CIP = Ciprofloxacin, DAL = Dalbavancin, ERY = Erythromycin, GAR = Garenoxacin, GEN = Gentamicin, GTX = Gatifloxacin, LZD = Linezolid, MXF = Moxifloxacin, OXA = Oxacillin, PEN = Penicillin  
 SPX = Sparfloxacin, TEC = Teicoplanin, VAN = Vancomycin

n.d. = nicht durchgeführt; + = positiver Nachweis der Resistenz-Determinante; - = negativer Nachweis der Resistenz-Determinante

## Material

**Tabelle 15** Auflistung der klinischen *Enterococcus* spp. Isolate aus dem Varia-Labor

Species	ID-Bezeichnung	Jahr	DK-Nr.	AMP [mg/L]	DAP [mg/L]	GEN [mg/L]	LZD [mg/L]	TEC [mg/L]	VAN [mg/L]	Resistenz-Determinante		
										<i>aac(6')-aph(2'')</i>	<i>van</i>	<i>G2576T</i>
<i>E. faecalis</i>	UR7939/04	2004	BJ0075	4	2	>500	2	0,5	1	+	-	-
<i>E. faecium</i>	UR7940/04	2004	BJ0076	>64	4	>500	2	0,25	0,5	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	UR7941/04	2004	BJ0077	1	2	>500	2	0,5	1	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	UR7951/04	2004	BJ0045	4	2	500	2	0,25	1	-	-	-
<i>E. faecium</i>	UR7953/04	2004	BJ0079	>64	4	500	2	0,5	0,5	+	-	-
<i>E. faecium</i>	UR7980/04	2004	BJ0080	4	0,5	500	2	0,5	0,5	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA 25451/04	2004	BJ0066	0,125	2	500	2	0,25	1	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA 25508/04	2004	BJ0067	0,5	4	500	2	0,25	2	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA 25602/04	2004	BJ0068	0,5	2	500	2	0,5	1	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA 25604/04	2004	BJ0069	0,5	0,5	>500	2	0,25	2	-	-	-
<i>E. faecium</i>	VA25324/04	2004	BJ0065	32	4	500	4	0,5	0,5	-	-	-
<i>E. faecium</i>	VA26058/04	2004	BJ0071	>64	4	>500	2	0,5	0,5	+	-	-
<i>E. faecium</i>	VA26067/04	2004	BJ0072	>64	4	>500	4	0,5	0,5	+	-	-
<i>E. faecium</i>	VA26102/04	2004	BJ0074	>64	4	>500	2	0,5	1	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA 21669/05	2005	BJ0273	0,125	1	>500	2	≤0,25	1	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA 21870/05	2005	BJ0278	1	2	>500	2	≤0,25	0,5	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA 3643/05	2005	BJ0191	0,25	1	>500	2	0,5	0,5	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA 3688/05	2005	BJ0195	0,125	0,5	>500	2	0,5	0,25	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA 3742/05	2005	BJ0194	0,5	1	500	2	1	0,5	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA 3744/05	2005	BJ0193	0,5	1	>500	2	0,5	0,5	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA 3761/05	2005	BJ0190	64	2	500	2	1	0,5	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA 3872/05	2005	BJ0188	0,5	1	500	4	1	0,5	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA 3883/05	2005	BJ0189	2	0,25	>500	2	1	0,5	+	-	-
<i>E. faecium</i>	VA20539/05	2005	BJ0255	16	1	>500	2	≤0,25	0,5	+	-	-
<i>E. faecium</i>	VA20974/05	2005	BJ0261	16	4	>500	1	0,5	0,5	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA21235/05	2005	BJ0263	0,125	0,5	>500	1	≤0,25	0,5	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA21257/05	2005	BJ0266	0,125	0,5	>500	1	≤0,25	1	+	-	-
<i>E. faecium</i>	VA21260/05	2005	BJ0267	>64	4	>500	1	0,5	0,5	+	-	-
<i>E. faecium</i>	VA3741/05	2005	BJ0192	>64	4	500	4	1	0,5	-	-	-
<i>E. faecium</i>	VA4327/05	2005	BJ0127	64	4	>500	4	1	0,5	+	-	-

## Material

**Tabelle 15 (Fortsetzung)** Auflistung der klinischen *Enterococcus* spp. Isolate aus dem Varia-Labor

Species	ID-Bezeichnung	Jahr	DK-Nr.	AMP [mg/L]	DAP [mg/L]	GEN [mg/L]	LZD [mg/L]	TEC [mg/L]	VAN [mg/L]	Resistenz-Determinante		
										<i>aac(6')-aph(2'')</i>	<i>van</i>	<i>G2576T</i>
<i>E. faecium</i>	TY3140/06	2006	BJ0482	>64	2	500	2	0,5	32	-	<i>vanB</i>	-
<i>E. faecium</i>	UR1371/06	2006	BJ0299	>64	2	>500	2	≤0,25	≤0,25	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	UR1416/06	2006	BJ0300	0,5	1	500	2	≤0,25	≤0,25	-	-	-
<i>E. faecium</i>	UR1630/06	2006	BJ0302	>64	2	500	2	≤0,25	≤0,25	-	-	-
<i>E. faecium</i>	UR2234/06	2006	BJ0297	>64	4	>500	4	0,25	0,5	+	-	+
<i>E. faecium</i>	VA 14908/06	2006	BJ0418	>64	2	500	2	0,5	0,5	-	-	-
<i>E. faecium</i>	VA 14996/06	2006	BJ0400	>64	4	>500	2	1	0,5	+	-	-
<i>E. faecium</i>	VA 15001/06	2006	BJ0402	>64	4	>500	2	0,5	0,5	+	-	-
<i>E. faecium</i>	VA 15150/06	2006	BJ0420	>64	1	>500	2	0,5	0,5	+	-	-
<i>E. faecium</i>	VA 16186/06	2006	BJ0449	64	2	500	2	0,5	0,5	-	-	-
<i>E. faecium</i>	VA 16248/06	2006	BJ0455	>64	4	>500	2	0,5	1	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA 1764/06	2006	BJ0303	0,25	0,5	500	1	≤0,25	≤0,25	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA 1943/06	2006	BJ0304	1	1	500	2	≤0,25	1	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA 2009/06	2006	BJ0306	2	0,5	>500	2	0,25	1	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA 2026/06	2006	BJ0307	0,5	1	500	2	0,25	1	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA 2085/06	2006	BJ0354	1	0,5	500	1	≤0,25	0,5	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA 2175/06	2006	BJ0274	0,5	1	500	2	0,25	1	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA 2194/06	2006	BJ0309	1	0,5	500	2	0,25	0,5	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA 2238/06	2006	BJ0310	1	1	500	2	0,25	0,5	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA 2506/06	2006	BJ0373	1	4	500	2	≤0,25	0,5	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA1418/06	2006	BJ0301	2	0,5	>500	2	≤0,25	0,5	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA14681/06	2006	BJ0381	16	0,5	500	2	2	2	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA14910/06	2006	BJ0385	1	1	500	2	≤0,25	2	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA15040/06	2006	BJ0408	0,5	1	500	2	0,5	1	-	-	-
<i>E. faecium</i>	VA15086/06	2006	BJ0410	>64	4	500	4	64	256	-	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecalis</i>	VA15490/06	2006	BJ0424	0,5	1	500	1	≤0,25	1	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA16187/06	2006	BJ0450	2	2	500	2	≤0,25	2	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA16257/06	2006	BJ0456	2	0,5	>500	1	0,5	0,5	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA16259/06	2006	BJ0457	1	2	>500	1	0,5	0,5	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA16820/06	2006	BJ0477	1	0,5	500	2	≤0,25	0,5	-	-	-

## Material

**Tabelle 15 (Fortsetzung)** Auflistung der klinischen *Enterococcus* spp. Isolate aus dem Varia-Labor

Species	ID-Bezeichnung	Jahr	DK-Nr.	AMP [mg/L]	DAP [mg/L]	GEN [mg/L]	LZD [mg/L]	TEC [mg/L]	VAN [mg/L]	Resistenz-Determinante		
										<i>aac(6')-aph(2'')</i>	<i>van</i>	<i>G2576T</i>
<i>E. faecalis</i>	VA16823/06	2006	BJ0478	1	1	500	2	≤0,25	0,5	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA16897/06	2006	BJ0463	1	1	500	2	≤0,25	2	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA16900/06	2006	BJ0479	0,5	1	>500	1	≤0,25	1	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA16905/06	2006	BJ0480	0,125	0,5	500	2	1	≤0,25	-	-	-
<i>E. faecium</i>	BK0228/07	2007	BJ0131	>64	4	500	16	256	256	-	<i>vanA</i>	+
<i>E. faecium</i>	BK0405/07	2007	BJ0490	>64	2	500	8	1	0,5	-	-	+
<i>E. faecalis</i>	UR 1078/07	2007	BJ0549	1	1	500	0,5	1	1	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	UR 1089/07	2007	BJ05550	0,5	1	500	0,5	0,5	0,5	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	UR 1093/07	2007	BJ0551	2	2	500	1	0,5	1	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	UR 1116/07	2007	BJ0551	0,5	2	500	0,5	0,5	0,5	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	UR 1132/07	2007	BJ0554	0,5	1	500	0,5	1	1	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	UR 1134/07	2007	BJ0555	2	1	>500	2	0,5	0,5	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	UR 1137/07	2007	BJ0557	2	1	>500	1	1	1	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	UR 1138/07	2007	BJ0556	0,5	0,5	>500	1	0,25	1	-	-	-
<i>E. faecium</i>	UR1126/07	2007	BJ0553	>64	4	500	2	0,5	0,5	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	UR1135/07	2007	BJ0558	1	1	500	2	≤0,25	1	-	-	-
<i>E. faecium</i>	UR1139/07	2007	BJ0559	>64	4	500	2	1	0,5	-	-	-
<i>E. faecium</i>	UR1246/07	2007	BJ0560	64	2	500	1	0,5	0,5	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA 1633/07	2007	BJ0321	4	0,5	500	2	1	0,5	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA 1911/07	2007	BJ0337	0,06	0,25	500	2	0,5	≤0,25	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA 2001/07	2007	BJ0521	1	2	500	2	0,5	1	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA 2142/07	2007	BJ0535	1	2	500	2	1	2	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA 2326/07	2007	BJ0539	2	1	500	1	0,5	1	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	VA 2797/07	2007	BJ0586	1	0,25	500	0,25	0,5	0,5	-	-	-
<i>E. faecium</i>	VA2060/07	2007	BJ0524	>64	2	500	2	1	0,5	-	-	-
<i>E. faecium</i>	VA2351/07	2007	BJ0564	>64	4	>500	2	1	0,5	-	-	-
<i>E. faecium</i>	VA2353/07	2007	BJ0565	>64	2	>500	4	1	0,5	-	-	-
<i>E. faecium</i>	VA2772/07	2007	BJ0584	64	4	>500	2	0,5	0,5	-	-	-

AMP = Ampicillin, DAP = Daptomycin, GEN = Gentamicin, LZD = Linezolid, TEC = Teicoplanin, VAN = Vancomycin

n.d. = nicht durchgeführt; + = positiver Nachweis der Resistenz-Determinante; - = negativer Nachweis der Resistenz-Determinante

## Material

**Tabelle 16** Auflistung der *Enterococcus* spp. Isolate mit phänotypischer Vancomycin-Resistenz

Species	ID-Bezeichnung	Jahr	DK-Nr.	MHK AMP [mg/L]	MHK DAP [mg/L]	MHK DAL [mg/L]	MHK GEN [mg/L]	MHK LZD [mg/L]	MHK TEC [mg/L]	MHK VAN [mg/L]	Resistenz-Determinante	
											<i>vanA</i>	G2576T
<i>E. faecium</i>	Kein Befund	k.A.	BJ0181	64	2	8	>500	2	16	256	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	kein Befund	k.A.	BJ0182	64	2	8	>500	2	16	256	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	kein Befund	k.A.	BJ0142	64	1	32	500	2	64	256	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	kein Befund	k.A.	BJ0482	>64	4	>32	500	2	>256	>256	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	kein Befund	k.A.	BJ0144	>64	2	4	>500	2	16	256	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	UR297	k.A.	BJ0204	64	4	8	500	4	16	256	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	UR5821	k.A.	BJ0176	64	2	8	>500	2	16	256	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	UR7029	k.A.	BJ0205	>64	2	≤0,03	500	2	32	256	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	KA03013/96	1996	BJ0148	>64	2	4	>500	2	16	256	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	KA5435/96	1996	BJ0158	>64	2	4	500	2	16	256	<i>vanA</i>	-
<i>E. gallinarum</i>	TY4637/96	1996	BJ0152	64	4	0,25	500	4	0,5	8	<i>vanC1</i>	-
<i>E. faecium</i>	TY5402/96	1996	BJ0157	64	2	8	>500	2	16	256	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecalis</i>	UR10519/96	1996	BJ0149	2	2	1	500	2	1	128	<i>vanB</i>	-
<i>E. faecium</i>	UR11144/96	1996	BJ0150	>64	2	4	>500	2	16	256	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	UR14436/96	1996	BJ0155	>64	2	4	>500	2	16	128	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	UR20154/96	1996	BJ0161	64	2	4	>500	2	16	64	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	VA15216/96	1996	BJ0145	>64	2	4	>500	2	16	256	<i>vanA</i>	-

## Material

**Tabelle 16 (Fortsetzung)** Auflistung der *Enterococcus* spp. Isolate mit phänotypischer Vancomycin-Resistenz

Species	ID- Bezeichnung	Jahr	DK-Nr.	MHK AMP [mg/L]	MHK DAP [mg/L]	MHK DAL [mg/L]	MHK GEN [mg/L]	MHK LZD [mg/L]	MHK TEC [mg/L]	MHK VAN [mg/L]	Resistenz-Determinante	
											<i>vanA</i>	G2576T
<i>E. faecium</i>	VA16227/96	1996	BJ0147	1	2	4	500	2	64	>256	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	VA16239/96	1996	BJ0146	>64	4	8	>500	2	16	128	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	VA31970/96	1996	BJ0151	64	2	4	>500	2	16	128	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	VA32991/96	1996	BJ0154	>64	4	4	>500	2	16	128	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	VA36693/96	1996	BJ0159	>64	4	4	>500	2	16	128	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	VA38200/96	1996	BJ0141	64	2	≤0,03	500	2	≤0,25	64	<i>vanB</i>	-
<i>E. faecium</i>	VA41280/96	1996	BJ0160	>64	2	4	>500	2	16	128	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	VA45276/96	1996	BJ0162	64	2	4	>500	2	16	128	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	VA667/96	1996	BJ0163	64	2	4	500	2	16	128	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	BK1091/97	1997	BJ0166	64	2	4	>500	2	32	256	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	KA1216/97	1997	BJ0171	64	2	4	>500	2	16	>256	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	KA4904/97	1997	BJ0143	64	2	8	500	2	16	128	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	TY2083/97	1997	BJ0179	64	2	8	>500	2	16	128	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	UR1711/97	1997	BJ0170	64	2	8	>500	1	32	256	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	UR228/97	1997	BJ0164	64	2	4	>500	2	16	128	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	UR2302/97	1997	BJ0167	>64	1	4	500	2	16	128	<i>vanA</i>	-

## Material

**Tabelle 16 (Fortsetzung)** Auflistung der *Enterococcus* spp. Isolate mit phänotypischer Vancomycin-Resistenz

Species	ID- Bezeichnung	Jahr	DK-Nr.	MHK AMP [mg/L]	MHK DAP [mg/L]	MHK DAL [mg/L]	MHK GEN [mg/L]	MHK LZD [mg/L]	MHK TEC [mg/L]	MHK VAN [mg/L]	Resistenz-Determinante	
											<i>vanA</i>	G2576T
<i>E. faecium</i>	UR521/97	1997	BJ0165	32	2	4	>500	1	16	64	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	UR5654/97	1997	BJ0175	>64	4	8	>500	2	32	128	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	UR6110/97	1997	BJ0178	64	2	4	>500	2	16	256	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	VA10176/97	1997	BJ0172	64	4	16	500	2	256	>256	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	VA11275/97	1997	BJ0174	64	4	32	500	2	256	>256	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	VA13572/97	1997	BJ0177	>64	2	8	>500	2	64	256	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	VA14433/97	1997	BJ0180	64	2	4	>500	2	16	128	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	VA17906/97	1997	BJ0173	>64	0,5	32	500	2	256	>256	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	VA5049/97	1997	BJ0169	64	2	4	>500	2	16	256	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	UR2894/98	1998	BJ0203	64	4	8	500	2	16	256	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	UR3253/98	1998	BJ0202	>64	4	16	>500	2	16	256	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	UR3561/98	1998	BJ0201	>64	4	>32	500	2	>256	>256	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	VA25259/98	1998	BJ0200	>64	4	0,06	500	2	0,5	256	<i>vanB</i>	-
<i>E. faecium</i>	VA25990/98	1998	BJ0199	64	4	0,06	500	2	≤0,25	256	<i>vanB</i>	-
<i>E. faecalis</i>	VA36657/00	2000	BJ0198	64	2	≤0,03	500	2	16	256	<i>vanA</i>	-
<i>E. faecium</i>	UR9411/01	2001	BJ0197	>64	2	0,125	500	2	≤0,25	>256	<i>vanB</i>	-

## Material

**Tabelle 16 (Fortsetzung)** Auflistung der *Enterococcus* spp. Isolate mit phänotypischer Vancomycin-Resistenz

Species	ID- Bezeichnung	Jahr	DK-Nr.	MHK AMP [mg/L]	MHK DAP [mg/L]	MHK DAL [mg/L]	MHK GEN [mg/L]	MHK LZD [mg/L]	MHK TEC [mg/L]	MHK VAN [mg/L]	Resistenz-Determinante	
											van	G2576T
<i>E. faecium</i>	TY555/02	2002	BJ0187	64	0,03	32	500	2	16	128	vanA	-
<i>E. faecium</i>	UR1184/02	2002	BJ0185	>64	2	0,5	500	2	256	>256	vanA	-
<i>E. gallinarum</i>	UR2398/02	2002	BJ0184	4	0,25	0,25	500	2	0,5	4	vanCI	-
<i>E. gallinarum</i>	UR2470/02	2002	BJ0183	1	1	0,06	500	2	≤0,25	4	vanCI	-
<i>E. faecium</i>	VA1184/02	2002	BJ0168	4	≤0,016	16	500	2	128	256	vanA	-
<i>E. faecium</i>	VA31421/02	2002	BJ0206	64	2	1	500	1	256	256	vanA	-
<i>E. faecium</i>	VA20616/03	2003	BJ0208	>64	4	≤0,03	>500	16	≤0,25	128	vanB	+
<i>E. faecium</i>	VA21032/03	2003	BJ0209	>64	4	≤0,03	>500	16	≤0,25	128	vanB	+
<i>E. gallinarum</i>	VA3564/05	2005	BJ0099	64	1	≤0,03	500	2	≤0,25	4	vanCI	-
<i>E. faecium</i>	BK822/06	2006	BJ0291	>64	1	0,125	500	2	≤0,25	32	vanB	-
<i>E. faecium</i>	TY3140/06	2006	BJ0482	>64	2	4	500	2	0,5	32	vanB	-
<i>E. faecium</i>	VA14929/06	2006	BJ0386	>64	2	16	500	2	256	256	vanA	-
<i>E. faecium</i>	VA15086/06	2006	BJ0410	>64	4	32	500	4	64	256	vanA	-
<i>E. faecium</i>	VA1646/06	2006	BJ0287	>64	0,5	0,25	500	8	≤0,25	32	vanB	+
<i>E. faecium</i>	BK228/07	2007	BJ0489	>64	4	32	500	16	256	256	vanA	+

AMP = Ampicillin, DAP = Daptomycin, DAL = Dalbavancin, GEN = Gentamicin, LZD = Linezolid, TEC = Teicoplanin, VAN = Vancomycin  
n.d. = nicht durchgeführt; + = positiver Nachweis der Resistenz-Determinante; - = negativer Nachweis der Resistenz-Determinante

**Tabelle 17** Auflistung der *S. aureus* Isolate mit phänotypischer Linezolid-Resistenz

Species	ID-Bezeichnung	Jahr	DK-Nr.	LZD [mg/ L]	ERY [mg/ L]	[mg/ L] CLI	Resistenz-Determine
<i>S. aureus</i>	VA39140/04	2004	BJ0291	1	≥256	≥256	<i>ermA, ermC</i>
<i>S. aureus</i>	VA10260/05	2005	BJ0547	32	≥256	≥256	<i>ermA, ermC</i>
<i>S. aureus</i>	TY2300/05	2005	BJ0541	32	0,25	0,25	<i>ermA</i>
<i>S. aureus</i>	VA14775/05	2005	BJ0543	32	0,25	0,25	<i>ermA</i>
<i>S. aureus</i>	TY2403/05	2005	BJ0544	32	0,25	0,25	<i>ermA</i>
<i>S. aureus</i>	VA19213/05	2005	BJ0548	32	0,25	0,25	<i>ermA</i>

LZD = Linezolid, ERY = Erythromycin, CLI = Clindamycin

## 1.1 Referenzstämme

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Referenz-Stämme sind in Tabelle 18 aufgeführt.

**Tabelle 18** Auflistung der Referenz-Stämme

Stamm- Bezeichnung	Charakteristika	Quelle/ Herkunft
<i>E. casseliflavus</i> ATCC® 25788	Referenz-Stamm mit <i>vanC2/3</i> -Resistenz-Gen-Cluster	Dr. Witte, Wernigerode
<i>E. faecalis</i> ATCC® 29212	Referenz-Stamm für Bestimmung der Antibiotika-Empfindlichkeit nach der Mikrodilutionsmethode	Stamm-Sammlung AK Heisig, Hamburg
<i>E. faecalis</i> ATCC® 51299	Referenz-Stamm mit <i>vanB</i> -Resistenz-Gen und <i>aac(6')-aph(2'')</i> -Gen	Dr. Witte, Wernigerode
<i>E. faecalis</i> UW 3696/02	Klinisches Isolat mit Linezolid-Resistenz und G→T SNP an Position 2576 der 23S rRNA	Dr. Halle, Berlin (105)
<i>E. faecalis</i> UW 3697/02	Klinisches Isolat mit Linezolid-Resistenz und G→T SNP an Position 2576 der 23S rRNA	Dr. Halle, Berlin (105)
<i>E. faecalis</i> V583	Referenz-Stamm mit <i>vanB</i> -Resistenz-Gen	Dr. Witte, Wernigerode
<i>E. faecium</i> BM4174	Referenz-Stamm mit <i>vanA</i> -Resistenz-Gen	Dr. Witte, Wernigerode
<i>E. faecium</i> UW 3695/02	Klinisches Isolat mit Linezolid-Resistenz und G→T SNP an Position 2576 der 23S rRNA	Dr. Halle, Berlin (105)
<i>E. faecium</i> UW 3698/02	Klinisches Isolat mit Linezolid-Resistenz und G→T SNP an Position 2576 der 23S rRNA	Dr. Halle, Berlin (105)
<i>E. gallinarum</i> BM4174	Referenz-Stamm mit <i>vanC1</i> -Resistenz-Gen-Cluster	Dr. Witte, Wernigerode
<i>E. malodoratus</i> ATCC® 43197	Referenz-Stamm für Bestimmung der Antibiotika-Empfindlichkeit nach der Mikrodilutionsmethode	Dr. Horstkotte, Hamburg
<i>S. aureus</i> ATCC® BAA-976	Referenz-Stamm mit <i>msrA</i> -Gen für die Bestimmung der Antibiotika-Empfindlichkeit nach der Agar-Diffusionsmethode	Dr. Horstkotte, Hamburg
<i>S. aureus</i> ATCC® 29213	Referenz-Stamm für Bestimmung der Antibiotika-Empfindlichkeit nach der Mikrodilutionsmethode	Stamm-Sammlung AK Heisig, Hamburg
<i>S. aureus</i> ATCC® 44300	Referenz-Stamm mit <i>mecA</i> -Gen für die Bestimmung der Antibiotika-Empfindlichkeit nach der Agar-Diffusionsmethode	Dr. Wiegand, Bonn

<i>S. aureus</i> <i>ermB</i>	Klinisches <i>S. aureus</i> Isolat mit <i>ermB</i> -Resistenz-Gen	Dr. Schwarz, Neustadt
<i>S. aureus</i> RN4220:pSES28	<i>ermC</i> konst. durch Transformation von Plasmid pSES28 aus <i>S. epidermidis</i> in <i>S. aureus</i> RN4220 und <i>in-vitro</i> Selektion	Dr. Schwarz, Neustadt
<i>S. aureus</i> RN4220:pSES34	<i>ermC</i> ind. durch Transformation von Plasmid pSES34 aus <i>S. epidermidis</i> in <i>S. aureus</i> RN4220	Dr. Schwarz, Neustadt
<i>S. intermedius</i> <i>ermA</i>	Klinisches <i>S. intermedius</i> Isolat mit <i>ermA</i> -Resistenz-Gen	Dr. Schwarz, Neustadt

## 2 Antibiotika

Die im Rahmen dieser Arbeit für die Empfindlichkeits-Bestimmung verwendeten Antibiotika sind in Tabelle 19 aufgeführt.

**Tabelle 19** Auflistung der verwendeten Antibiotika

Name	Herkunft	Lösemittel
Ampicillin-Anhydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)	H <sub>2</sub> O
Ciprofloxacin-Hydrochlorid	Bayer Vital GmbH (Leverkusen, Deutschland)	H <sub>2</sub> O
Erythromycin	Abbott-Abbott GmbH & Co. KG (Wiesbaden, Deutschland)	H <sub>2</sub> O
Dalbavancin	Pfizer Pharma GmbH (Karlsruhe, Deutschland)	H <sub>2</sub> O
Daptomycin	Novartis Pharma GmbH (Nürnberg, Deutschland)	H <sub>2</sub> O
Gatifloxacin	Grünenthal GmbH (Aachen, Deutschland)	Essigsäure (1 %)
Garenoxacin	Bristol-Myers Squibb GmbH & Co. KGaA (München, Deutschland)	H <sub>2</sub> O
Gentamicin-Sulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)	H <sub>2</sub> O
Linezolid	Pfizer Pharma GmbH (Karlsruhe, Deutschland)	H <sub>2</sub> O
Moxifloxacin	Bayer Vital GmbH (Leverkusen, Deutschland)	Salzsäure (0,1 N)
Oxacillin-Natrium	Infectopharm Arzneimittel und Consilium GmbH (Heppenheim, Deutschland)	H <sub>2</sub> O
Penicillin G-Natrium	Grünenthal GmbH (Aachen, Deutschland)	H <sub>2</sub> O
Sparfloxacin	Aventis Pharma Deutschland GmbH (Frankfurt, Deutschland)	Essigsäure (1 %)
Teicoplanin	Aventis Pharma Deutschland GmbH (Frankfurt, Deutschland)	H <sub>2</sub> O
Vancomycin-Hydrochlorid	Abbott-Abbott GmbH & Co. KG (Wiesbaden, Deutschland)	H <sub>2</sub> O

### 3 Laborchemikalien und andere Materialien

Die Tabelle 20 gibt einen Überblick über die verwendeten Chemikalien. Diese wurden alle in analytischem Reinheitsgrad bezogen.

**Tabelle 20** Auflistung der Laborchemikalien und anderer Materialien

Name	Herkunft
2x RNA Loading Dye Solution	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, Deutschland)
Acrylamide-Solution (40 %)	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
Agarose (Seakem <sup>®</sup> LE)	Biozym Diagnostik GmbH (Hess. Oldendorf Deutschland)
Agarose Neeo (RNase frei)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
BigDye <sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Bis-Solution (2 %)	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
Borsäure	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Bromphenolblau	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
dCTP-Lösung (10 mM)	Applied Biosystems (Foster City, USA)
ddATP-Lösung (10 mM)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
dGTP-Lösung (10 mM)	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Dithiothreitol (DTT)	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
DNEasy Blood & Tissue Kit	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)
dNTP-Stammlösungen (100mM)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
dUTP-Lösung (20 mM)	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Eisessig	Acros Organics (Geel, Belgien)
Ethanol 96 %	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Ethidiumbromid	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

## Material

---

Ficoll-400 (20 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Glycerol 87 %	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Harnstoff	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
Isopropanol 100 %	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
LiChrosolv-H <sub>2</sub> O	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Magnesiumacetat-tetrahydrat	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Natriumacetat-Trihydrat	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Natriumdodecylsulfat – Lsg 10 % (SDS)	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
Natriumhydroxid	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
NucleoSpin Extrakt II-Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland)
NucleoSpin <sup>®</sup> RNA II-Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland)
Phenylalanyl-Arginyl- $\beta$ -Naphthylamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Polyoxyethylensorbitan-monolaurat (Tween 20)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Pyro-Gold Reagents	Biotage AB (Uppsala, Schweden)
RNAprotect <sup>®</sup> Bacteria Reagent	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)
RNase AWAY	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Salzsäure 37 %	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Streptavidin Sepharose HP	Amersham Biosciences GmbH (Freiburg, Deutschland)
TEMED (Tetramethylethylendiamin)-Lösung	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Triton <sup>®</sup> X-100-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Xylencyanol	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
$\beta$ -Mercapto-Methanol	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

## 4 Puffer und Lösungen

Die Tabelle 21 gibt einen Überblick über die verwendeten Puffer und Lösungen sowie deren Zusammensetzung und Herstellung.

**Tabelle 21** Auflistung der Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung/ Herstellung
0,2 M Natriumhydroxid-Lösung	8 g Natriumhydroxid in 1000 mL demineralisiertem Wasser lösen
0,5 M EDTA-Lösung pH7,5	93,06 g Ethylendiamintetraessigsäure und ca. 40 g NaOH in 400 mL demineralisiertem Wasser lösen, pH mit 0,2 M Natriumhydroxid-Lösung auf 7,5 einstellen und mit demineralisiertem Wasser auf 500 mL auffüllen
0,5x Tris-Acetat-EDTA-Buffer	10 mL 50x Tris-Acetat-EDTA-Buffer mit 1000 mL demineralisiertem Wasser auffüllen
1x Annealing Buffer pH 7,6	2,42 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan und 0,43 g Magnesiumacetat-tetrahydrat in 900 mL demineralisiertem Wasser lösen, mit Eisessig pH auf 7,6 einstellen und mit demineralisiertem Wasser auf 1000 mL auffüllen
3 M Natriumacetat-Lösung pH4,6	40,8 g Natriumacetat-Trihydrat in 50 mL demineralisiertem Wasser lösen, mit Eisessig pH auf 4,6 einstellen und mit demineralisiertem Wasser auf 100 mL auffüllen
10x Tris-Borat-EDTA-Buffer pH8,0	109,0 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 55,6 g Borsäure und 7,4 g Ethylendiamintetraessigsäure in 1000 mL demineralisiertem Wasser lösen
1x Tris-Borat-EDTA-Buffer pH8,3	50 mL 10x Tris-Borat-EDTA-Buffer mit 500 mL demineralisiertem Wasser auffüllen
50x Tris-Acetat-EDTA-Buffer	242,2 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan und 18,7 g Ethylendiamintetraessigsäure in 500 mL demineralisiertem Wasser lösen, mit Eisessig auf pH 8,0 einstellen und mit demineralisiertem Wasser lösen auf 1000 mL auffüllen

## Material

---

Ammoniumpersulfat-Lösung (40 %)      400 mg Ammonium-persulfat in 1 mL demineralisiertem Wasser lösen

Binding-Buffer pH 7,6      1,21 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 117 g Natriumchlorid, 0,292 g Ethylendiamintetraessigsäure in 90 mL demineralisiertem Wasser lösen, mit Salzsäure pH auf 7,6 einstellen, 1 mL Polyoxyethylensorbitan-monolaurat (Tween 20) hinzugeben und mit demineralisiertem Wasser auf 1000 mL auffüllen

Bromphenolblau-Lösung      2,5 mg Bromphenolblau, 2,5 mg Xylencyanol in 1 mL Ficoll-400 lösen

Calcium-Chlorid-Lösung      3,68 g CaCl<sub>2</sub>-Dihydrat in 100 mL demineralisiertem Wasser lösen

dNTP-Mischung für PCR-Ansätze      Je 10 µL dATP, dCTP, dGTP und dTTP-Stamm-Lösung (100 mM) mischen und mit bidestilliertem Wasser auf 500 µL auffüllen

dNTP-Mischung für RT-Ansätze      Je 10 µL ddATP, dCTP, dGTP (10 mM) und 5 µL dUTP-Stamm-Lösung (20mM) mischen und mit RNase-freiem Wasser auf 40 µL auffüllen

Enzymatic-Lysis-Buffer      200 µL 2 M Tris-HCL-Lösung pH7,5, 80 µL 0,5 M EDTA-Lösung pH7,5 und 240 µL Triton<sup>®</sup> X-100-Lösung in 20 mL demineralisiertem Wasser lösen

Ethanol 70 %      58,9 g Ethanol 96 % mit 29,7 g demineralisiertem Wasser mischen

Harnstoff-Lösung      105 g Harnstoff in 100 mL demineralisiertem Wasser lösen

Lysostaphin-Stamm-Lösung      1 mg Lysostaphin in 500 µL demineralisiertem Wasser lösen

---

Natriumchlorid-Lösung  
0,9 %      9 g Natriumchlorid in 1000 mL demineralisiertem Wasser lösen und im Anschluss im gespannten und gesättigten Wasserdampf autoklavieren (15 min/ 121 °C/ 2 bar)

TE-Puffer pH7,5      5 mL 2 M Tris-HCL-Lösung pH7,5 und 20 mL 0,5 M EDTA-Lösung pH7,5 mit 1000 mL demineralisiertem Wasser auffüllen

2 M Tris-HCL-Lösung  
pH7,5      24,24 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan in 80 mL demineralisiertem Wasser lösen, mit Salzsäure auf pH7,5 einstellen und mit demineralisiertem Wasser lösen auf 100 mL auffüllen

Washing-Buffer pH 7,6      1,21 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan in 900 mL demineralisiertem Wasser lösen, mit Eisessig pH auf 7,6 einstellen und mit demineralisiertem Wasser lösen auf 1000 mL auffüllen

---

## 5 Enzyme

Die verwendeten Enzyme sind in Tabelle 22 aufgeführt.

**Tabelle 22** Auflistung der verwendeten Enzyme

Bezeichnung	Zusammensetzung/ Herstellung
Lysostaphin (456 U/mg)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Lysozym (100.000 U/mg)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
rDNase, RNase-free (30 U/ $\mu$ L)	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland)
RNase OUT™ (40 U/ $\mu$ L)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
SuperScript™ II Reverse Transcriptase (200 U/ $\mu$ L)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Taq-DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ L)	New-England Biolabs (Ipswich, USA)

## 6 Nährmedien und Nährböden

Die Tabelle 23 gibt einen Überblick über die verwendeten Nährmedien und Nährböden sowie deren Zusammensetzung und Herstellung.

**Tabelle 23** Auflistung der verwendeten Nährmedien

Bezeichnung	Herkunft	Zusammensetzung/ Herstellung
LB-Agar	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L Natriumchlorid, 15 g/L Agar-Agar 40 g der Fertigmischung in 1000 mL demineralisiertem Wasser durch Aufkochen lösen und im gespannten gesättigten Wasserdampf autoklavieren (15 min/ 121 °C/ 2 bar)
LB-Medium	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L Natriumchlorid 25 g der Fertigmischung in 1000 mL demineralisiertem Wasser durch Aufkochen lösen und im gespannten gesättigten Wasserdampf autoklavieren (15 min/ 121 °C/ 2 bar)
Difco™ Mueller Hinton-Agar	Becton-Dickinson Microbiology Systems, Sparks, USA	2,0 g/L Rindfleischextrakt-Pulver, 17,5 g/L durch Säure abgebautes Casein, 1,5 g/L Stärke, 17 g/L Agar 38 g der Fertigmischung in 1000 mL demineralisiertem Wasser durch Aufkochen lösen und im gespannten gesättigten Wasserdampf autoklavieren (15 min/ 121 °C/ 2 bar)

Difco™ Mueller Hinton-Broth	Becton-Dickinson Microbiology Systems, Sparks, USA	2,0 g/L Rindfleischextrakt-Pulver, 17,5 g/L durch Säure abgebautes Casein, 1,5 g/L Stärke 21 g der Fertigmischung in 1000 mL demineralisiertem Wasser durch Aufkochen lösen und im gespannten gesättigten Wasserdampf autoklavieren (15 min/ 121 °C/ 2 bar)
Difco™ Mueller Hinton-Broth (CaCl <sub>2</sub> -Supplement)	Becton-Dickinson Microbiology Systems, Sparks, USA	2,0 g/L Rindfleischextrakt-Pulver, 17,5 g/L durch Säure abgebautes Casein, 1,5 g/L Stärke 21 g der Fertigmischung in 1000 mL demineralisiertem Wasser durch Aufkochen lösen und mit 4,5 mL CaCl <sub>2</sub> -Lsg auf eine Ca <sup>2+</sup> -Konzentration von 50 mg/L einstellen. Anschließend im gespannten gesättigten Wasserdampf autoklavieren (15 min/ 121 °C/ 2 bar)
Difco™ Mueller Hinton-Broth (NaCl-Supplement)	Becton-Dickinson Microbiology Systems, Sparks, USA	2,0 g/L Rindfleischextrakt-Pulver, 17,5 g/L durch Säure abgebautes Casein, 1,5 g/L Stärke 21 g der Fertigmischung und 20 g NaCl in 1000 mL demineralisiertem Wasser durch Aufkochen lösen und im gespannten gesättigten Wasserdampf autoklavieren (15 min/ 121 °C/ 2 bar)

## 7 Nukleinsäuren

### 7.1 Oligonukleotide

Die Tabelle 24 gibt Auskunft über die Sequenz und Herkunft der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide. Diese wurden von der Firma Sigma Aldrich Chemie GmbH oder der Firma Invitrogen GmbH bezogen.

**Tabelle 24** Auflistung der verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz und Bindungsposition	Referenz
APH(2')-AAC(6') FP	5'-CCA CAA ATG TTA AGG CAATGA A -3' (549 bp-570 bp)	Diese Arbeit
APH(2')-AAC(6') RP	5'-ACT GTT GTT GCA TTT AGT CTT TCC -3' (1088 bp-1065 bp)	Diese Arbeit
EF 23S rRNA gene Domain V FP	5'-CCC TCA GAA TGG TTG GAAATC A -3' (2293 bp-2314 bp)	Diese Arbeit
EF 23S rRNA gene Domain V RP	5'-CTT GAG GTG GGC TTC ACA CTT AGA -3' (2777 bp-2754 bp)	Diese Arbeit
<i>ermA S. aureus</i> FP	5'-AAT TGA TGG AGG CTT ATG TCA AGT -3' (177 bp-200 bp)	Diese Arbeit
<i>ermA S. aureus</i> RP	5'-CGA TAT TCA CGG TTT ACC CAC TTA -3' (611 bp-588 bp)	Diese Arbeit
<i>ermB S. aureus</i> FP	5'-GTA AAG GGC ATT TAA CGA CGA A -3' (116 bp-137 bp)	Diese Arbeit
<i>ermB S. aureus</i> RP	5'-GGC GTG TTT CAT TGC TTG AT -3' (655 bp-636 bp)	Diese Arbeit
<i>ermC S. aureus</i> FP	5'-GGG CAT TTT ACC CTT GAA TTA GT -3' (124 bp-146 bp)	Diese Arbeit
<i>ermC S. aureus</i> RP	5'-ATC TTT TAG CAA ACC CGT ATT CCA -3' (403 bp-380 bp)	Diese Arbeit
grl_3'_+485_Sau	5'-TTA GGA AAT CTT GAT GGC A -3' (485 bp-467 bp)	Dr. Anke Heisig

## Material

---

grl_5'+27_Sau	5'-ACT TGA AAG ATG TTT TTA GGT GA -3' (27 bp-41 bp)	Dr. Anke Heisig
gyr_3'+377_Sau	5'-GCT TCA GTA TAA CGC AT -3' (377 bp-361bp-)	Dr. Anke Heisig
gyr_5'+43_Sau	5'-ACC AGT GAA ATG CGT GAA TC -3' (43 bp-62 bp)	Dr. Anke Heisig
LRE PSQ G2588T FP	5'-GGC TGT TCG CCC ATT AAA G -3' (2549 bp-2576 bp) <sup>a</sup>	Diese Arbeit
LRE PSQ G2588T RP BIO	Biotin-5'-CGG ATA GGG ACC GAA CTG -3' (2618 bp-2601 bp) <sup>a</sup>	Diese Arbeit
LRE PSQ G2588T RP	5'-CGG ATA GGG ACC GAA CTG -3' (2618 bp-2601 bp) <sup>a</sup>	Diese Arbeit
LRE PSQ G2588T SP	5'-CCA TTA AAG CGG CAC -3' (2573 bp-2559 bp) <sup>a</sup>	Diese Arbeit
LRSA PSQ G2603T SP	5'-GCC CAT TAA AGC GGT A -3' (2572 bp-2557 bp) <sup>a</sup>	Diese Arbeit
MLSB 2058 Methylation 24 bp	5'-TAC AGT AAA GCT CCA CGG GGT CTT -3' (2082 bp-2059 bp) <sup>a</sup>	Diese Arbeit
MLSB 2058 Methylation 42 bp	5'-TAC AGT AAA CGT CCA CGG GGT CTT TCC GTC CTG TCG GGC GTA -3' (2082 bp-2041 bp) <sup>a</sup>	Diese Arbeit
MLSB 2058 Methylation RP 18 bp	5'-TAC AGT AAA GCT CCA CGG -3' (2082 bp-2065 bp) <sup>a</sup>	Diese Arbeit
MLSB 2058 Methylation RP 18 bp BIO	Biotin-5'-TAC AGT AAA GCT CCA CGG -3' (2082 bp-2065 bp) <sup>a</sup>	Diese Arbeit
MLSB 2058 Methylation RP 18 bp 6-FAM	6-FAM-5'-TAC AGT AAA GCT CCA CGG -3' (2082 bp-2065 bp) <sup>a</sup>	Diese Arbeit
MLSB 2058 Methylation SP1	5'-CA GGT TAC CCG CGA CAG G-3' (2073 bp-2056 bp) <sup>a</sup>	Diese Arbeit
MLSB 2058 Methylation SP2	5'-GAA GAT GCA GGT TAC CCG-3' (2080 bp-2063 bp) <sup>a</sup>	Diese Arbeit
MLSB 2058 Methylation SP3	5'-TAC CCG CGA CAG GAC-3' (2082 bp-2068 bp) <sup>a</sup>	Diese Arbeit

## Material

---

MLSB 2058 Methylation SP27	5'-GGA AAG ACC CCG TGG AGC TTT ACT GTA -3' (2082 bp-2056 bp) <sup>a</sup>	Diese Arbeit
msrA <i>S. aureus</i> FP	5'-AAA AAG GCA CGG TTG AGA AG -3' (745 bp-765 bp)	Diese Arbeit
msrA <i>S. aureus</i> RP	5'-TGC CAT TTG CAC TTT AGG AGA -3 (1079 bp-1059 bp)	Diese Arbeit
parE-829R-6-FAM	6-FAM-5'-AAG CCC GGT GAG TAC CTC AAT G -3 (851bp-829 bp)	Dr. Tom Grüger
<i>S. aureus</i> PBP2a FP	5'-TGA AGA TGG CTA TCG TGT CAC A -3' (879 bp-900 bp)	Diese Arbeit
<i>S. aureus</i> PBP2a RP	5'-CTG CCT AAT TCG AGT GCT ACT CTA -3' (1427 bp-1404 bp)	Diese Arbeit
SA Tn554 Regulatory Region FP	5'-TCC TTT TCC TGA TCC GAT TT -3 (5157 bp-5176 bp)	Diese Arbeit
SA Tn554 Regulatory Region RP	5'-TTG GGG ATA AAA CTT CCC TT -3 (5729 bp-5710 bp)	Diese Arbeit
StaAur 23S rRNA 5' +1900	5'-GCG AAG CTA CGA ATC GAA GCC -3' (1873 bp-1893 bp) <sup>a</sup>	Kristina Bahr
VRE <i>E. faecalis</i> -specific FP	5'-ATC AAG TAC AGT TAG TCT TTA TTA G -3'(98 bp-116 bp)	(106-108)
VRE <i>E. faecalis</i> -specific RP	5'-ACG ATT CAA AGC TAA CTG AAT CAG T -3' (1038 bp-1021 bp)	(106-108)
VRE <i>E. faecium</i> -specific FP	5'-TTG AGG CAG ACC AGA TTG ACG -3' (310 bp-330 bp)	(109)
VRE <i>E. faecium</i> -specific RP	5'-TAT GAC AGC GAC TCC GAT TCC -3' (967 bp-947 bp)	(109)
VRE vanA FP	5'-CAT GAA TAG AAT AAA AGT TGC AAT A -3'(130 bp-154 bp)	(110)
VRE vanA RP	5'-CCC CTT TAA CGC TAA TAC GAT CAA -3' (1336 bp-1313 bp)	(110)
VRE vanB FP	5'-GTG ACA AAC CGG AGG CGA GGA -3' (138 bp-158 bp)	(110)

## Material

---

VRE vanB RP	5'-CCG CCA TCC TCC TGC AAA AAA -3' (570 bp-540 bp)	(110)
VRE vanC1 FP	5'-GGT ATC AAG GAA ACC TC -3' (246 bp-272 bp)	(107, 108)
VRE vanC1 RP	5'-CTT CCG CCA TCA TAG CT -3' (1067 bp-1051 bp)	(107, 108)
VRE vanC2/3 FP	5'-CGG GGA AGA TGG CAG TAT -3' (350 bp-367 bp)	(111)
VRE vanC2/3 RP	5'-CGC AGG GAC GGT GAT TTT -3' (833 bp-816 bp)	(111)

<sup>a</sup>*E. Coli* Nummerierung

## 7.2 Größenmarker

Die zur Größenbestimmung und Konzentrationsabschätzung bei der Agarose-Gel-Elektrophorese verwendeten DNA-Größenmarker sind in der Tabelle 25 aufgeführt.

**Tabelle 25** Auflistung der verwendeten DNA-Größenmarker

Name	Herkunft	Bandenspektrum	Abbildung
Fast-Ruler™ DNA-Ladder Low-Range	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, Deutschland)	50 bp-1500 bp	Abbildung 3
Fast-Ruler™ DNA-Ladder Middle-Range	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, Deutschland)	100 bp-5.000 bp	Abbildung 4
Smart-Ladder	Eurogentec (Seraing, Belgien)	200 bp-10.000 bp	Abbildung 5

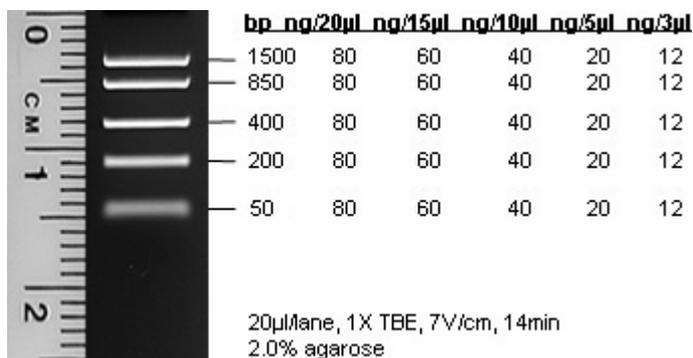


Abbildung 3 Größen-Standard Fast-Ruler™ DNA-Ladder, Low-Range

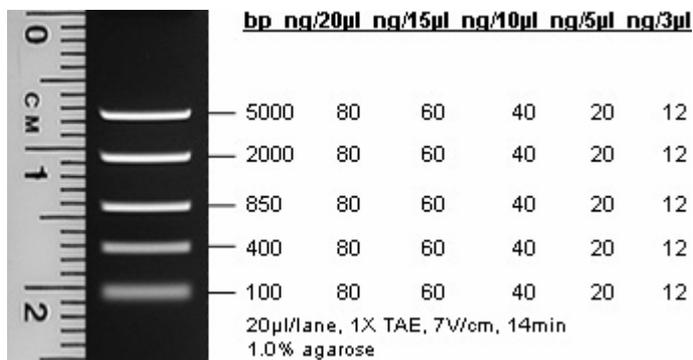


Abbildung 4 Größenstandard Fast-Ruler™ DNA-Ladder, Middle-Range

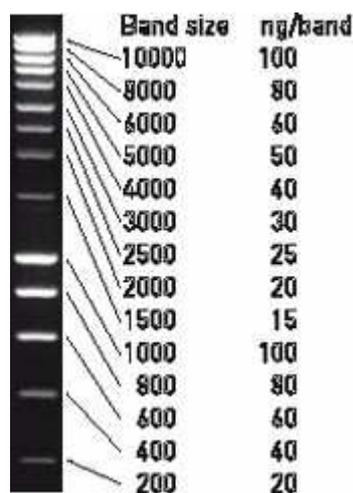


Abbildung 5 Größen-Standard Smart-Ladder

## 8 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

### 8.1 Laborgeräte

Tabelle 26 Auflistung der verwendeten Laborgeräte

Bezeichnung	Fabrikationstyp	Herkunft
Andruckdispenser für 6 Antibiotika-Testplättchen	ST6090	Oxoid GmbH (Wesel, Deutschland)
Autoklav, gross	3870 EL V	Systec GmbH Labor-Systemtechnik (Wettenberg, Deutschland)
Autoklav, klein	Mediaprep 2540 ELV	Systec GmbH Labor-Systemtechnik (Wettenberg, Deutschland)
Brutschrank	k. A.	Kendro Laboratory Products (Hanau, Deutschland)
DNA-Sequenzierer	ABI-Prism 310	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Erlenmeyerkolben (V=250 mL, 500 mL)	k. A.	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Gefrierschrank (-20C)	Premium	Liebherr (Biberach a. d. Riss, Deutschland)
Gefrierschrank (-80C)	Hera Freeze HFU 486 Basic	Kendro Laboratory Products (Hanau, Deutschland)
Gel-Elektrophorese-Kammern	ComphorMini, ComphorMidi	Biozym Diagnostik GmbH (Hess. Oldendorf Deutschland)
Glasflaschen (V=100 mL-1000 mL)	k. A.	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Kühlschränke	Öko_Santo Super	AEG (Nürnberg, Deutschland)
Magnet-Heizrührer	Heidolph MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, Deutschland)
Mikrowelle	CB 1253	Bomann (Kempen, Deutschland)
MilliQ-Apparatur	Milli-Q Synthesis	Millipore S.A. (Molsheim, Frankreich)

## Material

Multistep-Pipette (1 Kanal)	k.A.	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG (Eberstadt, Deutschland)
Multistep-Pipette (8 Kanal)	k.A.	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG (Eberstadt, Deutschland)
PCR-Thermocycler	Biometra T Gradient Thermoblock	Biometra biomedizinische Analytik GmbH (Göttingen, Deutschland)
PCR-Thermocycler	Biometra T Personal 48	Biometra biomedizinische Analytik GmbH (Göttingen, Deutschland)
PCR-Thermocycler	Biometra T3 Thermocycler	Biometra biomedizinische Analytik GmbH (Göttingen, Deutschland)
PCR-Thermocycler	Biometra Ti5	Biometra biomedizinische Analytik GmbH (Göttingen, Deutschland)
pH-Meter	Inolab pH Level 1	WTW GmbH (Weilheim, Deutschland)
Photometer	Cary 50 bio	Varian (Darmstadt, Deutschland)
Pipette, variabel (5000 µL)	Gilson	Gilson Inc. (Middleton USA)
Pipetten, variabel (10 µL, 100 µL, 1000 µL)	Labmate	Abimed (Langenfelde, Deutschland)
Pyrosequenzierer	PSQ MA96	Biotage AB (Uppsala, Schweden)
Quarzküvetten	k. A.	k. A.
Schüttelinkubator	Certomat H	B. Braun Biotech International GmbH (Melsungen, Deutschland)
Schüttelinkubator	Certomat R	B. Braun Biotech International GmbH (Melsungen, Deutschland)
Schüttelinkubator	C25 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific (Edison, USA)
Sicherheitswerkbank	Hera guard	Kendro Laboratory Products (Hanau, Deutschland)
Sicherheitswerkbank	Hera safe	Kendro Laboratory Products (Hanau, Deutschland)
Spannungsgeber	Consort E122	Biozym Diagnostik GmbH (Hess. Oldendorf Deutschland)
Spannungsgeber	PowerPac1000	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
Thermopapier	Sony UPP-110HP	Biometra biomedizinische Analytik GmbH (Göttingen, Deutschland)
Thermoprinter	SONY UP-D890	Biometra biomedizinische Analytik GmbH (Göttingen, Deutschland)
Vacuum Prep Workstation	k. A.	Biotage AB (Uppsala, Schweden)
Vertikal-Elektrophorese-Kammer	MiniPotanIII	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
Video-Dokumentations-Anlage	Biometra BioDoc Analyzer	Biometra biomedizinische Analytik GmbH (Göttingen, Deutschland)
Video-Dokumentations-Anlage	UVIchemi 12.1	Uvitec Ltd. (Cambridge, England)

Vortex	Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc. (Bohemia, USA)
Waage	Navigator	OHAUS (Giessen, Deutschland)
Waage	Mettler AC100	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Wasserbad	Julabo MWB	Julabo Labortechnik GmbH (Seilbach, Deutschland)
Zentrifuge	Biofuge Fresco	Kendro Laboratory Products (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge	Biofuge Pico	Kendro Laboratory Products (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge	Biofuge Stratos	Kendro Laboratory Products (Hanau, Deutschland)

## 8.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 27** Auflistung der Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Herkunft
0,2 mL PCR-Reaktionsgefäße	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
0,5 mL PCR-Reaktionsgefäße	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
1,5 mL PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co (Nümbrecht, Deutschland)
2,0 mL PCR-Reaktionsgefäße	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Antibiotika-Testplättchen (Clindamycin 2 µg)	Oxoid GmbH (Wesel, Deutschland)
Antibiotika-Testplättchen (Erythromycin 15 µg)	Oxoid GmbH (Wesel, Deutschland)
Einmalspritzen (5 mL, 10 mL, 20 mL, 50 mL)	B. Braun Biotech International GmbH (Melsungen, Deutschland)
Halbmikro-Küvetten	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Micronaut-Fertigplatten	Merlin Diagnostik (Bornheim-Hersel, Deutschland)
Mikrotiterplatten (U. Form), steril	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Parafilm (Laboratory Film)	Serra Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
PCR-Platten	Sarstedt AG & Co (Nümbrecht, Deutschland)
Petrischalen	Sarstedt AG & Co (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitze Biohit TP 1200 µL	Biohit Oyj (Helsinki, Finnland)
Pipettenspitze D5000 5000µL Tip	Gilson Inc. (Middleton USA)
Pipettenspitzen (2 µL, 10 µL, 100 µL, 1000 µL)	Sarstedt AG & Co (Nümbrecht, Deutschland)

Pipettenspitzen mit Filter (2 µL, 10 µL, 100 µL, 1000 µL)	Sarstedt AG & Co (Nümbrecht, Deutschland)
Pyrosequencing <sup>TM</sup> -Platten	Biotage AB (Uppsala, Schweden)
Sterilfilter (Porengröße: 0,20µm)	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Zentrifugenröhrchen (15 mL, 20 mL)	Renner (Dannstadt, Deutschland)

## 9 Software

**Tabelle 28** Auflistung der Software

Name	Herkunft
Adobe Acrobat	Adobe (San Jose, USA)
Assay Design Software 1.0	Biotage AB (Uppsala, Schweden)
GeneScan Software	Applied Biosystems (Foster City, USA)
ISIS Draw	Elsevier MDL (San Leandro, USA)
Microsoft Office 2003	Microsoft (Redmond, USA)
Microsoft Windows (98, 2000, XP)	Microsoft (Redmond, USA)
UVIprochemi 12.1	Uvitec Ltd. (Cambridge, England)
Vector-NTI Advanced 10.0	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

## **C Methoden**

### **1 Mikrobiologische Methoden**

#### **1.1 Herstellung einer Übernachtskultur**

Zur Gewinnung einer Übernachts-Kultur (ÜNK) wurde eine Kolonie einer auf Agar frisch überimpften Kultur mit einem sterilen Glasstab abgenommen und in einem sterilen Glasröhrchen mit entsprechender Bouillon verrieben. Im Anschluss wurde das so beimpfte Medium über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator (Certomat H, B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Deutschland) bei 130 rpm inkubiert.

#### **1.2 Anlegen einer Glycerin-Dauerkultur**

Zunächst wurden Probenröhrchen mit Schraubverschluss mit 0,5 mL NI-Bouillon und Glycerin (87 %) im Verhältnis 1:1 und ca. 10 Glasperlen gefüllt, verschlossen und autoklaviert.

Um die Glycerin-Dauerkultur (Glycerin-DK) anzulegen, wurden anschließend drei bis fünf Kolonien einer frisch überimpften Kultur mit einem sterilen Glasstab abgenommen. Die so abgenommenen Kolonien wurden in dem sterilen Probenröhrchen mit den Glasperlen verrührt. Das beimpfte Probenröhrchen wurde nun 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Das überstehende Medium wurde mit einer Pipette abgenommen, das Probenröhrchen verschlossen und in einem Kryo-Block schockgefroren. Die so gewonnene Glycerin-DK wurde bei -80 °C gelagert.

Zur Ausimpfung der Glycerin-DK wurde dem Probenröhrchen mit einer Platin-Öse, die zuvor durch Ausglühen in einer Bunsenbrennerflamme sterilisiert wurde, eine Glasperle entnommen und diese auf einer Agar-Platte ausgestrichen (112). Im Anschluss wurde die beimpfte Platte bei 37 °C im Brutschrank für 24 h inkubiert.

#### **1.3 Bestimmung der MHK nach der Mikrodilutionsmethode**

##### **1.3.1 Herstellung der Wirkstoffverdünnungen**

Die erforderliche Menge Antibiotikum für die Herstellung eines bestimmten Volumens der Antibiotika-Stammlösung ergibt sich aus der Formel in Tabelle 29.

**Tabelle 29** Berechnung der Einwaage für die Antibiotika-Stammlösung

$$\text{Massenanteil}_{\text{Antibiotikum}}(\text{mg}) = \frac{\text{Volumen}_{\text{Lösemittel}}(\text{mL}) \cdot \text{benötigte Konzentration}_{\text{Antibiotikum}}(\mu\text{g/mL})}{\text{Mikrobiologischer Aktivitätsfaktor}(\mu\text{g/mg})^{\text{a}}}$$

<sup>a</sup>Der Mikrobiologische Aktivitätsfaktor drückt den Anteil an wirksamen Gehalt in  $\mu\text{g}$  pro  $\text{mg}$  aus

Die errechnete Menge an Antibiotikum wurde in der gewünschten Menge Aqua bidest. gelöst. Wenn nötig wurde das Antibiotikum unter Zusatz von Essigsäure (1 %) oder Salzsäure (1 %) gelöst. Die Lösung wurde mit einer sterilen Einmalspritze aufgenommen und durch einen Steril-Filter in ein steriles Zentrifugenröhrchen gegeben. Die so hergestellte Lösung wurde bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die hergestellte Antibiotikum-Stammlösung wurde mit Mueller-Hinton-Bouillon im Verhältnis 1:10 verdünnt. Anschließend wurde mit Mueller-Hinton-Bouillon eine serielle Verdünnungsreihe in sterilen Zentrifugenröhrchen im Verhältnis 1:2 erstellt. Wenn nötig wurde nach der zugrunde liegenden Vorschrift (113, 114) supplementierte Mueller-Hinton-Bouillon verwendet.

### 1.3.2 Herstellung der MHK-Platten

Von der hergestellten seriellen Verdünnungsreihe wurden nun  $50\text{ }\mu\text{L}$  in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen, U-Form) gegeben.

### 1.3.3 Herstellung des Inokulums zur Beimpfung der MHK-Platten

Die Einstellung des Inokulums (Testvolumen) erfolgte photometrisch. Dazu wurde zunächst mit steriler, isotoner Kochsalz-Lösung ein Nullabgleich bei  $\lambda = 550\text{ nm}$  vorgenommen. Anschließend wurde aus einer ÜNK eine entsprechende Menge Kultur entnommen und diese in  $4,5\text{ mL}$  steriler, isotoner Kochsalzlösung verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden  $1,0\text{ mL}$  entnommen und bei  $\lambda = 550\text{ nm}$  die optische Dichte (OD) gemessen. Die so vermessene Lösung sollte ein OD von  $0,125 \pm 0,02$  besitzen. Dies entspricht einer Dichte der Bakteriensuspension von  $1,5 \times 10^8\text{ KBE/mL}$  (= McFarland-Standard 0,5).

Das hergestellte Inokulum wurde mit Mueller-Hinton-Bouillon im Verhältnis 1:100 verdünnt. Anschließend wurden  $50\text{ }\mu\text{L}$  der Verdünnung entsprechend in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen, U-Form) gegeben.

### 1.3.4 Auswertung der MHK-Platten

Die inokulierten Mikrotitrationsbehältnisse wurden nun  $18\text{ h} \pm 2\text{ h}$  bei  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert und anschließend ausgewertet. Bei der Auswertung wurde zunächst die Wachstumskontrolle durchgeführt. In keiner anderen Vertiefung sollte ein stärkeres Wachstum als bei der Wachstumskontrolle zu finden sein. Die mitgeführten Stämme mussten den Anforderungen

der zugrunde liegende Vorschrift entsprechen (113, 114). Als nächstes wurde die minimale Hemmkonzentration bestimmt. Die MHK ist definiert als die niedrigste Konzentration eines Antibiotikums [mg/L], bei der kein sichtbares Wachstum zu erkennen ist. Das Ergebnis der MHK-Bestimmung für den zu testenden Stamm wurde nach der zugrunde liegenden Vorschrift nach „sensibel“ (S), „intermediär“ (I) und „resistent“ (R) eingeteilt (113, 114). Das Ergebnis „intermediär“ bedeutet eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber dem getesteten Antibiotikum bei therapeutischen Konzentrationen.

#### **1.4 Unterscheidung zwischen konstitutiven und induzierbarem Phänotyp der durch *erm*-codierte rRNA-Methyltransferasen vermittelten Makrolid-Resistenz bei *S. aureus* durch Double-Disc-Test**

Die alleinige Einteilung von Stämmen nach ihrer Makrolid-Empfindlichkeit erwies sich als häufig nicht ausreichend. So kann bei Isolaten von *S. aureus*, die eine verminderte Empfindlichkeit oder Resistenz gegenüber Erythromycin aufweisen, ein induzierbarer oder konstitutiver Phänotyp vorliegen, welcher für die Wahl des richtigen Antibiotikums zur Behandlung entscheidend ist. Der einfachste und zuverlässigste Nachweis zur Unterscheidung der beiden Phänotypen ist der Agardiffusionstest in Form des Double-Disc-Test (DD-Test). Dazu wurde der zu testende Stamm auf einer Mueller-Hinton-Agar-Platte mit einem, in einer auf McFarland Standard 2,0 ( $KBE = 6 \times 10^8$  KBE/mL) eingestellten Bakteriensuspension getränkten, sterilen Tupfer fächerförmig ausgestrichen. Im Anschluss wurden zwei Testplättchen mit Antibiotikum (Erythromycin 15  $\mu$ g und Clindamycin 2  $\mu$ g) in einem Abstand von ca. 25 mm auf dieser beimpften Agar-Platte angebracht (115, 116).

Die beimpften Platten wurden nun für 18 h  $\pm$  2 h bei 36 °C  $\pm$  1 °C inkubiert und anschließend ausgewertet.

Der konstitutive Phänotyp zeichnet sich durch eine Resistenz gegenüber Erythromycin und Clindamycin aus, während bei dem induzierbaren Phänotyp ein Antagonismus zwischen den beiden Antibiotika nachweisbar ist. Dieser wird durch die Ausbildung einer D-förmigen Wachstumszone innerhalb eines großen Clindamycin-Hemmhofs in dem Bereich, der zum Erythromycin-Testplättchen benachbart ist, erkennbar. Die Resistenzinduktion der getesteten Stämme in diesem Bereich gegenüber Clindamycin, erfolgt durch die Diffusion des Erythromycins in den Agar um das benachbarte Clindamycin-Testplättchen, wodurch die phänotypische Resistenz der Stämme induziert und das Wachstum gegenüber Clindamycin gehemmt wird.

## **1.5 Induzierung der durch *erm*-codierte rRNA-Methyltransferasen vermittelten Makrolid-Resistenz bei *S. aureus***

Zur Untersuchung der durch *erm*-codierte rRNA-Methyltransferasen vermittelten Makrolid-Resistenz bei *S. aureus* wurden in Rahmen dieser Arbeit Stämme, welche einen nachgewiesenen induzierbaren Phänotyp dieses Resistenztypen besitzen, *in-vitro* mit Erythromycin induziert. Dazu wurde eine Methode verwendet, die von Weaver und Pattee 1964 etabliert wurde (117).

Zunächst wurde in einem sterilen 50 mL Zentrifugenröhrchen eine ÜNK des zu untersuchenden Stammes mit 10 mL LB-Medium angesetzt und wie unter C1.1 beschrieben inkubiert. Im Anschluss wurde die ÜNK für 20 Min. bei 8500 g (4 °C) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in frischem LB-Medium mit einer Erythromycin-Konzentration von 0,1 µg/mL resuspendiert und für 60 Min. bei 180 rpm (37 °C) im Schüttelinkubator (Certomat R, B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz sofort auf Eis gestellt und 1000 µL dieser Suspension in 50 mL LB-Medium gegeben und bei 130 rpm (37 °C) im Schüttelinkubator (Certomat R, B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Deutschland) inkubiert. Die Isolierung der Gesamt-RNA der Bakterien zur weiteren Verwendung erfolgte wie unter C2.2. beschrieben.

## **1.6 Untersuchung des Einfluss von Effluxpumpen auf die verminderte Empfindlichkeit oder Resistenz von *S. aureus* gegenüber Fluorchinolonen**

Bei bestimmten, ausgewählten Stämmen, die eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber dem getesteten Antibiotikum zeigen, kommt als Ursache für die verminderte Empfindlichkeit die Überexpression einer Effluxpumpe in Betracht, die das Antibiotikum aus der Zelle von seinem Wirkort heraus transportiert. Zur Untersuchung dieser Ursache wurde die MHK in Gegenwart eines Effluxpumpen-Inhibitors durchgeführt. Dazu wurde das verwendeten Nährmedium mit einer zuvor getesteten Konzentration eines Inhibitors versetzt und die MHK wie unter C1.3. beschrieben bestimmt. Als Inhibitor wurde in dieser Arbeit Phenylalanyl-Arginyl-β-Naphthylamid in einer Konzentration von 32 mg/L eingesetzt.

## 1.7 Bestimmung der Generationszeit

Für bestimmte Stämme wurde, um einen möglichen Fitness-Verlust zu untersuchen, die Generationszeit  $\nu$  bestimmt, indem die optische Dichte (OD) gegen die Zeit  $t$  aufgetragen wurde.

Zunächst wurde eine Übernacht-Kultur des zu untersuchenden Stammes 1:100 in LB-Medium verdünnt und im Schüttelinkubator (Certomat R, B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Deutschland) bei 130 rpm bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte in regelmäßigen Abständen eine Probenentnahme, welche dann photometrisch bei  $\lambda = 600$  nm vermessen wurde.

In der graphischen Auftragung der OD bei  $\lambda = 600$  nm gegen die Zeit  $t$  wurde aus den Messwerten in der exponentiellen Wachstumsphase eine lineare Regressionsgrade erstellt und von dieser die Steigung  $m$  ermittelt. Die Generationszeit  $\nu$  des zu untersuchenden Stammes ergibt sich aus dem reziproken Wert der Steigung  $m$  der Regressionsgerade.

## 2 Molekularbiologische Methoden

### 2.1 Isolierung von chromosomaler DNA

Die Isolierung chromosomaler DNA aus *S. aureus* und *Enterococcus* spp. erfolgte mit Hilfe des DNeasy Blood & Tissue Kit der Fa. Qiagen (Hilden, Deutschland). Dazu wurden zunächst 500 µL einer ÜNK in ein steriles 1,5 mL Eppendorf-Gefäß gegeben und 10 Min. bei 5.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 180 µL frisch angesetzten Enzymatic Lysis Buffer mit einer Lysozym-Konzentration von 20 mg/mL Lysozym suspendiert. Die Suspension wurde 30 Min. bei 37 °C im Schüttelinkubator (Certomat H, B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Deutschland) bei 130 rpm inkubiert. Anschließend wurde 25 µL Proteinase K ( $c_{\text{Proteinase K}} = 20 \text{ mg/mL}$ ) und 200 µL Buffer AL hinzu gegeben und der Ansatz für 15 s gründlich gemischt. Nach 30 Min. Inkubation bei 56 °C wurde 200 µL Ethanol abs. hinzu gegeben und der Ansatz gründlich gemischt. Die Suspension wurde nun in ein DNeasy Mini spin column mit einem 2 mL Auffanggefäß überführt und dann 1 min bei 6.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss und das Auffanggefäß wurden verworfen und die Säule in ein neues 2 mL Auffanggefäß gesetzt. Nun wurden 500 µL Buffer AW1 hinzugeben und erneut 1 Min. bei 6.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss und das Auffanggefäß wurden wieder verworfen und die Säule in ein neues 2mL Auffanggefäß gesetzt. Jetzt wurden 500 µL Buffer AW2 hinzugegeben und 3 Min. bei 20.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule in ein steriles 1,5 mL Eppendorfgefäß gesetzt. Im Anschluss wurden 200 µL Buffer AE in die Mitte der Membran gegeben und 1 Min. bei RT inkubiert und darauf für 60 s bei 6.000 g zentrifugiert. Die Säule wurde verworfen, die DNA befindet sich jetzt im 1,5 mL Eppendorfgefäß. Die so isolierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung luftdicht verschlossen bei  $-20 \text{ °C}$  gelagert.

### 2.2 Isolierung von Gesamt RNA

Für das Arbeiten mit RNA müssen grundsätzlich besondere Vorkehrungen getroffen werden (118). So wurde, um Kontaminationen mit RNasen zu vermeiden, bei allen Arbeiten Einmalhandschuhe getragen. Weiterhin wurden die Arbeiten an einem abgetrennten RNase-freien Arbeitsplatz unter Verwendung eines separaten Pipettensatzes mit RNase-freien Filterspitzen durchgeführt.

Alle Puffer und Lösungen wurden mit RNase-freiem Wasser angesetzt. Dieses wurde durch Zugabe von 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC), kräftigem Schütteln, Inkubation über Nacht bei 37 °C und anschließendem Autoklavieren zubereitet. Die Bildung von kovalenten

Bindungen zwischen DEPC und primären und sekundären Aminen führt zur Zerstörung von RNAsen. Außerdem wurden RNase-freie Reaktionsgefäße verwendet, sowie Glasgeräte durch Spülen mit SDS-Lösung (0,5 %) und RNase-freiem Wasser oder Inkubation für vier Stunden in trockener Hitze bei 210 °C dekontaminiert.

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus *S. aureus* erfolgte unter Verwendung des Nucleospin RNA II Kit der Firma Machery und Nagel (Düren, Deutschland). Zuerst wurden 500 µL einer ÜNK in 50 mL LB-Bouillon pipettiert und bei 37 °C, 130 rpm inkubiert (Certomat H, B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Deutschland). Bei Erreichen einer OD von 1,0-1,2 ( $\lambda = 600$  nm) wurden 500 µL abgenommen und in ein steriles 2,0 mL Eppendorf-Gefäß pipettiert.

Anschließend wurden 1000 µL RNAProtect Bacteria Reagent hinzugegeben und sofort für 5 s gründlich gemischt. Der Ansatz wurde für 5 Min. bei RT inkubiert und dann für 25 Min. bei 17.000 g (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde nun vollständig, aber vorsichtig abdekantiert und das Pellet über Nacht bei -70 °C eingefroren. Das Pellet wurde nach dem Auftauen für 2 Min. bei 14.000 g abzentrifugiert und eventuell noch vorhandener Überstand abgenommen. Das Pellet wurde nun in 100 µL frisch angesetztem Enzymatic Lysis Buffer mit Lysozym (60 mg/mL) und  $\beta$ -Mercaptomethanol (1 %) suspendiert. Dann wurden 25 U Lysostaphin hinzugegeben. Die Suspension wurde nun für 60 Min. bei 37 °C im Schüttelinkubator (Certomat R, B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Deutschland) bei 130 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden 350 µL Buffer RA1 hinzugegeben und die Suspension kräftig gemischt. Jetzt wurde ein NucleoSpin Filter in ein „collection tube“ gegeben, der Ansatz dazugegeben und für 1 Min. bei 11.000 g zentrifugiert. Nun wurden 350 µL Ethanol (70 %) zu dem Durchfluss hinzugegeben und durch mehrmaliges Pipettieren gemischt. Der Ansatz wurde jetzt in ein NucleoSpin RNA II column überführt und für 30 s bei 11.000 g zentrifugiert. Jetzt wurden 350 µL Buffer MDB auf die Säule gegeben und 1 Min. bei 11.000 g zentrifugiert. Zur Entfernung von genomischer DNA wurden zunächst 10 µL rDNase in 90 µL Reaction Buffer for rDNase suspendiert und durch Invertieren gemischt. Von dieser Lösung wurden 95 µL direkt auf die Membran der Säule gegeben und für 15 Min. bei RT inkubiert. Anschließend wurden 200 µL Buffer RA2 hinzugegeben und für 30 s bei 11.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und ein neues „collection tube“ verwendet. Jetzt wurden 600 µL Buffer RA3 hinzugegeben und für 30 s bei 11.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und das „collection tube“ erneut verwendet. Nun wurden 250 µL Buffer RA3 hinzugegeben und für 2 Min. bei 11.000 g zentrifugiert. Das NucleoSpin RNA II column wurde in ein steriles, RNase freies 1,5 mL

Eppendorf-Gefäß gesetzt, 50 µL RNase-freies Wasser hinzugegeben und für 1 Min. bei 11.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut auf die Säule gegeben und wiederholt für 1 Min. bei 11.000 g zentrifugiert. Die Säule wurde verworfen und die so isolierte Gesamt-RNA aliquotiert bei -70 °C gelagert.

### 2.2.1 Photometrische Quantifizierung der isolierten RNA

Zur genauen Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA wurde diese in TE-Puffer pH 7,5 verdünnt und in einer für UV-Licht durchlässigen Küvette bei  $\lambda = 260$  nm vermessen. Die Konzentration der RNA konnte nun mit folgender Formel berechnet werden (Tabelle 30).

**Tabelle 30** Berechnung der RNA-Konzentration

Konzentration RNA ( $\mu\text{g/mL}$ ) = $A_{260\text{nm}}^1 \cdot A_{260\text{nm}} \cdot f$
$A_{260\text{nm}}^1 = 44 \mu\text{g/mL}$ ; entspricht der Konzentration einer RNA-haltigen Lösung mit der Absorption $A = 1$
$A_{260\text{nm}}$ = gemessene Absorption
f = Verdünnungsfaktor

### 2.2.2 Überprüfung der isolierten RNA auf Reinheit

Zur Überprüfung auf mögliche Verunreinigungen z. B. durch Proteine, wurde gleichzeitig während der Quantifizierung (siehe C2.2.1.) auch die Absorption bei  $\lambda = 280$  nm gemessen. Der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  (Ratio) gibt eine ungefähre Aussage über die Reinheit der RNA. Eine reine RNA-Lösung muss einen Quotienten von 1,9-2,1 aufweisen (118).

### 2.2.3 Überprüfung der isolierten RNA auf Unversehrtheit

Um die isolierte RNA auf einen möglichen Abbau mit RNasen zu überprüfen, wurde ein Aliquot der isolierten RNA in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe C2.5.1). Dabei wurde ein denaturierender Ethidiumbromid-haltiger RNA-Ladepuffer verwendet, um RNA-Sekundärstrukturen aufzulösen (119). Die Probe wurde vor dem Auftragen auf das Agarosegel für 10 Min. bei 70 °C inkubiert und im Anschluss sofort auf Eis gestellt. Die Banden der rRNA sollten als klare und scharfe Banden deutliche zu erkennen sein, zudem sollte das Verhältnis zwischen der Bande der 23S- und 16S rRNA im Verhältnis 2:1 betragen (118).

## 2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction; PCR) ist eine einfache Methode zur exponentiellen Vervielfältigung von ausgewählten DNA-Abschnitten *in-vitro*, welche thermostabile DNA-Polymerasen benutzt (120). Für die Durchführung muss die Nukleotidsequenz des Randbereichs des ausgewählten DNA-Abschnitts bekannt sein, so dass für jeden DNA-Einzelstrang ein komplementärer Nukleotidstrang (Primer) erstellt werden kann. Durch die Verlängerung dieser durch die DNA-Polymerase, entsteht eine Kopie des ursprünglichen DNA-Abschnittes.

Der typische Ablauf einer PCR besteht aus verschiedenen Schritten mit unterschiedlichen Temperaturstufen. Zunächst wird durch Temperaturerhöhung auf 92-98 °C die zu vervielfältigende DNA (Template) in ihre Einzelstränge denaturiert (Denaturierung). Im nächsten Schritt wird durch Erniedrigung der Temperatur ein Anlagern (Annealing) der Primer mit einem freien 3'-OH-Ende ermöglicht. Diese Anlagerungstemperatur wird durch Basensequenz der Primer bestimmt, welche für die Spezifität der PCR entscheidend ist. Nach diesem Schritt wird die Temperatur auf 72 °C erhöht, welche das Aktivitätsoptimum des verwendeten Enzyms, der *Taq*-Polymerase darstellt und eine schnelle Verlängerung (Extension) der Primer am 3'-OH-Ende gewährleistet. Die Dauer dieser Verlängerung ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes und beträgt im Allgemeinen bei einer *Taq*-Polymerase etwa eine Minute für 1000 Basenpaare.

Die PCR besteht aus der stetigen Wiederholung der Schritte Denaturierung, Annealing und Extension, wobei in den folgenden Zyklen auch neu amplifizierte DNA-Abschnitte als Template dienen, so dass es zu einer exponentiellen Vermehrung kommt. Im Allgemeinen reichen 30-35 Zyklen für die Amplifizierung einer ausreichenden Menge an DNA. Die Tabelle 31 gibt einen Überblick über ein typisches Temperaturprofil einer PCR.

**Tabelle 31** Temperatur- und Zeit-Profil für eine Standard-PCR

Schritt	T	t
1. Initialdenaturierung	94 °C	5 min
2. Denaturierung	94 °C	30 s
3. Annealing	$T_A$ °C	30 s
4. Extension	$T_E$ °C	$t_E$
5. Verlängerte Extension	$T_E$ °C	$t_E$

Anzahl der Zyklen 2-4: 30-35

$T_A$  = Anlagerungs-Temperatur

$T_E$  = Extensions-Temperatur

$t_E$  = Extensions-Zeit

Die Schritte 2 bis 4 wurden während der PCR entsprechend wiederholt. Die Durchführung erfolgt in automatischen Thermocyclern (siehe B8.1).

Dem Ansatz aus Template, Primer und *Taq*-Polymerase wurden vor Beginn der Reaktion noch 2'-Desoxynukleotide (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) zugesetzt, sowie ein auf die *Taq*-Polymerase abgestimmter Puffer mit geeigneter  $Mg^{2+}$ -Konzentration (120). Anschließend wird auf ein entsprechendes Volumen mit Aqua bidest. aufgefüllt.

### **2.3.1 Detektion von Resistenz-Mechanismen mit Hilfe der PCR**

Ausgewählte Isolate, die eine bestimmte phänotypische Resistenz zeigten, wurden zusätzlich genotypisch hinsichtlich ihres genauen Resistenz-Mechanismus untersucht. Dabei wurde als häufigste Methode die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt um gezielt Abschnitte eines bestimmten für die Resistenz in Frage kommenden Gens zu amplifizieren und nachzuweisen. Ein positiver Nachweis des Gens kann als Ursache für die Resistenz interpretiert werden. Darüber hinaus wurden mit Hilfe der PCR vervielfältigte Abschnitte weiter mit dem Cycle-Sequencing und Pyrosequencing™ untersucht. Das Ziel dieser weiteren Untersuchung war es, Punktmutationen in bestimmten Genen nachzuweisen, die für bestimmte Antibiotika als Zielstrukturen dienen und welche zu einer verminderten Empfindlichkeit oder Resistenz führen können.

#### **2.3.1.1 Nachweis des Aminoglykosid-modifizierenden Enzyms AAC(6')-APH(2'') bei Gentamicin-hochresistenten *Enterococcus* spp. mit Hilfe der PCR**

Für die genauere Untersuchung der Ursache für eine hohe Unempfindlichkeit bei *Enterococcus* spp. gegenüber Gentamicin ( $MHK \geq 500$  mg/L) wurde für diese Arbeit eine PCR entwickelt, die ein 541 bp Fragment des für die Resistenz in Frage kommenden Doppelenzyms AAC(6')-APH(2'') amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit Hilfe eines Agarosegels (1,2 %) aufgetrennt und unter UV-Licht durch Ethidiumbromid detektiert. Als Positiv-Kontrolle diente ein PCR-Produkt, das aus der DNA von *E. faecalis* ATCC® 51229 gewonnen wurde, sowie als Negativ-Kontrolle ein PCR-Produkt aus der DNA von *E. faecalis* ATCC® 29212. Das Vorhandensein einer Bande gibt einen Hinweis auf die Ursache der Resistenz durch die Expression des Doppelenzyms AAC(6')-APH(2''). Die nachfolgenden Tabellen zeigen die Zusammensetzung des Ansatzes für die PCR (Tabelle 32) und das durchgeführte Temperatur- und Zeitprofil (Tabelle 33).

**Tabelle 32** Zusammensetzung des PCR-Ansatzes [*aac(6')*+*aph(2'')*]

Bestandteil	$\mu\text{L}$
1. 10x ThermoPolReaction Buffer	2,5
2. <i>APH(6')</i> - <i>AAC(2'')</i> FP <sup>a</sup>	0,5
3. <i>APH(6')</i> - <i>AAC(2'')</i> RP <sup>a</sup>	0,5
4. dNTP-Mix (je 2 mM)	0,625
5. <i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0,125
6. DNA (DNEasy Tissue Kit)	1,0
7. Aqua bidest.	Ad 25,0

<sup>a</sup> **Konzentration der Primer-Lösung: 10 pmol/ $\mu\text{L}$**

**Tabelle 33** Temperatur- und Zeitprofil [*aac(6')*+*aph(2'')*]

Schritt	T	t
1. Initialdenaturierung	94 °C	5 min
2. Denaturierung	94 °C	30 s
3. Annealing	56 °C	30 s
4. Extension	72 °C	30 s
5. Verlängerte Extension	72 °C	5 min
6. Kühlphase	4 °C	$\infty$

**Anzahl der Zyklen 2-4: 30**

### 2.3.1.2 Nachweis der *vanA*-, *vanB*- und *vanC*-Gene bei Vancomycin-resistenten *Enterococcus* spp. mit Hilfe einer Multiplex-PCR

Zur genaueren Unterscheidung des Resistenz-Genotyps bei *Enterococcus* spp. gegenüber Glykopeptiden, aber auch zur Bestätigung des Ergebnisses der MHK-Bestimmung, wurde für diese Arbeit eine in der Literatur zuvor beschriebene Multiplex-PCR verwendet (106). *Enterococcus* spp., deren MHK-Wert eine Unempfindlichkeit oder eingeschränkte Empfindlichkeit gegenüber Teicoplanin oder Vancomycin aufzeigen, tragen möglicherweise verschiedene Resistenzgene, die mit dieser Multiplex-PCR nachgewiesen und differenziert werden konnten. Dazu wurden in einen Ansatz für die PCR insgesamt sechs Primerpaare eingesetzt, die für die Resistenz in Frage kommenden Gene *vanA* (1030 bp), *vanB* (433 bp), *vanC1* (822 bp) und *vanC2/3* (484 bp) nachweisen, sowie eine gleichzeitige Species-Zuordnung nach *E. faecalis* (941 bp) und *E. faecium* (658 bp) durchführten. Das PCR-Produkt wurde mit Hilfe eines Agarosegels (1,3 %) aufgetrennt und unter UV-Licht durch Ethidiumbromid detektiert. Als Positiv-Kontrolle für das *vanA*-Gen diente ein PCR-Produkt, das aus der DNA von *E. faecium* BM4174 gewonnen wurde, für das *vanB*-Gen ein Produkt aus der DNA von *E. faecalis* V583 für das *vanC1*- und *vanC2/3*-Gen jeweils PCR-Produkte aus der DNA von *E. gallinarum* BM4174 und *E. casseliflavus* ATCC<sup>®</sup> 25788 sowie als Negativ-Kontrolle ein PCR-Produkt aus der DNA von jeweils *E. faecalis* ATCC<sup>®</sup> 29212 und

*Enterococcus malodoratus* ATCC<sup>®</sup> 43197. Der Stamm *E. faecalis* ATCC<sup>®</sup> 29212 diente dabei als Negativ-Kontrolle für den *van*-Gen Nachweis, während der Stamm *E. malodoratus* ATCC<sup>®</sup> 43197 als Negativ-Kontrolle für die *Enterococcus* spp. Zuordnung angewandt wurde. Die nachfolgenden Tabellen zeigen eine Zusammensetzung des Ansatzes für die PCR (Tabelle 34) und das durchgeführte Temperaturprofil (Tabelle 35).

**Tabelle 34** Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (*van*)

Bestandteil	µL
1. 10x ThermoPolReaction Buffer	2,5
2. VRE <i>vanA</i> FP <sup>a</sup>	0,25
3. VRE <i>vanA</i> RP <sup>a</sup>	0,25
4. VRE <i>vanB</i> FP <sup>a</sup>	0,125
5. VRE <i>vanB</i> RP <sup>a</sup>	0,125
6. VRE <i>vanC1</i> FP <sup>a</sup>	0,125
7. VRE <i>vanC1</i> RP <sup>a</sup>	0,125
8. VRE <i>vanC2/3</i> FP <sup>a</sup>	0,125
9. VRE <i>vanC2/3</i> RP <sup>a</sup>	0,125
10. VRE <i>E. faecium</i> FP <sup>a</sup>	0,1
11. VRE <i>E. faecium</i> RP <sup>a</sup>	0,1
12. VRE <i>E. faecalis</i> FP <sup>a</sup>	0,25
13. VRE <i>E. faecalis</i> RP <sup>a</sup>	0,25
14. dNTP-Mix (je 2 mM)	0,625
15. <i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/µL)	0,125
16. DNA (DNEasy Tissue Kit)	2,5
17. Aqua bidest.	Ad 25,0

<sup>a</sup> Konzentration der Primer-Lösung: 10 pmol/µL

**Tabelle 35** Temperatur- und Zeitprofil (*van*)

Schritt	T	t
1. Initialdenaturierung	94 °C	5 min
2. Denaturierung	94 °C	1 min
3. Annealing	55 °C	1 min
4. Extension	72 °C	1 min
5. Verlängerte Extension	72 °C	10 min
6. Kühlphase	4 °C	∞

Anzahl der Zyklen 2-4: 30

### 2.3.1.3 Nachweis des *mecA*-Gens bei Methicillin-resistenten *S. aureus* Isolaten mit Hilfe der PCR

Für *S. aureus* Isolate mit Resistenz gegenüber Oxacillin wurde zur Verifizierung des Ergebnisses der MHK-Bestimmung eine PCR entwickelt, die ein 549 bp Fragment des *mecA*-Gens vervielfältigt. Dieses Gen ist codiert das für die Resistenz gegenüber Oxacillin verantwortliche PBP2a. Ein positiver Nachweis ist ein Beweis dafür, dass bei diesem Isolat das *mecA*-Gen vorliegt und eine Resistenz gegenüber Methicillin in hohem Maß

wahrscheinlich ist. Jedoch kann über den Expressionsstatus der Resistenz gegenüber Methicillin keine Aussage getroffen werden (121). Bei einem negativen Ergebnis der PCR trotz phänotypischer Resistenz gegenüber Oxacillin, können andere Faktoren zu dieser Unempfindlichkeit, wie zu Beispiel eine Überproduktion von  $\beta$ -Lactamasen durch das Isolat führen (121). Das PCR-Produkt wurde mit Hilfe eines Agarosegels (1,0 %) aufgetrennt und unter UV-Licht durch Ethidiumbromid detektiert. Als Positiv-Kontrolle diente ein PCR-Produkt, das aus der DNA von *S. aureus* ATCC<sup>®</sup> 44300 gewonnen wurde, sowie als Negativ-Kontrolle ein PCR-Produkt aus der DNA von *S. aureus* ATCC<sup>®</sup> 29213. Die folgenden Tabellen zeigen eine Zusammensetzung des Ansatzes für die PCR (Tabelle 36) und das durchgeführte Temperaturprofil (Tabelle 37).

**Tabelle 36** Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (*mecA*)

Bestandteil	$\mu\text{L}$
1. 10x ThermoPolReaction Buffer	2,5
2. <i>S. aureus</i> PBP2a FP <sup>a</sup>	0,5
3. <i>S. aureus</i> PBP2a RP <sup>a</sup>	0,5
4. dNTP-Mix (je 2 mM)	0,625
5. <i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0,125
6. DNA (DNEasy Tissue Kit)	1,0
7. Aqua bidest.	Ad 25,0

<sup>a</sup> Konzentration der Primer-Lösung: 10 pmol/ $\mu\text{L}$

**Tabelle 37** Temperatur- und Zeitprofil (*mecA*)

Schritt	T	t
1. Initialdenaturierung	94 °C	5 min
2. Denaturierung	94 °C	30 s
3. Annealing	59 °C	45 s
4. Extension	72 °C	30 s
5. Verlängerte Extension	72 °C	5 min
6. Kühlphase	4 °C	$\infty$

Anzahl der Zyklen 2-4: 35

### 2.3.1.4 Nachweis der *ermA*- und *ermC*-Gene bei Erythromycin-resistenten *S. aureus* Isolaten mit Hilfe einer Duplex PCR

Zur genaueren Differenzierung bei *S. aureus* Isolaten mit einer durch MHK-Bestimmung ermittelten Resistenz gegenüber Erythromycin wurde für diese Arbeit eine Duplex-PCR entwickelt, die zwischen den beiden am häufigsten für die Resistenz gegenüber Erythromycin vermittelnden rRNA-Methyltransferasen ErmA und ErmC unterscheidet (47). Dazu wurde mit Hilfe der PCR ein 430 bp Fragment des *ermA*-Gens und ein 280 bp Fragment des *ermC*-Gens amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit Hilfe eines Agarosegels (1,5 %) aufgetrennt

und unter UV-Licht durch Ethidiumbromid detektiert. Als Positiv-Kontrolle für das *ermA*- und *ermC*-Gen dienten PCR-Produkte, die aus der DNA aus *Staphylococcus intermedius* und *S. aureus* Stämmen isoliert wurde. Diese hatten zuvor den entsprechenden Genabschnitt durch Transformation erhalten. Als Negativ-Kontrolle wurde ein PCR-Produkt aus der DNA von *S. aureus* ATCC® 29213 verwendet. Die weiteren Tabellen zeigen eine Zusammensetzung des Ansatzes für die PCR (Tabelle 38) und das durchgeführte Temperaturprofil (Tabelle 39).

**Tabelle 38** Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (*erm*)

Bestandteil	µL
1. 10x ThermoPolReaction Buffer	2,5
2. <i>S. aureus ermA</i> FP <sup>a</sup>	0,5
3. <i>S. aureus ermA</i> RP <sup>a</sup>	0,5
4. <i>S. aureus ermC</i> FP <sup>a</sup>	0,5
5. <i>S. aureus ermC</i> RP <sup>a</sup>	0,5
6. dNTP-Mix (je 2 mM)	0,625
7. <i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/µL)	0,125
8. DNA (DNEasy Tissue Kit)	1,0
9. Aqua bidest.	Ad 25,0

<sup>a</sup> Konzentration der Primer-Lösung: 10 pmol/µL

**Tabelle 39** Temperatur- und Zeit-Profil (*erm*)

Schritt	T	t
1. Initialdenaturierung	94°C	5min
2. Denaturierung	94°C	30s
3. Annealing	59°C	45s
4. Extension	72°C	30s
5. Verlängerte Extension	72°C	5min
6. Kühlphase	4°C	∞

Anzahl der Zyklen 2-4: 35

Bei Fehlen einer Bande, die auf eine rRNA-Methyltransferase (codiert durch das *ermA*- oder *ermC*-Gen) zurückschließen lassen, wurde im Anschluss eine PCR unter den gleichen Bedingungen der Duplex-PCR durchgeführt jedoch unter Verwendung eines spezifischen Primerpaares, welches ein 539 bp Fragment des Gens, das für die rRNA-Methyltransferase ErmB codiert, vervielfältigt. Diese Methyltransferase spielt eine eher untergeordnete Rolle bei der Resistenz von *S. aureus* gegenüber Erythromycin. Der fehlende Nachweis der drei Methyltransferasen lässt auf einen anderen Resistenzmechanismus schließen, wie z. B. Inaktivierung des Antibiotikums oder aktiver Efflux aus der Zelle. Die weitere phänotypische Charakterisierung der Isolate hinsichtlich der Art der Expression der nachgewiesenen Methyltransferase erfolgte dann nach C1.4.

### 2.3.1.5 Nachweis des *msrA*-Gens bei Erythromycin-resistenten *S. aureus* Isolaten mit Hilfe der PCR

Bei *S. aureus* Isolaten, die ihre Resistenz gegenüber Makroliden nicht durch Expression einer *erm*-codierten rRNA-Methyltransferase erlangen, kommen als weitere häufigste Ursache für diese Resistenz, die Expression von Effluxpumpen in Frage, die durch die Expression des *msrA*-Gens vermittelt werden (47).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Nachweismethode durch eine PCR etabliert, die dieses Gen nachweist. Dazu wurde ein 338 bp langes Fragment des Gens, welches für das *msrA*-Gen codiert, durch diese PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in einem Agarosegel (1,5 %) aufgetrennt und unter UV-Licht mit Hilfe von Ethidiumbromid detektiert. Als Positiv-Kontrolle für das *msrA*-Gen diente ein PCR-Produkt, welches aus der DNA von *S. aureus* ATCC® BAA-976 isoliert wurde. Als Negativ-Kontrolle wurde ein PCR-Produkt aus der DNA von *S. aureus* ATCC® 29213 verwendet. Die Zusammensetzung des Ansatzes für die PCR sind in der Tabelle 40 aufgeführt, das durchgeführte Temperaturprofil in Tabelle 41.

**Tabelle 40** Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (*msrA*)

Bestandteil	µL
1. 10x ThermoPolReaction Buffer	2,5
2. <i>S. aureus msrA</i> FP <sup>a</sup>	0,5
3. <i>S. aureus msrA</i> RP <sup>a</sup>	0,5
6. dNTP-Mix (je 2 mM)	0,625
7. <i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/µL)	0,125
8. DNA (DNEasy Tissue Kit)	1,0
9. Aqua bidest.	Ad 25,0

<sup>a</sup> Konzentration der Primer-Lösung: 10 pmol/µL

**Tabelle 41** Temperatur- und Zeitprofil (*msrA*)

Schritt	T	t
1. Initialdenaturierung	94 °C	5 min
2. Denaturierung	94 °C	30 s
3. Annealing	55 °C	45 s
4. Extension	72 °C	30 s
5. Verlängerte Extension	72 °C	5 min
6. Kühlphase	4 °C	∞

Anzahl der Zyklen 2-4: 35

Die Abwesenheit einer Bande deutet darauf hin, dass die Resistenz weder auf die Expression einer *erm*-codierten rRNA-Methyltransferase (siehe C2.3.1.4) noch von Effluxpumpen zurückzuführen ist. Somit kommt als mögliche Resistenzursache die Bildung von Enzymen, die die entsprechenden Antibiotika inaktivieren oder Punktmutationen in der Target-Region der 23S rRNA in Frage (47).

## 2.4 Reverse Transcriptase Reaktion

Für die Umschreibung und Amplifikation von RNA in einzelsträngige cDNA durch RNA-abhängige DNA-Polymerasen (Reverse-Transcriptase Reaktion) können drei verschiedene Arten von Primer verwendet werden.

- Sequenzspezifische Primer
- Oligo(dT)-Primer
- kurze *random*-Primer (Hexamere)

Nach der Reverse-Transcriptase Reaktion (RT-Reaktion), in welcher die RNA in einzelsträngige cDNA umgeschrieben wird, kann dieser einzelsträngige cDNA-Strang nun als Template für eine Standard-PCR dienen.

Sequenzspezifische Primer binden sowohl während der RT-Reaktion als auch in der nachfolgenden Standard-PCR spezifisch an die RNA bzw. cDNA, so dass die beiden Reaktionen in einem Ansatz stattfinden können. Oligo(dT)-Primer bestehen aus einer Nukleotidsequenz von 12-18 dTs, die spezifisch an den poly(A)-Schwanz von eukaryontischer mRNA binden. Diese binden nur während der RT, so dass für die Standard-PCR weitere sequenzspezifische Primer benötigt werden. Kurze *random* Primer (Hexamere) sind Gemische aus Hexanukleotiden unterschiedlicher Sequenz und binden zufällig an die RNA. Dadurch kommt es zu einem Gemisch aus unterschiedlich langer cDNAs, die dann mithilfe von sequenzspezifischen Primer weiter amplifiziert werden müssen. Bei den beiden letzteren Primer-Typen ist es notwendig die RT und Standard-PCR in zwei separaten Ansätzen nacheinander durchzuführen (120).

### 2.4.1 Primer-Extension

Eine häufig verwendete Methode, bei der gleichzeitig die Menge sowie das 5'-Ende der zu untersuchenden RNA ermittelt werden kann, ist die Primerverlängerung (Primer-Extension). Dabei wird während der Reaktion eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) verwendet. Als Template für die Reaktion wird einzelsträngige RNA verwendet, an die sich ein Primer mit komplementärer Sequenz zur untersuchenden RNA anlagert. Der spezifische Primer ist dabei an seinem 5'-Ende radioaktiv markiert. Durch Zugabe von Reverser Transkriptase und 2'-Desoxynukleotiden erfolgt nun die Synthese eines zu der RNA komplementären cDNA-Stranges.

Zur Durchführung einer Primer-Extension-Reaktion wird zunächst der folgende Ansatz typischerweise gemischt (Tabelle 42). Die genaue Zusammensetzung kann dabei je nach Fragestellung variieren.

**Tabelle 42** Ansatz 1

Bestandteil	$\mu\text{L}$	Menge
Spezifischer Primer	-	2 pmol/ 1 $\mu\text{g}$ RNA
RNA	-	10-50 $\mu\text{g}$ RNA
dNTP-Mix (je 10mM)	1,0	
H <sub>2</sub> O (RNase-frei)	Ad 12,0	

Der Ansatz wird für 5 Min. bei 65 °C inkubiert, abzentrifugiert und auf Eis gestellt. Im Anschluss wird der Ansatz mit dem folgend Ansatz (Tabelle 43) gemischt, für 2 Min. bei 42 °C inkubiert, abzentrifugiert und auf Eis gestellt.

**Tabelle 43** Ansatz 2

Bestandteil	$\mu\text{L}$
5X First-Strand Buffer	4,0
0.1 M DTT	2,0
RNaseOUT™ (40 U/ $\mu\text{L}$ )	1,0

Zuletzt wurden 1,0  $\mu\text{L}$  SuperScript™ II RT (200 U/ $\mu\text{L}$ ) hinzugegeben und durch Pipetieren gemischt. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation des Ansatzes nach folgendem Programm (Tabelle 44) in einem Thermocycler.

**Tabelle 44** Temperatur- und Zeit-Einstellung für die RT-Reaktion

Schritt	T	t
1. RT-Reaktion	40-45 °C	30-60 min
2. Inaktivierung der Reversen Transkriptase	70 °C	15 min

Die so gewonnene cDNA kann nun in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel aufgetrennt werden und durch die radioaktive Markierung am 5'-Ende autoradiographisch detektiert werden. Die aufgetrennten Fragmente in dem Autoradiogramm liefern nun Informationen über Menge und Größe der gesuchten RNA.

Der Abstand zwischen dem verwendeten spezifischen Primer und dem 5'-Ende der RNA sollte dabei nicht länger als 100 bp betragen, da das Vorhandensein von Sekundärstrukturen und modifizierter Nukleotide (z.B. Methylierungen von Adenin und Guanin) in der RNA zu

einem Abbruch der Primer-Extension-Reaktion führt. Diese vorzeitigen Abbrüche erscheinen in dem Autoradiogramm als zusätzliche Banden. Der Abbruch der Reaktion durch modifizierte Nukleotide in der RNA kann auch gezielt verwendet werden, um Veränderung in der RNA nachzuweisen. So können Aussagen getroffen werden über z.B. verminderte Bindungseigenschaften von Antibiotika an das bakterielle Ribosom durch veränderte Nukleotide.

## 2.5 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Die Größe von DNA-Fragmenten kann nach elektrophoretischer Auftrennung eines Gemisches einfach und schnell bestimmt. Die Auftrennung erfolgt dabei im elektrischen Feld innerhalb einer Trägermatrix, wobei Mittel der Wahl Agarose oder Polyacrylamid sind. Entscheidend für die Wahl des Trägermaterials sind Art und Größe und der zu analysierenden Nukleinsäure.

### 2.5.1 Agarosegele

Agarose ist für die Elektrophorese von doppelsträngigen Nukleinsäuren eines Größenbereiches in Abhängigkeit von der Konzentration der Agarose geeignet (Tabelle 45).

**Tabelle 45** Auftrennung von DNA-Fragmenten bei verschiedenen Agarose-Konzentrationen (120)

Agarose-Konzentrationen [%]	Optimaler Auftrennungsbereich [kb]
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1 2

Abhängig von der erwarteten Größe der zu untersuchenden linearen Nukleinsäure wurde ein Gel mit einer entsprechenden Konzentration hergestellt. Dazu wurde die Agarose in 0,5x Tris-Acetat-Puffer suspendiert und vorsichtig durch Aufkochen gelöst wird. Anschließend wurde nach dem Abkühlen der Agarose zum späteren Identifizierung der Nukleinsäuren Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 0,1 µg/mL hinzugefügt. Durch Interkalation des Ethidiumbromids in DNA-Doppelstränge können die Nukleinsäuren unter UV-Licht-Bestrahlung sichtbar gemacht werden. Das noch flüssige Gel wurde nun in eine

Horizontalgel-Kammer mit Probenkamm gegossen und nach dem vollständigem Erkalten mit 0,5x Tris-Acetat-Puffer überschichtet.

Die zu untersuchenden Nukleinsäuren wurden mit 1 T Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen gegeben. Nach der Auftrennung im elektrischen Feld wurden die Nukleinsäuren unter UV-Licht-Bestrahlung sichtbar gemacht, das Gel mit Hilfe einer Videodokumentationsanlage fotografiert und ausgewertet. Zur Größenabschätzung der Nukleinsäuren wurden Standards mit Nukleinsäuren bekannter Größe gleichzeitig aufgetrennt (siehe B7.2).

## 2.5.2 Polyacrylamid-Gele

Im Vergleich zu Agarosegelen besitzen Gele aus Polyacrylamid ein höheres Auftrennungsvermögen, sowie eine höhere Ladekapazität ohne Auflösungsverlust (Tabelle 46).

**Tabelle 46** Auftrennung von DNA-Fragmenten in Polyacrylamid-Gelen verschiedenen Konzentrationen (120)

Acrylamid-Konzentrationen [%]	Auftrennungsbereich [bp]
3,5	100-2000
5,0	100-500
8,0	60-400
12,0	50-200
15,0	25-150
20,0	5-100

Für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Fragestellung wurde ein Polyacrylamid-Gel mit einer Acrylamid-Konzentration von 15 % gewählt. Zur besseren Auftrennung kleiner cDNA-Fragmente wurde ein denaturierendes Gel mit Hilfe des folgenden Ansatzes gegossen (Tabelle 47).

**Tabelle 47** Zusammensetzung des verwendeten Polyacrylamid-Gels

Bestandteil	Volumen [ $\mu$ L]
40 % Acrylamid-Lösung	1785,0
2 % Bis-Lösung	1875,0
Harnstoff-Lösung (105 g/100mL)	830,0
10x Tris-Borat-Puffer	500,0
TEMED-Lösung	15,0
APS-Lösung (40 %)	5,0
Aqua dem.	ad 5000,0

Dazu wurden alle Bestandteile bis auf die TEMED-Lösung und die APS-Lösung vorsichtig in einem sterilen Zentrifugenröhrchen geschwenkt. Nach Zugabe der beiden Lösungen wird der Ansatz zwischen die Glasplatten, die in der Vertikalkammer eingespannt sind, gegossen und das Ende der Polymerisation abgewartet. Anschließend wird das Geld mit 1x Tris-Borat-Puffer überschichtet.

## **2.6 Aufarbeitung von Nukleinsäuren**

### **2.6.1 Aufreinigung von Nukleinsäuren**

Vor der weiteren Verwendung von durch PCR gewonnenen Nukleinsäuren, ist es oft notwendig, diese aufzureinigen, d. h. von möglicherweise in der Folgereaktion störenden Bestandteilen der PCR wie Salzen, überschüssigen dNTPs, nicht verbrauchten Primern und Enzymen (z. B. Polymerase) zu trennen. Dazu wurde das Nucleo Spin Extract II Kit der Fa. Macherey und Nagel verwendet.

Das Prinzip der Aufreinigung beruht auf der Bindung von Nukleinsäuren an Anionenaustauschersäulen in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen, während Proteine und andere Bestandteile eluiert werden.

Zunächst wurde ein Teil der durch die PCR gewonnenen Nukleinsäure mit zwei Teilen Puffer NT1 gemischt. Anschließend wurde ein Nucleo spin Extract II column in ein Auffanggefäß gesetzt und der Ansatz auf die Membran der Säule pipetiert. Jetzt wurde für eine Minute bei 13.000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nun wurden 600 µL Puffer NT3 hinzugegeben, erneut eine Minuten bei 13.000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Im Anschluss wurde zum Trocknen der Säule zwei Minuten bei 13.000 g zentrifugiert und die Nucleo spin Extract II column in ein steriles 1,5 mL Eppendorf-Gefäß gegeben. Als letztes wurden je nach Ausgangsvolumen 25-50 µL Puffer NE hinzugegeben, der Ansatz für eine Minute bei RT inkubiert und eine Minute bei 13.000 g zentrifugiert. Die Nucleo spin Extract II column wurde verworfen und die so aufgereinigte Nukleinsäuren wurden bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### **2.6.2 Ethanol-Fällung von Nukleinsäuren**

Zur Aufkonzentrierung von Nukleinsäuren wurden diese in Gegenwart von Ethanol gefällt. Dazu wurden zehn Teile der zu konzentrierenden Nukleinsäure-Lösung mit einem Teil 3M Natrium-Acetat (pH 4,6) in einem 1,5 mL Eppendorf-Gefäß gemischt und mit 20 Teilen Ethanol abs. versetzt. Die DNA bildet nun in Gegenwart von monovalenten Ionen in hoher Konzentration einen unlöslichen Niederschlag. Durch Zentrifugation bei 15.000 g für 25 Min.

und Abnehmen des Überstandes mit einer Vakuumpumpe wurde dieser isoliert, durch Zugabe von 400  $\mu$ L Ethanol (70 %) und erneuter Zentrifugation bei 15.000 g für 5 Min. gewaschen. Die DNA bleibt ungelöst während Teile des überschüssigen Salzes sich in Ethanol (70 %) lösen. Nach Abnahme des Überstandes mit einer Vakuumpumpe wurde das Eppendorf-Gefäß für eine halbe Stunde bei 37 °C im Trockenschrank gelagert um so überschüssiges Wasser und Ethanol-Reste zu entfernen. Die so gewonnenen, aufkonzentrierten Nukleinsäuren wurden nach Aufnahme in einem geeigneten Medium bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

## 2.7 Sequenzierung von DNA

Der alleinige Nachweis von Fragmenten eines bestimmten Resistenzgens mit Hilfe der PCR zur Klärung einer möglichen Ursache für die Unempfindlichkeit eines Isolates, reicht oft nicht aus. Häufig wird eine Resistenz durch Strukturveränderungen von natürlich im Bakterium vorhandenen Zielstrukturen hervorgerufen, wie z. B. Punktmutationen in dem zu untersuchendem Genabschnitt, die zu einem Aminosäureaustausch führen. Somit es ist für eine eindeutige Aufklärung der Resistenzursache erforderlich, die Sequenz der entsprechenden DNA-Abschnitte auf mögliche Punktmutationen zu untersuchen. Dazu wurden je nach Fragestellung im Rahmen dieser Arbeit zwei verschiedene Methoden verwendet, zum einem eine modifizierte, nicht radioaktiven Variante der Kettenabbruchmethode nach Sanger (122) (Cylcesequencing) und Pyrosequencing™.

### 2.7.1 Cycle-Sequencing

Das Cylcesequencing beruht auf Vervielfältigung der zu untersuchenden Nukleinsäure unter Verwendung von 2'-Desoxynukleotiden und 2',3'-Didesoxynukleotiden mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen.

An eine bekannte Sequenz der zu untersuchenden Nukleinsäure, welche zuvor durch eine Standard-PCR vervielfältigt worden war, erfolgt eine Anlagerung eines Sequenzierprimers, so dass unter Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase die Synthese eines komplementären DNA-Stranges erfolgen kann. Während der Synthese des komplementären DNA-Stranges kommt es durch die Verwendung eines Gemisches aus 2'-Desoxynukleotiden und 2',3'-Didesoxynukleotiden zu unterschiedlichen Reaktionsergebnissen. Die Besonderheit der verwendeten 2',3'-Didesoxynukleotiden liegt in dem Fehlen der freien 3'-OH-Gruppe, so dass der Einbau eines 2',3'-Didesoxynukleotiden zu einem Kettenabbruch (Termination) der DNA-Strang-Synthese führt, da keine freie 3'-OH-Gruppe für den weiteren Einbau eines Nukleotids vorhanden ist, während der Einbau der 2'-Desoxynukleotide zu keiner

Termination der DNA-Strang-Synthese führt. Der Einbau der 2',3'-Didesoxynukleotide erfolgt dabei zufällig. Somit entstehen DNA-Stränge verschiedener Länge, die jeweils durch den Einbau eines 2',3'-Didesoxynukleotids terminiert sind, wobei das eingebaute 2',3'-Didesoxynukleotid Auskunft über die komplementäre Base gibt. Die Verwendung von 2',3'-Didesoxynukleotiden, die mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert sind, ermöglicht eine Detektion dieser 2',3'-Didesoxynukleotide durch eine Laser-Vorrichtung, nachdem diese mit Hilfe einer Kapillar-Elektrophorese aufgetrennt wurden (120).

### 2.7.1.1 Untersuchung der Gene der 23S rRNA bei *S. aureus* und *Enterococcus* spp. auf Punktmutationen, die zu einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber Linezolid führen können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Isolate von *S. aureus* und *Enterococcus* spp., die eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber Linezolid aufzeigten, hinsichtlich auf Punktmutationen in den Genen, welche für die 23S rRNA codieren untersucht. Dazu wurde zunächst eine PCR verwendet, die ein 484 bp großes Fragment der Domain V der 23S rRNA (Positionen 2294-2777) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit Hilfe eines Agarosegels (1,3 %) aufgetrennt und unter UV-Licht durch Ethidiumbromid detektiert. Die Tabelle 48 und Tabelle 49 zeigen die Zusammensetzung des Ansatzes für die PCR und das durchgeführte Temperaturprofil.

**Tabelle 48** Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (23S rRNA 2294-2777)

Bestandteil	µL
1. 10x ThermoPolReaction Buffer	5,0
2. EF 23S rRNA gene Domain V FP <sup>a</sup>	1,0
3. EF 23S rRNA gene Domain V RP <sup>a</sup>	1,0
4. dNTP-Mix (je 2 mM)	1,25
5. <i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/µL)	0,25
6. DNA (DNEasy Tissue Kit)	1,0
7. Aqua bidest.	Ad 50,0

<sup>a</sup> Konzentration der Primer-Lösung: 10 pmol/µL

**Tabelle 49** Temperatur- und Zeit-Profil (23S rRNA 2294-2777)

Schritt	T	t
1. Initialdenaturierung	94 °C	5 min
2. Denaturierung	94 °C	30 s
3. Annealing	57 °C	45 s
4. Extension	72 °C	30 s
5. Verlängerte Extension	72 °C	5 min
6. Kühlphase	4 °C	∞

Anzahl der Zyklen 2-4: 35

Anschließend erfolgte eine Aufreinigung des PCR-Produktes wie unter C2.6.1 beschrieben. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde zur Konzentrationsabschätzung erneut mit Hilfe eines Agarosegels (1,3 %) aufgetrennt und unter UV-Licht durch Ethidiumbromid detektiert. Nun wurde ein entsprechendes Aliquot des PCR-Produktes für die Synthese des komplementären DNA-Stranges unter Verwendung von 2'-Desoxynukleotiden und 2',3'-Desoxynukleotiden eingesetzt. Die Tabelle 50 und Tabelle 51 zeigen die Zusammensetzung des Ansatzes für das Cycle-Sequencing und das durchgeführte Temperaturprofil.

**Tabelle 50** Zusammensetzung des Cycle-Sequencing-Ansatzes (23S rRNA 2294-2777)

Bestandteil	µL
1. 5x BigDye Terminator Sequencing Buffer	2,5
2. BigDye	3,0
3. EF 23S rRNA gene Domain V FP <sup>a</sup>	1,0
4. gereinigtes PCR-Produkt	3,0-4,0
5. Aqua bidest.	Ad 20,0

<sup>a</sup> **Konzentration der Primer-Lösung: 10 pmol/µL**

**Tabelle 51** Temperatur- und Zeitprofil (23S rRNA 2294-2777)

Schritt	T	t
1. Initialdenaturierung	96° C	2 min
2. Denaturierung	96° C	10 s
3. Annealing	57° C	5 s
4. Extension	60° C	4 min
5. Kühlphase	4° C	∞

**Anzahl der Zyklen 2-4: 25**

Das gewonnene Produkt wurde im Anschluss wie unter C2.6.2 ausgefällt und dann nach Aufnahme in einem geeigneten Medium sequenziert.

Für einige *S. aureus* Stämme mit Linezolid-Resistenz, die durch den Erwerb dieser Unempfindlichkeit ihre Resistenz gegenüber Makroliden verloren haben, wurde eine erweiterte Sequenzierung der Domäne V der 23S rRNA durchgeführt.

Durch die Amplifizierung eines 746 bp großen PCR-Produktes mit Hilfe einer PCR, welches die Positionen 1873 bis 2618 der 23S rRNA umfasst, sollten weitere Veränderungen erfasst werden. Das gewonnene Fragment wurde in einem Agarosegel (1,3 %) aufgetrennt und unter UV-Licht durch Ethidiumbromid detektiert. Die Tabelle 52 und Tabelle 53 zeigen die Zusammensetzung des Ansatzes für die PCR und das durchgeführte Temperaturprofil.

**Tabelle 52** Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (23S rRNA 1873-2618)

Bestandteil	$\mu\text{L}$
1. 10x ThermoPolReaction Buffer	5,0
2. StaAur 23S rRNA 5' +1900 <sup>a</sup>	1,0
3. LRE PSQ G2588T RP <sup>a</sup>	1,0
4. dNTP-Mix (je 2 mM)	1,25
5. <i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0,25
6. DNA (DNEasy Tissue Kit)	1,0
7. Aqua bidest.	Ad 50,0

<sup>a</sup> Konzentration der Primer-Lösung: 10 pmol/ $\mu\text{L}$ **Tabelle 53** Temperatur- und Zeitprofil (23S rRNA 1873-2618)

Schritt	T	T
1. Initialdenaturierung	94 °C	5 min
2. Denaturierung	94 °C	30 s
3. Annealing	64 °C	45 s
4. Extension	72 °C	60 s
5. Verlängerte Extension	72 °C	5 min
6. Kühlphase	4 °C	$\infty$

Anzahl der Zyklen 2-4: 35

Anschließend erfolgte eine Aufreinigung des PCR-Produktes wie unter C2.6.1 beschrieben. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde zur Abschätzung der Konzentration erneut mit Hilfe eines Agarosegels (1,3 %) aufgetrennt und unter UV-Licht durch Ethidiumbromid detektiert. Nun wurde ein entsprechendes Aliquot des PCR-Produktes für die Synthese des komplementären DNA-Stranges unter Verwendung von 2'-Desoxynukleotiden und 2',3'-Desoxynukleotiden eingesetzt. Die Tabelle 54 und Tabelle 55 zeigen die Zusammensetzung des Ansatzes für das Cycle-Sequencing und das durchgeführte Temperaturprofil.

**Tabelle 54** Zusammensetzung des Cycle-Sequencing-Ansatzes (23S rRNA 1873-2618)

Bestandteil	$\mu\text{L}$
1. 5x BigDye Terminator Sequencing Buffer	2,5
2. BigDye	3,0
3. StaAur 23S rRNA 5' +1900 <sup>a</sup>	1,0
4. gereinigtes PCR-Produkt	3,0-4,0
5. Aqua bidest.	Ad 20,0

<sup>a</sup> Konzentration der Primer-Lösung: 10 pmol/ $\mu\text{L}$ **Tabelle 55** Temperatur- und Zeitprofil (23S rRNA 1873-2618)

Schritt	T	T
1. Initialdenaturierung	96 °C	2 min
2. Denaturierung	96 °C	10 s
3. Annealing	64 °C	5 s
4. Extension	60 °C	4 min
5. Kühlphase	4 °C	$\infty$

Anzahl der Zyklen 2-4: 25

Das gewonnene Produkt wurde im Anschluss wie unter C2.6.2 gefällt und nach Aufnahme in einem geeigneten Lösemittel sequenziert.

### 2.7.1.2 Untersuchung der Untereinheiten GyrA und ParC der Gyrase bei *S. aureus* auf Punktmutationen, die zu einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen führen können.

Bei *S. aureus* Isolaten, die im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen untersucht wurden und dabei eine verminderte Empfindlichkeit oder Resistenz gegenüber diesen Antibiotika zeigten, wurde für diese, die für diese Resistenz in Frage kommenden Untereinheiten der bakteriellen Gyrase GyrA und der Topoisomerase IV ParC auf Punktmutationen untersucht. Für diese Fragestellung wurden zwei etablierte PCRs verwendet, welche ein 380 bp bzw. ein 450 bp großes Fragment des jeweiligen Abschnittes der Gene *gyrA* und *parC* amplifizieren. Das PCR-Produkt wurde mit Hilfe eines Agarosegels (1,0 %) aufgetrennt und unter UV-Licht durch Ethidiumbromid detektiert. Die Tabelle 56 bis Tabelle 59 zeigen die Zusammensetzung des Ansatzes für die PCR und das durchgeführte Temperaturprofil.

**Tabelle 56** Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (*gyrA*)

Bestandteil	$\mu\text{L}$
1. 10x ThermoPolReaction Buffer	5,0
2. <i>gyr_5'_+43_Sau</i> <sup>a</sup>	2,5
3. <i>gyr_3'_+377_Sau</i> <sup>a</sup>	2,5
4. dNTP-Mix (je 2 mM)	1,25
5. <i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0,25
6. DNA (DNEasy Tissue Kit)	50
7. Aqua bidest.	Ad 50,0

<sup>a</sup> Konzentration der Primer-Lösung: 10 pmol/ $\mu\text{L}$

**Tabelle 57** Temperatur- und Zeitprofil (*gyrA*)

Schritt	T	t
1. Initialdenaturierung	94 °C	5 min
2. Denaturierung	94 °C	30 s
3. Annealing	48 °C	45 s
4. Extension	72 °C	1 min
5. Verlängerte Extension	72 °C	5 min
6. Kühlphase	4 °C	$\infty$

Anzahl der Zyklen 2-4: 35

**Tabelle 58** Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (*parC*)

Bestandteil	$\mu\text{L}$
1. 10x ThermoPolReaction Buffer	5,0
2. <i>grl_5'_+27_Sau</i> <sup>a</sup>	2,5
3. <i>grl_3'_+485_Sau</i> <sup>a</sup>	2,5
4. dNTP-Mix (je 2 mM)	1,25
5. <i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0,25
6. DNA (DNEasy Tissue Kit)	50
7. Aqua bidest.	Ad 50,0

<sup>a</sup> Konzentration der Primer-Lösung: 10 pmol/ $\mu\text{L}$ **Tabelle 59** Temperatur- und Zeitprofil (*parC*)

Schritt	T	t
1. Initialdenaturierung	94 °C	5 min
2. Denaturierung	94 °C	30 s
3. Annealing	55 °C	45 s
4. Extension	72 °C	1 min
5. Verlängerte Extension	72 °C	5 min
6. Kühlphase	4 °C	$\infty$

Anzahl der Zyklen 2-4: 35

Anschließend erfolgte eine Aufreinigung des PCR-Produktes wie unter C2.6.2. beschrieben. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde zur Konzentrationsabschätzung erneut mit Hilfe eines Agarosegels (1,3 %) aufgetrennt und unter UV-Licht durch Ethidiumbromid detektiert. Nun wurde ein entsprechendes Aliquot des PCR-Produktes für das Cycle-Sequencing eingesetzt (Tabelle 60 bis Tabelle 63).

**Tabelle 60** Zusammensetzung des Cycle-Sequencing-Ansatzes (*gyrA*)

Bestandteil	$\mu\text{L}$
1. 5x BigDye Terminator Sequencing Buffer	2,5
2. BigDye	3,0
3. <i>gyr_3'_+377_Sau</i> <sup>a</sup>	1,0
4. gereinigtes PCR-Produkt	3,0-4,0
5. Aqua bidest.	Ad 20,0

<sup>a</sup> Konzentration der Primer-Lösung: 10 pmol/ $\mu\text{L}$ **Tabelle 61** Temperatur- und Zeiteinstellung (*gyrA*)

Schritt	T	t
1. Initialdenaturierung	96 °C	2 min
2. Denaturierung	96 °C	10 s
3. Annealing	48 °C	5 s
4. Extension	60 °C	4 min
5. Kühlphase	4 °C	$\infty$

Anzahl der Zyklen 2-4: 25

**Tabelle 62** Zusammensetzung des Cycle-Sequencing-Ansatzes (*parC*)

Bestandteil	$\mu\text{L}$
1. 5x BigDye Terminator Sequencing Buffer	2,5
2. BigDye	3,0
3. <i>grl_3'_+485_Sau</i> <sup>a</sup>	1,0
4. gereinigtes PCR-Produkt	3,0-4,0
5. Aqua bidest.	Ad 20,0

<sup>a</sup> **Konzentration der Primer-Lösung: 10 pmol/ $\mu\text{L}$**

**Tabelle 63** Temperatur- und Zeitprofil (*parC*)

Schritt	T	t
1. Initialdenaturierung	96 °C	2 min
2. Denaturierung	96 °C	10 s
3. Annealing	55 °C	5 s
4. Extension	60 °C	4 min
5. Kühlphase	4 °C	$\infty$

**Anzahl der Zyklen 2-4: 25**

Die so gewonnenen Produkte wurden im Anschluss wie unter C2.6.2. ausgefällt und dann nach Aufnahme in einem geeignetem Medium sequenziert.

### **2.7.1.3 Untersuchung des Transposon Tn554 in *S. aureus* auf strukturelle Veränderung der *ermA*-Regulator-Region, die zu einer veränderten Expression des *ermA*-Gens führen können.**

Im Rahmen der Untersuchung der Linezolid-resistenten MRSA Isolate mit Verlust ihrer Resistenz gegenüber Makroliden, war es neben dem Nachweis der relevanten Resistenzgene (*ermA*, *ermC*) von Interesse die Regulatorregion des Transposon 554 (Tn554) in *S. aureus* auf strukturelle Veränderungen zu untersuchen. Zuvor war in der Literatur beschrieben worden, dass strukturelle Veränderungen, wie z. B. Deletionen, Insertionen und Punktmutationen in der Regulatorregion des *ermA*-Gens, eine veränderte phänotypische Expression des Gens von induzierbar zu konstitutiv bewirken können. Der beobachtete Verlust der Resistenz gegenüber Makroliden könnte daher auch durch eine veränderte attenuierte Translation des *ermA*-Gens verursacht worden sein.

Zur Klärung dieses Phänomens wurde mit Hilfe der PCR ein 571 bp großes Fragment amplifiziert, welches die gesamte Regulator-Region des Tn554 und den Beginn des *ermA*-Gens umschließt.

Die Auftrennung des PCR-Produktes erfolgte durch ein Agarosegel (1,0 %) und die erwarteten Fragmente wurden unter UV-Licht durch Ethidiumbromid detektiert. Die Tabelle

64 und Tabelle 65 zeigen die Zusammensetzung des Ansatzes für die PCR und das durchgeführte Temperaturprofil.

**Tabelle 64** Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (Tn554)

Bestandteil	$\mu\text{L}$
1. 10x ThermoPolReaction Buffer	5,0
2. SA Tn554 Regulatory Region FP <sup>a</sup>	1,0
3. SA Tn554 Regulatory Region RP <sup>a</sup>	1,0
4. dNTP-Mix (je 2 mM)	1,25
5. <i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0,25
6. DNA (DNEasy Tissue Kit)	3,5
7. Aqua bidest.	Ad 50,0

<sup>a</sup> Konzentration der Primer-Lösung: 10 pmol/ $\mu\text{L}$

**Tabelle 65** Temperatur- und Zeitprofil (Tn554)

Schritt	T	t
1. Initialdenaturierung	94 °C	5 min
2. Denaturierung	94 °C	30 s
3. Annealing	56 °C	30 s
4. Extension	72 °C	1 min
5. Verlängerte Extension	72 °C	5 min
6. Kühlphase	4 °C	$\infty$

Anzahl der Zyklen 2-4: 35

Anschließend erfolgte eine Aufreinigung des PCR-Produktes wie unter C2.6.2. beschrieben. Eine erneute Auftrennung und Detektion unter UV-Licht durch Ethidiumbromid des aufgereinigten PCR-Produktes in einem Agarosegels (1,0 %) diente der Konzentrations-Abschätzung der Fragmente. Im Anschluss wurde ein entsprechendes Aliquot des PCR-Produktes für das Cycle-Sequencing eingesetzt (Tabelle 66 und Tabelle 67).

**Tabelle 66** Zusammensetzung des Cycle-Sequencing-Ansatzes (Tn554)

Bestandteil	$\mu\text{L}$
1. 5x BigDye Terminator Sequencing Buffer	2,5
2. BigDye	3,0
3. SA Tn554 Regulatory Region FP <sup>a</sup>	1,0
4. gereinigtes PCR-Produkt	3,0-4,0
5. Aqua bidest.	Ad 20,0

<sup>a</sup> Konzentration der Primer-Lösung: 10 pmol/ $\mu\text{L}$

**Tabelle 67** Temperatur- und Zeitprofil (Tn554)

Schritt	T	t
1. Initialdenaturierung	96 °C	2 min
2. Denaturierung	96 °C	10 s
3. Annealing	56 °C	5 s
4. Extension	60 °C	4 min
5. Kühlphase	4 °C	$\infty$

Anzahl der Zyklen 2-4: 25

Das so gewonnene Produkt wurde im Anschluss wie unter C2.6.2. ausgefällt und dann nach Aufnahme in einem geeignetem Medium sequenziert.

## 2.7.2 Pyrosequencing™

Neben dem Cyclesequencing (122) wurde im Rahmen dieser Arbeit als eine weitere Methode der Sequenz-Aufklärung das Pyrosequencing™ verwendet. Diese Methode hebt sich gegenüber dem Cycle-Sequencing durch eine schnelle, kostengünstige Untersuchung hoher Probenanzahlen hervor. Das Prinzip des Pyrosequencing™ beruht auf dem Nachweis von Licht, welches bei der schrittweisen Synthese des zu untersuchenden DNA-Stranges beim Einbau eines Nukleotids entsteht.

Pyrophosphats, welches durch den Einbau eines Nukleotids entsteht, wird durch das Enzym ATP-Sulfurylase in Adenosintriphosphat (ATP) umgewandelt. Das gebildete ATP wird von dem Enzyme Luciferase als Energiequelle für die Umwandlung von Luciferin zu Oxyluciferin verwendet. Das bei dieser Reaktion freigesetzte Licht von mit Hilfe einer CCD-Kamera registriert. Der erfolgreiche Einbau eines Nukleotids führt somit zur Freisetzung eines Lichtsignals und weist somit dieses nach (123). Durch die Vorgabe der Zugabe der Nukleotide in einer bestimmten Reihenfolge kann durch Detektion des Lichtsignals auf die Sequenz zurückgeschlossen werden („sequencing by synthesis“) (124). Nicht eingebaute Nukleotide werden durch das Enzym Apyrase abgebaut.

### 2.7.2.1 Detektion und Quantifizierung einer G → T Punktmutation an Position 2576 in den Genen der 23S rRNA bei *S. aureus* und *Enterococcus* spp., die zu einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber Linezolid führt

Bei Isolaten von *S. aureus* und *Enterococcus* spp., die eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber Linezolid aufzeigten, wurde mit Hilfe von Pyrosequencing™ die molekulare Ursache für die Resistenz weiter untersucht. Dazu wurde ein Essay etabliert, der eine G → T Punktmutation an Position 2576 in den Genen der 23S rRNA untersucht, welcher in der Literatur als für die Resistenz hauptsächlich verantwortlich beschrieben wurde. Zunächst erfolgte eine PCR, die ein 70 bp Fragment der Gene, welche für die 23S rRNA codieren amplifiziert. Als Besonderheit ist hier zu beachten, dass der 3'-Primer eine Biotin-Markierung am 5'-Ende trägt. Das PCR-Produkt wurde mit Hilfe eines Agarosegels (2,0 %) aufgetrennt

und unter UV-Licht durch Ethidiumbromid detektiert. Die Tabelle 68 und Tabelle 69 zeigen die Zusammensetzung des Ansatzes für die PCR und das durchgeführte Temperaturprofil.

**Tabelle 68** Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (LRE PSQ)

Bestandteil	$\mu\text{L}$
1. 10x ThermoPolReaction Buffer	10,0
2. LRE PSQ G2588T FP <sup>a</sup>	3,0
3. LRE PSQ G2588T RP 5' BIO <sup>a</sup>	3,0
4. dNTP-Mix (je 2 mM)	2,5
5. <i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0,5
6. DNA (DNEasy Tissue Kit)	4,0
7. Aqua bidest.	Ad 100,0

<sup>a</sup> **Konzentration der Primer-Lösung: 10 pmol/ $\mu\text{L}$**

**Tabelle 69** Temperatur- und Zeitprofil (LRE PSQ)

Schritt	T	t
1. Initialdenaturierung	94 °C	5 min
2. Denaturierung	94 °C	45 s
3. Annealing	57 °C	30 s
4. Extension	72 °C	4 s
5. Verlängerte Extension	72 °C	5 min
6. Kühlphase	4 °C	$\infty$

**Anzahl der Zyklen 2-4: 35**

Im Anschluss erfolgte eine Aufreinigung des gewonnenen PCR-Produktes. Um den gewonnenen DNA-Strang mit der Biotin-Markierung am 5'-Ende abzutrennen, wurde dieser an Streptavidin gebunden, die an Sepharose-Beads überzogen vorliegt. Dazu wurden 3  $\mu\text{L}$  einer Streptavidin-Sepharose-Suspension mit 37  $\mu\text{L}$  Binding-Buffer gemischt und in eine PCR-Platte pipettiert. Anschließend wurde ein 20  $\mu\text{L}$  Aliquot des PCR-Produktes hinzugegeben und der Ansatz nach Verschluss mit einer adhäsiven Folie auf einem geeigneten Apparat für 10 Min. geschüttelt. Dies diente der Bindung des Biotins an die Streptavidin-Sepharose-Beads. Nun wurde der Ansatz für die Sequenzier-Reaktion vorbereitet. Dazu wurden 8  $\mu\text{L}$  einer verdünnten Lösung des Sequenzierprimer (5 pmol/ $\mu\text{L}$ ) mit 40  $\mu\text{L}$  Annealing Buffer vermischt und in eine Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Platte gegeben. Die Tabelle 70 gibt einen Überblick für die verwendeten Primer der Sequenzier-Reaktion für *Enterococcus* spp. und *S. aureus*.

**Tabelle 70** Verwendete Sequenzierprimer in Abhängigkeit der Species

Species	Bezeichnung	Sequenz
<i>Enterococcus</i> spp.	LRE PSQ G2588T SP	5'-CCA TTA AAG CGG CAC -3'
<i>S. aureus</i>	LRSA PSQ G2603T SP	5'-GCC CAT TAA AGC GGT A -3'

**Verwendete Sequenzierprimer in Abhängigkeit der Species**

Nach Bindung des PCR-Produktes an die Beads wurden diese mit Hilfe des Vacuum-Prep-Worktables aufgesogen. Dabei wurde die Flüssigkeit mit Hilfe von Filterstiften, an denen ein Vakuum angelegt wurde, aufgesogen. Aufgrund ihrer Größe wurden die Beads und das daran gebundene PCR-Produkt an dem Filter zurückgehalten. Im Anschluss wurden das PCR-Produkt mit Ethanol (70 %) gewaschen, in 0,1 N Natronlauge denaturiert und als letztes in Washing Buffer gewaschen. Abschließend wurden die Beads in die vorbereitete Pyrosequencing™-Platte überführt, für 5 Min. bei 60-70 °C erhitzt, wieder auf Raumtemperatur abgekühlt und in der Pyrosequencing™-Apparatur untersucht. Die Tabelle 71 gibt einen Überblick über die verwendeten Assays für die Untersuchung mit dem Pyrosequencer.

**Tabelle 71** Verwendete Pyrosequencing™-Assays in Abhängigkeit der Species

Species	Bezeichnung	Sequence to analyze
<i>Enterococcus</i> spp.	LRE Assay <i>Enterococcus</i> spp.	GC G/T AGC TGG GTT CAG AAC GTC GTG AGA C
<i>S. aureus</i>	LRSA Assay <i>S. aureus</i>	CGC G/T AGC TGG GTT CAG AAC GTC GTG AGA C

**Verwendete Pyrosequencing™-Assays in Abhängigkeit der Species; Die markierten Nukleotide kennzeichnen den zu untersuchenden SNP.**

Als Positiv-Kontrolle dienten dabei klinische *E. faecium* und *E. faecalis* Isolate mit Linezolid-Resistenz, die zuvor mit Hilfe des Cyclesequencing und RFLP auf den G2576T SNP charakterisiert worden waren (105). Als Negativ-Kontrolle diente ein Amplifikat, welches aus der DNA von *E. faecalis* ATCC® 29212 gewonnen wurde.

## D Ergebnisse

### 1 Empfindlichkeit Gram-positiver Isolate aus dem Routine-Labor

#### 1.1 Sammlung Gram-positiver Isolate aus dem Routine-Labor

Die in diesem Teil der Arbeit verwendeten Stämme wurden im Rahmen einer epidemiologischen Untersuchung aus der Routine-Diagnostik des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) gesammelt. Dazu wurden von Herbst 2004 bis Frühjahr 2007 zweimal im Jahr für je vier Wochen alle isolierten *S. aureus* und *Enterococcus* spp. Stämme aus dem Routine-Labor gesammelt. Dabei wurde nur ein Isolat per Patient während der Sammlung zugelassen. Folge-Isolate wurden bei einer dokumentierten Infektion gesammelt und untersucht, fanden aber keinen Eingang in die Untersuchung.

Der überwiegende Teil der Isolate stammte aus dem Varia-Labor. Weiterhin wurden auch Isolate aus Blut- und Urinkulturen sowie aus Stuhlproben untersucht. Die Abbildung 6 gibt einen Überblick über die Verteilung nach ihrer Herkunft.

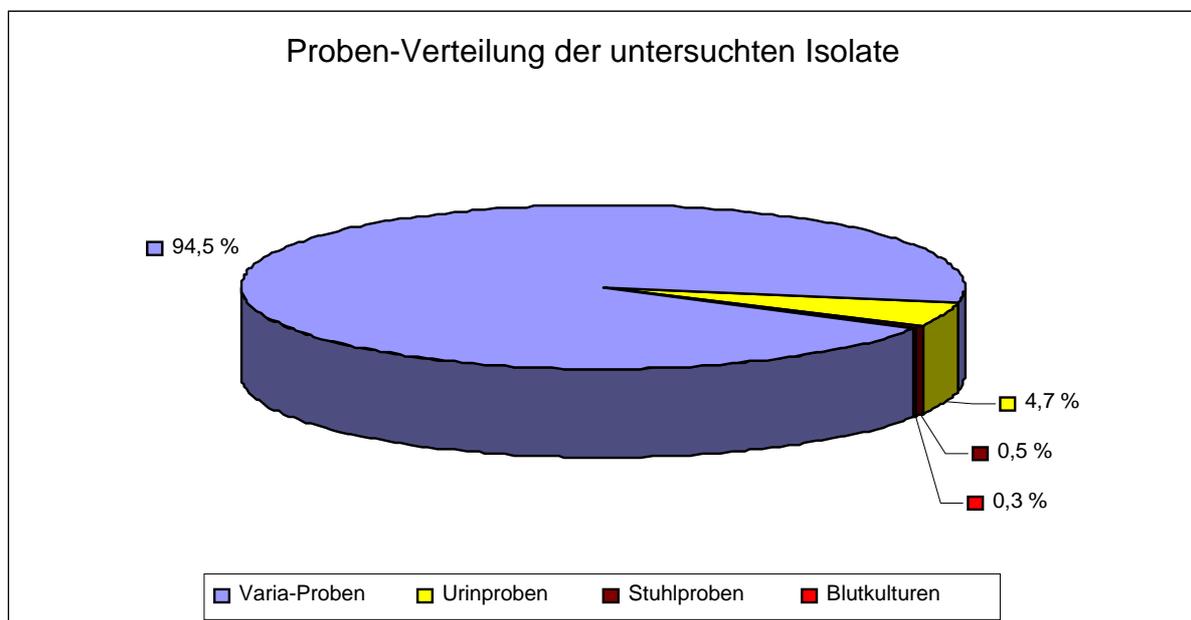


Abbildung 6 Proben-Verteilung der untersuchten Varia-Isolate

Die Mehrheit der Varia-Isolate beinhaltete Hautabstriche (30,4 %), Kulturen aus Gewebe und Flüssigkeiten (25,7 %) und Schleimhautabstriche (22,8 %). Die restlichen Isolate wurden aus Wundabstrichen (10,7 %) und Instrumenten-Abstrichen (6,0 %) gewonnen. Ein kleiner Anteil (4,5 %) trug keine genauere Bezeichnung nach Herkunft der Probe.

Insgesamt wurden 375 klinische Isolate gesammelt, von denen 287 als *S. aureus* identifiziert wurden. Weitere 56 Isolate wurden als *E. faecalis* und 32 Isolate als *E. faecium* identifiziert. Der Hauptanteil der isolierten Stämme stammte dabei aus den Abteilungen der zentralen Intensiv-Ambulanz (17,8 %), gefolgt von der Hämatologie (15,7 %), sowie der Chirurgie (13,6 %), der Pädiatrie (10,5 %) und der Inneren Medizin (8,9 %).

## 1.2 Bestimmung der MHK gegenüber ausgewählten Antibiotika

Zur genaueren Einschätzung der Resistenzlage am UKE wurde für die gesammelten klinischen Isolate die MHK nach der Mikrodilutionsmethode bestimmt (113, 114).

Dabei richtete sich die Auswahl der getesteten Antibiotika nach ihrer klinischen Relevanz, z.B. natürlicher Resistenz oder verminderter Empfindlichkeit abhängig von der Species, aber auch nach anderen Aspekten. So wurden die beiden Vertreter der Fluorchinolone Gatifloxacin und Sparfloxacin, obwohl sie in Deutschland nicht mehr zugelassen sind, zur Testung ausgewählt, da sie immer noch für Fragestellungen im Labor von großem Interesse sind.

Aus den verschiedenen Stoffklassen von Antibiotika wurden Hemmer der Zellwandsynthese, der Proteinbiosynthese und der bakteriellen Gyrase und Topoisomerase IV gewählt.

Als Vertreter der zyklischen Lipopeptide, einer Substanzklasse mit einem bisher völlig neuartigen Wirkmechanismus, wurde Daptomycin verwendet. Weiterhin wurde mit Teilen der gesammelten Isolate Testungen mit Dalbavancin, einem synthetischen Lipoglykopeptid und Garenoxacin, einem Desfluorchinolon durchgeführt.

Während Dalbavancin ähnlich wie Teicoplanin und Vancomycin die Zellwandsynthese hemmt, zeigt Garenoxacin eine Aktivität gegen die bakterielle Gyrase und Topoisomerase IV. Beide Substanzen befinden sich zur Zeit in der Zulassung durch die FDA bzw. EMEA.

Bei der Testung von *Enterococcus* spp. gegen Gentamicin wurde ein Screening auf Aminoglykosid-Hochresistenz durchgeführt, um einen möglichen synergistischen Effekt mit anderen Antibiotika, die die Zellwandsynthese hemmen (z.B. Ampicillin), zu prüfen. Dabei wurde im Gegensatz zu den anderen Testungen nur auf eine sehr hohe Konzentration des Antibiotikums (500 mg/L) getestet. Zeigt der getestete Stamm Wachstum, so ist ein synergistischer Effekt auszuschließen, während bei nicht beobachtetem Wachstum ein Synergismus vorhanden ist. Die Tabelle 72 gibt einen Überblick über die getesteten Antibiotika.

**Tabelle 72** Einteilung der getesteten Antibiotika  
**Hemmstoffe der Zellwandsynthese**

Substanzklasse	Substanz	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>S. aureus</i>	Bereich [mg/L]
β-Lactam-Antibiotikum	Ampicillin	+	–	0,06-64
Lipoglykopeptide	Dalbavancin	+	+	0,03-32
β-Lactam-Antibiotikum	Oxacillin	–	+	0,06-64
β-Lactam-Antibiotikum	Penicillin	–	+	0,03-32
Glykopeptid	Teicoplanin	+	+	0,25-256
Glykopeptid	Vancomycin	+	+	0,25-256

**Hemmstoffe der Proteinbiosynthese**

Substanzklasse	Substanz	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>S. aureus</i>	Bereich [mg/L]
Makrolid	Erythromycin	–	+	0,06-64
Aminoglykosid	Gentamicin	HLAR	+	0,125-128
Oxazolidinon	Linezolid	+	+	0,06-64

**Hemmstoffe der bakterielle Gyrase**

Substanzklasse	Substanz	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>S. aureus</i>	Bereich [mg/L]
Fluorchinolon	Ciprofloxacin	–	+	0,03-32
Desfluorchinolon	Garenoxacin	–	+	0,002-2
Fluorchinolon	Gatifloxacin	–	+	0,03-32
Fluorchinolon	Moxifloxacin	–	+	0,03-32
Fluorchinolon	Sparfloxacin	–	+	0,03-32

**Hemmstoffe des bakteriellen Membran-Potentials**

Substanzklasse	Substanz	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>S. aureus</i>	Bereich [mg/L]
Zyklisches Lipopeptid	Daptomycin	+	+	0,016-16

(+) = Testung erfolgt

(–) = keine Testung erfolgt

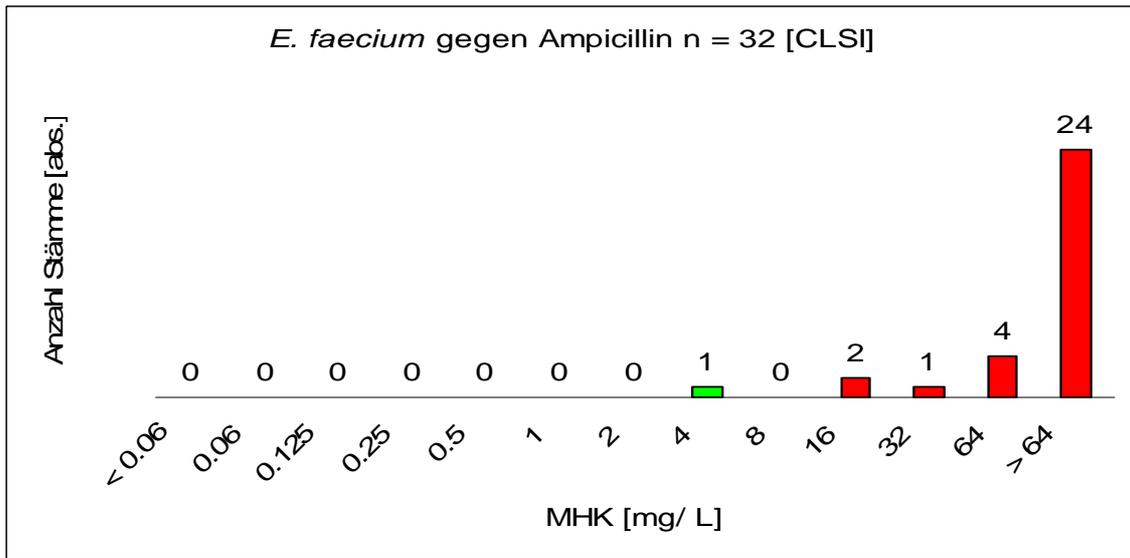
HLAR = High-Level-Aminoglykoside Resistance-Screening

Von besonderem Interesse bei der Auswertung der MHK-Bestimmung ist das mögliche Vorhandensein von Parallel- oder Kreuzresistenzen gegenüber Antibiotika anderer oder gleicher Stoffklassen.

Die Einteilung der getesteten Stämme in sensibel, intermediär oder resistent anhand ihrer MHK-Werte erfolgte unter Berücksichtigung der der Testung zu Grunde liegenden Vorschrift (113, 114).

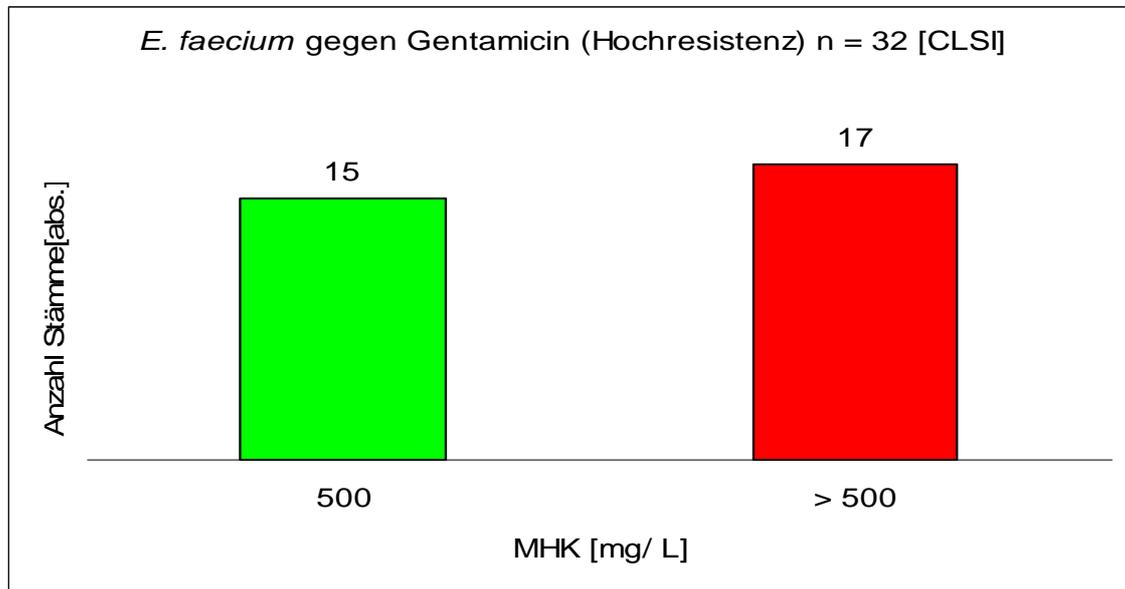
Die Abbildung 7 bis Abbildung 32 geben in graphischer Darstellung die Resultate der Testungen wieder. In der Tabelle 73 ist das Endergebnis der MHK-Bestimmung für alle Stämme zusammengefasst. Dabei wird der Anteil an empfindlichen, intermediären und

resistenten Isolaten, aber auch der  $MHK_{50}$ ,  $MHK_{90}$  und der Konzentrationsbereich der  $MHK$ -Werte angegeben. Diese wichtigen Größen dienen als zum Vergleich der Antibiotika. Die  $MHK_{50}$ - und  $MHK_{90}$ -Werte kennzeichnen die kumulative Anzahl an Stämmen (50 % oder 90 %), welche den gleichen oder einen niedrigeren  $MHK$ -Wert besitzen. Der Konzentrationsbereich gibt die Spanne zwischen dem niedrigsten und höchsten ermittelten  $MHK$ -Wert wieder.



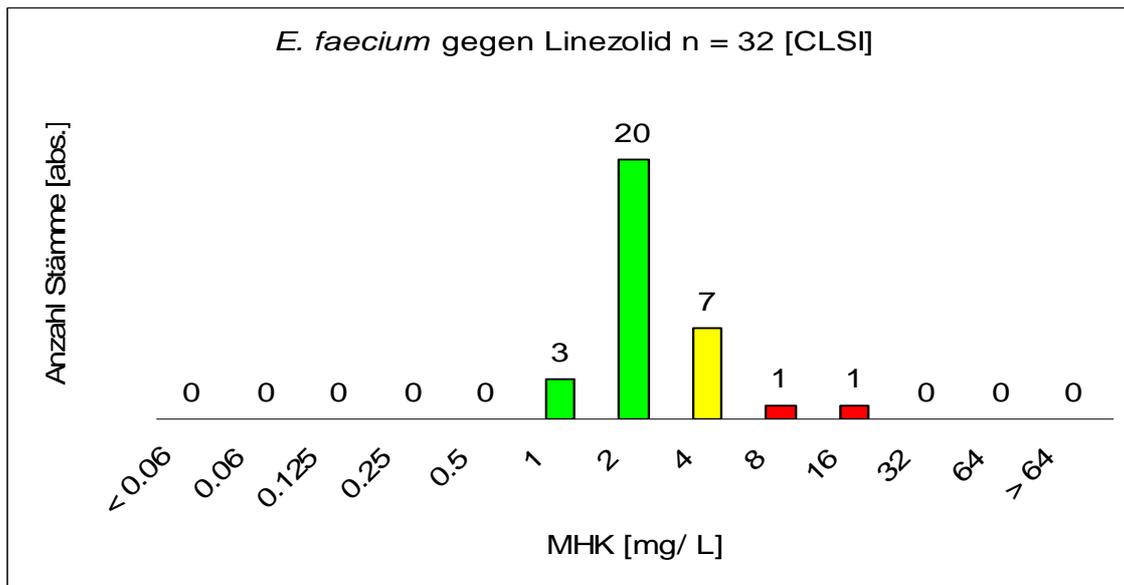
MHK -Wert	<0,06	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	>64	
abs.	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1	4	24	
%-kum.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,1	3,1	9,4	12,5	25,0	100	
%-Anteil									3,1					96,9

Abbildung 7 MHK-Verteilung *E. faecium* gegen Ampicillin



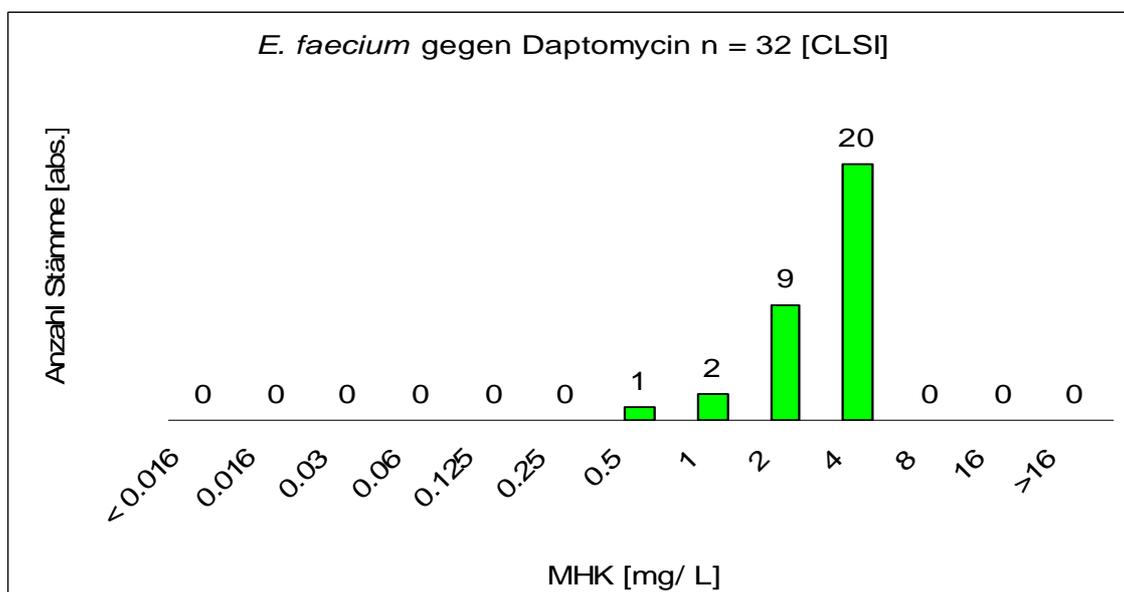
MHK-Wert	500	> 500
abs.	15	17
%-kum.	46,9	100,0
%-Anteil	46,9	53,1

Abbildung 8 MHK-Verteilung *E. faecium* gegen Gentamicin



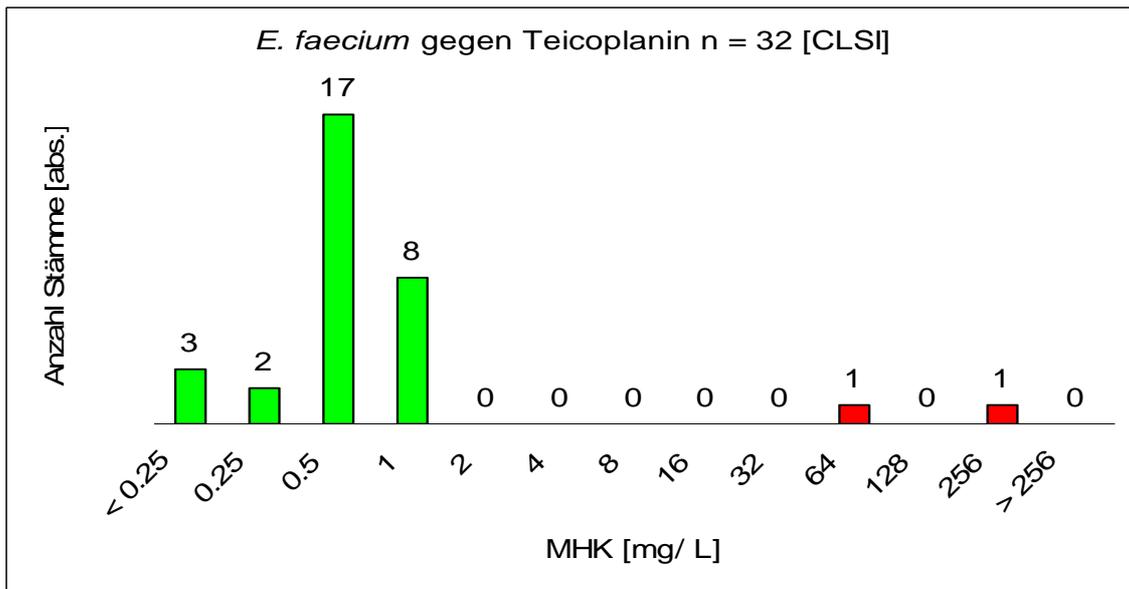
MHK -Wert	<0,06	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	>64
abs.	0	0	0	0	0	3	20	7	1	1	0	0	0
%-kum.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	9,4	71,9	93,8	96,9	100,0	100,0	100,0	100
%-Anteil							71,9	21,9					6,3

Abbildung 9 MHK-Verteilung *E. faecium* gegen Linezolid



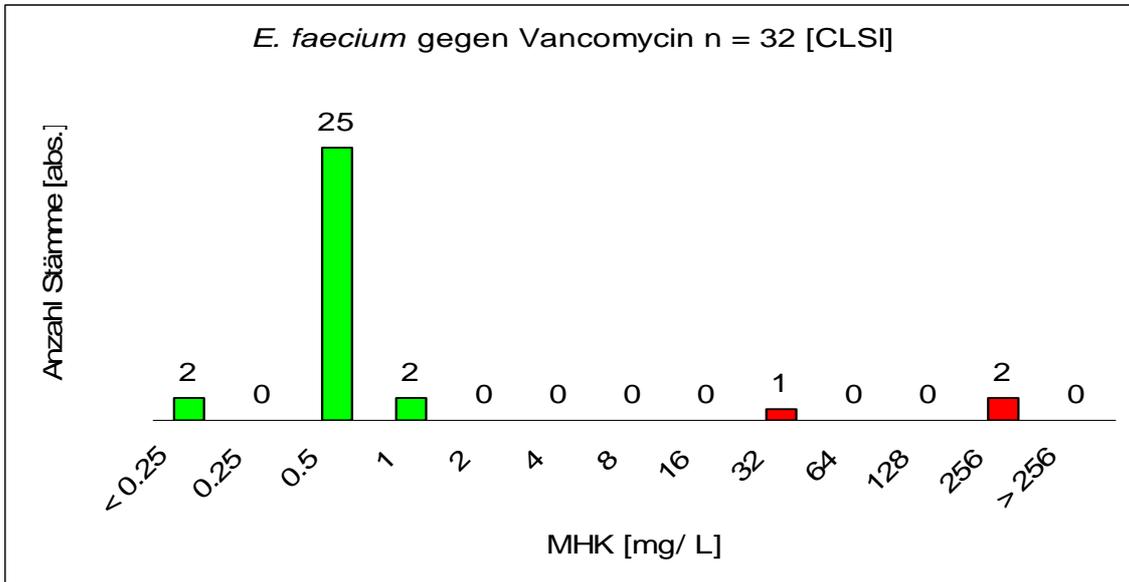
MHK -Wert	<0,016	0,016	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	>16
abs.	0	0	0	0	0	0	1	2	9	20	0	0	0
%-kum.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,1	9,4	37,5	100,0	100,0	100,0	100
%-Anteil										100,0			0,0

Abbildung 10 MHK-Verteilung *E. faecium* gegen Daptomycin



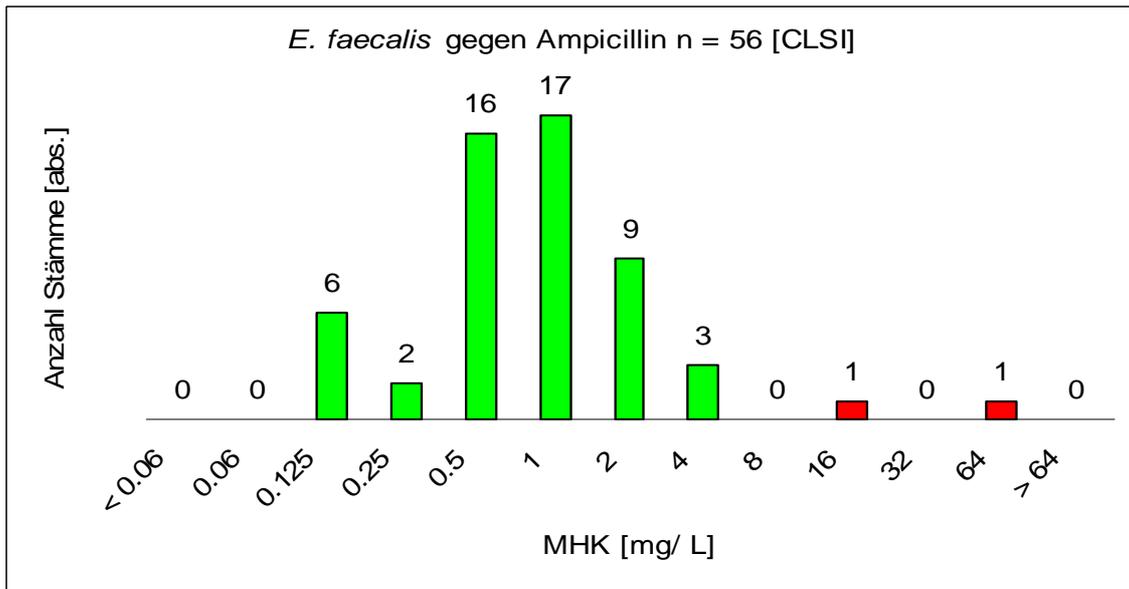
MHK -Wert	<0,25	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256	
abs.	3	2	17	8	0	0	0	0	0	1	0	1	0	
%-kum.	9,4	15,6	68,8	93,8	93,8	93,8	93,8	93,8	93,8	96,9	96,9	100,0	100	
%-Anteil								93,8	0,0					6,3

Abbildung 11 MHK-Verteilung *E. faecium* gegen Teicoplanin



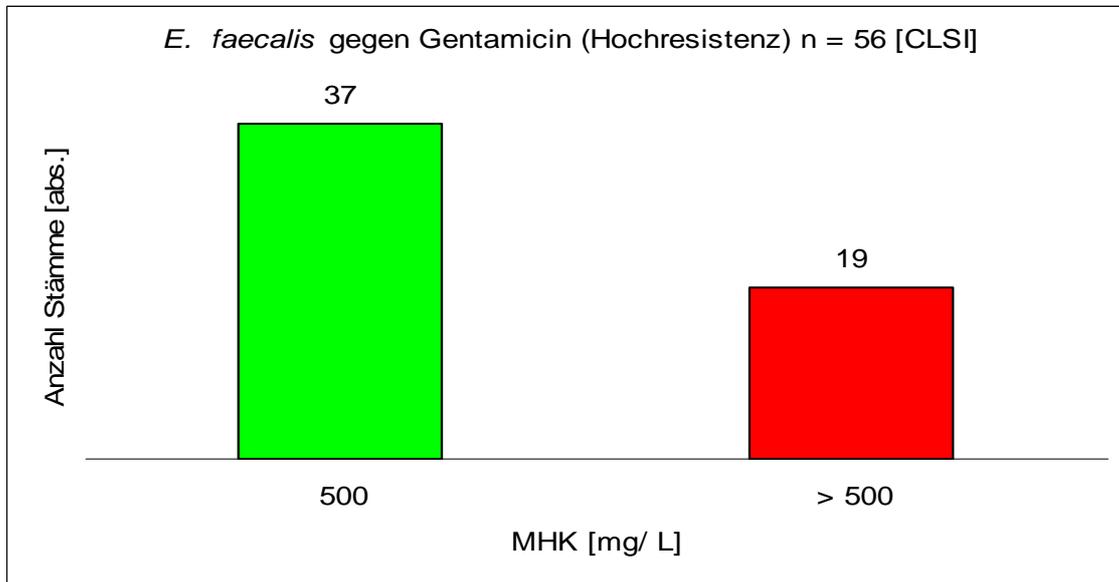
MHK -Wert	<0,25	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256	
abs.	2	0	25	2	0	0	0	0	1	0	0	2	0	
%-kum.	6,3	6,3	84,4	90,6	90,6	90,6	90,6	90,6	93,8	93,8	93,8	100,0	100	
%-Anteil								90,6	0,0					9,4

Abbildung 12 MHK-Verteilung *E. faecium* gegen Vancomycin



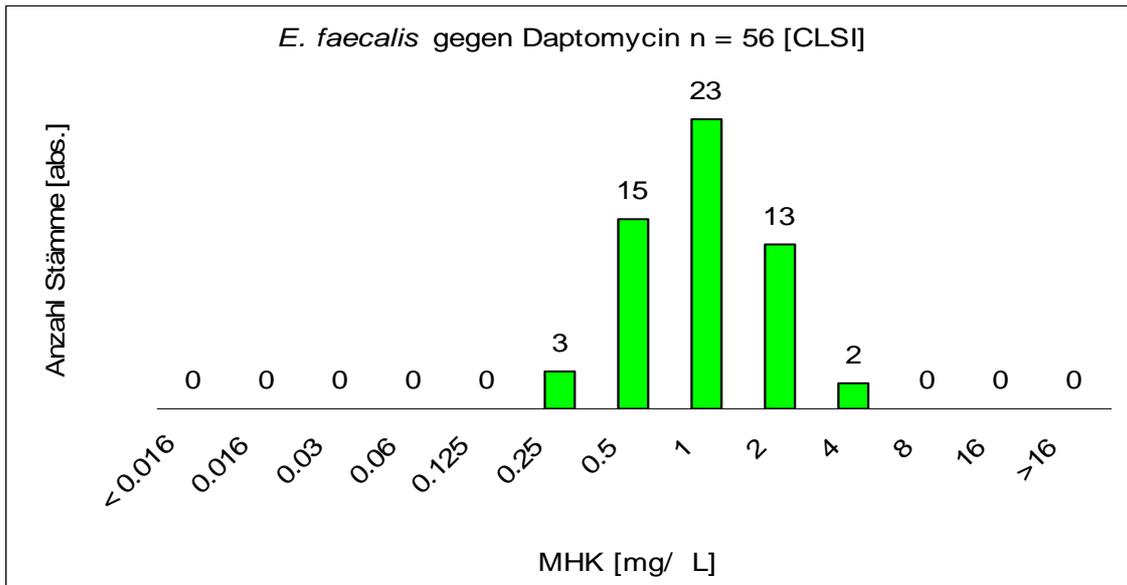
MHK-Wert	<0,06	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	>64	
abs.	0	0	6	2	16	17	9	3	0	1	0	1	0	
%-kum.	0,0	0,0	10,9	14,5	43,6	74,5	90,9	96,4	96,4	98,2	98,2	100,0	100	
%-Anteil									96,4					3,6

Abbildung 13 MHK-Verteilung *E. faecalis* gegen Ampicillin



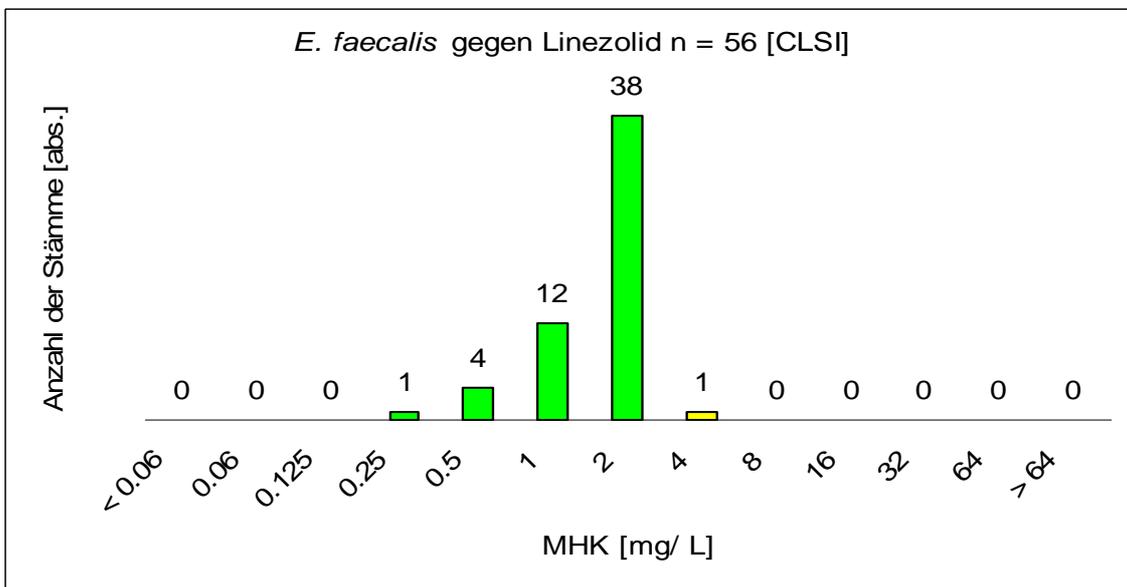
MHK-Wert	500	> 500
abs.	37	19
%-kum.	66,1	100,0
%-Anteil	66,1	33,9

Abbildung 14 MHK-Verteilung *E. faecalis* gegen Gentamicin



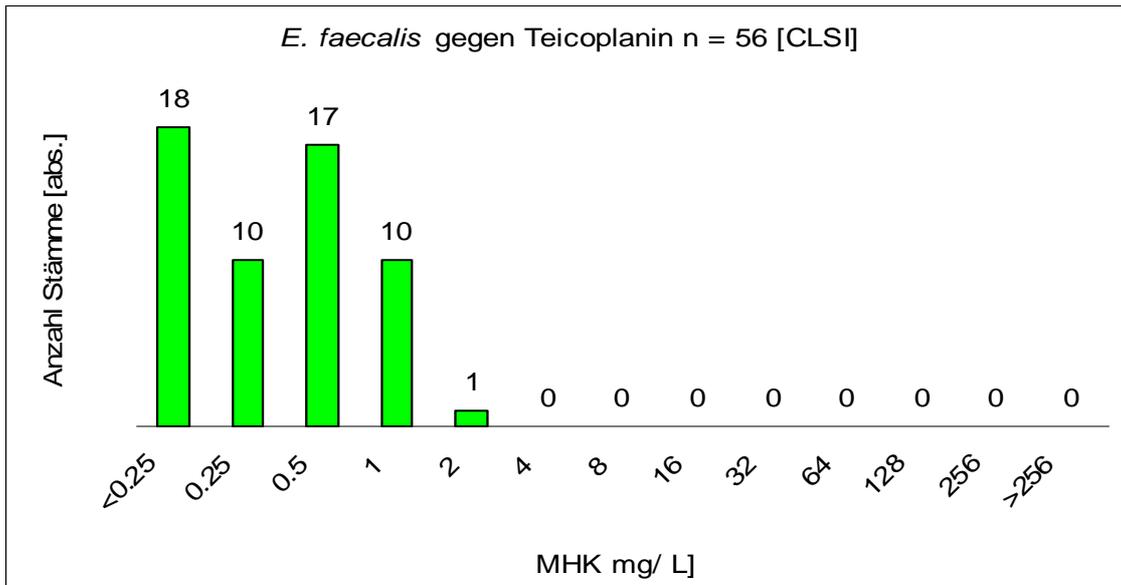
MHK -Wert	<0,016	0,016	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	>16
abs.	0	0	0	0	0	3	15	23	13	2	0	0	0
%-kum.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,4	32,1	73,2	96,4	100,0	100,0	100,0	100
%-Anteil										100,0			0,0

Abbildung 15 MHK-Verteilung *E. faecalis* gegen Daptomycin



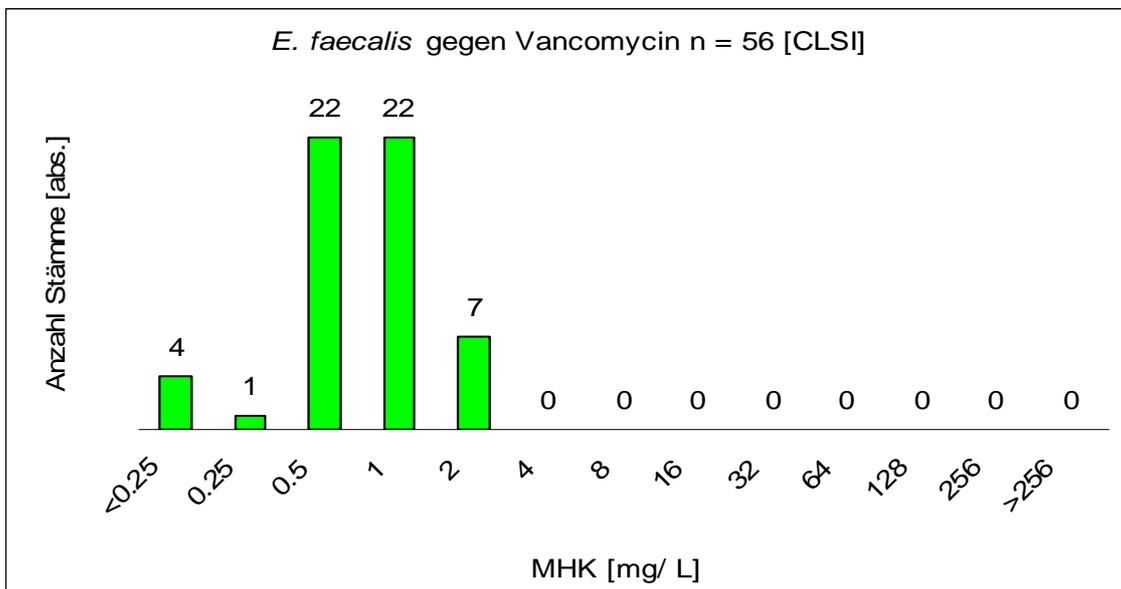
MHK -Wert	< 0,06	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	> 64
abs.	0	0	0	1	4	12	38	1	0	0	0	0	0
%-kum.	0,0	0,0	0,0	1,8	8,9	30,4	98,2	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100
%-Anteil							98,2	1,8					0,0

Abbildung 16 MHK-Verteilung *E. faecalis* gegen Linezolid



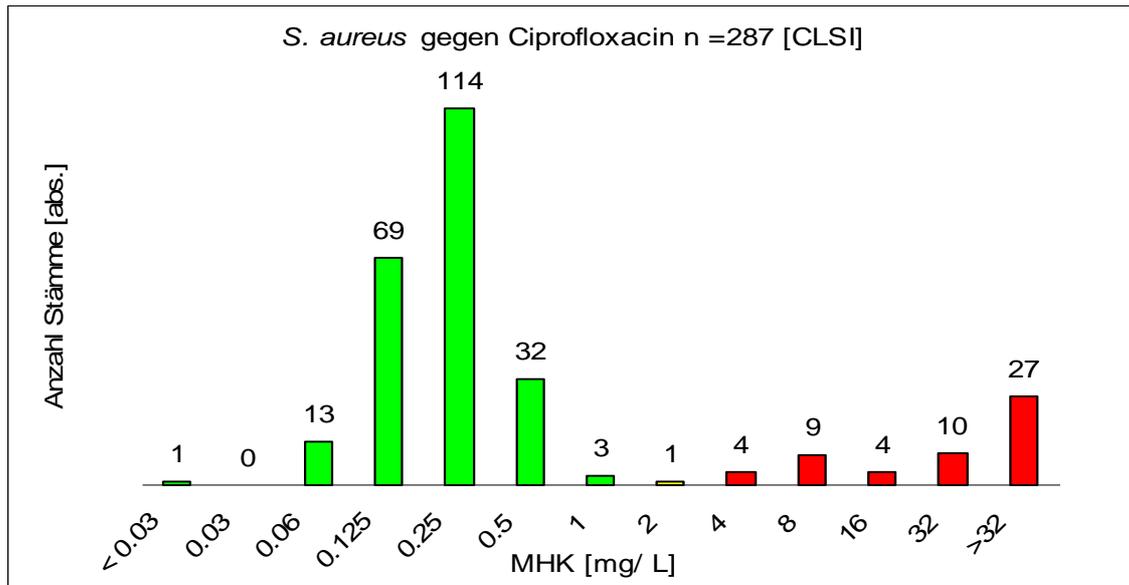
MHK -Wert	<0,25	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256	
abs.	18	10	17	10	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
%-kum.	32,1	50,0	80,4	98,2	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100	
%-Anteil								100,0	0,0					0,0

Abbildung 17 MHK-Verteilung *E. faecalis* gegen Teicoplanin



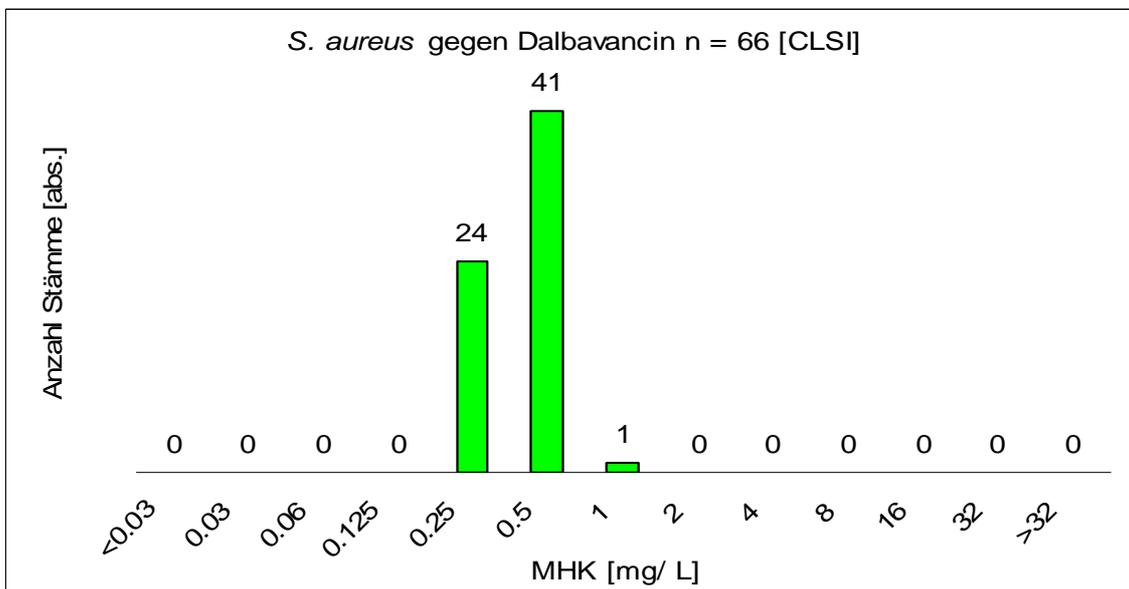
MHK -Wert	<0,25	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256	
abs.	4	1	22	22	7	0	0	0	0	0	0	0	0	
%-kum.	7,1	8,9	48,2	87,5	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100	
%-Anteil							100,0	0,0						0,0

Abbildung 18 MHK-Verteilung *E. faecalis* gegen Vancomycin



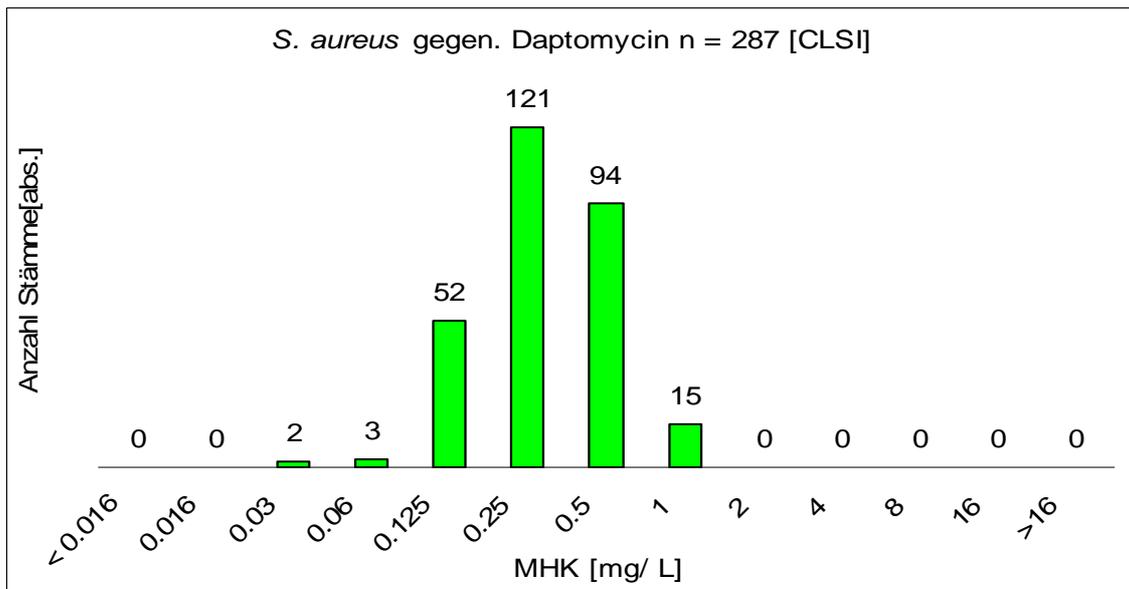
MHK -Wert	<0,03	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	>32	
abs.	1	0	13	69	114	32	3	1	4	9	4	10	27	
%-kum.	0	0,0	4,5	28,7	68,5	79,7	80,8	81,1	82,5	85,7	87,1	90,6	100,0	
%-Anteil							80,8	0,3						18,9

Abbildung 19 MHK-Verteilung *S. aureus* gegen Ciprofloxacin



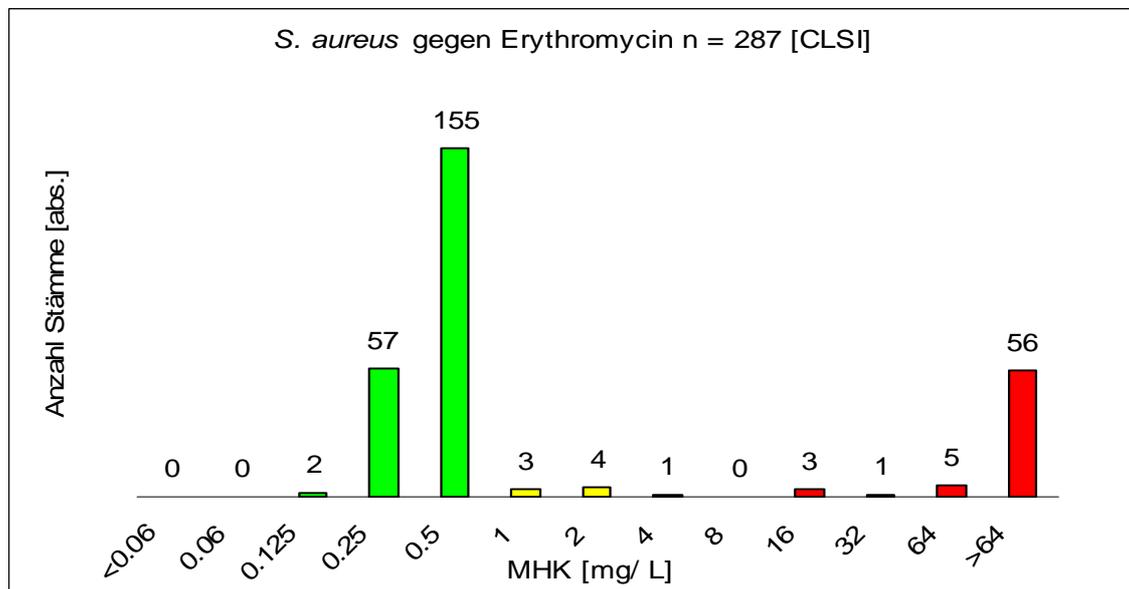
MHK -Wert	<0,03	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	>32
abs.	0	0	0	0	24	41	1	0	0	0	0	0	0
%-kum.	0,0	0,0	0,0	0,0	36,4	98,5	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100

Abbildung 20 MHK-Verteilung *S. aureus* gegen Dalbavancin



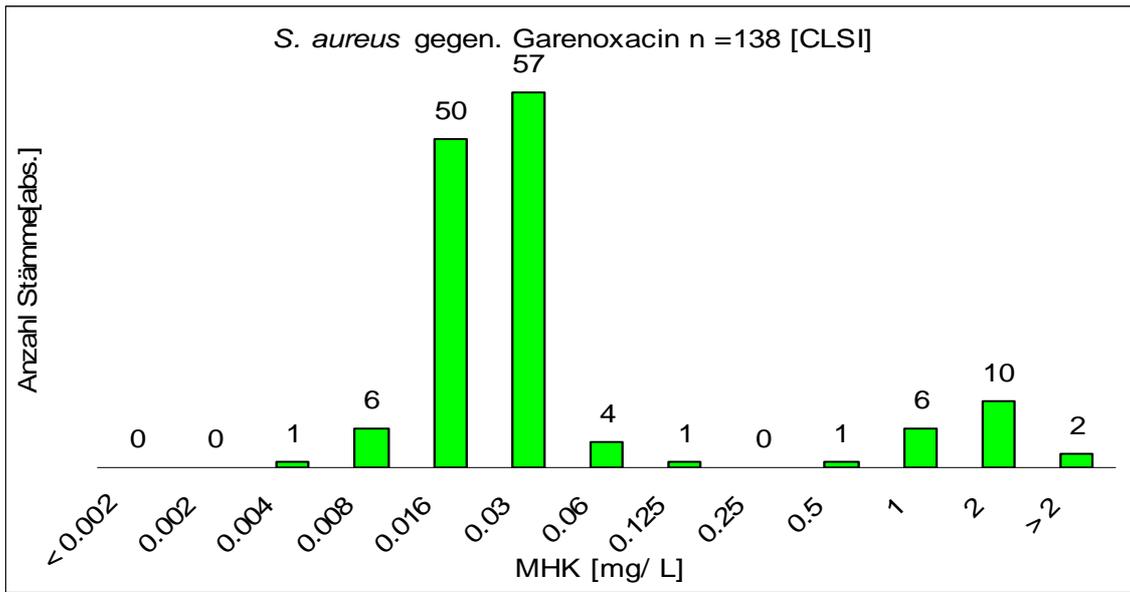
MHK-Wert	<0,016	0,016	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	>16	
abs.	0	0	2	3	52	121	94	15	0	0	0	0	0	
%-kum.	0,0	0,0	0,7	1,7	19,9	62,0	94,8	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100	
%-Anteil								100,0						0,0

Abbildung 21 MHK-Verteilung *S. aureus* gegen Daptomycin



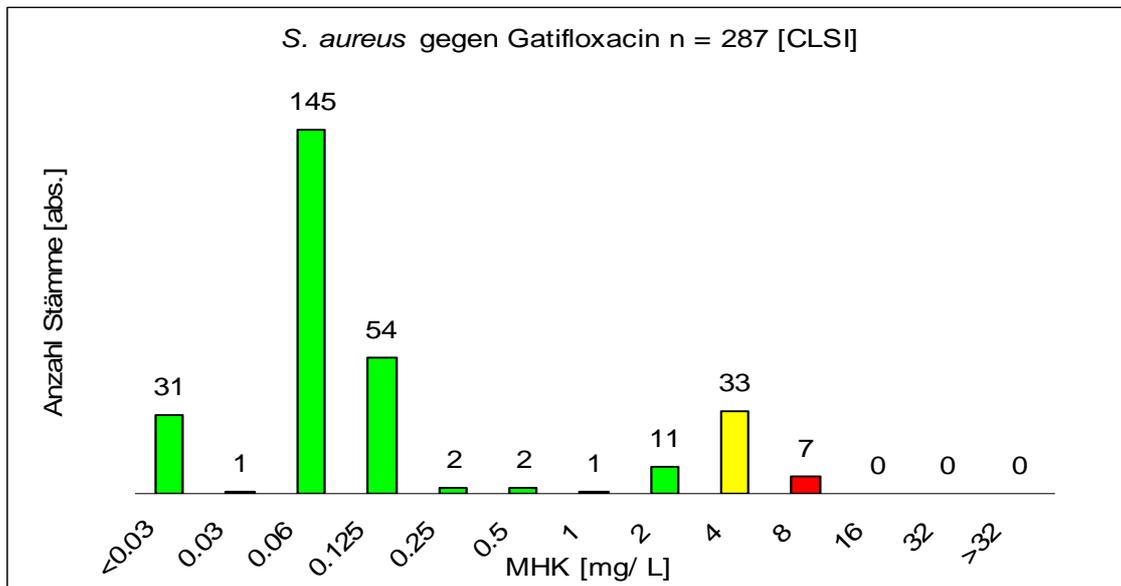
MHK-Wert	<0,06	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	>64	
abs.	0	0	2	57	155	3	4	1	0	3	1	5	56	
%-kum.	0	0	0,7	20,6	74,6	75,6	77,0	77,4	77,4	78,4	78,7	80,5	100,0	
%-Anteil					74,6				2,8					22,6

Abbildung 22 MHK-Verteilung *S. aureus* gegen Erythromycin



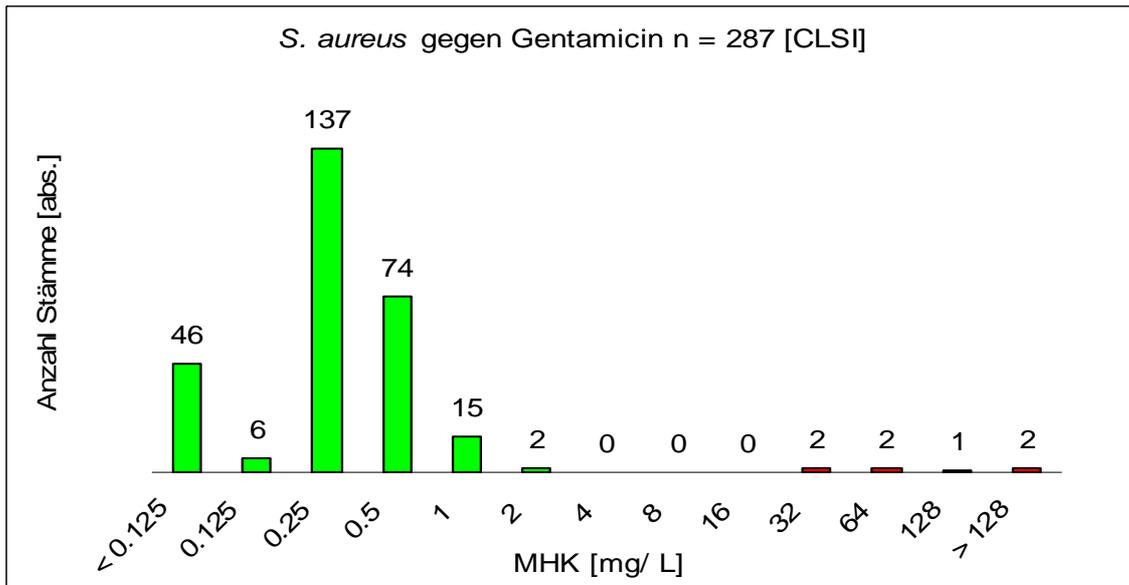
MHK -Wert	<0,002	0,002	0,004	0,008	0,016	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	>2
abs.	0	0	1	6	50	57	4	1	0	1	6	10	2
%-kum.	0,0	0,0	0,7	5,1	41,3	82,6	85,5	86,2	86,2	87,0	91,3	98,6	100

Abbildung 23 MHK-Verteilung *S. aureus* gegen Garenoxacin



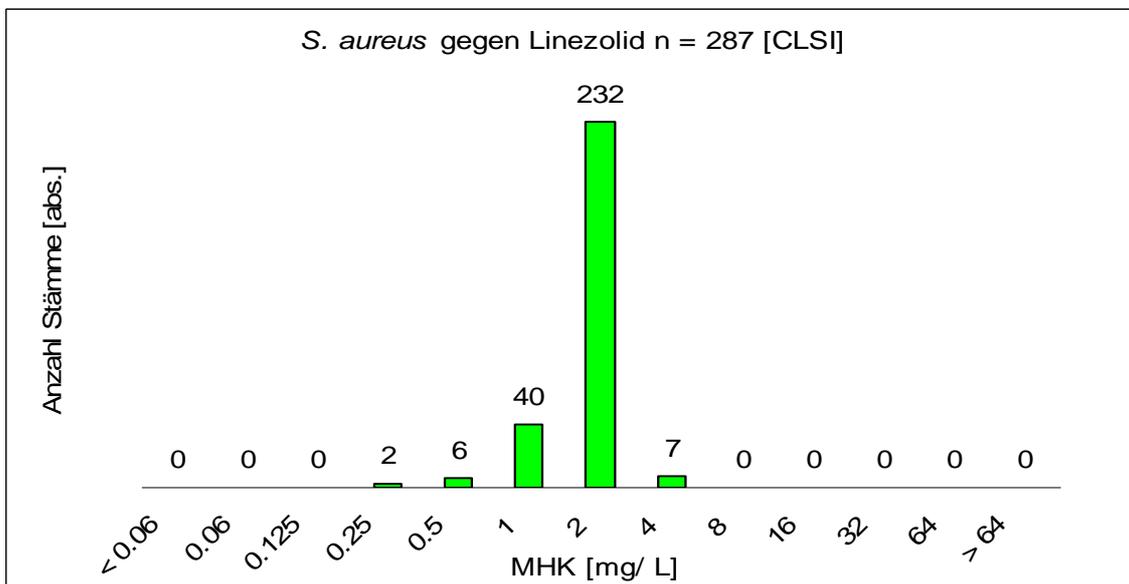
MHK -Wert	<0,03	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	>32	
abs.	31	1	145	54	2	2	1	11	33	7	0	0	0	
%-kum.	10,8	11,1	61,7	80,5	81,2	81,9	82,2	86,1	97,6	100,0	100,0	100,0	100	
%-Anteil								86,1	11,5					2,4

Abbildung 24 MHK-Verteilung *S. aureus* gegen Gatifloxacin



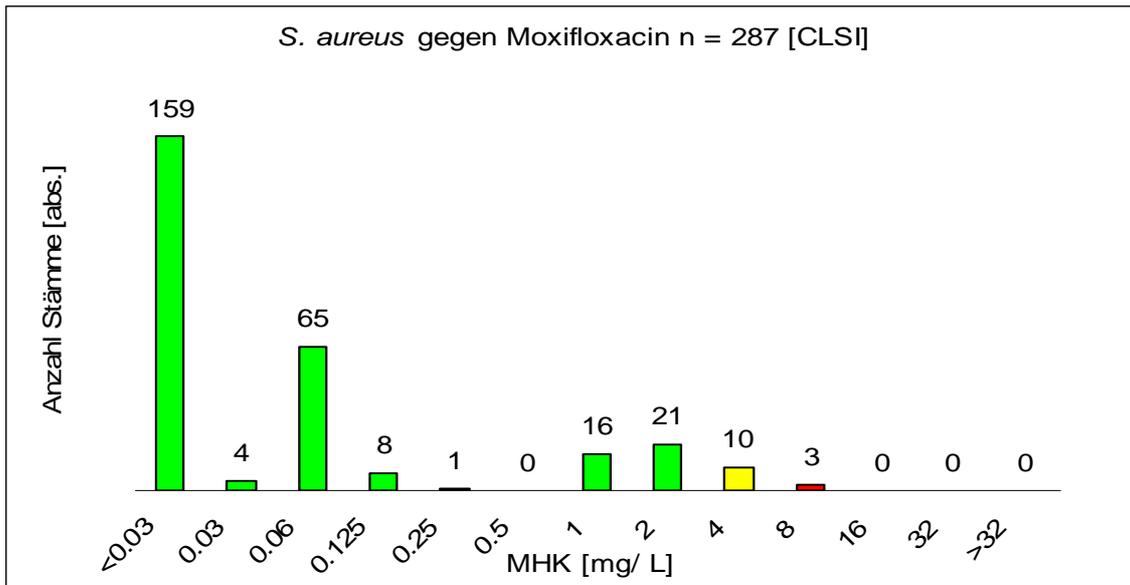
MHK-Wert	<0,125	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128
abs.	46	6	137	74	15	2	0	0	0	2	2	1	2
%-kum.	16,0	18,1	65,9	91,6	96,9	97,6	97,6	97,6	97,6	98,3	99,0	99,3	100
%-Anteil							97,6	0,0					2,4

Abbildung 25 MHK-Verteilung *S. aureus* gegen Gentamicin



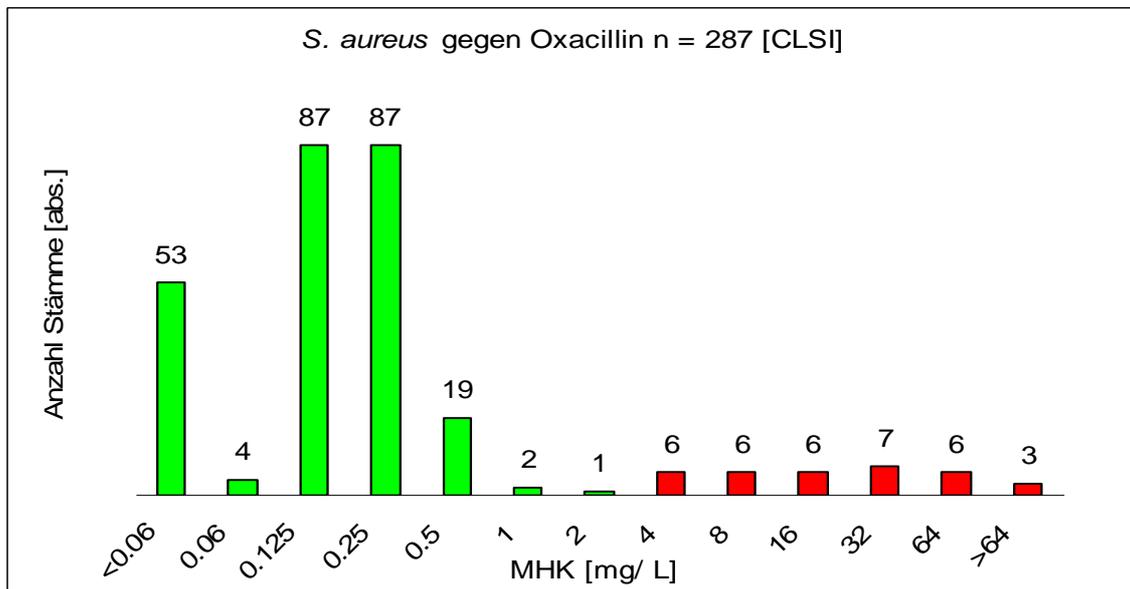
MHK-Wert	<0,06	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	>64	
abs.	0	0	0	2	6	40	232	7	0	0	0	0	0	
%-kum.	0	0,0	0,0	0,7	2,8	16,7	97,6	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100	
%-Anteil								100,0						0,0

Abbildung 26 MHK-Verteilung *S. aureus* gegen Linezolid



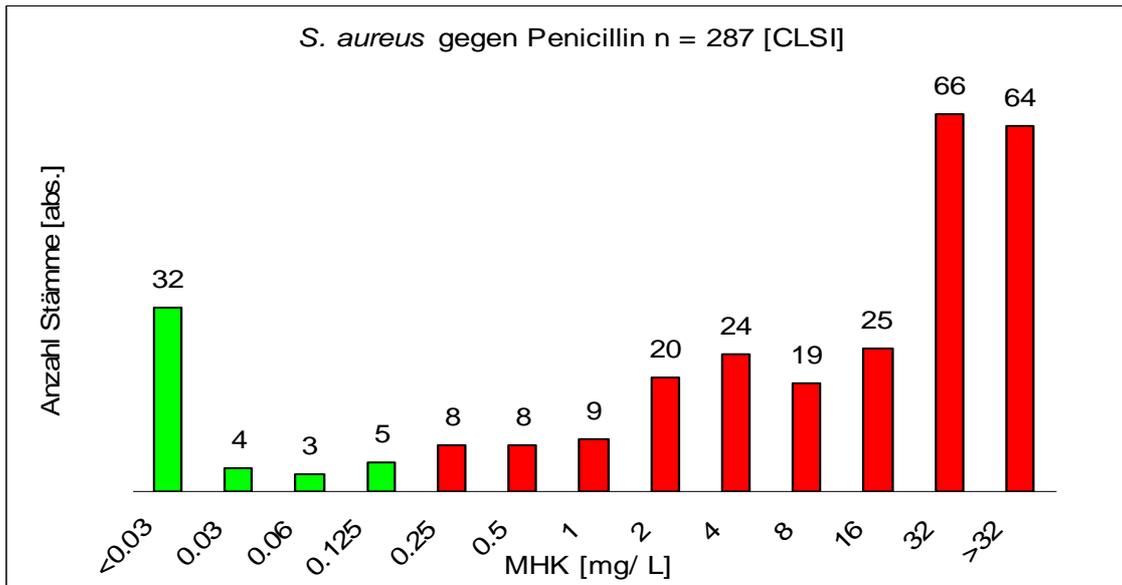
MHK-Wert	<0,03	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	>32	
abs.	159	4	65	8	1	0	16	21	10	3	0	0	0	
%-kum.	55,4	56,8	79,4	82,2	82,6	82,6	88,2	95,5	99,0	100,0	100,0	100,0	100	
%-Anteil								95,5	3,5					1,0

Abbildung 27 MHK-Verteilung *S. aureus* gegen Moxifloxacin



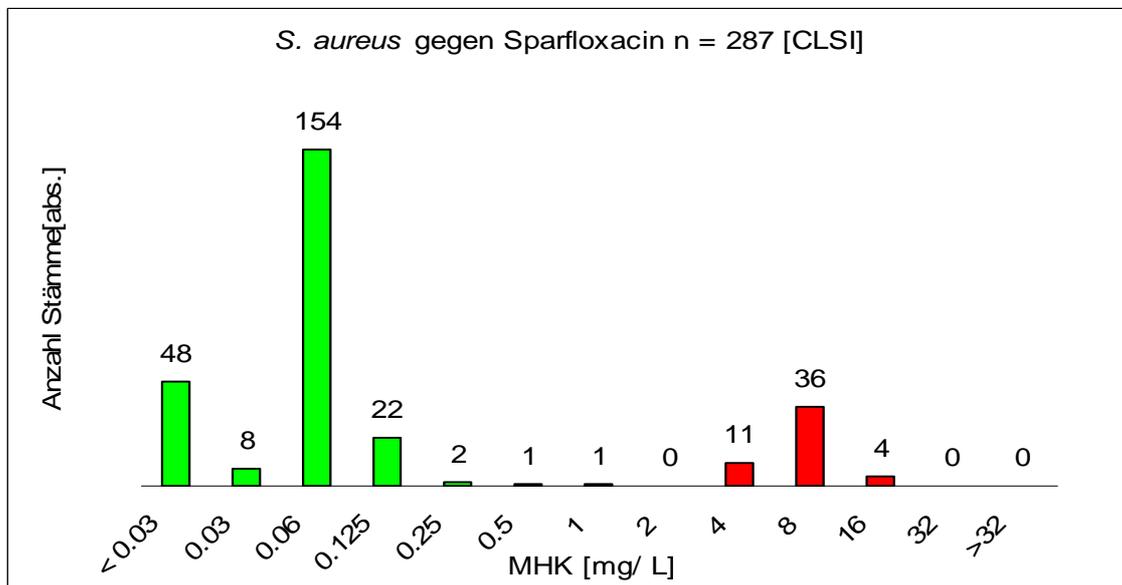
MHK-Wert	<0,06	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	>64	
abs.	53	4	87	87	19	2	1	6	6	6	7	6	3	
%-kum.	18,5	24,4	50,2	80,5	87,1	87,8	88,2	90,2	92,3	94,4	96,9	99,0	100,0	
%-Anteil							88,2							11,8

Abbildung 28 MHK-Verteilung *S. aureus* gegen Oxacillin



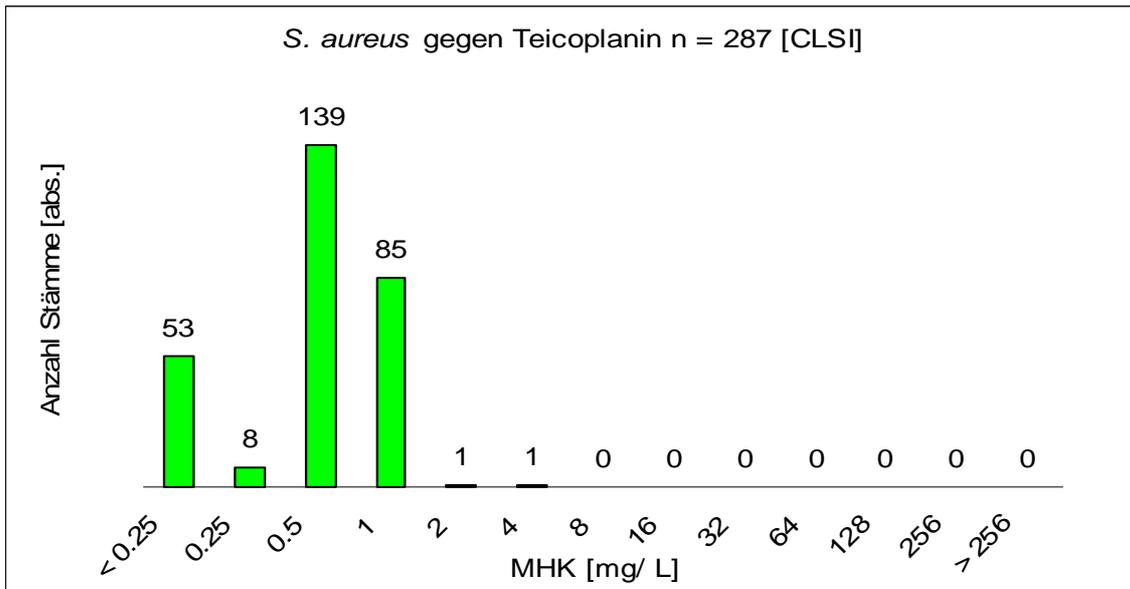
MHK-Wert	<0,03	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	>32	
abs.	32	4	3	5	8	8	9	20	24	19	25	66	64	
%-kum.	11,1	12,5	13,6	15,3	18,1	20,9	24,0	31,0	39,4	46,0	54,7	77,7	100	
%-Anteil				15,3										84,7

Abbildung 29 MHK-Verteilung *S. aureus* gegen Penicillin



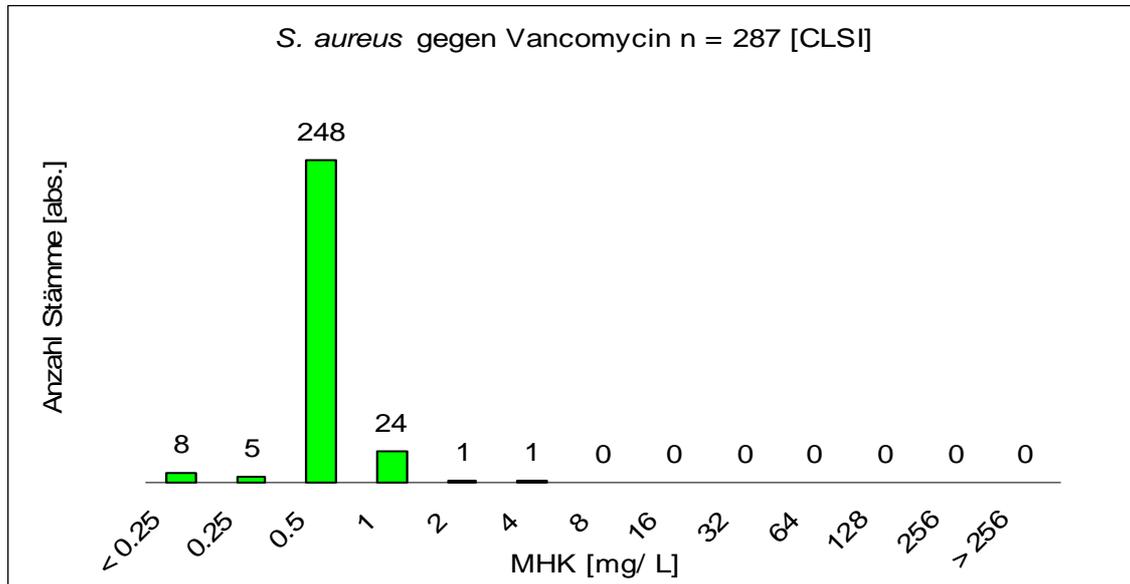
MHK-Wert	<0,03	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	>32	
abs.	48	8	154	22	2	1	1	0	11	36	4	0	0	
%-kum.	16,7	19,5	73,2	80,8	81,5	81,9	82,2	82,2	86,1	98,6	100,0	100,0	100,0	
%-Anteil						81,9	0,3							17,8

Abbildung 30 MHK-Verteilung *S. aureus* gegen Sparfloxacin



MHK -Wert	<0,25	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
abs.	53	8	139	85	1	1	0	0	0	0	0	0	0
%-kum.	18,5	21,3	69,7	99,3	99,7	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100
%-Anteil							100,0	0,0					0,0

Abbildung 31 MHK-Verteilung *S. aureus* gegen Teicoplanin



MHK -Wert	<0,25	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
abs.	8	5	248	24	1	1	0	0	0	0	0	0	0
%-kum.	2,8	4,5	90,9	99,3	99,7	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100
%-Anteil							100,0	0,0					0,0

Abbildung 32 MHK-Verteilung *S. aureus* gegen Vancomycin

**Tabelle 73** Endergebnis der Empfindlichkeits-Prüfung 2004-2007

Erreger	Antibiotikum	Anteil [%] sensibel	Anteil [%] intermediär	Anteil [%] resistent	MHK <sub>50</sub> [mg/L]	MHK <sub>90</sub> [mg/L]	Konzentrations- bereich [mg/L]
<i>E. faecalis</i> (n = 56)	Ampicillin	96,4	-	3,6	1	2	0,125-64
	Daptomycin	100,0	-	0,0	2	4	0,25-4
	Gentamicin (HLAR)	-	-	33,9	-	-	-
	Linezolid	98,2	1,8	0,0	2	4	0,25-4
	Teicoplanin	100,0	0,0	0,0	0,25	1	≤ 0,25-2
	Vancomycin	100,0	0,0	0,0	0,5	2	≤ 0,25-2
<i>E. faecium</i> (n = 32)	Ampicillin	3,1	-	96,9	> 64	> 64	4-> 64
	Daptomycin	100,0	-	0,0	4	4	0,5-4
	Gentamicin (HLAR)	-	-	53,1	-	-	-
	Linezolid	71,9	21,9	6,3	2	4	1-16
	Teicoplanin	93,8	0,0	6,3	0,5	1	≤ 0,25-256
	Vancomycin	90,6	0,0	9,4	0,5	1	≤ 0,25-256
<i>S. aureus</i> (n = 287)	Ciprofloxacin	80,8	0,3	18,9	0,25	32	≤ 0,03-> 32
	Dalbavancin <sup>a</sup>	-	-	-	0,5	0,5	0,25-1
	Daptomycin	100,0	-	0,0	0,25	0,5	0,03-1
	Erythromycin	74,6	2,8	22,6	0,5	> 64	0,125-> 64
	Garenoxacin <sup>b</sup>	-	-	-	0,03	1	0,004->2
	Gatifloxacin	86,1	11,5	2,4	0,06	4	≤ 0,03-8
	Gentamicin	96,8	0,0	2,4	0,25	0,5	≤ 0,125->128
	Linezolid	100,0	-	0,0	2	2	0,25-4
	Moxifloxacin	95,5	3,5	1,0	0,03	2	≤ 0,03-8
	Oxacillin	88,2	-	11,8	0,125	4	≤ 0,06-> 64
	Penicillin G	15,3	-	84,7	16	> 32	≤ 0,03-> 32
	Sparfloxacin	81,9	0,3	17,8	0,06	8	≤ 0,03-16
	Teicoplanin	100,0	0,0	0,0	0,5	1	≤ 0,25-4
Vancomycin	100,0	0,0	0,0	0,5	0,5	≤ 0,25-4	

<sup>a</sup> n = 66, <sup>b</sup> n = 138

### 1.3 Kreuz- bzw. Parallelresistenzen

Von besonderem Interesse für die Auswertung der epidemiologischen Untersuchung, war die Beobachtung von Kreuzresistenzen. Dabei wurde zu einem der Fokus auf die mögliche Kreuzresistenz zwischen verwandten Antibiotikaklassen oder aber auch verschiedenen Stoffgruppen gelegt.

#### 1.3.1 Ergebnisse der Auswertung für *S. aureus*

Aminoglykoside: Der Anteil der getesteten *S. aureus* Isolate mit einem Resistenz gegenüber Gentamicin war mit 2,4 % (7 Isolate) sehr gering. Jedoch waren fünf dieser Isolate gegenüber Erythromycin resistent. Bei einer Anzahl von sechs Isolaten fand sich eine gleichzeitige Resistenz gegenüber den Fluorchinolonen Ciprofloxacin und Sparfloxacin, während alle Isolate gegenüber Gatifloxacin und Moxifloxacin als intermediär oder sensibel eingestuft wurden. Bei den beiden getesteten  $\beta$ -Lactam-Antibiotika waren vier Isolate gegenüber Oxacillin und sechs entsprechend gegenüber Penicillin resistent.

$\beta$ -Lactam-Antibiotika: Bei der Betrachtung der Kreuzresistenz gegenüber  $\beta$ -Lactam-Antibiotika erscheint es ratsam, sich auf das Antibiotikum Oxacillin zu beschränken. Von den getesteten Isolaten waren 34 (11,8 %) gegenüber Oxacillin resistent.

Von diesen waren 94,1 % (n= 32) gegenüber den Fluorchinolonen Ciprofloxacin und Sparfloxacin resistent, während nur zwei Isolate gegenüber Moxifloxacin und sechs gegenüber Gatifloxacin resistent waren. Ein großer Anteil (73,5 %) dieser Isolate zeigte gleichzeitig Resistenz gegenüber Erythromycin. Weiterhin waren insgesamt vier Isolate gegenüber Gentamicin resistent.

Fluorchinolone: Bei den getesteten Fluorchinolonen waren 18,9 % gegenüber Ciprofloxacin, ein Anteil von 17,8 % gegenüber Sparfloxacin und je 2,4 % und 1,0 % gegenüber Gatifloxacin und Moxifloxacin.

Nahezu alle Isolate mit einer Resistenz gegenüber Ciprofloxacin zeigten gleichzeitig eine Unempfindlichkeit gegenüber Sparfloxacin (92,6 %), während nur drei und sieben Isolate jeweils eine Unempfindlichkeit gegenüber Moxifloxacin und Gatifloxacin zeigten.

In 59,3 % der Isolate konnte gleichzeitig eine Unempfindlichkeit gegenüber Oxacillin gezeigt werden, während 64,8 % der getesteten Stämme gleichzeitig eine Unempfindlichkeit gegenüber Erythromycin aufwiesen.

Glycopeptide: Alle getesteten Stämme waren sensibel gegenüber den verwendeten Antibiotika Teicoplanin und Vancomycin.

Lipopeptide: Wie bei den Glykopeptiden zeigten alle getesteten Stämme Sensibilität gegenüber Daptomycin.

Makrolide: Gegenüber dem verwendeten Makrolid Erythromycin zeigten 22,6 % der getesteten Isolate eine Resistenz. Von diesen Stämmen zeigten jeweils 53,8 % gleichzeitig eine Unempfindlichkeit gegenüber Ciprofloxacin und Sparfloxacin. Bei einer Anzahl von 25 Isolaten konnte eine Unempfindlichkeit gegenüber Oxacillin beobachtet werden, während jeweils sieben Stämme eine Resistenz gegenüber Gatifloxacin und weitere fünf und zwei Isolate jeweils gegenüber Gentamicin und Moxifloxacin unempfindlich waren.

Oxazolidinone: Alle getesteten Isolate zeigten keine Resistenz gegenüber Linezolid.

### **1.3.2 Ergebnisse der Auswertung für *Enterococcus* spp.**

Für die Auswertung von Kreuzresistenzen bei *Enterococcus* spp. war es von besonderem Interesse den Zusammenhang zwischen Gentamicin-Hochresistenz und Ampicillin-Unempfindlichkeit zu beobachten. So konnte in 41,7 % der Stämme mit einer Hochresistenz gegenüber Gentamicin gleichzeitig eine Unempfindlichkeit gegenüber Ampicillin beobachtet werden. Interessanterweise wurden alle diese Stämme der Species *E. faecium* zugeordnet.

Alle getesteten Isolate, inklusive dieser mit Resistenz gegenüber Linezolid und den Glykopeptiden, Teicoplanin und Vancomycin, zeigten Empfindlichkeit gegenüber Daptomycin.

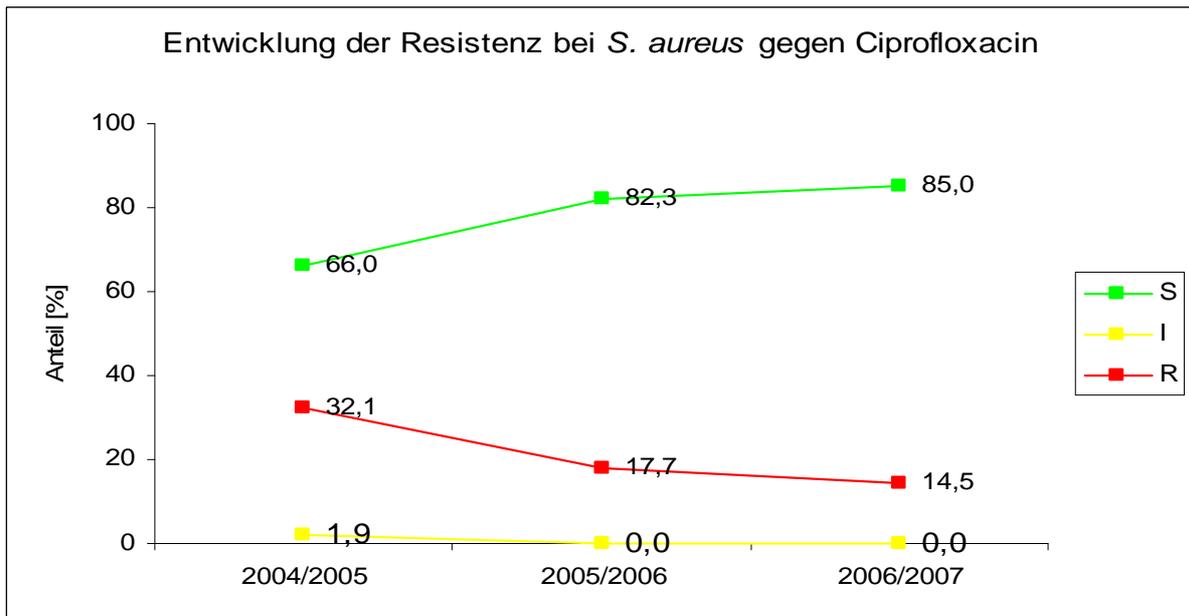
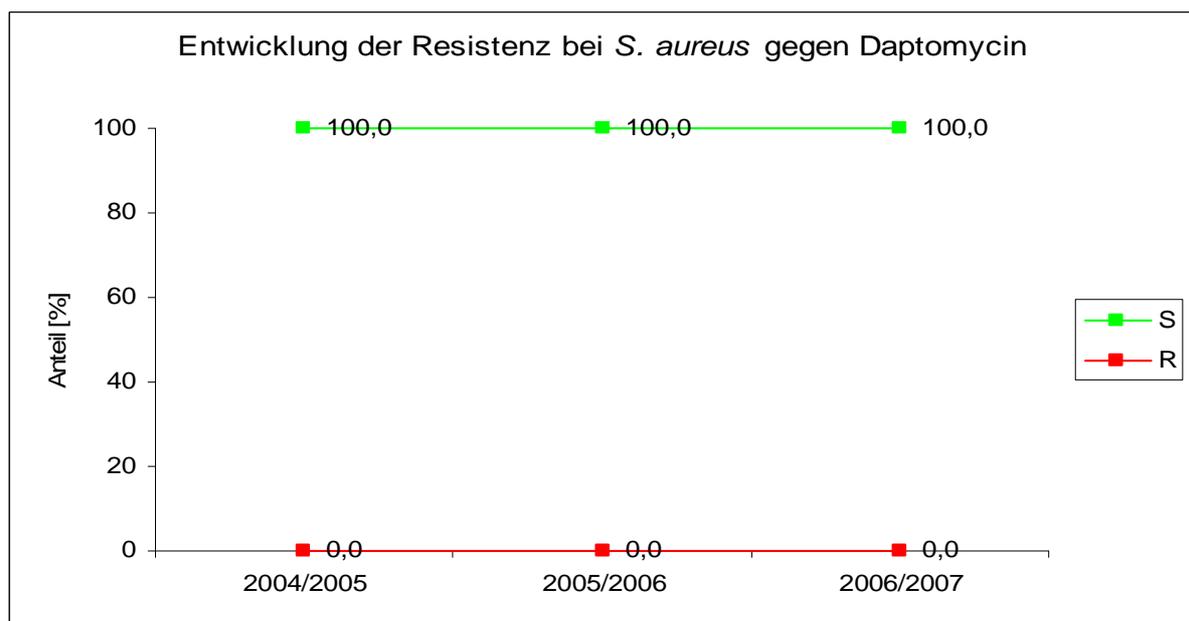
## **1.4 Zeitliche Entwicklung der Resistenzen**

Für die über einen Zeitraum von zweieinhalb Jahren gesammelten Isolate aus dem Routine-Labor wurde die zeitliche Entwicklung der Resistenz gegenüber den getesteten Antibiotika beobachtet. Dazu wurden jeweils die Isolate, welche im Herbst und im Frühjahr des folgenden Jahres getestet wurden, zu einem Kollektiv zusammengefasst. Dabei ergab sich für die einzelnen Species *S. aureus* und *Enterococcus* spp. folgende Aufteilung (Tabelle 74).

**Tabelle 74** Probenverteilung der gesammelten Isolate

Jahr (Herbst/ Frühjahr)	<i>S. aureus</i>	<i>Enterococcus</i> spp.
2004/2005	n= 53	n= 23
2005/2006	n= 96	n= 21
2006/2007	n= 138	n= 44

Die Abbildung 33 bis Abbildung 50 geben jeweils einen Überblick über die zeitliche Entwicklung der Resistenz für *S. aureus* und *Enterococcus* spp..

Abbildung 33 Entwicklung der Resistenz bei *S. aureus* gegen CiprofloxacinAbbildung 34 Entwicklung der Resistenz bei *S. aureus* gegen Daptomycin

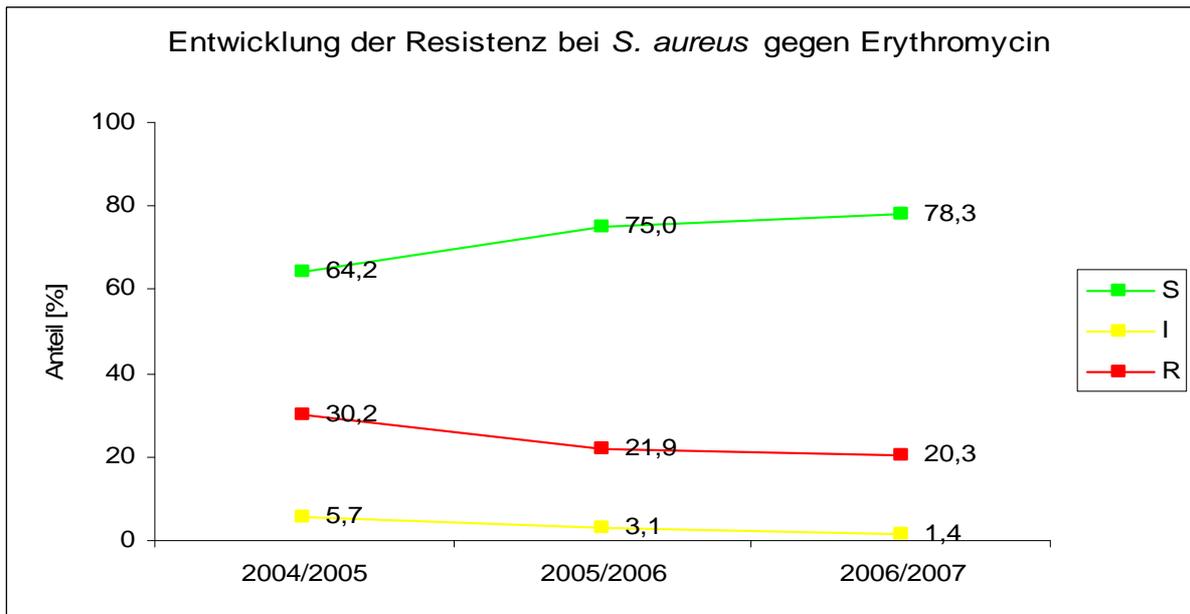


Abbildung 35 Entwicklung der Resistenz bei *S. aureus* gegen Erythromycin

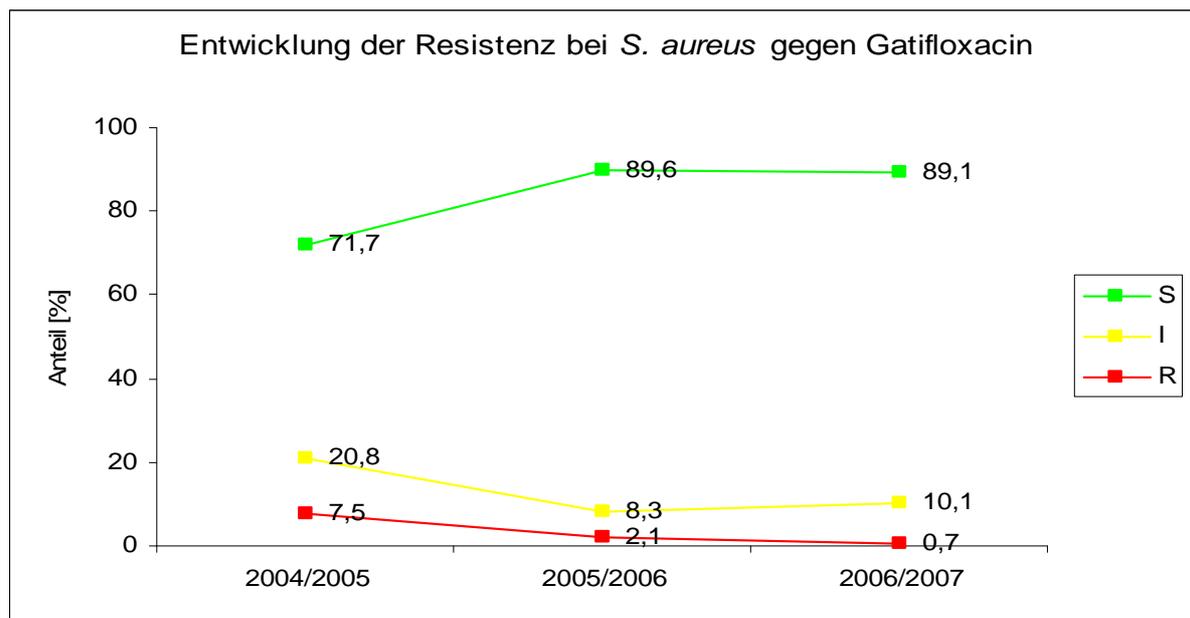
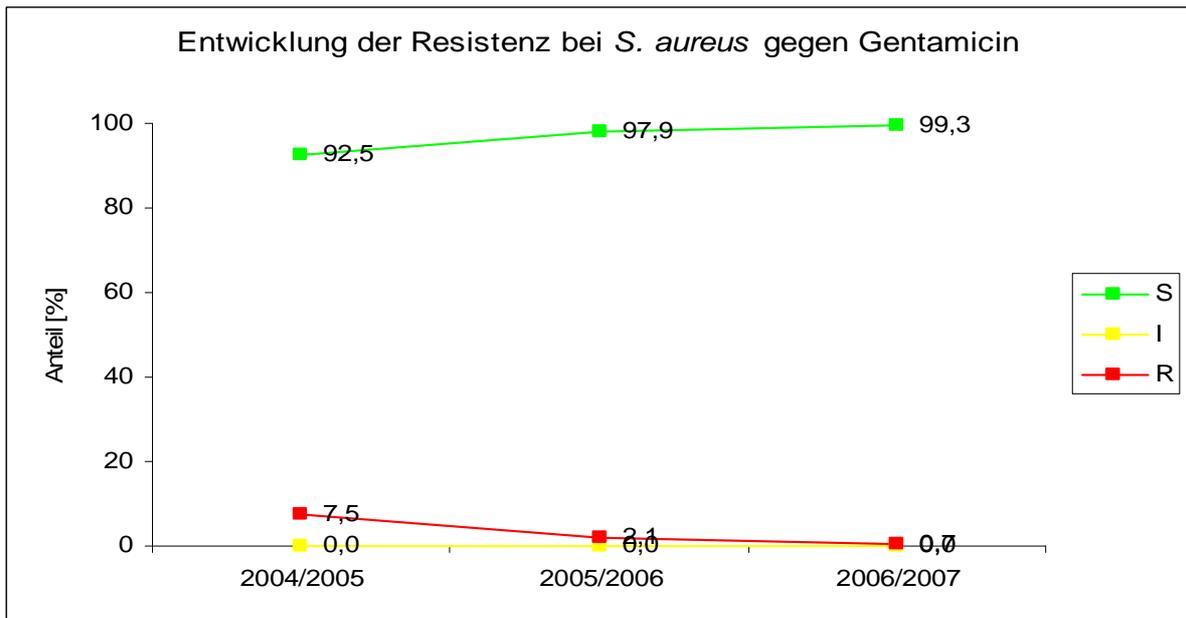
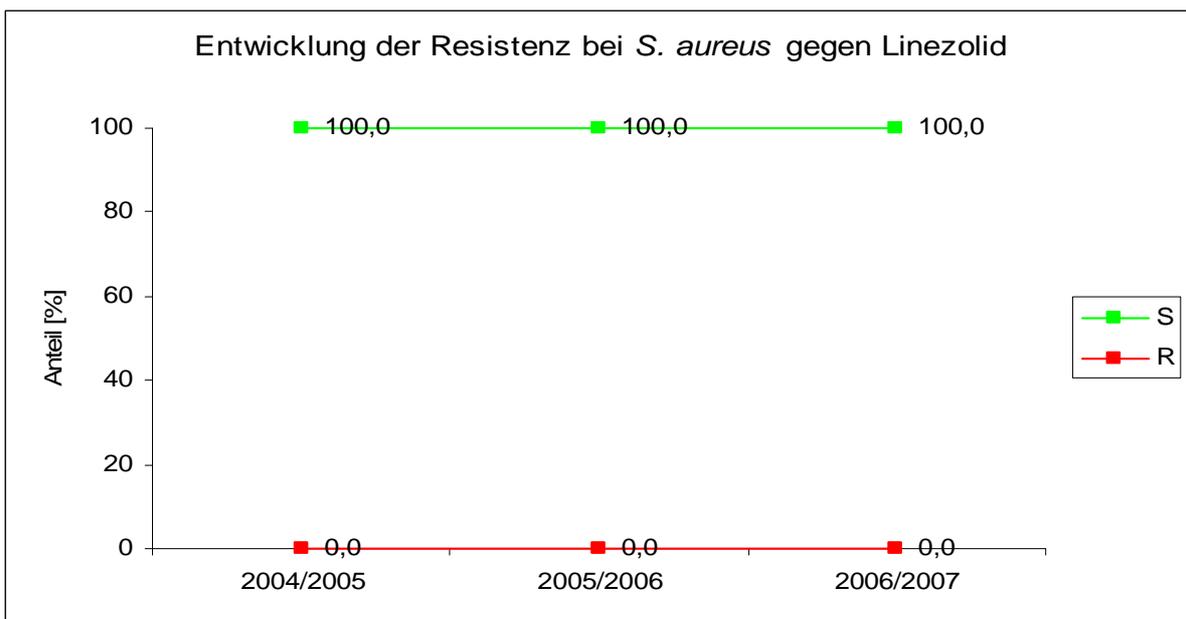


Abbildung 36 Entwicklung der Resistenz bei *S. aureus* gegen Gatifloxacin

Abbildung 37 Entwicklung der Resistenz bei *S. aureus* gegen GentamicinAbbildung 38 Entwicklung der Resistenz bei *S. aureus* gegen Linezolid

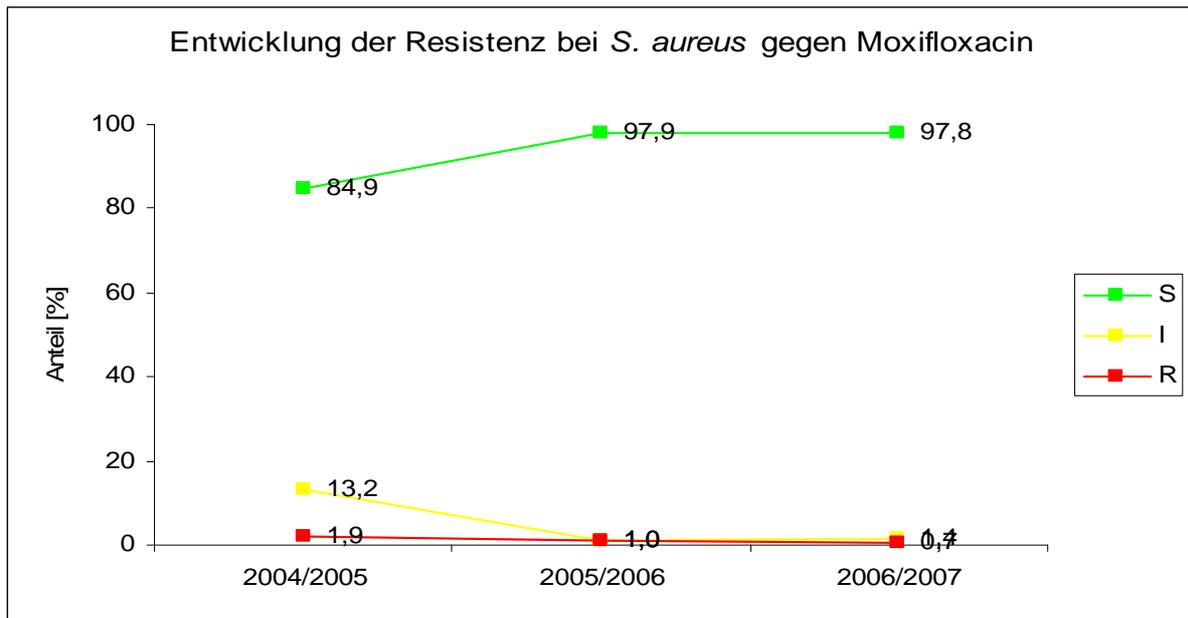


Abbildung 39 Entwicklung der Resistenz bei *S. aureus* gegen Moxifloxacin

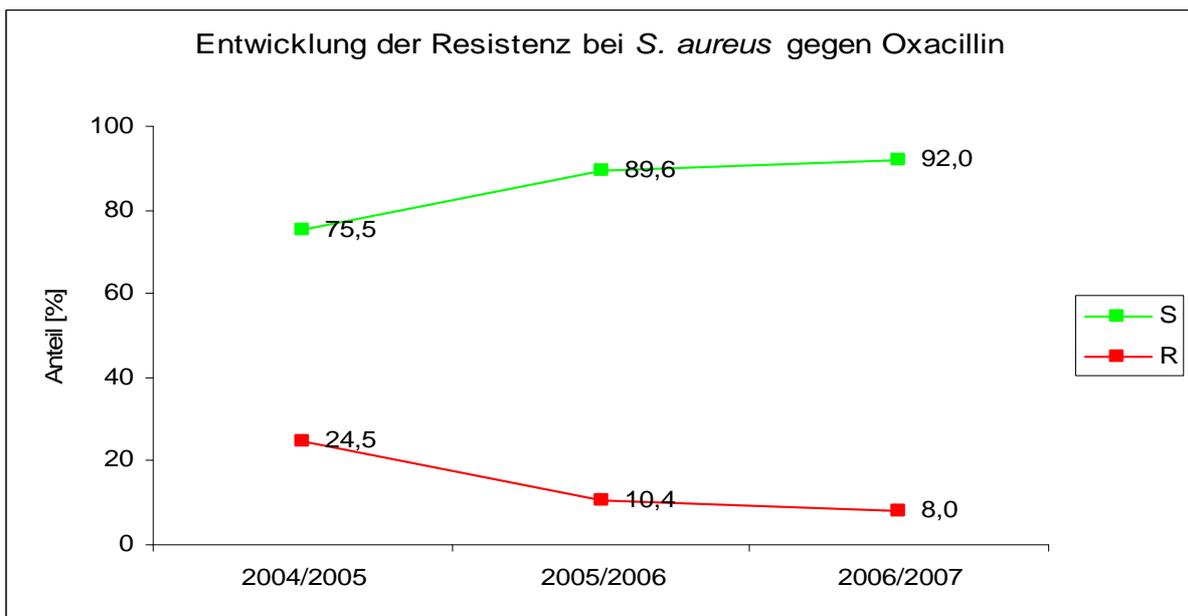
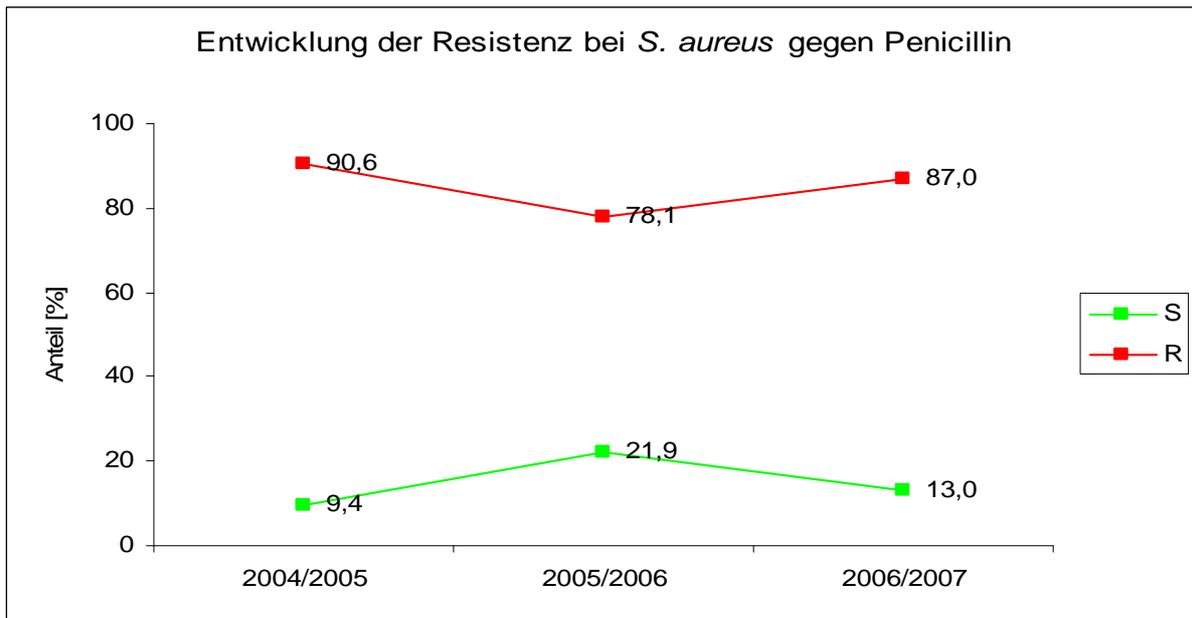
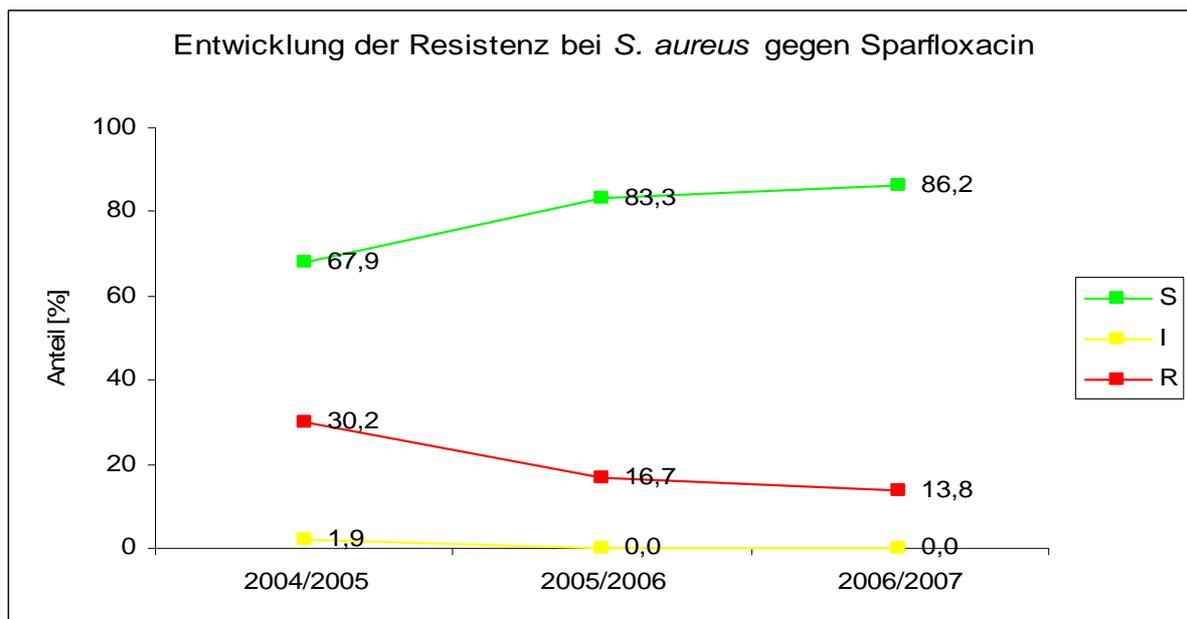


Abbildung 40 Entwicklung der Resistenz bei *S. aureus* gegen Oxacillin

Abbildung 41 Entwicklung der Resistenz bei *S. aureus* gegen PenicillinAbbildung 42 Entwicklung der Resistenz bei *S. aureus* gegen Sparfloxacin

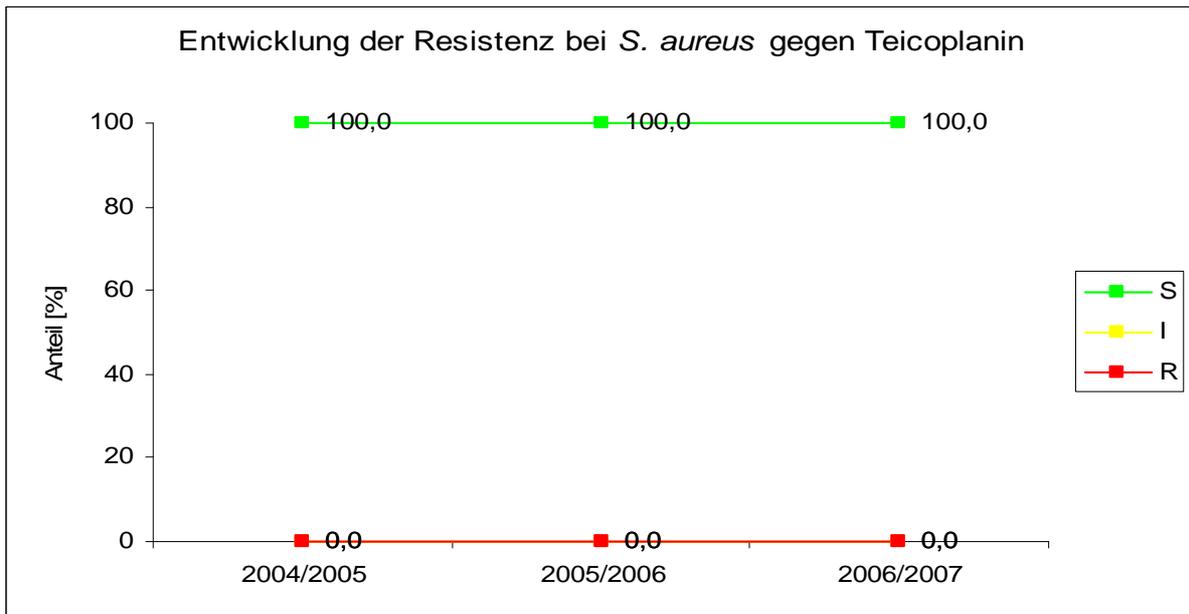


Abbildung 43 Entwicklung der Resistenz bei *S. aureus* gegen Teicoplanin

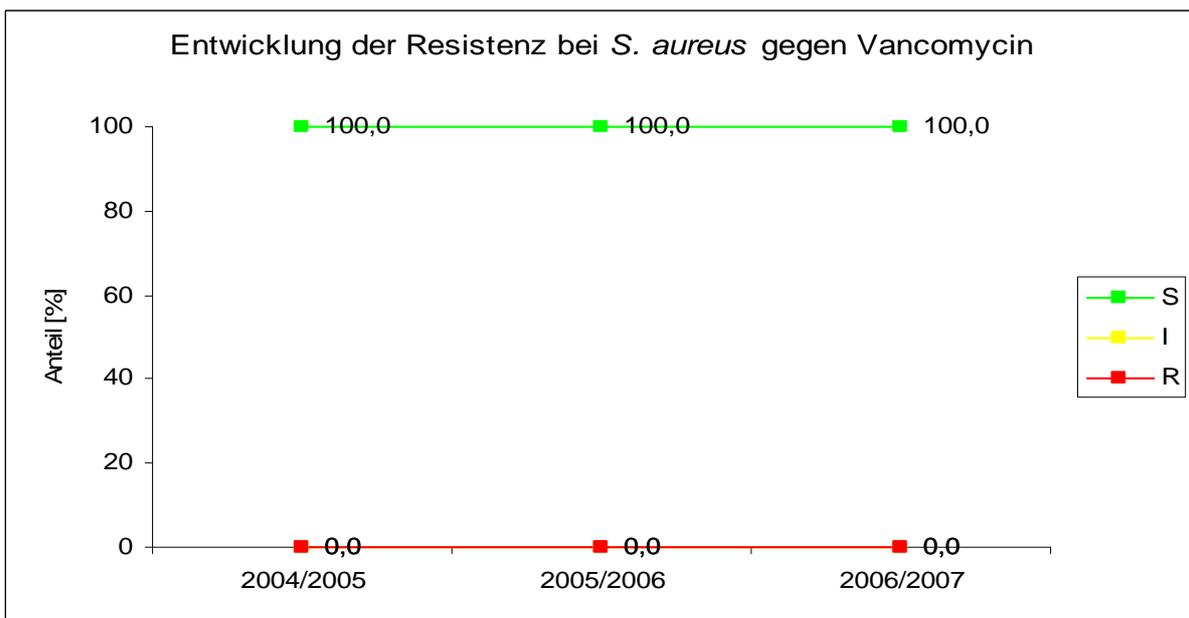
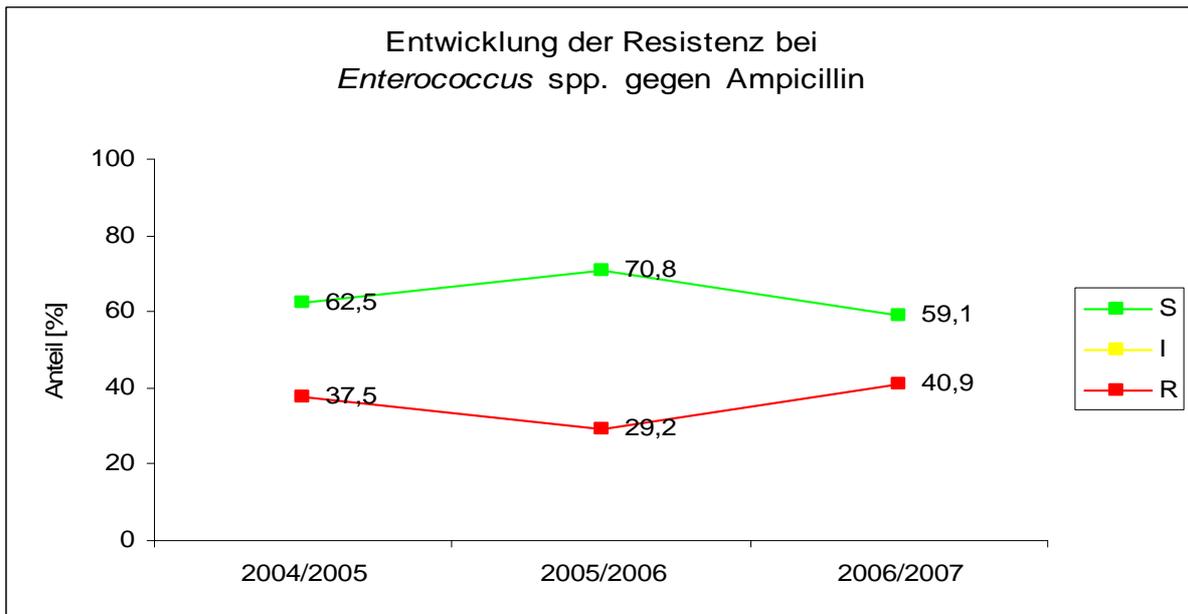
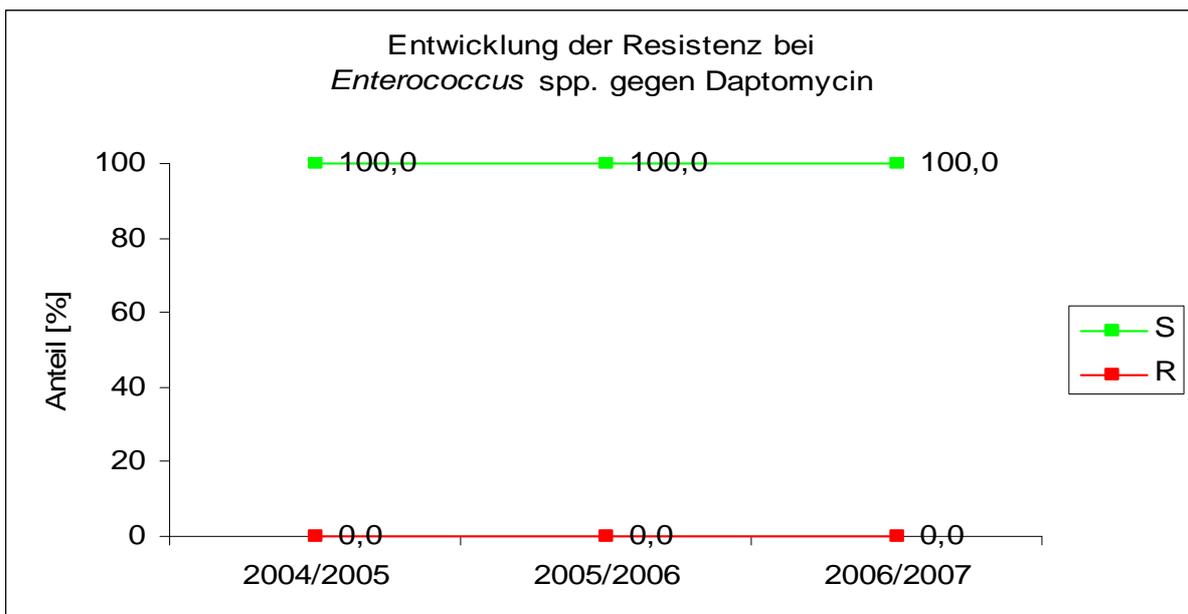


Abbildung 44 Entwicklung der Resistenz bei *S. aureus* gegen Vancomycin

Abbildung 45 Entwicklung der Resistenz bei *Enterococcus* spp. gegen AmpicillinAbbildung 46 Entwicklung der Resistenz bei *Enterococcus* spp. gegen Daptomycin

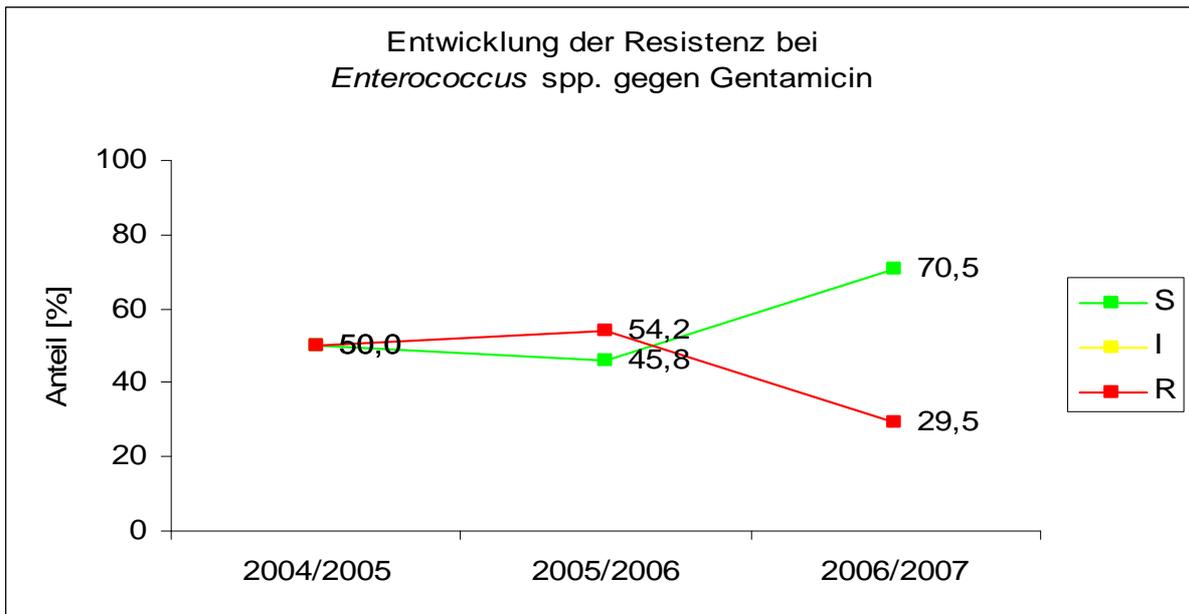


Abbildung 47 Entwicklung der Resistenz bei *Enterococcus* spp. gegen Gentamicin

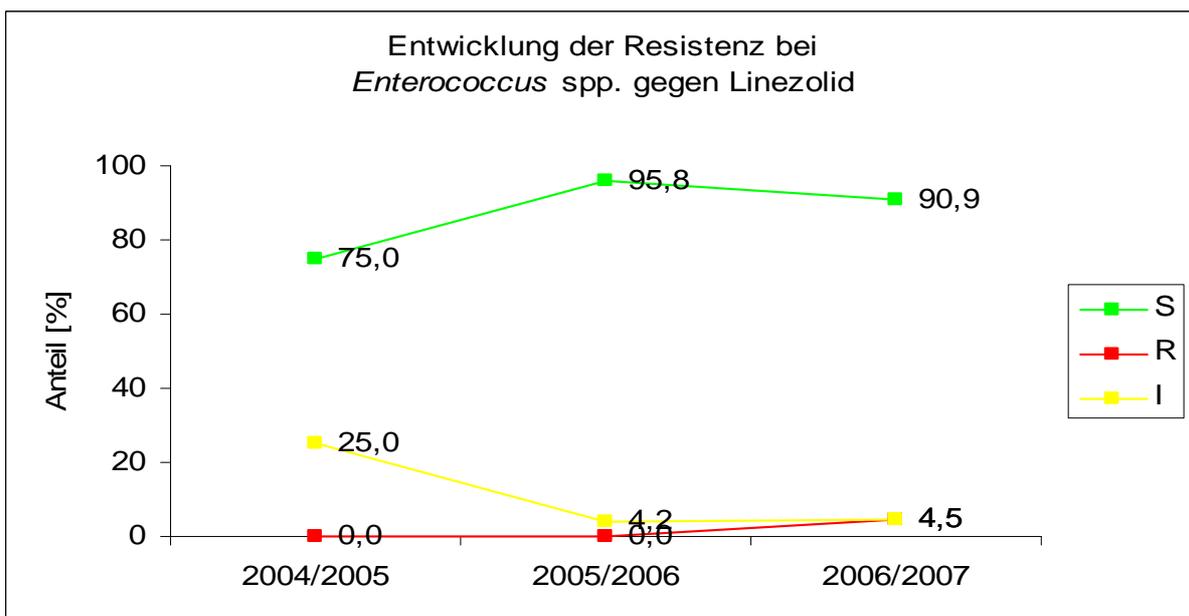
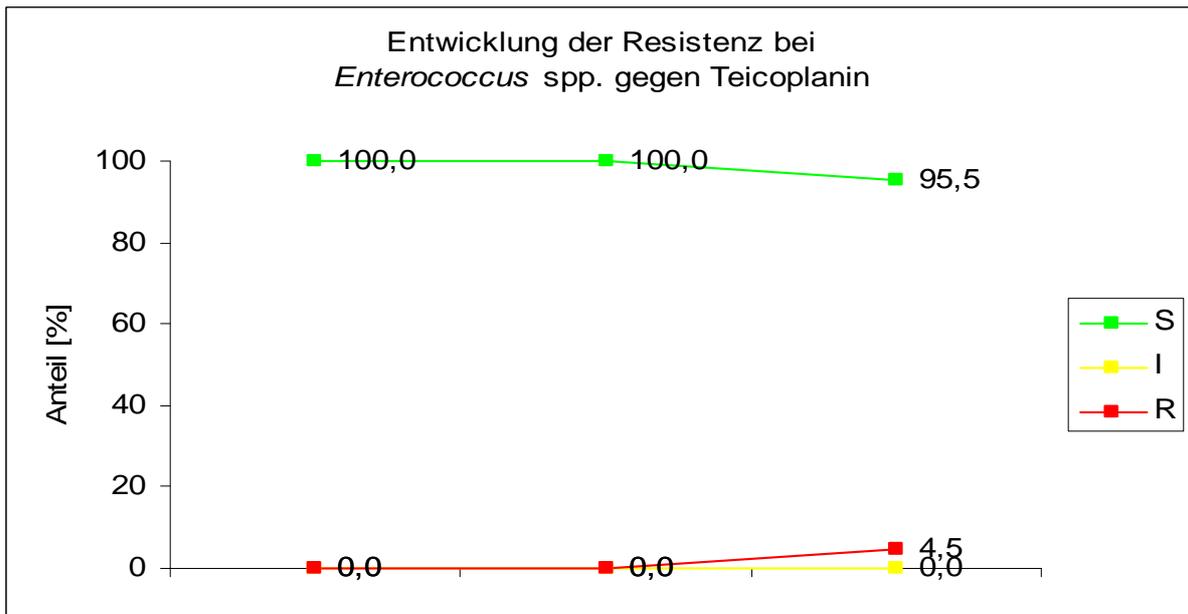
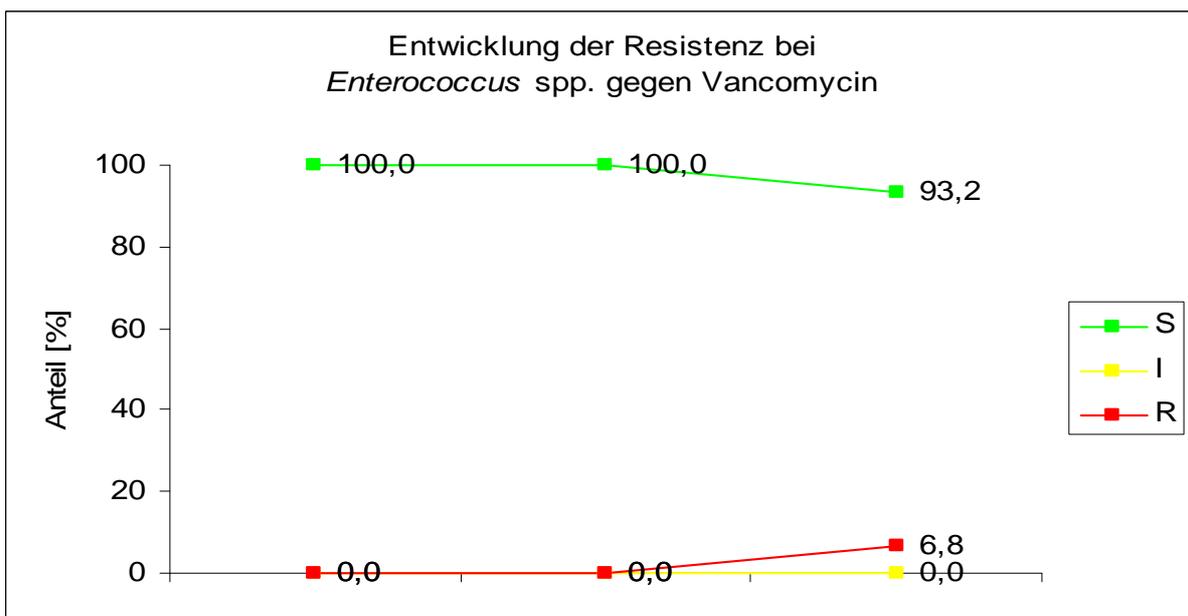


Abbildung 48 Entwicklung der Resistenz bei *Enterococcus* spp. gegen Linezolid

Abbildung 49 Entwicklung der Resistenz bei *Enterococcus* spp. gegen TeicoplaninAbbildung 50 Entwicklung der Resistenz bei *Enterococcus* spp. gegen Vancomycin

## 2 Empfindlichkeit Vancomycin-resistenter *Enterococcus* spp.

### 2.1 Sammlung von *Enterococcus* spp. Isolaten mit Vancomycin-Resistenz

Die diesem Teil der Arbeit vorliegende Stämme bilden ein Kollektiv VRE, die in der Routine-Diagnostik des UKE von 1996 bis 2007 gesammelt wurden.

Diese Stämme haben als gemeinsames Kriterium eine phänotypisch nachgewiesene Vancomycin-Resistenz oder verminderte Empfindlichkeit. Insgesamt wurden 64 Isolate untersucht, von denen 58 als *E. faecium*, vier als *E. gallinarum* und zwei als *E. faecalis* identifiziert wurden.

Die Abbildung 51 gibt einen Überblick über die Verteilung der Proben nach Ihrer Herkunft

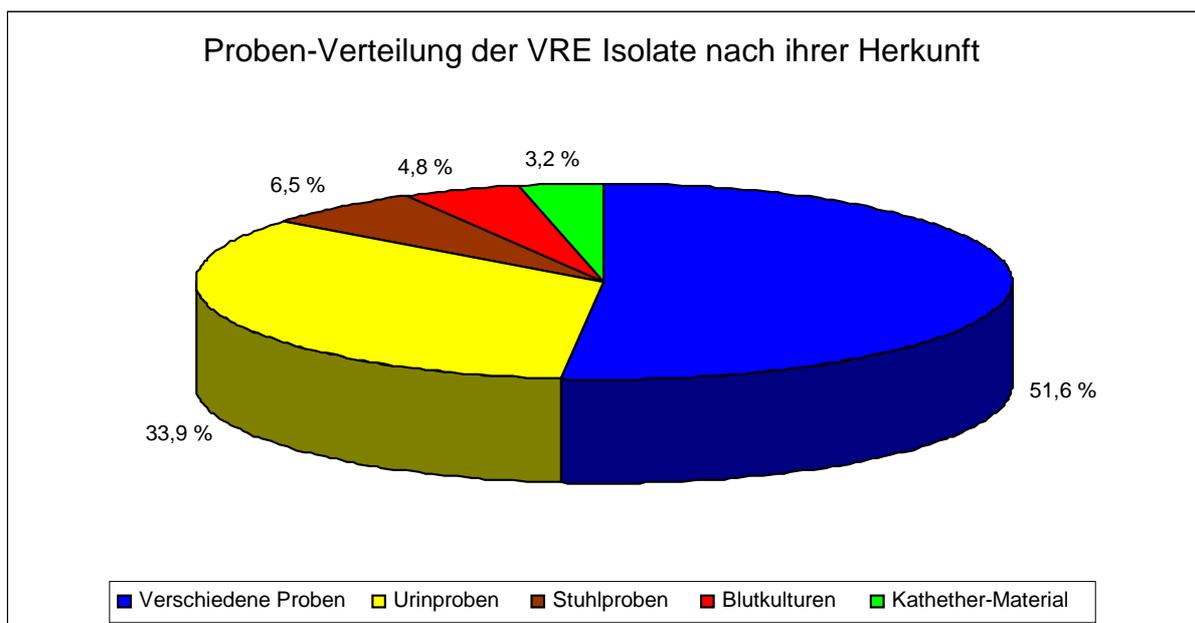


Abbildung 51 Proben-Verteilung der VRE Isolate nach ihrer Herkunft.

### 2.2 Bestimmung der MHK gegenüber ausgewählten Antibiotika

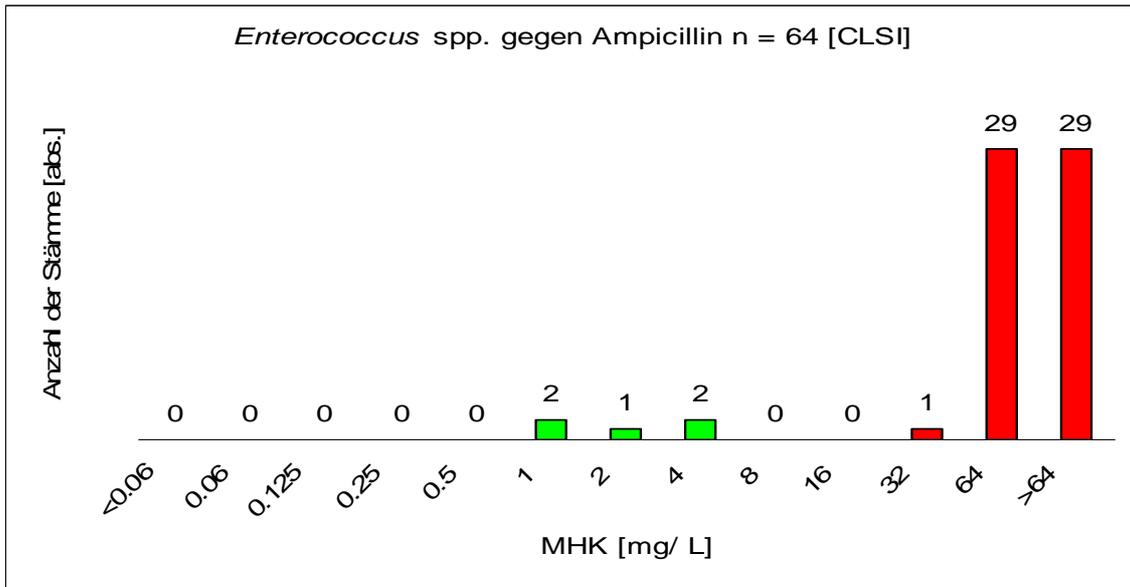
Zur genaueren Charakterisierung und Bestätigung der Vancomycin-Resistenz der gesammelten Isolate, wurde für Vancomycin und weitere ausgewählte Antibiotika, die MHK nach der Mikrodilutionsmethode bestimmt.

Dabei war besonders die Testung gegenüber neueren, gerade zugelassenen Antibiotika (Daptomycin, Linezolid) von Interesse, aber auch die Testung von Substanzen, die sich

gerade in der Zulassung befinden (Dalbavancin). Weiterhin wurde zur genaueren Charakterisierung der Isolate, die Testung mit bewährten Standard-Antibiotika durchgeführt (Ampicillin, Gentamicin, Teicoplanin).

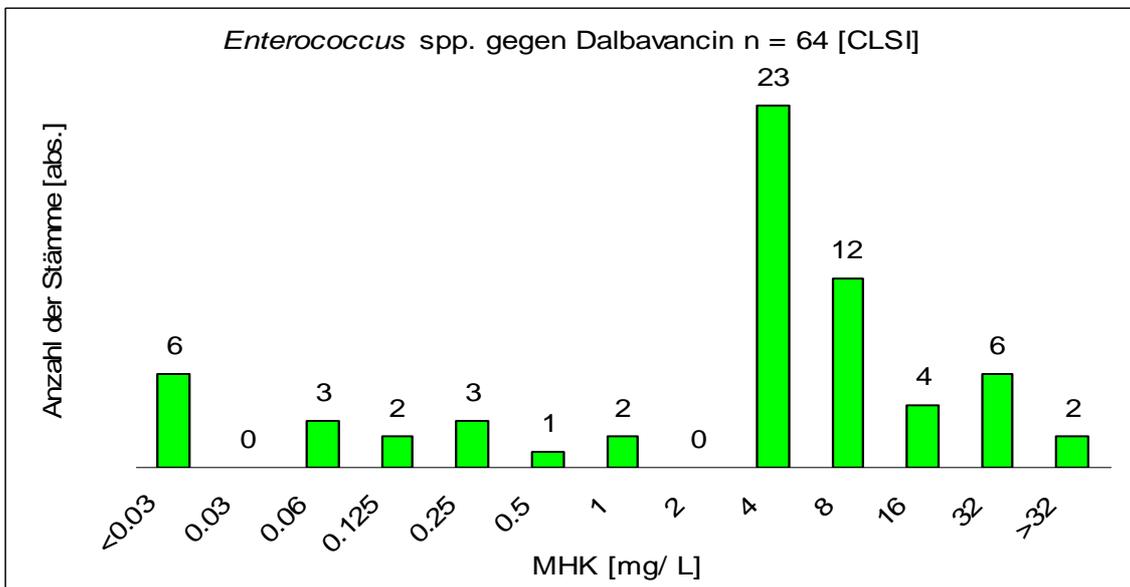
Die Einteilung der getesteten Stämme in sensibel, intermediär oder resistent anhand ihrer MHK-Werte erfolgte unter Berücksichtigung der dieser Testung zugrunde liegenden Vorschrift (113, 114).

Die Abbildung 52 bis Abbildung 58 geben eine graphische Übersicht über die Testung und deren Endergebnis (Tabelle 75).



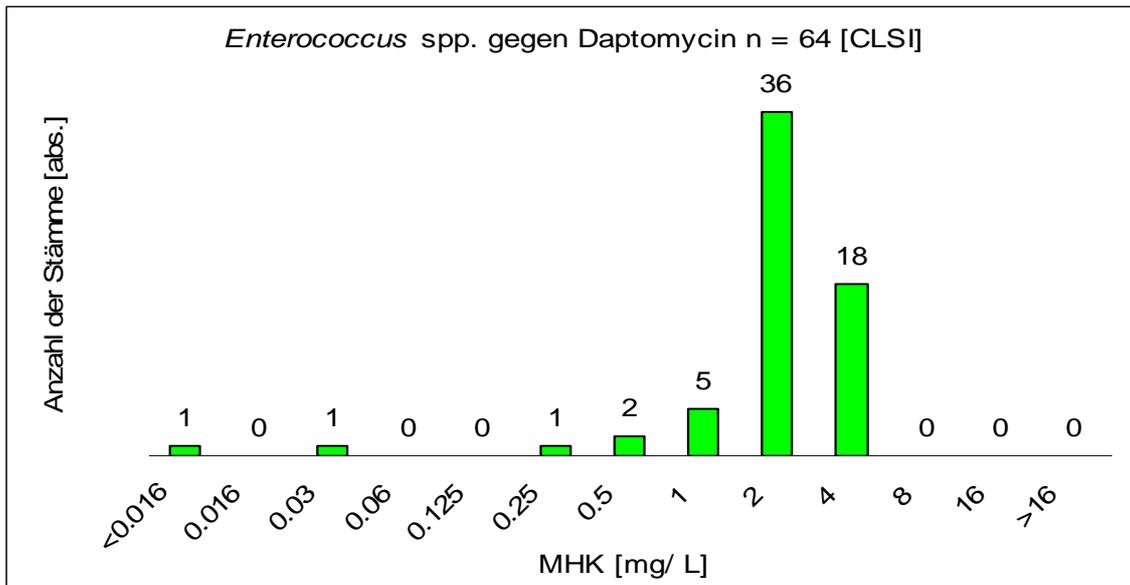
MHK-Wert	<0.06	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	>64	
abs.	0	0	0	0	0	2	1	2	0	0	1	29	29	
%-kum.	0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,1	4,7	7,8	7,8	7,8	9,4	54,7	100	
%-Anteil									7,8					92,2

Abbildung 52 MHK-Verteilung *Enterococcus* spp. gegen Ampicillin



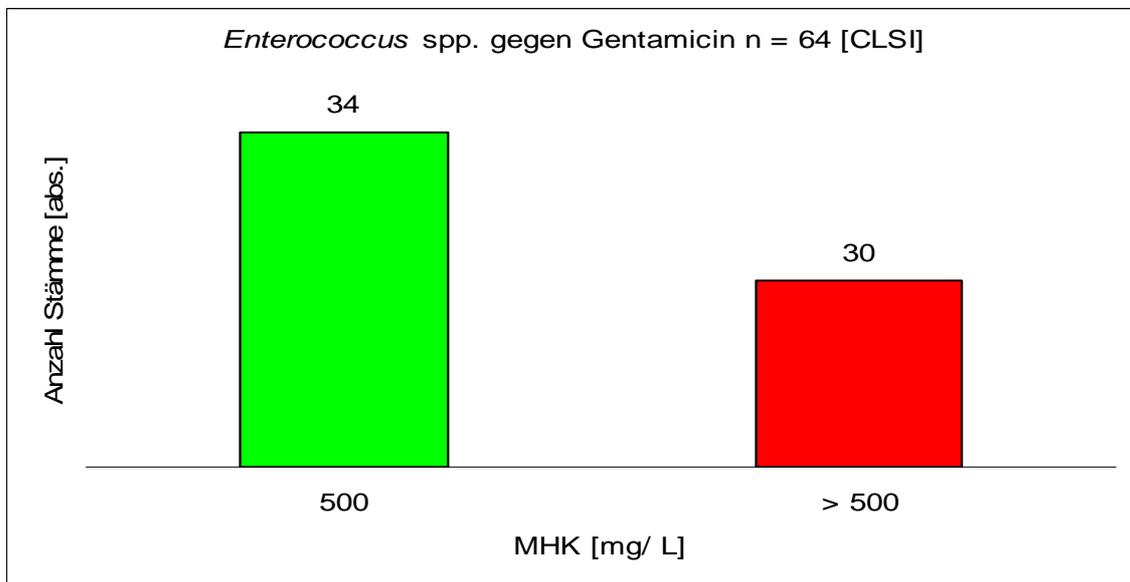
MHK-Wert	<0,03	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	>32
abs.	6	0	3	2	3	1	2	0	23	12	4	6	2
%-kum.	9,4	9,4	14,1	17,2	21,9	23,4	26,6	26,6	62,5	81,3	87,5	96,9	100

Abbildung 53 MHK-Verteilung *Enterococcus* spp. gegen Dalbavancin



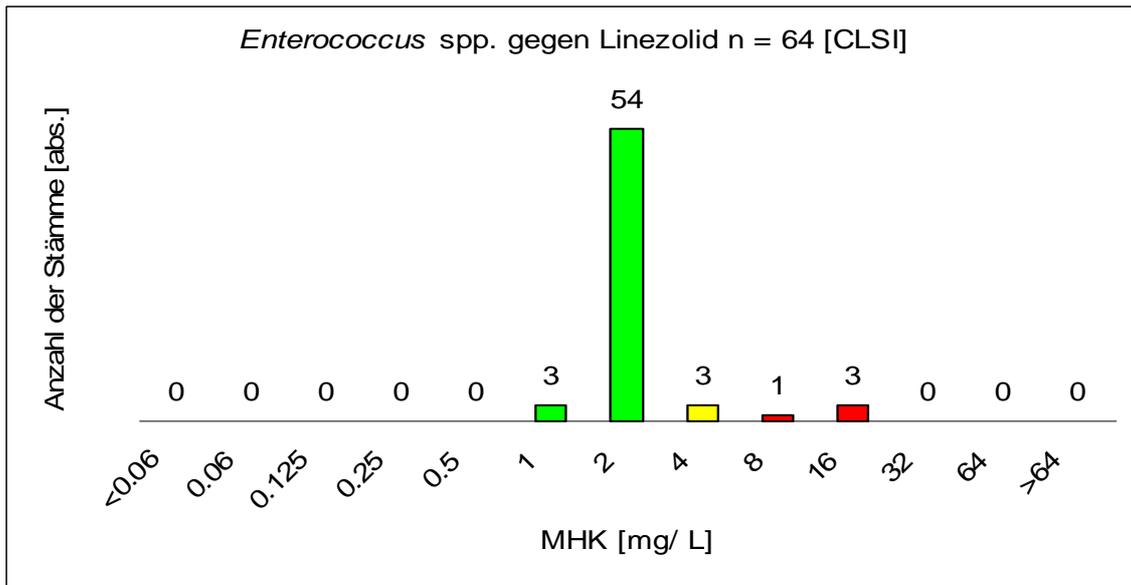
MHK -Wert	<0,016	0,016	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	>16
abs.	1	0	1	0	0	1	2	5	36	18	0	0	0
%-kum.	1,6	1,6	3,1	3,1	3,1	4,7	7,8	15,6	71,9	100,0	100,0	100,0	100
%-Anteil										100,0			0,0

Abbildung 54 MHK-Verteilung *Enterococcus* spp. gegen Daptomycin



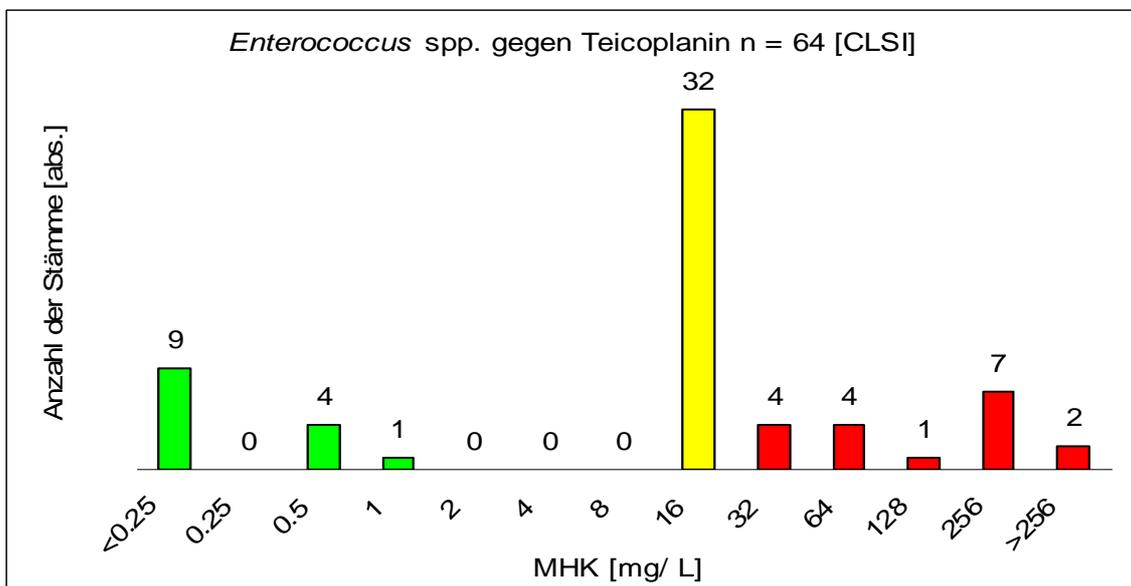
MHK-Wert	500	> 500
abs.	34	30
%-kum.	53,1	100,0
%-Anteil	53,1	46,9

Abbildung 55 MHK-Verteilung *Enterococcus* spp. gegen Gentamicin



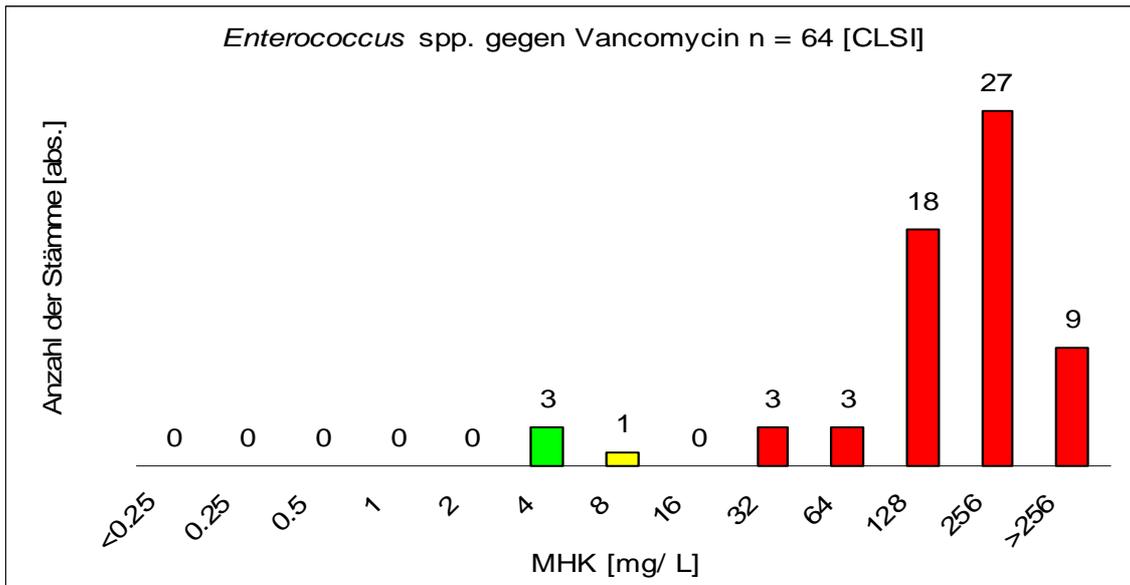
MHK-Wert	<0.06	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	>64
abs.	0	0	0	0	0	3	54	3	1	3	0	0	0
%-kum.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,7	89,1	93,8	95,3	100,0	100,0	100,0	100
%-Anteil							89,1	4,7					6,3

Abbildung 56 MHK-Verteilung *Enterococcus* spp. gegen Linezolid



MHK-Wert	<0,25	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
abs.	9	0	4	1	0	0	0	32	4	4	1	7	2
%-kum.	14,1	14,1	20,3	21,9	21,9	21,9	21,9	71,9	78,1	84,4	85,9	96,9	100
%-Anteil							21,9	50,0					28,1

Abbildung 57 MHK-Verteilung *Enterococcus* spp. gegen Teicoplanin



MHK-Wert	<0,25	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
abs.	0	0	0	0	0	3	1	0	3	3	18	27	9
%-kum.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,7	6,3	6,3	10,9	15,6	43,8	85,9	100
%-Anteil						4,7		1,6					93,8

Abbildung 58 MHK-Verteilung *Enterococcus* spp. gegen Vancomycin

**Tabelle 75** Endergebnis der Empfindlichkeits-Prüfung für die Vancomycin-resistenten *Enterococcus* spp.

Erreger	Antibiotikum	Anteil [%] sensibel	Anteil [%] intermediär	Anteil [%] resistent	MHK <sub>50</sub> [mg/L]	MHK <sub>90</sub> [mg/L]	Konzentrations- bereich [mg/L]
<i>Enterococcus</i> spp. (n = 64)	Ampicillin	7,8	-	92,2	64	>64	1->64
	Dalbavancin	-	-	-	4	32	≤0,03->32
	Daptomycin	100,0	-	0,0	1	4	0,25-4
	Gentamicin (HLAR)	-	-	46,9	-	-	-
	Linezolid	89,1	4,7	6,3	2	4	1-16
	Teicoplanin	21,9	50,0	28,1	8	256	≤0,25-256
	Vancomycin	4,7	1,6	93,8	256	>256	4->256

### 3 Detektion von Resistenz-Mechanismen auf molekularer Ebene

Nach Charakterisierung der Isolate auf phänotypischer Ebene sollte als nächster Schritt der Nachweis ausgewählter Resistenzmechanismen auf molekularer Ebene erfolgen. Die am häufigsten verwendete Methode zur genotypischen Charakterisierung war die PCR, mit deren Hilfe Abschnitte des nachzuweisenden Gens amplifiziert wurden. Diese Fragmente wurden im Anschluss mittels Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt und unter UV-Licht durch Ethidiumbromid detektiert.

#### 3.1 Nachweis des Aminoglykosid-modifizierenden Enzyms AAC(6')-APH(2'') bei Gentamicin-hochresistenten *Enterococcus* spp. mit Hilfe der PCR

Als mögliche Ursache für eine hohe Unempfindlichkeit von Enterokokken gegenüber Gentamicin (MHK  $\geq$  500 mg/L) kann das Vorhandensein eines bifunktionalen Doppelenzyms eine Rolle spielen. Dieses Enzym AAC(6')-APH(2'') inaktiviert das Gentamicin durch spezifische Modifikationen, so dass die Bindung an die Zielstruktur verhindert wird.

Mit Hilfe einer PCR (C2.3.1.1) wurde unter Verwendung von spezifischen Primern ein 541 bp großer Abschnitt des korrespondierenden Gens amplifiziert und im Anschluss im Agarosegel aufgetrennt und detektiert (Abbildung 59). Dabei wurde ein geeigneter Größenstandard verwendet, um die visualisierten Banden zuzuordnen. Als Negativ-Kontrolle diente ein PCR-Produkt aus der DNA von *E. faecalis* ATCC<sup>®</sup> 29212, sowie als Positiv-Kontrolle ein PCR-Produkt, das aus der DNA von *E. faecalis* ATCC<sup>®</sup> 51229 gewonnen wurde.

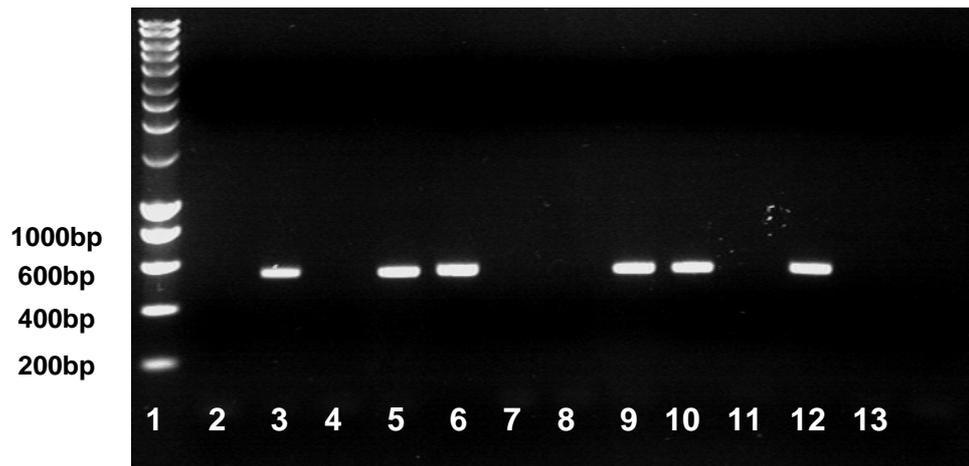


Abbildung 59 Auftrennung der amplifizierten Abschnitte (541 bp) in einem 1,2 %igen Agarosegel und Detektion unter UV-Licht mit Ethidiumbromid.

1:Größenstandard Smart-Ladder (200-10.000 bp), 2:*E. faecalis* UR7951/04(-), 3:*E. faecalis* UR7939/04(+), 4:*E. faecium* UR7980/04(-), 5:*E. faecium* UR7940/04(+), 6:*E. faecalis* UR7941/04(+), 7:*E. faecalis* VA25451/04(-), 8:*E. faecalis* VA25508/04(-), 9:*E. faecium* UR7953/04(+), 10:*E. faecium* VA26058/04(+), 11:*E. faecalis* ATCC®29212, 12:*E. faecalis* ATCC®51229, 13:PCR-Negativ-Kontrolle  
(+)Nachweis des Doppelenzym AAC(6')-APH(2''),(-)kein Nachweis des Doppelenzym AAC(6')-APH(2'')

Dabei wurden insgesamt 36 *Enterococcus* spp., davon 19 Isolate *E. faecalis* und 17 *E. faecium* mit phänotypischer Gentamicin-Hochresistenz mit Hilfe dieser PCR untersucht.

Bei einem Anteil von 68,4 % der *E. faecalis* Isolaten zeigte sich eine Übereinstimmung zwischen dem Vorhandensein des AAC(6')-APH(2'')-Enzyms und der phänotypischen Resistenz. Dagegen wurde bei 88,2 % der *E. faecium* Isolate mit Gentamicin-Hochresistenz das AAC(6')-APH(2'')-Enzym nachgewiesen.

Insgesamt konnte bei 77,8 % aller *Enterococcus* spp. Isolaten mit hoher Unempfindlichkeit gegenüber Gentamicin das AAC(6')-APH(2'')-Enzym mittels PCR nachgewiesen werden.

### 3.2 Nachweis der *vanA*-, *vanB* -und *vanC*-Gene bei Vancomycin-resistenten *Enterococcus* spp. mit Hilfe einer Multiplex-PCR

Zur Verifizierung der Ergebnisse der MHK-Bestimmung gegenüber Vancomycin und Teicoplanin wurde eine aus der Literatur übernommene Multiplex-PCR (C2.3.1.2) durchgeführt. Dabei wurde mit Hilfe von Sequenz-spezifischen Primern bestimmte Abschnitte aus den entsprechenden Resistenzgen-Determinanten (*vanA*, *vanB*, *vanC1* und *vanC2/3*) amplifiziert. Gleichzeitig erfolgte ebenfalls unter Verwendung von spezifischen Primern eine Species-Zuordnung (*E. faecium* und *E. faecalis*). Die gewonnenen Fragmente wurden im Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid unter UV-Licht detektiert

(Abbildung 60 und Abbildung 61). Gleichzeitig wurde ein geeigneter Größenstandard verwendet, um die detektierten Fragmente einem Größenbereich zuordnen zu können.

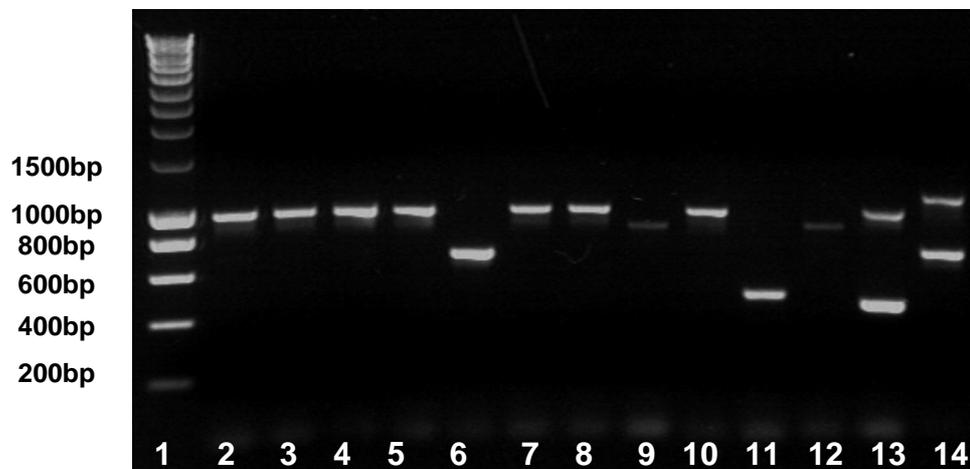


Abbildung 60 Auftrennung der amplifizierten Abschnitte zum Nachweis der Vancomycin-Resistenz in einem 1,3 %igen Agarosegel und Detektion unter UV-Licht mit Ethidiumbromid.

1:Größenstandard Smart-Ladder (200-10.000 bp), 2:*E. faecalis* UR7939/04(-), 3:*E. faecalis* UR7941/04(-), 4:*E. faecalis* UR7951/04(-), 5:*E. faecalis* VA25451/04(-), 6:*E. faecium* UR7953/04 (-), 7:*E. faecalis* VA25508/04 (-), 8:*E. faecalis* VA25602/04 (-), 9:*E. gallinarum* VA3564/05(+), 10:*E. faecalis* ATCC®29212, 11:*E. casseliflavus* ATCC®25788, 12:*E. gallinarum* BM4174, 13:*E. faecalis* V583, 14:*E. faecium* BM4174

(+)Nachweis einer Vancomycin-Resistenz-Determinante, (-)kein Nachweis einer Vancomycin-Resistenz-Determinante

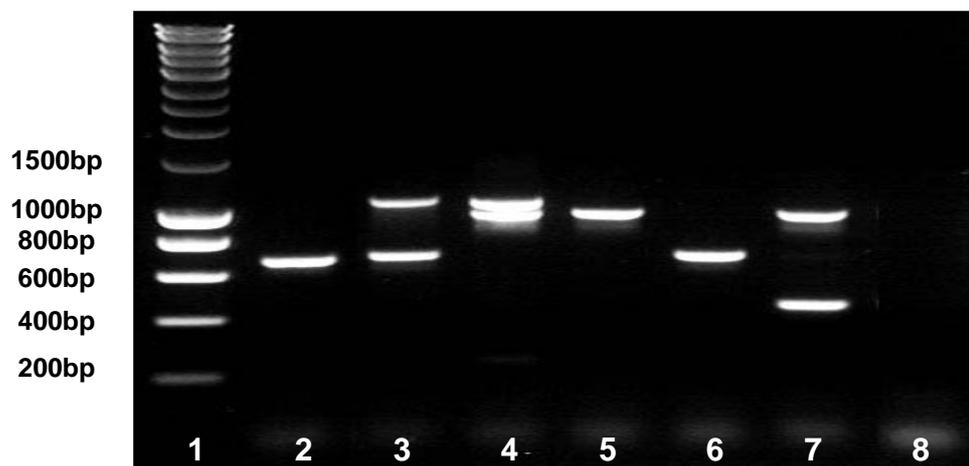


Abbildung 61 Auftrennung der amplifizierten Abschnitte zum Nachweis der Vancomycin-Resistenz in einem 1,3 %igen Agarosegel und Detektion unter UV-Licht mit Ethidiumbromid.

1:Größenstandard Smart-Ladder (200-10.000 bp), 2:*E. faecium* VA20359/05(-), 3:*E. faecium* UR3561/98(+), 4:*E. faecalis* VA36657/00(+), 5:*E. faecalis* VA21235/05(-), 6:*E. faecium* VA21260/05(-), 7:*E. faecalis* UR10519/96(+), 8:PCR-Negativ-Kontrolle

(+)Nachweis einer Vancomycin-Resistenz-Determinante, (-)kein Nachweis einer Vancomycin-Resistenz-Determinante

### 3.2.1 Gram-positive Isolate aus dem Routine-Labor

Unter den *Enterococcus* spp. Isolaten, die im Rahmen der Sammlung aus dem Routine-Labor untersucht fanden sich insgesamt 3 *E. faecium* Isolate mit einer Vancomycin-Resistenz (Tabelle 76).

**Tabelle 76** *Enterococcus* spp. Isolate aus dem Routine-Labor mit Vancomycin-Resistenz

Isolate (Interne ID)	MHK [mg/L]			Resistenz-Determinate
	VAN	TEC	LZD	
<i>E. faecium</i> VA 15086/06	256	64	4	<i>vanA</i>
<i>E. faecium</i> TY 3140/06	32	0,5	2	<i>vanB</i>
<i>E. faecium</i> BK 228 /07	256	256	16	<i>vanA</i>

VAN = Vancomycin, TEC = Teicoplanin, LZD = Linezolid

Bezogen auf die untersuchte Anzahl an *Enterococcus* spp. Isolaten, tragen 3,4 % aller charakterisierten Stämme eine Vancomycin-Resistenz-Determinante. Betrachtet man die Verteilung hinsichtlich der Species, so tragen 0,0 % aller *E. faecalis* und 9,4 % der *E. faecium* Isolate ein Gen für die Expression der Vancomycin-Resistenz.

### 3.2.2 Vancomycin-resistente *Enterococcus* spp.

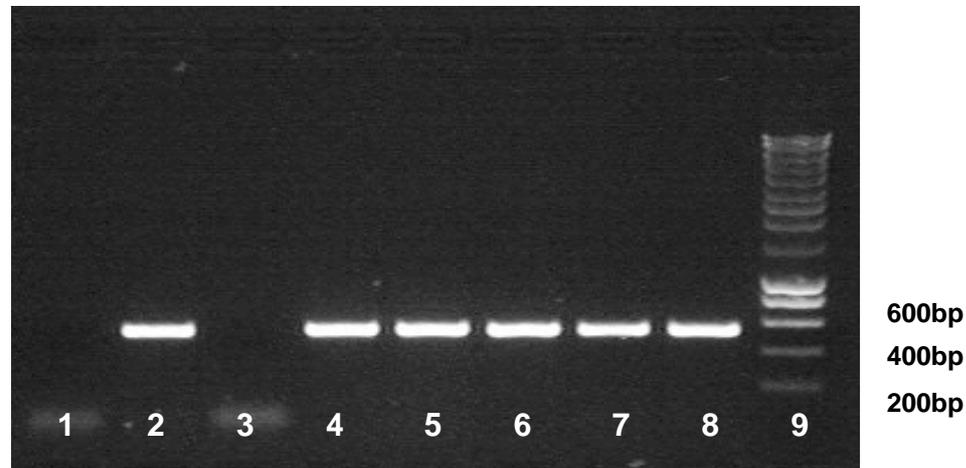
Bei den von 1996 bis 2007 insgesamt gesammelten 64 *Enterococcus* spp. Isolaten mit Vancomycin Resistenz oder verminderter Empfindlichkeit gegenüber Vancomycin wurde in 78,1 % der Isolate eine *vanA*-Determinante, in 15,6 % der Isolate eine *vanB*-Determinante und in 6,3 % der Stämme eine *vanC1*-Determinante nachgewiesen. Keines der untersuchten Isolate trug eine *vanC2/3*-Determinante.

Der überwiegenden Anteil Isolate (76,6 %) waren *E. faecium* Isolate mit *vanA*-Determinante. Bei 14,1 % der Isolate von *E. faecium* Isolate wurde eine *vanB*-Determinante nachgewiesen. Schließlich wurde jeweils ein Isolat entsprechend (1,6 %) als *E. faecalis* mit *vanA* bzw. *vanB*-Determinante identifiziert.

## 3.3 Nachweis des *mecA*-Gens bei Methicillin-resistenten *S. aureus* Isolate mit Hilfe der PCR

Zur Bestätigung der phänotypischen Methicillin-Resistenz bei *S. aureus* Isolaten, die durch eine MHK-Bestimmung der fraglichen Isolate gegenüber Oxacillin detektiert worden war, erfolgte im Anschluss ein PCR (C2.3.1.3), welche diese Resistenz auch genotypisch nachweisen sollte. Unter Verwendung von spezifischen Primern wurde ein 549 bp des für die Methicillin-Resistenz verantwortlichen *mecA*-Gens amplifiziert. Das erhaltene Fragmente

wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und unter Verwendung von Ethidiumbromid mit UV-Licht detektiert (Abbildung 62) Zur Größenordnung wurde ein geeigneter Größenstandard verwendet.

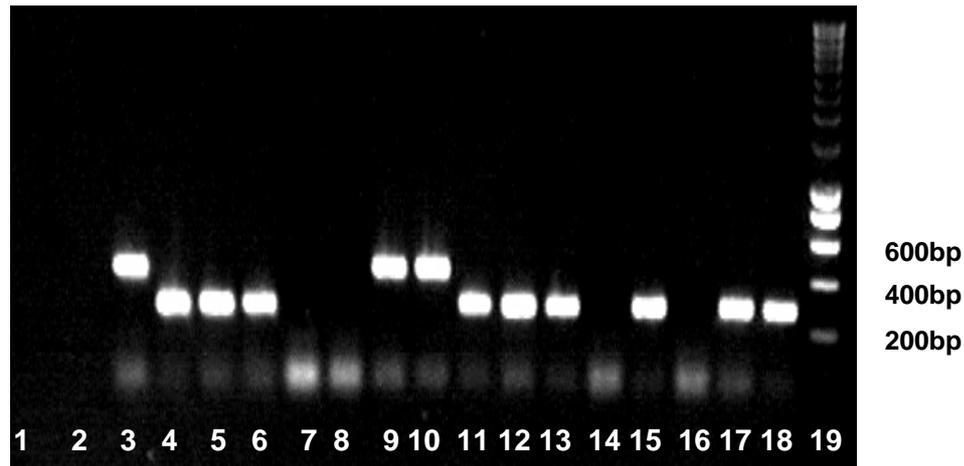


**Abbildung 62** Auftrennung des amplifizierten Abschnitts (549 bp) zum Nachweis der *mecA*-Determinante in einem 1,0 %igen Agarosegel und Detektion unter UV-Licht mit Ethidiumbromid.  
 1:PCR-Negativ-Kontrolle, 2:*S. aureus* ATCC®44300, 3:*S. aureus* ATCC®29213, 4:*S. aureus* VA24655/04(+), 5:*S. aureus* VA24795/04(+)  
 6:*S. aureus* VA24909/04(+), 7:*S. aureus* VA25145/04(+), 8:*S. aureus* VA25157/04(+),9:Größenstandard Smart-Ladder (200-10.000 bp)  
 (+)Nachweis einer *mecA*-Determinante, (-)kein Nachweis einer *mecA*-Determinante

Dabei zeigten alle untersuchten Isolate mit einer phänotypischen Resistenz gegenüber Oxacillin (MHK  $\geq 4$  mg/L) einen positiven Nachweis der *mecA*-Determinante.

### 3.4 Nachweis des *ermA*- und *ermC*-Gens bei Erythromycin-resistenten *S. aureus* Isolaten mit Hilfe einer Duplex PCR

Um bei *S. aureus* Isolaten mit Makrolid-Resistenz eine genauere Einteilung hinsichtlich des Genotyps vornehmen zu können, erfolgte bei Stämmen, mit einer Resistenz gegenüber Erythromycin (MHK  $\geq 16$  g/mL), eine Duplex-PCR (C2.3.1.4), um das in Frage kommende Resistenzgen zu identifizieren. Dabei wurde mit Hilfe von Primern ein jeweils 280 bp und 430 bp großes Fragment des für die *ermA*- und *ermC*-rRNA-Methyltransferase codierenden Gens vervielfältigt. Im Anschluss erfolgte eine Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel. Die aufgetrennten Fragmente wurden unter UV-Licht durch Interkalation mit Ethidiumbromid detektiert (Abbildung 63).



**Abbildung 63** Auftrennung der amplifizierten Abschnitte (430 bp und 280 bp) zum Nachweis der *ermA*- und *ermC*-Gene in einem 1,5 %igen Agarosegel und Detektion unter UV-Licht mit Ethidiumbromid.

1:PCR-Negativ-Kontrolle, 2:*S. aureus* ATCC<sup>®</sup>29213, 3:*S. aureus* RN4220 mit *ermA*, 4:*S. aureus* RN4220 mit *ermC*, 5:*S. aureus* VA24655/04(+), 6:*S. aureus* VA25145/04(+), 7: *S. aureus* VA24801/04(-), 8:*S. aureus* VA25491/04(-), 9:*S. aureus* VA25157/04(+), 10:*S. aureus* VA25567/04(+), 11:*S. aureus* VA20394/04(+), 12:*S. aureus* VA21294/04(+), 13:*S. aureus* VA2681/05(+), 14:*S. aureus* VA20576/04(-), 15:*S. aureus* VA21920/05(+), 16:*S. aureus* VA21844/05(-), 17:*S. aureus* VA3649/05(+), 18:*S. aureus* VA3652/05(+), 19:Größenstandard Smart-Ladder (200-10.000 bp)

(+)Nachweis einer *erm*-Determinante, (-)kein Nachweis einer *erm*-Determinante

Für Stämme, die weder einen positiven Nachweis für das *ermA*- noch für das *ermC*-Gen erbrachten, wurde ein PCR zum Nachweis des *ermB*-Gens wie unter C2.3.1.4. beschrieben durchgeführt.

In Abbildung 64 wird die Verteilung der nachgewiesenen Resistenzgene dargestellt. Insgesamt wurden 65 Isolate untersucht. Der überwiegende Anteil der getesteten *S. aureus* Isolate (52,3 %) trägt als Ursache für die Unempfindlichkeit gegenüber Erythromycin das *ermC*-Gen. Weiterhin konnte bei 38,5 % der untersuchten *S. aureus* das *ermA*-Gen nachgewiesen werden. Keiner der untersuchten Stämme trug das *ermB*-Gen. Bei einem Anteil von 12,3 % konnte kein *erm*-Gen nachgewiesen werden. Diese Stämme wurden daraufhin mit einer weiteren PCR (C2.3.1.5.) auf ihre alternative Resistenzursache untersucht.

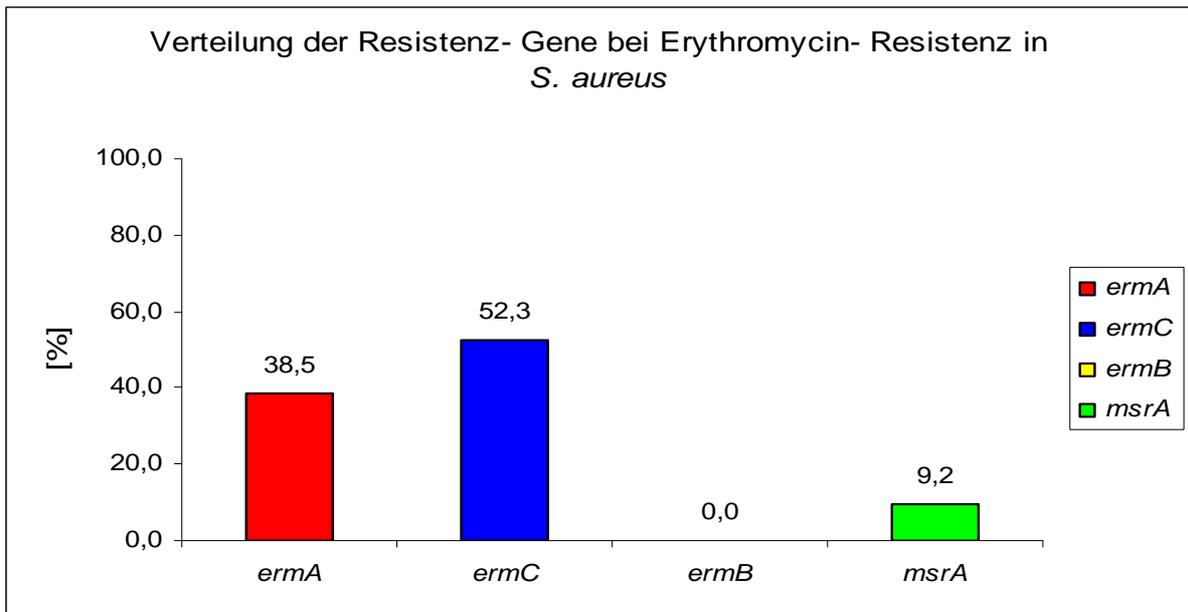


Abbildung 64 Verteilung der Resistenz-Gene bei Erythromycin-Resistenz in *S. aureus*

### 3.5 Nachweis des *msrA*-Gens bei Erythromycin-resistenten *S. aureus* Isolaten mit Hilfe der PCR

Bei *S. aureus* Stämmen, die keinen positiven Nachweis eines *erm*-Gens erbrachten, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit eine PCR durchgeführt, die einen 338 bp Abschnitt des *msrA*-Gens amplifiziert (Abbildung 65). Dieses codiert für eine *mdr*-Effluxpumpe, durch die Makrolide wie Erythromycin aktiv aus der Zelle heraus transportiert werden.

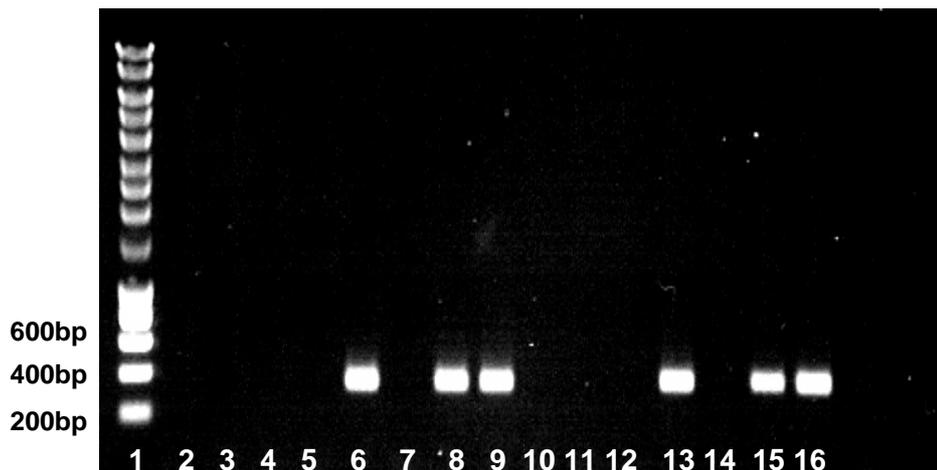


Abbildung 65: Auftrennung des amplifizierten Abschnitts (338 bp) zum Nachweis des *msrA*-Gens in einem 1,5 %igen Agarosegel und Detektion unter UV-Licht mit Ethidiumbromid.

1: Größenstandard Smart-Ladder (200-10.000 bp), 2:PCR-Negativ-Kontrolle, 3:*S. aureus* ATCC®29213 4:*S. aureus* RN4220 mit *ermA*, 5:*S. aureus* RN4220 mit *ermC*, 6:*S. aureus* ATCC®BAA-976, 7:*S. aureus* VA24801/04(-), 8:*S. aureus* VA20445/05(+), 9:*S. aureus* VA1446/06(+), 10:*S. aureus* VA14948/06(-), 11:*S. aureus* VA14979/06(-), 12:*S. aureus* VA14981/06(-), 13:*S. aureus* VA15730/06(+), 14:*S. aureus* VA19949/06(-), 15:*S. aureus* VA1725/06(+), 16:*S. aureus* VA2062/06(+)  
(+)Nachweis einer *msrA*-Determinante, (-)kein Nachweis einer *msrA*-Determinante

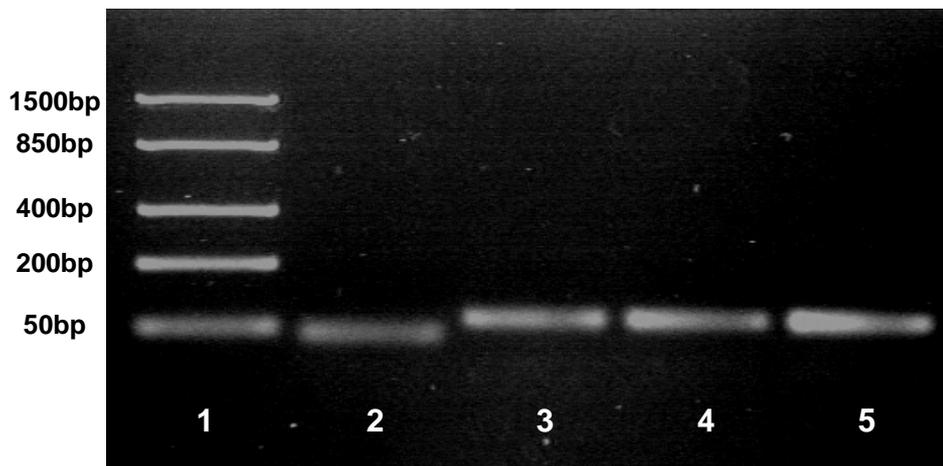
Dabei konnte bei den verbliebenen sechs Isolaten von *S. aureus* (9,2 %) ohne positiven Nachweis eines *erm*-Gens das *msrA*-Gen nachgewiesen werden (Abbildung 64).

### 3.6 Detektion und Quantifizierung eines G2576T Single Nucleotide Polymorphism bei *Enterococcus* spp.

Zur genaueren Untersuchung der molekularen Ursache für die Linezolid-Resistenz bei *Enterococcus* spp. wurde für Isolate mit einem MHK-Wert von Linezolid  $\geq 8$  mg/L ein im Rahmen dieser Arbeit entwickelter Pyrosequencing™-Assay angewandt. Dieser dient dazu, den für die Resistenz gegenüber Linezolid am häufigsten verantwortlichen SNP an Position 2576 zu detektieren. Dabei handelt es sich um eine G  $\rightarrow$  T Austausch, der zu einer Resistenz bzw. verminderten Empfindlichkeit gegenüber Linezolid führt.

Da das Gen für die 23S rRNA Species-abhängig in unterschiedlicher Kopienanzahl vorliegt, war es möglich, den Assay dazu zu verwenden, die Anzahl der Gene mit dem SNP zu ermitteln. Dazu erfolgte eine Auswertung der gewonnenen Pyrogramme mit Hilfe der Allel-Quantifizierungs-Software. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass die Anzahl der Kopien, die den SNP tragen in Korrelation zu dem MHK-Wert stehen (65).

Zunächst erfolgte wie unter C2.7.2.1 beschrieben die Amplifizierung eines 70 bp-Fragmentes der zu untersuchenden Region des Gens für die 23S rRNA unter Verwendung eines spezifisch bindenden Primer-Paares. Dieses PCR-Produkt wurde im Anschluss in einem 2,0 %igen Agarosegel aufgetrennt und die erwarteten Banden unter UV-Licht mit Ethidiumbromid detektiert (Abbildung 66).



**Abbildung 66** Auftrennung der amplifizierten Abschnitte (70 bp) für die Detektion des G2576T SNP mittels Pyrosequencing™ in einem 2,0 %igen Agarosegel und Detektion unter UV-Licht mit Ethidiumbromid. 1:Größenstandard Fast-Ruler™ DNA-Ladder, Low-Range (Fa.Fermentas), 2:PCR-Negativ-Kontrolle, 3:*E. faecalis* ATCC®29212, 3:*E. faecalis* UW3696/02, 4:*E. faecalis* UW3697/02, 5:*E. faecium* BK 405/07

Nach der Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel, wurden diese wie unter C2.7.2.1 beschrieben aufgereinigt. Die Analyse der Fragmente im Pyrosequencer erfolgte nach dem Standard-Protokoll der Firma Biotage unter Verwendung von 20 µL PCR-Produkt nach den in C2.7.2.1. für *Enterococcus* spp. beschriebenen Pyrosequencing™-Assay. Dabei wurde für jedes Isolat die Bestimmung dreifach durchgeführt, wobei die PCR-Produkte jeweils separat amplifiziert wurden.

Die Abbildung 67 bis Abbildung 69 zeigen jeweils beispielhaft Pyrogramme für die Detektion und Allel-Quantifizierung des G2576T SNP für die untersuchten Linezolid-empfindlichen und resistenten *Enterococcus* spp. Stämme. Die Pyrogramme zeigen die relativen Lichteinheiten gegen die Dispensations-Reihenfolge. Die Punkte E and S geben den Zusatz des Enzym-Mixes und des Substrat-Mixes während des Pyrosequencing™-Laufes an. Der zu untersuchende G2576T SNP ist durch eine schattierte Region (gelb) gekennzeichnet.

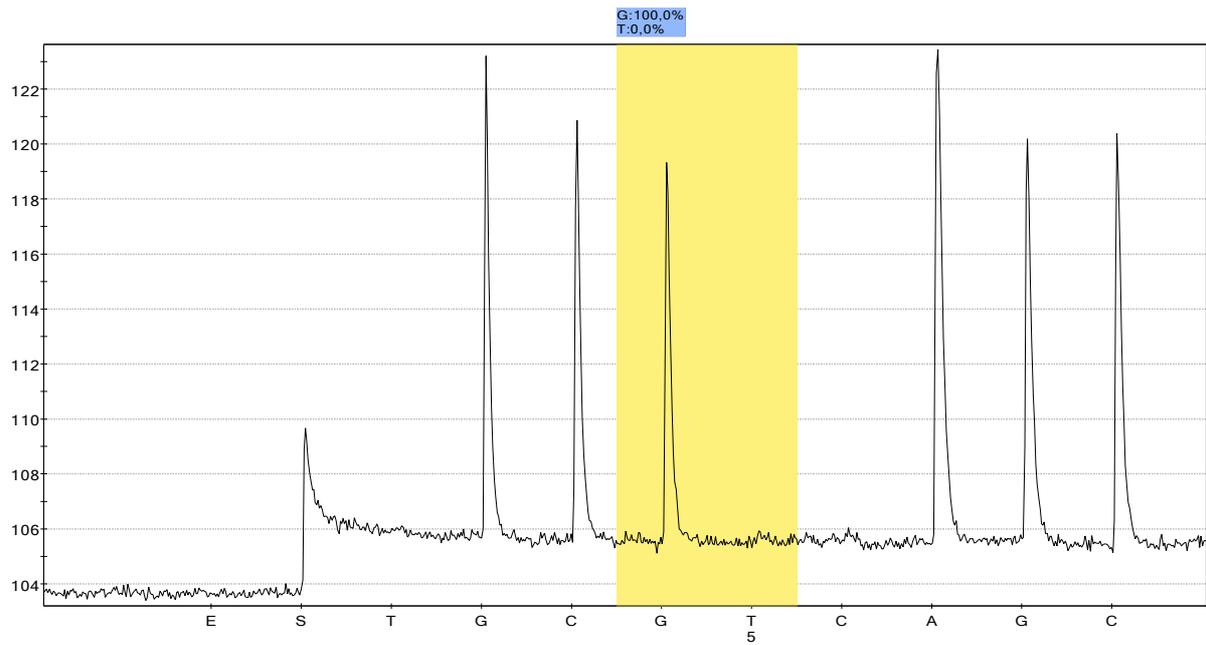


Abbildung 67 *E. faecalis* ATCC® 29212 mit der Wild-Typ Sequenz (G2576) in allen Gen-Kopien.

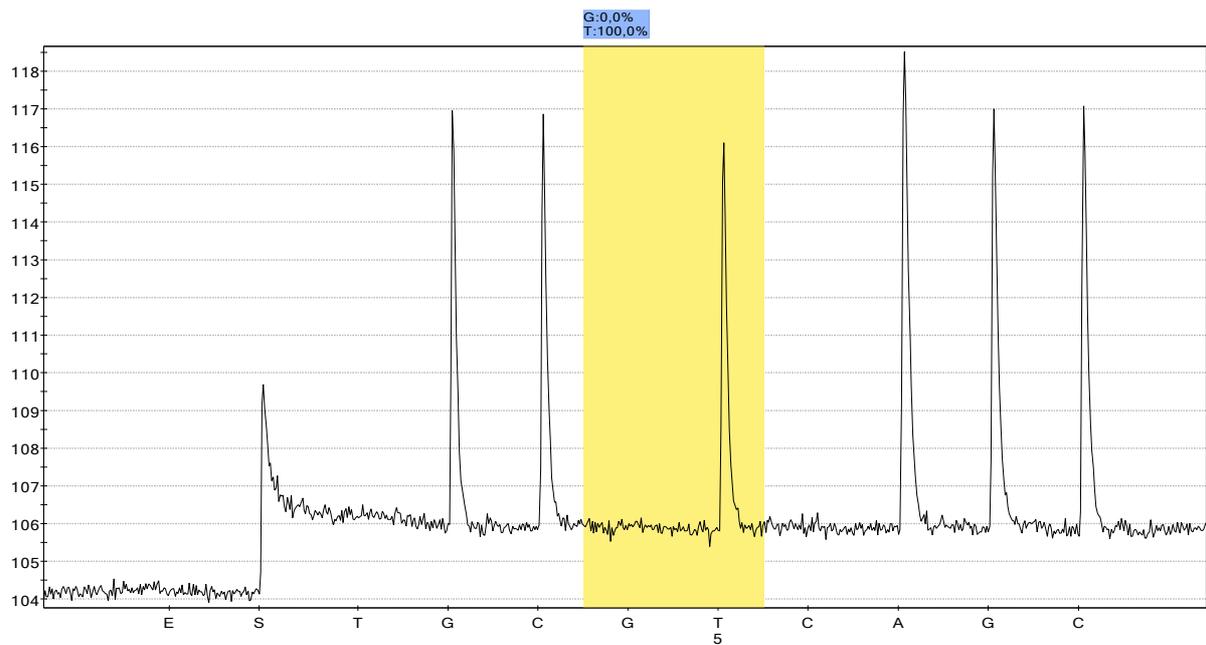
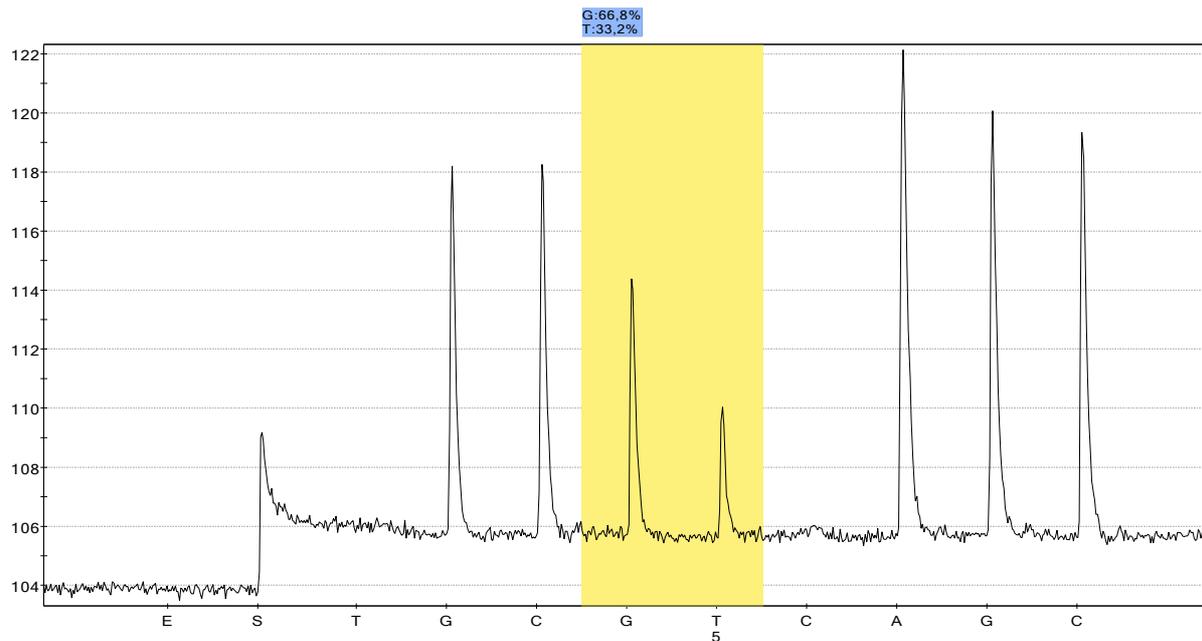


Abbildung 68 *E. faecalis* UW3696/02 mit der Mutations-Sequenz (T2576) in allen Gen-Kopien.



**Abbildung 69** *E. faecium* BK 405/07 mit der Wild-Typ (G2576) und Mutations-Sequenz (T2576) in den Gen-Kopien.

Die Auswertung der Allel-Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Software des Pyrosequencer durch Vergleich der Lichtsignale untereinander, die beim Einbau des Nukleotids für die Wild-Typ und für die Mutations-Sequenz entstehen.

### 3.6.1 Gram-positive Isolate aus dem Routine-Labor

Bei der Testung der Isolate aus dem Routine-Labor konnte insgesamt zwei *E. faecium* Isolate mit einem MHK-Wert  $\geq 8$  mg/L identifiziert werden (Tabelle 77).

**Tabelle 77** *Enterococcus* spp. Isolate aus dem Routine-Labor mit Linezolid-Resistenz

Isolate (Interne ID)	MHK [mg/L]			Resistenz-Determinate
	VAN	TEC	LZD	
<i>E. faecium</i> BK 405/07	0,5	1	8	
<i>E. faecium</i> TY 228 /07	256	256	16	<i>vanA</i>

VAN = Vancomycin, TEC = Teicoplanin, LZD = Linezolid

Für diese Isolate konnte der G2576T SNP durch den Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Assay nachgewiesen werden. Dabei ergab die Allel-Quantifizierung folgende Verteilung des T2576 SNP in den Isolaten (Tabelle 78).

**Tabelle 78** *Enterococcus* spp. Isolate aus dem Routine-Labor mit Linezolid-Resistenz

Isolate (Interne ID)	G2576T SNP Verteilung <sup>a</sup>	S <sub>rel</sub> [%]	Anzahl der Gene mit T2576 SNP <sup>b</sup>
<i>E. faecium</i> BK405/07	G 67,9 % T 33,6 %	2,3	2
<i>E. faecium</i> TY228/07	G 50,9 % T 49,1 %	3,5	3

<sup>a</sup> Ergebnis einer Dreifach-Bestimmung mit separat amplifizierten PCR-Produkten, <sup>b</sup> Basierend auf der Existenz von sechs Gen-Kopien der 23S rRNA für *E. faecium*.

Interessanterweise wurde bei dem *E. faecium*-Isolat BK 405/07 eine Resistenz gegenüber Linezolid jedoch nicht gegenüber Vancomycin oder Teicoplanin detektiert.

Gleichzeitig konnte für das Isolat *E. faecium* UR2234/06 mit einem MHK-Wert von 4 mg/L für Linezolid mit Hilfe dieser Methode der T2576 SNP auf einem Allel detektiert werden und dies ohne phänotypischen Nachweis einer Linezolid-Resistenz.

### 3.6.2 Vancomycin-resistente *Enterococcus* spp.

Die Isolate mit Vancomycin-Resistenz, die während der Jahre 1996 bis 2007 isoliert worden waren, wurden ebenfalls auf den für die Linezolid-Resistenz verantwortlichen G→T SNP an Position 2576 untersucht.

Bei der phänotypischen Untersuchung durch Ermittlung des MHK-Wertes konnten vier Isolate mit einem MHK-Wert für Linezolid von  $\geq 8$  mg/L identifiziert werden (Tabelle 79).

**Tabelle 79** *Enterococcus* spp. Isolate mit Linezolid-Resistenz

Isolate (Interne ID)	MHK [mg/L]			Resistenz-Determinate
	VAN	TEC	LZD	
<i>E. faecium</i> VA 20616/03	128	$\leq 0,25$	16	<i>vanB</i>
<i>E. faecium</i> VA 21032/03	128	$\leq 0,25$	16	<i>vanB</i>
<i>E. faecium</i> VA 1646/06	32	$\leq 0,25$	8	<i>vanB</i>
<i>E. faecium</i> BK 228 /07	256	256	16	<i>vanA</i>

VAN = Vancomycin, TEC = Teicoplanin, LZD = Linezolid

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden im Anschluss alle 64 Isolate mit Hilfe des entwickelten Assays wie unter C2.7.2.1. untersucht, um zu überprüfen, ob das System geeignet ist unter einem Kollektiv von sensiblen und resistenten Stämmen, die Resistenz korrekt zu detektieren.

Für diese vier untersuchten Isolate mit phänotypischer Linezolid-Resistenz konnte der G2576T SNP durch Anwendung des Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Assays nachgewiesen werden. Eine Auswertung der Verteilung des SNP auf die Allele durch die Software ergab die folgende Verteilung des T2576 SNP in den Isolaten ( 80).

**80 *Enterococcus* spp. Isolate mit Linezolid-Resistenz**

Isolate (Interne ID)	G2576T SNP Verteilung <sup>a</sup>	S <sub>rel</sub> [%]	Anzahl der Gene mit T2576 SNP <sup>b</sup>
<i>E. faecium</i> VA20616/03	G 66,7 % T 33,2 %	1,5	2
<i>E. faecium</i> VA21032/03	G 67,9 % T 33,6 %	2,8	2
<i>E. faecium</i> VA1646/06	G 67,6 % T 32,4 %	3,9	2
<i>E. faecium</i> BK228/07	G 50,9 % T 49,1 %	2,0	3

<sup>a</sup>Ergebnis einer Dreifach-Bestimmung mit separat amplifizierten PCR-Produkten, <sup>b</sup>Basierend auf der Existenz von sechs Gen-Kopien der 23S rRNA für *E. faecium*.

Die Untersuchung der übrigen Stämme des Kollektivs mit verminderter oder vollständiger Empfindlichkeit für Linezolid (MHK-Wert  $\leq 4$  mg/L) zeigte, dass keiner dieser Stämme den fraglichen G $\rightarrow$ T SNP an Position 2576 trug.

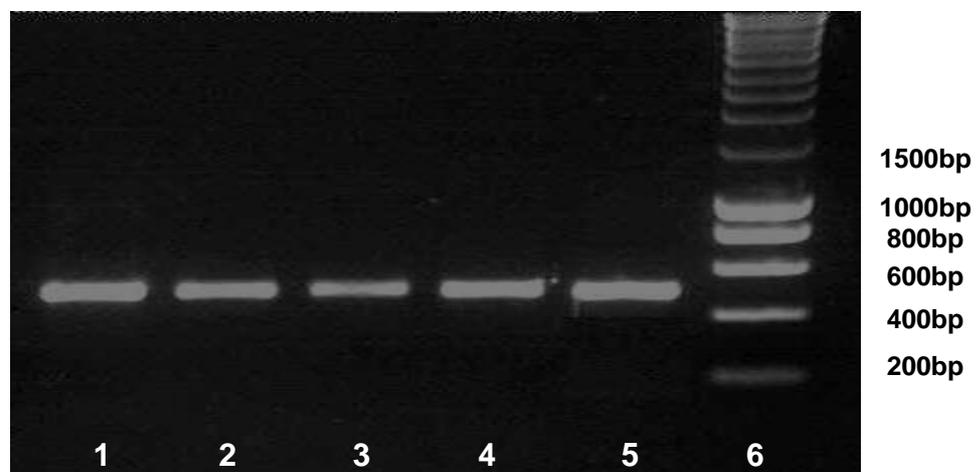
Interessanterweise konnte für ein Linezolid-sensibles Folge-Isolat von VA1646/04 mit einem MHK-Wert = 2 mg/L (TY1052/06), welches von der gleichen Patientin vier Monate nach Absetzen der Linezolid-Therapie isoliert wurde, der G $\rightarrow$ T SNP an Position 2576 in keinem der sechs Allele nachgewiesen werden. Die Reversion von gegenüber Linezolid resistenten *Enterococcus* spp. auf einen sensiblen Phänotyp nach Unterbrechung der Therapie mit Linezolid war zuvor in der Literatur schon beschrieben worden (68), jedoch konnte stets der G $\rightarrow$ T SNP an Position 2576 zumindest auf einem Allel nachgewiesen werden. Der hier beobachtete Fall einer Reversion auf einen sowohl sensiblen Phänotyp und als auch Genotyp wurde bislang noch nie beschrieben.

### **3.7 Untersuchung der Gene der 23S rRNA bei *Enterococcus* spp. auf Punktmutationen mittels Cycle-Sequencing, die zu einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber Linezolid führen können**

Eine weitere, interessante Fragestellung, die sich bei der Untersuchung der Linezolid-resistenten *Enterococcus* spp. Isolaten stellte war, ob diese Stämme neben dem für die Resistenz hauptsächlich verantwortlichen G $\rightarrow$ T SNP an Position 2576 möglicherweise andere Punktmutationen in den einzelnen oder allen Genen für die 23S rRNA tragen. In der

Literatur waren zuvor Punktmutationen für *in-vitro* selektierte Linezolid-resistente *Enterococcus* spp. beschrieben worden, die in der Domäne V der 23S rRNA liegen (62). Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit die insgesamt sechs *Enterococcus* spp. Isolate mit phänotypischer und genotypischer Linezolid-Resistenz mittels Cycle-Sequencing auf solche Punktmutationen in der Domäne V der 23S rRNA untersucht.

Dazu wurde aus der gewonnen DNA der sechs Isolate wie unter C2.7.1.1 beschrieben ein 484 bp großes PCR-Produkt amplifiziert, welches die Genabschnitte für die Domäne V der 23S rRNA umfasst. Dieses Fragment wurde anschließend mit Hilfe eines Agarosegels (1,3 %) aufgetrennt und unter UV-Licht durch Ethidiumbromid detektiert (Abbildung 70).



**Abbildung 70:** Auftrennung der amplifizierten Abschnitte (484 bp) für die Untersuchung der Gene der Domäne V der 23S rRNA mittels Cycle-Sequencing in einem 1,3 %igen Agarosegel und Detektion unter UV-Licht mit Ethidiumbromid.

1:*E. faecium* VA20616/03, 2:*E. faecium* VA21032/03, 3:*E. faecium* VA1646/06, 4:*E. faecium* BK228/07, 5:*E. faecium* BK405/07, 6:Größenstandard Smart-Ladder (200-10.000bp)

Die PCR-Produkte wurden wie unter C2.6.1 beschrieben aufgereinigt, für die Sequenzierung mit Ethanol gefällt (C2.6.2) und im Anschluss sequenziert.

Dabei konnte der Nachweis des G2576T SNP mit Hilfe des Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Assay in allen sechs *Enterococcus* spp. Isolaten bestätigt werden. Zusätzlich trug jedoch keines der Isolate einen weiteren SNP in den Genabschnitten für die Domäne V der 23S rRNA.

### 3.8 Detektion von Punktmutationen in der bakteriellen Gyrase mittels Cycle-Sequencing bei *S. aureus* Isolaten mit verminderten Empfindlichkeit oder Resistenz gegenüber Fluorchinolonen

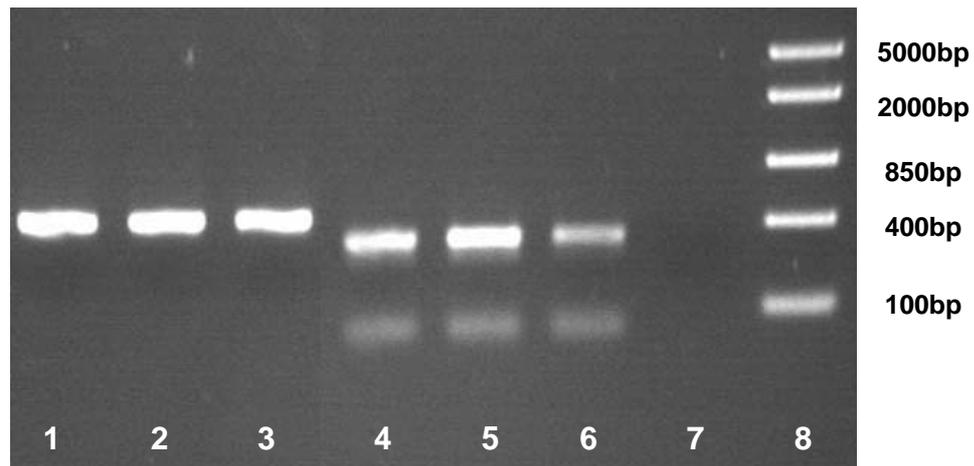
Im Rahmen der phänotypischen Untersuchung der *S. aureus* Isolate aus dem Routine-Labor fielen einige Isolate durch ihre verminderte Empfindlichkeit gegenüber den getesteten Fluorchinolonen auf, da sich diese Isolate durch eine ungewöhnliche Abweichung von dem erwarteten Resistenzprofil auszeichneten. Die Auswertung der Kreuzresistenz innerhalb der Fluorchinolone hatte zuvor gezeigt, dass Isolate mit einer Unempfindlichkeit oder verminderten Empfindlichkeit gegenüber den weiterentwickelten Fluorchinolonen wie Gatifloxacin, Moxifloxacin oder Sparfloxacin stets einen deutlich erhöhten MHK-Wert gegenüber Ciprofloxacin aufweisen, der auf hohe Unempfindlichkeit schließen lässt. Im Fall von zwei untersuchten Isolaten jedoch zeigte sich ein erhöhter MHK-Wert gegenüber Sparfloxacin (8 mg/L), verbunden mit einem ebenfalls erhöhten MHK-Wert gegenüber Gatifloxacin (2 mg/L) und Moxifloxacin (1 mg/L), verbunden aber mit einem erhöhtem MHK-Wert von 4 mg/L für Ciprofloxacin. Für ein weiteres Isolat konnte sogar ein erhöhter MHK-Wert von 4 mg/L gegenüber Sparfloxacin bei gleichzeitiger Unempfindlichkeit gegenüber Ciprofloxacin, Gatifloxacin und Moxifloxacin festgestellt werden. Die Tabelle 81 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse der MHK-Bestimmung.

**Tabelle 81** *S. aureus* Isolate mit Fluorchinolon-Resistenz

Isolate (Interne ID)	MHK [mg/L]			
	CIP	GTX	MXF	SPX
<i>S. aureus</i> VA1546/07	4	2	1	8
<i>S. aureus</i> VA1549/07	4	2	1	8
<i>S. aureus</i> VA3737/05	0,25	0,03	≤0,03	4

CIP = Ciprofloxacin, GTX = Gatifloxacin, MXF = Moxifloxacin, SPX = Sparfloxacin

Zunächst sollte der Einfluss von Punktmutationen in der Zielstruktur der Fluorchinolone, den Untereinheiten der bakterielle Gyrase (GyrA) und Topoisomerase (GrlA = ParC) untersucht werden. Dazu wurde aus der DNA der Stämme wie unter C2.7.1.2 beschrieben ein jeweils 380 bp und ein 450 bp Fragment des jeweiligen Abschnittes des Genes *gyrA* und *parC* amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit Hilfe eines Agarosegels (1,0 %) aufgetrennt und unter UV-Licht mit Hilfe von Ethidiumbromid detektiert (Abbildung 71).



**Abbildung 71:** Auftrennung der amplifizierten Abschnitte (450 bp und 380 bp) für die Untersuchung der Untereinheiten der bakteriellen Gyrase ParC und GyrA mittels Cycle-Sequencing in einem 1,0 %igen Agarosegel und Detektion unter UV-Licht mit Ethidiumbromid. 1:*S. aureus* VA1546/07 (*parC*), 2:*S. aureus* VA1549/07 (*parC*), 3:*S. aureus* VA3737/05 (*parC*), 4:*S. aureus* VA1546/07 (*gyrA*), 5:*S. aureus* VA1549/07 (*gyrA*), 6:*S. aureus* VA3737/05 (*gyrA*), 7:PCR-Negativ-Kontrolle, 8:Größenstandard Fast-Ruler™ DNA-Ladder, Middle-Range (Fa. Fermentas)

Die PCR-Produkte wurden wie unter C2.6.1 beschrieben aufgereinigt, für die Sequenzierung mit Ethanol gefällt C2.6.2 und im Anschluss sequenziert. Die Tabelle 82 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Sequenzierung.

**Tabelle 82** Ergebnisse der Sequenzierung der GyrA und ParC-Untereinheit der bakteriellen Gyrase bei Fluorchinolon-resistenten *S. aureus* Isolaten.

Isolate (Interne ID)	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>
<i>S. aureus</i> VA1546/07	84 S→L (TCA → TTA)	80 S→F (TCC → TTC)
<i>S. aureus</i> VA1549/07	84 S→L (TCA → TTA)	80 S→F (TCC → TTC)
<i>S. aureus</i> VA3737/05	95 Q→H (CAA → CAC)	144 P→S (CCA→TCA)

Dabei konnte gezeigt werden, dass in den beiden *S. aureus* Isolaten VA1546/07 und VA1549/07 in der GyrA-Untereinheit an der Position 84 ein Aminosäureaustausch von Serin zu Leucin und in der ParC-Untereinheit an Position 80 ein Aminosäureaustausch von Serin zu Phenylalanin stattgefunden hat. Dagegen fand in dem *S. aureus* Isolat VA3737/05 in der GyrA-Untereinheit an Position 95 ein Austausch von Glutamin zu Histidin und in der ParC-Untereinheit an Position 144 ein Austausch von Prolin zu Serin statt.

Die weitere Untersuchung dieser Stämme erfolgte phänotypisch (C1.6) um eine eventuelle Rolle von Effluxpumpen bei der Resistenz zu berücksichtigen.

## 4 Phänotypische Charakterisierung von Resistenz-Mechanismen

### 4.1 Unterscheidung zwischen konstitutivem und induzierbarem Phänotyp der durch *erm*-codierte rRNA-Methyltransferasen vermittelten Makrolid-Resistenz bei *S. aureus* durch Double-Disc-Test

Ein Teil der auf Makrolid-Resistenz, bedingt durch *erm*-codierte rRNA-Methyltransferasen, charakterisierten *S. aureus* Stämme wurde weiterhin mit Hilfe des DD-Test auf ihren konstitutiven oder induzierbaren Phänotyp wie unter C1.4 beschrieben untersucht. Die Abbildung 72 zeigt beispielhaft die Ergebnisse des DD-Test. Aufgrund der genotypischen Resultate war eine Induktion zu erwarten. Diese konnte im DD-Test bestätigt werden

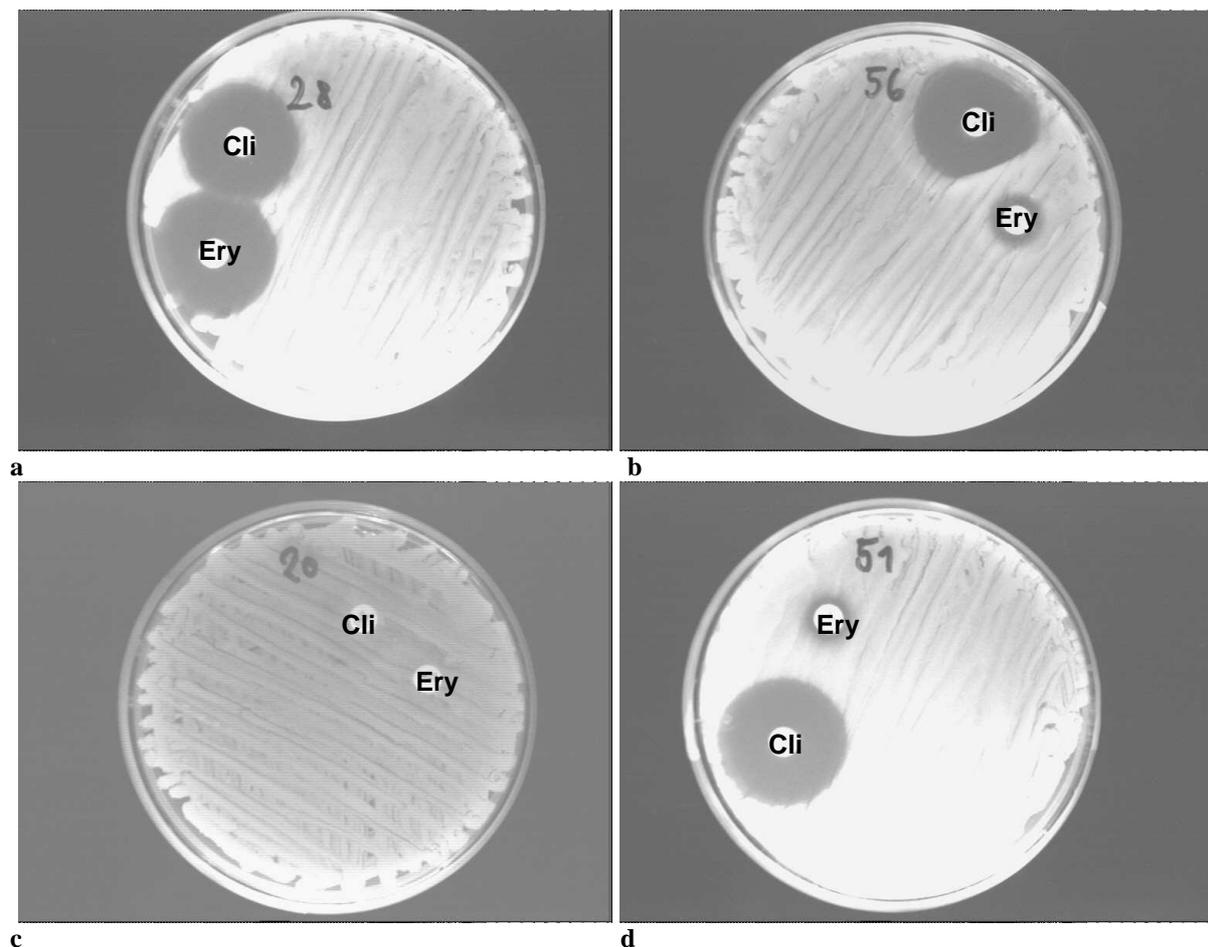


Abbildung 72 Ergebnisse des DD-Test zur Unterscheidung zwischen induzierbarem und konstitutivem Phänotyp bei durch *erm*-codierter rRNA-Methyltransferasen bedingter Makrolid-Resistenz in *S. aureus*, a: Erythromycin- und Clindamycin-sensibles *S. aureus* Isolat VA1709/07 mit Hemmhöfen bei beiden Antibiotika-Testplättchen, b: Erythromycin-resistentes und Clindamycin-sensibles *S. aureus*-Isolat VA2106/07; Der D-förmige Hemmhof um das Clindamycin-Testplättchen deutet auf einen induzierbaren Phänotyp hin, c: Erythromycin- und Clindamycin-resistentes *S. aureus* Isolat VA1546/07; Der fehlende Hemmhof bei beiden Antibiotika-Testplättchen deutet auf einen konstitutiven Phänotyp hin,

d: Erythromycin-resistentes und Clindamycin-sensibles *S. aureus* Isolat VA2081/07; Der vorhandene, nicht D-förmige Hemmhof um das Clindamycin-Testplättchen deutet auf einen anderen, nicht durch *erm*-codierte rRNA-Methyltransferasen bedingten Resistenz-Mechanismus hin

In der Tabelle 83 sind die Ergebnisse für die untersuchten *S. aureus* Isolate aufgeführt

**Tabelle 83** Ergebnisse des DD-Test für ausgewählte *S. aureus* Isolate als Referenz

ID	Genotyp	Phänotyp (DD-Test)	MHK [mg/L]
			ERY
VA1709/07	-	-	0,5
VA1453/07	<i>ermA</i>	Induzierbar	>64
VA1670/07	<i>ermA</i>	Induzierbar	>64
VA1546/07	<i>ermC</i>	Konstitutiv	>64
VA1549/07	<i>ermC</i>	Konstitutiv	>64
VA2361/07	<i>ermC</i>	Induzierbar	>64
VA2081/07	<i>msrA</i>	-	8

ERY = Erythromycin, CLI = Clindamycin, LIN = Lincomycin

## 4.2 Nachweis eines möglichen Einflusses von Efflux-Pumpen auf die verminderte Empfindlichkeit oder Resistenz von *S. aureus* gegenüber Fluorchinolonen

Die unter D3.8 genotypisch charakterisierten *S. aureus* Isolate wurden weiterhin auf einen möglichen Einfluss von Effluxpumpen auf die verminderte Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen untersucht. Dazu wurde wie unter C1.6 beschrieben eine MHK-Bestimmung gegenüber den untersuchten Fluorchinolonen in Gegenwart eines Effluxpumpen-Inhibitors durchgeführt. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 84 aufgeführt.

**Tabelle 84** MHK-Werte für *S. aureus* Isolate mit Fluorchinolon-Resistenz in Abwesenheit und Gegenwart eines Efflux-Pumpen-Inhibitors

Isolate	MHK [mg/L]							
	CIP	CIP+EPI	GTX	GTX+EPI	MXF	MXF+EPI	SPX	SPX+EPI
<i>S. aureus</i> VA1546/07	4	2	2	2	1	0,5	8	2
<i>S. aureus</i> VA1549/07	4	2	2	2	1	0,5	8	2
<i>S. aureus</i> VA3737/05	0,25	0,25	0,03	0,03	≤0,03	≤0,03	4	4

EPI = Efflux-Pumpen-Inhibitor Phenylalanyl-Arginyl-β-Naphtylamid (Konz. = 32 mg/L); CIP = Ciprofloxacin, GTX = Gatifloxacin, MXF = Moxifloxacin, SPX = Sparfloxacin

Dabei konnte für die Isolate VA 1546/07 und 1549/07 ein deutlicher Rückgang für den MHK-Wert von Sparfloxacin um zwei Verdünnungsstufen von 8 mg/L auf 2 mg/L in Gegenwart eines Effluxpumpen-Inhibitors gezeigt werden, während bei den übrigen Fluorchinolonen

kein oder nur ein Rückgang um eine MHK-Stufe gezeigt werden konnte. Für das Isolat VA3737/05 konnte keinerlei Veränderung für den MHK-Wert festgestellt werden.

## **5 Entwicklung eines Pyrosequencing™-basierten Verfahrens zur Detektion der durch *erm*-codierte rRNA-Methyltransferasen bedingten Dimethylierung von rRNA in klinischen Isolaten von *S. aureus***

Eine etablierte Methode zur Untersuchung von RNA hinsichtlich Quantifizierung, Bestimmung der Position von 5'-Enden, sowie dem Vorhandensein von modifizierten Nukleotiden, stellt die Primerverlängerung (Primer-Extension) dar (C2.4.1).

Ein von Sigmund et al. entwickeltes und von Vester und Douthwaite modifiziertes Verfahren (125, 126) dient dem Nachweis einer Dimethylierung des Adenins an Position 2058 in der 23S rRNA. Eine Dimethylierung führt zur Resistenz gegenüber Makroliden, mit Erythromycin als wichtigstem Vertreter, Lincosamiden und den Streptograminen der Gruppe B (A1.3.2.2) durch eine verminderte Affinität dieser Substanzen für das bakteriellen Ribosom. Die Dimethylierung erfolgt dabei katalytisch durch spezifische *erm*-codierte rRNA-Methyltransferasen. Mit Hilfe der Primer-Extension-Methode kann der Anteil dimethylierter rRNA erfasst und quantifiziert werden. Dabei hybridisiert ein am 5'-Ende radioaktiv markierter Primer (komplementär zu den Positionen 2061 bis 2078) kurz vor der Position des methylierten Adenins. Bei dieser etablierten Methode erfolgt allein in Anwesenheit des 2'-Desoxynukleotids dTTP und des 2',3'-Desoxynukleotids ddCTP die Synthese eines komplementären cDNA-Stranges. Bei Vorhandensein einer Dimethylierung an Position 2058 bricht die Reaktion an Position 2057 ab, es entsteht somit ein 20 bp langes cDNA-Fragment. Ist an der Position 2058 keine Dimethylierung vorhanden so wird die Reaktion durch den Einbau von ddCTP wegen des Fehlens einer freien 3'-OH Gruppe abgebrochen, wodurch ein 22 bp langes cDNA-Fragment entsteht (Abbildung 73).

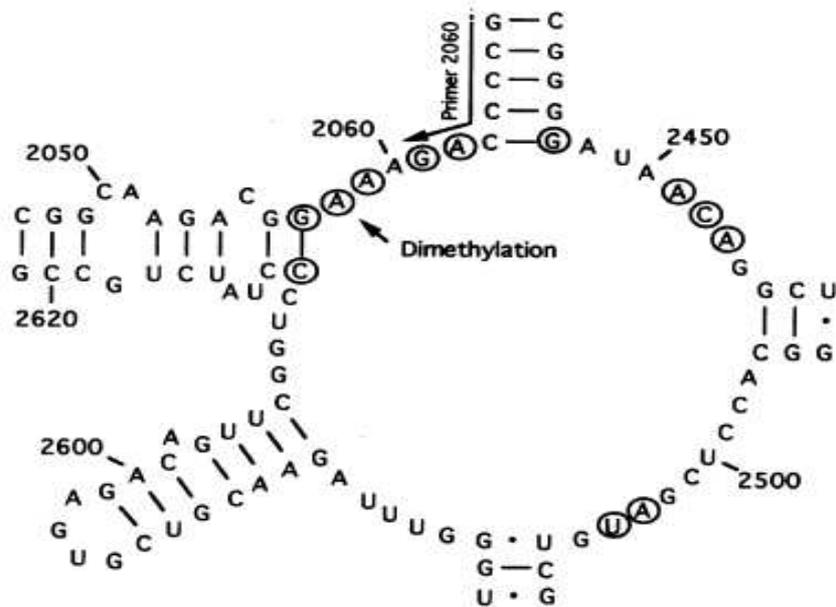


Abbildung 73 Sekundärstruktur der Peptidyltransferase-Region in der Domäne V der 23S rRNA von *E. coli*. Die Position der Dimethylierung des Adenins an Position durch *erm*-codierte rRNA-Methyltransferasen ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die Bindungsposition des 3'-Ende des für die Primer-Extension verwendeten Primer (komplementär zu den Positionen 2061 bis 2078) ist ebenfalls gekennzeichnet [nach (126)].

Nach erfolgter Auftrennung in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel und autoradiographischer Detektion erlaubt das Vorhandensein des 20 bp langen cDNA-Fragmentes einen Rückschluss auf eine Dimethylierung an Position 2058. Gleichzeitig kann der Anteil an dimethylierter rRNA densitometrisch erfasst werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die während dieser Primer-Extension Reaktion gebildeten cDNA-Fragmente mit Hilfe der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Methode detektiert werden können. Die während der Primer-Extension-Reaktion entstandenen cDNA-Fragmente wurden mit geeigneten Sequenzier-Primern zunächst hybridisiert. Anschließend erfolgt der Zusatz von Nucleotiden während der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Reaktion, wobei durch die Wahl der Dispensierungsreihenfolge gezielt die einzelnen cDNA-Fragmente nachgewiesen und quantifiziert werden sollen. Das Vorhandensein und die Höhe des Peaks der durch den Einbau der Nucleotide entsteht wurde dabei als Nachweis und Maß zur Quantifizierung verwendet.

Dabei war es notwendig Modifikationen vorzunehmen, um die gebildeten cDNA-Fragmente an die Anforderungen der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Methode anzupassen.

Ziel dieser Modifizierung war es, die aufwendige Auftrennung der gewonnenen cDNA-Fragmente durch ein Polyacrylamid-Gel zu optimieren. Von besonderem Interesse war dabei die Option gleichzeitig einen hohen Probendurchsatz zu ermöglichen (96 Proben in 10 Min.).

In den folgenden Abschnitten sollen die Untersuchungen zu der Weiterentwicklung dieser Methode beschrieben werden.

## 5.1 Charakterisierung klinischer *S. aureus* Isolate

Zunächst erfolgte eine Auswahl an *S. aureus* Isolaten, die im Rahmen der Empfindlichkeits-Untersuchung in der Routine-Diagnostik isoliert worden waren, um mit diesen das Verfahren zu testen. Diese Stämme zeichnen sich alle durch eine Resistenz gegenüber dem Makrolid-Antibiotikum Erythromycin aus. Gleichzeitig wurde ein Erythromycin empfindliches Isolat als Negativ-Kontrolle charakterisiert.

Neben der Bestimmung der MHK von Erythromycin wurden zusätzlich die MHK-Werte von Clindamycin, Lincomycin und Telithromycin bestimmt. Dazu wurden kommerziell gefertigte Platten der Firma Merlin verwendet.

Außerdem erfolgte wie unter C2.3.1.4 beschrieben mit Hilfe der PCR der Nachweis der Gene *ermA* und *ermC* für rRNA-Methyltransferasen, die bei Erythromycin-resistenten *S. aureus* Stämmen das Adenin der 23S rRNA an Position 2058 spezifisch dimethylieren. Anschließend wurden die untersuchten Stämme anhand der Ergebnisse des DD-Test in solche mit induzierbaren bzw. konstitutivem Genotyp eingeteilt (C1.4.). Als Kontrolle dienten bei beiden Untersuchungen *S. aureus* Stämme, die durch Transformation die jeweilige genetische Information erhalten haben (*ermA* und *ermC* induzierbar, *ermC* konstitutiv). Weiterhin wurde mittels PCR untersucht, ob das *msrA*-Gen, welches für eine mdr-Effluxpumpe codiert, für eine die beobachtete Erythromycin-Resistenz verantwortlich ist (C2.3.1.5.) Jeweils ein Isolat mit induzierbarem *ermA*- (VA1670/06) und induzierbarem *ermC*-Genotyp (VA2361/06) wurde vor der Messung nach Weaver und Pattee (117) mit Erythromycin induziert (C1.5.).

Die Tabelle 85 gibt einen Überblick über die so charakterisierten Stämme zur Testung des Verfahrens.

**Tabelle 85** Eigenschaften der zur Testung verwendeten klinischen *S. aureus* Isolaten

ID	Genotyp	Phänotyp	MHK [mg/L]			
			ERY	CLI	LIN	TEL
VA1709/07	-	-	0,5	0,03	0,5	≤0,03
VA1453/07	<i>ermA</i>	Induzierbar	>64	0,125	0,5	≤0,03
VA1670/07	<i>ermA</i>	Induzierbar	>64	0,125	0,5	0,06
VA1670/07 ind <sup>+</sup>	<i>ermA</i>	Induzierbar	>64	>32	>32	>64
VA1546/07	<i>ermC</i>	Konstitutiv	>64	>32	>32	>64
VA1549/07	<i>ermC</i>	Konstitutiv	>64	>32	>32	>64
VA2361/07	<i>ermC</i>	Induzierbar	>64	0,125	0,5	≤0,03
VA2361/07 ind <sup>+</sup>	<i>ermC</i>	Induzierbar	>64	>32	>32	>64
VA2081/07	<i>msrA</i>	-	8	0,03	0,5	0,06

ind<sup>+</sup>: Die Stämme VA1670/06 und 2361/06 wurde wie unter C1.5 beschrieben mit Erythromycin induziert; ERY = Erythromycin, CLI = Clindamycin, LIN = Lincomycin, TEL = Telithromycin

Mit Ausnahme des Isolates VA2081/06 trug keiner der in Rahmen dieser Testung untersuchten Stämme das *msrA*-Gen.

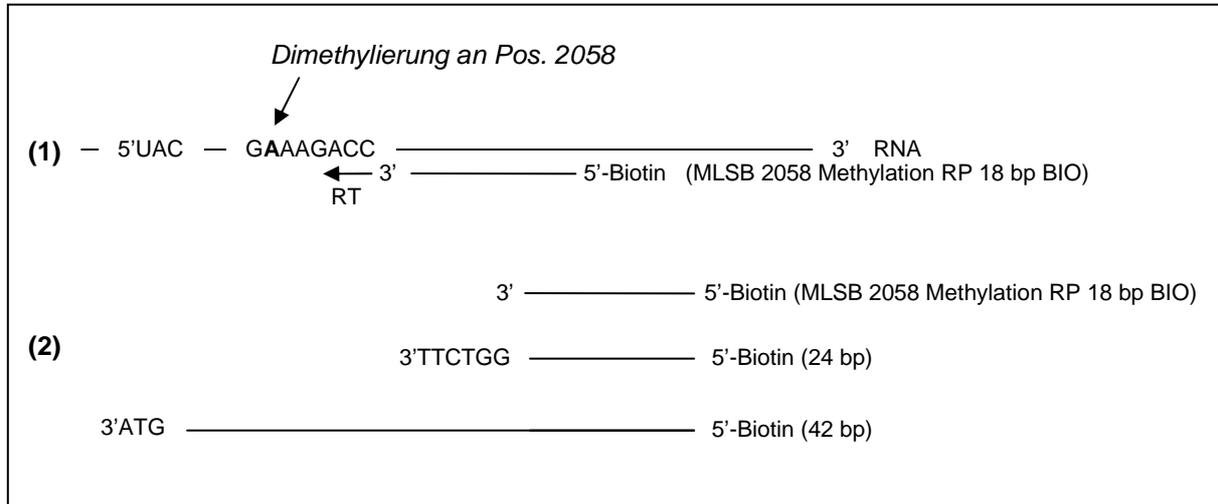
## 5.2 Primer-Design

Ein essentieller Schritt für die Adaption der von Vester und Douthwaite (126) entwickelten Methoden zur Bestimmung der Dimethylierung der 23S rRNA an Position 2058 war das Primer-Design. Dabei sollte untersucht werden, ob der bei der etablierten Methode verwendete am 5'-Ende radioaktiv markierte Primers (komplementär zu den Positionen 2061 bis 2078) unverändert eingesetzt werden kann oder ob es notwendig ist, diesen zu modifizieren.

So war es notwendig, den verwendeten Primer am 5'-Ende durch eine Biotin-Gruppe zu markieren, um die während der Primer-Extension-Reaktion gebildeten cDNA-Fragmente mit der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Technologie zu analysieren, damit eine Auftrennung wie unter C2.7.2 beschrieben erfolgen kann. Biotin-markierte 2'-Desoxynukleotide bzw. 2',3'-Didesoxynukleotide sollten für die Primer-Extension-Reaktion verwendet werden, um nicht eingebaute Primer der Extension-Reaktion aus dem Reaktionsansatz durch die unter C2.7.2 beschriebene Aufreinigung entfernen zu können.

Als nächstes wurde mit Hilfe der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Assay-Design Software geprüft, ob der in der Methode von Vester und Douthwaite (126) verwendete Primer für den Nachweis durch die Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Technologie geeignet ist. Dabei standen besonders die Ausbildung von Duplex- und Self-Annealing-Komplexen im Vordergrund, die einen Nachweis stören können. Dabei zeigte sich durch die Verwendung der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Assay-Design Software, dass

eine Änderung der Sequenz und Bindungsposition (Primerbezeichnung: MLSB 2058 Methylation RP 18 bp BIO komplementär zu den Positionen 2065 bis 2082) für die Anwendung geeignet ist (Abbildung 74).



**Abbildung 74 (1):** Bindung des mit Biotin am 5'-Ende markierten Primers an das RNA-Template und Verlängerung durch die Reverse Transcriptase; (2) Dimethylierung des Adenins an Position 2058 führt zum Abbruch der Reversen Transkriptase-Reaktion an Position 2059 und zur Bildung eines 24 bp langen cDNA-Fragmentes; Ohne Dimethylierung wird die Reaktion erst nach Einbau eines ddATP beendet, wobei ein 42 bp langes cDNA-Fragment gebildet wird. Nach Abschluss der Primer-Extension-Reaktion liegen insgesamt drei Fragmente vor: die in der Reverse Transkriptase-Reaktion gebildeten cDNA-Fragmente und der freie unverbrauchte am 5'-Ende markierte Primer MLSB 2058 Methylation RP 18 bp BIO

Jedoch erfordert diese Modifikation die Verwendung eines veränderten 2'-Desoxynukleotids- bzw. 2',3'-Didesoxynukleotid-Gemisches für die Primer-Extension-Reaktion. Während es bei der Methode durch Vester und Douthwaite (126) ausreichte, das 2'-Desoxynukleotid dTTP und das 2',3'-Didesoxynukleotid ddCTP zu verwenden um einen Abbruch der Reaktion zu erzwingen, ist durch die Veränderung der Bindungsposition nötig die verwendeten 2'-Desoxynukleotide bzw. 2',3'-Didesoxynukleotide anzupassen. So kann bei Verwendung der 2'-Desoxynukleotide (dCTP, dGTP und dTTP) sowie des 2',3'-Didesoxynukleotids ddATP mit der Primer-Extension-Reaktion ein komplementärer cDNA-Strang gebildet werden, der bei Vorliegen einer Dimethylierung des Adenins an Position 2058, bedingt durch die Expression von rRNA-Methyltransferasen, abbricht, wobei ein 24 bp langes cDNA-Fragment entsteht. Ohne Dimethylierung oder nur eine Monomethylierung des Adenins an Position 2058 kommt es zu nicht zu einem Abbruch der cDNA-Synthese. Diese erfolgt erst durch den Einbau des 2',3'-Didesoxynukleotid ddATP an Position 2041, so dass ein 42 bp langes cDNA-Fragment entsteht. Somit sind nach Ende der Primer-Extension-Reaktion drei Fragmente in dem Reaktionsansatz zu finden. Der für die Primer-Extension-Reaktion

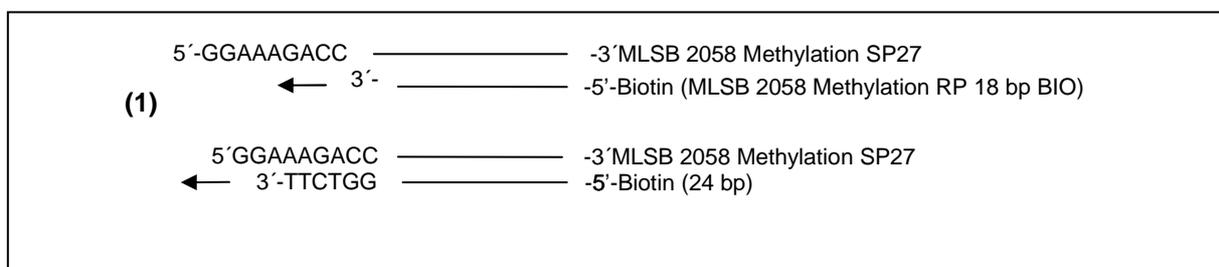
verwendete, am 5'-Ende Biotin-markierte Primer MLSB 2058 Methylation RP 18 bp BIO mit einer Länge von 18 bp sowie die gebildeten cDNA-Fragmente mit jeweils 24 bp und 42 bp Länge mit ebenfalls einer Biotin-Markierung am 5'-Ende (Abbildung 74).

Weiterhin wurden nun Möglichkeiten erwogen, um die gebildeten cDNA-Fragmente zu detektieren und überlegt, ob dabei eine Quantifizierung möglich ist.

Dabei stand der gleichzeitige Nachweis und die Quantifizierung aller drei während der Primer-Extension-Reaktion gebildeten cDNA-Fragmente durch einen spezifischen Sequenzier-Primer dem Nachweis und der Quantifizierung der cDNA-Fragmente durch verschiedene spezifische Sequenzier-Primer gegenüber. Für die Untersuchungen wurde der letztgenannte Ansatz gewählt. Hierbei standen wiederum der Nachweis durch verschiedene spezifische Sequenzier-Primer gleichzeitig in einem oder die getrennte Erfassung in zwei verschiedenen Reaktionsansätzen gegenüber.

Die Entwicklung verschiedener spezifischer Sequenzier-Primer erfolgte wiederum mit Hilfe der Pyrosequencing™-Assay-Design Software. Durch die Wahl geeigneter spezifischer Sequenzier-Primer, welche mit den gebildeten cDNA-Fragmenten hybridisieren und der anschließenden Pyrosequencing™-Reaktion sollte eine selektive Erfassung und Quantifizierung der während der Primer-Extension-Reaktion gebildeten cDNA-Fragmente erfolgen. Dabei wurde die Reihenfolge der Nukleotid-Dispensation in der Form gewählt, dass durch den Einbau eines Nukleotids und dem damit verbundenen Peak eine Erfassung und Quantifizierung des cDNA-Fragmentes möglich ist.

Unter Verwendung der Pyrosequencing™-Assay-Design Software zeigte sich, dass durch die Anlagerung eines spezifischen 27 bp langen Sequenzierprimers (Primerbezeichnung: MLSB 2058 Methylation SP27) an die 18 bp und 24 bp langen cDNA-Fragmente die Detektion dieser Fragmente möglich ist und somit die Detektion der Dimethylierung (Abbildung 75).

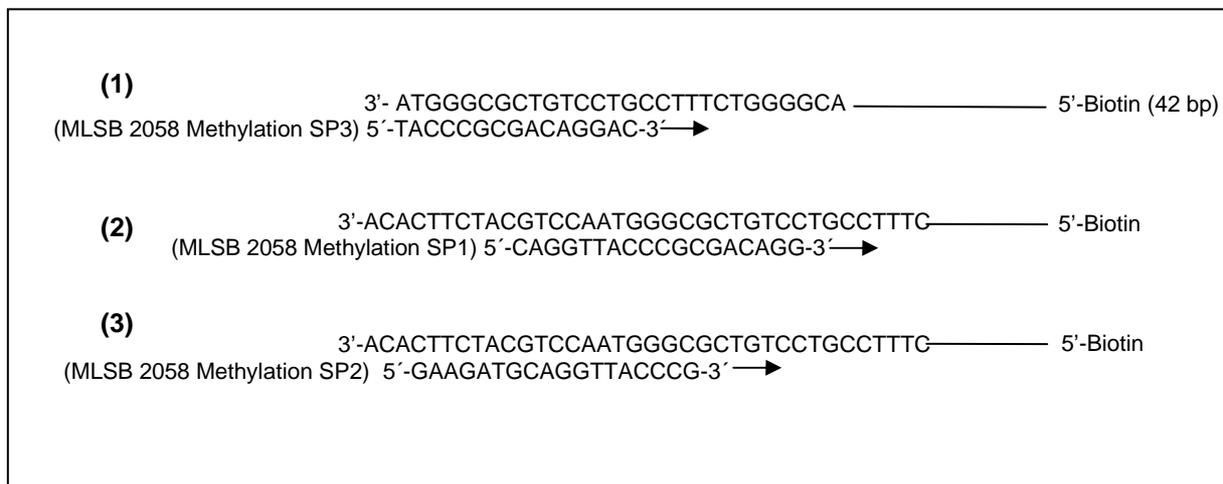


**Abbildung 75 (1) Die Anlagerung des 27bp langen Sequenzierprimers an die 18bp und 24bp langen cDNA-Fragmente erlaubt die Detektion der Dimethylierung rRNA; Die Pfeile markieren die Richtung der Dispensation der Nukleotide.**

Für den Nachweis und die Quantifizierung der nicht dimethylierten rRNA an Position 2058 wurden wiederum zwei verschiedene Möglichkeiten bei der Entwicklung der Sequenzier-

Primer berücksichtigt. Zunächst der Nachweis des 42 bp langen cDNA-Fragmentes, welches bei der Primer-Extension-Reaktion unter Verwendung der 2'-Desoxynukleotide (dCTP, dGTP und dTTP) sowie des 2',3'-Didesoxynukleotids ddATP gebildet wurde mit Hilfe eines spezifischen Sequenzier-Primers, der nur auf dem 42 bp cDNA-Fragment bindet.

Weiterhin wurden zwei Sequenzier-Primer entwickelt, welche spezifisch an ein gebildetes cDNA-Fragment binden, das während einer Primer-Extension-Reaktion synthetisiert wurde, bei der alle vier 2'-Desoxynukleotide (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) und kein 2',3'-Didesoxynukleotid ddATP eingesetzt wurden. Dies führt nicht zu einem Abbruch der Reaktion an Position 2041, sondern zu einer Fortführung der Reaktion über diese Position hinaus (Abbildung 76).



**Abbildung 76** (1) Nachweis des 42 bp langen cDNA-Fragmentes erfolgt durch Anlagerung des Sequenzierprimers MLSB 2058 Methylation SP3, (2) Nachweis der gebildeten cDNA durch Anlagerung des Sequenzierprimers MLSB 2058 Methylation SP1 (3) Nachweis der gebildeten cDNA durch Anlagerung des Sequenzierprimers MLSB 2058 Methylation SP2; Die Pfeile markieren die Richtung der Dispensation der Nukleotide.

Durch die Verwendung der Sequenzier-Primer MLSB 2058 Methylation SP1 und MLSB 2058 Methylation SP2 in Kombination mit dem Sequenzier-Primer MLSB 2058 Methylation SP27 war der Nachweis der cDNA-Fragmente in einem Reaktionsansatz möglich, während der Nachweis der cDNA-Fragmente mit Hilfe der Sequenzier-Primer MLSB 2058 Methylation SP3 in Kombination mit dem Sequenzier-Primer MLSB 2058 Methylation SP27 in zwei getrennten Ansätzen erfolgte.

### 5.3 Überprüfung des Primer-Designs

Im Anschluss wurden Oligonukleotide der entsprechenden Länge und Sequenz der cDNA-Fragmente, welche während der Primer-Extension-Reaktion gebildet und eingesetzt werden (24 bp, 42 bp langes cDNA-Fragment und 5'-Biotin-markierter Primer) verwendet, um die

unter D5.2 entwickelten spezifischen Sequenzier-Primer für den Nachweis der gebildeten cDNA-Fragmente zu testen.

Um die Bildung von Self-Annealing-Komplexen oder Dimeren der zu untersuchenden cDNA-Fragmente zu untersuchen, wurden 1,0 µL einer Lösung der entsprechenden Oligonukleotide (MLSB 2058 Methylation 24 bp, MLSB 2058 Methylation 42 bp und MLSB 2058 Methylation RP 18 bp) mit einer Konzentration von 10 pmol/µL mit 48,0 µL Annealing Buffer ohne Zusatz einer Lösung des zu untersuchenden Sequenzier-Primers mit einer Konzentration von 5 pmol/µL direkt in einer PSQ-Platte gemischt

Weiterhin wurde, um die Bildung von Self-Annealing-Komplexen oder Dimeren der zu verwendenden Sequenzier-Primer zu untersuchen, 40,0 µL Annealing Buffer mit 8,0 µL einer Lösung des zu untersuchenden Sequenzier-Primers mit einer Konzentration von 5 pmol/µL ohne Zusatz einer Lösung der entsprechenden Oligonukleotide (MLSB 2058 Methylation 24 bp, MLSB 2058 Methylation 42 bp und MLSB 2058 Methylation RP 18 bp) direkt in einer PSQ-Platte gemischt

Für den spezifischen Nachweis der gebildeten cDNA-Fragmente mit Hilfe der Sequenzier-Primer wurden 1,0 µL einer Lösung der entsprechenden Oligonukleotide (MLSB 2058 Methylation 24 bp, MLSB 2058 Methylation 42 bp und MLSB 2058 Methylation RP 18 bp) mit einer Konzentration von 10 pmol/µL mit 40,0 µL Annealing Buffer und 8,0 µL einer Lösung des zu untersuchenden Sequenzier-Primers mit einer Konzentration von 5 pmol/µL direkt in einer PSQ-Platte gemischt.

Nach erfolgter Hybridisierung bei 65 °C für 5 Min. erfolgte die Vermessung in der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Apparatur PSQ96MA nach dem Standard-Protokoll.

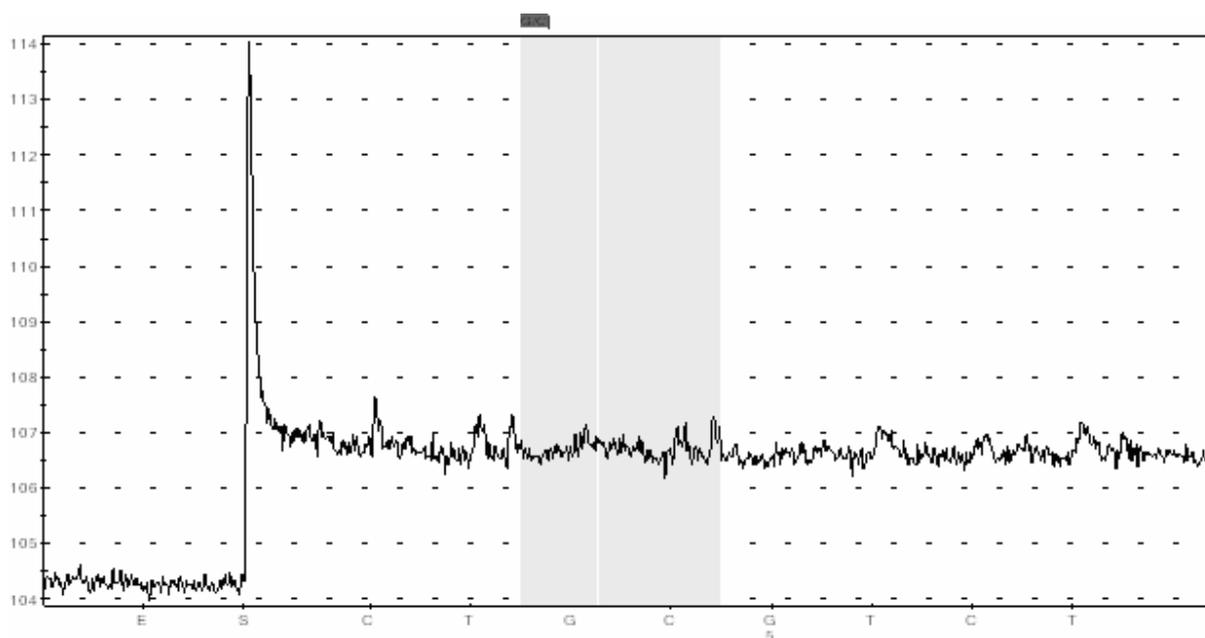
Gleichzeitig wurde die Dispensationsfolge der während der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Reaktion zugesetzten Nukleotide festgelegt, die einen Nachweis und Quantifizierung der gebildeten cDNA-Fragmente ermöglichen soll (Abbildung 75 und Abbildung 76). Die Tabelle 86 gibt einen Überblick über die verwendeten Dispensationsfolgen und erläutert die Reihenfolge dieser und die durch diese verbundenen Nachweisreaktionen der einzelnen cDNA-Fragmente in Abhängigkeit zu den verwendeten spezifischen Sequenzierprimern.

**Tabelle 86** Verwendete Dispensationsfolge zur Detektion der Dimethylierung an Pos. 2058

Bezeichnung des Sequenzier-Primers	Assay-Bezeichnung	Dispensationsfolge
MLSB 2058 Methylation SP27	1	C [Kontrolle] T [24 bp] G [RP] C [24 bp] G [Kontrolle] T [RP] C [RP] T [RP]
MLSB 2058 Methylation SP1	2	C [Kontrolle] T [24 bp] A [42 bp] G [RP] T [RP] C [24 bp + 42 bp + RP]
MLSB 2058 Methylation SP2	3	A [Kontrolle] T [24 bp] G [RP] C [24 bp + 42 bp] G [42 bp] C [Kontrolle] T [RP] C [RP]
MLSB 2058 Methylation SP3	4	C [Kontrolle] G [42 bp] A [42 bp] G [42 bp] A [42 bp] C [42 bp] G [42 bp]

Die durch die Dispensationsreihenfolge nachgewiesenen cDNA Fragmente sind hinter dem zugefügten Nukleotid in eckiger Klammer beschrieben; [24 bp] = Nachweis des 24 bp langen cDNA-Fragmentes, [42 bp] = Nachweis des 42 bp langen cDNA-Fragmentes, [RP] = Nachweis des während der Primer-Extension-Reaktion verwendeten am 5'-Ende Biotin markierten Primers (MLSB 2058 Methylation RP 18 bp BIO), [Kontrolle] = Kontroll-Nukleotide zur Überprüfung der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Reaktion.

Einen Überblick über die Ergebnisse der Messungen zur Untersuchung bezüglich Ausbildungen von Self-Annealing-Komplexen und Duplexen der während der Primer-Extension-Reaktion gebildeten cDNA-Fragmente und der entwickelten spezifischen Sequenzier-Primer sind in der Abbildung 77 bis Abbildung 83 zu sehen. Die Pyrogramme zeigen die relativen Lichteinheiten gegen die Dispensations-Reihenfolge. Die Punkte E und S geben den Zusatz des Enzym-Mixes und des Substrat-Mixes während des Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Laufes an.



**Abbildung 77** Ergebnis der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Reaktion: 1,0  $\mu$ L einer Primer-Lösung von MLSB 2058 Methylation RP 24 bp (Konzentration = 10 pmol/ $\mu$ L) in 48,0  $\mu$ L Annealing Buffer nach 5 min Hybridisierung bei 65 °C; Dispensationsfolge nach Assay-Bezeichnung 1 (Tabelle 86); Ermittelte Sequenz: keine.

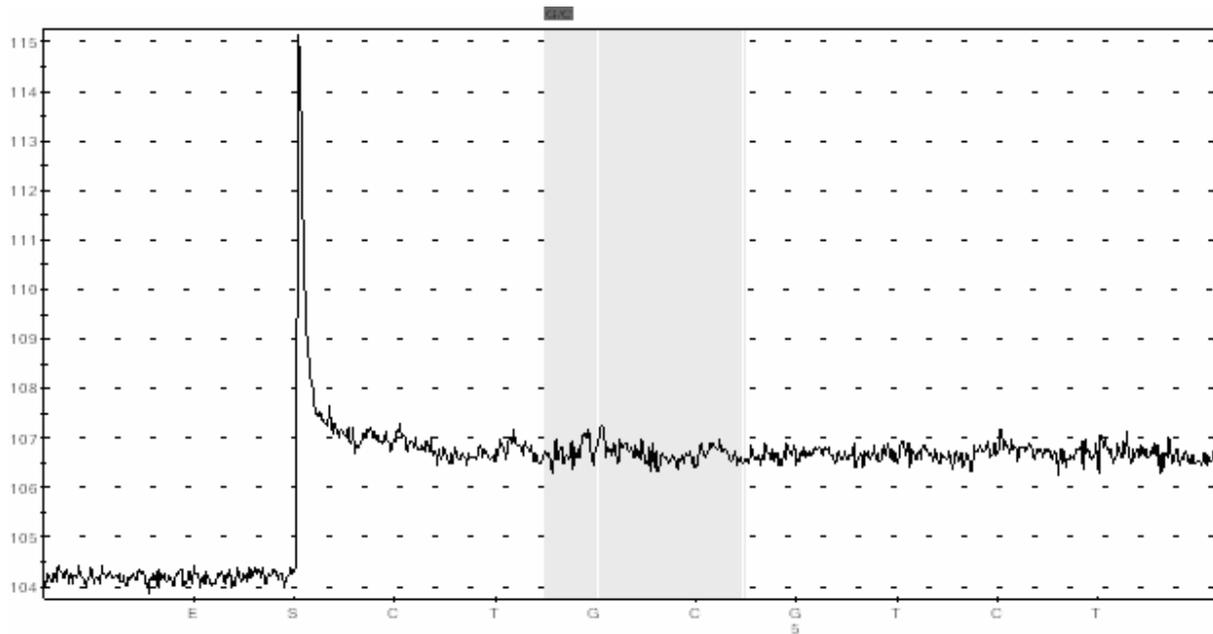


Abbildung 78 Ergebnis der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Reaktion: 1,0  $\mu\text{L}$  einer Primer-Lösung von MLSB 2058 Methylation RP 42 bp (Konzentration = 10 pmol/ $\mu\text{L}$ ) in 48,0  $\mu\text{L}$  Annealing Buffer nach 5 min Hybridisierung bei 65 °C; Dispensationsfolge nach Assay-Bezeichnung 1 (Tabelle 86); Ermittelte Sequenz: keine.

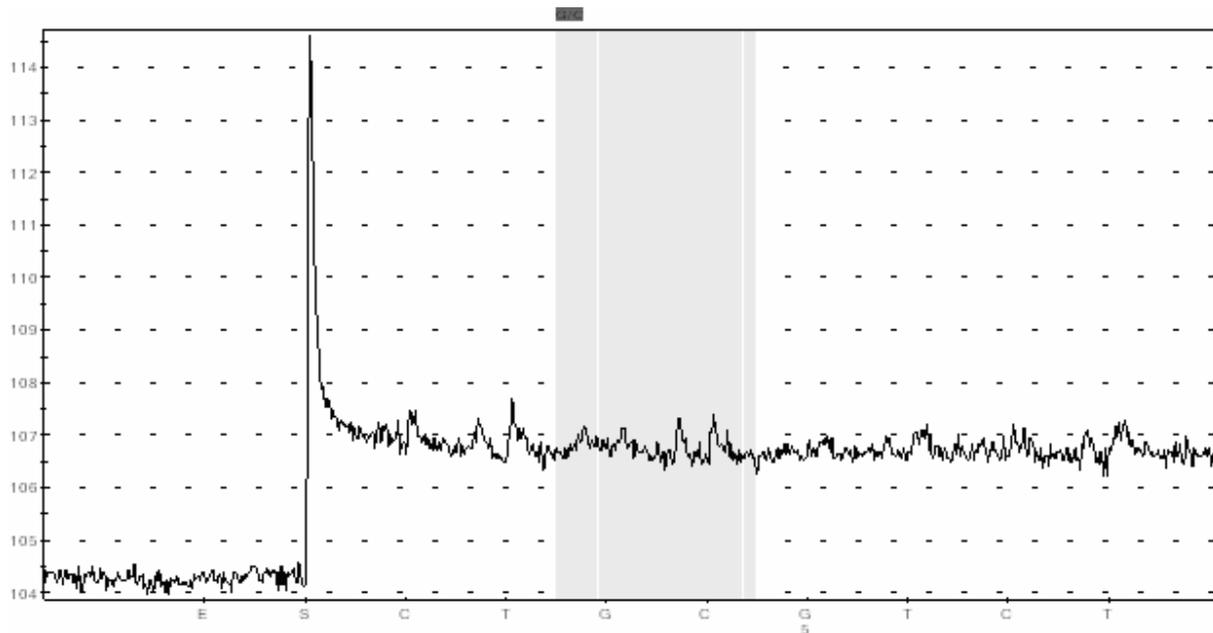


Abbildung 79 Ergebnis der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Reaktion: 1,0  $\mu\text{L}$  einer Primer-Lösung von MLSB 2058 Methylation RP 18 bp (Konzentration = 10 pmol/ $\mu\text{L}$ ) in 48,0  $\mu\text{L}$  Annealing Buffer nach 5 min Hybridisierung bei 65 °C; Dispensationsfolge nach Assay-Bezeichnung 1 (Tabelle 86); Ermittelte Sequenz: keine.

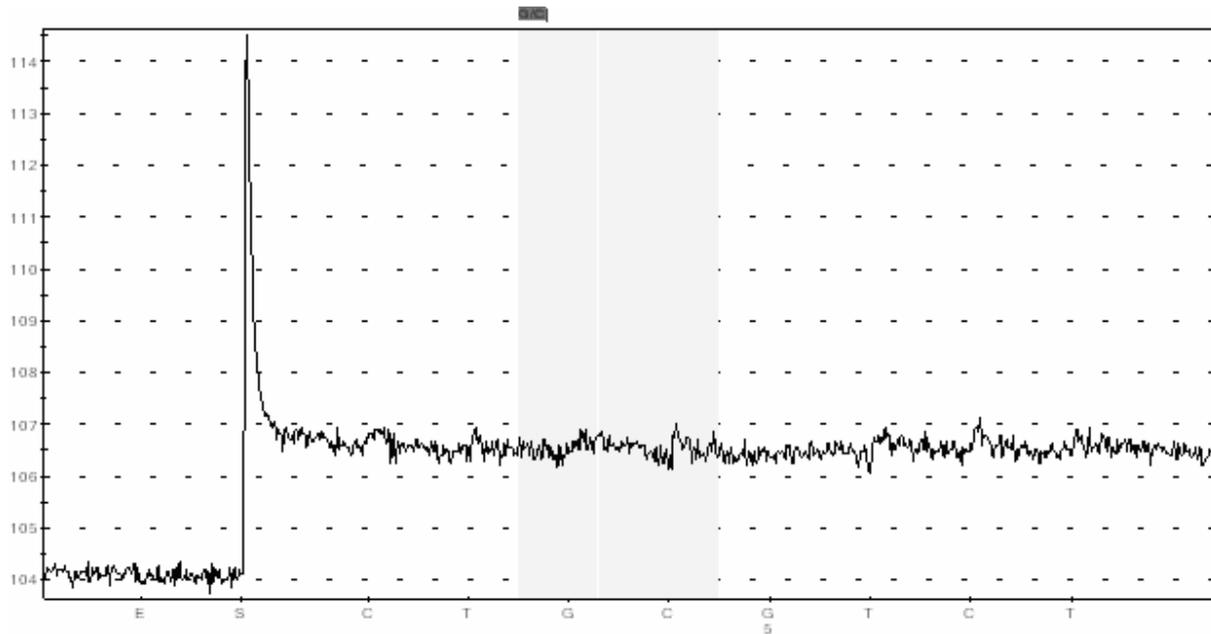


Abbildung 80 Ergebnis der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Reaktion: 8,0  $\mu\text{L}$  einer Primer-Lösung von MLSB 2058 Methylation SP27 (Konzentration = 5 pmol/ $\mu\text{L}$ ) und 40,0  $\mu\text{L}$  Annealing Buffer nach 5 min Hybridisierung bei 65 °C; Dispensationsfolge nach Assay-Bezeichnung 1 (Tabelle 86); Ermittelte Sequenz: keine.

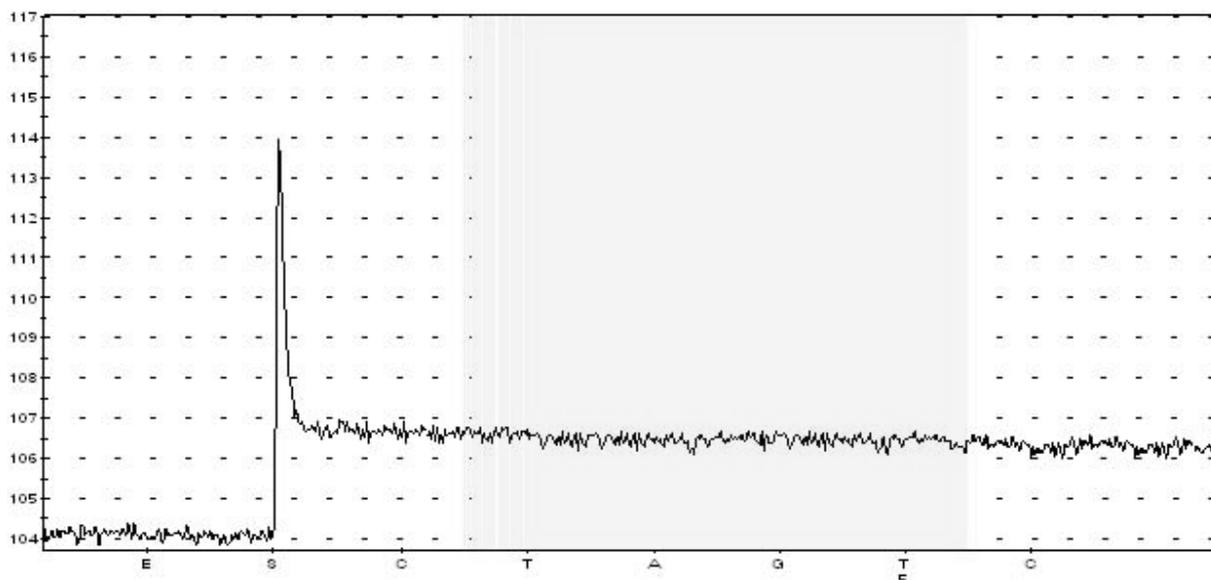
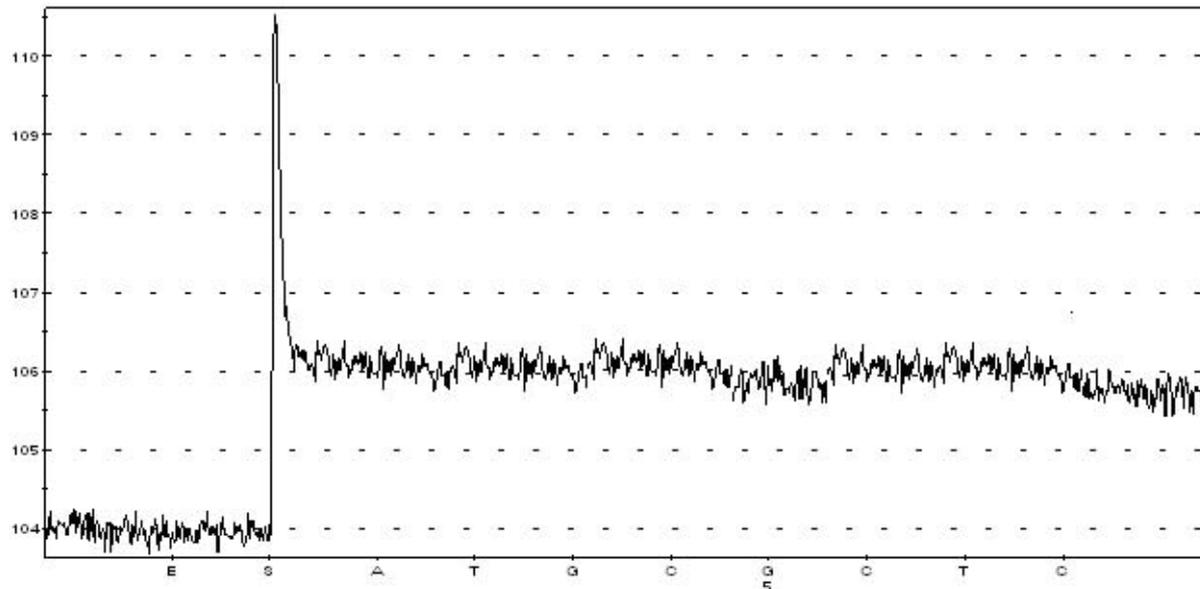
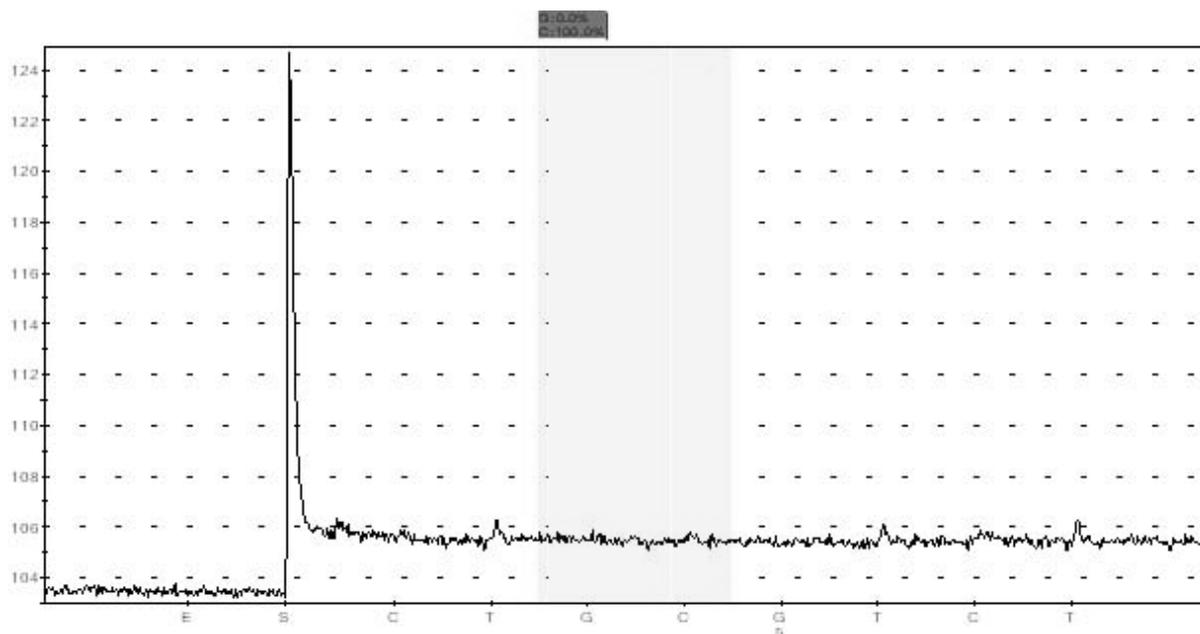


Abbildung 81 Ergebnis der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Reaktion: 8,0  $\mu\text{L}$  einer Primer-Lösung von MLSB 2058 Methylation SP1 (Konzentration = 5 pmol/ $\mu\text{L}$ ) und 40,0  $\mu\text{L}$  Annealing Buffer nach 5 min Hybridisierung bei 65 °C; Dispensationsfolge nach Assay-Bezeichnung 2 (Tabelle 86); Ermittelte Sequenz: keine.



**Abbildung 82** Ergebnis der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Reaktion: 8,0  $\mu$ L einer Primer-Lösung von MLSB 2058 Methylation SP2 (Konzentration = 5 pmol/ $\mu$ L) und 40,0  $\mu$ L Annealing Buffer nach 5 min Hybridisierung bei 65 °C; Dispensationsfolge nach Assay-Bezeichnung 3 (Tabelle 86); Ermittelte Sequenz: keine.

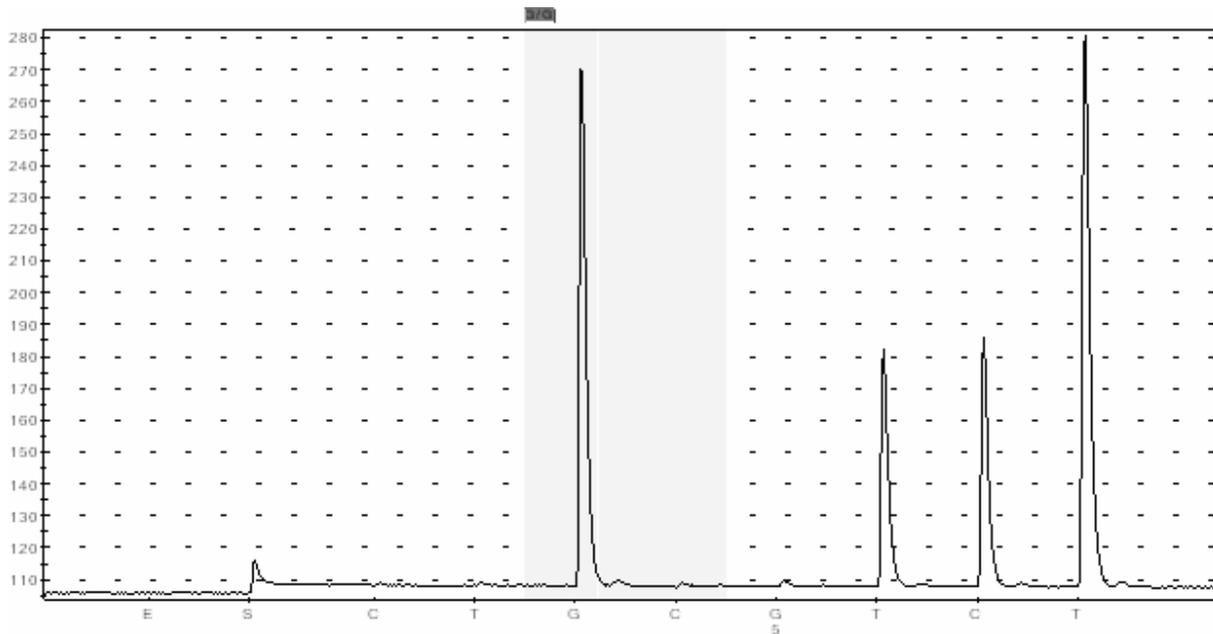


**Abbildung 83** Ergebnis der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Reaktion: 8,0  $\mu$ L einer Primer-Lösung von MLSB 2058 Methylation SP3 (Konzentration = 5 pmol/ $\mu$ L) und 40,0  $\mu$ L Annealing Buffer nach 5 min Hybridisierung bei 65 °C; Dispensationsfolge nach Assay-Bezeichnung 1 (Tabelle 86); Ermittelte Sequenz: keine.

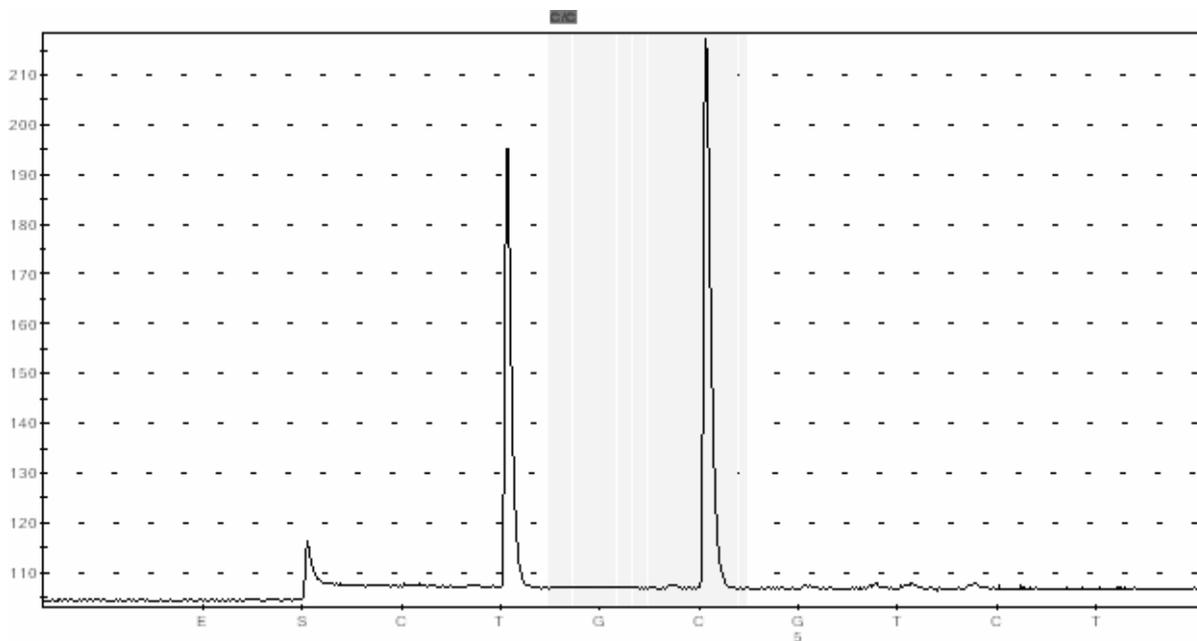
Die Pyrogramme zeigen keine Peaks durch den Zusatz der Nukleotide bei der gewählten Dispensationsreihenfolge. Somit konnte die Bildung von Self-Annealing-Komplexen und Duplexen durch die während der Primer-Extension-Reaktion gebildeten cDNA-Fragmente und der ausgewählten spezifischen Sequenzier-Primer ausgeschlossen werden und die Eignung dieser Vorgehensweise gezeigt werden.

Weiterhin wurden nun die entwickelten Sequenzier-Primer MLSB 2058 Methylation SP3 und Sequenzier-Primer MLSB 2058 Methylation SP27 auf ihre Fähigkeit getestet, die während

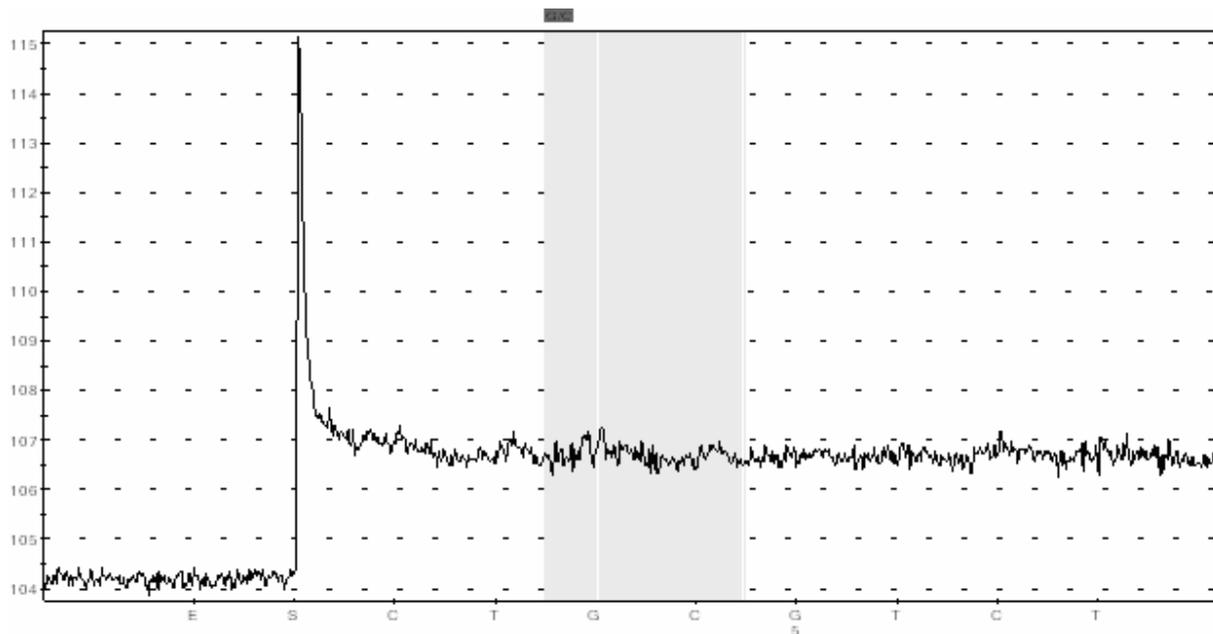
der Primer-Extension-Reaktion gebildeten cDNA-Fragmente spezifisch nachzuweisen. Die Abbildung 84 bis Abbildung 90 zeigen die Ergebnisse der Untersuchungen.



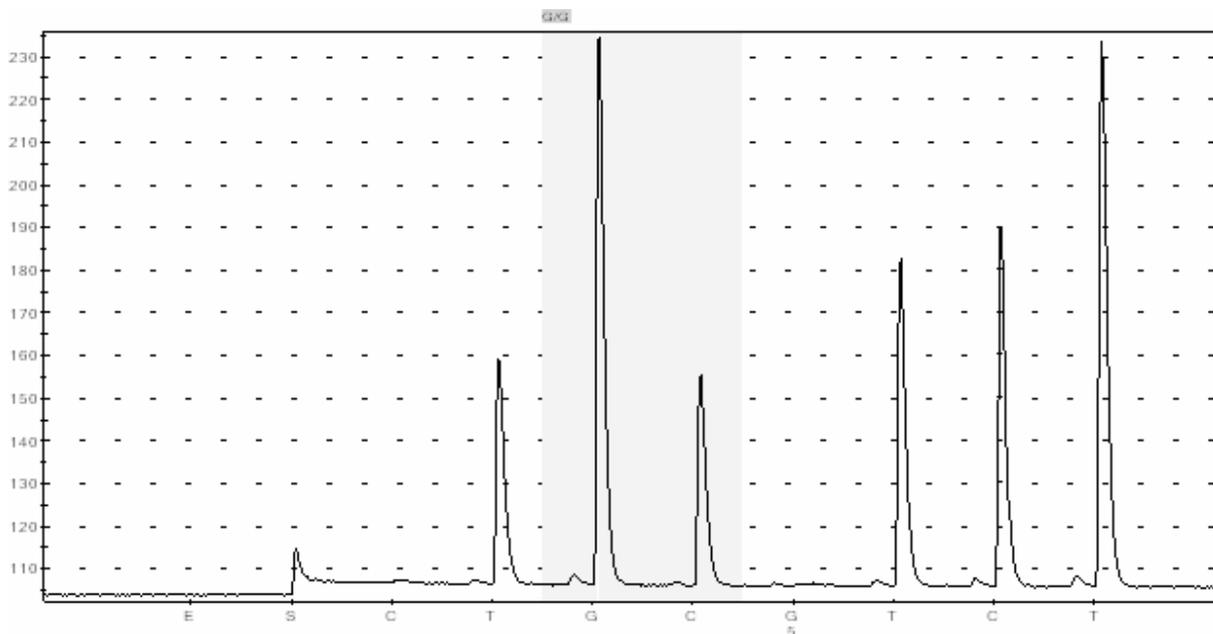
**Abbildung 84** Ergebnis der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Reaktion: 1,0  $\mu\text{L}$  einer Primer-Lösung von MLSB 2058 Methylation RP 18 bp (Konzentration = 10 pmol/ $\mu\text{L}$ ) in 8,0  $\mu\text{L}$  einer Primer-Lösung von MLSB 2058 Methylation RP SP27 (Konzentration = 5 pmol/ $\mu\text{L}$ ) und 40,0  $\mu\text{L}$  Annealing Buffer nach 5 min Hybridisierung bei 65 °C; Dispensationsfolge nach Assay-Bezeichnung 1 (Tabelle 86); Ermittelte Sequenz: GGTCTT.



**Abbildung 85** Ergebnis der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Reaktion: 1,0  $\mu\text{L}$  einer Primer-Lösung von MLSB 2058 Methylation 24 bp (Konzentration = 10 pmol/ $\mu\text{L}$ ) in 8,0  $\mu\text{L}$  einer Primer-Lösung von MLSB 2058 Methylation RP SP27 (Konzentration = 5 pmol/ $\mu\text{L}$ ) und 40,0  $\mu\text{L}$  Annealing Buffer nach 5 min Hybridisierung bei 65 °C; Dispensationsfolge nach Assay-Bezeichnung 1 (Tabelle 86); Ermittelte Sequenz: TC.



**Abbildung 86** Ergebnis der Pyrosequencing™-Reaktion: 1,0 µL einer Primer-Lösung von MLSB 2058 Methylation 42 bp (Konzentration = 10 pmol/µL) in 8,0 µL einer Primer-Lösung von MLSB 2058 Methylation RP SP27 (Konzentration = 5 pmol/µL) und 40,0 µL Annealing Buffer nach 5 min Hybridisierung bei 65 °C; Dispensationsfolge nach Assay-Bezeichnung 1 (Tabelle 86); Ermittelte Sequenz: keine.



**Abbildung 87** Ergebnis der Pyrosequencing™-Reaktion: je 1,0 µL einer Primer-Lösung von MLSB 2058 Methylation RP 18 bp und von MLSB 2058 Methylation 24 bp (Konzentration = 10 pmol/µL) in 8,0 µL einer Primer-Lösung von MLSB 2058 Methylation RP SP27 (Konzentration = 5 pmol/µL) und 40,0 µL Annealing Buffer nach 5 min Hybridisierung bei 65 °C; Dispensationsfolge nach Assay-Bezeichnung 1 (Tabelle 86); Ermittelte Sequenz: TGGCTCTT.

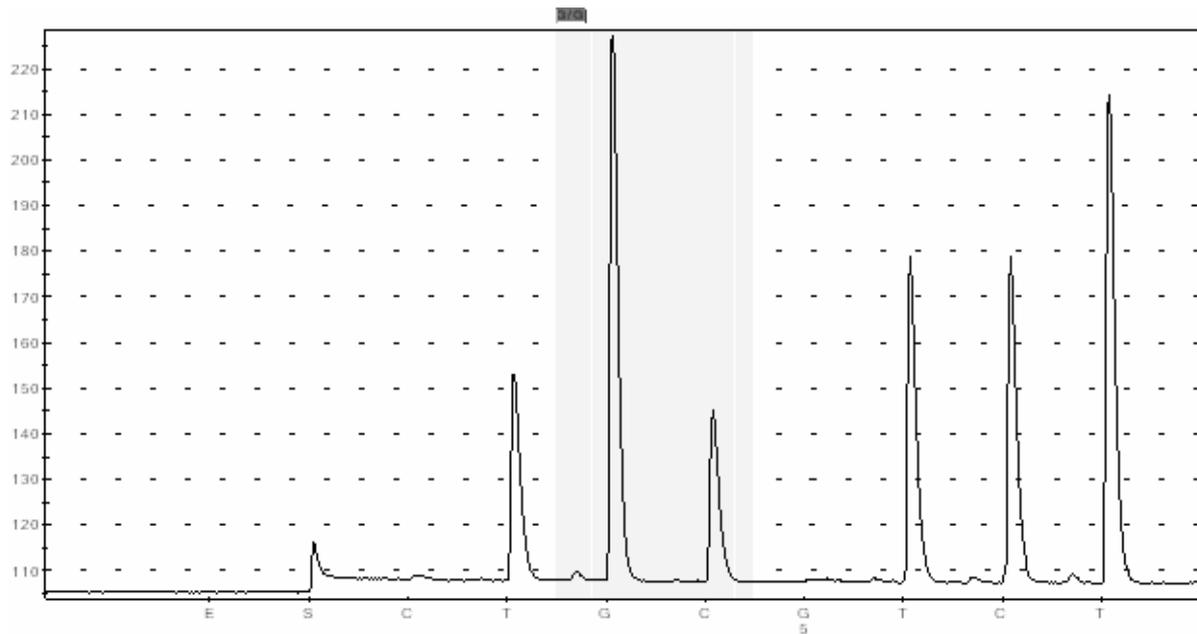


Abbildung 88 Ergebnis der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Reaktion: je 1,0  $\mu\text{L}$  einer Primer-Lösung von MLSB 2058 Methylation RP 18 bp, von MLSB 2058 Methylation 24 bp und von MLSB 2058 Methylation 42 bp (Konzentration = 10 pmol/ $\mu\text{L}$ ) in 8,0  $\mu\text{L}$  einer Primer-Lösung von MLSB 2058 Methylation RP SP27 (Konzentration = 5 pmol/ $\mu\text{L}$ ) und 40,0  $\mu\text{L}$  Annealing Buffer nach 5 min Hybridisierung bei 65 °C; Dispensationsfolge nach Assay-Bezeichnung 1 (Tabelle 86); Ermittelte Sequenz: TGGCTCTT.

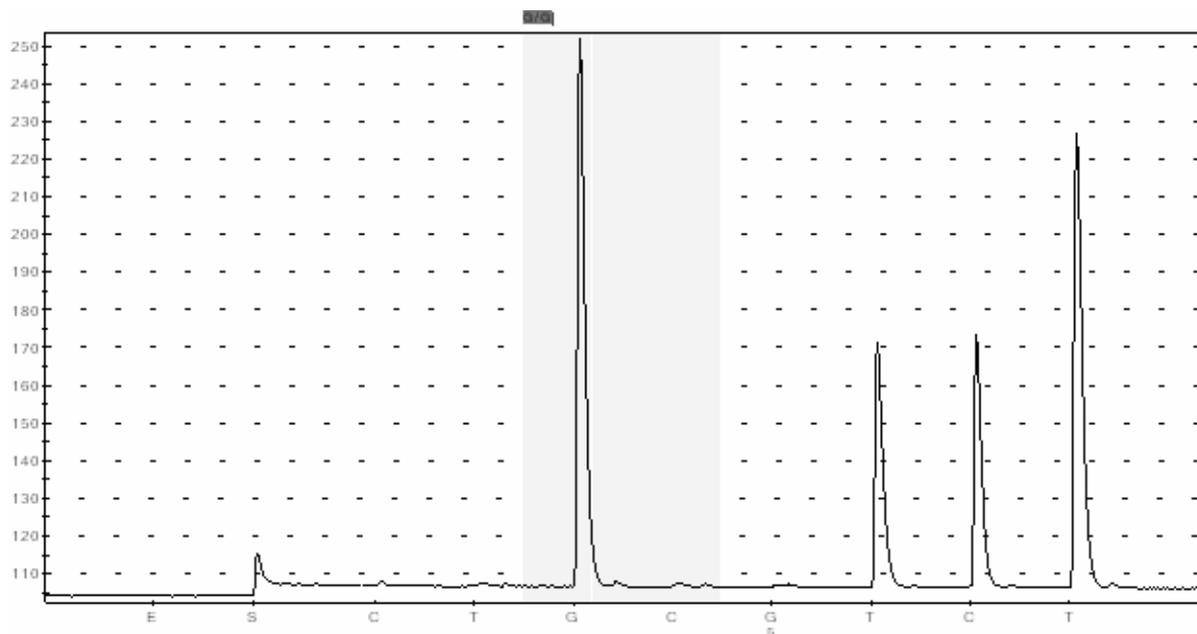
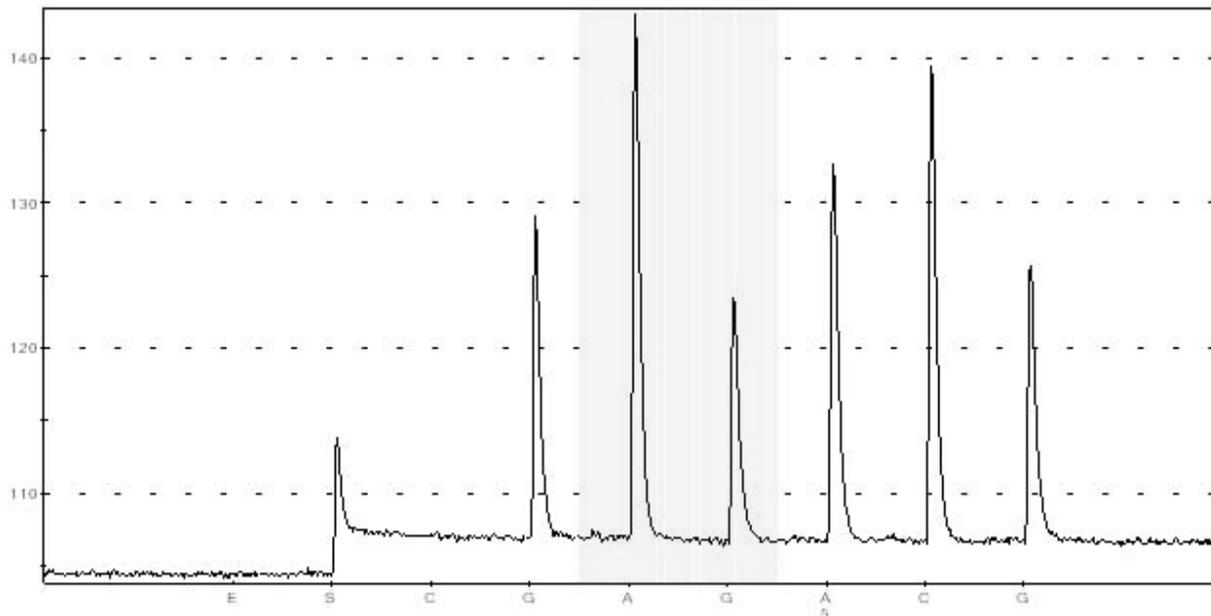


Abbildung 89 Ergebnis der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Reaktion: je 1,0  $\mu\text{L}$  einer Primer-Lösung von MLSB 2058 Methylation RP 18 bp und von MLSB 2058 Methylation 42 bp (Konzentration = 10 pmol/ $\mu\text{L}$ ) in 8,0  $\mu\text{L}$  einer Primer-Lösung von MLSB 2058 Methylation RP SP27 (Konzentration = 5 pmol/ $\mu\text{L}$ ) und 40,0  $\mu\text{L}$  Annealing Buffer nach 5 min Hybridisierung bei 65 °C; Dispensationsfolge nach Assay-Bezeichnung 1 (Tabelle 86); Ermittelte Sequenz: GGTCTT.



**Abbildung 90** Ergebnis der Pyrosequencing™-Reaktion: 1,0 µL einer Primer-Lösung von MLSB 2058 Methylation 42 bp in 8,0 µL einer Primer-Lösung von MLSB 2058 Methylation SP3 (Konzentration = 5 pmol/µL) und 40,0 µL Annealing Buffer nach 5 min Hybridisierung bei 65 °C; Dispensationsfolge nach Assay-Bezeichnung 4 (Tabelle 86); Ermittelte Sequenz: GGAAAGAACCCG.

Dabei konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe des entwickelten Sequenzier-Primers MLSB 2058 Methylation SP27 der Nachweis des 24 bp langen cDNA-Fragment, welches während der Primer-Extension-Reaktion gebildet wird, spezifisch erfolgen kann. Das zuerst zugesetzte Nukleotid T wird durch die Anlagerung des Sequenzier-Primers bedingt nur in das Oligonukleotid MLSB 2058 Methylation 24 bp eingebaut. Das im zweiten Schritt folgende Nukleotid G wiederum wird nur in das Oligonukleotid MLSB 2058 Methylation RP 18 bp eingebaut. Im dritten Dispensationsschritt erfolgt der Einbau des Nukleotids C wieder nur in das Oligonukleotid MLSB 2058 Methylation 24 bp. Die folgende zugesetzten Nukleotide TCT ergänzen das Oligonukleotid MLSB 2058 Methylation RP 18 bp (Abbildung 87 und Abbildung 88). Bei dem Vergleich der gemessenen Peakhöhen mit den erwarteten Peakhöhen wurde festgestellt, dass beim dem nach Assay-Bezeichnung 1 (Tabelle 86) als zweites zugefügtes Nukleotid C, die Höhe des Peaks nur halb so hoch ausfiel wie erwartet. Gleiches gilt für das als letztes zugefügtes Nukleotid T. Hier wurde eine um ein Drittel geringere Höhe gemessen.

Der Nachweis des während der Primer-Extension-Reaktion gebildeten 42 bp langen cDNA-Fragment unter Verwendung des Sequenzier-Primers MLSB 2058 Methylation SP3 ist nicht möglich, da die gemessenen Peaks nicht den erwarteten Höhen entsprechen und somit keine Aussage über eine spezifische Detektion möglich ist. So wurde statt der Sequenz GGAAAGACCCCG die Sequenz GGAAAGAACCCG gemessen (Abbildung 90). Weiterhin

wurde beobachtet, dass die Peakhöhen für die Signale des 24 bp cDNA- Fragmentes im Verhältnis zu den Peakhöhen für die Signale des 18 bp langen RP Primers ebenfalls um die Hälfte geringer ausfallen. Dieses wurde bei der Auswertung der Sequenzen berücksichtigt.

#### 5.4 Messung der während Primer-Extension-Reaktion gebildeten cDNA-Fragmente mit der Pyrosequencing™-Technologie

Für den Nachweis und Quantifizierung der während der Primer-Extension-Reaktion gebildeten cDNA-Fragmente mit Hilfe der Pyrosequencing™-Technologie musste zunächst untersucht werden, welche Menge des Primers MLSB 2058 Methylation RP BIO 18 bp während der Primer-Extension-Reaktion eingesetzt werden muss und wie groß der Verlust des Primers durch die Aufreinigung wie unter C2.7.2.1 beschrieben ist. Dazu wurden in einer PCR-Platte je 0,5 µL, 1,0 µL, 2,0 µL und 4,0 µL des Primers MLSB 2058 Methylation RP 18 bp in einer Lösung von 37,0 µL Binding-Buffer und 3,0 µL einer Streptavidin-Sepharose-Suspension gemischt und für 10 Min. auf einer Vortex-Apparatur gemischt. Im Anschluss erfolgt die Aufreinigung mit dem Vacuum-Prep-Tool wie unter C2.7.2.1 beschrieben. Die aufgereinigten Ansätze wurden nun in der Pyrosequencing™-Apparatur PSQMA96 nach Hybridisierung für 5 Min. bei 65 °C mit dem Sequenzier-Primer MLSB 2058 Methylation RP SP27 (8,0 µL einer Primer Lösung mit der Konzentration von 5 pmol/µL verdünnt mit 40,0 µL Annealing Buffer) unter Verwendung der Dispensationsfolge 1 (Tabelle 86) vermessen. Die Abbildung 91 bis Abbildung 94 geben ein Überblick über die Messungen.

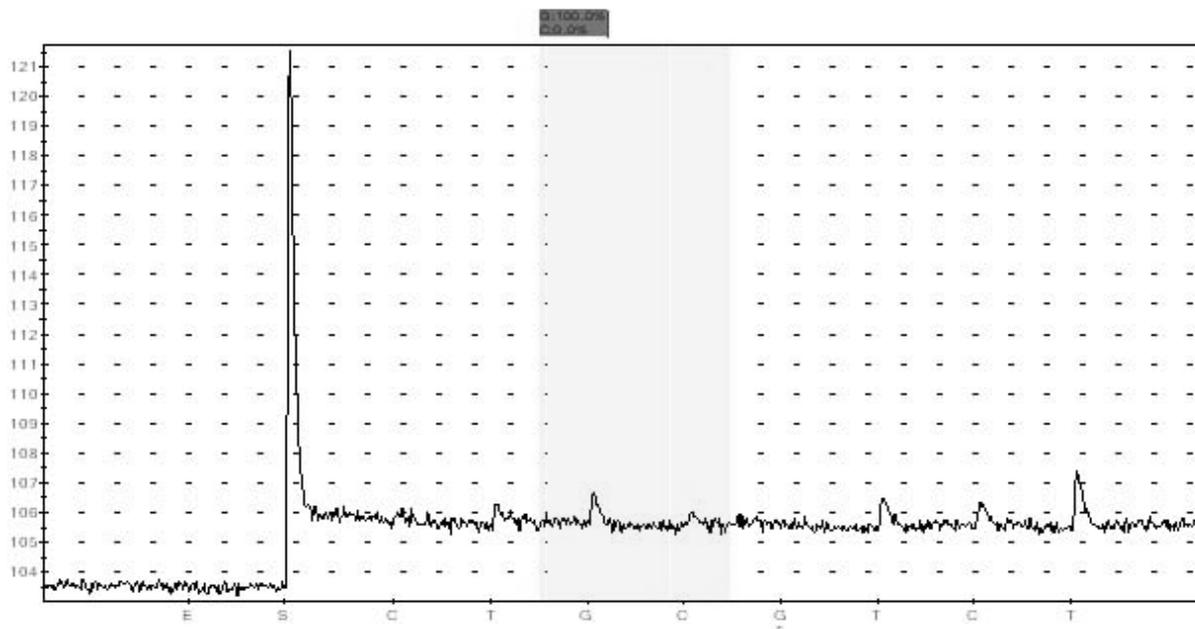
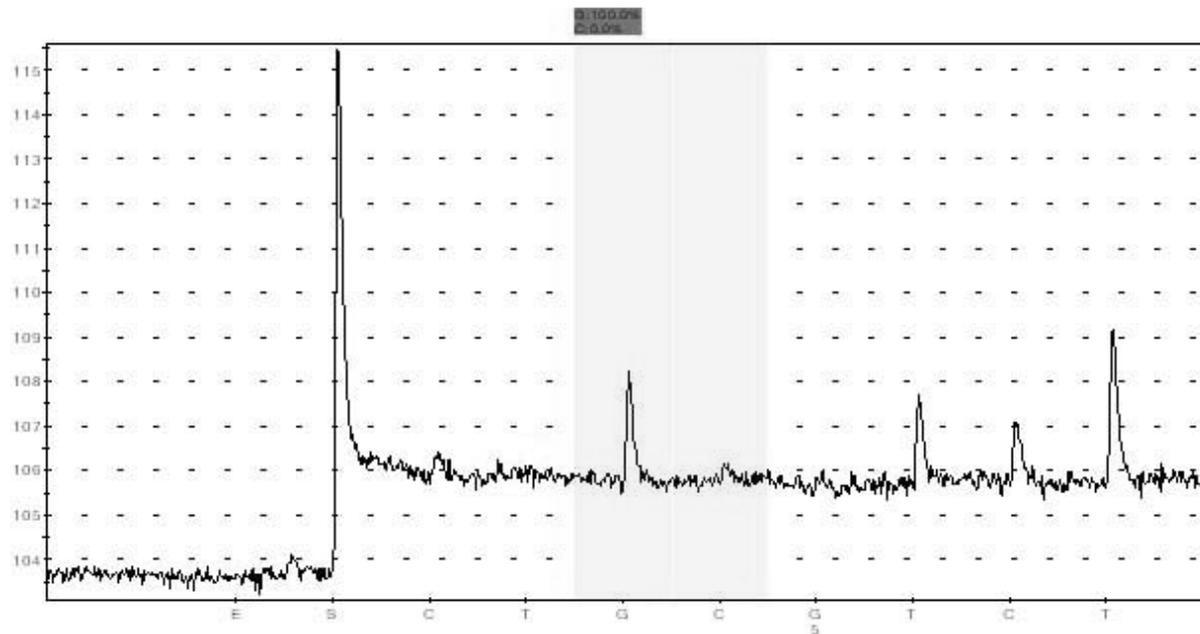
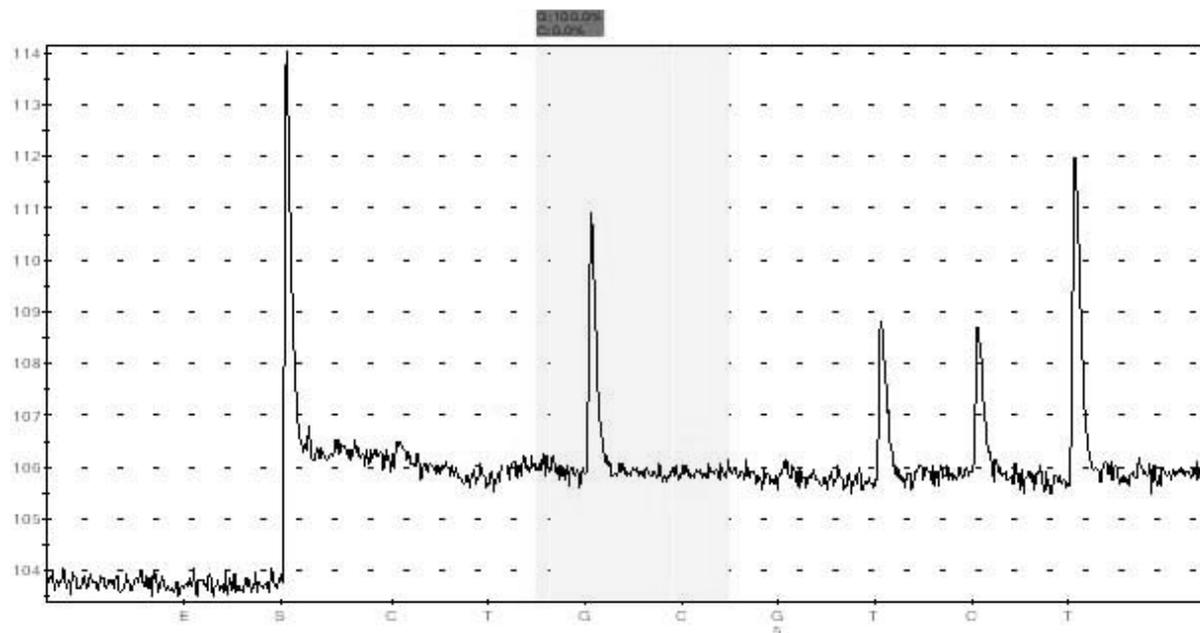


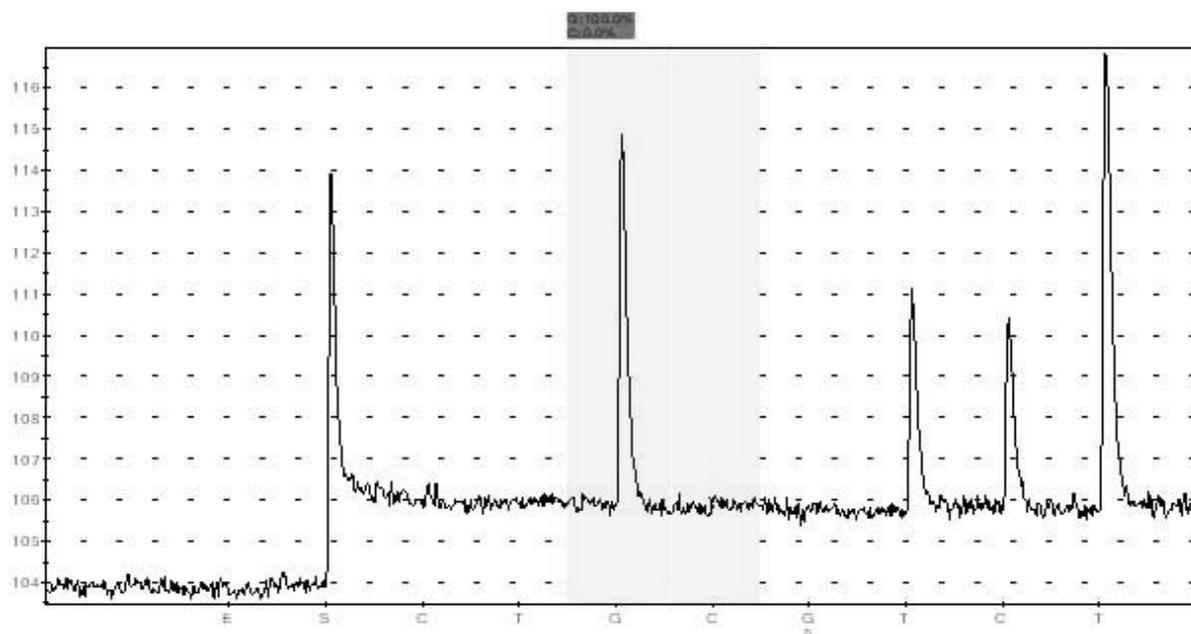
Abbildung 91 Ergebnis der Pyrosequencing™-Reaktion: Aufgereinigter Ansatz nach C2.7.2.1 von 0,5 µL einer Primer-Lösung von MLSB 2058 Methylation RP 18 bp nach 5 min Hybridisierung bei 65 °C mit dem Sequenzier-Primer MLSB 2058 Methylation SP27 (8,0 µL einer Primer-Lösung mit einer Konzentration von 5 pmol/µL verdünnt mit 40,0 µL Annealing Buffer); Dispensationsfolge nach Assay-Bezeichnung 1 (Tabelle 86); Ermittelte Sequenz: nicht auswertbar.



**Abbildung 92** Ergebnis der Pyrosequencing™-Reaktion: Aufgereinigter Ansatz nach C2.7.2.1 von 1,0 µL einer Primer-Lösung von MLSB 2058 Methylation RP 18 bp nach 5 min Hybridisierung bei 65 °C mit dem Sequenzier-Primer MLSB 2058 Methylation SP27 (8,0 µL einer Primer-Lösung mit einer Konzentration von 5 pmol/µL verdünnt mit 40,0 µL Annealing Buffer); Dispensationsfolge nach Assay-Bezeichnung 1 (Tabelle 86); Ermittelte Sequenz: GGTCTT.



**Abbildung 93** Ergebnis der Pyrosequencing™-Reaktion: Aufgereinigter Ansatz nach C2.7.2.1 von 2,0 µL einer Primer-Lösung von MLSB 2058 Methylation RP 18 bp nach 5 min Hybridisierung bei 65 °C mit dem Sequenzier-Primer MLSB 2058 Methylation SP27 (8,0 µL einer Primer-Lösung mit einer Konzentration von 5 pmol/µL verdünnt mit 40,0 µL Annealing Buffer); Dispensationsfolge nach Assay-Bezeichnung 1 (Tabelle 86); Ermittelte Sequenz: GGTCTT.



**Abbildung 94** Ergebnis der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Reaktion: Aufgereinigter Ansatz nach C2.7.2.1 von 4,0  $\mu\text{L}$  einer Primer-Lösung von MLSB 2058 Methylation RP 18 bp nach 5 min Hybridisierung bei 65 °C mit dem Sequenzier-Primer MLSB 2058 Methylation SP27 (8,0  $\mu\text{L}$  einer Primer-Lösung mit einer Konzentration von 5 pmol/ $\mu\text{L}$  verdünnt mit 40,0  $\mu\text{L}$  Annealing Buffer); Dispensationsfolge nach Assay-Bezeichnung 1 (Tabelle 86); Ermittelte Sequenz: GGTCTT.

Dabei konnte gezeigt werden, dass ein für die Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Reaktion optimales Pyrogram bei der Verwendung von 4,0  $\mu\text{L}$  des Primers MLSB 2058 Methylation RP 18 bp zu erwarten ist.

Im folgenden Schritt wurden nun aus den zuvor auf ihre Resistenzeigenschaften phänotypisch und genotypisch charakterisierten klinischen Isolaten *S. aureus* VA1546/07 und VA1709/07 wie unter C2.2 beschrieben Gesamt-RNA gewonnen. Diese wurde nun mit Hilfe des am 5'-Ende Biotin markieren Primer MLSB 2058 Methylation RP 18 BIO und unter Verwendung von allen vier 2'-Desoxynukleotide (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) durch eine Primer-Extension-Reaktion in die gewünschten cDNA-Fragmente umgeschrieben. Dazu wurden zunächst die folgenden Ansätze gemischt (Tabelle 87 und Tabelle 88).

**Tabelle 87** Ansatz 1

Bestandteil	$\mu\text{L}$	Menge
MLSB 2058 Methylation RP 18 BIO <sup>a</sup>	4,0	
RNA	-	12 $\mu\text{g}$ <sup>b</sup>
dNTP-Mix (je 10mM)	4,0	
H <sub>2</sub> O	Ad 48,0	

<sup>a</sup> Konzentration der Primer-Lösung: 10 pmol/ $\mu\text{L}$

<sup>b</sup> Die Menge wurde nach C2.2.1 bestimmt

**Tabelle 88** Ansatz 2

Bestandteil	$\mu\text{L}$
5X First-Strand Buffer	16,0
0.1 M DTT	8,0
RNaseOUT™ (40 U/ $\mu\text{L}$ )	4,0

Der Ansatz 1 wurde für 5 Min. bei 65 °C inkubiert, abzentrifugiert und auf Eis gestellt. Anschließend wurden Ansatz 1 und 2 gemischt, für 2 Min. bei 42 °C inkubiert, abzentrifugiert und auf Eis gestellt. Zuletzt wurden 4,0  $\mu\text{L}$  SuperScript™ II RT (200 U/ $\mu\text{L}$ ) hinzugegeben und durch Pipettieren gemischt. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation des Ansatzes nach folgendem Programm (Tabelle 89) in einem Thermocycler.

**Tabelle 89** Temperatur- und Zeit-Einstellung der Primer-Extension-Reaktion

Schritt	T	t
1. RT-Reaktion	45 °C	60 min
2. Inaktivierung der Reversen Transkriptase	70 °C	15 min

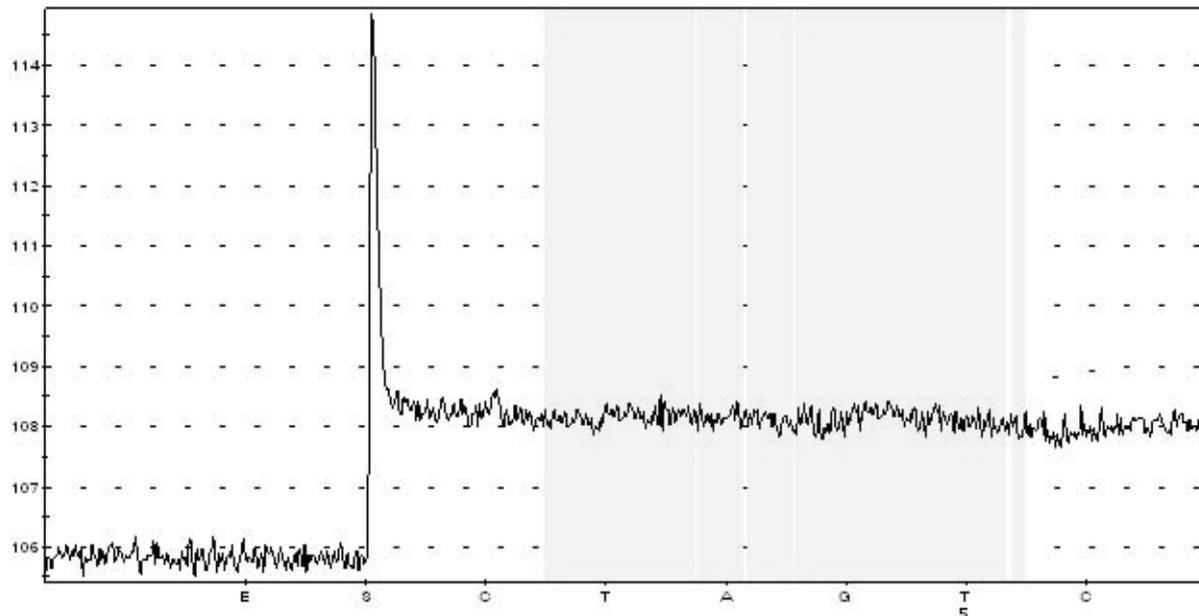
Die weitere Untersuchung der gewonnenen cDNA-Fragmente erfolgt nach einer Aufreinigung wie unter C2.7.2 beschrieben mit Hilfe der Pyrosequencing™-Apparatur. Zur Aufreinigung wurden abweichend zu dem Pyrosequencing™-Standard-Protokoll 80,0  $\mu\text{L}$  RT Produkt mit 3,0  $\mu\text{L}$  Streptavidin-Sepharose-Suspension und 77,0  $\mu\text{L}$  Binding-Buffer gemischt.

Im Anschluss erfolgte eine Hybridisierung mit den Sequenzierprimer MLSB 2058 Methylation SP27, MLSB 2058 Methylation SP1 und MLSB 2058 Methylation SP2.

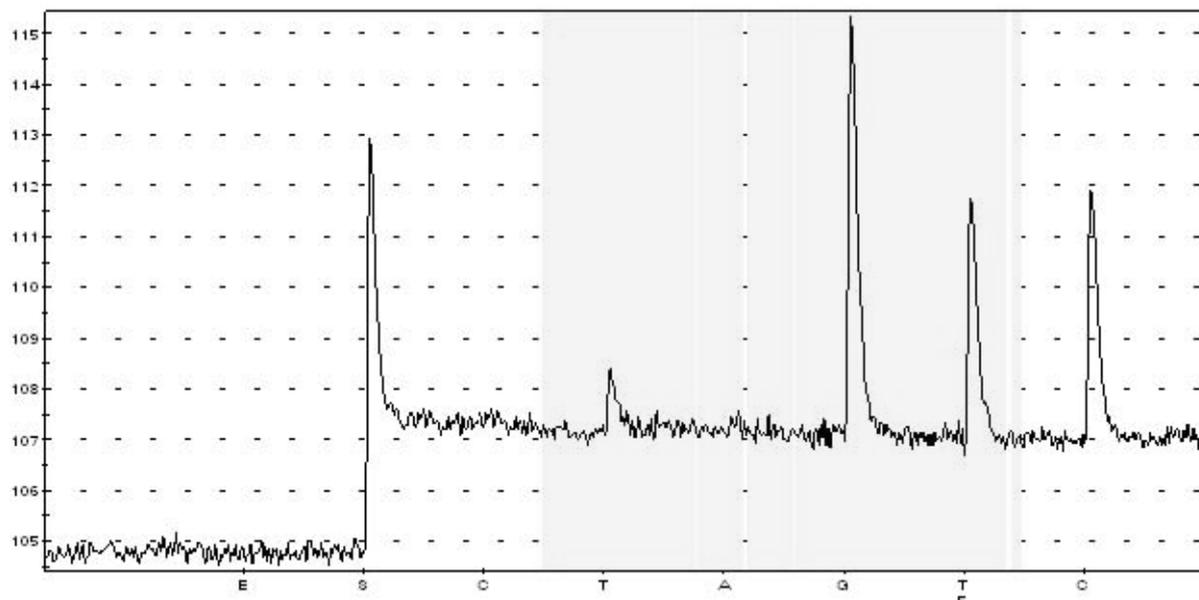
Dazu wurden zwei Möglichkeiten der Hybridisierung und des Nachweises untersucht. Für den Nachweis und die Quantifizierung in zwei getrennten Ansätzen wurden je 8,0  $\mu\text{L}$  der entsprechenden Primer-Lösung mit einer Konzentration von 5 pmol/ $\mu\text{L}$  mit 40,0  $\mu\text{L}$  Annealing Buffer verdünnt und durch Erhitzen bei 65 °C für 5 Min. mit den gewonnenen cDNA-Fragmenten hybridisiert. Um die gewonnenen cDNA-Fragmente gleichzeitig in einem Ansatz nachzuweisen und zu quantifizieren wurden 8,0  $\mu\text{L}$  der Primer-Lösung MLSB 2058 Methylation SP27 und 8,0  $\mu\text{L}$  der Primer-Lösung MLSB 2058 Methylation SP1 mit 32,0  $\mu\text{L}$  Annealing Buffer verdünnt und durch Erhitzen bei 65 °C für 5 Min. hybridisiert. Entsprechend wurden 8,0  $\mu\text{L}$  der Primer-Lösung MLSB 2058 Methylation SP27 und 8,0  $\mu\text{L}$  der Primer-Lösung MLSB 2058 Methylation SP2 mit 32,0  $\mu\text{L}$  Annealing Buffer verdünnt und durch Erhitzen bei 65 °C für 5 Min. hybridisiert.

Nach erfolgter Hybridisierung wurden die aufgereinigten cDNA-Fragmente in der Pyrosequencing™-Apparatur PSQMA96 unter der Verwendung der entsprechenden

Dispensationsfolge für die verwendeten Sequenzier-Primer (Tabelle 86) vermessen. Die Abbildungen 95 bis 106 zeigen die Ergebnisse der Messungen.



**Abbildung 95** Ergebnis der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Reaktion: Aufgereinigter Ansatz nach C2.7.2.1 von 80,0  $\mu$ L Primer-Extension-Produkt nach Tabelle 87 bis Tabelle 89 von *S. aureus* VA1546/07 nach 5 min Hybridisierung bei 65 °C mit dem Sequenzier-Primer MLSB 2058 Methylation SP1 (8,0  $\mu$ L einer Primer-Lösung mit einer Konzentration von 5 pmol/ $\mu$ L verdünnt mit 40,0  $\mu$ L Annealing Buffer); Dispensationsfolge nach Assay-Bezeichnung 2 (Tabelle 86); Ermittelte Sequenz: keine.



**Abbildung 96** Ergebnis der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Reaktion: Aufgereinigter Ansatz nach C2.7.2.1 von 80,0  $\mu$ L Primer-Extension-Produkt nach Tabelle 87 bis Tabelle 89 von *S. aureus* VA1546/07 nach 5 min Hybridisierung bei 65 °C mit dem Sequenzier-Primer MLSB 2058 Methylation SP27 (8,0  $\mu$ L einer Primer-Lösung mit einer Konzentration von 5 pmol/ $\mu$ L verdünnt mit 40,0  $\mu$ L Annealing Buffer); Dispensationsfolge nach Assay-Bezeichnung 2 (Tabelle 86); Ermittelte Sequenz: GGTC.

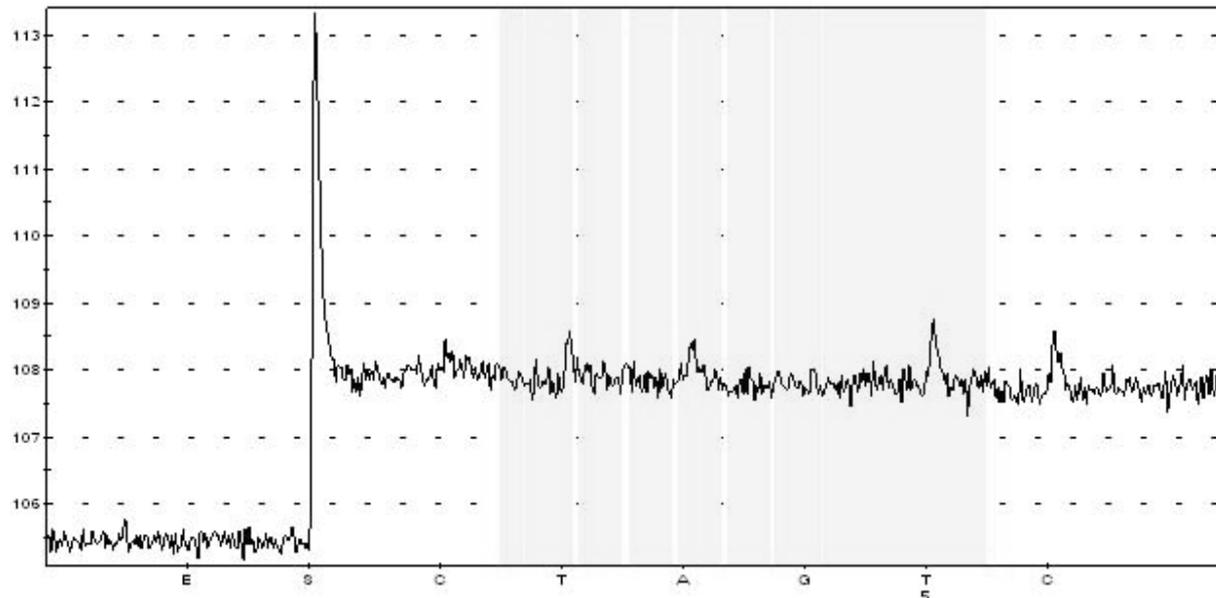


Abbildung 97 Ergebnis der Pyrosequencing™-Reaktion: Aufgereinigter Ansatz nach C2.7.2.1 von 80,0 µL Primer-Extension-Produkt nach Tabelle 87 bis Tabelle 89 von *S. aureus* VA1709/07 nach 5 min Hybridisierung bei 65 °C mit dem Sequenzier-Primer MLSB 2058 Methylation SP1 (8,0 µL einer Primer-Lösung mit einer Konzentration von 5 pmol/µL verdünnt mit 40,0 µL Annealing Buffer); Dispensationsfolge nach Assay-Bezeichnung 2 (Tabelle 86); Ermittelte Sequenz: nicht auswertbar.

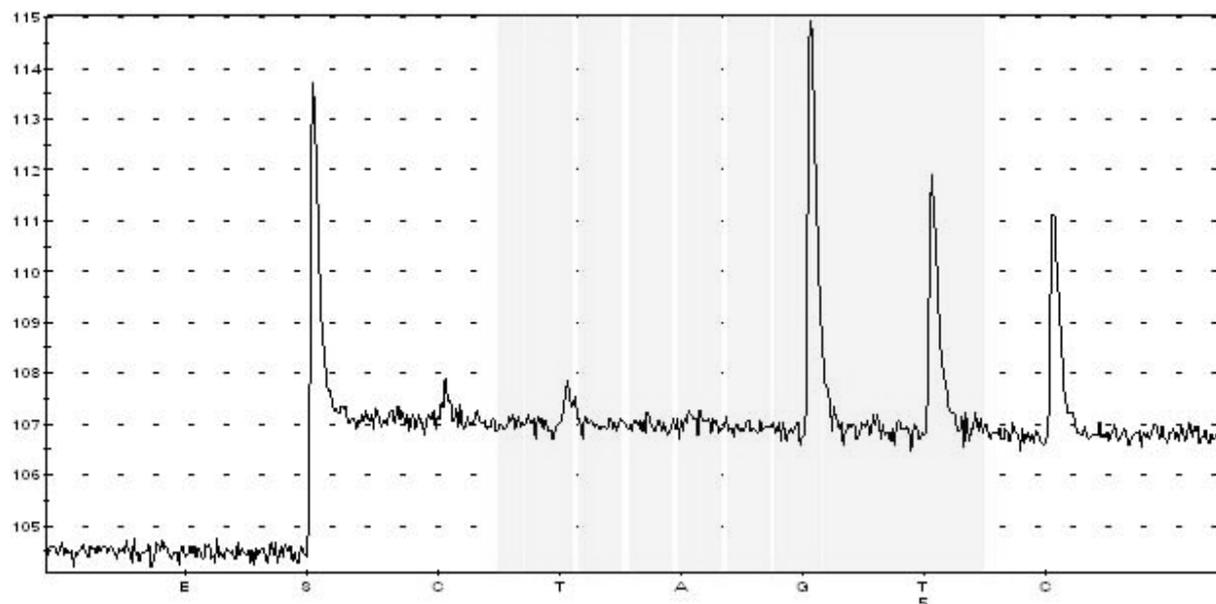


Abbildung 98 Ergebnis der Pyrosequencing™-Reaktion: Aufgereinigter Ansatz nach C2.7.2.1 von 80,0 µL Primer-Extension-Produkt nach Tabelle 87 bis Tabelle 89 von *S. aureus* VA1709/07 nach 5 min Hybridisierung bei 65 °C mit dem Sequenzier-Primer MLSB 2058 Methylation SP27 (8,0 µL einer Primer-Lösung mit einer Konzentration von 5 pmol/µL verdünnt mit 40,0 µL Annealing Buffer); Dispensationsfolge nach Assay-Bezeichnung 2 (Tabelle 86); Ermittelte Sequenz: GGTC.

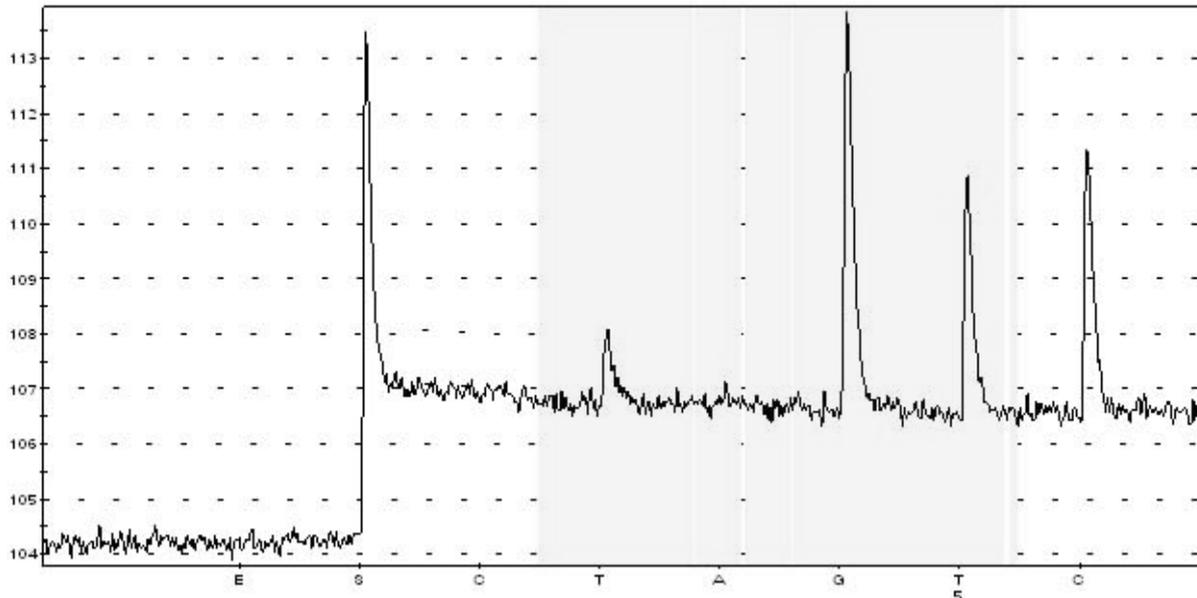


Abbildung 99 Ergebnis der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Reaktion: Aufgereinigter Ansatz nach C2.7.2.1 von 80,0  $\mu\text{L}$  Primer-Extension-Produkt nach Tabelle 87 bis Tabelle 89 von *S. aureus* VA1546/07 nach 5 min Hybridisierung bei 65 °C mit den Sequenzier-Primern MLSB 2058 Methylation SP27 und Sequenzier-Primern MLSB 2058 Methylation SP1 (je 8,0  $\mu\text{L}$  einer Primer-Lösung mit einer Konzentration von 5 pmol/ $\mu\text{L}$  verdünnt mit 32,0  $\mu\text{L}$  Annealing Buffer); Dispensationsfolge nach Assay-Bezeichnung 2 (Tabelle 86); Ermittelte Sequenz: TGGTC.

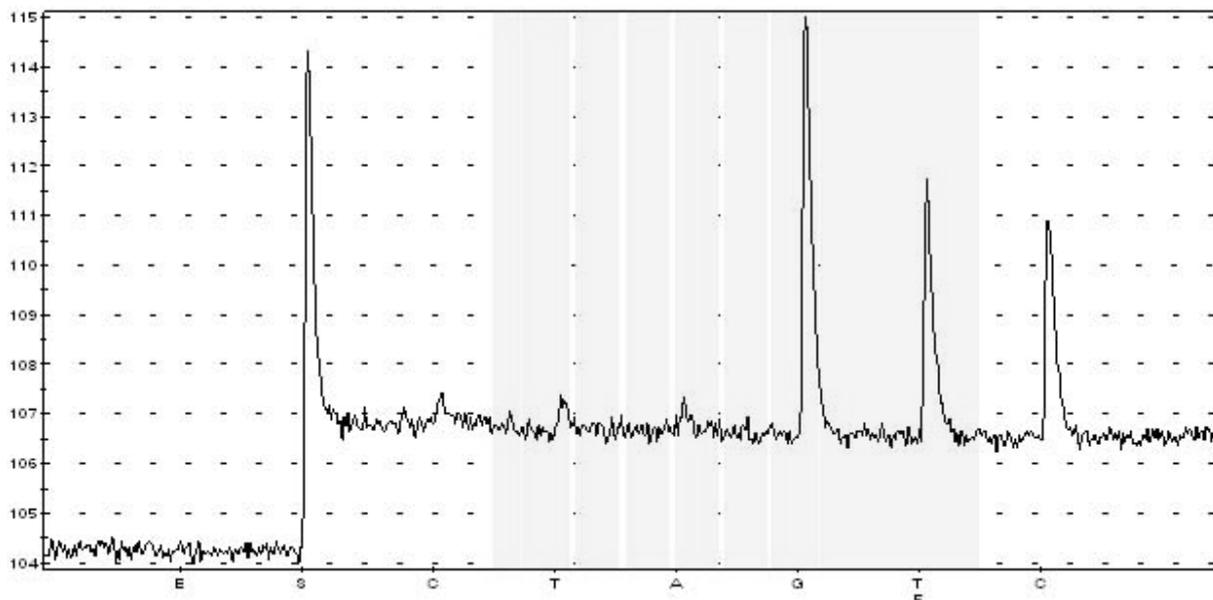


Abbildung 100 Ergebnis der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Reaktion: Aufgereinigter Ansatz nach C2.7.2.1 von 80,0  $\mu\text{L}$  Primer-Extension-Produkt nach Tabelle 87 bis Tabelle 89 von *S. aureus* VA1709/07 nach 5 min Hybridisierung bei 65 °C mit den Sequenzier-Primern MLSB 2058 Methylation SP27 und Sequenzier-Primern MLSB 2058 Methylation SP1 (je 8,0  $\mu\text{L}$  einer Primer-Lösung mit einer Konzentration von 5 pmol/ $\mu\text{L}$  verdünnt mit 32,0  $\mu\text{L}$  Annealing Buffer); Dispensationsfolge nach Assay-Bezeichnung 2 (Tabelle 86); Ermittelte Sequenz: GGTC.

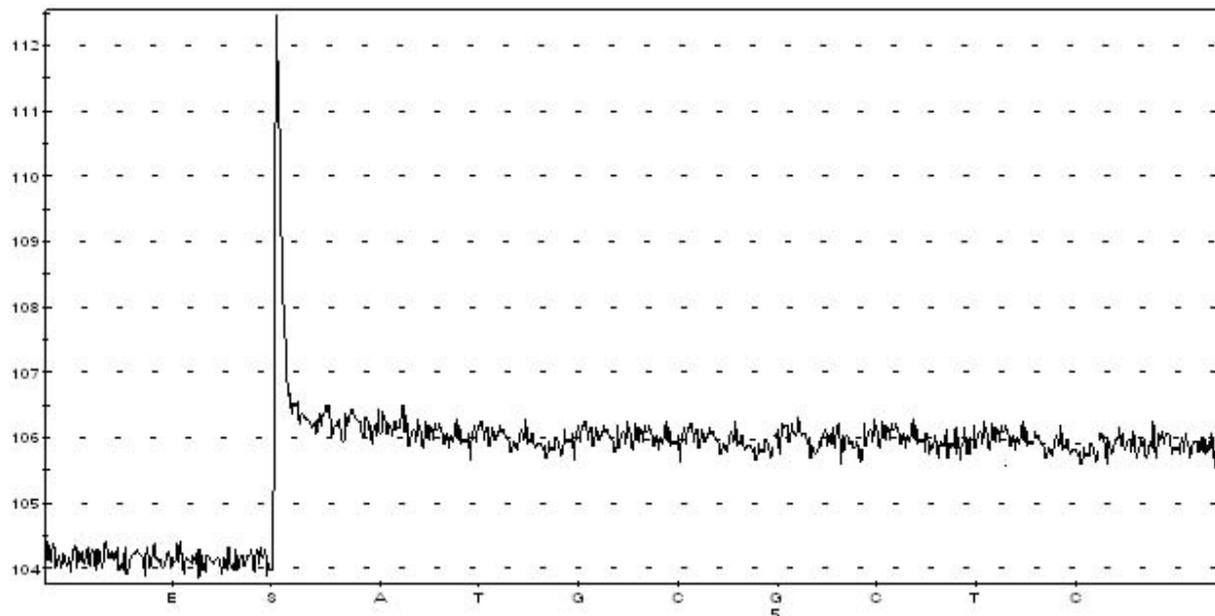


Abbildung 101 Ergebnis der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Reaktion: Aufgereinigter Ansatz nach C2.7.2.1 von 80,0  $\mu$ L Primer-Extension-Produkt nach Tabelle 87 bis Tabelle 89 von *S. aureus* VA1546/07 nach 5 min Hybridisierung bei 65 °C mit dem Sequenzier-Primer MLSB 2058 Methylation SP2 (8,0  $\mu$ L einer Primer-Lösung mit einer Konzentration von 5 pmol/ $\mu$ L verdünnt mit 40,0  $\mu$ L Annealing Buffer); Dispensationsfolge nach Assay-Bezeichnung 3 (Tabelle 86); Ermittelte Sequenz: keine.

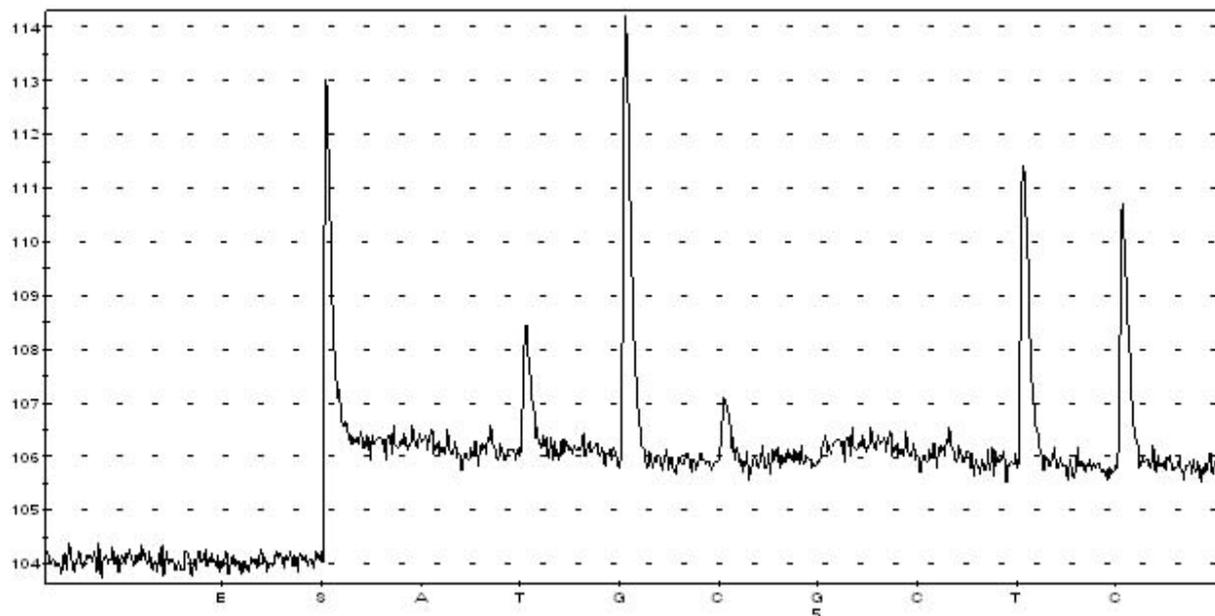


Abbildung 102 Ergebnis der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Reaktion: Aufgereinigter Ansatz nach C2.7.2.1 von 80,0  $\mu$ L Primer-Extension-Produkt nach Tabelle 87 bis Tabelle 89 von *S. aureus* VA1546/07 nach 5 min Hybridisierung bei 65 °C mit dem Sequenzier-Primer MLSB 2058 Methylation SP27 (8,0  $\mu$ L einer Primer-Lösung mit einer Konzentration von 5 pmol/ $\mu$ L verdünnt mit 40,0  $\mu$ L Annealing Buffer); Dispensationsfolge nach Assay-Bezeichnung 3 (Tabelle 86); Ermittelte Sequenz: TGGCTC.

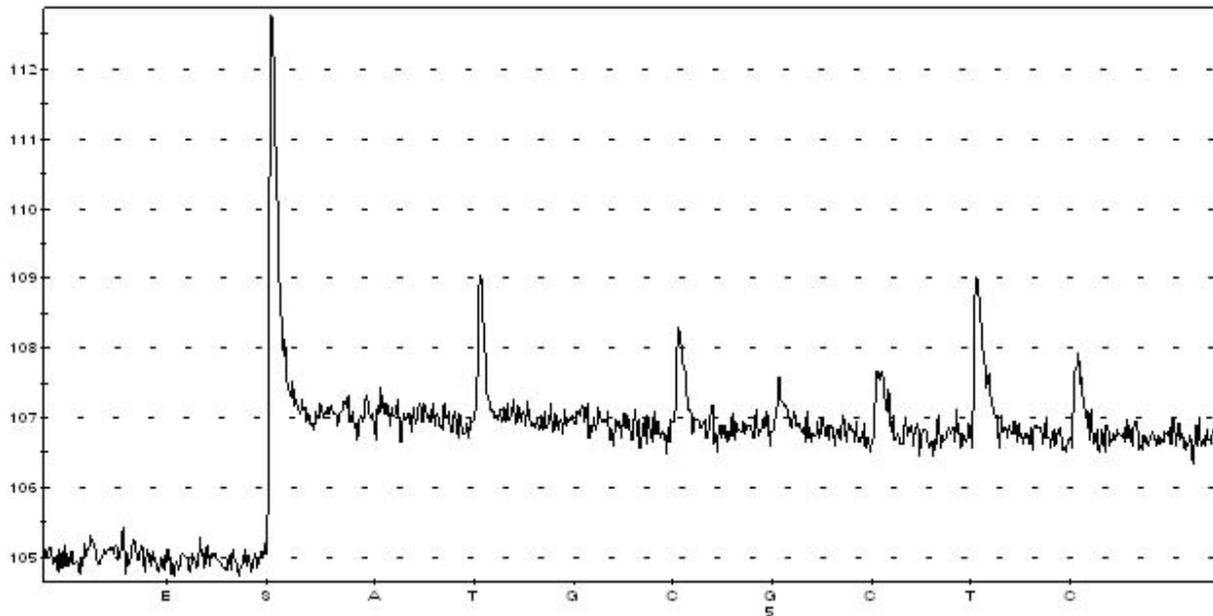


Abbildung 103 Ergebnis der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Reaktion: Aufgereinigter Ansatz nach C2.7.2.1 von 80,0  $\mu\text{L}$  Primer-Extension-Produkt nach Tabelle 87 bis Tabelle 89 von *S. aureus* VA1709/07 nach 5 min Hybridisierung bei 65 °C mit dem Sequenzier-Primer MLSB 2058 Methylation SP2 (8,0  $\mu\text{L}$  einer Primer-Lösung mit einer Konzentration von 5 pmol/ $\mu\text{L}$  verdünnt mit 40,0  $\mu\text{L}$  Annealing Buffer); Dispensationsfolge nach Assay-Bezeichnung 3 (Tabelle 86); Ermittelte Sequenz: TCT.

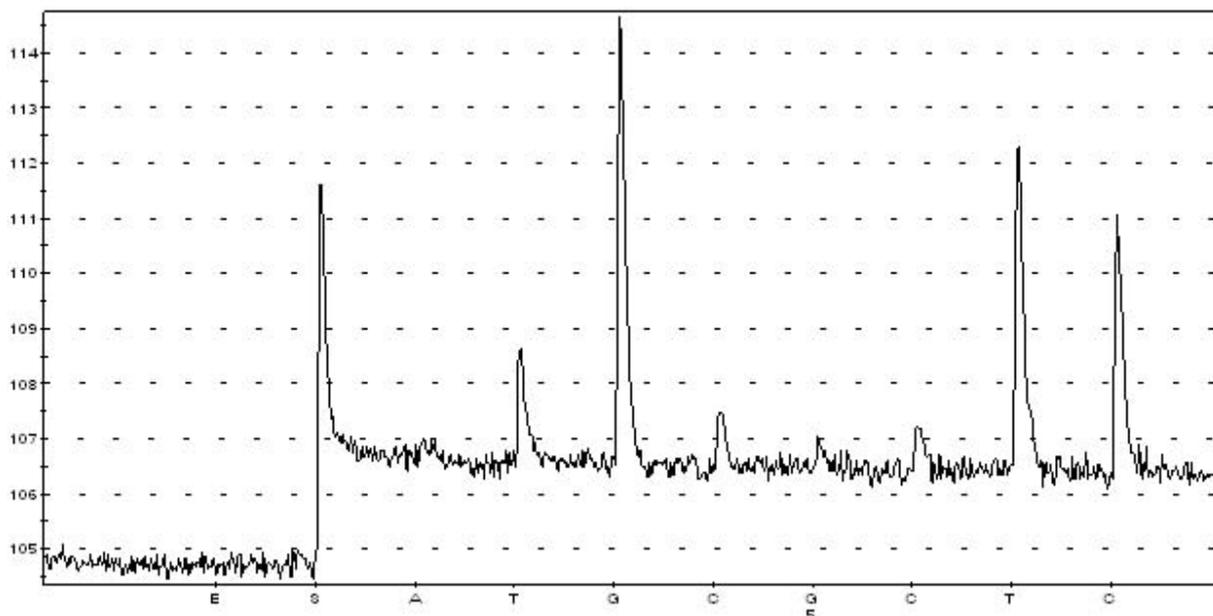


Abbildung 104 Ergebnis der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Reaktion: Aufgereinigter Ansatz nach C2.7.2.1 von 80,0  $\mu\text{L}$  Primer-Extension-Produkt nach Tabelle 87 bis Tabelle 89 von *S. aureus* VA1709/07 nach 5 min Hybridisierung bei 65 °C mit dem Sequenzier-Primer MLSB 2058 Methylation SP27 (8,0  $\mu\text{L}$  einer Primer-Lösung mit einer Konzentration von 5 pmol/ $\mu\text{L}$  verdünnt mit 40,0  $\mu\text{L}$  Annealing Buffer); Dispensationsfolge nach Assay-Bezeichnung 3 (Tabelle 86); Ermittelte Sequenz: TGGCTC

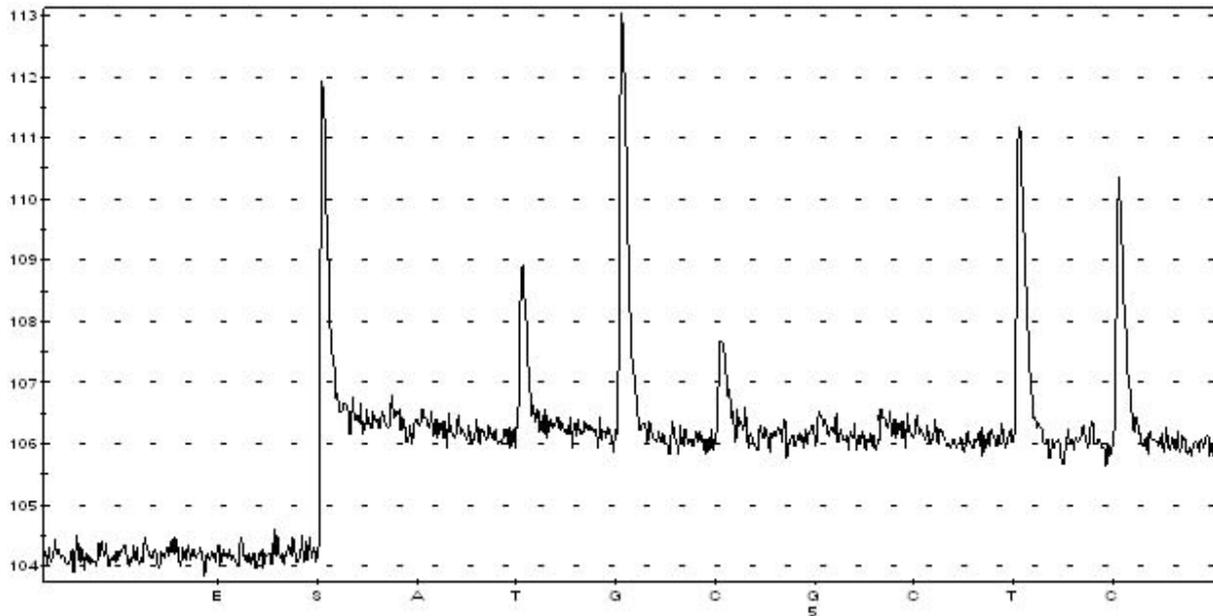


Abbildung 105 Ergebnis der Pyrosequencing™-Reaktion: Aufgereinigter Ansatz nach C2.7.2.1 von 80,0  $\mu\text{L}$  Primer-Extension-Produkt nach Tabelle 87 bis Tabelle 89 von *S. aureus* VA1546/07 nach 5 min Hybridisierung bei 65 °C mit den Sequenzier-Primern MLSB 2058 Methylation SP27 und Sequenzier-Primern MLSB 2058 Methylation SP2 (je 8,0  $\mu\text{L}$  einer Primer-Lösung mit einer Konzentration von 5 pmol/ $\mu\text{L}$  verdünnt mit 32,0  $\mu\text{L}$  Annealing Buffer); Dispensationsfolge nach Assay-Bezeichnung 3 (Tabelle 86); Ermittelte Sequenz: TGGCTC.

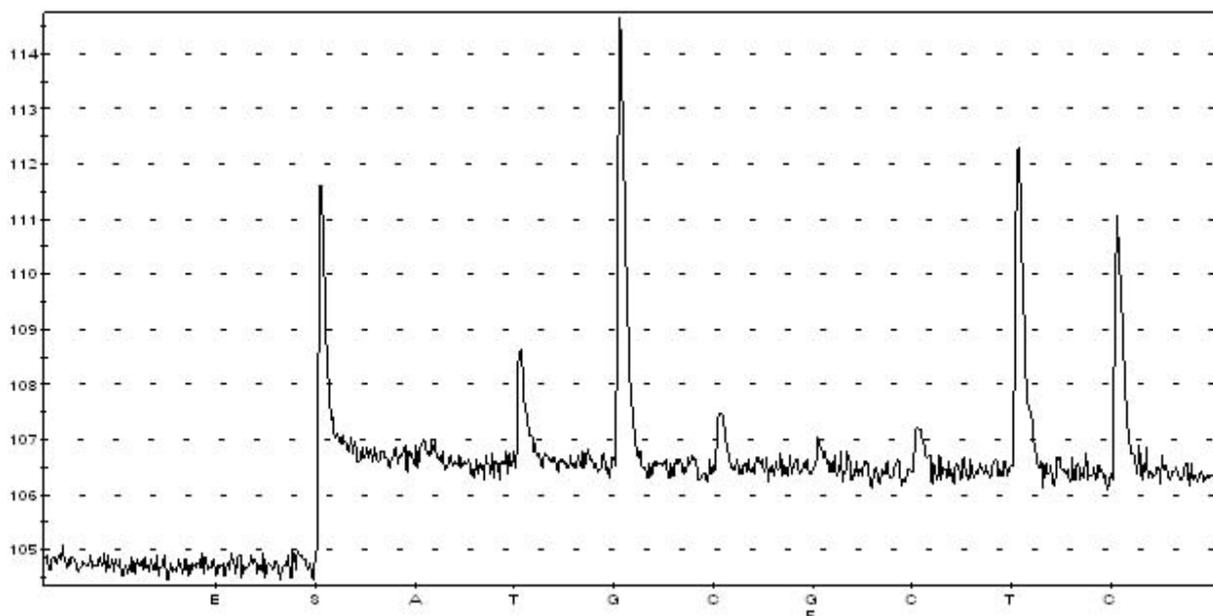
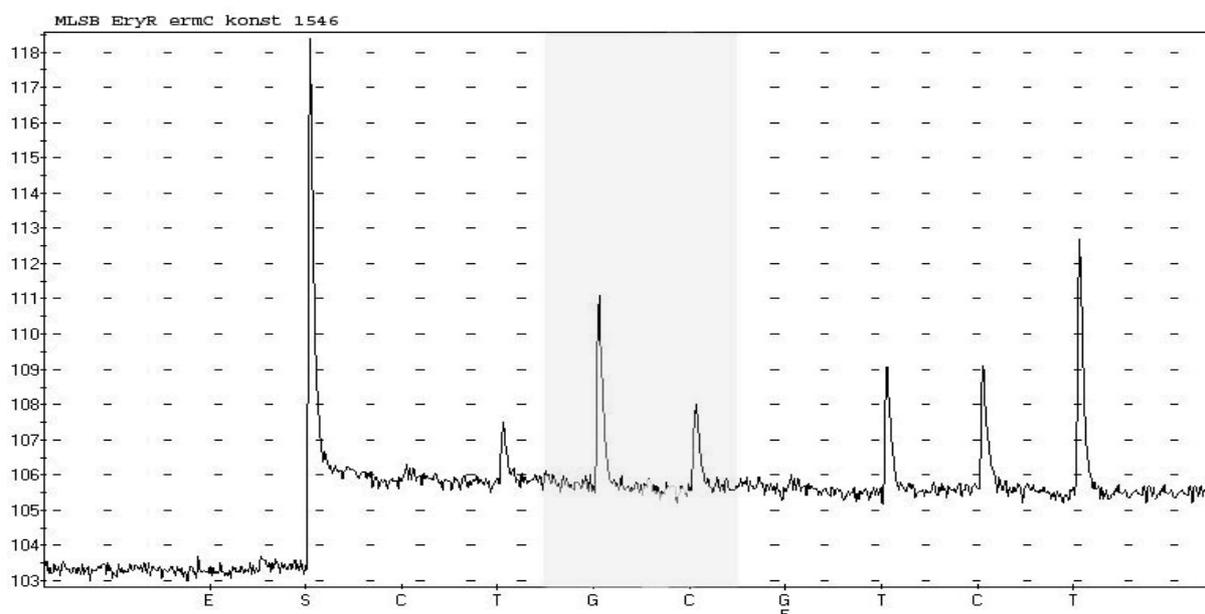


Abbildung 106 Ergebnis der Pyrosequencing™-Reaktion: Aufgereinigter Ansatz nach C2.7.2.1 von 80,0  $\mu\text{L}$  Primer-Extension-Produkt nach Tabelle 87 bis Tabelle 89 von *S. aureus* VA1709/07 nach 5 min Hybridisierung bei 65 °C mit den Sequenzier-Primern MLSB 2058 Methylation SP27 und Sequenzier-Primern MLSB 2058 Methylation SP2 (je 8,0  $\mu\text{L}$  einer Primer-Lösung mit einer Konzentration von 5 pmol/ $\mu\text{L}$  verdünnt mit 32,0  $\mu\text{L}$  Annealing Buffer); Dispensationsfolge nach Assay-Bezeichnung 3 (Tabelle 86); Ermittelte Sequenz: TGGCTC.

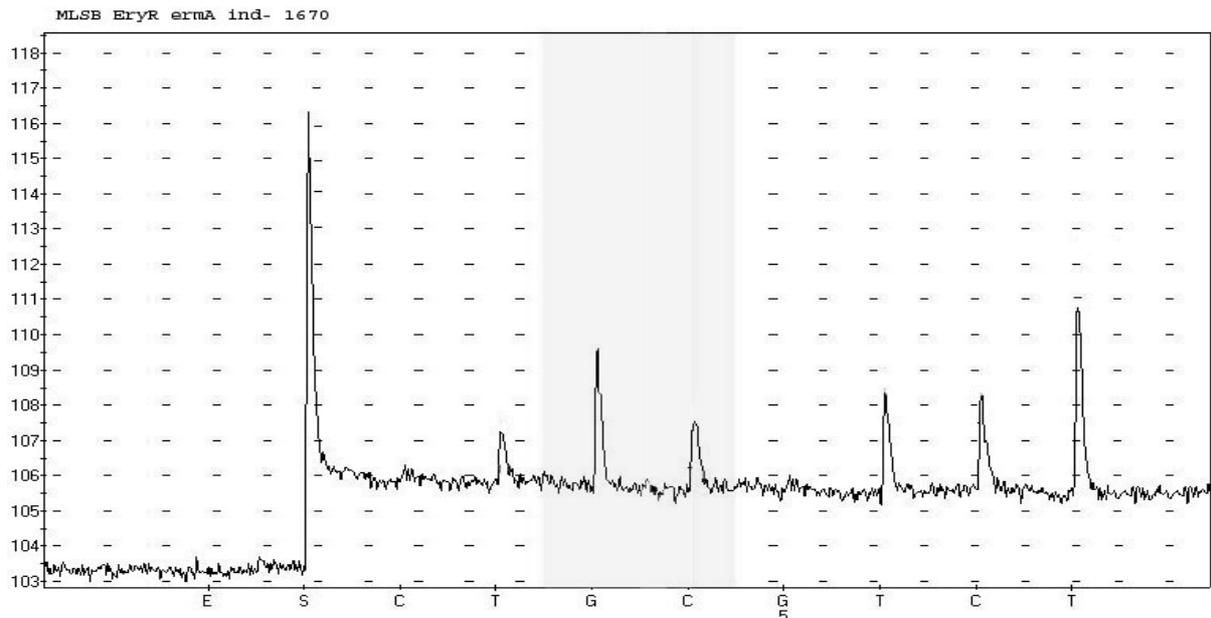
Die durchgeführten Messungen mit den Sequenzier-Primern MLSB 2058 Methylation SP1 und MLSB 2058 Methylation SP2 zeigen, dass eine Unterscheidung zwischen rRNA mit dimethyliertem Adenin an Position 2058 unter Verwendung von allen vier 2'-

Desoxynukleotide (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) nicht möglich ist, da die gezeigten Pyrogrammen unspezifische Peaks aufweisen.

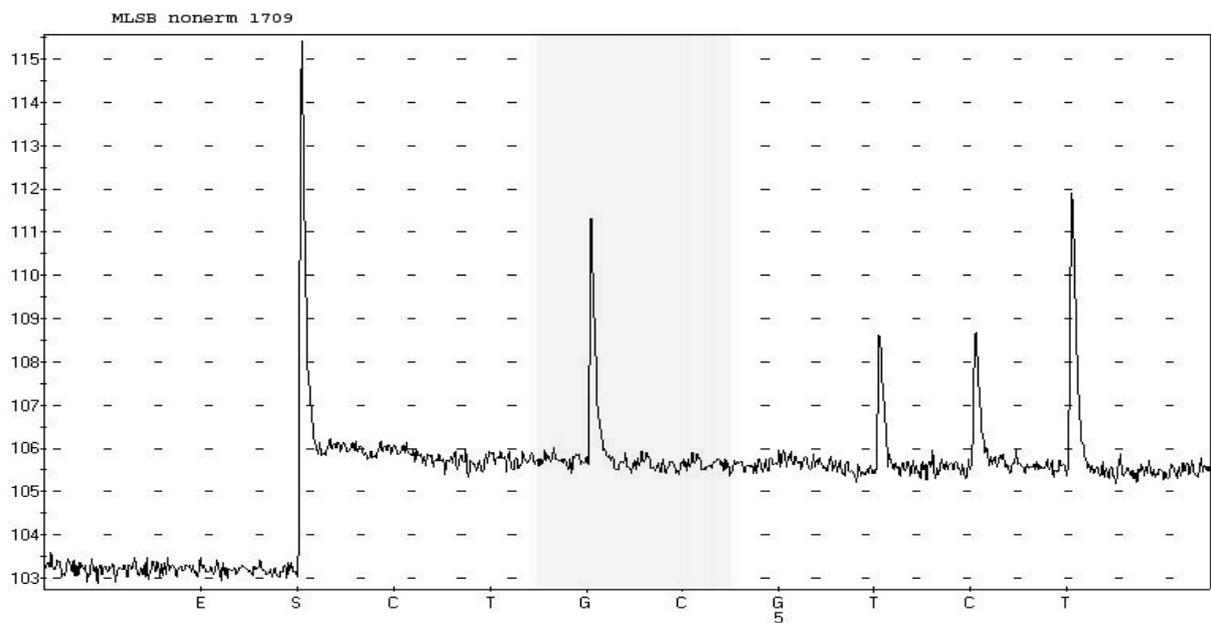
Deshalb wurde ein anderer Ansatz durch Hybridisierung mit dem Sequenzier-Primer MLSB 2058 Methylation SP27 gewählt, der einen Nachweis des während der Primer-Extension-Reaktion gebildeten 24 bp langen cDNA-Fragment erlaubt. Dabei erfolgte die Primer-Extension-Reaktion wie in Tabelle 87 bis Tabelle 89 beschrieben, jedoch unter Verwendung der 2'-Desoxynukleotide (dCTP, dGTP und dTTP) sowie des 2',3'-Didesoxynukleotids ddATP, so dass bei Vorhandensein eines mono- bzw. nichtmethyliertem Adenin an Position 2058 ein 42 bp langen cDNA-Fragment entsteht. Es wurde auf den Einsatz des Sequenzier-Primers Sequenzier-Primer MLSB 2058 Methylation SP3 verzichtet, da gezeigt werden konnte, dass bei dessen Hybridisierung mit dem 42 bp langen cDNA-Fragment keine spezifischen Peaks in dem Pyrogram zu erkennen sind (Abbildung 90). Somit erfolgt nur ein Nachweis des 24 bp langen cDNA-Fragment. Dies ermöglicht einen Nachweis der Dimethylierung des Adenins an Position 2058, jedoch nicht in Relation zum unmethylierten Anteil. Die Abbildungen 107 bis 110 zeigen die Ergebnisse der Messungen für die Stämme VA1546/07, VA1670/07, VA1709/07 sowie VA2361/07. Diese wurden jeweils dreimal durchgeführt.



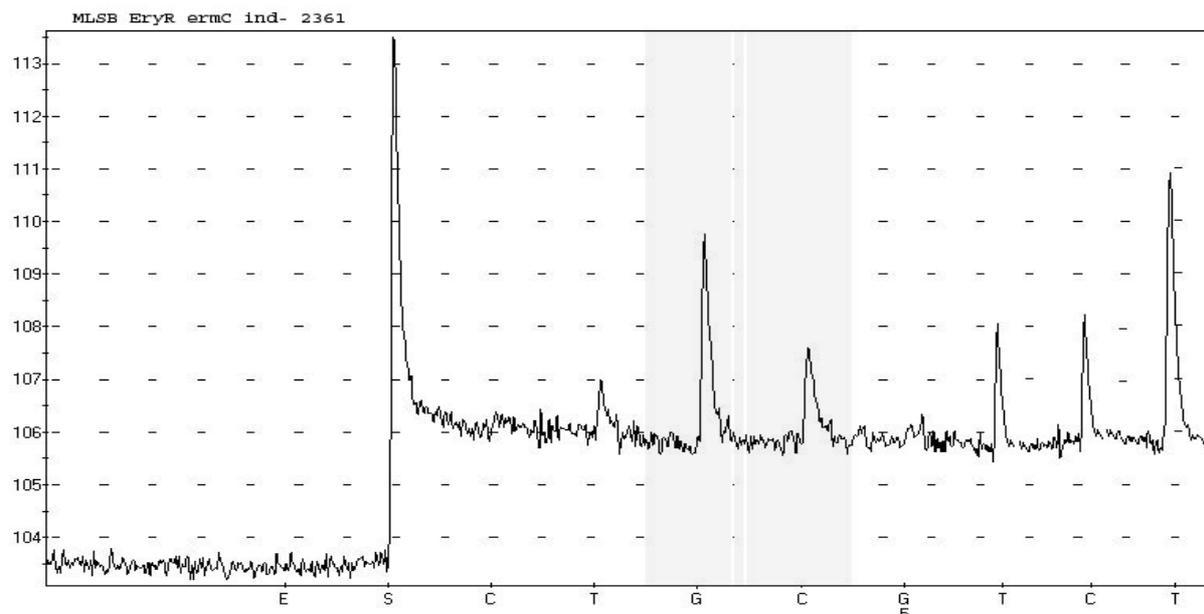
**Abbildung 107** Ergebnis der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Reaktion: Aufgereinigter Ansatz nach C2.7.2.1 von 80,0 µL Primer-Extension-Produkt nach Tabelle 87 bis Tabelle 89 von *S. aureus* VA1546/07 nach 5 min Hybridisierung bei 65 °C mit dem Sequenzier-Primern MLSB 2058 Methylation SP27 (8,0 µL einer Primer-Lösung mit einer Konzentration von 5 pmol/µL verdünnt mit 40,0 µL Annealing Buffer); Dispensationsfolge nach Assay-Bezeichnung 1 (Tabelle 86); Ermittelte Sequenz: TGGCCTCT.



**Abbildung 108** Ergebnis der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Reaktion: Aufgereinigter Ansatz nach C2.7.2.1 von 80,0  $\mu\text{L}$  Primer-Extension-Produkt nach Tabelle 87 bis Tabelle 89 von *S. aureus* VA1670/07 nach 5 min Hybridisierung bei 65 °C mit dem Sequenzier-Primern MLSB 2058 Methylation SP27 (8,0  $\mu\text{L}$  einer Primer-Lösung mit einer Konzentration von 5 pmol/ $\mu\text{L}$  verdünnt mit 40,0  $\mu\text{L}$  Annealing Buffer); Dispensationsfolge nach Assay-Bezeichnung 1 (Tabelle 86). Ermittelte Sequenz: TGGCCTCT.



**Abbildung 109** Ergebnis der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Reaktion: Aufgereinigter Ansatz nach C2.7.2.1 von 80,0  $\mu\text{L}$  Primer-Extension-Produkt nach Tabelle 87 bis Tabelle 89 von *S. aureus* VA1709/07 nach 5 min Hybridisierung bei 65 °C mit dem Sequenzier-Primern MLSB 2058 Methylation SP27 (8,0  $\mu\text{L}$  einer Primer-Lösung mit einer Konzentration von 5 pmol/ $\mu\text{L}$  verdünnt mit 40,0  $\mu\text{L}$  Annealing Buffer); Dispensationsfolge nach Assay-Bezeichnung 1 (Tabelle 86). Ermittelte Sequenz: GGTCTT.



**Abbildung 110** Ergebnis der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Reaktion: Aufgereinigter Ansatz nach C2.7.2.1 von 80,0  $\mu\text{L}$  Primer-Extension-Produkt nach Tabelle 87 bis Tabelle 89 von *S. aureus* VA2361/07 nach 5 min Hybridisierung bei 65 °C mit dem Sequenzier-Primern MLSB 2058 Methylation SP27 (8,0  $\mu\text{L}$  einer Primer-Lösung mit einer Konzentration von 5 pmol/ $\mu\text{L}$  verdünnt mit 40,0  $\mu\text{L}$  Annealing Buffer); Dispensationsfolge nach Assay-Bezeichnung 1 (Tabelle 86). Ermittelte Sequenz: TGGCCTCTT

Das Nukleotid T, welches zuerst zugesetzt wird, kann durch die Anlagerung des Sequenzierprimers MLSB 2058 Methylation SP27 bedingt nur in das 24 bp lange cDNA-Fragment eingebaut werden. Das im darauf folgenden Schritt folgende Nukleotid G wird nur in den freien unverbrauchten Primer MLSB 2058 Methylation RP BIO der Primer-Extension-Reaktion eingebaut. Während des dritten Dispensationsschritts erfolgt der Einbau wieder ausschließlich in das 24 bp cDNA-Fragment. Die im Anschluss folgende Nukleotide TCT C ergänzen den freien unverbrauchten Primer.

Das Vorhandensein eines Peaks, der durch den Einbau des Nukleotids T und C (erster und dritter Dispensationsschritt) ausgelöst wurde, zeigt, dass bei diesen Stämmen eine durch *erm*-Gene vermittelten Erythromycin Resistenz vorliegt, die durch eine Dimethylierung an dieser Position verursacht wird. Bei Stämmen die keine Erythromycin oder keine durch *erm*-Gene vermittelte Resistent besitzen wird kein Peak ausgelöst

Die gemessene Peak-Höhen, welche durch die Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Software errechnet wurden sind in der Tabelle 90 gezeigt.

**Tabelle 90** Ergebnisse der Messungen

ID	T	G	C	T	C	T
	24bp	RP	24bp	RP	RP	RP
VA1546/07 (1)	1,71	5,34	2,21	3,48	3,63	7,17
VA1546/07 (2)	1,22	3,35	1,45	2,02	1,81	4,01
VA1546/07 (3)	1,48	3,69	1,85	2,22	1,99	4,41
VA1670/07 (1)	1,15	3,75	1,27	2,46	2,47	5,03
VA1670/07 (2)	1,50	5,45	1,76	3,30	2,59	6,72
VA1670/07 (3)	1,24	4,91	1,42	2,97	2,33	6,05
VA1709/07 (1)	0,41	7,14	0,18	3,61	3,14	7,84
VA1709/07 (2)	0,57	8,01	0,49	4,01	3,67	9,36
VA1709/07 (3)	0,62	8,98	0,39	4,89	4,31	10,76
VA2361/07 (1)	1,20	3,95	1,70	2,59	2,60	5,29
VA2361/07 (2)	1,24	4,85	2,73	2,91	2,69	6,08
VA2361/07 (3)	1,49	5,58	2,49	3,35	3,09	6,99

## 6 Untersuchungen zu Alternativen eines Pyrosequencing™-basierten Detektions-Verfahrens für durch *erm*-codierte rRNA-Methyltransferasen katalysierte Dimethylierung von rRNA in klinischen Isolaten von *S. aureus*

### 6.1 Nachweis durch Auftrennung in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel

Eine mögliche Alternative für den Nachweis und Quantifizierung dimethylierter rRNA und somit dem Nachweis der durch *erm*-codierte rRNA-Methyltransferasen bedingten Erythromycin-Resistenz in *S. aureus* ist der Nachweis der während der Primer-Extension-Reaktion gebildeten cDNA-Fragmente nach Auftrennung in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel. Diese Methode war zuvor schon von Sigmund et. al (125) und von Vester und Douthwaite (126) beschrieben worden, jedoch unter der Verwendung von radioaktiv markierter Primer und autoradiographischer Detektion der während der Primer-Extension gebildeten cDNA-Fragmente. Eine mögliche Alternative zur Verwendung radioaktiv markierter Primer ist die Verwendung von am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzmarker versehenen Primern und dem Nachweis der während der Primer-Extension-Reaktion gebildeten cDNA-Fragmente durch Fluoreszenzdetektion.

Dazu wurde aus den zuvor phänotypisch und genotypisch auf ihre Resistenzeigenschaften charakterisierten klinischen Isolaten *S. aureus* VA1546/07 und VA1709/07 wie unter C2.2 beschrieben Gesamt-RNA gewonnen. Unter Verwendung des Primers MLSB 2058 Methylation RP 18 bp 6-FAM, welcher am 5'-Ende mit 6-FAM-phosphoramidit (6-FAM) markiert ist, wurde die Primer-Extension-Reaktion unter Verwendung von der 2'-Desoxynukleotide (dCTP, dGTP und dTTP) und des 2',3'-Didesoxynukleotids ddATP durchgeführt und die Gesamt-RNA in die gewünschten cDNA-Fragmente umgeschrieben. Hierzu wurden zunächst die folgenden Ansätze gemischt (Tabelle 91 und Tabelle 92).

**Tabelle 91** Ansatz 1

Bestandteil	µL	Menge
MLSB 2058 Methylation RP 18 bp 6-FAM <sup>a</sup>	1,0	
RNA	-	3 µg <sup>b</sup>
dNTP-Mix (je 10mM dCTP,cGTP,dTTP,ddATP)	1,0	
H <sub>2</sub> O	Ad 12,0	

<sup>a</sup> Konzentration der Primer-Lösung: 10 pmol/µL

<sup>b</sup> Die Menge wurde nach C2.2.1bestimmt

**Tabelle 92** Ansatz 2

Bestandteil	µL
5X First-Strand Buffer	4,0
0.1 M DTT	2,0
RNaseOUT™ (40 U/µL)	1,0

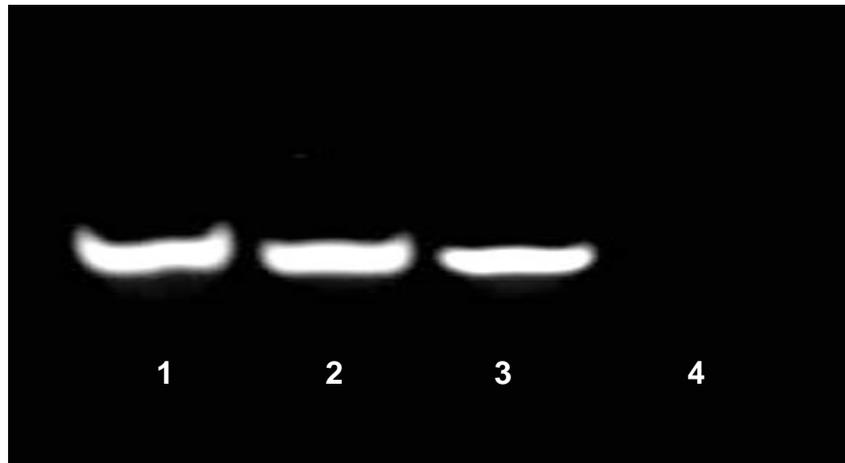
Der Ansatz 1 wurde für 5 Min. bei 65 °C inkubiert, abzentrifugiert und auf Eis gestellt. Anschließend wurden Ansatz 1 und 2 gemischt, für 2 Min. bei 42 °C inkubiert, abzentrifugiert und auf Eis gestellt. Zuletzt wurden 1,0 µL SuperScript™ II RT (200 U/µL) hinzu gegeben und durch Pipetieren gemischt. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation des Ansatzes nach folgendem Programm (Tabelle 93) in einem Thermocycler.

**Tabelle 93** Temperatur- und Zeit-Einstellung der Primer-Extension-Reaktion

Schritt	T	t
1. RT-Reaktion	45 °C	60 min
2. Inaktivierung der Reversen Transkriptase	70 °C	15 min

Anschließend wurden die Ansätze mit 1T Ladepuffer gemischt und in wie unter C2.5.2 beschrieben in einem Polyacrylamid-Gel mit einer Acrylamid-Konzentration von 15 % bei einer Spannung von 40 V für 5 h aufgetrennt. Zusätzlich wurden als Kontrollen 1,0 µL einer Lösung des Primers MLSB 2058 Methylation RP 18 bp 6-FAM mit einer Konzentration von

10 pmol/ $\mu\text{L}$  verdünnt in 20,0  $\mu\text{L}$  TE-Puffer und 3  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA von *S. aureus* VA1546/07 verdünnt in 20,0  $\mu\text{L}$  TE-Puffer aufgetrennt. Die Detektion und Dokumentation der gebildeten Banden erfolgte unter einer Videoanlage nach Anregung durch UV-Licht. Die zeigt Abbildung 111 die Ergebnisse der Untersuchung.



**Abbildung 111 Ergebnis der Primer-Extension-Reaktion unter Verwendung des Primers MLSB 2058 Methylation RP 18 bp 6-FAM; Detektion unter UV-Licht der Ansätze in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel (15 %) nach Auftrennung bei 40 V für 5 h. 1:*S. aureus* VA1546/07, 2:*S. aureus* VA1709/07, 3:1,0  $\mu\text{L}$  MLSB 2058 Methylation RP 18 bp 6-FAM verdünnt in 20,0  $\mu\text{L}$  TE-Puffer, 4:3  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA von *S. aureus* 1546/07 verdünnt in 20,0  $\mu\text{L}$  TE-Puffer.**

Nach Auftrennung der Ansätze der Primer-Extension-Reaktion konnte nur eine Bande nachgewiesen werden, die dem Primer MLSB 2058 Methylation RP 18 bp 6-FAM zugeordnet werden konnte, jedoch keine weiteren Banden.

Somit wurde weiterhin die Menge an für die Primer-Extension-Reaktion verwendeter Gesamt-RNA auf 12  $\mu\text{g}$  erhöht. Aus den phänotypisch und genotypisch auf ihre Resistenz-Eigenschaften charakterisierten klinischen Isolaten *S. aureus* VA1546/07 und VA1709/07, wurde wie unter C2.2 beschrieben, Gesamt-RNA gewonnen. Die Primer-Extension-Reaktion wurde unter Verwendung des Primers MLSB 2058 Methylation RP 18 bp 6-FAM mit Hilfe der 2'-Desoxynukleotide (dCTP, dGTP und dTTP) und des 2',3'-Didesoxynukleotids ddATP durchgeführt und somit die Gesamt-RNA in die gewünschten cDNA-Fragmente umgeschrieben. Folgenden Ansätze wurden dazu gemischt (Tabelle 94 und Tabelle 95).

**Tabelle 94** Ansatz 1

Bestandteil	$\mu\text{L}$	Menge
MLSB 2058 Methylation RP 18 bp 6-FAM <sup>a</sup>	4,0	
RNA	-	12 $\mu\text{g}$ <sup>b</sup>
dNTP-Mix (je 10mM dCTP,cGTP,dTTP,ddATP)	4,0	
H <sub>2</sub> O	Ad 48,0	

<sup>a</sup> Konzentration der Primer-Lösung: 10 pmol/ $\mu\text{L}$

<sup>b</sup> Die Menge wurde nach C2.2.1bestimmt

**Tabelle 95** Ansatz 2

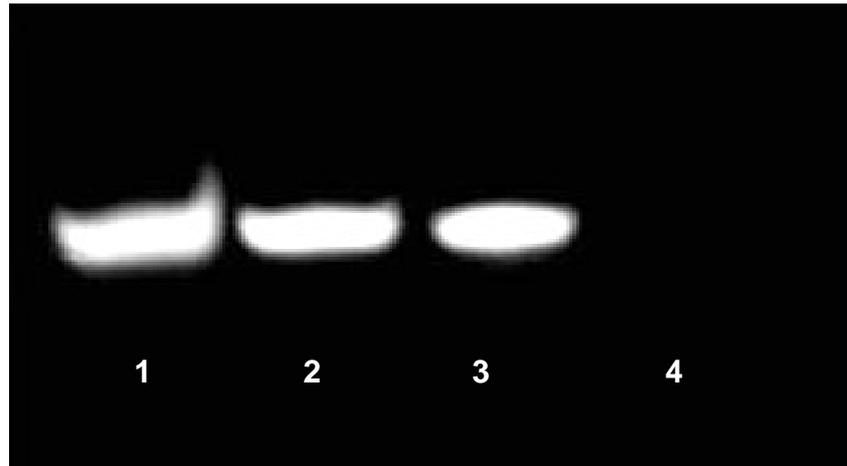
Bestandteil	$\mu\text{L}$
5X First-Strand Buffer	16,0
0.1 M DTT	8,0
RNaseOUT™ (40 U/ $\mu\text{L}$ )	4,0

Der Ansatz 1 wurde für 5 Min. bei 65 °C inkubiert, abzentrifugiert und auf Eis gestellt. Anschließend wurden Ansatz 1 und 2 gemischt, für 2 Min. bei 42 °C inkubiert, abzentrifugiert und auf Eis gestellt. Zuletzt wurden 4,0  $\mu\text{L}$  SuperScript™ II RT (200 U/ $\mu\text{L}$ ) hinzugegeben und durch Pipettieren gemischt. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation des Ansatzes nach folgendem Programm (Tabelle 96) in einem Thermocycler.

**Tabelle 96** Temperatur- und Zeit-Einstellung der Primer-Extension-Reaktion

Schritt	T	t
1. RT-Reaktion	45 °C	60 min
2. Inaktivierung der Reversen Transkriptase	70 °C	15 min

Anschließend wurden die Ansätze wie unter C2.6.2 aufgereinigt und in 20,0  $\mu\text{L}$  TE-Puffer aufgenommen und im Anschluss mit 1T Ladebuffer gemischt und in wie unter C2.5.2 beschrieben in einem Polyacrylamid-Gel mit einer Acrylamid-Konzentration von 15 % bei einer Spannung von 40 V für 5 h aufgetrennt. Zusätzlich wurden als Kontrollen 4,0  $\mu\text{L}$  einer Lösung des Primers MLSB 2058 Methylation RP 18 bp 6-FAM mit einer Konzentration von 10 pmol/ $\mu\text{L}$  verdünnt in 80,0  $\mu\text{L}$  TE-Puffer und 12  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA von *S. aureus* VA1546/07 verdünnt in 80,0  $\mu\text{L}$  TE-Puffer ebenfalls wie unter C2.6.2 aufgereinigt, in 20,0  $\mu\text{L}$  TE-Puffer aufgenommen und dieses Ansätze aufgetrennt. Die Detektion und Dokumentation der gebildeten Banden erfolgte unter einer Videoanlage nach Anregung durch UV-Licht. Die Abbildung 112 zeigt das Ergebnis der Untersuchung.



**Abbildung 112** Ergebnis der Primer-Extension-Reaktion unter Verwendung des Primers MLSB 2058 Methylation RP 18 bp 6-FAM; Detektion unter UV-Licht der Ansätze nach Aufreinigung (C2.6.2) und Aufnahme in 20,0  $\mu$ L TE-Puffer in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel (15 %) nach Auftrennung bei 40 V für 5 h.

1:*S. aureus* VA1546/07, 2:*S. aureus* VA1709/07, 3:4,0  $\mu$ L MLSB 2058 Methylation RP 18 bp 6-FAM verdünnt in 80,0  $\mu$ L TE-Puffer, 4:12  $\mu$ g Gesamt-RNA von *S. aureus* VA1546/07 verdünnt in 80,0  $\mu$ L TE-Puffer.

Auch nach Erhöhung der Menge an Gesamt-RNA konnte nach Auftrennung der Ansätze der Primer-Extension-Reaktion nur eine Bande nachgewiesen werden, welche dem Primer MLSB 2058 Methylation RP 18 bp 6-FAM zugeordnet werden konnte. Es wurden keine weiteren Banden nachgewiesen.

## 6.2 Nachweis durch Auftrennung mit Hilfe der Kapillarelektrophorese

Eine im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Möglichkeit der Detektion der während der Primer-Extension-Reaktion gebildeten cDNA-Fragmente beruht auf der Auftrennung der gebildeten cDNA-Fragmente durch Kapillarelektrophorese. Dazu erfolgt wie unter D6.1 die Primer-Extension-Reaktion unter Verwendung eines am 5'-Ende mit 6-FAM markierten Primers. Die Auftrennung der gebildeten cDNA erfolgt im POP-6<sup>TM</sup>-Polymer durch Kapillarelektrophorese im ABI Prism310 DNA-Sequenzierer mit Hilfe der GeneScan Software.

Zunächst wurde, um zu überprüfen, ob eine Auftrennung mittels Kapillarelektrophorese möglich ist, der während der Primer-Extension-Reaktion verwendete Primer MLSB 2058 Methylation RP 18 bp 6-FAM mit der Länge 18 bp und ein ebenfalls am 5'-Ende mit 6-FAM markierter Primer parE-829R-6-FAM der Länge 22 bp (Dissertation Tom Grüger), im ABI Prism310 DNA-Sequenzierer aufgetrennt.

Dazu wurden je 0,5  $\mu\text{L}$  einer Lösung der jeweiligen Primer mit einer Konzentration von 10 pmol/ $\mu\text{L}$  sowie eine Mischung von jeweils 0,5  $\mu\text{L}$  und sowie 1,0  $\mu\text{L}$  der beiden Lösungen in 20,0  $\mu\text{L}$  HiDi Formamide verdünnt und durch Kapillar-Elektrophorese aufgetrennt. Die Auswertung erfolgt durch die GeneScan Software. Die Abbildung 113 bis Abbildung 116 zeigen die Ergebnisse der Untersuchungen.

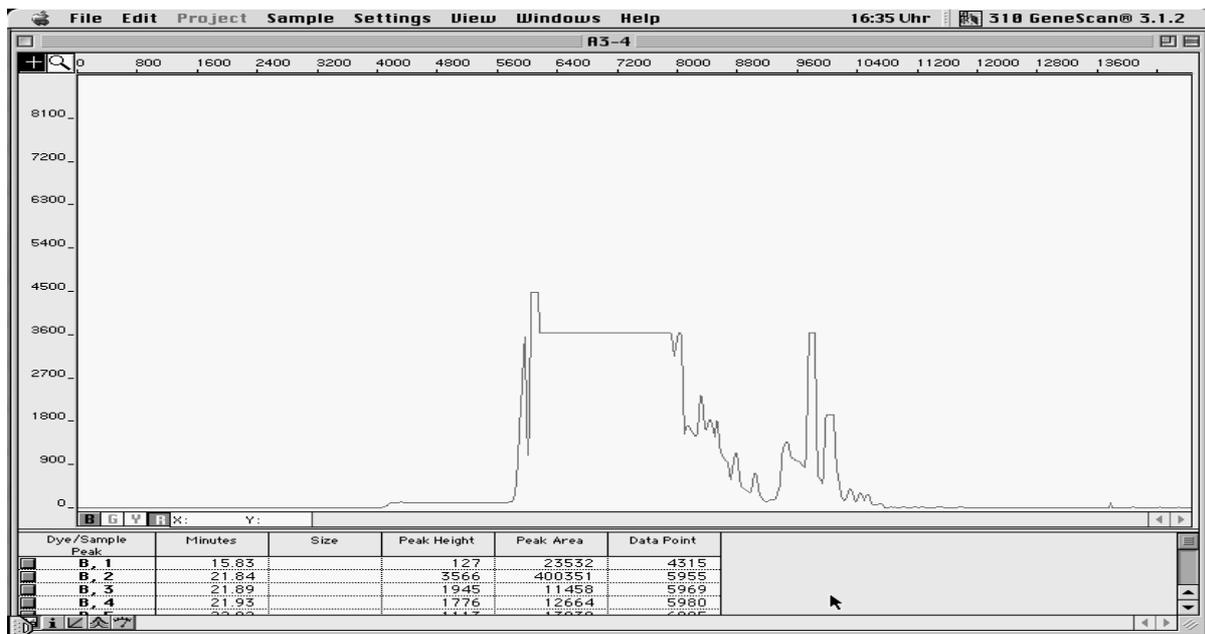


Abbildung 113 Ergebnis der Auftrennung durch Kapillar-Elektrophorese nach Auswertung die GeneScan Software; 0,5  $\mu\text{L}$  einer Lösung mit der Konzentration 10 pmol/ $\mu\text{L}$  des Primers MLSB 2058 Methylation RP 18 bp 6-FAM nach Aufnahme in 20,0  $\mu\text{L}$  HiDi Formamide

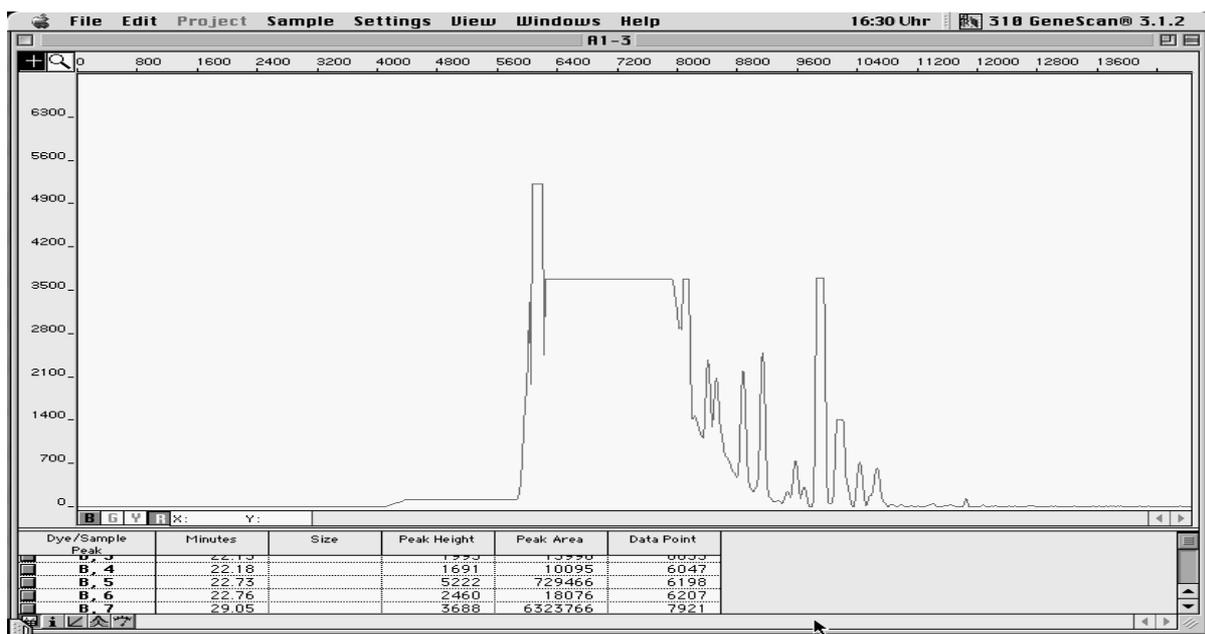


Abbildung 114 Ergebnis der Auftrennung durch Kapillar-Elektrophorese nach Auswertung die GeneScan Software; 0,5  $\mu\text{L}$  einer Lösung mit der Konzentration 10 pmol/ $\mu\text{L}$  des Primers parE-829R-6-FAM nach Aufnahme in 20,0  $\mu\text{L}$  HiDi Formamide

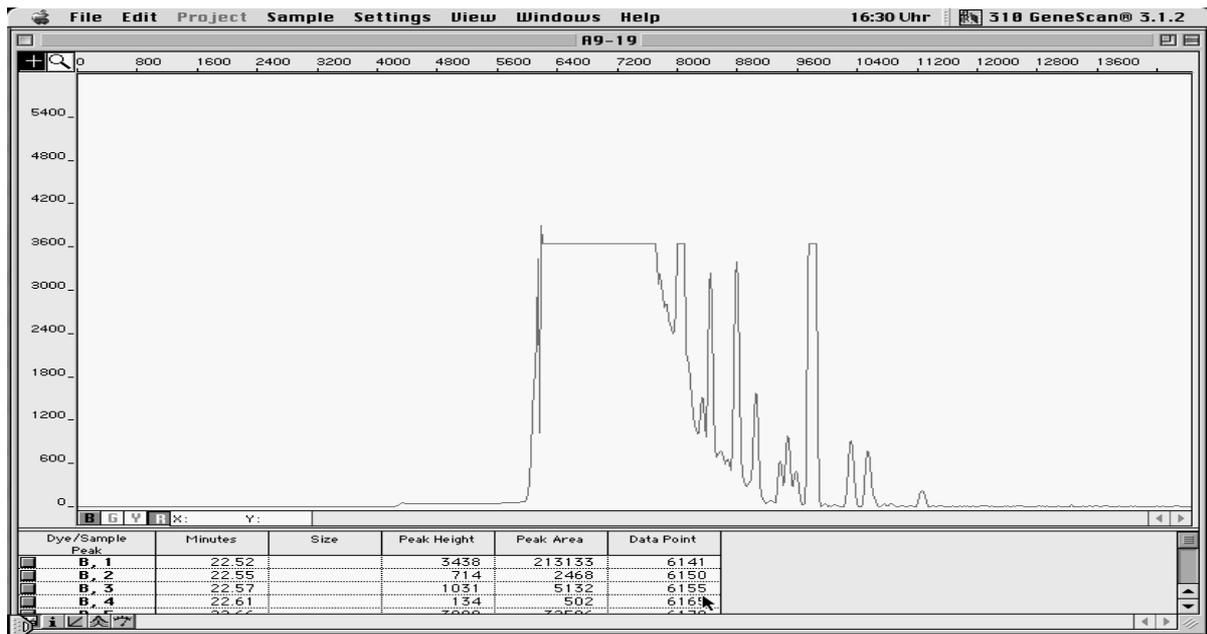


Abbildung 115 Ergebnis der Auftrennung durch Kapillar-Elektrophorese nach Auswertung die GeneScan Software; je 0,5  $\mu\text{L}$  einer Lösung mit der Konzentration 10 pmol/ $\mu\text{L}$  der Primer parE-829R-6-FAM und MLSB 2058 Methylation RP 18 bp 6-FAM nach Aufnahme in 20,0  $\mu\text{L}$  HiDi Formamide

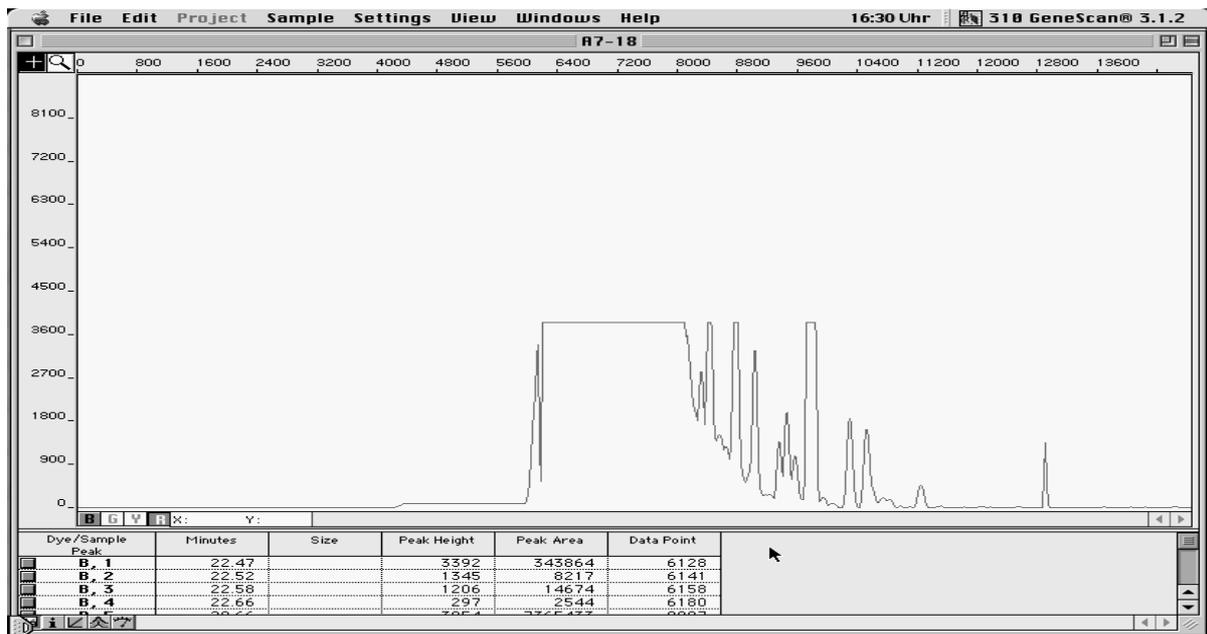


Abbildung 116 Ergebnis der Auftrennung durch Kapillar-Elektrophorese nach Auswertung die GeneScan Software; je 1,0  $\mu\text{L}$  einer Lösung mit der Konzentration 10 pmol/ $\mu\text{L}$  der Primer parE-829R-6-FAM und MLSB 2058 Methylation RP 18 bp 6-FAM gemischt nach Aufnahme in 20,0  $\mu\text{L}$  HiDi Formamide

Die Auswertung der Ergebnisse zeigt, dass eine Detektion durch Auftrennung der 18 bp und 22 bp langen Primer parE-829R-6-FAM und MLSB 2058 Methylation RP 18 bp 6-FAM mittels Kapillar-Elektrophorese nicht möglich ist. In den verwendeten Konzentrationen überlagern sich die eingesetzten Primer derart, dass eine Unterscheidung nicht möglich ist (Abbildung 117).

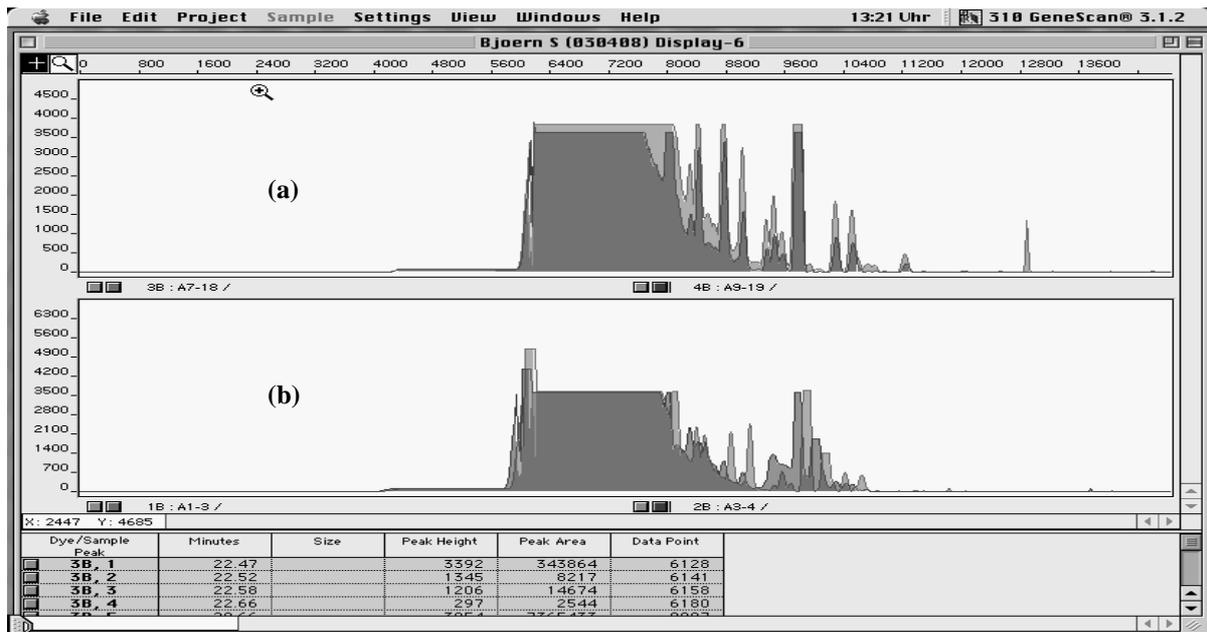


Abbildung 117 Überlagerung der Ergebnisse der Auftrennung durch Kapillar-Elektrophorese nach Auswertung die GeneScan Software;

(a) 1,0  $\mu\text{L}$  einer Lösung mit der Konzentration 10 pmol/ $\mu\text{L}$  der Primer parE-829R-6-FAM und MLSB 2058 Methylation RP 18 bp 6-FAM gemischt nach Aufnahme in 20,0  $\mu\text{L}$  HiDi Formamide (Abbildung 115 und Abbildung 116 )

(b) 0,5  $\mu\text{L}$  einer Lösung mit der Konzentration 10 pmol/ $\mu\text{L}$  des Primers parE-829R-6-FAM und MLSB 2058 Methylation RP 18 bp 6-FAM nach Aufnahme in 20,0  $\mu\text{L}$  HiDi Formamide (Abbildung 114 und Abbildung 115)

## 7 Empfindlichkeit von MRSA Isolate mit Linezolid-Resistenz

### 7.1 Isolierung von MRSA Isolaten mit Linezolid-Resistenz

Während dieser Arbeit wurden im UKE insgesamt sechs MRSA-Stämme von einem Patienten isoliert, von denen fünf neben ihrer Resistenz gegenüber Oxacillin auch eine Resistenz gegenüber Linezolid (MHK-Wert  $\geq 8\text{mg/L}$ ) zeigten, wobei in Deutschland ein derartiger Fall noch nicht beschrieben worden war. Die Tabelle 97 gibt einen Überblick über die ermittelten MHK-Werte sowie den Zeitpunkt der Isolierung der Stämme.

**Tabelle 97** MHK-Werte für *S. aureus* Isolate mit phänotypischer Linezolid-Resistenz

Datum der Isolation	Isolate (Interne ID)	DK-Nr.	MHK [mg/ L]			Resistenz-Determinate <sup>a</sup>
			LZD	ERY	CLI	
27.12.2004	<i>S. aureus</i> VA39140/04	BJ0291	1	$\geq 256$	$\geq 256$	<i>ermA, ermC</i>
18.04.2005	<i>S. aureus</i> VA10260/05	BJ0547	32	$\geq 256$	$\geq 256$	<i>ermA, ermC</i>
31.05.2005	<i>S. aureus</i> TY2300/05	BJ0541	32	0,25	0,25	<i>ermA</i>
06.06.2005	<i>S. aureus</i> VA14775/05	BJ0543	32	0,25	0,25	<i>ermA</i>
08.06.2005	<i>S. aureus</i> TY2403/05	BJ0544	32	0,25	0,25	<i>ermA</i>
25.07.2005	<i>S. aureus</i> VA19213/05	BJ0548	32	0,25	0,25	<i>ermA</i>

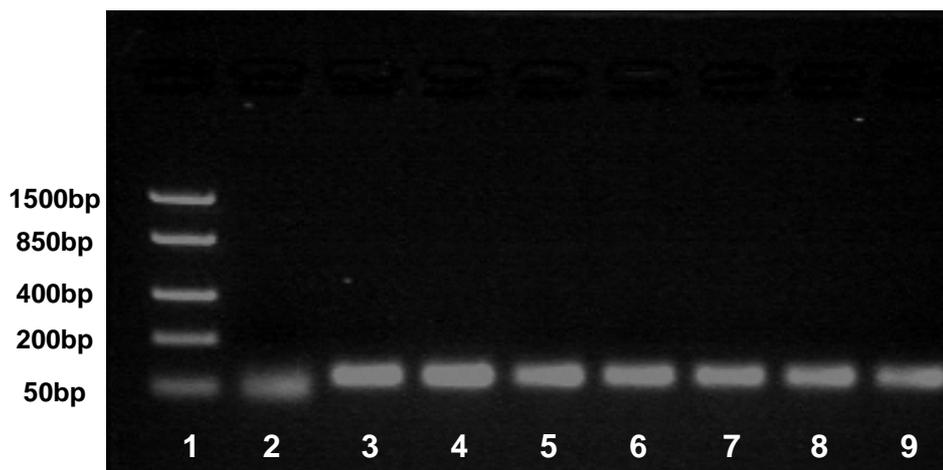
LZD = Linezolid, ERY = Erythromycin, CLI = Clindamycin, <sup>a</sup> Die Resistenz-Determinante wurde nach C2.3.1.4 bestimmt.

Zur genaueren Untersuchung der molekularen Ursache für die Linezolid-Resistenz bei diesen MRSA Isolaten wurde ein im Rahmen dieser Arbeit entwickelter Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Assay angewandt, welcher dazu dient, den für die Resistenz gegenüber Linezolid am häufigsten verantwortlichen SNP an Position 2576 zu detektieren. Dabei handelt es sich um eine G  $\rightarrow$  T Austausch, der zu einer Resistenz bzw. verminderten Empfindlichkeit gegenüber Linezolid führt.

Das Vorhandensein verschiedener Copy-Gene für das Gen der 23S rRNA bei *S. aureus* unterschiedlicher Anzahl ermöglichte es, den Assay dazu zu verwenden, die Anzahl der Gene zu ermitteln, welche den für die Resistenz verantwortlichen SNP tragen. Dazu erfolgte eine

Auswertung der gewonnenen Pyrogramme mit Hilfe der durch das Gerät gegebenen Allel-Quantifizierungs-Software.

Zunächst erfolgte wie unter C2.7.2.1 beschrieben die Amplifizierung eines 70bp-Fragmentes der zu untersuchenden Region des Gens für die 23S rRNA unter Verwendung eines spezifisch bindenden Primer-Paares. Dieses PCR-Produkt wurde im Anschluss in einem 2,0 %igen Agarosegel aufgetrennt und die erwarteten Banden unter UV-Licht mit Ethidiumbromid detektiert (Abbildung 118).



**Abbildung 118** Auftrennung der amplifizierten Abschnitte (70 bp) für die Detektion des G2576T SNP mittels Pyrosequencing™ in einem 2,0 %igen Agarosegel und Detektion unter UV-Licht mit Ethidiumbromid.

1:Größenstandard Fast-Ruler™ DNA-Ladder, Low-Range (Fa.Fermentas), 2:PCR-Negativ-Kontrolle, 3:*S. aureus* ATCC® 29213, 4:*S. aureus* VA39140/04, 5:*S. aureus* VA10260/05, 6:*S. aureus* TY2300/05, 7:*S. aureus* VA14775/05, 8:*S. aureus* TY2403/05, 9:*S. aureus* VA19213/05

Nach der Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel, erfolgte eine Aufreinigung dieser wie unter C2.7.2.1 beschrieben. Die Analyse der Fragmente im Pyrosequencer erfolgte nach dem Standard-Protokoll der Firma Biotage unter Verwendung von 20 µL PCR-Produkt nach den in C2.7.2.1 für *S. aureus* beschriebenen Pyrosequencing™-Assay. Dabei wurde für jedes Isolat die Bestimmung dreifach durchgeführt, wobei die PCR-Produkte jeweils separat amplifiziert wurden.

Die Abbildung 119 bis Abbildung 120 zeigen jeweils Pyrogramme beispielhaft für die Detektion und Allel-Quantifizierung des G2576T SNP für die untersuchten Linezolidempfindlichen und resistenten *S. aureus* Stämme. In den Pyrogrammen werden die relativen Lichteinheiten gegen die Dispensations-Reihenfolge aufgetragen. Durch die Punkte E and S werden der Zusatz des Enzym-Mixes und des Substrat-Mixes während des Pyrosequencing™-Laufes angezeigt. Der zu untersuchende G2576T SNP ist durch eine schattierte Region (gelb) gekennzeichnet.

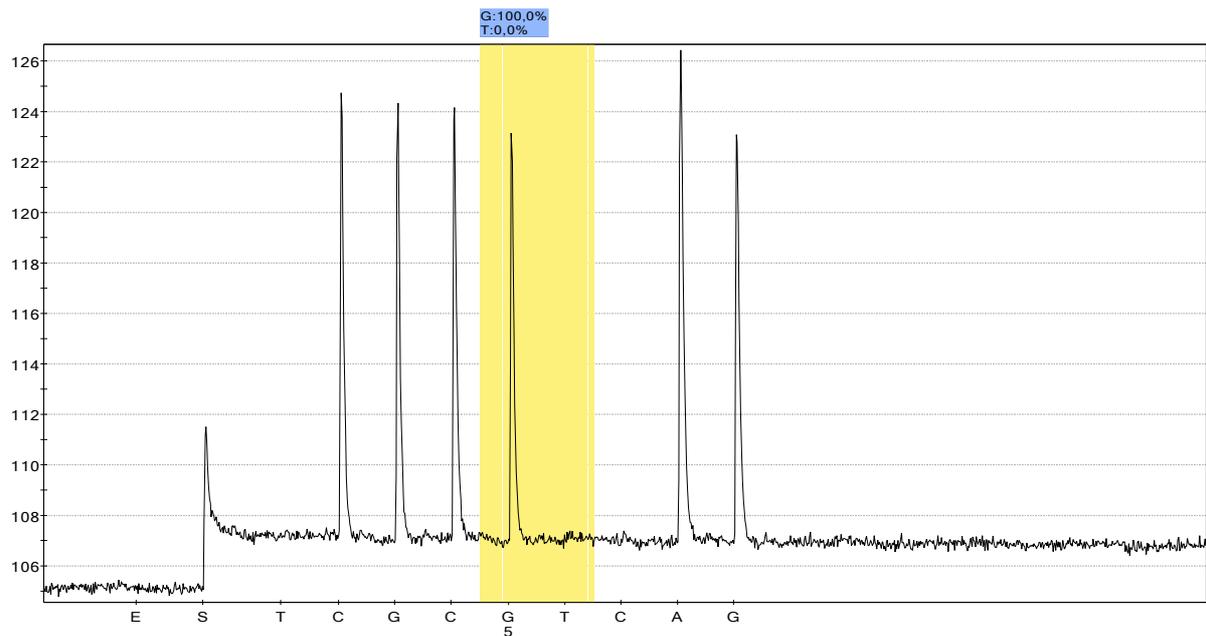


Abbildung 119 *S. aureus* Isolat VA39140/04 mit der Wild-Typ Sequenz (G2576) in allen Copy-Genen.

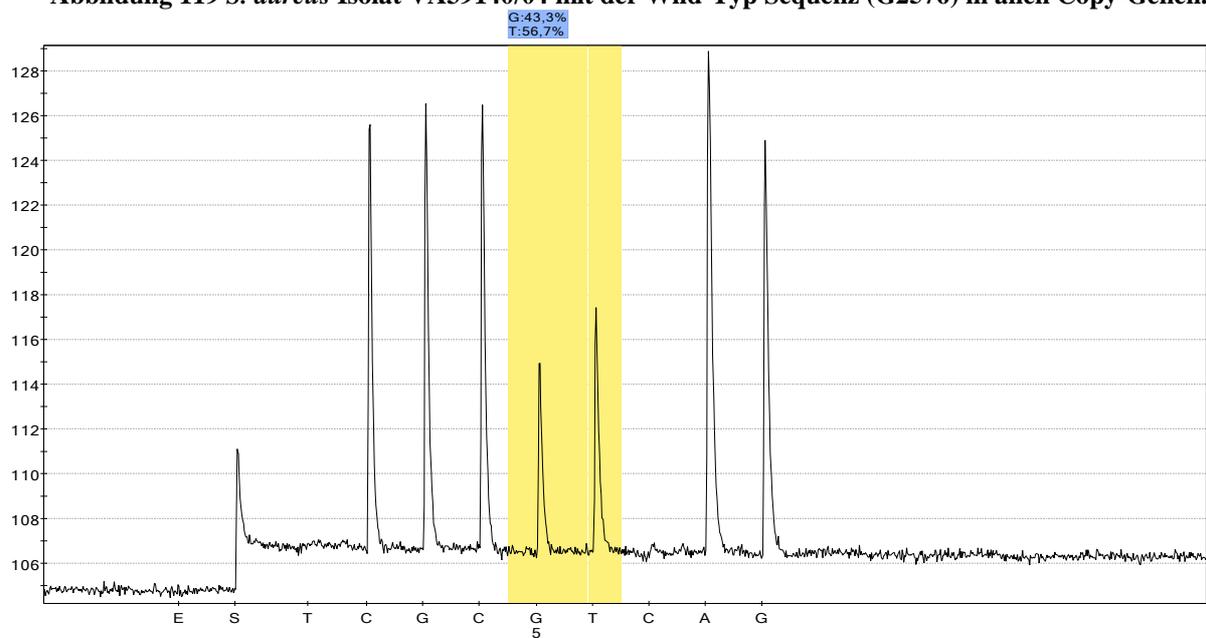


Abbildung 120 *S. aureus* Isolat VA10260/05 mit der Wild-Typ (G2576) und Mutations-Sequenz (T2576) in den Copy-Genen.

Die Auswertung der Allel-Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Software des Pyrosequencer durch Vergleich der Lichtsignale untereinander, die beim Einbau des Nukleotids für die Wild-Typ und für die Mutations-Sequenz entstehen.

Für diese Isolate konnte der G2576T SNP durch den Pyrosequencing™-Assay nachgewiesen werden. Dabei ergab die Allel-Quantifizierung folgende Verteilung des T2576 SNP in den Isolaten (Tabelle 98).

**Tabelle 98** *S. aureus* Isolate mit phänotypischer Linezolid-Resistenz

Isolate (Interne ID)	G2576T SNP Verteilung <sup>a</sup>	S <sub>rel</sub> [%]	Anzahl der Gene mit T2576 SNP <sup>b</sup>
<i>S. aureus</i> VA39140/04	G 100,0 % T 0,0 %	0,0	0
<i>S. aureus</i> VA10260/05	G 46,3 % T 53,7 %	1,7	2-3
<i>S. aureus</i> TY2300/05	G 46,3 % T 53,7 %	2,0	2-3
<i>S. aureus</i> VA14775/05	G 45,9 % T 54,1 %	3,1	2-3
<i>S. aureus</i> TY2403/05	G 46,9 % T 53,1 %	2,9	2-3
<i>S. aureus</i> VA19213/05	G 49,1 % T 50,9 %	5,3	2-3

<sup>a</sup>Ergebnis einer Dreifach-Bestimmung mit separat amplifizierten PCR-Produkten, <sup>b</sup> Basierend auf der Existenz von fünf Copy-Genen der 23S rRNA für *S. aureus*.

Eine zusätzliche Untersuchung der Genabschnitte für die Domäne V (Positionen 1873-2618 und 2294-2777) der 23S rRNA durch Cycle-Sequencing zeigt keine weiteren Punktmutationen, bestätigte jedoch das Ergebnis der Untersuchung mittels Pyrosequencing™.

Gleichzeitig erfolgte wie unter C2.3.1.4 beschrieben ein Nachweis der für die Makrolid-Resistenz verantwortlichen Gene, welche für die Expression von spezifischen Methyltransferasen codieren (*ermA* und *ermC*).

Interessanterweise konnte für die beiden zuerst isolierten *S. aureus*-Stämme VA39140/04 und VA10260/05 parallel die beiden Gene für die rRNA-Methyltransferasen *ermA* und *ermC* bei gleichzeitiger phänotypischer Resistenz gegenüber Erythromycin und Clindamycin nachgewiesen werden. Außerdem zeigte das Folge-Isolat VA39140/04 gegenüber Linezolid phänotypisch und genotypisch keine, jedoch gegenüber Erythromycin und Clindamycin Resistenz, während das Isolat VA10260/05 neben der Unempfindlichkeit gegenüber Erythromycin und Clindamycin zusätzlich eine Linezolid-Resistenz aufzeigte.

Die Folge-Isolate hingegen erbrachten trotz phänotypischer Sensibilität gegenüber Erythromycin und Clindamycin einen genotypischen Nachweis des *ermA*-Gens, jedoch nicht des *ermC*-Gens (Tabelle 98).

Zur genaueren Untersuchung dieses Phänomens wurden für die Isolate VA39140/04, VA10260/05 und VA19213/05 die Generationszeit wieder unter C1.7 beschrieben bestimmt (Tabelle 99).

**Tabelle 99** Generationszeit für ausgewählte *S. aureus* Isolate

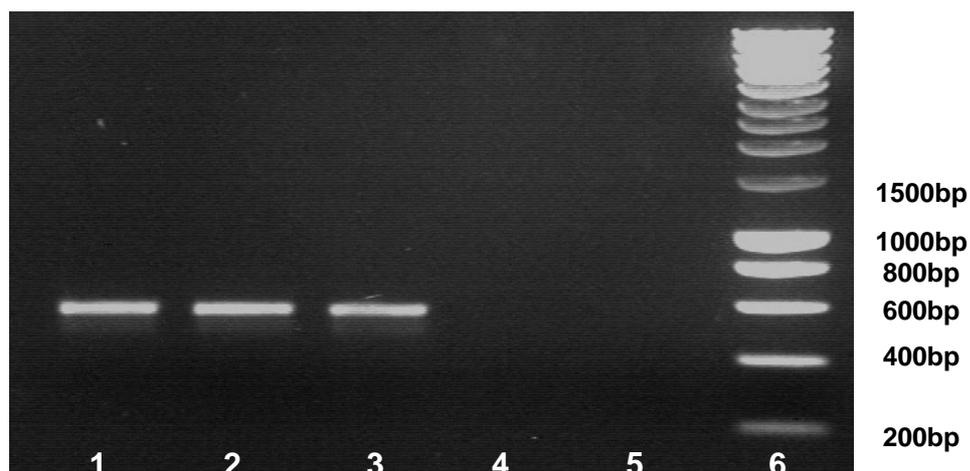
Isolate (Interne ID)	Generationszeit v [min]
<i>S. aureus</i> VA39140/04	22
<i>S. aureus</i> VA10260/05	25
<i>S. aureus</i> VA19213/05	22

Diese Untersuchung zeigt nur einen geringfügigen Unterschied zwischen den Isolaten VA39140/04, VA19213/05 (je 22 Min.) und VA 10260/05 (25 Min.).

Weiterhin wurden die Isolate wie unter C1.4 beschrieben darauf untersucht, ob die *erm*-codierten rRNA-Methyltransferasen konstitutiv oder induzierbar expremiert werden. Dabei ergab sich für die Isolate VA39140/04 und VA10260/05 ein konstitutiver Phänotyp, während bei dem Isolat VA19213/05 weder ein induzierbarer noch konstitutiver Phänotyp ermittelt werden konnten.

Zur genaueren Charakterisierung der Resistenzgene erfolgte wie unter C2.7.1.3 eine beschriebene Sequenzierung der Regulatorregion des *ermA*-Gens im Transposon Tn554 von *S. aureus*.

Dafür wurde zunächst mit Hilfe von spezifischen Primern amplifizierte 571 bp PCR-Produkt in einem 1,0 %igen Gel aufgetrennt und die DNA unter UV-Licht durch Interkalation mit Ethidiumbromid detektiert (Abbildung 121).



**Abbildung 121** Auftrennung der amplifizierten Abschnitte (571 bp) für das Cycle-Sequencing der Regulator-Region des *ermA*-Gens im Transposon Tn554 in *S. aureus* in einem 1,0 %igen Agarosegel und Detektion unter UV-Licht mit Ethidiumbromid.

1:*S. aureus* VA10260/05, 2:*S. aureus* VA19213/05, 3:*S. aureus* VA39140/04, 4:*S. aureus* ATCC®29213, 5:PCR-Negativ-Kontrolle, 6:Größenstandard Smart-Ladder (200-10.000 bp)

Die PCR-Produkte wurden wie unter C2.6.1. beschrieben aufgereinigt, für die Sequenzierung mit Ethanol ausgefällt (C2.6.2) und im Anschluss sequenziert.

Dabei konnte in der Regulatorregion des *ermA*-Gens in Tn554 von *S. aureus* in allen drei Isolaten keine strukturelle Veränderung gezeigt werden, jedoch fanden sich Veränderungen außerhalb der Regulatorregion in unmittelbarer Nähe der Shine-Dalgarno-Region des ersten Leader-Peptids für alle Isolate (Tabelle 100).

**Tabelle 100** Strukturelle Veränderungen in Tn554 in ausgewählten *S. aureus* Isolaten

Veränderung	Position (in Bezug auf Shine-Dalgarno-Region)
1bp $\Delta$ (T $\downarrow$ )	-65 bp
G $\rightarrow$ T SNP	-66 bp
1bp $\Delta$ (C $\downarrow$ )	-73 bp
1bp $\Delta$ (C $\downarrow$ )	-103 bp

Die Isolierung eines Linezolid-resistenten Isolates nach zwei Monaten trotz Unterbrechung der Therapie mit diesem Antibiotikum ist unter anderem neben dem Verlust der Makrolid-Resistenz auch von besonderem Interesse. Weiterhin ist der sehr stabile Resistenz-Phänotyp auch zwei Monate nach Ende der Therapie mit Linezolid von großem Interesse.

## **E Diskussion**

### **1 Empfindlichkeit Gram-positiver Isolate aus dem Routine-Labor**

#### **1.1 *S. aureus* Isolate**

Ziel der für die *S. aureus* Isolate durchgeführten Empfindlichkeits-Untersuchung war es, über einen Zeitraum von drei Jahren die lokale Resistenzlage gegenüber bewährten Antibiotika und neueren oder noch nicht zugelassenen Antibiotika am UKE zu erfassen. So sollte innerhalb des gewählten Zeitraumes von drei Jahren eine punktuelle Aufnahme der Resistenz erfolgen, so dass eine Entwicklung der Resistenzsituation nach weiteren drei Jahren bei Fortführung der Untersuchung möglich ist. Für die Untersuchung war es nicht möglich, epidemiologische Besonderheiten wie z. B. Ausbrüche von Infektionen zu berücksichtigen, da eine Untersuchung der gesammelten Isolate auf klonale Verwandtschaft nicht vorgenommen wurde. Jedoch wurde bei der Auswahl der Isolate nur ein Isolat pro Patient und Infektion berücksichtigt. Folge-Isolate wurden erfasst und untersucht, fanden aber keinen Eingang in die Resistenz-Statistik.

Interessant für die Auswertung der durchgeführten Untersuchungen ist der Anteil an identifizierten MRSA Isolaten, da MRSA als der Hauptgrund für nosokomiale Infektionen unter klinisch relevanten pathogenen Keimen verantwortlich gemacht werden kann (102). Dabei muss für die Betrachtung der MRSA-Prävalenz zwischen Infektionen, die mit Aufenthalt in einem Krankenhaus in Verbindung gebracht werden können (ha-MRSA = „hospital-acquired“-MRSA) und solchen, die ohne bekannte Risiko-Faktoren für eine Besiedlung mit MRSA auftreten (ca-MRSA = „community-acquired“-MRSA) unterschieden werden. Die weltweite Epidemiologie von ha-MRSA lässt sich dabei auf fünf bedeutsame MRSA-Klone begrenzen (Tabelle 101).

**Tabelle 101** Weltweit verbreitet, bedeutsame ha-MRSA-Klone modifiziert nach (127, 128)

Bezeichnung (engl.)	Verbreitung, modifiziert nach (129)
Iberian clone	Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Großbritannien, Italien, Kroatien, Niederlande, Polen, Portugal, Schweden, Schweiz, Slowenien, Spanien, Tschechei, USA
Brazilian clone	Algerien, Argentinien, Australien, Brasilien, China, Chile, Großbritannien, Deutschland, Finnland, Griechenland, Indien, Indonesien, Korea, Mongolei, Niederlande, Österreich, Polen, Portugal, Singapur, Slowenien, Spanien, Sri Lanka, Schweden, Tschechei, Thailand, Uruguay, USA, Vietnam
Hungarian clone	Algerien, Argentinien, Australien, Brasilien, China, Chile, Großbritannien, Deutschland, Finnland, Griechenland, Indien, Indonesien, Korea, Mongolei, Niederlande, Österreich, Polen, Portugal, Singapur, Slowenien, Spanien, Sri Lanka, Schweden, Tschechei, Thailand, Uruguay, USA, Vietnam
New York/ Japanese clone	Australien, Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Großbritannien, Irland, Japan, Kanada, Korea, Mexiko, Singapur, Schweden, Uruguay, USA
Pediatric clone	Algerien, Argentinien, Australien, Brasilien, Dänemark, Großbritannien, Frankreich, Kolumbien, Korea, Norwegen, Polen, Portugal, Spanien, Schweden, Uruguay, USA

Als Risikofaktoren für eine Infektion mit ha-MRSA sind dabei zu nennen (129):

- eine lang anhaltende, multiple Antibiotika-Therapie
- stationärer Aufenthalt in einer Intensivstation
- schwere zugrundeliegende Erkrankungen
- invasive Eingriffe
- Chirurgische Wunden
- Kontakt mit Patienten mit MRSA-Besiedlung

Gegenüber diesen abzugrenzen, sind Infektionen mit den zuvor erwähnten ca-MRSA Isolaten, welche eine stärkere Virulenz, aber in der Regel ein besseres, günstigeres Resistenz-Profil als ha-MRSA Isolate aufweisen. So sind ca-MRSA Isolate häufig z. B. gegenüber Fluorchinolonen sensibel. Die stärkere Virulenz hingegen erklärt sich durch die Expression des Panton-Valentin-Leukozidin-Gens (PVL-Gen). Durch Leukozyten-Schädigung und Gewebs-Nekrose, welche durch ein durch dieses Gen gebildetes Cytotoxin verursacht werden, können dabei Haut- und Weichteilinfektionen in Form von Furunkeln, Abszessen und schweren Nekrosen entstehen (25-27). Ein MRSA-Isolat gilt dann als ca-MRSA-Isolat, wenn es die folgende Kriterien erfüllt (129):

- Isolierung des Stammes in einer ambulanten Einrichtung oder an Patienten innerhalb von 24 h nach Aufnahme in einer stationären Einrichtung
- keine vorherige Besiedlung des Patienten mit MRSA in der Krankengeschichte
- keine Aufnahme des Patienten in eine stationäre Einrichtung, Altenheim, Dialyse-Einrichtung oder ärztliche Einrichtung innerhalb des letzten Jahres
- Patient weist keine die Haut penetrierenden Medizinprodukte, wie z. B. Dauerkatheter auf

Die Inzidenz weltweit für ca-MRSA ist zur Zeit gering (Anteil < 0,5 %), jedoch steigt diese an (130, 131). Die genauen Risikofaktoren für eine Infektion mit ca-MRSA sind noch nicht vollständig aufgeklärt. So gelten zur Zeit als Risikofaktoren gastrointestinale Erkrankungen, intravenöser Drogenkonsum und direkter Kontakt mit einer Person mit ca-MRSA-Besiedlung. Weiterhin wird angenommen, dass indirekter Kontakt durch kontaminierte Objekte wie gemeinsam genutzte Seifenstücke und Handtüchern in Gemeinschaftseinrichtungen eine Infektion mit ca-MRSA auslösen können (129).

Der ha-MRSA-Anteil während der durchgeführten Empfindlichkeitsuntersuchung lag bei durchschnittlich 11,8 %. Vergleicht man diesen mit dem Anteil, der in Deutschland identifizierten MRSA Isolate im Rahmen der Empfindlichkeitsstudie der Paul-Ehrlich-Gesellschaft (PEG) 2004 von 22,6 % (132), so ist der Anteil von 11,8 % für Hamburg im Vergleich deutlich geringer, während eine weitere von 2002 bis 2004 durchgeführte Studie einen ähnlichen Anteil an MRSA Isolaten in Deutschland ergab (9,8 %) (31).

Die unterschiedlichen Grenzwerte zur Beurteilung einer Oxacillinresistenz von DIN (Grenzwert MHK  $\geq 2$  mg/L), welcher für die Empfindlichkeitsstudie der PEG (132) angewandt wurde und CLSI (Grenzwert MHK  $\geq 4$  mg/L), welcher im Rahmen dieser Arbeit

verwendet wurde, sowie die unterschiedliche NaCl-Supplementierung des Nährmediums (DIN: Mueller-Hinton-Nährbouillon mit 3 % NaCl-Anteil, CLSI: Mueller-Hinton-Nährbouillon mit: 2 % NaCl-Anteil) könnten ein Grund für die abweichenden Ergebnisse sein. Berücksichtigt man jedoch den MRSA-Anteil unter Anwendung der CLSI-Grenzwerte bei der Empfindlichkeitsstudien der PEG (132) so wäre der MRSA-Anteil mit 17,5 % immer noch größer. Weiterhin sollte auch berücksichtigt werden, dass der MRSA-Anteil bei den an der Empfindlichkeitsstudie der PEG (132) teilnehmenden Zentren durchaus regionalen Schwankungen unterliegt und der Wert nur einen Mittelwert darstellt. Weiterhin ist darauf hinzuweisen, dass das UKE an den früheren Studien der PEG nicht teilgenommen hat.

Interessanterweise konnte für den MRSA-Anteil ein rückläufiger Trend innerhalb der Untersuchung von 24,5 % zu Beginn im Herbst 2004 auf 8,0 % im Frühjahr 2007 beobachtet werden, während sich der Anteil an MRSA Isolaten im Verlauf der Empfindlichkeitsstudie der PEG von 20,7 % (2001) (133) auf 22,6 % (2004) (132) erhöht hat. Es bleibt abzuwarten, wie sich dieser Trend bei Weiterführung der Untersuchung nach weiteren drei Jahren entwickelt.

Vergleicht man den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Anteil an MRSA Isolaten mit Studien in europäischen oder amerikanischen Ländern so kann man hinsichtlich des regional sehr unheitlichen Auftretens und der Häufigkeit von MRSA Isolaten die Ergebnisse dieser Arbeit als Durchschnitt betrachten.

So liegt der Anteil an MRSA Isolaten, welcher im Rahmen dieser Arbeit ermittelt wurde mit 11,8 % deutlich unter den beobachteten MRSA-Prävalenzen in einigen südeuropäischen Ländern, wie Portugal (54,4 %) und Italien mit 50,5 %, sowie weiteren europäischen Ländern wie England (27,5 %) und Frankreich (21,4 %) Weiterhin liegt der ermittelte Anteil an MRSA deutlich unter dem vom Argentinien, Brasilien und den USA (42,7 %, 33,7 % und 34,2 %). Gleichzeitig ist der MRSA-Anteil größer als in Kanada (5,7 %) den Niederlanden und in der Schweiz, die eine sehr geringe Prävalenz mit je 2,0 % und 1,8 % zeigten (30).

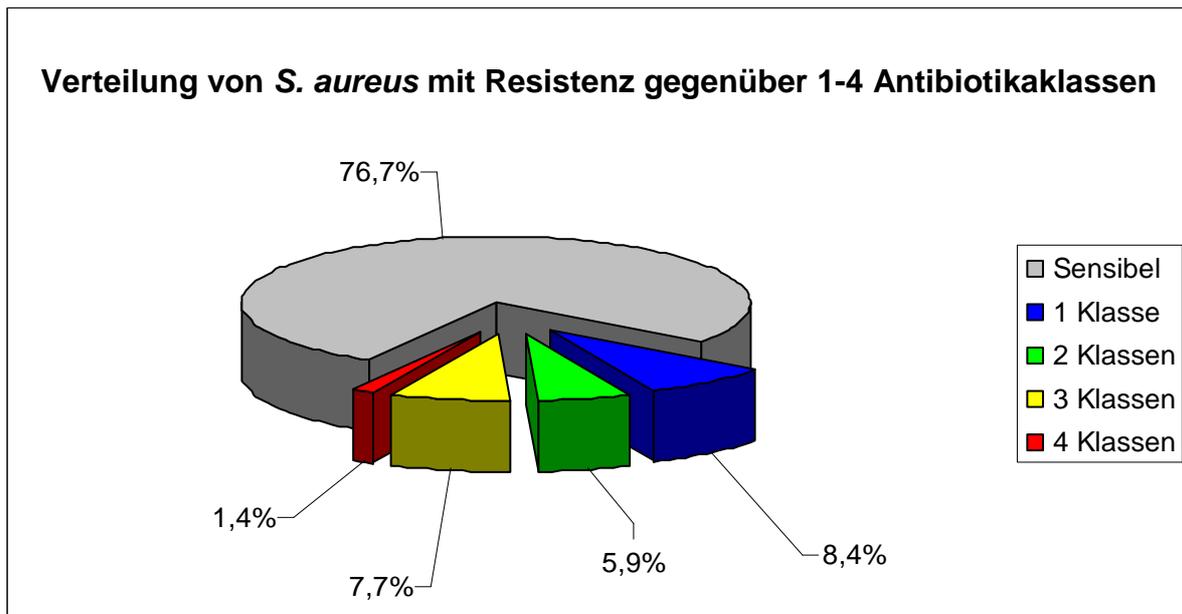
Diese sehr geringen Anteile sind sicherlich auf die Etablierung und konsequente Durchführung von hygienischen Maßnahmen zur Prävention und der Verbreitung von MRSA-Infektionen im Krankenhaus zurückzuführen („search & destroy policy“). So wird in den Niederlanden standardmäßig jeder Patient vor und während der stationären Aufnahme sowie regelmäßig das Pflegepersonal auf eine MRSA-Besiedlung in der Nase oder im Rachen untersucht und verbleibt solange isoliert, bis der negative mikrobiologische Befund vorliegt. Sollte der Befund positiv sein wird eine Eradikations-Therapie durchgeführt und die bestehenden Isolierungsmaßnahmen weitergeführt. Weiterhin werden Risikopatienten mit

einer MRSA-Infektion isoliert, solange eine MRSA-Besiedlung nachgewiesen werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass die Kosten für diese Maßnahmen zur Prävention von MRSA-Besiedlungen bzw. Infektionen geringer sind als die Behandlung einer Infektion durch MRSA (134).

Vergleicht man die untersuchten Fluorchinolone untereinander, so wurde der höchste Anteil an resistenten Isolaten bei den Vertretern Ciprofloxacin (18,9 %) und Sparfloxacin (17,8 %) gefunden. Der Anteil an Gatifloxacin-resistenten *S. aureus* Isolaten lag deutlich niedriger bei 2,4 %. Der Anteil Moxifloxacin-resistenter *S. aureus* Isolate lag bei 1,0 %. Das in der Zulassung befindliche Garenoxacin als neuer Vertreter der 6-Desfluorochinolone zeigt gleiche MHK<sub>50</sub>-Werte von 0,03 mg/L für die isolierten *S. aureus*-Stämme und annähernd identische MHK<sub>90</sub>-Werte von 1 mg/L (Garenoxacin) gegenüber 2 mg/L (Moxifloxacin).

Weiterhin konnte ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten von MRSA und einer Resistenz gegenüber Ciprofloxacin beobachtet werden. So waren 94,2 % aller Isolate mit einer Resistenz gegenüber Oxacillin gleichzeitig gegenüber Ciprofloxacin resistent.

Dieses Ergebnis stimmt mit der generell beobachteten „multi-drug-resistance“ von MRSA Isolaten zusätzlich gegenüber verschiedenen Antibiotikaklassen, wie Fluorchinolonen, Makroliden und Aminoglykosiden überein (135). So konnte die Aneignung multipler Resistenzen bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *S. aureus* Isolaten unter Berücksichtigung der Antibiotika Ciprofloxacin, Erythromycin, Gentamicin und Oxacillin als Vertreter der einzelnen Substanzklassen bei insgesamt 26 Isolaten gezeigt werden. Der Gesamtanteil der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *S. aureus* Isolate mit einer multiplen Antibiotika Resistenz lag somit bei 9,1 % (Abbildung 122).



**Abbildung 122** Verteilung von *S. aureus* mit Resistenz gegenüber 1-4 Antibiotikaklassen: Der Anteil an Isolaten mit Resistenz gegenüber mindestens einem Vertreter der ausgewählten Klasse (Ciprofloxacin, Erythromycin, Gentamicin oder Oxacillin) betrug 8,4 %, der Anteil gegenüber mindestens zwei Vertretern der ausgewählten Klasse lag bei 5,9 % und der Anteil gegenüber mindestens drei und vier Vertretern der ausgewählten Klassen lag bei 7,7 % und 1,4 %. Der Anteil an Isolaten mit multipler Antibiotika Resistenz, also Resistenz gegenüber mindestens drei Vertreter der ausgewählten Klassen lag bei 9,1 %.

Von diesen waren 22 Isolate entweder gleichzeitig gegenüber Ciprofloxacin, Erythromycin und Oxacillin (Cip<sup>R</sup>-Ery<sup>R</sup>-Oxa<sup>R</sup>-Muster) oder Ciprofloxacin, Erythromycin und Gentamicin (Cip<sup>R</sup>-Ery<sup>R</sup>-Gen<sup>R</sup>-Muster) resistent, während 4 Isolate gleichzeitig gegenüber allen vier Substanzklassen eine Resistenz aufwiesen (Cip<sup>R</sup>-Ery<sup>R</sup>-Gen<sup>R</sup>-Oxa<sup>R</sup>-Muster). Der überwiegende Anteil der untersuchten Isolate (21 Stämme) zeigte dabei im Hinblick auf die Expression multipler Antibiotikaresistenzen das Cip<sup>R</sup>-Ery<sup>R</sup>-Oxa<sup>R</sup>-Muster während nur ein Isolat das Cip<sup>R</sup>-Ery<sup>R</sup>-Gen<sup>R</sup>-Muster zeigte. Für den Zusammenhang zwischen Fluorchinolon-Resistenz und Auftreten von MRSA kommen dabei zwei verschiedene Mechanismen als mögliche Ursache in Frage. So erfolgt durch Fluorchinolone eine Selektion *in-vitro* von MRSA in einem heterogen Methicillin-resistenten Kollektiv von *S. aureus*, wobei die Fluorchinolone nicht als Mutagen agieren, sondern den prädisponierten Stämmen einen Wachstumsvorteil verschaffen (136). Andererseits führt die *in-vitro* Passage von MRSA mit Fluorchinolonen zu der vermehrten Selektion von Fluorchinolon-resistenten Klonen (137). Der genaue Mechanismus der Interaktion von Fluorchinolon-Exposition und dem Auftreten von MRSA ist noch nicht vollständig geklärt. Jedoch erscheint eine Möglichkeit die Beeinflussung des *mecI*-Gens durch Fluorchinolone, welches als regulatorischer Repressor für das *mecA*-Gen dient. So könnte eine Repression des *mecI*-Gens durch Fluorchinolone zur Aufregulation des *mecA*-Gens führen und somit das Auftreten von MRSA begünstigen (138).

Dagegen konnte bei nahezu allen Ciprofloxacin-resistenten *S. aureus* und MRSA Isolaten eine sehr gute Wirksamkeit von Moxifloxacin gezeigt werden. Nur drei *S. aureus* Isolate zeigten bei gleichzeitiger Resistenz gegenüber Ciprofloxacin eine Unempfindlichkeit gegenüber Moxifloxacin, bei den MRSA Isolaten wiesen nur zwei eine Resistenz gegenüber Moxifloxacin auf. Dies ist auf die höhere intrinsische Aktivität von Moxifloxacin gegenüber Gram-positiven Erregern wie Staphylokokken im Vergleich zu Ciprofloxacin zurückzuführen (139).

Der hohe Anteil von Moxifloxacin-empfindlichen *S. aureus* Isolaten inklusive der untersuchten MRSA Isolate unterstreicht dessen Bedeutung als Reserve-Antibiotikum bei der Behandlung von ambulant erworbenen Pneumonien und schweren Haut- und Weichteilinfektionen. Eine gute Wirksamkeit von Moxifloxacin *in-vitro* gegenüber *S. aureus* konnte gezeigt werden, jedoch werden als häufigste Erreger bei einer ambulant erworbenen Pneumonie *S. pneumoniae* und *H. influenzae* isoliert. Für die initial kalkulierte Behandlung dieser Erkrankung ohne Kenntnis des Erregers sollten als Mittel der Wahl Cephalosporine der 2. oder 3. Generation angewandt werden, während Moxifloxacin als Reserve bei Unverträglichkeit oder nachgewiesener Unempfindlichkeit erst nach Erregerkenntnis und Empfindlichkeitstestung verwendet werden sollte. Gleiches gilt für die bei einer durch Mischinfektionen mit Streptokokken verursachte Haut- und Weichteilinfektion, welche initial kalkuliert durch ein geeignetes  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum behandelt werden sollte.

Somit ist zu fordern, dass Moxifloxacin weiterhin in der Klinik und in der ambulanten Versorgung restriktiv eingesetzt werden sollte, um dessen Wirksamkeit zu erhalten. Die Schwierigkeit in der Umsetzung dieser Forderung begründet sich sicherlich in der sowohl oral als auch intravenös nur einmal täglich notwendigen Gabe von Moxifloxacin, wodurch die Compliance des Patienten erhöht bzw. die Applikation in der Klinik durch das Pflegepersonal erleichtert und das Risiko von z. B. Sekundärinfektion durch eine intravenöse Gabe gemindert wird. Dabei sollte jedoch das Beispiel der Resistenzentwicklung von Ciprofloxacin gegenüber MRSA Isolaten innerhalb kurzer Zeit nach der Zulassung (1987) als weitere Untermauerung dieser Forderung betrachtet werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine initial kalkulierte Therapie von MRSA-Infektion durch Ciprofloxacin durch die beobachtete „multi-drug-resistance“ nicht sinnvoll ist. Dies war bei der Einführung von Ciprofloxacin durchaus nicht der Fall. So war Ciprofloxacin bei seiner Einführung das erste oral verfügbare Antibiotikum zur Behandlung von MRSA-Infektionen. Bereits ein Jahr nach der Zulassung zeichnete sich ein deutlicher Anstieg der Ciprofloxacin-Resistenz bei MRSA Isolaten (79 %) ab (23), während gleichzeitig die Resistenz gegenüber Ciprofloxacin bei MSSA Isolaten nur auf 13,6

% stieg (84). Somit erscheint die heute fehlende Indikation für Ciprofloxacin gerechtfertigt. Gleichzeitig zeigt diese Resistenzentwicklung am Beispiel von Ciprofloxacin deutlich auf, dass neue Antibiotika wie Moxifloxacin, gerade wenn sie über eine oder mehrere für die Anwendung vorteilhafte Optionen verfügen, trotzdem restriktiv verwandt werden sollten.

Für die Reserve-Antibiotika Linezolid, Teicoplanin und Vancomycin ergab sich aufgrund der beobachteten Empfindlichkeit bei allen getesteten *S. aureus* Isolaten eine sehr gute Wirksamkeit. Ebenso konnte für das während der Empfindlichkeits-Untersuchung im April 2006 zugelassene Lipopeptid Daptomycin (Cubicin®) durch eine Empfindlichkeit bei allen *S. aureus* Isolaten eine sehr gute Wirksamkeit gezeigt werden. Die Ergebnisse für das sich noch in der Zulassung befindliche Glykopeptid Dalbavancin sprechen ebenfalls für eine sehr gute Wirksamkeit durch die erfasste Empfindlichkeit aller getesteten *S. aureus* Isolate. Dabei entfaltete sich die Wirksamkeit aller vier Antibiotika sowohl bei MSSA Isolaten und MRSA Isolaten gleichermaßen.

Für alle drei Glykopeptide konnten ähnliche oder identische MHK<sub>50</sub>- und MHK<sub>90</sub>-Werte ermittelt werden. Bei Linezolid zeigte sich sowohl für den MHK<sub>50</sub>- und MHK<sub>90</sub>-Wert im Vergleich dazu leicht höhere Werte von je 2 mg/L, welcher jedoch auf die gute Wirksamkeit des Linezolid keinen Einfluss hat.

Interessanterweise zeigte sich jedoch für Dalbavancin ein geringerer Bereich der MHK-Werte, welcher sich nur über drei Verdünnungsstufen (0,25-1 mg/L) erstreckt, während sich diese bei Linezolid (0,25-4 mg/L) und Daptomycin (0,03-1 mg/L) über fünf Verdünnungsstufen, bei Teicoplanin und Vancomycin (<0,25-4 mg/L) über sechs Verdünnungsstufen erstreckt. Diese geringere Verteilung weist jedoch auf keine überlegene Wirkung gegenüber den übrigen betrachteten Antibiotika hin und könnte durch die geringere Probenzahl an getesteten *S. aureus* Isolaten gegenüber Dalbavancin (n = 66) erklärt werden. Durch die Fortführung der Empfindlichkeits-Untersuchung und die damit verbundene höhere Probenzahl ist eine Näherung des Bereiches der MHK-Werte zu erwarten.

Der Anteil Erythromycin-resistenter *S. aureus* Isolate lag mit 22,6 % ähnlich hoch wie der im Rahmen der PEG-Studie 2004 (132). Für die weitere Untersuchung von Kreuz- und Parallelresistenzen wurde der Zusammenhang zwischen Makrolid und Methicillin-Resistenz untersucht. Dazu wurden mit Hilfe einer unter C2.3.1.4 und C2.3.1.5 beschriebenen PCR die im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten *S. aureus* Isolate mit phänotypischer Erythromycin-Resistenz auf ihre molekularen Mechanismen untersucht.

Dabei konnte als häufigste Ursache der Erythromycin-Resistenz (52,3 % der untersuchten *S. aureus* Isolate) das für die Expression einer *erm*-codierten rRNA-Methyltransferase verantwortliche *ermC*-Gen nachgewiesen werden. In 38,5 % der untersuchten *S. aureus* Isolate wurde das *ermA*-Gen, in 9,2 % das für eine Effluxpumpe codierenden *msrA*-Gen nachgewiesen. Keines der der untersuchten *S. aureus* Isolate trug das *ermB*-Gen. Betrachtet man den gleichzeitigen Nachweis des *mecA*- und der *erm*-Gene, so tragen 52,9 % der MRSA Isolate mit *mecA*-Gen (n= 34) gleichzeitig das *ermC*-Gen, während jeweils bei 11,8 % das *ermA*-Gen sowie bei 5,9 % das *msrA*-Gen nachgewiesen werden konnte.

Diese Untersuchungen decken sich teilweise mit den Ergebnissen anderer Studien. So war in einer Untersuchung von 134 Erythromycin-resistenten *S. aureus* Isolaten aus Blutkulturen, welche an 15 deutschen Universitätskrankenhäusern gesammelt worden waren, ebenfalls das *ermC*-Gen dominierend (50,7 %), gefolgt von dem *ermA*-Gen (38,8 %) und dem *msrA*-Gen (6,0 %). In 2,2 % der Isolate konnte das *ermB*-Gen nachgewiesen werden (140). Gleichzeitig zeigte eine andere an 24 Universitätskrankenhäusern in Europa durchgeführte Untersuchung über den Zusammenhang zwischen Makrolid- und Methicillin-Resistenz im Gegensatz zu dieser Arbeit, dass der überwiegende Anteil (88 %) der MRSA Isolate gleichzeitig das *ermA*-Gen trug. Der Anteil von *S. aureus* Isolaten mit gleichzeitiger Methicillin-Empfindlichkeit und Nachweis des *ermC*-Gens lag bei 47 %. Es konnte bei keinem der MRSA Isolate gleichzeitig das *mecA*-Gen und das *msrA*-Gen nachgewiesen werden (141).

## 1.2 *Enterococcus* spp. Isolate

Für die Ergebnisse der Untersuchung der *Enterococcus* spp. Isolate aus dem Routine-Labor erscheint es zunächst sinnvoll die Ergebnisse getrennt zu diskutieren.

So zeigte sich keine Resistenz bei den untersuchten *E. faecalis* Isolaten gegenüber den Reserve-Antibiotika Daptomycin, Linezolid, Teicoplanin und Vancomycin und eine geringe Resistenz gegenüber dem  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum Ampicillin (3,6 %). Dieser auf den ersten Blick zunächst sehr gering erscheinenden Resistenzrate steht ein Anteil von 33,9 % der untersuchten *E. faecalis* Isolaten mit einer Hochresistenz (MHK  $\geq 500$  mg/L) gegenüber Gentamicin gegenüber. Die Therapie mit einem Aminoglykosid wie Gentamicin erscheint nur dann sinnvoll, wenn diese in Kombination mit einem die Zellwandsynthese inhibierenden Antibiotikum wie z.B. Ampicillin als Vertreter der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika erfolgen kann (14, 15). Die gleichzeitige Gabe von Ampicillin erleichtert den Transport von Gentamicin in die Bakterienzelle durch Zerstörung der Zellwand, da ansonsten dessen Transport aktiv über die Zellmembran durch eine Pumpe erfolgt (8). Somit kann in etwa ein Drittel der hier

untersuchten *E. faecalis* Isolate keine kombinierte Therapie aus Ampicillin und Gentamicin erfolgen, da bei diesen Isolaten durch die Hochresistenz bedingt ein Erfolg der Therapie unwahrscheinlich ist.

Betrachtet man die untersuchten *E. faecium* Isolate so ergibt sich auch hier, ähnlich wie bei den untersuchten *E. faecalis* Isolaten, eine sehr gute Wirksamkeit gegenüber Daptomycin. Dies wird durch Empfindlichkeit gegenüber Daptomycin bei allen untersuchten *E. faecium* Isolaten bestätigt. Interessanterweise zeigen dabei beide Species identische MHK<sub>90</sub>-Werte (je 4 mg/L) und nur geringfügig abweichende MHK<sub>50</sub>-Werte (2 mg/L für *E. faecalis* und 4 mg/L für *E. faecium*).

Die ungünstige Resistenzlage gegenüber Ampicillin und Gentamicin, welche bei den untersuchten *E. faecalis* Isolaten aufgezeigt werden konnte, war bei den untersuchten *E. faecium* Isolaten noch ungünstiger. So waren 95,7 % der untersuchten *E. faecium* Isolate gegenüber Ampicillin resistent und 53,1 % der Isolate zeigten eine Hochresistenz gegenüber Gentamicin. Eine kombinierte Therapie mit Ampicillin und Gentamicin ist somit in etwa bei der Hälfte der untersuchten *E. faecium* Isolate nicht sinnvoll.

Darüber hinaus wurde für alle *Enterococcus* spp. Isolate bei denen phänotypisch eine Hochresistenz gegenüber Gentamicin (High-Level-Aminoglycoside-Resistance = HLAR) festgestellt wurde, das Ergebnis der phänotypischen Resistenzbestimmung mit dem Ergebnis der PCR zum Nachweis des AAC(6')-APH(2'')-Doppelenzyms (C2.3.1.1) verglichen. Dies wurde für 19 untersuchte *E. faecalis* Isolate und 17 untersuchte *E. faecium* Isolate mit HLAR vollzogen, wobei für 68,4 % (n = 13) der *E. faecalis* Isolate und 88,2 % (n = 15) der *E. faecium* Isolate mit HLAR ein positiver Nachweis des AAC(6')-APH(2'')-Doppelenzyms gezeigt werden konnte. Betrachtet man alle (n = 36) untersuchten *Enterococcus* spp. Isolate mit HLAR, so trugen 77,8 % (n = 28) dieser Isolate mit HLAR das AAC(6')-APH(2'')-Doppelenzym. Für die Isolate ohne Nachweis des AAC(6')-APH(2'')-Doppelenzyms als häufigste molekulare Ursache der HLAR bei *Enterococcus* spp. (142) kommen andere Aminoglykosid-modifizierenden Enzyme in Frage, wie z.B. das ANT(4'')-Enzym mit Aminoglykosid-Nukleotid-Transferaseaktivität. Dieses kann ebenso wie das nachgewiesene AAC(6')-APH(2'')-Doppelenzym für eine HLAR bei *Enterococcus* spp. verantwortlich gemacht werden kann. Für die verbleibenden acht *Enterococcus* spp. Isolate wäre die weitere Untersuchung des molekularen Resistenzmechanismus ein Ziel im Zusammenhang mit der Weiterführung der Empfindlichkeits-Untersuchung dieser Arbeit.

Weiterhin konnte bei den untersuchten *E. faecium* Isolaten das Auftreten von Resistenzen bei den Reserve-Antibiotika Linezolid, Teicoplanin und Vancomycin gezeigt werden. So lag der

Anteil an Linezolid-resistenten *E. faecium* Isolaten bei 6,3 % (2 Isolate). Ebenfalls waren zwei Isolate (6,3 %) der untersuchten Isolate gegenüber Teicoplanin resistent und immerhin 9,4 % (3 Isolate) gegenüber Vancomycin. Interessanterweise war die phänotypische Resistenz gegenüber Linezolid nicht in allen Isolaten mit einer gleichzeitigen Resistenz gegenüber Teicoplanin und Vancomycin verbunden. Das *E. faecium*-Isolat VA BK405/07 zeigte nur eine phänotypische Resistenz gegenüber Linezolid, jedoch eine Empfindlichkeit gegenüber Teicoplanin und Vancomycin. Dieser Befund ist ungewöhnlich, da bisher in der Literatur Linezolid-resistente *E. faecium* Isolate häufig als Vancomycin-resistent beschrieben wurden (64, 143-147). Eine Erklärung für den beobachteten Zusammenhang zwischen Linezolid- und Vancomycin-Resistenz konnte die Gruppe um Pai erbringen (144). So sind der Einsatz, die Therapiedauer mit Linezolid sowie eine zuvor schon durchgeführte Behandlung mit Linezolid Risikofaktoren für die Entwicklung einer Linezolid-Resistenz in *E. faecium*. Weiterhin erklärt sich das vermehrte Auftreten von Linezolid-Resistenz in *E. faecium* durch den überwiegenden Einsatz von Linezolid bei Infektion mit VRE als eine der wenigen letzten wirksamen Optionen. Das vermehrte Auftreten von Vancomycin-Resistenz bei *E. faecium* Isolaten wurde hingegen in der Literatur häufig beschrieben (148).

Der zunächst hoch erscheinende Anteil an Vancomycin-resistenten *E. faecium* Isolaten von 9,4 % sowie die sehr hohe Inzidenz an *E. faecium* Isolaten mit einer Linezolid-Resistenz von 6,3 % kann durch eine nicht mehr nach Species differenzierte Betrachtung relativiert werden. So liegt die Gesamtrate an VRE bei allen untersuchten *Enterococcus* spp. Isolaten (n = 88) bei 3,4 %. Damit deckt sich das im Rahmen dieser Arbeit ermittelte Ergebnis mit dem Ergebnis der PEG-Studie von 2004 (3,7 %) (132).

Andererseits liegt die Gesamtrate an Linezolid-resistenten *Enterococcus* spp. (LRE) bei allen untersuchten *Enterococcus* spp. Isolaten bei 2,3 %, während diese im Rahmen der Empfindlichkeitsstudie der PEG 2004 (132) bei 0,6 % lag. Die nicht nach Species differenzierte Erfassung aller VRE erscheint sinnvoller, da die Gesamtrate an VRE ähnlich wie der Gesamtanteil an MRSA, als eine Hauptursache für nosokomiale Infektionen unter allen pathogenen Keimen, die klinisch relevant sind, angesehen werden kann (102).

Insgesamt ist das Auftreten von LRE im Krankenhausbereich sowohl im Rahmen dieser Untersuchung als auch anderer nationaler und internationaler Studien (71-73, 149) sehr gering. Dies ist sicherlich auf den sehr restriktiven Einsatz dieser Substanz allein im Klinikbereich zurückzuführen. Jedoch geben die steigende Anzahl an Fällen von LRE Grund zur Besorgnis, ob Linezolid weiterhin ein gut wirksames Reserve-Antibiotikum bleiben wird.

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte und eingesetzte Verfahren zur schnellen Detektion der molekularen Ursache der Linezolid-Resistenz bei *Enterococcus* spp. und *S. aureus*, einem G→T SNP an Position 2576 der 23S rRNA, mit Hilfe der Pyrosequencing™-Technologie (C2.7.2.1) könnte dabei von großem Nutzen sein.

Mit Hilfe dieses Verfahrens konnte die phänotypische Resistenz gegenüber Linezolid aller LRE Isolate aus dem Routine-Labor genotypisch bestätigt werden. Von besonders großem Interesse war dabei die sehr rasche Identifizierung der Isolate als LRE innerhalb von zwölf Stunden nach Erhalt der mikrobiologischen Reinkultur, der geringen Kosten von etwa 2,50 Euro für eine Probe, sowie der Möglichkeit 96 Proben innerhalb von 15 Minuten parallel zu untersuchen.

Im Vergleich zu alternativen, etablierten Methoden zur genotypischen Aufklärung des Resistenzmechanismus wie Cycle-Sequencing der entsprechenden DNA-Abschnitte, RFLP oder RT-PCR (150) liefert das Verfahren in kurzer Zeit ein eindeutiges Ergebnis, welches durch die Software sofort ausgewertet werden kann und nachträglich beurteilt werden kann. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit die Auswertung genau wie bei der Anwendung einer RT-PCR (150) auch halbquantitativ, jedoch wesentlich preisgünstiger, durchzuführen.

Diese schnelle Möglichkeit der Allel-Quantifizierung ermöglicht neben der Identifizierung der Isolate als LRE auch eine sehr gute und zuverlässige Einschätzung des Grades der Resistenz. Der Zusammenhang zwischen Höhe der Resistenz gegenüber Linezolid und der Anzahl der Gen-Kopien, welche den für die Resistenz gegenüber Linezolid verantwortlichen G→T SNP an Position 2576 der 23S rRNA tragen (65, 151), kann mit Hilfe des entwickelten Verfahrens erfasst und untersucht werden. Dies erfolgt durch die halbquantitative Auswertung der Pyrogramme und unter Berücksichtigung der bei *Enterococcus* spp. unterschiedlichen Anzahl der Gen-Kopien (Sechs Gen-Kopien der 23S rRNA für *E. faecium* und vier Gen-Kopien der 23S rRNA für *E. faecalis*). Für eine klinische relevante phänotypische Resistenz gegenüber Linezolid ist das Vorhandensein von zwei Gen-Kopien mit G→T SNP an Position 2576 der 23S rRNA notwendig (68). Dieser Zusammenhang konnte im Rahmen dieser Arbeit anhand der untersuchten *Enterococcus* spp. Isolate bestätigt werden.

Interessanterweise konnte für das *E. faecium*-Isolat UR2234/06, welches keine phänotypische Linezolid- und Vancomycin- Resistenz zeigt der G→T SNP an Position 2576 der 23S rRNA auf einem Allel der sechs Gen-Kopien nachgewiesen werden. Dieser Befund ist von besonderem Interesse, da dieses Isolat bei einer herkömmlichen phänotypischen Empfindlichkeitsbestimmung, z. B. mittels Mikro-Dilutions-Methode, dem Plättchen-Agar-Diffusions-Test oder dem E-Test nicht erkannt worden wäre. Bei Vorliegen des G→T SNP an

Position 2576 der 23S rRNA auf nur einem Allel kann die Resistenzentwicklung durch homologe Rekombination beschleunigen (67) und würde somit eventuell zu einem Versagen der Therapie mit Linezolid führen. Somit ist das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte und verwendete Verfahren zur Detektion des G→T SNP an Position 2576 der 23S rRNA mit Hilfe der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Technologie durch seine Schnelligkeit eine äußerst hilfreiche Methode, um z.B. vor und während der Therapie mit Linezolid den Grad der Resistenz gegenüber Linezolid zu erfassen und bei Auftreten einer genotypischen Resistenz eine alternative antibiotische Therapie zu erwägen.

## **2 Empfindlichkeit Vancomycin-resistenter *Enterococcus* spp.**

Für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *Enterococcus* spp. Isolate mit phänotypischer Vancomycin-Resistenz zeigte sich für die Ergebnisse der Empfindlichkeits-Untersuchung ein sehr interessantes Bild. Zunächst konnte die phänotypische Resistenz unter Anwendung einer aus der Literatur bekannten Multiplex-PCR (107, 108) genotypisch bestätigt werden.

Weiterhin zeigte sich eine sehr gute Wirksamkeit von Daptomycin, dem Vertreter der neuen Substanzklasse der Lipopeptide, für die untersuchten VRE Isolate, durch eine Empfindlichkeit aller Isolate gegenüber diesem neuartigen Wirkstoff. Leider konnte bei einem geringen Anteil (6,3 %) der getesteten VRE Isolate eine Resistenz gegenüber Linezolid festgestellt werden. So waren insgesamt vier VRE Isolate (Tabelle 79) gegenüber Linezolid phänotypisch resistent. Die genotypische Resistenz konnten mit Hilfe des entwickelten Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Assays (C2.7.2.1) durch Detektion des G→T SNP an Position 2576 der 23S rRNA bestätigt werden. Wie zuvor gezeigt, waren bei diesen Isolaten das Vorhandensein von mindestens zwei Genkopien mit G→T SNP an Position 2576 der 23S rRNA notwendig, um einen phänotypische Resistenz zu exprimieren (65). Alle untersuchten VRE Isolate wurden als *E. faecium* identifiziert, während bei keinem der untersuchten *E. faecalis* Isolate eine phänotypische und genotypische Resistenz gegenüber Linezolid gezeigt werden konnte. Weiterhin zeigten immerhin 4,7 % der untersuchten VRE Isolate eine eingeschränkte (intermediäre) Empfindlichkeit gegenüber Linezolid. Die Untersuchung der Gene der 23S rRNA durch Cycle-Sequencing (C2.7.1.1) zeigte, dass diese Isolate keine weiteren SNP trugen, welche zuvor in der Literatur bei *in-vitro* erzeugten Linezolid-resistenten *Enterococcus* spp. Isolaten beschrieben worden waren (62). Der Grund für den erhöhten MHK-Wert von 4 mg/L mag durch die Methode der Empfindlichkeitsprüfung gegeben sein. Eine Schwankung von einer Verdünnungsstufe wird als vertretbare Variation bei der Testung der Empfindlichkeit nach

der Mikro-Dilutions-Methode akzeptiert, so dass der wahre MHK-Wert auch bei 2 mg/L oder 8 mg/L liegen kann. Diese Schwankung zeigt die Bedeutsamkeit des sicheren Nachweises von Linezolid-resistenten klinischen Isolaten. Diese Problematik in der korrekten Resistenzbestimmung wird durch die zuvor beschriebenen Schwierigkeiten bei der Detektion von Linezolid intermediär-empfindlichen Isolaten durch den Agar-Diffusion-Test verdeutlicht (70).

Eine weitere Beobachtung konnte durch die Untersuchung des Folge Isolates *E. faecium* TY1052/06 von *E. faecium* VA1646/06 gemacht werden, welche in einem Abstand von vier Monaten isoliert worden waren: Für das Folge-Isolat *E. faecium* TY1052/06 konnte im Gegensatz zu dem zuvor isolierten Stamm *E. faecium* VA1646/06 der G→T SNP an Position 2576 der 23S rRNA auf keinem der sechs Gen-Kopien nachgewiesen werden.

Es hatte sich somit für dieses Isolat eine Reversion zu einer phänotypischen Linezolid-Empfindlichkeit vollzogen, verbunden mit der gleichzeitigen, vollständigen Reversion aller Gen-Kopien zu der Wild-Typ-Sequenz. Zuvor war in der Literatur eine Reversion der Linezolid-Resistenz beschrieben worden, jedoch konnte bei allen Isolaten auf mindestens einem der Gen-Kopien der G→T SNP an Position 2576 der 23S rRNA nachgewiesen werden (67, 68, 70). In den hier beschriebenen Isolaten wurde das erste Mal für ein klinisches *E. faecium*-Isolat die vollständige Reversion der Linezolid-Resistenz sowohl phänotypisch und als auch genotypisch beschrieben (69).

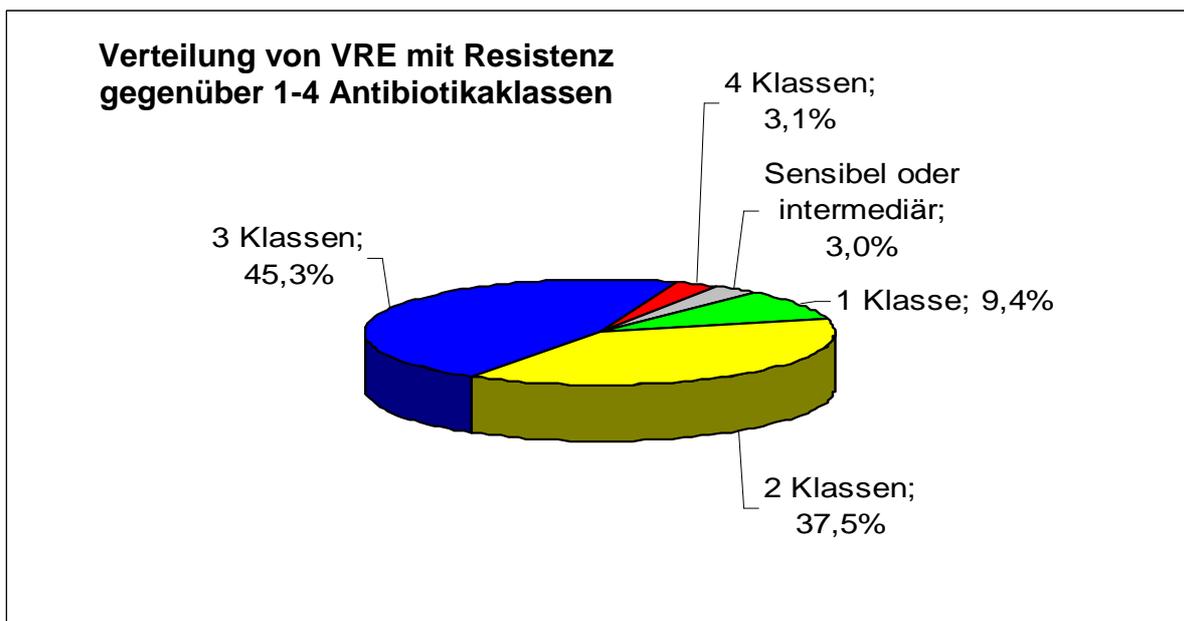
Durch den einfachen und eindeutigen Nachweis des G→T SNP an Position 2576 der 23S rRNA mit dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Pyrosequencing™-Assay werden Linezolid-resistente *Enterococcus* spp. Isolate zweifelsfrei identifiziert. Darüber hinaus können Isolate mit phänotypischer Empfindlichkeit, welche den G→T SNP an Position 2576 der 23S rRNA auf nur einer Gen-Kopie tragen und somit keine phänotypische Resistenz exprimieren können ebenso identifiziert werden. Dies ist, wie zuvor schon erwähnt, für die Erkennung einer möglichen rascheren Resistenzentwicklung gegenüber Linezolid wichtig und ermöglicht weiterhin eine Überwachung des Resistenzstatus während einer Therapie unter Linezolid, da sich durch homologe Rekombination eine Mutation zur Linezolid-Resistenz rascher ausbreiten könnte (67).

Neben der untersuchten Empfindlichkeit gegenüber den neuen, kürzlich für die Therapie zugelassenen Antibiotika Linezolid und Daptomycin und den bewährten Antibiotika Teicoplanin und Vancomycin, erfolgte eine Testung gegenüber dem sich noch in der Zulassung befindlichen Lipoglykopeptid Dalbavancin. Diese Substanz zeigt eine gute *in-vitro* Aktivität gegenüber Gram-positiven Erregern, wie z.B. MRSA (33, 152, 153). Eine weitere

Besonderheit von Dalbavancin ist die Halbwertszeit von 170-210 h, wodurch die für die Klinik interessante Option einer einmal wöchentlichen Gabe besteht (32). Vergleicht man die für Dalbavancin ermittelten MHK-Werte mit denen für die strukturell verwandten Glykopeptide Teicoplanin und Vancomycin, so zeigt Dalbavancin ein besseres Empfindlichkeitsprofil gegenüber den getesteten VRE Isolaten. So ist für alle drei getesteten Substanzen der Bereich der ermittelten MHK-Werte sehr weit (Dalbavancin:  $\leq 0,03$ ->32 mg/L, Teicoplanin:  $\leq 0,25$ -256 mg/L und Vancomycin: 4->256 mg/L), jedoch konnte nur für zwei VRE Isolate ein MHK-Wert über 32 mg/L von Dalbavancin gegenüber 14 VRE Isolaten bei Teicoplanin und 32 VRE Isolaten bei Vancomycin ermittelt werden. Somit konnte für Dalbavancin eine bessere Wirksamkeit als für Teicoplanin und Vancomycin gegenüber den getesteten VRE Isolaten gezeigt werden. Dieser Befund wird durch die geringeren  $MHK_{50}$ - und  $MHK_{90}$ -Werte für die getesteten Antibiotika gestützt. So liegt der  $MHK_{90}$ -Wert für Dalbavancin bei 32 mg/L, während Teicoplanin und Vancomycin jeweils einen  $MHK_{90}$ -Wert von 256 mg/L und >256 mg/L aufwiesen. Bei Einteilung der getesteten Antibiotika nach ihrer Wirksamkeit zeigt Dalbavancin die beste Wirksamkeit gefolgt von Teicoplanin und Vancomycin. Die Überlegenheit von Dalbavancin und Teicoplanin gegenüber Vancomycin erklärt sich durch den Wirkmechanismus der beiden Substanzen, welcher trotz einer Einteilung in unterschiedliche Substanzklassen sehr ähnlich ist. Durch Verankerung ihrer apolaren Seitenkette in die Zellmembran können Teicoplanin und Dalbavancin ihre Wirkung durch eine verlängerte Interaktionszeit verstärken (34, 35). Trotz der im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Unterschiede in der *in-vitro* Empfindlichkeit besitzen alle drei Antibiotika einen wichtigen Stellenwert in der Bekämpfung von lebensbedrohlichen Infektionen durch Gram-positiver Erreger und sollten wie die Substanzen Linezolid und Daptomycin weiterhin als Reserve-Antibiotika gelten. Gerade die Möglichkeit einer oralen Therapie mit Linezolid, die sicherlich einen enormen Vorteil bei der Therapie lebensbedrohlicher Infektion bietet, könnte dazu beitragen, dass eine Therapie mit Linezolid leichtfertig begonnen wird.

Weiterhin konnte bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten VRE Isolaten eine sehr hohe Unempfindlichkeit gegenüber Ampicillin gezeigt werden. So konnte bei einem Anteil von 92,3 % der getesteten Isolate eine Resistenz gegenüber Ampicillin ermittelt werden. Gleichzeitig zeigten 46,9 % der im Rahmen dieser Arbeit getesteten VRE Isolate gegenüber Gentamicin eine Hochresistenz, die eine kombinierte Therapie mit Ampicillin oder einem weiteren  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum ausschließt. Darüber hinaus wurde eine Kreuzresistenz gegenüber Ampicillin und Gentamicin in einem Anteil von 45,3 % der im Rahmen dieser getesteten VRE Isolate gezeigt.

Eine Untersuchung zum Erwerb multipler Resistenzen der untersuchten VRE Isolate gegenüber den Antibiotika Ampicillin, Gentamicin, Linezolid und Vancomycin als Vertreter ausgewählter Substanz-Klassen zeigte, dass 48,4 % der im Rahmen dieser Arbeit getesteten VRE Isolate gegenüber drei oder vier dieser Antibiotika-Klassen resistent sind (Abbildung 123).



**Abbildung 123** Verteilung der im Rahmen dieser Arbeit getesteten VRE Isolate mit Resistenzen gegenüber 1-4 Antibiotikaklassen: Der Anteil an Isolaten mit Resistenz gegenüber mindestens einem Vertreter der ausgewählten Klasse (Ampicillin, Gentamicin, Linezolid und Vanomycin) betrug 9,4 %, der Anteil gegenüber mindestens zwei Vertretern der ausgewählten Klasse lag bei 37,5 % und der Anteil gegenüber mindestens drei und vier Vertretern der ausgewählten Klassen lag bei 45,3 % und 3,1 %. Der Anteil an Isolaten mit multipler Antibiotika Resistenz, also Resistenz gegenüber mindestens drei Vertretern der ausgewählten Klassen lag bei 48,4 %:

Von diesen waren 62 Isolate gleichzeitig gegenüber Ampicillin, Gentamicin und Vancomycin resistent (Amp<sup>R</sup>-Gen<sup>R</sup>-Van<sup>R</sup>-Muster).

Die Ergebnisse der durchgeführten Empfindlichkeitsprüfung zeigt, dass die Reserve-Antibiotika Daptomycin und Linezolid für die Therapie Vancomycin-resistenter *Enterococcus* spp. eine sehr wichtige Rolle spielen. Dies wird durch die bisher sehr geringe Resistenz gegenüber Linezolid und die vollständige Empfindlichkeit gegenüber Daptomycin verdeutlicht.

Für die weitere Verwendung von Daptomycin als Reserve-Antibiotikum erweist sich als günstig, dass für diese bisher als unempfindlich gegenüber Daptomycin eingestufte Isolate eher von einer eingeschränkten Empfindlichkeit als von einer Resistenz ausgegangen werden sollte (91, 92, 94-96, 154). Der Wirkmechanismus von Daptomycin (5, 153) bietet zwar wenig Möglichkeiten für die Entwicklung von Resistenzen, jedoch konnten auf molekularer

Ebene Veränderungen an *in-vitro* erzeugten Daptomycin-resistenten *S. aureus* Isolaten gezeigt werden, die als mögliche Ursache für die Unempfindlichkeit oder Resistenz gelten könnten (98). Somit sollte der Einsatz von Daptomycin in der Klinik bei Infektionen durch Gram-positive Erreger nur dann erfolgen, wenn keine weiteren Möglichkeiten der Therapie möglich sind. Weiterhin ist jedoch ebenso wichtig, die genaue molekulare Ursache für die Unempfindlichkeit der in der Literatur beschriebenen Isolate zu kennen, um Möglichkeiten für Strategien zur Umgehung dieser Unempfindlichkeit zu schaffen.

Für die Resistenzentwicklung gegenüber Linezolid erweist sich zum einem günstig, dass eine klinisch und phänotypisch relevante Resistenz erst nach langer Therapiedauer, vorhergegangener Anwendung zahlreicher verschiedener Antibiotika (65, 68, 155) und bedingt durch die homologe Rekombination sehr langsam erfolgt (67). Dagegen scheint das Auftreten einer Infektion mit LRE durch eine Übertragung von Patient zu Patient begünstigt zu werden, so dass bei Auftreten einer Infektion mit Linezolid-resistenten Erregern Isolierungsmaßnahmen zwingend erforderlich sind (155). Besorgniserregend ist das Auftreten von Isolaten mit Linezolid-Resistenz, deren molekulare Ursache nicht in dem Vorhandensein des G→T SNP an Position 2576 der 23S rRNA liegt. Vielmehr wurden zunächst *S. aureus* Isolate mit Linezolid-Resistenz beobachtet, deren Resistenz gegenüber Linezolid durch die Expression einer *cfr*-Methyltransferase (chloramphenicol-florfenicol-resistance) bedingt ist (156-158). Dieses Plasmid-codierte Gen, welches für diese *cfr*-Methyltransferase codiert, war zuvor bei Resistenzen gegenüber Chloramphenicol und Lincosaminen identifiziert worden und spielte eine Rolle bei *S. aureus* und *E. coli* Isolaten, welche aus Tieren isoliert worden waren (159, 160). Die exprimierte *cfr*-Methyltransferase modifiziert das Adenin an Position 2503 in der ribosomalen 23S rRNA, wodurch eine Resistenz gegenüber zahlreichen wichtigen chemisch nicht verwandten Antibiotikaklassen vermittelt wird. Diese erfolgt durch verminderte Affinität der Substanzen zum aktiven Zentrum der Peptidyltransferase. Zu den Substanzklassen mit verminderter Aktivität durch Expression dieser *cfr*-Methyltransferase gehören Chloramphenicol, die Lincosamine (z.B. Clindamycin), die Oxazolidinone (z.B. Linezolid), die Pleuromutiline und die Streptogramine der Gruppe A. Besonders die Lokalisation des Resistenzgens auf einem Plasmid könnte sich als besonderes Problem erweisen, da dadurch die Verbreitung der genetischen Information leichter erfolgen kann, und sich folglich eine Resistenz rascher und möglicherweise sogar über *Species*-Grenzen hinaus ausbreiten kann.

Es bleibt somit abzuwarten, wie sich der Trend der Resistenzentwicklung gegenüber Linezolid verhält und ob in Zukunft neben dem bisher am häufigsten beobachteten Resistenz-

Mechanismus, dem Vorhandensein des G→T SNP an Position 2576 in der 23S rRNA, das Gen für die Expression der *cfr*-Methyltransferase vermehrt in Linezolid-resistenten Gram-positiven Erregern gezeigt werden kann.

### **3 Untersuchungen zur Entwicklung eines Pyrosequencing<sup>TM</sup>-basierten Nachweisverfahrens für die durch *erm*-codierte rRNA-Methyltransferasen katalysierte Dimethylierung des Adenins an Position 2058 der 23S rRNA in *S. aureus***

Ein weiterer Teil dieser Arbeit war die Entwicklung eines Pyrosequencing<sup>TM</sup>-basierten Nachweisverfahrens, um den Grad der Dimethylierung des Adenins an Position 2058 der 23S rRNA in *S. aureus* durch die Enzyme der Familie der *erm*-codierten rRNA-Methyltransferasen zu detektieren und zu quantifizieren.

Mit der Hilfe der neuartigen Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Technologie sollte die etablierten Methoden zur Detektion der Dimethylierung (125, 126), wie Quantifizierung der gewonnenen cDNA-Fragmente nach Auftrennung in einem Polyacrylamid-Gel, im Hinblick auf die Durchführung und auch Sicherheit für den Anwender verbessert werden. So sollte die Auftrennung der gewonnenen cDNA-Fragmente durch ein Polyacrylamid-Gel entfallen. Dies hätte in der Hinsicht den entscheidenden Vorteil, dass keine für die Herstellung eines Polyacrylamid-Gels nötigen gesundheitsschädlichen, neurotoxischen Acrylamid-Lösungen verwendet werden müssten. Weiterhin wäre die Auftrennung der Proben durch die Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Technologie bei einem Probendurchsatz von 96 Proben in 10 Min. gegenüber einer kleineren Probenanzahl in Abhängigkeit der Größe des verwendeten Polyacrylamid-Gels wesentlich schneller. Außerdem entfällt durch die Verwendung eines am 5'-Ende mit Biotin markierten Primers, der Einsatz eines am 5'-Ende radioaktiv markierten Primers, wodurch einerseits die Durchführung in einem gewöhnlichen Labor ohne besondere Ausstattungsmerkmale möglich wäre und andererseits das gesundheitliche Risiko enorm gesenkt werden würde.

So konnte durch die durchgeführten Arbeiten gezeigt werden, dass es mit Hilfe der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Technologie möglich ist, die Dimethylierung des Adenins an Position 2058 der 23S rRNA in *S. aureus* zu detektieren. Dazu wurde zuvor die Spezifität der entwickelten Primer und die optimale Menge des einzusetzenden Primers während der RT-Reaktion bestimmt. Weiterhin wurden die Unterschiede in der Verwendung von 2'-Desoxynukleotiden und 2',3'- Didesoxynukleotiden bei der Durchführung der Primer-Extension-Reaktion untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass für eine Detektion der

Dimethylierung des Adenins an Position 2058 der 23S rRNA in *S. aureus* die Verwendung von 2',3'-Dideoxynukleotiden während der Primer-Extension-Reaktion notwendig ist.

Für die Untersuchung zur Quantifizierung der Dimethylierung des Adenins an Position 2058 der 23S rRNA mit Hilfe der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Technologie wurden verschiedene Sequenzier-Primer und Dispensationsfolgen während der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Reaktion verwendet. Die Ergebnisse dieser Messungen haben gezeigt, dass eine Quantifizierung mit Hilfe der verwendeten Sequenzier-Primer nicht möglich ist (Abbildungen 84 bis 90 und Abbildungen 95 bis 106). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich der im Überschuss vorhandene Primer bei allen Messungen für die Auswertung als hinderlich erweist.

Eine Möglichkeit für die Untersuchung zur Quantifizierung ist die Verwendung von entsprechenden 2'-Desoxynukleotiden mit einer Biotin-Markierung während der Primer-Extension-Reaktion anstelle des am 5'-Ende Biotin-markierten Primers. Der Vorteil liegt in der Möglichkeit, den während der Primer-Extension-Reaktion im Überschuss verwendeten und die weiteren Messungen störenden Primer durch Aufreinigung mit Streptavidin vollständig zu entfernen. Somit verbleiben nur die gebildeten cDNA-Fragmente im weiter zu untersuchenden Ansatz. Bei 2'-Desoxynukleotiden mit Biotin-Markierung erfolgt die Konjugation des Biotin durch einen 14 C-Atome langen Spacer. Der Abstand, der durch diesen Spacer geschaffen wird, ermöglicht die Bindung von Biotin an Streptavidin bei der späteren Aufreinigung. Jedoch werden die während der Primer-Extension-Reaktion eingesetzten, nicht eingebauten mit Biotin markierten 2'-Desoxynukleotide ebenfalls bei der Aufreinigung in den Ansatz der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Reaktion überführt. Diese würden dann durch Einbau in das zu untersuchende cDNA-Fragment während der folgenden Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Reaktion stören und ein nicht auswertbares Ergebnis liefern. Weiterhin ist es denkbar, dass die Biotin-Gruppe schon während der Primer-Extension-Reaktion die cDNA-Fragment-Bildung beeinträchtigt. So könnte ein durch den Einbau eines 2'-Desoxynukleotids mit Biotin-Markierung verursachter Abbruch der Primer-Extension-Reaktion, das erwartete Ergebnis empfindlich verfälschen. Dies wäre besonders dramatisch, da unter Umständen zu erwarten wäre, dass der Abbruch der Primer-Extension-Reaktion rein zufällig erfolgen würde und somit selbst bei einer Mehrfachbestimmung eine statistisch nicht signifikante Abweichung erfolgen würde. Außerdem muss die Frage geklärt werden, ob die in den während der Primer-Extension-Reaktion gebildeten cDNA-Fragmenten vorhandene Biotin-Gruppe die Aktivität der Polymerase während der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Reaktion beeinträchtigen könnten.

Die gesammelten Ergebnisse haben für die weitere Fortentwicklung des Nachweisverfahrens einen Stellenwert, als dass auf unnötige noch durchzuführende Experimente verzichtet werden kann, besonders im Hinblick auf die Verwendung teurer Enzyme und Substrate wie z.B. der Reversen-Transcriptase. Weiterhin konnten Erkenntnisse für die Anwendung der Allelquantifikation beim Pyrosequencing gewonnen werden.

Die weiterhin durchgeführten Experimente, zum Nachweis der während der Primer-Extension-Reaktion gebildeten cDNA-Fragmente unter Verwendung eines am 5'-Ende 6-FAM-markierten Primers haben eine mögliche Alternative aufgezeigt. Es konnte gezeigt werden, dass für die Quantifizierung der während der Primer-Extension-Reaktion gebildeten cDNA-Fragmente (am 5'-Ende mit 6-FAM markiert) durch ein Polyacrylamid-Gel die Nachweisgrenze zu gering ist.

Eine interessante, weitere Option ergibt sich aus dem durchgeführten Ansatz, mit dessen Hilfe die während der Primer-Extension-Reaktion gebildeten cDNA-Fragmente (5'-6-FAM-markiert) durch eine Kapillar-Elektrophorese aufgetrennt werden sollten. Auch hier zeigte sich der im Überschuss vorhandene Primer der Primer-Extension-Reaktion für die Auswertung als hinderlich, da der Peak die nachfolgenden Peaks stark überlagerte. Die eingesetzten Oligonukleotide waren jedoch auf die Bedürfnisse der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Technologie abgestimmt und sollten eine möglichst kurze Basenpaar-Länge besitzen, um z.B. die Bildung von Sekundär-Strukturen zu verhindern, wodurch die Überlagerung zu Stande kam.

Ein neues Primer-Design, welches völlig losgelöst von den Anforderungen der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Technologie (möglichst kurze cDNA-Fragmente) wäre, würde somit auch die Bildung und auch die anschließende Auftrennung wesentlich längerer cDNA-Fragmente durch die Methode der Kapillar-Elektrophorese ermöglichen. Somit könnte durch einen ausreichenden Abstand zwischen dem verwendeten Primer und der Position des Abbruchs der Primer-Extension-Reaktion die Überlagerung der Peakflächen verhindert werden. Auf diese Weise wären somit ein Nachweis und eine Quantifizierung der Dimethylierung unter Verwendung eines geeigneten Standards während der Kapillar-Elektrophorese möglich.

## 4 Untersuchung von MRSA Isolaten mit Linezolid-Resistenz

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten MRSA Isolate beschreiben die ersten in Deutschland isolierten MRSA-Stämme mit Linezolid-Resistenz (161). Wie auch bei den in der Literatur zuvor beschriebenen Fällen von Linezolid-Resistenz (70, 162, 163), zeigte sich diese nach einer lang anhaltenden Therapie mit Linezolid.

Die langsame Entwicklung einer Resistenz gegenüber Linezolid ist durch den schrittweisen Mechanismus des Auftretens von klinisch relevanten Mutationen gegeben, so dass für die Ausbildung eines gegenüber Linezolid resistenten Phänotyps das Vorhandensein des G→T SNP an Position 2576 auf der Mehrzahl der Kopien des Gens der 23S rRNA notwendig ist. Somit stellt die Therapie mit Linezolid über einen längeren Zeitraum einen offensichtlichen Risikofaktor für die Ausbildung einer Resistenz gegenüber diesem Antibiotikum dar. Ebenso scheint neben der Exposition mit Linezolid auch eine Übertragung von Patient zu Patient eine wichtige Rolle bei der Übertragung von Infektion mit Linezolid-resistenten nosokomialen Erregern zu spielen (155).

Berücksichtigt man die enorme Wichtigkeit der Erkennung und Eingrenzung von Infektionen mit Linezolid-resistenten Erregern, welche für lebensbedrohliche Erkrankungen verantwortlich sein können, für den effizienten Betrieb eines Krankenhauses, so sind zuverlässige und robuste Methoden zur Detektion einer klinisch relevanten phänotypischen Resistenz gegenüber Linezolid unverzichtbar.

Der häufig in der Routine-Diagnostik verwendete Agar-Diffusions-Test könnte dabei bei der Detektion der Linezolid-Resistenz kein eindeutiges Ergebnis liefern. Linezolid-resistente Stämme können innerhalb des Hemmhofes um das mit Antibiotikum präparierte Plättchen ein schwaches Wachstum zeigen, welches bei der Interpretation der Testung zu einem falschen Ergebnis führen könnte (70). Bei der Untersuchung der MRSA Isolate im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Beobachtung ebenfalls gemacht. Eines der Isolate (*S. aureus* VA10260/05) war im Institut für Infektionsmedizin des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf mit Hilfe des Agar-Diffusions-Tests untersucht und als Linezolid-empfindlich eingeschätzt worden. Eine weitere Untersuchung der Empfindlichkeit gegenüber Linezolid durch Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration nach der Mikrodilutionsmethode hingegen ergab einen MHK-Wert von 32 mg/L und somit eine eindeutige Unempfindlichkeit gegenüber Linezolid. Daher sollte die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration nach

der Mikrodilutionsmethode für die Empfindlichkeitstestung gegenüber Linezolid in der Routine als Standard diskutiert werden.

Darüber hinaus wurde mit Hilfe des VITEK 2 Advanced Expert System (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) ebenfalls im Rahmen der Arbeit eine Untersuchung am Institut für Infektionsmedizin des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Dabei wurden die Isolate durch das Expertensystem als empfindlich eingestuft, obwohl MHK-Werte von  $\geq 8$  mg/L ermittelt wurden. Diese Beobachtung zeigt deutlich, dass bei der Verwendung von automatischen Test-Systemen, wie des verwendeten VITEK 2 Advanced Expert System, eine nachträgliche Interpretation der automatisch generierten Ergebnisse zwingend notwendig ist.

Die Stabilität der phänotypischen Linezolid-Resistenz *in-vitro* und *in-vivo* ist derzeit ein sehr kontrovers diskutiertes Thema. Eine Untersuchung zeigte, dass der Erwerb des G→T SNP an Position 2576 in der 23S rRNA zu keinem phänotypischen Defizit des Wachstums *in-vitro* führte und dieser Resistenz-Phänotyp auch über mehrere Passagen stabil blieb (164). Weitere Arbeiten mit Linezolid-resistenten Stämmen zeigten, dass die untersuchten Isolate ohne Selektionsdruck in Abwesenheit von Linezolid sich innerhalb von sieben bzw. zwei Monaten zu einem Linezolid-sensiblen Phänotyp zurückentwickeln konnten (70, 163). Weiterhin wurde im Rahmen der erwähnten Untersuchungen eine *in vitro*-Studie durchgeführt, welche zeigen konnte, dass der gegenüber Linezolid-resistente Phänotyp nach 60 Passagen sich als instabil erwies (70).

Die Unterschiede zwischen der *in-vitro* und *in-vivo* Stabilität in den erwähnten Untersuchungen wurden mit dem Vorhandensein und der Abwesenheit von Wild-Typ Sequenzen auf den untersuchten Gen-Kopien der 23S rRNA erklärt, welche für die Zurückentwicklung zu einem gegenüber Linezolid sensiblen Phänotyp durch homologe Rekombination der Genabschnitte notwendig zu sein scheint. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten MRSA Isolate mit Linezolid-Resistenz zeigten keine Veränderung des Resistenz-Phänotyps auch zwei Monate nach Ende der Therapie mit Linezolid.

Die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass das Auftreten einer Resistenz gegenüber Linezolid mit dem Verlust der Resistenz gegenüber den Substanzen der Klasse der Makrolide verbunden sein kann (165, 166). Weiterhin wurden auch Linezolid-resistente MRSA-Stämme isoliert, welche gegenüber den Makroliden sensibel blieben (70, 162).

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten MRSA Isolate mit Linezolid-Resistenz verloren ebenfalls mit dem Erwerb des G→T SNP an Position 2576 in der 23S rRNA ihre Resistenz gegenüber Makroliden, wie es zuvor in der Literatur beschrieben worden war.

Interessanterweise konnte ein Zwischen-Isolat untersucht werden (*S. aureus* VA10260/05), welches einen Linezolid-resistenten Phänotyp aufweisen konnte, jedoch weiterhin Makrolid-resistent war.

Die weiteren genaueren Untersuchungen der isolierten MRSA-Stämme mit Linezolid-Resistenz zeigte dabei ein sehr interessantes Bild. Für die beiden zuerst isolierten Stämme *S. aureus* VA39140/05 und VA10260/05, welche beide eine Makrolid-Resistenz aufwiesen, konnten die für die Expression der Makrolid-Resistenz verantwortlichen Gene *ermA* und *ermC* nachgewiesen werden. Für die folgenden vier Isolate konnte jedoch nur das für die Expression der Makrolid-Resistenz verantwortliche *ermA*-Gen nachgewiesen werden, jedoch nicht das *ermC*-Gen. Dies ist sehr verwunderlich, da diese Isolate trotz des positiven Nachweises des *ermA*-Gens gegenüber Makroliden empfindlich sind. Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte die überwiegend Plasmid-codierte Expression des *ermC*-Gens sein. Die Aneignung der Linezolid-Resistenz zusätzlich zur der Resistenz gegenüber den Makroliden könnte sich für das Wachstum des Stammes als nachteilig erweisen. Der Verlust des Plasmids mit der genetischen Information für die *ermC*-vermittelte Makrolid-Resistenz stellt möglicherweise einen Versuch des Bakteriums dar, sich dieses Nachteils zu entledigen. Die Untersuchung der Wachstumsgeschwindigkeit der isolierten MRSA-Stämme stützt diese Vermutung. Der zuerst isolierte Stamm *S. aureus* VA39140/05 mit Empfindlichkeit gegenüber Linezolid zeigte eine Generationszeit  $\nu = 22$  Min. und trug gleichzeitig das *ermA*- und *ermC*-Gen. Das folgende Isolat *S. aureus* VA10260/05 mit Unempfindlichkeit gegenüber Linezolid hingegen zeigte eine Generationszeit  $\nu = 25$  Min. und trug ebenfalls das *ermA*- und *ermC*-Gen und zeigte somit ein geringfügig langsameres Wachstum. Das folgende Isolat *S. aureus* VA19213/05 mit Linezolid-Resistenz und Makrolid-Empfindlichkeit hingegen zeigte eine gleiche Generationszeit  $\nu = 22$  Min. wie das Isolat *S. aureus* VA39140/05, trug jedoch nur das *ermA*-Gen (Tabelle 97).

Weiterhin sollte geklärt werden, wieso für die zeitlich nach dem Isolat *S. aureus* VA10260/05 isolierten Stämme trotz des Nachweises des *ermA*-Gens Empfindlichkeit für Makrolide nachgewiesen wurde. Durch Sequenzierung des Transposon 554 (Tn554) in *S. aureus* sollte dabei diese Region auf mögliche strukturelle Veränderungen, wie z. B. Deletionen, Insertionen und Punkt-Mutationen in der Regulator-Region des *ermA*-Gens untersucht werden, wodurch eine, wie zuvor in der Literatur beschrieben, veränderte phänotypische Expression des Gens bewirkt werden könnte (52, 54, 167-169). Die beobachtete Reversion der Resistenz gegenüber Makroliden könnte daher auch durch eine veränderte attenuierte Translation des *ermA*-Gens verursacht sein. Dabei konnte in allen untersuchten *S. aureus*

Isolaten VA39140/05, VA10260/05 und 19213/05 keine Unterschiede untereinander gezeigt werden, jedoch für alle Isolate gemeinsam Veränderungen vor der Shine-Dalgarno-Region (Tabelle 100). Diese Veränderungen könnten bewirken, dass das *ermA*-Gen bei allen Isolaten auch schon vor Erwerb der Linezolid-Resistenz bereits nicht korrekt exprimiert wird. Somit ist es wahrscheinlich, dass für die Makrolid-Resistenz bei allen Isolaten allein das Plasmid-codierte *ermC*-Gen verantwortlich ist. Durch den möglichen weiteren Verlust des Plasmids mit der genetischen Information für die Expression des *ermC*-Gens wird auch die *ermC*-vermittelte Makrolid-Resistenz nicht mehr exprimiert. Somit ist der im Rahmen dieser Arbeit gezeigte Zusammenhang zwischen Linezolid und Makrolid-Resistenz vielleicht ein zufälliger Befund ohne Zusammenhang. Zur genauen Beantwortung dieser Fragestellung wäre eine genaue systematische Analyse nach mechanistischer, epidemiologischer, bzw. klinischer Ursache, wie z. B. Selektionsbedingungen, nötig.

Das Auftreten des Isolates *S. aureus* VA10260/05 mit gleichzeitiger Linezolid- und Makrolid-Resistenz könnte jedoch ebenfalls die Entstehung der Resistenz gegenüber Linezolid über einen zweistufigen Prozess erklären, bei dem zunächst die Resistenz gegenüber Linezolid auftritt und erst im späteren Verlauf die bereits existierende Resistenz gegenüber der Substanzklasse der Makrolide verloren geht.

Zusammengefasst zeigen die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten MRSA Isolate mit Linezolid-Resistenz, dass der Einsatz von Linezolid weiterhin restriktiv erfolgen sollte und eine Überwachung der Resistenz vor und während der Therapie unverzichtbar für die erfolgreiche Anwendung von Linezolid ist.

## F Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Empfindlichkeits-Untersuchung muss in drei Teilabschnitte untergliedert werden. Zum einem die Untersuchung der über drei Jahre gesammelten klinischen Isolate aus dem Routine-Labor, sowie zum anderen die Empfindlichkeitsprüfung der *Enterococcus* spp. Isolate mit phänotypischer Vancomycin-Resistenz. Als dritten Teil sollte man die Isolierung der MRSA Isolate mit phänotypischer und genotypischer Linezolid-Resistenz betrachten.

Für alle drei Abschnitte bleibt die Beobachtung, dass das Auftreten von Resistenzen gegenüber neuen Reserve-Antibiotika wie Linezolid und multipler Resistenzen gegenüber verschiedener Antibiotika-Substanzklassen ein schwerwiegendes Problem in der Behandlung von nosokomialen Infektionen darstellt. Diese Beobachtung erfordert somit den rationalen Einsatz von Antibiotika nach vorheriger Empfindlichkeitstestung und folglich der raschen und preisgünstigen Resistenzdetektion. Ist keine Empfindlichkeitstestung möglich, da eine rasche initiale Therapie erforderlich ist, so sollte nach den Empfehlungen anerkannter Fachgesellschaften bis zum Ergebnis einer Empfindlichkeitsprüfung therapiert werden (100, 101). Die derzeitige ungünstige Entwicklung, dass einem zunehmend wachsenden und immer komplexer strukturierten Feld der Antibiotika-Resistenz eine immer geringere Anzahl an neuen, innovativen Antibiotika gegenübersteht, unterstreicht diese Aussage.

So bleibt für den ersten Teil der Arbeit, der Empfindlichkeitsprüfung der klinischen Isolate aus dem Routine-Labor als Ausblick eine Weiterführung der Untersuchung für weitere drei Jahre wünschenswert, um somit die Möglichkeit einer weiteren Trendentwicklung aufzuzeigen. Weiterhin stellt die Erweiterung des zu testenden Panels um das neue Antibiotikum Tigecyclin (Tygacil®) eine viel versprechende Option dar. Dabei sollten außerdem etablierte Tetracycline wie Tetracyclin, Doxycyclin und Minocyclin in die Testung mit einbezogen werden. Besonders auf das Minocyclin als Entwicklungsvorstufe des Tigecyclins sollte ein Augenmerk gelegt werden. Weiterhin wäre eine detaillierte Untersuchung der klinischen Isolate bezüglich ihrer MRSA-Typisierung interessant. Eine Unterscheidung zwischen ha-MRSA und ca-MRSA ist eine interessante Fragestellung und würde die Aussagekraft der Daten steigern. Dabei könnte der Nachweis des Panton-Valentin-Leukozidin-Gens (PVL-Gen) mit Hilfe einer PCR erfolgen, dessen Vorhandensein mit der verstärkten Virulenz der ca-MRSA in Verbindung gebracht wird (26). Gleichzeitig könnte eine zusätzliche Empfindlichkeitsprüfung gegenüber Fusidinsäure erfolgen, da das Auftreten einer Infektion durch einen ca-MRSA ebenfalls durch eine Resistenz gegenüber Fusidinsäure

charakterisiert ist (170) und somit eine Unterscheidung gegenüber einem ha-MRSA möglich wäre.

Die aufgeführten Überlegungen zur Testung mit Tigecyclin gelten ebenfalls für die untersuchten *Enterococcus* spp. Isolate mit phänotypischer Vancomycin-Resistenz. Eine Empfindlichkeitstestung gegenüber Tigecyclin bei *Enterococcus* spp. Isolaten mit charakterisierter Vancomycin-Resistenz würde sehr interessante Aussagen über dessen Einsatz bei *Enterococcus* spp. Isolaten erlauben, da Tigecyclin nur für die Therapie von Vancomycin-sensiblen *E. faecalis* Isolaten zugelassen ist.

Ebenfalls von großem Interesse wäre die gleichzeitige Untersuchung der in beiden Teilabschnitten untersuchten Kollektive bezüglich des Zusammenhangs der Linezolid-Resistenz und dem Nachweis des *cfr*-Gens in den gefundenen Linezolid-resistenten Isolaten. Dieses Gen kommt als eine weitere Resistenzursache durch die Expression einer 23S rRNA Methyltransferase gegenüber Linezolid in Betracht (156) wobei bisher das *cfr*-Gen nur sehr selten in *S. aureus* nachgewiesen werden konnte. Durch die mögliche plasmid-gebundene Übertragung erscheint jedoch eine vereinfachte Verbreitung nicht ausgeschlossen. Eine interessante Fragestellung ist, welches Ausmaß die Linezolid-Resistenz bei gleichzeitigem Vorkommen des *cfr*-Gens und des G→T SNP an Position 2576 in der 23S rRNA hat.

Es bleibt für den Nachweis der Dimethylierung des Adenins an Position 2058 in der 23S rRNA, die gewonnenen Ergebnisse für die Optimierung der Methode zu verwenden. So erscheint es aussichtsreich, die während der Primer-Extension-Reaktion gewonnenen cDNA-Fragmente mit Hilfe der Kapillar-Elektrophorese und Verwendung eines neu entwickelten am 5'-Ende 6-FAM-markierten Primers, aufzutrennen.

Für die untersuchten MRSA Isolate mit Linezolid-Resistenz ergeben sich als weitere mögliche Fragestellung der gefundene, nicht genau zu erklärende Zusammenhang zwischen Makrolid-Empfindlichkeit und Linezolid-Resistenz. Dabei stellt sich die Frage, ob das Auftreten des beobachteten Resistenz-Phänotyps kausal verknüpft ist, entweder durch den G→T SNP an Position 2576 in der 23S rRNA oder durch die eventuelle Expression des *cfr*-Gens und der damit verbundenen Dimethylierung des Adenins an Position 2503 der 23S rRNA. In beiden Fällen könnte eine strukturelle Veränderung der Bindungsregion für die Makrolide durch veränderte Sekundärstrukturen die Folge sein, welche zu einer besseren Bindungsaffinität der Makrolide und somit zur Empfindlichkeit führt. Gleichzeitig könnten aber auch die gefundenen Veränderung in der Regulatorregion des *ermA*-Gens zu einer Inaktivierung des *ermA*-Gens führen und der mögliche Verlust des Plasmids mit der genetischen Information für das *ermC*-Gen somit zu einer Inaktivierung der Makrolid-

Resistenz führen. In beiden Fällen müsste durch eine strukturelle Untersuchung (Modelling) die Bedeutung der gefunden strukturellen Veränderungen in der Regulator-Region des *ermA*-Gens untersucht und experimentell überprüft werden.

Gleichzeitig müsste die Rolle der Plasmid-codierten *ermC*-vermittelten- und chromosomal-codierten *ermA*-vermittelten Makrolid-Resistenz untersucht werden. Dabei gilt es zu untersuchen, welche Hierarchie bei gleichzeitiger Präsenz zweier verschiedener *erm*-codierter rRNA-Methyltransferasen die Expression beider Gene unterliegt. Im Fall der Expression nur eines Gens könnte der Verlust der Makrolid-Resistenz und der Erwerb der Linezolid-Resistenz zwei zufällige Ereignisse sein. Für eine genauere Untersuchung ist es jedoch notwendig, die plasmid-codierte *ermC*-vermittelte Makrolid-Resistenz durch eine Charakterisierung des Plasmids zu untersuchen und durch Ausschaltung des *ermC*-Gens und anschließender Transformation zurück in den Organismus den Zusammenhang zu beweisen oder zu widerlegen.

Die Arbeit der Gruppe um Sakoulas konnte zeigen, dass nach Transformation eines Linezolid-resistenten MRSA-Stamm mit einem Plasmid, welches das *ermC*-Gen trägt, die Linezolid-Empfindlichkeit nicht wieder hergestellt wird (171).

## G Zusammenfassung

Die Gram-positiven Erreger *S. aureus* und *Enterococcus* spp. gelten als eine häufigsten Ursachen für schwere Infektion wie z.B. Infektionen der Blutwege bei hospitalisierten Patienten (23). Der zunehmende Selektionsdruck in Krankenhäusern hat für nahezu allen Antibiotikaklassen gegenüber allen wichtigen Erregern zur Ausbildung von Resistenzen geführt (172), wobei in der Zukunft durch die fehlende Entwicklung neuer, innovativer Antibiotika die Bekämpfung von Infektionen sicherlich immer schwieriger werden wird (173).

Die durchgeführten Untersuchungen zur Entwicklung eines Pyrosequencing<sup>TM</sup>-basierten Nachweisverfahrens der Dimethylierung des Adenins an Position 2058 der 23S rRNA zeigen, dass die Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Technologie zur Detektion der Dimethylierung geeignet ist. Weiterhin konnten für die Quantifizierung der Dimethylierung wichtige Kenntnisse gewonnen werden. Dabei wurden verschiedene Sequenzier-Primer während der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Reaktion, sowie die Verwendung von 2'-Desoxynukleotiden und 2',3'-Dideoxynukleotiden während der Primer-Extension-Reaktion untersucht. Ebenso wurden alternative Methoden zur Detektion und Quantifizierung der Dimethylierung des Adenins an Position 2058 der 23S rRNA untersucht. Dabei ist die aussichtsreichste Möglichkeit die Auftrennung der nach einem neuen Primer-Design durch Primer-Extension gewonnenen cDNA-Fragmente mit Hilfe der Kapillar-Elektrophorese.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in-vitro* Empfindlichkeitsprüfungen an *S. aureus* -und *Enterococcus* spp. Isolaten liefern einen wertvollen Beitrag, da sie die lokale Resistenz-Lage an dem Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf zeitlich punktuell aufzeigen. Dabei wurde ein im Vergleich zu dem in der Routine-Diagnostik verwendeten Agar-Diffusions-Test detailliertes Bild durch die Bestimmung der MHK durch die Mikro-Dilutions-Methode erstellt. So wurden die für die Einschätzung der Resistenzlage wichtigen Parameter wie MHK<sub>50</sub>-und MHK<sub>90</sub>-Wert sowie die Spannweite der MHK-Werte ermittelt. Die über drei Jahre geführte Empfindlichkeits-Untersuchung zeigt somit für die in Deutschland verfügbaren Reserve-Antibiotika Daptomycin, Linezolid, Teicoplanin und Vancomycin ein günstiges Bild mit sehr geringen Resistenzraten für Linezolid, Teicoplanin und Vancomycin und einer vollständigen Empfindlichkeit für Daptomycin. Weiterhin wurde ein Anteil an MRSA Isolaten von 11,8 % sowie eine VRE-Rate von 3,4 % ermittelt. Das Auftreten von Resistenzen gegenüber Linezolid in 2,3 % der untersuchten *Enterococcus* spp. Isolate zeigt gleichzeitig, dass der Einsatz dieses Antibiotikums in Zukunft sehr restriktiv

erfolgen sollte. So ist es erforderlich eine Prüfung des Resistenzstatus gegenüber Linezolid auf molekularer Ebene vor und während der Therapie vorzunehmen. Dabei ist von besonderem Interesse der G→T SNP an Position 2576 in der 23S rRNA, für dessen schnelle Detektion im Rahmen dieser Arbeit ein Pyrosequencing<sup>TM</sup>-basiertes Nachweisverfahren entwickelt und angewandt wurde. Dabei wurde der erste klinische Fall eines MRSA Isolates mit Linezolid-Resistenz (161) sowohl genotypisch als auch phänotypisch und auf einen möglicher Zusammenhang des Verlustes der Makrolid-Resistenz und der Aneignung der Linezolid-Resistenz in *S. aureus* untersucht. Dabei gilt es in der Zukunft zu klären, ob die gefundenen Veränderungen in der Regulatorregion des *ermA*-Gens und der mögliche Verlust des Plasmids mit der genetischen Information für das *ermC*-Gen von Bedeutung sind.

Weiterhin wurde die bisher noch nicht beschriebene genotypische Veränderung eines Vancomycin und Linezolid-resistenten *E. faecium* Isolates zurück zur vollständigen genotypischen Sensibilität mit Hilfe des entwickelten Pyrosequencing<sup>TM</sup>-basierten Nachweisverfahrens untersucht (69). Durch die Ergebnisse dieser Untersuchungen, aber auch die Isolierung eines phänotypisch gegenüber Linezolid unauffälligen *E. faecium* Isolates mit genotypischer Prädisposition, welche zu einer möglichen rascheren Resistenzentwicklung gegenüber Linezolid führen könnte, konnte die enorme Wichtigkeit der schnellen und korrekten Detektion der Linezolid-Resistenz gezeigt werden. Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Assay zur Bestimmung des G→T SNP an Position 2576 in der 23S rRNA mit Hilfe der Pyrosequencing<sup>TM</sup>-Technologie hat sich zur Beantwortung dieser Fragestellung als sehr zuverlässig erwiesen.

## H Summary

The pathogen bacteria *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* spp. are the most common cause of bloodstream-infections in hospitalized patients (23). Increasing selective pressure has resulted in resistance to nearly all clinically relevant classes of antibiotics for almost all important bacteria associated with noscomial infections (172). Thus in the near future the appropriate therapy of those infections will presumably become more difficult, as development of new, innovative antibiotics for the successful treatment of nosocomial infections is lacking (173).

The studies conducted for establishing a pyrosequencing<sup>TM</sup>-based detection of the dimethylation of the adenine at position 2058 in the 23S rRNA demonstrated the potential to detect the dimethylation. Furthermore the applied work for developing a pyrosequencing<sup>TM</sup>-based approach to detect and quantify the dimethylation provides useful information for further investigations. So various sequencing-primers for the pyrosequencing<sup>TM</sup>-reaction as well as the application of 2'-desoxynucleotides and 2',3'-dideoxynucleotides during the primer-extension-reaction were tested. At last alternative ways for the detection and quantification of the dimethylation of the adenine at position 2058 in the 23S rRNA were tested. The most promising way should be the separation by capillar electrophoresis of the primer-extension-reaction produced cDNA-fragments with prior development of a new 5'-6-FAM-labeled primer.

Present result of the *in-vitro* susceptibility-testing provide data on local status of resistance at the University Medical-Center of Hamburg-Eppendorf in Germany. During this work used microbroth dilution in contrast to in routine-diagnostics commonly used agar-diffusion test provided much more differentiated results. Thus for the evaluation of resistance the MIC<sub>50</sub>-values and MIC<sub>90</sub>-values as well as range were determined. The data being collected during the *in-vitro* susceptibility-testing for three years show an optimistic perspective for the last-line antibiotics available in Germany (daptomycin, linezolid, teicoplanine and vancomycin), with low rates of resistance for linezolid, teicoplanine and vancomycin and complete susceptibility for daptomycin. Furthermore a resistance rate of 11,8 % for MRSA and 3,4 % for VRE could be detected.

The emergence of resistance against linezolid (2,3 % of the analyzed isolates of *Enterococcus* spp. showed resistance towards linezolid) points out the need for restrictive application of this last-line antibiotic. Furthermore the state of resistance should be analyzed very carefully before and during the treatment with linezolid. For this question a pyrosequencing<sup>TM</sup>-based

assay to detect the G→T SNP at position 2576 in the genes encoding for the 23S rRNA has been developed and applied. During this thesis the first case of a linezolid-resistant MRSA Isolate (161) has been successfully analyzed genotypically and phenotypically, as well as the connection between the loss of resistance to the classes of macrolides and the acquisition of resistance to linezolid. For further studies, notably the role of the finding of genetic changes in the regulatory region of the *ermA*-gene and a proposed loss of the plasmid harbouring the genetic information for the *ermC*-gene should be analyzed further.

The molecular characterization of a novel genotype, i.e. the reversion of vancomycin and linezolid resistance to complete susceptibility in an *E. faecium* isolate (69) have been analyzed. Furthermore the identification of a phenotypically susceptible but genotypically affected *E. faecium* isolate with the possibility of a much more rapid development of resistance to linezolid points out the great importance of the fast and reliable detection of resistance to linezolid with the pyrosequencing<sup>TM</sup>-based assay developed during this thesis.

## I Literaturverzeichnis

1. **Fleming, A.** 1980. Classics in infectious diseases: on the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae* by Alexander Fleming, Reprinted from the British Journal of Experimental Pathology 10:226-236, 1929. Rev Infect Dis **2**:129-39.
2. Classics in infectious diseases. A contribution to the chemotherapy of bacterial infections. Gerhard Domagk, 1935. 1986. Rev Infect Dis **8**:163-6.
3. **Lerner, P. I.** 2004. Producing penicillin. N Engl J Med **351**:524.
4. **Alanis, A. J.** 2005. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? Arch Med Res **36**:697-705.
5. **Tenover, F. C.** 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Am J Infect Control **34**:S3-10; discussion S64-73.
6. **Strahilevitz, J., and E. Rubinstein.** 2002. Novel agents for resistant Gram-positive infections--a review. Int J Infect Dis **6 Suppl 1**:S38-46.
7. **Philippon, A., R. Labia, and G. Jacoby.** 1989. Extended-spectrum beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother **33**:1131-6.
8. **Berger-Bachi, B.** 2002. Resistance mechanisms of gram-positive bacteria. Int J Med Microbiol **292**:27-35.
9. **Cohen, M. L.** 2000. Changing patterns of infectious disease. Nature **406**:762-7.
10. **Schwarz, S., and C. Kehrenberg.** 2006. Old dogs that learn new tricks: modified antimicrobial agents that escape pre-existing resistance mechanisms. Int J Med Microbiol **296 Suppl 41**:45-9.
11. **Alekshun, M. N., and S. B. Levy.** 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. Cell **128**:1037-50.
12. **Mazel, D.** 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. Nat Rev Microbiol **4**:608-20.
13. **Levy, S. B., and B. Marshall.** 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. Nat Med **10**:S122-9.
14. **Marre, R., T. Mertens, and M. Trautmann.** 2000. Klinische Infektiologie, 1st ed. Urban & Fischer Verlag, München.
15. **Hof, H., and R. Dörries.** 2002. Medizinische Mikrobiologie, 2nd ed. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
16. **Heisig, P.** 2006. [Actions and resistance mechanisms of beta-lactam antibiotics. Penicillin-binding proteins, beta-3-lactamases and signal proteins.]. Pharm Unserer Zeit **35**:400-8.
17. **Olsen, J. E., H. Christensen, and F. M. Aarestrup.** 2006. Diversity and evolution of blaZ from Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci. J Antimicrob Chemother **57**:450-60.
18. **Ito, T., Y. Katayama, K. Asada, N. Mori, K. Tsutsumimoto, C. Tiensasitorn, and K. Hiramatsu.** 2001. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother **45**:1323-36.
19. **Hiramatsu, K., Y. Katayama, H. Yuzawa, and T. Ito.** 2002. Molecular genetics of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Int J Med Microbiol **292**:67-74.
20. **Labischinski, H.** 1992. Consequences of the interaction of beta-lactam antibiotics with penicillin binding proteins from sensitive and resistant Staphylococcus aureus strains. Med Microbiol Immunol **181**:241-65.
21. **Chambers, H. F.** 1997. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev **10**:781-91.

22. **Zetola, N., J. S. Francis, E. L. Nuermberger, and W. R. Bishai.** 2005. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect Dis* **5**:275-86.
23. **Rice, L. B.** 2006. Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. *Am J Infect Control* **34**:S11-9; discussion S64-73.
24. **Herold, B. C., L. C. Immergluck, M. C. Maranan, D. S. Lauderdale, R. E. Gaskin, S. Boyle-Vavra, C. D. Leitch, and R. S. Daum.** 1998. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. *JAMA* **279**:593-8.
25. **Okuma, K., K. Iwakawa, J. D. Turnidge, W. B. Grubb, J. M. Bell, F. G. O'Brien, G. W. Coombs, J. W. Pearman, F. C. Tenover, M. Kapi, C. Tiensasitorn, T. Ito, and K. Hiramatsu.** 2002. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *J Clin Microbiol* **40**:4289-94.
26. **Boyle-Vavra, S., and R. S. Daum.** 2007. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin. *Lab Invest* **87**:3-9.
27. **Lina, G., Y. Piemont, F. Godail-Gamot, M. Bes, M. O. Peter, V. Gauduchon, F. Vandenesch, and J. Etienne.** 1999. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis* **29**:1128-32.
28. **Buescher, E. S.** 2005. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pediatrics. *Curr Opin Pediatr* **17**:67-70.
29. **Vandenesch, F., T. Naimi, M. C. Enright, G. Lina, G. R. Nimmo, H. Heffernan, N. Liassine, M. Bes, T. Greenland, M. E. Reverdy, and J. Etienne.** 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* **9**:978-84.
30. **Diekema, D. J., M. A. Pfaller, F. J. Schmitz, J. Smayevsky, J. Bell, R. N. Jones, and M. Beach.** 2001. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis* **32 Suppl 2**:S114-32.
31. **Sader, H. S., J. M. Streit, T. R. Fritsche, and R. N. Jones.** 2006. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated from European medical centres: results of the Daptomycin Surveillance Programme (2002-2004). *Clin Microbiol Infect* **12**:844-52.
32. **Chen, A. Y., M. J. Zervos, and J. A. Vazquez.** 2007. Dalbavancin: a novel antimicrobial. *Int J Clin Pract* **61**:853-63.
33. **Lin, G., K. Credito, L. M. Ednie, and P. C. Appelbaum.** 2005. Antistaphylococcal activity of dalbavancin, an experimental glycopeptide. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:770-2.
34. **Beauregard, D. A., D. H. Williams, M. N. Gwynn, and D. J. Knowles.** 1995. Dimerization and membrane anchors in extracellular targeting of vancomycin group antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:781-5.
35. **Leimkuhler, C., L. Chen, D. Barrett, G. Panzone, B. Sun, B. Falcone, M. Oberthur, S. Donadio, S. Walker, and D. Kahne.** 2005. Differential inhibition of *Staphylococcus aureus* PBP2 by glycopeptide antibiotics. *J Am Chem Soc* **127**:3250-1.
36. **Reed, R. P., V. G. Sinickas, C. Lewis, and K. A. Byron.** 1999. A comparison of polymerase chain reaction and phenotyping for rapid speciation of enterococci and detection of vancomycin resistance. *Pathology* **31**:127-32.

37. **Cui, L., H. Murakami, K. Kuwahara-Arai, H. Hanaki, and K. Hiramatsu.** 2000. Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:2276-85.
38. **Hanaki, H., K. Kuwahara-Arai, S. Boyle-Vavra, R. S. Daum, H. Labischinski, and K. Hiramatsu.** 1998. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. *J Antimicrob Chemother* **42**:199-209.
39. **Finan, J. E., G. L. Archer, M. J. Pucci, and M. W. Climo.** 2001. Role of penicillin-binding protein 4 in expression of vancomycin resistance among clinical isolates of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:3070-5.
40. **Murray, B. E.** 1997. Vancomycin-resistant enterococci. *Am J Med* **102**:284-93.
41. **Hiramatsu, K., H. Hanaki, T. Ino, K. Yabuta, T. Oguri, and F. C. Tenover.** 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* **40**:135-6.
42. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin--United States, 2002. 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **51**:565-7.
43. **Chang, S., D. M. Sievert, J. C. Hageman, M. L. Boulton, F. C. Tenover, F. P. Downes, S. Shah, J. T. Rudrik, G. R. Pupp, W. J. Brown, D. Cardo, and S. K. Fridkin.** 2003. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. *N Engl J Med* **348**:1342-7.
44. **Low, D. E., N. Keller, A. Barth, and R. N. Jones.** 2001. Clinical prevalence, antimicrobial susceptibility, and geographic resistance patterns of enterococci: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis* **32 Suppl 2**:S133-45.
45. **Weisblum, B.** 1998. Macrolide resistance. *Drug Resist Updat* **1**:29-41.
46. **Leclercq, R., and P. Courvalin.** 1991. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob Agents Chemother* **35**:1267-72.
47. **Schwarz, S., and F. J. Schmitz.** 2001. Genetische Grundlagen der Resistenz gegenüber Makroliden, Lincosamiden und Streptograminen bei *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* und *Enterococcus faecium*. *Mikrobiologie* **11**:203-9.
48. **Prunier, A. L., B. Malbruny, D. Tande, B. Picard, and R. Leclercq.** 2002. Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* with ribosomal mutations conferring resistance to macrolides. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:3054-6.
49. **Schmitz, F. J., J. Verhoef, and A. C. Fluit.** 1999. Prevalence of resistance to MLS antibiotics in 20 European university hospitals participating in the European SENTRY surveillance programme. SENTRY Participants Group. *J Antimicrob Chemother* **43**:783-92.
50. **Weisblum, B.** 1995. Insights into erythromycin action from studies of its activity as inducer of resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:797-805.
51. **Horinouchi, S., and B. Weisblum.** 1980. Posttranscriptional modification of mRNA conformation: mechanism that regulates erythromycin-induced resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:7079-83.
52. **Murphy, E.** 1985. Nucleotide sequence of *ermA*, a macrolide-lincosamide-streptogramin B determinant in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **162**:633-40.
53. **Schmitz, F. J., J. Petridou, N. Astfalk, S. Scheuring, K. Kohrer, J. Verhoef, A. C. Fluit, and S. Schwarz.** 2001. Structural alterations in the translational attenuator of constitutively expressed *erm(A)* genes in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1603-4.

54. **Werckenthin, C., S. Schwarz, and H. Westh.** 1999. Structural alterations in the translational attenuator of constitutively expressed *ermC* genes. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:1681-5.
55. **Daly, J. S., G. M. Eliopoulos, S. Willey, and R. C. Moellering, Jr.** 1988. Mechanism of action and in vitro and in vivo activities of S-6123, a new oxazolidinone compound. *Antimicrob Agents Chemother* **32**:1341-6.
56. **Zurenko, G. E., B. H. Yagi, R. D. Schaadt, J. W. Allison, J. O. Kilburn, S. E. Glickman, D. K. Hutchinson, M. R. Barbachyn, and S. J. Brickner.** 1996. In vitro activities of U-100592 and U-100766, novel oxazolidinone antibacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother* **40**:839-45.
57. **Shinabarger, D. L., K. R. Marotti, R. W. Murray, A. H. Lin, E. P. Melchior, S. M. Swaney, D. S. Dunyak, W. F. Demyan, and J. M. Buysse.** 1997. Mechanism of action of oxazolidinones: effects of linezolid and eperezolid on translation reactions. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:2132-6.
58. **Swaney, S. M., H. Aoki, M. C. Ganoza, and D. L. Shinabarger.** 1998. The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:3251-5.
59. **Livermore, D. M.** 2003. Linezolid in vitro: mechanism and antibacterial spectrum. *J Antimicrob Chemother* **51 Suppl 2**:ii9-16.
60. **Zurenko, G. E., W. M. Todd, B. Hafkin, B. Meyers, C. Kaufman, J. Bock, J. Slightom, and D. L. Shinabarger.** 1999. Development of Linezolid-Resistant *Enterococcus faecium* in Two Compassionate Use Program Patients Treated with Linezolid, p. 26-29;39, Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 117. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, San Francisco.
61. **Moellering, R. C.** 2003. Linezolid: the first oxazolidinone antimicrobial. *Ann Intern Med* **138**:135-42.
62. **Prystowsky, J., F. Siddiqui, J. Chosay, D. L. Shinabarger, J. Millichap, L. R. Peterson, and G. A. Noskin.** 2001. Resistance to linezolid: characterization of mutations in rRNA and comparison of their occurrences in vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:2154-6.
63. **Tsiodras, S., H. S. Gold, G. Sakoulas, G. M. Eliopoulos, C. Wennersten, L. Venkataraman, R. C. Moellering, and M. J. Ferraro.** 2001. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **358**:207-8.
64. **Gonzales, R. D., P. C. Schreckenberger, M. B. Graham, S. Kelkar, K. DenBesten, and J. P. Quinn.** 2001. Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. *Lancet* **357**:1179.
65. **Marshall, S. H., C. J. Donskey, R. Hutton-Thomas, R. A. Salata, and L. B. Rice.** 2002. Gene dosage and linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:3334-6.
66. **Kloss, P., L. Xiong, D. L. Shinabarger, and A. S. Mankin.** 1999. Resistance mutations in 23 S rRNA identify the site of action of the protein synthesis inhibitor linezolid in the ribosomal peptidyl transferase center. *J Mol Biol* **294**:93-101.
67. **Lobritz, M., R. Hutton-Thomas, S. Marshall, and L. B. Rice.** 2003. Recombination proficiency influences frequency and locus of mutational resistance to linezolid in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:3318-20.
68. **Swoboda, S., S. Fritz, M. E. Martignoni, R. A. Feldhues, T. Hoppe-Tichy, M. W. Buchler, and H. K. Geiss.** 2005. Varying linezolid susceptibility of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates during therapy: a case report. *J Antimicrob Chemother* **56**:787-9.

69. **Saager, B., H. Rohde, B. S. Timmerbeil, G. Franke, W. Pothmann, J. Dahlke, S. Scherpe, I. Sobottka, P. Heisig, and M. A. Horstkotte.** 2008. Molecular characterisation of linezolid resistance in two vancomycin-resistant (VanB) *Enterococcus faecium* isolates using Pyrosequencingtrade mark. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.
70. **Meka, V. G., H. S. Gold, A. Cooke, L. Venkataraman, G. M. Eliopoulos, R. C. Moellering, Jr., and S. G. Jenkins.** 2004. Reversion to susceptibility in a linezolid-resistant clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* **54**:818-20.
71. **Ross, J. E., T. R. Fritsche, H. S. Sader, and R. N. Jones.** 2007. Oxazolidinone susceptibility patterns for 2005: International Report from the Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum Study. *Int J Antimicrob Agents* **29**:295-301.
72. **Jones, R. N., J. E. Ross, T. R. Fritsche, and H. S. Sader.** 2006. Oxazolidinone susceptibility patterns in 2004: report from the Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum (ZAAPS) Program assessing isolates from 16 nations. *J Antimicrob Chemother* **57**:279-87.
73. **Jones, R. N., T. R. Fritsche, H. S. Sader, and J. E. Ross.** 2007. LEADER surveillance program results for 2006: an activity and spectrum analysis of linezolid using clinical isolates from the United States (50 medical centers). *Diagn Microbiol Infect Dis* **59**:309-17.
74. **Grohs, P., S. Houssaye, A. Aubert, L. Gutmann, and E. Varon.** 2003. In vitro activities of garenoxacin (BMS-284756) against *Streptococcus pneumoniae*, viridans group streptococci, and *Enterococcus faecalis* compared to those of six other quinolones. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:3542-7.
75. **Heisig, P.** 2001. Inhibitors of bacterial topoisomerases: mechanisms of action and resistance and clinical aspects. *Planta Med* **67**:3-12.
76. **Ng, E. Y., M. Trucksis, and D. C. Hooper.** 1996. Quinolone resistance mutations in topoisomerase IV: relationship to the *flqA* locus and genetic evidence that topoisomerase IV is the primary target and DNA gyrase is the secondary target of fluoroquinolones in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **40**:1881-8.
77. **Tanaka, M., T. Wang, Y. Onodera, Y. Uchida, and K. Sato.** 2000. Mechanism of quinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Infect Chemother* **6**:131-9.
78. **Robicsek, A., J. Strahilevitz, G. A. Jacoby, M. Macielag, D. Abbanat, C. H. Park, K. Bush, and D. C. Hooper.** 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* **12**:83-8.
79. **Martinez-Martinez, L., A. Pascual, and G. A. Jacoby.** 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* **351**:797-9.
80. **Arsene, S., and R. Leclercq.** 2007. Role of a *qnr*-like gene in the intrinsic resistance of *Enterococcus faecalis* to fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:3254-8.
81. **Rodriguez-Martinez, J. M., C. Velasco, A. Briales, I. Garcia, M. C. Conejo, and A. Pascual.** 2008. *Qnr*-like pentapeptide repeat proteins in gram-positive bacteria. *J Antimicrob Chemother* **61**:1240-3.
82. **Drlica, K., and X. Zhao.** 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**:377-92.
83. **Fournier, B., R. Aras, and D. C. Hooper.** 2000. Expression of the multidrug resistance transporter *NorA* from *Staphylococcus aureus* is modified by a two-component regulatory system. *J Bacteriol* **182**:664-71.

84. **Blumberg, H. M., D. Rimland, D. J. Carroll, P. Terry, and I. K. Wachsmuth.** 1991. Rapid development of ciprofloxacin resistance in methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* **163**:1279-85.
85. **Weber, S. G., H. S. Gold, D. C. Hooper, A. W. Karchmer, and Y. Carmeli.** 2003. Fluoroquinolones and the risk for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitalized patients. *Emerg Infect Dis* **9**:1415-22.
86. **Steenbergen, J. N., J. Alder, G. M. Thorne, and F. P. Tally.** 2005. Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections. *J Antimicrob Chemother* **55**:283-8.
87. **Garau, J.** 2006. Management of cSSTIs: the role of daptomycin. *Curr Med Res Opin* **22**:2079-87.
88. **Hancock, R. E.** 2005. Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens. *Lancet Infect Dis* **5**:209-18.
89. **Cha, R., and M. J. Rybak.** 2004. Influence of protein binding under controlled conditions on the bactericidal activity of daptomycin in an in vitro pharmacodynamic model. *J Antimicrob Chemother* **54**:259-62.
90. **Fuchs, P. C., A. L. Barry, and S. D. Brown.** 2002. In vitro bactericidal activity of daptomycin against staphylococci. *J Antimicrob Chemother* **49**:467-70.
91. **Fraher, M. H., G. D. Corcoran, S. Creagh, and E. Feeney.** 2007. Daptomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a patient with no prior exposure to daptomycin. *J Hosp Infect* **65**:376-8.
92. **Hayden, M. K., K. Rezai, R. A. Hayes, K. Lolans, J. P. Quinn, and R. A. Weinstein.** 2005. Development of Daptomycin resistance in vivo in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **43**:5285-7.
93. **Kaatz, G. W., T. S. Lundstrom, and S. M. Seo.** 2006. Mechanisms of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* **28**:280-7.
94. **Lesho, E. P., G. W. Wortmann, D. Craft, and K. A. Moran.** 2006. De novo daptomycin nonsusceptibility in a clinical isolate. *J Clin Microbiol* **44**:673.
95. **Lewis, J. S., 2nd, A. Owens, J. Cadena, K. Sabol, J. E. Patterson, and J. H. Jorgensen.** 2005. Emergence of daptomycin resistance in *Enterococcus faecium* during daptomycin therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:1664-5.
96. **Marty, F. M., W. W. Yeh, C. B. Wennersten, L. Venkataraman, E. Albano, E. P. Alyea, H. S. Gold, L. R. Baden, and S. K. Pillai.** 2006. Emergence of a clinical daptomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate during treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia and osteomyelitis. *J Clin Microbiol* **44**:595-7.
97. **Silverman, J. A., N. Oliver, T. Andrew, and T. Li.** 2001. Resistance studies with daptomycin. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1799-802.
98. **Friedman, L., J. D. Alder, and J. A. Silverman.** 2006. Genetic changes that correlate with reduced susceptibility to daptomycin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:2137-45.
99. **Liebowitz, L. D., J. Saunders, L. J. Chalkley, and H. J. Koornhof.** 1988. In vitro selection of bacteria resistant to LY146032, a new cyclic lipopeptide. *Antimicrob Agents Chemother* **32**:24-6.
100. **Vogel, F., and H. Scholz.** 2002. Rationaler Einsatz oraler Antibiotika bei Erwachsenen. *Chemotherapie Journal* **2**:47-58.
101. **Scholz, H., and F. Vogel.** 2002. Rationaler Einsatz oraler Antibiotika bei Kindern und Jugendlichen. *Chemotherapie Journal* **2**:59-70.
102. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. 2004. *Am J Infect Control* **32**:470-85.

103. **Paparaskevas, J., A. Vatopoulos, P. T. Tassios, A. Avlami, N. J. Legakis, and V. Kalapothaki.** 2000. Diversity among high-level aminoglycoside-resistant enterococci. *J Antimicrob Chemother* **45**:277-83.
104. **DeMarco, C. E., L. A. Cushing, E. Frempong-Manso, S. M. Seo, T. A. Jaravaza, and G. W. Kaatz.** 2007. Efflux-related resistance to norfloxacin, dyes, and biocides in bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:3235-9.
105. **Halle, E., J. Padberg, S. Rosseau, I. Klare, G. Werner, and W. Witte.** 2004. Linezolid-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from a septic patient: report of first isolates in Germany. *Infection* **32**:182-3.
106. **Kariyama, R., R. Mitsuhashi, J. W. Chow, D. B. Clewell, and H. Kumon.** 2000. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* **38**:3092-5.
107. **Dutka-Malen, S., S. Evers, and P. Courvalin.** 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol* **33**:24-7.
108. **Dutka-Malen, S., S. Evers, and P. Courvalin.** 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol* **33**:1434.
109. **Cheng, S., F. K. McCleskey, M. J. Gress, J. M. Petroziello, R. Liu, H. Namdari, K. Beninga, A. Salmen, and V. G. DeVecchio.** 1997. A PCR assay for identification of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* **35**:1248-50.
110. **Clark, N. C., R. C. Cooksey, B. C. Hill, J. M. Swenson, and F. C. Tenover.** 1993. Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from U.S. hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* **37**:2311-7.
111. **Satake, S., N. Clark, D. Rimland, F. S. Nolte, and F. C. Tenover.** 1997. Detection of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples by PCR. *J Clin Microbiol* **35**:2325-30.
112. **Bast, E.** 2001. *Mikrobiologische Methoden: Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken*, 2nd ed. Spektrum Akademischer Verlag, München.
113. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.** 2006. 7th ed, Wayne, PA.
114. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.** 2007. 17th ed, Wayne, PA.
115. **Montanari, M. P., M. Mingoia, E. Giovanetti, and P. E. Varaldo.** 2001. Differentiation of resistance phenotypes among erythromycin-resistant *Pneumococci*. *J Clin Microbiol* **39**:1311-5.
116. **Waites, K., C. Johnson, B. Gray, K. Edwards, M. Crain, and W. Benjamin, Jr.** 2000. Use of clindamycin disks To detect macrolide resistance mediated by *ermB* and *mefE* in *Streptococcus pneumoniae* isolates from adults and children. *J Clin Microbiol* **38**:1731-4.
117. **Weaver, J. R., and P. A. Pattee.** 1964. INDUCIBLE RESISTANCE TO ERYTHROMYCIN IN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*. *J Bacteriol* **88**:574-80.
118. **Farrell, R. E.** 2005. *RNA Methodologies, Third Edition: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization* 3rd ed. Academic Press.
119. **Ogretmen, B., H. Ratajczak, A. Kats, B. C. Stark, and S. M. Gendel.** 1993. Effects of staining of RNA with ethidium bromide before electrophoresis on performance of northern blots. *Biotechniques* **14**:932-5.
120. **Lottspeich, F., and J. W. Engels.** 2006. *Bioanalytik*, 2nd ed. Spektrum Akademischer Verlag, München.

121. **Geiss, H. K., D. Mack, and H. Seifert.** 2004. Identifizierung von speziellen Resistenzmechanismen und zur Interpretation von Ergebnissen der Antibiotikaempfindlichkeitstestung bei grampositiven und gramnegativen Erregern. *Chemotherapie Journal* **1**:1-16.
122. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**:5463-7.
123. **Hyman, E. D.** 1988. A new method of sequencing DNA. *Anal Biochem* **174**:423-36.
124. **Ronaghi, M.** 2001. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res* **11**:3-11.
125. **Sigmund, C. D., M. Ettayebi, A. Borden, and E. A. Morgan.** 1988. Antibiotic resistance mutations in ribosomal RNA genes of *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* **164**:673-90.
126. **Vester, B., and S. Douthwaite.** 1994. Domain V of 23S rRNA contains all the structural elements necessary for recognition by the ErmE methyltransferase. *J Bacteriol* **176**:6999-7004.
127. **Oliveira, D. C., A. Tomasz, and H. de Lencastre.** 2002. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis* **2**:180-9.
128. **Gordon, R. J., and F. D. Lowy.** 2008. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis* **46 Suppl 5**:S350-9.
129. **Deurenberg, R. H., C. Vink, S. Kalenic, A. W. Friedrich, C. A. Bruggeman, and E. E. Stobberingh.** 2007. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* **13**:222-35.
130. **Chambers, H. F.** 2001. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg Infect Dis* **7**:178-82.
131. **Salgado, C. D., B. M. Farr, and D. P. Calfee.** 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. *Clin Infect Dis* **36**:131-9.
132. **Kresken, M., D. Hafner, F. J. Schmitz, and T. A. Wichelhaus.** 2006. Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Antibiotika in Deutschland und im mitteleuropäischen Raum. Bericht über die Ergebnisse einer multizentrischen Studie der Arbeitsgemeinschaft Empfindlichkeitsprüfungen & Resistenz der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e. V. aus dem Jahre 2004. Antii Infectives Intelligence Gesellschaft für klinisch-mikrobiologische Forschung und Kommunikation mbH, Rheinbach.
133. **Kresken, M., D. Hafner, F. J. Schmitz, and T. A. Wichelhaus.** 2003. Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Antibiotika in Deutschland und im mitteleuropäischen Raum. Bericht über die Ergebnisse einer multizentrischen Studie der Arbeitsgemeinschaft Empfindlichkeitsprüfungen & Resistenz der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e. V. aus dem Jahre 2001. Antii Infectives Intelligence Gesellschaft für klinisch-mikrobiologische Forschung und Kommunikation mbH, Bonn.
134. **Nulens, E., E. Broex, A. Ament, R. H. Deurenberg, E. Smeets, J. Scheres, F. H. van Tiel, B. Gordts, and E. E. Stobberingh.** 2008. Cost of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* search and destroy policy in a Dutch university hospital. *J Hosp Infect* **68**:301-7.
135. **Aucken, H. M., M. Ganner, S. Murchan, B. D. Cookson, and A. P. Johnson.** 2002. A new UK strain of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (EMRSA-17) resistant to multiple antibiotics. *J Antimicrob Chemother* **50**:171-5.

136. **Venezia, R. A., B. E. Domaracki, A. M. Evans, K. E. Preston, and E. M. Graffunder.** 2001. Selection of high-level oxacillin resistance in heteroresistant *Staphylococcus aureus* by fluoroquinolone exposure. *J Antimicrob Chemother* **48**:375-81.
137. **Limoncu, M. H., S. Ermertcan, C. B. Cetin, G. Cosar, and G. Dinc.** 2003. Emergence of phenotypic resistance to ciprofloxacin and levofloxacin in methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* strains. *Int J Antimicrob Agents* **21**:420-4.
138. **Santo, T., E. Hiyama, Y. Takesue, Y. Matsuura, and T. Yokoyama.** 1999. Analysis of *mec* regulator genes in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates according to the production of coagulase, types of enterotoxin, and toxic shock syndrome toxin-1. *Hiroshima J Med Sci* **48**:49-56.
139. **Naber, K. G., and D. Adam.** 1998. Classification of fluoroquinolones. *Int J Antimicrob Agents* **10**:255-7.
140. **Schmitz, F. J., J. Petridou, A. C. Fluit, U. Hadding, G. Peters, and C. von Eiff.** 2000. Distribution of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* blood-culture isolates from fifteen German university hospitals. M.A.R.S. Study Group. Multicentre Study on Antibiotic Resistance in Staphylococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **19**:385-7.
141. **Schmitz, F. J., R. Sadurski, A. Kray, M. Boos, R. Geisel, K. Kohrer, J. Verhoef, and A. C. Fluit.** 2000. Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. *J Antimicrob Chemother* **45**:891-4.
142. **Fluit, A. C., M. R. Visser, and F. J. Schmitz.** 2001. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* **14**:836-71, table of contents.
143. **Herrero, I. A., N. C. Issa, and R. Patel.** 2002. Nosocomial spread of linezolid-resistant, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med* **346**:867-9.
144. **Pai, M. P., K. A. Rodvold, P. C. Schreckenberger, R. D. Gonzales, J. M. Petrolatti, and J. P. Quinn.** 2002. Risk factors associated with the development of infection with linezolid- and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Clin Infect Dis* **35**:1269-72.
145. **Liao, C. H., S. P. Tseng, C. T. Fang, L. J. Teng, and P. R. Hsueh.** 2005. First linezolid- and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain in Taiwan. *J Antimicrob Chemother* **55**:598-9.
146. **Bonora, M. G., M. Solbiati, E. Stepan, A. Zorzi, A. Luzzani, M. R. Catania, and R. Fontana.** 2006. Emergence of linezolid resistance in the vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* multilocus sequence typing C1 epidemic lineage. *J Clin Microbiol* **44**:1153-5.
147. **Dobbs, T. E., M. Patel, K. B. Waites, S. A. Moser, A. M. Stamm, and C. J. Hoesley.** 2006. Nosocomial spread of *Enterococcus faecium* resistant to vancomycin and linezolid in a tertiary care medical center. *J Clin Microbiol* **44**:3368-70.
148. **Brauers, J., M. Kresken, D. Hafner, and P. M. Shah.** 2005. Surveillance of linezolid resistance in Germany, 2001-2002. *Clin Microbiol Infect* **11**:39-46.
149. **Anderegg, T. R., H. S. Sader, T. R. Fritsche, J. E. Ross, and R. N. Jones.** 2005. Trends in linezolid susceptibility patterns: report from the 2002-2003 worldwide Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum (ZAAPS) Program. *Int J Antimicrob Agents* **26**:13-21.
150. **Woodford, N., L. Tysall, C. Auckland, M. W. Stockdale, A. J. Lawson, R. A. Walker, and D. M. Livermore.** 2002. Detection of oxazolidinone-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains by real-time PCR and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* **40**:4298-300.

151. **Seedat, J., G. Zick, I. Klare, C. Konstabel, N. Weiler, and H. Sahly.** 2006. Rapid emergence of resistance to linezolid during linezolid therapy of an *Enterococcus faecium* infection. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:4217-9.
152. **Goldstein, E. J., D. M. Citron, Y. A. Warren, K. L. Tyrrell, C. V. Merriam, and H. T. Fernandez.** 2006. In vitro activities of dalbavancin and 12 other agents against 329 aerobic and anaerobic gram-positive isolates recovered from diabetic foot infections. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:2875-9.
153. **Appelbaum, P. C., and M. R. Jacobs.** 2005. Recently approved and investigational antibiotics for treatment of severe infections caused by Gram-positive bacteria. *Curr Opin Microbiol* **8**:510-7.
154. **Sakoulas, G., J. Alder, C. Thauvin-Eliopoulos, R. C. Moellering, Jr., and G. M. Eliopoulos.** 2006. Induction of daptomycin heterogeneous susceptibility in *Staphylococcus aureus* by exposure to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:1581-5.
155. **Kainer, M. A., R. A. Devasia, T. F. Jones, B. P. Simmons, K. Melton, S. Chow, J. Broyles, K. L. Moore, A. S. Craig, and W. Schaffner.** 2007. Response to emerging infection leading to outbreak of linezolid-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis* **13**:1024-30.
156. **Arias, C. A., M. Vallejo, J. Reyes, D. Panesso, J. Moreno, E. Castaneda, M. V. Villegas, B. E. Murray, and J. P. Quinn.** 2008. Clinical and microbiological aspects of linezolid resistance mediated by the *cfr* gene encoding a 23S rRNA methyltransferase. *J Clin Microbiol* **46**:892-6.
157. **Long, K. S., J. Poehlsgaard, C. Kehrenberg, S. Schwarz, and B. Vester.** 2006. The *Cfr* rRNA methyltransferase confers resistance to Phenicol, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:2500-5.
158. **Mendes, R. E., L. M. Deshpande, M. Castanheira, J. Dipersio, M. Saubolle, and R. N. Jones.** 2008. First Report of *cfr*-mediated Resistance to Linezolid in Human *Staphylococcal* Clinical Isolates Recovered in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*.
159. **Kehrenberg, C., S. Schwarz, L. Jacobsen, L. H. Hansen, and B. Vester.** 2005. A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503. *Mol Microbiol* **57**:1064-73.
160. **Toh, S. M., L. Xiong, C. A. Arias, M. V. Villegas, K. Lolans, J. Quinn, and A. S. Mankin.** 2007. Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. *Mol Microbiol* **64**:1506-14.
161. **Hentschke, M., B. Saager, M. A. Horstkotte, S. Scherpe, M. Wolters, H. Kabisch, R. Grosse, P. Heisig, M. Aepfelbacher, and H. Rohde.** 2008. Emergence of Linezolid Resistance in a Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Strain. *Infection* **36**:85-7.
162. **Gales, A. C., H. S. Sader, S. S. Andrade, L. Lutz, A. Machado, and A. L. Barth.** 2006. Emergence of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* during treatment of pulmonary infection in a patient with cystic fibrosis. *Int J Antimicrob Agents* **27**:300-2.
163. **Roberts, S. M., A. F. Freeman, S. M. Harrington, S. M. Holland, P. R. Murray, and A. M. Zelazny.** 2006. Linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* in two pediatric patients receiving low-dose linezolid therapy. *Pediatr Infect Dis J* **25**:562-4.
164. **Pillai, S. K., G. Sakoulas, C. Wennersten, G. M. Eliopoulos, R. C. Moellering, Jr., M. J. Ferraro, and H. S. Gold.** 2002. Linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*: characterization and stability of resistant phenotype. *J Infect Dis* **186**:1603-7.

165. **Howe, R. A., M. Wootton, A. R. Noel, K. E. Bowker, T. R. Walsh, and A. P. MacGowan.** 2003. Activity of AZD2563, a novel oxazolidinone, against *Staphylococcus aureus* strains with reduced susceptibility to vancomycin or linezolid. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:3651-2.
166. **Wilson, P., J. A. Andrews, R. Charlesworth, R. Walesby, M. Singer, D. J. Farrell, and M. Robbins.** 2003. Linezolid resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* **51**:186-8.
167. **Zorzi, W., X. Y. Zhou, O. Dardenne, J. Lamotte, D. Raze, J. Pierre, L. Gutmann, and J. Coyette.** 1996. Structure of the low-affinity penicillin-binding protein 5 PBP5fm in wild-type and highly penicillin-resistant strains of *Enterococcus faecium*. *J Bacteriol* **178**:4948-57.
168. **Werckenthin, C., and S. Schwarz.** 2000. Molecular analysis of the translational attenuator of a constitutively expressed *erm(A)* gene from *Staphylococcus intermedius*. *J Antimicrob Chemother* **46**:785-8.
169. **Luthje, P., and S. Schwarz.** 2007. Molecular analysis of constitutively expressed *erm(C)* genes selected in vitro in the presence of the non-inducers pirlimycin, spiramycin and tylosin. *J Antimicrob Chemother* **59**:97-101.
170. **Witte, W., C. Braulke, C. Cuny, B. Strommenger, G. Werner, D. Heuck, U. Jappe, C. Wendt, H. J. Linde, and D. Harmsen.** 2005. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Panton-Valentine leukocidin genes in central Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **24**:1-5.
171. **Sakoulas, G., H. S. Gold, L. Venkataraman, R. C. Moellering, Jr., M. J. Ferraro, and G. M. Eliopoulos.** 2003. Introduction of *erm(C)* into a linezolid- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* does not restore linezolid susceptibility. *J Antimicrob Chemother* **51**:1039-41.
172. **Hawkey, P. M.** 2008. Molecular epidemiology of clinically significant antibiotic resistance genes. *Br J Pharmacol* **153 Suppl 1**:S406-13.
173. **Nordmann, P., T. Naas, N. Fortineau, and L. Poirel.** 2007. Superbugs in the coming new decade; multidrug resistance and prospects for treatment of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* in 2010. *Curr Opin Microbiol* **10**:436-40.

## J Abkürzungsverzeichnis

### A

A	Absorption
A	Adenin (bei DNA-Sequenzen)
APS	Ammoniumpersulfat
Asn	Asparagin
ATCC <sup>®</sup>	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat

### B

bidest.	bidestiliert
BK	Blutkultur
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise

### C

C	Cytosin (bei DNA-Sequenzen)
ca-MRSA	community-acquired MRSA
cDNA	Copy-DNA
CLSI	Clinical Laboratory Standard Institute

### D

dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
ddATP	Didesoxyadenosin-5'-triphosphat
ddCTP	Didesoxycytidin-5'-triphosphat
DD-Test	Double-Disc-Test
dem.	demineralisiert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DIN	Deutsches Institut für Normung

DK	Dauerkultur
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythmidin-5'-triphosphat
dUTP	Desoxyuridin-5'-triphosphat

## **E**

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMA	European Medicines Agency
ESBL	Extended-spectrum- $\beta$ -lactamases
E-Test	Epsilometer test
EUR	Euro

## **F**

6-FAM	6-FAM-phosphoroamidite
F	Phenylalanin (bei Aminosäuren)
FDA	Federal Drug Agency
f-MET	Formyl-Methionin

## **G**

G	Guanin (bei DNA-Sequenzen)
g	Erdbeschleunigung

## **H**

ha-MRSA	hospital-acquired MRSA
HLAR	High-Level-Aminoglycoside-Resistance

## **I**

IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
-------	---

**K**

k. A.	keine Angabe
kb	Kilobasen

**L**

L	Leucin (bei Aminosäuren)
LRE	Linezolid-resistente Enterokokken
LRSA	Linezolid-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>

**M**

M	Molekulargewicht
mdr	multi-drug-resistance
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MLSB	Makrolid-Lincosamin-Streptogramin B
mRNA	Messenger-RNA
MRSA	Methicilin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicilin-sensibler <i>Staphylococcus aureus</i>

**N**

N	Stickstoff
n. B.	nicht bestimmt
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards

**O**

OD	Optische Dichte
----	-----------------

**P**

PBP	Penicillin-bindende Proteine
PCR	englisch: Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PEG	Paul-Ehrlich-Gesellschaft
Pos.	Position

**R**

R	Resistent
r	resistent (hochgestellt)
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse-Transkriptase

**S**

S	Sensibel
s	sensibel (hochgestellt)
S	Serin (bei Aminosäuren)
S	Svedberg-Einheit (bei RNA)
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SNP	Single nucleotide polymorphism
sp.	species
$s_{rel}$	relative Standardabweichung
ssDNA	single-stranded DNA

**T**

T	Thymin (bei DNA-Sequenzen),
TAE	Tris-Acetat-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TY	Typhus-Kultur

**U**

U	Units
u. a.	unter anderem
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
ÜNK	Übernachtkultur
UR	Urin-Kultur
UV	Ultraviolett

**V**

VA	Varia-Kultur
VRE	Vancomycin-Resistente Enterokokken

**W**

WT	Wildtyp
----	---------

**Z**

z. B.	zum Beispiel
-------	--------------

## K Gefahrstoffverzeichnis

Liste der Gefahrstoffe

Gefahrstoff	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
$\beta$ -Mercaptoethanol	T, N	22-23/24-34- 51/53	45-61-26- 36/37/39
Acrylamid-Lösung (40 %)	T	45-46-E20/21- E25-36/38-43- E48/23/24/25-62	53-36/37-45
Ammoniumpersulfat	O, X <sub>n</sub>	8-22-36/37/38	22-24-36-37
Bis-Lösung (2 %)	T	45-46-E22-43- E48/23/24/25-62	53-36/37-45
Calciumchlorid-Dihydrat	X <sub>i</sub>	36	22-24
DEPC	X <sub>n</sub>	22-36/37	23,5
DTT	X <sub>n</sub>	22-36/37	-
Eisessig	C	10-35	23-26-45
Ethanol (96 %)	F	11	7-16
Ethidiumbromid	T <sub>+</sub>	22-26-36/37/38- 68	26-28-36/37-45
Ethylendiamintetraessigsäure	X <sub>i</sub>	36-52/53	61
Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz	X <sub>i</sub>	36/38	26
Natriumcarbonat	X <sub>i</sub>	36	22-26

Natriumhydroxid	C	35	26-37/39-45
Salzsäure 37 %	C	34-37	26-36/37/39-45
SDS	F, X <sub>n</sub>	22-36/38	22-24/25
Streptavidin Sepharose HP	-	10	16-23
TEMED	F, C	11-20/22-34	16-26-36/37/39-45
Trans-1-2-Diaminocyclo-hexan-N,N,N',N'-tetra-acetat	X <sub>i</sub>	36/38	-
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	X <sub>i</sub>	36/38	-
Xylencyanol	X <sub>i</sub>	20/21-32	34

## L Lebenslauf

Björn Saager

geboren am 04. September 1978 in Stade

### **Berufliche Ausbildung**

seit 03/2008	Angestellter Apotheker in der Zentralapotheke der Regio Kliniken GmbH in Elmshorn und Weiterbildung zum Fachapotheker für klinische Pharmazie
04/2004-03/2008	Promotion an der Universität Hamburg am Institut für Pharmazie („Molekulare Grundlagen der Mechanismen und Epidemiologie von Resistenzen gegenüber neuen Antibiotika bei Gram-positiven klinischen Isolaten aus dem Norddeutschen Raum“)
12/2003	Approbation als Apotheker
06/2003-11/2003	Praktisches Jahr in der Nikolai-Apotheke in Hamburg
11/2002-04/2003	Praktisches Jahr in der Apotheke des Evangelischen Amalie-Sieveking Krankenhauses in Hamburg
10/1998-10/2002	Studium der Pharmazie an der Universität Hamburg

### **Praktika**

03/2000	Famulatur in der Kranz-Apotheke in Stade
07/1999-08/1999	Famulatur in der Apotheke des Universitäts-Krankenhauses Eppendorf in Hamburg
08/1997-10/1997	Krankenpflege-Praktikum im Seehospital Sahlenburg

### **Grundwehrdienst**

11/1997-08/1998	Wehrpflichtdienst als Sanitätssoldat im Panzerbataillon 74 in Cuxhaven-Altenwalde
-----------------	---

### **Schulische Ausbildung**

1990-1997	Vincent-Lübeck-Gymnasium in Stade, Abschluss: Abitur (2,5)
-----------	--

**Kongressbeiträge**

B. Saager, M.A. Horstkotte, P. Heisig

Detection of linezolid resistance in vancomycin-resistant *enterococci* isolates: Broth-microdilution in comparison with pyrosequencing™

20. Jahrestagung der Paul-Ehrlich-Gesellschaft, Bonn, 14.-16.09.2006

B. Saager, H. Rohde, I. Sobottka, P. Heisig

Epidemiological survey of susceptibility to daptomycin and clinical important antibiotics for *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in the University Medical Center Hamburg-Eppendorf (Germany) from 2004 to 2006

58th annual Conference of DGHM, October 1-4, 2006 in Würzburg, Germany

B. Saager, M.A. Horstkotte, P. Heisig

Comparison of broth microdilution and pyrosequencing™ for the detection of linezolid resistance in vancomycin-resistant *enterococci*

58th annual Conference of DGHM, October 1-4, 2006 in Würzburg, Germany

Saager B., Horstkotte M.A., Rohde H., Sobottka I., Heisig P.

In vitro activity of dalbavancin against clinical vancomycin-resistant *enterococci* isolates

17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ICC, Munich, Germany, 31 Mar-04 Apr 2007

Saager B., Horstkotte M.A., Rohde H., Sobottka I., Heisig P.

Susceptibility of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* to daptomycin at a university medical centre Hamburg-Eppendorf, Germany

17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ICC, Munich, Germany, 31 Mar-04 Apr 2007

M. Hentschke, H. Rohde, B. Saager, M. Horstkotte, S. Scherpe, H. Kabisch, R. Grosse, P. Heisig, M. Aepfelbacher

Emergence of linezolid resistance in a methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strain

59th annual Conference of DGHM, September 30-October 4, 2007 in Göttingen Germany

## Veröffentlichungen

Björn S. Timmerbeil, Björn Saager, Stefanie Scherpe, Enno Stürenburg und Peter Heisig, Hamburg

Nachweis eines Carbapenem-resistenten *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Norddeutschland  
Chemotherapie Journal Heft 6 – Dezember 2007

Hentschke M, Saager B, Horstkotte MA, Scherpe S, Wolters M, Kabisch H, Grosse R, Heisig P, Aepfelbacher M, Rohde H.

Emergence of Linezolid Resistance in a Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Strain  
Infection. 2008 Feb;36(1):85-7

Saager, B., H. Rohde, B. S. Timmerbeil, G. Franke, W. Pothmann, J. Dahlke, S. Scherpe, I. Sobottka, P. Heisig, and M. A. Horstkotte.

Molecular characterisation of linezolid resistance in two vancomycin-resistant (VanB) *Enterococcus faecium* isolates using Pyrosequencing™.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2008 27:873-8.

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Arbeiten entnommen sind, habe ich unter genauer Angabe der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht.

Hamburg, den 09.Dezember 2008

Björn Saager