

6. ZUSAMMENFASSUNG

Trotz der in den letzten Jahren auch bei veterinärmedizinisch relevanten Staphylokokken steigenden Resistenzraten gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen liegen für diese, verglichen mit entsprechenden humanmedizinischen Isolaten, erst wenige detaillierte Untersuchungen zu Struktur, Lokalisation und Expression von Resistenzgenen vor. Am Beispiel von Resistenzen gegenüber drei Klassen von Proteinbiosyntheseinhibitoren, Tetracycline, Makrolid-Lincosamid-Streptogramin B (MLS)-Antibiotika und Chloramphenicol wurden hierzu im Rahmen der vorliegenden Arbeit Daten erarbeitet, die die Bedeutung resistenzvermittelnder Plasmide und Transposons für die Verbreitung entsprechender Resistenzgene unterstreichen. Dabei konnten unter Verwendung molekularbiologischer Verfahren bei Isolaten von Tauben, Nerzen, Hunden, einem kleinen Wiederkäuer und Menschen drei Tetracyclinresistenzgene, *tetK*, *tetL* und *tetM*, drei MLS-Resistenzgene, *ermA*, *ermB* und *ermC*, sowie zwei Chloramphenicolresistenzgene, *cat* (pC221) und *cat* (pC223), nachgewiesen werden.

(1) Untersuchungen zur Tetracyclinresistenz ergaben folgende Resultate:

- Resistenzgene der Hybridisierungsklasse K wurden auf Plasmiden unterschiedlicher Größe nachgewiesen. Plasmide mit einer Größe von 4,4 kbp, die in ihren Restriktionskarten dem *tetK*-kodierenden Prototypplasmid pT181 aus *S. aureus* weitgehend entsprachen, ließen sich aus Vertretern der Spezies *S. intermedius*, *S. lentus* und *S. epidermidis* isolieren. Darüber hinaus war ein weiterer, bisher noch nicht beschriebener Typ *tetK*-kodierender Plasmide von 4,6 kbp Größe bei *S. intermedius* und *S. lentus* nachweisbar.
- Vier Isolate der Spezies *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* und *S. warneri* verfügten über *tetK*-Gene auf großen Plasmiden von 31 kbp bis 82 kbp. In allen vier Fällen beruhte die Präsenz der *tetK*-Gene auf der durch die Insertionssequenz IS257 vermittelten Integration eines Teiles oder aber kompletter pT181-analoger Plasmide in die entsprechenden großen Plasmide. Sequenzanalysen der Integrate führten zur Identifizierung von vier neuen Integrationsstellen für IS257 in der *repC*- oder *prf*-Genregion pT181-analoger Plasmide.

- Bei einem *S. xylosus*-Isolat wurde erstmalig für Staphylokokken ein *tetL*-Gen in der chromosomalen DNA beschrieben.
- Gene der Hybridisierungsklasse M wurden sowohl auf nicht-konjugativen Plasmiden von etwa 76 kbp bis 115 kbp (pSCS29-33) als auch in der chromosomalen DNA vornehmlich bei *S. intermedius* nachgewiesen, wobei drei Isolate der Spezies *S. intermedius* und *S. lentus* neben chromosomal lokalisierten *tetM*-Genen auch über plasmidkodierte *tetK*-Gene verfügten.

(2) Untersuchungen zur MLS-Resistenz ergaben folgende Resultate:

- Gene der Hybridisierungsklasse C konnten auf strukturell eng verwandten, 2,3 kbp bis 2,4 kbp großen Plasmiden aus *S. epidermidis*, *S. intermedius* und *S. lentus* nachgewiesen werden. Analysen der Regulatorregionen der konstitutiv exprimierten *ermC*-Gene ergaben das Vorhandensein von Deletionen unterschiedlicher Größe im Translationsattenuator. Die hierbei identifizierten Deletionen von 16 bp und 111 bp wurden erstmalig nachgewiesen, die ebenfalls beschriebene 58 bp große Deletion war zuvor nur von einem Plasmid aus *S. aureus* vom Menschen bekannt.
- Gene vom Typ *ermA* konnten erstmalig bei *S. intermedius*-Isolaten auf strukturell homologen, nicht-konjugativen Plasmiden von etwa 70 kbp Größe identifiziert werden. Sequenzanalysen der Regulatorregion eines, im Gegensatz zum induzierbar exprimierten *ermA*-Prototypgen des Transposons Tn554, konstitutiv exprimierten *ermA*-Genes von *S. intermedius* zeigten, daß der konstitutive Expressionstyp auf den Austausch von zwei Basenpaaren im *ermA*-Translationsattenuator zurückzuführen war.
- *ermB*-Gene wurden zusammen mit Chloramphenicolresistenzgenen und *tetM*-Genen auf den in diesem Zusammenhang erwähnten großen *S. intermedius*-Plasmiden nachgewiesen. Darüber hinaus gelang bei einem *S. lentus*-Isolat der für Staphylokokken erstmalige Nachweis eines *ermB*-Genes auf einem kleinen Plasmid von 8,0 kbp. Analysen der *ermB*-Genregion deuteten auf die Integration eines Teiles eines Tn917-analogen, nicht-konjugativen, *ermB*-kodierenden Transposons in ein kleines *S. lentus*-Plasmid hin.

(3) Untersuchungen zur Chloramphenicolresistenz ergaben folgende Resultate:

- Anhand von Restriktionskartierungen konnten drei Typen pC221-analoger Plasmide bei *S. intermedius*, *S. lentus* und *S. haemolyticus* sowie zwei Typen pC223-analoger Plasmide bei *S. lentus* nachgewiesen werden. Die Plasmide variierten in ihren Größen zwischen 3,7 kbp und 4,5 kbp.
- Die *S. intermedius*-Plasmide pSCS29-33 enthielten ein pC221-analoges *cat*-Gen sowie einen Teil eines pC221-analogen *repD*-Genes. Die den *repD/cat*-Genbereich flankierenden Sequenzen zeigten Ähnlichkeiten zu Sequenzen des von *Streptococcus agalactiae* bekannten Plasmides pIP501. Der Übergang von pIP501- zu pC221-Sequenzen im *repD*-Bereich befand sich exakt im Replikationsursprung *oriR* und war durch die Duplikation oder Triplikation eines 15 bp großen Bereiches gekennzeichnet. Stromabwärts des *cat*-Genes konnte der Übergang zwischen beiden Sequenzen im Bereich des *cat*-Transkriptionsterminators lokalisiert werden.

Die in der vorliegenden Studie erarbeiteten Resultate zeigen, daß die bei Staphylokokken nachweisbaren *tet*-, *erm*- und *cat*-Gene in der Mehrzahl der Fälle auf Plasmiden unterschiedlicher Größe und nur gelegentlich in der chromosomalen DNA zu finden sind. Der Nachweis strukturell homologer *tetK*-, *ermC*- und *cat*-kodierender Plasmide bei unterschiedlichen Staphylokokkenspezies deutet auf einen Interspeziestransfer dieser Resistenzplasmide, der Nachweis pIP501-analoger Sequenzen auf einen Intergenustransfer hin. Die Präsenz der von Enterokokken und Streptokokken bekannten transposonkodierten Resistenzgene *tetM* und *ermB* auf Plasmiden oder in der chromosomalen DNA der untersuchten Staphylokokken unterstützen ebenfalls die Vermutung eines in vivo stattfindenden Intergenustransfers von Resistenzgenen.

Die Integration nicht-konjugativer *ermA*- oder *ermB*-kodierender Transposons in Plasmide, die IS257-vermittelte Integration kleiner *tetK*-kodierender Plasmide sowie die Integration pC221-analoger *cat*-Gene in große Plasmide unterstreichen die Vielfalt der Ausbreitungswege von Resistenzgenen über Spezies- und Gengrenzen hinweg und bekräftigen die Bedeutung von Plasmiden und Transposons für die Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen und die Entstehung multiresistenter Staphylokokken.

SUMMARY

Christiane Susanne Werckenthin:

Molecular studies on the distribution of antibiotic resistance genes in staphylococci with particular reference to the role of resistance-mediating plasmids and transposons.

Despite increasing rates of antibiotic resistance observed during recent years in animal staphylococci, very few detailed studies on the structure, the localization and the expression of the resistance genes are available as compared to the wealth of data known for antibiotic resistance genes of staphylococci of human origin. Therefore, resistances to the three classes of protein biosynthesis inhibitors, tetracyclines, macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLS)-antibiotics and chloramphenicol, were investigated in the present study. The data obtained confirmed that plasmids and transposons were mainly involved in resistance to these antibiotics and consequently also in the spread of the respective resistance genes. During the course of the study, three tetracycline resistance genes, *tetK*, *tetL*, and *tetM*, another three MLS resistance genes, *ermA*, *ermB*, and *ermC* as well as two chloramphenicol resistance genes, *cat* (pC221) and *cat* (pC223), were identified in isolates of different staphylococcal species from human and animal sources by using various molecular techniques.

(1) Studies on tetracycline resistance yielded the following results:

- Resistance genes of the hybridization class K were detected on plasmids of different sizes. Plasmids of 4.4 kbp which were indistinguishable from the *tetK*-encoding prototype plasmid pT181 from *S. aureus* occurred in isolates of *S. intermedius*, *S. lentus* and *S. epidermidis*. Moreover, a novel type of *tetK*-encoding plasmids represented by the 4.6 kbp plasmid pSTS13, was isolated from animal strains of *S. intermedius* and *S. lentus*.
- Four isolates of the species *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* and *S. warneri* carried *tetK* genes on large plasmids of 31 kbp to 82 kbp. The presence of *tetK* genes in these large plasmids based on the integration of a complete or part of a pT181-analogous plasmid. These integration processes were mediated by the insertion element IS257 in all four cases. Sequence analyses led to the identification of four

novel integration sites of IS257 in the *repC* or *pre* region of pT181-analogous plasmids.

- For the first time in staphylococci, the chromosomal location of a *terL* gene was identified in an animal isolate of *S. xylosus*.
- Genes of the hybridization class M were found to be located on large non-conjugative plasmids of 76 kbp to 115 kbp designated pSES29-33, but also in the chromosomal DNA of mainly *S. intermedius* isolates. Three chromosomally *terM* resistant isolates of *S. intermedius* and *S. lentus* also carried plasmid-encoded *terK* genes.

(2) Studies on MLS resistance yielded the following results:

- Genes assigned to the hybridization class C were detected on structurally closely related plasmids varying in size between 2.3 kbp and 2.4 kbp in isolates of *S. epidermidis*, *S. intermedius* and *S. lentus*. Analyses of the regulatory region of constitutively expressed *ermC* genes led to the identification of three different types of sequence deletions in the translational attenuator. Deletions of 16 bp and 111 bp were detected for the first time in staphylococci while the remaining 58 bp deletion has only been observed once before in a plasmid of *S. aureus* of human origin.
- The location of *ermA* genes on structurally homologous, non-conjugative plasmids of approximately 70 kbp, as represented by *S. intermedius* plasmid pSES29, was a novel observation for animal staphylococci. Sequence analysis of the regulatory region of the constitutively expressed *ermA* gene of pSES29 revealed the presence of two base pair exchanges in the *ermA* translational attenuator as compared to the corresponding region of the inducibly expressed *ermA* gene of Tn554.
- Genes of the type *ermB* were found together with *terM* genes and chloramphenicol resistance genes on the previously mentioned large plasmids pSCS29-33 of *S. intermedius*. In addition, an *ermB* gene was identified for the first time in staphylococci on the small 8,0 kbp plasmid pSES20 from *S. lentus*. Sequence analysis of the *ermB* gene region confirmed the presence of part of a Tn917-like, *ermB*-encoding transposon in pSES20.

(3) Studies on chloramphenicol resistance yielded the following results:

- Based on restriction mapping, three different types of pC221-related plasmids were identified in isolates of *S. intermedius*, *S. lentus* and *S. haemolyticus* and another two different types of pC223-related plasmids were seen in *S. lentus* isolates. All these chloramphenicol resistance plasmids varied in their sizes between 3.7 kbp and 4.5 kbp.
- The *S. intermedius* plasmids pSCS29-33 contained a pC221-analogous *cat* gene as well as part of a pC221-analogous *repD* gene. The sequences flanking this *repD/cat* area revealed homologies to sequences of the *S. agalactiae* plasmid pIP501. The junction between pIP501 and pC221 sequences in the *repD* region was located exactly in the origin of replication (*oriR*) within the *repD* gene; a duplication or triplication of a stretch of 15 bp was identified at this junction. The junction between pIP501 and pC221 sequences downstream of the *cat* gene was located in the region of the *cat* transcriptional terminator.

The data presented in this study confirm that the *tet*, *erm* and *cat* genes identified in these staphylococcal isolates were mainly located on plasmids and were only occasionally present in the chromosomal DNA. The presence of structurally homologous *tetK*-, *ermC*- and *cat*-encoding plasmids in different staphylococcal species indicated the occurrence of interspecies transfer of these resistance plasmids while the presence of pIP501-analogous sequences even suggested the occurrence of intergenus transfer processes. This latter assumption was confirmed by the detection of *ermB* and *tetM* genes which are known to be located on transposons of streptococci and enterococci. The presence of these genes on plasmids or in the chromosomal DNA of the staphylococcal isolates investigated in this study points to in vivo occurring intergenus transfer of resistance genes.

The integration of non-conjugative *ermA*- and *ermB*-encoding transposons into plasmids, the IS257-mediated integration of small *tetK*-encoding plasmids into large plasmids as well as the integration of pC221-analogous *cat* genes into large plasmids illustrate the wide variety of ways by which resistance genes may be distributed among isolates of different bacterial species and genera. Moreover, these data confirm the extraordinary role of plasmids and transposons in the spreading of antibiotic resistance genes and in the development of multiresistant staphylococcal isolates.