



Doctoral Thesis

## **Epidemiologie, Biochemie und Genetik der Antibiotika-Resistenz bei *Acinetobacter calcoaceticus* var. *Anitratus***

**Author(s):**

Devaud-Felix, Marlyse

**Publication Date:**

1981

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000238127> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

EPIDEMIOLOGIE, BIOCHEMIE UND GENETIK DER ANTIBIOTIKA-  
RESISTENZ BEI ACINETOBACTER CALCOACETICUS VAR. ANITRATUS

---

Abhandlung zur Erlangung des Titels eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN  
der EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZUERICH

vorgelegt von

Marlyse DEVAUD-FELIX

eidg. dipl. Apothekerin

geboren am 12. Juni 1945

von Porsel (FR)

angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. O. Sticher, Referent

Prof. Dr. F.H. Kayser, Korreferent

## VI. KURZFASSUNG

Der biochemische Mechanismus und die Genetik der multiplen Antibiotika-Resistenz eines Acinetobacter calcoaceticus Stammes wurden untersucht. Dieser Stamm verursachte im Jahre 1977 eine Epidemie in einer Intensivpflegestation des Kantonsspitals Zürichs. Der untersuchte Stamm war gegen fast alle gebräuchlichen Antibiotika resistent, empfindlich war er nur gegen die Aminoglykoside Tobramycin und Amikacin.

Die Resistenz gegen verschiedene Aminoglykoside konnte auf drei Aminoglykosid-modifizierende Enzyme zurückgeführt werden. Die Sisomicin- und Gentamicin-Resistenz beruhte auf der Aminoglykosid-3-Acetyltransferase TypI, die Resistenzen gegen Kanamycin, Neomycin und Lividomycin wurden durch die Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase TypI vermittelt, während die Streptomycin- und Spectinomycin-Resistenz durch die Aminoglykosid-3"-Adenylyltransferase bedingt war. Auf Grund ihrer Substratprofile entsprachen die drei Enzyme bekannten, bei Enterobakterien und Pseudomonas häufig anzutreffenden Enzymen.

A. calcoaceticus produzierte ausserdem eine periplasmatisch lokalisierte TEM-Betalaktamase und eine zellgebundene Cefalosporinase. Die beiden konstitutiv gebildeten Enzyme waren der Grund für die Ampicillin-, Carbenicillin- und Cefalosporin-Resistenz.

Die Resistenzen für Ampicillin, Kanamycin, Gentamicin,

Tetracyclin und Sulfonamid konnten eliminiert werden; nicht eliminierbar waren die Resistenzen für Cefalosporin, Chloramphenicol und Streptomycin. Mit Hilfe des Plasmides RP4 konnten die Resistenzen für Gentamicin, Sulfonamid, Streptomycin, Tetracyclin und Chloramphenicol von einer Ampicillin- und Kanamycin-empfindlichen Variante des Wildtypstammes mobilisiert werden. Die Resistenzen wurden fast immer en bloc übertragen. Nur 1 Kolonie von 100 war Gentamicin-empfindlich, sowie eine von 100 Kolonien Chloramphenicol-empfindlich.

Der Wildtypstamm sowie die Antibiotika-empfindlichen Varianten beherbergten ein 6 MD schweres, kryptisches Plasmid. Ein Resistenzplasmid wurde nicht gefunden.

Die mobilisierbaren Resistenzen lagen somit auf einem im Chromosom integrierten Transposon.

Die Antibiotika-empfindliche Variante konnte die Vielfachresistenz eines Spitalkeimes durch Konjugation aufnehmen.

Es ist anzunehmen, dass der Wildtypstamm seine Resistenzen im Spitalmilieu auf diese Weise erworben hatte, wobei

nach der Aufnahme eines R-Plasmides die transponierbaren R-Determinanten in das Acinetobacter Chromosom inseriert wurden.

Die mittels Saccharosegradienten-Zentrifugation bestimmten Molekulargewichte von vier aus dem Acinetobacter Transposon und dem Plasmid RP4 zusammengesetzten, hybriden Plasmiden ergaben 40 MD, 52 MD, 65 MD und 66 MD. Dies zeigte, dass die Transposition nicht nach einem ein-

heitlichen Muster verlief. Die hybriden Plasmide wiesen auch unterschiedliche Eigenschaften bezüglich Stabilität, Konjugations- und Transformationsfähigkeit auf.

In einer Transkonjuganten war das hybride Plasmide sehr instabil. Es zerfiel in seine Komponenten. Während das Plasmid RP4 spontan segregierte, blieben die Acinetobacter-Resistenzen zurück. Ein Plasmid konnte nicht mehr nachgewiesen werden. Diese Transposition ins Chromosom bestätigte die Transposonnatur der Acinetobacter R-Determinanten. Der gleiche Vorgang wurde nach dem Transfer des hybriden Plasmides in die Antibiotika-empfindliche Variante des Acinetobacter Wildtypstammes beobachtet.

Das am intensivsten analysierte hybride Plasmid von 52 MD wies 5 transposonspezifische PstI-Verdaufragmente von einer Gesamtlänge von 16 MD auf. Das Transposon enthielt zudem 2 BglII-, 3 HindIII- und 3 EcoRI-Schnittstellen.

Die Hybridisierung der radioaktiv markierten Plasmid-DNS mit der totalen DNS-Fraktion des Acinetobacter Stammes, in dem die Transposition stattgefunden hatte, erlaubte den Nachweis gemeinsamer DNS-Sequenzen. Die homologen PstI-Fragmente der verdauten Acinetobacter DNS entsprachen in Zahl und Grösse den transposonspezifischen PstI-Banden des hybriden Plasmides. Das im hybriden Plasmid untersuchte Transposon entsprach somit der im Acinetobacter Chromosom enthaltenen transponierbaren DNS-Sequenz.

In der Antibiotika-empfindlichen Varianten wurden keine

homologen Sequenzen festgestellt. Das Transposon war vollständig eliminiert worden.

Aus diesen Resultaten wurde der Schlussgezogen, dass die Resistenz-Determinanten für Gentamicin, Streptomycin, Chloramphenicol, Tetracyclin und Sulfonamid im Acinetobacter Wildtypstamm ein 16 MD schweres, im Chromosom inseriertes Transposon bildeten.

ABSTRACT

In 1977 an Acinetobacter calcoaceticus strain caused a hospital epidemic in the intensive care unit of the university hospital of Zurich. The strain was resistant to most of the commonly used antibiotics and sensitive to tobramycin and amikacin only. The biochemical mechanism and the genetic of this multiple antibiotic resistance have been studied in the present thesis.

The resistance to gentamicin, kanamycin and streptomycin was based on the production of three aminoglycoside-modifying enzymes: the 3-N-acetyltransferase I, the 3'-O-phosphotransferase I and the 3"-O-adenylyltransferase. These enzymes are well known and frequently found among Enterobacteriaceae and Pseudomonas.

The resistance to ampicillin, carbenicillin and cephalosporines was due to the production of the TEM-beta-lactamase and a cephalosporinase.

None of the resistances could be transferred by conjugation. No R-plasmid was found in the Acinetobacter wildtype strain. The plasmid RP4 however mobilized the resistance determinants for gentamicin, sulfonamide, streptomycin, tetracyclin and chloramphenicol from an ampicillin sensitive derivative of the Acinetobacter calcoaceticus wildtype strain to an E.coli K12 receptor strain and to an antibiotic sensitive Acinetobacter strain.

The transposition of the *Acinetobacter* R-determinants to the plasmid RP4 resulted in hybrid plasmids with different biochemical and microbial properties. Molecular weights of 40, 52, 65 and 66 Mdal were found by saccharose gradient centrifugation. The most frequent type of the hybrid plasmids with the molecular weight of 52 Mdal was analysed in more details. The patterns of several restriction enzymes were compared with the patterns of RP4 which were not altered by the insertion of the *Acinetobacter* resistance genes. The hybrid plasmid contained an *Acinetobacter* specific DNA sequence of 16 Mdal.

A homologous 16 Mdal DNA sequence was found by hybridization with the total DNA of the *Acinetobacter* strain from which the transposition had occurred.

From these results it was concluded that in the *Acinetobacter* wildtype strain the resistance determinants for gentamicin, streptomycin, chloramphenicol, tetracyclin and sulfonamide formed a 16 Mdal transposon, inserted in the chromosome. In vitro experiments had shown that an antibiotic sensitive variant of the *Acinetobacter* wildtype strain could acquire by conjugation the R plasmid of a multiple resistant *Proteus mirabilis* strain of the hospital flora. It can be assumed that in vivo the *Acinetobacter* wildtype strain had acquired its antibiotic resistance in the same way, but that the R plasmid was lost after the insertion of the transposon into the *Acinetobacter* chromosome.