

Diss. ETH No. 14763

# **Characterisation of Erythromycin and Tetracycline Resistance in Oral Streptococci**

A dissertation submitted to the  
Swiss Federal Institute of Technology (ETH)  
Zurich

for the degree of  
Doctor of Technical Sciences

presented by  
**Christina Raphaela Stadler**  
Dipl.-Ing. rer. nat. techn.  
University of Agricultural Sciences, Austria  
born February 27th, 1975  
from Vienna, Austria

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Michael Teuber, examiner  
Dr. Vincent Perreten, co-examiner

August 12th, 2002

# Summary

Antibiotic resistance in bacteria isolated from food of animal origin is now a common phenomenon. The oral cavity is the first place where food borne bacteria meet the human oral microflora. This would be the first opportunity for a genetic exchange of antibiotic resistance genes from food bacteria to oral microorganisms.

It was the aim of this study to isolate appropriate recipient strains for a possible antibiotic gene transfer. Furthermore, the transfer of selected antibiotic resistance genes should be investigated.

A total of 61 oral streptococci from two healthy, non-hospitalised persons was isolated on non-selective agar. Antibiotic resistant strains were identified as *S. salivarius* and *S. mitis* by sequencing their *sodA* gene. Tetracycline resistance in nine strains was due to the protection of the ribosome encoded by *tet(M)* (8 strains) and *tet(O)* (1 strain). Erythromycin resistance was encoded by *erm(B)* in nine strains and by *mef(E)* in eight strains. Three strains carried both erythromycin resistance determinants.

In addition, the saliva of 14 healthy, non-hospitalised persons was screened for erythromycin resistant streptococci. Erythromycin resistant strains (*S. salivarius*, *S. mitis*, *S. cristatus* and *S. parasanguinis*) were found in 11 persons. All streptococci carried *erm(B)*, 16 strains additionally *mef(E)*.

There was no conjugal transfer of antibiotic resistances from food-borne enterococci to oral streptococci using filter mating. On the contrary, erythromycin resistance genes from two *S. salivarius* and one *S. mitis* were transferred to *E. faecalis* JH2-2 at a frequency of  $10^{-5}$  to  $10^{-6}$  per donor cell.

To elicit the origin of the *mef(E)* gene, a *S. salivarius* strain (Sp6) was chosen as a model

microorganism and adjacent sequences were determined. *mef*(E) was found to be part of a macrolide efflux genetic assembly, 99.8 % identical at the nucleotide level to an element isolated from *S. pneumoniae* [50]. Similar assemblies were found in all *mef*(E)-carrying strains.

*S. pneumoniae* R800 could be transformed with the macrolide efflux genetic assembly from *S. salivarius* and *S. mitis* with a significant frequency .

In this study, we found the macrolide efflux genetic assembly for the first time in commensal oral streptococci other than *S. pneumoniae*. This is also the first report of a successful transformation of *S. pneumoniae* with chromosomal *S. salivarius* DNA.

# Zusammenfassung

Bakterien aus Lebensmitteln weisen heutzutage vielfach Resistenzen gegen Antibiotika auf. Bei der Nahrungsaufnahme treffen diese Bakterien als erstes auf Bakterien der menschlichen Mundhöhle. Dies ist somit auch die erste Möglichkeit einer Übertragung der Antibiotikaresistenzen auf die orale Mundflora.

Das Ziel dieser Studie war einerseits, geeignete Rezipienten-Stämme für einen Antibiotikaresistenztransfer zu isolieren und zu charakterisieren, andererseits einen möglichen *in vitro* Transfer von Resistenzen von Bakterien aus dem Lebensmittel auf Bakterien der Mundhöhle nachzuweisen.

Zunächst wurden 61 orale Streptokokken von zwei gesunden, nicht hospitalisierten Personen auf nicht selektivem Agar isoliert. Antibiotikaresistente Stämme wurden anhand der Sequenz ihrer *sodA* Gene als *S. salivarius* und *S. mitis* identifiziert. Für Tetrazyklinresistenzen waren in acht Stämmen *tet(M)* und in einem Stamm *tet(O)* Gene verantwortlich, die beide für ribosomale Schutzproteine kodieren. Erythromycinresistenzen wurden in neun Stämmen von *erm(B)*, in acht Stämmen von *mef(E)* kodiert. Drei Stämme trugen beide Erythromycinresistenzdeterminanten.

Zusätzlich wurde der Speichel von 14 gesunden, nicht hospitalisierten Personen gezielt auf erythromycinresistente orale Streptokokken untersucht. Aus 11 Personen konnten erythromycinresistente Stämme isoliert werden, die zu den Species *S. salivarius*, *S. mitis*, *S. cristatus* und *S. parasanguinis* gehören. Alle untersuchten Streptokokken trugen das *erm(B)* Gen, 16 Stämme ebenso das *mef(E)* Gen.

Im "filter mating-Test" konnte kein konjugativer Transfer von Antibiotikaresistenzen von Enterokokken aus Lebensmitteln auf orale Streptokokken nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden Erythromycinresistenzen von zwei *S. salivarius* Stämmen und

einem *S. mitis* Stamm auf *E. faecalis* JH2-2 mit einer Frequenz von  $10^{-5}$  to  $10^{-6}$  pro Donorzelle übertragen.

Um auf die Herkunft des *mef*(E) Gens in *S. salivarius* Sp6 schliessen zu können, wurden die angrenzenden Regionen sequenziert. *mef*(E) wurde als Teil eines genetischen Elementes mit dem Namen “macrolide efflux genetic assembly” identifiziert. Dieses Element ist auf Nukleotid Ebene zu 99,8 % identisch mit einem Element von *S. pneumoniae* [50]. Ähnliche Elemente wurden in allen isolierten oralen *mef*(E) tragenden Streptokokken gefunden.

Das “macrolide efflux genetic assembly” Element von *S. salivarius* und *S. mitis* konnte mittels natürlicher Transformation mit einer signifikanten Transferfrequenz auf *S. pneumoniae* R800 übertragen werden.

In dieser Studie konnte erstmals das “macrolide efflux genetic assembly” Element in kommensalen, oralen Streptokokken identifiziert werden. Dies ist auch der erste Bericht über eine erfolgreiche Transformation von *S. pneumoniae* mit chromosomaler DNA von *S. salivarius*.