

MH Központi Honvédkórház Mikrobiológiai Laboratóriuma

## Inaktiváló enzim és efflux együttes hatásaként kialakuló linkozamid rezisztencia *Staphylococcus*ban

Dr. Barcs István, az orvostudomány kandidátusa

Közlésre érkezett: 1995. december 10.

**Kulcsszavak:** *lincomycin, clindamycin, Staphylococcus, rezisztencia, efflux*

A linkozamid nukleotidil transzferáz (LNT) enzim egyaránt inaktiválja a lincomycint (L) és a clindamycint (CM). Az LNT termelő *Staphylococcus* törzsek korong-diffúziós módszerrel rezisztensek L-nel szemben, de érzékenyek mutatkoznak a másik linkozamid antibiotikumra, a CM-re. Egy CM specifikus efflux folyamat létét bizonyították, mely következtében a környezet antibiotikum koncentrációjának csökkentével az intracelluláris bakteriosztatikus hatás is megszűnik. Az enzimhatás és az efflux együttes hatása következtében LNT-termelő törzsek egyaránt rezisztensek mindkét linkozamiddal szemben.

Az antibakteriális szerekkel szembeni rezisztencia három fő típusba sorolható. Ezek: a megfelelő támadáspont kémiai módosítása a sejten belül, az antibiotikum molekula inaktiválása a sejten kívül és a hatóanyag bejutásának megakadályozása a sejtfa-átjárhatóság megváltozásán keresztül, vagy egy transzport mechanizmus útján (1, 6). A Gram-pozitív és az anaerob baktériumok okozta infekciók terápiájában jelentős szerepet játszó clindamycinnel szemben mindhárom mechanizmus válthat ki rezisztenciát. Az általános a target, a 50S riboszomális alegység kémiai modifikálása (1), de humán patogén staphylococcusokban van egy ritka rezisztencia típus, melyet egy inaktiváló exoenzim (LNT) és egy efflux mecha-

nizmus együttes hatása alakít ki. A rezisztencia mechanizmusának mikrobiológiai és biokémiai vizsgálatát ismertetjük ebben a közleményben.

### Vizsgálati anyag és módszer

**Baktériumtörzsek és plazmidok:** Az LNTA-termelést meghatározó 2,5 kb méretű pIP855 plazmidot (12) és az LNTA'-termelést meghatározó 2,6 kb pIP856 plazmidot (13) Roland Leclercq-től (Hopital Henri Mondor, Université Paris, Franciaország) kaptuk. A pBI109PGL plazmid A' típusú LNT enzim termelését határozza meg (4). A gazdaként alkalmazott RN4220 *Staphylococcus aureus* törzset (7) Jeremy I. Ross-tól (University of Leeds, Leeds, Anglia) kaptuk.



**Antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok:** A törzsek antibiotikum érzékenységét agar-diffúziós módszerrel vizsgáltuk (11) *Mueller-Hinton* táptalajon (Humán) a következő antibiotikum korongokkal: lincomycin (L) 10 µg (Oxoid) és clindamycin (CM) 2 IU (Diagnostics Pasteur). Az egyes antibiotikumok baktériumtörzsrre *legkisebb gátló koncentrációját* (MIC) lemezhibitációs módszerrel *Mueller-Hinton* agaron és csőhibitációs módszerrel (11) nutrient bouillonban határoztuk meg. MIC-nek azt a legalacsonyabb antibiotikum-koncentrációt tekintettük, amely a baktériumok növekedését teljesen gátolta 48 óra inkubálás után. A *legkisebb öltő koncentráció* (MBC) meghatározására a csőhibitációs MIC-meghatározás minden egyes hibitációs fokozatából 18 óra inkubálás után antibiotikum-mentes agarlemezre oltottunk azt megállapítandó, mely koncentráció mellett tűnnek el az életképes baktériumsejtek.

**A clindamycin-rezisztencia indukcióját** a L és a CM legmagasabb, a törzs szaporodását még nem befolyásoló koncentrációi mellett vizsgáltuk *Antibiotic Medium 3* (Difco) agarlemezeken (2). A megfelelő koncentrációk megállapítására az antibiotikumokat emelkedő koncentrációban tartalmazó *Iso-Sensitest Broth* (Oxoid) 1-1 ml-eit  $10^6$  telepképző egység (cfu) baktériummal oltottuk be és  $35^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk 24 órán át. A minták minden 10 percben *Bioscreen C* (Labsystems) fotométerrel 540 nm-en mért optikai denzitását NEC PC-9801RA számítógéppel dolgoztuk fel. A kapott szaporodási görbék szerint a L 1,6 mg/l, a CM 0,003 mg/l koncentrációban még nem fejt ki gátló hatást LNT-termelő törzsekre.

**Szubsztrát-profil meghatározás:** A linkozamidok acetilációját, nukleotidilálá-

sát vagy foszforilálását 0,7 mg/ml protein koncentráció mellett 1 óra  $37^\circ\text{C}$ -on történt inkubálással végeztük (5,16).  $\text{Mg}^{2+}$  jelenlétében és a jelölt végkoncentrációban a következő koenzimeket használtunk: Acetil-koenzim A-Li (Sigma, 0,1 mM), adenosin 5' trifoszfát- $\text{Na}_2$  (ATP, Sigma, 4 mM), guanosin 5' trifoszfát- $\text{Na}_2$  (GTP, Wako, 4mM), citidin 5' trifoszfát- $\text{Na}_2$  (CTP, Wako, 4mM) és uridin 5' trifoszfát-Na (UTP, Wako, 4mM). A L és CM (mindkettő Upjohn) 5 µg mennyiségeinek inaktiválását vizsgáltuk 500 µl térfogatban. A *visszamaradt antibiotikum koncentrációját* mikrobiológiai módszerrel határoztuk meg *Micrococcus luteus* HNCMB117001 indikátor törzs felhasználásával (4). A módszer érzékenysége L-re 0,05 mg/l, CM-re 0,005 mg/l.

**A specifikus és a relatív enzimaktivitás meghatározása:** A specifikus enzimaktivitást egy mg protein által egy óra alatt inaktivált antibiotikum nmol-nyi mennyiségeként határoztuk meg. A relatív aktivitás számításakor a L inaktiválását tekintettük 100%-nak (4).

**A linkozamidok hatása a szaporodási görbékre:** A L és a CM antibakteriális hatásának összehasonlítására a pB1109PGL plazmidot hordozó és a plazmidmentes *S. aureus* RN4220 törzs korai és késői logaritmus fázisú tenyészetét ( $10^6$  vagy  $10^9$  cfu/ml) kiegészítettük az antibiotikum MIC/2, MIC, MICx2 és MICx4 koncentrációval. A tenyészeteket  $35^\circ\text{C}$ -on enyhe (150 rpm) rázás mellett inkubáltuk. Csíraszámolást végeztünk közvetlenül az antibiotikumok adása előtt, valamint azt 1, 2, 4, 6, 9, 12 és 24 órával követően (2).



**Akkumulációs vizsgálat:** Az antibiotikumok felvételét L-t ill. CM-t 20 mg/l végkoncentrációban tartalmazó Antibiotic Medium 3 (Difco) táptalajban vizsgáltuk (9). Az antibiotikumok hozzáadása előtt, majd az inkubálás 5., 10., 15., 20., 30. és 40. percében mintát vettünk, azonnal 0°C-ra hűtöttük és ultrahangos kezeléssel a sejteket feltártuk, a minták mikrobiológiai aktivitását meghatároztuk. Párhuzamos kísérletekben karbonilcianid m-klór-fenilhidrazont (CCCP, Sigma) adtunk a rendszerhez 100 mM végkoncentrációban 10 perccel az antibiotikum adását követően (22).

### Eredmények:

Az I. táblázat a L-t és a CM-t, mint a pBI109PGL-hordozó törzs enzimjének lehetséges szubsztrátjait mutatja. Az enzim adenililáció/foszforiláció körülményei között inaktíválja mindkét linkozamidot. A különböző nukleotid-trifoszfatok, mint koenzimek összehasonlítása szerint az ATP és CTP hatása a legerősebb (II. táblázat). A pIP855, pIP856 és pBI109PGL plazmid által termelt enzimek szubsztrát- és koenzim-specifitása között különbséget nem találtunk.

### I. táblázat

*A pBI109PGL plazmid által meghatározott linkozamid-inaktíváló enzim szubsztrát-spektruma*

Reakció	Relatív aktivitás (%) <sup>*</sup>	
	L	CM
Acetiláció	ND	ND
Adeniláció vagy foszforiláció	100	150

\* A lincomycin inaktíválása 100%

Rövidítések: L lincomycin, CM clindamycin, ND nem kimutatható

### II. táblázat

*Staphylococcus rezisztencia-plazmidok által meghatározott linkozamid-inaktíváló enzimek koenzim specifitása*

Koenzim	Relatív aktivitás <sup>*</sup>					
	Lincomycin			Clindamycin		
	pBI109PGL	pIP855	pIP856	pBI109PGL	pIP855	pIP856
ATP	100	100	100	100	100	100
CTP	92	79	80	70	74	78
UTP	25	16	28	34	47	45
GTP	67	57	56	45	47	53

\* Az ATP mellett mért inaktíválás 100%



## III. táblázat

A *Staphylococcus aureus* RN4220 (pBI109PGL) törzs legkisebb gátló (MIC) és legkisebb baktericid (MBC) koncentrációi

Csíra- szám <sup>#</sup> (cfu/ml)	Lincomycin			Clindamycin		
	MIC*		MBC*	MIC*		MBC*
	lemezen	csőben	csőben	lemezen	csőben	lemezen
10 <sup>6</sup>	25	25	400	0,006	0,025	6,25
10 <sup>8</sup>	100	100	>800	1,6	25	50

\* Koncentráció, mg/l-ben megadva

# Öt mikroliter inokulumban adva

Az inokulum nagyságának hatása a kvantitatív rezisztenciára: A MIC és a csíraszám összefüggéseit a III. táblázat mutatja. A CM-MIC ezerszeresére emelkedik a csíraszám százszoros növelésével, míg a L esetében a változás csak 2-8-szoros. Folyékony táptalajban vizsgálva magasabb értékeket kaptunk, mint lemezhibítási módszerrel.

Szaporodási görbék. Az 1. ábra a két- és négyszeres gátló koncentráció, a MIC és a szubinhibitoros koncentráció hatását mutatja a plazmidmentes és a pBI109PGL plazmidot hordozó törzs szaporodási görbéjére. Ez a vizsgálat azt mutatja, hogy az LNT-termelő törzs szaporodását a MIC négyszerese sem gátolja tartósan.

Százszoros csíraszám mellett hasonló tendencia érvényesül, de a változások lassabban következnek be (2. ábra). A diagramok jobb oldalán, zárójelben a maradék antibiotikum koncentráció látható 24 óra inkubálás után. Az ábrán nem szerepel, de öt napos inkubálás alatt még az extrém magas, 100 mg/l CM-koncentráció is 28%-ára csökkent. A tenyészetekből CM-rezisztens mutánsokat nem izoláltunk.

A 3. ábra, a L és CM terápiásan elérhető legmagasabb szérumszintje (12,5 mg/l) és a csíraszám pár-

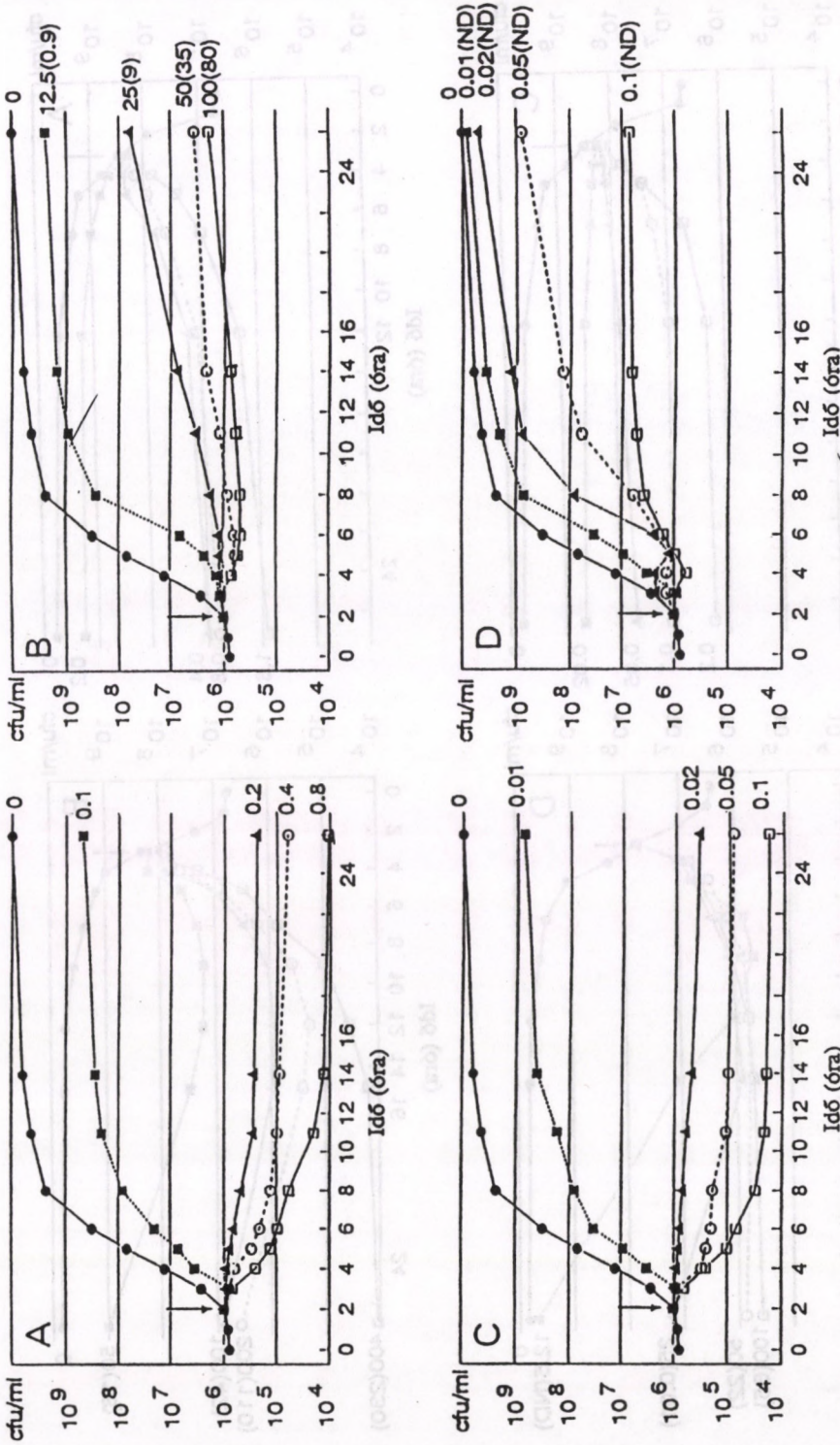
huzamos alakulását mutatja. Eszerint a CM sokkal gyorsabban inaktiválódik enzimermelő törzs tenyésztésében, mint a L, szintje az inkubálás 4. órájában a MIC érték alá kerül, amit a törzs exponenciális szaporodása követ.

Rezisztencia indukálási próbák: A pBI109PGL plazmidot hordozó törzs előtenyésztése 1,6 mg/l L-t vagy 0,003 mg/l CM-t tartalmazó agarlemezen nem okozott emelkedést a MIC értékekben az antibiotikum-mentes táptalajon tenyésztett kontrollhoz képest.

A linkozamidok akkumulációjának vizsgálata: A linkozamidok akkumulációját staphylococcusokban plazmidmentes, nem enzimermelő törzs tenyésztésén vizsgáltuk (4. ábra). Eredményeink szerint 20 mg/l L és CM gyors intracelluláris felhalmozódást vált ki: a csúcskoncentráció 5 perc alatt kialakul, majd hirtelen csökkenés után megállapodik egy állandó értéken. A CM intracelluláris koncentrációját a L által kialakított érték kétszeresének találtuk.

Energia-inhibitor, CCCP hozzáadása a CM-koncentrációjában magas csúcsot eredményez, amit lassú csökkenés követ. Ugyanez a változás a L esetében nem számottevő.



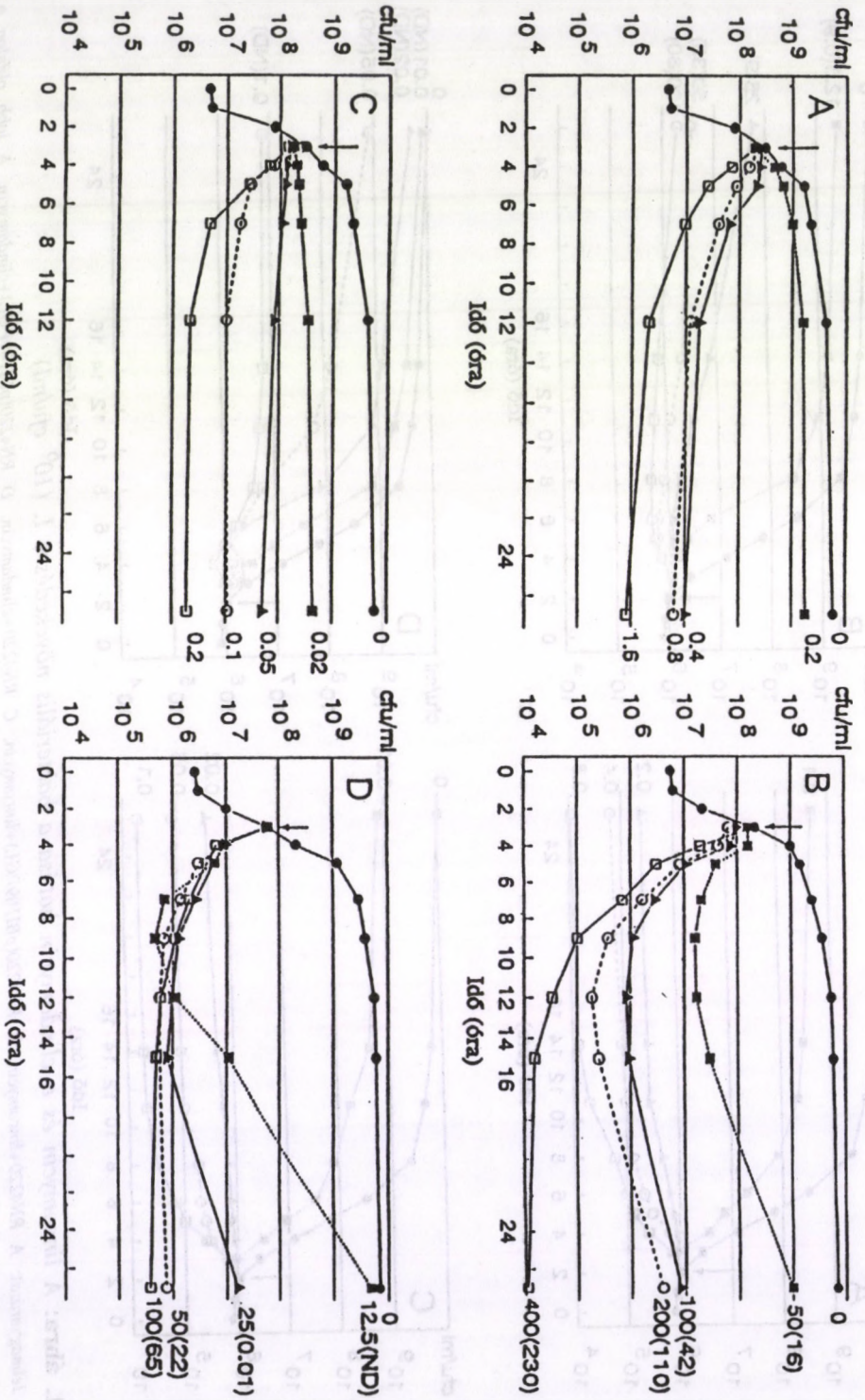


**1. ábra: A lincamycin és a clindamycin hatása a bakterialis növekedésre I. ( $10^6$  cfu/ml)**

Jelmagyarázat: A RN4220+lincamycin, B RN4220+clindamycin, C RN4220+clindamycin, D RN4220(pBI109PGL)+clindamycin. A jobb oldalon a kiindulási és zárójelben a 24 órai inkubálás utáni maradék antibiotikumkoncentráció (mg/l) látható. A nyíl az antibiotikumok hozzáadásának pillanatát jelzi.

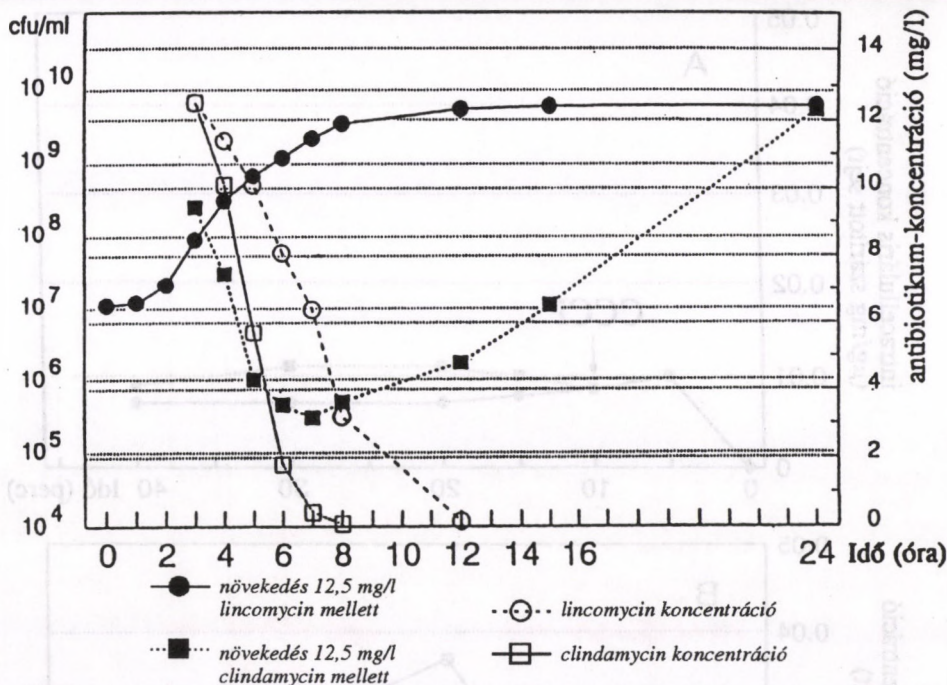
●— antibiotikum-mentes kontroll —▲— MIC. ●—●— MIC<sub>2</sub>. —□— MIC<sub>4</sub>





2. ábra: A lincomycin és a clindamycin hatása a bakterialis növekedésre II. (10<sup>8</sup> cfu/ml)





3. ábra: A csíraszám és az antibiotikum koncentráció párhuzamos alakulása a *Staphylococcus aureus* RN4220(pBI109PGL) törzs tenyésztésében.

### Megbeszélés

A linkozamid antibiotikumok bakteriosztatikus hatásukat az 50S riboszomális alegységhez kapcsolódva fejtik ki az aminoacil-tRNS disszociációját stimulálva (1, 15, 18).

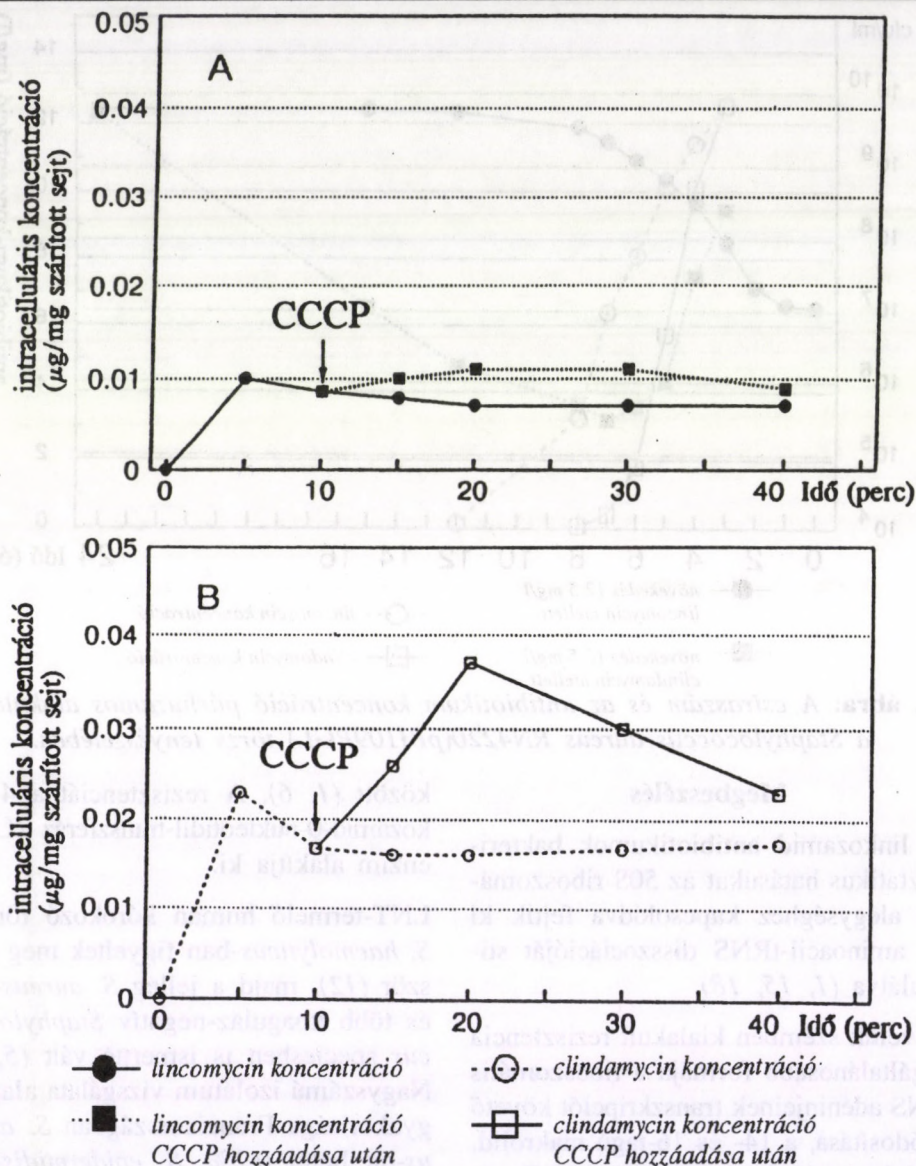
A velük szemben kialakult rezisztencia legáltalánosabb formája a riboszomális RNS adeninjeinek transzkripciót követő módosítása, a 14- és 16-tagú makrolid, a linkozamid és a streptogramin B antibiotikumok közötti teljes keresztrezisztenciában nyilvánul meg. Ez a típus lehet a szubsztrát által indukálható és konstitutív (1).

Az antibiotikumok hatástalanítása szubsztrát-specifikus enzim termelésén alapul, nem vált ki keresztrezisztenciát az egymással nem rokon antibiotikumok

között (1, 6). A rezisztenciát a 4-linkozamid-0-nukleotidil-transzferáz (LNT) enzim alakítja ki.

LNT-termelő humán kórokozó törzset *S. haemolyticus*-ban figyeltek meg először (12), majd a jelleg *S. aureus*-ban és több koaguláz-negatív *Staphylococcus* speciesben is ismertté vált (5,13). Nagyszámú izolátum vizsgálata alapján gyakorisága Franciaországban *S. aureus*-on belül 0,2%, *S. epidermidis*-ben 4,6%, *S. cohnii*-ban 8% (1). Magyarországon országos előfordulásáról nem áll rendelkezésre adat, de szelektált baktériumpopuláción belül, különleges kórházi osztályon 40%-os előfordulását figyeltük meg *S. capitis*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* és *S. warneri* izolátumok körében (3). Ez a típus megfigyelhető a Gram-pozitív coccuso-





**4. ábra:** A *Staphylococcus aureus* RN4220 lincomycin (A) és clindamycin (B) felvétele. A nyíl az energia-inhibitor (karbonilcianid *m*-klór-fenilhidrazon, CCCP) hozzáadásának pillanatát jelzi.

kon kívül a *L-t* is termelő streptomycések mellett a *Lactobacillus* genusban (1) is. Két egymással rokon gén, a *linA* és a *linA'* felelős termelésért (13), filogenetikailag a streptomycésekből származtat-

hatók (21). A *linA* gén a *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* és *S. hominis* törzsekben fordul elő, a *linA'* gént eddig *S. aureus*, *S. cohnii* és *S. epidermidis* izolátumokban mutatták ki (1).



A *lin* gének minden esetben extrakromoszomális lokalizációjúak. Két típusú rezisztencia plazmid hordozhatja őket. A pIP855 és a pIP856 plazmidot Franciaországban *S. haemolyticus* ill. *S. aureus* törzsből mutatták ki (12,13), a pBII plazmidot Magyarországon izoláltuk *S. epidermidis*-ben (4). Ezek mérete közel áll egymáshoz (2,4-2,6 kb) és azonosak abban, hogy csak egy rezisztencia gént hordoznak. Különböző tőlük a *S. epidermidis* 44 kb méretű pBI109PGL plazmidja, mely egyidejűleg határoz meg rezisztenciát három különböző antibiotikum csoport, penicillinek, aminoglikozidok és linkozamidok ellenében (4), ezáltal a *Staphylococcus* plazmidok új, korábban nem ismert osztályát képviseli.

Biokémiai vizsgálataink során linkozamid-inaktiválást az adenililációnak és foszforilációnak megfelelő körülmények között kaptunk. Inaktivációt mind a négy vizsgált nukleotid trifoszfát jelenlétében kimutattunk. Az ATP és a CTP bizonyult a leghatásosabb koenzimnek, a GTP és az UTP kisebb kapacitást mutatott. Ez a nukleotidizálás végbementé mellett szól, foszforiláció során az UTP lenne a hatásosabb koenzim (14). Marshall és mtsai *Streptomyces coelicolor* enzimológiai vizsgálatával az egyes LNT enzimek eltérő koenzim-specificitását találták (14). Mi nem mutattunk ki különbséget a különböző *Staphylococcus* speciesek LNT enzimjeinek koenzim igénye között (4).

Az LNT enzim in vitro egyaránt inaktiválja a L-t és a CM-t (5). Ez ellentmondásban áll a korong-diffúziós antibiotikum-érzékenységi vizsgálatokkal,

melyek szerint LNT-termelő *Staphylococcus* törzs L-rezisztens, de érzékenynek mutatkozik CM-re (12). E jelenség hátterének tisztázására megvizsgáltuk a csíraszám és a MIC összefüggését, különböző hatóanyagkoncentrációk hatását az LNT-termelő törzs szaporodására, a CM-rezisztencia esetleges indukálhatóságát és a linkozamidok felvétele közötti különbségeket.

Folyékony táptalajban vizsgálva a LNT-termelő törzs kvantitatív érzékenységét, lényegesen magasabb értékeket kaptunk, mint agar lemezen. A különbség nagyobbak adódott, mint azt *Leclercq* és *mtsai* találták (13).

A linkozamidok különböző koncentrációinak a szaporodási görbékre gyakorolt hatása azt bizonyította, hogy LNT-termelő törzs tenyészetében mindkét antibiotikum gyorsan inaktiválódik. Még a magas CM-koncentrációk sem fejtenek ki tartós gátló hatást: a terápiásan elérhető legmagasabb, 12,5 mg/l koncentrációjú CM is 4 óra inkubálás alatt a MIC alá csökkent, a törzs extrém magas, 100 mg/l CM-koncentráció mellett is életképes maradt és szaporodni volt képes. A CM-rezisztencia indukálódását, de még a linkozamidok MIC értékeinek mérsékelt emelkedését sem észleltük; CM-rezisztens mutánsokat nem izoláltunk.

Habár kémiai szerkezetük közel azonos, a 7 pozícióban található klorid szubsztituens a CM nagyobb lipid-oldékonyságát eredményezi (18). Kísérleteink során magasabb sejten belüli CM-, mint L-koncentrációt mértünk. A megfigyelt különbség a CM jobb membrán penet-



ráló képességének, nem pedig aktív transzportnak tulajdonítható. Energia inhibítorral (CCCP) kezelt sejtekben az intracelluláris CM-szint megduplázódott, míg a L koncentrációjában csak csekély emelkedés volt megfigyelhető. Ez a CM esetében jelentékeny efflux mechanizmus működését bizonyítja, mely energia felhasználásával folyamatosan eltávolítani igyekszik a sejtbe passzív transzporttal bejutott antibiotikumot. Ugyanez a L esetében nem számottevő (2).

Hasonló efflux működik *S. epidermidis* (8,19) és *S. aureus* (22) rezisztens törzseiben az erythromycin, illetve az új fluorokinolonok felvétele ellenében is. Eltérően azonban ezektől, a CM-specifikus efflux nem egy rezisztencia-gén működésének az eredménye, hanem az érzékeny *Staphylococcus* sajátja.

Az LNT enzim magas affinitása a CM-hez és az enzimet termelő törzs látszólagos CM-érzékenységének jelensége nem állnak tehát ellentmondásban egymással. Szilárd táptalajon a LNT enzim hatása a telepek közvetlen környezetére korlátozódik. A diffúzió a táptalaj egészéből állandó antibiotikum-koncentrációt biztosít. Ezzel szemben folyékony közegben az enzim gyors inaktiváló hatása egyszerre érvényesül az egész táptalajban, ez magasabb MIC-ben nyilvánul meg. Nagyobb csíraszámú tenyészetet vizsgálva az inaktiváló hatás megsokszorozódik, amint azt *Leclercq* és *mtsai* (13) is megfigyelték vagy kimutatható volt az exopenicillináz aktivitás inokulum-függőségén is (20).

A CM bakteriosztatikus szer lévén nem pusztítja el a sejteket, de gyors akkumulációja erős kezdeti gátló hatást vált ki. Ez az érzékeny és a LNT-termelő törzsek esetében egyaránt látszólagos CM-érzékenység formájában nyilvánul meg. Ugyanekkor a CM folyamatos aktív transzportja irányul ki a sejtől, lehetővé téve a sejtek szaporodó képességének visszanyerését a környező antibiotikum-koncentráció csökkenését követően. LNT-termelő törzseknél ezt a csökkenést meggyorsítja a konstitutívan termelő inaktiváló enzim. Amikor az extracelluláris CM-koncentráció az alá az érték alá csökken, mely még gátló intracelluláris szintet alakít ki, a sejtek ismét szaporodni kezdenek.

A L mára már szinte teljesen kiszorult a gyógyászati gyakorlatból: 1994-ben az Országos Gyógyszerészeti Intézet adatai szerint összesen 300 adagot hoztak be az országba, kizárólag kórházi felhasználásra. Ez az előző évi érték kevesebb, mint egyharmada. Ezzel szemben a CM felhasználása évről évre növekszik. Az elmúlt évben a különböző kiszerezések hatáserősségei közötti különbséget nem figyelembe véve 4 092 726 adag, az előző évi 211%-a fogyott (10). Ezzel magyarázható, hogy a CM felváltotta a L-t a klinikai mikrobiológiai gyakorlatban is.

Vizsgálatainkkal bizonyítottuk, hogy enzimtermelésen alapuló L-rezisztencia esetében a CM-től sem várható terápiás hatás. *Staphylococcus* törzs *in vivo* CM-érzékenységéről paradox módon a L rezisztencia *in vitro* vizsgálata nyújt valós információt, ezért a L, mint típus antibiotikum használatát javasoljuk a diagnosztikában, szemben a CM vizsgálá-



latát előíró nemzetközi gyakorlattal (17).

**Köszönetnyilvánítás:** A szerző köszönetet mond együttműködésükért Dr. Matsuhisa Inoue professzornak (Kita-

sato University, Sagamihara, Japán) és Dr. Kelemen Juditnak (Népjóléti Minisztérium).

### IRODALOM

1. Arthur M., Brisson-Noël A., Courvalin P.: Origin and evolution of genes specifying resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics: data and hypotheses. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1987, 20: 783.

2. Barcs I.: Different kinetic of enzymatic inactivation of lincomycin and clindamycin in *Staphylococcus aureus*. *J. Chemother.*, 1993, 5: 215.

3. Barcs I., Herendi Á., Lipcsey A., Bognár C., Hashimoto H.: Phage pattern and antibiotic resistance pattern of coagulase-negative staphylococci obtained from immunocompromised patients. *Microbiol. Immunol.*, 1992, 36: 947.

4. Barcs I., Pászti J.: Characterization of penicillin-, aminoglycoside- and lincosamide-inactivating enzymes determined by *Staphylococcus epidermidis* plasmid pBI109PGL. *Alpe Adria Microbiol. J.*, 1994, 2: 103.

5. Brisson-Noël A., Delrieu P., Samain D., Courvalin P.: Inactivation of lincosaminide antibiotics in *Staphylococcus*. *J. Biol. Chem.*, 1988, 263: 15880.

6. Eady E. A., Ross J. I., Cove J. H.: Multiple mechanisms of erythromycin resistance. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1990, 26: 461.

7. Fairweather N., Kennedy S., Foster T.

J., Kehoe M., Dougan G.: Expression of a cloned *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -haemolysin determinant in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, 1983, 41: 1112

8. Goldman R. C., Capobianco J. O.: Role of an energy-dependent efflux pump in plasmid pNE24-mediated resistance to 14- and 15- membered macrolides in *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1990, 34: 1973.

9. Hirai K., Aoyama H., Irikura T., Iyobe S., Mitsuhashi S.: Differences in susceptibilities to quinolones of outer membrane mutants of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1986, 29: 535.

10. Kelemen J.: személyes közlés

11. Konkoly Thege M.: Az antibiotikum-érzékenység vizsgálatának alapelvei és módszerei. Aerob és fakultatív anaerob baktériumok antibiotikum-érzékenységének meghatározása. In: Lányi B. (szerk): Járványügyi és klinikai bakteriológia/Módszertani útmutató. Országos Közegészségügyi Intézet, Budapest, 1980, 449. old.

12. Leclercq R., Carlier C., Duval J., Courvalin P.: Plasmid-mediated resistance to lincomycin by inactivation in *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1985, 28: 421.

13. Leclercq R., Brisson-Noël A., Duval J., Courvalin P.: Phenotypic expression



and genetic heterogeneity of lincosamide inactivation in *Staphylococcus* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1987, 31: 1887.

14. Marshall V. P., Liggett W. F., Cialdella J. I.: Enzymic inactivation of lincosaminide and macrolide antibiotics: divalent metal cation and coenzyme specificities. *J. Antibiot.*, 1989, 42: 826.

15. Menninger J. R., Otto D. P.: Erythromycin, carbomycin, and spiramycin inhibit protein synthesis by stimulating the dissociation of the peptidyl-tRNA from ribosomes. *Antibiot. Agents Chemother.*, 1982, 21: 811.

16. Ozanne B., Benveniste R., Tipper D., Davies J.: Aminoglycoside antibiotics: Inactivation by phosphorylation in *Escherichia coli* carrying R factors. *J. Bacteriol.*, 1969, 100: 1144.

17. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. NCCLS Document M100-S5. 1994, 14: M2-A5.

18. Rimmer D. M. D., Sales J. E. L.: Lincomycin and clindamycin. *Antibiot. Chemother.*, 1978, 25: 204.

19. Ross J. I., Eady E. A., Cove J. H., Cunliffe W. J., Baumberg S., Wootton J. C.: Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. *Mol. Microbiol.*, 1990, 4: 1207.

20. Tamura A., Mitsuhashi S., Okubo T., Inoue M.: Antibacterial activity of  $\beta$ -lactam antibiotics against *Staphylococcus aureus*: Effect of inoculum size and  $\beta$ -lactamase stability. *Chemotherapy*, (Tokyo) 1989, 37: 1.

21. Walker M. S., Walker J. B.: Streptomycin biosynthesis and metabolism. *J. Biol. Chem.*, 1970, 245: 6683.

22. Yoshida S., Kojima T., Inoue M., Mitsuhashi S.: Uptake of sparfloxacin and norfloxacin by clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1991, 35: 368.

## I. Barcs, Ph.D.

### Lincosamide resistance in staphylococci due to the simultaneous effect of enzymic inactivation and an efflux

An unusual type of staphylococcal resistance to lincosamides is the enzymic inactivation of the drugs. The lincosamide nucleotidyl transferase (LNT) enzymes inactivate both lincomycin and clindamycin in vitro. Clindamycin, due to its better membrane permeability, brings about a bacteriostatic intracellular concentration manifesting in pseudosensitivity to clindamycin; MICs of

LNT producing strains were less than 0.5 mg/l. The drug accumulated intracellularly is eliminated by an energy-dependent efflux when extracellular antibiotic concentration is decreased by the LNT enzyme. This efflux leads to no effectivity of clindamycin. As lincomycin has a low membrane permeability generating no bacteriostatic intracellular concentration, use of lincomycin as an appropriate class antibiotic of lincosamides is suggested.

Dr. Barcs István  
1553 Budapest, Pf. 1.