

Zweiter Zwischenbericht zum Forschungsvorhaben:

Erfassung phänotypischer und genotypischer Resistenzeigenschaften bei Salmonella- und E. coli-Isolaten vom Tier, Lebensmitteln, Futtermitteln und der Umwelt.

Helmuth, R., Guerra, B., Malorny, B., Miko, A., Schroeter, A.

Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
Nationales Referenzlabor für Salmonellen (NRL-Salm)

Die wesentliche Aufgabe des hier dargestellten Forschungsvorhabens ist es den Anteil resistenter Salmonellen und Escherichia coli Isolate, die vom Nutztier und den daraus resultierenden Lebensmitteln stammen, zu erfassen. Außerdem sollen ihre für die Resistenz verantwortlichen molekularbiologischen Strukturen aufgeklärt werden. Dadurch soll in diesem wichtigen Bereich der Lebensmittelsicherheit ein Beitrag zum vorsorgenden Verbraucherschutz geleistet werden.

Seit dem Ende der sechziger Jahre wurde bereits in den Vorläufereinrichtungen des jetzigen Nationalen Referenzlabors für Salmonellen am BgVV die Resistenz der eingesandten Salmonella Isolate im Agardiffusionstest, zuletzt nach DIN (58940 Teil 3) bestimmt. Je nach epidemiologischer Bedeutung und Zulassung variierte die Zahl der geprüften antimikrobiell wirksamen Substanzen über den Zeitraum der mehr als 30 Jahre. Im Jahr 2000 wurde parallel zu der Agardiffusionsmethode die Mikrodilutionsmethode eingeführt und der MHK-Wert (**M**inimale **H**emmstoff-**K**onzentration) aller eingesandten Salmonella Isolate bestimmt. Der Vorteil dieser Methode besteht u.a. darin, dass die Anzahl der Isolate mit einer definierten Empfindlichkeit gegenüber der getesteten Konzentration einer antimikrobiell-wirksamen Substanz angegeben werden kann. Dies erlaubt nicht nur die detaillierte Darstellung der gegenwärtigen Resistenzsituation bei Salmonella Isolaten, sondern gestattet es auch, die zeitliche Entwicklung der Resistenz bei Isolaten bestimmter Herkünfte wie z. B. Rind, Schwein oder Geflügel zu verfolgen. Da hier im Gegensatz zur Agardiffusion mehrere Konzentrationen des Wirkstoffs geprüft werden, sind die möglichen Angaben quantitativ und folglich viel präziser und aussagekräftiger. Die Auswahl der zu prüfenden antimikrobiellen Substanzen und deren Konzentrationen erfolgte nach den Vorgaben der ARBAO-Arbeitsgruppe der EU (**A**ntibiotic **R**esistance in **B**acteria of **A**nimal **O**ri origin, FAIR PL 97 3654) und in enger Abstimmung mit dem Danish Veterinary Institute (DVI, Dänemark) und dem Veterinärlabor des britischen Ministry for Agriculture Fisheries and Food in Weybridge. Die Mikrodilutionsmethode wird nach einem international häufig anerkannten Verfahren (NCCLS M31-A, Juni 1999) durchgeführt. Die verwendeten Grenzwerte zur Beurteilung der Empfindlichkeit sind den NCCLS-Vorschriften M31-A und M7-A5 und DANMAP1998 entnommen bzw. persönliche Informationen des DVI Kopenhagen.

1. Erfassung der Prävalenz von Resistenzen gegen siebzehn antimikrobiell wirksame Substanzen bei Salmonellen

Die Tabelle 1 gibt für die Jahre 2000 und 2001 den Anteil resistenter Isolate aufgrund der ermittelten MHK Werte an. Im Jahr 2000 waren 78,9 % und im Jahre 2001 65,9 % der untersuchten Salmonella Isolate einfach oder mehrfach resistent. Die Isolate vom Schwein und vom Rind/Kalb tragen besonders zu Resistenzsituation bei. Außerdem fällt der hohe Anteil von durchschnittlich 40 % multiresistenter Isolate besonders auf. Diese besitzen oft eine Fünffachresistenz (gegen Ampicillin AMP, Chloramphenicol CHL, Streptomycin-

Spectinomycin [STR-SP], Sulphonamiden SU und Tetracyclin TET). Besonders häufig ist diese bei dem Lysotyp DT104 von *Salmonella* Typhimurium nachweisbar (Tabelle 2). Sein Anteil hat im Jahr 2001 wieder auf insgesamt 45 % zugenommen. Diese DT104 Isolate können besonders häufig vom Rind/Kalb und Schwein isoliert werden. Mit über 42 % aller Isolate ist er auch beim Fleisch der Nutztiere nachweisbar und kann auf diesem Wege den Verbraucher erreichen. Bei den Nutztierarten Rind und Schwein herrscht der fünf- bis sechzehnfachresistente Salmonellatyp *S. Typhimurium* DT104 mit 68,3% (390/571) bzw. 63,2 % (431/682) vor. Im Berichtszeitraum wurden lediglich 2 sensible Isolate unter den Einsendungen vom Schwein und Rind gefunden.

Die im Jahre 2001 festgestellte Veränderung der Gesamtresistenzlage gegenüber 2000 von 79 % auf 66 % beruht hauptsächlich auf dem Rückgang der Anzahl einfach resistenter Isolate (Tabelle 1). Der Anteil multiresistenter Isolate sinkt nur um ca. 2 % und ist mit gleichbleibend über 40 % bemerkenswert hoch. Bei den einfach resistenten Isolaten betrifft der Rückgang vor allem die Resistenz gegenüber Sulfamethoxazol, deren Nachweis sich im ersten Jahr der Einführung der MHK-Bestimmung als technisch schwierig erwies. Diese technischen Schwierigkeiten sind jedoch im Jahre 2001 ausgeräumt.

Beim Rind ergab sich bei Ampicillin, Chloramphenicol, Florfenicol, Spectino- Streptomycin und Tetracyclin eine Zunahme des resistenten Erregeranteils von mehr als 10 %. Beim Schwein nahm die Ampicillinresistenz und beim Geflügel die Resistenz gegen Sulfamethoxazol um mehr als 10 % ab.

Die Tabelle 3 gibt einen Überblick über die im NRL-Salm getesteten 17 antimikrobiellen Substanzen sowie über den Anteil resistenter Isolate gegenüber der jeweiligen Substanz. Dabei besitzen die Isolate vom Geflügel überwiegend andere Resistenzmuster als die vom Rind und Schwein. Auffällig ist aber auch hier die chromosomal kodierte 5-fach Resistenz, die besonders häufig bei Isolaten vom Schwein und Rind nachweisbar ist (siehe auch Beitrag zu den molekularbiologischen Untersuchungen in diesem Bericht). Außerdem muss darauf hingewiesen werden, dass zu dieser 5-fach Resistenz auch weitere Resistenzen hinzutreten können (u.a. Sulfamethoxazol/Trimethoprim SXT, Trimethoprim TMP, Florfenicol FLO, Gentamicin GEN, Kanamycin KAN, Nalidixinsäure NAL, Neomycin NEO). Weiterhin wurden bereits vom Tier und Lebensmittel stammende *Salmonella* Isolate mit mehr als 10 Resistenzen nachgewiesen. In diesem Zusammenhang soll auch darauf hingewiesen werden, dass hier verschiedene Substanzklassen antimikrobiell wirksamer Substanzen betroffen sind, die dann für die Therapie nicht mehr eingesetzt werden können.

1.1 Bewertung der Situation bei Salmonellen

- Insgesamt liegt speziell bei den Salmonellen aus Lebensmittel liefernden Tieren die Resistenzrate mit durchschnittlich 87,7 % (2411/2749) auf einem viel zu hohen Niveau.
- Bei den Nutztierarten Rind und Schwein herrscht der resistente Salmonellatyp *S. Typhimurium* DT104 mit 87 bzw. 62 % vor.
- Bei DT 104 sind 68,3% (390/571) der vom Rind und 63,2 % (431/682) der vom Schwein stammenden Isolate fünf- bis sechzehnfachresistent.
- Beim Rind hat die Resistenz gegenüber 6 Substanzen um mehr als 10% zugenommen.

Tabelle 1. Resistenzverhalten von Salmonella Isolaten verschiedener Herkünfte 2000/2001

Herkunft	Sensitiv		Einfach resistent		Mehrfach resistent		N-Gesamt (% resistent)	
	2000	2001	2000	2001	2000	2001	2000	2001
Tier	440 (22,6 %)	561(28,0%)	599 (30,7 %)	546(27,2%)	912 (46,8 %)	897(44,8 %)	1951 (77,5 %)	2004 (72,0 %)
Rind	66 (16,2 %)	32(9,7 %)	115 (28,2 %)	25(7,6 %)	227 (55,6 %)	273 (82,7 %)	408 (83,8 %) ↑	330 (90,3 %)
Schwein	31 (5,7 %)	29(10,2 %)	63 (11,6 %)	41(14,4 %)	451 (82,7 %)	215 (75,4 %)	545 (94,3 %) ↓	285 (89,8 %)
Geflügel	105 (24,3 %)	275(36,7 %)	190 (44,0 %)	250(33,4 %)	137 (31,7 %)	224 (29,9 %)	432 (75,7 %) ↓	749 (63,3 %)
LM	220 (18,9 %)	355(36,8 %)	395 (34,0 %)	186(19,2 %)	548 (47,1 %)	425 (44,0 %)	1163 (81,1 %) ↓	966 (63,3 %)
FM	112 (23,1 %)	122(44,4 %)	299 (61,6 %)	124(45,1 %)	74 (15,3 %)	29 (10,5 %)	485 (76,9 %) ↓	275 (55,6 %)
Umwelt	52 (17,2 %)	151(56,6 %)	122 (40,3 %)	39(14,6 %)	129 (42,5 %)	77 (28,8 %)	303 (82,8 %) ↓	267 (43,4 %)
Total*	825 (21,1 %)	1227(34,1%)	1422(36,3 %)	927 (25,7 %)	1670(42,6 %)	1448 (40,2 %)	3917 (78,9 %) ↓	3602(65,9 %)

* einschließlich der hier nicht aufgeführten sonstigen Isolate

Tabelle 2. Vorkommen von *Salmonella* Typhimurium DT104 Isolaten in Deutschland von 1992 bis 2001.

Jahr	Anzahl von DT104 Isolaten (prozentualer Anteil von DT104 an allen <i>S. Typhimurium</i> Isolaten je Herkunft)						Total
	Rind	Schwein	Geflügel	Andere Tiere ¹	Fleisch	Andere Herkünfte	
1992	1 (0,4)	9 (3,9)	0 (<2,8)	6 (1,9)	10 (3,1)	0 (< 1,0)	26 (2,0)
1993	46 (10,6)	10 (3,6)	2 (1,9)	21 (2,8)	36 (6,6)	16 (4,9)	131 (5,4)
1994	156 (37,5)	12 (3,8)	4 (7,6)	19 (2,5)	36 (6,6)	24 (7,1)	251 (10,3)
1995	187 (40,3)	47 (14,8)	1 (2,2)	74 (8,3)	64 (10,4)	51 (15,5)	424 (15,9)
1996	402 (62,4)	124 (30,8)	33 (42,8)	76 (10,6)	113 (20,4)	44 (50,5)	792 (31,9)
1997	659 (74,5)	397 (50,6)	49 (31,2)	134 (15,9)	165 (30,7)	128 (41,8)	1532 (43,6)
1998	307 (63,0)	289 (53,1)	19 (28,8)	54 (9,9)	140 (37,6)	107 (40,2)	916 (40,2)
1999	518 (82,0)	179 (55,8)	21 (37,5)	59 (10,4)	149 (44,1)	74 (40,4)	1000 (47,7)
2000	174 (60,6)	329 (73,0)	5 (14,7)	17 (4,8)	100 (36,2)	78 (35,3)	703 (43,1)
2001	248 (87,6)	143 (61,9)	23 (23,2)	71 (17,8)	121 (42,3)	123 (42,0)	729 (45,6)

¹: Hunde, Katzen, Nagetiere, Vögel, Pferde, Wild, etc.

Tabelle 3. Prozentualer Anteil resistenter Salmonella-Isolate verschiedener Herkünfte im NRL-Salm 2000/2001

Substanz	Break Point µg/ml	Rind		Schwein		Geflügel		Tiere			
		2000	%	2001	2000	%	2001	2000	%	2001	
		n=408		n=330	n=545	n=285	n=432	n=749	n=1951	n=2004	
Ampicillin	32	52,0	↑	74,2	72,5	↓	57,9	9,3	13,9	34,5	29,5
Amoxicillin/ Clavulansäure	32	5,4		3,9	4,2		7,4	0,2	0,4	2,4	2,1
Ceftiofur	8	1,2		<0,3	0,2		<0,4	0,9	<0,1	1,2	0,1
Chloramphenicol	32	43,1	↑	70,9	47,9		47,7	5,8	8,4	24,7	24,7
Florfenicol	32	34,8	↑	65,8	40,0		44,6	1,4	5,1	19,6	22,1
Ciprofloxacin	2	0,5		<0,3	0,4		<0,4	0,7	0,3	0,4	0,2
Nalidixinsäure	32	1,5		1,2	3,1		2,5	5,3	7,3	3,1	3,8
Colistin	16	1,7		<0,3	2,2		<0,4	1,2	0,1	1,3	0,1
Gentamicin	16	1,0		<0,3	2,4		1,1	1,9	1,7	1,3	0,9
Kanamycin	64	5,9		1,2	2,4		5,3	7,4	5,3	3,5	3,0
Neomycin	16	5,9		1,2	2,8		5,3	7,4	5,3	3,6	3,0
Spectinomycin	128	44,9	↑	73,9	51,2		56,8	20,8	15,4	29,8	30,1
Streptomycin	32	54,4	↑	79,1	78,9		69,8	22,0	19,6	43,8	45,1
Sulfamethoxazol	512	80,9		89,1	91,0		83,5	71,1	↓ 57,4	72,8	↓ 61,5
Sulfamethoxazol/ Trimethoprim	4	5,9		6,1	5,3		10,2	16,2	5,7	6,5	5,6
Trimethoprim	16	6,4		7,0	5,7		10,2	16,7	6,4	6,9	6,3
Tetracyclin	16	52,2	↑	70,9	79,3		71,2	17,6	13,1	38,7	30,6

2. Molekularbiologische Charakterisierung multiresistenter Salmonellen

Die molekularbiologischen Untersuchungen konzentrierten sich auf wichtige Teilaspekte der Resistenzforschung. Sie dienen der Erfassung und Verhütung der Ausbreitung neuer und besonders gravierender Resistenzeigenschaften. So stehen die Charakterisierung der Chinolon und Fluorchinolonresistenz und die Erfassung der Integronstruktur sowie der Nachweis der häufigsten Resistenzgene bei multiresistenten Erregern im Vordergrund

2.1 Nachweis von Resistenzgenen bei multiresistenten Salmonellen

In den letzten 10 Jahren konnte auch in Deutschland bei Salmonella-Isolaten verschiedener Serovare ein Anstieg der Multiresistenz (MDR) gegenüber antimikrobiell wirksamen Substanzen nachgewiesen werden (siehe Teil 1 dieses Berichts). Deshalb wurde die umfassende molekularbiologische Charakterisierung repräsentativer MDR-Stämme fortgesetzt. Sie konzentrieren sich auf die in den letzten Jahren in Deutschland am häufigsten vorkommenden Salmonella-Serovare.

Dazu wurden 35 Isolate aller vorhandenen Salmonella-Serovare, die mindestens die Pentaresistenz AMP-CHL-[STR-SP]-SU-TET, z.T. in Kombination mit weiteren Resistenzen [TMP-KAN/NEO-NAL-GEN), aufwiesen, sowie 10 weitere multiresistente Isolate mit anderem Resistenzmuster und 6 sensible Stämme ausgewählt. Vom Serovar *Salmonella* Typhimurium wurden neben dem in den letzten Jahren bedeutsamen Phagentyp DT104 auch weitere Phagentypen mit einbezogen.

In 43 der untersuchten 45 multiresistenten Salmonella-Stämme konnten ein bis drei Class 1-Integrone unterschiedlicher Größe nachgewiesen werden (siehe auch Zwischenbericht 2001).

Class 1 Integrone, die bei Salmonellen am häufigsten nachgewiesenen Integron-Klasse, enthält 2 konservierte Regionen, das 5'-konservierte Segment (5'-CS) und das 3'-konservierte Segment (3'-CS). Das 5'-CS enthält das Integrase-Gen (*intl*), die Attachment-Site (*attI*) und einen Promoter, während das 3'-CS das *sul1*-Gen (verantwortlich für die Resistenz gegenüber Sulfonamiden) (Stokes and Hall, 1989, Sandvang et al., 1998, Sundström et al., 1988), das *qacEΔ1*-Gen (verantwortlich für die Resistenz gegenüber quaternären Ammoniumverbindungen) (Paulsen et al., 1993) und den ORF5 trägt. Zwischen dem 5'-CS und 3'-CS Segment ist/sind die Antibiotika-Resistenz-Genkassette/n integriert (Recchia and Hall, 1995).

Ein weiteres Ziel dieses Projekts ist es, in den MDR-Stämmen die wichtigsten für die Antibiotika-Resistenz kodierenden Gene innerhalb und außerhalb der Integronstrukturen zu identifizieren, um Aussagen zu den Resistenzmechanismen machen zu können. Dazu wurden PCR- und Gensonden-Techniken etabliert und geeignete Primer ermittelt. Zur Spezifitätstestung wurden außerdem Sequenzierungen durchgeführt. Die bisher eingesetzten Primer, ihre Zielgene sowie die PCR- und Hybridisierungs-Bedingungen können den Publikationen des NRL-Salm entnommen bzw. im NRL-Salm abgefragt werden. Antibiotika-Resistenzgene können auf Plasmiden oder im Chromosom lokalisiert sein. Diese Zuordnungen sind noch nicht abgeschlossen. Das für *S. Typhimurium* DT104-Stämme charakteristische Gencluster [*pse1-floR-aadA2-sul1-tet(G)*] liegt auf dem Chromosom (Threlfall et al., 1993).

Einige Resistenzgene haben die Fähigkeit, Genkassetten zu bilden, die in Integron/Transposon-Strukturen eingefügt werden und auf Plasmiden oder im Chromosom lokalisiert sein können. Diese mobilen Elemente sind in hohem Maße für die Ausbreitung der Resistenz verantwortlich (Carattoli, 2001).

Folgende Resistenzmechanismen und Resistenzgene konnten in den untersuchten multiresistenten Stämmen der wichtigsten in Deutschland auftretenden Salmonella-Serovare nachgewiesen werden:

Integrans -In 95,6% (43/45) der multiresistenten Salmonella-Stämme sind ein bis drei Class1-Integrans nachweisbar. Dabei tragen alle S. Typhimurium-Stämme mit dem Phänotyp AMP-CHL-[STR-SP]-SU-TET die bekannten zwei Integrans mit Amplikongrößen von 1000 bp und 1200 bp in der Integron-PCR. In einem S. Typhimurium DT104-Stamm mit dem Phänotyp AMP-CHL-[STR-SP]-SU-TET-TMP-NAL konnte zusätzlich zu diesen beiden Integrans ein drittes Integron mit einer Amplikongröße von 1600 bp in der Integron-PCR nachgewiesen werden. Die getesteten multiresistenten Salmonella-Stämme anderer Serovare weisen nur ein Integron mit Amplikongrößen von 1000 bp, 1600 bp, 1900 bp oder >2000 bp auf. Ein S. Brandenburg-Stamm trägt neben einem 1600 bp-Integron ein 600 bp-Integron. Die 6 sensiblen Kontrollstämme haben kein Integron.

β -Lactam-Resistenz -Die Resistenz gegenüber β -Lactam-Antibiotika (u.a. Resistenz gegenüber AMP) beruht vorwiegend auf der Wirkung von β -Lactamasen und wird durch zwei Typen von β -Lactamase-Genen codiert: *tem1* und *pse1*. Das β -Lactamase-Gen *oxa1* tritt in keinem Stamm auf. *Pse1* liegt als Genkassette vor und wird nur in den 12 S. Typhimurium-Stämmen mit dem Phänotyp AMP-CHL-[STR-SP]-SU-TET-(TMP) nachgewiesen, während *tem1* in allen 24 Ampicillin-resistenten Stämmen der einbezogenen 12 Salmonella-Serovare, außer in den S. Typhimurium-Stämmen mit dem Phänotyp AMP-CHL-[STR-SP]-SU-TET, vorkommt, jedoch niemals als Genkassette. In einem S. Typhimurium-Stamm konnten beide Gene nachgewiesen werden.

Aminoglycosid-Resistenz -Die Aminoglycosid-Resistenz (Resistenz gegenüber Spectinomycin, Streptomycin, Kanamycin/Neomycin, Gentamicin u.a.) beruht hauptsächlich auf der Wirkung von spezifischen Adenyltransferasen, Acetyltransferasen und Phosphotransferasen. Die sie kodierenden Gene sind die *aad*-Gene *aadA1a*, *aadA2*, *aadA5* für Spectinomycin/Streptomycin, *strA/B* für Streptomycin, *aphA1* für Kanamycin/Neomycin, *aac(3)-IV* für Gentamicin. *AadA*-Gene konnten in allen 45 multiresistenten Salmonella-Stämmen nachgewiesen werden und liegen dort stets in Genkassetten vor - entweder allein oder in Kombination mit einem *dfrA*-Gen bzw. einem oder mehreren noch nicht identifizierten anderen Resistenzgenen. 22 dieser Stämme haben zusätzlich *strA/B*-Gene. Mit einer Ausnahme konnte in allen 18 Kanamycin/Neomycin-resistenten Stämmen das *aphA1*-Gen nachgewiesen werden. *Aac(3)-IV* war in 5 Gentamicin-resistenten Stämmen nachweisbar, in weiteren 4 Stämmen wird die Gentamicin-Resistenz durch ein anderes, bisher nicht identifiziertes Gen codiert.

Chloramphenicol/Florfenicol-Resistenz -Die Resistenz gegenüber Chloramphenicol /Florfenicol wird durch die Produktion sowohl von Chloramphenicol-Acetyltransferasen als auch von Efflux-Proteinen bewirkt. In allen Chloramphenicol-resistenten Stämmen außer den S. Typhimurium Stämmen mit dem Phänotyp AMP-CHL-[STR-SP]-SU-TET-(TMP) konnte das Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen *catA1* nachgewiesen werden. Das Efflux-Protein-Gen *floR* ist für die 12 S. Typhimurium Stämme mit dem Phänotyp AMP-CHL-[STR-SP]-SU-TET-(TMP) typisch sowie für einen S. Brandenburg-Stamm, der phänotypisch Florfenicol-Resistenz zeigt. Neben *floR* konnte in diesem Stamm und 4 anderen multiresistenten Stämmen *cmlA* als weiteres Efflux-Protein-Gen nachgewiesen werden.

Tetracyclin-Resistenz -Die Resistenz gegenüber Tetracyclin wird durch die Efflux-Protein-Gene *tet(A)*, *tet(B)* und *tet(G)* codiert. *Tet(G)* tritt ausschließlich in den 12 S. Typhimurium-Stämmen mit dem Phänotyp AMP-CHL-[STR-SP]-SU-TET-(TMP) auf, während in den anderen Salmonella Serovaren entweder *tet(A)* (in 19 Stämmen) oder *tet(B)* (in 8 Stämmen) nachgewiesen wurde. In einem Stamm war keines der drei *tet*-Gene vorhanden.

Trimethoprim-Resistenz -Die Resistenz gegenüber Trimethoprim wird durch verschiedene *dfrA*- Dihydrofolatreductase-Gene kodiert. Die Gene *dfrA1*-like und *dfrA12* sind in 26 von 27 Trimethoprim-resistenten Stämmen vorhanden und immer in Kombination mit einem *aadA*-Gen in einer Genkassette nachweisbar, während in einem *S. Typhimurium* DT104 Stamm mit dem Phänotyp AMP-CHL-[STR-SP]-SU-TET-TMP-NAL das Gen *dfrA17* in Kombination mit dem *aadA*-Gen *aadA5* in einer Genkassette auftritt.

Sulfonamid-Resistenz -Die Resistenz gegenüber Sulfonamiden beruht auf der Wirkung von zwei alternativen Antibiotika-resistenten Varianten der Dihydropteroat-Synthasen im Folsäure-Pathway. Die kodierenden Gene sind *sul1* und *sul2*. *Sul1* war immer mit anderen Resistenzgenen assoziiert und wird in allen 43 Stämmen gefunden, die Class1-Integron(s) besitzen, während *sul2* in 16 Stämmen und außerhalb von Integronstrukturen auftritt. In 14 Stämmen konnten beide Gene nachgewiesen werden.

2.2 Bewertung der molekularbiologischen Eigenschaften von Salmonellen

- Nahezu 96% (43/45) der getesteten multiresistenten *Salmonella*-Stämme tragen Integrons.
- Die am weitesten verbreiteten Resistenzgene sind die *aadA*-Gene, die für die Spectinomycin/Streptomycin-Resistenz codieren und in allen 45 multiresistenten Stämmen vorkommen.
- Danach folgen mit 62,7 % die Trimethoprim-Resistenz *dfrA*-Gene.
- In allen *S. Typhimurium* Stämmen mit dem Phänotyp AMP-CHL-[STR-SP]-SU-TET ist neben einer *aadA*-Genkassette eine *pse1*-Genkassette nachweisbar, die für die β -Lactamase-Resistenz verantwortlich ist.
- Die hohe Prävalenz von Integrons in multiresistenten *Salmonella* Stämmen aller Serovaren sollte aufmerksam und kritisch verfolgt werden, da Integrons sehr effektive Vektoren zur Ausbreitung von Resistenzen darstellen.

2.3 Literatur zur molekularbiologischen Charakterisierung

- Carattoli, A. 2001. Importance of Integrons in the Diffusion of Resistance. *Vet. Res.* 32:243-259.
- Paulsen, I. T., T. G. Littlejohn, P. Radström, L. Sundström, O. Sköld, G. Swedberg, and R. A. Skurray. 1993. The 3' Conserved Segment of Integrons Contains a Gene Associated with Multidrug Resistance to Antiseptics and Disinfectants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:761-768.
- Recchia, G. D. and R. M. Hall. 1995. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology* 141:3015-3027.
- Ridley, A. and E. J. Threlfall. 1998. Molecular Epidemiology of Antibiotic Resistance Genes in Multiresistant Epidemic *Salmonella typhimurium* DT 104. *Microb. Drug Res.* 4:113-118.
- Sandvang, D., F. M. Aarestrup, and L. B. Jensen. 1998. Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microb. Lett.* 160:37-41.
- Stokes, H. W. and R. M. Hall. 1989. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrations. *Mol. Microbiol.* 3:1669-1683.
- Sundström, L., P. Radström, G. Swedberg, and O. Sköld. 1988. Site-specific recombination promotes linkage between trimethoprim- and sulfonamide resistance genes. Sequence characterization of *dhfrV* and *sull* and a recombination active locus of Tn21. *Mol. Gen. Genet* 213:191-201.
- Threlfall, E. J., B. Rowe, and L. R. Ward. 1993. A comparison of multiple drug resistance in salmonellas from humans and food animals in England and Wales, 1981 and 1990. *Epidemiol. Infect.* 111:189-197.

3. Chinolonresistenz bei Salmonellen (2000-2001)

Chinolone und Fluorchinolone sind eine Klasse hochwirksamer antimikrobiell wirksamer Substanzen, die die DNA Gyrase und Topoisomerase IV von sensiblen Bakterien inhibieren können. Sie gehören zu den neuesten und wirksamsten antimikrobiell wirksamen Substanzen, die im Falle einer lebensbedrohlichen Salmonellose als Mittel der Wahl angesehen werden. Deswegen soll die Chinolonresistenz bei Salmonellen gesondert betrachtet werden.

Die Zulassung des Fluorchinolons Enrofloxacin in Deutschland 1989 zur Therapie von Nutztieren verursachte einen Anstieg der Chinolon-resistenten Salmonella Isolate (Malorny et al. 1999). Seit dem Jahr 2000 wird die phänotypische Resistenz von Salmonellen und *E. coli* am NRL-Salm mit dem Verfahren der Mikrodilution gemessen und löst damit die ungenauere Methode der Agardiffusion ab. In diesem Bericht stellen wir die Resistenzsituation bei Salmonellen isoliert in den Jahren 2000 und 2001 gegenüber dem Chinolon Nalidixinsäure und dem Fluorchinolon Ciprofloxacin dar. Nalidixinsäure ist ein Antibiotikum der ersten Generation der Chinolone, während Ciprofloxacin und Enrofloxacin, zur dritten Generation gehören. Ciprofloxacin ist nur für die Humanmedizin zugelassen. Allerdings besteht eine Kreuzresistenz. Der vorliegende Bericht konzentriert sich besonders auf die Situation von Salmonella-Isolaten aus Geflügel, da Resistenzen besonders in diesen Isolaten gefunden wurden. Die Abbildungen 1-4 zeigen die Verteilungen der MHK-Werte verschiedener Salmonella Erregergruppen. Da speziell bei Fluorchinolonen die Größe von Grenzwerten kontrovers diskutiert wird, ist dies die objektivste Methode Resistenzdaten zu präsentieren. Das gilt besonders vor dem Hintergrund, dass Isolate mit nur reduzierter Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen als therapeutisch bedenklich einzustufen sind (Hof et al., 1991; Piddock et al., 1993), da sie auch schon zum Tode von Patienten geführt haben (Mølback et al., 1999).

3.1 Fluorchinolonresistenz: Gesamtsituation und Vorkommen beim Geflügel

Abbildung 1 zeigt die MHK-Wert-Verteilung aller untersuchten Salmonella Isolate für Nalidixinsäure und Ciprofloxacin aus den Jahren 2000 und 2001. Der Anteil Nalidixinsäure resistenter Salmonellen aus den Jahren 2000 und 2001 betrug 4,8 %. Die Ciprofloxacin Resistenz ($\geq 2 \mu\text{g/ml}$) betrug 0,6%. Diese Werte erscheinen oberflächlich betrachtet recht gering, eine genauere Analyse der resistenten Salmonellen zeigt jedoch, dass es in einigen Bereichen zum Teil gravierende Resistenzprobleme gibt. Während die Nalidixinsäure-Resistenz bei Isolaten vom Schwein (incl. Lebensmittel vom Schwein) 1,7% (n = 1037) und Rind (incl. Lebensmittel vom Rind) 1,0% (n = 750) beträgt, sind Isolate vom Geflügel und Geflügelfleisch zu 11,4% Nalidixinsäure resistent. Abbildung 2 zeigt die MHK-Wert Verteilung der untersuchten Salmonella Isolate vom Geflügel und Geflügelfleisch aus den Jahren 2000 und 2001 gegenüber Nalidixinsäure und Ciprofloxacin. Eine genauere Analyse zeigt, dass bestimmte Serotypen, wie *S. Paratyphi B d-Tartrat* positiv, *S. Hadar*, *S. Virchow* und zunehmend auch *S. Enteritidis* für die Resistenzrate verantwortlich sind (Abbildung 3). Nahezu 45% aller *S. Paratyphi B d-Tartrat* positiven Isolate vom Huhn waren durchschnittlich in den Jahren 2000/2001 Nalidixinsäure resistent. 1998/1999 waren es sogar 61,1%. Ähnlich hohe Raten findet man in Isolaten von *S. Virchow* und *S. Hadar* aus Geflügel wieder.

3.2 Chinolonresistenz bei *S. Enteritidis* PT4 und *S. Typhimurium* DT104

S. Typhimurium DT104 und *S. Enteritidis* PT4 verursachen die häufigsten Salmonellosen des Menschen und sind die in den letzten Jahren die am häufigsten an das NRL-Salm eingesandten Phagentypen. Eine Analyse speziell ihrer Resistenzraten ist daher von besonderem epidemiologischen Interesse. *S. Enteritidis* PT4 ist im Geflügel der am häufigsten vorkommende Phagentyp. Abbildung 4 zeigt die Nalidixinsäure Resistenz dieser Isolate über einen Zeitraum von vier Jahren. 1998-2000 erfolgte ein kontinuierlicher Anstieg

der Resistenzraten, der sich 2001 konsolidiert. Ähnlich hohe Raten wurden von Rabsch et al. (2001) für humane Isolate beschrieben.

S. Typhimurium DT104 wird hauptsächlich vom Schwein und Rind isoliert. Auch hier ist ein leichter Anstieg der Chinolonresistenz seit 1998 zu beobachten (Abbildung 4).

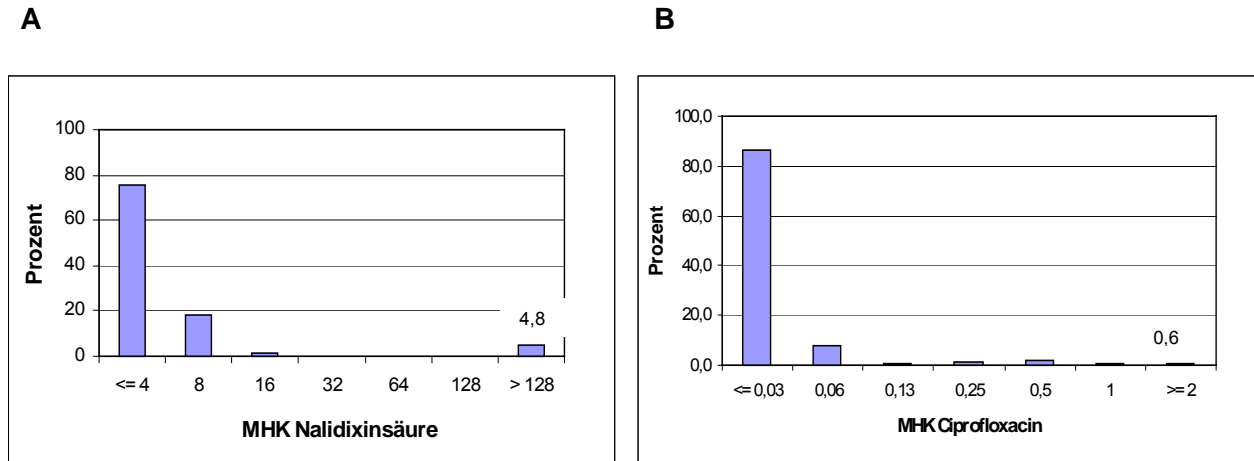


Abbildung 1. MHK-Wert Verteilung aller untersuchten Salmonella Isolate für A) Nalidixinsäure und B) Ciprofloxacin aus dem Jahr 2000 und 2001 (n = 6548)

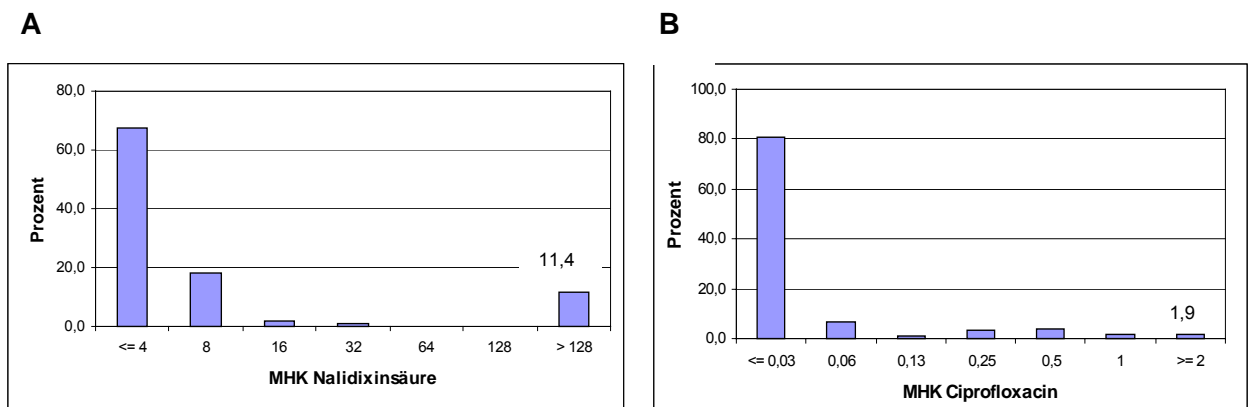


Abbildung 2. MHK-Wert Verteilung von Salmonella Isolaten isoliert vom Geflügel und Geflügelfleisch für A) Nalidixinsäure und B) Ciprofloxacin aus dem Jahr 2000 und 2001 (n = 1318)

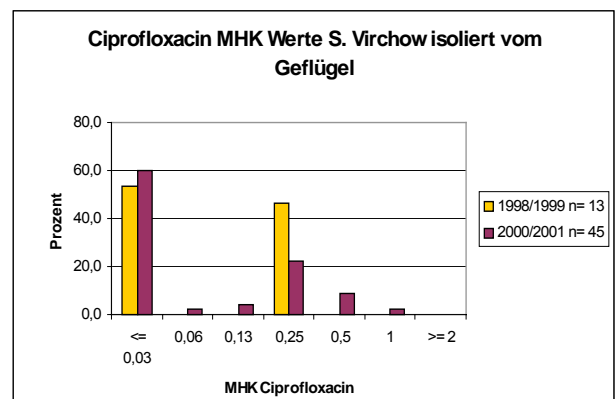
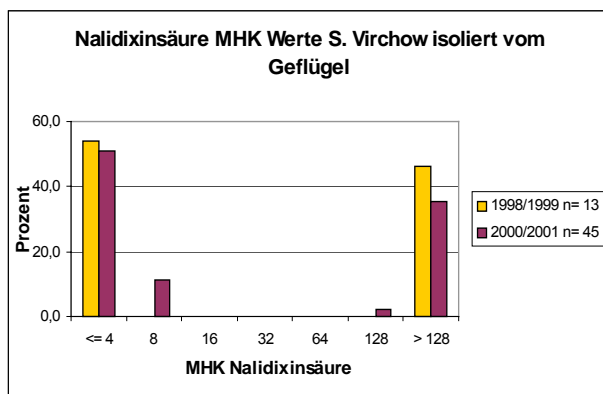
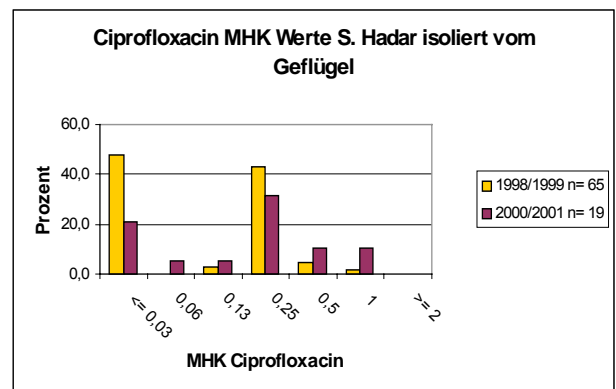
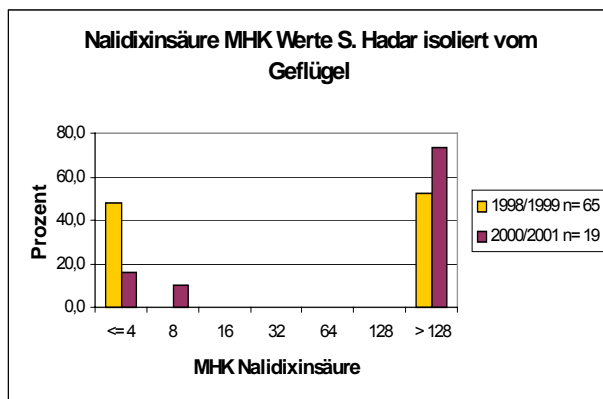
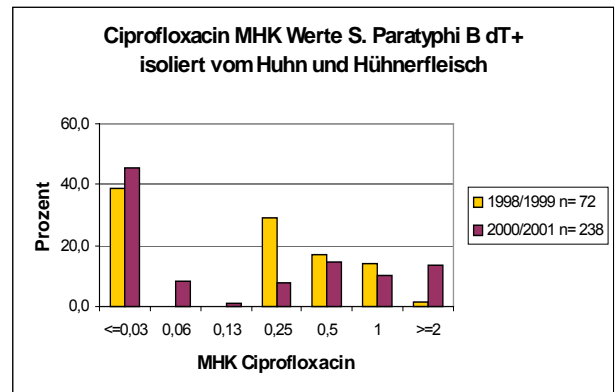
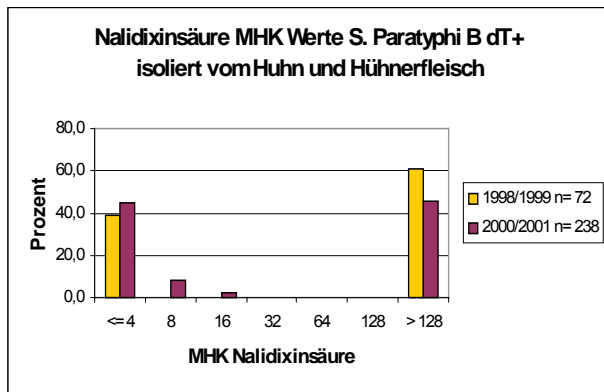


Abbildung 3. MHK-Wert Verteilung von spezifischen Salmonella Serovare isoliert vom Geflügel.

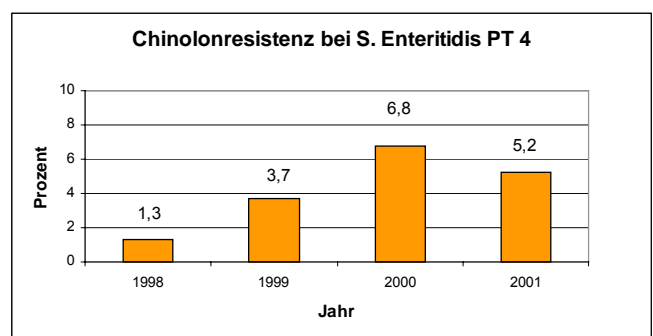
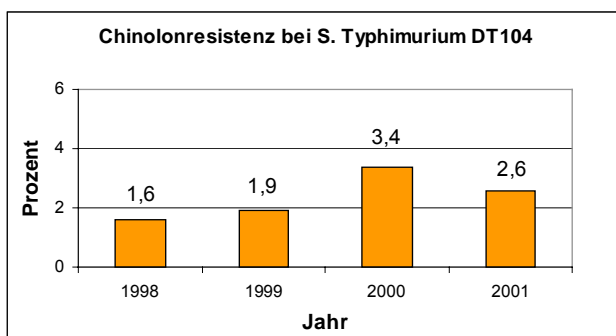


Abbildung 4. Chinolonresistenz (Nalidixinsäure) bei S. Typhimurium DT104 und S. Enteritidis PT4 aller Salmonella Isolate

3.3 Molekularbiologische Charakterisierung der Chinolonresistenz bei Salmonellen

Nalidixinsäure zeigt sich als guter Indikator für die ersten Schritte der Entstehung einer Resistenz gegenüber Flurochinolonen. Während eine Mutation in der QRDR Region des *gyrA* Gens eine hohe Resistenz gegenüber Nalidixinsäure anzeigt, bleibt die Resistenz gegenüber Fluorchinolonen unter dem Grenzwert (nach NCCLS für Ciprofloxacin ≥ 4 und nach DIN ≥ 2). Dies bewertet man als eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen. Reduzierte Empfindlichkeiten können auch auf sog. Effluxpumpen zurück geführt werden. Erfolgt eine zweite Mutation in derselben Region, werden Salmonella Stämme, die vorher nur eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen hatten, resistent. Eine weitere Punktmutation in dem *gyrB* Gen oder *parC* Gen verursacht eine bedeutend höhere Resistenz und führt zu Stämmen, die gegenüber Fluorchinolonen hochresistent sind (Tabelle 4).

Tabelle 4. Effekte der Resistenzmechanismen auf den MHK-Wert von Chinolonen bei gram-negativen Bakterien.

Genotyp	MHK _{Nal} (µg/ml)	MHK _{Cip} (µg/ml)
Wildtyp	≥ 4	0,015
GyrA, Substitution für Ser83	≥ 128	0,125-4
GyrA, Substitution für Asp87	≥ 128	0,125-2
GyrA, Substitution für Ser83 + Asp87	≥ 128	4-8
GyrA + GyrB Substitution	≥ 128	32-128
1 GyrA + ParC Substitution	≥ 128	4-8
2 GyrA + ParC Substitution	≥ 128	8-32
Regulation von OmpF		0,25-0,5
Überexpression von AcrAB-TolC		0,12
Überexpression von MarA		0,12

Im Rahmen der Arbeit wurden von verschiedenen chinolonresistenten Salmonella Isolaten die QRDR Region des *gyrA* und *parC* Gens sequenziert. Tabelle 5 gibt eine Zusammenfassung der erhaltenen Ergebnisse. Es wurden verschiedene Punktmutationen gefunden, die zur Chinolonresistenz und reduzierten Empfindlichkeit gegenüber Ciprofloxacin führten. Doppelte Punktmutationen, in der QRDR Region an Position 83 und 87 wurden bisher nicht gefunden und auch im *parC* Gen waren bisher keine Punktmutationen in der QRDR Region nachweisbar.

Tabelle 5. Zusammenhang zwischen MHK Wert gegenüber Nalidixinsäure und Ciprofloxacin und Punktmutationen in der QRDR Region von *gyrA*.

Serovar	Anzahl der Stämme	<i>gyrA</i> 83 (Aminosäure)	<i>gyrA</i> 87 (Aminosäure)	MIC (µg/ml) NAL	MIC (µg/ml) CIP
Paratyphi B (dT+)	3	TCC (S)	GAC (D)	≤ 0,03	≤ 4,0
Enteritidis	1	TCC (S)	GAC (D)	≤ 0,03	≤ 4,0
Typhimurium DT104	1	TCC (S)	GAC (D)	≤ 0,03	≤ 4,0
Paratyphi B (dT+)	1	TCC (S)	AAC (N)	≥ 128	0,25
Hadar	1	TCC (S)	AAC (N)	≥ 128	1
Anatum	1	TCC (S)	GGC (G)	≥ 128	1
Senftenberg	1	TCC (S)	TAC (Y)	≥ 128	0,5
Enteritidis	1	TCC (S)	TAC (Y)	≥ 128	0,5
Blockley	2	TCC (S)	TAC (Y)	≥ 128	0,25
Typhimurium DT104	1	TCC (S)	TAC (Y)	≥ 128	0,25
Saintpaul	1	TAC (Y)	GAC (D)	≥ 128	1
Enteritidis	3	TAC (Y)	GAC (D)	≥ 128	0,25-0,5
Paratyphi B (dT+)	9	TTC (F)	GAC (D)	≥ 128	0,5-2
Hadar	1	TTC (F)	GAC (D)	≥ 128	0,5
Typhimurium DT104	4	TTC (F)	GAC (D)	≥ 128	1-2

3.4 Bewertung zur Chinolonresistenz

- Die Chinolonresistenz der untersuchten *Salmonella* Stämme ist bei Isolaten vom Geflügel mit 11,4 % im Vergleich zu anderen Nutztierarten besonders hoch.
- Speziell die Serotypen *S. Paratyphi B dT+*, *S. Virchow* und *S. Hadar* zeigen Werte über 40 %.
- Das gehäufte Vorkommen chinolonresistenter Erreger beim Geflügel belegt, dass die im Rahmen der Bestandsmedikation oral verabreichten Fluorchinolone einen hohen Selektionsdruck ausüben.
- Nalidixinsäure erweist sich als guter Frühindikator für eine beginnende Fluorchinolonresistenz.
- Bisher wurde nur eine Punktmutation in der QRDR Region des *gyrA* Gens gefunden, die eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen verursacht.
- Um dem Entstehen hochresistenter *Salmonellen* vorzubeugen, sollen Chinolone restriktiv eingesetzt werden.

3.5 Literatur zur Chinolonresistenz

Bager, F., R. Helmuth. 2001. Epidemiology of resistance to quinolones in *Salmonella*. Vet. Res. 32:285-290.

Hof, H., I. Ehrhard, H. Tschäpe. 1991. Presence of quinolone resistance in a strain of *Salmonella typhimurium*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 10:747-749.

Malorny, B., A. Schroeter, R. Helmuth. 1999. Incidence of chinolone resistance over the period 1986 to 1998 in veterinary *Salmonella* isolates from Germany. Antimicrob. Agents Chemother. 43:2278-2282.

Mølbak, K., D. L. Baggesen, F. M. Aarestrup, J. M. Ebbesen, J. Engberg, K. Frydendahl, P. Gerner-Smidt, A. M. Petersen, H. C. Wegener. 1999. An outbreak of multidrug-resistant, chinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. N. Engl. J. Med. 341:1420-1425.

Piddock, L. J., D. J. Griggs, M. C. Hall, and Y. F. Jin. 1993. Ciprofloxacin resistance in clinical isolates of *Salmonella typhimurium* obtained from two patients. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 37:662-666.

Rabsch, W., A. Fruth, and H. Tschäpe. 2001. Entwicklung der Fluorchinolone-Resistenz bei Salmonellen. *Fleischwirtschaft.* 12:103-106.

4. Erfassung der Resistenz bei *Escherichia coli*

Wie bereits im ersten Zwischenbericht erwähnt musste die Erfassung der Resistenz bei *Escherichia coli* Isolaten erst aufgebaut werden. Das ist inzwischen geschehen und die phänotypische Resistenzbestimmung ist somit voll etabliert.

Die Auswahl von *E. coli* Stämmen zur Bestimmung der MHK-Werte von 17 antimikrobiell wirksamen Substanzen erfolgte aus der Datenbank des BgVV Bereichs Dessau (Fachgebiet 502). Sie enthält Daten über die Herkunft, Serotyp, Biotyp und molekularbiologische Pathogenitätseigenschaften von *E. coli* Stämmen, die an das Fachgebiet zur weiteren Untersuchung von Landesuntersuchungsämtern, Universitäten, Firmen und anderen öffentlichen Einrichtungen eingesandt wurden.

Der Beginn des Monitorings von Resistenzen, Resistenzgenen, resistenten Erregern und deren molekularbiologische Charakterisierung wurde für *E. coli* Stämme für das Jahr 1999 festgelegt. Dabei sollten speziell *E. coli* Isolate aus Nutztieren (Rind, Schwein, Geflügel) und Lebensmitteln betrachtet werden.

Die Datenbank des Fg. 502 enthält insgesamt 668 Isolate aus dem Jahr 1999, 700 Isolate aus dem Jahr 2000, 748 aus dem Jahr 2001 (bis einschließlich Oktober 2001). Tabelle 6 zeigt die Anzahl der Isolate aus jeder Herkunftskategorie und Jahr, die zum Resistenzmonitoring ausgewählt wurden. Bei der Auswahl wurde darauf geachtet, dass für jede Kategorie repräsentative Isolate und ein möglichst breites Spektrum an Serotypen erfasst wurde. Das Fachgebiet 502 übernahm die Überprüfung der eingesandten *E. coli* Isolate und stellt sie dem Fachgebiet 501 zur Resistenzbestimmung und Charakterisierung als Glycerinkulturen zur Verfügung.

Die Tabelle 7 gibt den durchschnittlichen Anteil resistenter *E. coli* Isolate der Jahre 1999, 2000 und 2001, aufgrund der ermittelten MHK Werte, an. Die Isolate vom Schwein und vom Geflügel tragen besonders zur Resistenzsituation bei den untersuchten *E. coli* Isolaten bei. Der hohe Anteil von durchschnittlich 36 % multiresistenter Isolate fällt besonders auf. Diese besitzen oft (53 % der resistenten Isolate) eine mindestens Dreifachresistenz (Streptomycin, Sulfonamiden und Tetracyclin). Häufig ist sie mit einer Resistenz gegen, Ampicillin, und/oder Spectinomycin, u/o Kanamycin, u/o Chloramphenicol, u/o Trimethoprim, u/o Nalidixinsäure gekoppelt. Tabelle 8 zeigt den resistenten Anteil gegenüber den untersuchten antimikrobiell wirksamen Substanzen. Auffällig ist, dass beim Geflügel bereits ein Drittel (33,3 %) der Isolate eine Nalidixinsäureresistenz zeigen. In Bezug auf die Ciprofloxacinresistenz weisen 19,8 % der Isolate eine reduzierte Empfindlichkeit und 13,5 % einen MHK Wert von über 4 µg/ml auf. Somit liegt bereits heute wie bei den Salmonellen die Chinolonresistenz mit einem Drittel der untersuchten *E. coli* Isolate vom Geflügel bedenklich hoch.

Tabelle 6. Anzahl der zur Resistenzbestimmung ausgewählten *E. coli* Isolate für die Jahre 1999,2000 und 2001.

Herkunft/Jahr	1999	2000	2001	Gesamt
Rind	83	57	40	180
(davon Lebensmittel)	(59)	(33)	(22)	(114)
Schwein	11	21	10	42
(davon Lebensmittel)	(0)	(0)	(2)	(2)
Geflügel	24	35	37	96
(davon Lebensmittel)	(0)	(0)	(0)	(0)
Summe	118	113	87	318
(davon Lebensmittel)	(59)	(33)	(24)	(116)

Tabelle 7. Prozentualer Anteil resistenter *E. coli* Isolate nach NCCLS, DIN 58940 Teil3.

Herkunft (N. Stämme)	Sensitiv N. Stämme (%)	Resistent * N. Stämme (%)	Einfach resistent (%)	Mehrfach resistent (%)
Rind (N=180)	130 (72,2)	50 (27,8)	8 (4,4)	42 (23,3)
Schwein (N=42)	17 (40,5)	25 (59,5)	3 (7,1)	22 (52,4)
Geflügel (N=96)	37 (38,5)	59 (61,5)	8 (8,3)	51 (53,1)
Total (N=318)	184 (57,9)	134 (42,1)	19 (5,9)	115 (36,2)

*: Inklusive Stämme mit intermediären-Resistenzwerten.

Tabelle 8. Prozentualer Anteil resistenter *E. coli* Isolate verschiedener Herkünfte nach der Mikrodilutionsmethode.

Antimikrobielle Substanz	Rind (N =180) ¹	Schwein (N =42) ¹	Geflügel (N =96) ¹	Gesamt (N =318) ¹
Ampicillin	8,9	31,0	33,3	19,2
Amoxicillin/ Clavulansäure	3,3	0	5,2	3,5
Ceftiofur	0	0	0	0
Chloramphenicol	5,0	23,8	11,5	9,4
Ciprofloxacin (MHK ≥ 4 µg/ ml)	0	2,4	13,5	4,4
(MHK 0.12-2 µg/ ml)*	1,7	2,4	19,8	7,2
Colistin	0,6	0	1,0	0,6
Florfenicol	1,1	7,1	0	1,6
Gentamicin	1,1	2,4	3,1	1,9
Kanamycin	5,0	16,7	16,7	10,1
Nalidixinsäure	2,2	4,8	33,3	11,9
Neomycin	5,0	16,7	16,7	10,1
Sulfamethoxazol	18,3	40,5	50,0	30,8
Spectinomycin	9,4	31,0	17,7	14,8
Streptomycin	31,4	52,4	40,6	31,4
Sulfamethoxazol/ Trimethoprim	3,3	9,5	20,8	9,4
Tetracyclin	15,6	50,0	44,8	28,9
Trimethoprim	3,3	11,9	21,9	10,1

¹: Auffällige prozentuale Anteile wurden fett markiert. N gibt die Anzahl getesteter Isolate an. *:Reduzierte Empfindlichkeit

4.1 Bewertung der Situation bei *E. coli*

- 42 % der untersuchten *E. coli* sind resistent.
- 36 % aller *E. coli* sind mehrfach resistent.
- Isolate vom Geflügel und Schwein weisen mit 61 % bzw. 59 % besonders hohe Prävalenzen resistenter Isolate auf.
- 33 % der Geflügel Isolate sind Chinolon resistent und weisen eine verminderte Empfindlichkeit (19,8 %) bzw. Resistenz (13,5 %) gegen Fluorchinolone auf.

5. Molekularbiologische Charakterisierung resistenter *E. coli*

Die molekularbiologischen Untersuchungen konzentrierten sich bisher auf wichtige Teilaspekte der Resistenzforschung. So standen die Charakterisierung ausgewählter Resistenzgene und die Erfassung der Integronstruktur resistenter Erreger im Vordergrund.

5.1 Nachweis von Resistenzgenen bei resistenten *E. coli*

Um Aussagen zu den Resistenzmechanismen machen zu können ist es eines der Ziele dieses Projekts auch bei den resistenten *E. coli* Stämmen, die wichtigsten Resistenzgene zu identifizieren. Dazu wurden PCR- und Gensonden-Techniken etabliert und geeignete Primer ermittelt (siehe auch Zwischenbericht 2001). Die bisher eingesetzten Primer, ihre Zielgene und die PCR-Bedingungen können im NRL-Salm abgefragt werden. Zur Spezifitätstestung werden außerdem Sequenzierungen durchgeführt.

Bis jetzt sind 88 der 134 resistenten *E. coli* Stämme charakterisiert worden. Alle diese Stämme wurden auf unterschiedliche Gene, die für die Resistenz gegen antimikrobielle wirksame Substanzen verantwortlich sind, untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Es zeigt sich, dass bei den meisten Resistenzen bekannte Gene dominieren. Allerdings tragen einige Stämme mehr als ein Resistenzgen und bei einigen Stämmen konnten die Resistenzgene bisher nicht identifiziert werden.

5.2 Integronstruktur bei resistenten *E. coli*

In multiresistenten *E. coli* Stämmen von Mensch und Tier werden häufig Integrons nachgewiesen. Diese können entweder auf dem Bakterienchromosom oder auf Plasmiden mit weitem Wirtsbereich (broad host range) lokalisiert sein und in übertragbare Elemente (Transposons u.ä.) integriert werden (siehe auch Zwischenbericht 2001). Diesen Integrons kommt aufgrund ihrer besonderen Fähigkeit, Antibiotika-Resistenzgene anzuhäufen, zu exprimieren und "en bloc" vertikal oder horizontal zu übertragen, eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von Multiresistenzen zu. Deshalb wurden resistente Stämme, die in den letzten drei Jahren in Deutschland am häufigsten vorkommenden *E. coli*, umfassend molekularbiologisch charakterisiert.

Bis jetzt sind 88 ausgewählte resistente *E. coli* Stämme von 1999 und 2000, charakterisiert worden. Alle diese Stämme wurden auf Integronstrukturen und die mit Integrons assoziierten *sul1* (verantwortlich für die Resistenz gegenüber Sulfonamiden) und *qacEΔ1*-Gene (verantwortlich für die Resistenz gegenüber quarternären Ammoniumverbindungen) untersucht. Dazu wurden PCR- und Gensonden-Techniken und geeignete Primer benutzt. Außerdem wurden Sequenzierungen für Spezifitätstestungen durchgeführt.

Die Untersuchungen erbrachten die folgenden Ergebnisse. Insgesamt tragen 27 (30,68 %) von 88 resistenten *E. coli* Stämmen Class 1-Integrons. In Bezug zu ihren unterschiedlichen Größen und unterschiedlichen Resistenzgenkassetten konnten fünf Integron-profile (IP) definiert werden (Tabelle 10). Alle untersuchten Stämme trugen auch die *sul1*- und *qacEΔ1*-Gene.

5.3 Bewertung der molekularbiologischen Eigenschaften bei *E. coli*

- Nahezu ein Drittel der getesteten resistenten *E. coli* Stämme tragen Integrons.
- Die hohe Prävalenz von Integrons in resistenten *E. coli* Stämmen sollte aufmerksam und kritisch verfolgt werden, da Integrons sehr effektive Vektoren zur Ausbreitung von Resistenzen darstellen.

- Eine Vielzahl der in der Literatur beschriebenen Resistenzgene sind weit verbreitet. Dazu gehören *bla*_{TEM}, *dfrA1 like*, *aadA*, *strA/B*, *sul2* und *tet(A)*.

Tabelle 9. Vorkommen von Resistenzgenen bei *E. coli*.

Antimikrobielle Substanz (N. Resistente Stämme)	Gen*	N. Stämme	%
Ampicillin n=42	<i>bla</i> _{TEM}	40	95,2
	<i>bla</i> _{OXA}	0	0
	<i>bla</i> _{CARB}	0	0
Chloramphenicol n=17	<i>catA</i>	13	65,0
	<i>floR</i>	0	0
	<i>cmlA</i>	5	25,0
Gentamicin n=3	<i>aac(3)-IV</i>	2	66,7
	<i>aac(3)-II</i>	0	0
Kanamycin n=18	<i>aphA1</i>	18	100
	<i>Kn</i>	0	0
Streptomycin n=67	<i>aadA</i>	41	61,2
	<i>strA</i>	38	56,7
	<i>strB</i>	38	56,7
Sulfamethoxazol n=67	<i>sul1</i>	26	38,8
	<i>sul2</i>	39	52,2
Tetracyclin n=59	<i>tet(A)</i>	41	69,5
	<i>tet(B)</i>	24	40,7
	<i>tet(G)</i>	0	0
Trimethoprim n=21	<i>dfrA1 like</i>	17	80,9
	<i>dfrA12</i>	2	9,5
	<i>dfrA17</i>	3	14,3

N.- Anzahl der Stämme

Tabelle 10. Integronstrukturen und Resistenz-Genkassetten in *E. coli* Stämmen

Integron Profile	Amplicongröße in Integron-PCR	Genkassetten	N. Stämme n=27
IP-I	1000 bp	<i>aadA1a</i>	7
IP-II	1600 bp	<i>dfrA1-aadA1a</i>	9
IP-III	1900 bp	<i>sat1-aadA1a</i>	7
IP-IV	1700 bp	<i>dfrA17-aadA5</i>	3
IP-V	1850 bp	<i>dfrA12-aadA2</i>	1