

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

1. Zwischenbericht zum Forschungsvorhaben vom 21. Juli 2001

### **Teil 1: Erfassung der Prävalenz von Resistenzen gegen siebzehn antimikrobiell wirksame Substanzen bei *Salmonella* und *Escherichia coli*.**

#### 1.1. Salmonella

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**inimalen **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 (s. Anhang). 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**rigine, FAIR PL 97 3654) und in enger Abstimmung mit dem Danish Veterinary Laboratory (DVL, Dänemark) und dem Veterinärlabor des britischen Ministry for Agriculture Fisheries and Food in Weybridge.

Die Mikrodilutionsmethode wird nach einer international häufig anerkannten Methode (NCCLS M31A, Juni 1999) durchgeführt. Die verwendeten Grenzwerte zur Beurteilung der Empfindlichkeit sind den NCCLS-Vorschriften M31A und M7-A5 und DANMAP1998 entnommen bzw. pers. Informationen von A. Seyfahrt (DVL Copenhagen).

Die Tabelle 1 gibt den Anteil resistenter Isolate aufgrund des Agardiffusionstests an. Fast 40 % der untersuchten *Salmonella* Isolate sind einfach oder mehrfach resistent. Die Isolate vom Schwein und vom Rind/Kalb tragen besonders zu Resistenzsituation bei den im NRL-Salm untersuchten *Salmonella* Isolaten bei. Der hohe Anteil von durchschnittlich 34% multiresistenter Isolate fällt besonders auf. Diese besitzen oft eine Fünffachresistenz (gegen Ampicillin AMP, Chloramphenicol CHL, Streptomycin [STR-SP], Sulphonamiden SU und Tetracyclin TET). Besonders häufig ist diese bei dem Lysotyp DT104 von *Salmonella* Typhimurium nachweisbar, der besonders bei den Nutztieren Schwein und Rind nachgewiesen werden kann (Tabelle 2). Auffällig ist hierbei, dass dieser Serotyp seit 1992 kontinuierlich zugenommen hat und besonders beim Rind und Schwein dominiert.

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. Augenscheinlich 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 soll darauf hingewiesen werden, dass auch weitere Resistenzen zu dieser 5-fach Resistenz hinzutreten können (u.a. Sulfamethoxazol/Trimethoprim SXT, Trimethoprim TMP, Gentamicin GEN, Nalidixinsäure NAL).

Die prozentuale Verteilung der Häufigkeit des Vorkommens einzelner MHK-Werte bei den untersuchten Isolate gegenüber der jeweiligen antimikrobiellen Substanz kann aus den grafischen Abbildungen des Anhangs entnommen werden.

**Tabelle 1:** Anteil resistenter Isolate im NRL-Salm 2000 nach DIN 58940 Teil3

<b>Herkunft</b>	<b>Sensitiv</b>	<b>Einfach resistent</b>	<b>Mehrfach resistent</b>	<b>Gesamt</b>
Rind	185 (45,6 %)	7 (1,7 %)	214 (52,7 %)	406
Schwein	93 (17,1 %)	33 (6,0 %)	419 (76,9 %)	545
Geflügel	296 (70,8 %)	23 (5,5 %)	99 (23,7 %)	418
Total	2389 (60,9 %)	192 (4,9 %)	1342 (34,2 %)	3923

## 1.2. Escherichia coli

Im Gegensatz zu den Salmonellen hat die Erfassung der Resistenz bei *E. coli* keine so lange Tradition. Folglich muß dieses Erfassungssystem erst aufgebaut werden. Die Auswahl von *E. coli* Stämmen zur Bestimmung der MHK-Werte von 17 antimikrobiell wirksamen Substanzen beruht auf der Datenbank des BgVV Bereichs Dessau (Fachgebiet 502). Sie enthält Daten über die Herkunft, Serovar, Biotyp und molekularbiologische Pathogenitätseigenschaften von *E. coli* Stämmen, die an das Fachgebiet zur weiteren Untersuchung von Landesuntersuchungsämtern, Universitäten, Firmen und anderen öffentlichen Einrichtungen zugesandt wurden. Allerdings liegen hier hauptsächlich Stämme, die im Zusammenhang mit Erkrankungen stehen vor.

Der Beginn des Monitorings von Resistenzen, Resistenzgenen, resistenten Erregern und deren molekularbiologische Charakterisierung wurde für *E. coli* Stämme ab dem Jahr 1999 festgelegt. Dabei sollen 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 und 700 Isolate aus dem Jahr 2000. Tabelle 4 zeigt die Anzahl der Isolate aus jeder Kategorie und Jahr, die zum Resistenzmonitoring ausgewählt wurden. Zur Zeit wird diese noch zwischen den Fachgebieten 501 und 502 abgestimmt. Bei der Auswahl wurde darauf geachtet, dass für jede Kategorie repräsentative Isolate und ein möglichst breites Spektrum an Serovaren erfasst wurde.

In der Projektplanung beider Fachgebiete wurde eine enge Zusammenarbeit hinsichtlich der Beschaffung und Bereitstellung der *E. coli* Stämme vereinbart. Das Fachgebiet 502 übernimmt hierbei die Überprüfung der eingesandten *E. coli* Isolate und stellt die ausgewählten Isolate dem Fachgebiet 501 zur Resistenzbestimmung und Charakterisierung als Glycerinkultur zur Verfügung.

**Tabelle 2:** Vorkommen von *Salmonella* Typhimurium DT104 Isolaten in Deutschland von 1992 bis 2000.

Jahr	Anzahl von DT104 Isolaten (prozentualer Anteil von DT104 an allen <i>S. Typhimurium</i> Isolaten je Herkunft)						Total
	Rind	Schwein	Geflügel	Andere Tiere <sup>1</sup>	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)

<sup>1</sup>:Hunde, Katzen, Nagetiere, Vögel, Pferde, Wild, etc.

## Teil 2: Molekularbiologische Charakterisierung multiresistenter Salmonellen

Die molekularbiologischen Untersuchungen konzentrierten sich bisher auf wichtige Teilaspekte der Resistenzforschung. So standen die Charakterisierung der Chinolon und Fluorochinolonresistenz und die Erfassung der Integronstruktur multiresistenter Erreger im Vordergrund.

### 2.1. Chinolon-Resistenz bei *S. Enteritidis*

Chinolone und Fluorochinolone sind eine Klasse von hochwirksamen antimikrobiell wirksamen Substanzen, die die DNA Gyrase und Topoisomerase IV von sensiblen Bakterien inhibieren können. Die Zulassung des Fluorochinolons Enrofloxacin in Deutschland 1989 zur Therapie von Nutztieren verursachte einen Anstieg der Chinolon-resistenten *Salmonella* Isolate (Malorny et al 1999). Resistenz gegen Chinolone und Fluorochinolone wird hauptsächlich durch Punktmutationen in dem Gyrase kodierenden Gen *gyrA* verursacht (Griggs et al 1996, Griggs et al 1994) Stämme, die gegenüber Chinolonen hochresistent sind, besitzen neben *gyrA* Punktmutationen auch Punktmutationen im *parC* Gen, welches für eine Topoisomerase IV kodiert (Pidcock et al 1998).

**Tabelle 3:** Prozentualer Anteil resistenter *Salmonella* Isolate verschiedener Herkünfte nach der Mikrodilutionsmethode.

Antimikrobielle Substanz	Rind (N = 406) <sup>1</sup>	Schwein (N = 545) <sup>1</sup>	Geflügel (N = 418) <sup>1</sup>	Gesamt (N = 3919) <sup>1</sup>
Ampicillin	<b>51,7</b>	<b>72,7</b>	9,6	<b>26,9</b>
Amoxicillin/ Clavulansäure	5,4	1,7	0,2	1,6
Ceftiofur	1,2	< 0,2	0,7	0,9
Chloramphenicol	<b>43,1</b>	<b>48,1</b>	6,0	<b>17,5</b>
Ciprofloxacin	0,5	0,4	0,7	0,9
Colisitin	1,7	2,2	8,9	0,9
Florfenicol	<b>34,7</b>	<b>40,2</b>	1,4	<b>13,3</b>
Gentamicin	1,0	2,4	1,9	1,0
Kanamycin	5,9	2,4	7,7	3,2
Nalidixinsäure	1,5	3,1	5,5	6,1
Neomycin	5,9	2,8	7,7	3,1
Sulfamethoxazol	<b>80,8</b>	<b>91,2</b>	<b>70,1</b>	<b>74,5</b>
Spectinomycin	<b>45,1</b>	<b>51,6</b>	<b>21,5</b>	<b>26,2</b>
Streptomycin	<b>54,7</b>	<b>79,3</b>	<b>22,5</b>	<b>36,7</b>
Sulfamethoxazol/ Trimethoprim	5,7	5,1	<b>16,5</b>	9,5
Tetracyclin	<b>52,2</b>	<b>79,5</b>	<b>18,2</b>	<b>29,6</b>
Trimethoprim	6,4	5,7	<b>17,0</b>	<b>10,4</b>

<sup>1</sup>: Auffällige prozentuale Anteile wurden fett markiert. N gibt die Anzahl getesteter Isolate an.

**Tabelle 4:** Anzahl der zur Resistenzbestimmung für die Jahre 1999 und 2000 ausgewählten *E. coli* Isolate.

Isolate	1999	2000
Rind	19	24
Schwein	10	23
Geflügel	20	38
Lebensmittel	21	33
Summe	70	118

Ein Anstieg der minimalen Hemmkonzentration (MHK) über die Jahre und ein Anstieg der Anzahl isolierter Chinolon resistenter *S. Enteritidis* Stämme wurde bei Isolaten aus Deutschland vom Nutztier bei den Serotypen *S. Hadar*, *S. Paratyphi B dTartrat+* und *S. Saintpaul* beschrieben (Malorny et al 1999). Bei *S. Enteritidis* Stämmen, welche häufig vom Geflügel und Eierspeisen isoliert werden, war ein solcher Anstieg bisher noch nicht beobachtet worden. Tabelle 5 zeigt die Zunahme der an das NRL-Salm gesandten Chinolon-resistenten *S. Enteritidis* Isolaten der letzten fünf Jahre (1996-2000).

25 Stämme der zugesandten *S. Enteritidis* Stämme aus dem Jahr 2000 (Einführung der MHK-Wertbestimmung am NRL-Salm) besitzen MHK-Werte für Nalidixinsäure  $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ , welche als gegen Chinolone resistent angesehen werden müssen. 24 der Stämme besitzen zusätzlich auch eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Fluorochinolon Ciprofloxacin ( $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$ ), welches für therapeutische Anwendungen beim Menschen zugelassen ist.

Die Daten zeigen, daß nun auch bei *S. Enteritidis* Isolaten des Phagentyps 4 vom Geflügel die Chinolon-Resistenz zunimmt. Es ist zu erwarten, daß sich dieser Trend bei weiterer Anwendung der Fluorochinolone fortsetzt.

**Tabelle 5:** Entwicklung der Chinolon-Resistenz bei *S. Enteritidis* Isolaten, die dem NRL-Salm im Zeitraum 1997-2000 zugesandt wurden. Die Bestimmung der Resistenz erfolgte mittels Agardiffusionstest für das Chinolon Nalidixinsäure (Inhibitionszone,  $\leq 13 \text{ mm}$ ).

Jahr	Zahl der sensitiven <i>S. Enteritidis</i> Stämme	Zahl der resistenten <i>S. Enteritidis</i> Stämme	Resistenz-Häufigkeit in %
1996	149	0	0
1997	171	2	1,2
1998	438	3	0,7
1999	511	15	2,9
2000	435	22	4,8

## 2.2. Molekularbiologische Charakterisierung Chinolon resistenter *S. Enteritidis* Lyso- typ PT4 Stämme

Am Beispiel von *S. Enteritidis* Isolaten des Lyso-  
typs PT 4 wurde die genotypische Bestimmung der Chinolon Resistenz evaluiert. Als molekularbiologische Methode wurde die Sequenzierung ausgewählt, da sie präzise und schnell Ergebnisse liefern kann. Anhand der gewonnenen Sequenzdaten kann schließlich in Zukunft die PCR und Hybridisierungstechnik zur umfangreichen Testung vieler Isolate entwickelt werden (Screening).

Um festzustellen, ob die erhöhten MHK-Werte gegenüber Fluorochinolonen bei diesen Stämmen durch Punktmutationen im *gyrA* Gen hervorgerufen wurden, wurde eine bestimmte Region (QRDR-Region) des Gens amplifiziert. Diese Region enthält häufig Punktmutationen, die zur Resistenz führen können (Griggs et al 1996, Griggs et al 1994). Die Region umspannt die Kodons 67 bis 106 und kann durch die Primer *gyrA*-P1 und *gyrA*-P2 (Mølback et al 1999) amplifiziert werden. Häufig vorkommende Mutationen betreffen das Kodon 83 und 87 der Region (Piddock et al 1998). Die Sequenz des PCR-Produkts, das 342 bp beträgt, wurde mit Hilfe eines Kapillar-Sequenziergerätes der Firma Applied Biosystems bestimmt.

Es wurden insgesamt von sechs *S. Enteritidis* PT4 Stämmen die QRDR-Region sequenziert. Zwei der sechs Stämme sind gegenüber Chinolonen sensibel (Nalidixinsäure,  $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ ; Ciprofloxacin,  $0,03 \mu\text{g/ml}$ ). 4 Stämme besitzen ein MHK-Wert von  $\geq 128 \mu\text{g/ml}$  für Nalidixin-

säure und 0,5 µg/ml für Ciprofloxacin. Tabelle 6 zeigt die für das Kodon 83 und 87 ermittelte Aminosäure der sechs untersuchten Stämme. Während sensible Stämme Ser83 (Serin) und Asp87 (Asparaginsäure) besitzen, kommen bei resistenten Stämmen zwei verschiedene Kombinationen der zwei Kodons vor. Eine Klasse, zeigt eine Punktmutation im Kodon 83, die zum Austausch von Ser83 zu Tyr83 (Tyrosin) führt. Dieser Austausch wurde schon bei einem deutschen *S. Typhimurium* DT104, isoliert vom Lebensmittel, beschrieben (Mølback et al 1999), der eine erniedrigte Empfindlichkeit gegen Ciprofloxacin ausweist. Die zweite Klasse besitzt eine Punktmutation, die das Kodon 87 betrifft und Asp87 zu Tyr87 ausgetauscht hat. Dieser Austausch wurde in der Literatur noch nicht beschrieben. Beide untersuchten Isolate stammen von einem Salmonellose Ausbruch bei Menschen, die zuvor Tiramisu zu sich nahmen.

**Tabelle 6:** Korrelation des MHK Wertes für Nalidixinsäure und Ciprofloxacin und vorkommenden Punktmutationen in den Kodons der Gyrase.

Stamm-Nr.	Herkunft	MHK CIP <sup>1</sup> (µg/ml)	MHK NAL <sup>2</sup> (µg/ml)	Kodon 83 (kod. Nuleotide)	Kodon 87 (kod. Nukleotide)
00-2992	Mensch	0,03	8	Ser (TTC)	Asp (GAC)
00-2627	Huhn	0,03	≤ 4	Ser (TTC)	Asp (GAC)
00-2987	Mensch	0,5	≥ 128	Tyr (TAC)	Asp (GAC)
00-832	Ei	0,5	≥ 128	Tyr (TAC)	Asp (GAC)
00-2864	Tiramisu	0,5	≥ 128	Ser (TTC)	Tyr (TAC)
00-2977	Mensch	0,5	≥ 128	Ser (TTC)	Tyr (TAC)

<sup>1</sup>: Ciprofloxacin

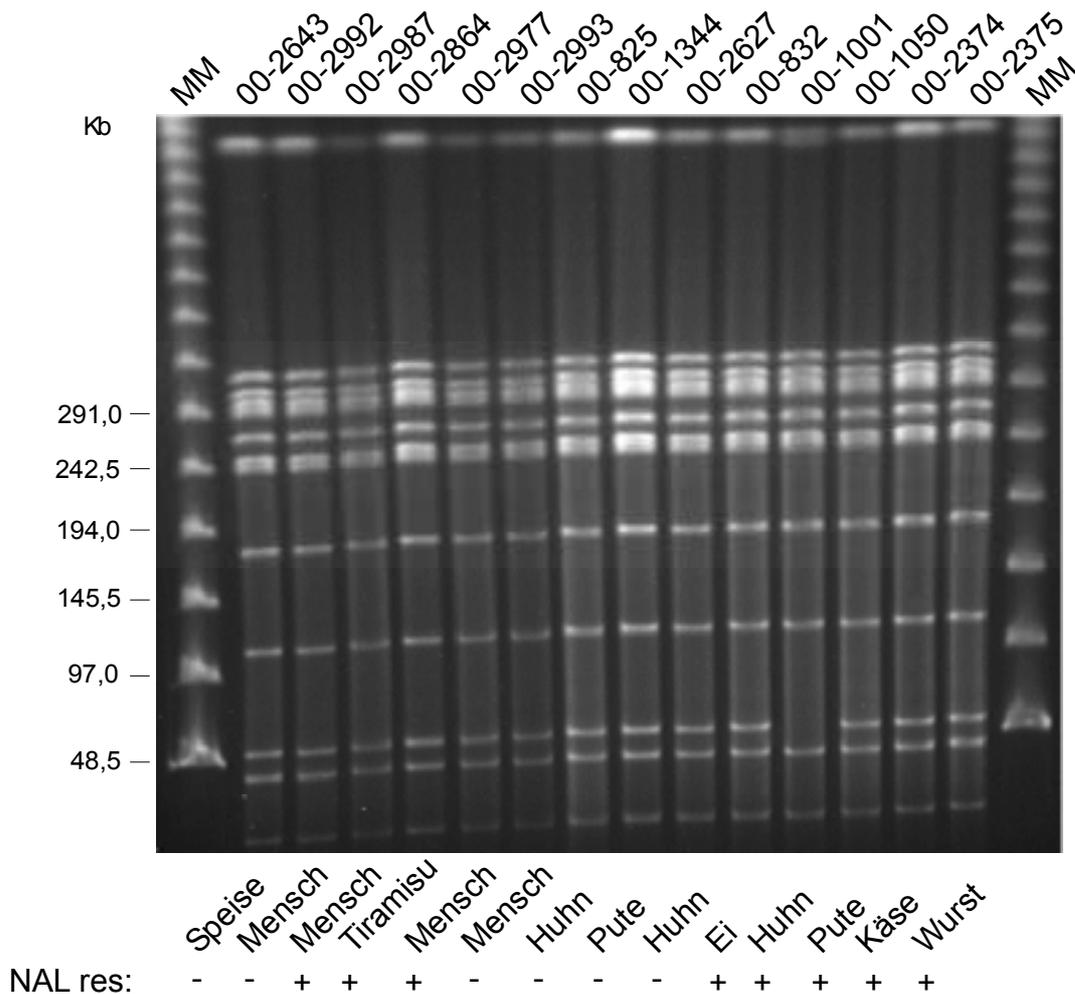
<sup>2</sup>: Nalidixinsäure

Um zu untersuchen, ob es sich bei den Chinolon resistenten *S. Enteritidis* Stämmen um einen neuen Sub-Klon des Lysotyps PT4 handelt, wurde eine Auswahl von Stämmen mittels Pulsfeldgel-Elektrophorese und Plasmid-Profilierung feintypisiert. Die Restriktion von chromosomaler DNA mit selten schneidenden Enzymen zeigt für das Enzym *Xba*I nach Elektrophorese bis auf einen Stamm (Nr. 00-1001) ein identisches Fragmentmuster. Dem Ausnahmestamm fehlt ein Fragment bei ca. 56 kb (Abb. 1). Das Restriktionsmuster von *Spe*I des Stammes 00-1001 unterscheidet sich ebenfalls von allen anderen untersuchten Stämmen in zwei Fragmenten (Daten nicht gezeigt). Für ausgewählte Stämme zeigt das Plasmid-Profil mit Ausnahme des Stammes 00-1001 ein 37 MDa (56 kb) Plasmid (Abb. 2). Dieses Isolat besitzt kein Plasmid, welches mit dem Fehlen des Fragments und der Größe des Plasmids im Restriktionsmuster von *Xba*I übereinstimmt.

## Schlußfolgerung

Die Daten zeigen, daß eine Punktmutation im *gyrA* Gen, die zu einem Aminosäureaustausch im Kodon 83 (Ser→Tyr) bzw. 87 (Asp→Tyr) führt, für die Resistenz gegenüber Chinolonen und eine erniedrigte Empfindlichkeit gegenüber Fluorochinolonen verantwortlich ist.

Die hier untersuchten Chinolon resistenten *S. Enteritidis* Stämme unterscheiden sich von sensiblen Stämmen bis auf eine Ausnahme in ihren *Xba*I und *Spe*I Restriktionsmuster sowie im Plasmid-Profil nicht. Chinolon resistente *S. Enteritidis* PT4 Stämme haben sich daher wahrscheinlich ursprünglich aus sensiblen Vorfahren durch Selektionsdruck entwickelt. Durch ihren möglichen Selektionsvorteil gegenüber Fluorochinolonen ist zu befürchten, daß bei weiteren Einsatz von Fluorochinolonen in der Tiermedizin die Resistenzraten weiter zunehmen werden.

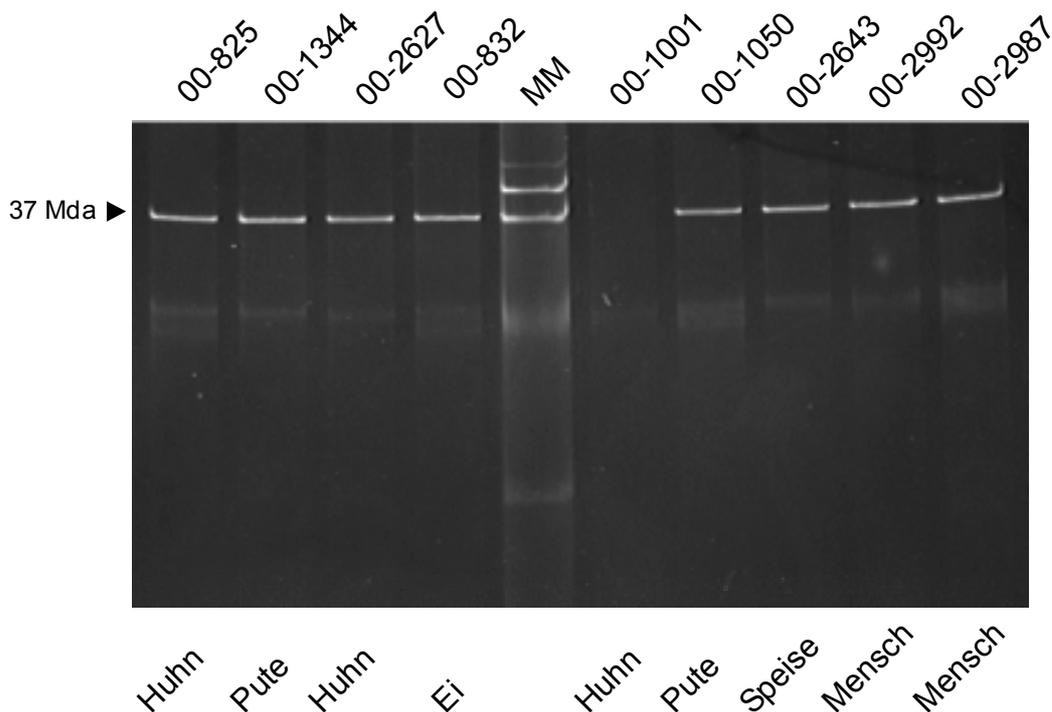


**Abbildung 1.** Pulsfeldgel-Elektrophorese von *S. Enteritidis* PT4 Stämmen, deren DNA mit *Xba*I geschnitten und elektrophoretisch aufgetrennt wurde. Oberhalb des Gels sind die Stamm-Nummern der Isolate angegeben. Unterhalb des Gels ist die Herkunft des Isolats und die Chinolon-Resistenz angegeben. + bedeutet, daß das Isolat resistent gegenüber Nalidixinsäure (NAL) ist, - bedeutet, daß das Isolat gegenüber Nalidixinsäure sensibel ist. MM ist ein Molekulargewichts-Standard  $\lambda$ -ladder PFG marker (Biolabs). Die Größen der Fragmente sind links vom Gel in Kilobasen (kb) angegeben.

### 2.3. Zum Vorkommen von Integronstrukturen bei multiresistenten Salmonellen

In den letzten 10 Jahren konnte auch in Deutschland bei *Salmonella* -Isolaten der verschiedensten Serovare ein Anstieg der Multiresistenz (MDR) gegenüber antimikrobiellen Substanzen nachgewiesen werden (siehe Teil 1 dieses Berichts).

In multiresistenten *Salmonella*-Stämmen von Mensch und Tier werden sehr häufig genetische Strukturen, sog. Integrons, nachgewiesen, die entweder auf dem Bakterienchromosom oder auf Plasmiden mit weitem Wirtsbereich (broad host range) lokalisiert sind und in übertragbare Elemente (Transposons u.ä.) integriert werden können. 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 (Hall et al 1999; Lévesque et al 1995; Recchia and Hall 1995; Stokes and Hall 1989). Deshalb wurden repräsentative MDR-Stämme, der in den letzten drei Jahren in Deutschland am häufigsten vorkommenden *Salmonella*-Serovare, umfassend molekularbiologisch charakterisiert.



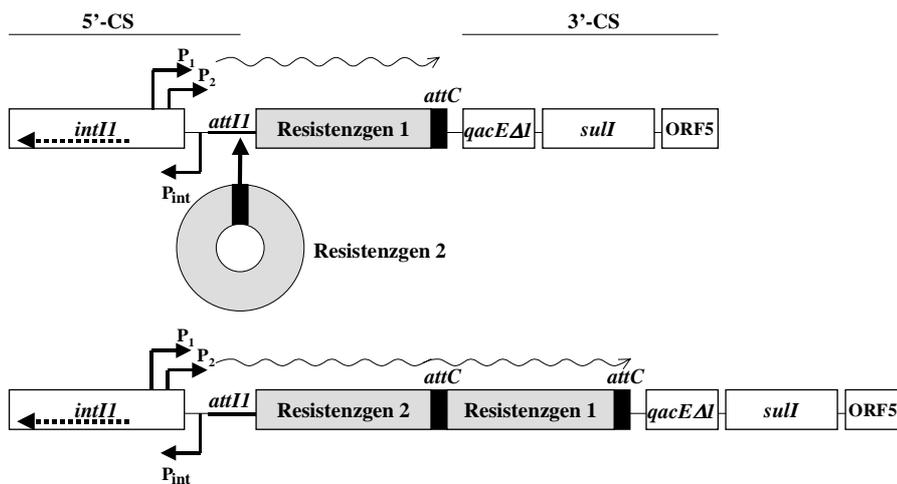
**Abbildung 2.** Plasmid-Profil von ausgewählten *S. Enteritidis* PT4 Stämmen. Oberhalb des Gels sind die Stamm-Nummern angegeben, unterhalb des Gels deren Herkunft. MM ist ein Molekulargewichtsstandard (von oben nach unten) 112 Mda, 62 Mda, 36 Mda, 4,2 Mda.

Ausgewählt wurden 64 Stämme 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. Vom Serovar *Salmonella* Typhimurium wurden neben dem Phagentyp DT104, der in letzter Zeit besondere Bedeutung aufgrund seiner epidemiologischen Ausbreitung erlangte, weitere Phagentypen miteinbezogen. Alle in das Projekt einbezogenen 40 multiresistenten *Salmonella*-Serovare wurden auf diese Integronstrukturen hin untersucht, und es wurde begonnen, die für die Resistenz codierenden Gene zu identifizieren. Dazu wurden im Labor PCR- und Gensonden-Techniken etabliert und geeignete Primer ermittelt. Die bisher eingesetzten Primer, ihre Targetgene und die wesentlichen PCR-Bedingungen sind in der Tabelle 7 zusammengestellt worden. In den kommenden Monaten werden die zur Spezifitätstestung notwendigen Sequenzierungen durchgeführt.

Die Untersuchungen erbrachten die in Tabelle 8 gezeigten Ergebnisse. Insgesamt zeigen sie, dass alle getesteten MDR-Salmonella-Stämme ein bis drei Class 1-Integrone unterschiedlicher Größe tragen.

Bei den Class 1 Integrone handelt es sich um die am häufigsten vorkommende Integron-Klasse. Sie enthält 2 konservierte Regionen, das 5'-konservierte Segment (5'-CS) und das 3'-konservierte Segment (3'-CS). Das 5'-CS enthält das Integrase-Gen (*intI*), die Attachment-Site (*attI*) und einen Promoter, während das 3'-CS das *sul1*-Gen (verantwortlich für die Resistenz gegenüber Sulfonamiden) (Sandvang et al 1997; Stokes and Hall 1989; Sundström et al 1988), das *qacEΔ1*-Gen (verantwortlich für die Resistenz gegenüber quaternären Ammoniumverbindungen) (Paulsen et al 1993) und den ORF5 trägt. Zwischen 5'-CS und 3'-CS ist/sind die Antibiotika-Resistenz-Genkassette/n integriert. Bis zu sieben dieser Genkassetten sind in einem einzelnen Integron nachgewiesen, und bisher mehr als 60 unterschiedliche Resistenz-Genkassetten identifiziert worden (Martinez-Freijo et al 1998). Abbildung 3 zeigt

## Class 1-Integron



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung eines Class 1-Integrans und Modell der Aquisition einer Genkassette nach Carattoli (Carattoli 2001). Die Abbildung zeigt den Prozess, durch den eine circuliäre Genkassette (Resistenzgen 2) an der *attI*-Site in ein Class 1-Integron eingefügt wird, das bereits eine Genkassette (Resistenzgen 1) enthält. Gene und ORF's in der 5'-CS und 3'-CS-Region sind als Boxen dargestellt. In das Integron eingefügte Resistenz-Genkassetten sind als graue Boxen dargestellt. Vertikale schwarze Balken stellen die *attC*-Rekombinations-Sites dar.  $P_1$  und  $P_2$  sind Integron-assoziierte Promotoren;  $P_{int}$  ist der Integrase-Gen (*intI1*)-Promoter. Die *qacEΔ1*- und *sulI*-Gene vermitteln Resistenz gegenüber quaternären Ammoniumverbindungen und Sulfonamiden.

die schematische Darstellung eines Class 1-Integrans und ein Modell für die Aquisition einer Genkassette.

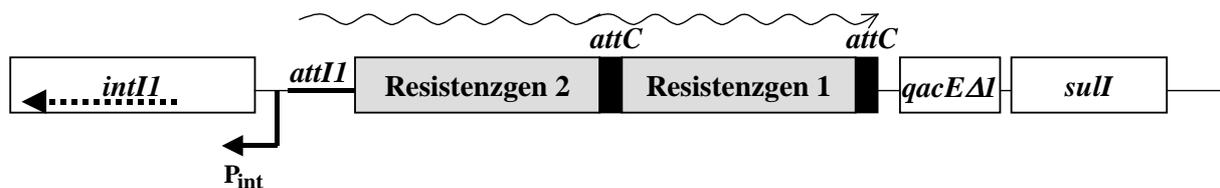
Multiresistente *Salmonella* Typhimurium DT104-Stämme zeichnen sich dadurch aus, dass alle für die Pentaresistenz AMP-CHL-[STR-SP]-SU-TET verantwortlichen Resistenzdeterminanten in zwei nahe beieinanderliegenden Class 1-Integrans auf dem Chromosom lokalisiert sind (Briggs and Fratamico 1999). Andere Resistenzen, wie z.B. die Trimethoprim-Resistenz TMP, befinden sich auf Plasmiden. In allen untersuchten multiresistenten DT104-Stämmen konnten die typischen beiden Class 1-Integrans mit den Amplikongrößen 1000 bp und 1200 bp nachgewiesen werden. Diese tragen die Gene *aadA2*, *pse-1* und *sul1*, die die Resistenzen gegenüber Streptomycin/Spectinomycin, Beta-Lactamen (Ampicillin) und Sulfonamiden vermitteln. Die Region zwischen den beiden Integrans enthält das *floR<sub>st</sub>*-Gen (Arcangioli et al 1999) (Arcangioli et al 2000), das die Resistenz gegenüber Florfenicol und Chloramphenicol vermittelt, in enger Nachbarschaft mit den *tetR*- und *tetA* (class G)-Genen, die Tetracyclin-Resistenz vermitteln. Die Abbildung 4 gibt eine schematische Darstellung des DT104-Pentaresistenz-Genclusters.



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung eines DT104-Pentaresistenz-Genclusters nach Carattoli (Carattoli 2001). In die Integrans eingefügte Resistenz-Genkassetten sind als graue Boxen dargestellt. Die *aadA2*-Resistenz-Genkassette vermittelt die Resistenz gegenüber Streptomycin/Spectinomycin, die *pse-1*-Resistenz-Genkassette die Resistenz gegenüber Beta-Lactamen (Ampicillin). Weiße Boxen stellen das Putative Resolvase-Gen (*tnpR*), das Integrase-Gen (*intI1*), das Sulfonamid-Gen (*sulI*), das Florfenicol/Chloramphenicol-Gen (*floR<sub>st</sub>*) und die Tetracyclin-Gene (*tetR* und *tetA*) dar. Vertikale schwarze Balken stellen die *attC*-Rekombinations-Sites dar.

In den Antibiotika-sensitiven DT104-Stämmen und den meisten anderen Phagentypen von *Salmonella* Typhimurium ist dieses komplette Pentaresistenz-Gencluster nicht vorhanden. In der Literatur sind ähnliche Cluster in bestimmten Nicht-DT104-Isolaten und im *Salmonella* Serovar Agona beschrieben worden (Cloeckaert et al 2000, Carlson et al 2000, Frana et al 2001), und auch in eigenen Untersuchungen konnte eine ähnliche Struktur bei einigen U302-, DT120-, DT12-, DT195- und DT41-Stämmen nachgewiesen werden. Dies deutet auf einen horizontalen Transfer des Pentaresistenz-Genclusters zwischen einigen *Salmonella* Stämmen hin. Allerdings war dies Cluster in allen anderen untersuchten multiresistenten *Salmonella*-Serovaren nicht nachweisbar. Diese und die erwähnten Nicht-DT104-Isolate tragen nur ein einzelnes Class 1-Integron unterschiedlicher Größe, das im Unterschied zu den Integrons der DT104-Stämme fast immer zwei Resistenz-Genkassetten enthält, in ganz wenigen Stämmen ist nur eine Genkassette nachweisbar. Die Amplikongrößen dieser Integrons betragen 1000 bp, 1600 bp und 1900/2000bp.

Abbildung 5 zeigt die schematische Darstellung der Integronstruktur in den untersuchten Nicht-DT104-Salmonella-Stämmen. Alle einbezogenen Stämme tragen eine *aadA1a*-Genkassette, die die Resistenz gegenüber Streptomycin/Spectinomycin vermittelt. Als zweite Genkassette wurde in der Mehrzahl der Stämme eine *dfrA*-Genkassette nachgewiesen, die die Resistenz gegenüber Trimethoprim kodiert. Die für die Beta-Lactam-Resistenz (Ampicillin) codierende *pse-1*-Genkassette wurde anders als in den DT104-Stämmen nicht nachgewiesen. Dies bestätigt die Ergebnisse anderer Gruppen (u.a. Guerra et al 2000) und weist daraufhin, dass die für die Beta-Lactam-Resistenz verantwortlichen Resistenzgene in Nicht-DT104-*Salmonella* Stämmen (u.a. TEM Typ und SHV Typ) in den meisten Fällen nicht im Integron lokalisiert sind (Brown et al 2000, Breuil et al 2000).



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Integronstruktur in den untersuchten Nicht-DT104-Salmonella-Serovaren. In das Integron eingefügte Resistenz-Genkassetten sind als graue Boxen, die anderen Gene als weiße Boxen dargestellt. Alle untersuchten Salmonella-Stämme enthalten als Resistenz-Genkassette 1 eine *aadA1a*-Resistenz-Genkassette. Sie vermittelt die Resistenz gegenüber Streptomycin/Spectinomycin. Die überwiegende Mehrheit der untersuchten Stämme weist als Resistenz-Genkassette 2 eine *dfrA*-Resistenz-Genkassette auf, die die Resistenz gegenüber Trimethoprim vermittelt. Vertikale schwarze Balken stellen die *attC*-Rekombinations-Sites dar. Die *qacEΔI*- und *sulf*-Gene vermitteln Resistenz gegenüber quartären Ammoniumverbindungen und Sulfonamiden.

## Schlußfolgerung

Die vorgelegten Daten zeigen, dass bei vielen *Salmonella* Serovaren im Jahre 2000 Multiresistenzen auf Plasmid- oder chromosomal kodierten Integrons vorliegen. Dadurch ist es zu erwarten, dass bei Fortbestehen des Selektionsdrucks eine noch weitere Zunahme der Resistenzen, nicht nur bei Salmonellen erfolgen wird.

**Tabelle 7:** PCR-Primer und PCR-Bedingungen, die in diesem Projekt verwendet wurden

Regi- on/Gen	Primer- Name	Sequenz (5' to 3')	Genbank Zugangsnr.	Referenz	Amplicon Größe	PCR- Bedingungen <sup>h</sup>	
						T <sub>a</sub> (° C)	t <sub>e</sub> (min)
Integron	[5'CS/3'CS]	GGCATCCAAGCAGCAAG / AAGCAGACTTGACCTGA	M73819	(Lévesque, Piché, Larose, and Roy 1995)	Variabel	55	02:30
<i>qacEΔ1</i>	[ <i>qacEΔ1</i> -F/B]	ATCGCAATAGTTGGCGAAGT /CAAGCTTTTGCCCATGAAGC	X15370	(Sandvang, Aarestrup, and Jen- sen 1997)	250 bp	60-65	00:20
<i>sul1</i> <sup>a</sup>	[ <i>sul1</i> -F/B]	CTTCGATGAGAGCCGGCGGC / GCAAGGCGGAAACCCGCGCC	X12869	(Sandvang, Aarestrup, and Jen- sen 1997)	436 bp	65	00:30
part of integron	[5'CS/aadA]	GGCATCCAAGCAGCAAGC / ATTGCCAGTCGGCAGCG	M73819	(Lévesque, Piché, Larose, and Roy 1995)	Variabel	64	00:30
part of integron	[5'CS/pse-1]	GGCATCCAAGCAGCAAGC / CTGGTTCATTTAGATAGCG	M73819	(Lévesque, Piché, Larose, and Roy 1995)	750 bp	60	00:30
part of integron	[5'CS/sul1]	GGCATCCAAGCAGCAAGC / GCAAGGCGGAAACCCGCGCC	M73819	(Lévesque, Piché, Larose, and Roy 1995)	Variabel	65	00:30
<i>floR</i> <sup>b</sup>	[ <i>cml01/cml15</i> ]	TTTGGWCCGCTMTCRGAC / SGAGAARAAGACGAAGAAG	AF071555	(Arcangioli, Leroy-Setrin, Martel, and Chaslus-Dancla 2000)	496 bp	55	00:30
<i>aadA</i> <sup>c</sup>	[ <i>aadA1a</i> -F/B]	GTGGATGGCGGCCTGAAGCC / ATTGCCAGTCGGCAGCG	M10241	(Sandvang, Aarestrup, and Jen- sen 1997)	526 bp	70	00:30
<i>bla<sub>pse1</sub></i> <sup>d</sup>	[ <i>pse-1</i> -F/B]	CGCTTCCCGTTAACAAGTAC / CTGGTTCATTTAGATAGCG	M69058	(Sandvang, Aarestrup, and Jen- sen 1997)	500 bp		
<i>dfrA1</i> like <sup>e</sup>	[ <i>dfrA15</i> -F/B]	GTGAAACTATCACTAATGG / CCCTTTTGCCAGATTTGG	Z83311	(Guerra, Soto, Cal, and Mendo- za 2000)	473 bp	55	00:30
<i>aphA1</i> <sup>f</sup>	[ <i>aphA1</i> -F/B]	TTATGCCTCTTCCGACCATC / GAGAAAACCTACCGAGGCAG	U63147	(Ng et al 1999)		65	00:30

<sup>a-f</sup>: Gene, die für SUL-, FNN/CHL-, STR/SPT;- AMP-, TMP- and KAN- Resistenz kodieren.

<sup>h</sup>: T<sub>a</sub>: Annealingtemperatur; t<sub>e</sub>: Elongationszeit; F: forward; B: backward.

**Tabelle 8:** Integronstrukturen und Resistenz-Genkassetten in den untersuchten *Salmonella*-Stämmen

Integron-Profil (IP)	Salmonella-Serovar	Anzahl der Stämme	Resistenzen	Anzahl der Amplicons	Amplicongröße in Integron-PCR	Genkassetten (1, 2)
IP-1	S-Typhimurium DT104	6	ACS/SpSUTE,FNN, (KAN,NEO,TMP)	2	1000bp, 1200bp	aadA2, pse-1
	S.Typhimurium DT 120	1	ACS/SpSUTE,FNN	2	1000bp, 1200bp	aadA2, pse-1
	U 302	2	ACS/SpSUTE,FNN	2	1000bp, 1200bp	aadA2, pse-1
	S-Typhimurium DT41	1	ACS/SpSUTE,FNN	2	1000bp, 1200bp	AadA2, pse-1
	S-Typhimurium DT195	1	ACS/SpSUTE,FNN	2	1000bp, 1200bp	aadA2, pse-1
	S-Typhimurium DT12	1	ACS/SpSUTE,FNN	2	1000bp, 1200bp	aadA2, pse-1
IP-2	S.Senftenberg	1	S/SpSU	1	1000bp	aadA1a
	S.Livingstone	1	ACS/SpSUTE , K	1	1000bp	aadA1a
	S.Heidelberg	2	ACS/SpSUTE , (KAN,NEO)	1	1000bp	aadA1a
IP-3	S.Saintpaul	4	ACS/SpSUTE ,(KAN,NEO,TMP,NAL)	1	1600bp	aadA1a
	S.Agona	1	ACS/SpSUTE ,KAN,NEO,TMP,NAL	1	1600bp	aadA1a
	S.Newport	2	ACS/SpSUTE, KAN,NEO,TMP,(NAL)	1	1600bp	aadA1a
	S.London	1	ACS/SpSUTE, TMP	1	1600bp	aadA1a, dfrA-
	S.Heidelberg	1	ACS/SpSUTE, TMP	1	1600bp	aadA1a, like
	S.Brandenburg	1	ACS/SpSUTE,FNN,TMP,NAL	1	1600bp	aadA1a
	S.Anatum	4	ACS/SpSUTE,KAN,NEO,TMP,NAL,(GEN)	1	1600bp	aadA1a
	S.Livingstone	1	ACS/SpSUTE ,(KAN,NEO,TMP)	1	1600bp	aadA1a
	S.Paratyphi	1	AS/Sp SUTE, TMP,NAL	1	1600bp	aadA1a
IP-4	S.Derby	3	ACS/SpSUTE,KAN,NEO,GEN,(NAL)	1	1900/2000bp	aadA1a, [nd]
	S.Newport	2	ACS/SpSUTE, NAL,GEN	1	1900/2000bp	aadA1a, [nd]
	S.Paratyphi	3	CS/SpSUTE, TMP,( KAN,NEO,NAL)	1	1900/2000bp	aadA1a, [nd]
IP-5	S.Typhimurium DT22	1	ACS/SpSU	1	größer 2000p	aadA1a, [nd]
ohne	S.Typhimurium DT104	4	sensibel	0		
	S.Typhimurium DT8	1	sensibel	0		
	S.Typhimurium DT2	1	sensibel	0		
	S.Paratyphi	16	SpTMP, (A,S,SU,NAL)	0		
	S.Enteritidis	1	ASSUTE	0		

[nd] = 2. Genkassette wurde noch nicht bestimmt

## Referenzen

- Arcangioli, M.A., Leroy-Setrin, S., Martel, J.L., Chaslus-Dancla, E., 2000. Evolution of chloramphenicol resistance, with emergence of cross-resistance to florfenicol, in bovine *Salmonella* Typhimurium strains implicates definitive phage type (DT) 104. J. Med. Microbiol. 49, 103-110.
- Arcangioli, M.A., Leroy-Sétrin, S., Martel, J.L., Chaslus-Dancla, E., 1999. A new chloramphenicol and florfenicol resistance gene flanked by two integron structures in *Salmonella typhimurium* DT104. FEMS Microbiol. Lett. 174, 327-332.
- Breuil, J., Brisabois, A., Casin, I., Armand-Lefèvre, L., Frémy, S., Collatz, E., 2000. Antibiotic resistance in salmonellae isolated from humans and animals in France: comparative data from 1994 and 1997. J. Antimicrob. Chemother. 46, 965-971.
- Briggs, C.E., Fratamico, P.M., 1999. Molecular Characterization of an Antibiotic Resistance Gene Cluster of *Salmonella typhimurium* DT104. Antimicrob. Agents Chemother. 43, 846-849.
- Brown, A.W., Rankin, S.C., Platt, D.J., 2000. Detection and characterisation of integrons in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. FEMS Microbiol. Lett. 191, 145-149.
- Carattoli, A., 2001. Importance of Integrons in the Diffusion of Resistance. Veterinary Research, in press.
- Carlson, S.A., Willson, R.M., Crane, A.J., Ferris, K.E., 2000. Evaluation of invasion-conferring genotypes and antibiotic-induced hyperinvasive phenotypes in multiple antibiotic resistant *Salmonella typhimurium* DT104. Microb. Pathog. 28, 373-378.
- Cloekaert, A., Boumedine, K.S., Flaujac, G., Imberechts, H., D'Hooghe, I., Chaslus-Dancla, E., 2000. Occurrence of a *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104-Like Antibiotic Resistance Gene Cluster Including the floR Gene in *S. enterica* Serovar Agona. Antimicrob. Agents Chemother. 44, 1359-1361.
- Frana, T.S., Carlson, S.A., Griffith, R.W., 2001. Relative distribution and conservation of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in *Salmonella enterica* serotype *typhimurium* phage type DT104. Appl. Environ. Microbiol. 67, 445-448.
- Griggs, D. J., K. Gensberg, and L. J. V. Piddock, 1996. Mutations in *gyrA* gene of chinolone-resistant *Salmonella* serotypes isolated from humans and animals. Antimicrob. Agents Chemother. 40, 1009-1013.
- Griggs, D. J., M. C. Hall, Y. F. Jin, Piddock, L.J.V., 1994. Chinolone resistance in veterinary isolates of salmonella. J. Antimicrob. Chemother. 33, 1173-1189.
- Guerra, B., Soto, S., Cal, S., Mendoza, M.C., 2000. Antimicrobial resistance and spread of class 1 integrons among *Salmonella* serotypes. Antimicrob. Agents Chemother. 44, 2166-2169.
- Hall, R.M., Collis, C.M., Kim, M.J., Partridge, S.R., Recchia, G.D., Stokes, H.W., 1999. Mobile gene cassettes and integrons in evolution. Ann. NY Acad. Sci. 870, 68-80.
- Lévesque, C., Piché, L., Larose, C., Roy, P.H., 1995. PCR Mapping of Integrons Reveals Several Novel Combinations of Resistance Genes. Antimicrob. Agents Chemother. 39, 185-191.

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

Martinez-Freijo,P., Fluit,A.C., Schmitz,F.J., Grek,V.S., Verhoef,J., Jones,M.E., 1998. Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. J. Antimicrob. Chemother. 42, 689-696.

National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1998. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Eight Informational Supplement M100-S8. NCCLS,Wayne,PA.

Ng,L.K., Mulvey,M.R., Martin,I., Peters,G.A., Johnson,W., 1999. Genetic characterization of antimicrobial resistance in Canadian isolates of *Salmonella* serovar typhimurium DT104. Antimicrob. Agents Chemother. 43, 3018-3021.

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

Paulsen,I.T., Littlejohn,T.G., Radström,P., Sundström,L., Sköld,O., Swedberg,G., Skurray,R.A., 1993. The 3' Conserved Segment of Integrons Contains a Gene Associated with Multidrug Resistance to Antiseptics and Disinfectants. Antimicrob. Agents Chemother. 37, 761-768.

Piddock, L. J. V., V. Ricci, I. McLaren, Griggs,D. J., 1998. Role of mutation in the *gyrA* and *parC* genes of nalidixic- acid-resistant *Salmonella* serotypes isolated from animals in the United Kingdom. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 41, 635-641.

Recchia,G.D., Hall,R.M., 1995. Gene cassettes: a new class of mobile element. Microbiology 141, 3015-3027.

Sandvang,D., Aarestrup,F.M., Jensen,L.B., 1997. Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. FEMS Microbiology Letter 160, 37-41.

Stokes,H.W., Hall,R.M., 1989. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrations. Mol. Microbiol. 3, 1669-1683.

Sundström,L., Radström,P., Swedberg,G., Sköld,O., 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.

---