

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)

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

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

Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben

Gefördert vom Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft (BMVEL), Förderzeitraum: 01. September 2000 bis 31. August 2003

2004

Inhaltsverzeichnis:

	Seite
Vorbemerkung	4
1. Erfassung der Prävalenz von Resistenzen bei Salmonellen	6
1.1. Bewertung der Resistenz bei Salmonellen	15
1.2. Literatur zur Resistenzfassung	16
2. Schwerpunktuntersuchungen zur Chinolonresistenz bei Salmonellen	17
2.1. Chinolonresistenz bei <i>S. Enteritidis</i> PT4 und <i>S. Typhimurium</i> DT104	22
2.2. Molekularbiologische Charakterisierung der Chinolonresistenz bei Salmonellen	25
2.3. Bewertung zur Chinolonresistenz bei Salmonellen	27
2.4. Literatur zur Chinolonresistenz	27
3. Molekularbiologische Charakterisierung multiresistenter Salmonellen	28
3.1. Nachweis von Resistenzgenen und Integronstrukturen in multiresistenten Salmonellen	29
3.1.1. Resistenzgene in multiresistenten Salmonellen aus Nutztieren, den daraus resultierenden Lebensmitteln, aus Futtermitteln und der Umwelt	29
3.1.2. Class 1 und Class 2 Integrons in multiresistenten Salmonellen aus Nutztieren, den daraus resultierenden Lebensmitteln, aus Futtermitteln und der Umwelt	33
3.2. Bewertung der molekularbiologischen Eigenschaften von Salmonellen aus Nutztieren, den daraus resultierenden Lebensmitteln, aus Futtermitteln und der Umwelt	39
3.3. Literatur zur molekularbiologischen Charakterisierung	39
4. Erfassung der Resistenz bei <i>Escherichia coli</i>	42
4.1. Bewertung der Situation bei <i>E. coli</i>	43
5. Molekularbiologische Charakterisierung resistenter <i>E. coli</i>	44
5.1. Nachweis von Resistenzgenen bei resistenten <i>E. coli</i>	44
5.2. Integronstruktur bei resistenten <i>E. coli</i>	45

5.3.	Bewertung der molekularbiologischen Eigenschaften bei <i>E. coli</i>	47
5.4.	Molekularbiologische Charakterisierung der Chinolonresistenz bei <i>E. coli</i>	48
5.5.	Bewertung zur molekularbiologische Charakterisierung der Chinolonresistenz bei <i>E. coli</i>	48
6.	Im Rahmen des Forschungsvorhabens verfasste Veröffentlichungen	50
7.	Danksagung	51

Vorbemerkung

Die wesentliche Aufgabe des hier dargestellten Forschungsvorhabens war es, den Anteil resistenter *Salmonella*- und *Escherichia coli*-Isolate, die vom Nutztier und den daraus hergestellten Lebensmitteln stammen, zu erfassen und hinsichtlich ihrer Resistenzeigenschaften zu charakterisieren. Außerdem sollten ihre für die Resistenz verantwortlichen molekulargenetischen Strukturen aufgeklärt werden. Die Untersuchungen leisten im Bereich der Lebensmittelsicherheit einen Beitrag zur Risikobewertung und zum vorsorgenden Verbraucherschutz.

Seit dem Ende der sechziger Jahre wurde bereits in den Vorläufereinrichtungen des jetzigen Nationalen Referenzlabors für Salmonellen am BfR 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 ermittelt. Seit 2001 hat diese Methode den Agardiffusionstest vollkommen ersetzt. 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 als bei der Agardiffusion. 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 Community Reference Laboratory for *Salmonella* (CRL-E, Niederlande), dem Danish Veterinary Institute (DVI, Dänemark) und dem Veterinärlabor des britischen Ministry for Agriculture Fisheries and Food in Weybridge (MAFF, UK).

Die Mikrodilutionsmethode wird nach dem international häufig angewandten Verfahren der NCCLS durchgeführt. Die verwendeten antimikrobiell wirksamen Substanzen, ihre Konzentrationsbereiche und die zur Beurteilung der Empfindlichkeit angewandten Grenzwerte sind in Tabelle 1 aufgeführt. Sie beruhen zum größten Teil auf den NCCLS-Vorschriften M31-A und M7-A5 und sind in einigen Fällen mit den deutschen DIN, dem dänischen DANMAP Programm bzw. den europäischen ARBAO Empfehlungen abgestimmt.

Tabelle 1. Im NRL-Salm getestete antimikrobiell wirksame Substanzen

Substanz	Abkürzungen	Break Point µg/ml	Getestete Konzentrationen in µg/ml
Ampicillin	AMP	32	2 - 32
Amoxicillin/ Clavulansäure	AUG2	32	2/1 - 32/16
Ceftiofur	XNL	8	0,5 - 8
Chloramphenicol	CHL	32	2 - 64
Florfenicol	FFN	32	2 - 64
Ciprofloxacin	CIP	2	0,03 - 4
Nalidixinsäure	NAL	32	4 - 128
Colistin	COL	16	4 - 64
Gentamicin	GEN	16	1 - 32
Kanamycin	KAN	64	4 - 64
Neomycin	NEO	16	2 - 32
Spectinomycin	SPE	128	4 - 128
Streptomycin	STR	32	4 - 64
Sulfamethoxazol	SMX	512	32 - 512
Sulfamethoxazol/ Trimethoprim	SXT	4	19/1 - 152/8
Trimethoprim	TMP	16	4 - 32
Tetracyclin	TET	16	2 - 32

Die in die Studie eingeschlossenen *Salmonella*-Isolate entstammten den Einsendungen verschiedener deutscher Untersuchungseinrichtungen aus allen Bundesländern an das Nationale Referenzlabor für Salmonellen (NRL-Salm). Für diese wurden keinerlei epidemiologischen Vorgaben gemacht und sie repräsentieren ein Stammkollektiv, das im Rahmen verschiedener Aktivitäten der Untersuchungseinrichtungen erhoben wird. Dazu gehören sowohl routinemäßig gezogene Überwachungs-, Umgebungs- und diagnostische Proben, als auch Proben, die zur Klärung spezifischer Fragestellungen genommen wurden.

Sie entstammen somit keinem vorher festgelegten Stichprobenplan. Demzufolge können zu den Prävalenzen der beschriebenen Erreger im Feld keine Aussagen getroffen werden. Das bezieht sich allerdings für Deutschland auch auf die Prävalenz von Salmonellen, *E. coli* und andere Erreger, für die generell Daten fehlen. Es ist zu hoffen, dass die Verabschiedung der neuen Zoonoserichtlinie für die Bundesrepublik zu entsprechenden, auf Stichprobenplänen basierenden Erhebungen führt.

Für die in diesem Bericht getroffenen statistischen Aussagen wird als Punktschätzer die Rate der resistenten *Salmonella*-Isolate für die vorliegende Stichprobe berechnet und das 95 % Konfidenzintervall bestimmt. Dieses Konfidenzintervall überdeckt mit 95 %-iger Wahrscheinlichkeit die wahre aber unbekannte Rate des resistenten Anteils einer Erregergruppe.

Das 95 % Konfidenzintervall für Raten wird nach folgender Formel berechnet:

$$p_{u,o} = p \pm 1,96 \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$$

wobei p_u untere Grenze des Konfidenzintervalls
 p_o obere Grenze des Konfidenzintervalls
 p Rate ($0 \leq p \leq 1$)
 n Stichprobenumfang.

Durch den Vergleich der Konfidenzintervalle kann festgestellt werden, ob diese sich überlappen oder nicht. Ist dies nicht der Fall, so besteht ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Raten.

Bei überlappenden Konfidenzintervallen ist kein statistisch signifikanter Unterschied vorhanden.

Die Daten gestatten somit Aussagen zum zeitlichen Verlauf des prozentualen Anteils resistenter Isolate bei den vom NRL-Salm erhaltenen Einsendungen. Weiterhin gestatten sie Aussagen über den prozentualen Anteil resistenter Erreger in Bezug auf die definierten Herkunftsquellen wie Tier, Nutztier, Rind/Kalb, Schwein, Geflügel, Lebensmittel, Futtermittel, Umwelt und andere.

1. Erfassung der Prävalenz von Resistenzen bei Salmonellen

Im Zeitraum 2000 bis 2003* sind 14.212 *Salmonella*-Isolate, die an das NRL-Salm zur weiteren Differenzierung geschickt wurden, hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber 17 antimikrobiell wirksamen Substanzen getestet worden. Die Konzentrationen und Breakpoints der getesteten Substanzen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Vierzig Prozent der Isolate (5.713) waren sensibel und knapp 60 % (8.499) resistent. Bemerkenswert ist, dass 5.455 Isolate (38 %) Mehrfachresistenzen tragen, die vor allem vom Schwein und Rind/Kalb isoliert werden konnten (Tab. 2). Aber auch in den daraus hergestellten Lebensmitteln waren mehrfach-resistente Salmonellen bei durchschnittlich 59 % der Fälle nachweisbar. Bei Isolaten aus Rind- und Schweinefleisch betrug der Anteil 73 % und bei Geflügelfleisch 66 %.

Die Resistenz bei *Salmonella*-Isolaten aus dem Geflügel liegt im Vergleich zu denen von Rind/Schwein auf einem niedrigeren Niveau, was vor allem auf den geringeren Prozentsatz von mehrfach-resistenten Isolaten (33 %) zurückzuführen ist. Hingegen kommen einfach-resistente *Salmonella*-Isolate doppelt so häufig beim Geflügel (23 %) als bei den Nutztieren Schwein/Rind/Kalb (11 %) vor. Insgesamt unterscheidet sich die Resistenzsituation sowohl beim Tier als auch den daraus hergestellten Lebensmitteln zwischen Schwein/Rind/Kalb und Geflügel signifikant voneinander (Tab. 2). Es wird zudem aber deutlich, dass resistente Isolate vom Tier über Lebensmittel den Menschen erreichen können und damit ein Gefährdungspotential darstellen.

*bis 31.08.2003

Tabelle 2. Resistenz von *Salmonella*-Isolaten verschiedener Herkunft (2000 - 2003*)

Herkunft	Untersuchte Isolate		Resistenz 2000 bis 2003*											
	N	Sensitiv		Resistent		Einfach resistent		Mehrfach resistent		95 % Konfidenzintervall (Resistenz)				
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%			
Tier	7371	2636	35,8	4735	64,2	1577	21,4	3158	42,8	63,1 - 65,3				
Nutztier	5350	1645	30,7	3705	69,3	901	16,8	2804	52,4	68,0 - 70,5				
Rind	1494	397	26,6	1097	73,4	183	12,2	914	61,2	71,2 - 75,7				
Schwein	1351	148	11,0	1203	89,0	129	9,5	1074	79,5	87,4 - 90,7				
Geflügel	2352	1011	43,0	1341	57,0	554	23,6	787	33,4	55,0 - 59,0				
Lebensmittel	4273	1733	40,6	2540	59,4	761	17,8	1779	41,6	58,0 - 60,9				
Fleisch gesamt	2669	823	30,8	1846	69,2	456	17,1	1390	52,1	67,4 - 70,9				
Fleisch Rind/Schwein	1253	335	26,8	918	73,2	202	16,1	716	57,1	70,8 - 75,7				
Fleisch Geflügel	1255	426	34,0	829	66,0	186	14,8	643	51,2	63,4 - 68,7				
Futtermittel	1287	700	54,4	587	45,6	467	36,3	120	9,3	42,9 - 48,3				
Umwelt	1074	546	50,8	528	49,2	188	17,5	340	31,7	46,2 - 52,2				
Total**	14212	5713	40,2	8499	59,8	3044	21,4	5455	38,4	59,0 - 60,6				

2003* - bis 31.08.2003 (03-02389)

N Gesamt - Anzahl der untersuchten Isolate

Total** - einschließlich nicht genannter Herkunft

Mit durchschnittlich über 50 % sensitiven *Salmonella*-Isolaten aus den Bereichen Umwelt (546) und Futtermitteln (700) liegt das Risikopotential auf einem niedrigeren Niveau als bei denen vom Tier und aus Lebensmitteln. Außerdem ist der Anteil von Einfachresistenzen bei den Isolaten aus Futtermitteln (36 %) am höchsten, während Mehrfachresistenzen nur zu 9 % nachgewiesen werden konnten. Die Futtermittel können damit nicht als wesentliche Eintragsquelle von Resistenzen in die Tierpopulation angesehen werden.

Die *Salmonella*-Isolate aus der Umwelt reflektieren die Situation der vorab betrachteten Herkünfte. Diese haben direkt oder indirekt Einfluss auf die Eigenschaften von *Salmonella*-Isolaten aus der Umwelt (wie z. B. bei Isolaten von Stufenkontrollen). Die Resistenzsituation ist deshalb im Vergleich zu Futtermittelisolaten durch einen signifikant höheren Anteil von mehrfachresistenten Isolaten (31 %) gekennzeichnet.

Vergleicht man die Resistenzsituation aller untersuchten Isolate der einzelnen Jahre miteinander, so zeigt die Tabelle 3 eine signifikante Abnahme des Anteils resistenter Isolate von fast 79 % im Jahr 2000 auf 45 % im Jahr 2002. Dieser Wert hat sich 2003* stabilisiert und liegt bei 45,4 %. Dabei hat der Anteil einfach resistenter Isolate 2003* um 3,5 % zugenommen, während der der Mehrfachresistenten von 36 % auf rund 33 % abgenommen hat. Die für die o.g. Angaben zutreffenden Konfidenzintervalle können der Tabelle 4 entnommen werden.

Die aus den verschiedenen Materialien isolierten Salmonellen tragen in differenziertem Maße zur Gesamtresistenzsituation bei (Tab. 2, 3). Im Untersuchungszeitraum bestimmten die Isolate von den Nutztieren Schwein und Rind/Kalb maßgeblich die Resistenzsituation. Für beide Herkunftsquellen ist es charakteristisch, dass der prozentuale Anteil des Serovars *Salmonella* Typhimurium sowie der eines speziellen Phagentyps bei *S. Typhimurium* - DT104 (Tab. 5) gut mit der jeweiligen Resistenzsituation korreliert. Zudem sind über 98 % aller DT104 Isolate (2000 - 2003*) resistent. Bemerkenswert ist, dass insgesamt über 95 % dieser DT104 Isolate Mehrfachresistenzen aufweisen. Typisch ist für DT104 die Resistenz gegen Ampicillin, Chloramphenicol, Streptomycin/Spectinomycin, Sulphonamiden und Tetracyclin. Diese ist chromosomal kodiert und wird deshalb stabil von Generation zu Generation weitervererbt. Das erklärt auch die stabile und an das Vorkommen von DT104 gekoppelte Resistenzsituation bei den Nutztieren Schwein und Rind/Kalb. Warum sich dieser Phagentyp seit dem Beginn der 90 ziger Jahre in den Beständen nicht nur in Deutschland durchgesetzt hat, ist bisher nicht hinreichend geklärt. Der insgesamt (auf 34,7 %) und auch beim Rind/Kalb (auf 42,6 %) gesunkene Nachweis von DT104 Isolaten in 2003* (Tab. 5) deutet möglicherweise auf eine epidemiologische Wende hin, wie sie bei dem multiresistenten Klon von *S. Typhimurium* DT204 zum Beginn der 90 ziger Jahre beobachtet werden konnte. Dieser Phagentyp wird in Deutschland zur Zeit kaum noch nachgewiesen.

Tabelle 3. Zeitlicher Verlauf der Resistenz von *Salmonella*-Isolaten verschiedener Herkünfte

Herkunft	2000						2001						2002						2003*					
	S			R			S			R			S			R			S			R		
	N	%		N	%		N	%		N	%		N	%		N	%		N	%		N	%	
Tier	440	22,6		1511	77,4		561	28,0		1443	72,0		1182	52,0		1090	48,0		453	39,6		691	60,4	
Nutztier	216	15,3		1196	84,7		351	25,0		1056	75,0		778	45,3		940	54,7		300	36,9		513	63,1	
Rind	66	16,2		342	83,8		32	9,7		298	90,3		196	36,4		342	63,6		103	47,3		115	52,7	
Schwein	31	5,7		514	94,3		29	10,2		256	89,8		43	16,7		215	83,3		45	17,1		218	82,9	
Geflügel	105	24,3		327	75,7		275	36,7		474	63,3		491	56,5		378	43,5		140	46,4		162	53,6	
Lebensmittel	220	18,9		943	81,1		355	36,7		611	63,3		722	50,0		721	50,0		436	62,2		265	37,8	
Fleisch gesamt	129	16,2		665	83,8		170	29,1		414	70,9		341	38,0		556	62,0		183	46,4		211	53,6	
Fleisch Rind/Schwein	41	13,5		263	86,5		76	21,6		275	78,4		122	33,2		246	66,8		96	41,7		134	58,3	
Fleisch Geflügel	69	16,1		359	83,9		81	39,9		122	60,1		195	41,2		278	58,8		81	53,6		70	46,4	
Futtermittel	112	23,1		373	76,9		122	44,4		153	55,6		312	87,6		44	12,4		154	90,1		17	9,9	
Umwelt	52	17,2		251	82,8		151	56,6		116	43,4		151	59,2		104	40,8		192	77,1		57	22,9	
Total	825	21,1		3092	78,9		1227	34,1		2375	65,9		2405	54,8		1987	45,2		1256	54,6		1045	45,4	

2003* - bis 31.08.2003 (03-02389)

N - Anzahl der Isolate

S-sensibel; R-resistent

Tabelle 4. Vergleich der Konfidenzintervalle der resistenten Isolate

Herkunft	95 % Konfidenzintervall				
	2000	2001	2002	2003*	2000 - 2003*
Tier	75,6 - 79,3	70,0 - 74,0	45,9 - 50,0	57,6 - 63,2	63,1 - 65,3
Nutztier	82,8 - 86,6	72,8 - 77,3	52,4 - 57,1	59,8 - 66,4	69,8 - 72,4
Rind	80,3 - 87,4	87,1 - 93,5	59,5 - 67,6	46,1 - 59,4	71,2 - 75,7
Schwein	92,4 - 96,3	86,3 - 93,3	78,8 - 87,9	78,3 - 87,4	87,4 - 90,7
Geflügel	71,6 - 79,7	59,8 - 66,7	40,2 - 46,8	48,0 - 59,3	55,0 - 59,0
Lebensmittel	78,8 - 83,3	60,2 - 66,3	47,4 - 52,5	34,2 - 41,4	58,0 - 60,9
Fleisch gesamt	81,2 - 86,3	67,2 - 74,6	58,8 - 65,2	48,6 - 58,5	67,4 - 70,9
Fleisch Rind/Schwein	82,7 - 90,4	74,0 - 82,7	62,0 - 71,7	51,9 - 64,6	70,8 - 75,7
Fleisch Geflügel	80,4 - 87,4	53,4 - 66,8	54,3 - 63,2	38,4 - 54,3	63,4 - 68,7
Futtermittel	73,2 - 80,7	49,8 - 61,5	8,9 - 15,8	5,5 - 14,4	42,9 - 48,3
Umwelt	78,6 - 87,1	37,5 - 49,4	34,8 - 46,8	17,7 - 28,1	46,2 - 52,2
Total**	77,7 - 80,2	64,4 - 67,5	43,8 - 46,7	43,4 - 47,4	59,0 - 60,6

2003* - bis 31.08.2003 (03-02389)

Total** - einschließlich oben nicht aufgeführter Herkünfte

Tabelle 5. Vorkommen von *Salmonella* Typhimurium DT104 Isolat in Deutschland von 1992 bis 2003*

Jahr	Anzahl von DT104 Isolat (prozentualer Anteil von DT104 an allen <i>S. Typhimurium</i> Isolat je Herkunft)													
	Rind		Schwein		Geflügel		Andere Tiere ¹		Fleisch		Andere Herkunft		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
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
2002	222	52,0	117	55,2	13	22,8	5	31,3	139	42,0	93	20,3	589	39,2
2003*	49	42,6	96	59,3	7	25,0	28	13,4	48	34,5	32	33,0	260	34,7

¹ Hunde, Katzen, Nagetiere, Vögel, Pferde, Wild, etc.
2003* - bis 31.08.2003 (03-02389)

Bei Isolaten vom Geflügel ist die Prävalenz von Resistenzen vom Jahr 2000 bis 2002 signifikant von gut 75 % auf knapp 44 % gefallen (Tab. 3, 4). Im Jahr 2003* ergab sich jedoch erneut ein signifikanter Anstieg auf knapp 54 %, der vor allem auf die Isolate von Puten zurückzuführen ist. Hier konnte neben dem multiresistenten Serovar *S. Heidelberg* auch der ebenfalls multiresistente Serovar *S. Saintpaul* nachgewiesen werden, der resistent gegenüber 4 bis 12 der getesteten 17 antimikrobiellen Substanzen ist. Es zeigt sich hier wiederum, dass beim Geflügel andere Serovare als beim Schwein bzw. Rind/Kalb dominieren und ein größeres Spektrum an verschiedenen Serovaren nachweisbar ist. Da *S. Typhimurium* seltener im Geflügel als beim Schwein/Rind/Kalb vorkommt, spielt auch der beim Rind/Kalb/Schwein zu einem hohen Prozentsatz multiresistente Phagentyp DT104 beim Geflügel eher eine untergeordnete Rolle (Tab. 5).

Bei den von Lebensmitteln stammenden Isolaten konnte von 2000 bis 2003* ein signifikanter Rückgang der Prävalenz der Resistenz von 81 % auf 38 % beobachtet werden (Tab. 3, 4). Dies beruht sowohl auf der Abnahme von einfach wie auch mehrfach resistenten Isolaten. Diese ist darauf zurückzuführen, dass der Hauptanteil der bei den Lebensmitteln untersuchten Isolate zu 41 bis 58 % vom Nahrungsmittel Fleisch stammt. Dementsprechend verläuft der Rückgang der resistenten Isolate parallel zu der beim Nutztier beobachteten Entwicklung.

Über den gesamten Untersuchungszeitraum unterscheidet sich der Anteil resistenter Isolate vom Fleisch des Schwein/Rind/Kalbes von dem des Geflügels signifikant voneinander (Tab. 2, 4). In diesen Herkünften bestimmen die dominierenden Serovare *S. Typhimurium* (Phagentyp DT104) beim Schwein/Rind/Kalb und *S. Enteritidis*, *S. Gruppe B* und *S. Paratyphi B* dT + (Huhn), *S. Saintpaul* und *S. Heidelberg* (Pute) weitgehend die Resistenzsituation. Bei beiden Herkunftsgruppen ist sowohl für einfach wie mehrfach resistente Isolate eine Abnahme der Prävalenz zu verzeichnen. Diese fällt beim Fleisch vom Schwein/Rind/Kalb von 87 % (2000) auf 58 % (2003*) und beim Geflügelfleisch von 84 % auf 46 % (Tab. 3). Der beim Fleisch von Nutztieren nachgewiesene hohe Anteil von DT104 Isolaten über den Untersuchungszeitraum (Tab. 5) zeigt aber auch, dass diese multiresistenten Salmonellen immer noch über die Lebensmittel den Verbraucher erreichen können. Auch bei den Isolaten vom Fleisch wurden neben der Fünffachresistenz weitere Resistenzen nachgewiesen. Das Auftreten von Isolaten aus Lebensmitteln mit bis zu 10 verschiedenen Resistenzen gegenüber verschiedenen antimikrobiell wirksamen Substanzgruppen zeigt, wie schwierig eine Bekämpfung bei einer humanen Erkrankung durch diesen Erreger werden könnte. Aufmerksam zu machen ist auch weiterhin auf die Tatsache, dass nur 2 % der DT104 Isolate aus dem Fleisch noch sensibel gegenüber den 17 getesteten Substanzen sind.

Auch bei den Futtermittel- und Umweltisolaten bestimmen die am häufigsten isolierten Serovare die Resistenzsituation, die insgesamt eine sinkende Tendenz aufweist. 10 bzw. 23 % der Isolate waren 2003* noch resistent. Aus Futtermitteln sind die Serovare *S. Anatum*, *S. Senftenberg* und *S. Mbandaka* am häufigsten isoliert worden, die bis zu 60 % resistent sind. Bei Umweltisolaten sind dies *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* und *S. Livingstone*, wobei sich der Anteil resistenter Isolate zwischen 68 % (*S. Typhimurium*) und 33 % (*S. Enteritidis*) bewegt.

Die Tabelle 6 zeigt einen Überblick über die Resistenzentwicklung bei den Nutztierarten Rind, Schwein und Geflügel über den Berichtszeitraum von 3,5 Jahren und differenziert nach den 17 eingesetzten antimikrobiellen Substanzen. Dabei sind alle Werte über 10% hervorgehoben. Sie stellen die momentanen Schwerpunkte der Resistenzentwicklung dar. Das gleiche gilt für die in Tabelle 7 dargestellten Werte für die von den jeweiligen Nutztieren stammenden Lebensmittel. Auffällig ist, dass zwischen den häufig vorkommenden Resistenzen der Isolate von Nutztieren und denen der aus ihnen resultierenden Lebensmittel eine hohe Übereinstimmung bei den vorherrschenden Resistenzen besteht.

Tabelle 6. Prozentualer Anteil resistenter *Salmonella*-Isolate verschiedener Herkunft gegenüber 17 antimikrobiell wirksamer Substanzen

Substanz	Rind			Schwein			Geflügel								
	2000 n=408	2001 n=330	2002 n=542	2003* n=218	Gesamt n=1498	2000 n=545	2001 n=285	2002 n=259	2003* n=263	Gesamt n=1352	2000 n=432	2001 n=749	2002 n=870	2003* n=302	Gesamt N=2353
Ampicillin	52,0	74,2	55,2	44,5	56,9	72,5	57,9	66,4	70,0	67,8	9,3	13,9	24,8	30,5	19,2
Amoxicillin/ Clavulansäure	5,4	3,9	23,1	1,8	11,0	4,2	7,4	25,5	3,8	8,9	0,2	0,4	10,2	7,0	4,9
Ceftiofur	1,2	<0,3	1,8	<0,5	1,0	0,2	<0,4	1,9	<0,4	0,4	0,9	<0,1	1,2	0,3	0,6
Chloramphenicol	43,1	70,9	39,9	25,2	45,5	47,9	47,7	49,8	30,8	44,9	5,8	8,4	4,5	7,0	6,2
Florfenicol	34,8	65,8	38,8	23,4	41,4	40,0	44,6	45,6	27,8	39,6	1,4	5,1	2,0	2,3	2,9
Ciprofloxacin	0,5	<0,3	<0,2	<0,5	0,1	0,4	<0,4	<0,4	<0,4	0,2	0,7	0,3	0,6	1,7	0,6
Nalidixinsäure	1,5	1,2	7,8	4,6	4,1	3,1	2,5	3,9	2,3	3,0	5,3	7,3	27,2	26,2	16,8
Colistin	1,7	<0,3	3,1	1,8	1,9	2,2	<0,4	1,9	2,3	1,7	1,2	0,1	2,0	3,6	1,5
Gentamicin	1,0	<0,3	0,7	<0,5	0,5	2,4	1,1	3,5	1,9	2,2	1,9	1,7	6,3	10,6	4,6
Kanamycin	5,9	1,2	0,9	0,9	2,3	2,4	5,3	5,8	10,3	5,1	7,4	5,3	5,2	9,3	6,2
Neomycin	5,9	1,2	0,9	0,9	2,3	2,8	5,3	5,8	10,3	5,3	7,4	5,3	1,8	5,3	4,4
Spectinomycin	44,9	73,9	40,4	26,1	46,9	51,2	56,8	57,1	38,0	51,0	20,8	15,4	27,2	32,1	22,9
Streptomycin	54,4	79,1	56,5	47,7	59,6	78,9	69,8	74,1	70,7	74,5	22,0	19,6	25,4	37,7	24,5
Sulfamethoxazol	80,9	89,1	57,0	47,3	69,2	91,0	83,5	75,3	74,9	83,3	71,1	57,4	27,5	38,4	46,4
Sulfamethoxazol/ Trimethoprim	5,9	6,1	5,9	0,9	5,2	5,3	10,2	13,5	18,6	10,5	16,2	5,7	7,4	10,6	9,4
Trimethoprim	6,4	7,0	6,1	0,9	5,6	5,7	10,2	15,1	18,6	11,0	16,7	6,4	14,5	11,9	12,0
Tetracyclin	52,2	70,9	53,3	45,0	55,7	79,3	71,2	73,8	72,2	75,2	17,6	13,1	10,6	17,5	13,6

2003* - bis 31.08.2003 (03-02389)
N - Anzahl der Isolate
Gesamt - Prozent resistenter Isolate 2000 - 2003*

Tabelle 7. Prozentualer Anteil resistenter *Salmonella*-Isolate verschiedener Herkunft gegenüber 17 antimikrobiell wirksamer Substanzen

Substanz	Fleisch Rind/Schwein			Fleisch Geflügel			Fleisch Gesamt								
	2000 n=274	2001 n=351	2002 n=369	2003* n=230	Gesamt n=1224	2000 n=426	2001 n=203	2002 n=475	2003* n=151	Gesamt n=1255	2000 n=793	2001 n=584	2002 n=897	2003* n=394	Gesamt N=2668
Ampicillin	40,9	41,9	48,5	38,7	43,1	27,5	23,7	29,9	21,2	27,0	30,9	33,4	37,2	31,7	33,7
Amoxicillin/ Clavulansäure*	2,6	4,0	n.d	1,7	6,7	0,2	3,5	n.d	2,0	5,4	1,0	3,9	n.d	2,3	6,0
Ceftiofur	0,4	<0,3	0,8	<0,4	0,3	0,2	<0,5	1,5	<0,7	0,6	0,3	<0,2	1,1	<0,3	0,5
Chloramphenicol	32,5	31,3	32,8	20,4	30,0	5,6	7,4	6,5	6,6	6,4	16,4	21,4	17,8	15,0	17,8
Florfenicol	20,4	27,9	25,8	19,1	23,9	1,9	4,4	1,7	0,7	2,1	9,8	18,2	12,2	12,2	12,8
Ciprofloxacin	<0,4	<0,3	<0,3	0,4	0,1	6,3	2,0	0,4	0,7	2,7	3,4	0,7	0,2	0,5	1,3
Nalidixinsäure	1,8	2,9	1,6	4,3	2,5	28,9	23,2	24,8	25,2	26,0	17,0	9,6	14,6	11,9	13,6
Colistin	0,7	<0,3	2,4	0,4	1,0	0,2	0,5	2,7	3,3	1,6	0,5	0,2	2,6	2,0	1,4
Gentamicin	1,5	0,6	1,9	<0,4	1,1	1,2	2,0	6,3	0,7	3,2	1,3	0,9	4,4	0,3	2,1
Kanamycin	6,9	2,3	5,2	3,0	4,3	3,3	3,0	4,0	2,6	3,4	4,5	2,6	4,4	2,8	3,8
Neomycin	6,9	2,3	5,2	3,0	4,3	3,1	3,0	3,8	2,6	3,3	4,4	2,6	4,2	2,8	3,7
Spectinomycin	31,0	40,5	35,8	25,2	34,1	47,7	36,0	28,4	25,2	35,8	38,1	36,1	32,2	24,4	33,7
Streptomycin	47,1	50,7	53,7	40,9	48,9	52,4	33,0	33,3	22,5	38,4	47,3	42,5	42,1	33,2	42,4
Sulfamethoxazol	79,2	72,9	57,7	47,4	65,0	74,2	45,8	46,3	21,2	52,7	75,7	62,2	51,0	37,1	58,7
Sulfamethoxazol/ Trimethoprim	8,4	9,1	11,7	15,2	10,9	40,6	26,6	8,6	9,9	22,6	24,3	14,0	10,7	12,4	15,7
Trimethoprim	8,4	9,1	12,5	15,7	11,2	43,9	27,1	13,3	12,6	25,8	26,0	14,2	13,7	13,7	17,5
Tetracyclin	51,8	51,3	58,5	41,7	51,8	12,4	24,6	30,3	12,6	21,2	28,3	39,6	41,7	30,5	35,6

2003* - bis 31.08.2003 (03-02389)

N - Anzahl der Isolate

Gesamt - Prozent resistenter Isolate 2000 - 2003*

* im Jahr 2002 konnte auf Amoxicillin/Clavulansäure nicht getestet werden n.d.=nicht getestet

Außerdem wird erneut der Unterschied der resistenten Isolate aus der Gruppe Rind/Schwein im Vergleich zum Geflügel deutlich.

Die Prävalenz der Resistenz von Chloramphenicol/Florfenicol kommt bei Geflügelisolaten (95 % KI=5,3 - 7,3 / 2,2 - 3,6) in einem signifikant geringeren Maße vor als bei Isolaten vom Rind (95 % KI=42,9 - 48,0/ 38,9 - 43,9) und Schwein (95 % KI=42,2 - 47,5/37,0 - 42,3). Der prozentuale Anteil der für die Resistenzsituation weiterhin relevanten Substanzen Ampicillin, Spectinomycin/Streptomycin, Sulfamethoxazol und Tetracyclin ist bei den *Salmonella*-Isolaten vom Rind/Schwein signifikant höher als bei den vom Geflügel.

Dagegen weisen Geflügelisolate eine signifikant höhere Prävalenz bei dem Chinolon Nalidixinsäure auf, das als Indikator für eine entstehende Fluorochinolonresistenz gilt. Diese (Ciprofloxacinresistenz) zeigt bisher sowohl bei Isolaten vom Rind/Schwein als auch noch beim Geflügel (mit leicht steigender Tendenz) eine geringe Prävalenz. Die Situation der Chinolonresistenz wird detailliert unter Punkt 2 dieses Berichtes betrachtet.

Unterschiede in der Prävalenz zwischen Isolaten vom Rind und Schwein gibt es bei den Substanzen Trimethoprim und der Kombination Trimethoprim/Sulfamethoxazol. Bei den Schweineisolaten konnte hier ein signifikanter Anstieg vom Jahr 2000 (KI = 3,4 - 7,2) bis 2003* (95 % KI= 13,9 - 23,3) beobachtet werden. Auch beim Geflügel zeigen diese Substanzen Prävalenzen von durchschnittlich 12,0 bzw. 9,4 %.

Aufmerksam gemacht werden soll hier auf die über den Untersuchungszeitraum bei Geflügelisolaten angestiegene Prävalenz von Ampicillin (95 % KI [2000] 6,5 - 12,0; [2003*] 25,3 - 35,7) und Gentamicin (95 % KI [2000] 0,6 - 3,1; [2003*] 7,1 - 14,1), deren Verlauf weiter verfolgt werden sollte.

In der Tabelle 7 wird die Prävalenz der einzelnen Resistenzen beim Lebensmittel Fleisch sowie weiter differenziert in Geflügelfleisch und Fleisch vom Rind/Schwein dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass die maßgebenden Resistenzen auch im Lebensmittel des jeweiligen Nutztiers nachgewiesen werden können.

Für eine differenziertere Beurteilung der Resistenzsituation gerade bei Nutztieren und den daraus hergestellten Lebensmitteln fehlen Daten über die eingesetzten Mengen an antimikrobiellen Substanzen. Nur sie könnten erklären, warum einige Resistenzen zu oder abnehmen. Ein Monitoring bei relevanten mikrobiellen Erregern in Verbindung mit der Erhebung des Verbrauchs an antimikrobiellen Substanzen könnte die bestehenden Defizite bei der Risikobewertung beseitigen.

1.1. Bewertung der Resistenz bei Salmonellen

- Trotz einer signifikanten Abnahme von 85 % im Jahre 2000 auf nunmehr 63 % liegt die Resistenzrate bei den Salmonellen aus Lebensmittel liefernden Tieren (Rind, Schwein, Geflügel) mit durchschnittlich 70 % weiterhin auf einem hohen Niveau.
- Die Abnahme der Gesamtresistenzrate beruht im wesentlichen auf der Abnahme der Einzelresistenz gegenüber Sulfamethoxazol.
- Trotz einer Abnahme seiner Prävalenz herrscht der resistente *Salmonellatyp* S. Typhimurium Phagentyp DT104 mit 42 bzw. 59 % im Jahr 2003* bei den Nutztierarten Rind und Schwein vor.
- Bei den Phagentyp DT104 Isolaten sind 99% aller Isolate des Untersuchungszeitraumes resistent und 97% mehrfachresistent.

- Der Anteil Chinolon resistenter Isolate vom Geflügel liegt bei 26 % (2003*) und hat damit signifikant um mehr als 20 % zugenommen. Die Fluorochinolonresistenz (MHK $\geq 2 \mu\text{g/ml}$) liegt 2003* bei 1,7 %. Bei Isolaten einiger Serovare vom Geflügel können aber Stämme mit verminderter Fluorochinolon Empfindlichkeit in mehr als 50 % der Isolate gefunden werden (Malorny et al., 2003).

1.2. Literatur zur Resistenzfassung

1. NCCLS (1999) Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. M31-A, Vol. 19 No. 11. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, USA.
2. NCCLS (2000) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. M7-A5, Vol. 20 No. 2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, USA.
3. NCCLS (2001) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100-S11, Vol. 21 No. 1. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, USA.
4. DIN 58940-4 Beiblatt 1 (1998) MHK-Grenzwerte von antibakteriellen Wirkstoffen. Normenausschuss Medizin (NaMed) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V..
5. DANMAP 98 (1999) Consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. Statens Serum Institut, Danish Veterinary & Food Administration, Danish Medicines Agency, Danish Veterinary Laboratory.
6. Malorny, B., A. Schroeter, B. Guerra, R. Helmuth (2003). Incidence of quinolone resistance in strains of Salmonella isolated from poultry, cattle and pigs in Germany between 1998 and 2001. Vet. Rec.153:643-648.

2. Schwerpunktuntersuchungen zur Chinolonresistenz bei Salmonellen

Chinolone und Fluorochinolone gehören zu den neuesten und wirksamsten antimikrobiell wirksamen Substanzen, die sowohl in der Human-, als auch der Veterinärmedizin von großer Bedeutung sind. Im Falle einer lebensbedrohlichen Salmonellose werden sie als Mittel der Wahl angesehen. Diese Klasse hochwirksamer antimikrobiell wirksamer Substanzen inhibieren die DNA Gyrase und Topoisomerase IV von sensiblen Bakterien. Die Zulassung des Fluorochinolons Enrofloxacin in Deutschland 1989 zur Therapie von Nutztieren verursachte einen Anstieg der Chinolon-resistenten *Salmonella*-Isolate des Rindes (Malorny et al., 1999), der allerdings Mitte der neunziger Jahre zurückging. In der Zwischenzeit sind jedoch weitere Zulassungen, speziell beim Geflügel zur Bestandsmedikation erfolgt. Dort werden Fluorochinolone über das Trinkwasser verabreicht.

In diesem Berichtsteil wird deswegen die Resistenzsituation bei Salmonellen gegenüber dem Chinolon Nalidixinsäure und dem Fluorochinolon Ciprofloxacin dargestellt. 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 zu dem in der Veterinärmedizin zugelassenen Enrofloxacin.

Nalidixinsäure zeigt sich als guter Indikator für die ersten Schritte der Entstehung einer Resistenz gegenüber Fluorochinolonen. Während bereits eine Mutation des *gyrA* Gens eine hohe Resistenz gegenüber Nalidixinsäure zeigt, bleibt die Resistenz gegenüber Fluorochinolonen unter dem Grenzwert nach NCCLS. Dies bewertet man als eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Fluorochinolonen (genauere Informationen dazu sind im Teil 2.2. dieses Berichtes zu erhalten). Allerdings soll dieser Grenzwert zum Anfang des Jahres 2004 reduziert werden, sodass die heute noch als reduziert empfindlich eingestuft Erreger dann als resistent gelten werden (Angulo CDC, persönliche Information).

Die Tabellen 8 und 9 geben einen Überblick über den prozentualen Anteil Nalidixinsäure resistenter Isolate der verschiedenen Herkünfte in Bezug auf die einzelnen Jahre und den gesamten Untersuchungszeitraum. Desgleichen beschreiben die Tabellen 10 und 11 die Daten für Ciprofloxacin. Beim Tier und Nutztier ist die Hauptherkunftsquelle für Chinolon resistente Isolate das Geflügel. Für die Chinolonresistenz gibt es einen signifikanten Anstieg vom Jahr 2000/2001 von 5,3/7,3 % zum Zeitraum 2002/2003* auf 27,2/26,2 %. Beim Schwein und Rind dagegen unterscheidet sich der prozentuale Anteil resistenter Isolate im Untersuchungszeitraum nicht signifikant voneinander (Ausnahme Rind im Jahr 2002).

Tabelle 8. Resistenz gegenüber Nalidixinsäure bei *Salmonella*-Isolaten (2000 - 2003*)

Herkunft	2000			2001			2002			2003*			
	N	R	% R	N	R	% R	N	R	% R	N	R	% R	KI
Tier	1951	60	3,1	2004	87	3,8	2272	313	13,8	1144	108	9,4	7,7 - 11,1
Nutztier	1412	46	3,3	1407	66	4,7	1718	308	17,0	813	96	11,8	9,6 - 14,0
Rind	408	6	1,5	330	4	1,2	538	42	7,8	218	10	4,6	1,8 - 7,4
Schwein	545	17	3,1	285	7	2,5	258	10	3,5	263	6	2,3	0,5 - 4,1
Geflügel	432	23	5,3	749	55	7,3	869	237	27,2	302	79	26,2	21,2 - 31,1
LM	1163	158	13,6	966	73	7,6	1443	146	10,3	701	57	8,1	6,1 - 10,2
Fleisch ges.	794	132	16,4	584	56	9,6	897	131	14,6	394	52	12,2	9,0 - 15,4
Fleisch R+S	304	5	1,6	351	10	2,9	368	6	1,6	230	9	3,9	1,4 - 6,4
Fleisch G.	426	123	28,9	203	47	23,2	475	118	24,8	151	38	25,2	18,2 - 32,1
FM	485	5	1,0	275	2	0,7	356	9	2,5	171	3	1,8	0,0 - 3,7
Umwelt	303	12	4,0	267	8	3,0	255	19	7,5	249	11	4,4	1,9 - 7,0
Total**	3917	240	6,3	3602	163	4,5	4392	493	11,2	2301	186	8,1	7,0 - 9,2

2003* - bis 31.08.2003 (03-02389)

N - Anzahl der Isolate

% R - Prozent resistente Isolate

KI - 95 % Konfidenzintervall

LM - Lebensmittel

Fleisch ges. - Fleisch gesamt

Fleisch R+S - Fleisch Rind + Schwein

Fleisch G. - Fleisch Geflügel

FM - Futtermittel

Total** - einschließlich nicht genannter Herkünfte

Tabelle 9. Resistenz gegenüber Nalidixinsäure bei *Salmonella*-Isolaten (2000 - 2003*)

Herkunft	2000 - 2003*			
	N gesamt	N resistent	% R	KI
Tier	7371	558	7,6	7,0 - 8,2
Nutztier	5350	500	9,3	8,6 - 10,1
Rind	1494	62	4,2	3,1 - 5,2
Schwein	1351	39	2,9	2,0 - 3,8
Geflügel	2352	394	16,8	15,2 - 18,3
LM	4273	434	10,2	9,3 - 11,1
Fleisch ges.	2669	367	13,8	12,4 - 15,1
Fleisch R+S	1253	30	2,4	1,5 - 3,2
Fleisch G.	1255	326	26,0	23,8 - 28,4
FM	1287	19	1,5	0,9 - 2,3
Umwelt	1074	50	4,7	3,4 - 5,9
Total**	14212	1086	7,6	7,2 - 8,1

- 2003* - bis 31.08.2003 (03-02389)
N - Anzahl der Isolate
% R - Prozent resistente Isolate
KI - 95 % Konfidenzintervall
LM - Lebensmittel
Fleisch ges. - Fleisch gesamt
Fleisch R+S - Fleisch Rind + Schwein
Fleisch G. - Fleisch Geflügel
FM - Futtermittel
Total** - einschließlich nicht genannter Herkünfte

Tabelle 10. Resistenz gegenüber Ciprofloxacin bei *Salmonella*-isolaten (2000 - 2003*)

Herkunft	2000			2001			2002			2003*						
	N	R	% R	KI	N	R	% R	KI	N	R	% R	KI				
Tier	1951	7	0,4	0,1 - 0,6	2004	3	0,2	0,0 - 0,3	2272	5	0,2	0,0 - 0,4	1144	5	0,4	0,1 - 0,8
Nutztier	1412	7	0,5	0,1 - 0,9	1407	2	0,1	0,0 - 0,3	1718	5	0,3	0,0 - 0,5	813	5	0,6	0,1 - 1,2
Rind	408	2	0,5	0,0 - 1,2	330	0	<=0,3	-	538	0	<=0,2	-	218	0	<=0,5	-
Schwein	545	2	0,4	0,0 - 0,9	285	0	<=0,4	-	258	0	<=0,4	-	263	0	<=0,4	-
Geflügel	432	3	0,7	0,0 - 1,5	749	2	0,3	0,0 - 0,6	869	5	0,6	0,1 - 1,1	302	5	1,7	0,2 - 3,1
LM	1163	29	2,5	1,6 - 3,4	966	4	0,4	0,0 - 0,8	1443	2	0,1	0,0 - 0,3	701	2	0,3	0,1 - 0,7
Fleisch ges.	794	27	3,4	2,1 - 4,7	584	4	0,7	0,0 - 1,1	897	2	0,2	0,0 - 0,5	394	2	0,5	0,0 - 1,2
Fleisch R+S	304	0	<=0,4	-	351	0	<=0,3	-	368	0	<=0,3	-	230	1	0,4	0,0 - 1,3
Fleisch G.	426	27	6,3	4,0 - 8,7	203	4	2,0	0,1 - 3,9	475	2	0,4	0,0 - 1,0	151	1	0,7	0,0 - 2,0
FM	485	0	<=0,2	-	275	0	<=0,4	-	356	0	<=0,3	-	171	0	<=0,6	-
Umwelt	303	1	0,3	0,0 - 1,0	267	1	0,4	0,0 - 1,1	255	0	<=0,4	-	249	3	1,2	0,0 - 2,6
Total**	3917	37	1,0	0,6 - 1,2	3602	9	0,3	0,1 - 0,4	4392	7	0,2	0,0 - 0,3	2301	10	0,4	0,2 - 0,7

2003* - bis 31.08.2003 (03-02389)

N - Anzahl der Isolate

% R - Prozent resistente Isolate

KI - 95 % Konfidenzintervall

LM - Lebensmittel

Fleisch ges. - Fleisch gesamt

Fleisch R+S - Fleisch Rind + Schwein

Fleisch G. - Fleisch Geflügel

FM - Futtermittel

Total** - einschließlich nicht genannter Herkünfte

Tabelle 11. Resistenz gegenüber Ciprofloxacin bei Salmonella-Isolaten (2000 - 2003*)

Herkunft	2000 - 2003*				
	N gesamt	N sensibel	N resistent	% R	KI
Tier	7371	7352	19	0,3	0,1 - 0,4
Nutztier	5350	5331	19	0,4	0,2 - 0,5
Rind	1494	1492	2	0,1	0,0 - 0,3
Schwein	1351	1349	2	0,2	0,0 - 0,4
Geflügel	2352	2337	15	0,6	0,3 - 1,0
LM	4273	4236	37	0,9	0,6 - 1,1
Fleisch ges.	2669	2634	35	1,3	0,9 - 1,7
Fleisch R+S	1253	1252	1	0,1	0,0 - 0,2
Fleisch G.	1255	1221	34	2,7	1,8 - 3,6
FM	1287	1287	0	<=0,1	-
Umwelt	1074	1069	5	0,5	0,1 - 0,9
Total**	14212	14149	63	0,4	0,3 - 0,6

2003*	-	bis 31.08.2003 (03-02389)
N	-	Anzahl der Isolate
% R	-	Prozent resistente Isolate
KI	-	95 % Konfidenzintervall
LM	-	Lebensmittel
Fleisch ges.	-	Fleisch gesamt
Fleisch R+S	-	Fleisch Rind + Schwein
Fleisch G.	-	Fleisch Geflügel
FM	-	Futtermittel
Total**	-	einschließlich nicht genannter Herkünfte

Beim Lebensmittel ist die Herkunftsquelle für Chinolon-resistente Salmonellen das Geflügelfleisch. Bemerkenswert ist der Sachverhalt, dass, von den anderen Resistenzen abweichend, ein hoher Prozentsatz - 29 bis 23 % - der Isolate über den gesamten Untersuchungszeitraum resistent ist. Das lässt auf einen fortbestehenden Selektionsdruck aufgrund des massiven Einsatz dieser Substanzklasse schließen - möglicherweise nicht nur bei deutschen Geflügelzüchtern.

Bei den Isolaten aus Futtermitteln ist der resistente Anteil sehr gering und unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den einzelnen Jahren.

Legt man einen Breakpoint für Ciprofloxacin von $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ zu Grunde, ist die Resistenz noch nicht sehr ausgeprägt und mit unter 1 % über den gesamten Untersuchungszeitraum recht niedrig. Lediglich bei Isolaten aus Geflügelfleisch ist sie mit 2,7 % am höchsten. Dieser Befund wird aber relativiert, wenn man die im Rahmen des Forschungsvorhabens durchgeführten Schwerpunktuntersuchungen zur Chinolonresistenz bei Salmonellen der Jahre 2000-2001 betrachtet.

Die Abbildungen 1 - 4 zeigen die Verteilungen der MHK-Werte verschiedener *Salmonella*-Erregergruppen. Da speziell bei Fluorochinolonen die Größe von Grenzwerten kontrovers diskutiert wird, ist dies die objektivste Methode, Resistenzdaten zu präsentieren. Das gilt besonders vor dem Hintergrund, dass Isolate mit reduzierter Empfindlichkeit gegenüber Fluorochinolonen 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, WHO 2003).

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 (inkl. Lebensmittel vom Schwein) 1,7 % (n = 1037) und Rind (inkl. 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 (Abb. 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.

2.1. 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 sechs Jahren. 1998 - 2000 erfolgte ein kontinuierlicher Anstieg der Resistenzraten, der sich in den darauf folgenden Jahren 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 seit 1998 ein Anstieg der Chinolonresistenz zu beobachten (Abb. 4).

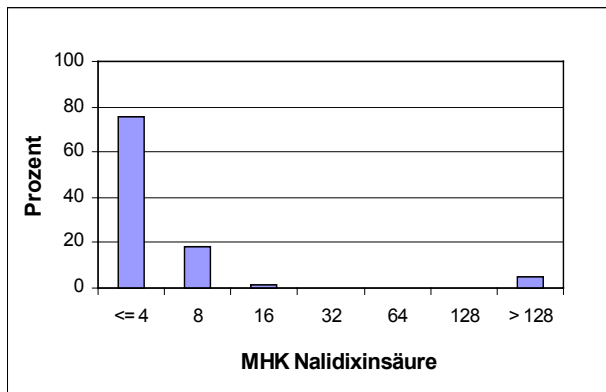
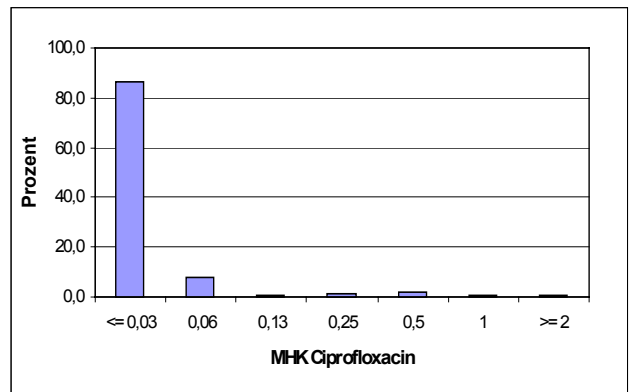
A**B**

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

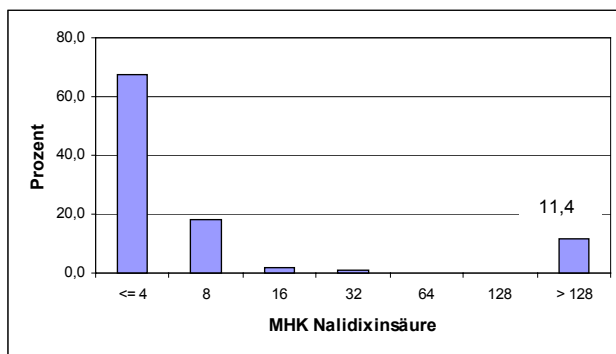
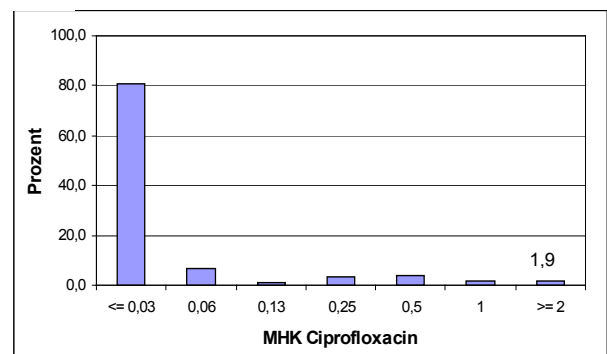
A**B**

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)

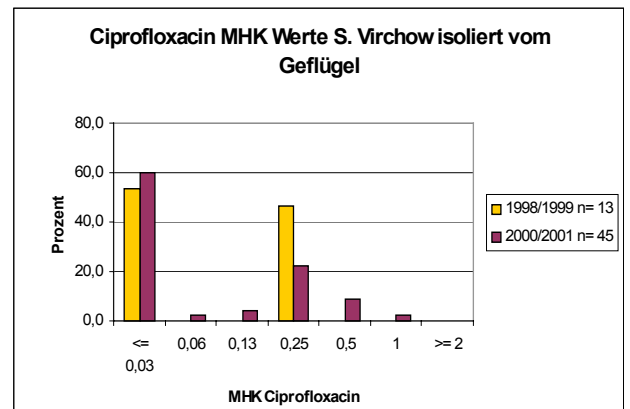
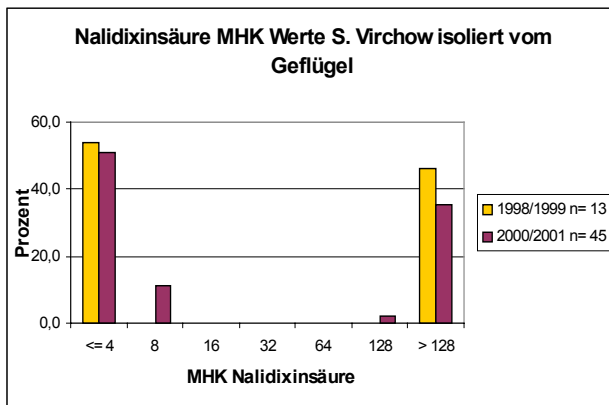
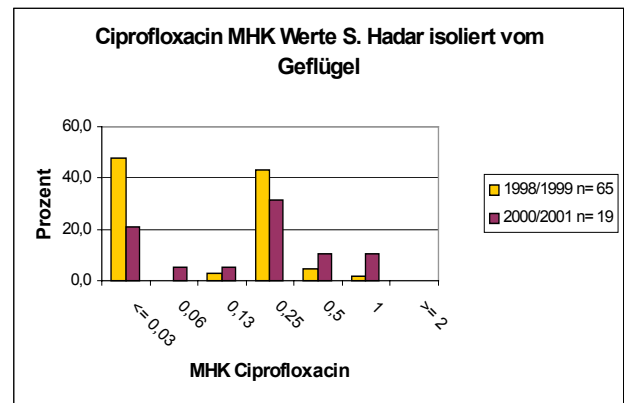
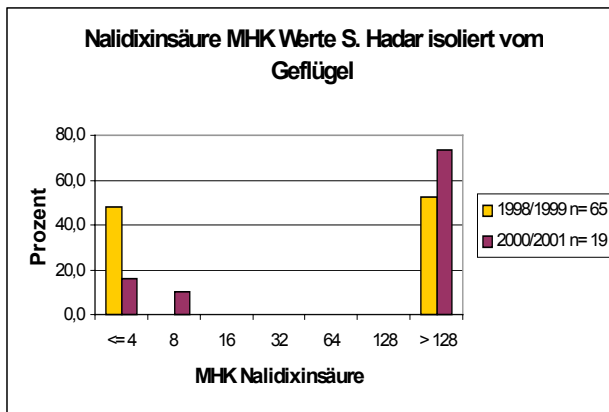
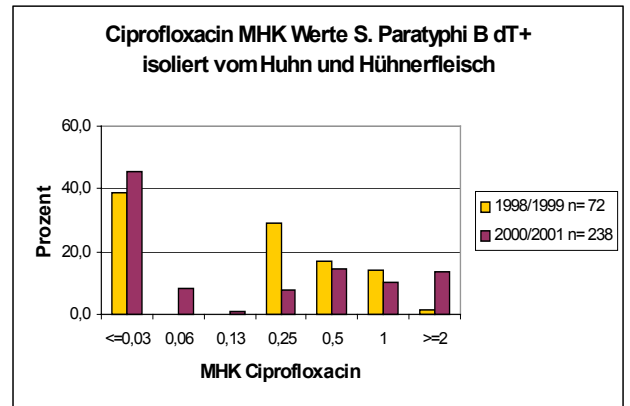
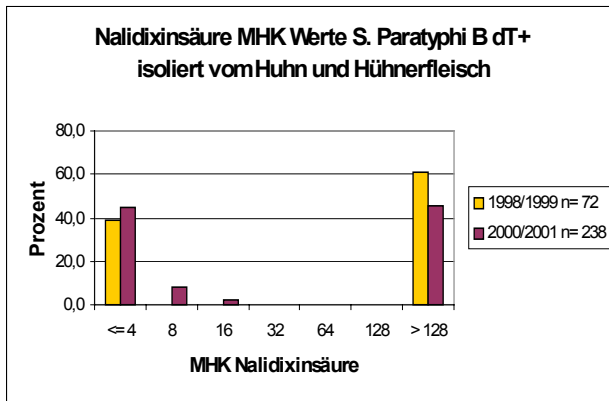


Abbildung 3. MHK-Werte wichtiger beim Geflügel vorkommender *Salmonella* Serovare für Nalidixinsäure und Ciprofloxacin

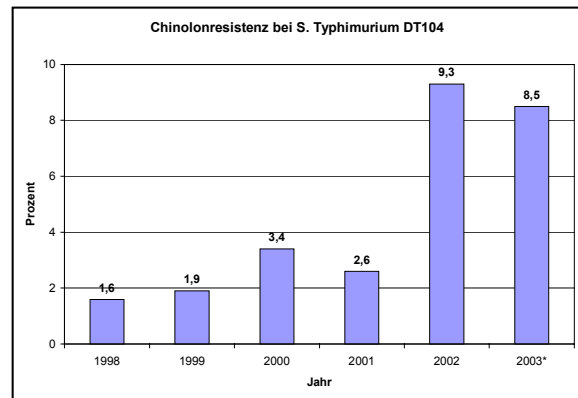
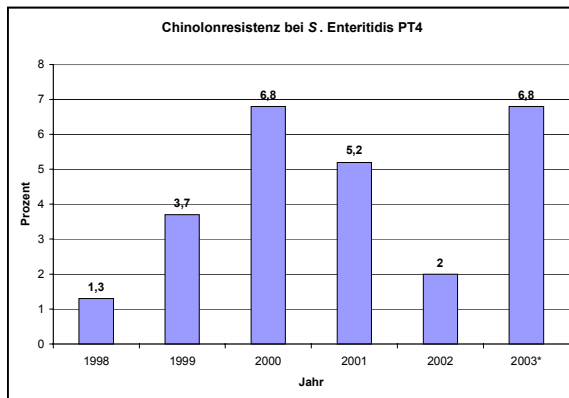


Abbildung 4. Zunahme der Chinoloneresistenz (Nalidixinsäure) bei S. Enteritidis PT4 und S. Typhimurium DT104 (Isolate aller Herkunftsquellen).

2.2. Molekularbiologische Charakterisierung der Chinolonresistenz bei Salmonellen

Nalidixinsäure zeigt sich als guter Indikator für die ersten Schritte der Entstehung einer Resistenz gegenüber Fluorochinolonen. Während eine Mutation in der QRDR Region des *gyrA* Gens eine hohe Resistenz gegenüber Nalidixinsäure anzeigt, bleibt die Resistenz gegenüber Fluorochinolonen unter dem Grenzwert (nach NCCLS für Ciprofloxacin $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ und nach DIN $\geq 2 \mu\text{g/ml}$). Dies bewertet man als eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Fluorochinolonen. 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 Fluorochinolonen hatten, resistent. Eine weitere Punktmutation in dem *gyrB* Gen oder *parC* Gen verursacht eine bedeutend höhere Resistenz und führt zu Stämmen, die gegenüber Fluorochinolonen hoch-resistent sind (Tab. 12). (Piddock et al., 2002).

Tabelle 12. Effekte von Mutationen auf den MHK-Wert von Chinolonen bei gram-negativen Bakterien.

Genotyp	MHK _{NaI} ($\mu\text{g/ml}$)	MHK _{Cip} ($\mu\text{g/ml}$)
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

Um Aufschluss über die in Deutschland vorkommenden Resistenzmechanismen zu geben, wurde von verschiedenen Chinolon-resistenten *Salmonella*-Isolaten die QRDR Region des *gyrA* und *parC* Gens sequenziert.

Tabelle 13 gibt eine Zusammenfassung der erhaltenen Ergebnisse. Es konnten verschiedene Punktmutationen nachgewiesen werden, die zur Chinolonresistenz und reduzierten Empfindlichkeit gegenüber Ciprofloxacin führen. Doppelte Punktmutationen in der QRDR Region an Position 83 und 87 wurden nicht gefunden und auch im *parC* Gen waren keine Punktmutationen in der QRDR Region der aus den Jahren 1999 bis 2003 stammenden Isolate nachweisbar (Malorny et al., 2003).

Allerdings wurden auch Isolate der frühen Neunziger Jahre in die Studie eingeschlossen. Zu dieser Zeit dominierte in deutschen Rindern ein multiresistenter *S. Typhimurium* Phagentyp DT204c Klon, der auch gegen Fluorochinolone hochgradig resistent war (Malorny et al., 1999). Die MHK Werte für Ciprofloxacin erreichten Werte $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ und für Enrofloxacin $\geq 128 \mu\text{g/ml}$. Mittlerweile ist dieser Klon vollständig durch den ebenfalls multiresistenten *S. Typhimurium* DT104 Klon ersetzt worden. Die QRDR Regionen der Gene *gyrA*, *gyrB* und *parC* wurden von zwei repräsentativen Stämmen multiresistenter *S. Typhimurium* Phagentyp DT204c sequenziert. Die Analyse der Region des *gyrA* Gens bestätigte einen bereits in der Literatur beschriebenen Aminosäureaustausch an Position 83 (Ser zu Ala) und 87 (Asp zu Asn). Die Analyse der Region des *gyrB* Gens zeigte eine vorher noch nicht beschriebene Mutation, die zum Aminosäureaustausch von Serin zu Phenylalanin an Position 464 führte. Dieser Austausch kann zur Veränderung der Hydrophobizität des Proteins und damit zu einer Veränderung der Struktur führen. Die Analyse des *parC* Gens zeigte, dass beide Isolate eine Mutation an Position 80 besaßen, die zur Substitution von Serin zu Isoleucin führte. Diese Substitution wurde, in Kombination mit einer Doppelmutation im *gyrA* Gen, häufig bei gegen Fluorochinolone hoch resistenten *Escherichia coli* Isolaten beschrieben (Webber und Piddock, 2001). Eine phänotypische Analyse der Toleranz gegenüber Cyclohexan zeigte, dass beide Isolate gegenüber dem Stoff resistent sind, was auf die Einbeziehung von Effluxpumpen bei der Resistenz gegenüber Fluorochinolonen schließen lässt (Guerra et al., 2003).

Inzwischen sind weitere Arbeiten, die Mutationen im *parC* Gen und andere Resistenzmechanismen wie "Resistenzpumpen" beschreiben und damit die im Rahmen des Forschungsvorhabens gewonnenen Daten bestätigen, veröffentlicht worden (Baucheron et al., 2002).

Tabelle 13. Zusammenhang zwischen MHK Werten 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)	MHK (µg/ml) NAL	MHK (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

2.3. Bewertung zur Chinolonresistenz bei Salmonellen

- Die Chinolonresistenz der untersuchten *Salmonella*-Stämme der Jahre 2000-2001 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 Fluorochinolone einen hohen Selektionsdruck ausüben.
- Nalidixinsäure erweist sich als guter Frühindikator für eine beginnende Fluorochinolonresistenz.
- Bei in Deutschland isolierten Salmonellen sind im Rahmen dieses Forschungsvorhabens Mutationen in allen QRDR Regionen des *gyrA*, *gyrB* und *parC* Gens sowie Effluxpumpen nachgewiesen worden.
- Um dem Entstehen hochresistenter Salmonellen vorzubeugen, sollen Fluorochinolone nur am Einzeltier und nicht zur Bestandsmedikation eingesetzt werden.

2.4. Literatur zur Chinolonresistenz

1. Bager, F., R. Helmuth. 2001. Epidemiology of resistance to quinolones in *Salmonella*. Vet. Res. 32:285-290.
2. Baucheron S., H. Imberechts, E. Chaslus-Dancla. A. Cloeckert. 2002. The AcrB multidrug transporter plays a major role in high level Fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium phage type 204. Microb. Drug Res. 8:281-289.
3. Guerra, B., B. Malorny, A. Schroeter, R. Helmuth. 2003. Multiple resistance mechanisms in Fluoroquinolone-resistant *Salmonella* isolates from Germany. Antimicrob. Agents Chemother. 47:2059.

4. 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.
5. 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.
6. Malorny B., A. Schroeter, B. Guerra, R. Helmuth. 2003. Incidence of quinolone resistance in veterinary *Salmonella* strains isolated in Germany between 1998 and 2001. Vet. Rec. 153:643-648.
7. 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.
8. Piddock, L.J., D.J. Griggs, M.C. Hall, Y.F. Jin. 1993. Ciprofloxacin resistance in clinical isolates of *Salmonella typhimurium* obtained from two patients. Antimicrob. Agents and Chemother. 37:662-666.
9. Piddock, L.J.V. 2002. Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from human and food animals. FEMS Microbiol. Rev. 26:3-16.
10. Rabsch, W., A. Fruth, H. Tschäpe. 2001. Entwicklung der Fluorochinolone-Resistenz bei Salmonellen. Fleischwirtschaft 12:103-106.
11. Webber, M., L.J. Piddock. 2001. Quinolone resistance in *Escherichia coli*. Vet. Res. 32:275-284.
12. WHO. 2003. Report of the Joint First FAO/OIE/WHO Expert Workshop on non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance: Scientific Assessment, Geneva, 1-5 Dec. <http://www.who.int/foodsafety/micro/meetings/nov2003/en/>

3. Molekularbiologische Charakterisierung multiresistenter Salmonellen

Die molekularbiologischen Untersuchungen konzentrierten sich auf diejenigen Teilaspekte der Antibiotika-Resistenzforschung, die für die Risikobewertung von besonderer Bedeutung sind. Sie dienen der Erfassung neuer und besonders gravierender Resistenzeigenschaften und der Aufklärung von Mechanismen der Resistenzübertragung. Dadurch bilden diese Daten eine wissenschaftlich fundierte Grundlage für Risikomanagementmaßnahmen, die der Verhütung der Entstehung bzw. Ausbreitung von Resistenzen dienen. So standen neben der unter 2. beschriebenen Chinolon- und Fluorochinolonresistenz der Nachweis der häufigsten Resistenzgene bei multiresistenten Erregern und die Erfassung und Charakterisierung von genetischen Elementen, die Multiresistenzen vermitteln, im Vordergrund.

Eine besonders wichtige Rolle bei der Resistenzübertragung und -verbreitung spielen die sogenannten Integrons. Diese kommen besonders häufig in multiresistenten *Salmonella*-Stämmen vor. Sie können entweder auf dem Bakterienchromosom oder auf Plasmiden mit weitem Wirtsbereich (broad host range) lokalisiert und in übertragbare Elemente (Transposons u.ä.) integriert sein. 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 (Carattoli, 2001).

3.1. Nachweis von Resistenzgenen und Integronstrukturen in multiresistenten Salmonellen

In den letzten 10 Jahren konnte auch in Deutschland bei *Salmonella*-Isolaten verschiedener Serotypen von Nutztieren und den daraus resultierenden Lebensmitteln sowie von Futtermitteln und der Umwelt ein Anstieg bzw. ein hohes Niveau der Multiresistenz gegenüber antimikrobiell wirksamen Substanzen nachgewiesen werden (siehe 1., 2. und 3. Zwischenbericht, Abschnitt 1 dieses Berichtes und Tabelle 2).

Umfassende molekularbiologische Untersuchungen zur Charakterisierung multiresistenter *Salmonella*-Stämme aus den Nutztieren Geflügel, Rind und Schwein sowie den daraus resultierenden Lebensmitteln, aus Futtermitteln und der Umwelt gab es in Deutschland bisher nicht. Dabei stellen gerade Antibiotika-resistente Erreger aus diesen Quellen ein hohes Gesundheitsrisiko dar, da sie über die Lebensmittelkette auf den Menschen übertragen werden können (WHO, 2003).

Im Berichtszeitraum wurden 723 multiresistente *Salmonella*-Isolate auf wichtige genotypische Resistenzeigenschaften untersucht. Die Isolate repräsentierten das phänotypische Antibiotikaresistenz-Spektrum aller Isolate eines bestimmten Herkunftsbereiches. Einbezogen wurden 80 Isolate vom Geflügel, 67 Isolate vom Schwein, 176 Isolate vom Rind, 334 Isolate aus Lebensmitteln, 14 Isolate aus Futtermitteln und 52 Isolate aus der Umwelt aus dem Jahr 2001. Die untersuchten Isolate umfassten 27 der in den letzten Jahren am häufigsten vorkommenden *Salmonella*-Serovare.

3.1.1. Resistenzgene in multiresistenten Salmonellen aus Nutztieren, den daraus resultierenden Lebensmitteln, aus Futtermitteln und der Umwelt

Um Aussagen zum Vorkommen spezifischer Resistenzgene und zu den Resistenzmechanismen machen zu können, wurden in den multiresistenten Stämmen (Stämmen mit mehr als einer Resistenzdeterminante) die wichtigsten für die Antibiotika-Resistenz kodierenden Gene identifiziert. 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.

Die Tabelle 14 gibt einen Überblick über die wichtigsten Resistenzgene und Resistenzmechanismen, die im Berichtszeitraum in den untersuchten *Salmonella*-Stämmen nachgewiesen wurden:

In Bezug auf die einzelnen antimikrobiell wirksamen Substanzen können die folgenden Ergebnisse wie folgt zusammengefasst werden:

β -Lactam-Resistenz: Die Resistenz gegenüber β -Lactam-Antibiotika (z.B. Resistenz gegenüber Ampicillin) beruht vorwiegend auf der Wirkung von β -Lactamasen und wird bei Salmonellen vorwiegend durch verschiedene Typen von β -Lactamase-Genen kodiert. z. B. ***pse-1*** und ***tem-1***.

Pse-1 trat in 335 der 522 Ampicillin-resistenten Stämme (64 %) auf. Es wurde in *S. Typhimurium* Stämmen (fast ausschließlich der Phagentypen DT104 und U302) - alle mit den Phänotypen AMP-SMX-(TMP) oder AMP-CHL/FFN-STR/SPE-SMX-TET-(TMP, NAL)-nachgewiesen. *Pse-1* lag immer als Genkassette in einem Class 1-Integron vor.

Tem-1 wurde in 189 der Ampicillin-resistenten Stämme (36 %), die zu 17 *Salmonella* Serovaren gehörten, nachgewiesen, jedoch niemals als Genkassette innerhalb eines Integrons. In einer geringen Anzahl von *S. Typhimurium*-Stämmen konnten sowohl *pse-1* als auch *tem-1* nachgewiesen werden.

In den Ampicillin-resistenten Isolaten vom Geflügel dominierte *tem-1* mit 87 %, während bei Isolaten von Rind und Lebensmitteln *pse-1* mit 92 % und 61 % am häufigsten auftrat. Bei Isolaten von Schwein, Futtermitteln und der Umwelt wurden beide Gene mit etwa gleicher Häufigkeit gefunden.

Das β -Lactamase-Gen *oxa1* trat in keinem Isolat auf.

Chloramphenicol/Florfenicol-Resistenz: Die Resistenz gegenüber Chloramphenicol/Florfenicol wird durch die Produktion sowohl von Chloramphenicol-Acetyltransferasen als auch von Efflux-Proteinen bewirkt.

Das Efflux-Protein-Gen *floR* konnte in 328 der 373 Chloramphenicol-resistenten Stämmen (88 %) nachgewiesen werden. In den Isolaten aller Herkunftsbereiche außer Geflügel war das *floR*-Gen hauptverantwortlich für die Kodierung der Chloramphenicol-Resistenz. Es trat nur in *S. Typhimurium*-Stämmen mit den Phänotypen AMP-CHL/FFN-STR/SPE-SMX-TET-(TMP) oder CHL/FFN-STR/SPE-SMX auf.

Das Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen *catA* konnte in 13 der Chloramphenicol-resistenten Stämme (3 %) nachgewiesen werden. Diese gehörten zu 7 Serovaren. In einem *S. Derby*-Stamm war das Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen *catB2* nachweisbar. Es lag als Genkassette in Kombination mit einer *aadA1a*- und einer *dfrA14*-Kassette in einem Class 1-Integron vor.

In 24 anderen multiresistenten Stämmen wurde *cmIA* als weiteres Efflux-Protein-Gen gefunden. Dieses Gen war mit 65 % besonders häufig in Isolaten vom Geflügel nachweisbar. Es trat in 6 Serovaren auf.

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 kodierenden Gene sind die *aadA*-Gene, z.B. *aadA1a* und *aadA2* für Streptomycin/Spectinomycin, *strA* für Streptomycin, *aphA1* und *kn* für Kanamycin/Neomycin sowie *aac(3)-II*, *aac(3)-IV* und *aadB* für Gentamicin.

AadA-Gene konnten in 518 der 665 Streptomycin-resistenten *Salmonella*-Stämme (78 %) nachgewiesen werden. *AadA*-Gene wurden in den Isolaten aller untersuchten Herkunftsbereiche sehr häufig gefunden (zwischen 61 und 95 %) [Tab. 14]. Sie lagen überwiegend als Genkassetten in Class 1- oder Class 2-Integrans vor.

StrA konnte in 193 der Streptomycin-resistenten *Salmonella*-Stämme (29 %) nachgewiesen werden. In Isolaten vom Geflügel wurde das Gen mit 61 % besonders häufig gefunden.

In 42 der 51 Kanamycin/Neomycin-resistenten Stämme (82 %) war das *aphA1*-Gen nachweisbar, während das *kn*-Gen nur in 8 Stämmen (16 %), die überwiegend vom Geflügel und aus der Umwelt stammten, gefunden wurde.

In den 23 Gentamicin-resistenten Stämmen wurde die Resistenz in acht Fällen durch das *aac(3)-IV*-Gen, in vier Fällen durch das *aadB*-Gen und in einem Fall durch das *aac(3)-II*-Gen, kodiert. Das *aadB*-Gen lag in drei Stämmen in Class 1-Integrans vor. In 11 Stämmen wird die Gentamicin-Resistenz durch andere, bisher nicht identifizierte Resistenzmechanismen hervorgerufen.

Tabelle 14. Vorkommen von Resistenzgenen bei multiresistenten Salmonellen aus Nutztieren (Geflügel: N=80, Schwein: N=67, Rind: N=176), Lebensmitteln (N= 334), Futtermitteln (N=14) und der Umwelt (N=52).

Antimikrob. Substanz (Res. Stämme)	Gen	Geflügel		Schwein		Rind		Lebensmittel		Futtermittel		Umwelt	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Ampicillin* G(46), S(44), R(155), L(234), F(12), U(31)	<i>bla_{TEM}</i>	40	87	25	56,8	12	7,7	90	38,5	6	6/12	16	51,6
	<i>bla_{OXa}</i>	0	<2,2	0	<2,3	0	<0,6	0	<0,4	0	0/12	0	<3,2
	<i>bla_{CARB}</i> (pse)	6	13	21	47,7	143	92,3	144	61,5	6	6/12	15	48,4
Chloramphenicol* G(29), S(24), R(144), L(154), F(6), U(16)	<i>catA</i>	5	17,2	1	4,2	1	0,7	5	3,3	0	0/6	1	1/16
	<i>floR</i>	5	17,2	20	83,3	143	99,3	140	90,9	6	6/6	14	14/16
	<i>cmIA</i>	19	65,5	1	4,2	0	<0,7	4	2,6	0	0/6	0	0/16
	Andere	3	10,3	2	8,3	0	<0,7	5	3,2	0	0/6	1	1/16
Gentamicin* G(8), S(2), R(2), L(10), F(0), U(1)	<i>aac(3)-IV</i>	3	3/8	2	2/2	0	0/2	2	2/10	nd	nd	1	1/1
	<i>aac(3)-II</i>	0	0/8	0	0/2	0	0/2	1	1/10	nd	nd	0	0/1
	<i>aadB</i>	1	1/8	0	0/2	2	2/2	1	1/10	nd	nd	0	0/1
	Andere	5	5/8	0	0/2	0	0/2	6	6/10	nd	nd	0	0/1
		18	90,0	6	6/6	4	4/4	12	12/14	1	1/2	1	1/5
Kanamycin* G(20), S(6), R(4), L(14), F(2), U(5)	<i>Kn</i>	3	15,0	0	0/6	0	0/4	1	1/14	1	1/2	3	3/5
	Andere	0	<5	0	0/6	0	0/4	1	1/14	0	0/2	1	1/5
		60	95,2	38	61,3	151	90,4	231	73,6	10	10/13	28	60,9
Streptomycin* G(63), S(62), R(167), L(314), F(13), U(46)	<i>strA</i>	18	28,6	38	61,3	26	15,6	93	29,6	3	3/13	15	32,6
		32	50,0	38	61,3	155	88,6	206	64,4	7	7/14	23	45,1
Sulfamethoxazol* G(64), S(62), R(175), L(320), F(14), U(51)	<i>sulI</i>	23	36,0	30	48,4	24	13,7	106	33,1	8	8/14	26	51,0
	<i>sulII</i>	17	26,6	1	1,6	0	<0,5	3	0,9	0	<7,1	nd	nd
	<i>sulIII</i>												

Tabelle 14. Fortsetzung Vorkommen von Resistenzgenen bei multiresistenten Salmonellen aus Nutztieren (Geflügel: N=80, Schwein: N=67, Rind: N=176), Lebensmitteln (N= 334), Futtermitteln (N=14) und der Umwelt (N=52).

Antimikrob. Substanz (Res. Stämme)	Gen	Geflügel		Schwein		Rind		Lebensmittel		Futtermittel		Umwelt	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Tetracyclin* G(42), S(58), R(146), L(264), F(10), U(33)	tet(A)	28	66,7	24	41,4	4	2,7	71	26,9	3	3/10	8	24,2
	tet(B)	10	23,8	17	29,3	5	3,4	35	13,4	1	1/10	11	33,3
	tet(G)	5	11,9	20	34,5	138	94,5	140	53,0	6	6/10	14	42,4
	Andere	1	2,4	1	1,7	0	<0,7	18	6,7	0	0/10	0	<3,0
Trimethoprim* G(31), S(19), R(13), L(87), F(5), U(11)	dfrA1 like	24	77,4	12	12/19	3	3/13	64	73,6	3	3/5	7	7/11
	dfrA12	4	13,0	1	1/19	0	0/13	5	5,6	1	1/5	3	3/11
	dfrA17	0	<3,2	0	0/19	0	0/13	0	<1,1	0	0/5	0	0/11
	dfrA7	0	<3,2	0	0/19	0	0/13	0	<1,1	0	0/5	0	0/11
	dfrA14	4	13,0	3	0/19	5	5/13	15	17,2	0	0/5	0	0/11
Andere	0	<3,2	3	3/19	5	5/13	3	3,6	1	1/5	1	1/11	

N: Anzahl der gegen die entsprechende antimikrobielle Substanz resistenten Stämme, in denen das genannte Resistenzgen mittels PCR bzw. Sequenzierung nachgewiesen wurde.

Andere: Zahl der Isolate, die mit den für die betreffende Antibiotika-Klasse genannten Genen keine Reaktion zeigten

nd: nicht getestet

*Ist die Anzahl der Isolate kleiner als 20, werden nur die absoluten Zahlen angegeben

Sulfonamid-Resistenz. Die Resistenz gegenüber Sulfonamiden beruht auf der Wirkung von verschiedenen alternativen Antibiotika-resistenten Varianten der Dihydropteroat-Synthasen im Folsäure-Pathway. Kodierende Gene sind z. B. *sul1* und *sul2*, die auf Plasmiden oder Transposons lokalisiert sind.

Sul1 wurde in 461 der 686 Sulfonamid-resistenten Stämme (67 %) gefunden. Es war besonders häufig in Isolaten vom Rind (88 %) nachweisbar. Das Gen war immer mit Class1-Integron(s) assoziiert.

Sul2 war in 217 Isolaten (32 %) nachweisbar, die vor allem vom Schwein, von Futtermitteln und aus der Umwelt stammten. In den letzten beiden Gruppen war *sul2* sogar häufiger als *sul1* nachweisbar. Das Gen trat nur außerhalb von Integronstrukturen auf. In einigen Stämmen konnten beide Gene gefunden werden.

Sul3, ein neues, bis jetzt nur in *E. coli*-Isolaten vom Schwein beschriebenes Gen, konnte zum erstenmal in *Salmonella* nachgewiesen werden (Guerra et al., 2004a). Das Gen tritt in einem Isolat vom Schwein, 17 Isolaten vom Geflügel und 3 Isolaten aus Geflügelprodukten auf.

Tetracyclin-Resistenz: Die Resistenz gegenüber Tetracyclin wird durch die Efflux-Protein-Gene, z. B. *tet(A)*, *tet(B)* und *tet(G)*, kodiert.

Tet(G) trat in 323 der 553 Tetracyclin-resistenten Isolate auf (58 %). Alle diese Isolate waren *S. Typhimurium*-Stämme mit dem Phänotyp AMP-CHL/FFN-STR/SPE-SMX-TET-(TMP).

In 138 anderen Tetracyclin-resistenten *Salmonella*-Stämmen (25 %) konnte ***tet(A)***, und in 79 weiteren Stämmen) ***tet(B)*** (14 %) nachgewiesen werden. In einigen Stämmen trat sowohl *tet(A)* als auch *tet(B)* auf.

Trimethoprim-Resistenz: Die Resistenz gegenüber Trimethoprim wird durch verschiedene *dfr*-Dihydrofolatreductase-Gene kodiert, die sehr häufig als Genkassetten in Integrons oder auf Plasmiden und Transposons lokalisiert sein können.

In dieser Studie war das Gen ***dfrA1*** in 113 von 166 Trimethoprim-resistenten Stämmen (68 %) nachweisbar. In Isolaten aller Herkunftsbereiche außer Rind war es das am häufigsten nachgewiesene Trimethoprim-kodierende Gen (Geflügel 77 %, Schwein 12/19, Lebensmittel 74 %).

DfrA14 wurde in 27 der Trimethoprim-resistenten Stämme gefunden (20 %). Dabei war es in Isolaten vom Rind das am häufigsten nachgewiesene Trimethoprim-kodierende Gen (5/13.) Mittels Sequenzierung konnte der Nachweis erbracht werden, dass in 18 dieser Stämme das *dfrA14*-Gen in das Streptomycin-Phosphotransferase-Gen *strA* eingefügt worden war, was zu einer funktionellen Inaktivierung der für *strA* codierenden Region führte. In einem *S. Derby* Stamm aus Lebensmitteln lag *dfrA14* als Genkassette in Kombination mit einer *aadA*-Genkassette und einer *catB2*-Genkassette in einem großen Class 1-Integron vor.

DfrA12 trat nur in 14 der Trimethoprim-resistenten Isolate (8 %) auf. Die geringe Nachweis-häufigkeit war für alle Herkunftsbereiche typisch.

Die Gene ***dfrA7*** und ***dfrA17*** waren in keinem Isolat nachweisbar.

In 13 Stämmen (8 %) wird die Trimethoprim-Resistenz durch bisher nicht identifizierte Gene kodiert.

3.1.2. Class 1 und Class 2 Integrons in multiresistenten Salmonellen aus Nutztieren, den daraus resultierenden Lebensmitteln, aus Futtermitteln und der Umwelt

In Salmonellen und anderen *Enterobacteriaceae* wurden bisher Class 1-Integrons am häufigsten nachgewiesen (Guerra et al., 2000, Kwon et al., 2002, Brown et al., 2000, Ridley und

Threlfall, 1998, Sandvang et al., 1998, Cloeckart et al., 2000). Class 1-Integrone enthalten 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) (Stokes und 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 und Hall, 1995).

Die meisten Class 1-Integrone sind in mobilen Transposons, wie Tn21 oder seinen Abkömmlingen, lokalisiert (Liebert et al., 1999, Bass et al., 1999, Villa et al., 2002).

Class 2-Integrone wurden in der Vergangenheit nur in *Acinetobacter baumannii*, *Shigella sonnei* und *E. coli* nachgewiesen, erst ab 2001 werden sie auch in Salmonellen beschrieben (Goldstein et al., 2001, Orman et al., 2002, Miko et al., 2003). Sie sind mit der Tn7-Transposon-Familie assoziiert (Rowe-Magnus und Mazel, 2002, Hansson et al., 2002, Tietze et al., 1987).

Die in der Studie erreichten Ergebnisse bezüglich des Vorkommens von Class 1- und Class 2-Integrone sind in den Tabellen 15 und 16 dargestellt. Die Größe der Integrone (genauer ihrer Amplikone in der PCR) sowie Typ und Anzahl der eingefügten Resistenzgenkassetten bildeten die Grundlage für eine Einordnung in verschiedene Genkassetten-Arrays.

Die Untersuchungen ergaben, dass in 458 (63,3 %) der multiresistenten Salmonellen aller untersuchten Herkunftsbereiche ein bis drei Class 1-Integrone unterschiedlicher Größe und mit den in der Tabelle 15 aufgeführten Genkassetten-Arrays nachgewiesen werden konnten, davon 30 (37,5 %) in Isolaten vom Geflügel, 38 (56,7 %) in Isolaten vom Schwein, 155 (88,1 %) in Isolaten vom Rind, 204 (61,1 %) in Isolaten aus Lebensmitteln, 8 (57,1 %) in Isolaten aus Futtermitteln und 23 (44,2 %) in Isolaten aus der Umwelt. Alle diese Isolate außer einem Futtermittel-Isolat besaßen in ihrem 3' CS-Segment das für Class 1-Integron charakteristische *sul1*-Gen. Vier zusätzliche Isolate, die auch das *sul1*-Gen besaßen, trugen Integrone ohne eingefügte Genkassetten (in Tabelle 15 nicht aufgeführt).

Die Integron-positiven Stämme umfassten die folgenden 15 epidemiologisch bedeutsamen Serovaren: Agona, Anatum, Derby, Enteritidis, Goldcoast, Haifa, Heidelberg, Infantis, Livingstone, London, Muenchen, Paratyphi B dT+, Saintpaul, Schwarzengrund und Typhimurium.

Aus Tabelle 15 ist ersichtlich, dass bestimmte Integron-Typen eine deutliche Serovarspezifität zeigen. So konnten das Integron mit der *pse-1*-Genkassette (1200 bp-Amplikon) und die beiden Integrone mit der *aadA2*- und der *pse1*-Genkassette (1000 bp- und 1200 bp-Amplikon) ausschließlich in Typhimurium-Isolaten und auch dort nur in den Phagentypen DT104 und U302 nachgewiesen werden, während andere Integrone in einer Vielzahl von Serovaren zu finden sind, z. B. das Integron mit der *aadA1a*-Genkassette (1000 bp-Amplikon) in 7 Serovaren und das Integron mit dem *dfrA1-aadA1a*-Genkassettenarray (1600 bp-Amplikon) in 11 Serovaren.

Die hohe Prävalenz des Phagentyps DT104 in *Salmonella*-Isolaten besonders vom Rind, aber auch vom Schwein und aus der Umwelt erklärt den hohen Anteil der 1000/*aadA2* + 1200/*pse1* Integrone in diesen Herkunftsbereichen: 87,7 % beim Rind, 68,6 % bei Lebensmitteln und 44,7 % beim Schwein, dagegen nur 16,7 % beim Geflügel.

Tabelle 15. Class 1-Integrans und Genkassetten-Arrays in *Salmonella*-Stämmen unterschiedlicher Herkunft

Amplikongröße (bp) in Class 1- Integron-PCR	Genkassetten-Array	Lokalisierung	Serovare	Class 1-Integron-positive Stämme											
				Geflügel N=30		Schwein N=38		Rind N=155		Lebensmittel N=204		Futtermittel N=8		Umwelt N=23	
				n	%	n	%	n	%	n	%	n	%*	n	%
1000	<i>aadA1a</i> bzw. <i>aadA2</i>	PI, Chr	Agona, Enteritidis, Goldcoast, Heidelberg, Infantis, Paratyphi B d+, Typhimurium, Derby	5	16,7	7	18,4	11	7,1	22	10,8	0	0/8	1	4,3
1200	<i>pse1</i>	Chr	Typhimurium	1	3,3	1	2,6	5	3,2	3	1,5	0	0/8	1	4,3
1600	<i>[cfrA1-aadA1a]</i>	PI	Anatum, Agona, Enteritidis, Derby, Heidelberg, Livingstone, London, Muenchen, Paratyphi B dT+, Saintpaul, Typhimurium	14	46,7	8	21,0	1	0,6	19	9,3	1	1/8	2	8,7
1700	<i>[aadB-aadA2]</i>	PI	Heidelberg, Typhimurium	1	3,3	0	<2,6	0	<0,6	1	0,5	0	0/8	0	<4,3
1900	<i>[cfrA12-orf-aadA2]</i>	PI	Livingstone, Schwarzengrund, Typhimurium	2	6,6	0	<2,6	0	<0,6	3	1,5	1	1/8	3	13,0
1950	<i>[sat¹-aadA1a]</i>	PI	Haifa, Saintpaul, Derby, Typhimurium	1	3,3	1	2,6	0	<0,6	3	1,5	0	0/8	2	8,7
2200	<i>[cfrA1-nd²-aadA1a]</i>	PI	London	0	<3,3	0	<2,6	0	<0,6	10	4,9	0	0/8	0	<4,3
2200	<i>[cfr2-nd-aadA1a]</i>	PI	Livingstone	0	<3,3	1	2,6	0	<0,6	0	<0,5	0	0/8	0	<4,3
2300	<i>[cfrA14-aadA1-catB2]</i>	PI	Derby	0	<3,3	0	<2,6	0	<0,6	1	0,5	0	0/8	0	<4,3
>2300	nd	PI	Livingstone	0	<3,3	0	<2,6	0	<0,6	1	0,5	0	0/8	0	<4,3
>2300	<i>[aadA2-nd-aadA1a]</i>	PI	Anatum	1	3,3	0	<2,6	0	<0,6	0	<0,5	0	0/8	0	<4,3
650+1200	<i>aadB + pse1</i>	Chr, Chr	Typhimurium	0	<3,3	1	2,6	2	1,3	0	<0,5	0	0/8	0	<4,3
1000 + 1200	<i>aadA2 + pse1</i>	Chr	Typhimurium	5	16,7	17	44,7	136	87,7	140	68,6	6	6/8	14	60,9
1200 + 1600	<i>pse1+ [cfrA1-aadA1a]</i>	Chr, PI	Typhimurium	0	<3,3	1	2,6	0	<0,6	1	0,5	0	0/8	0	<4,3
1000 + 1200 +1600	<i>aadA2 + pse1+ [cfrA1-aadA1a]</i>	Chr, PI	Typhimurium	0	<3,3	1	2,6	0	<0,6	0	<0,5	0	0/8	0	<4,3

¹ *sat* = Genbank Accession No. AY5090896, ² nd = noch nicht bestimmt, PI: Plasmid, Chr: Chromosom

*Aufgrund der wenigen Isolate werden für Futtermittelisolate nur die absoluten Zahlen gezeigt.

Tabelle 16. Class 2-Integrone und Genkassetten-Arrays in *Salmonella*-Stämmen unterschiedlicher Herkunft

Amplikongröße (bp) in Class 2- Integron-PCR	Genkassetten-Array	Lokalisierung	Serovare	Class 2-Integron-positive Stämme					
				Geflügel n=12	Schwein n=0	Rind n=1	Lebensmittel n=33	Futtermitteln n=2	Umwelt n=5
2200	[<i>dfrA1-sat¹-aadA1a-orfX</i>]	Chr	Paratyphi B dT+	12	0	1	32*	2	5
>2200	<i>nd</i>	<i>nd</i>	Typhimurium	0	0	0	1**	0	0

¹ *sat* = Genbank Accession No. M63169

*3 der Stämme enthalten neben dem Class 2-Integron ein Class 1-Integron, je 2 davon generieren ein 1000 bp-Amplikon, das dritte ein 1600 bp-Amplikon in der PCR

**der Stamm enthält neben dem Class 2-Integron ein Class 1-Integron, das in der PCR ein 1600 bp-Amplikon generiert

In 33 der multiresistenten *Salmonella*-Isolate aus Lebensmitteln (9,9 %), in einem Isolat vom Rind (0,6 %) und in 2 Isolaten aus der Umwelt (3,8 %) konnte ein Class 2-Integron (Amplikongröße 2200 bp) nachgewiesen werden (Tabelle 16). In diesen Class 2-Integrans wurde mit einer Ausnahme der gleiche Tn7-related Array aus 3 Resistenzgenkassetten gefunden, nämlich *dfrA1*, *sat* und *aadA1a*, die für die Resistenzen gegen Trimethoprim, Streptothricin und Spectinomycin/Streptomycin kodieren (R-Typ TMP (ST) STR/SPE). Eine vierte Genkassette *orfX* kodiert für ein Protein mit unbekannter Funktion. Die einzige Ausnahme generierte ein größeres Amplikon (größer 2200 bp), dessen exakte Größe unter den verwendeten PCR-Bedingungen nicht ermittelt werden konnte. In 3 Class 2-Integron-Stämmen ließ sich zusätzlich ein Class 1-Integron nachweisen.

Auffällig war, dass Class 2-Integrans (mit einer Ausnahme) nur in *Salmonella* Paratyphi B dT+-Stämmen nachgewiesen werden konnten. Diese Paratyphi B dT+-Stämme waren dem dominierenden Klon in Deutschland zuzuordnen (Miko et al. 2002, 2003).

Bei Geflügel und Futtermitteln wurden daraufhin gezielt nur die *Salmonella* Paratyphi B dT+-Isolate auf Class 2-Integrans untersucht. 32 Geflügel- und 5 Futtermittelisolate erbrachten das o.g. Tn7-related Class 2-Integron, unter den Schweine-Isolaten befand sich kein Paratyphi B dT+.

Die Lokalisation der Class 1-Integrans bzw. der Class 2-Integrans auf Plasmiden und/oder auf dem Chromosom wurde über ein Plasmid-Mapping und ein PFGE (Pulsfeldgelelektrophorese)-Mapping ermittelt. Beim Plasmid-Mapping wurden die Plasmide jedes *Salmonella*-Isolates in einer konventionellen Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und mit Integron-spezifischen Sonden, in der Regel mit Sonden, die auf den Integrasegenen *intI1* bzw. *intI2* basieren, hybridisiert. Ein positives Hybridisierungssignal war der Beweis dafür, dass auf diesem Plasmid das entsprechende Integron lokalisiert ist.

Beim PFGE-Mapping wurde die genomische DNA der *Salmonella*-Isolate mit dem Restriktionsenzym *XbaI* geschnitten und in einer Pulsfeldgelelektrophorese aufgetrennt. Die DNA-Fragmente wurden dann auf eine Nylonmembran transferiert und ebenfalls mit den oben beschriebenen Sonden hybridisiert. Ein positives Hybridisierungssignal bewies die Lokalisation des entsprechenden Integrans auf diesem Fragment/diesen Fragmenten. Für Spezifitätstestungen wurden Resistenzgen-spezifische Sonden eingesetzt.

Die Untersuchungen ergaben, dass die **Class 1-Integrans** der Mehrzahl der in allen Herkunftsbereichen vorkommenden *Salmonella*-Serotypen (Agona, Anatum, Derby, Enteritidis, Goldcoast, Haifa, Heidelberg, Infantis, Livingstone, London, Muenchen, Paratyphi B dT+, Saintpaul, Schwarzengrund und Typhimurium/Non DT104, Non302) auf hochmolekularen, konjugativen **Plasmiden** (Größe zwischen 50 kb und 350 kb) liegen (s. Tabelle 15). Damit stellen sie hocheffektive Vektoren zur horizontalen Übertragung und Ausbreitung von Resistenzgenen dar.

Die Abbildung 5 zeigt das Plasmid-Mapping von 10 repräsentativen *Salmonella*-Stämmen aus dem Geflügel unter Einsatz einer *intI1*-spezifischen Sonde.

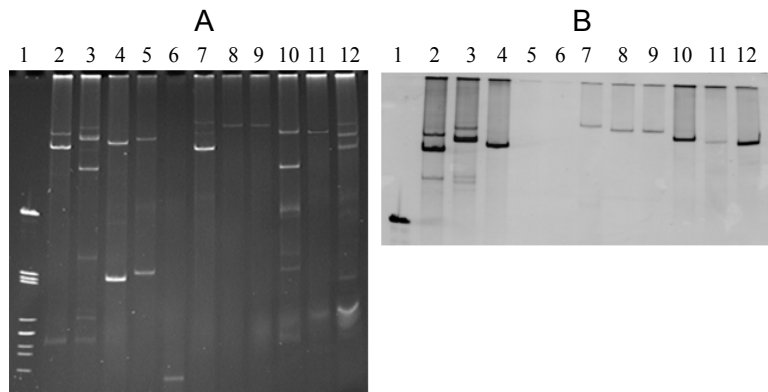


Abbildung 5. Lokalisierung der Class 1- Integrone mittels Plasmid-Mapping

A) Plasmid-Bandenmuster von 10 repräsentativen *Salmonella*-Stämmen aus Geflügel

B) Ergebnis der Southernblot-Analyse mit einer *intI1*-Sonde

Spalte 1, Lambda-*PstI*-Hybridisierungsmarker; Spalten 2-11, repräsentative Class 1-Integron-positive *Salmonella*-Isolate; Spalte 12, Plasmid-Molekulargewichtsmarker R27 (169,7 kb), R1 (93,4), V517 (51,2-1,9).

Bei *Salmonella* Typhimurium-Stämmen der Phagentypen DT104 und U302 dagegen lagen die nachgewiesenen Class 1-Integrone auf dem Chromosom:

-das für den R-Typ AMP SMX typische Class 1-Integron (1200 bp-Amplikon), das die *pse-1*-Genkassette enthält, auf einem *XbaI*-Fragment von 2,5 kb,

-das für den R-Typ SPE/STR SMX typische Class 1-Integron (1000 bp-Amplikon), das die *aadA2*-Genkassette enthält, auf einem *XbaI*-Fragment von ca. 7 kb,

-das für den epidemiologisch bedeutsamen R-Typ AMP CHL/FFN SPE/STR SMX TET charakteristische Gencluster, das beide vorher genannten Class 1-Integrone enthält, auf einem *XbaI*-Fragment von ca. 12 kb.

(Threlfall et al., 1993; Carattoli, 2001; Guerra et al., 2004b).

Die **Class 2-Integrone** wurden in keinem Fall auf Plasmiden nachgewiesen. Es konnte bewiesen werden, dass sie in 2 Kopien ins bakterielle **Chromosom** integriert wurden. Die Abbildung 6 zeigt das PFGE-Mapping von sieben repräsentativen *Salmonella* Paratyphi B dT+-Stämmen aus Geflügel und Geflügelprodukten unter Einsatz einer *intI2*-spezifischen Sonde. Die Class 2-Integrone liegen auf *XbaI*-Fragmenten von ca. 78 kb und ca. 410 kb.

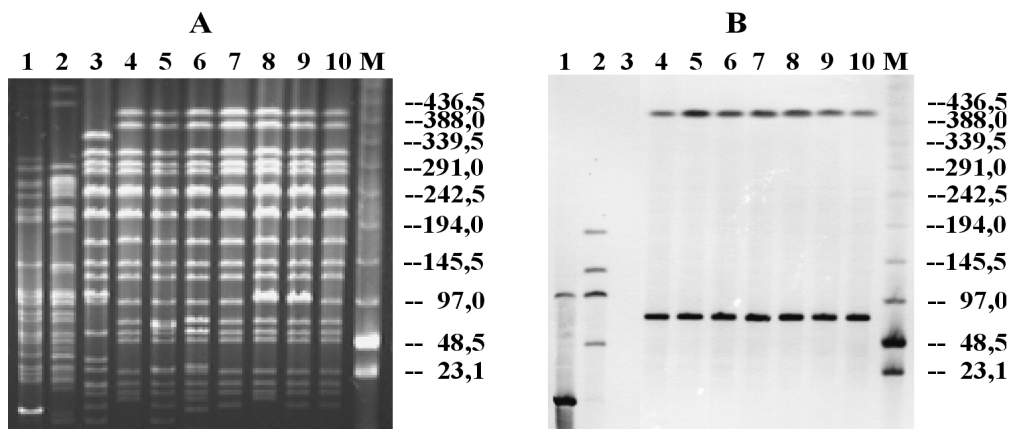


Abbildung 6. Lokalisierung der Class 2- Integrone mittels PFGE-Mapping

A) PFGE-Bandenmuster von 7 repräsentativen *Salmonella* Paratyphi B dT+-Stämmen

B) Ergebnis der Southernblot-Analyse mit einer *intI2*-Sonde

Spalte 1, ColE1::Tn7; Spalte 2, RP4-2; Spalte 3, Integron-negativer Vergleichsstamm; Spalten 4-10, repräsentative Class 2-Integron-positive *Salmonella* Paratyphi B dT+-Stämme; Spalte M, Low-Range PFGE-Marker.

Die in der Studie erreichten Ergebnisse (Miko et al., 2003) unterstützen die Hypothese, dass bei der Entwicklung der Multiresistenz in *d*-Tartrat-positiven *S. Paratyphi B*-Stämmen die Insertion des Class 2-Integron-Transposons Tn7 ins bakterielle Chromosom eine wesentliche Rolle spielte. Die vertikale Transmission innerhalb des Serotyps kann die schnelle Ausbreitung und die Persistenz dieser Resistenz im deutschlandweit dominierenden *d*-Tartrat-positiven *S. Paratyphi B*-Klon erklären.

3.2. Bewertung der molekularbiologischen Eigenschaften von Salmonellen aus Nutztieren, den daraus resultierenden Lebensmitteln, aus Futtermitteln und der Umwelt

- 63 % der getesteten multiresistenten *Salmonella*-Stämme vom Tier (Geflügel, Schwein, Rind), von Lebensmitteln, von Futtermitteln und aus der Umwelt trugen Class 1-Integrone.

Die Prävalenz war besonders hoch bei Isolaten vom Rind (88 %), gefolgt von Isolaten aus Lebensmitteln (61 %), Futtermitteln (57 %), vom Schwein (57 %), der Umwelt (44 %) und dem Geflügel (37 %).

- Die in den *Salmonella*-Isolaten am weitesten verbreiteten Resistenzgene waren:
 - für die Sulfonamid-Resistenz das *sul1*-Gen mit 67 %,
 - für die Streptomycin/Spectinomycin-Resistenz die *aadA*-Gene mit 78 %,
 - für die Tetracyclin-Resistenz das *tet(G)*-Gen mit 58 %,
 - für die Ampicillin-Resistenz das *pse-1*-Gen mit 64 %,
 - für die Chloramphenicol-Resistenz das *floR*-Gen mit 88 %,
 - für die Trimethoprim-Resistenz das *dfrA1*-Gen mit 68 %,
 - für die Kanamycin/Neomicin-Resistenz das *aphA1*-Gen mit 82 %,
 - für die Gentamicin-Resistenz das *aac(3)-IV*-Gen mit 35 %.
- Zwischen den Resistenzeigenschaften der vom Tier und Lebensmitteln stammenden *Salmonella*-Isolate besteht eine hohe Übereinstimmung.
- Die hohe Prävalenz von Integrone in multiresistenten *Salmonella*-Stämmen aller Serotypen und deren Assoziation mit Transposons und konjugativen Plasmiden sollte aufmerksam und kritisch verfolgt werden, da Integrone damit hocheffektive Vektoren sowohl zur horizontalen als auch zur vertikalen Ausbreitung von Resistenzen darstellen.

3.3. Literatur zur molekularbiologischen Charakterisierung

1. Bass, L., C. A. Liebert, M. D. Lee, A. O. Summers, D. G. White, S. G. Thayer, and J. J. Maurer. 1999. Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 43:2925-2929.
2. Brown, A. W., S. C. Rankin, and D. J. Platt. 2000. Detection and characterisation of integrons in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. FEMS Microbiol. Lett. 191:145-149.
3. Carattoli, A. 2001. Importance of Integrons in the Diffusion of Resistance. Veterinary Research 32:243-259.
4. Cloeckert, A., K. S. Boumedine, G. Flaujac, H. Imberechts, I. D'Hooghe, and E. Chaslus-Dancla. 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.
5. Goldstein, C., M. D. Lee, S. Sanchez, C. Hudson, B. Phillips, B. Register, M. Grady, C. Liebert, A. O. Summers, D. G. White, and J. J. Maurer. 2001. Incidence of Class 1 and 2

Integrases in Clinical and Commensal Bacteria from Livestock, Companion Animals, and Exotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:723-726.

6. Guerra, B., S. Soto, S. Cal, and M. C. Mendoza. 2000. Antimicrobial Resistance and Spread of Class 1 Integrons among *Salmonella* Serotypes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:2166-2169.
7. Guerra, B., E. Junker, R. Helmuth. 2004a. Incidence of the recently described sulfonamide resistance gene *sul3* among German *Salmonella enterica* strains from livestock and food origin. *Antimicrob. Agents Chemother.* (Eingereicht).
8. Guerra, B., E. Junker, A. Miko, R. Helmuth, M. C. Mendoza. 2004b. Characterization and location of drug resistance determinants in multidrug-resistant integron-carrying *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains. *Microb. Drug. Res.* 2: (Im Druck).
9. Hansson, K., L. Sundstrom, A. Pelletier, and P. H. Roy. 2002. IntI2 integron integrase in Tn7 J. *Bacteriol.* 184:1712-1721.
10. Kwon, H., T. Kim, S. Cho, J. Seol, B. Kim, J. Hyun, K. Park, S. Kim, and H. Yoo. 2002. Distribution and characterization of class 1 integrons in *Salmonella enterica* serotype Gallinarum biotype Gallinarum. *Vet. Microbiol.* 89:303.
11. Liebert, C. A., R. M. Hall, and A. O. Summers. 1999. Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:507-522.
12. Miko, A., Guerra, B., Schroeter A., Dorn C., Helmuth R. 2002. Molecular characterization of multiresistant d-tartrate positive *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B isolates. *J. Clin Microbiol.* 40:3184-3191.
13. Miko A., Pries K., Schroeter A., Helmuth R. 2003. Multiple-Drug Resistance in D-Tartrate-Positive *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B isolates from poultry is mediated by class 2 integrons inserted into the bacterial chromosome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:3640-3643.
14. Orman, B. E., S. A. Pineiro, S. Arduino, M. Galas, R. Melano, M. I. Caffer, D. O. Sordelli, and D. Centron. 2002. Evolution of multiresistance in nontyphoid *Salmonella* serovars from 1984 to 1998 in Argentina. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:3963-3970.
15. 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.
16. Recchia, G.D., R.M. Hall. 1995. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiol.* 141:3015-3027.
17. Ridley, A. and E. J. Threlfall. 1998. Molecular Epidemiology of Antibiotic Resistance Genes in Multiresistant Epidemic *Salmonella typhimurium* DT 104. *Microbial Drug Resistance* 4:113-118.
18. Rowe-Magnus, D. A. and D. Mazel. 2002. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *Int. J. Med. Microbiol.* 292:115-125.
19. 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 Microbiol. Lett.* 160:37-41.
20. Stokes, H. W., R.M. Hall. 1989. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrations. *Mol. Microbiol.* 3:1669-1683.
21. Sundström, L., P. Radström, G. Swedberg, 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.

22. 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. Epidemiology & Infection 111:189-197.
23. Tietze, E., J. Brevet, and H. Tschäpe. 1987. Relationships among the streptothricin resistance transposons *Tn1825* and *Tn1826* and the trimethoprim resistance transposon *Tn7* Plasmid 18:246-249.
24. Villa, L., P. Visca, F. Tosini, C. Pezzella, and A. Carattoli. 2002. Composite integron array generated by insertion of an ORF341-type integron within a *Tn21*-like element.
25. WHO, 2003. Report of the Joint First FAO/OIE/WHO Expert workshop on non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance: Scientific Assessment , Geneva, 1-5 Dec. <http://www.who.int/foodsafety/micro/meetings/nov2003/en/>

4. Erfassung der Resistenz bei *Escherichia coli*

Die Auswahl von *E. coli*-Stämmen zur Bestimmung der MHK-Werte von 17 antimikrobiell wirksamen Substanzen erfolgte zum größten Teil aus der Datenbank des NRL- *E. coli* des BfRs (früher BgVV Fachgebiet 502 Dessau/Berlin). Sie enthält Daten über die Herkunft, den Serotyp, Biotyp und molekularbiologische Pathogenitätseigenschaften der *E. coli*-Stämme, die an das Fachgebiet zur weiteren Untersuchung von Landesuntersuchungsämtern, Universitäten, Firmen und anderen öffentlichen Einrichtungen eingesandt 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 auf das Jahr 1999 festgelegt. Dabei sollten speziell *E. coli*-Isolate aus Nutztieren (Rind, Schwein, Geflügel) und den daraus resultierenden Lebensmitteln betrachtet werden.

Die Datenbank des Fg. 502 enthält insgesamt 668 Isolate aus dem Jahr 1999 (Bereich Dessau), 700 Isolate aus dem Jahr 2000 (Bereich Dessau), 770 aus dem Jahr 2001 (Bereiche Berlin/Dessau), und 600 aus dem Jahr 2002 (Bereiche Dessau/Berlin). Weitere 12 Stämme wurden von anderen Institutionen bezogen. Tabelle 17 zeigt die Anzahl der zum Resistenzmonitoring ausgewählten Isolate in Bezug auf jede Herkunftskategorie und das Isolationsjahr. Bei der Auswahl wurde darauf geachtet, dass für jede Kategorie repräsentative Isolate und ein möglichst breites Spektrum an Serotypen erfasst wurde. Das Nationale Referenzlabor für *E. coli* übernahm die Überprüfung der eingesandten *E. coli*-Isolate und stellt sie dem Nationalen Referenzlabor für Salmonellen zur Resistenzbestimmung und Charakterisierung zur Verfügung. Insgesamt liegt die Zahl der getesteten *E. coli*-Isolate mit 407 weit niedriger als bei den Salmonellen.

Tabelle 18 gibt den prozentualen Anteil sensibler und resistenter Isolate der Jahre 1999-2002 an. Allerdings lassen sich bezüglich der Inzidenz keine statistisch gesicherten Trends ablesen (Tab. 19). Diese sind jedoch bezüglich der Herkunft der Isolate möglich, wenn man den gesamten Untersuchungszeitraum betrachtet. Die Tabelle 20 gibt den durchschnittlichen Anteil resistenter *E. coli*-Isolate der Jahre 1999-2002, aufgrund der ermittelten MHK Werte, an. Die Isolate vom Schwein und vom Geflügel tragen in statistisch signifikanter Weise besonders zur Resistenzsituation bei den untersuchten *E. coli*-Isolaten bei (Tab. 19). Der hohe Anteil von durchschnittlich 36,6 % multiresistenter Isolate fällt besonders auf. Diese besitzen oft (56 % 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 17. Anzahl der zur Resistenzbestimmung ausgewählten *E. coli* -Isolate für die Jahre 1999-2002

Herkunft/Jahr	1999	2000	2001	2002	Gesamt
Rind	74	57	49	52	232
Schwein	11	21	10	19	61
Geflügel	24	35	36	19	114
Summe	109	113	95	90	407

Tabelle 18. Inzidenz sensibler und resistenter *E. coli*-Isolate

Herkunft	1999		2000		2001		2002									
	S		R		S		R									
	N	%	N	%	N	%	N	%								
Rind	61	82,4	13	17,6	35	61,4	22	38,6	39	79,6	10	20,4	37	71,2	15	28,8
Schwein	4	36,4	7	63,6	8	38,1	13	61,9	5	50	5	50	3	15,8	16	84,2
Geflügel	7	29,2	17	70,8	15	42,8	20	57,1	15	41,7	21	58,3	8	42,1	11	57,9
Total	72	66,1	37	33,9	58	51,3	55	48,7	59	62,1	36	37,9	48	53,3	42	46,7

S: sensible Isolate; R: resistente Isolate

Tabelle 19. Vergleich der Konfidenzintervalle der resistenten Isolate

Herkunft	95 % Konfidenzintervall				
	1999	2000	2001	2002	1999-2000
Rind	[8,9-26,2]	[26,0-51,2]	[9,1-31,7]	[16,5-41,2]	[3,6-11,5]
Schwein	[35,2-92,1]*	[41,1-82,7]	[19,0-81,0]*	[67,8-100]	[44,1-85,9]
Geflügel	[52,6- 89]	[40,7-73,5]	[42,2-74,4]	[35,7-80,1]	[15,6-42,1]
Total	[25,1-42,8]	[39,5-57,9]	[28,1-47,7]	[36,4-57]	[2,6-8,4]

*: Keine statistisch signifikante Aussagen möglich.

Tabelle 20. Prozentualer Anteil resistenter *E. coli*-Isolate über den ganzen Untersuchungszeitraum

Herkunft	Untersuchte Isolate	Sensitiv		Resistent *		Einfach resistent		Mehrfach resistent	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Rind	232	172	74,1	60	25,9	9	3,9	51	22,0
Schwein	61	20	33,0	41	67,2	3	4,9	38	62,3
Geflügel	114	45	39,5	69	60,5	9	7,9	60	52,6
Total	407	237	58,2	170	41,8	21	5,2	149	36,6

*: Ohne Stämme mit intermediären-Resistenzwerten.

Tabelle 21. Prozentualer Anteil resistenter *E. coli*-Isolate verschiedener Herkünfte

Antimikrobielle Substanz	Rind (N =232) ¹	Schwein (N =61) ¹	Geflügel (N =114) ¹	Gesamt (N =407) ¹
Ampicillin	8,2	36,1	35,1	20,0
Amoxicillin/ Clavulansäure	2,2	<1,6	2,6	2,0
Ceftiofur	<0,4	<1,6	<0,9	<0,2
Chloramphenicol	3,4	26,2	10,5	8,8
Ciprofloxacin (MHK ≥ 4 µg/ ml)	<0,4	1,6	14,0	4,2
(MHK 0.12-2 µg/ ml)*	1,3	4,9	18,4	6,6
Colistin	0,4	<1,6	0,9	0,5
Florfenicol	<0,4	1,6	<0,9	>0,2
Gentamicin	0,4	4,9	4,4	2,2
Kanamycin	5,2	16,4	15,8	9,8
Nalidixinsäure	1,3	6,6	32,5	11
Neomycin	5,2	16,4	15,8	9,8
Sulfamethoxazol	16,8	52,5	50,0	31,4
Spectinomycin	8,6	41,0	18,4	16
Streptomycin	20,7	55,7	39,5	31
Sulfamethoxazol/ Trimethoprim	3,4	18,0	23,7	11
Tetracyclin	14,2	50,8	45,6	29
Trimethoprim	3,4	19,7	24,6	12

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

*:Reduzierte Empfindlichkeit

Tabelle 21 zeigt den Anteil resistenter Isolate gegenüber den einzelnen antimikrobiell wirksamen Substanzen. Auffällig ist, dass beim Geflügel bereits ein Drittel (32,5 %) der Isolate eine Nalidixinsäureresistenz zeigen (95 % KI [24-41]). In Bezug auf die Ciprofloxacinresistenz weisen 18,4 % der Isolate eine reduzierte Empfindlichkeit und 14 % einen MHK Wert von über 4 µg/ml auf. Somit liegt bereits heute die Ciprofloxacinresistenz bei den *E. coli*-Isolaten vom Geflügel bedenklich hoch.

4.1. Bewertung der Situation bei *E. coli*

- 42 % der untersuchten *E. coli* sind resistent wovon 37 % mehrfach resistent sind.
- Isolate vom Geflügel und Schwein weisen mit 61 % bzw. 67 % höhere Prävalenzen resistenter Isolate als Isolate vom Rind auf (χ_2 , p<0,01).
- 33 % der Geflügel Isolate sind Chinolon resistent (95 % KI [24-41]) und weisen eine verminderte Empfindlichkeit (18,4 %) bzw. Resistenz (14 %) gegen Fluorochinolone 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 über die vorherrschenden Resistenzmechanismen machen zu können, war es eines der Ziele dieses Projekts, die wichtigsten Resistenzgene zu identifizieren. Dazu wurden PCR- und Gensonden-Techniken etabliert und geeignete Primer ermittelt. Die bisher eingesetzten Primer, ihre Zielgene und die PCR-Bedingungen können im NRL-Salm abgefragt werden. Zur Spezifitätstestung werden außerdem Sequenzierungen durchgeführt.

Dazu wurden alle 170 resistenten *E. coli*-Stämme auf 25 unterschiedliche Gene, die für die Resistenz gegen antimikrobielle wirksame Substanzen verantwortlich sind, untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 22 zusammengefasst.

Es zeigte sich, dass bei den meisten Resistenzen bekannte Gene dominierten. Allerdings trugen einige Stämme mehr als ein Resistenzgen und bei einigen Stämmen konnten die Resistenzgene bisher nicht identifiziert werden. Diese könnten bisher unbekannte Resistenzdeterminanten tragen.

Im Bezug auf die einzelnen antimikrobiell wirksamen Substanzen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

β-Lactam-Resistenz:

Tem-1 wurde in 78 der Ampicillin-resistenten *E. coli*-Stämme (96,3 %) nachgewiesen. Dagegen wurde dieses Gen in Salmonellen nur in Isolaten vom Geflügel (87 %) und vom Schwein (56,8 %) mit hoher Frequenz gefunden. Das Gen **oxa-1**, das bei *Salmonella*-Isolaten nie auftrat, wurde in zwei *E. coli*-Stämmen gefunden. Es lag in beiden Stämmen in einem Class 1-Integron vor. Das β-Lactamase-Gen **pse-1**, das sehr häufig bei Salmonellen vom Phagentyp DT104 auftrat, konnte in *E. coli*-Isolaten nicht nachgewiesen werden.

Chloramphenicol-Resistenz:

Das Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen **catA** konnte in 28 der Chloramphenicol-resistenten Stämme (73,7 %) nachgewiesen werden. In zwei Stämmen war das Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen **catB3** nachweisbar. Es lag als Genkassette in Kombination mit einer *dfrA1*- und einer *aadA1a*-Kassete in einem Class 1-Integron vor. In 14 anderen multiresistenten Stämmen wurde **cmIA** als weiteres Efflux-Protein-Gen gefunden (13 %). Das Efflux-Protein-Gen **floR**, das sehr häufig bei Salmonellen vom Phagentyp DT104 auftrat, konnte in keinem *E. coli*-Isolat nachgewiesen werden.

Aminoglycosid-Resistenz:

StrA konnte in 83 der 133 Streptomycin-resistenten *E. coli*-Stämme (62,4 %) nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu wurde dieses Gen in Salmonellen nur in Isolaten vom Geflügel häufig gefunden (61 %). **AadA**-Gene, die in Salmonellen sehr häufig vorkamen (78 %), konnten in 79 Streptomycin-resistenten *E. coli*-Stämme (59,4 %) nachgewiesen werden. Sie lagen überwiegend als Genkassetten in Class 1-Integrans vor.

In allen 40 Kanamycin/Neomycin-resistenten Stämmen war das **aphA1**-Gen nachweisbar, während das in *Salmonella*-Isolaten auch gefundene **kn**-Gen in keinem der *E. coli*-Isolate auftrat.

In den 9 Gentamicin-resistenten Stämmen wurde die Resistenz in fünf Fällen durch das **aac(3)-IV**-Gen kodiert. Das Gen **aadB** trat nie auf. In vier Stämmen wird die Gentamicin-Resistenz durch andere, bisher nicht identifizierte, Resistenzmechanismen hervorgerufen.

Sulfonamid-Resistenz:

Anders als in Salmonellen, trat das Gen **sul2** häufiger als das Gen **sul1** auf. **Sul2** wurde in 85 der 128 Sulfonamid-resistenten Stämmen (66,4 %) gefunden. Das Gen trat nur außerhalb von Integronstrukturen auf und immer im Tandem mit einem zweiten Gen, **strB**. **Sul1** war dagegen in 54 Isolaten (42,2 %) nachweisbar. Das Gen war immer mit Class 1-Integrans assoziiert. In einigen Stämmen konnten beide Gene nachgelesen werden. Das neue Gen **sul3** war in 13 Stämmen nachweisbar (13 %).

Tetracyclin-Resistenz:

Tet(A) konnte in 76 der 116 Tetracyclin-resistenten *E. coli*-Stämme (65,5 %) nachgewiesen werden, und **tet(B)** in 48 Stämmen (41,4 %). In einigen Stämmen trat sowohl **tet(A)** als auch **tet(B)** auf. **Tet(G)**, das sehr häufig bei Salmonellen vom Phagentyp DT104 gefunden wird, trat in keinem *E. coli*-Isolat auf.

Trimethoprim-Resistenz:

In dieser Studie war das Gen **dfrA1** in 34 von 48 Trimethoprim-resistenten Stämmen (71 %) nachweisbar. Vergleichbare Nachweis-Frequenzen sind auch bei *Salmonella*-Isolaten beschrieben worden. Die Palette an **dfrA**-Genen in den getesteten *E. coli*-Isolaten war größer als die in Salmonellen nachgewiesen. So wurden **dfrA17**, **dfrA12**, **dfrA14**, und **dfrA7** in Frequenzen von 10,4 bis 4,2 % nachgewiesen. Viele dieser Gene lagen in unterschiedlichen Class 1-integrans vor.

5.2. Integronstruktur bei resistenten *E. coli*

In multiresistenten *E. coli*-Stämmen von Mensch und Tier werden häufig Integrans 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. Diesen Integrans 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 alle 170 resistenten *E. coli*-Stämme der Jahre 1999-2002 auf Integronstrukturen und die mit Integrans assoziierten **sul1** (verantwortlich für die Resistenz gegenüber Sulfonamiden) und **qacEΔ1**-Gene (verantwortlich für die Resistenz gegenüber quarternären Ammoniumverbindungen) untersucht. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Insgesamt tragen 54 (32 %) der resistenten *E. coli*-Stämmen Class 1-Integrans. In Bezug zu ihren unterschiedlichen Größen und unterschiedlichen Resistenzgenkassetten konnten 8 Integrontypen (IT) definiert werden (Tabelle 23). Nicht alle der Integron tragenden Stämme trugen die **sul1**- und **qacEΔ1**-Gene.

Tabelle 22. Vorkommen von Resistenzgenen bei *E. coli*-Isolaten.

Antimikrobielle Substanz (N. Resistente Stämme)	Gen*	N	%
Ampicillin n=81	<i>bla</i> _{TEM}	78	96,3
	<i>bla</i> _{OXA}	2	2,5
	<i>bla</i> _{CARB}	0	<1,2
Chloramphenicol n=38	<i>catA</i>	28	73,7
	<i>floR</i>	0	<2,6
	<i>cmlA</i>	14	13,1
Gentamicin n=9	<i>aac(3)-IV</i>	5	55,6
	<i>aac(3)-II</i>	0	<11,1
	<i>aadB</i>	0	<11,1
	Andere	4	44,4
Kanamycin n=40	<i>aphA1</i>	40	100
	<i>Kn</i>	0	<2,5
Streptomycin n=133	<i>aadA</i>	79	59,4
	<i>strA</i>	83	62,4
	<i>strB</i>	83	62,4
Sulfamethoxazol n=128	<i>sul1</i>	54	42,2
	<i>sul2</i>	85	66,4
	<i>sul3</i>	17	13,3
Tetracyclin n=116	<i>tet(A)</i>	76	65,5
	<i>tet(B)</i>	48	41,4
	<i>tet(G)</i>	0	<0,8
Trimethoprim n=48	<i>dfrA1 like</i>	34	70,8
	<i>dfrA12</i>	4	8,3
	<i>dfrA17</i>	5	10,4
	<i>dfrA7</i>	2	4,2
	<i>dfrA14</i>	4	8,3

N.- Anzahl der Stämme

Tabelle 23. Integronstrukturen und Resistenz-Genkassetten in *E. coli*-Stämmen

Integron Profile	Amplicongröße in Integron-PCR	Genkassetten	Lokalisierung	N. Stämme N=54*	Herkunft der Stämme (Anzahl)
IT-I	1000 bp	<i>aadA1a</i>	Chromosom, Plasmid	18	G(10), S(6), R(2)
IT-II	1600 bp	<i>dfrA1-aadA1a</i>	Chromosom, Plasmid	20*	G(13), S(3), R(4)
IT-III	1900 bp	<i>sat1-aadA1a</i>	Plasmid	6	S(3), R(3)
IT-IV	1700 bp	<i>dfrA17-aadA5</i>	Chromosom, Plasmid	5	G(4), S(1)
IT-V	2000 bp	<i>oxa1-aadA1a</i>	Chromosom, Plasmid	2*	R(2)
IT-VI	2300 bp	<i>dfrA1-catB3-aadA1a</i>	Plasmid	2	S(2)
IT-VII	1850 bp	<i>dfrA12-aadA2</i>	Plasmid	1	S(1)
IT-VIII	1500 bp	<i>dfrA14-aadA6</i>	Chromosom	1	S(1)

* Ein Stamm trägt 2 integrons: 1600 bp und 2000 bp.

G: Geflügel, S: Schwein, R: Rind.

Aus Tabelle 23 ist ersichtlich, dass zwei Integron-Typen (IT-II und IT-I) am häufigsten vorkamen (37 und 33%). Allgemein traten in *E. coli*-Isolaten weniger Integron-Typen auf als in den untersuchten *Salmonella*-Isolaten. Vier der in *E. coli*-Isolaten nachgewiesenen Class 1-Integrone (mit den Genkassetten *dfrA1a-aadA1a*, *aadA1a*, *sat1-aadA1a*, und *dfrA12-aadA2*) traten auch in den *Salmonella*-Isolaten auf, während die anderen nur in *E. coli*-Isolaten nachweisbar waren. Die *Salmonella* Typhimurium-spezifischen Integrone mit den 1000/*aadA2* und 1200/*pse1*-Genkassetten wurden in *E. coli* nicht nachgewiesen.

5.3. Bewertung der molekularbiologischen Eigenschaften bei *E. coli*

- Die Resistenzdeterminanten von *E. coli* und Salmonellen weisen teilweise große Unterschiede auf.
- Nahezu ein Drittel der getesteten resistenten *E. coli*-Stämme tragen Integrone (95 % KI [24,8-38,8]).
- Die in den *E. coli*-Isolaten am weitesten verbreiteten Resistenzgene waren:
 - für die Sulfonamid-Resistenz das *sul2*-Gen mit 66 %,
 - für die Streptomycin/Spectinomycin-Resistenz das *strA*-Gen mit 62 %,
 - für die Tetracyclin-Resistenz das *tet(A)*-Gen mit 66 %,
 - für die Ampicillin-Resistenz das *tem-1*-Gen mit 96 %,
 - für die Chloramphenicol-Resistenz das *catA*-Gen mit 74 %,
 - für die Trimethoprim-Resistenz das *dfrA1*-Gen mit 71 %
 - für die Kanamycin/Neomycin-Resistenz das *aphA1*-Gen mit 100 %
 - für die Gentamicin-Resistenz das *aac(3)-IV*-Gen mit 56 %
- Die hohe Prävalenz von Integrone in resistenten *E. coli*-Stämmen sollte aufmerksam und kritisch verfolgt werden, da Integrone sehr effektive Vektoren zur Ausbreitung von Resistenzen darstellen.

5.4. Molekularbiologische Charakterisierung der Chinolonresistenz bei *E. coli*

Der Anteil Nalidixinsäure resistenter *E. coli* betrug 11 % (44 Stämme). Der Anteil Ciprofloxacin resistenter Stämme lag bei 4 % (17 Stämme) und 7 % (27 Stämme) wiesen eine reduzierte Empfindlichkeit gegen Ciprofloxacin auf. Im Rahmen der Arbeit wurden die QRDR Regionen des *gyrA* und *parC* Gens der 44 Chinolon resistenten (Nalidixinsäure - resistenten) *E. coli*-Isolaten sequenziert. Auffallend war, dass 37 der 44 Stämme (84 %) vom Geflügel/Geflügelprodukte isoliert wurden. Tabelle 24 gibt eine Zusammenfassung der erhaltenen Ergebnisse. Es wurden verschiedene Mutationen gefunden, die zur Chinolonresistenz, Fluorochinolon-Resistenz bzw. reduzierten Empfindlichkeit gegenüber Ciprofloxacin führten. Doppelmutationen in der QRDR Region an Position 83 und 87 des *gyrA* Gens, zusammen mit Einzelmutationen in *parC*, die für eine hohe Ciprofloxacin Resistenz verantwortlich sind, sind in 17 Isolaten gefunden worden. Sechzehn davon waren Stämme aus Geflügel und Geflügelprodukten. Die restlichen 21 Geflügel Isolaten hatten bereits eine Einzelmutation in *gyrA* und eine reduzierte Empfindlichkeit gegen Ciprofloxacin.

Tabelle 24. Zusammenhang zwischen MHK Wert gegenüber Nalidixinsäure und Ciprofloxacin und Mutationen in der QRDR Region von *gyrA* und *parC*.

MHK (µg/ml)		Aminosäureaustausch in der QRDR			Stämme (N = 44)		Herkunft (Anzahl Stämme)
Nal	Cip	<i>gyrA</i>		<i>parC</i>	Anzahl	%	
32	0,12	Ala83	-	-	1	2,3	G
64	0,12	-	Gly87	-	2	4,5	S
64	0,25-0,5	Leu83	-	-	4	9,0	G
>= 128	0,12-0,25	-	Asn87	-	2	4,5	G, R
>= 128	0,25-0,5	Leu83	-	-	16	36,4	G (14), R (1), S(1)
> 128	1,0	Leu83	-	-	1	2,3	G
> 128	2,0	Leu83	-	Ile80	1	2,3	R
> 128	4	Leu83	Asn87	Arg80	2	4,5	G
> 128	>4	Leu83	Asn87	Ile80	12	27,3	G (11), S (1)
> 128	>4	Leu83	Tyr87	Ile80	3	6,9	G

Sensible Stämme: Ser83 Asp87 Ser80 (Nal MHK<32,
Cip MHK<0,12)

QRDR: Chinolon Resistenz Region

G: Geflügel, S: Schwein, R: Rind

-: Keine Veränderung, Identisch mit sensiblen Stämmen.

5.5. Bewertung zur molekularbiologische Charakterisierung der Chinolonresistenz bei *E. coli*

- Die Chinolonresistenz der untersuchten *E. coli*-Stämme ist bei Isolaten vom Geflügel im Vergleich zu anderen Nutztierarten statistisch signifikant höher (84 % der Chinolon resistenten Stämme sind Isolate vom Geflügel, 95 % KI [73,3-94,4]. Das belegt, dass die im Rahmen der Bestandsmedikation oral verabreichten Fluorochinolone einen hohen Selektionsdruck ausüben.
- Der Test auf Nalidixinsäureresistenz erweist sich als guter Frühindikator für eine beginnende Fluorochinolon Resistenz.

- Einzelmutationen in der QRDR Region des *gyrA* Gens oder eine Einzelmutation im *gyrA* Gen und eine Einzelmutation im *parC* Gen bewirken eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Fluorochinolonen.
- Doppelmutationen in der QRDR des *gyrA* Gens zusammen mit einer Einzelmutation im *parC* Gen bewirken eine hohe Fluorochinolon-Resistenz.

6. Im Rahmen des Forschungsvorhabens verfasste Veröffentlichungen

1. Bager, F., R. Helmuth. 2001. Epidemiology of resistance to quinolones in *Salmonella*. *Vet. Res.* 32: 285-90.
2. Helmuth, R., C. Dorn, B. Malorny, A. Miko, B. Guerra, A. Schroeter. 2002. Resistenzsituation von Salmonellen in Geflügel und Geflügelprodukten. In: Tagung der Fachgruppe "Geflügelkrankheiten". S.25-31. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e. V. DVG Service GmbH. Gießen, Germany.
3. Helmuth R., A. Miko, B. Guerra, C. Dorn, A. Schroeter. 2002. Characterization of *d*-Tartrate positive *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B isolates from German Poultry. Proc. of the 3rd Int. Symposium *Salmonella* and salmonellosis. Ploufragan, France.
4. Guerra B., S. Soto, E. Junker, A. Miko, R. Helmuth, M. C. Mendoza. 2002. Molecular Characterization of Multidrug Resistant (MDR) strains related to *Salmonella* serotype Typhimurium. Proc. of the 3rd Int. Symposium *Salmonella* and salmonellosis. Ploufragan, France.
5. Guerra, B., S. Soto, R. Helmuth, M. C. Mendoza. 2002. Characterization of a self-transferable plasmid from *Salmonella* serotype Typhimurium clinical isolates carrying two integron-borne gene cassettes together with virulence and drug-resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:2977-2981.
6. Miko, A., B. Guerra, A. Schroeter, C. Dorn, R. Helmuth. 2002. Molecular characterization of multiresistant *d*-tartrate positive *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B isolates. *J. Clin. Microbiol.* 40:3184-3191.
7. Maidhof, H., B. Guerra, S. Abbas, H.M. Elshekia, T. S. Whittam, L. Beutin. 2002. A multiresistant clone of Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) O118:[H16] is spread in cattle and humans over different countries of Europe. *Appl. Environm. Microbiol.* 68: 5834-5842.
8. Malorny, B., A. Schroeter, C. Bunge, R. Helmuth. 2002. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 prophage-like sequences among German *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage types and their use in detection of phage type DT104 by the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 87:253-65.
9. Miko, A., K. Pries, A. Schroeter, R. Helmuth. 2003. Multiple-Drug Resistance in *D*-Tartrate-Positive *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B isolates from poultry is mediated by class 2 integrons inserted into the bacterial chromosome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:3640-3643.
10. Guerra, B., B. Malorny, A. Schroeter, R. Helmuth. 2003. Multiple resistance mechanisms in German Fluoroquinolones *Salmonella* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:2059.
11. Guerra B, E. Junker, A. Schroeter, B. Malorny, S. Lehmann, R. Helmuth. 2003. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from livestock and food. *J. Antimicrob. Chemother.* 52:489-492.
12. Malorny B, A. Schroeter, B. Guerra, R. Helmuth. 2003. Incidence of quinolone resistance in veterinary *Salmonella* strains isolated in Germany between 1998 and 2001. *Vet. Rec.* 153:643-648.
13. Guerra, B., E. Junker, A. Miko, R. Helmuth, M.C. Mendoza. 2004. Characterization and location of drug resistance determinants in multidrug-resistant integron-carrying *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains. *Microb. Drug. Res.* 2: (Im Druck).
14. Guerra, B., E. Junker, R. Helmuth. Incidence of the recently described sulfonamide resistance gene *sul3* among German *Salmonella enterica* strains from livestock and food origin. *Antimicrob. Agents Chemother.* (Eingereicht).

7. Danksagung

Wir danken speziell Frau Pries, Herrn Hoog und Herrn Junker für die exzellente technische Assistenz und allen anderen Mitarbeitern des NRL-Salm für ihre Unterstützung. Den Mitarbeitern/innen des NRL-E sei für die gute Kooperation und Unterstützung gedankt. Frau Zimmermann (WK) und ihren Mitarbeitern danken wir für die administrative Betreuung des FVs. Frau Sommerfeld (AG-Epi der Fg8) danken wir für die Beratung und Betreuung der statistischen Auswertung und Frau Schulze (5) für die engagierten Schreibarbeiten.
