

# Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)

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

Dritter Zwischenbericht des Forschungsprojektes vom 11. Februar 2003

Helmuth, R., Guerra, B., Malorny, B., Miko, A., Schroeter, A.  
Nationales Referenzlabor für Salmonellen (NRL-Salm)

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

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 bestimmt. 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 und E. coli Isolaten, sondern gestattet es auch, die zeitliche Entwicklung der Resistenz bei Isolaten bestimmter Herkünfte wie z. B. Rind, Schwein oder Geflügel zu verfolgen. Da hier im Gegensatz zur Agardiffusion mehrere Konzentrationen des Wirkstoffs geprüft werden, sind die möglichen Angaben quantitativ und folglich viel präziser und aussagekräftiger. Die Auswahl der zu prüfenden antimikrobiellen Substanzen und deren Konzentrationen erfolgte nach den Vorgaben der ARBAO-Arbeitsgruppe der EU (Antibiotic Resistance in Bacteria of Animal Origin, FAIR PL 97 3654) und in enger Abstimmung mit dem Danish Veterinary Institute (DVI, Dänemark) und dem Veterinärlabor des britischen Ministry for Agriculture Fisheries and Food in Weybridge.

Die Mikrodilutionsmethode wird nach einem international häufig angewandten Verfahren (NCCLS M31-A, Juni 1999) durchgeführt. Die verwendeten Grenzwerte zur Beurteilung der Empfindlichkeit sind den NCCLS-Vorschriften M31-A und M7-A5 und DANMAP 2000 entnommen.

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

Die Tabelle 1 gibt für die Jahre 2000 bis 2002 den Anteil resistenter Isolate aufgrund der ermittelten MHK Werte an. In den Jahren 2000/ 2001/ 2002 waren 78,9 % / 65,9 % / 45,2 % der untersuchten Salmonella Isolate im NRL-Salm einfach bzw. mehrfach resistent. Die Isolate vom Schwein und vom Rind/Kalb tragen besonders zur gegenwärtigen Resistenzsituation bei, obwohl auch bei diesen Isolaten der Anteil resistenter Isolate im Jahr 2002 im Vergleich zu den vorherigen Jahren abnahm. Dies korreliert mit der prozentualen Abnahme des Lysotyps DT104 (Tabelle 2) bei beiden Tierarten, der sich durch eine chromosomal kodierte Fünf- bzw. Mehrfachresistenz auszeichnet. Vor allem diese hochresistenten DT104 Isolate

des Serovars *Salmonella* Typhimurium tragen wesentlich zu dem hohen Anteil multiresistenter Isolate, von durchschnittlich 36,1 % aller untersuchten Isolate, bei. Zu dieser Fünffachresistenz (gegen Ampicillin AMP, Chloramphenicol CHL, Streptomycin/ Spectinomycin [STR-SPE], Sulphonamiden SU und Tetracyclin TET) können weitere Resistenzen hinzu kommen. Nachgewiesen wurden Resistenzen gegenüber Sulfamethoxazol SMX, Sulfamethoxazol/Trimethoprim SXT, Trimethoprim TMP, Florfenicol FFN, Nalidixinsäure NAL, Amoxicillin/ Clavulansäure AUG2, Kanamycin KAN und Neomycin NEO.

Insgesamt ist der Anteil von DT104 Isolaten im Jahr 2002 auf gut 39 % gesunken (2001 lag er bei 45 %). Auffällig ist aber, dass sich sein prozentuales Vorkommen bei Isolaten vom Fleisch und Geflügel im Vergleich zum Jahr 2001 kaum verändert hat. Beim Rind dagegen sank der Anteil von vormals fast 88 % auf jetzt 52 % und auch beim Schwein von 62 % auf 55 %. Der beim Fleisch von Nutztieren nachgewiesene Anteil von 42 % im Jahr 2002 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 8 der 589 DT104 Isolate (1,5 %) noch sensibel gegenüber den 17 getesteten Substanzen sind.

Die im Jahre 2002 festgestellte Veränderung der Gesamtresistenzlage gegenüber 2001 von 66 % auf 45 % beruht hauptsächlich auf dem Rückgang der Anzahl einfach resistenter Isolate (Tabelle 1). Der Anteil multiresistenter Isolate sinkt nur um ca. 4 % und ist mit über 36 % aller getesteten Salmonellen immer noch bemerkenswert hoch. Bei den einfach resistenten Isolaten betrifft der Rückgang vor allem die Resistenz gegenüber Sulfamethoxazol.

Die Isolate vom Geflügel zeigen zum Teil andere Resistenzmuster als die vom Rind und Schwein. Auffällig ist aber auch hier die chromosomal kodierte 5-fach Resistenz, die besonders häufig bei Isolaten vom Schwein und Rind nachweisbar ist (siehe auch Beitrag zu den molekularbiologischen Untersuchungen in diesem Bericht). Diese verschiedenen Substanzklassen antimikrobiell wirksamer Substanzen können folglich für die Therapie nicht mehr eingesetzt werden. Hingewiesen werden muss bei Isolaten vom Geflügel auch auf die mit über 20 % zugenommene Resistenz gegenüber Quinolonen (Nalidixinsäure), die jetzt einen Wert von 27,3 % erreicht. Beteiligt sind daran zu gleichen Teilen die Isolate von Puten und Hühnern.

### 1.1. Bewertung der Situation bei Salmonellen

- Trotz einer Abnahme von 75,4 % im Jahre 2001 auf 56 % (935/ 1665) liegt die Resistenzrate bei den Salmonellen aus Lebensmittel liefernden Tieren (Rind, Schwein, Geflügel) 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* DT104 mit 52 bzw. 55 % bei den Nutztierarten Rind und Schwein vor.
- Bei dem Lysotyp DT 104 des Serovars *Salmonella* Typhimurium sind 94,6 % (210/222) der vom Rind und 95,7 % (112/117) der vom Schwein stammenden Isolate mindestens fünffach resistent.
- Der Anteil Chinolon resistenter Isolate vom Geflügel liegt bei 27 % und hat damit um 20 % zugenommen. Die Fluorochinolonresistenz liegt bei 0,6 %.

## 2. Molekularbiologische Charakterisierung multiresistenter Salmonellen

Die molekularbiologischen Untersuchungen konzentrierten sich auch im Jahr 2002 auf wichtige Teilaspekte der Antibiotika-Resistenzforschung. Diese Untersuchungen dienen sowohl der Erfassung neuer und besonders gravierender Resistenzeigenschaften als auch der Erforschung von Mechanismen der Resistenzübertragung bei Salmonellen und bilden die Grundlage für Maßnahmen zur Verhütung der Entstehung bzw. Ausbreitung von Resistenzen. So stehen auch in diesem Berichtszeitraum neben dem Nachweis der häufigsten Resistenzgene bei multiresistenten Erregern die Erfassung und Charakterisierung von genetischen Elementen, die Multiresistenzen vermitteln (Integrone und Transposons) im Vordergrund.

### 2.1. Nachweis von Resistenzgenen und Integronstrukturen in multiresistenten Salmonellen

In den letzten 10 Jahren konnte auch in Deutschland bei *Salmonella* Isolaten verschiedener Serotypen von Tieren, Lebensmitteln, Futtermitteln und der Umwelt ein Anstieg der Multiresistenz (MDR) gegenüber antimikrobiell wirksamen Substanzen nachgewiesen werden (siehe 1. und 2. Zwischenbericht).

Umfassende molekularbiologische Untersuchungen zur Charakterisierung multiresistenter *Salmonella* Stämme in Lebensmitteln gibt es bisher nicht. Dabei stellen gerade Antibiotika-resistente Erreger in Lebensmitteln ein Gesundheitsrisiko dar, da sie über die Lebensmittelkette auf den Menschen übertragen werden können (Tollefson et al., 1997, Witte, 1998).

2002 wurde deshalb eine Studie begonnen, in die 810 aus Lebensmitteln stammende *Salmonella* Isolate aus dem Jahr 2001 einbezogen wurden. Phänotypisch (MHK-Bestimmung) erwiesen sich 334 (= 41,2 %) als mehrfach-resistent. Diese Gruppe wurde im Berichtszeitraum auf wichtige genotypische Resistenzeigenschaften untersucht und umfasst 27 der in den letzten Jahren am häufigsten vorkommenden Serotypen.

#### 2.1.1. Resistenzgene in multiresistenten Salmonellen aus Lebensmitteln

Um Aussagen zum Vorkommen spezifischer Resistenzgene und zu den Resistenzmechanismen machen zu können, wurden in den MDR-Stämmen 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.

**$\beta$ -Lactam-Resistenz:** Die Resistenz gegenüber  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (u.a. Resistenz gegenüber Ampicillin) beruht vorwiegend auf der Wirkung von  $\beta$ -Lactamasen und wird bei Salmonellen vorwiegend durch zwei Typen von  $\beta$ -Lactamase-Genen codiert: ***pse-1*** und ***tem-1***.

*Pse-1* liegt als Genkassette in einem Class 1-Integron vor und tritt in 142 der 235 Ampicillin-resistenten Stämme (= 60,4 %) auf. Es wird in 133 *S. Typhimurium* Stämmen (124 DT104, 4 U302, 5 andere Phagentypen) sowie 4 *S. Subsp.I* Rauh-Stämmen und 2 *Salmonella* Stämmen der Gruppe B - alle mit dem Phänotyp AMP-CHL-FFN-STR/SPE-SMX-TET-(TMP) - nachgewiesen. Alle diese Stämme tragen ein zweites Class 1-Integron mit der *aadA2*-Genkassette. In 3 *S. Typhimurium* Stämmen (2 DT104 und 1 U302) mit dem Phänotyp AMP-SMX-(TMP) tritt nur das Class 1-Integron mit der *pse-1*-Genkassette auf.

**Tabelle 1:** Resistenzverhalten von *Salmonella* Isolaten verschiedener Herkünfte 2000/2001/2002 im NRL-Salm

Herkunft	Sensitiv			Einfach resistent			Mehrfach resistent			Gesamt resistent		
	2000 Anzahl(%)	2001 Anzahl (%)	2002 Anzahl (%)	2000 Anzahl (%)	2001 Anzahl (%)	2002 Anzahl (%)	2000 Anzahl (%)	2001 Anzahl (%)	2002 Anzahl (%)	2000 Anzahl (%)	2001 Anzahl (%)	2002 Anzahl (%)
Tier	440 (22,6)	561 (28,0)	1182 (52,0)	599 (30,7)	546 (27,2)	232 (10,2)	912 (46,8)	897(44,8)	858 (37,8)	1951 (77,5)	2004 (72,0)	↓ 2272 (48,0)
Rind	66 (16,2)	32 (9,7)	196 (36,4)	115 (28,2)	25 (7,6)	33 (6,1)	227 (55,6)	273 (82,7)	309 (57,5)	408 (83,8)	↑ 330 (90,3)	↓ 538 (63,6)
Schwein	31 (5,7)	29 (10,2)	43 (16,7)	63 (11,6)	41 (14,4)	17 (6,6)	451 (82,7)	215 (75,4)	198 (76,7)	545 (94,3)	↓ 285 (89,8)	↓ 258 (83,3)
Geflügel	105 (24,3)	275 (36,7)	491 (56,5)	190 (44,0)	250 (33,4)	83 (9,6)	137 (31,7)	224 (29,9)	295 (33,9)	432 (75,7)	↓ 749 (63,3)	↓ 869 (43,5)
LM	220 (18,9)	355 (36,8)	722 (50,0)	395 (34,0)	186 (19,2)	115 (8,0)	548 (47,1)	425 (44,0)	606 (42,0)	1163 (81,1)	↓ 966 (63,3)	↓ 1443 (50,0)
FM	112 (23,1)	122 (44,4)	312 (87,6)	299 (61,6)	124 (45,1)	32 (9,0)	74 (15,3)	29 (10,5)	12 (3,4)	485 (76,9)	↓ 275 (55,6)	↓ 356 (12,4)
Umwelt	52 (17,2)	151 (56,6)	151 (59,2)	122 (40,3)	39 (14,6)	16 (6,3)	1 29 (42,5)	77 (28,8)	88 (34,5)	303 (82,8)	↓ 267 (43,4)	↓ 255 (40,8)
Total <sup>1</sup>	825 (21,1)	1227 (34,1)	2405 (54,6)	1422 (36,3)	927 (25,7)	402 (9,2)	1670(42,6)	1448 (40,2)	1585 (36,1)	3917 (78,9)	↓ 3602 (65,9)	↓ 4392 (45,2)

<sup>1</sup> einschließlich der hier nicht aufgeführten sonstigen Isolate

**Tabelle 2:** Vorkommen von *Salmonella* Typhimurium DT104 Isolaten in Deutschland von 1992 bis 2002.

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

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

*Tem-1* kommt in den o.g. *Salmonella* Stämmen mit den Phänotypen AMP-CHL-FNN-STR/SPE-SMX-TET (TMP) sowie AMP-SMX-(TMP) nicht vor. Es wurde in 84 der 235 Ampicillin-resistenten Stämme (= 35,7 %), die zu 14 *Salmonella* Serotypen gehören, nachgewiesen, jedoch niemals als Genkassette. In einem *S. Typhimurium* Stamm konnten sowohl *pse-1* als auch *tem-1* nachgewiesen werden.

Das  $\beta$ -Lactamase-Gen *oxa1* tritt in keinem Stamm 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 *aadA1a*, *aadA2*, *aadA5* für Spectinomycin/Streptomycin, *strA/B* für Streptomycin, *aphA1* für Kanamycin/Neomycin sowie *aac(3)-II*, *aac(3)-IV* und *aadB* für Gentamicin.

*AadA* Gene konnten in 232 der 334 multiresistenten *Salmonella* Stämme (= 69,5 %) nachgewiesen werden und liegen dort als Genkassetten in Class 1- oder Class 2-Integrans vor - entweder allein oder in Kombination mit einem *dfrA*-Gen bzw. einem oder mehreren noch nicht identifizierten anderen Resistenzgenen (s. Tabelle). 20 dieser Stämme haben zusätzlich *strA/B*-Gene.

In 11 der 15 Kanamycin/Neomycin-resistenten Stämmen konnte das *aphA1*-Gen nachgewiesen werden.

In den 9 Gentamicin-resistenten Stämmen wurde die Gentamicin-Resistenz in einem Fall durch das *aac(3)-II*-Gen, in zwei Fällen durch das *aac(3)-IV*-Gen und in einem Fall durch das *aadB*-Gen kodiert. Das *aadB*-Gen liegt dabei als Genkassette in Kombination mit einer *aadA2*-Genkassette in einem Class 1-Integron vor. In 4 Stämmen wird die Gentamicin-Resistenz durch ein anderes, bisher nicht identifiziertes Gen kodiert.

Die Gentamicin-kodierenden Gene *aacC1* und *grm* waren in keinem Stamm nachweisbar.

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

Das Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen *catA* konnte in 5 Chloramphenicol-resistenten Stämmen nachgewiesen werden. Diese gehörten zu den Serotypen Saintpaul, Derby, Typhimurium (DT120) und Subsp. I Rauh. Das *catA* Gen wurde nicht in den 133 S. Typhimurium und den 6 rauhen S. Stämmen mit dem Phänotyp AMP-CHL-STR/SPE-SMX-TET-(TMP) gefunden.

Das Efflux-Protein-Gen *floR* ist für die 133 S. Typhimurium und die 6 rauhen-Stämme mit dem Phänotyp AMP-CHL-STR/SPE-SMX-TET-(TMP) typisch.

In 4 anderen multiresistenten Stämmen wurde *cmIA* als weiteres Efflux-Protein-Gen nachgewiesen werden.

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

*Tet(G)* tritt ausschließlich in den 133 S. Typhimurium- und den 6 rauhen S. Stämmen mit dem Phänotyp AMP-CHL-STR/SPE-SU-TET-(TMP) auf, während in den anderen Tetracyclin-resistenten *Salmonella* Stämmen entweder *tet(A)* (in 71 Stämmen) oder *tet(B)* (in 36 Stämmen) nachgewiesen wurde. In 2 Stämmen trat sowohl *tet(A)* als auch *tet(B)* auf.

**Trimethoprim-Resistenz:** Die Resistenz gegenüber Trimethoprim wird durch verschiedene *dfrA*-Dihydrofolatreductase-Gene kodiert, die als Genkassetten in Integrons oder auf Plasmiden und Transposons lokalisiert sind.

In dieser Studie war das Gen *dfrA1* in 63 von 88 Trimethoprim-resistenten Stämmen (= 71,6 %) nachweisbar. Es wurde in 62 Stämmen als Genkassette in Kombination mit einer *aadA1*-Genkassette in einem Class 1- oder Class 2-Integron gefunden.

*DfrA12* trat nur in 5 der 88 Trimethoprim-resistenten Stämme (= 5,7 %) auf, in 3 dieser Stämme lag es als Genkassette in Kombination mit einer *aadA2*-Genkassette in einem Class 1-Integron vor.

*DfrA14* wurde in 15 der 88 Trimethoprim-resistenten Stämme gefunden (= 17,0 %) und ist in 14 Stämmen nicht mit einer Integronstruktur assoziiert. Mittels Sequenzierung konnte der Nachweis erbracht werden, dass in 13 dieser Stämme das *dfrA14*-Gen in das Streptomycin-Phosphotransferase-Gen *strA* eingefügt wurde, was zu einer funktionellen Inaktivierung der für *strA* codierenden Region führt. In einem S. Derby Stamm lag *dfrA14* als Genkassette in Kombination mit einer oder zwei bisher noch nicht identifizierten Genkassette(n) in einem Class 1-Integron vor.

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

In 5 Stämmen wird die Trimethoprim-Resistenz durch bisher nicht identifizierte Gene kodiert.

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

***Sul1*** war immer mit Class1-Integron(s) assoziiert und wird in allen 207 Stämmen gefunden, die diese Integron-Klasse aufweisen, während ***sul2*** in 34 Stämmen und nur außerhalb von Integronstrukturen auftritt. In 13 Stämmen konnten beide Gene nachgewiesen werden.

### 2.1.2. Class 1 und Class 2 Integrons in multiresistenten Salmonellen aus Lebensmitteln

In multiresistenten *Salmonella* Stämmen von Mensch, Tier und Lebensmitteln werden häufig genetische Elemente, sog. Integrons nachgewiesen. Diese können entweder auf dem Bakterienchromosom oder auf Plasmiden mit weitem Wirtsbereich (broad host range) lokalisiert und in übertragbare Elemente (Transposons u.ä.) integriert sein (siehe auch Zwischenbericht 2001). Diesen Integrons kommt aufgrund ihrer besonderen Fähigkeit, Antibiotika-Resistenzgene anzuhäufen, zu exprimieren und "en bloc" vertikal oder horizontal zu übertragen, eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von Multiresistenzen zu (Carattoli, 2001). 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 and Threlfall, 1998, Sandvang et al., 1998, Cloeckart et al., 2000). Die meisten Class 1 Integrons sind in mobilen Transposons, wie Tn21 oder seinen Abkömmlingen, lokalisiert (Liebert et al., 1999, Bass et al., 1999, Villa et al., 2002).

Class 2 Integrons wurden bisher 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. in Vorbereitung). Sie sind mit der Tn7-Transposon-Familie assoziiert (Rowe-Magnus and Mazel, 2002, Hansson et al., 2002, Tietze et al., 1987).

Die Studie erbrachte folgende Ergebnisse:

1. In 207 (= 62 %) der untersuchten 334 multiresistenten *Salmonella* Stämme aus Lebensmitteln konnten ein oder zwei Class 1-Integrons unterschiedlicher Größe nachgewiesen werden. Die Größe der Integrons (genauer ihrer Amplikons in der PCR) sowie Typ und Anzahl der eingefügten Resistenzgenkassetten bildeten die Grundlage für eine Einordnung in verschiedene Genkassetten-Arrays, die in Tabelle 3 aufgeführt sind.
2. In 31 (= 9,3 %) der untersuchten 334 multiresistenten *Salmonella* Stämme aus Lebensmitteln konnte ein einzelnes Class 2-Integron nachgewiesen werden mit jeweils dem gleichen Array aus 3 Genkassetten (s. Tabelle 4).
3. In 3 (= 0,9 %) der untersuchten 334 multiresistenten Salmonella-Stämme aus Lebensmitteln konnten sowohl ein Class 1-Integron unterschiedlicher Größe als auch das oben beschriebene Class 2-Integron nachgewiesen werden (s. Tabelle 5).

Die Class 1-Integrons der meisten *Salmonella* Serotypen sind in der Regel auf hochmolekularen, konjugativen Plasmiden lokalisiert. Dagegen liegen die beiden für *S. Typhimurium* Phagentyp DT104 charakteristischen Class 1-Integrons auf dem Chromosom (Threlfall et al., 1993). Mit der Lokalisationsbestimmung für die Class 2-Integrons wurde begonnen.

**Tabelle 3:** Class 1-Integrans und Genkassetten-Arrays in *Salmonella* Stämmen aus Lebensmitteln

Amplikongröße (bp) in Class 1-Integron-PCR	Genkassetten-Array	Anzahl Stämme n=207
150	keine ("leeres" Integron)	2
650	nd <sup>1</sup>	1
1000	<i>aadA1a</i> bzw. <i>aadA2</i>	22
1200	<i>pse-1</i>	3
1600	<i>dfrA1-aadA1a</i>	19
1700	<i>aadB-aadA2</i>	1
1900	<i>dfrA12-orf-aadA2</i>	3
1900	<i>sat</i> <sup>2</sup> - <i>aadA1a</i>	3
2000	<i>dfrA1-nd-aadA</i>	10
größer 2000	<i>dfrA14-aadA-nd</i>	1
größer 2000	<i>dfrA1-nd-aadA</i>	1
1000 + 1200	<i>aadA2 + pse-1</i>	140
1200 + 1600	<i>pse-1 + [dfrA1-aadA1a]</i>	1

<sup>1</sup> nd = noch nicht bestimmt<sup>2</sup> *sat* \*= Genbank Accession No.AY090896**Tabelle 3:** Class 1-Integrans und Genkassetten-Arrays in *Salmonella* Stämmen aus Lebensmitteln

Amplikongröße (bp) in Class 1-Integron-PCR	Genkassetten-Array	Anzahl Stämme n=207
150	keine ("leeres" Integron)	2
650	nd <sup>1</sup>	1
1000	<i>aadA1a</i> bzw. <i>aadA2</i>	22
1200	<i>pse-1</i>	3
1600	<i>dfrA1-aadA1a</i>	19
1700	<i>aadB-aadA2</i>	1
1900	<i>dfrA12-orf-aadA2</i>	3
1900	<i>sat</i> <sup>2</sup> - <i>aadA1a</i>	3
2000	<i>dfrA1-nd-aadA</i>	10
größer 2000	<i>dfrA14-aadA-nd</i>	1
größer 2000	<i>dfrA1-nd-aadA</i>	1
1000 + 1200	<i>aadA2 + pse-1</i>	140
1200 + 1600	<i>pse-1 + [dfrA1-aadA1a]</i>	1

<sup>1</sup> nd = noch nicht bestimmt<sup>2</sup> *sat* \*= Genbank Accession No.AY090896**Tabelle 4:** Class 2-Integrans und Genkassetten-Arrays in *Salmonella* Stämmen aus Lebensmitteln

Amplikongröße (bp) in Class 2-Integron-PCR	Genkassetten-Array	Anzahl Stämme
2400	<i>dfrA1-sat</i> ** <i>-aadA1-(orfX)</i>	31

*sat*\*\* = Genbank Accession No. M63169

**Tabelle 5:** Class 1 und Class 2-Integrone und Genkassetten-Arrays in *Salmonella* Stämmen aus Lebensmitteln

Amplikongröße (bp) in Class 1/Class 2- Integron-PCR/	Genkassetten-Array	Anzahl Stämme
1000 /2400	<i>aadA1a</i> + [ <i>dfrA1-sat**-aadA1a-(orfX)</i> ]	2
1600 /2400	[ <i>dfrA1-aadA1a</i> ] + [ <i>dfrA1-sat**-aadA1a-(orfX)</i> ]	1

*sat\*\** = Genbank Accession No. M63169

### 2.1.3 Molekularbiologische Charakterisierung der Fluorochinolonresistenz

Zu Beginn der frühen Neunziger 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  $\geq 32$  g/ml und für Enrofloxacin  $\geq 128$   $\mu$ 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 463 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 87 besaßen, die zur Substitution von Asparaginsäure 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). Für *Salmonella* Isolate wurde bisher keine Mutation im *parC* Gen beschrieben.

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.

## 2.2 Bewertung der molekularbiologischen Eigenschaften von Salmonellen in Lebensmitteln

- 71 % der getesteten multiresistenten *Salmonella* Stämme aus Lebensmitteln tragen Class 1-bzw. Class 2-Integrone. Die Integron-Prävalenz bezogen auf alle Lebensmittel-Isolate beträgt nahezu 30 %.
- Die in den Lebensmitteln am weitesten verbreiteten Resistenzgene sind:
  - die für die Sulfonamid-Resistenz-kodierenden Gene mit 29,8 %,
  - die für die Spectinomycin/Streptomycin-Resistenz kodierenden Gene mit 28,6 %
  - die  $\beta$ -Lactamase-Gene mit 27,9 %
  - die für die Trimethoprim-Resistenz kodierenden Gene mit nahezu 11 %.
- 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. 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 molekularbiologischen 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 6 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 Fachgebiet 502 übernahm die Überprüfung der eingesandten *E. coli* Isolate und stellt sie dem Fachgebiet 501 zur Resistenzbestimmung und Charakterisierung zur Verfügung.

Die Tabelle 7 gibt den durchschnittlichen Anteil resistenter *E. coli* Isolate der Jahre 1999, 2000, 2001 und 2002, aufgrund der ermittelten MHK Werte, an. Die Isolate vom Schwein und vom Geflügel tragen besonders zur Resistenzsituation bei den untersuchten *E. coli* Isolaten bei. Der hohe Anteil von durchschnittlich 36,6 % 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 6:** 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 7:** Prozentualer Anteil resistenter *E. coli* Isolate nach NCCLS, DIN 58940 Teil 3

Herkunft (N. Stämme)	Sensibel N. Stämme (%)	Resistent <sup>1</sup> N. Stämme (%)	Einfach resistent (%)	Mehrfach resistent (%)
Rind (N=232)	172 (74,1)	60 (25,9)	9 (3,9)	51 (22,0)
Schwein (N=61)	20 (33,0)	41 (67,2)	3 (4,9)	38 (62,3)
Geflügel (N=114)	45 (39,5)	69 (60,5)	9 (7,9)	60 (52,6)
Total (N=407)	237 (58,2)	170 (41,8)	21 (5,2)	149 (36,6)

<sup>1</sup>: Stämme mit intermediären Resistenzwerten sind nicht einbezogen worden.

Tabelle 8 zeigt den resistenten Anteil gegenüber den untersuchten antimikrobiell wirksamen Substanzen. Auffällig ist, dass beim Geflügel bereits ein Drittel (32,5 %) der Isolate eine Nalidixinsäureresistenz zeigen. 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 (siehe 2. Zwischenbericht) die Ciprofloxacinresistenz mit einem Drittel der untersuchten *E. coli* Isolate vom Geflügel bedenklich hoch.

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

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

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

<sup>2</sup>:Reduzierte Empfindlichkeit

Im Vergleich zu den im zweiten Zwischenbericht gefundenen Zahlen, liegen die Resistenzen im allgemeinen auf gleichen Niveaus. Eine abschließende Beschreibung des zeitlichen Verlaufs der Prävalenzen wird im Endbericht gegeben werden.

### 3.1 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 % besonders hohe Prävalenzen resistenter Isolate auf.
- 33 % der Geflügel Isolate sind Chinolon resistent und weisen eine verminderte Empfindlichkeit (18.4 %) bzw. Resistenz (14 %) gegen Fluorochinolone auf.

#### **4. 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.

##### 4.1 Nachweis von Resistenzgenen bei resistenten *E. coli*

Um Aussagen über die vorherrschenden Resistenzmechanismen machen zu können, ist es eines der Ziele dieses Projekts, die wichtigsten Resistenzgene zu identifizieren. Dazu wurden PCR- und Gensonden-Techniken etabliert und geeignete Primer ermittelt (siehe auch Zwischenbericht 2001, 2002). Die bisher eingesetzten Primer, ihre Zielgene und die PCR-Bedingungen können im NRL-Salm abgefragt werden. Zur Spezifitätstestung werden außerdem Sequenzierungen durchgeführt.

Bis jetzt sind 162 der 170 resistenten *E. coli* Stämme charakterisiert worden. Alle diese Stämme wurden auf unterschiedliche Gene, die für die Resistenz gegen antimikrobielle wirksame Substanzen verantwortlich sind, untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Es zeigt sich, dass bei den meisten Resistenzen bekannte Gene dominieren. Allerdings tragen einige Stämme mehr als ein Resistenzgen und bei einigen Stämmen konnten die Resistenzgene bisher nicht identifiziert werden. Diese könnten bisher unbekannte Resistenzdeterminanten tragen. Hierzu sind weitere Untersuchungen im Gange.

##### 4.2 Integronstruktur bei resistenten *E. coli*

In multiresistenten *E. coli* Stämmen von Mensch und Tier werden häufig Integrons nachgewiesen. Diese können entweder auf dem Bakterienchromosom oder auf Plasmiden mit weitem Wirtsbereich (broad host range) lokalisiert sein und in übertragbare Elemente (Transposons u.ä.) integriert werden (siehe auch Zwischenbericht 2001, 2002). Diesen Integrons kommt aufgrund ihrer besonderen Fähigkeit, Antibiotika-Resistenzgene anzuhäufen, zu exprimieren und "en bloc" vertikal oder horizontal zu übertragen, eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von Multiresistenzen zu. Deshalb wurden resistente Stämme, die in den letzten vier Jahren in Deutschland vorkommenden *E. coli*, auch hinsichtlich ihrer Integronstrukturen molekularbiologisch charakterisiert.

Bis jetzt sind 162 resistente *E. coli* Stämme der Jahre 1999-2002, charakterisiert worden. Alle diese Stämme wurden auf Integronstrukturen und die mit Integrons assoziierten *sul1* (verantwortlich für die Resistenz gegenüber Sulfonamiden) und *qacEΔ1*-Gene (verantwortlich für die Resistenz gegenüber quarternären Ammoniumverbindungen) untersucht. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Insgesamt tragen 49 (30,2%) der 162 untersuchten resistenten *E. coli* Stämmen Class 1-Integrons. In Bezug zu ihren unterschiedlichen Größen und unterschiedlichen Resistenzgenkassetten konnten 8 Integron-typen (IT) definiert werden (Tabelle.10). Nicht alle der Integron tragenden Stämme trugen die *sul1*- und *qacEΔ1*-Gene.

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

Antimikrobielle Substanz (N. Resistente Stämme)	Gen*	Anzahl Stämme	%
Ampicillin n=77	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	74	96,1
	<i>bla</i> <sub>OXA</sub>	2	2,6
	<i>bla</i> <sub>CARB</sub>	0	<1,3
Chloramphenicol n=36	<i>catA</i>	26	72,2
	<i>floR</i>	0	<2,8
	<i>cmlA</i>	14	38,9
Gentamicin n=7	<i>aac(3)-IV</i>	3	42,9
	<i>aac(3)-II</i>	0	<14,3
	<i>aac(3)-I</i>	0	<14,3
	<i>aadB</i>	0	<14,3
Kanamycin n=40	<i>aphA1</i>	40	100
	<i>Kn</i>	0	<2,5
Streptomycin n=125	<i>aadA</i>	74	59,2
	<i>strA</i>	77	61,6
	<i>strB</i>	77	61,6
Sulfamethoxazol n=121	<i>sul1</i>	49	40,5
	<i>sul2</i>	76	62,8
Tetracyclin n=112	<i>tet(A)</i>	73	65,2
	<i>tet(B)</i>	47	42,0
	<i>tet(G)</i>	0	<0,8
Trimethoprim n=45	<i>dfrA1 like</i>	31	68,9
	<i>dfrA12</i>	4	8,9
	<i>dfrA17</i>	5	11,1
	<i>dfrA7</i>	2	4,44
	<i>dfrA14</i>	4	8,9

N.- Anzahl der Stämme

#### 4.3. Bewertung der molekularbiologischen Eigenschaften bei *E. coli*

- Nahezu ein Drittel der getesteten resistenten *E. coli* Stämme tragen Integrons.
- Die hohe Prävalenz von Integrons in resistenten *E. coli* Stämmen sollte aufmerksam und kritisch verfolgt werden, da Integrons sehr effektive Vektoren zur Ausbreitung von Resistenzen darstellen.
- Eine Vielzahl der in der Literatur beschriebenen Resistenzgene sind weit verbreitet. Dazu gehören *bla*<sub>TEM</sub>, *catA*, *aphA1*, *aadA*, *strA/B*, *sul2*, *tet(A)* und *dfrA1 like*,

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

Integron Profile	Amplikongröße in Integron-PCR	Genkassetten	Lokalisierung	N. Stämme n=49*	Herkunft der Stämme
IT-I	1000 bp	<i>aadA1a</i>	Chromosom, Plasmid	16	G(9), S(5), R(2)
IT-II	1600 bp	<i>dfrA1-aadA1a</i>	Chromosom, Plasmid	17 <sup>1</sup>	G(11), S(3), R(3)
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>bla<sub>OXA1</sub>-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)

<sup>1</sup> Ein Stamm trägt 2 Integrons: 1600 bp und 2000 bp.

G: Geflügel, S: Schwein, R: Rind.

#### 4.4. Molekularbiologische Charakterisierung der Chinolonresistenz bei *E. coli*

Chinolone und Fluorochinolone sind eine Klasse hochwirksamer antimikrobieller Substanzen, die die DNA Gyrase und Topoisomerase IV von sensiblen Bakterien inhibieren können. Sie gehören zu den neuesten und wirksamsten Substanzen, die im Falle einer lebensbedrohlichen Gram-negativen bakteriellen Infektion (Salmonellose, Colibacteriose, Campylobacteriose), als Mittel der Wahl angesehen werden. Nalidixinsäure ist ein Antibiotikum der ersten Generation der Chinolone, während Ciprofloxacin und Enrofloxacin, zur dritten Generation gehören. Während Ciprofloxacin nur für die Humanmedizin zugelassen ist wird Enrofloxacin nur in der Tiermedizin eingesetzt. Zwischen ihnen besteht eine Kreuzresistenz. (Siehe 2. Zwischenbericht). 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 hoch Resistenz gegenüber Nalidixinsäure anzeigt, bleibt die Resistenz gegenüber Fluorochinolonen unter dem Grenzwert (nach NCCLS für Ciprofloxacin  $\geq 4$  und nach DIN  $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ ). Dies bewertet man als eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Fluorochinolonen (MIC 0.12-2  $\mu\text{g/ml}$ ). Isolate mit reduzierter Empfindlichkeit gegenüber Fluorochinolonen werden immer mehr als therapeutisch bedenklich eingestuft (Siehe 2. Zwischenbericht). Reduzierte Empfindlichkeiten können auch auf sog. Effluxpumpen zurückgeführt werden. Erfolgt eine zweite Mutation in derselben Region, werden *E. coli* 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 hochresistent sind (siehe 2. Zwischenbericht, Tabelle 4).

Im Rahmen der Arbeit wurden von 42 der 44 Chinolon resistenten (Nalidixinsäure -resistenten) *E. coli* Isolaten die QRDR Region des *gyrA* und *parC* Gens sequenziert. Auffallend war, dass 36 der 44 (81 %) Stämme vom Geflügel/Geflügelprodukte isoliert wurden. Tabelle 11 gibt eine Zusammenfassung der erhaltenen Ergebnisse. Es wurden verschiedene Mutationen gefunden, die zur Chinolonresistenz, Fluorochinolon-Resistenz b.z.w. 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 16 Isolaten gefunden worden. Fünfzehn davon waren Stämme aus Geflügel und Geflügelprodukten. Die restlichen 21 Geflügel Isolaten hatten bereits eine Einzelmutation in *gyrA* und eine reduzierte Empfindlichkeit gegen Ciprofloxacin.

#### 4.5. Bewertung zur molekularbiologische Charakterisierung der Chinolonresistenz

- Die Chinolonresistenz der untersuchten *E. coli* Stämme ist bei Isolaten vom Geflügel im Vergleich zu anderen Nutztierarten besonders hoch (81 % der Chinolon resistenten Stämme sind Isolate vom Geflügel). Das belegt, dass die im Rahmen der Bestandsmedikation oral verabreichten Fluorochinolone einen hohen Selektionsdruck ausübt.
- 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 ein 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.

**Tabelle 11:** 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 = 42)		Herkunft (Anzahl Stämme)
Nal	Cip	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	Anzahl	%		
32	0,12	Ala83	-	1	2,4	G	
64	0,12	-	Gly87	1	2,4	S	
64	0,25-0,5	Leu83	-	4	9,5	G	
>= 128	0,12-0,25	-	Asn87	2	4,8	G, R	
>= 128	0,25-0,5	Leu83	-	16	38,1	G (14), R (1), S(1)	
> 128	1,0	Leu83	-	1	2,4	G	
> 128	2,0	Leu83	Ile80	1	2,4	R	
> 128	4	Leu83	Asn87	2	4,8	G	
> 128	>4	Leu83	Asn87	12	28,6	G (11), S (1)	
> 128	>4	Leu83	Tyr87	2	4,8	G	
Sensible Stämme:		Ser83	Asp87	Ser80	(Nal MHK<32, Cip MHK>12)		

QRDR: Chinolon Resistenz Region

G: Geflügel, S: Schweine, R: Rind

-: Keine Veränderung, Identisch mit sensiblen Stämmen.

## 5. Bisher im Rahmen des Forschungsvorhaben verfasste Publikationen:

1. Schroeter, A., R. Helmuth (2000):  
Resistance of *Salmonella* isolates from turkey in Germany. In: 3rd International Symposium on Turkey diseases, 14th-17th June 2000, Berlin Ed.: Hafez, H.M. Verlag der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. Gießen, p. 326-333.
2. Bager, F., R. Helmuth (2001):  
Epidemiology of resistance to quinolones in *Salmonella*. *Vet Res.* 2001; 32: 285-90.
3. Dorn, Ch., A. Schroeter, A. Miko, D. Protz, R. Helmuth (2001):  
Increasing number of *Salmonella paratyphi* B isolates from slaughtered poultry sent to the national *Salmonella* reference laboratory. *Berl Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 114:179-183.
4. Wichmann-Schauer, H., L. Ellerbroek, C. Dorn, A. Schroeter, R. Helmuth (2001):  
Resistenz gegen antimikrobielle Wirkstoffe bei *Salmonellen* aus Hähnchenmast- und -schlachtbetrieben. *Arch. Lebensmittelhyg.* 52, 88-90.
5. Dorn, C., A. Schroeter, R. Helmuth (2002):  
Bericht über die im Jahr 1999 an das Deutsche Nationale Veterinärmedizinische Referenzlabor für *Salmonellen* eingesandten *Salmonella*-Isolate. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2002 Jul-Aug;115(7-8):252-8. German. PMID: 12174721.
6. Guerra, B., S. Soto, R. Helmuth, M. C. Mendoza (2002):  
Characterization of a Self-Transferable Plasmid from *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Clinical Isolates Carrying Two Integron-Borne Gene Cassettes Together with Virulence and Drug Resistance Genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Sep; 46 (9): 2977-2981.
7. Helmuth, R., C. Dorn, B. Malorny, A. Miko, B. Guerra, A. Schroeter (2002):  
Resistenzsituation von *Salmonellen* in Geflügel und Geflügelprodukten. *DVG* 62, 25-31.
8. 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.* 2002 Sep;40(9):3184-91.
9. Guerra, B., E. Junker, A. Schroeter, B. Malorny, S. Lehmann, R. Helmuth (2002):  
Phenotypic and Genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from livestock and food. (Veterinary Research eingereicht).
10. 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.* 2002 Jul 9;87(3):253-65.
11. Malorny, B., A. Schroeter, B. Guerra, R. Helmuth (2002):  
Incidence of quinolone resistance in veterinary *Salmonella* strains isolated in Germany between 1998 and 2001 (Veterinary Record in Druck).
12. Guerra, B., A. Schroeter, B. Malorny, R. Helmuth (2003).  
First report of a *parC* mutation and a novel *gyrB* mutation in fluoroquinolone-resistant *Salmonella* isolates (eingereicht).

## 6. Literatur

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. Cloeckaert, 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. Hansson, K., L. Sundstrom, A. Pelletier, and P. H. Roy. 2002. IntI2 integron integrase in Tn7. *J. Bacteriol.* 184:1712-1721.
8. 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.
9. 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.
10. Malorny, B., Schroeter A, and R. Helmuth. 1999. Incidence of quinolone resistance over the period 1986 to 1998 in veterinary *Salmonella* isolates from Germany. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:2278-2282.
11. 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.
12. 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.
13. Rowe-Magnus, D. A. and D. Mazel. 2002. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *Int. J. Med. Microbiol.* 292:115-125.
14. 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.
15. 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.
16. Tietze, E., J. Brevet, and H. Tschape. 1987. Relationships among the streptothricin resistance transposons Tn1825 and Tn1826 and the trimethoprim resistance transposon Tn7. *Plasmid* 18:246-249.
17. Tollefson, L., S. F. Altekruse, and M. E. Potter. 1997. Therapeutic antibiotics in animal feeds and antibiotic resistance. *Rev. Sci. Tech.* 16:709-715.
18. 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 1. *Microb. Drug Resist.* 8:1-8.
19. Webber, M., and L.J.V. Piddock. 2001. Quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Vet. Res.* 32:275-284.

20. Witte, W. 1998. BIOMEDICINE: Medical Consequences of Antibiotic Use in Agriculture. Science 279:996-997.