

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
(Direktor: Univ. Prof. Dr. med. K. Pfeffer)

**Prävalenz von Klasse I Integrons in Enterobacteriaceae**

**Erfahrungen aus einem Universitäts-Klinikum**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Stephanie Wunder

2004

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfgang H. M. Raab  
Dekan  
Referent: Prof. Dr. med. F.-J. Schmitz  
Korreferentin: Univ.-Prof. Dr. med. H. Idel

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Ancestral chromosomal super-integrans und ihr evolutionsgeschichtlicher Einfluß auf das Bakteriengenom</b>	<b>6</b>
<b>1.2 Insertionskassetten und ihre Bedeutung als mobile genetische Einheit</b>	<b>7</b>
1.2.1 Allgemeiner struktureller Aufbau der Insertionskassetten	7
1.2.2 Die kassettenassoziierte Rekombinationsschnittstelle	9
1.2.3 Alternative Lokalisation von Genkassetten innerhalb eines Genoms	12
<b>1.3 Die Bedeutung der Integron-Plattform als Genaquisitions- und expressions-System</b>	<b>13</b>
1.3.1 Allgemeiner struktureller Aufbau der Integron-Plattform	13
1.3.2 Beschreibung der Integrasegene und Integronklassen	12
1.3.3 Die Promotorregion und weitere Faktoren der Expression kassettenassoziiierter Gene	17
1.3.4 Definition der <i>attI1</i> -Rekombinationsschnittstelle von Klasse-1-Integrans	18
<b>1.4 Herkunft der Genkassetten und Integrans</b>	<b>21</b>
<b>1.5 Enterobacteriaceae</b>	<b>24</b>
1.5.1 Übersicht und allgemeine Eigenschaften der Enterobacteriaceae	24
1.5.2 Einteilung der Enterobacteriaceae	25
1.5.3 Antigenstrukturen der Enterobacteriaceae	26
1.5.4 Determinanten der Pathogenität und Virulenz von Enterobacteriaceae	27
1.5.5 Bedeutung der Enterobacteriaceae als Problemkeime im klinischen Alltag	27
<b>1.6 Ziel der Arbeit</b>	<b>29</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>31</b>
<b>2.1 Herkunft und Identifizierung der Enterobacteriaceae</b>	<b>31</b>
<b>2.2 Auswahl und Aufbereitung der Enterobacteriaceae-Isolate</b>	<b>31</b>
<b>2.3 Nachweis von Integron-Strukturen innerhalb des Bakteriengenoms</b>	<b>35</b>
<b>2.4 Bestimmung des DNA-Umfangs der Insertionsregion als Indikator für die Anzahl der integrierten Genkassetten</b>	<b>39</b>
<b>2.5 Diskrimination der 5'-CS-Promotorregion</b>	<b>44</b>
<b>2.6 Resistenztestung der Enterobacteriaceae</b>	<b>49</b>

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>51</b>
3.1	Epidemiologische Aspekte integronhaltiger Enterobacteriaceae	51
3.2	Bestimmung des DNA-Gehaltes der Integron-Insertionregion	53
3.3	Sequenzierungsergebnisse der Promotorregion	56
3.4	Diskrepanzen im Resistenzverhalten zwischen Enterobacteriaceae-Isolaten mit und ohne Integron-Klasse-1-assoziierte Genkassetten	58
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>60</b>
4.1	Epidemiologische Aspekte der Klasse-1-Integron-Struktur	60
4.2	Resistenzverhalten integronhaltiger Bakterienstämme	62
4.3	Multiresistenz-Integrone besitzen ein genetisches „Kurzzeitgedächtnis“	67
4.4	Aktuelle Überlegungen zu Therapie und Prävention integronassoziierter Infektionserkrankungen	70
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>76</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>81</b>

## 1. Einleitung

Der Erwerb nosokomialer Infekte bei hospitalisierten Patienten stellt ein zunehmend an Bedeutung gewinnendes Problem mit erheblichen negativen Auswirkungen, nicht nur auf den jeweiligen Rekonvaleszenzverlauf, sondern auch im Hinblick auf die ansteigende Kostenentwicklung im Gesundheitswesen, dar. Insbesondere die seit der Entdeckung des Penicillins im Jahr 1928 durch Fleming (1) und vor allem seit Beginn des flächendeckenden Einsatzes dieser Substanzgruppe in den Industrienationen als wirkungsvolles Therapeutikum gegen Krankheitserreger, beobachtete Kompetenz der Mikroorganismen zur Resistenzausbildung gegenüber Antibiotika, veranschaulicht eindrucksvoll die Notwendigkeit fundierte Erkenntnisse über die zugrunde liegende Fähigkeit zur Adaptation des Phänotyps bei gegebenem Selektionsdruck zu erlangen.

Erst Anfang der 1980er Jahre enthüllten Untersuchungen mehrerer Arbeitsgruppen unter Verwendung von Heteroduplex-Analysen und Restriktionsmethoden, dass bei verwandten potentiell transferierbaren Genstrukturen wie Plasmide und Transposonen verschiedene Antibiotika-Resistenzgene zum Teil in identischer Lokalisation nachweisbar sind (2, 3, 4, 5). Nachdem anschließend die Sequenzen dieser kodierenden Genomabschnitte entschlüsselt worden waren, zeigte sich, dass eine Vielzahl darunter von denselben Basenpaarabfolgen flankiert werden. Dies legte die Vermutung nahe, dass diese Resistenzgene in Form von so genannten „Gen“- oder „Insertionskassetten“ jeweils als Bestandteil einer einheitlichen Struktur zu sehen sind (6, 7, 8, 9). In der nachfolgenden Zeit wurden Gene für diverse antimikrobielle Resistenzen in eben dieser Lokalisation und an einem zweiten Ort, vergesellschaftet mit dem Transposon Tn7, identifiziert (10). Bei weiteren dieser Genkassetten konnte dem kodierenden, auch als „open reading frame“ (ORF) bezeichneten, eindeutig zu determinierenden Sequenzabschnitt bisher noch keine Funktion zugeordnet werden(10).

Es zeigte sich, dass vielfach solche Kassetten als Element einer geordneten Abfolge ihresgleichen innerhalb einer festgelegten Region einer großen mobilen genetischen Einheit anzutreffen sind (10, 11). Hierfür wurde von Stokes und Hall der Begriff „Integron“ eingeführt (11). In 5'-Richtung, gesehen von der jeweils ersten Genkassette innerhalb einer Reihenfolge, wurde ein konserviertes Segment detektiert, welches ein Gen enthält, dessen Proteinprodukt eine enge Verwandtschaft zu der Delta-Integrase-Familie aufweist (7, 8). Nachfolgend konnte bewiesen werden, dass dieses Enzym die ortsspezifische Rekombination genetischen Materials katalysiert (12, 13). Weitere Studien belegten die These, wonach

Genkassetten in der Tat als mobile Elemente verstanden werden müssen, die mit Hilfe dieser Integrase in ein Integron eingefügt oder daraus entfernt werden können (14, 15, 16, 17).

Daher forderte man zunächst als grundlegende Voraussetzungen für die Verwendung der Bezeichnung Integron, dass der entsprechende Genomabschnitt eine spezifische Rekombinationsschnittstelle einschließlich der Rekombinase aufweist und ferner über die Fähigkeit verfügt, verschiedene Resistenzgene zu akquirieren bzw. auch wieder aus dem Verbund auszuschleusen (11, 14, 16).

Bei der Verbreitung von Antibiotikaresistenzen spielen nun zwei sich ergänzende Mobilitätsmechanismen eine Rolle. Zum einen handelt es sich dabei um den oben beschriebenen Transfer von Genkassetten, zum anderen scheint die Struktur, in die Resistenzgene integriert werden, ebenfalls mobil zu sein, da diese in diversen unabhängigen Lokalisationen in unterschiedlichen Plasmiden und Transposonen nachweisbar ist (7, 11).

Die ursprünglichen Untersuchungen der natürlich vorkommenden Integrons gingen von grundlegend strukturellen Überlegungen aus, die zwangsläufig eine variable Region mit einem oder mehreren Resistenzgenen, flankiert von je einem konservierten Segment zu jeder Seite, postulierten (11). Demgegenüber zeigten jedoch Testreihen mit klinischen Isolaten, dass Integrons durchaus verschiedenartige Konfigurationen aufweisen können (18, 19). Somit wurde die Forderung nach einer mehr allgemein gehaltenen Definition laut.

Dies setzt zunächst einmal ein genaueres Verständnis der Genkassetten voraus. Sequenzielle Untersuchungen bezüglich des Aufbaus veranschaulichten, dass diese Strukturen neben dem ORF auch konstant über eine als „59-Basen-Element“ bezeichnete Region verfügen, mit der Funktion einer spezifischen Anheftungsstelle (10). Ferner handelt es sich bei Genkassetten um mobile Einheiten (14), die entweder frei in zirkulärer Form (15) oder nach Insertion innerhalb eines aufnehmenden Integron nachweisbar sind (16). Im Gegensatz zu einer Vielzahl anderer transponierbarer DNA-Elemente besitzen sie weder enzymkodierenden Abschnitte für die Translokation selbst, noch für die Expression der enthaltenen Gene und sind folglich alleine nicht in der Lage den Phänotyp des Rezipiente zu verändern.

Auf Basis dieser Erkenntnisse formulierten Hall und Collis eine strikt funktionelle Integrondefinition. Danach ist ein Integron jede zusammengehörige genetische Einheit innerhalb eines Bakteriengenoms, die über eine spezifische Rekombinationsschnittstelle für den Einbau von Genkassetten und die Enzymausstattung für die Replikation bzw. Expression der jeweiligen Gene verfügt (20). Genkassetten sind insofern nur dann formaler Bestandteil eines Integrons, wenn sie in kovalent gebundener Form im Bereich der spezifischen Insertionsregion in ein Genom integriert sind.

Die moderne Medizin sieht sich heute mit einer rasch zunehmenden Verbreitung von Resistenzen gegenüber einer Vielzahl unterschiedlichster Antibiotika nahezu aller im klinischen Alltag eingesetzten Klassen konfrontiert. Dieses Phänomen ist kaum durch eine unter verändertem Selektionsdruck entstandenen „de-novo-Synthese“ adaptierender mikrobieller Abwehrmechanismen zu erklären. Vielmehr ist ein präexistenter Pool von Resistenzgenen zu postulieren, der Ausdruck einer jahrtausende andauernden Exposition der Prokaryonten gegenüber natürlich vorkommenden Antibiotika darstellt, lange bevor sich der Mensch vergleichbare Substanzen nutzbar gemacht hat. Die Entdeckung der „ancestral chromosomal super-integrans“ (SIs) erbrachte den schlussendlichen Beweis für die Bedeutung des Integron-Systems als maßgeblicher Faktor im Evolutionsverlauf diverser Bakterienspezies (44, 52).

Klinische Studien der zurückliegenden Jahre haben belegt, dass bei Enterobacteriaceae-Stämmen aus europäischen Krankenhäusern eine weite Verbreitung von Integrons anzutreffen ist, vergesellschaftet mit Resistenzen gegenüber mehreren Antibiotikaklassen (21, 22, 23, 24, 25, 26). Die im Rahmen dieser Untersuchungen gemachten Beobachtungen, führten zur Detektion des so genannten „Multi-resistance-integron“ (MRI), dessen Vertreter eine Anzahl von bis zu acht unterschiedlichen kassettenassoziierten Resistenzgenen aufweisen (45). Basierend auf der Homologie der verschiedenen Integrase-Gene, deren entsprechende Translationsprodukte eine 45- bis 58-prozentige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz aufweisen, werden heute fünf unterschiedliche Klassen von Integrons definiert (43).

## 1.1 Ancestral chromosomal Super-Integrans und ihr evolutionsgeschichtlicher Einfluß auf das Bakteriengenom

Sowohl die immense Vielfalt der Genkassetten, als auch die Variabilität in Aufbau und Sequenz der Integrans bzw. ihrer einzelnen Komponenten, legte die Vermutung nahe, dass evolutionsrelevante Ereignisse schon lange Zeit vor der Ära der Antibiotika in Medizin und Tierzucht zur Ausbildung der unterschiedlichen genotypischen Merkmale geführt haben müssen. Mazel et al. und Manning et al. untersuchten die Beziehung zwischen MRI-assoziierten Genkassettenarrangements und einem Cluster von sich wiederholenden Nukleotidabfolgen in *V. cholerae* („VCR`s“, für *V. cholerae* repeated sequence) (46, 47, 48). Dabei ließ sich ein hohes Maß an strukturellen Übereinstimmungen belegen. Weitere Charakterisierungen der VCR-Cluster führten schlussendlich zur Entdeckung eines neuen, innerhalb des chromosomalen *V. cholerae*-Genoms lokalisierten und sich von den bekannten MRI's unterscheidenden Typ von Integron, für den der Begriff „Super-Integron“ (SI) geprägt wurde (46). Diese Region ist 126 Kilobasenpaare groß und beherbergt 214 ORFs mit überwiegend unbekannter Funktion (49, 50). Zwischen den spezifischen Integrasen der MRIs und der des *V. cholerae*-SI besteht ein eindeutiges Verwandtschaftsverhältnis und ihre Aktivität bezüglich des Genkassetten-Rekombinationsvorgangs ist hinreichend bewiesen (13, 51, 52). Eine systematische Suche nach gleichartigen SI-Strukturen belegte deren Bedeutung als einen entwicklungsgeschichtlich alten und unter den prokaryontischen Bakterien weit verbreiteten Mechanismus zur Aquisition neuer Gene bzw. adaptiver Funktionen (52, 53). Sie sind bei Vibronaceae, Shewanellen, Xanthomonaden, Pseudomonaden und Nitrosomonaden zu finden, verfügen alle über die selben generellen Charakteristika und sind hinsichtlich ihrer Entstehung eindeutig auf die Zeit vor der Antibiotikaära zu datieren, da sich entsprechende Sequenzen in Isolaten aus dem 19. Jahrhundert nachweisen ließen (46, 52). Das Ausmaß der Divergenz zwischen den für die jeweilige Integrase kodierenden Genen wird weitestgehend durch den chronologischen Verlauf der phylogenetischen Entwicklung der Bakterienspezies bestimmt. Bei diesem Abschnitt handelt es sich, im Vergleich zu den zumindest partiell durch horizontalen Transfer aquirierten ORFs, um den älteren Bestandteil der genetischen Funktionseinheit. Die SI-Plattform selbst ist nicht als ein mobiles Element zu betrachten (53). Lediglich die enthaltenen Genkassetten werden von den Integrasen als Substrat erkannt und sind somit potentiell transponierbar. Folglich besitzen MRIs und SIs denselben strukturellen Aufbau mit einem für die spezifischen Rekombinationsvorgänge kodierenden Integrase-Gen, gefolgt von einer unterschiedlichen Anzahl Genkassetten (50). Da es sich bei den SIs

offensichtlich um eine entwicklungsgeschichtlich ältere Einheit des Prokaryontengenoms handelt, deutet vieles auf deren Bedeutung als möglicher Progenitor der MRIs hin. Diese Hypothese wird zudem durch die Beobachtung gestützt, dass die assoziierten Integrasen gemeinsam eine Gruppe mit hoher Übereinstimmungsrate bilden, die sich von den übrigen Vertretern der spezifischen Delta-Tyrosin-Rekombinase-Familie abgrenzt. Wahrscheinlich führte der Einbau des Integrasegens zusammen mit der benachbarten *attI*-Schnittstelle in ein Transposon mit ausgeprägtem Mobilitätsverhalten, sowie die anschließende Rekombination mit unterschiedlichen SIs entstammenden Genkassetten zur Etablierung der nun weit verbreiteten Integrons respektive MRIs (52). Somit lässt sich auch erklären, dass die Sequenzen der 59-Basenelemente der SI-vergesellschafteten Genkassetten einen hohen speziesspezifischen Verwandtschaftsgrad aufweisen, diese Homologie hingegen aber bei MRI-ständigen Kassetten in der Regel nicht anzutreffen ist (44, 52).

## **1.2 Insertionskassetten und ihre Bedeutung als mobile genetische Einheit**

### **1.2.1 Allgemeiner struktureller Aufbau der Insertionskassetten**

Die Größe der bekannten Genkassetten variiert erheblich und umfasst ein Spektrum von 262 bis über 1600 Basenpaare (27). Diese Unterschiede sind in erster Linie auf die Länge der enthaltenen Resistenzgene zurückzuführen. In überwiegender Mehrzahl beinhalten die einzelnen Kassetten jeweils ein Resistenzgen, meist auch kurze, nicht kodierende flankierende Sequenzabschnitte und eine spezifische Anheftungsregion, die als 59-Basen-Element bezeichnet wird (10). Dieser Terminus kann wörtlich genommen zu Unklarheiten führen, da es sich hierbei nicht um einen hochgradig konservierten Abschnitt handelt, sondern die einzelnen Elemente sowohl unterschiedliche Längen, zwischen 57 und mehr als 140 Basenpaare, aufweisen, als auch keine durchgehend einheitliche Sequenz erkennbar ist. Bestimmte strukturelle Übereinstimmungen der jeweiligen Region erlauben dennoch eine eindeutige Zuordnung (6, 10, 15, 27). Abweichend von den vorausgehenden Ausführungen ist zu erwähnen, dass in anderen Fällen anstelle eines einzelnen Antibiotikaresistenz-kodierenden Gens auch „open reading frames“ (ORFs) mit bisher noch nicht geklärter Funktion oder selten sogar zwei potentiell kodierende Abschnitte innerhalb einer Genkassette detektiert wurden (10, 17, 28, 29). Möglicherweise entstehen solche „Fusionskassetten“ durch ein zwei unmittelbar benachbarte Kassetten innerhalb eines Integrons betreffendes Deletionsereignis,

wobei bisherigen Beobachtungen entsprechend im Anschluss häufig mindestens eines der involvierten Gene nur noch unvollständig vorliegt (17). Daneben wurden auch Insertionskassetten mit zwei aneinandergrenzenden, komplett erhaltenen kodierenden Abschnitten gefunden, so dass diesbezüglich der komplette oder unvollständige Verlust des dem 5'-Ende nächsten 59-Basen-Elementes, zum Beispiel während der DNA-Replikation oder durch ein Crossover-Ereignis zwischen alternativen Lokalisationen innerhalb der Rekombinationsschnittstellensequenz, anzunehmen ist (28, 29, 60, 61).

Originär liegen Genkassetten nach Exzision aus einem Integron als freies, durch kovalente Bindung der beiden entstandenen Enden geschlossenes, zirkuläres Molekül vor. Ausschließlich in dieser Konfiguration ist das 59-Basen-Element ungeteilt (10, 15). Die zirkuläre Form ist als wichtiges Intermediärprodukt für die Dissemination des genetischen Materials, insbesondere unter dem Gesichtspunkt der Verbreitung von Antibiotikaresistenzen, zu sehen. Zusätzlich bedeutsam ist der Umstand, dass eben diese relativ kleinen Moleküle in einer extrazellulären Umgebung deutlich stabiler sind als beispielsweise die deutlich größeren Plasmide (15). Insofern erhöht sich die Wahrscheinlichkeit noch intakt von einem anderen Bakterium inkorporiert zu werden und anschließend, bei Präsenz der erforderlichen Ausstattungsmerkmale, eine Alteration der phänotypischen Eigenschaften des Rezipienten zu bewirken.

Kommt es zur Insertion einer Genkassette unter Einbeziehung der spezifischen Rekombinationsschnittstelle eines Integron, so wird zunächst enzymatisch die Ringform gespalten und das Molekül, nun linear konfiguriert, mittels Integrase am vorgesehenen Platz eingefügt. Untersuchungen zur genauen Determination des Rekombinations-Crossover-Punktes haben belegt, dass in diesem Fall das kassettenassoziierte 59-Basen-Element fraktioniert vorliegt. Ein verhältnismäßig kurzer Abschnitt geht der genkodierende Region in 5'-Richtung voraus, der verbleibende Teil folgt strangabwärts (10, 11, 30).

Fast ausschließlich beträgt der Abstand zwischen dem Startkodon für die Gentranskription und dem vorausgehenden Kassettenende weniger als neun Basen. Folglich verfügen Genkassetten in der Regel nicht über eine eigene Promotorsequenz und sind daher zur Expression der enthaltenen Gene auf eine entsprechende Ausstattung des unmittelbar angrenzenden Genomabschnittes angewiesen, wie es zu Beispiel beim 5'-konservierten-Segment eines Integrons der Fall ist. Bisher existieren diesbezüglich lediglich wenige Ausnahmen, darunter die das *cmIA*-Gen enthaltende Kasette (31). Meist befindet sich zwischen dem terminalen Kodon der Cistronregion und dem strangabwärts gelegenen Teil des

59-Basen-Elementes keine oder nur eine sehr kurze nicht-kodierende Sequenz. Bisweilen erstreckt sich der Transkriptionsrahmen sogar bis in das 59-Basen-Element hinein (10).

Die richtige Ausrichtung der Genkassetten innerhalb eines Integrons ist festgelegt, d. h. die inverse Core-Region mit dem nachfolgenden Rest der kassettenassoziierten Rekombinationsschnittstelle liegt in 3'-Richtung von der kodierenden Sequenz (14, 16) aus gesehen. Nur so kann die Expression des transponierten Gens durch einen vorgeschalteten Promotor gewährleistet werden (10, 11). Es sollte jedoch an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben, dass eine zunehmende Anzahl von Insertionskassetten ihren eigenen Promoter enthalten und/oder eine gegensätzliche Orientierung im Bezug auf das zugehörige 59-Basen-Element aufweisen (43).

### 1.2.2 Die kassettenassoziierte Rekombinationsschnittstelle

Vergleichende Untersuchungen von Cameron et al. enthüllten erstmals, dass sich bei Genen, die als Bestandteil von Integrons angetroffen werden, regelhaft in 3'-Richtung an die Cistron-Region eine sich nicht ganz vollkommen in umgekehrter komplementärer Reihenfolge wiederholende Nukleotidabfolge („imperfekt inverted repeats“) anschließt (6, 8, 9, 13, 32, 34). Die entsprechenden Genomabschnitte unterschieden sich sehr wohl hinsichtlich Länge und Sequenz, dennoch konnte für 59 Basen ein gemeinsamer Konsensus formuliert werden, der schließlich Namen gebend für diese Region wurde (6). Neuere Publikationen verwenden hierfür auch die Bezeichnung *attC* (Attachment)-Schnittstelle in Anlehnung an die analoge *attI*-Struktur der Integron-Plattform. Zwischenzeitlich stellte sich heraus, dass auch 59-Basen-Elemente mit deutlich längeren „imperfect inverted repeats“ (bis über 140 Basenpaare) existieren. Trotz der Heterogenität verfügen jedoch alle Vertreter dieser Region über eindeutige Merkmale, die eine sichere Zuordnung erlauben (10, 15). So findet sich konstant, als die den kodierenden Abschnitt in 3'-Richtung begrenzende Struktur, die hochgradig konservierte so genannte inverse Core-Region mit der Sequenz RYYAAC und strangaufwärts, der Gensequenz vorausgehend, die Core-Region mit der Abfolge GTTRRRY [„R“ steht für Purinbasen (Adenin und Guanin), „Y“ steht für Pyrimidinbasen (Cytosin und Thymin)] (6, 8-11, 13, 32, 34). Lediglich in der freien zirkulären Ringform der Genkassette liegt das 59-Basen-Element ungeteilt vor (10, 15). Kommt es zum Einbau in ein Integron, so erfolgt die Aufspaltung innerhalb der Core-Sequenz, was zu Folge hat, dass die so entstandenen „Core-Fragmente“ die äußeren Begrenzungen der nun linearen Insertionskassette bilden (10, 27). Jeweils die zirka ersten und letzten 20 Basen, die von der

inversen Core-Region und dem am weitesten in 3'-Richtung gelegen kassettenassoziierten Core-Rest eingerahmt werden, unterliegen gleichfalls einem einheitlichem Konsensus (15). Dazwischen ist ein bezüglich Länge und Sequenz variabler Abschnitt, bestehend aus inverted repeats, lokalisiert. Die meisten 59-Basen-Elemente besitzen daher folglich eine zentrale Symmetrieachse (27). Ferner kann es in eben diesem Bereich, aufgrund polarisierender Wechselwirkungen zwischen den Purin- und Pyrimidin-Derivaten, nach der Transkription zur Ausbildung schleifenartiger Formationen (Stamm-Schleife-Strukturen [stem-loop-structures]), entsprechend einem rho-unabhängigen Transkriptionsterminator kommen und auf diese Weise Einfluss auf die Expression weiter strangabwärts gelegener Gene genommen werden (10, 41, 43).

Die bereits oben erwähnten Konsensusregionen entsprechen in ihrem Aufbau einfachen Erkennungsstrukturen, wie sie auch von anderen Integrasen verwendet werden. Jede dieser beiden so genannten „simple-sites“ setzt sich aus einem Paar spiegelbildlich ausgerichteter integrasebindender Domänen, repräsentiert durch die sieben basenpaargroße Core- bzw. inversen Core-Sequenz und den dazugehörigen Gegenpart, zwischen denen jeweils ein 7-8 Basenpaare umfassender „Spacer“ liegt, zusammen (59). Folglich partizipiert an der weiter strangabwärts gelegenen Bindungsstelle bei integronassoziierten Genkassetten das nachfolgende 59-Basenelement oder das 3'-konservierte Segment der Integronplattform.

Die *attC*-Elemente lassen sich teils zu mehreren strukturverwandten Gruppierungen zusammenfassen, deren Mitglieder jedoch mit vollkommen unterschiedlichen Resistenzgenen vergesellschaftet sind. Es wurden aber, trotz häufig weitestgehend gleicher Sequenzen innerhalb der einzelnen Gruppen, bisher noch keine vollständigen Übereinstimmungen gefunden (20, 27). Die Begründung für dieses Phänomen lieferte erst die Entdeckung der chromosomalen Super-Integrone.

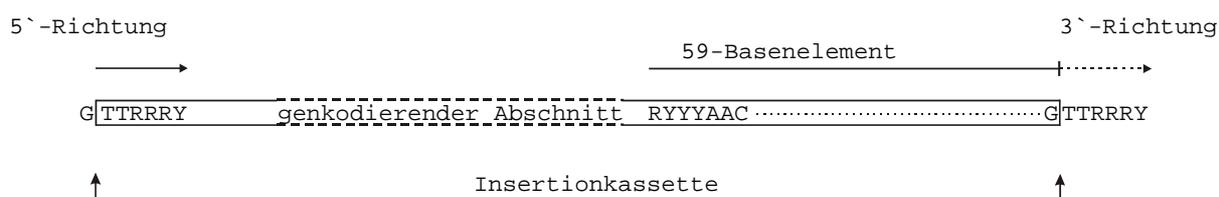
Weiterführende Studien belegten die schon frühzeitig von diversen Autoren geäußerte Vermutung, dass die 59-Basen-Elemente für den Insertionsprozess von genetischem Material in ein aufnehmendes Genom von besonderer Bedeutung sind (6, 11, 32, 33).

Martinez und de la Cruz bewiesen schließlich die zwingende Notwendigkeit der Präsenz eines *attC*-Elementes für die integronassoziierten transpositionellen Rekombination (13).

Wie bereits oben erläutert ist innerhalb der Core-Sequenz lediglich die Basenabfolge GTT immer exakt konserviert (10). Nachfolgend stellte sich heraus, dass in dieser Region der Kontakt des aufnehmenden Integrone mit dem 5'-Ende der zu integrierenden Genkassette in linearer Ausrichtung bzw. von zwei benachbarten Genkassetten genau zwischen dem „G“ und dem ersten „T“ statt findet (35). Der Einfachheit halber wird das strangaufwärts von der

kodierenden Region gelegene Core-Segment dennoch insgesamt als kassettenassoziiert betrachtet (20). Kommt es zum Einbau nur einer Genkassette, so schließt sich in 3'-Richtung das konservierte Integronende, beginnend mit der Sequenz TTRRRY, an (35). Folglich ist hier der zweite, strangabwärts gelegene Cross-over-Punkt lokalisiert und das terminale Nukleotid des 59-Basen-Elementes in dieser Ausrichtung trägt eine Guanin-Base.

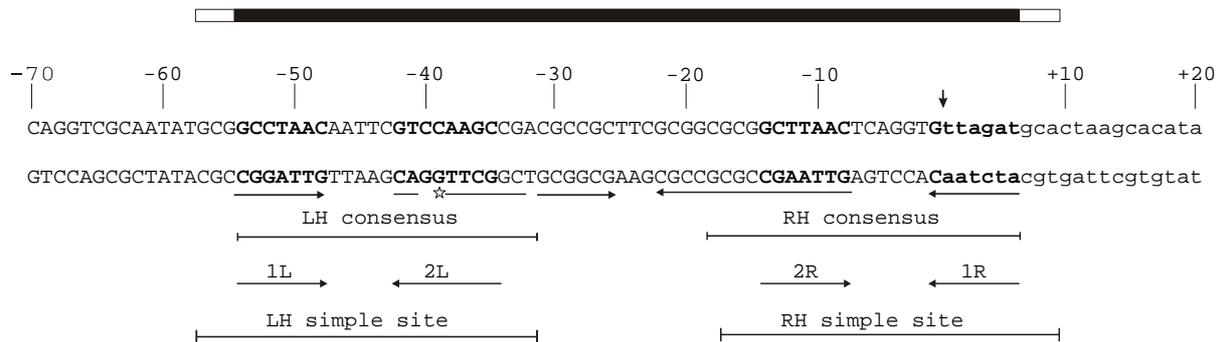
Abb. 1) Begrenzung der Insertionskassetten



Vertikale Pfeile markieren den genauen Ort des „Rekombinations-Cross-overs“. Die durchgezogene Linie und der durchgezogene Pfeil entsprechen der Ausdehnung des 59-Basenelementes der hier dargestellten Genkassette. Der gestrichelte Pfeil zeigt die zur Komplettierung der in 3'-Richtung gelegenen Core-Sequenz erforderlichen Nukleotide der angrenzenden Struktur an. Die gestrichelte Linie repräsentiert die Zentralregion des 59-Basenelementes.

Im Fall, dass mehrere Kassetten eingefügt werden, können an den beschriebenen Verknüpfungsvorgängen sowohl das 5'- oder das 3'-konservierte Segment der Integron-Plattform, als auch nur die 59-Basen-Elemente untereinander partizipieren. (10, 13, 20, 21, 27, 36). In seiner simpelsten Form, vorausgesetzt die Genkassetten liegen als freies ringförmiges Aggregat vor, wird für den Insertionsprozeß nur ein einziges spezifisches enzymvermitteltes Rekombinationsereignis zwischen wirtsseitiger *attI*-Region des Integrons und der Schnittstelle des zu transponierenden DNA-Abschnitts benötigt (10, 16, 34). Eine spätere Exzision ist unter diesen Umständen als reziproker Vorgang zu verstehen (14, 15, 37). Allerdings ist anzumerken, dass offensichtlich bei bereits integronassoziierten Genkassetten unter Umweltbedingungen alternative Routen unter Einbeziehung von zwei ortsspezifischen Rekombinationsereignisse für die Akquirierung und Deletion von Genen vorrangige Bedeutung besitzen (20).

Die Determination der Ausrichtung beim Einbau der Insertionskassette erfolgt nach heutigem Kenntnisstand anhand der nicht spiegelbildlich komplementären Basen innerhalb der inverted-repeats des 59-Basen-Elements (10).

Abb. 2) Die *aadB/qacE* 59-*be* Rekombinationsabschnitt

Die Abbildung zeigt die Rekombination zweier *attC*-Schnittstellen benachbarter, integronassoziierter Genkassetten. Der zur weiter in 3'-Richtung gelegenen *qacE*-Kassette gehörende Sequenzabschnitt ist in kleingeschriebenen Buchstaben dargestellt. Die Ausdehnung der Konsensusregion und der dazwischen liegenden „inverted-repeats“ wird durch den ausgefüllten Balken angezeigt. Weitere an der Erkennung durch die IntI1-Integrase potentiell beteiligte Basen sind von dem nicht geschwärzten Balken überdeckt (74). Nukleotidabfolgen, die sich von der 7 bp-großen Core-Region herleiten lassen sind in dicker Schrift dargestellt (1L, 2L, 2R, 1R) und ihre relative Orientierung wird durch horizontale Pfeile angezeigt. Ebenfalls ist die Ausdehnung der „simple-sites“ erkennbar. Die Rekombination-Cross-over-Stelle wird von einem vertikalen Pfeil markiert. „Inverted-repeats“ sind von teils unterbrochene Pfeilen unterlegt und der Stern zeigt die Position eines zusätzlichen „C“ in 2L im Vergleich zu 2R an. Ebenfalls ist die exakte Ausdehnung der von Stokes et al. 1997 definierten LH- und RH-Konsensusregion erkennbar.

### 1.2.3 Alternative Lokalisationen von Genkassetten innerhalb eines Genoms

Integrierte Genkassetten müssen nicht immer als Bestandteil eines Integrons vorkommen. Wenn auch gegenwärtig nur eine geringe Anzahl von Beschreibungen vorliegt, so ist doch auch eine durch Integrasen katalysierte transpositionelle Rekombination zwischen dem kassettenassozierten 59-Basen-Element und einem sekundären, unspezifischen Genomort möglich (38-40). Diesbezüglich wurde bisher regelhaft als Schnittstellen-Konsensus die Basenabfolge GNT (Gt/aT, Ga/tTNa/t) detektiert (20, 38, 39). Weil Gene, die auf diese Weise akquiriert wurden, nicht von zwei voll aktiven wirtsseitigen Schnittstellen flankiert sind, ist die Wahrscheinlichkeit der späteren Exzision trotz möglicherweise in Nachbarschaft vorhandener, für eine Integrase/Resolvase kodierende Sequenzabschnitte äußerst gering (40). Folglich führen solche Ereignisse zum dauerhaften Erwerb neuen genetischen Materials. Ob

hierdurch eine Änderung des Phänotyps erzielt wird, ist von der Präsenz einer für die Genexpression erforderlichen Ausstattung des Wirtsgenoms abhängig.

Es ist anzunehmen, dass solch Vorkommnisse sowohl für die Dissemination von kassetten-assoziierten Genen, als auch für die Evolution von Plasmiden und prokaryontischen Chromosomen bedeutungsvoll sind (38, 39).

## **1.3 Die Bedeutung der Integron-Plattform als Genaquisitions- und – expressions-System**

### **1.3.1 Allgemeiner Struktureller Aufbau der Integron-Plattform**

Innerhalb des Bakteriengenoms kommt den Integrons die Aufgabe der Erkennung, Aquisition und anschließenden Expression neuer gentragender DNA-Abschnitte zu. Durch diese Möglichkeit des Erwerbs zusätzlicher adaptiver Funktionen wird dem Mikroorganismus ein Selektionsvorteil verschafft. Nicht jedes Integron muss daher immer über eine oder mehrere Genkassetten verfügen. Kommt es jedoch zu deren Einbau im Bereich der Insertionsregion, sind sie definitionsgemäß als formaler Integronbestandteil zu betrachten (20).

Jede Integron-Plattform, unabhängig davon ob sie Bestandteil des chromosomalen Bakteriengenoms oder einer mobilen Genstruktur ist, verfügt über konstante, diese einzigartige genetische Funktionseinheit determinierende Ausstattungsmerkmale. Zentrales Element ist der zur spezifischen Rekombination von adaptive Eigenschaften enthaltenden Genkassetten bestimmte Abschnitt, der zu beiden Seiten von je einem konservierten DNA-Segment, nach der räumlichen Orientierung mit 5'- und 3'- benannt, eingefasst wird. Da ursprünglich als einzige sich identisch wiederholende Sequenz an den äußeren Grenzen der Insertionsregion „GTTRRRY“ gefunden wurde, sprach man dieser nun „core-site“ genannten Basenabfolge die Bedeutung der integroneigenen Schnittstelle zu (11). Nachfolgen konnte jedoch gezeigt werden, dass der exakte Crossover-Punkt zwischen „G“ und „T“ lokalisiert ist und daher beide Reaktionspartner am Zustandekommen dieses Abschnitts beteiligt sind (35).

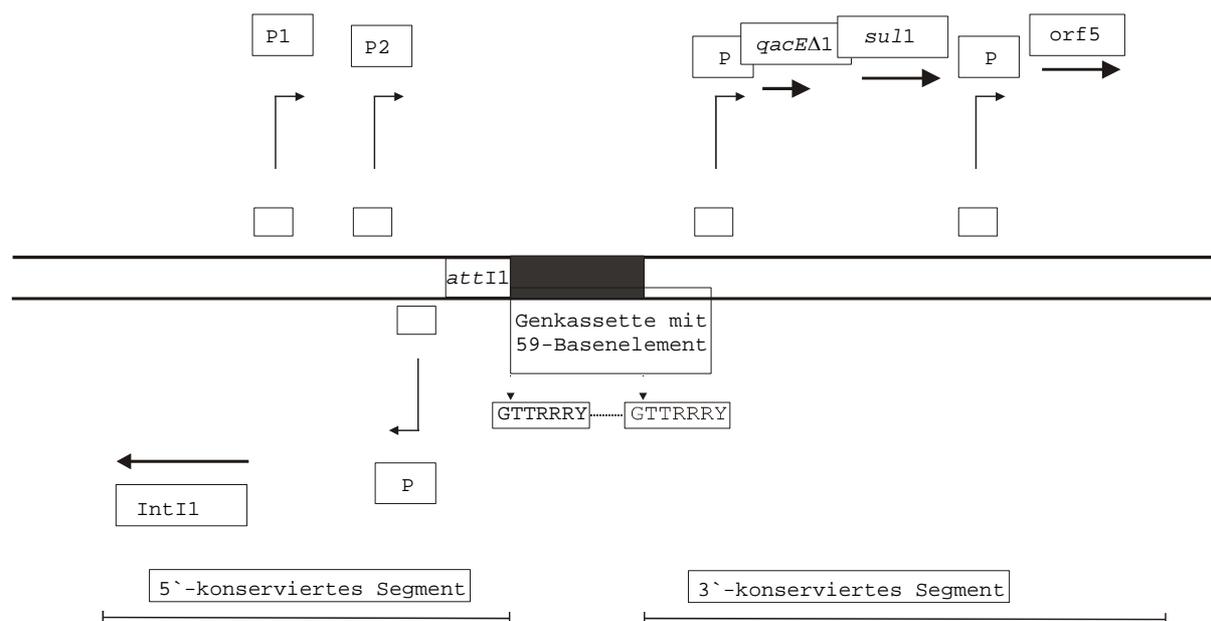
Die Organisation des 5'-konservierten Segment (CS) umfasst neben dem Integrasegen auch eine Promotorregion als Bindungsstelle für die Polymerase zur Expression der nachgeschalteten Strukturgene, sowie den Großteil der spezifischen integronseitigen Rekombinationsschnittstelle (*attI*) (20, 41, 62). Strangabwärts folgt dem Insertionsbereich schließlich das 3'-CS, beginnend mit der formal noch zur *attI*-Region zählenden Sequenz

„TTRRRY“ (35). Sich anschließende weitere Merkmale divergieren je nach Klassenzugehörigkeit des betreffenden Integrons respektive dessen Assoziation mit einem Transposon oder Transposonrest. So ist z.B. das für eine Antibiotikaresistenz gegenüber Sulfonamiden kodierende Gene „*sulI*“ fast immer als Bestandteil des 3'-CS von Klasse 1 Integrons anzutreffen (18, 19, 27). Die vermittelte phänotypische Eigenschaft lässt sich daher bei Screeninguntersuchungen als Surrogatmarker einsetzen. Die Einteilung der Integrons in aktuell fünf verschiedene Klassen basiert auf der Homologie der Integrasesgene, deren Identität untereinander zwischen 45-58% beträgt (43). Es ist jedoch davon auszugehen, dass in Zukunft die Diversität noch zunehmen wird.

Bei multiresistenten Bakterienpopulationen lassen sich überwiegend Klasse-1-Integrons nachweisen, denen daher auch die größte klinische Bedeutung zuerkannt wird (63).

Obwohl die grundlegende evolutionäre Bedeutung des Integronsystems gerade in der Aquirierung neuer adaptiver Funktionen jenseits der eigenen phylogenetischen Entwicklung des jeweiligen Bakteriums zu sehen ist, sollte an dieser Stelle dennoch nicht unerwähnt bleiben, dass neuere Studien die vorrangige Bedeutung des Transfers vollständiger Integrons oder zumindest größerer hochgradig konservierter Abschnitte zwischen Vertretern einer oder verschiedener Spezies gegenüber dem integrasekatalysierten Austausch einzelner Insertionskassetten vermuten lassen (24).

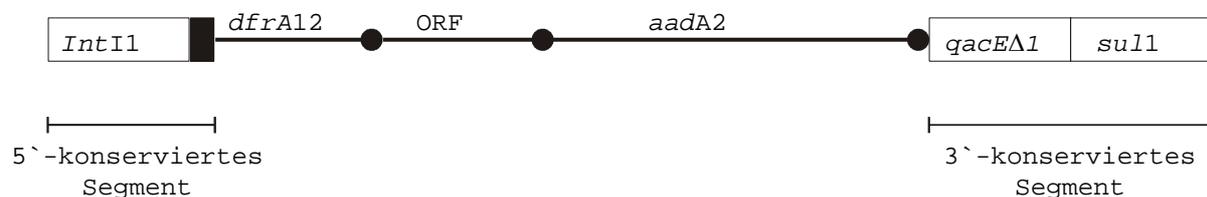
Abb.3) Allgemeine Struktur eines Klasse 1 Integrons



P, P1 und P2 bezeichnen Promotorsequenzen. Anhand der horizontalen Pfeile ist die Leserichtung der einzelnen DNA-Abschnitte ersichtlich. *AttI1* repräsentiert die

Rekombinationsschnittstelle der Integron-Plattform, *IntI1* die kodierende Region für die spezifische Integrase. Die vertikalen Pfeile zeigen die „Cross-over-Punkte“ an. *qacEΔ1* (antiseptische Resistenz gegenüber quaternären Ammoniumverbindungen) und *sul1* (Sulfonamidresistenz) sind Resistenzgene, die zusammen mit dem „orf5“ (open-reading-frame) typischerweise in dieser Anordnung bei der *Tn21*-Transposon-Familie angetroffen werden.

Abb. 4) Schematische Darstellung eines Klasse-1-Integrans mit drei assoziierten Insertionskassetten



Die Kästchen repräsentieren die Bestandteile der Integron-Plattform. Das ausgefüllte Rechteck entspricht dabei der *attI1*-Schnittstelle, *IntI1* dem für die spezifische Integrase kodierenden Sequenzabschnitt. Die geschwärtzten Kreise markieren die 59-Basenelemente. *dfrA12* und *aadA2* sind typische Resistenzgene, „ORF“ steht für den nicht näher spezifizierten Open-reading-frame einer Genkassette.

### 1.3.2 Beschreibung der Integrasegene und Integronklassen

Wie schon erwähnt sind bisher fünf unterschiedliche, jedoch miteinander verwandte Integrasegene, identifiziert worden (43). Sie alle gehören zu der Tyrosin-Rekombinase-Familie (64). Jedes dieser einzelnen Integrasegene definiert eine eigene Integronklasse. Das Genprodukt, also das Integraseenzym, katalysiert die ortsspezifischen Rekombinationsvorgänge der Integron-Plattform mit den Genkassetten. Da dem Enzym sowohl die Eigenschaften einer Integrase, als auch einer Resolvase innewohnen, kann hierdurch entweder die Aquisition oder die Deletion von Genen generiert werden, je nachdem ob gerade ein Insertions- oder Exzisionsprozeß erfolgt (13, 39, 51). Gegenüber der zur Expression der Genkassetten erforderlichen allgemeinen Promotorregion ist der integrasekodierende DNA-Abschnitt, einschließlich der eigenen Promotorsequenz, auf dem komplementären Strang lokalisiert (90).

Die Klasse-1-Integrone stellen die mit Abstand häufigste Gruppe dieser genetischen Funktionseinheiten dar und stehen folglich auch im Fokus der meisten wissenschaftlichen Untersuchungen in diesem Bereich. Die für die Integrase kodierende *intI1*-Sequenz fand sich schon in frühen Studien fast immer mit dem *suI1*-Resistenzgen vergesellschaftet. Nachfolgend wurde schließlich die Hypothese belegt, dass die Klasse-1-Integrone mit der Tn21-Transposon-Familie assoziiert anzutreffen sind (63). Insofern erklärt sich auch die Verknüpfung mit der Sulfonamidresistenz, da das entsprechende Gen ebenfalls als konservierte Struktur im Tn21-Transposon und bei nahen Verwandten nachgewiesen werden kann.

Die *intI1*-Integrase erkennt als Substrat sowohl das 59-Basenelement der Insertionskassetten, als auch die *attI*-Schnittstelle. Folglich sind drei integrative oder exzise Rekombinationsmöglichkeiten gegeben: *attI* X *attI* (65, 66), *attI* X 59-Basenelement (13, 39, 51) und 59-Basenelement X 59-Basenelement (10, 13, 59). Daneben wird, wenn auch mit deutlich niedriger Frequenz, die Generierung oder Auflösung von Kointegraten unter Einbeziehung eines sekundären Genomortes und einer der beiden spezifischen Anheftungsstellen katalysiert (38, 39, 59, 66, 67). Beobachtungen von Collis und Kollegen zeigten jedoch eine eindeutige Präferenz für die Rekombination der *attI*-Schnittstelle mit dem 59-Basenelementen (16, 39, 59). Demzufolge werden neue Genkassetten bevorzugt in erster Position in die Klasse-1-Integrone eingebaut, mit der höchst möglichen Wahrscheinlichkeit auch anschließend exprimiert zu werden.

Eine weitere Besonderheit der *intI1*-Integrase-vermittelten Rekombination ist, dass obwohl zwei Doppelstrang-DNA-Moleküle in den Vorgang involviert sind, es dennoch nur zum Austausch eines Einzelstranges kommt. Das Produkt enthält dann eine so genannte „Holliday junction“, die anschließend durch nachfolgende Bearbeitungsvorgänge, wie unter anderem Replikation oder die Aktivität einer Holliday-junction-Resolvase, wieder aufgelöst wird (59). Die Klasse-2-Integrone sind assoziiert mit der Tn7-Transposon-Familie (68). Das definierende *intI2*-Integrasegen stellt eine Variante des *intI1*-Genes dar und wird von einem Terminations-Codon unterbrochen. Die Homologie des Genproduktes zur *intI1*-Integrase beträgt 40% (7, 27).

Bisher wurde nur ein Exemplar der Klasse-3-Integron-Plattform innerhalb eines großen Plasmids eines *Serratia marcescens*-Stammes identifiziert. Die durch die entsprechende Sequenz des 5'-CS kodierte *intI3*-Integrase ist zu 61% mit der *intI1*-Integrase identisch (69).

Klasse-4-Integrone werden als Komponente der SXT-constin-Struktur, einem conjugative self-transmissible integrating element von *Vibrio cholerae*, angetroffen (70, 71).

Sequenzanalysen legen nahe, dass in dem Fall ein Kointegrat aus einem Integronrest und dem bereits residenten *Constin*, resultierend aus einem Integrase-vermittelten Rekombinationsvorgang zwischen der *attC*-Region der am weitesten in 3'-Richtung gelegenen Genkassette und einer sekundären Schnittstelle innerhalb dieses speziellen, potentiell mobilen Elementes, anzunehmen ist (72).

Eine fünfte eigenständige Integronklasse wurde kürzlich auf dem Plasmid pRVS1 eines *V. salmonicida*-Stammes detektiert (43).

Klasse-4 und -5-Integrone zeichnen sich durch eine weitere strukturelle Besonderheit aus. Sie verfügen jeweils nur über eine Antibiotikaresistenz-kodierende Genkassette, gefolgt von einer Anzahl weiterer Kassetten, deren ORFs in keinerlei Zusammenhang mit Resistenzeigenschaften zu bringen sind (43).

### **1.3.3 Die Promotorregion und weitere Faktoren der Expression kassettenassoziierter Gene**

Da die Genkassetten bis auf wenige Ausnahmen über keinen eigenen Promotor verfügen, sind sie bezüglich der Expression der enthaltenen Gene nach dem Insertionsprozeß auf eine entsprechende Ausstattung des vorausgehenden Genomabschnitts angewiesen. Jedes Integron erfüllt per definitionem diese Forderung. Die Promotorregion ist im 5'-CS, strangaufwärts von der *attI*-Schnittstelle lokalisiert (11, 13, 20). Sie ist damit geeignet eine gemeinsame Transkription sämtlicher kassettenassoziierter Cistrons in der Reihenfolge ihrer Position innerhalb des Integrone zu steuern. Dabei ist zu beachten, dass die Beschaffenheit der *attC*-Elemente mit teilweise enthaltenen Terminations-Codons oder vergleichbaren Strukturen, wie zum Beispiel stem-loop-structures, zu einem vorzeitigen mRNA-Synthesestop führen kann und folglich die Expressionswahrscheinlichkeit mit zunehmender Entfernung von der *attI*-Schnittstelle kleiner wird (41). Bei sich lediglich hinsichtlich der Reihenfolge ihrer Insertionskassetten unterscheidenden Integrone, variiert daher dennoch die Transkriptionsrate der einzelnen Gene mit entsprechender Auswirkung auf die phänotypischen Eigenschaften (41).

Die Promotorregion der Klasse-1-Integrone verfügt konstant über einen Sequenzabschnitt, der als P1-Promotor fungiert. Hiervon existieren insgesamt vier unterschiedlich Varianten, die sich im Bezug auf die Transkriptionseffizienz deutlich unterscheiden (17, 41). Der stärkste Promotor besitzt eine sechsmal größere Effizienz im Vergleich zum abgeschwächten *tac*-Promotor von *Escherichia coli* (41). Die schwache Variante weist hingegen eine geringere

Effizienz als dieser *tac*-Bezugspromotor auf. Daneben sind noch zwei Hybridformen mit intermediärer Potenz bekannt (17, 41). Bei einigen Klasse-1-Integrans ließ sich 119 Basenpaare weiter strangabwärts gelegen die Insertion von drei Guanosinmolekülen im Sequenzbereich zwischen -35 und -10 feststellen, wodurch ein zweiter, P2 genannter Promotor generiert wird. Diesbezüglich bestehen zwei Ausprägungen, eine aktive und eine inaktive Form. Findet sich die schwache P1-Variante, so ist sie mit dem aktiven P2-Promotor vergesellschaftet, der in dieser Konstellation zum Hauptpromotor wird (17, 24, 41, 62). Durch den Synergismus wird die Gesamteffizienz auf das Dreifache des *tac*-Promotors angehoben (41).

Insgesamt ist daher festzuhalten, dass die Gentranskription beeinflusst wird durch die Position der entsprechenden Insertionskassette innerhalb eines Integrans, die Beschaffenheit der vorgeschalteten 59-Basenelemente und die Promotorsequenz. Unter klinischen Gesichtspunkten sind somit auch sensible Mikroorganismen als mögliche genetische Quellen für eine Resistenzentwicklung gegenüber relevanten Antibiotika zu betrachten, bedingt durch die Möglichkeit des integrasekatalysierten Kassetten-Rearrangements oder durch Mutationen und Austausch innerhalb der Regulatorsequenzen (43).

Auch auf der Ebene der Translation lässt sich eine funktionelle Abhängigkeit der Insertionskassetten von der Integronplattform erkennen. Aufgrund ihrer Kompaktheit verfügen nicht alle Genkassetten über eine erkennbare „translation initiation region“ (TIR) (43). Da es in solchen Fällen, vorausgesetzt der Einbau in ein Integron erfolgt in erster Position, dennoch zur Genexpression kommt, ist die Existenz einer externen TIR zu postulieren. Hanau-Bercot et al. detektierten im äußersten 3'-Ende des 5'-CS von Klasse-1-Integrans eine kurze Sequenz (ORF-11), die eine translationsmodulierende Funktion besitzt. Weitere Untersuchungen belegten schließlich die Abhängigkeit der Translation des kodierenden Abschnitts TIR-loser Genkassetten von der Translation des ORF-11, nicht jedoch von dessen korrespondierendem Peptid (73).

### **1.3.4 Definition der attI1-Rekombinationsschnittstelle von Klasse-1-Integrans**

Wie schon erwähnt erkennen die integrankodierten Integrasen sowohl die 59-Basenelemente, als auch die größtenteils im Bereich des terminalen 5'-CS der Integron-Plattform gelegene *attI*-Region als spezifisches Substrat. Diese zwei Rekombinationsschnittstellen unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihres strukturellen Aufbaus. Verfügen die kassettenassoziierten 59-

Basenelemente im Bereich beider äußerer Begrenzungen über jeweils eine „simple-site“, bestehend aus einem Paar invers ausgerichteter, integrasebindender Domänen und einer dazwischen liegender 7 bis 8 Basenpaare umfassende „Spacer-Sequenz“ (59), so beinhaltet lediglich das 3'-Ende der *attI*-Schnittstellen von Klasse-1-, -2- und -3-Integrans eine potente „simple-site-Region“ (51, 60, 74). Bei Klasse-4-Integrans konnte bisher selbst dieses Ausstattungsmerkmal nicht detektiert werden (60). Strangaufwärts wird die *attI1*-Schnittstelle komplettiert durch zwei, aufgrund ihrer Übereinstimmungen mit der Core-Struktur hinsichtlich Sequenz und Orientierung, als „Direct-repeats“ bezeichnete Regionen, die weitestgehend identisch mit zwei zusätzlichen Integrasebindungsstellen sind (51, 74). Insgesamt können somit zeitgleich vier Enzymmoleküle gebunden werden. Die eigentliche Funktion der zwei zusätzlichen Bindungsdomänen besteht darin, die IntI1-Integrasen in der Nähe der „simple-site“ zu halten und dadurch die Frequenz der Rekombinationsereignisse zu erhöhen (74, 75). Aktuelle Studien zur exakten Bestimmung der minimalen erforderlichen Länge der *attI1*-Schnittstelle bei gleichzeitiger Beibehaltung der vollen Effizienz im Bezug auf die Fähigkeit der Generierung von Kointegraten mit potentiellen Reaktionspartnern, determinierten die am weitesten in 5'-Richtung gelegene Domäne als schwache IntI1-Bindungsstelle, die weiter strangabwärts lokalisierte als starke IntI1-Bindungsstelle (51, 74). Der aus biologischer Sicht wichtigste Rekombinationsvorgang *attI1* X 59-Basenelement (*attC*), zur Einschleusung neuer Genkassetten in ein Integron, ist 100-fach effizienter als die Verknüpfung von zwei *attI*-Regionen miteinander, vorausgesetzt, die Rekombinationsschnittstelle der Integron-Plattform umfasst mindestens 65 Basenpaare und damit sowohl die zwei IntI1-Bindungsdomänen der „simple-site“, als auch die beiden weiteren Enzym-Bindungsstellen (39, 60, 74, 75). Fehlt die „schwach“ IntI1-Bindungsstelle, so reduziert sich bei der Reaktion *attI1* X *attC* die Rekombinationsfrequenz um das 10-fach, der zusätzlich Verlust der „starken“ IntI1-Bindungsstelle bewirkt schlussendlich einen weiteren Aktivitätsrückgang um das 25-fache des Ausgangswertes (60). In diesem Szenario hat die *attI1*-assoziierte „simple-site“ alleine keine entscheidende Bedeutung für die Effizienz des Rekombinationsverhaltens, wohl aber dient sie als potente IntI1-Integraserkennungsregion, was sich aus der Rekombinationspräferenz gegenüber verfügbaren sekundären, unspezifischen Schnittstellen ableiten lässt, wenn der Reaktionspartner ein 59-Basenelement ist (60). Zudem liegen Determinanten für die korrekte Orientierung der beiden am entstehenden Kointegrat partizipierenden Strukturen innerhalb dieser „simple-site-Region“ (60).

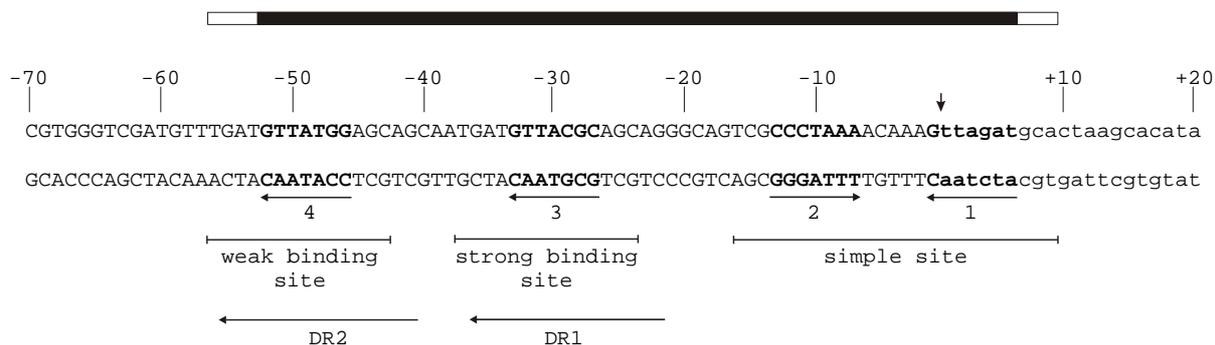
Nachfolgend wurde das weitaus selteneren *attI1* X *attI1*-Rekombinationsereignisses untersucht. Hierbei zeigte sich, dass ausschließlich die „*attI1*-simple-site“ zur Gewährleistung einer maximalen Effizienz erforderlich ist und folglich die zusätzlichen *IntI1*-Integrasebindungsstellen diesbezüglich nicht von zusätzlichem Nutzen sind (60, 66). In einer Versuchsanordnung von Partridge et al. wurde in diesem Zusammenhang die Rekombinationsfrequenz eines entsprechend kleinen *attI1*-Fragmentes mit einer vollständigen *attI1*-Region oder alternativ die einer ebenfalls kompletten *attI1*-Schnittstelle mit einem sekundären Genomort auf einem Vektorplasmid untersucht. Dabei kam es im erstgenannten Fall mit einer 65-fach höheren Frequenz zur Bildung von Kointegraten (60).

An der am weitesten in 3'-Richtung gelegenen *IntI1*-Integrasebindungsdomäne der „simple-site-Struktur“ ist die die Insertionsregion des Integrons einleitende Core-Sequenz beteiligt. Folglich kommt es hier bei einem Rekombinationsereignis zum „Cross-over“, so dass der überwiegende Anteil der dem Core-Konsensus entsprechenden Nukleotide dem Reaktionspartner entstammt, also in der Regel dem ersten 59-Basenelement.

Zusätzlich zu den hier angeführten „regulären“ *IntI1*-Integrase-vermittelten Insertions- und Exzisionsvorgängen finden mit erheblich geringerer Frequenz auch alternative Prozesse statt. Neben der voran erwähnten Ausbildung von Kointegraten mit mindestens einer sekundären Schnittstelle als Rekombinationspartner seien an dieser Stelle auch „Cross-over-Ereignisse im Bereich anderer Sequenzabschnitte innerhalb der *attI1*-Region und der 59-Basenelemente zu nennen, die jedoch allesamt dem Core-, respektive inversen Core-Konsensus entsprechen. Häufig kommt es dabei zur Deletion von DNA-Fragmenten mit der Folge einer stärkeren Verknüpfung angrenzender Insertionskassetten.

Der Umstand, dass sich die Architektur der *attI1*-Schnittstelle von der der 59-Basenelemente unterscheidet, bedingt maßgeblich den bevorzugten Einbau neuer Genkassetten in erster Position innerhalb der Integroninsertionsregion und garantiert insofern die größtmögliche Expressionswahrscheinlichkeit für die zuletzt erworbenen Eigenschaft.

Ob sich die genannten Gesetzmäßigkeiten auch auf vergleichbare Sequenzabschnitte der anderen Integronklassen übertragen lassen, ist noch wissenschaftlich zu belegen (60).

Abb. 5) Die *attI1/qacE*-Rekombinationsabschnitt

Dargestellt ist die Rekombination einer *attI1*-Schnittstelle mit dem 59-Basenelement der in erster Position in ein Integron integrierten Genkassette. Zur Beschreibung siehe auch Abb. 2. Der ausgefüllte Balken veranschaulicht die Ausdehnung der für die maximale Aktivität bezüglich der *attI1* X *attC*-Reaktion erforderlichen Länge der integronassoziierten Schnittstelle (60). Die von der Core-Region abgeleiteten Abschnitte sind mit 1 bis 4 beziffert. Ferner lassen sich die zusätzliche „schwache“ und „starke“ Integrasebindungsdomäne (74) und die „direct-repeats“ (DR1, DR2) erkennen.

## 1.4 Herkunft der Genkassetten und Integrons

Insbesondere für das Verständnis der phänotypischen Adaptationsfähigkeit von Bakterienstämmen unter dem Selektionsdruck des Antibiotikaeinsatzes in Klinik und Tierzucht, kommt dem Wissen über Herkunft und Verbreitung von Resistenzgenen eine wichtige Bedeutung zu. Manzel et al. zeigten, dass die *attC*-Schnittstellen der SI-assoziierten Genkassetten eine hohe speziesspezifisch Sequenzhomologie aufweisen, im Gegensatz dazu bei den einzelnen MRIs jedoch diesbezüglich kaum Übereinstimmungen gefunden werden (52). Ferner gelang der Nachweis von bisher 13 für Antibiotika-Resistenzen kodierender Insertionskassetten, deren 59-Basenelemente bezüglich Nukleotidabfolge und Länge praktisch identisch mit der entsprechenden Signatur verschiedener SIs sind (52). Die im *V. cholerae*-SI enthaltenen Kassetten besitzen die Eigenschaft eines Substrates für die Rekombinase der Klasse-1-Integrons, womit die Kompatibilität beider Strukturen bewiesen ist (46, 48, 52, 54). Zudem wurden fast identische Resistenz-ORFs als SI-Bestandteil bei nicht-artverwandten Erregern, jedoch assoziiert mit jeweils der speziesspezifischen *attC*-Schnittstelle gefunden. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass die Akkumulation hochgradig verwandter „Repeat-Sequenzen“, also der 59-Basenelemente, innerhalb der einzelnen SIs

Ausdruck der Substratpräferenz der entsprechenden Integron-Integrase ist, wohingegen die Uneinheitlichkeit der *attC*-Strukturen bei MRIs primär die Auswirkung des durch den Antibiotikaeinsatz der vergangenen Jahrzehnte veränderten Selektionsdruckes auf das Rekombinationsverhalten darstellt und insofern hierbei die Enzymaffinität nur als zweitrangig zu betrachten ist. Da die Bedeutung der Integrons, respektive der MRIs prinzipiell im Erwerb neuer, für Bakterienstämme vorteilhafter adaptiver Funktionen gesehen wird, ist zu erwarten, dass die Selektionskräfte eine Aquirierung neuer Insertionskassetten forcieren, weitestgehend unabhängig von der integrasespezifischen Bevorzugung bestimmter Schnittstellen, sofern diese nur mit brauchbaren Genen assoziiert sind. Dementsprechend besitzen sowohl SI- als auch MRI-Integrasen extrem flexible Substraterkennungseigenschaften (13, 15, 16, 20, 51, 52). In Anbetracht der Homogenität der 59-Basen-Elemente chromosomaler Super-Integrone imponiert in diesem Fall die Aufnahme bereits bestehender Genkassetten, also kompletter ORF-*attC*-Strukturen aus externen Quellen einer komplexen und manifoldigen mikrobiellen Umgebung, unwahrscheinlich. Die simpelste Erklärung für den hohen speziesspezifischen Verwandtheitsgrad der Rekombinationsschnittstellen beinhaltet daher die Annahme, dass der Prozeß der Entstehung von Genkassetten autark innerhalb jedes SI-tragenden Bakteriums stattfindet. Das endogene SI hat in diesem Szenario als genetische Funktionseinheit erstmals die Möglichkeit zu Rekombination. Jede unterschiedliche *attC*-Region einer MRI-assoziierten Insertionskassette repräsentiert dann folglich ein einzigartiges SI-Cluster verwandter Rekombinationsschnittstellen, wie es z.B. bei Vibrionaceae, Xanthomonaden und Pseudomonaden der Fall ist (43).

Gegen Ende des letzten Jahrtausendes waren mehr als 50 verschiedene 59-Basenelemente bei den bis dato bekannten 70 Antibiotikaresistenz-vermittelnden Genkassetten und beinahe 30 SI-haltige Spezies in 10 Gattungen identifiziert worden. Jedoch ist eine weitere Verbreitung dieser Strukturen unter den Prokaryonten anzunehmen (49, 55). Stokes und anderen Kollegen gelang es schließlich 2001 durch Amplifikationsverfahren unter Verwendung von synthetischen „Primern“ gegen Abschnitte hochgradig konservierter Segmente der *attC*-Schnittstellen, aus einer umfangreichen Sammlung genetischen Materials aus der natürlichen Umgebung hunderte bisher nicht beschriebene Genkassetten zu identifizieren. Die selbe Forschungsgruppe detektierte später drei neue Integronintegrasen in einer Kollektion von Umweltisolaten ohne bekannte vorausgegangene Antibiotikaexposition, wobei in diesem Fall als Erkennungssequenzen kurze Nukleotidabfolgen innerhalb der konservierten Region des Integrases selbst und der 59-Basenelemente gewählt wurden (56, 57). Diese Verfahren erlauben jedoch keine Aussage darüber, ob die so generierten DNA-Abschnitte aus einem

endogenen Super-Integron eines Bakteriums oder aus einem auf einer mobilen genetischen Struktur lokalisierten Integron bzw. MRI stammen.

Weiterhin ist festzustellen, dass *attC*-Sequenzen ausschließlich in den intercistronischen Regionen auftreten. Die Tatsache, dass Insertionskassetten bis auf wenige Ausnahmen über keinen eigenen Promoter verfügen und Abschnitte einiger 59-Basenelemente rho-unabhängige Transkriptionsterminatoren ähneln, lässt hinsichtlich des Vorgangs der Kassettengenerierung den Schritt einer reversen Transkription von RNA, wobei eine *attC*-Teilsequenz als Primer fungiert, vermuten (58). Dabei ist die Effektivität dieses enzymdependenten Prozesses bestimmt durch die wie auch immer limitierte Bereitstellung entsprechender Substrate aus einer Fülle externer Quellen. Jedoch widerspricht die Beobachtung einer zunehmenden Anzahl von Genkassetten mit eigenem Promotor und/oder inverser Ausrichtung des kodierenden Abschnitts in Bezug zum 59-Basenelement dem oben beschriebenen *attC*-Primer/reverse Transkriptase-Modell

Zusammenfassend ist also festzuhalten, dass Integrons unter bakteriellen Mikroorganismen weit verbreitet sind, sei es als chromosomaler Bestandteil oder auf einem mobilen DNA-Element gelegen, und dass sie nicht nur in der Lage sind zusätzliche Pathogenitätsmerkmale oder neue Antibiotikaresistenz dem jeweiligen Bakterium hinzuzufügen, sondern spätestens seit der Entdeckung der SIs als ein entwicklungsgeschichtlich altes, omnipotentes Gen-Aquirierungs-System zur Sicherstellung einer bestmöglichen Adaptationsfähigkeit verstanden werden müssen (43).

Schließlich ist noch die Möglichkeit eines Integrase-vermittelten Rekombinatinsvorgangs unter Partizipation eines alternativen Genomorts, also eines Abschnitts, der nicht über die integrontypischen Ausstattungsmerkmale verfügt, in Betracht zu ziehen. In diesem Fall besteht für das Integron die Möglichkeit des Erwerbs neuer Genkassetten unter Verlust des 3'-konservierten Segmentes, was zwangsläufig eine hohe Ortsständigkeit der neuen Sequenzen bedingt (27, 38).

## 1.5 Enterobacteriaceae

### 1.5.1 Übersicht und allgemeine Eigenschaften der Enterobacteriaceae

Unter den Prokaryonten ist die Bakterienfamilie der Enterobacteriaceae in infektiologischer Hinsicht für die Humanmedizin von größtem Interesse. Sie setzt sich aus mehr als 30 Gattungen, die wiederum in über 100 Spezies eingeteilt werden können, zusammen. Neben den Erregern von mit typischen klinischen Symptomen einhergehenden Krankheiten wie Typhus, Ruhr, Pest u. a. beinhaltet das Spektrum auch zunehmend an Bedeutung gewinnende Opportunisten, die vor allem nosokomiale Infekte hervorrufen. Morphologisch handelt es sich um gramnegative, plumpe, mit abgerundeten Enden versehene, häufig durch mono- bis peritriche Begeißelung bewegliche Stäbchenbakterien mit einem Durchmesser von 0,3-1,0  $\mu\text{m}$  und einer Länge von 1,0-6,0  $\mu\text{m}$ . Sie sind fakultativ anaerob und können Kohlenhydrate wie Glukose sowohl oxidativ als auch fermentativ abbauen. Enterobakterien werden daher auch als Fermenter bezeichnet und innerhalb der Gruppe der gramnegativen Stäbchen von den Non-Fermentern wie Pseudomonaden, Bordetella, Brucella u. a. abgegrenzt. Die Ansprüche an Nährmedien sind überwiegend gering. Sie sind oxidasenegativ und bis auf *Shigella dysenteriae* Typ 1 katalasepositiv. Abgesehen von einigen *Erwinia*- und *Yersinia*-stämmen sind Enterobacteriaceae in der Lage Nitrat zu Nitrit zu reduzieren.

Ihr natürliches Habitat ist der Darmtrakt von Mensch und Tier. Darüber hinaus kommen sie auch in der Umwelt, insbesondere in Wasser, Boden und zum Teil auch als Krankheitserreger bei Pflanzen vor.

Zur Differenzierung der einzelnen Enterobacteriaceae-Spezies macht man sich ihre spezifischen Stoffwechselleistungen zu nutze. Neben der klassischen „Bunten Reihe“ werden industrielle standardisierte Verfahren eingesetzt, durch die biochemische Muster in einem numerischen Code erfasst und meist computergestützt ausgewertet werden können. Ein wichtiger Parameter ist dabei die Verwertung von Laktose durch das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase. Typisch für Enterobakterien ist der Erwerb extrachromosomaler DNA in Form von Plasmiden, Transposonen und andere mobiler genetischer Elemente. Auf diese Weise ist es dem individuellen Bakterium möglich, durch zusätzliche adaptive Eigenschaften wie erworbene Antibiotikaresistenzen, Virulenzfaktoren und spezielle Enzyme, eine Modifikation des Phänotyps zu bewirken und sich somit einen Selektionsvorteil zu verschaffen (76, 77, 78).

## 1.5.2 Einteilung der Enterobacteriaceae

Die Einteilung der Enterobakterien erfolgt in zwei Gruppen. Zum einen handelt es sich um **fakultativ pathogene Mikroorganismen**, die zur physiologischen Darmflora zählen und auch als **Kommensalen** oder **Saprophyten** bezeichnet werden. In der Regel verursachen diese nur bei der Verschleppung in andere Körperregionen opportunistische, extraintestinale Infektionen. Als manifestationsbegünstigende Faktoren liegen meist eine reduzierte Immunkompetenz durch konsumierende Grunderkrankungen, Mangelernährung, COPD, Immunsuppressivatherapie, Alkoholismus u. a. oder eine Störung der den Verdauungstrakt begrenzenden Mukosabarriere zugrunde. Ein besonderes Problem dieser Gruppe resultiert aus der expansiven Zunahme von Isolaten mit multiplen Antibiotikaresistenzen. Der Grund hierfür ist in erster Linie in dem Umstand zu sehen, dass einer derartigen Infektion eine entsprechende Disposition des Wirtes vorausgehen muss und sich das in Frage kommende Klientel daher primär aus hospitalisierten Patienten mit vorausgegangener extensiver antimikrobieller Pharmakotherapie rekrutiert. Die wichtigsten Vertreter der fakultativ pathogene Enterobacteriaceae sind laktosepositive *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Morganella* spp. und *Providencia* spp.. Das klassische Erkrankungsspektrum umfasst Harnwegsinfekte, Pneumonien, Meningitiden/Enzephalitiden, Wundinfektionen, Endokarditiden, Sepsis, Weichteilinfektionen (z. B. Fasziiitis) und Arthritiden/Osteomyelitiden. Als Untersuchungsmaterialien eignen sich insofern Sputum, Urin, Liquor, Punktate und Abstriche.

Daneben existieren **obligat pathogene** oder auch **enteropathogen** genannte **Enterobakterien**. Hier sind in vor allem die pathogenen *E. coli*-Serovare EPEC (enteropathogene *E. coli*), ETEC (enterotoxische *E. coli*), EIEC (enteroinvasive *E. coli*), EHEC (enterohämorrhagische *E. coli*), sowie *Salmonella* spp., *Shigella* spp. und *Yersinia* spp. zu nennen. Diese Erreger verursachen überwiegend intestinale Erkrankungen, einzuteilen in entzündliche Enteritiden mit Kolonisation und Invasion der Mukosa unter Beteiligung von Zytotoxinen und nichtentzündliche, primär im proximalen Dünndarm lokalisierte Enteropathien mit Funktionsstörung der Mukosa durch Enterotoxine oder Zerstörung der Villi. Darüber hinaus können allerdings auch nach Penetration der intakten Mukosa, Translokation in regionäres Lymphgewebe und anschließender lymphogener oder hämatogener Generalisation Systemmanifestationen enteraler Infekte verursacht werden (76, 77, 78).

### 1.5.3 Antigenstrukturen der Enterobacteriaceae

Verschiedene morphologische Strukturen der Bakterienzelle wirken als Antigen und können mittels mono- und polyvalenter Antiseren nachgewiesen werden. Auf diese Weise lassen sich Spezies in Serovare unterteilen.

- a) O-Antigen (somatisches Antigen): Es handelt sich um eine hitzestabile Polysaccharid-Seitenkette eines in der äußeren Membran verankerten Lipopolysaccharids. Endotoxine sind Teil dieser O-Antigene. Die meisten Enterobacteriaceae besitzen darüber hinaus in der Core-Region der Zellwand einige weitere gemeinsame Antigene, wie unter anderem das Kunitz-Antigen (CEA), welches nur immunologisch in Erscheinung tritt, wenn das O-spezifische Polysaccharid nicht vorhanden ist.
- b) H-Antigen (Geißelantigen): Während die meisten beweglichen Arten in der Regel nur eines dieser hitzeempfindlichen, aus Protein bestehenden Antigene der Bakteriengeißeln ausbilden, weisen *Salmonella* und *Citrobacter diversus* häufig, *Escherichia coli* gelegentlich zwei unterschiedliche Geißelantigene auf.
- c) K-Antigen (Hüllenantigen): Diese linearen Polymere, bestehend aus sich repetierenden Kohlenhydrateinheiten, teils auch aus Proteinen der äußeren Bakterienzellwand, finden sich bei einigen kapseltragenden Enterobacteriaceae. Sie können bisweilen die Bakterien mit einem derart dichten Polysaccharidnetz überziehen, dass die O-Agglutination verhindert wird.
- d) F-Antigen (Fimbrienantigen): Die als haarförmige Proteinstrukturen aus der Zellwand herausragenden Fimbrien besitzen ebenfalls Antigeneigenschaften. Sie sind thermolabil und umgeben unter Umständen die Bakterienzelle wie eine dünne Kapsel, so dass gleichfalls die O-Agglutination beeinträchtigt wird. Verschiedene Typen von Fimbrien können gleichzeitig vorhanden sein und unterschiedliche Funktionen wie Adhäsion an Schleimhautepithel und anderen Oberflächen (Virulenzfaktor), Schutz des Mikroorganismus gegen Austrocknung und Umwelteinflüsse sowie Übertragung genetischen Materials bei der Konjugation (sog. Sex-Pili) vermitteln.
- e) Membranproteine: Bestimmte Proteinantigene der äußeren Membran sind als Virulenzfaktoren bedeutsam, wie unter anderem bei pathogenen *Yersinia*-Arten. Ihr Nachweis erfordert jedoch Spezialmethoden.

Es existieren weiterhin als R(Rau)-Formen bezeichnete Mutanten von Enterobakterien, die über keine O-Antigene mehr verfügen und bereits alleine mit physiologischer Kochsalzlösung zu Agglutination neigen (76, 77, 78).

### 1.5.4 Determinanten der Pathogenität und Virulenz von Enterobacteriaceae

Da Enterobakterien eine Vielzahl von Faktoren exprimieren, die zur Manifestation einer Erkrankung beitragen bzw. deren Verlauf maßgeblich beeinflussen, sollen an dieser Stelle nur die wichtigsten Determinanten angeführt werden.

- Kolonisationsfaktoren: Die oben genannten adhäsiven Fimbrien ermöglichen die Besiedlung von Schleimhäuten und anderen Oberflächen.
- Invasive Faktoren (Invasine): Es handelt sich dabei um Proteine der äußeren Membran, die eine Invasion der intakten Darmmukosa ermöglichen.
- Exotoxine: Hierzu zählen neben den Zytotoxinen mit direkter toxischer Wirkung auf die Darmmukosa auch die Enterotoxine. Diese führen zu einer Funktionsstörung der Dünndarmmukosa. Folge beider Noxen ist ein massiver intestinaler Wasser- und Elektrolytverlust bzw. Membranschädigung und nachfolgender Zelltod bei verschiedenen anderen Körperzellen. Auch Hämolsine fallen unter diese Kategorie.
- Endotoxin: Das in der Zellwand von Enterobacteriaceae gelegene Lipopolysaccharid, insbesondere der Lipidanteil A, entfaltet beim Menschen eine pyrogene Wirkung und kann mitunter einen toxischen Schock verursachen.

Es ist zu berücksichtigen, dass nicht jedes Enterobakterium über alle genannten Faktoren verfügt. Die spezifische Konstellation unterschiedlicher phänotypischer Eigenschaften lässt sich daher zur Differenzierung von Isolaten einsetzen (76, 77, 78).

### 1.5.5 Bedeutung der Enterobacteriaceae als Problemkeime im klinischen Alltag

Heute wird gut die Hälfte aller nosokomialen infektiologischen Erkrankungen durch vor allem fakultativ pathogene Enterobakterien verursacht. Mitunter rufen multiresistente Stämme z. B. der Gattung *Klebsiella* epidemisch auftretende Krankenhausinfektionen hervor (76). Dabei gewinnen die sogenannten „extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-“, kurz ESBL-haltigen Enterobacteriaceae zunehmend an Bedeutung. Das erste Bakterium, das diese überwiegend plasmidvermittelte Eigenschaft aufwies wurde 1983 in Deutschland bei einem *Klebsiella pneumoniae*-Stamm isoliert (80). Seither haben die auf ESBL-produzierende Mitglieder der Familie der Enterobacteriaceae zurückzuführenden Infektionen rapide zugenommen (81). Die ursächlichen Enzyme verleihen dem jeweiligen Mikroorganismus unterschiedliche Grade der Protektion gegenüber Cephalosporinen mit erweitertem Spektrum wie Cefotaxim, Ceftazidim

und dem Monobactam Aztreonam (79). In vitro lässt sich ihrer Aktivität durch den Zusatz von Clavulansäure inhibieren (80, 82). Die überwiegende Zahl der weltweit disseminiert auftretenden ESBL's sind Derivate der Schmalspektrum-Lactamasen des TEM- und SHV-Typs mit Substitution von einer oder mehreren Aminosäuren im Bereich des aktiven Zentrums und hieraus resultierender Extension des hydrolytischen Profils (81). Darüber hinaus lässt sich eine spezifische geographische Distribution weiterer ESBL-Enzymklassen erkennen. So sind z. B. in Europa und Südamerika schwerpunktmäßig CTX-M-Derivate, in Japan der TOHO-1- und -2-Typ, im vorderen Orient der PER-1- und in Südamerika ferner auch der PER-2-Typ anzutreffen (79, 83-87).

Die für die ESBL-Eigenschaft kodierenden Gene, zum Beispiel *bla<sub>VEB-1</sub>* und *bla<sub>IMP</sub>*, sind zum Teil in Integrons der Klasse 1 integriert und daher oft auch mit anderen, ebenfalls exprimierten Resistenzgenen vergesellschaftet (79). Folglich können sie sowohl chromosomal, als auch auf einem konjugativen Plasmid lokalisiert sein. Am Häufigsten leitet sich jedoch der ESBL-Phänotyp nach wie vor vom SHV- und TEM-Gen ab. Ihre Lokalisation innerhalb einer Integron-Struktur wurde bisher nicht nachgewiesen, wohl aber lässt sich eine Assoziation mit integronvermittelten Eigenschaften belegen, vermutlich aufgrund der Platzierung beider genetischer Elemente auf einem gemeinsamen Plasmid (23).

Es wurde eine Vielzahl unterschiedlicher Konfigurationen von Klasse-1-Integrons innerhalb der Enterobakterienfamilie nachgewiesen (88). Dabei konnte beobachtet werden, dass offensichtlich die unterschiedlichen Resistenzgene vielfach en bloc durch einen transpositionsähnlichen Mechanismus zwischen den Integron-Plattformen transferiert werden (89). Der auf diese Weise vermittelte Schutz des Bakteriums vor diversen im klinischen Alltag eingesetzten antimikrobiell wirksamen Substanzen führt zu einem relevanten Selektionsvorteil und somit zur forcierten in vivo Dissemination der integronhaltigen Enterobacteriaceae. Die Restriktion des Einsatzes bestimmter Breitspektrum-Antibiotika und die rigorose Durchführung erforderlicher Hygienemaßnahmen sind unbedingt erforderlich, um eine weitere Verbreitung von ESBL- und anderen aus infektiologischer Sicht problematischer Gene zu verhindern.

## 1.6 Ziele der Arbeit

Aus krankenhaushygienischer Sicht stellte in der vergangenen Dekade die Prävention von durch MRSA ausgelösten Infektionen die größte Herausforderung dar. Neben neuen therapeutischen Optionen in Ergänzung oder als Alternative zu den Glykopeptiden, wurde ein Konsensus detaillierte Hygieneempfehlungen gefunden, durch deren Umsetzung es zwischenzeitlich gelungen ist, die Inzidenz von auf diesen Problemkeim zurückzuführenden nosokomialen Erkrankungen einzudämmen.

Nachdem die Bedeutung des Integransystemes als mobile, multifunktionale Genaquirierungs-, -expressions- und -transduktionseinheit erkannt worden war, rückte diese exklusiv im prokaryontischen Genom anzutreffende Struktur zunehmend in den Mittelpunkt klinischer und labormedizinischer Untersuchungen. Heute wissen wir, dass eine Vielzahl der Infektionen hospitalisierter Patienten durch integronhaltige Erreger verursacht werden, die vielfach über ein umfangreiches Resistenzspektrum verfügen. Da es sich offensichtlich um einen evolutionsgeschichtlich älteren Mechanismus zum Erwerb unterschiedlichster adaptiver Funktionen handelt, sind im Gegensatz zu den MRSA-assoziierten Erkrankungen hiervon nicht nur überwiegend die Großkliniken betroffen. Folglich ist in Anbetracht der zur Distribution dieses Systems innerhalb des Bakterienreichs zur Verfügung stehenden langen Zeitspanne von einer weiten Verbreitung auszugehen.

Jedoch führte zweifelsohne der massive Einsatz antimikrobiell wirksamer Detergenzien, beginnend in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts, zu einer erheblichen Verschiebung der unter regulären Umweltbedingungen vorherrschenden selektiven Kräfte.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher Erkenntnisse über Veränderungen hinsichtlich der Prävalenz von Integrans, Alteration der spezifischen Promotorstrukturen, Anzahl integrierter Insertionskassetten und die daraus resultierenden Einflüsse auf das Resistenzverhalten der Bakterien im zeitlichen Verlauf zu gewinnen. Basierend auf derartigen Untersuchungen gilt es nun, entsprechend dem Vorgehen zur Prävention von MRSA-bedingten Infektionen, Richtlinien für den klinischen Alltag zu erarbeiten, die geeignet sind einer weiteren Verbreitung integronassoziierter Antibiotikaresistenzen und Virulenzfaktoren Einhalt zu gebieten. Ein besonderes Problem ergibt sich dabei aus der Möglichkeit des horizontalen Transfers von genetischem Material zwischen verschiedenen Prokaryonten, sowie der intraindividuellen Rekombination von Genkassetten mit unmittelbarer Auswirkung auf den jeweiligen Phänotyp.

Die Differenzierung von Infektionserregern bei hospitalisierten Patienten zeigt paneuropäische eine weite Verbreitung von Multiresistenz-Integrans innerhalb der Enterobacteriaceae-Familie. Dabei handelt es sich zum überwiegenden Teil um Klasse-1-Integrans.

In dieser Studie wurden aus Blutkulturen von in den Jahren 1994, 1997 und 2000 in den Universitätskliniken Düsseldorf behandelten Patienten insgesamt 900 Enterobakterien, die fünf unterschiedlichen Gattungen zugehörten, isoliert und einem Screening-Verfahren unterzogen. Neben der Untersuchung auf die Präsenz von Klasse 1 Integrans führten wir bei positiven Erregern auch eine Sequenzierung der 5'-CS Promotorregion durch und bestimmten gleichfalls den Umfang der innerhalb der Insertionsregion enthaltenen DNA, als ein grobes Maß für die Anzahl der eingeschleusten Genkassetten. Darüber hinaus erfolgte eine Empfindlichkeitstestung des eingesetzten Materials gegenüber 14 ausgewählten Antibiotika.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Herkunft und Identifizierung der Enterobacteriaceae

Die Untersuchungen zu den Fragestellungen der vorliegenden Arbeit erfolgten an jeweils 300 Enterobacteriaceae-Isolaten aus den Jahren 1994, 1997 und 2000, die zuvor im Rahmen klinischer Routinediagnostik in Blutkulturen von in den Universitätskliniken Düsseldorf behandelten Patienten nachgewiesen worden waren.

Beim Vorhandensein von gramnegativen Stäbchen im lichtmikroskopischen Direktpräparat wurde von den entsprechenden Proben anschließend eine Kultur auf selektiven Medien mit Indikatoreigenschaften (z. B. McConkey-Agar, Leifson-Agar) angefertigt. Nach spätestens 24 Stunden war so im Fall einer typischen Kulturmorphologie, Laktose positiver und Oxidase negativer Merkmale eine Zuordnung zu der Familie der Enterobakterien möglich. Durch Überimpfen auf kommerzielle biochemische Testsysteme, wie das MicroScan (Dade, Frankfurt, Germany) oder API Rapid 20 E-System (bioMérieux, Nürtingen, Germany), wurde auf Grundlage der spezifischen Stoffwechseleigenschaften innerhalb von zwei Tagen eine Zuordnung zur jeweiligen Gattung und Spezies getroffen. Die ebenfalls durchgeführte Sensibilitätstestung, in der Regel mit der microbroth Dilutionsmethode, war für die vorliegende Arbeit unerheblich.

Zur langfristigen Aufbewahrung wurde von den so gewonnenen Bakterienisolaten ein Archiv nach dem Microbank-System (ProLab) angelegt. Es handelt sich hierbei um sterile Glasröhrchen gefüllt mit einem Einfriermedium bestehend aus 25 Keramikperlen, deren Oberfläche durch Säurebehandlung porös gemacht wurde, um dadurch mehr Mikroorganismen binden zu können. Die Lagerung erfolgt bei  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2 Auswahl und Aufbereitung der Enterobacteriaceae-Isolate

Aus den Jahren 1994, 1997 und 2000 wurden jeweils die ersten 200 im Microbank-System aufbewahrten Isolate von *E. coli*, sowie die ersten 25 Isolate der Species *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes* und *Enterobacter cloacae* ausgewählt und nach dem Überimpfen auf ein Anreicherungs-nährmedium, vorwiegend fand diesbezüglich Mueller-Hinton-Agar oder Blutagar Verwendung, für 12 bis 15 Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

Bei allen 900 Ansätzen erfolgte dann zunächst die Durchführung eines Random amplified polymorphic DNA (RAPD) Typisierung zum Ausschluss einer klonalen Identität.

Pro RAPD-Typ wurde nur ein Isolat für die nachfolgenden Analysen dieser Studien ausgewählt, um untereinander bestehende Verwandtschaftsverhältnisse sicher ausschließen zu können.

### **Grundlagen der Random amplified polymorphic DNA (RAPD) Typisierung**

Konventionelle PCR-basierte Assays zur Untersuchung von Verwandtschaftsverhältnissen zwischen diversen Isolaten im Rahmen von epidemiologischen Studien benötigten als Voraussetzung zur Synthese spezifischer Amplifikationsprimer zuvor determinierte DNA-Zielsequenzen. Damit sind diese Methoden aufgrund eines zu hohen Kosten- und Zeitaufwandes als Screeningmethoden für den klinischen Alltag ungeeignet.

Das RAPD-Verfahren verwendet hingegen zufällig ausgewählte Oligomer mit einer Länge von 10 Nukleotiden, die ausgehend von entsprechenden komplementären oder weitestgehend komplementären Genomabschnitten des zu untersuchenden Organismus, die Synthese von DNA-Fragmenten initiieren. Auf diese Weise lassen sich nach elektrophoretischer Auftrennung der einzelnen Amplikons in einem Agarosegel und Anfärbung mit Ethidium-Bromid individuell unterschiedlich RAPD-Muster erzeugen, mit deren Hilfe eine klonale Identität sicher ausgeschlossen oder belegt werden kann. Empirische Studien haben gezeigt, dass für eine optimale Diskrimination von Enterobakterien Primer mit einem mindestens 60-prozentigen Gehalt an Guanin- und Cytosinbasen Verwendung finden sollten. Unter diesen Voraussetzungen wird ein Polymorphismus mit ca. 15 verschiedenen Banden in der Größenordnung von 0,5 bis 3 kb erzeugt. Im Falle nicht sicher zu interpretierender Ergebnisse, kann entweder der Primer gewechselt oder ein zweiter hinzugenommen werden. Als kritisch hat sich auch die  $MgCl_2$ -Gehalt im PCR-Ansatz erwiesen. Als Optimum ist diesbezüglich eine Konzentration von 3 mM  $MgCl_2$  zu betrachten (91, 92, 93).

In der Literatur wird auch die Bezeichnung AP („arbitrary primer“-)PCR als Synonym für RAPD benutzt.

## Durchführung der RAPD-Typisierung

### a) Bakterienzell-Lyse und DNA-Extraktion

Zunächst werden Reagenzgläser mit 5 ml Luria-Infusion-Medium (Oxoid, Basingstoke, UK) gefüllt und diese anschließend mit der jeweiligen Bakterienkultur, die unter sterilen Bedingungen mit einer Impföse von einer frisch bewachsenen Agarplatte zu entnehmen ist, für ca. 12 Stunden bei 37°C unter moderatem Schütteln inkubiert. Danach erfolgt eine Zentrifugation über zwei Minuten mit 10000 X g unter Verwendung von 1,5 ml des Ansatzes. Das Bakterienpellet wird in 567 µl TE-Puffer (40 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA), 30 µl 10%igem SDS (Natrium-Dodezyl-Sulfat) und 3 µl Proteinase K (20 mg/l) resuspendiert und bei 37°C erneut für eine Stunde inkubiert. Die Entfernung der Polysaccharide und Protein-Komplexe findet in 100 µl 5 molarer NaCl-Lösung und 80 µl 10%igem CTAB (Cetyl-Trimethyl-Ammonium-Bromid) in 0,7 molarer NaCl-Lösung statt, wobei die Eiweißextraktion mit einem Phenol/Chloroform/Isoamyl-Alkohol-Gemisch im Verhältnis 25:24:1 erfolgt. Schließlich wird die Suspension zwei Minuten lang mit 12000 X g zentrifugiert, die gereinigt DNA aus 20 µl Überstand mit Isopropanol ausgefällt und in TE-Puffer resuspendiert. Das Produkt kann nun für die nachfolgende AP-PCR verwendet werden.

### b) Auswahl der Primer

Basierend auf den vorangenannten Erkenntnissen wurde ein bereits zuvor bei der RAPD-Typisierung von Enterobakterien eingesetztes 10 Nukleotide großes Oligomer mit einem 60-prozentigen G+C-Anteil ausgewählt und von der Firma Pharmacia Biotech synthetisiert.

AP1290-Primer: [5`]-GTGGATGCGA-[3`]

Zur Verbesserung der Sensitivität wurde zusätzlich eine zweite, unabhängige PCR mit den beiden nachfolgenden Primern, kombiniert in einem Reaktionsansatz, durchgeführt:

Eric1R-Primer: [5`]-GCGAGTGGGGTCAGTGAATGAA-[3`]

Eric2-Primer: [5`]-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-[3`]

### c) Amplifikationsvorgang

Der Reaktionsansatz für die AP-PCR umfasst ein Volumen von 25 µl und setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

25 ng Proben-DNA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 pmol Primer, 1 U *AmpliTaq* DNA-Polymerase (Perkin Elmer), je 250 µM dCTP, dATP, dGTP, dTTP (Boehringer, Germany) in 10 mM Tris-Cl-Puffer (pH 8,3), 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100.

Zur Verhinderung von Verdunstung und Kondensierung wird jedem Ansatz zusätzlich 50 µl Mineralöl zugefügt.

Für die Amplifikation verwendeten wir den Thermocycler TC 4800 der Firma Perkin Elmer.

Es wurden folgende Reaktionsbedingungen festgelegt:

4 Zyklen:(Denaturierungsphase)	94°C für 5 Min. 36°C für 5 Min. 72°C für 5 Min.
30 Zyklen: Denaturierung	94°C für 1 Min.
Annealing	36°C für 1 Min.
Extension	72°C für 2 Min.
Final Extension	72°C für 10 Min.

Anschließend werden die AP-PCR-Produkte bis zur Durchführung der Gelelektrophorese bei 4°C gelagert.

[Zu Grundlagen der PCR siehe auch Kapitel 2.4]

### d) Agarose-Gel-Elektrophorese

Im Anschluß an das Amplifikationsverfahrens wird ein 20 µl Aliquot des Produktes zusammen mit 3 µl Probenpuffer (30% Glycerin, 0,1% BPB) in die Gel-Taschen eines 2-prozentigen Metaphor-Agarose-Gels mit 0,5 µg/ml Ethidium-Bromid-Zusatz eingebracht. Die Auftrennung findet in 1 X Tris-Azetat-, „Running“-Puffer statt. Als Größenstandart wird in jedem Gel 15 µl einer 1 kb-Leiter (GibcoBRL, Eggerstein) mitgeführt. Für die Elektrophorese sind bei 80 V Gleichspannung ca. 60 Min. zu veranschlagen. Durch UV-Transluminatation können so schlussendlich die DNA-Amplikons als unterschiedliche Banden entsprechend ihrer Größe sichtbar gemacht und fotografiert (Modul-Digit-Store-Duo Gerät, Intrax) werden.

Die Dokumentation und Auswertung der eingescannten Ergebnisse unter dem Gesichtspunkt der genetischen Distanz der von uns untersuchten Isolate erfolgte mit Hilfe des GelCompar-Programms.

Der Ausschluß einer klonalen Identität ist als gegeben zu betrachten, wenn sich die RAPD-Muster verschiedener Proben, bei Kombination der beiden PCRs, in mindestens zwei Banden unterscheiden.

[Zu Grundlagen der Gel-Elektrophorese siehe auch Kapitel 2.4]

### **2.3 Nachweis von Integron-Strukturen innerhalb des Bakteriengenoms**

Klasse-1-Integrone verfügen sowohl im 5'- als auch im 3'-CS in Nähe zur Insertionsregion über hochgradig konservierte Sequenzabschnitte, deren Nachweis in zu untersuchenden Bakterien das Vorhandensein von Integrone beweist. Zu diesem Zweck fand das Colony-Hybridisierungs-Verfahren Anwendung, basierend auf der Methode nach Grunstein und Hogness (1975 [94]) mit leichten Modifikationen, nachzulesen bei Maniatis et al. (1989 [95]). Als radioaktiv <sup>32</sup>P-markierte DNA-Sonden wurden von der Firma Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany) je ein zu den beiden oben genannten Zielsequenzen komplementäres Oligonukleotid synthetisiert:

5'-CS-Sonde: [5']-GGC ATC CAA GCA GCA AG-[3']

3'-CS-Sonde: [5']-AAG CAG ACT TGA CCT GA-[3']

Der Nachweis des spezifischen 5'- respektive 3'-CS-Abschnitts erfolgt für jedes Isolat jeweils in einem gesonderten Hybridisierungsverfahren.

#### **Grundlagen des Colony-Hybridisierungs-Verfahrens**

Aufgrund der verhältnismäßig einfachen Durchführung, des geringen Zeitaufwandes und der geringen Kosten wird diese Methode auch heute noch weitläufig als Screening-Verfahren zur Identifikation individueller Bakterienstämme, die eine bekannte Zielsequenz enthalten, eingesetzt. Es lassen sich dabei bis zu 100 verschiedene Proben gleichzeitig in einem Arbeitdurchgang untersuchen.

Zunächst wird Material der betreffenden Bakterienkolonien auf einen gemeinsamen, auf einer Agarplatte gelagerten Nitrozellulose-Filter (eine Nylon-Membran oder ein *Whatman 541*-Filterpapier) übertragen, die Lokalisation dokumentiert und eine erneute Inkubation vorgenommen.

Danach erfolgt die *in situ*-Lyse der Prokaryonten und Adhäsion der freigesetzten DNA an die Filtermatrix. Im nächsten Arbeitsgang werden die radioaktiv markierten Oligonukleotide mit der Zielsequenz komplementären Basenabfolge hinzugegeben. Während eines eingefügten Denaturierungsschritts löst sich die Doppelstrangkonfiguration der DNA-Fragmente auf, wodurch die Voraussetzung für die Anlagerung der Sonden an die filtergebundenen Genomabschnitte geschaffen ist. Die anschließende Hybridisierung erfolgt bei einer für jede Sequenz individuell zu berechnenden Reaktionstemperatur [ $T_h = 4(G+T) + 2(A+C) - 5$ ]. Zur Vermeidung einer Hintergrundstrahlung durch überschüssige Oligonukleotid-Sonden sind mehrere nachfolgende Wasch-Zyklen erforderlich. Schließlich wird ein Foto des Filters nach dem Autoradiographie-Verfahren angefertigt. Der Vergleich der „Spots“ mit den Kolonien auf der Ursprungagarplatte erlaubt dann die Identifikation der die Zielsequenz tragenden Stämme.

### **Durchführung der Colony-Hybridisierung**

#### **a) Transfer der zu untersuchenden Stämme auf den Nitrozellulose-Filter**

1. Zunächst ist ein Nitrozellulose-Filter (Millipore HAWP) auf einer McConkey-Agarplatte zu platzieren.
2. Mit einer sterilen Pipettenspitze wird von einer zu untersuchenden Bakterienkolonie Material auf den Filter und zur Kontrolle an gleicher Stelle auf eine zweite McConkey-Agarplatte ohne Filter aufgetragen und die genaue Lokalisation dokumentiert. Wir testeten im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf diese Weise pro Filter 20-30 Proben gleichzeitig. Als Negativkontrolle wurde ein integronfreier *E. coli*-Stamm mitgeführt.
3. Die Inkubation der Platten erfolgt für 8-14 Stunden bei 37°C und ist zu beenden, wenn singular wachsende Kolonien einen Durchmesser von ca. 1 mm erreicht haben.
4. Die Kontroll-Platte wird anschließend mit einer Parafinfolie verschlossen und in umgekehrter Position bei 4°C gelagert, bis die Hybridisierungsergebnisse zur Verfügung stehen.

### b) Bakterienzell-Lyse und Fixierung der DNA an den Nitrozellulose-Filter

1. Es werden 4 Whatman 3MM-Filterpapiere in der Größe einer Agarplatte zurechtgeschnitten und jedes Papier mit einer der folgenden Lösungen getränkt:
  - 10% Natrium-Dodezyl-Sulfat (SDS)
  - Denaturierungs-Lösung* (0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl)
  - Neutralisierungs-Lösung* (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-Cl [pH 7,4])
  - 2 X SSC (1 X SSC entspricht 0,15 M NaCl, 0,015 M Natrium-Citrat [pH 7]).
2. Der Nitrozellulose-Filter ist vorsichtig mit einer stumpfen Pinzette von der Agarplatte zu entfernen und mit der bewachsenen Seite nach oben für 3 Min. auf dem SDS-getränkten Papier zu platzieren (verhindert die Diffusion von DNA nach der Denaturierung und Neutralisation und bewirkt so ein „schärferes“ Hybridisierungssignal).
3. Nachfolgend wird der Nitrozellulose-Filter für jeweils 5 Minuten zunächst auf das Papier mit Denaturierungs-Lösung, dann auf das mit der Neutralisations-Lösung und zuletzt auf das 2 X SSC-getränkte Filterpapier gelegt. Hierbei ist darauf zu achten, dass nach dem Einwirken möglichst wenig der einzelnen Flüssigkeiten adhärent bleibt und die koloniebewachsene Seite der Nitrozellulose keinesfalls mit den Reagenzien in direkten Kontakt gerät.
4. Anschließend wird der Nitrozellulose-Filter auf einem trockenen 3MM-Filterpapier über 30 Min. bei Raumtemperatur getrocknet.
5. Zuletzt erfolgt die Fixierung der DNA an den für diesen Schritt zwischen zwei trockenen Blättern 3MM-Papier platzierten Nitrozellulose-Filter durch Erhitzen auf 80°C für 1-2 Stunden in einem Vakuumofen.

### c) Hybridisierung der Oligonukleotid-Sonden mit ihren an die Nitrozellulose gebundenen Zielsequenzen

1. Zunächst wird der nach oben aufgeführtem Schema präparierte Nitrozellulose-Filter für 5 Min. in einen mit 2 X SSC gefüllten Behälter getaucht.
2. Dann erfolgt der Transfer des Filters in ein mit 200 ml *Prewashing-Lösung* (5 X SSC, 0,5% SDS, 1 mM EDTA [pH 8,0]) gefülltes Gefäß und eine 30-minütige Inkubation bei 50°C. Es ist möglich mehrere Filter gleichzeitig in einem Behälter zu waschen und zu inkubieren. Dementsprechend ist es jedoch bei diesem und allen folgenden Schritten erforderlich, durch Einsatz einer Rotationsplattform unter moderatem „Schütteln“ ein Verkleben der Filter zu vermeiden.

3. Bakteriendetritus ist mit Hilfe von in Prewashing-Lösung getränkter Zellulose von der Filteroberfläche zu entfernen.
4. Im anschließenden Schritt wird der Filter in ein Behälter mit 150 ml *Prehybridization-Lösung* (6 X SSC, 0,25% BLOTTO [Bovine Lacto Transfer Technique Optimizer = 5% fettfreies Milchpulver aufgelöst in Aqua dest. mit 0,02% Natriumacetat]) überführt und für 1-2 Stunden bei 68°C inkubiert. Die in BLOTTO enthaltenen Proteine dienen der Blockade von Oberflächen des Nitrozellulose-Filters, die unspezifisch gebundene Einzel- oder Doppelstrang-DNA anlagern.
5. Die <sup>32</sup>P-markierten Oligonukleotid-Sonden liegen zunächst als Doppelstrangmolekül vor und werden durch den Zusatz von 0,1 Volumenanteile einer 3 N NaOH-Lösung denaturiert. Nach einer Einwirkzeit von 5 Min. ist der Ansatz in Eiswasser zu überführen, 0,05 Volumenanteile Tris-Cl-Puffer (pH 7,2) und zur Neutralisation ebenfalls 0.1 Volumenanteile einer 3 N HCl-Lösung hinzuzufügen.
6. Dann werden die Sonden in einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  cpm/ml Prehybridization-Lösung in den Behälter mit dem Nitrozellulose-Filter gegeben.
7. Die Hybridisierung erfolgt für die 5`-CS-Sonde bei 49°C und für die 3`-CS-Sonde bei 45°C. Der Vorgang benötigt 20 Stunden im verschlossenen Gefäß.
8. Nach Beendigung des Hybridisierungsprozesses wird der Nitrozellulose-Filter in einen großen Behälter mit 300 ml Waschlösung (6 X SSC) gegeben und nach 10 Min. in ein Gefäß mit frischer Waschlösung transferiert. Dieser Schritt ist dreimal unter Beibehaltung der spezifischen Hybridisierungstemperatur zu wiederholen.

#### d) Autoradiographie der Hybridisierungsprodukte

1. Der Filter wird dann auf Papier bei Raumtemperatur getrocknet und zu bessern Orientierung mit asymmetrisch aufgetragenen radioaktiven Punktmarkern versehen.
2. Die Lage der gebundenen Sonden ist anhand der Belichtung eines auf den Filter aufgetragenen Röntgenfilms zu bestimmen.
3. Die Autoradiographie erfolgt bei -70°C über einen Zeitraum von 15-18 Stunden. Zur Dokumentation der Ergebnisse fanden im Rahmen unserer Studie Kodak X-Omat AR-Filme Verwendung. Nach der Entwicklung des Filmes werden die radioaktiv markierten „Spots“ mit den Ursprungskulturen auf der Agarplatte in Bezug gesetzt und auf diese Weise die 5`-CS- respektive 3`-CS-haltigen Stämme identifiziert.

## 2.4 Bestimmung des DNA-Umfangs der Insertionsregion als Indikator für die Anzahl der integrierten Genkassetten

Da klinische Routineuntersuchungen bei Enterobacteriaceae, wie auch anderen gram-negativen Keimen, die als nosokomiale Infektionserregern von Bedeutung sind, eine deutliche Ausweitung des Resistenzspektrums erkennen lassen, ist als mögliche Ursache ein paralleler Anstieg der Anzahl integronassoziierter Genkassetten bei den einzelnen Bakterienstämmen in Betracht zu ziehen. Zum Beleg dieser Hypothese wurde mit Hilfe einer PCR die Insertionsregion aller integronhaltigen Isolate des von uns eingesetzten Materials amplifiziert, die jeweiligen Produkte mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und der approximierten Basenumfang durch Vergleich mit einer mitgeführten „Lambda-ladder“ ermittelt. Als Primer verwendeten wir die schon als Hybridisierungssonden eingesetzten Oligonukleotide, jedoch ohne radioaktive Markierung. Eine exakte Determination der Resistenzgene erfolgte hingegen im Rahmen dieser Studie nicht.

Zusätzlich wurde von jedem Isolat ein zweiter PCR-Ansatz mit dem 3'-CS-Primer in Kombination mit dem Int<sub>2</sub>F-Primer, ein zu einem hochgradig konservierten Abschnitt in der 3'-Region des Integrasegenes komplementäres Oligopeptid, hergestellt. Da sich dieser Int<sub>2</sub>F-Genomort ca. 600 bp strangaufwärts von der 5'-CS-Primerhybridisierungsstelle befindet, muss im Falle der erhaltenen Integrität des Integrons das hieraus hervorgehende Produkt um die entsprechende Länge größer sein, als das Amplikon unter Verwendung der 3'- und 5'-CS-Primer.

### **Grundlagen der Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Das Prinzip der PCR (Polymerase chain reaction) basiert auf der *in-vitro* Vervielfältigung von speziellen DNA-Abschnitten (templates), die einer weiteren Differenzierung unterzogen werden können.

Dieses Verfahren besitzt eine sehr hohe Sensitivität, da nur wenig genetisches Ausgangsmaterial benötigt wird. Zunächst müssen zu beiden Seiten des zu untersuchenden Abschnitts flankierende, kurze Nukleotidsequenzen bekannt sein. Es werden dann hierzu hinsichtlich der Basenanordnung komplementäre Oligomere synthetisiert. Es ist dabei zu beachten, dass die beiden gewählten Zielsequenzen jeweils auf unterschiedlichen Strängen der Doppelstrang-Helix liegen. Der Amplifikationsvorgang selbst erfolgt in speziellen Geräten mit der Möglichkeit einer individuellen Programmwahl. Initial wird durch kurzes Erhitzen

eine Denaturierung des DNA-Moleküls in seine Einzelstränge vorgenommen. Dadurch wird dem synthetischen Oligonukleotid die Hybridisierung auf der Zielsequenz ermöglicht („Annealing“). Unter geeigneten Reaktionsbedingungen ist eine hinzugefügte DNA-Polymerase in der Lage, auf Grundlage der einzelsträngigen DNA-Matrix, ausgehend von dem als Startermolekül (eng. „Primer“) fungierenden Oligonukleotid in Anwesenheit der Desoxynukleotidtriphosphate dCTP, dGTP, dATP und dTTP, einen neuen, komplementären DNA-Strang zu synthetisieren. Dabei können die Nukleotide nur an der 3'-Hydroxylgruppe angelagert werden, weshalb die Extension des neuen Moleküls immer vom 5'- in Richtung 3'-Ende erfolgt. Es empfiehlt sich eine hitzestabile Polymerase, wie z.B. die *Taq*-DNA-Polymerase des thermophile Bakteriums *Thermus aquaticus* zu verwenden, um den erneuten Zusatz nach jedem Denaturierungsschritt zu umgehen.

Am Ende dieses ersten Reaktionsschrittes liegen zwei semikonservative Doppelstrang-DNA-Moleküle vor. Jede nachfolgende Amplifikation beginnt ebenfalls mit einer Denaturierungsphase, damit die Primer während der nachfolgenden Annealingphase erneut an ihre Zielsequenz binden und so den nächsten Polymerisationsvorgang als letzte Phase des Zyklus initiieren können.

Das erste PCR-Produkt verfügt über ein definiertes 5'-Ende (Primer) und ein undefiniertes 3'-Ende aufgrund der Limitierung der polymeraseabhängigen Transkription durch eine vorgegebene Extensionsdauer oder Erreichen eines Transkriptionsterminators.

Ab dem zweiten Zyklus dienen auch die neusynthetisierten Stränge als DNA-Matrix, so dass anschließend nur noch Amplifikate des gesuchten Genomabschnitts mit der vorgegebenen Länge, gemäß der Lokalisation der Primersequenzen, entstehen und die Vermehrungskinetik eine annähernd exponentielle Zunahme aufweist. Die Ausbeute ist allerdings wegen Konkurrenz der Startermoleküle um ihre komplementären DNA-Abschnitte, sowie eine begrenzte Enzymaktivität und/oder -menge mit weniger als 100% zu veranschlagen.

Abschließend wird optional eine 5- bis 10-minütige Restextension, um gegebenenfalls noch unvollständige Stränge zu komplettieren, durchgeführt.

### **Grundlagen der Agarose-Gel-Elektrophorese**

Bei DNA (-Fragmenten) handelt es sich um elektrisch geladene Moleküle, die bei Anlegen einer Spannung aufgrund des Überwiegens negativer Ladungsträger zur Anode wandern.

Das Prinzip der Gelelektrophorese besteht nun darin, sich dieser Eigenschaft zu bedienen und die Migrationsgeschwindigkeit dabei gleichzeitig durch Einbringen einer Gelmatrix mit

definierter Porengröße zu limitieren. Unter standardisierten Bedingungen korreliert die Laufstrecke pro Zeiteinheit direkt mit der Molekülgröße der eingesetzten Proben. Folgende Parameter beeinflussen die Wanderung der DNA-Fragmente zusätzlich und sind daher im Voraus festzulegen:

1. Stärke des elektrischen Feldes
2. Konfiguration und Winkel des elektrischen Feldes
3. Temperatur und Ionenkonzentration des Gels und der eingesetzten Pufferlösungen

Die Porengröße ist durch Konzentration und Spezifität des verwendeten Agarosegels determiniert. Als definierter Größenstandard wird ein so genannter kb (Kilobasen)-Marker in einem gesonderten Gelslot aufgetragen. Mit einem „Bluemarker“ (Bromphenolblau), der im elektrischen Feld mitläuft, kann das Fortschreiten der Elektrophorese visualisiert werden. Glycerin dient dazu die Diffusion der Proben aus den Slots zu verhindern.

Ethidiumbromid kann entweder direkt bei der Anfertigung der Agarose beigemischt werden, oder es erfolgt in einem separaten Arbeitsschritt die Anfärbung des Gels in einem entsprechenden Bad. Dieses Reagenz lagert sich zwischen die Basenpaare der DNA-Fragmente, welche so anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht werden können.

Die hier beschriebene Methode erlaubt eine Diskrimination nur bis zu einer Molekülgröße von 40-50 kb. Größere Elemente sind beispielsweise mit der Pulsfeld-Gelelektrophorese aufzutrennen.

### **Durchführung der PCR-Amplifikation und anschließende gelelektrophoretische Auftrennung des Amplifikationsproduktes**

#### **a) Bakterienzell-Lyse und DNA-Extraktion**

Nach Identifikation der integronhaltigen Isolate wird unter sterilen Bedingungen Material der entsprechenden Bakterienkulturen von einer frisch bewachsenen Agarplatte entnommen und dieses für 12 bis 14 Stunden bei 37°C in einem mit 3ml Brain-Heart-Infusions-Medium (BHI; Difco, Augsburg, Germany) unter Zusatz von 10% Glycerol gefüllten Reagenzglas inkubiert. Zur Vermeidung einer zu starken Verklumpung der Mikroorganismen sind die Ansätze während dessen auf einer Rotationsplattform zu platzieren. 200µl dieser Kultur werden anschließend mit 800 µl Aqua dest. versetzt und für 10 Minuten auf Siedetemperatur erhitzt. Nach zweiminütiger Zentrifugation der Suspension bei 12000 X g ist der Überstand für die nachfolgende PCR zu verwenden.

### b) Auswahl der Primer

Wir verwendeten die gleichen Oligonukleotide wie bei dem voranbeschriebenen Hybridisierungsverfahren, da diese Sequenzenabschnitte in enger Nachbarschaft zur Integron-Insertionsregion lokalisiert sind und die Größe des Amplifikations-Produktes daher indirekt Aufschluss über die Anzahl der integrierten Genkassetten gibt.

5'-Primer: [5']-GGC ATC CAA GCA GCA AG-[3']

3'-Primer: [5']-AAG CAG ACT TGA CCT GA-[3']

Zum Beweis der Assoziation des auf diese Weise bestimmten DNA-Gehaltes der Insertionsregion mit dem Integrasegen des 5'-CS, wurde von jedem Isolat ein zweiter PCR-Ansatz mit den beiden nachstehenden Primern hergestellt:

Int<sub>2</sub>F-Primer: [5']-TCT CGG GTA ACA TCA AGG-[3']

3'-Primer: [5']-AAG CAG ACT TGA CCT GA-[3']

### c) Amplifikationsvorgang

Als interne Negativkontrolle zum Ausschluss eventuell vorhandener Verunreinigungen wird bei jeder PCR ein Reaktionsansatz ohne Bakterienlysat mitgeführt.

Um die Anzahl falsch negativer Ergebnisse so gering wie möglich zu halten, setzten wir ferner als positive Amplifikationskontrolle ein Plasmid mit durch DNA-Sequenzierung gesichertem Integrongehalt ein. Hierzu wurde RIP71a ausgewählt, dessen Insertionsregion nur das kassettenassoziierte Gen *ant(3'')-Ia* enthält.

Für die Amplifikation verwendeten wir den Thermocycler TC 4800 der Firma Perkin Elmer.

Die PCR erfolgt in einem ein 100 µl großes Volumen umfassenden Reaktionsansatz mit den nachstehenden Komponenten:

30 µl Template-DNA (Überstand aus Schritt „a“), 10 µl 10 X PCR-Puffer (100 mM Tris-HCl [pH 8,3], 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mg Gelatine pro ml), 10 µl 10 X Desoxynucleosidtriphosphat-Mix (je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), je 10 µl der beiden Primer-Stammlösungen (2,5 pmol Primer pro µl), 30 µl Aqua dest..

Zuletzt werden zur Verhinderung von Kondensation und Verdunstung auf jeden der Ansätze 75 µl Mineralöl appliziert.



4. Nachfolgend sind 0,75 ml Waschpuffer PE in die Säule hinein zu geben und eine erneute Zentrifugation bei 13000 U/min. über ein bis zwei Minuten Dauer schließt sich an.
5. Das Eluat wird wieder verworfen und Säule samt Sammelgefäß eine weitere Minute bei 13000 U/min. zentrifugiert.
6. Dann erfolgt der Transfer der Säule in ein 1,5 Safe-Lock-Cup (Eppendorf).
7. Es werden nun 50 µl Eluationspuffer (10 mM Tris-HCl [pH 8,5]) in die Säule pipettiert und 5 Minuten Einwirkzeit abgewartet.
8. Nach der letzten Zentrifugation über zwei Minuten bei 13000 U/min. befindet sich das aufgereinigt PCR-Produkt nun im Eppendorf-Cup und kann für die Gelelektrophorese eingesetzt oder gekühlt aufbewahrt werden.
9. Die Säule ist ein Einmalartikel und daher anschließend zu entsorgen.

#### e) Agarose-Gel-Elektrophorese

0,7 g Agarose werden mit 100 ml 1 X TBE-Puffer (10 mM Tris-HCl [pH 8,3]; 10 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA) versetzt und kurz in der Mikrowelle aufgekocht. Pro ml sind 0,5 µg Ethidiumbromid hinzu zu pipettieren. Anschließend wird die Flüssigkeit in eine Form gegossen. Eine zuvor angebrachte, mit einem „Gelkamm“ versehene Brücke sorgt dafür, dass in der ausgehärteten Agarose 20 Aussparungen für die Proben zurückbleiben. Das fertige Gel wird nach Entfernen des Kamms vorsichtig aus der Form genommen und in die mit 1 X TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer (BioRad) gesetzt.

8 µl des originären PCR-Produktes respektive 4 µl des aufgereinigten Amplikons sind optional in einem Eppendorfcup mit jeweils 4 µl Bluemarker zu vermischen.

Die Proben werden dann in die vorgesehen Gelkammern eingebracht, ein Slot ist mit 5-10 µl einer 1-kb-Leiter (Gibco, BRL, Eggerstein) zu versehen. Die elektrophoretische Auftrennung benötigt 2 Stunden bei anliegenden 100 V Gleichspannung. Mittels UV-Transluminations können schließlich die PCR-Produkte gemäß ihrer Größe sichtbar gemacht werden. Zur Fotodokumentation verwendeten wir das Modul-Digit-Store-Duo Gerät (Intras).

## **2.5 Diskrimination der 5'-CS-Promotorregion**

Von wenigen Ausnahmen abgesehen erfolgt die Expression der integronassoziierten Genkassetten von einer gemeinsamen, im 5'-CS der Klasse-1-Integrone lokalisierten,

Promotorstruktur aus. Innerhalb eines Sequenzabschnitts von weniger als 140 bp Länge findet sich eine konstante, P1 genannte und eine fakultative, mit P2 bezeichnete Promotorregion. Vom P1-Promotor existieren vier unterschiedlich Varianten, eine starke ([5′]-TTGACAN<sub>17</sub>TAAACT-[3′]), eine schwache ([5′]-TGGACAN<sub>17</sub>TAAGCT-[3′]) und zwei Hybridversionen ([5′]-TGGACAN<sub>17</sub>TAAACT-[3′] / [5′]-TTGACAN<sub>17</sub>TAAGCT-[3′]). P2 liegt entweder durch Insertion von drei benachbarten, zusätzlichen GTP-Molekülen im Sequenzbereich zwischen -35 und -10 in aktiver oder ohne diese Nukleotide, in inaktiver Form vor. Der Ausprägungsgrad von Resistenzeigenschaften eines Bakteriums ist somit maßgeblich durch die jeweilige Promotorkonfiguration und -konstellation bestimmt.

Um Erkenntnisse über den Einfluss dieser Variablen auf die epidemiologische Entwicklung der Enterobacteriaceae in unserem Raum zu gewinnen, führten wir zunächst eine PCR-Amplifikation des entsprechenden DNA-Abschnitts mit nachfolgender Sequenzierung durch.

### **Grundlagen der DNA-Sequenzierung**

Die meisten kommerziellen Sequenzierungsverfahren beruhen auf der Verwendung so genannter „chain-terminating-inhibitors“. Erstmalig wurde von Sanger et al. 1977 eine Methode etabliert, die sich die molekularstrukturellen Eigenschaft der Dideoxynukleosidtriphosphate zu Nutze machte. Werden diese Purin- bzw. Pyrimidinderivate von einer DNA-Polymerase als Baustein in eine entstehende Oligonukleotid-Kette eingebaut, so kann keine weitere Extension erfolgen, weil die für die nächstfolgenden Phosphorsäureesterbindung benötigte 3′-Hydroxyl-Gruppe nicht vorhanden ist. Wenn ein Primer und die entsprechende Template-DNA zusammen mit einem Gemisch, bestehend aus einem Di- und allen vier Deoxynukleosidtriphosphaten in Anwesenheit einer DNA-Polymerase inkubiert werden, kommt es exakt an der Stelle des Einbaus eines der in 3′-Position dehydroxilierten Moleküle zum Kettenabbruch, unabhängig von der nachfolgenden Matrix-Basensequenz. Werden solche Produkte mittels einer Elektrophorese aufgetrennt, zeigt sich ein Bandenmuster entsprechend der Größe der einzelnen Fragmente. Da die Inkorporation der einzelnen Bausteine in den neu synthetisierten Strang nach dem Zufallsprinzip erfolgt, ist mit einer kalkulierbaren statistischen Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass bei einer ausreichend hohen Amplifikationsrate jedes Nukleotid der gerade untersuchten Sorte (ATP, TTP, GTP oder CTP) einen Kettenabbruch markiert. Es ist hierbei erforderlich für jede der vier Basen des genetischen Codes einen separaten Sequenzierschritt durchzuführen. Das Verhältnis der 2′,3′-Dideoxynukleosidtriphosphate zu den analogen 2′-

Deoxynukleosidtriphosphaten sollte bei 1:100 liegen. Die Durchführung und Auswertung solcher Untersuchungen erfolgt heute computergestützt mit Hilfe spezieller Sequenzierungsgeräte. Moderne Verfahren verwenden mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (Rhodaminmarker) gekennzeichnete Deoxynukleosidtriphosphate, die ebenfalls als Terminationsmolekül fungieren. Folglich kann daher auf die Verwendung radioaktiver Isotope verzichtet werden und zur Differenzierung der verschiedenen Basen genügt eine einzige Sequenzierung.

Obwohl eigentlich die Analyse nur eines Stranges („forward-strand“) genügen würde, erfolgt in der Regel auch immer eine Konsolidierung des Ergebnisses am komplementären DNA-Fragment („reverse-strand“).

### **Durchführung der PCR-Amplifikation, Gelelektrophorese und Sequenzierung der Promotorregion**

#### **a) Bakterienzell-Lyse und DNA-Extraktion**

Die Anzucht der Bakterienstämme und anschließende DNA-Isolierung erfolgt gemäß dem in Abschnitt 2.4 aufgeführten Procedere zur Durchführung einer PCR.

#### **b) Auswahl der Primer**

Es wurden von uns Oligonukleotide ausgewählt, die jeweils auf einen komplementären Sequenzabschnitt zu beiden Seiten des die Promotorregion enthaltenden DNA-Bereiches hybridisieren. Diese Primer wurden gleichfalls von der Firma Pharmacia Biotech synthetisiert.

5'-Primer: [5']-AAC ACG CCT TTA GTC AC-[3']

3'-Primer: [5']-TCG AAC GTC TTG CAT-GC-[3']

#### **c) Amplifikationsvorgang**

Aufgrund des kleineren Amplifikationsproduktes ist eine Modifikation der Reaktionsbedingungen gegenüber dem im Abschnitt 2.4 festgelegten Protokoll erforderlich.

Zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse wird ebenfalls als interne Kontrolle ein Reaktionsansatz ohne Bakterienlysat bei jeder PCR mitgeführt.

Zur Amplifikation verwendeten wir den Thermocycler 9600 (Perkin Elmer), der keine abschließende Ölüberschichtung erfordert.



dRhodamine-Terminator-Cycle-Sequencing-Kit (Perkin Elmer) gemäß den Herstellerangaben. Pro Reaktionansatz sollten idealerweise 50 ng aufgereinigte Template-DNA enthalten sein. Im Fall von größeren Abweichungen sind die übrigen Zusätze mit dem entsprechenden Faktor zu multiplizieren. Da nur immer ein Strang sequenziert werden kann, wird auch nur jeweils einer der schon zuvor bei der PCR verwendeten Primer eingesetzt.

“Forward-strand-Primer”: [5`]-AAC ACG CCT TTA GTC AC-[3`]

“Reverse-strand-Primer”: [5`]-TCG AAC GTC TTG CAT GC-[3`]

Der Sequenzierungsansatz enthält die folgende Zusammensetzung:

Ca. 50 ng aufgereinigtes PCR-Produkt, 1 µl Primer-Stammlösung (2,5 pmol Primer pro µl), Sequenzier-Mix (Tris-Puffer, MgCl<sub>2</sub>, *Taq*-Polymerase, Fluoreszenzfarbstoff-markierte dNTPs), 3-5 µl Aqua dest. (je nach Volumen des PCR-Produktes)

Es wurden nachstehende Reaktionsbedingungen gewählt:

Denaturierungsphase	96°C für 5 Min.
25 Zyklen: Denaturierung	96°C für 30 Sek. 50°C für 15 Sek. 60°C für 4 Min.

Eine Final-Extension-Phase erübrigt sich bei diesem Verfahren.

Die Proben sind im Anschluss bei einer Temperatur von 4°C aufzubewahren.

Als nächster Schritt erfolgt die Fällung der DNA aus dem Reaktionsgemisch. Dazu wird der Sequenzierungsansatz in 90 µl Aqua dest. aufgenommen und dann der Ölbestandteil durch 4-minütiges Zentrifugieren bei 13000 X g abgetrennt. Nachfolgend lässt sich die aufliegende Ölschicht vorsichtig mit einer Pipettenspitze durchstechen, das darunter befindliche Gemisch entnehmen und in einem 1,5-ml-Eppendorf-Cup in 300 µl 96%-igem, unvergälltem Ethanol und 10 µl 3 mM Natriumacetat äquillibrieren. Anschließend wird erneut bei 13000 X g 30 Minuten zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands durch Dekantieren verbleibt das Pellet im offenen Cup, bis es vollständig getrocknet ist. Das Produkt kann eingefroren länger Zeit gelagert werden.

Zuletzt wird das DNA-Pellet in 4 µl TSR-Puffer (Perkin Elmer) aufgenommen, zwei Minuten bei 95°C denaturiert und dann von jeder Probe 1 µl auf eine separate Spur des ABI-Sequenzers geladen. Die Elektrophorese erfolgt mit 2,5 kV Gleichspannung. Zur Auswertung verwendeten wir das Sequencing-Analysis-Computerprogramm 1.0.2, ebenfalls von der Firma Perkin Elmer.

## **2.6 Resistenztestung der Enterobacteriaceae**

Die Minimale Hemmkonzentration (MHK) gilt als Maß für die Empfindlichkeit eines Mikroorganismus gegenüber einem bestimmten Antibiotikum. Es handelt sich hierbei um eine stammspezifische Größe. Die MHK gibt die geringste Konzentration einer antimikrobiell wirksamen Substanz an, bei der gerade noch die Keimvermehrung in einem Kulturansatz verhindert wird.

Die Empfindlichkeitstestung für 14 ausgewählte Antibiotika erfolgte mit Hilfe eines Mikrodilutionsverfahrens, gemäß den Kriterien des National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) [118]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit beschränkten wir uns auf eine Differenzierung des eingesetzten Untersuchungsmaterials in resistente und sensible Isolate, im Bezug auf die jeweils getestete Substanz. Eine genaue Determination der spezifischen MHK-Breakpoints erfolgte hingegen nicht.

Für die einzelnen Antibiotika fanden die allgemeingültigen Resistenz-Cut-off-Werte Verwendung. Es wurde jeweils eine „kurze“ Antibiotikaverdünnungsreihe mit drei Dilutionsstufen erstellt, die eine substanzspezifische Diskrimination in resistente und sensible Isolate erlaubte.

### **Durchführung der Resistenztestung**

1. Zunächst wird eine Übernachtskultur der zu untersuchenden Bakterienstämme auf eine optische Dichte von 0,1, gemessen im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 620 nm, verdünnt.
2. Dann erfolgt die Vermischung von 100µl dieser Suspension mit je 100µl der in den drei Konzentrationsstufen angefertigten Antibiotikallösung.
3. Im nächsten Schritt werden diese Reaktionsansätze in gekennzeichnete Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gegeben und für 16 bis 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Als

positive Wachstumskontrolle dient für jeden Bakterienstamm ein Ansatz ohne Zugabe eines Antibiotikums.

4. Die anschließende Auswertung erfolgt visuell.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Epidemiologische Aspekte integronhaltiger Enterobacteriaceae

Insgesamt wurden 900 Isolate der Familie der Enterobakterien bei der vorliegenden Studie analysiert. Dabei beschränkten wir uns hinsichtlich der Auswahl des Untersuchungsmaterials ausschließlich auf im Rahmen der klinischen Routinediagnostik gewonnene Blutkulturen. Sämtliche Proben stammten von Patienten, die in den Universitätskliniken Düsseldorf behandelt wurden und im Verlauf Hinweise auf ein erregerbedingt-inflammatorisches Krankheitsbild zeigten. Eine Berücksichtigung der Variablen Patientenalter und einsendende Fachrichtung erscheint für die in dieser Arbeit formulierten Fragestellungen unerheblich und erfolgte aus diesem Grund nicht. Die Identifizierung der Keime und Zuordnung zu den unterschiedlichen Gattungen und Spezies war bereits zuvor mit den gängigen kommerziell verfügbaren Untersuchungsmethoden durchgeführt und anschließend jedes Isolat einer Resistenztestung unterzogen worden. Letztlich wurde von allen Bakterienkulturen Material im Mikrobank-System archiviert, das uns nun für die Studie zur Verfügung stand. Entsprechend dem natürlichen, relativen Verteilungsmuster wählten wir jeweils die ersten 200 Isolate der Spezies *Escherichia coli* und die ersten 25 Isolate von *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes* und *Enterobacter cloacae* aus den Jahren 1994, 1997 und 2000 aus. Folglich liegt den Ausführungen und Schlussfolgerungen dieser Arbeit aus epidemiologischer Sicht eine retrospektive Longitudinaluntersuchung zu Grunde.

##### **Gewährleistung einer ausreichenden genetischen Distanz der Isolate**

Zum Ausschluss einer klonalen Identität unterzogen wir alle Proben einem RAPD-basierten Differenzierungsverfahren. Nur Enterobakterien, deren Amplikons bei Kombination beider durchgeführter PCRs in der gelelektrophoretischen Auftrennung ein in mindestens zwei Banden von den übrigen eingesetzten Stämmen abweichendes Muster aufwiesen, wurden für die nachfolgenden Untersuchungen verwendet.

Diese Voraussetzung erfüllten für das Jahr 1994 276 (92%), 1997 278 (92,7%) und 2000 287 (95,7%) der jeweils 300 getesteten Isolate. Insgesamt stand uns also mit 841 nicht-verwandten Enterobacteriaceae-Stämmen 93,4% des Ausgangsmaterials zur Verfügung.

### Prävalenz von Klasse 1 Integrons bei den untersuchten Enterobacteriaceae-Isolaten

Bei 96 der insgesamt 841 getesteten Isolate konnten wir innerhalb des Genoms mindestens ein Klasse-1-Integron nachweisen. Dies entspricht einem relativen Anteil von 11,4%. Eine genau Zuordnung bezüglich der Lokalisation dieser genetischen Elemente, das heißt ob es sich dabei um einen Bestandteil der chromosomalen DNA oder eines Plasmids o. ä. handelt, war mit den hier angewendeten Untersuchungsmethoden nicht möglich. Es zeigte sich jedoch eine signifikante Zunahme der Prävalenz im zeitlichen Verlauf. Waren 1994 nur 19 der insgesamt 276 (6,9%) Isolate Integron-positiv, so stieg die Anzahl 1997 bereits auf 27 von 278 (9,7%) untersuchten Proben. Im Jahr 2000 verfügten mit 50 von 287 sogar 17,4% der getesteten Enterobakterien über ein Klasse-1-Integron.

### **Herkunft der Enterobacteriaceae-Isolate mit positivem Klasse-1-Integron-Nachweis**

Während 78% aller integrontragenden Isolate von Patienten stammten, die auf Intensivstationen therapiert wurden, entfielen auf das Patientengut der Normalstationen nur 15%. Die übrigen 7% des integronhaltigen Untersuchungsmaterials wurden von Patienten in den Notaufnahmen entnommen.

### **Verteilung der Klasse-1-Integron-positiven Isolate auf die verschiedenen Enterobacteriaceae- Gattungen und –Species**

Die niedrigste Integron-Prävalenz fanden wir in der Zusammenschau aller drei ausgewählten Jahrgängen mit insgesamt 6,8% (40 von 585) bei den Isolaten der Species *Escherichia coli*. Während 1994 nur 4,1% (8 von 193) des *E. coli*-Kollektivs Integrons enthielten, lag der Prozentsatz 1997 schon bei 6,2% (12 von 194) und 2000 bei 10,1% (20 von 198). Der Anteil aller integrontragenden *Klebsiella pneumoniae*-Isolate ist mit 12,1% (8 von 66) anzugeben. Hierzu zählen 9,5% (2 von 21) positive Proben aus dem Jahr 1994, 9,1% (2 von 22) aus 1997 und 17,4% (4 von 23) aus 2000. 21,3% (13 von 61) der analysierten *Enterobacter aerogenes*-Isolate verfügten über ein Klasse-1-Integron. 1997 hatte sich der Zahl der positiven Isolate dieser Spezies auf 4 von 20 (20,0%) gegenüber 1994 mit 3 von 20 (15%) erhöht. 2000 enthielten sogar 28,6% (6 von 21) des *E. aerogenes*-Kollektivs die gesuchte genetische Struktur. Die Integronprävalenz für die *Enterobacter cloacae*-Isolate zeigte eine vergleichbare Entwicklung. Waren 1994 nur 9,5% (2 von 21) der *E. cloacae*-Proben positiv, so betrug 1997 der Anteil schon 19,0% (4 von 21) und 2000 schließlich 36,4% (8 von 22). Damit waren insgesamt 21,9% (14 von 64) aller Vertreter dieser Art mit einem Klasse-1-Integron

ausgestattet. Mit Abstand am häufigsten fanden wir innerhalb der Spezies *Klebsiella oxytoca* integronhaltige Isolate. Von 65 eingesetzten Proben konnte bei 21 (32,3%) ein entsprechender Nachweis erbracht werden. Bei Betrachtung der einzelnen Jahrgänge entfielen auf 1994 19% (4 von 21), auf 1997 23,8% (5 von 21) und auf 2000 52,2% (12 von 23) positive Isolate.

Tabelle 1: Prävalenz der Klasse-1-Integrone bei verschiedenen Enterobacteriaceae-Spezies

Spezies	1994			1997			2000		
	Anzahl Integron- pos. Isolate	Gesamt- zahl der Isolate	Prä- va- lenz	Anzahl Integron- pos. Isolate	Gesamt- zahl der Isolate	Prä- va- lenz	Anzahl Integron- pos. Isolate	Gesamt- zahl der Isolate	Prä- va- lenz
<i>E. coli</i>	8	/ 193	4,1%	12	/ 194	6,2%	20	/ 198	10,1%
<i>K. pneumoniae</i>	2	/ 21	9,5%	2	/ 22	9,1%	4	/ 23	17,4%
<i>E. aerogenes</i>	3	/ 20	15,0%	4	/ 20	20,0%	6	/ 21	28,6%
<i>E. cloacae</i>	2	/ 21	9,5%	4	/ 21	19,0%	8	/ 22	36,4%
<i>K. oxytoca</i>	4	/ 21	19,0%	5	/ 21	23,8%	12	/ 23	52,2%
Summe	19	/ 276	6,9%	27	/ 278	9,7%	50	/ 287	17,4%

### 3.2 Bestimmung des DNA-Gehaltes der Integron-Insertionsregion

Die Bestimmung des Umfangs des zwischen dem 5'- und 3'-CS befindlichen DNA-Abschnitts, dient als grobes Maß für die Anzahl der integronassoziierten Genkassetten. Der Einfachheit halber betrachten wir im Folgenden die Größe der aus der PCR mit den beiden entsprechenden Primern hervorgehenden Amplikons als stellvertretend für die genaue Länge der jeweiligen Insertionsregion. Auf ein genaueres „Integron-Mapping“ und eine Identifikation der speziellen Resistenzgene wurde hingegen verzichtet.

Zur Überprüfung der strukturellen Integrität der genetischen Funktionseinheit wurde ebenfalls von allen Isolaten das Amplifikationsprodukt aus der PCR mit dem Int<sub>2</sub>F- und dem 3'-CS-Primer hinsichtlich seiner Größe analysiert.

### **Verteilung der Amplikongrößen aus der PCR mit dem 5'- und 3'-Primer für die verschiedenen Spezies**

Das Größenspektrum bei Einschluss aller 96 integronpositiven Enterobacteriaceae-Isolate reichte von 650 bis 3000 bp.

Die Distribution der Amplikons auf unterschiedliche Molekülgrößen war bei der Spezies *E. coli* am breitesten. Dabei ist jedoch auch dem Umstand Rechnung zu tragen, dass die überwiegende Anzahl der untersuchten Proben dieser Art zuzuordnen ist. 1994 besaßen 5 *E. coli*-Isolate uneinheitlich große Insertionsregionen, wobei 650, 800, 1500, 1600 und 1800 bp umfassende Amplifikationsprodukte gemessen wurden. Hervorzuheben ist die Besonderheit des mit 650 bp kleinsten Genkassetten-tragenden DNA-Abschnittes, der ausschließlich bei einem einzigen *E. coli*-Isolat detektiert werden konnte. 1997 variierte die Größe der Insertionsregion innerhalb dieser Spezies zwischen 800 und 2000 bp. Im Einzelnen differenzierten wir Amplifikationsprodukte mit einer Länge von 800, 1000, 1400, 1500, 1600, 1800 und 2000 bp. 2000 wurde für *E. coli* zusätzlich eine 3000 bp große Insertionsregion nachgewiesen, wo hingegen keine Amplikons kleiner als 1000 bp mehr gefunden werden konnten.

Ein einziges *K. pneumoniae*-Isolate von 1994 besaß eine Insertionsregion mit einer Länge von 750 bp. 1997 wurden bei dieser Spezies Amplifikationsprodukte mit 750 und 1800 bp Größe bestimmt und 2000 ließen sich zusätzlich 1600 und 3000 bp umfassende Regionen detektieren.

Die variablen Integronabschnitte der *E. aerogenes*- und *E. cloacae*-Isolate maßen 1994 800 und 1000 bp respektive 1997 800, 1000 und 1500 bp Länge. 2000 war lediglich unter den Vertretern der Species *E. cloacae* gegenüber dem Verteilungsmuster drei Jahre zuvor kein Isolat mit einem 800 bp großen Amplikon mehr auffindbar.

Die Heterogenität bei der Art mit dem höchsten relativen Integronanteil, *K. oxytoca*, präsentierte sich hingegen wenig umfangreich. 1994 und 1997 wurden Insertionsregionen mit 750 und 1600 bp, 2000 zusätzlich auch mit 3000 bp Größe detektiert.

Insgesamt ist also im zeitlichen Verlauf bei den Enterobakterien eine Zunahme des DNA-Gehaltes der variablen Integronregion zwischen den beiden CS zu belegen. Diese

Beobachtung erlaubt die Schlussfolgerung, dass auch die Anzahl der integrierten Genkassetten im gleichen Verhältnis angestiegen ist.

Fünf untersuchte Isolate, drei der Species *E. coli* und zwei von *E. aerogenes*, nehmen eine Sonderstellung ein, da sie zwei, bzw. ein *E. aerogenes*-Isolat sogar drei unterschiedliche Amplikons mit einer Größe zwischen 800 und 2000 bp hervorbringen. Nachfolgend wurde durch Vergleich mit dem PCR-Produkt unter Einsatz des Int<sub>2</sub>F- und 3'-CS-Primer die räumliche Beziehung dieser DNA-Abschnitte zur integronassoziierten Integrase belegt.

Für drei weitere *E. coli*-, ein *K. oxytoca*-, ein *E. aerogenes*- und ein *K. pneumoniae*-Isolat, allesamt aus dem Jahr 1994 und mit positivem Integronnachweis im Colony-Hybridisierungsverfahren, lässt sich auf die hier beschriebene Weise keine genkassettenhaltige Insertionsregion nachweisen.

Tabelle 2: Zuordnung der einzelnen Insertionsregiongrößen zu den verschiedenen Spezies und Jahrgängen

Spezies	1994 Größe der Insertions- regionen (bp)	1997 Größe der Insertions- regionen (bp)	2000 Größe der Insertions- regionen (bp)
<i>E. coli</i>	650, 800, 1500, 1600, 1800 [und 3 „empty“ Integrans]	800, 1000, 1400, 1500, 1600, 1800, 2000	1000, 1400, 1500, 1600, 1800, 2000, 3000
<i>K. pneumoniae</i>	750 [und 1 „empty“ Integron]	750, 1800	750, 1600, 1800, 3000
<i>E. aerogenes</i>	800, 1000 [und 1 „empty“ Integron]	800, 1000, 1500	800, 1000, 1500
<i>E. cloacae</i>	800, 1000	800, 1000, 1500	1000, 1500
<i>K. oxytoca</i>	750, 1600 [und 1 “empty” Integron]	750, 1600	750, 1600, 3000
Summe	650, 750, 800, 1000, 1500, 1600, 1800 [und 6 “empty” Integrans]	750, 800, 1000, 1400, 1500, 1600, 1800, 2000	750, 800, 1000, 1400, 1500, 1600, 1800, 2000, 3000

### **Verteilung der Amplikongrößen aus der PCR mit dem Int<sub>2</sub>F- und 3'-CS-Primer für die verschiedenen Spezies**

Lediglich bei drei *E. coli*-, zwei *K. oxytoca*- und je einem *E. cloacae*- und *E. aerogenes*-Isolat ließ sich mit diesen beiden Primern im Gegensatz zu der PCR mit dem 5'- und 3'-Primer, kein Amplikon erzeugen. In allen anderen Fällen war das Produkt, gemäß der Lokalisation der Zielsequenzen im Bereich des Integrasegens und des 3'-CS, um 600 Basenpaare länger, als die entsprechende Bezugssequenz unter Verwendung der Primer zur Bestimmung der Größe der Insertionsregion. Insofern ist für diese Isolate die Integrität des strukturellen Aufbaus des untersuchten DNA-Abschnitts im Sinne der Definition der Klasse-1-Integrone belegt. Daher verzichten wir an dieser Stelle auf eine genaue Angabe des Verteilungsmusters der einzelnen Amplikongrößen für die verschiedenen Spezies.

Unter Verwendung der hier genannten Primer konnte bei zwei der drei integronpositiven *E. coli*- und jeweils einem *K. pneumoniae*-, *K. oxytoca*- und *E. aerogenes*-Isolaten, deren Insertionsregionen mit dem 5'- und 3'-CS-Primer nicht nachweisbar waren, ein ca. 600 bp großes PCR-Produkt amplifiziert werden. Folglich handelt es sich hierbei um „leere“ Integron-Plattformen ohne akquirierte Genkassen, ein Phänomen, das nur 1994 von uns beobachtet wurde.

Das Amplikon des letzten verbleibenden *E. coli*-Isolates umfasste eine längere DNA-Sequenz. Wahrscheinlich liegt dem Ergebnis eine Alteration im 5'-CS zu Grunde. Der Beweis dieser These steht noch aus. Wegen der fehlenden Darstellbarkeit einer DNA-haltigen Insertionsregion, trotz eindeutig vorhandener integronspezifischer Sequenzabschnitte, postulierten wir für dieses Isolat ebenfalls die Präsenz einer „leeren“ Integron-Plattform.

### **3.3 Sequenzierungsergebnisse der Promotorregion**

Die Sequenzierung der Promotorregion erfolgte unter der Fragestellung, ob sich eine Verschiebung der Prävalenz, hin zu Promotortypen mit einer höheren Transkriptionseffizienz, im Verlauf des Untersuchungszeitraumes belegen lässt.

1994 verfügten 15,8% (3 von 19) aller integronpositiven Enterobacteriaceae-Isolate über die „starke“ Variante des P1-Promotors mit der dadurch vermittelten höchst möglichen Transkriptionsrate für die nachgeschalteten Genkassetten. Drei Jahre später lag der Prozentsatz

schon bei 22,2% (6 von 27) und 2000 besaß mit 46% (23 von 50) nahezu die Hälfte des Untersuchungsmaterials diesen Typ.

Annähernd reziproke Verteilungsverhältnisse fanden sich für die „schwache“ P1-Promotorvariante. 1994 betrug die relative Häufigkeit für diesen Typ 57,9% (11 von 19). In den nachfolgenden Jahren reduzierte sich der Anteil, so dass 1997 nur noch 55,9% (15 von 27) der Isolate den Promotor mit der geringsten Transkriptionseffizienz aufwiesen und 2000 der Prozentsatz sogar auf 34% (17 von 50) gefallen war.

Da die phänotypischen Eigenschaften der beiden verschiedenen Hybridpromotor-Varianten als identisch zu betrachten sind, erfolgte eine gemeinsame Betrachtung im Sinne eines einzigen Promortyps. In allen drei Untersuchungsjahrgängen dieser Studie fanden wir jeweils drei integronpositive Isolate mit einem Hybridpromotor. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Gesamtzahl aller analysierten Proben ist für 1994 ein prozentualer Anteil von 15,8% (3 von 19), für 1997 von 11,1% (3 von 27) und für 2000 nur noch von 6% (3 von 50) anzuführen.

Schließlich existiert noch eine vierte strukturelle Organisationsform der Promotorregion, wobei der „schwache“ P1-Promortyp vergesellschaftet mit der 119 Basenpaare weiter strangabwärts gelegenen aktiven Variante des P2-Promotors nachweisbar ist. 1994 betrug der Anteil dieser Konstellation, bezogen auf alle Isolate mit einem positiven Klasse-1-Integron-Nachweis, 10,5% (2 von 19). Drei Jahre später war bereits ein Anstieg auf 11,1% (3 von 27) zu verzeichnen gewesen und 2000 enthielten 14% (7 von 50) aller untersuchten Proben diese synergistisch wirkende Promotorkombination.

Betrachtet man nun die „starke“ P1-Promotorvariante und den Kompositionspromotor (P1<sub>weak</sub> + P2<sub>aktiv</sub>) zusammen, so ist im Verlauf eine deutlich Verschiebung zu diesen beiden Organisationsformen der Promotorregion mit den höchsten Transkriptionseffizienzen erkennbar. Diesbezüglich fand sich ein signifikanter Prävalenzanstieg gemessen an der Gesamtzahl aller integrontragenden Enterobacteriaceae-Isolaten von 26,3% (5 von 19) 1994 über 33,3% (9 von 27) 1997 bis auf zuletzt 60% (30 von 50) im Jahr 2000.

Tabelle 3: Verteilung der Promotortypen

	1994		1997		2000	
	n	%	n	%	n	%
P1 <sub>strong</sub>	3	15,8	6	22,2	23	46,0
P1 <sub>weak</sub>	11	57,9	15	55,6	17	34,0
P1 <sub>Hybrid</sub>	3	15,8	3	11,1	3	6,0
P1 <sub>weak</sub> + P2 <sub>aktiv</sub>	2	10,5	3	11,1	7	14,0
Summe	19	100,0	27	100,0	50	100,0

### 3.4 Diskrepanzen im Resistenzverhalten zwischen Enterobacteriaceae-Isolaten mit und ohne Integron-Klasse-1-assoziierte Genkassetten

Für diesen Abschnitt des Ergebnisteils bedienten wir uns des Mikrodilutionsverfahrens entsprechend den standardisierten Kriterien des NCCLS. Die Empfindlichkeitstestung erfolgt mit Hilfe einer Antibiotika-Verdünnungsreihe und anschließender Inkubation des Versuchsansatzes in 96-Loch-Mikrotiterplatten. Wir verglichen die insgesamt 90 integronpositive **und** genkassettentragende Isolate mit den verbleibenden 751 Isolaten, bei denen keine integronassoziierten Insertionskassetten nachgewiesen werden konnte. Hierzu zählten folglich auch die 6 Isolate mit den „empty“-Integrans.

Die Auswertung belegte, dass die Einschleusung von Genkassetten in eine Integron-Plattform statistisch gesehen zu einer signifikanten Zunahme von Resistenzen gegenüber einigen  $\beta$ -Lactamen und anderen Antibiotikaklassen führt. Für Ampicillin lag die Prävalenz resistenter Isolate bei 53% gegenüber 37% ( $P < 0,01$ ), für Ticarcillin bei 49% gegenüber 29% ( $P < 0,01$ ) und für Piperacillin bei 42% gegenüber 19% ( $P < 0,01$ ), jeweils zu Gunsten des integron- **und** genkassettenpositiven Kollektives.

Bezüglich der Kombination aus den beiden Folsäureantagonisten Trimethoprim und Sulfamethoxazol zeigten sich 52% der Isolate mit genkassettenhaltigen Klasse-1-Integrans, jedoch nur 7% aus der anderen Gruppe resistent.

Ferner verhielten sich beide Kollektive auch hinsichtlich der Empfindlichkeit gegenüber dem Gyrasehemmer Ciprofloxacin statistisch eindeutiger diskrepant. Während 8% des Untersuchungsmaterials mit integronassoziierten Genkassetten gegenüber dem genannten Chinolon resistent waren erfüllten nur 3% der übrigen Enterobakterien dieses Kriterium.

Letztlich waren auch 10% der mit einem genkassettenhaltigen Integron ausgestatteten Isolate Gentamicin-unempfindlich, die Prävalenz für dieses phänotypische Merkmal lag in der anderen Gruppe jedoch nur bei 5%.

Tabelle 4: Prävalenz unterschiedlicher Antibiotikaresistenzen

Antibiotikum		Isolate mit integron- assoziierten Genkassetten	Isolate ohne integron- assoziierte Genkassetten
β- Lactam- Anti- biotika	Ampicillin	53%	37%
	Ticarcillin	49%	29%
	Piperacillin	42%	19%
Trimethoprim + Sulfamethoxazol		52%	7%
Ciprofloxacin		8%	3%
Gentamicin		10%	5%

Eine signifikante, integronvermittelte Veränderung der Suszeptibilität von Erregern gegenüber den Cephalosporinen Cefuroxim, Cefotaxim, Ceftazidim und Cefipime, dem Carbapenem Imipenem, den Aminoglykosiden Tobramycin und Amikacin, sowie dem Monobactam Aztreonam, ließ sich in unserer Studie nicht nachweisen.

## 4. Diskussion

### 4.1 Epidemiologische Aspekte der Klasse-1-Integron-Struktur

Kliniker nahezu aller Fachdisziplinen sehen sich heute mit dem Problem einer zunehmenden Verbreitung von Resistenzen gegenüber einer Vielzahl antimikrobiell wirksamer Substanzen konfrontiert. Gerade der Einsatz so genannter „Breitspektrumantibiotika“ in der Initialphase der Therapie unklarer Infekte mit noch ausstehendem Erregernachweis, verschafft besonders in jüngster Zeit häufig nicht mehr den gewünschten Behandlungserfolg. Diese Beobachtung lässt einen vorwiegend horizontalen inter- und intraspeziellen Gentransfer, mit der Folge der raschen Distribution unterschiedlicher adaptiver Eigenschaften, vermuten. So belegen beispielsweise die Daten der PEG-Resistenzstudie 2001 einen rapiden Prävalenzanstieg von ESBL-Bildnern bei den gram-negativen Bakterien, parallel zum forcierten Gebrauch entsprechender  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (97). Besonders die nosokomialen Infektionserreger sind in der Krankenhausumgebung einem hohen und wechselnden Selektionsdruck exponiert. Nur die Fähigkeit zur schnellen Anpassung des Phänotyps an die sich ändernden Anforderungen kann in einem solchen Umfeld das Überleben garantieren. Dabei spielt zum einen die Plastizität des Genoms, das heißt die Möglichkeit zur Aquirierung neuer Sequenzabschnitte bzw. der Umverteilung bereits vorhandener DNA-Kompartimente eine entscheidende Rolle, zum anderen muss jedoch auch zusätzlich die Expression der auf diese Weise erworbenen oder neu platzierten Gene gewährleistet sein.

Im Gegensatz zu den klassischen mobilen Elementen wie Plasmide und Transposonen, sind Integrons selbst residente Strukturen, die jedoch kleinere und damit auch stabilere DNA-Fragmente durch einen spezifischen integrasekatalysierten Rekombinationsvorgang in das Genom einbauen können. Sie besitzen ferner eine dem Insertionsbereich vorgeschaltete Promotorregion, von der aus die assoziierten Strukturgene gemeinsam exprimiert werden (10, 11, 20). Integronhaltige Bakterienstämme verfügen somit über eine genetische Ausstattung, die es ihnen erlaubt innerhalb kürzester Zeit auf sich ändernde Umweltfaktoren reagieren zu können. Die hohe Anpassungsfähigkeit verschafft den entsprechenden Mikroorganismen einen relevanten Selektionsvorteil, besonders dort, wo ein massiver Einsatz von Antibiotika unterschiedlicher Klassen stattfindet. Diese theoretischen Überlegungen leiten zu der Schlussfolgerung, dass eine positive Korrelation zwischen Umfang und Häufigkeit antimikrobieller Therapien und Prävalenz von Erregern mit positivem Integronnachweis zu postulieren ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen die genannte These. Unsere Untersuchungen berücksichtigten die jeweils ersten 300 Enterobacteriaceae-Isolaten der Jahre 1994, 1997 und 2000, gewonnen aus Blutkulturen von Patienten der Universitätskliniken Düsseldorf. Dabei war eine signifikante Zunahme der integronpositiven Keime im zeitlichen Verlauf zu belegen. Lag die Integron-Prävalenz innerhalb unseres Kollektivs 1994 noch, bei 6,9%, so fand sich im Jahr 2000 diesbezüglich bereits ein relativer Anteil von 17,4%. Zwar wiesen die unterschiedlichen Spezies keine einheitlichen Zuwachsraten auf, dennoch konnte für jede der untersuchten Enterobakterienart eine gleichgerichtete Entwicklung belegt werden. Hervorzuheben ist, dass der Prävalenzanstieg von Isolaten mit positivem Integronnachweis im Zeitintervall zwischen 1997 und 2000 signifikant steiler ausfiel als zwischen 1994 und 1997. Diese Beobachtung lässt für die Zukunft eine möglicherweise exponentielle Zunahme integronhaltiger Enterobacteriaceae-Stämme vermuten, sofern der flächendeckende Einsatz von Maßnahmen zur Eindämmung einer weiteren Verbreitung unterbleibt.

Bezeichnender Weise stammten 78% der integronpositiv getesteten Isolate von intensivmedizinisch behandelten Patienten, 15% von Patienten auf Normalstationen und nur 7% von Patienten der Notaufnahmen. Insofern scheint, wie erwartet, ein konstant hoher bzw. ansteigender Selektionsdruck durch Antibiotikagebrauch unmittelbaren Einfluss auf die Verteilung der hier untersuchten genetischen Funktionseinheit innerhalb der mikrobiellen Umgebung zu haben.

Die von uns gefundenen Integron-Prävalenzdaten decken sich mit den publizierten Ergebnissen anderer vergleichbarer Studien. So konnten beispielsweise Alvarez-Fernandez et al. innerhalb eines Kollektivs multiresistenter Enterobakterien einen Anstieg des Anteils der integronhaltigen Isolate von 21,2% aus den Jahren 1992-1994 auf 72% aus 1995-1997 verzeichnen (98).

Im Gegensatz zu einer Reihe anderer Arbeiten bedienten wir uns bei der Feststellung der Integronprävalenz einem Colony-Hybridisierungsverfahren. Dabei fanden als Zielsequenzen für die Oligonukleotidsonden jeweils die gleichen hochgradig konservierten DNA-Abschnitte des 5'- respektive 3'-CS Verwendung, die auch von den spezifischen Primern für die Amplifikation der Insertionsregion erkannt werden. Auf diese Weise gelang es uns auch bei sechs Isolaten, allesamt aus dem Jahr 1994, so genannte „Empty-Integrone“ nachzuweisen. Untersuchungsprotokolle, die lediglich die genannte PCR-Methode zur Integronidentifikation und gleichzeitigen Umfangbestimmung der Insertionsregion vorsehen, beinhalten nicht die Option genkassettenlose Integron-Plattformen zu detektieren, da sich das hierbei zu

erwartende Amplikon aufgrund seiner geringen Größe außerhalb des durch das Agarosegel vorgegebenen Auftrennungsbereiches befinden würde.

Diverse internationale Untersuchungen haben belegt, dass die genannten Beobachtungen nicht wenigen regionalen Besonderheiten entsprechen, sondern Integronstrukturen heute vor allem bei gram-negativen Bakterien als ubiquitär verbreitet zu betrachten sind (22, 23, 99).

Die nachweislich überaus schnelle Distribution dieser genetischen Funktionseinheit bei einer zunehmenden Anzahl unterschiedlicher Prokaryontenfamilien, -gattungen und -arten während der letzten 20 Jahren seit der Erstbeschreibung ist nur durch einen horizontalen Transfer entsprechender Genombestandteile zu erklären. Der Beweis dieser Hypothese konnte mit Hilfe von Sequenzierungsverfahren erbracht werden. Zwar handelte es sich bei den Integron-Plattformen selbst nicht um mobile Elemente, jedoch sind sie überwiegend auf konjugativen Plasmiden lokalisiert und/oder mit Transpososomen assoziiert (20, 43, 99, 100). Einige Vertreter sind als defekte Transposonderivate zu verstehen, die zur illegitimen Rekombination eine zusätzliche Erkennungsstruktur benötigen (101, 102, 103). Der Nachweis einer Beteiligung dieser Transpositionsmechanismen erklärt somit das Phänomen des rapiden Integron-Prävalenzanstieges bei einer Vielzahl von Bakterienspezies und die zunehmende Verbreitung innerhalb des Prokaryontenreiches. Eine Ausnahme bilden in dieser Hinsicht jedoch die evolutionsgeschichtlich älteren chromosomalen Super-Integrone, die als residente Strukturen zu betrachten sind (43).

## 4.2 Resistenzverhalten integronhaltiger Bakterienstämme

Der Begriff „MRSA“ definiert eine eindeutige phänotypische Eigenschaft eines entsprechenden Bakteriums. Im Gegensatz dazu erfolgt die Einteilung in integronpositive und -negative Stämme einzig anhand des jeweiligen Genotyps. Ob die Ausstattung des Genoms mit einer solchen Struktur einen individuellen Selektionsvorteil verschafft, richtet sich nach Art und Anzahl der innerhalb der Insertionsregion lokalisierten adaptiven Eigenschaften und der Effizienz ihrer Expression.

Für Klasse-1-Integrone gilt, dass, abgesehen von ORFs unbekannter Funktion, nahezu ausschließlich Antibiotikaresistenz-vermittelnde Genkassetten akquiriert werden (24). Die Transkriptionsrate der einzelnen Cistrons ist dabei von mehreren Faktoren bestimmt. Hierzu zählt die Positionierung der kodierenden Abschnitte innerhalb der Reihenfolge der Insertionskassetten, die Eigenschaft der vorausgehenden 59-Basenelemente bezüglich ihrer

Funktion als Transkriptionsterminator oder „Processing-Signal“ und die Stärke der jeweils gegebenen Promotorkonfiguration hinsichtlich ihrer Affinität gegenüber den *DNA-abhängigen RNA-Polymerasen*(20, 24, 27, 41, 90). Allgemein lässt sich formulieren, dass die Expressionswahrscheinlichkeit eines Gens mit zunehmender Entfernung von der gemeinsamen Promotorstruktur im 5'-CS der Integron-Plattform abnimmt (27, 41, 90).

Darüber hinaus existieren auch TIR-lose Insertionskassetten, deren adaptive Funktionen nur dann zum Tragen kommen können, wenn sie exakt in erster Position innerhalb der Insertionsregion eingebaut sind. Die Translation wird in diesen Fällen in Abhängigkeit vom ORF-11 im äußersten 3'-Ende des 5'-CS initiiert (43, 73).

In Anbetracht der vorab dargestellten komplexen Zusammenhänge wird deutlich, dass sich Untersuchungen zum Resistenzverhalten integronpositiver Bakterien nicht nur auf phänotypische Testungen beschränken dürfen, sondern parallel auch Erkenntnisse über die jeweiligen strukturellen Gegebenheiten der genetischen Funktionseinheit gewonnen werden müssen.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher neben den antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfungen auch die Größe der Insertionsregion eines jeden zuvor als integronhaltig identifizierten Isolates bestimmt und zusätzlich die Promotorregion sequenziert. Auf eine genaues „Mapping“ der einzelnen Gene verzichteten wir hingegen.

Daher war es uns nicht möglich mit den gewählten Methoden die exakte Anzahl der eingebauten Genkassetten und deren genaue Funktion zu determinieren. Jedoch konnte anhand des Umfangs der Amplifikationsprodukte aus der PCR mit den spezifischen 5'-CS- und 3'-CS-Primern ein eindeutiger Tendenz hin zu größeren Insertionsregionen während des siebenjährigen Untersuchungszeitraumes belegt werden.

Eine solche Entwicklung ist einzig durch die entsprechende numerische Zunahme integrierter Genkassetten zu erklären, da diese Strukturen generell nur ein, in seltenen Fällen auch zwei Cistrons neben dem 59-Basenelement enthalten (15, 27). Insgesamt stimmen diesbezüglich unsere Daten mit anderen Studien, darunter auch die der Arbeitsgruppe von Naas et al. überein, die ebenfalls den Trend zum Multi-Resistenz Integron (MRI) erkennen lassen (45).

Es konnten für alle getesteten Spezies, als Ausdruck der Heterogenität der Insertionssequenzen, verschiedene unterschiedliche Größen des variablen Integronsegments nachgewiesen werden.

Andererseits fanden sich jedoch auch vielfach dem Umfang der enthaltenen Basenpaare nach identische Insertionsregionen bei nicht verwandten Isolaten unterschiedlicher oder derselben

Art. Diese Beobachtung bestärkt die Hypothese des horizontalen intra- und interspeziellen DNA-Transfers stabiler genetischer Elemente.

Martinez-Freijo et al. beschäftigten sich mit der nachfolgenden Frage, ob zusätzlich auch eine Assoziation von bestimmten Promotorsequenzen mit offensichtlich relativ feststehenden Genkassetten-Kombinationen nachweisbar ist. Dabei konnte tatsächlich bei unterschiedlichen, nicht verwandten Isolaten eine Verknüpfung des 5'-konservierten Integronsegments mit den am häufigsten vorkommenden Insertionssequenzen im Sinn einer als stabil zu betrachtenden Struktur gefunden werden. Diese Elemente lassen sich en bloc aus dem Genom mobilisieren und auf andere Prokaryonten übertragen (24). Folglich besteht somit für den neuen Wirtsorganismus auch dann die Möglichkeit zur Expression, wenn die entsprechenden (Resistenz-) Gene nicht wie bei einem spezifischen Integrase-vermittelten Rekombinationvorgang in ein vollständiges Integron eingebaut werden, sondern die Insertion an einem sekundären Genomort stattfindet. Dieses Modell des DNA-Transfers ist insofern auch dazu geeignet, einige Aspekte der Genese des Klasse-4-Integron-Typus zu erklären (24, 43, 46).

Eine weitere interessante Beobachtung hinsichtlich des vergesellschafteten Auftretens gestimmter Resistenzmechanismen bei nosokomialen Erregern machten Levesque et al. Mitte der 90er Jahre. Im Rahmen ihrer Evaluierungsstudie zum Einsatz des PCR-Mappings bei integronpositiven Bakterien fanden sie häufig wiederkehrende Multiresistenz-Operone, die zehn Jahre zuvor nicht detektiert worden waren und deren Existenz somit in erster Linie durch den Umstand einer gemeinsamen Mobilisierung und Integration der einzelnen Komponenten in geeignete genetische Aquirierungs- und Expressionselemente zu erklären ist (90). Die ausschließliche Verwendung damals aktueller Isolate aus der Routinediagnostik unterstreicht die klinische Relevanz dieser Untersuchungen.

Der Grad der Widerstandsfähigkeit eines Bakteriums gegenüber einem bestimmten Antibiotikum ist nicht nur durch die Art, also die Qualität des Resistenzmechanismus, sondern unter anderem auch durch die Quantität seiner Expression bestimmt. Die Effizienz des Promotors gilt als Maß für die Transkriptionsrate der nachgeschalteten Gene. Vorausgesetzt die entsprechenden Sequenzabschnitte verfügen über eine „translation initiation region“, so korreliert die Menge der produzierten m-RNA direkt mit dem Ausprägungsgrad der jeweiligen adaptiven Funktion.

Darüber hinaus wird die Expressionsstärke einer Eigenschaft auch durch die fakultative Anwesenheit eines weiteren internen Promotors und die Anzahl der Plasmidkopien mit dem zu untersuchenden Gen beeinflusst.

Bekanntermaßen setzt sich die Promotorregion der Klasse-1-Integrone aus zwei potentiellen Promotorstrukturen, P1 und P2 genannt, zusammen. Von P1 existieren insgesamt vier Varianten, ein „starker“, ein „schwacher“ und zwei Hybrid-Promotoren. P2 ist entweder in aktiver oder inaktiver Form nachweisbar (17, 41).

Um Erkenntnisse über mögliche, die Expressionseffizienz betreffende Veränderungen im Verlauf des von uns gewählten Untersuchungszeitraums nachweisen zu können, führten wir bei alle integronhaltigen Isolaten eine Sequenzierung der entsprechenden Region durch. Hierbei zeigte sich, dass 1994 noch über die Hälfte aller Integrone allein mit dem „schwachen“ Promotor ausgestattet waren. 2000 lag der Anteil dieser Variante hingegen nur noch bei einem Drittel. Umgekehrte Verhältnisse fanden sich erwartungsgemäß für den „starken“ Promortyp, der 1994 noch mit 15,8%, 2000 hingegen bereits mit 46% relativem Anteil vertreten war. Eine gleichgerichtete, wenn auch weniger extreme Entwicklung ließ sich für den Compound-Promotor ( $P1_{\text{weak}}+P2_{\text{activ}}$ ) beobachten. Die beiden Hybridvarianten wurden aufgrund der identischen Potenz in Bezug auf ihre spezifische, verhältnismäßig geringe Transkriptionswirksamkeit zusammen gefasst gewertet und zeigten dabei trotz konstantem numerischen Auftreten eine Reduktion der relativen Häufigkeit von 15,8% im Jahr 1994 bis auf 6% sieben Jahre später. Insgesamt konnte somit ein „Shift“ von den Promortypen mit geringer hin zu denen mit hoher Effizienz hinsichtlich des zu erwartenden Ausprägungsgrades der von den in 3'-Richtung gelegenen Genkassetten kodierten phänotypischen Merkmalen bewiesen werden.

Der klinisch relevante Bezug für diese Beobachtung lässt sich theoretisch zum Beispiel durch eine Longitudinalstudie mit Bestimmung der MHK (Minimale Hemmkonzentration)-Breakpoints für ein ausgewähltes Antibiotikum bei integronpositiven Isolaten derselben Spezies aus verschiedenen Jahren herstellen. Der Nachweis, dass die Resistenz jeweils durch das gleiche Gen vermittelt wird und dabei Abfolge, Anzahl und Struktur der übrigen Genkassetten innerhalb der Insertionsregion identisch bleiben, muss im Fall eines angestrebten direkten Vergleichs erbracht sein. Dies setzt den Transfer verhältnismäßig stabiler Operone voraus. Wie oben erwähnt ist jedoch offensichtlich auch die Promotorstruktur Teil dieser Art von genetischen Elementen und daher ist gerade unter solchen Bedingungen nicht mit einer raschen Alteration derselben zu rechnen. Folglich sind in diesem Zusammenhang nur Isolate mit Integrone, welche ausschließlich über das eine, zur Ausprägung der ausgewählten Resistenz erforderliche Gen verfügen, verwendbar. In Anbetracht der forcierten Entwicklung hin zu den Multiresistenz-Integrone dürfte sich die Auswahl entsprechenden Untersuchungsmaterials als schwierig erweisen (43, eigene

Ergebnisse). Ferner muss die Anzahl der jeweiligen Plasmidkopien konstant und der Einfluß anderer kodierender Sequenzabschnitte auf die Ausprägung des Zielparameters ausgeschlossen werden. Insgesamt ist eine alle genannten Kriterien erfüllende Studie praktisch nicht durchführbar.

Dennoch belegen vergleichende epidemiologische Untersuchungen für integronhaltigen Isolaten aus jüngster Zeit eine offenkundige Entwicklung hin zu höheren MHK-Breakpoints für die unterschiedlichen getesteten Antibiotika (23, 26, 79, 104, 105). Insofern lassen diese Beobachtungen im Zusammenhang mit den Ergebnissen unserer Sequenzierungen den Schluß zu, dass der nachgewiesene „Shift“ der Promotorregion in Richtung der effizienteren Typen in der Tat ein entsprechendes phänotypisch erkennbares Korrelat aufweist.

In der vorliegenden Studie führten wir zur Beantwortung der Resistenzfrage eine Suszeptibilitätstestung mit Hilfe des Mikrodilutionsverfahrens gemäß den standardisierten Kriterien des NCCLS durch. Für die Gruppe der integronhaltigen Bakterien konnte dabei eine signifikant höhere Prävalenz von gegenüber den  $\beta$ -Laktam-Antibiotika Ampicillin, Ticarcillin, und Piperacillin, der Kombination der beiden Folsäureantagonisten Trimethoprim und Sulfonamid, dem Gyrasehemmer Ciprofloxacin sowie dem Aminoglykosid Gentamicin unempfindlichen Isolaten im Vergleich zum Kontrollkollektiv ohne Integronstruktur belegt werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Resultaten diverser anderer Untersuchungen (23, 26). Insofern ist für integronpositive Bakterien ein eindeutiger Zusammenhang zwischen ihrem spezifischen genotypischen Ausstattungsmerkmal und einer herabgesetzten Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika (-klassen) nachweisbar.

Aussagen zu der Frage, ob eine exprimierte Resistenzeigenschaft tatsächlich von einem Sequenzabschnitt innerhalb der Insertionsregion kodiert wird, lassen sich wie schon gesagt nur bei gleichzeitiger Anwendung eines genetischen Mapping-Verfahrens treffen. Aus verschiedenen Untersuchungen geht jedoch hervor, dass durch die Platzierung von Klasse-1-Integrone und anderen Operonen auf einem gemeinsamen Wirtsplasmid eine starke Assoziation zwischen diesen Strukturen generiert wird. Folglich werden auch die jeweils enthaltenen Strukturgenen im Falle einer Konjugation zusammen an die nächste Bakterienzelle weitergegeben und hier erneut klonal vervielfältigt. Ein Beispiel hierfür ist die vom SHV- und TEM-Gen abgeleitete, überwiegend plasmidvermittelte ESBL-Eigenschaft gram-negativer Erreger, die aktuell zunehmend bei integronhaltigen Isolaten nachgewiesen wird, ohne das bisher das entsprechende Cistron als Bestandteil der Insertionsregion determiniert werden konnte (23, 26). Diese Konstellation bietet den Vorteil der konstanten Resistenzexpression, unabhängig von möglichen spezifischen Rekombinationsereignissen und

führt daher diesbezüglich zu einem unter statistischen Gesichtspunkten beständigeren phänotypischen Merkmal.

Auch die Suszeptibilität gegenüber Chinolonen ist bei integronpositiven Bakterien signifikant häufiger herabgesetzt als bei Erregern ohne ein solches DNA-Element, obwohl bekanntlich vorrangig chromosomale Punktmutationen und keine potentiell transferierbaren Gene für die Ausprägung einer Resistenz diese Antibiotikaklasse betreffend verantwortlich sind (26, 106). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen liefert die Existenz von so genannten Mutatorplasmiden, die zum einen zu einer Erhöhung der Mutationsrate im Wirtsorganismus führen, zu anderen aber auch als Integronträger fungieren können (106, 107). Kürzlich wurde darüber hinaus das eine Low-Level-Quinolon-Resistenz kodierende *qur*-Gen auf dem Plasmid pM6252 in einer Integron-ähnlichen Umgebung nachgewiesen. Anders als bei den Insertionskassetten konnte allerdings kein 59-Basenelement der Cistronsequenz in 3'-Richtung folgend detektiert werden (108).

Eine weitere Besonderheit der Klasse-1-Integrone ist durch den strukturellen Aufbau des 3'-konservierten Segmentes begründet. Dieser Bereich verfügt über das *sul1*- (Sulfonamidresistenz) und das *qacEΔ1* (antiseptische Resistenz gegenüber quaternären Ammoniumverbindungen)-Gen, sowie deren eigene, den kodierenden Sequenzen unmittelbar in 5'-Richtung vorausgehende Promotorregion (20, 27, 36, 90). Folglich ist auch die Expression dieser beiden Eigenschaften nicht den für die Insertionskassetten geltenden Gesetzmäßigkeiten unterworfen. Levesque et al. erreichten mit ihrem PCR-Verfahren unter Verwendung einer *sul1*-Sonde eine 90%ige Sensitivität hinsichtlich der Identifizierung von Klasse-1-Integron-positiven Bakterien (90). Die gewählte Zielsequenz muss daher innerhalb eines hochgradig konservierten DNA-Abschnitts des nachzuweisenden genetischen Elementes liegen. Im klinischen Alltag kann somit die Untersuchung von Isolaten auf das Vorhandensein einer durch das *sul1*-Gen bedingten Sulfonamidresistenz im Sinne eines Surrogatmarkers für Klasse-1-Integrone von Nutzen sein.

### **4.3 Multiresistenz-Integrone besitzen ein genetisches „Kurzzeitgedächtnis“**

Jeder Organismus ist in seiner natürlichen Umgebung verschiedenen, wechselnden Selektionsfaktoren gegenüber exponiert. Sich ändernde Umweltbedingungen sorgen dabei für ein dynamisches Zusammenspiel der einzelnen Einflussgrößen. Die Überlebenswahrscheinlichkeit für jede Spezies innerhalb eines solchen Kosmos ist einerseits von der

Fähigkeit zur raschen Adaptation an neue Gegebenheiten, andererseits aber auch von einer möglichst hohen individuellen Reproduktionsrate abhängig, um von Arten mit vergleichbarer Widerstandskraft nicht aus dem Habitat gedrängt zu werden. Grundsätzlich gilt, dass mit jedem zusätzlich exprimierten Merkmal der Vermehrungszyklus länger wird. Anders ausgedrückt besitzen Antibiotika-resistente Bakterien gegenüber sensitiven Bakterien der gleichen Spezies in Abwesenheit eines entsprechenden Selektionsdrucks eine reduzierte „Fitness“ (109-112). Um die Balance zwischen den beiden oben genannten Paradigmen zu wahren, führt im Allgemeinen das kontinuierliche Wachstum in einer nicht-selektionierenden Umgebung eher zur kompensatorischen Akkumulation von sekundären, den energetischen Umsatz des Organismus verbessernden Mutationen, als zum Verlust der neu erworbenen adaptiven Resistenzeigenschaft (109, 111).

Integrone eröffnen in diesem Zusammenhang eine weitere Option. Wie schon erwähnt nimmt die Expressionswahrscheinlichkeit einer Genkassetten-assoziierten Funktion mit wachsender Entfernung vom 5'-konservierten Segment ab. Bei Multiresistenz-Integrone, die bis zu acht verschiedene adaptive Eigenschaften beherbergen können, werden die weiter in 3'-Richtung gelegenen Cistrons in der Regel nicht mehr transkribiert. Die mRNA-Synthese wird dabei in erster Linie durch Ausbildung von „stem-loop-structures“ innerhalb der zu den entsprechenden 59-Basenelementen komplementären Sequenzabschnitten im neu entstehenden Strang terminiert (27, 41, 43, 69). Da die *IntI1*-Integrase sowohl spezifische Integrations- als auch Exzisionsvorgänge katalysiert, befähigt sie das jeweilige Integron zum internen „Kassetten-Rearrangement“ (10, 13, 14, 39). Das Enzym ist am effizientesten, wenn als Reaktionspartner je eine *attI1*-Rekombinationsschnittstelle und ein 59-Basenelement involviert sind. Folglich werden Genkassetten bevorzugt in erster Position innerhalb der Insertionsregion eingebaut (13, 59, 60). Diese Gesetzmäßigkeiten gelten natürlich auch für integroninterne Rekombinationsvorgänge. Durch diesen integraseabhängigen Regulationsmechanismus kann auf einfache Weise die Genexpression allein anhand der Positionierung der kodierenden Sequenzabschnitte gesteuert werden. Dem Wirtsorganismus bleiben so einmal erworbene, jedoch zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht benötigte adaptive Funktionen erhalten, ohne dabei einen zusätzlichen energetischen Aufwand zu verursachen. Da mit einer gewissen statistischen Wahrscheinlichkeit immer spontane Genkassettenneuordnungen stattfinden, sind integronpositive Bakteriestämme bei entsprechendem Selektionsdruck hinsichtlich einer einmal erworbenen antimikrobiellen Eigenschaft in der Lage vom sensiblen in den resistenten Status zu wechseln und vice versa. Für die phänotypische Untersuchung von Infektionserregern lassen sich daraus im klinischen

Alltag zwei grundlegende Probleme ableiten. Zum einen kann derselbe Bakterienstamm zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedliche Resistenzmuster aufweisen, zum anderen ist es auch möglich, dass ein bezüglich eines bestimmten Antibiotikums sensibel getesteter Stamm dennoch als genetische Quelle für die Integron-assoziierte Distribution eben dieser Resistenz in Betracht zu ziehen ist (43).

Im interindividuellen DNA-Transfer spielen spezifische Rekombinationsereignisse einzelner Genkassetten eine untergeordnete Rolle. Verschieden Studien haben den vorrangigen Austausch ganzer Integrons oder zumindest größerer stabiler genetischer Elemente, die insbesondere die (komplette) Insertionsregion und den Promotorabschnitt enthalten, belegt (24, 90). Dieser Mechanismus ist unter evolutionären Gesichtspunkten durchaus effektiv und ökonomisch. Es ist zu postulieren, dass bei nosokomialen integronhaltigen Keimen die Ausstattung der Insertionsregion mit verschiedenen Resistenzgenen den in der jeweiligen Umgebung herrschenden antimikrobiellen Selektionsdruck reflektiert. Daher ist es sinnvoll wenn sowohl beim intra- als auch beim interspeziellen DNA-Transfer zwischen Bakterien innerhalb desselben Refugiums bereits etablierte Kombinationen adaptiver Eigenschaften „en bloc“ ausgetauscht werden. Auf diese Weise wird dem neuen Wirtsorganismus von Beginn an die bestmögliche Widerstandsfähigkeit gegenüber den existierenden Umwelteinflüssen vermittelt. Insofern kann durch horizontalen Transfer eine/ein in dieser Umgebung neu hinzugetretene/-er Spezies/Stamm ad hoc auf den phylogenetischen Stand einer/eines angestammten Spezies/Stamms gebracht werden, ohne vorher den hierfür verantwortlichen Selektionskräften gegenüber exponierte gewesen zu sein.

Die phänotypische Flexibilität eines integrontragenden Bakteriums lässt sich im Wesentlichen durch die folgenden drei Faktoren begründen.

- 1.) Ancestral chromosomal Super-Integrons sind entwicklungsgeschichtlich alte Bestandteile verschiedener Prokaryontengenome. Jedes einzelne enthält über 200 ORFs mit unterschiedlichen adaptiven Eigenschaften. Die Super-Integrons sind vermutlich heute in erster Linie als „genetischer Pool“ von während der jeweiligen Bakterienphylogese erworbenen Resistenzen gegenüber einer Vielzahl natürlich vorkommender Antibiotika bedeutsam (44, 50, 52).
- 2.) Multiresistenz-Integrons repräsentieren hinsichtlich der Zusammensetzung ihrer Gene den über einen gewissen Zeitraum auf das sie beherbergende Bakterienkollektiv einwirkenden Selektionsdruck. Dabei kodieren die Insertionskassetten in den ersten Positionen für

aktuell verwandte Antibiotika. Beim inter- und intraspeziellen DNA-Transfer werden primär ganze MRIs oder zumindest große stabile Integronen ausgetauscht (24, 90).

- 3.) IntI1-Integrase-abhängige spezifische Rekombinationsvorgänge dienen wahrscheinlich überwiegend der integroninternen Insertionskassetten-Neuordnung. Auf diese Weise ist es dem Bakterium möglich, alternieren nur jeweils einen Teil (oder auch nur eine) der unterschiedlichen im MRI enthaltenen Resistenzen zu exprimieren. Mit einer weitaus geringeren Frequenz können auch neue adaptive Funktionen akquiriert und solche ohne relevanten Selektionsvorteil wieder aus der Insertionsregion entfernt werden (13, 14, 59, 60).

#### **4.4 Aktuelle Überlegungen zu Therapie und Prävention Integron-assoziiierter Infektionserkrankungen**

In den zurückliegenden Jahren wurden krankenhaushygienischen Maßnahmen, nicht zuletzt wegen der Bedrohung durch MRSA, eine wachsende Bedeutung zuteil. Es gelang durch strikte Einhaltung präventiver Handlungsvorgaben, Aufdeckung und Beseitigung von Infektketten, sowie der angepassten antibiotischen Therapie nach entsprechendem Erregernachweis Inzidenz und Prävalenz dieses Problemkeims bei stationären Patienten signifikant zu senken (113, 114). Hiervon offensichtlich unbeeinflusst stieg im selben Zeitraum in der Gruppe der nosokomialen Infektionserreger der Anteil Integron-Klasse-1-haltiger Isolate an. Folglich bedarf es zur Verhinderung der Besiedlung und/oder Infektion von Patienten mit diesen zum Teil hochresistenten, überwiegend gram-negativen Bakterien anderer Vorgehensweisen. Ein wesentliches Problem stellt zunächst einmal die Identifizierung integronpositiver Isolate dar. Die Durchführung klassischer Antibiotika-Empfindlichkeitstestungen erlaubt in diesem Kontext keine Aussage über die Ausstattung eines Bakteriengenoms mit speziellen Funktionselementen, wie zum Beispiel dem hier untersuchten Genaquirierungs- und -expressionssystem. Zum Nachweis integronspezifischer DNA-Abschnitte bieten sich gegenwärtig vor allem PCR-Untersuchungen an. Die Verwendung des Int<sub>2</sub>F-Primers in Kombination mit dem 3'-CS-Primers empfiehlt sich besonders, da so zum einen direkt die Präsenz der IntI1-Integrase belegt und zum anderen auch „empty-Integrons“ detektiert werden können. In Zukunft gilt es dieses und andere valide genotypische Testverfahren in die Routinediagnostik zu implementieren.

In Anbetracht gegenwärtig noch fehlender flächendeckend verfügbarer Nachweismethoden, lassen sich heute nur in begrenztem Umfang spezielle Präventions- und Therapierichtlinien formulieren.

Dennoch sollte insbesondere bei multiresistenten nosokomialen Erregern der strikten Einhaltung grundsätzlicher Hygienemaßnahmen eine vorrangige Bedeutung zuteil werden.

Im Einzelnen zählen dazu:

- Gebrauch von Einmal-Handschuhen bei pflegerischen und ärztlichen Tätigkeiten. Nach Beendigung des Kontaktes mit dem betreuten Patienten müssen die Handschuhe umgehend sachgerecht entsorgt werden, um das Risiko einer Keimübertragung auf andere Personen und bisher nicht kontaminierte Oberflächen weitestgehend möglich zu reduzieren.
- Händedesinfektion zusätzlich zum Gebrauch von Einmal-Handschuhen und nach jeder Tätigkeit im Umgang mit potentiell erkrankten oder kontaminierten Personen innerhalb und außerhalb der Patientenzimmer.
- Regelmäßiger Kittelwechsel des Klinikpersonals.
- Regelmäßige intensive Schulung und Information des Klinikpersonals über Grundlagen und Ausmaß nosokomialer Epidemien und Endemien von Problemkeimen, mögliche Infektketten, Kontakt-Isolierungsmöglichkeiten, allgemeine Hygienemaßnahmen und Reinigungs- sowie Desinfektionsverfahren.
- Schnellstmögliche Entlassung von Problemkeim-Trägern aus der stationären Versorgung nach Abschluss aller erforderlichen Behandlungen, um so eine potentielle Infektionsquelle zu eliminieren.
- Bei geplanter Verlegung frühzeitige Information der aufnehmenden Abteilung/Station, um durch Vorbereitung und Einleitung geeigneter Maßnahmen das Risiko einer inter- oder intrainstitutionellen Verbreitung möglichst gering zu halten. Dies gilt auch für ambulante Eingriffe/Untersuchungen.

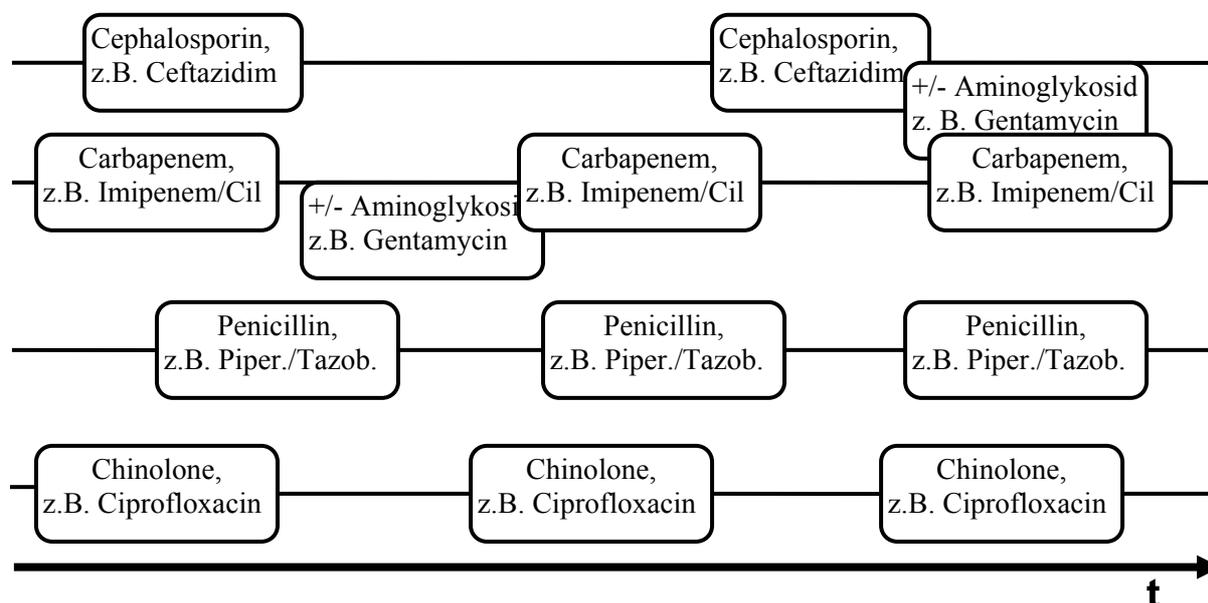
Die aktuelle Studienlage ermöglicht keine zuverlässige Aussage über den Nutzen spezieller Versorgungskonzepte, wie der Separation und Kohortenpflege, bei Patienten mit integronassoziierten infektiologischen Erkrankungen während der stationären Behandlungsphase. Hier müssen zunächst entsprechende routinemäßig durchführbare Nachweisverfahren etabliert werden, die es dem Kliniker erlauben, geeignete Vorkehrungen erfolgsversprechend frühzeitig zu veranlassen. Insbesondere die Patientenisolierung könnte die Übertragung sowohl der vielfach hochresistenten Integron-Klasse-1-positiven Infektionserregern selbst, als auch den inter- und intraspeziellen Transfer von MRIs und/oder

stabiler Integronen verhindern oder zumindest erschweren. Die Kohortenpflege ist in diesem Zusammenhang allerdings kritisch zu betrachten. Durch die geringe räumliche Distanz von zwei oder mehr Patienten zueinander bei dieser Art der Versorgung wird der Austausch mobiler genetischer Strukturen zwischen unterschiedlichen „Reservoirs“ erleichtert. Es besteht insofern die Gefahr, dass sich unter einem externen Antibiotikaselektionsdruck das Resistenzspektrum einzelner integronhaltiger Bakterien in dieser Umgebung noch ausweitet. Weiterhin sollten institutionsspezifische Gegebenheiten bei der Erstellung von krankenhausinternen Verhaltens- und Therapierichtlinien Berücksichtigung finden.

Letztendlich bedarf es zur Kontrolle Integron-Klasse-1-assoziiierter Infektionserkrankungen, zusätzlich zu krankenhaushygienischen Maßnahmen, auch einer Modifikation des herrschenden Antibiotikaselektionsdrucks. Vorrangiges Ziel ist es dabei die Anpassung pathogener Bakterien an das Spektrum der eingesetzten antimikrobiell wirksamen Substanzen zu verhindern. Verschiedene Strategien zur Vermeidung von Resistenzproblemen bei nosokomialen Erregern, ohne die gleichzeitige Verminderung der Effektivität einer kalkulierten Therapie, haben Einzug in den klinischen Alltag gehalten. Für die Behandlung integronhaltiger Problemkeime bieten sich zwei Vorgehensweisen in besonderem Maße an.

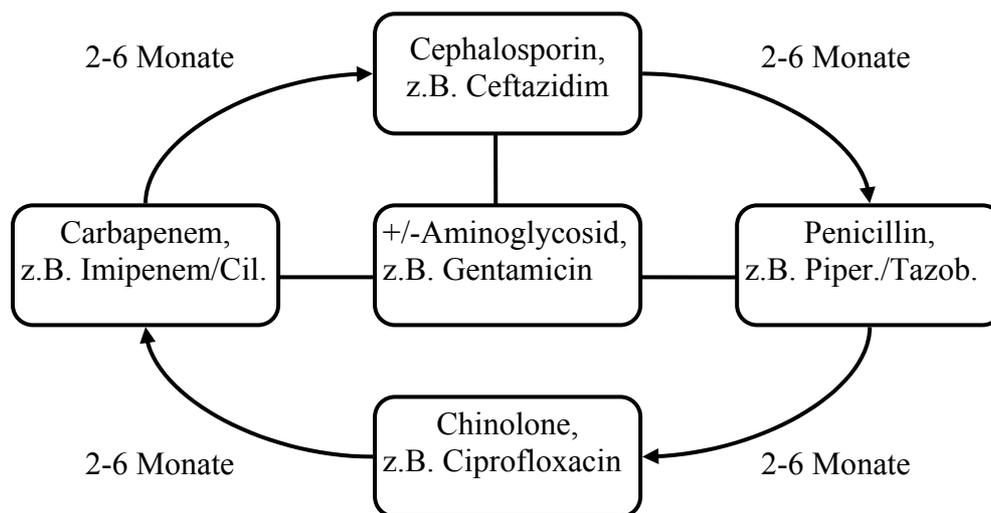
#### A: Das Konzept der „antibiotischen Heterogenität“

Bei dieser Strategie erhalten verschiedene, gleichzeitig auf einer Station betreute Patienten, im Fall einer therapiebedürftigen Infektion Antibiotika, die jeweils unterschiedlichen Wirkstoffklassen angehören. Dadurch lässt sich eine „Umfangssteigerung“ des Selektionsdrucks erzielen (115).

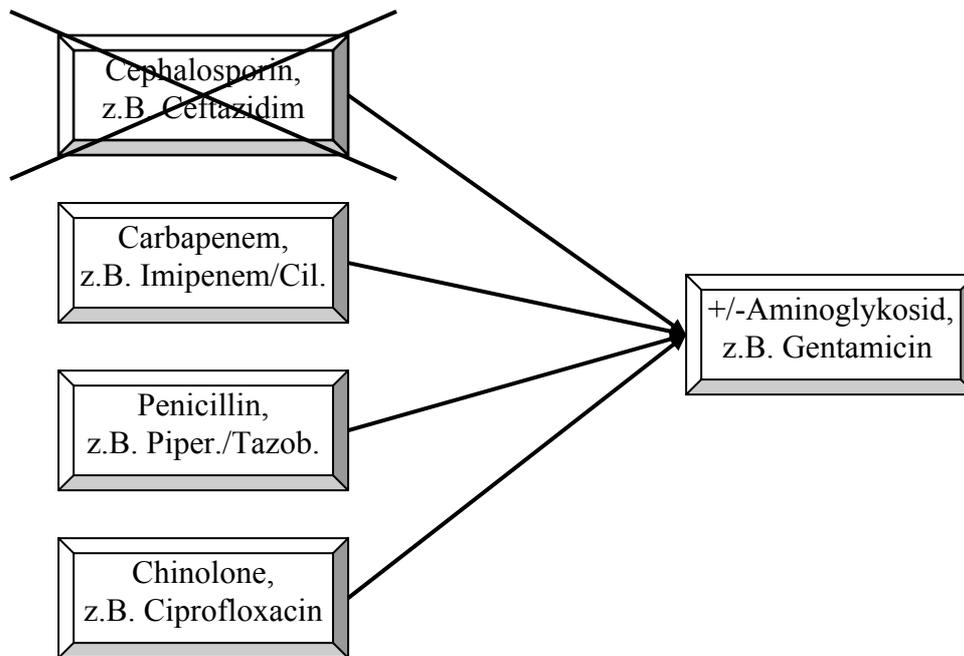


### B: Das Konzept des „Antibiotic Cycling“

Dieses Prinzip sieht einen Wechsel von standardisierten Antibiotika-Regimen nach einem festgelegten Zyklus vor. Dabei ändert sich auf der entsprechenden Station in definierten zeitlichen Abständen der Selektionsdruck, mit dem Ziel eine Habituation der residenten, nosokomialen Infektionserreger an häufig eingesetzte antimikrobiell wirksame Substanzen zu verhindern (115).

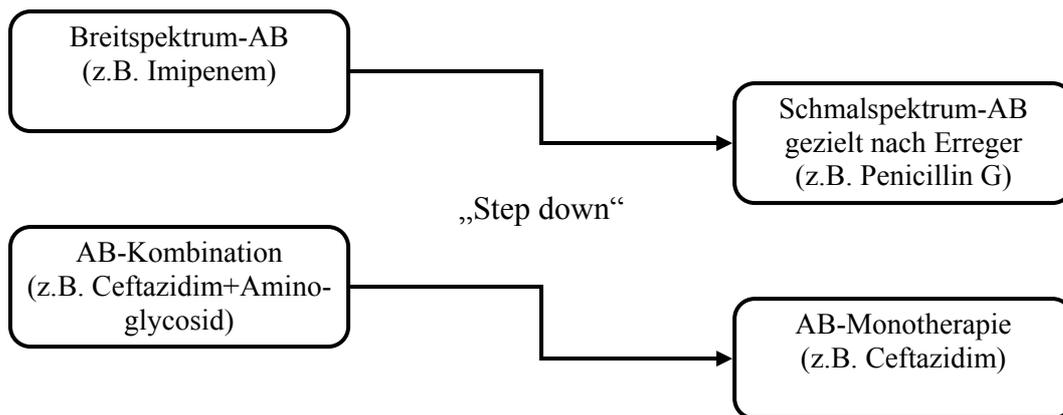


Auch das Konzept der „Antibiotika-Restriktion“ wurde in den zurückliegenden Jahren mit messbarem Erfolg in der Behandlung und Prävention von durch Problemkeime verursachten Erkrankungen angewendet (115). Durch den passageren Ausschluss einzelner Wirkstoffklassen aus den antimikrobiellen Therapieregimen soll die nachweisliche Selektionierung bestimmter, vorwiegend nosokomialer Erreger verhindert werden. Beispielsweise konnten Charbonneau et al. im Rahmen ihrer Studie nachweisen, dass sich durch eine einjährige Chinolonrestriktion die MRSA-Prävalenz von 36% auf 32,3%, die MRSA-Inzidenz sogar um fast die Hälfte von 0,74/1000 Patiententage auf 0,4/1000 Patiententage senken ließ (116). Allerdings ist nur ein gesicherter Zusammenhang zwischen Chinolonverbrauch und MRSA-Kolonisation, nicht hingegen die MRSA-Infektion betreffend zu belegen (117). Da die häufig mit Integrons der Klasse 1 assoziierten ESBL-bildenden gram-negativen Bakterien vorwiegend durch Cephalosporine selektioniert werden, ist ein vertretbarer eingeschränkter Gebrauch dieser Antibiotikaklasse als durchaus sinnvoll zu betrachten (23, 79).



Unter der „Deeskalationstherapie“ ist eine empirische antimikrobielle Behandlungsstrategie zu verstehen, die durch zwei wesentliche Charakteristika gekennzeichnet ist. Initial wird ein Breitspektrum-Antibiotikum oder eine Antibiotika-Kombination gewählt, um den noch unbekanntem Erreger mit hoher Wahrscheinlichkeit zu erfassen. Nach 48 bis 72 Stunden erfolgt die Umstellung der Therapie anhand der vorliegenden mikrobiologischen Daten auf eine Substanz mit engerem Spektrum, das den/die ursächlichen Keim/Keime gezielt eliminiert. Auf diese Weise soll das bestmöglich Behandlungsergebnis bei gleichzeitig geringem Risiko einer Resistenzselektion erzielt werden (115).

Aufgrund theoretischer Überlegungen ist jedoch eine solche Vorgehensweise im Fall der MRI-tragenden Bakterien eher kritisch zu betrachten. Resistogramme verschaffen nur einen Überblick über die von einem gewonnenen Isolat zum Untersuchungszeitpunkt tatsächlich exprimierten Eigenschaften. Kommt es im weiteren Erkrankungsverlauf jedoch zu integroninternen Rekombinationsvorgängen, so können vorher nicht erfasste Resistenzen plötzlich vom Wirtsbakterium zur Ausprägung gebracht werden. Es besteht folglich die Gefahr, dass eine gezielte Schmalspektrum-Antibiotikatherapie wegen der möglichen phänotypischen Alteration des Erregers im zeitlichen Verlauf doch unwirksam wird.



In Zukunft bedarf es eines koordinierten Vorgehens von Klinikern, Krankenhaushygienikern und Mikrobiologen, um einer weiteren Ausbreitung von Integron-assoziierten nosokomialen Infektionserkrankungen entgegenwirken zu können. Dabei sollten auch die im Zusammenhang mit MRSA gewonnenen Erkenntnisse gewinnbringend bei der Erarbeitung neuer, problemadaptierter Präventions- und Therapiestrategien Berücksichtigung finden. Eine wichtige Voraussetzung für die Aufdeckung von Infektketten stellt die Etablierung flächendeckend verfügbarer genotypischer Testverfahren zum Nachweis von Integronstrukturen in entsprechenden Bakterienisolaten dar.

Auch auf dem Gebiet der Infektiologie ist somit die enge interdisziplinäre Kooperation als Grundlage für eine adäquate Patientenversorgung zu betrachten.

## 5. Zusammenfassung

Nosokomiale Infektionserkrankungen verlangen heutzutage von Klinikern, Mikrobiologen und Krankenhaushygienikern ein gemeinsames und koordiniertes Vorgehen. Eines der größten Probleme in der modernen Infektiologie stellt dabei in jüngster Zeit die rapide Zunahme multiresistenter, überwiegend gram-negativer Bakterien dar. Gegenwärtig werden gut die Hälfte aller im Krankenhaus erworbenen erregerbedingt-entzündlichen Erkrankungen durch überwiegend fakultativ pathogene Enterobacteriaceae verursacht. Epidemilogische Untersuchungen enthüllten, dass unter anderem bei mehreren Spezies dieser Familie innerhalb kürzester Zeit eine Vielzahl neu erworbene Resistenzen, teils sogar gegenüber erst in jüngster Vergangenheit therapeutisch eingesetzter antimikrobiell wirksamer Substanzen, zu verzeichnen war. Dieses Phänomen lässt sich nur durch einen inter- und intraspeziellen horizontalen DNA-Transfer erklären.

Als einen dazu geeigneten, multikompatiblen Genaquirierungs- und Expressionsmechanismus untersuchten wir die Klasse-1-Integronstruktur bei Enterobakterien.

Hierbei handelt es sich um ein potentiell transferierbares genetisches Element, bestehend aus einer variablen Insertionsregion, eingerahmt von je einem konservierten Segment (CS) in 5'- und 3'-Richtung. Die Mobilität dieser gesamten Struktur ist durch ihre bevorzugte Lokalisation auf (Resistenz-) Plasmiden und/oder ihre Assoziation mit Transposonen zu erklären. Die Insertionsregion beherbergt bis zu acht so genannte Genkassetten. Diese bestehen in der Regel ausschließlich aus dem kodierenden Sequenzabschnitt und einer Rekombinationsschnittstelle, dem 59-Basenelement (*attC*-Region). Überwiegend werden durch solche Kassetten Resistenzeigenschaften vermittelt. Der strukturelle Aufbau, der sich aus dem 5'- und 3'-CS zusammensetzenden Integron-Plattform ist hingegen immer identisch. Die Organisation des der Insertionsregion vorgeschalteten Abschnitts umfasst neben einem Integrasegen auch eine Promotorregion als Bindungsstelle für die zur Expression der nachfolgenden Strukturgene erforderliche Polymerase, sowie den Großteil der spezifischen integronseitigen Rekombinationsschnittstelle (*attI*). Das 3'-CS beginnt mit der formal noch zur *attI*-Region zählenden Sequenz „TTRRRY“. Sich anschließende weitere Ausstattungsmerkmale divergieren je nach Klassenzugehörigkeit des betreffenden Integrons respektive dessen Assoziation mit einem Transposon oder Transposonrest.

Bisher wurden fünf unterschiedliche, jedoch miteinander verwandte Integrasegene detektiert. Die synthetisierten Translationsprodukte sind in der Lage spezifische Rekombinationsvorgänge zwischen der *attC*- und *attI*-Region, bzw. zwischen zwei

gleichartigen Reaktionspartner des jeweiligen Schnittstellentypus zu katalysieren. Das Ergebnis kann sowohl zur Insertions, als auch zur Exzision von DNA-Abschnitten führen.

Jeder einzelne Integrasetyp definiert eine eigene Integronklasse unter denen die Integron-Klasse-1 die klinisch bedeutsamste Stellung einnimmt.

Die Promotorregion verfügt über einen als obligat (P1) und einen weiteren als fakultativ (P2) zu betrachtenden Promotorsequenzabschnitt. Von P1 existieren insgesamt vier verschiedene Varianten, die sich hinsichtlich ihrer Transkriptionseffizienz unterscheiden und dementsprechend als „starker“, „schwacher“ und insgesamt zwei Formen umfassender „Hybrid“-Typ“ bezeichnet werden. Durch Insertion von drei Guanosinmolekülen erfolgt die Transformation von P2 aus der inaktiven in die aktive Ausprägung. Letztere Variante kommt nur in Kombination mit dem „schwachen“ P1-Typ vor und führt hier zu einer deutlichen Effizienzsteigerung.

Insgesamt wurden jeweils 300 im Microbank-System archivierte Enterobacteriaceae-Proben, im Einzelnen zusammengestellt aus 200 *Escherichia coli*-, 25 *Klebsiella pneumoniae*-, 25 *Klebsiella oxytoca*-, 25 *Enterobacter aerogenes*- und 25 *Enterobacter cloacae*-Isolaten, aus den Jahren 1994, 1997 und 2000 im Rahmen der vorliegenden Arbeit getestet. Als Untersuchungsmaterial verwendeten wir ausschließlich Blutkulturen. Zunächst erfolgte der Ausschluss einer klonalen Identität verschiedener eingesetzter Proben mit Hilfe eines RAPD-basierten Differenzierungsverfahrens. Hiernach standen mit insgesamt 841 Isolaten 93,4% des Ausgangsmaterials zur Verfügung.

Die Gesamtprävalenz der eine Klasse-1-Integronstruktur tragenden Bakterienstämme betrug unter Einbeziehung aller Untersuchungsjahrgänge 11,4%. Dies entsprach einem absoluten Anteil von 96 der insgesamt 841 Isolate.

Bei Betrachtung der jahrgangsbezogenen Häufigkeitsverteilung konnte ein signifikanter Prävalenzanstieg von 6,9% (19/276 Isolaten) 1994 über 9,7% (27/278 Isolaten) 1997 bis auf 17,4% (50/287 Isolaten) 2000 im zeitlichen Verlauf belegt werden.

Weiterhin untersuchten wir die Distribution Integron-Klasse-1-positiver Isolate bezogen auf die einzelnen Enterobacteriaceae-Gattungen und -Spezies. Die kumulative Integronprävalenz betrug für *E. coli* 6,8% (40 von 585), für *Klebsiella pneumoniae* 12,1% (8 von 66), für *Enterobacter aerogenes* 21,3% (13 von 61), für *Enterobacter cloacae* 21,9% (14 von 64) und für *Klebsiella oxytoca* 32,3% (21 von 65). Sämtliche hier eingesetzte Arten wiesen dabei eine

signifikante, wenn auch untereinander divergierende Zuwachsraten im zeitlichen Verlauf auf. So war ein Prävalenzanstieg, bezogen auf die integronpositiven Isolate zwischen 1994 und 2000 bei *E. coli* von 4,1% auf 10,1%, bei *Klebsiella pneumoniae* von 9,5% auf 17,4%, bei *Enterobacter aerogenes* von 15,0% auf 28,6%, bei *Enterobacter cloacae* von 9,5% auf 36,4% und bei *Klebsiella oxytoca* von 19,0% auf 52,2%, zu verzeichnen gewesen.

Extrapoliert man diese Entwicklung, so sehen wir uns in naher Zukunft einer Vielzahl nosokomialer Infektionserreger gegenüber, die über einen multikompatiblen genetischen Mechanismus zum Erwerb und zur Expression neuer Antibiotikaresistenzen verfügen.

Unabhängig vom Isolationszeitpunkt entstammten 78% aller integronpositiven Isolate von intensivmedizinisch betreuten Patienten, 15% wurden von Patienten fachlich unterschiedlicher Normalstationen und 7% von in den Ambulanzen/Notaufnahmen versorgten Patienten gewonnen. Diese Verteilung veranschaulicht eindrucksvoll, dass ein konstant hoher respektive ansteigender Antibiotikaselektionsdruck die Verbreitung der hier untersuchten genetischen Funktionseinheit innerhalb eines institutionsresidenten Erregerreservoirs begünstigt.

Da der DNA-Gehalt der Insertionsregion Rückschlüsse auf die Anzahl integrierter Genkassetten zulässt, amplifizierten wir mittels PCR-Verfahren den zwischen 5'- und 3'-CS eingeschlossenen Sequenzabschnitt integronpositiver Isolate und führten nachfolgend eine genaue Längenbestimmung des generierten Produktes durch.

Auch für diesen Parameter ließ sich eine eindeutige Zuwachsraten während des gewählten Untersuchungszeitraums beobachten. Lediglich bei sechs Proben, alle aus dem Jahr 1994 stammend, konnten so genannte „empty-Integrone“ nachgewiesen werden. Im Übrigen variierte der Umfang des Amplikons zwischen 650 bp und 3000 bp, wobei diese beiden Extremwerte ausschließlich zu Beginn respektive am Ende der Siebenjahresspanne angetroffen wurden.

Ferner ließen sich für alle getesteten Spezies, als Ausdruck der Heterogenität der Insertionsregion, verschiedene Größen des variablen Integronsegments nachweisen. Andererseits fanden wir jedoch auch vielfach identisch lange Insertionssequenzabschnitte bei nicht verwandten Isolaten unterschiedlicher oder derselben Art. Diese Beobachtung bestärkt die Hypothese des horizontalen inter- und intraspeziellen DNA-Transfers stabiler genetischer Elemente.

Untersuchungen der Promotorregion legten diesbezüglich zudem im zeitlichen Verlauf eine Verschiebung der Prävalenz hin zu Promotortypen mit einer hohen Transkriptionseffizienz offen. So lag der relative Anteil der entweder mit der „starken“ P1-Variante oder dem Kompositionspromotor (P1<sub>weak</sub>+P2<sub>activ</sub>) ausgestatteten Isolate, bezogen auf das gesamte integronhaltige Untersuchungsmaterial, 1994 bei 26,3% (5 von 19), 1997 schon bei 33,3% (9 von 27) und 2000 schließlich bei 60% (30 von 50). Zwangsläufig wiesen der „schwache“ P1- und die beiden Hybridpromotor-Typen eine gegensätzliche Entwicklung auf.

Klinische findet dieser beobachtete „Shift“ offensichtlich Ausdruck in der Veränderung quantitativer Resistenzeigenschaften integronpositiver Bakterienisolate, die in jüngster Zeit eine Verschiebung hin zu höheren MHK-Breakpoints für verschiedene Antibiotika erkennen lässt. Allerdings ist darauf hinzuweisen, dass in diesem Punkt der tatsächliche Kausalzusammenhang untersuchungstechnisch kaum zu belegen ist.

Schließlich betrachteten wir noch die Diskrepanzen im Resistenzverhalten zwischen Enterobacteriaceae-Isolaten mit und ohne integronassoziierte Genkassetten.

Bakterienstämme, die über genetisches Material im Bereich der Insertionsregion verfügten, waren signifikant häufiger unempfindlich gegenüber bestimmten  $\beta$ -Lactamen und anderen Antibiotikaklassen. Für Ampicillin lag die Prävalenz resistenter Isolate bei 53% vs. 37%, für Ticarcillin bei 49% vs. 29%, für Piperacillin bei 42% vs. 19%, für Gentamicin bei 10% vs. 5%, für Ciprofloxacin bei 8% vs. 3% und für die Folsäureantagonisten-Kombination Trimethoprim/Sulfamethoxazol sogar bei 52% vs. 7%, jeweils zu Gunsten des integron- **und** genkassettenpositiven Kollektives. Hinsichtlich weiterer getesteter antimikrobiell wirksamer Substanzklassen fanden sich weniger deutliche Suszeptibilitätsunterschiede im direkten Vergleich.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen nachhaltig die Funktion des Integron-Systems als genetischer Mechanismus zur Verbesserung der Anpassungsfähigkeit von Bakterien unter einem hohen und rasch wechselnden (Antibiotika-) Selektionsdruck. Wir konnten neben epidemiologischen Faktoren wie der ansteigenden Prävalenzrate im Untersuchungszeitraum auch die Entwicklung hin zu Multiresistenz-Integrone und zu einer verbesserten Transkriptionseffizienz belegen. Weiterhin veranschaulichten relevante Alterationen des Phänotyps integronpositiver Isolate die klinische Bedeutung dieses genetischen Elements.

Zur Kontrolle dieser verhältnismäßig neuen, vielfach multiresistenten nosokomialen Infektionserreger bedarf es in Zukunft der Implementierung geeigneter krankenhaushygienischer Handlungsvorgaben und der Etablierung adäquater antibiotischer Therapieregime im Umgang mit entsprechend erkrankten Patienten.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Fleming A (1929). On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Brit J Exp Path* **10**: 226-36
2. Ward J M, Grinstead J (1982). Physical and genetic analysis of Inc-W group plasmids R388, Sa, and R7K. *Plasmid* **7**, 239-250
3. Schmidt F, Klopfer-Kaul I (1984). Evolutionary relationship between Tn21-like elements and pBP201, a plasmid from *Klebsiella pneumoniae* mediating resistance to gentamicin and eight other drugs. *Mol and Gen Genet* **197**, 109-119
4. Tanaka M, Yamamoto T, Sawai T (1983). Evolution of complex resistance transposons from an ancestral mercury transposon. *J Bacteriol* **153**, 1432-1438
5. Meyer J F, Nies B A, Wiedemann B, (1983). Amikacin resistance mediated by multiresistance transposon Tn2424. *J Bacteriol* **155**, 755-760
6. Cameron F H, Groot Obbink D J, Ackermann V P, Hall R M (1986). Nucleotide sequence of the AAD(2'') aminoglykoside adenylyltransferase determinant *aadB*. Evolutionary relationship of this region with those surrounding *aadA* in R538-1 and *dhfrII* in R388. *Nucleic Acids Res* **14**, 8625-8635
7. Hall R M, Vockler C (1987). The region of the IncN plasmid R46 coding for resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics, streptomycin/ spectinomycin and sulphonamids is closely related to antibiotic resistance segments found in IncW plasmids and in Tn21-like transposons. *Nucleic Acids Res* **15**. 7491-7501
8. Ouellette M, Roy P H (1987). Homology of ORFs from Tn2603 and from R46 to site-specific recombinases. *Nucleic Acids Res* **15**, 10055
9. Ouellette M, Bissonnette L, Roy P H (1987). Precise insertion of antibiotics resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1  $\beta$ -lactamase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 7378-7382
10. Hall R M, Brookes D E, Stokes H W (1991). Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point. *Mol Microbiol* **5** 1941-1959
11. Stokes H W, Hall R M (1989). A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons *Mol Microbiol* **3**, 1669-1683

12. Martinez E, de la Cruz F (1988). Transposon Tn21 encodes a RecA-independent site-specific system. *Mol and Gen Genet* **211**, 320-325
13. Martinez E, de la Cruz F (1990). Genetic Elements involved in Tn21 site-specific integration, a novel mechanism for the dissemination of antibiotic resistance genes. *EMBO J* **9**, 1275-1281
14. Collis C M, Hall R M (1992a). Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalysed by the integron DNA integrase. *J Bacteriol* **174**, 1574-1585
15. Collis C M, Hall R M (1992b). Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. *Mol Microbiol* **6**, 2875-2885
16. Collis C M, Grammaticopoulos G, Briton J, Stokes H W, Hall R M (1993). Site-specific insertion of gene cassettes into integrons. *Mol Microbiol* **9**, 41-52
17. Bunny K L, Hall R M, Stokes H W (1995). New mobile gene cassettes containing an aminoglycoside resistance gene, *aacA7*, and chloramphenicol resistance gene, *catB3*, in an integron in pBWH301. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 686-693
18. Hall R M, Brown H J, Brookes D E, Stokes H W (1994). Integrons found in different locations have identical 5' ends but variable 3' ends. *J Bacteriol* **176**, 6286-6294
19. Radström P, Sköld O, Swedberg G, Flensburg J, Roy P H, Sundström L (1994). Transposon Tn5090 of Plasmid R751, which carries an integron, is related to Tn7, Mu, and the retroelements. *J Bacteriol* **176**, 3257-3268
20. Hall R M, Collis C M (1995). Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol* **15**, 593-600
21. Fluit A C, Schmitz F J (1999). Class I integrons, gene cassettes, mobility and epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **18**, 761-770
22. Jones M E, Peters E, Weersink A M, Fluit A C, Verhoef J (1997). Widespread occurrence of integrons causing multiple antibiotic resistance in bacteria. *Lancet* **349**, 1742-1743
23. Martinez-Freijo P, Fluit A C, Schmitz F J, Grek V S, Verhoef J, Jones M E (1998). Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. *J Antimicrob Chemother* **42**, 689-696
24. Martinez-Freijo P, Fluit A C, Schmitz F J, Verhoef J, Jones M E (1999). Many class I integrons comprise distinct stable structures occurring in different species of Enterobacteriaceae isolated from widespread geographic regions in Europe. *Antimicrob Agents Chemother.* **43**, 686-689

25. Sallen B, Rajoharison A, Desvarenne S, Mabilat C (1995). Molecular epidemiology of integron-associated antibiotic resistance genes in clinical isolates of Enterobacteriaceae. *Microb Drug Resist.* **1**, 195-202
26. Schmitz F J, Martinez-Freijo P, Theis S, Fluit A C, Verhoef J, Heinz H P, Jones M E (1999). Prevalence of class I integrons and association with decreased antibiotic susceptibility in German Gram-negative blood culture isolates. *Clin Microbiol Infect.* **5**, 496-498
27. Recchia G D, Hall R M (1995). Gene cassettes : a new class of mobile elements. *Microbiology* **141**, 3015-3027
28. Tolmasky M E (1990). Sequencing and expression of *aadA*, *bla*, and *tnpR* from the multiresistance transposon Tn1331. *Plasmid.* **24**, 218-226
29. Tenover F C, Filpula D, Phillips K L, Plorde J J (1988). Cloning and sequencing of a gene encoding an aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase from an R factor of *Citrobacter diversus*. *J Bacteriol.* **170**, 471-473
30. O'Gorman D, Stokes H W, Hall R M. unpublished observations, erwähnt in Recchia G D, Hall R M (1995). Gene cassettes : a new class of mobile elements. *Microbiology.* **141**, 3015-3027
31. Stokes H W, Hall R M (1991). *Plasmid.* **26**, 10-19
32. Sundström L, Radström P, Swedberg G, Sköld O (1988). Site-specific recombination promotes linkage between trimethoprim- and sulfonamide resistance genes. Sequence characterization of *dhfrV* and *sulI* and a recombination active locus of Tn21. *Mol Gen Genet.* **213**, 191-201
33. Schmidt F R J, Nücken E J, Henschke R B (1989). Structure and function of hot spot providing signals for site-directed specific recombination and gene expression in Tn21 transposons. *Mol Microbiol.* **3**, 1545-1555
34. Sundström L, Sköld O (1990). The *dhfrI* trimethoprim resistance gene of Tn7 can be found at specific site in other genetic surroundings. *Antimicrob Agents Chemother.* **34**, 642-650
35. O'Gorman D, Hall R M, Stokes H W unpublished observations, erwähnt in Hall R M, Collis C M (1995). Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol.* **15**, 593-600
36. Geisel R, Schmitz F J (2000). Aufbau, Funktion und Verbreitung von Integrons als mobile Überträger von Antibiotikaresistenzen. *Der Mikrobiologe.* **10**, 201-207

37. Wiedemann B, Meyer J F, Zuhlsdorf M T (1987). Insertion of resistance genes into Tn21-like transposons. *J Antimicrob Chemother.* **18**, 85-92
38. Francia M V, de la Cruz F, Gracia Lobo M (1993). Secondary site for integration mediated by the Tn21 integrase. *Mol Microbiol.* **10**, 823-828
39. Recchia G D, Stokes H W, Hall R M (1994). Characterisation of specific and secondary recombination sites recognised by the integron DNA integrase. *Nucleic Acid Res.* **22**, 2071-2078
40. Recchia G D, Hall R M (1995). Plasmid evolution by acquisition of mobile gene cassettes: plasmid pIE723 contains the *aadB* gene cassette precisely inserted at a secondary site in the IncQ plasmid RSF1010. *Mol Microbiol.* **15**, 179-187
41. Collis C M, Hall R M (1995). Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob Ag Chemother.* **39**, 155-162
42. Sundström L, Swedberg G, Sköld O (1993). Characterization of transposon Tn5086, carrying the site-specifically inserted gene *dhfr*VII mediating trimethoprim resistance. *J Bacteriol.* **175**, 1796-1805
43. Rowe-Magnus D A, Manzel D (2002). The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *Int J Med Microbiol.* **292**, 115-125
44. Rowe-Magnus D A, Manzel D (2001). Integrons: natural tools for bacterial genome evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 565-569
45. Naas T, Mikami Y, Imai T, Poirel L, Nordmann P (2001). Characterization of In53, a class 1 plasmid- and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. *J Bacteriol.* **183**, 235-249
46. Manzel D, Dychinco B, Webb V A, Davies J (1998). A distinctive class of integron in the *V. cholerae* genome. *Science.* **280**, 605-608
47. Barker A, Clark C A, Manning P A (1994). Identification of VCR, a repeated sequence associated with a locus encoding a hemagglutinin in *Vibrio cholerae* O1. *J Bacteriol.* **176**, 5450-5458
48. Clark C A, Purins L, Kaewrakon P, Focareta T, Mannings P A (2000). The *Vibrio cholerae* O1 chromosomal integron. *Microbiology.* **146**, 2605-2612
49. Heidelberg J F et al. (2000). DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *V cholerae*. *Nature.* **406**, 477-483
50. Rowe-Magnus D A, Mazel D (1999). Resistance gene capture. *Curr Opin Microbiol.* **4**, 483-488

51. Hall R M, Collis C M, Kim M J, Partridge S R, Recchia G D, Stokes H W (1999). Mobile gene cassettes and integrons in evolution. *Ann NY Acad Sci.* **870**, 68-80
52. Rowe-Magnus D A, Guernout A-M, Ploncard P, Dychinco B, Davies J, Mazel D (2001). The evolutionary history of chromosomal super-integrons provides an ancestry for multi-resistant integrons. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**, 652-657
53. Vaisvila R, Morgan R D, Posfai J, Raleigh E A (2001). Discovery and distribution of super-integrons among pseudomonads. *Mol Microbiol.* **42**, 587-601
54. Rowe-Magnus D A, Guerout A-M, Mazel D (2002). Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes. *Mol Microbiol.* **43**, 1657-1669
55. Rowe-Magnus D A, Guerout A-M, Mazel D (1999). Super-Integrons. *Res Microbiol.* **150**, 641-651
56. Stokes H W, Holmes A J, Nield B S, Holley M P, Nevalainen K M, Mabbutt B C, Gillings M R (2001). Gene cassette PCR: sequence-independent recovery of entire genes from environmental DNA. *Appl Environ Microbiol.* **67**, 5240-5246
57. Nield B S, Holmes A J, Gillings M R, Recchia G D, Mabbutt B C, Nevalainen K M, Stokes H W (2001). Recovery of new integron classes from environmental DNA. *FEMS Microbiol Lett.* **195**, 59-65
58. Recchia G D, Hall R M (1997). Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. *Trends Microbiol.* **5**, 389-394
59. Stokes H W, O`Gorman D B, Recchia G D, Parsekhian M, Hall R M (1997). Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes. *Mol Microbiol.* **26**, 731-745
60. Partridge S R, Recchia G D, Scaramuzzi C, Collis C M, Stokes H W, Hall R M (2000). Definition of the *attI1* site of class 1 integrons. *Microbiology.* **146**, 2855-2864
61. Hall L M C, Livermore D M, Gur D, Avoka M, Akalin H E (1993). OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2)  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **37**, 1637-1644
62. Levesque C, Brassard S, Lapointe J, Roy P H (1994). Diversity and relative strength of tandem promoters for the antibiotic-resistance genes of several integrons. *Gene.* **142**, 49-54
63. Hall R M (1997). Mobile gene cassettes and integrons: moving antibiotic resistance genes in gram-negative bacteria. *Ciba Found Symp.* **207**, 192-202; *discussion* 202-207

64. Nunes-Duby S E, Kwon H J, Tirumalai R S, Ellenberger T, Landy A (1998). Similarities and differences among 105 members of the Int family of site-specific recombinases. *Nucleic Acid Res.* **26**, 391-406
65. Recchia G D (1996). *Mobile gene cassettes and integrons: evolutionary and recombinational studies*. PhD thesis, Macquarie University Sydney, Australia
66. Hansson K, Sköld O, Sundström L (1997). Non-palindromic *attI* sites of integrons are capable of site-specific recombination with one another and with secondary targets. *Mol Microbiol.* **26**, 441-453
67. Francia M V, Avila P, de la Cruz F, Gracia Lobo M (1997). A hot spot in plasmid F for site-specific recombination mediated by Tn21 integron integrase. *J Bacteriol.* **179**, 4419-4425
68. Hall R M, Stokes H W (1993). Integrons: novel DNA elements which capture genes by site-specific recombination. *Genetica.* **90**, 115-132
69. Arakawa Y, Murakami M, Susuki K, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S, Kato N, Ohta M (1995). A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. *Antimicrob Agents Chemother.* **39**, 1612-1615
70. Hochhut B, Waldor M K (1999). Site-specific integration of the conjugal *Vibrio cholerae* SXT element into *prfC*. *Mol Microbiol.* **32**, 99-110
71. Waldor M K, Tschäpe H, Mekalanos J J (1996). A new type of conjugative Transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim and streptomycin in *Vibrio cholerae* O 139. *J Bacteriol.* **178**, 4157-4165
72. Hochhut B, Lofti Y, Mazel D, Faruque S M, Woodgate R, Waldor M K (2001). Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT Constins. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**, 2991-3000
73. Hanau-Bercot B, Podglajen I, Casin I, Collatz E (2002). An intrinsic control element for translational initiation in class 1 integrons. *Mol Microbiol.* **44**, 119-130
74. Collis C M, Kim M-J, Stokes H W, Hall R M (1998). Binding of the purified integron DNA integrase IntI1 to integron- and cassette-associated recombination sites. *Mol Microbiol.* **29**, 477-490
75. Gravel A, Fournier B, Roy P H (1998). DNA complexes obtained with the integron integrase IntI1 at the *attI1* site. *Nucleic Acid Res.* **26**, 4347-4355
76. Adam D, Doerr H W, Link H, Lode H (Hrsg.). *Die Infektiologie*. Springer-Verlag 2004, 1. Auflage, S. 1024-1043

77. Burkhardt F (Hrsg.). Mikrobiologische Diagnostik. Thieme-Verlag 1992, 1. Auflage, S. 119-127
78. Kayser F H, Bienz K A, Eckert J, Lindenmann J. Medizinische Mikrobiologie. Thieme-Verlag 1995, 9. Auflage, S. 197-222
79. Girlich D, Poirel L, Leelaporn A, Karim A, Tribuddharat C, Fennewald M, Nordmann P (2001). Molekular epidemiology of the Integron-located VEB-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand. *J Clin Microbiol.* **39**, 175-182
80. Knothe H, Shah P, Kremery V, Antal M, Mitsuhashi S (1983). Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection.* **11**, 315-317
81. Medeiros A A (1997). Evolution and dissemination of  $\beta$ -Lactamases accelerated by generations of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Clin Infect Dis.* **24** (Suppl.), S19-S45
82. Jarlier V, Nicolas M-H, Fournier G, Philippon A (1988). Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility pattern. *Rev Infect Dis.* **10**, 867-878
83. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirt R, Ernst S, Casellas J M (1996). Sequences of  $\beta$ -lactamases genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* **40**, 509-513
84. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirt R, Mangold P, Amann S, Akalin E, Ang O, Bal C, Casellas J M (1996). Characterization of  $\beta$ -lactamase gene *bla*-PER-2, which encodes an extended-spectrum class A  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* **40**, 616-620
85. Ishii Y, Ohno A, Taguchi H, Imajo S, Ishiguro M, Matsuzawa H (1995). Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A  $\beta$ -lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* **39**, 2269-2275
86. Ma L, Ishii Y, Ishiguro M, Matsuzawa H, Yamaguchi K (1998). Cloning and sequencing of the gene encoding TOHO-2, a class A  $\beta$ -lactamase preferentially inhibited by tazobactam. *Antimicrob Agents Chemother.* **42**, 1181-1186

87. Vahaboglu H, Öztürk R, Aygun G, Coskuncan F, Yaman A, Kaygusuz A, Leblebicioglu H, Balik I, Aydin K, Otkun M (1997). Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother.* **41**, 2265-2269
88. Dalsgaard A, Forslund A, Serichantalergs O, Sandvang D (2000). Distribution and content of class 1 integrons in different *Vibrio cholerae* O-serotype strains isolated in Thailand. *Antimicrob Agents Chemother.* **44**, 1315-1321
89. Bennett P M (1999). Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J Antimicrob Chemother.* **43**, 1-4
90. Levesque C, Piche L, Larose C, Roy P H (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother.* **39**, 185-191
91. Akopyanz N, Nickolai O, Bukanov T, Westblom U, Kresovich S, Berg D (1992). DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Research.* **20**, 5137-5142
92. Makino S I, Okada Y, Maruyama T, Kaneko S, Sasakawa C (1994). PCR-based Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting of *Yersinia pseudotuberculosis* and its practical applications. *J clin Microbiol.* **32**, 65-69
93. Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, Rafalski J A, Tingey S V (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research.* **18**, 6531-6535
94. Grunstein M, Hogness D S (1975). Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **72**, 3961-3965
95. Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook E F (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory.* Cold Spring Harbor, NY.
96. Sanger F, Nicklen S, Coulson A R (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **74**, 5463-5467
97. Kresken M (Sept. 2002). Neue Resistenzdaten. Ergebnisse der PEG- Resistenzstudie November 2001. *Paul-Ehrlich-Gesellschaft*
98. Alvarez-Fernandes M, Rodriguez-Sousa T, Brey-Fernandez E, Lopez-Melendes C, Pineiro L (2003). Class 1 integrons in Enterobacteriaceae and its association with multidrug resistance and conjugative plasmids. *Rev Esp Quimioter.* **16(4)**, 394-397

99. White P A, McIver C J, Rawlinson (2001). Integrons and gene cassettes in the Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**, 2658-2661
100. Liebert C A, Hall R M, Summers A O (1999). Transposon Tn21. Flagship of the floating genome. *Microbiol Mol Biol Rev.* **63**, 507-522
101. Brown H J, Stokes H W, Hall R M (1996). The Integrons In0, In2 and In5 are defective transposon derivatives. *J Bacteriol.* **178**, 4429-4437
102. Craig N L (1996). Transposon Tn7. *Curr Top Microbiol Immunol.* **204**, 27-48
103. Minakhina S, Kholodii G, Mindlin S, Yurieva O, Nikiforov V (1999). Tn5053 family transposons are *res* site hunters sensing plasmidal *res* sites occupied by cognate resolvase. *Mol Microbiol.* **33**, 1059-1068
104. Houang E T S, Chu Y-W, Lo W-S, Chu K-Y, Cheng A F B (2003). Epidemiology of Rifampin ADP-Ribosyltransferase (*arr-2*) and Metallo- $\beta$ -Lactamase (*bla*<sub>IMP-4</sub>) gene cassettes in Class 1 integrons in *Acinetobacter* strains isolated from blood cultures in 1997 to 2000. *Antimicrob Agents Chemother.* **47**, 1382-1390
105. Barbolla R, Catalano M, Orman B E, Famiglietti A, Vay C, Smayevsky J, Centron D, Pineiro S A (2004). Class 1 integrons increase trimethoprim-sulfamethoxazole MICs against epidemiologically unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**, 666-669
106. Piddock L J (1995). Mechanism of resistance to fluoroquinolones: state of the art (1992-1994). *Drugs.* **49 (suppl. 2)**, 29-35
107. Ambler J E, Pinney R J (1995). Positive R plasmid mutator effects on chromosomal mutations to nalidixic acid-resistance in nalidixic acid-exposed cultures of *E coli*. *J Antimicrob Chemother.* **35**, 603-609
108. John H, Jacoby G A, Jacoby T (2002). Mechanism of plasmid-mediated quinolone-resistance. *Proc Natl Acad Sci USA.* **99(8)**, 5638-5642
109. Hughes V M, Datta N (1983). Conjugative plasmids in bacteria of the "pre-antibiotic" era. *Nature.* **302**, 725-726
110. Levin B R, Lipsitch M, Perrot V, Schrag S J, Antia R, Simonsen L, Walker N M, Stewart F M (1997). The population genetics of antibiotic resistance. *Clin Infect Dis.* **24 (suppl. 1)**, 9-16
111. Schrag S J, Perrot V (1996). Reducing antibiotic resistance. *Nature.* **381**, 120-121
112. Schrag S J, Perrot V, Levine B R (1997). Adaption to the fitness costs of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* **264**, 1287-1291

113. Schmitz F J, MacKenzie C R, Geisel R, Wagner S, Idel H, Verhoef J, Hadding U, Heinz H P (1997). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains in the greater Düsseldorf area. *Eur J Epidemiol.* **13**, 709-717
114. Schmitz F J, Verhoef J, Idel H, Hadding U, Heinz H P, Jones M E (1998). Impact of hygienic measures on the development of methicillin resistance among staphylococci between 1991 and 1996 in a university hospital. *J Hosp Infect.* **3**, 237-240
115. Paterson D L, Rice L B (2003). Empirical antibiotic choice for the seriously ill patient: Are minimization of selection of resistant organisms and maximization of individual outcome mutually exclusive? *Clin Infect Dis.* **36(8)**, 1006-101
116. Charbonneau P, Thibon P, Parienti M, D'Alche-Gautier M J, Chaillot F, Henriët L, Saint-Lorent G, Lebouvier G, Le Coutour X, LeClercq P (2003). Impact of 12-month fluorochinolone restriction on MRSA-incidence in an French university hospital. *43rd ICAAC abstracts*, page 396
117. Krummi K et al. *43<sup>rd</sup> ICAAC abstracts. American Society for Microbiology*
118. National Committee for Clinical Laboratory Standards (1993). *Methodes for Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*. Approved Standart M7-A3. 3<sup>rd</sup>. ed. NCCLS, Villanova, PA.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Stephanie Wunder  
Geburtsdatum /-ort: 23.07.1968 in Frankfurt / Main  
Anschrift: Castroper Str. 241  
44791 Bochum

Familienstand: ledig, ein Kind  
Nationalität: deutsch

## Schulbildung

08. 1974 – 07. 1979 Grundschole mit zweijähriger Eingangsstufe  
Oberursel- Weißkirchen / Hessen  
08. 1979 – 06. 1980 Gesamtschole integriert  
Oberursel–Stierstadt / Hessen  
07. 1980 – 06. 1988 Pestalozzi–Gymnasium Unna / Abitur

## Studium

10. 1988 – 07. 1989 Jura an der Westfälischen Wilhelms–Universität Münster

## Berufsausbildung

08. 1989 – 06 – 1991 Ausbildung zur MTA an der Völker–Schule Osnabrück /  
Staatlicher Prüfungsabschluss

## Studium

10. 1991 – 10. 1998 Humanmedizin  
Ruhr–Universität Bochum / GHS Essen  
Praktisches Jahr: Alfred Krupp KH Essen  
Wahlfach: Neurologie

## Ärztin im Praktikum

16.12.1998 – 15.06.2000 Kliniken Wuppertal GmbH Klinikum Barmen / Neurologische Klinik

## Assistenzärztin

07. 2000 – 12. 2001 BG-Kliniken Bergmannsheil Bochum / Universitätsklinik  
Neurologische Klinik  
10. 2002 – 03. 2003 Städtische Kliniken Dortmund / Neurologische Klinik  
05. 2003 – 10. 2004 Knappschaftskrankenhaus Bochum-Langendreer / Universitätsklinik  
Neurologische Klinik  
ab 11. 2004 Westfälisches Zentrum für Psychiatrie Bochum / Universitätsklinik

Bochum, 18.11.2004

## Abstract

### Prävalenz von Klasse I Integrons in Enterobacteriaceae – Erfahrungen aus einem Uni-Klinikum von Stephanie Wunder

Der Einsatz verschiedener antimikrobiell wirksamer Substanzen in Humanmedizin und Tierzucht begünstigt durch eine rasche Alteration der Selektionskräfte innerhalb eines Lebensraumes bei exponierten Mikroorganismen die Ausprägung neuer Adaptionsmechanismen. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der klinisch bedeutsamen Klasse I Integron-Struktur bei verschiedenen Enterobacteriaceae-Species. Es handelt sich hierbei um einen multikompatiblen Genaquirierungs- und Expressionsmechanismus, der dem entsprechenden Wirtsbakterium eine hohe phänotypische Anpassungsfähigkeit verleiht und somit entscheidend dazu beiträgt, die Überlebenschancen einer Art zu verbessern.

Integrons sind potentiell transferierbare genetische Elemente, bestehend aus einer variablen Insertionsregion, eingerahmt von je einem konservierten Segment (CS) in 5'- respektiv 3'-Richtung. Die Mobilität dieser Struktur in toto wird durch ihre bevorzugte Lokalisation auf (Resistenz-) Plasmiden und / oder der Assoziation mit Transposonen erreicht. So genannte Genkassetten, zusammengesetzt aus einem Strukturgen und einer spezifischen Anheftungsregion (59-Basenelement = attachment-C-Region), können mittels eines enzymdependenten Rekombinationsvorgangs im Bereich der Insertionsregion in ein Integron eingebaut oder auch wieder hieraus gelöst werden. Die dazu erforderliche „Integrase“ wird von einem im 5'-CS gelegenen Sequenzabschnitt codiert und definiert zugleich die Zugehörigkeit zu einer der gegenwärtig fünf unterschiedlichen Integron-Klassen. Innerhalb einer Insertionsregion können bis zu acht unterschiedliche Genkassetten vergesellschaftet sein. Als weitere obligatorische Bestandteile enthält das 5'-CS einen Großteil der integronseitigen Rekombinationschnittstelle (*attI*-Region) und die die Expression der integrierten Strukturgene steuernde Promotorregion. Ferner sind translationsmodulierende Eigenschaften ebenfalls mit diesem Integronabschnitt assoziiert. Das 3'-CS hingegen beginnt mit einer kurzen, formal noch zur *attI*-Region zählenden Basenpaarabfolge. Sich anschließende Ausstattungsmerkmale divergieren in Abhängigkeit von der jeweiligen Klassenzugehörigkeit.

Wir untersuchten jeweils die ersten 200 *E. coli*-, und je 25 *Klebsiella pneumoniae*-, *Klebsiella oxytoca*-, *Enterobacter aerogenes*- und *Enterobacter cloacae*-Isolate aus Blutkulturen von in den Jahren 1994, 1997 und 2000 in den Universitätskliniken Düsseldorf behandelten Patienten. Nach Ausschluss einer klonalen Identität mittels RAPD-basiertem Differenzierungsverfahren standen mit insgesamt 841 Stämmen 93,4% des Ausgangsmaterials zur Verfügung. Die Gesamtprävalenz Integron-Klasse-I-haltiger Isolate bei Einschluss aller drei Untersuchungsjahrgänge betrug 11,4 %. Allerdings war im zeitlichen Verlauf ein signifikanter Zunahme der relativen Häufigkeit von 6,9% in 1994 bis auf 17,4% in 2000 zu beobachten gewesen.

Diese Entwicklung zeigte sich bei allen eingesetzten Enterobacteriaceae-Species, jedoch in unterschiedlich starker Ausprägung. Der deutlichste Anstieg fand sich bei *Klebsiella oxytoca* von 19,0% in 1994 auf 52,2% im Jahr 2000.

Unabhängig vom Isolationszeitpunkt entstammten 78% aller integronpositiven Isolate von intensivmedizinisch betreuten Patienten, 15% wurden von Patienten fachlich unterschiedlicher Normalstationen und 7% von in den Ambulanzen / Notaufnahmen versorgten Patienten gewonnen. Diese Verteilung veranschaulicht eindrucksvoll, dass ein konstant hoher respektive ansteigender Antibiotikaselektionsdruck die Verbreitung der hier untersuchten genetischen Funktionseinheit innerhalb eines institutionsresidenten Erregerreservoirs begünstigt.

Daneben war auch die Größe der Insertionsregion als indirektes Maß für die Anzahl eingeschleuster Genkassetten Gegenstand der Untersuchungen. Hier zeigte sich ebenfalls eine eindruckliche Zuwachsrate im Verlauf der Siebenjahrespanne. So genannte genkassettenlose „Empty-Integrons“ wurden nur 1994 detektiert.

Die Promotorregion verfügt über einen als obligat (P1) und einen als fakultativ zu betrachtenden Promotorsequenzabschnitt. Von P1 existieren vier unterschiedliche Varianten, eine mit hoher, eine mit niedriger Transkriptionseffizienz und zwei „Hybrid“-Formen. P2 kommt hingegen nur in aktiver oder passiver Ausprägung vor. Unsere Untersuchungen belegten ein „Shift“ hin zum P1- und Kompositionen (P1<sub>weak</sub>+P2<sub>active</sub>)-Promotortyp, den beiden Varianten, die die höchsten Transkriptionsraten vermitteln. Im Kollektiv der integronhaltigen Isolate aus dem Jahr 1994 lag ihre Prävalenz zusammengefasst noch bei 26,3% gegenüber 60% im Jahr 2000.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Testungen phänotypischer Eigenschaften beschränkten sich auf das Resistenzverhalten des eingesetzten Untersuchungsmaterials. Bakterienstämme, die über eine DNA-haltige Insertionsregion verfügten, waren signifikant häufiger unempfindlich gegenüber bestimmten  $\beta$ -Lactamen und anderen Antibiotikaklassen. Für Ampicillin lag die Prävalenz resistenter Isolate bei 53% vs. 37%, für Ticarcillin bei 49% vs. 29%, für Piperacillin bei 42% vs. 19%, für Gentamicin bei 10% vs. 5%, für Ciprofloxacin bei 8% vs. 3% und für die Folsäureantagonisten-Kombination Trimethoprim / Sulfamethoxazol sogar bei 52% vs. 7%, jeweils zu Gunsten des integron- und genkassettenpositiven Kollektivs.

Zusammengefasst belegen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit neben den Veränderungen epidemiologischer Faktoren wie einer ansteigenden Integron-Prävalenzrate im Untersuchungszeitraum auch die Entwicklung hin zu Multiresistenz-Integrons und zu einer verbesserten Transkriptionseffizienz bezüglich eingeschleuster Gene. Weiterhin veranschaulichen relevante Alterationen des Phänotyps integronpositiver Isolate die klinische Bedeutung dieses genetischen Elements.

Düsseldorf, den 28.10.2004

Prof. Dr. med. Franz-Josef Schmitz, Ph.D.