



**Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**  
**Fakultät für Klinische Medizin Mannheim**  
**Dissertations-Kurzfassung**

**Der Nachweis von Aminoglykosid-Resistenzgenen mittels  
Pulsfeldgelelektrophorese und Southern-Blot Hybridisierung in  
gramnegativen Hospitalkeimen**

Autor: Anja Maria Dewes  
Einrichtung: Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
Doktorvater: Prof. Dr. H. Hof

In den letzten 20 Jahren spielten Aminoglykoside eine wichtige Rolle in der antibakteriellen Chemotherapie und ihre Inaktivierung über Aminoglykosid modifizierende Enzyme (AME), als häufigste Form der erworbenen Resistenz, ist immer noch Gegenstand intensiver Untersuchungen.

Die Methoden der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) ermöglichen bei den Untersuchungen im Bereich der Resistenzcodierung von AME die Auftrennung längerer DNA-Moleküle als die herkömmliche Elektrophorese. Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus einer Vielzahl von Elektrophoresemethoden die PFGE mit programmierbarem, automatisch kontrolliertem Elektrodensystem ausgewählt. Es sollte überprüft werden, ob sich ihre Durchführung schnell und einfach gestalten läßt und ob das im Blättchendiffusionstest ermittelte phänotypische Resistenzmuster der eingesetzten gramnegativen Hospitalkeime mit dem genotypischen Muster aus der Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten DNA-Sonden, die gegen spezifische Resistenzgene gerichtet sind, übereinstimmt.

Auf der Basis des Blättchendiffusionstestes wurde das phänotypische Resistenzmuster von 32 aus Patientenmaterial isolierten, Aminoglykosid-resistenten, gramnegativen Keimen ermittelt und die Verteilung der AME aufgezeigt. Die weiteren Untersuchungen beschränken sich auf die häufigsten AME: AAC(3)-IV, AAC(3)-V, APH(3')-I und ANT(2''). Dazu wurden mit Hilfe des GENUISnet-Computersystems am Deutschen Krebsforschungszentrum vier spezifische, jeweils ein AME codierende Gensonden ermittelt. Es konnte gezeigt werden, daß die Dot-Blot-Hybridisierung mit den Digoxigenin-markierten Gensonden ein geeignetes und zuverlässiges Verfahren zum Nachweis von Aminoglykosid-Resistenzgenen darstellt. Die Ergebnisse korrelierten gut mit den phänotypischen Resistenzprofilen aus dem Blättchendiffusionstest. Nur in 8,6% der Fälle stimmten die Ergebnisse aus der Hybridisierung nicht mit dem Phänotyp überein. Es wird angenommen, daß eventuell ein Fehler bei der Interpretation der phänotypischen Resistenzmuster zugrunde liegt oder aber Resistenzgene nachgewiesen wurden, deren entsprechendes AME nicht synthetisiert wird. Möglicherweise codieren die Resistenzgene andere zum Stoffwechsel der Bakterien gehörende Enzyme oder ihre Expression wird durch Regulationsmechanismen unterdrückt. Andererseits konnten einige Aminoglykosid-modifizierende Enzyme genotypisch nicht nachgewiesen werden. Der Grund dafür könnten Isoenzyme sein, die von verschiedenen Resistenzgenen codiert werden. Die eingesetzten Gensonden erkennen jedoch nur ein spezifisches Aminoglykosid-Resistenzgen, sodaß die jeweiligen Isoenzym-codierung nicht erfaßt worden wäre. Das genotypische Screening wird dadurch erschwert, denn die Untersuchung müßte mit Gensonden aller bekannten Resistenzgene durchgeführt werden.

Im Rahmen der Etablierung der Methoden konnte gezeigt werden, daß die Anwendung der Pulsfeldgelelektrophorese ein zuverlässiges Verfahren ist, um größere DNA-Moleküle aufzutrennen, jedoch ist die Einstellung der Elektrophorese-Parameter sehr zeitaufwendig.

Bei der Durchführung der Hybridisierungsexperimente zeigten sich die Digoxigenin-markierten Gensonden als hervorragend geeignet. Im Gegensatz zu einer radioaktiven Markierung konnte mit der Digoxigenin-Markierung schneller, kostengünstiger und ungefährlich gearbeitet werden.