

Populationsgenetische Untersuchungen bei Bakterien und deren mögliche Anwendung bei der Risikoabschätzung von Probiotika in der Tierproduktion

Dr. Jörg Jores und Prof. Lothar H. Wieler

Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Freie Universität Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin

Einleitung

Der Gastrointestinaltrakt Lebensmittel liefernder Tiere beherbergt eine Vielzahl unterschiedlichster Mikroorganismen, die für die physiologischen Darmfunktionen unabdingbar sind. Zum einen sind sie unter Einsatz ihrer katabolen Enzymkaskaden direkt an der Verdauung von Futter beteiligt und können andererseits für den Wirt essenzielle Stoffwechselprodukte synthetisieren. Die Konzentration von lebenden Bakterien innerhalb des Darmtraktes ist sehr hoch und beläuft sich auf bis zu 10^9 bis 10^{11} pro Gramm Darminhalt (HIRSH, 1999). Angesichts derartig hoher Bakterienkonzentrationen kann davon ausgegangen werden, dass ein Spezies-spezifischer bzw. Spezies-übergreifender horizontaler Gentransfer der gastrointestinalen Mikroorganismen sehr wahrscheinlich ist. Derzeit liegen nur wenige Erkenntnisse über die tatsächliche in vivo-Austauschrates von Genen intestinaler Bakterien vor (HUYCKE et al., 1992; SCOTT, 2002; TUOHY et al., 2002), jedoch konnte in in vitro-Experimenten ein horizontaler Gentransfer belegt werden.

Das Konzept der Probiotika ist schon seit fast 100 Jahren bekannt und fußt auf den von Metschnikoff gemachten Beobachtungen an sehr alten Menschen in Bulgarien, die regelmäßig fermentierte Milchprodukte konsumierten. Aufgrund der sich ausbreitenden Antibiotikaresistenzen, als deren Ursache u. a. auch die Verfütterung von Antibiotika als Wachstumsförderer bei Tieren gesehen wird und eines damit verbundenen zukünftigen Verbots dieser Praxis in der Europäischen Union, finden probiotisch wirksame Mikroorganismen als Alternative zur Antibiotikaverfütterung immer mehr das Interesse von Tierärzten und Landwirten.

Verschiedene probiotisch aktive Mikroorganismen haben derzeit eine vorläufige Zulassung als Futterzusatzstoff in Europa und werden deshalb in großem Maßstab in der Tierproduktion eingesetzt. Die wiederholte Verfütterung dieser probiotisch aktiven Mikroorganismen erwies sich z. B. als förderlich angesichts einer steigenden Mastleistung der Tiere, da die Probiotika anscheinend die Anzahl pathogener Bakterien im Darmtrakt reduzieren oder aber positive immunmodulierende Eigenschaften vermitteln.

Probiotika sind definitionsgemäß apathogene Mikroorganismen, die ihrerseits die Gesundheit und Physiologie des Konsumenten (in dem Falle der Tiere) positiv beeinflussen, deren exakter Wirkungsmechanismus derzeit jedoch noch nicht vollkommen verstanden wird (SIMON und WIELER, 2001).

Im Allgemeinen werden heutzutage nur apathogene Hefen und Bakterien verschiedener Genera als Futterzusatzstoffe verwendet. Oftmals sind probiotische Mikroorganismen aber auch Vertreter von Hefe- oder Bakterien-Spezies, die ebenso pathogene Vertreter einschließen. Eine typische Eigenschaft dieser Mikroorganismen ist ihre Säuretoleranz, die notwendig ist, da diese Probiotika die Magenpassage vital überstehen müssen, um ihren eigentlichen Wirkungsort, nämlich die nachfolgenden Darm-

abschnitte, erreichen zu können. Die meisten Probiotika können nach ihrer Verfütterung lediglich transient aus Fäces isoliert werden, was deren mehr oder weniger permanente Verfütterung erforderlich macht, um die genannten positiven Effekte für das Tier aufrecht zu erhalten.

Um die Stellung der probiotisch aktiven Mikroorganismen im Netzwerk ihrer Spezies zu beleuchten, sind phylogenetische Untersuchungen nötig. Diese Untersuchungen ermöglichen einen Einblick in die Evolution der pathogenen Vertreter. Eine Kopplung phylogenetischer Daten mit den erfassten Virulenzeigenschaften der Mikroorganismen erlaubt es, die Evolution der Pathogene innerhalb einer Art zu verfolgen (ACHTMAN, 2002). Da prinzipiell apathogene Bakterien z. B. durch die Aquirierung so genannter Pathogenitätsinseln (DNA-Fragmente, die mehrere Virulenzgene enthalten) via horizontalem Gentransfer ein pathogenes Potenzial erwerben können, hat unser Bild der Evolution von Pathogenen einen Paradigmenwechsel erfahren (HACKER et al., 1997).

Deshalb ist es unserer Meinung nach ratsam, den Einsatz von Probiotika in der Tierproduktion durch ein Monitoring unter Verwendung von phylogenetischen Analysen zu begleiten. Das Anliegen dieser Arbeit ist es deshalb, die Populationsstrukturen und die Evolution von Bakterien im allgemeinen darzustellen, um beim Leser ein besseres Verständnis für die Bedeutung des horizontalen Gentransfers in der Evolution von Mikroorganismen zu wecken.

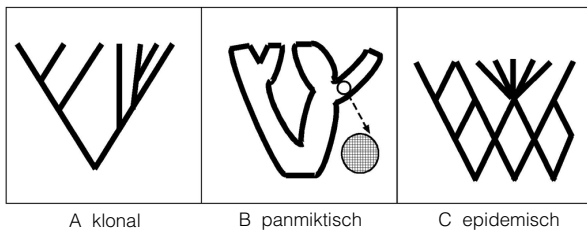
Populationsstrukturen und Evolution

Evolution im philosophischen Sinne ist ein irreversibler Veränderungsprozess. Van Valen beschrieb den evolutionären Prozess in Anlehnung an das Märchen „Alice im Wunderland“ als „Red Queen“ Paradigma (VALEN, 1973). Dementsprechend befinden sich alle Lebewesen inklusive der Mikroorganismen ständig in direkter bzw. indirekter Konkurrenz zueinander und evolvieren permanent. Evolution ist gekennzeichnet durch die Variation des Genotyps von Populationen in einem definierten Zeitraum (Generationen) durch Mutationen oder Rekombinationen des Genoms und die Verbreitung neuer Varianten durch natürliche Selektion oder genetische Drift. Populationen bestehen aus Gruppen von Individuen, die der selben Art zugehörig sind und in relativer Nähe zueinander existieren. Diese sind in der Lage, genetisches Material untereinander auszutauschen, sie konkurrieren um die lebensnotwendigen Ressourcen und interagieren miteinander (LENSKI, 1992).

Innerhalb der letzten Jahre hat sich unser Verständnis bezüglich der Evolution und Populationsstruktur der Mikroorganismen grundlegend geändert. Dies beruht v. a. darauf, dass durch die zunehmende Entschlüsselung von DNA-Sequenzen immer mehr Informationen zur Verfügung stehen, die mit Hilfe von mathematischen Modellen zur Aufklärung der Populationsgenetik von Mikroorganismen genutzt werden können.

Allgemein können Populationen von Mikroorganismen als klonal, panmiktisch oder epidemisch klassifiziert werden (MAYNARD SMITH et al., 1993) (Abb. 1). Klonale Arten entwickeln sich durch die Akkumulation stochastischer Punktmutationen, die dann wiederum zu leichten Unterschieden zum gemeinsamen Vorfahren führen. Die Phylogenie (evolutionäre Geschichte) verschiedener genetischer Orte des Genoms (z. B. konservierter Gene) ist demzufolge bei einem klonalen Bakterium sehr ähnlich wenn nicht identisch. Idealerweise reflektiert jede Gabel eines phylogenetischen Baumes (erstellt anhand des Sequenzvergleichs einer homologen Sequenz) eine Punktmutation in der Geschichte des Organismus. Die Anzahl der Schritte in einem phylogenetischen Baum ist daraus resultierend identisch mit der Anzahl variabler Nukleotide der DNA-Sequenzen der jeweiligen Bakterien, die Grundlage der Untersuchung sind. Typische Vertreter solcher sich klonal verhaltender Bakterien sind z. B. *Escherichia coli* oder *Salmonella enterica*, wobei jedoch ein horizontaler Gentransfer auch bei dieser Spezies dokumentiert ist und dann zu einer Veränderung des Genotyps nach Integration fremder DNA in das Genom führen kann.

Abbildung 1: Darstellung der drei möglichen Populationsstrukturen von Bakterien, verändert nach (MAYNARD SMITH et al., 1993)



- A Darstellung einer idealen klonalen Populationsstruktur, in der keine Rekombinationen vorkommen und bei der das Dendrogramm einen evolutionären Baum darstellt.
- B Bei panmiktischen Bakterien kommen Rekombinationsereignisse häufig zwischen Stämmen innerhalb der Hauptlinien vor, die dort zu einer netzartigen Struktur führen (siehe Vergrößerungsausschnitt). Es gibt jedoch keine Rekombinationen zwischen den Stämmen der verschiedenen großen Linien.
- C zeigt eine epidemische Struktur, die durch frequente Rekombinationen zwischen allen Stämmen zustande kommt und ebenfalls zu einer netzartigen Struktur führt. Manchmal entstehen als Folge der Rekombination erfolgreiche Klone, die sich aufgrund ihrer erhöhten Fitness ausbreiten.

Im Gegensatz dazu weisen panmiktische Bakterien eine andere Populationsstruktur auf. Innerhalb dieser Populationen findet über horizontalen Gentransfer ein reger Austausch statt, dessen Resultat viele Rekombinationen innerhalb des Genoms sind. Deshalb sind panmiktische Bakterien durch den Besitz von mosaikartigen DNA-Sequenzen gekennzeichnet, die partiell von ihren verschiedenen Spenderorganismen derselben Art oder anderer Arten stammen. Die jeweiligen Spender hatten natürlich eine unterschiedliche Geschichte zu jener des panmiktischen Empfängers, weshalb die Kongruenz der Phylogenie unterschiedlicher Loci zerstört ist bzw. unterschiedlich erscheint. Zudem variieren panmiktische Bakterien in ihrem Genotyp stärker als klonale Bakterien. Bakterien der Gattung *Helicobacter*, die häufig aus Säugermägen isoliert werden können, sind klassische Beispiele panmiktischer Bakterien (FALUSH et al., 2001; SUERBAUM et al., 1998).

Epidemische Bakterien hingegen sind allgemein charakterisiert durch das transiente Vorhandensein bestimmter Klone innerhalb panmiktischer Bakterienpopulationen. Diese Klone breiten sich sehr schnell aus. Der Grund der schnellen Ausbreitung ist die Ausfüllung einer ökologischen Nische über einen bestimmten Zeitraum, der dadurch erklärt werden kann, dass mit der zufälligen Rekombination neuartiger DNA in das Genom eine steigende Fitness einhergeht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein Minimum an genetischer Variabilität an verschiedenen Loci des Genoms eines Bakteriums das Resultat einer klonalen Populationsstruktur darstellt oder aber die Folge einer sehr kurzen Entwicklungsgeschichte einer panmiktischen Spezies ist, wenn nicht genügend Zeit verstrichen ist, um wiederholte Rekombinationsereignisse ablaufen zu lassen. Folglich tritt relativ wenig genetische Diversität zum gemeinsamen Vorläuferorganismus in Erscheinung.

Um aber die Populationsstruktur einer Spezies zu bestimmen, ist aus Sicht des aktuellen Wissensstandes eine Untersuchung mittels **Multi Locus Sequence Typing (MLST)** anzustreben. Derzeit ist diese Methode der „goldene Standard“ für die Evolutionsanalyse und molekulare Epidemiologie von Bakterien. Die MLST basiert auf einer Identifizierung von Allelen mehrerer Gene (in aller Regel mindestens 7), die über das Genom des zu untersuchenden Organismus verteilt sind. Zum DNA-Sequenzvergleich eignen sich Haushaltsgene besonders gut, d. h. Gene, die Proteine für die essenziellen Stoffwechselfvorgänge kodieren, da diese aufgrund ihrer Unentbehrlichkeit bei allen Vertretern der jeweiligen Spezies vorkommen und demzufolge bei allen Vertretern auch mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und anschließend sequenzanalysiert werden können.

Darüber hinaus evolvieren diese Gene neutral, d. h. sie sind nicht Gegenstand eines strengen Selektionsdruckes, und dies ist für Evolutionsstudien essenziell. Die genetische Varianz in den Haushaltsgenen kann durch die von Kimura beschriebene Neutralitätstheorie erklärt werden, die im Gegensatz zu Darwins Theorie der natürlichen Selektion die zufällige genetische Drift und den Mutationsdruck als Hauptquellen der molekularen Evolution betrachtet (KIMURA, 1991).

Die Bestimmung der Populationsstruktur eines bestimmten Mikroorganismus kann z. B. für die Bewertung des Einsatzes als Probiotikum in der Tierhaltung von großem Interesse sein. Bei einem panmiktischen Organismus ist die Chance der Aufnahme und Rekombination „fremder“ DNA im Vergleich zu klonalen Organismen höher. Allerdings spielen dabei auch Faktoren wie die Größe der fremden DNA-Fragmente, das vorhandene Restriktionsendonukleasensystem des Empfängerorganismus als auch unter Umständen essenzielle Erkennungssequenzen in der fremden DNA eine wichtige Rolle. Theoretisch könnte ein probiotischer Organismus pathogene Eigenschaften mittels horizontalem Gentransfer hinzugewinnen. Ob dann von diesem Organismus aber tatsächlich eine Gesundheitsgefahr für das Tier ausgeht oder aber eine Verbreitung in der Umwelt die Folge ist, hängt wiederum davon ab, ob sich dieser Stamm anschließend in seinem Habitat durchsetzen kann. Ebenso könnte jedoch auch ein klonaler Probiotikastamm DNA hinzugewinnen. Wenn dieser Stamm pathogene Eigenschaften erlangen würde, die ihm bevorzugte Fähigkeiten im entsprechenden Habitat verleihen würden, so könnte sich ein solcher Klon evtl. massiv durchsetzen und würde wegen seiner Klonalität evtl.

über einen längeren Zeitraum als der oben angesprochene panmiktische Probiotikastamm stabil bleiben.

Da bei der Probiotikafütterung ständig der eigentliche Ausgangsstamm in großen Mengen zugefüttert wird, könnte aber die neu entstandene Variante auch sehr leicht wieder verdrängt werden. All diese Überlegungen sind rein theoretisch, und derzeit können wir keine klaren Aussagen über die Folgen des Probiotikaeinsatzes für unsere Umwelt treffen. Mit den uns zur Verfügung stehenden Methoden können diese Vorgänge jedoch verfolgt und objektiviert werden. Deshalb sind wir der Ansicht, dass solche Untersuchungen in Form eines Monitoring beispielhaft an Probiotika unterschiedlicher Populationsstruktur einzelner Spezies durchgeführt werden sollten.

Horizontaler Gentransfer bei Bakterien

Transformation, Transduktion und Konjugation sind die drei Säulen des horizontalen Gentransfers bei Bakterien (PAUL, 1999). Diese Prozesse werden auch als Sex der Bakterien in einem strengen evolutionären Kontext angesehen. Die Unterschiede zum eukaryontischen Sex im klassischen Sinne sind nach HUDSON und MICHOD (1992):

- i) die Entkoppelung von Sex und Reproduktion
- ii) die Bereitstellung von Genen in einem ungleichen Verhältnis von Donor und Rezipient
- iii) neue Gene sind das Produkt von Rekombinationen oder des Importes der entsprechenden Gene
- iv) nur eine lokale Alteration, nämlich die des Rekombinationsortes im Genom ist die Folge.

Die Transformation ist gekennzeichnet durch die Aufnahme und Integration fremder DNA (einzel- oder doppelsträngig) in das Genom der Empfängerbakterien. Dabei können weite phylogenetische Distanzen bezüglich des DNA-Flusses übersprungen werden, wobei ein physischer Kontakt der Spenderorganismen und Empfängerbakterien nicht notwendig ist. Unseres Wissens nach sind nur relativ wenige Bakterien derzeit als natürlich transformierbar beschrieben.

Transduktion ist die Inkorporation von Bakteriophagenspezifischen oder -assoziierten Nukleinsäuren in das Genom eines Empfängerbakteriums. Gene eines mit einem Bakteriophagen infizierten Wirts-Bakteriums, die fälschlicherweise im Zuge des lytischen Zyklus in das Kapsid verpackt wurden oder die essenzielle Bakteriophagen-DNA flankierten und durch ein unsauberes Herausschneiden der Phagen-DNA mitverpackt wurden, können so nachfolgend auf andere empfängliche Wirts-Bakterien übertragen werden. Solch ein Gentransfer kann unter Umständen ebenfalls weite taxonomische Grenzen überwinden, obwohl Phagen sehr spezifische Rezeptoren erkennen. Mittels Phagen können neben chromosomalen DNA-Fragmenten auch Plasmide übertragen werden.

Die Konjugation wiederum beinhaltet den Transfer von speziellen mobilen (konjugativen) Plasmiden von einer Donorzelle zu einer Rezipientenzelle. Es bedarf bei diesem Vorgang eines innigen Zell-Zell-Kontaktes, denn nur so kann ein Einzelstrang des konjugativen Plasmids in die Rezipientenzelle befördert werden. Anschließend wird der komplementäre DNA-Strang sowohl im Donor als auch im Rezipienten synthetisiert, so dass die episomale DNA bei beiden Stämmen verbleibt. Diese Art des horizontalen

Gentransfers geschieht häufig nur zwischen taxonomisch eng verwandten Bakterien und ist demzufolge in aller Regel eine spezifische Art des Gentransfers.

Die Übertragung von Virulenz-assoziierten Genen, wie z. B. von Pathogenitätsinseln oder Resistenzgenen mittels horizontalem Gentransfer, ist seit vielen Jahren bekannt und wurde bei vielen Bakterienarten beschrieben. Die so aufgenommenen neuen Gene können unter geeigneten Umweltbedingungen zu einer Erhöhung der so genannten Fitness - im Falle der Aufnahme von virulenzassoziierten Genen zu einer Erhöhung der Pathogenität - des jeweiligen Bakteriums führen. Ist die Anzahl der empfänglichen Wirte der „neu-pathogenen“ Bakterien gering, so kann das Resultat der Infektion im Extremfall ein Verschwinden der Wirte und möglicherweise damit einhergehend die Vernichtung des Habitats mit fatalen Konsequenzen für die Bakterienpopulation bedeuten. Andererseits bewirkt eine hohe Wirtsdichte die schnelle Ausbreitung der Bakterien, auch wenn deren Wirte im Extremfall letale Krankheiten erleiden könnten (PAUL, 1999).

Rekombinationsrate und Homoplasie

Rekombination ist ein Prozess, bei dem sich homologe (ähnliche) DNA-Sequenzen paaren, die DNA-Stränge brechen und verbinden sich wieder. Das Resultat einer Rekombination ist eine Genomveränderung, die zu neuen Allelen, zu einer Deletion vorhandener Gene, oder zum Import fremder Gene führen kann. Die letzten beiden Möglichkeiten lassen sich mittels DNA-Sequenzanalyse genomischer DNA relativ einfach identifizieren, machen jedoch den Vergleich des Anteils von Rekombinationen im Laufe der Phylogenie bei verschiedenen Mikroorganismen untereinander problematisch. Deshalb sind für die phylogenetischen Untersuchungen Haushaltsgene aus den bereits erwähnten Gründen gut geeignet. Angenommen, die Rekombinationsrate ist gering und nur Punktmutationen bedingen Genalterationen, so sollten z. B. die phylogenetischen Untersuchungen anhand von Haushaltsgenen einer Gruppe von Bakterienisolaten jeweils die gleichen Stammbäume produzieren, unabhängig vom verwendeten Gen. Wenn jedoch Rekombinationsereignisse relativ häufig stattfanden, ist ein Verbindungs-Ungleichgewicht (d. h., die nicht zufällige Assoziation von Allelen) verschiedener Gene bezüglich der gemeinsamen Geschichte denkbar niedrig und eine Panmixie sehr wahrscheinlich. Wenn Rekombinationsraten sehr niedrig sind, kann das Phänomen der fehlenden Homoplasie beobachtet werden (MAYNARD SMITH und SMITH, 1998).

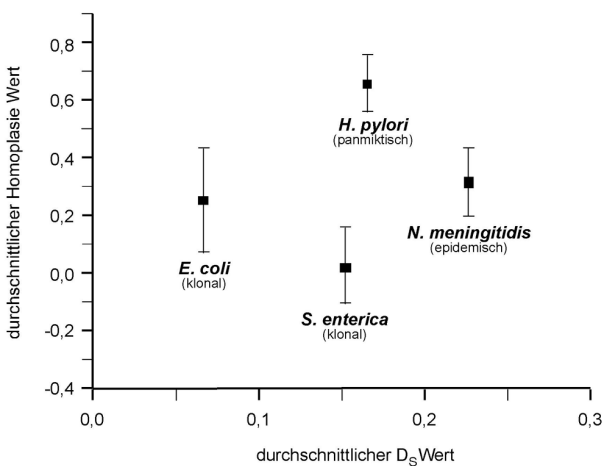
Um Rekombinationsereignisse nachzuweisen und eine so genannte Homoplasie bei verschiedenen Allelen aufzudecken, ist wiederum eine MLST-Analyse unter Einbeziehung mathematischer Modelle ein probates Mittel. Die Homoplasie (h) ist definiert als die Anzahl der Punktmutationen (t) abzüglich der Anzahl der variablen Basen (v) und kann Werte von null bis eins annehmen. In einem Organismus, in dem modellhaft keine Rekombinationsereignisse oder wiederholte Mutationen stattgefunden haben, ist die Homoplasie eines jeden Locus gleich null. Wenn jedoch die Homoplasie größer als null ist, so haben Rekombinationen oder wiederholte Mutationen stattgefunden. Demzufolge ist der Homoplasie-Test ein indirekter Hinweis der Rekombinationsrate (MAYNARD SMITH und SMITH, 1998).

Beispielsweise beträgt die Homoplasie des Bakteriums *Helicobacter pylori* mehr als 0,6. Dies weist auf eine pan-

miktische Populationsstruktur hin, wohingegen *E. coli* eine Homoplasie von weniger als 0,3 ausweist und demzufolge eine klonale Populationsstruktur hat (Abb. 2). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Homoplasie-Test eine elegante Methode darstellt, um den Anteil der Rekombination in einem Bakterium zu bestimmen. Demzufolge sollte dieser Parameter bei Mikroorganismen, die potenziell als probiotische Substanzen in der Tierhaltung Verwendung finden sollen, bestimmt werden, um das potenzielle Risiko des Erwerbs fremder Virulenz-kodierender Gene via horizontalem Gentransfer zu beleuchten.

Daraus resultierend ermöglicht die Analyse der Populationsstrukturen der Mikroorganismen die Abschätzung der Wahrscheinlichkeit eines Allelflusses, d. h. der Rekombinationsereignisse zwischen Populationen. In diesem Sinne ist die Wahrscheinlichkeit der Integration fremder leicht positiv selektierter oder neutraler Allele höher bei panmiktischen oder epidemischen Bakterien als bei klonalen Spezies. Wenn jedoch der Selektionsdruck sehr hoch ist, z. B. bei vorhandener Antibiotikaresistenz und dem Einsatz des jeweiligen Antibiotikums, so wird die Penetrationsrate positiv selektierter Gene in den meisten Bakterienpopulationen relativ hoch sein, unabhängig davon, ob es sich um klonale oder panmiktische Bakterienspezies handelt!

Abbildung 2: Vergleich der Homoplasie Werte (H) und mittleren genetischen Distanz an synonymen Basen (D_S) zwischen verschiedenen Bakterienarten, verändert nach SUERBAUM und ACHTMAN (2001)



Beispielhafte Diskussion anhand *Enterococcus faecium*

Basierend auf dem natürlichen Habitat der probiotisch einzusetzenden Mikroorganismen können diese in drei Kategorien gruppiert werden. Zum einen sind dies Milchsäure produzierende Bakterien (*Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*), deren natürlicher Lebensraum auch der Verdauungstrakt vieler Tiere ist. Zweitens werden verschiedene Vertreter der Gattung *Bacillus* verwendet, deren natürliches Habitat der Boden ist und die in der Lage sind, Sporen zu bilden. Drittens handelt es sich um Hefen der Gattung *Saccharomyces*, die natürlicherweise auf Oberflächen von Pflanzen wachsen.

Bakterienspezies der Gattung *Enterococcus* gehören bekanntlich zur autochthonen Flora des Gastrointestinaltraktes der Säugetiere. Obwohl *Enterococcus faecium* relativ häufig aus Stuhlproben des Menschen isoliert werden kann, ist seine Prävalenz in der Schweine-, Schaf- und Rinderhaltung relativ gering (LECLERC et al., 1996). Momentan haben mehrere *Enterococcus faecium* Stämme eine vorläufige Genehmigung als Futterzusatzstoff, aber die Spezies selbst stellt sich bezüglich ihrer pathogenen Eigenschaften relativ divers dar (VANCANNEYT et al., 2002).

Pheromon-sensitive Plasmide, konjugative Transposons und Plasmide mit einem breiten Wirtsspektrum spielen eine wichtige Rolle als Vehikel im horizontalen Gentransfer von *Enterococcus* spp. (CLEWELL, 1990). Vancomycin-resistente *E. faecium* (VREF) Stämme sind seit einiger Zeit als wichtige Pathogene bekannt und werden in Krankenhäusern zunehmend isoliert (BONTEN et al., 2001; WILLEMS et al., 2001). Solche Stämme wurden auch bei Nutztieren isoliert, wobei angenommen wird, dass u. a. die häufige Verfütterung von Avoparcin als Leistungssteigerer kausal für das Vorkommen dieser Resistenz verantwortlich zu machen ist, obwohl z. B. in den Vereinigten Staaten diese Erklärung nicht greift, da dort Avoparcin nicht als Leistungsförderer eingesetzt wurde (GOOSSENS, 1998; KLARE et al., 1995). Die Verbreitung der entsprechenden Resistenzgene wird von selbst-übertragbaren Plasmiden und konjugativen Transposons realisiert.

Interessanterweise ist in *E. faecium*-Stämmen ein Transfer von Pheromon-induzierbaren Plasmiden möglich, dies wurde experimentell im Darmtrakt eines Hamsters nachgewiesen (HUYCKE et al., 1992). Erste MLST-Analysen von *E. faecium* belegten die Existenz von vier Hauptlinien (A, B, C und D). Bemerkenswerterweise konnte eine Assoziation zwischen bestimmten evolutionären Linien und verschiedenen Wirten festgestellt werden, was als ein Hinweis auf eine Koevolution - ausgelöst durch eine Wirtsadaptation- gewertet werden kann. Ausschließlich humane Isolate konnten in allen evolutionären Linien gefunden werden (HOMAN et al., 2002). Man muss jedoch anmerken, dass bislang nur eine sehr begrenzte Anzahl von Isolaten untersucht wurde. Vorausgesetzt, dass die Vancomycin-resistenten Enterokokken vor ungefähr 40 Jahren durch die Verfütterung Vancomycin-ähnlicher Antibiotika entstanden wären, so ist eine epidemische Ausbreitung dieser Bakterien der evolutionären Linie C evident. Die bereits zitierten MLST-Analysen konnten diesen Sachverhalt belegen, da 78 % der in dieser Studie untersuchten VREF-Stämme das gleiche Allelprofil hatten, während nur 22 % der Vancomycin-sensitive (VSEF) Stämme ein gemeinsames (anderes) Allelprofil hatten (HOMAN et al., 2002).

Epidemische Stämme beherbergen das *esp*-Gen, das anscheinend für die weltweite Verbreitung im evolutionären Sinne vorteilhaft zu sein scheint. Die Erstellung phylogenetischer Stammbäume anhand nur jeweils eines Gens und der Vergleich der so generierten Stammbäume zeigte, dass in den untersuchten Enterokokken-Stämmen viele Rekombinationen stattgefunden hatten, so dass sich die einzelnen Bäume voneinander unterschieden. Somit weisen diese ersten MLST-Daten auf eine epidemische Populationsstruktur der resistenten *E. faecium*-Population hin. Ein horizontaler Gentransfer der Antibiotika-Resistenzgene und des Virulenzgens *esp* sind demnach wahrscheinlich die Haupttriebkraft der epidemischen Populationsstruktur, und die Verbreitung der Klone ist das Resultat eines starken Antibiotika-Selektionsdruckes.

Diese Daten sollten bei der Verwendung von *E. faecium* als Futterzusatzstoff beachtet werden. Allerdings wurden unseres Wissens die derzeit verwendeten Stämme noch nicht analysiert, so dass wir deren Populationsstruktur lediglich ableiten können. Selbst wenn ein gewisses Risiko der Übertragung von Virulenzdeterminanten gegeben ist, haben wir demgegenüber z. B. per se die positiven Effekte für die Tiere und die Umwelt (Reduktion des Antibiotikaeinsatzes) zu betrachten. Außerdem ist die Konzentration der zugeführten Bakterien im Vergleich zur autochthonen Darmflora immer noch sehr gering und die Anzahl der zugeführten Ausgangsprobiotika gegenüber dem theoretisch durch DNA-Transfer entstandenem Klon sehr hoch. Die Verbreitung solcher eventuell entstandener potenzieller Klone (entstanden aus dem Probiotikum) mit dem Kot in die Umwelt hängt wiederum von der Tenazität der Erreger, vom hygienischen Status des Betriebes etc. ab. Eine abschließende Bewertung kann nur über ein entsprechendes längerfristiges Monitoring getroffen werden. Die Methoden hierzu stehen uns heute zur Verfügung.

Referenzen

- ACHTMAN, M. (2002): A Phylogenetic Perspective on Molecular Epidemiology. In: Molecular Medical Microbiology. Edt. M. Sussman, 485-509, Academic Press, London
- BONTEN, M.J., R. WILLEMS, R.A. WEINSTEIN (2001): Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, und where do they come from? *Lancet Infect Dis.* 1, 314-25
- CLEWELL, D.B. (1990): Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 9, 90-102
- FALUSH, D., C. KRAFT, N.S. TAYLOR, P. CORREA, J.G. FOX, M. ACHTMAN, S. SUERBAUM (2001): Recombination and mutation during long-term gastric colonization by *Helicobacter pylori*: estimates of clock rates, recombination size, and minimal age. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 15056-61
- GOOSSENS, H. (1998): Spread of vancomycin-resistant enterococci: differences between the United States and Europe. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 19, 546-51
- HACKER, J., G. BLUM-OEHLER, I. MÜHLENDORFER, H. TSCHÄPE (1997): Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol.* 23, 1089-97
- HIRSH, D.C. (1999): The Alimentary Canal as a Microbial Habitat. In: *Veterinary Microbiology.* Edt. D. C. Hirsh and Y. C. Zee, 61-64, Blackwell Science, Malden, Mass
- HOMAN, W.L., D. TRIBE, S. POZNANSKI, M. LI, G. HOGG, E. SPALBURG, J.D. VAN EMBDEN, R.J. WILLEMS (2002): Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 40, 1963-71
- HUDSON, R.E., R.E. MICHOD (1992): Genetic Transformation, Evolution. In: *Encyclopedia of microbiology.* Edt. J. Lederberg, 4 v., Academic Press, San Diego
- HUYCKE, M.M., M.S. GILMORE, B.D. JETT, J.L. BOOTH (1992): Transfer of pheromone-inducible plasmids between *Enterococcus faecalis* in the Syrian hamster gastrointestinal tract. *J Infect Dis.* 166, 1188-91
- KIMURA, M. (1991): Recent development of the neutral theory viewed from the Wrightian tradition of theoretical population genetics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88, 5969-73
- KLARE, I., H. HEIER, H. CLAUS, R. REISSBRODT, W. WITTE (1995): vanA-mediated high-level glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from animal husbandry. *FEMS Microbiol Lett.* 125, 165-71
- LECLERC, H., L.A. DEVRIESE, D.A. MOSSEL (1996): Taxonomical changes in intestinal (faecal) *enterococci* and *streptococci*: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. *J Appl Bacteriol.* 81, 459-66
- LENSKI, R.E. (1992): Evolution, Experimental. In: *Encyclopedia of microbiology.* Edt. J. Lederberg, 4 v., Academic Press, San Diego
- MAYNARD SMITH, J., N.H. SMITH (1998): Detecting recombination from gene trees. *Mol Biol Evol.* 15, 590-9
- MAYNARD SMITH, J., N.H. SMITH, M. O'ROURKE, B.G. SPRATT (1993): How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90, 4384-8
- PAUL, J.H. (1999): Microbial gene transfer: an ecological perspective. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 1, 45-50
- SCOTT, K.P. (2002): The role of conjugative transposons in spreading antibiotic resistance between bacteria that inhabit the gastrointestinal tract. *Cell Mol Life Sci.* 59, 2071-82
- SIMON, O., L.H. WIELER (2001): Probiotika, Anwendungsgebiete und Wirkungsmechanismen. In: *Handlexikon der tierärztlichen Praxis.* Edt. E. Wiesner, 681 r-681 y, Enke Verlag Stuttgart, Stuttgart
- SUERBAUM, S., M. ACHTMAN (2001): Population Genetics. In: *Helicobacter pylori: molecular and cellular biology.* Edt. M. Achtman and S. Suerbaum, 355-361, Horizon Scientific Press, Wymondham, Norfolk, England
- SUERBAUM, S., J. MAYNARD SMITH, K. BAPUMIA, G. MORELLI, N.H. SMITH, E. KUNSTMANN, I. DYREK, M. ACHTMAN (1998): Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 12619-24
- TUOHY, K., M. DAVIES, P. RUMSBY, C. RUMNEY, M.R. ADAMS, I.R. ROWLAND (2002): Monitoring transfer of recombinant and nonrecombinant plasmids between *Lactococcus lactis* strains and members of the human gastrointestinal microbiota in vivo—impact of donor cell number and diet. *J Appl Microbiol.* 93, 954-64
- VALEN, V. (1973): A new evolutionary law. *Evol. Theory.* 1, 1-30
- VANCANNEYT, M., A. LOMBARDI, C. ANDRIGHETTO, E. KNIJFF, S. TORRIANI, K.J. BJORKROTH, C.M. FRANZ, M.R. FOULQUIE MORENO, H. REVETS, L. DE VUYST, J. SWINGS, K. KERSTERS, F. DELLAGLIO, W.H. HOLZAPFEL (2002): Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Appl Environ Microbiol.* 68, 1381-91
- WILLEMS, R.J., W. HOMAN, J. TOP, M. VAN SANTEN-VERHEUVEL, D. TRIBE, X. MANZIOROS, C. GAILLARD, C.M. VANDENBROUCKE-GRAULS, E.M. MASCINI, E. VAN KREGTEN, J.D. VAN EMBDEN, M.J. BONTEN (2001): Variant esp gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. *Lancet.* 357, 853-5.

Anschrift der Verfasser

Dr. Jörg Jores und Prof. Lothar H. Wieler
Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
Freie Universität Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin
Philippstraße 13
10115 Berlin