



Aktueller Zwischenstand Projekt FED-AMR



K.HAMMER, N.SEITER, V.KUNDRATITZ, A.CABAL ROSEL, W.RUPPITSCH

12.10.2021

Zusammenfassung

Das FED-AMR Projekt analysiert das Auftreten antimikrobielle Resistenzgenen (AMR) in extrazellulärer DNA, sowie deren Relevanz für die Verbreitung von AMR im landwirtschaftlichen Ökosystem Europas. Auf Basis deterministischer und probabilistischer Modelle wird analysiert, welcher Zusammenhang zwischen dem Einsatz von antimikrobiellen Mitteln (u.a. Antibiotika, Pestizide) und antimikrobiellen Resistenzgenen (ARG) in der Umwelt besteht.

Abstract

The FED-AMR project analyses the occurrence of antimicrobial resistance (AMR) genes in extracellular DNA and their relevance for the spread of AMR in the agricultural ecosystem of Europe. Deterministic and probabilistic models are used to analyse the relationship between the use of antimicrobial agents (antibiotics, pollutants, herbicides and pesticides) and AMR genes in the environment.

Schlüsselwörter

OHEJP, antimikrobielle Resistenzgene, *C. difficile*, exDNA, ARG, AMR

Keywords

OHEJP, antimicrobial resistance, *C.difficile*, exDNA, ARG, AMR

Hintergrund

Im Zuge des OHEJP-Projekts FED-AMR untersuchen zwölf europäische Partnerorganisationen die Rolle freier extrazellulärer DNA bei der Verbreitung antimikrobieller Resistenzen über Ökosystemgrenzen, entlang der Nahrungs-/Futtermittelkette. Der Beitrag bakterieller Transformation zum horizontalen Gentransfer (HGT) von antimikrobiellen Resistenzgenen (ARGs) in Umgebungen, welche für die Gesundheit von Mensch als auch Tier entscheidend sind, ist derzeit unklar.

Extrazelluläre DNA, kurz exDNA, ist allgegenwärtig und persistent in natürlichen Umgebungen. Als eine Quelle von ARGs in zum Beispiel Gülle, Abwasser, Futtermitteln aber auch Lebensmitteln wurde die freie exDNA identifiziert. Außerdem ist die freie exDNA ein wichtiger Matrixbestand von bakteriellen Biofilmen. Nachweisbar ist dies im Magen-Darm-Trakt von Säugetieren und in Fäkalien. ExDNA ist in der natürlichen Umgebung allgegenwärtig und ausreichend stabil, weshalb sie ein wichtiges Reservoir für ARGs bilden kann.

ARG verbreiten sich durch natürliche genetische Transformation von Umweltbakterien, aber auch tierischen und humanen Pathogenen. Bei dieser natürlich vorkommenden bakteriellen Transformation handelt es sich um einen HGT-Prozess. Es wird angenommen, dass die exDNA einen wesentlichen Beitrag zum Umweltresistom leistet, da bis zu 60 Prozent der aus dem Boden extrahierten DNA aus extrazellulären Quellen stammen. Des Weiteren spielt die Transformation bei der Bildung von Mosaik-ARGs, eine entscheidende Rolle.

Zwischen Spender- und Empfängerbakterien wird bei der natürlichen Transformation kein physischer Kontakt erfordert, was dazu führt, dass es zu einer großen zeitlich-räumlichen Trennung zwischen der Quelle und dem Empfänger der genetischen Information kommt und ausschließlich von der Empfängerzelle reguliert wird. Diese Bedingungen erleichtern es ARGs, Ökosystembarrieren zu überwinden und in neue Ökosysteme einzudringen. Im Zuge des Projektes wird auf Elemente des EFFORT-Projektes zurückgegriffen und der „One Health“-Ansatz berücksichtigt. Unter anderem werden landwirtschaftlich genutzte Böden, Wasserproben, Futtermittel und Lebensmittel untersucht.

Ziel und Durchführung

Ziel

Das Hauptziel des FED-AMR Projektes ist, die Bewertung der Rolle der natürlichen bakteriellen Transformation bei der Verbreitung von AMR über die Grenzen der Ökosysteme Mensch, Tier und Umwelt hinaus. Wesentlich sind die Forschungsergebnisse, da bisweilen empirische Daten zu dieser Materie fehlen. Die Ergebnisse werden benötigt, um wirkungsvolle Richtlinien und gesetzliche Rahmenbedingungen zu schaffen. Die gewonnenen Proben aus Entnahmestellen in Nord-, Süd- und Osteuropa werden mithilfe von harmonisierten Protokollen gewonnen und analysiert.

Daraus werden Daten erarbeitet, welche die Systemgrenzen überschreitende Übertragung und die Etablierung von ARG in Ökosystemen aufzeigen. Dies kann Aufschluss über die unterschiedlichen (Ausgangs-)Situationen in den verschiedenen Regionen Europas geben. In weiterer Folge werden Entscheidungsträger mit den fundierten, breit gefächerten Ergebnissen unterstützt um ARG-Überwachungs- und Interventionsstrategien auszuarbeiten. Ein weiteres Ziel dieses Projekts ist es, die Liste der bekannten Bakterien zu erweitern, welche in der Lage sind ARG-kodierende exDNA aufzunehmen.

Mit Hilfe der aus dem Projekt gewonnenen Ergebnisse soll das Potenzial der extrazellulären DNA als risikoreiche Quelle für Resistenzdeterminanten in landwirtschaftlichen Böden und entlang der Futtermittel- und Lebensmittelkette bewertet werden.

Durchführung

Das FED-AMR Projekt ist eine Langzeitstudie, die aus sechs Arbeitspaketen, sogenannten WPs (siehe Tabelle 1) besteht. Insgesamt sind 13 Laboratorien aus zwölf Partnerinstitutionen an diesem Projekt beteiligt, wodurch ein breites Spektrum an molekularem, mikrobiologischem, epidemiologischem, biostatistischem, analytisch-chemischem und probabilistischem Fachwissen abdeckt wird und direkt ins Projekt einfließt.

Die natürlichen Umweltbedingungen werden in hydrologischen Freilandlaboratorien (HOAL) in Österreich (Petzenkirchen) und Portugal sowie auf konventionellen

landwirtschaftlichen Flächen (Tschechische Republik, Estland) oder einzelnen Umweltkompartimenten (Irland, Vereinigtes Königreich) überwacht und untersucht. Dabei soll die Verbreitung von AMR durch exDNA, über Ökosystemgrenzen hinweg, beobachtet werden. Die Studie wird auf einem landwirtschaftlichen Freilandforschungsgebiet (HOAL) mit natürlich vorkommenden Umweltbedingungen durchgeführt. Die Untersuchungen umfassen unterschiedliche Dünge- und Landbewirtschaftungstechniken sowie verschieden, miteinander verbundenen Umweltkompartimenten (siehe Abbildung 1).

Im Zuge der Untersuchungen wird die in einer Anbauperiode vorkommende Konzentration der ARGs, die Diversität, die dynamische Variabilität, die Mobilität und die bakterielle Biodiversität bestimmt. Im Folgenden werden die Ergebnisse von HOALs und konventionellen landwirtschaftlichen Flächen miteinander verglichen.

Im Rahmen dieses Projektes werden auch epidemiologische Analysen durchgeführt, um die Verbindung zwischen menschlichen und nicht-menschlichen, sogenannte zoonotischen Reservoiren von ARGs zu erforschen. Dabei wird *C. difficile* (WP3) als paradigmatische Genaustauschplattform verwendet. Außerdem werden die Daten der Feldstudien, mit Daten aus Laborexperimenten ergänzt, um die Treiber von AMR in den getesteten Kompartimenten identifizieren zu können.

Tabelle 1: Arbeitspakete

| WP1 | Wissenschaftliches und administratives Management |
|------------|---|
| WP2 | Feldversuche: Bestimmung der natürlich vorkommenden ARG-Hintergrundbelastung und der mikrobiellen Biodiversität in den untersuchten Umweltkompartimenten |
| WP3 | Aufklärung der Rolle von <i>C.difficile</i> als ARG-Transferplattform über die Ökosystemgrenzen hinweg, sowie die Verbindung des <i>C.difficile</i> zwischen menschlichen und nicht-menschlichen (zoonotischen) Reservoiren. |
| WP4 | Bestimmung der Selektionsbelastung in den untersuchten Kompartimenten der Ökosysteme Mensch, Tier und Umwelt. |
| WP5 | Laborstudien: Identifizierung der Umweltbedingungen, welche die Transformationshäufigkeit in Bodenmikrokosmen und Schweine Chemostat-Darmmodellen regulieren. |
| WP6 | Entwicklung von probalistischen und mechanistischen Modellen, welche die Zusammenhänge zwischen den Einsatz von antimikrobiellen Mitteln bei Tieren, AMR in der Umwelt und den Risiken für die öffentliche Gesundheit erklären. |

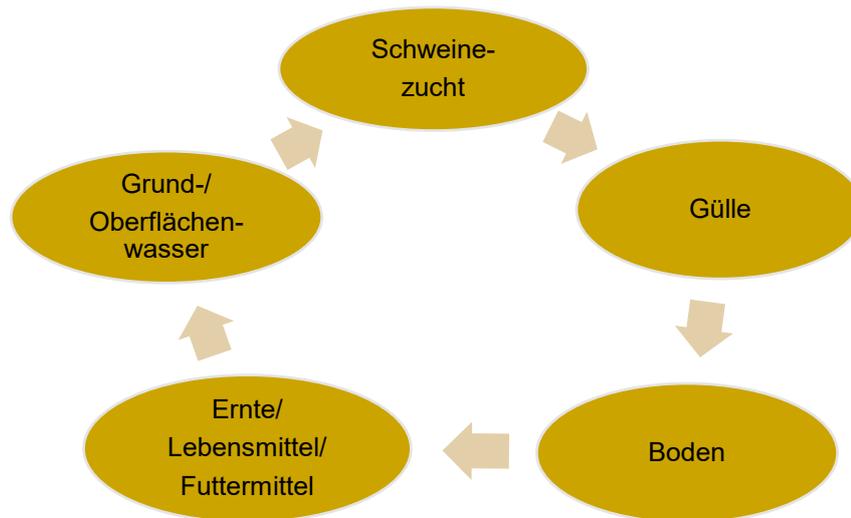


Abbildung 1: Kreislauf verbundener Umweltkompartimente

Tabelle 2: Projektverantwortliche/-mitwirkende

| No. | Scientific Contact Person | Name of the Organisation | Country | EU Region | Expertise/ Area |
|-----|--|---|---------|-----------|---------------------------------------|
| 1. | Prof. Dr. Mark Chambers (MAC) | 23-UoS: University of Surrey | UK | West | Animal Health |
| 2. | Dr. Monica Oleastro (MO) | 36-INSA: National Institute of Health | PT | South | Public Health |
| 3. | Prof. Dr. Tanel Tenson (TT) | 14-UT: University of Tartu | EE | North | Public Health, Environment |
| 4. | Dr. Werner Ruppitsch (WR) | 2-AGES - Austrian Agency for Health and Food Safety | AT | West | Environment, Feed |
| 5. | Dr. Anna Gajda (AG) | 34-PIWET: National Veterinary Research Institute | PL | East | Environment, Public and Animal Health |
| 6. | Dr. Magdalena Zimova (MZ) Dr. Zdislava Boštíková (ZB) | 7-SZU: National Institute of Public Health | CZ | East | Environment |
| 7. | Dr. Solveig Sølverød Mo(SSM) | 33-NVI: Norwegian Veterinary Institute | NO | North | Animal Health, Food |
| 8. | Dr. Eva Møller Nielsen (EM) | 13-SSI: Statens Serum Institut | DK | North | Public Health |

| | | | | | |
|-----|--------------------------------|---|----|-------|---------------------------------------|
| 9. | Dr. Sven Maurischat (SM) | 9-BfR: German Federal Institute for Risk Assessment | DE | West | Food, Feed |
| 10. | Dr. Christelle Mazuet (CM) | 20-IP: Institute Pasteur | FR | West | Public Health |
| 11. | Dr. Christian Seyboldt (CS) | 10-Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) | DE | West | Animal Health |
| 12. | Dr. Alexandre De Menezes (ADM) | 25-NUIG: National University of Ireland, Galway | IE | West | Environment |
| 13. | Dr. Manuela Caniça (MC) | 36-INSA: National Institute of Health (AMR Lab) | PT | South | Public and Animal Health, Environment |

Ergebnisse und Diskussion

Da das FED-AMR-Projekt noch nicht abgeschlossen ist, liegen zum jetzigen Zeitpunkt nur vorläufige Ergebnisse vor.

Im Falle Österreichs stammen die ersten Ergebnisse aus WP2 und WP3. Aus insgesamt 85 Proben, die im Zuge des WP2 aus verschiedenen Umweltkompartimenten entnommen wurden, konnten Stämme von *E. coli*, *Enterococcus* spp. und *K. pneumoniae* mit unterschiedlichen Resistenzgraden gegen antimikrobielle Mittel isoliert werden. Außerdem wurde bei ein und derselben Bakterienart manchmal derselbe Klon in verschiedenen Kompartimenten gefunden. Der E-Test ergab bei den Umweltisolaten eine geringe Häufigkeit von phänotypischen Resistenzen gegen in der klinischen Praxis verwendete antimikrobielle Mittel. Eine hohe Diversität zeigte cgMLST zwischen Isolaten derselben Spezies und zwischen Kompartimenten, aber auch die Verbreitung identischer Stämme zwischen den beiden Abwassertypen. Das Vorhandensein identischer Stämme in verschiedenen Kompartimenten kann nicht ausgeschlossen werden. Sie wird durch die Kultivierbarkeit und die Anzahl der pro Kompartiment und Spezies analysierten Isolate begrenzt. Eine kontinuierliche Überwachung von ARGs und ARB in der Umwelt ist erforderlich, um eine weitere Ausbreitung von Resistenzen und potenziell pathogenen Bakterien zu verhindern.

Das in WP3 festgestellte RT078-Isolat ist, wie auch in anderen Ländern beobachtet, zoonotisch, die Umweltklone jedoch scheinen hierbei etwas weniger resistent zu sein als jene, menschlichen Ursprungs.

Von den 85 in WP2 entnommenen Proben wurden sieben toxische *C. difficile* (WP3) RT078/ST11-Isolate festgestellt, von denen drei auf Gülle (n=3), drei auf Abwasser (n=3) und eines auf Wildtiere (n=1) zurückzuführen sind. Fünf Isolate waren phänotypisch resistent gegen Moxifloxacin und eines gegen Clindamycin. Alle zeigten eine Empfindlichkeit gegenüber Vancomycin, Metronidazol und Rifampicin und trugen die Resistenzgene *cdeA* (n=7), *tet40* (n=3) und *efpA* (n=1). Im Gegensatz zu den österreichischen FED-AMR-Isolaten waren die zu Vergleichszwecken verwendeten Humanisolate toxisch (n=20) und resistent gegen Tomoxifloxacin (n=9), Clindamycin (n=7) und Rifampicin (n=1). Eine Resistenz gegen Metronidazol und Vancomycin wurde nicht festgestellt, aber sie weisen eine höhere ARG-Diversität auf als Umweltisolate. Das Ergebnis der MLST-basierten Kerngenom-Typisierung ergab ein Cluster von antimikrobiell resistenten *C. difficile* RT78/ST11-Isolaten aus tierischen, menschlichen und ökologischen Quellen. Diese Gruppe weist zoonotische Merkmale auf, da es keine epidemiologischen Verbindungen gibt. Die Ergebnisse legen nahe, dass die phänotypisch und genetisch vielfältigen RT078/ST11-resistenten Stämme von *C. difficile* kontinuierlich überwacht werden müssen (CABAL ROSEL et al., 2021).

Ausblick

Die AMR Thematik stellt ein wichtiges Zukunftsthema dar, da alle wesentlichen Bereiche des Ökosystems involviert sind. Deshalb wird es essentiell sein, AMR weiter zu untersuchen. Dies ist nötig um präventiv agieren zu können und die Einschränkung der rapiden Vermehrung von multiresistenten Pathogenen zu erreichen.

Für die Europäische Union ist AMR ebenfalls von Bedeutung, da diese auf nationaler, aber auch internationaler und supranationaler Ebene spezifische Gesetze und Richtlinien erlassen und bestehende erweitern kann. Ein Beispiel hierfür ist die von der Europäischen Kommission erarbeitete „EU-Leitlinie für die umsichtige Verwendung antimikrobieller Mittel in der Humanmedizin“.

Literaturverzeichnis

- CABAL ROSEL, A., Reichl, J., Rab, G., Heger, F., Stoeger, A., Loncaric, I., Rathhammer, K., Indra, A., Wögerbauer, M., Allerberger, F., Ruppitsch, W. (2021): Dissemination of AMR RT078/ST11 in Austria across the human-animal-wildlife interface; <https://zenodo.org/record/4915872#.YPfpYqhxeUk>, letzter Zugriff: 21.07.2021.
- CORINAKDESI, C., TANGHERLINI, M., MANEA, E., DELL'ANNO, A. (2018): Extracellular DNA as a genetic recorder of microbial diversity in benthic deep-sea ecosystems. *Scientific Reports* 8:1839.
- DOMINGUES, S., HARMS, K., FRICKE, W.F., JOHNSEN, P.J., DA SILVA, G.J., NIELSEN, K.M. (2012): Natural Transformation Facilitates Transfer of Transposons, Integrons and Gene Cassettes between Bacterial Species. *PLoS Path* 8:e1002837.
- EUROPÄISCHEN KOMMISSION (n.a.): EU-Maßnahmen zur Bekämpfung antimikrobieller Resistenzen; https://ec.europa.eu/health/antimicrobial-resistance/eu-action-on-antimicrobial-resistance_de, letzter Zugriff: 21.07.2021.
- LARSSON, D.G.J., ANDREMONT, A., BENGTSSON-PALME, J., BRANDT, K.K., DE RODA HUSMAN, A.M., FAGERSTEDT, P., FICK, J., FLACH C.-F., GAZE, W.H., KURODA, M., KYINT, K., LAXMINARAYAN, R., MANAIA, C.M., NIELSEN, K.M., PLANT, L., PLOY, M.-C., SEGOVIA, C., SIMONET, P., SMALLA, K., SNAPE, J., TOPP, E., VAN HENGEL, A.J., VERNER-JEFFREYS, D.W., VIRTA, M.P.J., WELLINGTON, E.M., WERNERSSON, A.-S. (2018): Critical knowledge gaps and research needs related to the environmental dimensions of antibiotic resistance. *Environ Int* 117:132-138.
- LIANG, Z., KEELEY, A. (2013): Filtration Recovery of Extracellular DNA from Environmental Water Samples. *Environ Sci Technol* 47:9324-9331.
- NAGLER, M., INSAM, H., PIETRAMELLARA, G., ASCHER-JENULL, J. (2018): Extracellular DNA in natural environments: features, relevance and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*.
- NIELSEN, K.M., JOHNSEN, P.J., BENSASSON, D., DAFFONCHIO, D. (2007): Release and persistence of extracellular DNA in the environment. *Environ Biosafety Res* 6:37-53.
- NIELSEN, K.M., TOWNSEND, J.P. (2004): Monitoring and modeling horizontal gene transfer. *Nat Biotechnol* 22:1110-1114.
- NIELSEN, K.M., VAN ELSAS, J.D. (2019): Horizontal Gene Transfer and Microevolution in Soil, p. 1-33. *In* Van Elsas JD, Jansson JK, Trevors JT (ed.), *Modern Soil Microbiology*. CRC Press, Boca Raton. Submitted.
- THOMAS, C.M., NIELSEN, K.M. (2005): Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 3:711-721.
- ZINGER, L., CHAVE, J., COISSAC, E., IRIBAR, A., LOUISANNA, E., MANZI, S., SCHILLING, V., SCHIMANN, H., SOMMERIA-KLEIN, G., TABERLET, P. (2016):

Extracellular DNA extraction is a fast, cheap and reliable alternative for multi-taxa surveys based on soil DNA. Soil Biol Biochem 96:16-19.

Kontakt:

MMag. Dr. Karin Rainer

karin.rainer@ages.at

Spargelfeldstraße 191 | 1220 Wien

Tel.: +43 50 555-25404 | mobil: +43 664 88 47 5557



GESUNDHEIT FÜR MENSCH, TIER & PFLANZE

www.ages.at