



RESET - ESBL and (fluoro)quinolone RESistance in *EnTerobacteriaceae*

Wesentliche Ergebnisse und Erkenntnisse aus einem kooperativen Forschungsverbund im Spannungsfeld von Human- und Tiermedizin, Epidemiologie und Mikrobiologie

gefördert im Zeitraum 1. 11. 2010 bis 30.4.2017

gefördert durch



Mitglied der

TMF – Technologie- und Methodenplattform
für die vernetzte medizinische Forschung e.V.



Hintergrund Antibiotikaresistenz

Das Spektrum der Erreger, die zwischen Mensch und Tier übertragbar sind, den sogenannten zoonotischen Erregern, umfasst sehr unterschiedliche Organismen einschließlich Viren, Bakterien und Parasiten. Innerhalb dieses Spektrums haben in den letzten 20 Jahren Bakterien, die gegen antimikrobielle Substanzen (Antibiotika) resistent sind, eine besondere Relevanz erlangt. Bereits Alexander Fleming warnte vor der Selektion Penicillin-resistenter Bakterien durch den Einsatz von Antibiotika. Das Bulletin der Weltgesundheitsorganisation WHO berichtete schon 1963 vom Risiko der Resistenzentstehung.

Seit einigen Jahren ist das Thema antimikrobieller Resistenzen zunehmend Gegenstand der öffentlichen und politischen Diskussion. Hierbei wird u. A. der Einsatz von Antibiotika bei Nutztieren mit der Resistenzausbreitung beim Menschen in einen engen Zusammenhang gebracht. Im Januar 2015 wurde der erste gemeinsame Bericht des "European Centre for Disease Prevention and Control" ECDC, der "European Food Safety Authority" EFSA und der "European Medicines Agency" EMA zum Verbrauch von antimikrobiellen Substanzen und dem Auftreten von Antibiotikaresistenzen in Bakterien von Tieren und Menschen veröffentlicht. Die darin durchgeführten Analysen bestätigten den generellen Zusammenhang zwischen dem Antibiotikaeinsatz und dem Auftreten antimikrobieller Resistenzen. Zudem wird in dem Bericht darauf hingewiesen, dass die Datenlage für eine fundierte Abschätzung des Risikos für den Einfluss von Resistenzen in der Tierproduktion auf die menschliche Gesundheit weiterhin unzureichend ist.

Die Förderung von Forschung zur Verbreitung von Resistenzen und möglichen Transmissionswegen ist auch wesentlicher Bestandteil der "Deutschen Antibiotika-Resistenzstrategie" DART und des "Global Action Plan on Antimicrobial Resistance" der WHO.

Zoonoseforschungsverbund RESET

Enterobakterien sind Bestandteil der normalen Darmflora von Menschen und Tieren. Einige Enterobakterien sind jedoch in der Lage Infektionen hervorzurufen. Die Behandlung von bakteriellen Infektionen kann besonders problematisch sein, wenn die Bakterien unempfindlich gegen bestimmte Antibiotika sind, die zur Therapie eingesetzt werden sollen. Infektionsquellen für den Menschen können andere Menschen (einschließlich der Krankenhausumgebung), die Umwelt, Tiere sowie Nahrungsmittel pflanzlicher und tierischer Herkunft sein. Resistenzen können aber auch de novo während der Therapie, also unter Antibiotikadruck entstehen.

Die Selektion von Resistenzen gegen Antibiotika bei/in Bakterien hängt mit dem Einsatz antimikrobieller Substanzen in Human- und Tiermedizin zusammen. Insbesondere Resistenzen gegen β -Laktam-Antibiotika (z.B. Cefotaxim) und gegen Fluorchinolone (z.B. Ciprofloxacin) können die therapeutischen Möglichkeiten in der Veterinär- und Humanmedizin erheblich einschränken. Der häufigste Resistenzmechanismus gegen β -Laktam-Antibiotika ist die Produktion bakterieller Enzyme, welche diese Antibiotika inaktivieren. Diese Enzyme nennt man β -Laktamasen. Mittlerweile sind sehr viele verschiedene β -Laktamasen bekannt, unter anderem solche, die auch neuere β -Laktame - auch Cephalosporine der 3. und 4. Generation - inaktivieren können, sogenannte β -Laktamasen mit erweitertem Wirkungsspektrum, die im englischen Sprachgebrauch als "extended-spectrum β -lactamases" (ESBLs) bezeichnet werden.

ESBL-produzierende Enterobakterien sind inzwischen weit verbreitet. Sie treten bei verschiedenen Tierarten, in der Umwelt und in Lebensmitteln, genauso wie beim Menschen auf, und können innerhalb und zwischen diesen übertragen werden. Die Bedeutung der verschiedenen Reservoirs sowie der möglichen Übertragungsmechanismen resistenter Enterobakterien und ihrer Resistenzgene verschiedenen Ursprungs für die menschliche Gesundheit ist aber bisher wenig verstanden. Obwohl sich in der Vergangenheit Studien mit Resistenzen und ihrer Ausbreitung beschäftigt haben, stellen die facettenreichen Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Wirten und Pathogenen immer noch Herausforderungen für Forscher und Gesundheitsbehörden dar.

Im Rahmen des Forschungsverbundes RESET wurden daher im Zeitraum von 2010 bis 2017 neue Erkenntnisse zur Epidemiologie, Molekulargenetik und Pharmakologie resistenter Bakterien erarbeitet, die in eine Risikobewertung einfließen. Durch das konsequente Zusammenführen von Ergebnissen der unterschiedlichen Forschungsgebiete in einer gemeinsamen Datenbank konnten Annahmen überprüft und Erkenntnislücken geschlossen werden.

Wichtige Ergebnisse RESET

Im Rahmen der Arbeit des Forschungsverbundes wurden die folgenden Strukturen geschaffen:

- Eine gemeinsame Datenbank ermöglicht die umfassende Erfassung und gemeinsame Analyse zu Herkunft und Eigenschaften der Bakterienstämme in den erfassten Daten aller unterschiedlicher Projekte.
- Methoden zum Nachweis und zur Charakterisierung von Resistenzen vermittelt durch ESBL-Enzyme, Plasmid-vermittelte Fluorchinolonresistenz-Determinanten und Carbapenemasen wurden harmonisiert und validiert und sind wesentlich in das Standardverfahren der EFSA aufgenommen worden.
- Eine "Next Generation Sequencing" (NGS) -Pipeline zur Plasmid- und Gesamtgenom-Sequenzierung wurde entwickelt. Dies ermöglicht nicht nur eine umfassende Analyse der Lokalisation von Resistenzgenen und pathogenitätsassoziierten genetischen Strukturen (Virulenzgenen) in Plasmiden und im Bakteriengenom sondern vor allem detaillierte genetische Verwandtschaftsanalysen von Isolaten verschiedenster Herkunft.

Auf Basis dieser Strukturen wurden die nachfolgend aufgeführten Erkenntnisse gewonnen:

- In einem sehr hohen Anteil der untersuchten Betriebe mit Haltung von landwirtschaftlichen Nutztieren (100% bei Broilerhaltung; 85% bei Schweinehaltung; 85% bei Milchvieh- und 70% bei Rindermasthaltung) wurden Proben mit ESBL- bzw. AmpC produzierenden *E. coli* gefunden.
- Erstmals wurden Carbapenemase-bildende *E. coli* und *Salmonella* bei landwirtschaftlichen Nutztieren in Deutschland gefunden.
- Auf Grundlage der gemeinsamen Stamm- und Datensammlung gelang Anfang 2016 der erstmalige Nachweis des übertragbaren Colistinresistenzgens (*mcr-1*) in bereits multiresistenten *E. coli* vom Nutztier in Deutschland.
- Erstmals wurden mittels Gesamtgenom-Sequenzierung ein deutschlandweit verbreiteter ESBL-*E. coli*-Klon (ST410) gefunden, der in Tier, Mensch, Umwelt und Lebensmittel zirkuliert. Dies ist der erste Nachweis dafür, dass ein wechselseitiger Austausch von ESBL-Klonen zwischen Tier, Mensch und Umwelt stattfindet und ein gemeinsames Reservoir vorliegt.
- Unter der Behandlung von Tiergruppen mit Antibiotika kann unabhängig von der Applikationsmethode eine Verschleppung in die direkte Umgebung der Tiere stattfinden.
- Gemüsepflanzen (Weißkohl, Porree) nehmen aus Böden, die mit Antibiotika belasteter Schweinegülle gedüngt sind, in geringen Konzentrationen antimikrobiell wirksame Stoffe auf (Enrofloxacin, Tetracycline u.a.) und lagern sie in verzehrbare Pflanzenteile ein.
- ESBL-*E. coli*, die zur Gülle dotiert worden sind, lassen sich noch fünfmonatiger Anbauperiode in Boden und Gemüse nachweisen.
- Auch die Exposition mit subtherapeutischen antimikrobiellen Konzentrationen, z.B. über Pflanzen, die Enrofloxacin aufgenommen haben, übt einen Selektionsdruck aus und führt in Fütterungsexperimenten mit Tieren zu vermehrt auftretenden, in ihrer Sensibilität Empfindlichkeit reduzierten bis resistenten Bakterien.
- ESBL-*E. coli* können auch in gänzlich unbehandelten Tiergruppen (insbesondere Mastgeflügel) mit hohen Einzeltier-Prävalenzen gefunden werden. Bei Einstellung der Tiere trotz intensiver Reinigung und Desinfektion noch vorhandene ESBL-*E. coli* sind hierfür die wahrscheinliche Ursache.
- ESBL-*E. coli* können entlang der gesamten Masthähnchen-Produktionskette beginnend von den Elterntieren bis hin in Schlachtung und Verarbeitung vertikal und pseudo-vertikal weitergegeben werden, wobei es auf den einzelnen Produktionsstufen häufig auch zu horizontalen Einträgen (Kreuzkontamination) kommt.
- Die ESBL-*E. coli* Kolonisationsrate lag bei gesunden Probanden bei 6,3% (2009 – 2012) und bei Landwirten mit Schweinehaltung bei 6,0% (2014/2015), d.h. in einer gleichen Größenordnung.
- Nosokomiale Infektionen mit ESBL-positiven Enterobakterien nehmen in Deutschland kontinuierlich zu. Zwischen 2007 und 2012 sind sie (als Anteil aller nosokomialen Infektionen mit Enterobakterien) von 11,9% auf 15,4% gestiegen.
- Es gibt regional ein heterogenes Aufkommen nosokomiale Infektionen mit ESBL-positiven Enterobakterien. So war im Zeitraum 2011/12 in den Bundesländern Nordrhein Westfalen und Thüringen ein (im Vergleich zu den anderen Bundesländern) sehr starker Anstieg zu verzeichnen.
- Die Kolonisationsrate mit ESBL-positiven Enterobakterien bei Krankenhauspatienten liegt aktuell im Rahmen eines Aufnahmescreening bei Krankenhausaufnahme (2014-2015) bei 13%
- Faktoren, die mit einer nosokomialen Infektion mit diesen Erregern nach rektaler Kolonisation assoziiert sind, sind Darmoperationen, Harnwegkatheterisierung, Zentraler Venenkatheter und Immunsuppression durch Steroidtherapie.
- Faktoren, die mit einer Besiedlung mit ESBL-positiven *E. coli* bei Krankenhausaufnahme assoziiert sind, sind sozio-kulturelle Verbindungen zum asiatischen Kontinent und ein hoher Schweinefleischverzehr.
- ESBL Infektionen im Krankenhaus sind assoziiert mit einer verlängerten Liegedauer und erhöhten Krankenhaukosten sowie mit einer erhöhten Krankenhaussterblichkeit.

- Ergebnisse der molekularen Charakterisierung der Plasmide, die ESBL- und/oder PMQR-Gene tragen und der Untersuchungen zur genetischen Verwandtschaft der ESBL- und/oder PMQR-tragenden Isolate geben Hinweise auf eine horizontale Verbreitung der entsprechenden Plasmide, aber auch auf eine klonale Verbreitung der resistenten Isolate.
- ESBL-Gen-tragende Plasmide können auch andere Gene, die Resistenzen gegenüber weiteren Wirkstoffklassen (z. B. Aminoglykoside, Folsäurestoffwechsellinhibitoren, Phenicol oder Tetracykline) oder verminderte Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolone vermitteln. Diese Resistenzeigenschaften deuten darauf hin, dass Co-Selektion und Persistenz von ESBL-Genen in Gegenwart anderer Wirkstoffe als β -Laktam-Antibiotika wahrscheinlich ist.
- Cephalosporin-resistente *E. coli*, die CMY-Enzyme bilden, kommen bei Geflügel häufig, beim Menschen dagegen selten vor. Gesamtgenom-Untersuchungen zeigten keine große genetische Ähnlichkeit der Stämme in beiden Populationen; allerdings wiesen die hohen Ähnlichkeiten der das Resistenzgen-tragenden konjugativen Plasmide auf einen Austausch dieser Plasmide zwischen *E. coli* in den beiden Populationen hin.
- ESBL-bildende *E. coli*-Stämme der klonalen Linie ST131 sind beim Menschen als Kolonisationskeime und Infektionserreger besonders häufig, bei Nutztieren dagegen sind diese kaum zu finden. Die Selektion dieser Stämme erfolgt im humanmedizinischen Bereich.
- Der Erwerb eines β -Laktamase-Gen-tragenden Plasmids führte in *E. coli in vitro* Experimenten zu einer unterschiedlich ausgeprägten Fitnesslast; Stämme mit einer initial nachweisbaren Fitnesslast zeigten eine Kompensation des anfänglichen Wachstumsnachteils über die Zeit.

Die Forschungsergebnisse im RESET-Verbund verdeutlichen die sehr weite Verbreitung von ESBL-kodierenden Resistenzgenen und deren Heterogenität. Gleiche Gene können auf unterschiedlichen Plasmiden und Bakterien lokalisiert sein. Insgesamt zeigte sich, dass verschiedene ESBL-Klone das Vermögen haben, zwischen Menschen, Tieren und deren Umwelt ausgetauscht zu werden, dass aber der Anteil der Transmissionen identischer ESBL-bildender Bakterienklone derzeit noch sehr gering ist. Eine wesentlich größere Rolle scheint der genetische Austausch von Resistenzdeterminanten über Plasmide und andere mobile genetische Elemente zwischen nicht-verwandten *E. coli* Isolat (horizontaler Gentransfer) zu spielen. Im Rahmen des Forschungsverbundes wurde bei der Analyse dieser Zusammenhänge der Fokus auf *E. coli* und *Salmonella* spp. gelegt. Bei der Bewertung muss allerdings beachtet werden, dass viele weitere Enterobacteriaceae-Spezies den gemeinsamen β -Laktamase Genpool speisen und am Austausch von Resistenzdeterminanten beteiligt sein können. Die Verwendung hochauflösender Analysemethoden wie Gesamtgenomvergleiche ermöglicht ein wesentlich besseres Verständnis der genauen Mechanismen und Treiber des Austauschs der die Resistenzeigenschaften kodierenden Gene zwischen Isolaten verschiedener Habitats, hinterlässt aber trotzdem eine Reihe weiterhin offener Fragen.

Daher ist zu fordern, dass forschende Institutionen und das öffentliche Gesundheitswesen bzw. der öffentliche Veterinärdienst gemeinsam Anstrengungen unternehmen, weiterhin Daten zum Auftreten von Resistenzen und deren Mechanismen zu erarbeiten und wissenschaftlich auszuwerten. Hierbei ist vor dem Hintergrund des One-Health-Ansatzes Sorge zu tragen, dass moderne molekulare Methoden bei gleichzeitiger Erfassung epidemiologischer Information simultan und harmonisiert bei Mensch, Tier und Umwelt zum Einsatz kommen und nachhaltige Monitoringsysteme etabliert bzw. ausgebaut werden, die administrativ wie wissenschaftlich nutzbar sind. Die von Seiten des RESET-Verbundes erarbeiteten Methoden bzw. die Datenbank können hierfür als Grundlage genutzt werden. Zudem sind die gemeinsam mit der Zoonoseplattform und der TMF entwickelten infrastrukturellen Prozesse und Netzwerke weiter auszubauen und zu verstetigen, da sie als wesentliche Triebfeder der Kooperation im One-Health-Kontext angesehen werden müssen.

Forschungspartner RESET

An dem Verbund haben die folgenden Institutionen mitgewirkt:

- FG 46: Antibiotikaresistenz und Resistenzdeterminanten und FG 43: Epidemiologie und Zoonosen, Nationales Referenzlabor für Antibiotikaresistenz, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin
- Institut für Tier- und Umwelthygiene, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin
- Institut für Nutztiergenetik, Friedrich-Loeffler-Institut, Neustadt-Mariensee
- FG13: Nosokomiale Infektionserreger und Antibiotikaresistenzen, Robert Koch-Institut, Wernigerode
- Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung, WHO-Collaborating Centre for Research and Training for Health in the Human-Animal-Environment Interface, und Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, Tierärztliche Hochschule Hannover
- Department Chemie - Anorganische und Analytische Chemie, Fakultät für Naturwissenschaften, Universität Paderborn
- Institut für Medizinische Mikrobiologie, Fachbereich Medizin, Justus-Liebig-Universität Gießen und Deutsches Zentrum für Infektionsforschung, Standort Gießen-Marburg-Langen, Campus Gießen
- Institut für Hygiene und Umweltmedizin, Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen, Charité - Universitätsmedizin Berlin

Weitere assoziierte Partner und Institutionen waren:

- Fachbereich Agrarwirtschaft, Fachhochschule Südwestfalen, Abtl. Soest
- Max Rubner-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel, Detmold
- Referat 505: Antibiotikaresistenzmonitoring, Abteilung 5: Referenzlaboratorien, Methodenstandardisierung, Antibiotikaresistenz, Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit Berlin
- Fachbereich Veterinärmedizin Institut für Lebensmittelhygiene, Freie Universität Berlin
- Abteilung 5, Lebensmittel- und Veterinärinstitut, Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Oldenburg
- Forschungscoordination und Risikoanalyse, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Erlangen
- Fachgebiet Lebensmittelhygiene/ Lebensmittelmikrobiologie, Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen, Dresden
- Fachgebiet Lebensmittelhygiene, Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, Gießen
- Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere und Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie, Fachbereich Tiermedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Institut f. Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Veröffentlichungen RESET

Die Ergebnisse aus dem Forschungsverbund wurden in wissenschaftlichen Publikationen detailliert dargestellt. Eine vollständige Liste dieser Publikationen sowie weitere Informationen findet man unter <http://reset-verbund.de>.

Projektkoordination RESET

Prof. Dr. Lothar Kreienbrock
Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung
WHO-Collaborating Centre for Research and Training
for Health in the Human-Animal-Environment Interface
Tierärztliche Hochschule Hannover
Bünteweg 2
30559 Hannover
Tel. +49 (0) 511 / 953-7950
FAX +49 (0) 511 / 953-7974
e-mail lothar.kreienbrock@tiho-hannover.de
<http://www.tiho-hannover.de/bioepi>