

Mezinárodní projekt mapující možnosti horizontálního přenosu genů rezistence k antibiotikům napříč různými ekosystémy

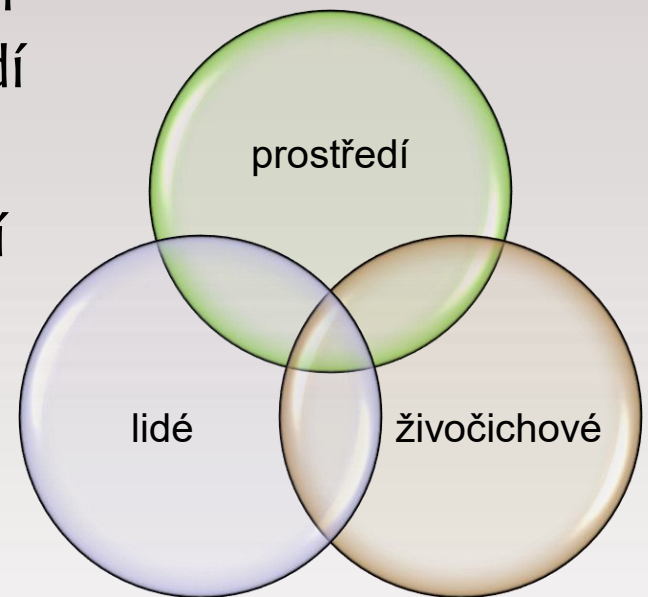
Marta Kořínková, Martina Štěpánková, Zdislava Drahošová, Nelly
Matoušková, Ladislava Matějů, Karolína Hochmalová, Magdalena Zimová
email: marta.korinkova@szu.cz

Státní zdravotní ústav
Šrobárova 49/48
100 00 Praha 10



Přístup „One Health“

- Mezioborová spolupráce
- Zaměřeno na dosažení rovnováhy mezi zdravím lidí, zvířat a životního prostředí
- Poukazuje na souvislosti mezi zdravím lidí, zvířat a stavem životního prostředí
- Dle odhadů WHO pochází 60% lidských patogenů ze zvířat
- www.who.int; www.onehealthjp.eu



One Health EJP FED-AMR

https://onehealthjep.eu/jpr-fed-amr/

Register Log In

ne HEALTHEJJP

About Consortium Projects Training Outcomes ASM News Contacts

Home / FED-AMR

FED-AMR: The role of free extracellular DNA in dissemination of antimicrobial resistance over ecosystem boundaries along the food/feed chain

Start:	1 January 2020
Duration:	2.5 Years
Domain:	Antimicrobial Resistance
Key Words:	Bacterial transformation, free extracellular DNA, antimicrobial resistance, horizontal gene transfer, ecosystem boundaries.
Contact:	Werner Ruppitsch (AGES)



The Project #FEDAMR

Over the course of this project, the relevance of horizontal antimicrobial resistance gene (ARG) transfer on free extracellular DNA (exDNA) over ecosystem boundaries relative to bacterial conjugation will be evaluated. ExDNA is widely present in natural environments and sufficiently stable to constitute an important reservoir for ARGs. The dissemination of AMR on exDNA over ecosystem boundaries will be monitored under controlled but naturally occurring environmental conditions in an open-air agricultural research area: The Hydrology Open Air Laboratory (HOAL) in Petzenkirchen, Austria. ARG concentrations, diversity, dynamic variability, mobility and bacterial biodiversity will be determined in an annual longitudinal study covering a crop growing period, different fertilisation and land management techniques and various different – but interlinked – environmental compartments along the route: pig farm → manure → soil → crop/food/feed → ground/surface water → pig farm (and other associated human compartments). The results obtained from HOAL will be compared with data retrieved from equivalent compartments in Northern, Eastern and Southern Europe. Movement of ARGs over ecosystem barriers will be inferred by sequence comparisons and construction of phylogenetic trees of ARGs and ARBs. The linkage between human and non-human reservoirs of AMR will be investigated exemplarily with *C. difficile* as ARG transfer platform over ecosystem boundaries and conjugation as means for HGT.

The prevailing selection pressure in each tested habitat during the longitudinal study will be determined by quantifying antimicrobials, herbicides and trace elements in the tested compartments. Environmental conditions which may induce or inhibit the expression of competence genes that are necessary to enable the uptake of free extracellular DNA by bacteria will be identified in soil microcosms and in a pig gut model. The impact of transformation relative to conjugation will be evaluated using *Acinetobacter* sp. (transformation) and *C. difficile* (conjugation) as model organisms in these experiments.

Experimental data obtained during the project will be used to feed and tune probabilistic modelling of the emergence of AMR in target bacteria and to delineate the relative contribution of transformation and conjugation to ARG acquisition in soil environments. Mechanistic models will address key questions regarding the spatio-temporal changes observed in microbial communities and shall support the identification of critical control points for intervention to reduce the spread of AMR from environmental sources



Project Events

FED-AMR Kick-off meeting- 27th January 2020

One Health EJP Project Kick-off meeting- 13th November 2019, Berlin, Germany



Konsorcium

 <p>ANSES The French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety France</p>	 <p>AGES Austrian Agency for Health and Food Safety (AGES) Austria</p>	 <p>BFSa Bulgarian Food Safety Agency (BFSa) Bulgaria</p>	 <p>VRI Veterinary Research Institute (VRI) Czech Republic</p>	 <p>sciensano Sciensano Belgium</p>	 <p>BfR Bundesinstitut für Risikobewertung The German Federal Institute for Risk Assessment (BfR) Germany</p>	 <p>FLI Friedrich-Loeffler-Institut für Tiergesundheit Friedrich Loeffler Institute (FLI) Germany</p>	 <p>ROBERT KOCH INSTITUT Robert Koch Institute (RKI) Germany</p>	 <p>DTU Technical University of Denmark Technical University of Denmark – DTU Denmark</p>	 <p>STATENS SERUM INSTITUT Statens Serum Institute (SSI) Denmark</p>
 <p>University of Tartu Estonia</p>	 <p>VFL Estonian Veterinary and Food Laboratory (VFL) Estonia</p>	 <p>INIA Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria The National Institute for Agricultural and Food Research and Technology (INIA) Spain</p>	 <p>VISAVET UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID Center for Veterinary Health Surveillance (VISAVET) U.C.M. Spain</p>	 <p>NATIONAL INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH (SZU) Czech Republic</p>	 <p>MED-VET-NET ASSOCIATION Med-Vet-Net Association (MVNA) Europe</p>	 <p>INRAE science for people, life & earth National Research Institute for Agriculture, Food and Environment (INRAE) France</p>	 <p>Institut Pasteur Institute Pasteur France</p>	 <p>NUI Galway National University of Ireland, Galway (NUIG) Ireland</p>	
 <p>Animal & Plant Health Agency Animal Plant Health Protection Agency (APHA) United Kingdom</p>	 <p>Public Health England Public Health England United Kingdom</p>	 <p>UNIVERSITY OF SURREY University of Surrey United Kingdom</p>	 <p>ANTSZ National Institute of Public Education (OKI) Hungary</p>	 <p>NATIONAL INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH (SZU) Czech Republic</p>	 <p>TEAGASC Agriculture and Food Development Authority (TEAGASC) Ireland</p>	 <p>ISTITUTO NAZIONALE DI SANITÀ Istituto Nazionale di Sanità Italy</p>	 <p>IZSAM Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSAM) Italy</p>	 <p>ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER) Italy</p>	
 <p>National Institute for Public Health and the Environment (RIVM) Netherlands</p>	 <p>WAGENINGEN Wageningen Bioveterinary Research Institute (WbvRI) Netherlands</p>	 <p>NIPH Norwegian Institute of Public Health Norwegian Institute for Public Health (NIPH) Norway</p>	 <p>Veterinærinstituttet National Veterinary Institute (NVI) Norway</p>	 <p>PIWet National Veterinary Research Institute (PIWet) Poland</p>	 <p>INIAV Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. National Institute for Agricultural and Veterinary Research (INIAV) Portugal</p>	 <p>Instituto Nacional de Saúde National Health Institute Dr. Ricardo Jorge (INSA) Portugal</p>	 <p>INSTITUTUL DE IGIENA SI SANATATE PUBLICA VETERINARA (IISPV) Institutul de Igiena si Sanatate Publica Veterinara (IISPV) Romania</p>	 <p>Livmedelsverket National Food Agency (SLV) Sweden</p>	 <p>Folkhälsomyndigheten The Public Health Agency of Sweden (FoHM) Sweden</p>
 <p>SVA National Veterinary Institute (SVA) Sweden</p>	 <p>NMVRVI National Food and Veterinary Risk Assessment Institute (NMVRVI) Lithuania</p>	 <p>Instituto de Salud Carlos III (SCIII) Institute of Health Carlos III (SCIII) Spain</p>	 <p>BIOR Institute of Food Safety, Animal Health and Environment (BIOR) Latvia</p>	 <p>FINNISH FOOD AUTHORITY Finnish Food Authority (RUOKA) Finland</p>	 <p>FINNISH INSTITUTE FOR HEALTH AND WELFARE (THL) Finnish Institute for Health and Welfare (THL) Finland</p>	 <p>nébih National Food Chain Safety Office (NEBIH) Hungary</p>			



„Vzorkaři“

Severní Evropa

Norsko

Dánsko

Estonsko

Západní Evropa

Velká Británie

Irsko

Německo

Francie

Rakousko

Východní Evropa

Česko

Polsko

Jižní Evropa

Portugalsko

Kompartmenty – Rakousko, Portugalsko, Česko



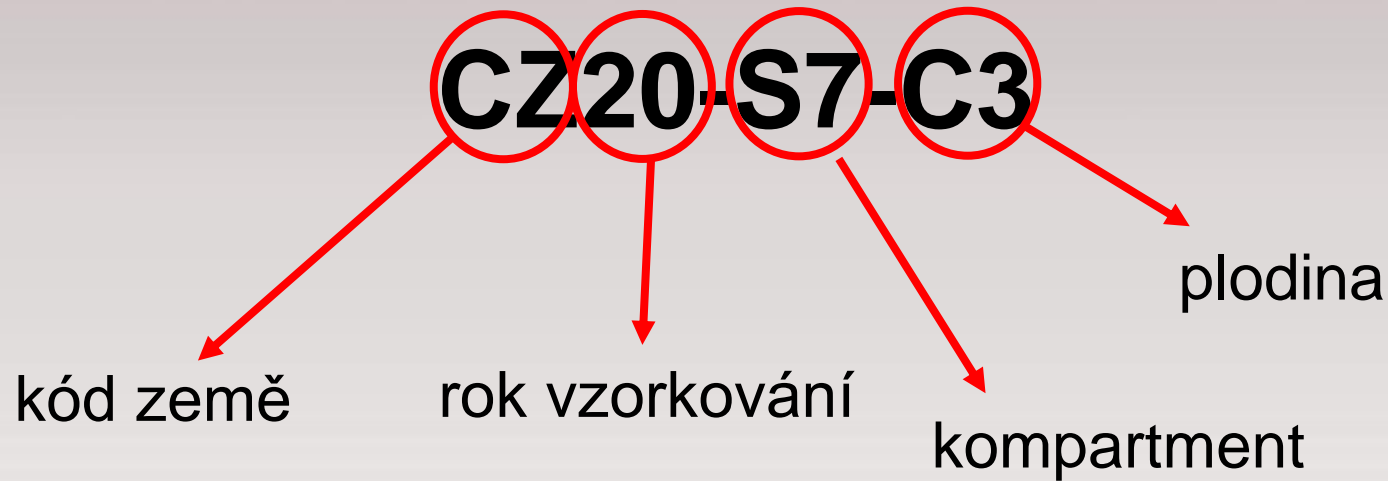
Vzorkování v ČR

- Karlovarský kraj
- vzorkovací období: **duben 2020 až prosinec 2020**
- kompartmenty:
 - půda z polí a kontrolní zeminy, plodiny (pšenice, řepka), povrchová voda (říčka), podzemní voda (pitná voda v areálu vepřína), kejda (z vepřína), prasečí exkrementy, krmivo (krmná směs z vepřína)
- plodiny: C1 a C2 pšenice hnojená kejdou, C3 pšenice hnojená umělým hnojivem, C4 řepka hnojená umělým hnojivem

Vzorkování

- jedno celé vegetační období plodin
 - před setbou a hnojením -1 den - pole + kontrolní zemina (louka, les)
 - setba +1 den
 - 1 týden
 - 6 týdnů – pole + kontrolní zemina (louka, les)
 - 18 týdnů (sklizeň 12. týden a 16. týden) – pole + kontrolní zemina (louka, les)
 - před sklizní (11. týden a 14. týden) – zemina z pole, rostliny (kořeny, stonky, listy, „plody“)
 - po sklizni – pole + kontrolní zemina (louka, les)
- roční období obvyklá pro danou zemi
 - kejda, exkrementy prasat, voda podzemní, voda povrchová (jaro, léto, podzim, zima)

Vzorkování - kódy vzorků



= vzorek zeminy odebraný po sklizni z pole s pšenicí hnojenou umělým hnojivem v roce 2020 v ČR

Analyty

- DNA

- **volná nebuněčná (eDNA, extracelulární DNA)**; izolace do 18h
- **celková (tDNA, total DNA)** - kultivovatelné, nekultivovatelné a mrtvé bakterie; izolace do 24 h
- buněčná – kultivovatelné bakterie (***E.coli*, *Salmonella spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, MRSA, VRE**); zahájení izolace do 48h
- analýzy 16S rDNA a whole genome sequencing (WGS)
- AGES akademie a ARES Genetics Rakousko

- Prvky

- Univerzita Surrey ve Velké Británii
- Cd, Cr, Cu, Ni, Hg, Co, Pb, Zn
- analýzy probíhají

- Antibiotika

- PIWET Polsko
- tetracykliny, sulfonamidy, chinolony, makrolidy
- analýzy probíhají

- Herbicidy

- AGES akademie Rakousko
- glyfosáty, glufosináty
- analýzy probíhají

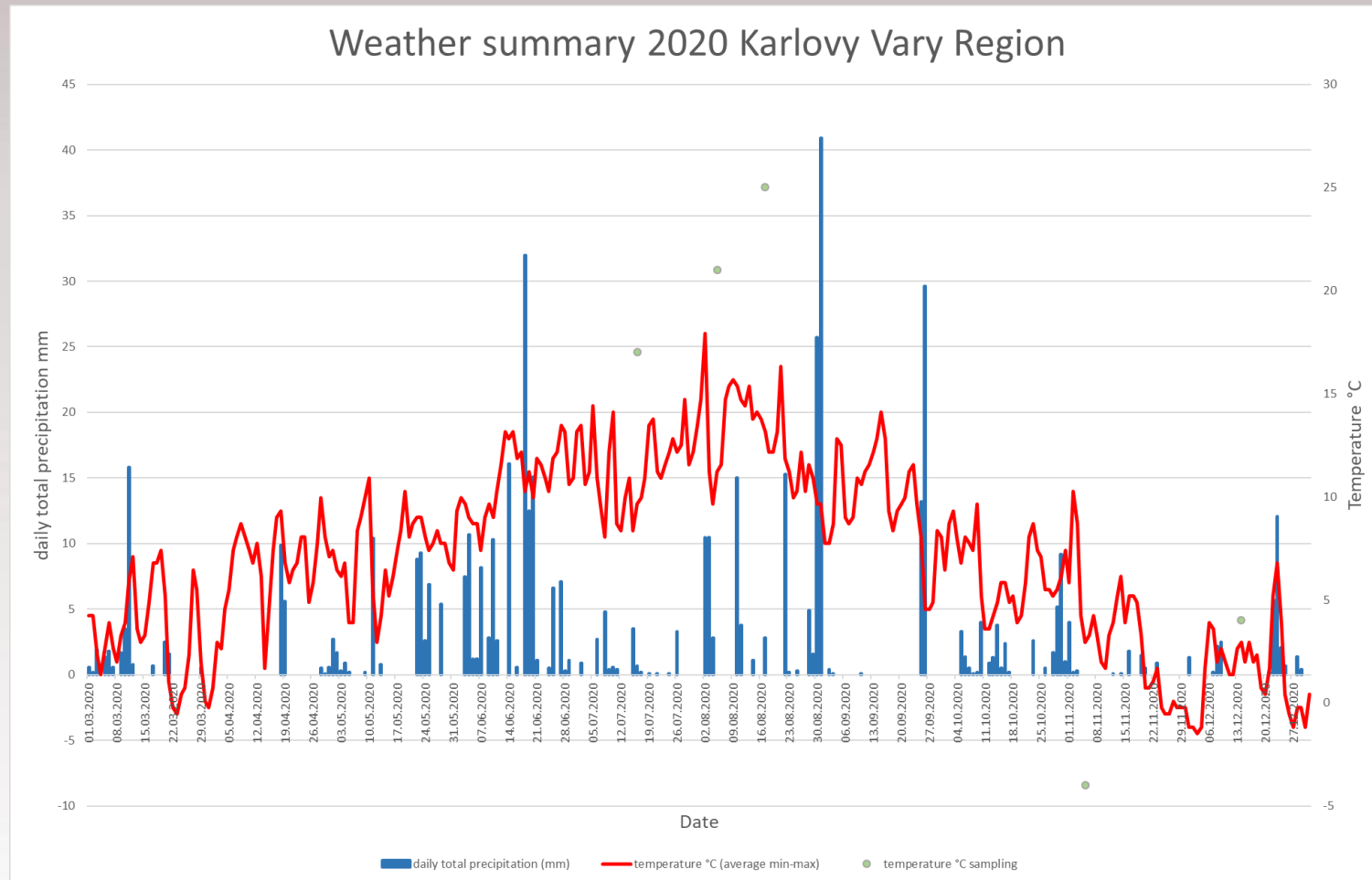
Získané izoláty

- 437 bakteriálních izolátů (kultivačně suspektní *E.coli*, *Klebsiella* spp., enterokoky)
- z toho 192 kultivačně **suspektně rezistentních** bakterií
- eDNA a tDNA ze všech odebraných vzorků (36 vzorků zeminy, 8 vzorků vod, 4 vzorky kejdy, 4 vzorky prasečích exkrementů, po 4 vzorcích z každé plodiny, 3 vzorky krmiva) – 71 triplikátů
- zatím analyzováno:
 - „16S“ a „target enrichment“ 52 vzorků tDNA a 20 vzorků eDNA

Identifikace izolátů

Izolát	kultivačně suspektní	ID vzorku	kompartment	identifikace MALDI	identifikace WGS
S1-C1-ECR3 CTX	<i>E. coli</i> resistentní	CZ20-S1-C1	zemina	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter ludwigii</i>
S2-C1-EFS1	<i>Enterococcus</i> spp. sensitivní	CZ20-S2-C1	zemina	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
S6-C2-KSU1	<i>Klebsiella</i> spp. sensitivní	CZ20-S6-C2	zemina	<i>Escherichia vulneris</i>	<i>Pseudoescherichia vulneris</i>
C2S-ESU2	<i>E. coli</i> sensitivní	CZ20-Cs2-S	plodina stonky	<i>Kosakonia cowanii</i> (pův. klas. <i>Enterobacter cowanii</i>)	<i>Kosakonia cowanii</i>
C3R-KSU2	<i>Klebsiella</i> spp. sensitivní	CZ20-Cs3-R	plodina kořeny	<i>Raoultella ornithinolytica</i> (pův. klas. <i>Klebsiella</i>)	<i>Raoultella ornithinolytica</i>
M1-VRE2	<i>Enterococcus</i> spp. rezistentní	CZ20-M1	kejda	<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Enterococcus hirae</i>
M4-ECR6	<i>E. coli</i> rezistentní	CZ20-M	kejda	<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>E. coli</i>
R4-KCS2	<i>Klebsiella</i> spp. sensitivní	CZ20-R4	říční voda	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

Počasí během vzorkovacího období



Dosavadní výsledky

- provedena identifikace a citlivost k antibiotikům (MIC) části suspektně rezistentních izolátů (AGES)
 - zatím potvrzeno 8 rezistentních *E. coli*, 1 *Klebsiella* sp., 4 enterokoky (analyzováno <100 ze 192 suspektně rezistentních)
- analýzy DNA (eDNA/tDNA) (AGES, ARES Genetics)
 - analyzováno 52 vzorků tDNA, 20 vzorků eDNA
 - 70 GB surových dat, probíhá zpracování a třídění dat
 - příprava rastrů pro třídění dat
 - očekává se porovnání zastoupení mikroorganismů v kompartmentech dle 16S rDNA, množství a poměr genů rezistence k antibiotikům, porovnání informací z eDNA/tDNA s kultivovanými izoláty
- antibiotika (PIWET) – předběžné výsledky naznačují přítomnost antibiotik v kejdě a v zemině před sklizní a po sklizni
- herbicidy (AGES) – analýzy probíhají
- prvková analýza (Univerzita Surrey) - probíhá

Překvapivá zjištění?

- nepřítomnost MRSA (methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*) ve všech kompartmentech v ČR i v zahraničí
- nepřítomnost *Salmonella* spp. ve všech kompartmentech v ČR i v zahraničí
- vysoká kvalita kultivovaných izolátů (předběžná identifikace pouze na základě růstu na chromogenních půdách)
- nepřítomnost antibiotik ve vodě (podzemní i povrchové)
- nepřítomnost antibiotik ve vzorcích prasečích exkrementů (v chovu nejsou přítomna léčená prasata, ta jsou oddělena a do chovu se nevrací, jejich exkrementy jsou součástí kejdy)
- nízký podíl rezistentních izolátů bakterií ve vzorcích (z důvodu nedostatku financí nemohly být zatím identifikovány a vyšetřeny na citlivost k antibiotikům všechny suspektně rezistentní izoláty, plánuje se analýza DNA senzitivních izolátů pro identifikaci a zjištění přítomnosti „spících“ genů rezistence)

Hledané odpovědi

- Projeví se na výsledcích „nestandardní“ přístup k chovu prasat?
- Jak významné jsou rozdíly v mikrobiální populaci na základě analýzy tDNA?
- Budou u rezistentních izolátů detekovány stejné geny rezistence k antibiotikům, jako ty identifikované v eDNA a tDNA?
- Budou rozdíly v zastoupení genů rezistence v zeminách s aplikovaným umělým hnojivem a kejdou?
- Projeví se na úrovni DNA klimatické rozdíly mezi vzorkujícími zeměmi?

.....

Poděkování

Autoři příspěvku děkují všem zúčastněným institucím za vytvoření a sdílení jednotných pracovních postupů, analýzy vzorků a podporu při řešení problémů v průběhu řešení projektu.

Za provedené analýzy děkujeme kolegyním a kolegům z institucí AGES, ARES Genetics, PIWET a Univerzity Surrey.

Za umožnění vzorkování děkujeme vlastníkům a pracovníkům vepřína a vlastníkům polí s pšenicí a řepkou.

Příspěvek vznikl za finanční podpory European Joint Programme One Health EJP - Horizon 2020 Grant č. 773830



Děkuji za pozornost!

Pokračování