



Monitoring der Entwicklung von Antibiotikaresistenzen im Zusammenhang mit dem Einsatz von Streptomycin zur Bekämpfung von Feuerbrand

Zusammenfassung

1 Einführung

Im Januar 2008 liess das Bundesamt für Landwirtschaft (BLW) den Einsatz von Streptomycin zur Bekämpfung von Feuerbrand unter kontrollierten Bedingungen zu. Es knüpfte diese Zulassung an die Auflage, die behandelten Flächen auf die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen hin zu beobachten. Die Forschungsanstalt Agroscope Changins-Wädenswil (ACW) lancierte daraufhin ein Monitoring, das sich auf die Untersuchung der kultivierbaren Bakterien im Boden und auf Pflanzen konzentrierte, insbesondere auf *Erwinia amylovora*, den Erreger von Feuerbrand. Am 18. Dezember 2008 erneuerte das BLW die Zulassung von Streptomycin für das Jahr 2009 mit der Auflage, das Monitoring fortzusetzen. Solche befristete Zulassungen werden so lange erteilt, bis eine wirksame Alternative gefunden ist.

Die Eidgenössische Fachkommission für biologische Sicherheit (EFBS) unterstrich die Notwendigkeit eines multidisziplinären Monitoringprojekts, welches neben pflanzen- und bodenspezifischen Aspekten auch die potenzielle Entwicklung von Antibiotikaresistenzen und -multiresistenzen bei Tier und Mensch abdeckt. Zusammen mit verschiedenen Bundesstellen, Forschungseinrichtungen und weiteren Fachstellen¹ rief die EFBS deshalb ein interdisziplinäres Projekt ins Leben. Angesichts der in jüngster Zeit in der Genomik wie auch in der Metagenomik erzielten Fortschritte schlug die Fachkommission ein dreijähriges Programm mit mehreren Modulen vor. Hauptziel des Programms war eine objektive Einschätzung der effektiven Risiken einer solchen Behandlung anhand neuester wissenschaftlicher Methoden zu liefern und nicht, Argumente gegen den Einsatz von Streptomycin zur Bekämpfung von Feuerbrand zu finden.

Das Programm wurde von verschiedenen Bundesämtern und weiteren Einrichtungen gemeinsam finanziert².

¹ Eidgenössische Fachkommission für biologische Sicherheit (EFBS), Bundesamt für Umwelt (BAFU), Bundesamt für Landwirtschaft (BLW), Forschungsanstalt Agroscope Changins-Wädenswil (ACW), Forschungsanstalt Agroscope Reckenholz-Tänikon (ART), Bundesamt für Veterinärwesen (BVET), Staatssekretariat für Wirtschaft (SECO).

² Folgende Einrichtungen trugen zur Finanzierung bei: EFBS, BLW, BAFU, BVET, ACW, Amt für Abfall, Wasser, Energie und Luft des Kantons Zürich (AWEL). ACW sowie das Institut für Veterinärbakteriologie der Universität Bern (IVB) stellten ausserdem Laborräumlichkeiten und -einrichtungen, allgemeine Leistungen und Personal zur Verfügung.

Die Koordination des Programms wurde durch Jean-Claude Piffaretti von Interlifescience in Massagno sichergestellt.

2 Experimentelle Untersuchungen und Ergebnisse

2.1 Modul A: Beurteilung der Auswirkungen des Einsatzes von Streptomycin auf Umweltbakterien (in Boden und Pflanzen) und Resistenzgene

Für dieses Modul war das Nationale Kompetenzzentrum Feuerbrand der Forschungsanstalt ACW zuständig. Ein Teil der Forschungsarbeiten wurde im Rahmen von COST (Initiative für Europäische Zusammenarbeit in Wissenschaft und Technik) durchgeführt. Die wichtigsten Untersuchungen und Ergebnisse werden im Folgenden erörtert.

2.1.1 Erarbeitung der molekularen Werkzeuge zur Überwachung der in der Umwelt vorhandenen Resistenzgene

Im Hinblick auf das Monitoring der quantitativen Entwicklung von in der Umwelt vorhandenen Resistenzgenen in kultivierbaren und nicht kultivierbaren Mikroorganismen mussten die Methoden zur Entnahme von DNA aus unterschiedlichen Ökosystemen (pflanzliche Matrices, Boden) sowie zum Nachweis und zur Quantifizierung dieser Sequenzen optimiert und validiert werden. Folgende Resistenzgene wurden untersucht: *aph3 (strA)*, *aph6 (strB)* und *aadA* in Bezug auf Streptomycin sowie *tetB*, *tetM* und *tetW* im Hinblick auf Tetracyclin. Die generierten Daten wurden anhand der Sequenzen für ribosomale RNA (16S rRNA) normalisiert.

2.1.2 Wirksamkeit von Streptomycin zur Bekämpfung von Feuerbrand

In zwei Obstplantagen wurde eine vergleichende Untersuchung durchgeführt. In der ersten Plantage (Neukirch TG) waren 67 % der Bäume und 17 % der Blütenstände, die nicht mit Streptomycin behandelt worden waren, mit *E. amylovora* infiziert, während dort, wo 3 Behandlungen mit Streptomycin stattgefunden hatten, die Infektionsrate lediglich 20 % beziehungsweise 1 % betrug. Noch bessere Ergebnisse wurden in der zweiten untersuchten Plantage (Lömmenschwil SG) erzielt: Dort verringerte sich die Infektionsrate bei den Bäumen von 100 % auf 13 % und bei den Blütenständen von 14 % auf <1 %. Obwohl sie nur in kleinem Massstab erfolgten, bestätigten diese Untersuchungen, dass der Feuerbrand durch rechtzeitige Anwendung des Antibiotikums deutlich eingedämmt werden kann.

2.1.3 Erarbeitung einer Baseline vor Streptomycinbehandlung, Monitoring der Resistenz im Anschluss an die Behandlung und Beurteilung der Auswirkungen auf die Bakteriengesellschaften

Die Untersuchungen wurden auf Parzellen mehrerer kommerziell bewirtschafteter Obstanlagen und Versuchsplantagen durchgeführt, welche (gemäss den mit der Zulassung herausgegebenen Weisungen) mit Streptomycin beziehungsweise mit Alternativen (Hefepilz *Aureobasidium pullulans* oder Wasser) behandelt wurden. Es wurden Pflanzen- und Bodenproben untersucht.

Die wichtigsten Befunde lauten wie folgt:

- a. Weder vor noch nach der Anwendung des Antibiotikums wurden streptomycinresistente Klone des Erregers *E. amylovora* gefunden. Andererseits wurden aber auch dort, wo keine Behandlung mit Streptomycin erfolgte, in den natürlichen Bakteriengesellschaften resistente Klone (z. B. *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Aeromicrobium* usw.) nachgewiesen.
- b. An keinem der Standorte hatten wiederholte Anwendungen von Streptomycin Auswirkungen auf die native Bakteriendiversität (kultivierbare und nicht kultivierbare Mikroorganismen) in Blüten, Früchten, Blättern oder im Boden. Selbst eine grösstmögliche Exposition (Anwendung der 100-fachen erlaubten Dosierung) blieb ohne Auswirkungen auf die Biodiversität der nativen Bakteriengesellschaften im Boden.

2.1.4 Entwicklung der für Streptomycin- und Tetracyclinresistenz kodierenden Gene im Anschluss an Streptomycinanwendungen

Die Untersuchungen fanden während drei aufeinanderfolgenden Jahren (2010–2012) in drei Versuchs-Apfelplantagen in den Kantonen Thurgau und Zürich statt. Dabei wurden Streptomycin- und

Tetracyclinresistenz kodierende Gene in kultivierbaren und nicht kultivierbaren Bakterien von Blüten und Blättern und aus dem Boden beobachtet. Jedes Jahr fanden 3 Behandlungen mit Streptomycin oder mit Wasser (Kontrolle) statt. Die Probenahme erfolgte einen Tag vor der ersten Anwendung, einen Tag sowie zwei Wochen nach der dritten Anwendung und bei der Ernte.

Die wichtigsten Befunde lauten wie folgt:

- a. Die meisten Resistenzgene wurden in den ersten Proben (Boden, Blüten, Blätter) vor jeglicher Behandlung nachgewiesen, und zwar für alle drei Standorte in grosser Zahl.
- b. An allen drei Standorten waren die relativen Zunahmen an Resistenzgenen im Anschluss an die Streptomycinanwendungen – sofern solche Zunahmen überhaupt beobachtet wurden – vereinzelt, inkonsistent und in den Folgejahren nicht reproduzierbar.
- c. Die beobachteten relativen Zunahmen an Resistenzgenen im Anschluss an die Streptomycinanwendungen waren vorübergehender Natur und in den Erstproben des Folgejahres nicht mehr nachweisbar.
- d. Unter den vorherrschenden Untersuchungsbedingungen konnten keine dauerhaften Auswirkungen auf die Zahl der Resistenzgene für Streptomycin und Tetracyclin festgestellt werden.

2.2 Modul B: Beurteilung der Auswirkungen von Streptomycinanwendungen auf die kommensale Flora von Nutztieren in der Umgebung der behandelten Flächen

Zuständig für dieses Modul ist das Institut für Veterinär bakteriologie am Tierspital der Vetsuisse-Fakultät Universität Bern.

Zwei Gruppen (Test- und Kontrollgruppe) mit je fünf Lämmern und zwei Mutterschafen wurden auf zwei verschiedenen, je rund 2000 m² grossen Weideflächen gehalten. Auf der Weide der Testgruppe wurde Streptomycin in vier Anwendungen direkt auf das Gras zweier aneinandergrenzender/angrenzender Flächen von 180 m² und 120 m² gespritzt. Die Antibiotikakonzentrationen betragen 17,5 mg/m² beziehungsweise 12,0 mg/m² und bildeten den Gradienten der Streptomycinkontamination infolge einer Behandlung von Obstkulturen ab. Im Anschluss an die Anwendung wurden die Tiere während 12 Stunden auf der behandelten Fläche eingezäunt. Danach konnten sie sich wieder auf der ganzen Weide frei bewegen. Am Tag 0, 3 Tage nach der ersten Streptomycinanwendung, 6 Tage nach der dritten Anwendung, 2 Tage nach der vierten Anwendung sowie an den Tagen 67 und 90 wurden bei allen Tieren beider Gruppen Nasen- und Analabstriche gemacht. Diese Proben wurden auf zwei Indikatorbakterien hin untersucht: *Escherichia coli* (Analabstriche) und *Staphylococcus* spp. (Nasenabstriche). Bei den isolierten Kolonien wurden Empfindlichkeitstests in Bezug auf verschiedene Antibiotika durchgeführt. Zur Analyse der genetischen Ausprägung der Streptomycinresistenz wurde nach den Sequenzen *aph3* (*strA*), *aph6* (*strB*), *aadA*-, *ant(6)-1a* gesucht, und das Gen *rpsL*, welches das Ribosomalprotein S12 kodiert, wurde sequenziert.

Die wichtigsten Befunde lauten wie folgt:

- a. Insgesamt wurden 455 *E. coli*-Stämme getestet. Vor der Streptomycinanwendung zeigten 16 % der Stämme der Kontrollgruppe und 15 % der Stämme der Testgruppe eine Resistenz gegen das Antibiotikum.
- b. Am Tag 90 enthielt der Kot der Tiere, die dem Streptomycin ausgesetzt waren, 44 % resistente *E. coli*, während es bei der Kontrollgruppe nur 17 % waren. Bezogen auf die Gesamtheit der seit der ersten Anwendung isolierten *E. coli* fanden sich bei den exponierten Tieren 40 % der resistenten *E. coli* und bei den Tieren der Kontrollgruppe 22 % ($p = 0,0001$).
- c. Der Anteil der Multiresistenzen (hauptsächlich gegen Sulfamethoxazol, Ampicillin, Tetracyclin und Chloramphenicol) war unter den exponierten Tieren mit 40 % signifikant höher als in der Kontrollgruppe (24 %, $p = 0,0002$). Einige Stämme zeigten sich resistent gegenüber Cephalosporinen der 3. Generation.

- d. Es wurden 184 *Staphylococcus* ssp.-Stämme getestet. Zwischen der ersten Anwendung des Antibiotikums und der letzten Probenahme wurden in den Nasenhöhlen der exponierten Tiere gesamthaft lediglich 8 streptomycinresistente Stämme nachgewiesen und bei den Tieren der Kontrollgruppe überhaupt keiner. Jeder Zeitpunkt für sich betrachtet zeigte keine signifikanten Unterschiede beim Auftreten von resistenten *Staphylococcus* ssp. Erst wenn alle Zeitpunkte zusammengefasst wurden, war der Unterschied beim Auftreten der Stämme signifikant ($p = 0,001$). Die 8 streptomycinresistenten Stränge waren auch gegen Tetracyclin, Fusidinsäure und Tiamulin resistent.

3 Diskussion

Die Ergebnisse dieser beiden Projekte scheinen auf den ersten Blick zu divergieren. In den Obstplantagen waren unter den Untersuchungsbedingungen vereinzelte und vorübergehende Zunahmen an Resistenzgenen zu beobachten. Allerdings konnten diese Zunahmen nicht mit den Streptomycinanwendungen in Verbindung gebracht werden. Vor allem aber war 6 bis 7 Monate nach Abschluss der jährlichen Behandlungen keine anhaltende Zunahme der Resistenz nachweisbar. Diese beruhigenden Ergebnisse lassen sich auf die die strengen Vorgaben zurückführen, an die die Zulassungen von Streptomycin zur Bekämpfung von Feuerbrand geknüpft waren. Es ist deshalb wichtig, dass dieses Vorgehen in den kommenden Jahren beibehalten wird. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Verwendung von Streptomycin langfristig zu einer anhaltenden Zunahme der Resistenz führt. Aus diesem Grund sollte das Monitoring des Bodens der behandelten Plantagen fortgesetzt werden.

Die Ergebnisse der Untersuchung mit den Schafen lassen sich nur schwer extrapolieren. Tatsächlich wurde bei den *E. coli*-Stämmen in der Darmflora der Tiere, die auf der mit Streptomycin behandelten Fläche geweidet haben, eine signifikante Zunahme der Resistenz festgestellt. Allerdings wurden 4 Antibiotikaanwendungen durchgeführt und nicht 3 oder sogar nur 2, wie in der jährlichen Zulassung vorgesehen. Zudem konnten die Schafe 12 Stunden lang auf der behandelten Fläche grasen, was gemäss den Zulassungsaufgaben untersagt ist. Höchstwahrscheinlich waren die Schafe deshalb grösseren Mengen an Streptomycin ausgesetzt, als in den Zulassungen erlaubt. Die Zunahme der Resistenz darf dennoch nicht ignoriert werden, sondern ist als deutliches Warnsignal zu interpretieren.

4 Fazit

Die Ergebnisse dieses Forschungsprogramms und des von ACW seit 2008 durchgeführten Monitorings machen deutlich, dass - unter den gegebenen Versuchsbedingungen - die Anwendung von Streptomycin vereinzelte und reversible Auswirkungen auf den Grad der Antibiotikaresistenz der Mikroorganismen im Boden der behandelten Plantagen, sowie auf Blättern und Blüten und in den Früchten hatte. Obwohl vorübergehender Natur, darf diese Zunahme nicht ignoriert werden, genauso wenig wie das indikative Signal, das von der zunehmenden Resistenz der *E. coli*-Stämme im Kot der Schafe ausgeht, die Streptomycin ausgesetzt waren. Diese Beobachtungen sowie die Streptomycinrückstände, die gelegentlich in Honig und Äpfeln nachgewiesen werden, machen unmissverständlich klar, dass diesem Thema weiterhin unverminderte Aufmerksamkeit geschenkt werden muss. Falls die Zulassung von Streptomycin zur Behandlung von Feuerbrand auch in Zukunft erneuert wird, ist unbedingt dafür zu sorgen, dass:

- a. die derzeitigen strengen Kontrollmassnahmen, an die der Einsatz von Streptomycin geknüpft ist, beibehalten werden, und
- b. das Monitoring der Resistenzen im Boden der behandelten Plantagen fortgesetzt wird.

Wichtig ist ferner, dass die Risiken beurteilt werden, die sich auf die Methode und Bedingungen der Streptomycinanwendung zurückführen lassen, um diese Risiken nach Möglichkeit zu vermindern. Beim Spritzen von Streptomycin erscheint es ratsam, nahe gelegene Flächen so wirksam wie möglich zu schützen, um eine Kontamination durch Verwehung zu vermeiden. Besondere Aufmerksamkeit ist schliesslich dem Schutz der Personen zu schenken, die das Antibiotikum spritzen. Sie sind korrekt über die Risiken einer übermässigen Exposition gegenüber dem Wirkstoff zu informieren.

Die optimale Lösung des Problems der zunehmenden Antibiotikaresistenz von Bakterien wäre es, für die Bekämpfung von Feuerbrand eine wirksame Alternative zu Streptomycin zu finden. Dies macht deutlich, dass die wissenschaftliche Forschung auf diesem Gebiet aktiv gefördert und angemessen finanziert werden muss. Ermutigende Resultate wurden bereits von ACW mit dem Bakterium *Pantoea agglomerans* erzielt; dasselbe gilt für anorganische Substanzen wie Aluminiumkaliumsulfat $[KAl(SO_4)_2]$, welches derzeit in Baden-Württemberg eingeführt wird. Eine weitere interessante Perspektive wäre die Selektion von Obstbäumen mit geringerer Suszeptibilität gegenüber *E. amylovora*. Dies lässt sich einerseits durch klassische Hybridisierungsverfahren erzielen oder mithilfe von Gentechnikverfahren deutlich beschleunigen.

Dank

Folgenden Personen sei an dieser Stelle für ihr Engagement als Sachverständige gedankt: Pascal Meylan (Universität Lausanne, Präsident der EFBS), Isabel Hunger-Glaser (Geschäftsführerin der EFBS), Markus Hardegger (BLW), Eduard Holliger (ACW), Christian Pillonel (BAFU), Sabina Büttner (BVET), Kathrin Mühlemann[†] (EFBS und Universität Bern), Irene Schiller (BVET), Olivier Sanvido (SECO), Nicolas Foresti (BLW), Mauro Tonola (EFBS und Istituto Cantonale di Microbiologia, Bellinzona), Jean-Claude Piffaretti (Interlifescience, Massagno, Programmkoordinator).

Dank gebührt ferner Brion Duffy (ACW), Fiona Walsh (ACW) und Joachim Frey (Universität Bern) für die Durchführung der in diesem Bericht beschriebenen Versuche.

[†] Kathrin Mühlemann ist im November 2012 verstorben.

Hinweis: Zahlreiche Ergebnisse des Programms wurden bereits in internationalen wissenschaftlichen Zeitschriften publiziert oder stehen kurz vor der Veröffentlichung.