

5

VORKOMMEN VON ANTIBIOTIKA- RESISTENTEN BAKTERIEN IN DEUTSCHEN FLÜSSEN

**Lara Stelmaszyk, Claudia Stange,
Andreas Tiehm**

TZW: DVGW-Technologiezentrum Wasser, Karlsruhe

5.1 Einleitung

Die Antibiotikaresistenz zählt zu den größten Bedrohungen für die globale Gesundheit (WHO 2019). Weltweit ist eine Zunahme von Infektionen mit antibiotikaresistenten Bakterien zu verzeichnen. Die gesellschaftliche und wirtschaftliche Belastung durch Antibiotikaresistenzen ist noch nicht absehbar, aber einige Prognosen gehen davon aus, dass resistente bakterielle Infektionen bis zum Jahr 2050 weltweit die häufigste Todesursache sein werden (O'Neill 2014). Globale und nationale Aktionspläne basieren im Allgemeinen auf einem One-Health-Ansatz (Mensch-Tier-Umwelt) für die Bekämpfung von Antibiotikaresistenzen (EC 2017; Hernando-Amado et al. 2019); es wird jedoch zunehmend anerkannt, dass den Umweltaspekten mehr Aufmerksamkeit geschenkt werden sollte (Liguori et al. 2022). Die Notwendigkeit, die Rolle der Umwelt bei der Ausbreitung von antibiotikaresistenten Bakterien (ARB) und Antibiotikaresistenzgenen (ARG) innerhalb und zwischen Menschen, Pflanzen und Tieren besser zu verstehen, wurde auch im deutschen Aktionsplan zur Bekämpfung antibiotikaresistenter Bakterien hervorgehoben (BMG 2023). Die Umwelt wird inzwischen nicht nur als wichtiger Weg für die Übertragung von Antibiotikaresistenzen anerkannt, sondern auch als Reservoir für ARG und damit als Ort für die mögliche Aufnahme von ARG durch Pathogene (Berglund et al. 2020; Forsberg et al. 2012, Larsson et al. 2022; Vassallo et al. 2021). Eine große Herausforderung besteht darin, dass ARG über mobile genetische Elemente zwischen Bakterien ausgetauscht werden können. Daher ist es notwendig, diesen Gentransfer in der Umwelt zu berücksichtigen.

Das TZW hat sich in der Vergangenheit im Rahmen mehrerer Projekte bereits intensiv mit dem globalen Auftreten von antibiotikaresistenten Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen in der aquatischen Umwelt und der Trinkwasseraufbereitung beschäftigt (Stange et al. 2019; Stange und Tiehm 2020; Stelmaszyk 2023; Stieber et al. 2006; Stoll et al. 2009 und 2012). Die durchgeführten Studien verdeutlichten die weite Verbreitung von Resistenzen in der aquatischen Umwelt in Deutschland. Für die Überwachung von Antibiotikaresistenzen in der Umwelt stehen u. A. Kultur- und PCR-basierte Methoden zur Verfügung. Die kulturellen Verfahren fokussieren sich bislang auf den Nachweis von antibiotikaresistenten Pathogenen oder Fäkalindikatorbakterien. Verfahren für den Nachweis von oligotrophen Bakterien, die in der Umwelt von hoher Relevanz sind und zur Verbreitung der Bakterien beitragen können, waren bislang noch nicht verfügbar.

5.2 Methoden

Zum Nachweis von Resistenzen in der aquatischen Umwelt existieren unterschiedliche methodische Ansätze, wie in Bild 6.1 dargestellt.

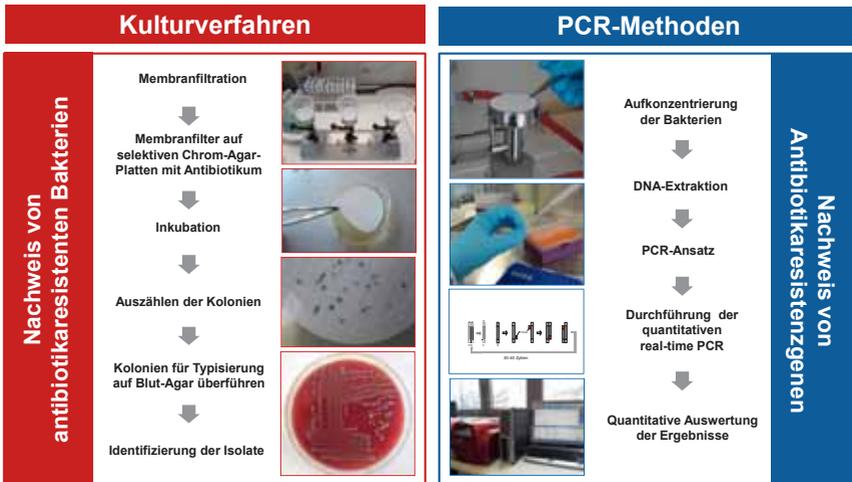


Bild 5.1: Vergleich von Kultur-basierten und PCR-basierten Verfahren zum Nachweis von Resistenzen aus Umweltproben.

Ein Kultur-basierter Nachweis von Resistenzen ermöglicht die Erfassung von vermehrungsfähigen Bakterien. Diese können sowohl für die menschliche Gesundheit relevant, als auch für die Verbreitung in der Umwelt wichtige Träger sein. Sie beruhen auf chromogenen, mit β -Laktam Antibiotika versetzten nährstoffreichen Medien (z.B. CHROM ESBL). Um die Pathogenen oder Fäkalindikatorbakterien zu selektieren, werden die zu untersuchenden Proben auf diesen Medien für 24 h bei 41 °C inkubiert (Schreiber et al. 2021). Dieser Kultur-basierte Nachweis wurde um die Erfassung von antibiotikaresistenten Umweltbakterien erweitert. Dabei wurde nährstoffarmes R2A-Medium (=oligotrophe Bedingungen) mit β -Laktam-Antibiotika (Cephalosporine (BL1) nach Rupp und Fey (2003) und Carbapeneme (BL2) nach Diab et al. (2018)) versetzt und die Inkubationsbedingungen angepasst (21°C, 2 Tage, siehe Bild 6.2). Zur Auswertung der resistenten Bakterien wurden die Koloniezahlen pro Volumen einer Wasserprobe bestimmt (KBE/100 mL) und die Identität von Isolaten stichprobenartig ermittelt (MALDI-TOF MS). Die gewonnenen Resistenz-Daten wurden mit den Ergebnissen aus den qPCR-

Analysen abgeglichen. Eine stichprobenartige Bestätigung der β -Laktamasen (β -Laktam hydrolysierende Enzyme der resistenten Bakterien) wurde mit einem für Umweltbakterien angepassten Mikrodilutionstest (Micronaut-S, Merlin, Bruker) durchgeführt. Die Identifizierung erfolgt bei diesem Test durch das Wachstum eines Isolats in Gegenwart eines Antibiotikums und das ausbleibende Wachstum in Gegenwart von Antibiotikum und β -Laktamase Inhibitor.

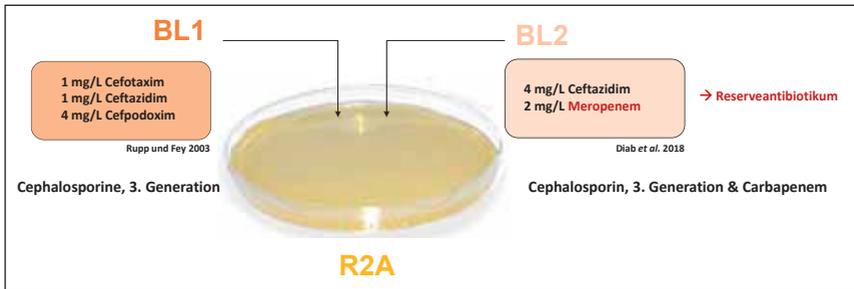


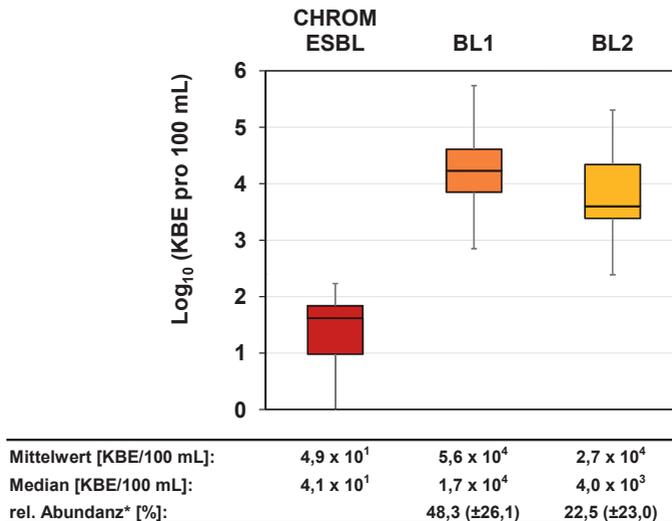
Bild 5.2: Angepasste Kulturverfahren zum Nachweis von β -Laktam-resistenten Umweltbakterien.

Auf molekularer Ebene lassen sich die Resistenzgene in Wasserproben mittels qualitativer oder quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachweisen. Die PCR ist eine Untersuchungsmethode, die DNA-Fragmente für die Analyse exponentiell amplifiziert. Der Prozess ist hochspezifisch und ermöglicht selbst mit winzigen Probenmengen das Auffinden spezifischer Genomsequenzen. Hierbei handelt es sich um eine Methodik, die weltweit zum Nachweis von Resistenzen in Umweltpflanzen Anwendung findet. Auch die ARG nicht-kultivierbarer Bakterien können dadurch erfasst werden.

5.3 Ergebnisse

Aus vier verschiedenen Oberflächengewässern (Rhein bei Karlsruhe; Ruhr & Stever bei Mülheim und Donau bei Langenau) wurden an mehreren Probenahmeterminen insgesamt 28 Proben gewonnen, um die entwickelten R2A-basierten Kultivierungsmethoden für die Untersuchung von β -Laktamase-produzierenden oligotrophen Bakterien zu testen. Die koloniebildenden Einheiten (KBE) pro mL Wasserprobe sind in Abb. 3 gezeigt. Oligotrophe Mikroorganismen mit Resistenzen gegen bereits seit längerer Zeit im Einsatz befindlichen Cephalosporinen der

3. Generation kommen in deutlich höherer Zahl vor ($1,7 \times 10^4$ KBE/100 mL) als Bakterien mit Resistenzen gegen die Reserveantibiotika-Gruppe der Carbapeneme ($4,0 \times 10^3$ KBE/100 mL). Damit kommen β -Laktam resistente Umweltbakterien 100-1000 häufiger in Oberflächengewässern vor als die mit dem CHROM ESBL Medium isolierten ARB ($4,1 \times 10^1$ KBE/100 mL). Carbapeneme sind als Reserveantibiotika eingestuft und werden deshalb als antibiotische Wirkstoffe nur für schwer therapierbare bakterielle Infektionen eingesetzt. Dass trotz des geringeren Einsatzes von Carbapenemen in Deutschland in allen untersuchten Oberflächenwässern resistente und vor allem Carbapenemase-bildende Organismen gefunden werden konnten, ist alarmierend. MALDI-TOF MS-basierte Identifizierungen exemplarischer Isolate von den Medien BL1 und BL2 zeigten, dass die angepassten Verfahren ausschließlich Umwelt-relevante Bakteriengattungen, darunter am häufigsten *Pseudomonas*, *Falvobacterium* und *Janthinobacterium*, selektieren.



*relativ zu KBE auf Antibiotika-freien Medien

Bild 5.3: Koloniebildende Einheiten (KBE) pro 100 mL Wasser auf Standard Medien für die Isolation ESBL bildender Pathogene und Fäkalindikatoren (CHROM ESBL) und R2A-basierten Medien (21 °C, 48 h Inkubation) BL1 (Cephalosporin-resistente Umweltbakterien) und BL2 (Carbapenem-resistente Umweltbakterien). Insgesamt wurden 28 Oberflächenwasserproben untersucht.

Einige Isolate wurden außerdem auf die Expression einer β -Laktamase untersucht, um auszuschließen, dass es sich bei der phänotypisch feststellbaren Resistenz um unspezifische Mechanismen, wie z. B. Schutz durch die Ausbildung einer extrazellulären Matrix, o. Ä. handelt. Mit dem Micronaut-S β -Laktamasen Mikrodilutionstest konnte für die Mehrzahl der 37 untersuchten Isolate eine Bildung von β -Laktamasen bestätigt werden. 19 % waren dabei resistent gegen Carbapeneme, wobei die Resistenz durch EDTA oder Avibactam-Zugabe inhibierbar war. Keine Hemmung durch diese Substanzen wurde bei den restlichen 81% Carbapenem-resistenter Bakterien nachgewiesen, was auf die Produktion von D-Carbapenemasen hindeutet. Bei 70% der Isolate konnte zudem gleichzeitig eine Resistenz gegen Cephalosporine festgestellt werden, die durch Clavulansäure hemmbar war.

Die Erkenntnisse aus den Kulturverfahren zeigen, dass die Umwelt und speziell die dort vorherrschenden oligotrophen Bakterien ein Reservoir für diese Resistenzen darstellen.

Der Vergleich von Kulturverfahren und PCR-basierten Methoden bestätigt die Erkenntnisse (siehe Abb. 4). Analog zum Kultur-Nachweis konnten in der PCR Cephalosporin-Resistenzgene deutlich häufiger detektiert werden als die Carbapenem-Resistenzgene, die eine Resistenz gegen die Reserve-Antibiotika der Carbapenem-Gruppe vermitteln.

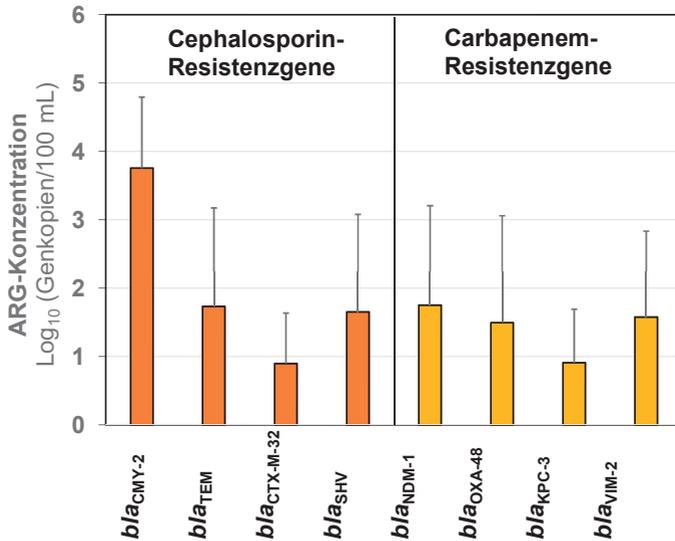


Bild 5.4: Konzentration von Antibiotikaresistenzgenen pro 100 mL. Die Gene sind nach ihrer Ausprägung von Cephalosporin-Resistenz, Carbapenem-Resistenz gruppiert (Einordnung lt. CARD-Datenbank: <https://card.mcmaster.ca/>). Die Mittelwerte wurden aus den Analysen der selben 28 Oberflächenwasserproben gebildet, die auch für die Nachweise im Kulturverfahren verwendet wurden. Die Bestimmungsgrenze der qPCR liegt bei 2 Genkopien/mL.

5.4 Schlussbemerkungen

Am TZW konnte erfolgreich ein kultur-basiertes Verfahren zum Nachweis von antibiotikaresistenten Umweltbakterien etabliert werden. Insgesamt belegen die Ergebnisse der qPCR- und Kultur-basierten Untersuchungen die weite Verbreitung von antibiotikaresistenten Umweltbakterien und ARG in Oberflächengewässern. Die Umwelt als Reservoir für Antibiotikaresistenzen sollte deshalb zukünftig intensiver untersucht werden, um die Rolle der oligotrophen Bakterien als Promotoren für die Verbreitung der Resistenzen besser zu verstehen und zeitliche Entwicklungen erfassen zu können. Daher empfehlen wir ein regelmäßiges Monitoring auf ARG und resistente Umweltbakterien. Darüber hinaus ist die Kontrolle von Antibiotikaresistenzen in Kläranlagenabläufen und eine weitergehende Abwasserreinigung sinnvoll, um die Einträge in die Umwelt zu reduzieren.

5.5 Danksagung

Die AutorInnen danken dem DVGW (Projekt EVA, W 201830) für die finanzielle Unterstützung.

5.6 Literatur

Berglund, F.; Böhm, M.-E.; Martinsson, A.; Ebmeyer, S.; Österlund, T.; Johnning, A.; Larsson, J. D. G.; Kristiansson, E. (2020): Comprehensive screening of genomic and metagenomic data reveals a large diversity of tetracycline resistance genes, *Microbial genomics* 6.

Bundesministerium für Gesundheit (BMG) Referat 615 (2023): Resistenzstrategie 2030 - Abschlussbericht, https://www.bundesgesundheitsministerium.de/fileadmin/Dateien/3_Downloads/A/Antibiotika-Resistenz-Strategie/DART_2030_bf.pdf.

Diab, M.; Hamze, M.; Bonnet, R.; Saras, E.; Madec, J.-Y.; Haenni, M. (2018): Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in water sources in Lebanon. *Veterinary microbiology* 217, S. 97–103.

European Commission (EC) (2017): A European One Health Action Plan, https://health.ec.europa.eu/system/files/2020-01/amr_2017_action-plan_0.pdf

Forsberg, K. J.; Reyes, A.; Wang, B.; Selleck, E. M.; Sommer, M. O. A.; Dantas, G. (2012): The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens, *Science* 337, S. 1107–1111.

Hernando-Amado, S.; Coque, T. M.; Baquero, F.; Martínez, J. L. (2019): Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives, *Nature microbiology* 4, S. 1432–1442.

Larsson, J. D. G.; Flach, C.-F. (2022): Antibiotic resistance in the environment, *Nature reviews microbiology* 20, S. 257–269.

Liguori, K.; Keenum, I.; Davis, B. C.; Calarco, J.; Milligan, E.; Harwood, V. J.; Pruden, A. (2022): Antimicrobial resistance monitoring of water environments. A framework for standardized methods and quality control, *Environmental science and technology* 56, S. 9149–9160.

O'Neill, J. (2014): The review on antimicrobial resistance, https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf

Rupp, M. E.; Fey, P. D. (2003): Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae. Considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. *Drugs* 63 (4), S. 353–365.

Schreiber, C.; Zacharias, N.; Essert, S. M.; Wasser, F.; Müller, H.; Sib, E.; Precht, T.; Parcina, M.; Bierbaum, G.; Schmithausen, R. M.; Kistemann, T.; Exner, M. (2021): Clinically relevant antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments - An optimized culture-based approach. *The Science of the total environment* 750, S. 142265.

Stange C., Tiehm A. (2017). Verhalten von Antibiotika-Resistenzgenen bei der Trinkwasseraufbereitung, Veröffentlichungen aus dem Technologiezentrum Wasser, ISSN 1434-5765, TZW-Band 76

Stange, C.; Tiehm, A. (2020): Occurrence of antibiotic resistance genes and microbial source tracking markers in the water of a karst spring in Germany. *The Science of the total environment* 742, S. 140529.

Stange, C.; Yin, D.; Xu, T.; Guo, X.; Schäfer, C.; Tiehm, A. (2019): Distribution of clinically relevant antibiotic resistance genes in Lake Tai, China. *The Science of the total environment* 655, S. 337–346.

Stelmaszyk, L. (2023): Antibiotikaresistenzen im Rohwasser, Veröffentlichungen aus dem Technologiezentrum Wasser Karlsruhe, ISSN 1434-5765.

Stieber M., Böckle K., Köhler C., Hamsch B., Tiehm A. (2006): Antibiotikaresistenzen in der Umwelt – Ursachen, Nachweis, Verbreitung, Veröffentlichungen aus dem Technologiezentrum Wasser Karlsruhe, ISSN 1434-5765, TZW-Band 29, S. 97-161

Stoll, C.; Tiehm, A.; Langer, S. (2009): Bedeutung von Antibiotikaresistenzen für die Rohwasserqualität: Vorkommen, Transport und natürliche Eliminationsprozesse, Veröffentlichungen aus dem Technologiezentrum Wasser, ISSN 1434-5765, TZW-Band 40

Stoll, C.; Sidhu, J.P.S.; Tiehm, A.; Toze, S. (2012): Prevalence of clinically relevant antibiotic resistance genes in surface water samples collected from Germany and Australia, *Environmental science and technology* 46 (17), S. 9716–9726.

Vassallo, A.; Kett, S.; Purchase, D.; Marvasi, M. (2021): Antibiotic-resistant genes and bacteria as Evolving Contaminants of Emerging Concerns (e-CEC). Is it time to include evolution in risk assessment?, *Antibiotics* 10, S. 1066.

World Health Organization (WHO) (2019): Monitoring and evaluation of the global action plan on antimicrobial resistance. Framework and recommended indicators. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325006/9789241515665-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>