

## **Methodenüberblick zum Sondermessprogramm**

### **„Vorkommen antibiotika-resistenter Bakterien und Antibiotikawirkstoffe in niedersächsischen Kläranlagen und Oberflächengewässern“**

#### **Messstellenauswahl**

Im Rahmen der vom NLWKN bzw. des Niedersächsischen Ministeriums für Umwelt, Energie, Bauen und Klimaschutz beauftragten Sonderuntersuchungen zum Vorkommen antibiotikaresistenter Bakterien und Antibiotikawirkstoffe in niedersächsischen Kläranlagen und Oberflächengewässern ist eine Beprobung an 80 Standorten und damit verbunden eine Entnahme von insgesamt mehr als 200 Proben in Gewässern, Kläranlagen und Kläranlagenabläufen vorgesehen. Hauptziel dieser orientierenden Untersuchungen ist die Erfassung der allgemeinen landesweiten Belastungssituation in Oberflächengewässern sowie eine erste Abschätzung der Relevanz unterschiedlicher, potentieller Eintragsquellen.

Neben Vergleichsuntersuchungen an den vom NDR veröffentlichten Standorten ist eine Beprobung an insgesamt 22 Kläranlagenstandorten, insbesondere der Kläranlagenabläufe, vorgesehen. Die Kläranlagenauswahl umfasst sowohl kommunale Anlagen als auch industrielle Direktleiter (fleischverarbeitende Betriebe). Darüber hinaus werden an gewässerkundlichen Überblicksmessstellen (39 im Binnen- und zwei im Küstenbereich) des Gewässerüberwachungssystems Niedersachsens (GÜN) Wasserproben entnommen und auf antibiotikaresistente Bakterien und Antibiotikawirkstoffe hin untersucht. Zusätzlich wurden Hintergrundmessstellen in vermeintlich unbelasteten Gebieten sowie mehrere Messpunkte in Gewässern mit bekannter Beeinflussung durch Kläranlagen oder Ausbringung organischen Düngers ausgewählt.

#### **Verwendete Methoden**

##### **Kurzüberblick**

Anwendung des umfangreichen HyReKa-Methodenspektrums

= aktueller Stand der Technik/Forschung

3 Hauptmodule:

- Mikrobiologie: diverse Kulturverfahren zur phänotypischen Resistenzbestimmung (z. B. Antibiotogramme)
- Molekularbiologie: v.a. Detektion von Resistenzgenen in der Gesamtbioasse der Proben sowie aus Isolaten (qPCR)
- Chemische Analytik: begleitende Antibiotikarückstandsanalytik in allen wässrigen Proben (LC-MS/MS, GC-MS/MS)

Die im Rahmen des Sondermessprogramms zur Anwendung kommenden mikrobiologischen (molekularbiologische und kulturelle) sowie chemischen Verfahren werden im Folgenden beschrieben.

##### **Probenahme**

Es werden Stichproben entnommen. Diese Proben werden seitens des akkreditierten Probenehmers unter sterilen bzw. kontaminationsfreien Umständen entnommen, in ein steriles Transportmedium überführt und im Anschluss kühl und dunkel transportiert. Die labortechnischen Untersuchungen erfolgen spätestens 24 Stunden nach der Entnahme. Um Querkontaminationen zu vermeiden, werden alle Probenahmegefäße vorher desinfiziert.

Die Gewässerproben werden im Labor geteilt. Untersuchungsmaterial für die wasserchemische Analyse wird direkt vor Ort für die Antibiotika-Rückstandsuntersuchungen abgefüllt.

## Laboranalytik

### **Kulturverfahren**

Mit Hilfe von selektiven Kulturverfahren können einzelne Bakterienpopulationen analysiert und ggf. die phänotypisch resistenten Bakterien (z.B. mit Carbapenem-Resistenz) identifiziert und für weitere Untersuchungsschritte isoliert werden.

Die Klassifizierung multi-resistenter gramnegativer Bakterien erfolgt auf Basis ihrer phänotypischen Eigenschaften (R= resistent oder I= intermediär resistent, S= sensibel) nach den Empfehlungen der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO):

- 3 MRGN (Multi-resistente gramnegative Bakterien mit Resistenz gegen 3 der 4 Antibiotikagruppen)
- 4 MRGN (Multi-resistente gramnegative Bakterien mit Resistenz gegen 4 der 4 Antibiotikagruppen)

Die bewerteten Antibiotikagruppen (Leitsubstanzen) sind: 1. Acylureidopenicilline und Betalaktamasehemmer (Piperacillin/Tazobactam), 2. Cephalosporine der 3. Generation, 3. Carbapeneme und 4. Fluorchinolone.

Für die Bewertung werden nur diejenigen Isolate berücksichtigt, die sich in die MRGN-Klassifikation einordnen lassen und/oder Colistin-Resistenzen aufwiesen.

Weitere möglicherweise identifizierte Umwelt-Bakterien wie z.B. Aeromonaden werden nicht berücksichtigt.

Grundsätzlich erfolgt die Identifizierung, Interpretation und Bewertung in folgenden Schritten:

### Quantifizierung und Isolation antibiotikaresistenter Bakterien aus Originalprobe

- Verarbeitung der Wasserproben (Filtrierung, etc.) und Ausplattieren auf chromogene Selektiv-Agarplatten, die Antibiotika enthalten, so dass nur resistente Bakterien wachsen.
- Auswertung der Agarplatten nach Bebrütung und Selektion mutmaßlicher klinisch-relevanter Pathogene.
- Subkultivierung (auf weiteren Agarmedien)
- Spezies-Identifizierung unter Verwendung eines MALDI-TOF MS und ggf. biochemischer Differenzierung.
- Bestimmungen grampositiver Bakterien sind auch möglich (z.B. Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*, Vancomycin resistente Enterokokken)

### Antibiogrammerstellung aus gewonnen Isolaten

- Mikrodilutionstest: Bestimmung der Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika.

### **Molekularbiologische Methoden**

Im Rahmen des molekularbiologischen Analyseverfahrens werden folgende Schritte durchgeführt:

- Anreicherung von Nukleinsäuren (DNA) sowohl direkt aus dem Nativmaterial (Oberflächenwasser, Abwasser aus Kleinkläranlagen, Sediment) als auch aus den resistenten, kultivierten Bakterien
- Multiplex-PCR

Mit der „Carbapenemase-PCR“ werden Nukleinsäuren oder Nukleinsäurefragmente im Gesamtmedium (z.B. Wasser, Abwasser) nachgewiesen. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass sich in

dieser Probe ggf. Plasmide befinden. Es kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob und wie und wann diese fähig sind, in vermehrungsfähige“ Bakterien integriert zu werden. Der alleinige Nachweis von Resistenzgenen beweist nur das Vorhandensein von genetischen Elementen. Der Nachweis ist rein qualitativ. Die Herkunft der Carbapenemasen ist derzeit nicht sicher zu bewerten.

Zudem sind zu einem Zeitpunkt entnommene Untersuchungen in diesem Zusammenhang nicht ohne Weiteres im Hinblick auf eine längerfristige Entwicklung zu interpretieren.

In Bezug auf den molekularbiologischen Nachweis von Resistenzgenen existieren derzeit noch keinerlei standardisierte Methoden.

Die Typisierung bzw. Stammzuordnung von resistenten, klinisch-relevanten Bakterien erfolgt mittels:

- Multi-Locus-Sequenz-Typisierung (MLST)
- Doppel-Locus-Sequenz-typisierung (DLST)
- Staphylokokken Protein A (spa)

### **Chemische Analytik**

Die wasserchemische Analyse der Wasser/Abwasserproben erfolgt auf folgende Antibiotikarückstände:  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, Carbapeneme, Tetracycline, Gyrasehemmer, Sulfonamide, Makrolide, Glykopeptide, zusätzlich Spiramycin und Tylosin.