

# **Antibiotikaresistente Bakterien in Abwasser und Fließgewässern in NRW**

## **Ein Blick in das analytische Vorgehen.**

Wasserhygienetage Bad Elster 2024

Susanne Grobe, Bernd Schwanke - LANUV NRW, FG 64.6 Umweltmikrobiologie

# Antibiotikaresistenz – Ein natürliches Phänomen

- Viele Wirkstoffklassen von Antibiotika natürlichen Ursprungs
- Resistenzen ein natürliches Phänomen
- Antibiotika-Einsatz hat allerdings zur Folge, dass zusätzlich antibakteriell wirksame Substanzen in die Umwelt eingetragen werden



Selektion ARB



Weitergabe über  
vertikalen und/oder  
horizontalen Gentransfer



# Die Umwelt - Reservoir für Antibiotikaresistenzen?



[https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/479/publikationen/181012\\_uba\\_hg\\_an\\_tibiotika\\_bf.pdf](https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/479/publikationen/181012_uba_hg_an_tibiotika_bf.pdf)



<https://www.who.int/publications/i/item/no-time-to-wait-securing-the-future-from-drug-resistant-infections>



<https://www.tagesschau.de/wissen/gesundheit/who-antibiotikaresistenzen-101.html>



[https://www.lanuv.nrw.de/fileadmin/lanuvpub/3\\_fachberichte/LANUV\\_Fachbericht\\_93\\_web.pdf](https://www.lanuv.nrw.de/fileadmin/lanuvpub/3_fachberichte/LANUV_Fachbericht_93_web.pdf)



# Eintragspfade – AB/ARB/ARG → Umwelt

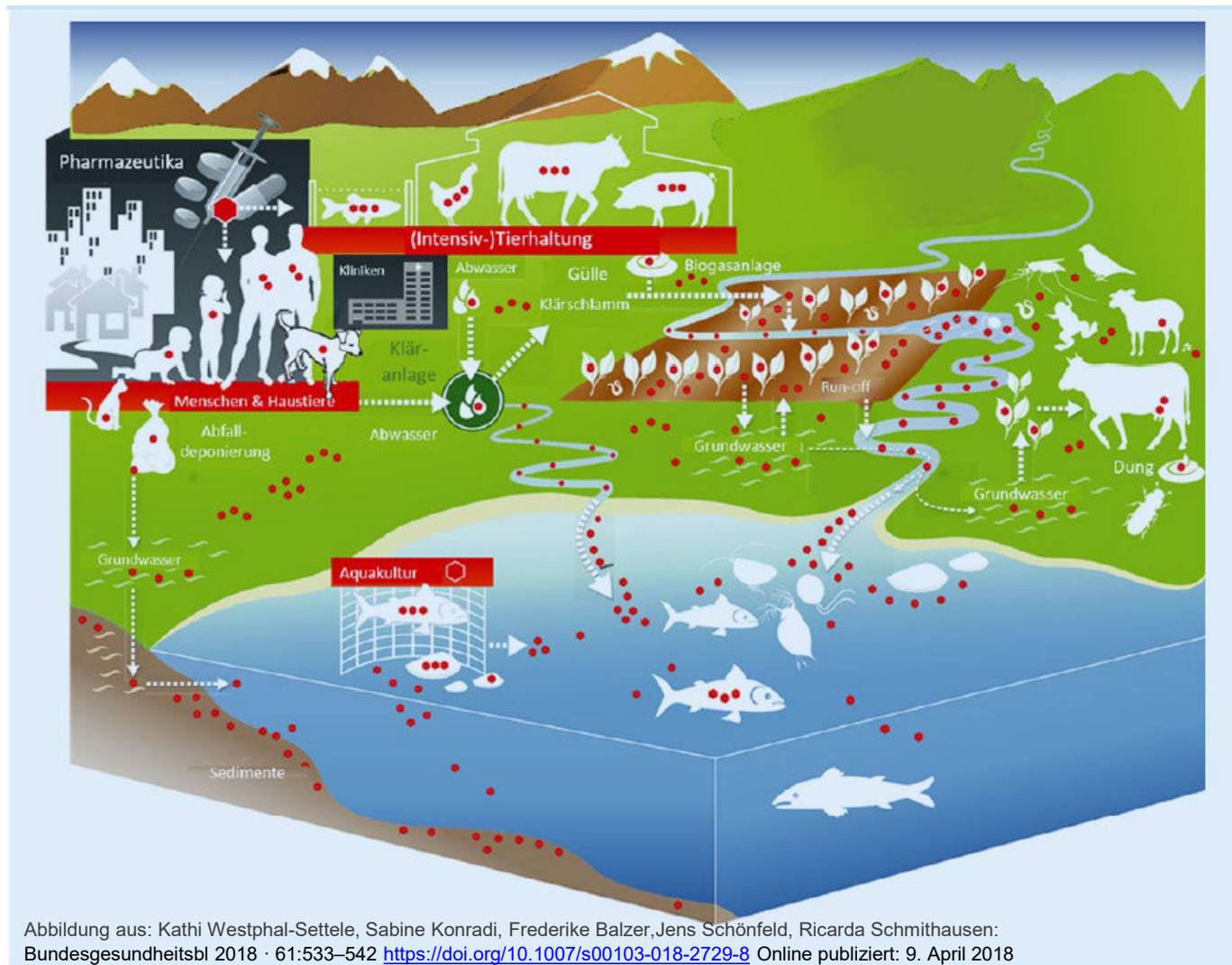


Abbildung aus: Kathi Westphal-Settele, Sabine Konradi, Frederike Balzer, Jens Schönfeld, Ricarda Schmithausen: Bundesgesundheitsbl 2018 · 61:533–542 <https://doi.org/10.1007/s00103-018-2729-8> Online publiziert: 9. April 2018





# LANUV – ARB-Projekt

**Bestandsaufnahme zum Vorkommen abwasserbürtiger antibiotikaresistenter Bakterien in Abwasser und in Gewässern in NRW sowie Aufklärung relevanter Quellen und Eintragspfade in die Umwelt (LANUV-ARB-Projekt)\***

- Überblick bzgl. Vorkommens von **klinisch-relevanten antibiotikaresistenten Bakterien (ARB)** in **Abwässern** und **Oberflächengewässern** in NRW
- Ergebnisse bereits abgeschlossener Projekte auf ihre Übertragbarkeit auf das Land NRW prüfen
- **Abschätzung potenzieller Risiken** für den Menschen

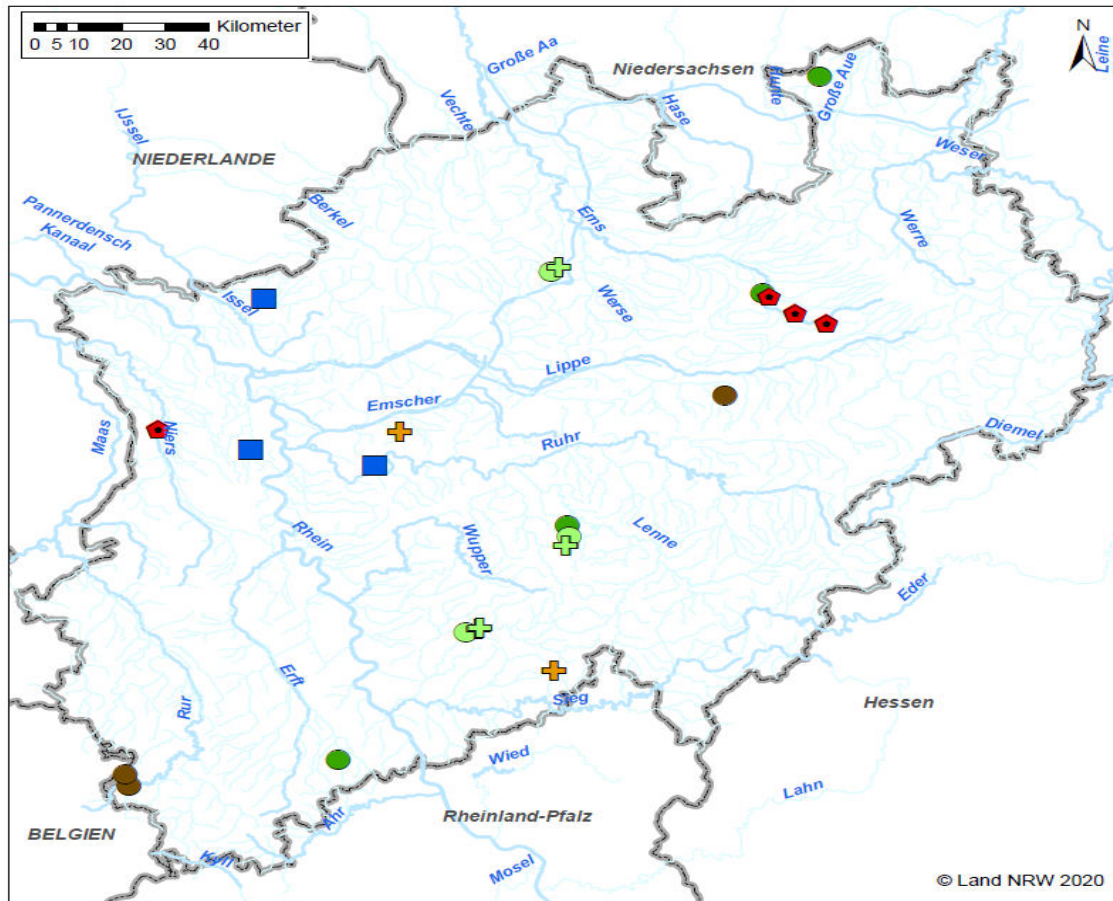


# LANUV – ARB-Projekt

- **Beitragen zu einer Bewertung** von Einträgen und Vorkommen von ARB sowie Resistenzgenen in der aquatischen Umwelt aus hygienischer Sicht
- **Handlungsmöglichkeiten und -notwendigkeiten** identifizieren
- Klären, ob ein dauerhaftes **Gewässermonitoring** auf ARB für NRW notwendig erscheint
- Fokus auf **Abwasser**
- Überprüfung beschriebener bzw. vermuteter **Hotspots** und Eintragspfade
- **Überprüfung** bereits installierter weitergehender **Abwasserbehandlungstechniken** in NRW



# LANUV – ARB-Projekt



Stand: September 2020

## Legende

### Messstellen

- EG-Badegewässer
- Kommunale Kläranlagen mit weitergehender Abwasserbehandlung
- Kommunale Kläranlagen mit hohem Krankenhausabwasseranteil
- ⊕ Krankenhaus
- ⊕ Krankenhaus mit weitergehender Abwasserbehandlung
- ⬠ Betriebe der Fleischwirtschaft

### Gewässerachsen GSK3C

#### Fließgewässer

- Rhein
- Weser, Ems, Maas
- Größere Fließgewässer
- Mittlere Fließgewässer
- Schifffahrtskanäle
- ▭ Staats-, und Landesgrenze

Landesamt für Natur,  
Umwelt und Verbraucherschutz  
Nordrhein-Westfalen



- insgesamt **15 Anlagen**
- mit insgesamt **74 Messstellen**
- 27 amtliche Messstellen, 47 neu dokumentierte Messstellen
- plus drei **EG-Badegewässer**
- und ein **Quellgewässer**



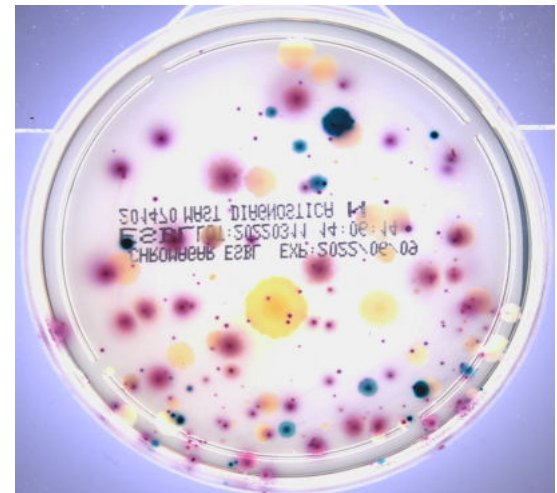
# LANUV – ARB-Projekt

- Antibiotikaresistente **Bakterien** (ARB) mit besonderer klinischer Relevanz
- Antibiotikaresistenzgene (ARG)
- Arzneimittel inkl. **Antibiotika**
- **Hygienische Parameter** (u. a. Badegewässerverordnung)
- **TOC** (Total Organic Carbon) als Vergleichswert

**Heute Fokus:**

ESBL-bildende *E. coli*

ESBL-bildende KEC-Gruppe





# Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase (ESBL)

- Bakterielle Enzyme, die die meisten Penicilline und Cephalosporine spalten können, aber durch  $\beta$ -Lactam-Inhibitoren gehemmt werden können



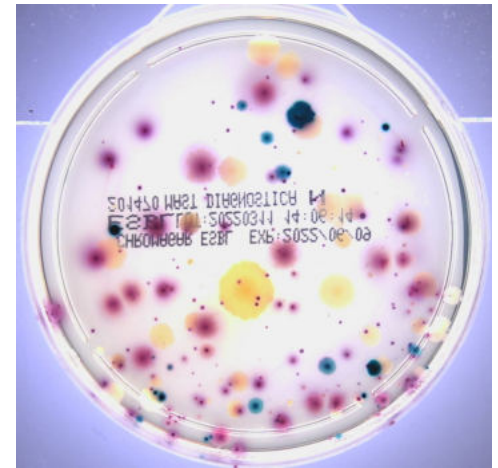
- TEM-, SHV-ESBL früher häufig
- Heute dominieren ESBL des CTX-M-Typs
- bisher mehr als 700 Gene bekannt
- i.d.R. auf hoch mobilen genetischen Elementen (Plasmiden) lokalisiert
- neben vertikalem auch horizontaler Gentransfer möglich

- Verursachen eine Resistenz gegenüber diesen Antibiotika, die zur Therapie von bakteriellen Infektionen wichtig sind
- Zur Therapie von Bakterien mit ESBL können als Alternative auch Carbapenem-Antibiotika angewendet werden



# Ziel der Analytik

- Zielbakterien – hier: *Enterobacterales*  
*Escherichia coli* / KEC-Gruppe  
(*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp.)
- Resistenzmechanismus  
Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase (ESBL)
- Ergebnisangabe (KBE/100 ml)  
Bestätigt: ESBL-bildend *E. coli* / KEC
- Einheitliche Vorgaben  
Probenahme / Analytik / Auswertung / Ergebnisangabe  
valide / reproduzierbar / vergleichbar  
Akzeptanz der Untersuchungsergebnisse durch Dritte



Leistungsmerkmale nach DIN  
EN ISO 13843:2018-03

**Statistisch sicherer quantitativer Nachweis von Zielbakterien mit definiertem Resistenzmechanismus aus komplexen Umweltproben**



# Von der Probe bis zum Ergebnis – Was ist zu beachten?

- **Auswahl Primärkulturmedium**
- Erster Selektionsschritt: CHROMagar ESBL

- **Qualität Nährkulturmedium**
- Eignungsprüfung angelehnt an DIN EN ISO 11133:2020-10

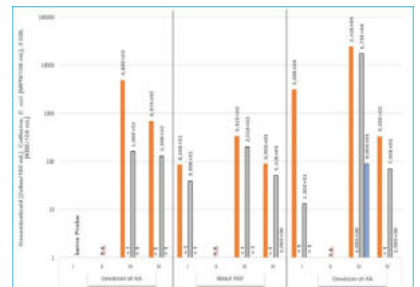
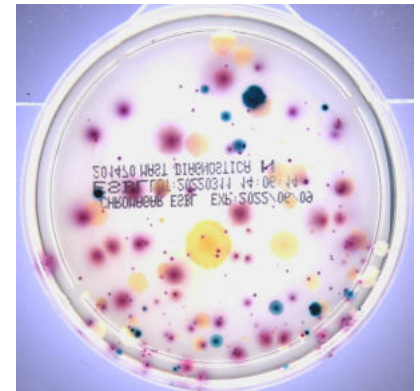
- **Heterogenität von Proben**
- Reproduzierbar homogenisieren

- **Statistisch sicherer quantitativer Nachweis**
- $\geq 10$  Zielkolonien angelehnt an DIN EN ISO 8199:2021-12

- **Zielbakterien vs. Nicht-Zielbakterien**
- Sichere Identifizierung präsumtiver Bakterien

- **Nachweis Resistenzmechanismus**
- Workflow Resistenzmechanismen unter Berücksichtigung EUCAST, NAK etc.


- **Ergebnisangabe**
- Angelehnt an DIN EN ISO 8199:2021-12



LANUV-Arbeitsblatt und Ringversuche



# Primärnähragarmedium zum Nachweis ESBL-bildender *E. coli* und KEC

<u>Agarnährmedium</u>	CHROMagar ESBL
primär zum Nachweis	ESBL Produktion
Hinweis auf Resistenz gegenüber	Cefpodoxim = Cephalosporin 3. Gen.
in Kombination mit	Cloxacillin und Vancomycin (zur Hemmung von Nicht-Zielorganismen)
<b>Beispiel:</b> <b>Krankenhausabwasser</b>  rötlich = <i>E. coli</i> (präsumtiv)  blau = KEC (präsumtiv)	

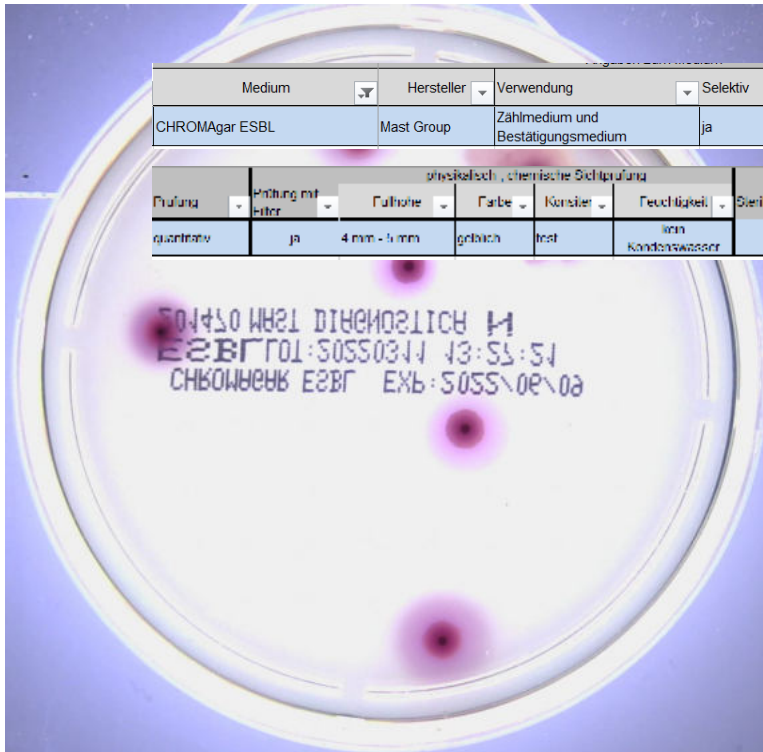






# Eignungsprüfung Nährmedien

- Eignungsprüfung für quantitative Verwendung
- Nährmedien-, Membranfilterüberprüfung; DIN EN ISO 11133:2020-10



Medium	Hersteller	Verwendung	Selektiv	Konsistenz	Typ	Prüfung	Prüfung mit Filter	Füllhöhe	Farbe	Konsistenz	Feuchtigkeit
CHROMagar ESBL	Mast Group	Zählmedium und Bestätigungsmedium	ja	Fest	Fertig zubereitetes Medium	quantitativ	ja	4 mm - 5 mm	gelblich	fest	kein Kondenswasser

physikalisch, chemische Sichtprüfung							Produktivität				
Prüfung	Prüfung mit Filter	Füllhöhe	Farbe	Konsistenz	Feuchtigkeit	Sterilität	zertifiziertes Referenzmaterial	Verdünnung	Referenzmedium	Leistungskriterium	Erwartete Reaktion
quantitativ	ja	4 mm - 5 mm	gelblich	fest	kein Kondenswasser	+	1. Klebsiella pneumoniae ATCC 27053, #50 2. Escherichia coli CCUG 8975, #71	10 <sup>-1</sup> - 10 <sup>-7</sup>	ISA	P <sub>R</sub> > 0,5	max. 1 od. 2 Kolonien

## Leistungskriterien:

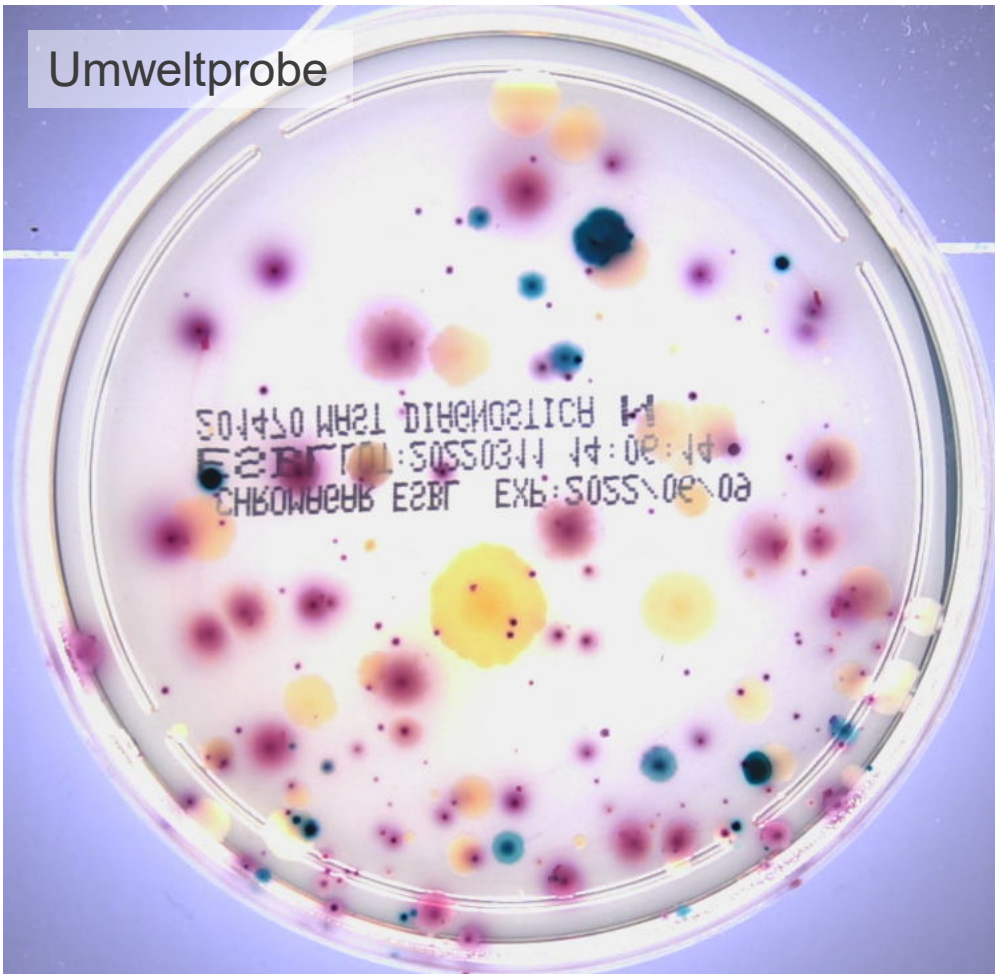
- Produktivität  $P_R > 0,5$
- Selektivität  $S_F \geq 2$



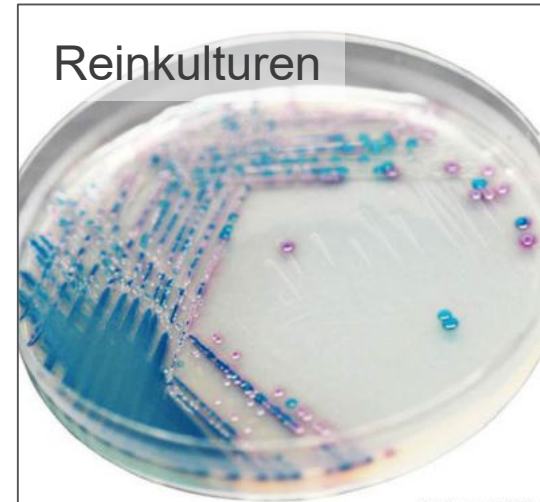
# Präsumtive Zielbakterien

CHROMagar ESBLE: Nachweis von ESBL-produzierenden gramnegativen Bakterien

Umweltprobe



Reinkulturen



Quelle: Mast Diagnostica

All rights reserved CHROMag



• *E.coli* ESBL  
→ dunkel pinkfarben bis rötlich

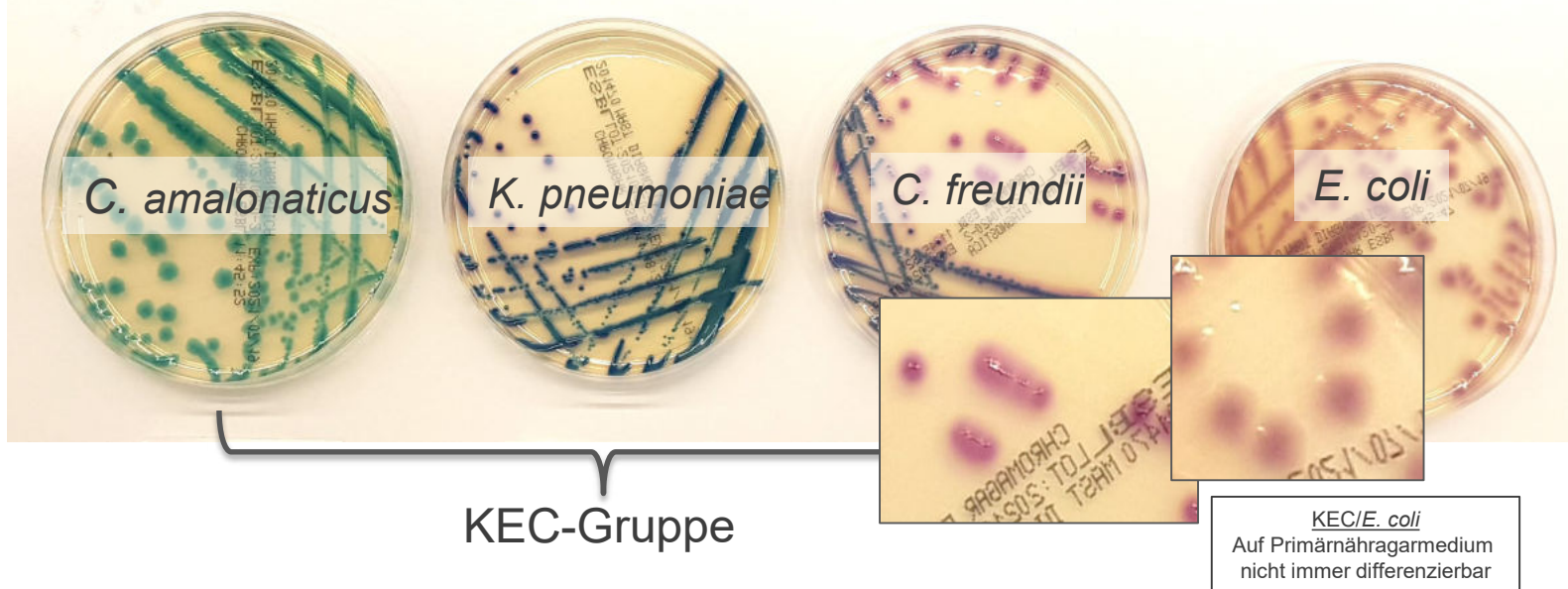


• *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter* ESBL  
→ metallisch blau (+/- roter Hof)

Quelle: Mast Diagnostica



# Sichere Identifizierung präsumtiver Zielbakterien



- Subjektive Inspektion ohne Bestätigung → Fehlinterpretation möglich
- Falsch-positive Befunde durch präsumtives Kolonie-Aussehen von
  - Nicht-Zielorganismen
  - „*E. coli*-Aussehen“ von KEC-Isolaten
- Identifizierung ein MUSS (z.B. MALDI-TOF)



# ESBL-Nachweis

CHROMagar ESBL: Nachweis von ESBL-produzierenden gramnegativen Bakterien

Umweltprobe

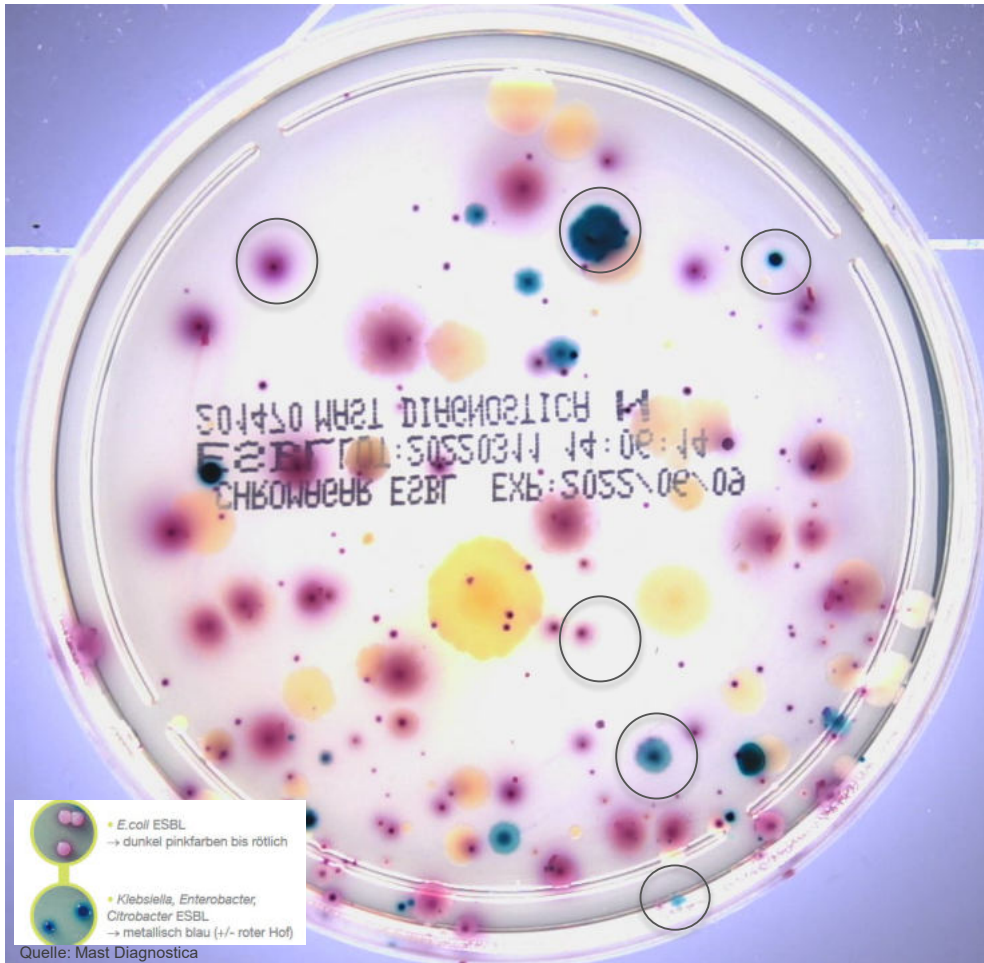


- Phänotypisch nach EUCAST
- Immunochromatographisch mittels Kassettest (CTX-M-Gruppe)
- Molekularbiologisch mittels qualitativer qPCR TEM/SHV/CTX-M/GES





# Statistisch sicherer quantitativer Nachweis



- Mindestens 10 präsumtive Kolonien pro Kolonietyp  
(DIN EN ISO 8199:2021; Kap. 9.1.8.4.1)
  - Farbe
  - Aussehen
  - ggf. Größe
- Weitere Bearbeitung von i.d.R. 20 Isolaten/Probe und Agarnährmedium
- Achtung:
  - Nicht alle Kolonien sind Zielorganismen
  - Nicht alle Zielorganismen tragen den gesuchten Resistenzmechanismus





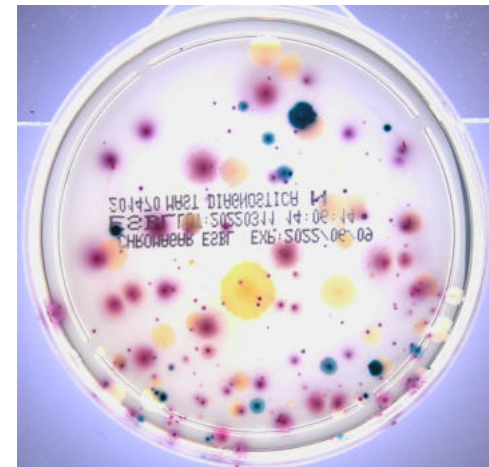
# Ergebnisberechnung, -angabe

## Ergebnisberechnung

- Gewichtetes Mittel bei mehreren auswertbaren Verdünnungsstufen
- Obere Auszählgrenzen beachten
- Endergebnis auf zwei signifikante Stellen runden

## Ergebnisangabe

- ESBL-produzierende *Escherichia coli* KBE/100 mL
- ESBL-produzierende KEC KBE/100 mL



# Weiteres Vorgehen



- Empfehlung zur einheitlichen Probenahme, Analytik, Auswertung und Ergebnisangabe
- Vorschlag für Workflow „Hot-Spot-Analyse“
  - Bzgl. ESBL-ARB
  - Bzgl. Carbapenemase-ARB
  - Bzgl. weitergehenden Untersuchungen bei Kontaminationsquellensuche
- Für interessierte Laboratorien  
Ausrichtung Ringversuch / Laborvergleichsuntersuchung zum Nachweis von ARB in Umweltmatrices



# Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!

**Fachgebiet 64.6**  
**Umweltmikrobiologie / wirkungsbezogene Analytik**

Dr. Susanne Grobe  
Fachgebietsleiterin 64.6  
Umweltmikrobiologie / wirkungsbezogene Analytik  
[susanne.grobe@lanuv.nrw.de](mailto:susanne.grobe@lanuv.nrw.de)

Dipl.-Biol. Bernd Schwanke  
Laborleiter Umweltmikrobiologie  
[bernd.schwanke@lanuv.nrw.de](mailto:bernd.schwanke@lanuv.nrw.de)

