

Prof. Dr. Thomas Schwartz; Dr. Johannes Alexander; Norman Hembach

Identifikation von kritischen Kontrollpunkten für Antibiotikaresistenzen im kommunalen Abwasserkanalsystem

Ein kommunales Abwasserkanalsystem wird derzeit an 20 Stellen systematisch auf die Häufigkeit des Vorkommens von Antibiotikaresistenzgenen, fakultativ pathogenen Bakterien und Multiresistenzen untersucht. So können Belastungs-Hotspots aufgezeigt werden.

Die Relevanz der lokalen und nationalen Überwachung von Antibiotikaresistenzen zur Einführung von Regularien und Inter-

ventionsstrategien ist schon seit längerer Zeit erkannt. Internationale Überwachungsstrategien für Antibiotikaresistenzen fokus-

sieren hauptsächlich auf klinische Bereiche. Eine umfassendere Überwachung von Verbreitungswegen wird jedoch bereits u. a.



Bild 1 Systematische Untersuchung eines kommunalen Abwasserkanalsystems auf die Häufigkeit des Vorkommens von Antibiotikaresistenzgenen
Quelle: esclii/Adobe Stock

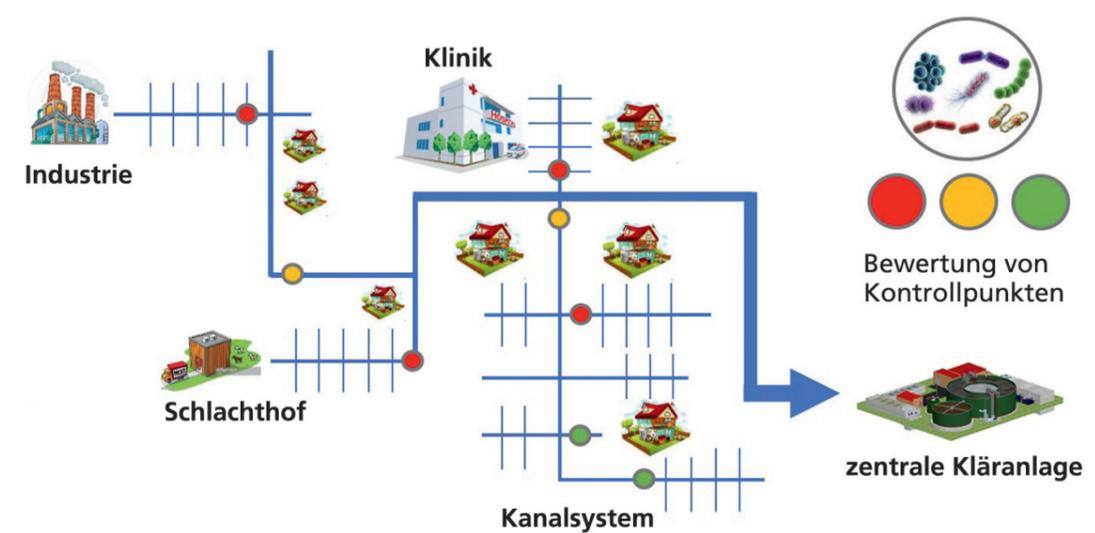


Bild 2 Schematische Darstellung eines städtischen Abwasserkanalsystems mit unterschiedlichen Eintragsquellen.
Quelle: KIT-IfG

von der WHO gefordert. Etliche Studien befassten sich dazu mit der Bewertung von Kläranlagen und zeigten die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Umwelt. Kläranlagen sind jedoch nur als Sammelbecken unterschiedlicher Abwasserbereiche zu werten. So sind bei hoher Belastung mit Antibiotikaresistenzen zentrale Maßnahmen vor Ort zu fordern, gerade wenn nachfolgend Schutzgüter der öffentlichen Gesundheit betroffen sind. Es sollte jedoch gelingen, frühzeitig wichtige Eintragsquellen zu identifizieren, um dann gezielt dezentrale Maßnahmen am Ort der Einleitung und Entsorgung zu ergreifen. Konkret wird zurzeit ein kommunales Abwasserkanalsystem systematisch auf die Häufigkeit des Vorkommens von Antibiotikaresistenzgenen, fakultativ pathogenen Bakterien und Multiresistenzen an insgesamt 20 unterschiedlichen Stellen untersucht. Jede Beprobungsstelle repräsentiert dabei definierte Bereiche der städtischen Kommune, so dass bereits Belastungs-Hotspots aufgezeigt werden konnten, die das Konzept einer Früherkennung von mikrobiellen Belastungen bereits in Kanalsystemen unterstützen.

Einführung eines Früherkennungssystems

Das Management im Umgang mit klinisch bedeutsamen Infektionen sollte zukünftig nicht nur die Behandlung von Patienten betreffen, sondern eben auch die Maßnahmen berücksichtigen, die einer Verbreitung

von Antibiotika-resistenten Mikroorganismen aus z. B. Kliniken und Pflegeheimen entgegenwirken. Die Überwachung eines möglichen Transfers von Organismen in der Bevölkerung, bei Patienten und der Umwelt ist wichtig und sollte immer mitberücksichtigt werden /1/. Verschiedene kulturbasierte und andere (meta-)genomische Verfahren sind mittlerweile verfügbar, um die mikrobielle Diversität im Hinblick auf Antibiotikaresistenzen und multiple Resistenzen auch in der Umwelt zu überwachen /2, 3/. Gerade die Anwendung von molekularbiologischen Technologien eröffnen heutzutage neue Möglichkeiten im Umwelt-Monitoring und der Früherkennung von biologischen Risiken bezüglich Antibiotikaresistenz und Multiresistenzen. Ein Monitoring von Resistenzdeterminanten ist eine bisher noch ungewöhnliche und nur teilweise akzeptierte Praxis. Darüber hinaus fehlt bei diesen Überwachungsanstrebungen oftmals der direkte Bezug zur öffentlichen Gesundheit. Wir wissen zwar, dass der Gebrauch von Antibiotika z. B. in der Human- und Veterinärmedizin erfolgreich eingesetzt wird, dass aber der Missbrauch dieser Wirkstoffe zu einer Selektion und einer Evolution von Resistenzen in Bakterien beiträgt, die in naher Zukunft ein Einsatz von Antibiotika unwirksam machen, wird gerne verdrängt. Eine Unterbindung solcher selektierender Prozesse durch geeignete Strategien der Vermeidung kann dazu beitragen, die Resistenzentwicklung zu stoppen. Dazu zählt eben auch die Implementierung eines Früherkennungssystems von Hotspots der

Emission von Antibiotikaresistenzen und Multiresistenzen im Abwasserbereich von Kommunen.

Das Untersuchungsprogramm

In diesem Untersuchungsprogramm werden verschiedene genomische und kulturbasierte Verfahren genutzt, um Hotspots der mikrobiellen Kontaminationen mit klinisch-relevanten Antibiotikaresistenzgenen und Multiresistenzen im Abwasserkanalnetz einer Stadt (ca. 20.000 Einwohner) zu identifizieren. Diese Art der Früherkennung von Hotspots erfolgt somit schon vor der zentralen Kläranlage, die ein Sammelbecken aller Abwassereinträge darstellt, und ermöglicht dadurch den Nachweis von Hauptemittenten und folglich eine Verursacheridentifizierung.

Eine schematische Darstellung eines solchen Abwasserkanalsystems ist in Bild 2 dargestellt. Es zeigt mögliche kritische Bereiche des Eintrags an Antibiotikaresistenzen und Multiresistenzen, wie Kliniken, Schlachthöfe und Industrie, aber eben auch häusliche Bereiche des Kanalsystems, die im Gesamtvolumen einen Großteil des Abwassers produzieren.

Identifikation von kritischen Kontrollpunkten in einem städtischen Abwasserkanalsystem

Antibiotikaresistente Bakterien und deren Resistenzgene werden oft in Abwassersystemen beobachtet und gelangen über

Tab. 1: Einteilung der klinisch relevanten Antibiotikaresistenzen nach ihren Häufigkeiten und klinischen Bedeutungen als ausgewählte genetische Untersuchungsindikatoren zur Identifizierung von Hotspots. Zusätzlich sind die gewählten Parameter zur Erkennung von multiresistenten Gram-negativen Bakterien nach KRINKO benannt.

Klassifizierung der Antibiotikaresistenzgene nach ihrer klinischen Relevanz		
	Resistenzgen	Art und Funktion
Intermediär vorkommend	<i>bla</i> CMY2	β-Laktamasen; enzymatischer Abbau des Antibiotikums
	<i>bla</i> CTX-M15	
	<i>bla</i> CTX-M32	
	<i>bla</i> OXA48	Carbapenemase; enzymatischer Abbau des Antibiotikums
Kritisch bewertet	<i>mecA</i>	Methicillinresistenz in Staphylokokken; veränderte Zielstruktur so dass β-Laktam-Antibiotika nicht mehr wirken können
	<i>bla</i> NDM-1	Carbapenemase; enzymatischer Abbau des Antibiotikums
	<i>bla</i> KPC-3	
	<i>bla</i> VIM2	
	<i>vanA</i>	Vancomycinresistenz; Strukturänderung im Zielmolekül sodass das Antibiotikum nicht mehr wirken kann
<i>mcr-1</i>	übertragbare Colistinresistenz, sorgt für eine Strukturänderung im Zielmolekül sodass Colistin nicht mehr wirken kann	
Klassifizierung multiresistenter Gram-negativer Bakterien		
	Antibiotikagruppe	Leitsubstanz
EUCAST System	Acylureidopenicilline	Piparacillin
	3./4. Generation Cephalosporine	Cefotaxim und/oder Ceftazidim
	Carbapeneme	Imipenem und/oder Meropenem
	Fluorchinolone	Ciprofloxacin

diese auch in die Umwelt /2, 3, 4/. Die Belastungen von unbehandeltem Abwasser und Kläranlagenabläufen oder Schlamm von Kläranlagen werden u. a. als ursächlich für die Verbreitung von Resistenzen in die aquatische Umwelt angesehen und haben damit eine Signifikanz für die Gefährdung der öffentlichen Gesundheit. Vielfach sind Antibiotika-Resistenzgene und damit auch die bakteriellen Trägerorganismen bereits in weiten Bereichen der aquatischen Umwelt präsent, so dass bei dieser Gruppe der häufig auftretenden Antibiotikaresistenzgene Maßnahmen an der Quelle eine Verbreitung nicht mehr aufhalten oder vermeiden kann /2/. Viele dieser Resistenzgene sind zudem genetisch transferierbar und können über einen horizontalen Gentransfer über eine Bakterienspezies hinaus in der Natur ausgetauscht werden.

Indikatoren für eine Früherkennung von Hotspots

Zur Identifizierung von kritischen Kontrollpunkten ist daher der Blick auf besonders hygienisch relevante Antibiotikaresistenzgene gelegt worden, die gegen Reserveantibiotika gerichtet sind und noch in geringeren bzw. geringen Häufigkeiten in Abwassersystemen mittels genetischen Verfahren gemessen wurden /3, 5/. Dazu zählen die intermediär vorkommenden Carbapenem-Resistenzgene Gram-negativer fakultativ-pathogener Erreger (z. B. *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*) mit den Markergenen *bla*CTX-M32, *bla*CTX-M15, *bla*OXA-48 und *bla*CMY-2. Zu den besonders kritischen und noch relativ selten vorkommenden Resistenzen

gehören das Methicillin-Resistenzgen aus Staphylokokken (*mecA*), das Colistin-Resistenzgen Gram-negativer Bakterien (*mcr-1*), das Vancomycin-Resistenzgen aus Enterokokken (*vanA*) sowie die besonders kritisch zu bewertenden mobilen Carbapenem-Resistenzgene aus Gram-negativen Erregern (*bla*NDM-1 und *bla*KPC3). Zusätzlich wurden über Kulturverfahren und Auswertungen nach KRINKO-Empfehlung des Robert-Koch-Instituts Multiresistenzen für Gram-negative und ESBL-produzierende Bakterien (ESBL: Extended Spectrum Beta-Lactamases) untersucht. Hier wurde speziell auf Multiresistenz gegen 3 und 4 Wirkstoffklassen (3/4 MRGN) untersucht (Tab. 1).

Belastungssituationen über genetische Marker

Die Belastung aller untersuchten Abwassersysteme und Teilbereiche des kommunalen Kanalsystems mit den bereits intermediär vorkommenden Antibiotikaresistenzgenen (blau) zeigt Bild 3 deutlich. Hier betrug der Medianwert aus allen Untersuchungen der 4 Messkampagnen 2,47x10⁷ Genkopien/100 ml Abwasser. Verschiedenste Messungen aus spezifischen Bereichen des Kanalsystems lagen bereits über diesem Median. Dazu zählten sowohl häusliche Bereiche als auch Bereiche mit Kliniken oder Altenpflegeheimen. Ein Verursacherprinzip für Belastungen mit Antibiotikaresistenzen kann man aus dieser Gruppe an intermediär vorkommenden Antibiotikaresistenzgenen nicht mehr ableiten, da sie bereits zu häufig in der spezifischen Konzentration im Abwasser unterschiedlicher Bereiche vorkommen. Ein deutlich differenzierteres Bild zeigen die Untersuchungen zu den als besonders kritisch bewerteten Antibiotikaresistenzgenen gegen die Reserveantibiotika Carbapeneme, Methicillin, Vancomycin und Colistin. Hier ist das durchschnittliche Vorkommen deutlich geringer mit einem Medianwert in allen Untersuchungen von 5,86x10⁴ Genkopien/100 ml. Das entspricht ca. 3 Log₁₀-Stufen weniger als die Gruppe der intermediär vorkommenden Resistenzgene. Dennoch zeigen die quantitativen genomischen Messungen signifikante Hotspots im Auftreten dieser besonders kritischen Parameter an. Diese Hotspots beziehen sich deutlich weniger auf rein häusliche Abwäs-

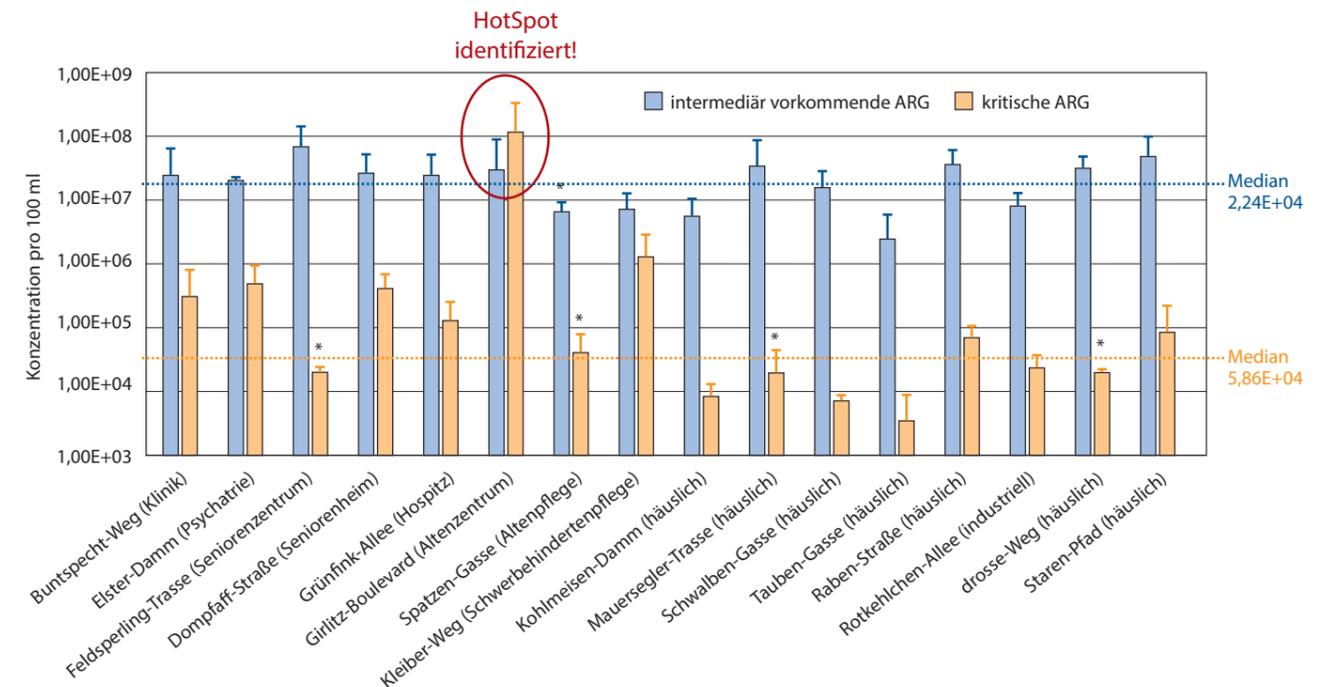
ser, sondern lassen den signifikanten Einfluss von Kliniken und vor allem Altenpflegeeinrichtungen sichtbar werden. An einer Pflegeeinrichtung lag die Abundanz der als besonders kritisch bewertete Parameter sogar über den intermediär vorkommenden Antibiotikaresistenzen. Demzufolge sind nicht nur Kliniken, sondern eben auch Pflegeheime ein Hotspot für den Eintrag von hygienisch relevanten Antibiotikaresistenzen in das kommunale Abwassersystem. Diese Belastung mit Antibiotikaresistenzen wirkt sich auf das Abwasser in den nachfolgenden Abschnitten des Kanalsystems bis hin zur zentralen Kläranlage aus, die dann an zentraler Stelle aus dem Abwasser entfernt werden müssten, um die aquatische Umwelt und damit auch den Menschen zu schützen. Als besonderer Hotspot hat sich das Altenzentrum des „Giriltz-Boulevards“ gezeigt. Hier waren Häufigkeiten als deutlich erhöht für intermediär vorkommende und besonders kritisch zu wertende Resistenzen in den 4 Messkampagnen gemessen worden, so dass man hier dezentral eine Hygienisierung des Abwassers fordern sollte.

Oftmals werden generell Kliniken als „primärer Hotspot“ für die Entstehung und Verbreitung von Antibiotikaresistenzen und entsprechende Genpools über Klinik-assoziierte Routen angesehen /6, 7/. Weltweit erkranken 7 % bis 12 % der Patienten im Krankenhaus an Infektionen, das sind über 1,4 Mio. Personen. Hier können entsprechende Hygienemaßnahmen greifen. Eine Studie des International Nosocomial Infection Control Consortiums beobachtete, dass ca. 46 % der erworbenen Infektionen in Kliniken durch *Enterobacteriaceae* und 27 % auf *P. aeruginosa* zurückzuführen sind, gefolgt von 6 % *Acinetobacter spp.* und 3 % *Staphylococcus aureus* /1/. Unter den *Enterobacteriaceae* ist die stark zunehmende Resistenz gegen die Carbapeneme mit den Resistenzgenen *bla*NDM-1, *bla*OXA-23 und *bla*KPC als Besorgnis erregend zu benennen /1/. Gene, die teilweise auch in den vorliegenden Abwasseruntersuchungen bereits gefunden wurden. Dennoch zeigen sich Altenpflegeheime, die bisher weniger häufig als Hotspot benannt sind, als bedeutende Eintragsquelle gerade was die kritisch

benannten Antibiotikaresistenzen gegen Reserveantibiotika angeht.

Multiresistenz als weiterer Indikator der Früherkennung

Weiterführende Untersuchungen konzentrierten sich auf den Nachweis von Multiresistenzen in Gram-negativen *Enterobacteriaceae* gegen 3 bzw. 4 Wirkstoffklassen an klinisch relevanten Antibiotika. Nach kulturbasierter Vorselektion auf ESBL-produzierende *Enterobacteriaceae* auf einen Selektivagar (ChromAGAR ESBL) wurden je 10 Isolate pro Probenahmestelle im Antibiogrammtest auf Multiresistenz nach KRINKO/RKI überprüft. Die qualitativen (nicht quantitativen) Ergebnisse sind in Tab. 2 für die jeweiligen Probenahmestellen im kommunalen Abwasserkanalsystem aufgeführt. Das Auftreten von 3 aber auch 4 MRGN Isolaten macht einen Zusammenhang mit Abwässern aus Kliniken und Pflegeheimen deutlich sichtbar. Bei diesen Untersuchungen ist jedoch nicht abschätzbar, inwieweit diese multiresistenten Erreger im Kanalsys-



Die Straßennamen sind anonymisiert, lediglich die speziellen Einflussgrößen sind benannt. Gezeigt werden neben den Mittelwerten (Balken) auch die Maximalwerte für intermediäre vorkommende (blau) und kritische Antibiotikaresistenzgene (orange). Die durchschnittlichen Medianwerte der beiden Gruppen an Antibiotikaresistenzgenen sind entsprechend angegeben. Der *Messwert zeigte in 1 von 4 Messkampagnen eine deutlich erhöhte ARG (Antibiotikaresistenzgene) Konzentration an. Für diese Darstellung wurde der Wert nicht gewichtet.

Bild 3 Darstellung der gemessenen Konzentrationen an Antibiotikaresistenzgenen in 100 ml Abwasserprobe verschiedener Probenahmestellen des städtischen Kanalsystems aus 4 zeitversetzten Messkampagnen. Quelle: KIT-IfG

Tab. 2: Vorkommen von ESBL-produzierenden *Enterobacteriaceae* mit phänotypischer 3 bzw. 4-facher Resistenz gegen unterschiedliche Wirkstoffklassen nach KRINKO-Empfehlung.

Messstellen	3MRGN	4MRGN
Buntspecht-Weg (Klinik)	+	+
Elster-Damm (Psychiatrie)	+	-
Feldsperling-Trasse (Seniorenzentrum)	+	+
Dompfaff-Straße (Seniorenheim)	+	-
Grünfink-Allee (Hospitz)	+	-
Girlitz-Boulevard (Altenzentrum)	+	-
Spatzen-Gasse (Altenpflege)	-	+
Kleiber-Weg (Schwerbehindertentpflege)	-	-
Kohlmeisen-Damm (häuslich)	-	-
Mauersegler-Trasse (häuslich)	-	-
Schwalben-Gasse (häuslich)	+	+
Tauben-Gasse (häuslich)	-	-
Raben-Straße (häuslich)	-	-
Rotkehlchen-Allee (industriell)	-	-
Drossel-Weg (häuslich)	-	-
Staren-Pfad (häuslich)	+	-

tem verbreitet werden, so dass auch wie im Falle der „Schwalbengasse“ 3 und 4 MRGN

in ursprünglich häuslichen Abwässern auftreten und nachweisbar waren. Alternativ können auch Ausscheider dieser multiresistenten Bakterien über die Exkremente das entsprechende Abwasser belasten. Es muss bei diesen Untersuchungen immer darauf verwiesen werden, dass es sich bei diesen Kultur-basierten Messungen nicht um quantitative Werte handelt. Es ist daher denkbar, dass die gezeigte Tabelle lediglich Schwerpunkte der Belastung mit Multiresistenzen darstellt, zumal bei den genetischen Untersuchungen gezielt auf Carbapenem-Resistenzgene fokussiert wurde, die als Indikatoren für eine Multiresistenz bei Enterobakterien gewertet werden können /8/. Einige dieser Carbapenem-Resistenzgene wurden schon im überwiegenden Teil der Probennahmestellen und damit auch in häuslichen Bereichen gefunden.

Fazit der Untersuchungen

Es konnte gezeigt werden, dass es durch die Auswahl geeigneter Parameter möglich ist, Hotspots der Einleitung von Antibiotikaresistenzen in das kommunale Kanalsystem aufzuzeigen. Dies könnte dann als Monitoring einer routinemäßig durchgeführten Überwachungsstrategie genutzt werden, um dem Verursacherprinzip zu entsprechen, wenn es um die Forderung nach dezentralen Gegenmaßnahmen zur Einleitung und Verbreitung von Antibiotikaresistenzen geht. Es sind sowohl die quantitative Erfassung von genetischen Determinanten besonders kritischer Antibiotikaresistenzgene als auch die kultur- und Antibiogramm-basierte

Bestimmung von multiresistenten *Enterobacteriaceae* geeignet, Hotspots in kommunalen Kanalsystemen zu identifizieren. Letztlich geht es darum, dem Verursacherprinzip entsprechend vor Ort Maßnahmen zu initialisieren, um zentrale Kläranlagen zu entlasten und damit einer Verbreitung in der aquatischen Umwelt entgegenwirken zu können. Dies spielt gerade dann eine große Rolle, wenn Schutzgüter wie Wasserreservoirs, Badegewässer, Gewässer der Freizeitnutzung und Wässer, die in der Landwirtschaft z. B. zur Beregnung genutzt werden, betroffen sind.

■ Prof. Dr. Thomas Schwartz

KIT Karlsruhe Institut für Technologie

thomas.schwartz@kit.edu

www.ifg.kit.edu

■ Dr. Johannes Alexander

KIT Karlsruhe Institut für Technologie

■ Norman Hembach

KIT Karlsruhe Institut für Technologie

Danksagung

Die Autoren danken der Stadtentwässerung einer mittelgroßen Stadt (20.000 Einwohner) für die Kooperation und den Zugang zu Abwasserproben aus dem kommunalen Kanalsystem. In besonderem Maße wird für die finanzielle Unterstützung gedankt. Weiterhin danken wir dem BMBF, Projektträger Karlsruhe, da über das HyReKA-Projekt die genannten Messparameter definiert wurden.

Literatur:

- /1/ Dafale, N.; Purohita, H. (2016): Genomic tools for the impact assessment of Hotspots for early warning of MDR threats *Biomed Environ Sci* 29(9); 6556-674
- /2/ Hembach, N.; Schmid, F.; Alexander, J.; Hiller, C.; Rogall, E. T.; Schwartz, T. (2017): Occurrence of the mcr-1 colistin resistance gene and other clinically relevant antibiotic resistance genes in microbial populations at different municipal wastewater treatment plants in Germany. *Front Microbiol* 8:1282
- /3/ Alexander, J.; Hembach, N.; Schwartz, T. (2019): Die Problematik der Antibiotika-resistenten Bakterien. *wwt Sonderausgabe Modernisierungsreport 2019/20*, S. 52-57
- /4/ Alexander, J.; Hembach, N.; Schwartz, T. (2020): Evaluation of antibiotic resistance dissemination by wastewater treatment plant effluents with Different catchment areas in Germany. *Sci Rep* 10(1):8952
- /5/ Hembach, N.; Alexander, J.; Hiller, C.; Wieland, A.; Schwartz, T. (2019): Dissemination prevention of antibiotic resistant and facultative pathogenic bacteria by ultrafiltration and ozone treatment at an urban wastewater treatment plant. *Sci Rep* 9:12843
- /6/ Sib, E.; Voigt, A. M.; Wilbring, G.; Schreiber, C.; Faerber, H. A.; Skutlarek, D.; Parcina, M.; Mahn, R.; Wolf, D.; Brossart, P.; Geiser, F.; Engelhart, S.; Exner, M.; Bierbaum, G.; Schmithausen R. M. (2019): Antibiotic resistant bacteria and resistance genes in biofilms in clinical wastewater networks. *Int J Hyg Environ Health* 222(4): 655-662
- /7/ Sib, E.; Lenz-Plet, F.; Barabasch, V.; Klanke, U.; Savin, M.; Hembach, N.; Schallenberg, A.; Kehl, K.; Albert, C.; Gajdiss, M.; Zacharias, N.; Müller, H.; Schmithausen, R. M.; Exner, M.; Kreyenschmidt, J.; Schreiber, C.; Schwartz, T.; Parcina, M.; Bierbaum, G. (2020): Bacteria isolated from hospital, municipal and slaughterhouse wastewaters show characteristic, different resistance profiles. *Sci Total Environ*. 746:140894
- /8/ Robert Koch-Institut: EUCAST-Neudefinition der Kategorie „I“ – zum Umgang hinsichtlich der Meldepflicht. *Epid Bull* 2019;9:84 | DOI 10.25646/5917