



GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

HyReKA

Hygienisch-medizinische Relevanz und Kontrolle Antibiotika-resistenter
Krankheitserreger in klinischen, landwirtschaftlichen und kommunalen
Abwässern und deren Bedeutung in Rohwässern

Methodenkompodium der Laboranalytik

Bonn, Karlsruhe, Dresden 2020

Verbundpartner

Projektleitung

Prof. Dr. med. Dr. h.c. Martin Exner, Universität Bonn / Universitätsklinikum Bonn

Projektkoordination

Dr. med. Dr. agr. Ricarda Schmithausen Universität Bonn / Universitätsklinikum Bonn

Telefon: +49 228 287 13452; Fax: +49 228 287 15645

ricarda.schmithausen@ukbonn.de

Prof. Dr. Thomas Schwartz (Karlsruher Institut für Technologie)

Telefon: +49 721-608-26802; Fax: +49 721-608-26858

thomas.schwartz@kit.edu

Forschungspartner



Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

Hermann-von Helmholtz Platz 1

76344 Eggenstein-Leopoldshafen

Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG)

Ansprechpartner: Prof. Dr. Thomas Schwartz

Telefon: +49 721-608-26802; Fax: +49 721-608-26858

thomas.schwartz@kit.edu

Institut für Mikrosystemtechnik (IMT)

jetzt: Universität Freiburg,

Institut für Mikrosystem Technik IMTEK)

Ansprechpartner: Prof. Dr. Bastian E. Rapp

Tel.: +49 761 203 7351;

bastian.rapp@imtek.uni-freiburg.de



Universitätsklinikum Bonn

**Institut für Hygiene und öffentliche Gesundheit (IHPH)**

Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Exner

Venusberg-Campus 1

53127 Bonn

Ansprechpartner: Dr. med. Dr. h.c. M. Exner

Tel: +49 228287-15520; Fax 49 228287-16545

martin.exner@ukbonn.de

Dr. C. Schreiber

Tel: +49 228 287-16862 bzw. -14885;

Fax: +49 228 287-19516 Christiane.Schreiber@ukbonn.de
(AG Med Geo)

Prof. Dr. T. Kistemann

Tel: +49 228 28714885 Fax: +49 228 287-19516

Thomas.Kistemann@ukbonn.de (AG Med Geo)

Dr. H. Färber

Tel: +49 228 2871-6864, Fax: +49 228 2871 -1144

Harald.Faerber@ukbonn.de (Wasserchemie)

Prof. Dr. med. S. Engelhart

Tel.: +49 228 2871-4434, Fax. + 48 228 2871-5645

Steffen.Engelhart@ukbonn.de (Abt. Krankenhaushygiene)

IMMIP**Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie (IMMIP)**

Venusberg-Campus 1

53127 Bonn

Ansprechpartner: Prof. Dr. G. Bierbaum

Tel. 228-2871 9103; Fax 228-2871 4808

g.bierbaum@uni-bonn.de

Dr. M. Parcina

Tel.: +49 228 2871 5952

parcina@uni-bonn.de



Universität Bonn

food·net·center**bonn**



Landwirtschaftliche Fakultät

International FoodNetCenter (FNC)

Fokusgruppe „Food Waste“

Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften (IEL), Lebensmittelverfahrenstechnik

Katzenburgweg 7-9

53115 Bonn

Ansprechpartner: Prof. Dr. Judith Kreyenschmidt,

Tel.: +49 228 733886, Fax.: +49 228 732617

j.kreyenschmidt@uni-bonn.de

Fokusgruppe „One Health“

Institut für Tierwissenschaften (ITW), Präventives Gesundheitsmanagement

Katzenburgweg 7-9

53115 Bonn

Ansprechpartner: Prof. Dr. Brigitte Petersen

Tel.: +49 228 732821, Fax.: +49 228 736517

b-petersen@uni-bonn.de

Dr. Julia Steinhoff-Wagner

Tel.: +49 228 731977, Fax.: +49 228 736517

jste@itw.uni-bonn.de



**TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DRESDEN**

Technische Universität Dresden

Institut für Hydrobiologie

Drudebau

Zellescher Weg 40

01062 Dresden

Ansprechpartner: Prof. Dr. Thomas U. Berendonk

Tel. +49 351-463 4 2379; Fax: +49 351-463 3 7108

Thomas.Berendonk@TU-Dresden.de

**RWTH Aachen**

Institut für Siedlungswasserwirtschaft der RWTH Aachen
Mies-van-der-Rohe-Straße 1
52074 Aachen

Ansprechpartner: Prof. Dr.-Ing. Johannes Pinnekamp
Telefon: +49 241 8025207
isa@isa.rwth-aachen.de

**Umweltbundesamt Bad Elster**

Heinrich-Heine-Straße 12
08645 Bad Elster

Ansprechpartner:
Dr. Claudia Strobel
Claudia.strobel@uba.de

**TZW Karlsruhe**

DVGW-Technologiezentrum Wasser
Umweltbiotechnologie und Altlasten
Karlsruher Straße 84
76139 Karlsruhe

Ansprechpartner:
Prof. Dr. Andreas Tiehm, Dipl. Ing. Claudia Stange
Tel: +49 721 9678-137; Fax: +49 721 9678-101
andreas.tiehm@tzw.de; claudia.stange@tzw.de

**Erftverband Bergheim**

Am Erftverband 6
50126 Bergheim

Ansprechpartner: Dr. Christian Gattke
Tel: +49 2271 88 1245 , Fax: +49 2271 88 1261
christian.gattke@erftverband.de

**Oldenburgisch-Ostfriesischer Wasserverband (OOWV)**

Hauptverwaltung Brake

Georgstraße 4

26919 Brake

Ansprechpartner:

Frau Ulrike Biebert-Petermann, Herr Jürgen Wachtendorf,
Frau Silke Bücken,

Tel: +49 441 40837-601; Fax: +49 441 40837-623

buecker@oowv.de; wachtendorf@oowv.de

Zweckverband
Klärwerk Steinhäule**Zweckverband Klärwerk Steinhäule**

Reinzstr. 1

89233 Neu-Ulm

Ansprechpartner: Herr Christian Hiller,

Tel.: +49 731 97972137; Fax.: +49 731 97972 43

c.hiller@klaerwerk-steinhaeule.de

**Xylem Services GmbH**

Boschstr. 4 – 14

32051 Herford

Ansprechpartner: Arne Wieland

Tel: +49 5221 930-129; Fax: +49 5221 930-108

Arne.Wieland@xylem-inc.com

Das Verbundprojekt „HyReKA“ wird vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) als Teil der Fördermaßnahme „Risikomanagement von neuen Schadstoffen und Krankheitserregern im Wasserkreislauf (RiSKWa)“ unter dem Förderkennzeichen 02WRS1377A-K gefördert. Es wird betreut vom Projektträger Karlsruhe (PTKA).

GEFÖRDERT VOM

Bundesministerium
für Bildung
und ForschungPTKA
Projektträger Karlsruhe
Karlsruher Institut für Technologie

Inhalt

Abbildungen	X
Tabellen	X
Abkürzungen	XI
Einleitung.....	- 1 -
1 Säule: Kultivierungsverfahren zur Anreicherung und Identifizierung von Antibiotika-resistenten Bakterien (spezifische Nährmedien, Antibiogramme).....	1
1.1 Probenahmen.....	7
1.1.1 Sanitärprobenahme (Probenahme im Patientenzimmer).....	7
1.1.2 Automatisierte 24-Stunden Mischprobe von Abwasser und an Gewässern.....	8
1.1.3 Qualifizierte Stichprobe von Abwasser und an Gewässern	8
1.1.4 Ereignis-abhängige Probenahmen von Niederschlags-Abflüssen aus Kanalisation und Landschaft	9
1.1.5 Probenahme von Biofilmen aus Kläranlagen und Gewässern	9
1.1.6 Muscheln (Bivalvia) aus Fließgewässern	10
1.2 Bestimmung der Vor-Ort-Parameter	11
1.3 Kultivierung hygienisch-relevanter mikrobiologischer Parameter	12
1.4 Quantitative Analyse antibiotika-resistenter Bakterien	13
1.4.1 MRSA	13
1.4.2 VRE	15
1.4.3 ESBL-bildende Bakterien	16
1.5 Indikatorparametern	19
1.5.1 <i>Escherichia coli</i> , Enterokokken, Pseudomonaden.....	19
1.5.2 <i>Acinetobacter</i> spp.	20
1.6 Angabe des Ergebnisses und Dokumentation	21
1.6.1 Validierung.....	22
1.6.2 Abweichende Methodik für Proben des Fallbeispiels Flughafenabwässer:.....	22
1.6.3 Abweichende Methodik für Proben des Fallbeispiels agro-industrielle Abwässer:	22
1.6.4 Artbestimmung der Antibiotika-resistenten Bakterien	23
1.6.5 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen	23
1.7 Während des HyReKA-Projekts entstandene Veröffentlichungen zur weiterführenden Information	25
1.8 Literatur	26
1.9 Anhang.....	27

2	Säule: Typisierung von Bakterienisolaten und Bestimmung der Resistenzgene über Taqman-PCR	29
2.1	Kurze Einführung in die Messprinzipien	31
2.2	Allgemeines Vorgehen	32
2.2.1	Benötigte Geräte für alle Typisierungen	32
2.2.2	DNA-Aufreinigung	32
2.2.3	PCR	32
2.2.4	Agarosegelelektrophorese und Aufreinigung der PCR-Produkte.....	33
2.3	Typisierungsmethoden nach Organismen geordnet	33
2.3.1	Spa-Typisierung <i>Staphylococcus aureus</i> (Harmsen et al., 2003)	33
2.3.2	MLST-Typisierungen.....	34
2.3.3	<i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i> cplx	35
2.3.4	<i>Citrobacter freundii</i>	36
2.3.5	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	37
2.3.6	<i>Enterococcus faecium</i>	38
2.3.7	<i>Escherichia coli</i>	39
2.3.8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	40
2.3.9	<i>Klebsiella oxytoca</i>	41
2.3.10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42
2.3.11	DLST <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43
2.4	Bestimmung von Resistenzgenen aus kultivierten Antibiotika-resistenten Bakterien	45
2.4.1	DNA Extraktion aus bakteriellen Kolonien	45
2.4.2	Real-time PCR	45
2.4.3	Mastermix Präparation	46
2.4.4	Primer und Sonden	46
2.4.5	Temperaturprofil.....	48
2.5	Literatur	49
2.6	Während des HyReKA-Projekts entstandene Veröffentlichungen zur weiterführenden Information	50
3	Säule: Kulturunabhängige molekularbiologische Identifizierung und Quantifizierung von Antibiotikaresistenzgenen und von Genen fakultativ-pathogener Bakterienspezies (qPCR/ddPCR)	51
3.1	Vorbereitung: DNA Extraktion aus Wasser- und Feststoffproben	53
3.1.1	Probenahme	53
3.1.2	Lebend/Tot Diskriminierung mittels PMA.....	53
3.1.3	Extraktion genomischer DNA aus Wasserproben.....	54
3.1.4	Extraktion genomischer DNA aus Feststoffproben	55
3.1.5	Überprüfung der DNA Integrität und DNA-Konzentration.....	55
3.2	Quantitative Analyse mittels quantitativer Real-Time PCR.....	56
3.2.1	Molekularbiologische Nachweissysteme für Antibiotikaresistenzgene und fakultativ pathogene Bakterien	56
3.2.2	Durchführung der quantitative Real-Time PCR	59
3.2.3	Generierung einer Kalibriergeraden	59
3.2.4	Quantitative Analyse einer Probe	60

3.3	Quantitative Analyse mittels digitaler droplet PCR	62
3.3.1	Durchführung der Quantifizierung molekularbiologischer Parameter ohne Kalibriergerade mit Hilfe der Digitalen Droplet PCR (ddPCR)	62
3.4	Während des HyReKA-Projekts entstandene Veröffentlichungen zur weiterführenden Information	64
3.5	Literatur	65
3.6	Anhang	67
3.6.1	Fallbeispiel 1: Erstellung einer Kalibriergeraden	67
3.6.2	Fallbeispiel 2: Quantitative Analyse einer unbekannten Probe	68
3.6.3	Fallbeispiel 3: Quantitative Analyse einer Probe mittels ddPCR	69
4	Säule: Chemisch-analytische Rückstandsanalyse von Antibiotika: Quantitative Bestimmung von Antibiotikarückständen in wässrigen Matrices mittel LC- MS/MS	71
4.1	Anwendungsbereich	74
4.2	Begriffe	75
4.3	Grundlage des Verfahrens	76
4.4	Materialien und Chemikalien	77
4.4.1	Chemikalien	77
4.4.2	Verbrauchsmaterialien	77
4.4.3	Geräte	78
4.4.4	Probenahme	78
4.4.5	Durchführung	79
4.5	Auswertung	80
4.6	Angabe der Ergebnisse	81
4.7	Literatur	82
4.8	Anhang	83

Abbildungen

Abbildung 4.1:	Wirkmechanismus von PMA	53
Abbildung 4.2:	Auswertung der ddPCR über die Software QuantaSoft.	69

Tabellen

Tabelle 1.1:	Merkmale von E. coli, KEC, Proteus, Pseudomonas und Acinetobacter auf CHROMagar TM ESBL	17
Tabelle 1.2:	Morphologie von A. baumannii auf CHROMagar TM Acinetobacter und Columbia-Blutagar.	21
Tabelle S1.3:	organo-leptischer Vor-Ort-Parameter bei Gewässern und Abwasser.	27
Tabelle 3.1:	Zusammensetzung des Mastermixes pro PCR Reaktion.....	46
Tabelle 3.2:	Primer und Sonden zur Detektion der Resistenzgene	46
Tabelle 3.3:	Zyklusbedingungen der multiplex qPCR	48
Tabelle 4.1:	Real-Time Primersysteme zur Detektion von klinisch relevanten Antibiotikaresistenzgenen und fakultativ pathogenen Bakterien.	58
Tabelle 5.1	Charakterisierung der Leermatrizes Trinkwasser (TW), Grundwasser (GW) und Oberflächenwasser (OFG) nach Voigt et al. (2019). ^[1]	74
Tabelle 5.2	Benötigte Chemikalien und Lösemittel für die Probenvorbereitung und messtechnische Durchführung der vorgestellten Methode.	77
Tabelle 5.3	Herzustellende Lösungen für die Probenvorbereitung und messtechnische Durchführung der vorgestellten Methode.	77
Tabelle 5.A1:	Berechnete Wiederfindung ± relative Standardabweichung (RSD) ermittelt aus dotiertem Trinkwasser (0,05 µg/L, 0,1 µg/L, 0,5 µg/L, 2,0 µg/L) nach Voigt et al. (2019) ^[1]	83
Tabelle 5.A2:	Berechnete Wiederfindung ± relative Standardabweichung (RSD) ermittelt aus dotiertem Oberflächenwasser (0,05 µg/L, 0,1 µg/L, 0,5 µg/L, 2,0 µg/L) nach Voigt et al. (2019) ^[1]	84
Tabelle 5.A3:	Berechnete Wiederfindung ± relative Standardabweichung (RSD) ermittelt aus dotiertem Grundwasser (0,05 µg/L, 0,1 µg/L, 0,5 µg/L, 2,0 µg/L) nach Voigt et al. (2019) ^[1]	85
Tabelle 5.A4:	Berechnete Wiederfindung ± relative Standardabweichung (RSD) ermittelt aus dotiertem behandeltem Abwasser (0,05 µg/L, 0,1 µg/L, 0,5 µg/L, 2,0 µg/L) nach Voigt et al. (2019) ^[1]	86

Abkürzungen

3GCR	Drittgenerations-Cephalosporin-resistent
3MRGN	Multiresistente gramnegative Stäbchen mit einer Resistenz gegen 3 der 4 Antibiotikagruppen
4MRGN	Multiresistente gramnegative Stäbchen mit einer Resistenz gegen 4 der 4 Antibiotikagruppen
°C	Grad Celsius
ABR	Antibiotikaresistenzen
AmpC	AmpC betalactamasen
AMG	Arzneimittelgesetz
AR	Antibiotikarückstände
ARB	antibiotikaresistente Bakterien
ARG	Antibiotikaresistenzgene
AST	automatic susceptibility typing
BD	Becton Dickinson GmbH
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
BMG	Bundesministerium für Gesundheit
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
CFU	colony forming units
cm	centimeter
CTX-M	cefotaximase-Munich type betalactamase
DART	Deutsche Antibiotika-Resistenzstrategie
DDD	Definierte Tagesdosis (<i>Defined daily dose</i> , engl.)
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
e.g.	<i>exempli gratia</i>
EG	Europäische Gemeinschaft
ESBL(s)	extended-spectrum betalactamase(s)
ESBL	extended-spectrum betalactamase-producing <i>Enterobacteriaceae</i>
E.U.	European Union
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GC	Gaschromatographie
HACCP	hazard analysis and critical control points
HGT	Horizontaler Gentransfer
HPCIA	<i>Highest Priority Critically Important Antimicrobials</i> , engl.
HPLC-MS/MS	Hochleistungsflüssigchromatographie gekoppelt mit Tandemmassenspektrometer
HyReKA	Biologische bzw. hygienisch-medizinische Relevanz und Kontrolle Antibiotika-resistenter Krankheitserreger in klinischen, landwirtschaftlichen und kommunalen Abwässern und deren Bedeutung in Rohwässern
i.e.	<i>id est</i>
IE	Intestinale Enterokokken

IHPH	Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit des Universitätsklinikums Bonn
IMMIP	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie
IncN	incompatibility group N
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
KEC	<i>Klebsiella</i> spez., <i>Enterobacter</i> spez. und <i>Citrobacter</i> spez.
KRINKO	Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention
LC	Flüssigchromatographie (<i>liquid chromatography</i> , engl.)
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization time-of-flight mass spectrometry
MDR	Multiresistent (<i>multi drug resistant</i> , engl.)
mecA	methicillin resistance determinant
MGE	Mobile genetische Elemente
MHK	Minimale Hemmkonzentration
min	Minute(s)
µl	microliter
ml	milliliter
µm	micrometer
MLST	multilocus sequence typing
mm	millimeter
MRE	Multiresistente Erreger
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
n.a.	not applied
n.d.	not determined
NDM	New Delhi metallo-beta-lactamase
ng	nanogramm
NRW	<i>Nordrhein-Westfalen</i>
OR	Odds Ratio
OXA	oxacillin-resistant-type beta-lactamase
OXA-48	oxacillin resistant
PBP	penicillin binding protein
PCR	Polymerase Chain Reaction
PNEC _{Res}	<i>Predicted-No-Effect-Concentration</i> ³ , engl.
R	Resistenz gegen ein Antibiotikum
S	Sensibilität gegen ein Antibiotikum
RKI	Robert Koch-Institut
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>spa</i> type	<i>Staphylococcus aureus</i> protein A gene typing
spp.	<i>species pluralis</i>
TEM	Temoneira-type beta-lactamase
VIM	Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i> , engl.)
XDR	Extrem resistant (<i>extensively drug resistant</i> , engl.)

Einleitung

Die Verbreitung von klinisch relevanten Antibiotikaresistenzgenen (ARGs) und Antibiotika-resistenten Bakterien (ARBs) aus anthropogenen Quellen sowie der exzessive und unsachgemäße Einsatz von Antibiotika in Human- und Veterinärbereichen, stellen ein zunehmendes Problem im Umweltbereich dar. Über verschiedene Eintragspfade gelangen diese Bakterien mit obligat- und fakultativ-pathogener Bedeutung in die aquatische Umwelt und von dort, über den aquatischen Nutzungspfad, wieder zurück zum Menschen, zu Nutztieren oder auf Nutzpflanzen. Zurzeit gibt es keine adäquaten Risikoabschätzungen, die die Wirkungen von Antibiotika und Antibiotikaresistenzgenen auf das Auftreten und die Selektion von Resistenzen in Bakterien, vor allem im nicht-klinischen Umweltbereich, abbilden können.

Seit den 40iger Jahren des letzten Jahrhunderts wurden 18 Wirkstoffgruppen definiert und eine große Zahl von Wirkstoffpräparaten von Pharmaunternehmen auf den Markt gebracht. Mit dem Einsatz dieser Präparate konnte man eine Zunahme der Resistenzentwicklung bei Bakterien gegen diese Wirkstoffe erkennen. Die Konsequenz aus dieser Resistenzdynamik ist die Neuentwicklung von antibakteriellen Wirkstoffen. Während in den Jahren 1994 bis 2004 noch 16 neue Präparate auf den deutschen Markt kamen, reduzierte sich die Zahl der Neuzulassungen in den Jahren 2004-2013 auf nur 7, trotz gleichbleibend hoher Resistenzentwicklung bei den Infektionserregern. In letzter Zeit wird immer mehr beschrieben, dass die Forschung der pharmazeutischen Industrie nach neuen antibiotisch wirkenden Substanzen aus ökonomischen Gründen eingestellt wird. Es muss also davon ausgegangen werden, dass aufgrund dieser Problematik die Ära einer erfolgreichen Antibiotikatherapie bei bakteriellen Infektionen zu Ende gehen wird.

Die globale Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen (ARG) und ihrer Aufnahme durch klinisch relevante Mikroorganismen geht einher mit einer steigenden Hospitalisierung und Sterblichkeitsrate von Patienten, die mit diesen Mikroorganismen infiziert sind (World Health Organisation, Antimicrobial resistance: global report on surveillance, 2014). Man geht davon aus, dass in Deutschland mindestens 7.500-15.000 Sterbefälle in Krankenhäusern auf Infektionen mit multi-resistenten Bakterien zurückgeführt werden können. Schätzungen zu Infektionen und Sterblichkeit für das Jahr 2013 gehen davon aus, dass bei 15.000 Methicillin resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Infektion die Sterblichkeit bei 39% lag, im Falle von Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium/faecalis* (VRE) mit 13.750 dokumentierten Infektion lag die Sterblichkeitsrate zwischen 21 und 35.5%, bei 9500 Infektionen mit resistenten *E. coli* (ESBL) lag die Sterblichkeit bei 47% und bei 2000 erfassten Infektionen mit resistenten *Klebsiella pneumoniae* lag die Sterblichkeitsrate sogar bei über 50%. Die zusätzlichen Kosten, die bei einer Behandlung eines Patienten mit einer Infektion durch resistente Keime entstehen, belaufen sich auf durchschnittlich 13.000 bis 30.000 €, je nach Infektionserreger.

Im Gegensatz zu vielen chemischen Kontaminanten, deren Konzentrationen durch Abbau, Verdünnung oder Sorption typischerweise verringert wird, sind bakterielle Kontaminationen fähig in der Umwelt zu persistieren und sich dort auch auszubreiten. Dies bezieht sich nicht nur auf die Bakterienspezies selbst, sondern auch auf deren Resistenzgene als Teil ihres Erbguts und als freie DNA vorliegende Resistenzgene. Die Antibiotikaresistenzgene, die von die-

sen bakteriellen Kontaminanten im Genom getragen werden, können innerhalb der Populationen auf andere Bakterien übertragen werden und damit zur Evolution und Anpassung von Mikroorganismen an Stresssituationen beitragen. Dieses natürliche Verhalten des Gentransfers kann zu einem potentiellen Gefährdungspotential für den Menschen werden und aktuelle Veröffentlichungen zeigen bereits, dass in Abwasser beeinflussten aquatischen Habitaten die Häufigkeiten an klinisch-relevanten Resistenzgenen gegen Vancomycin und Imipenem in der Gesamtpopulation deutlich höher sind, als das Vorhandensein der eigentlichen Resistenzträgerorganismen. Dies konnte nur mit Hilfe von kombinatorischer Analyseverfahren erfasst werden. Die vermehrte Verbreitung von Antibiotika-resistenten Bakterien in der Umwelt basiert wohl auf 3 wesentlichen Mechanismen, die sich gegenseitig beeinflussen können:

- dem bereits erwähnten horizontalen Gentransfer von Resistenzgenen,
- der genetischen Mutation und Rekombination und
- der Vermehrung von bereits resistenten Bakterien durch den selektiven Druck durch antibiotische Verbindungen oder anderen Kontaminanten wie Schwermetalle und Biozide.

Trotz dieser Erkenntnisse ist es schwer, das Verhalten bzw. den Verbleib von Antibiotikaresistenzgenen und Antibiotika-resistenten Bakterien in der Umwelt vorherzusagen. Es ist jedoch jetzt schon klar, dass neben den medizinischen Einrichtungen auch anthropogen beeinflusste Kompartimente einen selektiven Druck auf Bakterien ausüben können. Dazu gehören kommunale Kläranlagen, Abwässer der Pharmaunternehmen, Aquakultur-Einrichtungen und Tiermastbetriebe. Diese Bereiche sind gekennzeichnet durch eine hohe Bakteriendiversität und – dichte, die einhergeht mit therapeutischen, aber auch subtherapeutischen Konzentrationen von Antibiotika. Diese Kombinationen wiederum unterstützen den Gentransfer und die Selektion resistenter Bakterien und damit eine zunehmende Belastung mit Antibiotika-resistenten Bakterien.

Die Mechanismen, die überwiegend genetisch kodiert, zu einer Resistenz führen können, lassen sich im Überblick wie folgt erklären:

- Die Bakterien verändern durch Mutation die Moleküle, die das Angriffsziel der Antibiotika in der Zelle darstellen, so dass die Antibiotika dort nicht mehr binden können.
- Bakterien befinden sich in einem Ruhezustand und hemmen dadurch diejenigen Antibiotika, die nur aktiv wachsende Zellen angreifen.
- Die Bakterien bilden Proteine aus, die Antibiotika inaktivieren (durch Hydrolyse, Phosphorylierung etc.).
- Gram-negative Bakterien verändern die Durchlässigkeit ihrer äußeren Membran, sodass eine geringere Menge des Antibiotikums eindringen kann
- Sie bilden eine Transportproteine aus, die dafür sorgen, dass das Antibiotikum bereits aus der Membran des Bakteriums heraustransportiert wird, bevor es an seiner Zielstruktur ankommt.
- Sie produzieren jene Proteine im Übermaß, die als Angriffsziel der Antibiotika dienen, so dass die Bakterienzelle schließlich doch weiter funktioniert.

Im Rahmen des HyReKA-Verbundvorhabens ist zu klären, in welchem Ausmaß, Antibiotika-resistente Bakterien bzw. deren Antibiotikaresistenzgene in die Umwelt und damit auch zu

Menschen/Tier gelangen und auch von dort aus dem Erwerben und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen bei klinisch relevanten Bakterien beeinflussen können. Mögliche Rückkopplungen aus dem Umweltbereich zurück zum Menschen, sei es in Kliniken oder in Alltagsbereichen im Kontakt mit Wasser oder kontaminierten Lebensmitteln, müssen daher aufgezeigt werden, um Wege der Verbreitung der Risikobakterien zu unterbrechen und damit Hotspot des Auftretens zu reduzieren.

Wie oben beschrieben, haben Bakterien unterschiedliche Mechanismen entwickelt Antibiotika unwirksam zu machen, die vielfach genetisch determiniert sind. Es ist für Einschätzung des Risikopotentials unabdingbar einerseits die Bakterienspezies zu ermitteln und auch die Art des zugrundeliegenden molekularen Resistenzmechanismus zu bestimmen. Dies gelingt über die Kombination von Analyseverfahren, wie sie im HyReKA-Projekt definiert und umgesetzt wurden:

- 1. Kultivierungsverfahren zur Anreicherung und Identifizierung von Antibiotika-resistenten Bakterien und Multiresistenzen (spezifische Nährmedien, Antibiogramme)**
- 2. Typisierung von Bakterienisolaten über Sequenzmarker sowie Bestimmung der Resistenzgene**
- 3. Kulturunabhängige molekularbiologische Identifizierung und Quantifizierung von Antibiotikaresistenzgenen und von Genen fakultativ-pathogener Bakterienspezies (qPCR/ddPCR)**
- 4. Chemisch-analytische Rückstandsanalyse von Antibiotika: Quantitative Bestimmung von Antibiotikarückständen in wässrigen Matrices mittel LC-MS/MS**

Durch die Interdisziplinarität der Verbundprojektpartner konnten damit für die genannten 4 Säulen der mikrobiologischen/molekularbiologische und chemischen Analysen Protokolle standardisiert werden, die von den betroffenen Partnern an den unterschiedlichen Standorten genutzt wurden, so dass eine gesicherte Interpretation der erhaltenen Daten zu Belastungen und daraus resultierenden abgeleiteten biologischen Risiken erfolgen konnte.

In den nachfolgenden Kapiteln sind die jeweiligen Methoden zu den genannten 4 analytischen Säulen der Antibiotikaresistenz- bzw. Antibiotika-Untersuchungen aufgeführt. Dazu gehören auch die ausgewählten Bakterienspezies mit den entsprechenden Antibiotikaresistenz-Determinanten, überwiegend genetisch mobile Antibiotika-Resistenzgene und auch die ausgewählten Antibiotikarückstände.

1 Säule: Kultivierungsverfahren zur Anreicherung und Identifizierung von Antibiotika-resistenten Bakterien (spezifische Nährmedien, Antibiotogramme)

C. Schreiber, T. Kistemann, N. Zacharias, C. Timm

Geo Health Centre, Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit, Universitätsklinikum Bonn, Universität Bonn, Venusberg-Campus 1, 53127 Bonn

M. Parčina, F. Lenz, R. Jozić, E. Sib

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie, Universitätsklinikum Bonn, Universität Bonn, Venusberg-Campus 1, 53127 Bonn

1.1 Probenahmen

Für alle Probenahmen im HyReKA-Projekt wurde zu Projektbeginn eine detaillierte standardisierte Arbeitsanweisung verfasst, die hier in Kurzfassung wiedergegeben wird. Sofern möglich orientieren sich diese Anweisungen zur Probenahme an entsprechend geltenden Normen und Richtlinien.

1.1.1 Sanitärprobenahme (Probenahme im Patientenzimmer)

Materialien

- Probenahmeprotokoll, Pläne/Übersichten Gebäude (z.B. Stationsplan)
- sterile 50 mL Spritzen, sterile Einmalkatheter, sterile Stieltupfer, sterile Probenahmegefäße
- Einmalhandschuhe, Müllbeutel
- Thermometer zur Bestimmung der Raum- und Außentemperatur

Durchführung

Für die Sanitärprobenahme in den Patientenzimmern werden gemischte Wasser- und Biofilmpollen als Zufallsstichprobe aus dem Waschbecken-Siphon, der Toilette und dem Duschafluss entnommen (s.a. Sib et al 2019, Müller et al. 2019).

Waschbecken-Siphon und Duschafluss

- Der Katheter wird in den Waschbecken-Siphon eingeführt. Dabei wird mit der Katheterspitze die Siphon-Wand manipuliert, um Biofilmstücke abzulösen.
- Die Spritze wird mit dem Katheter verbunden. Das sich im Siphon befindliche Wasser wird mit der Spritze über den Katheter abgezogen.
- Die Spritze wird vom Katheter diskonnektiert und das abgezogene Wasser in das Probenahmegefäß gegeben. Ggf. muss zusätzlich mit einem sterilen Stieltupfer Biofilm von der Wand des Siphons abgelöst werden. Der Stieltupfer wird dann in die zuvor entnommene Wasserprobe inokuliert.
- Proben transport und Lagerung bis zur Bearbeitung erfolgen gekühlt.

Achtung: Vor der Entnahme der Wasserprobe dürfen das Waschbecken und die Dusche nicht gespült werden!

Toilette

- 1x mit der Kurzspültaste spülen.
- Vorgehen analog zu der Entnahme des Waschbecken-Siphons

Achtung: Bei hartnäckiger Verschmutzung diese dokumentieren!

1.1.2 Automatisierte 24-Stunden Mischprobe von Abwasser und an Gewässern

Materialien

- Automatisierter Probenehmer
- Sterile Probenahmebehälter zum Bestücken des Probenehmers
- 2 Rührstäbe (Zulauf und Ablauf getrennt)
- Einmalhandschuhe
- Mindestens 4 x 3 L destilliertes Wasser (zum Abspülen von Geräten/Materialien)
- Geeignete Probenahmegefäße

Durchführung

Die Probe wird entsprechend der Programmierung der Probenahmegeräte als eine Mischprobe in verschiedenen Teilproben oder in einem ausreichend großen sterilen Gefäß gesammelt. Im HyReKA-Projekt ist dies zumeist für die Regelproben an Kläranlagen von Mo 8:00 bis Di 8:00. Die Probe muss vor Abfüllung mit desinfiziertem Rührgerät oder durch vorsichtiges Schwenken im Gefäß behutsam (nicht zu schnell) durchmischt werden. Die Probe wird mit einem sterilen Schöpfgefäß in die Probenahmeflasche überführt oder proportional aus den einzelnen Teilproben umgefüllt. Transport und Lagerung der Proben erfolgt in einer Kühlbox mit Kühlakkus. Das restliche nicht benötigte Probematerial wird verworfen. Das genutzte Material vor dem Verstauen im Auto mindestens mit Trinkwasser oder destilliertem Wasser abspülen, besser direkte Desinfektion. Der Probenehmer wird mit (einem) neuen sterilen Gefäß(en) bestückt, das Programm für die Routineprobenahme eingestellt und erneut gestartet.

1.1.3 Qualifizierte Stichprobe von Abwasser und an Gewässern

Materialien

- Langer Teleskopschöpfer
- Probenflaschen
- Steriles Homogenisierungsgefäß 10 Liter
- Probenahmeprotokoll
- Einmalhandschuhe
- 5l Kanister mit Wasser (Aqua demin./dest.)
- Vor-Ort-Parameter-Koffer
- Stoppuhr oder Uhr mit Minutenanzeige

Durchführung der Probenahme

Eine qualifizierte Stichprobe ist nach DIN 38402-11:2009-02 (S.6) eine „Sonderform einer Mischprobe, bestehend aus mindestens fünf Stichproben, die in einem Zeitraum von höchstens 2 h im Abstand von nicht weniger als 2 min entnommen und gemischt werden“. Im Projekt HyReKA werden 5 Stichproben in einem Abstand von je 2 Minuten genommen. Bei Abfüllung

mehrerer Probeflaschen gleichzeitig (z.B. für Chemie, ARG und ARB parallel) wird ein Sammelgefäß zur Homogenisierung der Stichproben genutzt und die Probe anschließend aufgeteilt. Transport und Lagerung der Proben erfolgen in einer Kühlbox mit Kühllakkus. Das restliche nicht benötigte Probematerial wird verworfen. Das genutzte Material vor dem Verstauen im Auto mindestens mit Trinkwasser oder destilliertem Wasser abspülen, besser direkte Desinfektion.

1.1.4 Ereignis-abhängige Probenahmen von Niederschlags-Abflüssen aus Kanalisation und Landschaft

Die Probenahme von Niederschlags-Abflüssen aus Kanalisation und Landschaft erfolgt ereignisabhängig nach Niederschlägen, die ausreichend Probenmaterial generieren. Es ist an die jeweilige Probenahmestelle anzupassen.

Die Probensammlung an den abwassertechnischen Bauwerken sowie der Drainage erfolgt dabei Wasserstand-gesteuert im Falle gefüllter Überlaufrinnen bzw. Drainsammler mittels automatisierten Probenehmern über die Dauer des jeweiligen Entlastungsereignisses (s.a. Mertens et al 2012, 2013, 2017, 2018, Christoffels et al 2014, Schreiber et al 2019). Das weitere Vorgehen entspricht dem der automatisierten 24-h-Mischproben.

Die Probenahme aus den Passivsammlern erfolgt wie in den Abschlussberichten der Projekte Swist III (Kistemann et al 2008) und Swist IV (Mertens et al 2013) bzw. in Franke et al (2009) und Schreiber et al (2015) beschrieben. Die Wannen müssen vor dem Zurücksetzen ins Rack gespült und desinfiziert werden.

1.1.5 Probenahme von Biofilmen aus Kläranlagen und Gewässern

Materialien

- sterile Wattetupfer mit Sollbruchstelle
- sterile Gefäße mit 10 ml 0,9% NaCl
- Sterile Einmalhandschuhe
- Probenahmeprotokoll
- Langer Teleskopschöpfer
- 5l Kanister mit Wasser (Aqua demin./dest.)

Durchführung

Die Biofilm-Entnahmen aus den Fließgewässern und den Kläranlagen Zu- und Abflüssen werden je nach Zugänglichkeit unterschiedlich durchgeführt. An gut zugänglichen Stellen wird das Biofilmmaterial von einer ca. 4 cm² großen Steinfläche direkt mit einem sterilen Wattetupfer abgenommen. An schwer zugänglichen wird mit dem desinfizierten Schöpfbecher Biofilm-Material abgekratzt und, wie oben geschildert, mit einem sterilen Wattestäbchen in 10 ml 0,9% NaCl aufgenommen. An den Kläranlagenzuläufen wird eine kleine Zufallsstichprobe der Kahmhaut entnommen (Phase an Feststoffen kurz oberhalb der Wasseroberfläche). Der Wattetupfer mit dem Biofilmmaterial wird in 10 ml 0,9% NaCl überführt. Transport und Lagerung der Proben erfolgt in einer Kühlbox mit Kühllakkus.

1.1.6 Muscheln (Bivalvia) aus Fließgewässern

Material

- Langer Teleskopschöpfer
- sterile 500 ml Probenahme-Gefäße
- Sterile Einmalhandschuhe
- Steriles Messer
- Probenahmeprotokoll

Durchführung

Die Muscheln werden mit einem Schöpfbecher aus dem Sand gegraben. Bei Muscheln die sich an Steinen durch Byssusfäden anhaften, werden diese Fäden mit einem sterilen Messer durchtrennt oder vorsichtig per Hand (sterile Einmalhandschuhe!) abgelöst. Da nur lebende und gesunde Muscheln analysiert werden sollen, wird die Vitalität getestet, indem beide Schalenhälften auseinandergezogen werden. Gelingt dies nicht, kann davon ausgegangen werden, dass sich die Muscheln in einem vitalen Zustand befinden. Die Muschelproben werden getrennt nach Art und Standort in Flaschen sortiert und mit Wasser vom jeweiligen beprobten Standort befüllt. Transport und Lagerung der Proben erfolgt in einer Kühlbox mit Kühllakkus.

Probenvorbereitung

Als Probenvorbereitung für die Analyse enthaltener Bakterien werden die einzelnen Muscheln aus den Flaschen entnommen und in einer sterilen Petrischale verarbeitet. Byssusfäden werden falls vorhanden mit einem sterilen Skalpell entfernt und die Muschel mit Hilfe des Skalpells geöffnet. Das Muschelfleisch wird durch Abtrennen der vorderen und hinteren Schalenadduktoren und -retraktoren auf beiden Seiten der Schale entnommen und der Mantel von dem Hypostractum mit einer Pinzette abgezogen. Das Gewicht des Muschelfleisches wird ermittelt und in 10 ml 0,9 % NaCl-Lösung homogenisiert.

1.2 Bestimmung der Vor-Ort-Parameter

Zu den Vor-Ort-Parametern, die zur Charakterisierung eines Gewässers bzw. einer Wasserprobe wichtig sind (s.a. Schreiber 2019), zählen:

- Lufttemperatur [°C], Witterung, Niederschlag vor/während der Probenahme
- Wassertemperatur [°C]
- O₂-Gehalt [mg/L]
- Elektrische Leitfähigkeit [µS/cm]
- pH-Wert
- Trübung [FNU]
- Organo-leptik: Geruchsart, Geruchsstärke, Färbung

Die Erhebungen der entsprechenden Mess-Daten sind sehr stark Messgerät- bzw. Hersteller-abhängig und werden daher hier nicht weiter aufgeführt.

Beschreibung der organoleptischen Vor-Ort-Parameter

Die Bestimmung der organo-leptischen Parameter erfolgt möglichst objektiv und standardisiert durch den Probennehmer. Klassische Parameter sind im Anhang aufgeführt.

1.3 Kultivierung hygienisch-relevanter mikrobiologischer Parameter

Zu Beginn des HyReKA-Projektes erfolgte unter Federführung des IHPH eine verbindliche, im Projektkonsortium abgestimmte Festlegung der zu untersuchenden mikrobiologischer Parameter und die Erstellung verbindlicher detaillierter standardisierter Arbeitsanweisung (SOPs) für deren Kultivierung. Diese sind hier in Kurzfassung wiedergegeben.

Alle Proben müssen innerhalb von 24 h nach Probenahme im Labor untersucht werden, eine eventuelle Lagerung und der Transport erfolgen gekühlt bei 2-8°C im Dunkeln.

Je nach zu erwartender bakterieller Belastung werden bis zu 100 mL Probe (v.a. Rohwasser, Grundwasser) untersucht. Proben von denen Volumina > 1 mL untersucht werden, werden mittels Membranfiltration aufkonzentriert, kleinere Volumina werden ausplattiert. Die zu untersuchenden Verdünnungsstufen der originalen Probe werden mit steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung in Zehnerschritten angesetzt.

Eine Aufkonzentration stark verschmutzter Proben (z.B. Kläranlagen-Zulauf) ist nicht sinnvoll, da es zum einen Filtrationsprobleme durch organisches Material in der Probe gibt, zum anderen zu massivem Aufwuchs der Begleitflora trotz modifizierter Methodik kommt und eine Auswertung dann nicht möglich ist.

Für alle Parameter notwendige Chemikalien, Materialien und Geräte

Geräte

- Brutschränke 36°C, 42 °C, 44 °C
- Gasbrenner
- Membranfiltrationsanlage mit sterilen Trichtern
- Sterile Glasspatel oder Einmalspatel
- Pipette für 10 mL, Pipette für 100 µl, Pipette für 200-1000 µl
- Sterile Impfösen
- Sterile Pinzetten
- Sterilwerkbank

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

- Columbia-Blutagar mit 5% Schafsblut
- Cellulosenitrat-Membranfilter, Porenweite 0,45 µm
- sterile Pipettenspitzen
- Verdünnungsröhrchen mit steriler 0,9%iger NaCl

Die Agarplatten werden alle als Fertigplatten bezogen, Haltbarkeitsdaten sind den entsprechenden Herstellerangaben zu entnehmen.

1.4 Quantitative Analyse antibiotika-resistenter Bakterien

Die Verfahren werden im Rahmen des HyReKA-Projekts für unterschiedliche Wässer angewandt. Hier zeigt sich eine deutlich stärkere Störung des Nachweises bedingt durch hohes Wachstum an Hintergrundflora als bei Proben aus Trinkwasser oder Humanmaterial. Die ursprüngliche Methodik laut Herstellerangaben wurde daher besonders mit Blick auf Wachstums-Unterdrückung der Begleitflora bezüglich der Bebrütungstemperatur und zusätzlicher Tests zur Differenzierung modifiziert. Grundlage hierfür sind Ergebnisse diverser Vorversuche zur Verfahrensoptimierung mit aquatischen Umweltproben.

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

- Parameter-spezifische Selektiv-Agar-Platten: CHROMagar™ Fertigplatten der Firma: MAST Diagnostica GmbH, Reinfeld*

**Zusammensetzung und Zubereitung der Nährmedien s. Herstellerangaben*

Durchführung

Die Probenflasche wird vor dem Proben-Ansatz und jeder Entnahme geschüttelt. Volumina > 1 mL werden filtriert und der Filter luftblasenfrei auf dem jeweiligen selektiven CHROMagar™ aufgelegt. Wird eine höhere Belastung erwartet, können direkt 1 mL bzw. 0,1 mL Probe bzw. deren Verdünnungen ausplattiert werden. Von jeder Probe werden mindestens drei verschiedene Volumina untersucht, um mindestens einen auswertbaren Probenansatz zu erhalten.

Verdächtige Kolonien werden jeweils zur Bestätigung auf Columbia-Blutagar überimpft und als Reinkultur einer weitergehenden Differenzierung mittels Selektivmedien und physiologische Tests unterzogen. Alternativ oder zusätzlich kann eine Art-Bestimmung per PCR oder MALDI-TOF erfolgen. Bestätigte Isolate werden als Reinkultur auf Columbia-Blutagar zur Resistenztestung (AG Dr. M. Parčina) und Typisierung (AG Prof. Dr. G. Bierbaum) an das Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie (IMMIP) am UKB weitergegeben (S.32).

1.4.1 MRSA

Parameter-spezifische Chemikalien, Materialien und Geräte

Geräte

- Brutschrank 42 °C Brutschränke 42 °C

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

- CHROMagar™MRSA, MAST Diagnostica GmbH, Reinfeld, Art.-Nr.: 201402
- Koagulase-Testkit

Durchführung

Die Bebrütung erfolgt bei 42 ± 1 °C für 24 ± 3 h unter aeroben Bedingungen. Falls notwendig kann für eine bessere Beurteilung dieser MRSA-Kolonien die Bebrütung bis zu insgesamt 48 ± 3 h ausgedehnt werden.

Auswertung

Das Wachstum Methicillin-empfindlicher *Staphylococcus aureus* und anderer Methicillin-empfindlicher Bakterien wird laut Hersteller gehemmt. Andere Methicillin-resistente Bakterien-Arten wachsen demnach in blauen oder farblosen Kolonien. Die gewachsenen Kolonien werden wie folgt ausgewertet:

- Alle Kolonien mit einer rosa bis malvenfarbene, nicht transparente Färbung werden als MRSA verdächtig. Die Kolonien von MRSA sind leicht erhaben, ggf. mit kleiner Delle (wenn größer) und scharf begrenzt. Sie haben oft einen leicht ranzigen Geruch.
- Verdächtige Kolonien mit derselben Morphologie werden zu einer Gruppe zusammengefasst und mindestens eine Kolonie pro Gruppe wird zur Bestätigung auf Columbia-Blutagar ausgestrichen und bei 37 ± 1 °C aerob 24 ± 3 h inkubiert. → MRSA wächst auf Columbia-Blutagar als goldgelbe, manchmal auch gräuliche, glänzende, scharf abgegrenzte Kolonie mit Hämolyse und ranzigem Geruch.
- Bei charakteristischem Wachstum auf Columbia Blutagar wird ein Koagulase-Test durchgeführt. *S. aureus* muss Koagulase-positiv sein.

Qualitätssicherungsmaßnahmen

Eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle werden vor der Verwendung jeder neuen Charge Chemikalien oder Nährmedien durchgeführt. Die Kontrollen werden dokumentiert und die freigegebenen Chargen entsprechend gekennzeichnet.

Positivkontrolle:

- MR *S. aureus* ATCC® 33592 (malvenfarben)

Mögliche Negativkontrollen:

- MS *S. aureus* ATCC® 25923
- *P. aeruginosa* ATCC® 9027
- *E. faecalis* ATCC® 29212
- *E. coli* ATCC® 25922
- *C. albicans* ATCC® 1023

Sterilitätskontrolle:

- Unbeimpfte CHROMagar™MRSA-Platte

1.4.2 VRE

Parameter-spezifische Chemikalien, Materialien und Geräte

Geräte

- Brutschränke 42 °C, 44 °C

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

- CHROMagarTMVRE, Firma: MAST Diagnostica GmbH, Reinfeld, Art.-Nr.: 201460 (Fertigplatten)*
- Galle-Äsculin-Azid-Agar (VWR Best.-Nr. 100082XA, Fertigplatte)*

*Zusammensetzung und Zubereitung der Nährmedien s. Herstellerangaben

Durchführung

Die Bebrütung erfolgt bei 42 ± 1 °C für 48 ± 3 h unter aeroben Bedingungen.

Auswertung

VR *E. gallinarum* und VR *E. casseliflavus* wachsen als blaue Kolonien oder werden inhibiert. Bei einer Inkubation von mehr als 24 Stunden können manchmal einige seltene Stämme von *E. gallinarum* als malve-farbene Kolonien erscheinen. Das Wachstum anderer grampositiver und gramnegativer Bakterien und anderer Methicillin-sensibler Bakterien wird laut Hersteller gehemmt. Ebenso soll das Wachstum von Hefen und Schimmelpilze meist inhibiert sein. Einige seltene Stämme von Lactobacilli und *Pediococcus* können manchmal als punktförmige malve-farbene Kolonien erscheinen (laut Hersteller können daher für die definitive Identifizierung zusätzliche Tests erforderlich sein). Es wachsen bei aquatischen Umweltproben jedoch v.a. Sporenbildner gut. Die gewachsenen Kolonien können wie folgt ausgewertet werden:

Kolonien mit einer milchig bis kräftig pinken bis malvenfarbene Färbung werden als *E. faecium* bzw. *E. faecalis* verdächtigt. Die Kolonien sind meist sehr klein und punktförmig. Verdächtige Kolonien mit derselben Morphologie werden zu einer Gruppe zusammengefasst und je mindestens eine Kolonie pro Gruppe auf Columbia Blutagar vereinzelt und über diverse Zusatztests bestätigt:

- Morphologie auf Blutagar: klein, weißgrau, glatter Rand, nicht transparent, glänzende Oberfläche, erhaben, ggf. grünliche Verfärbung des Agars
- Auf Selektivnährboden für Enterokokken Galle-Äsculin-Azid-Agar: Bestätigte Kolonien verfärben das umgebende Medium bei $44 \pm 0,5$ °C aerob über Nacht braun bis schwarz.

Qualitätssicherungsmaßnahmen

Eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle werden vor der Verwendung jeder neuen Charge Chemikalien oder Nährmedien durchgeführt. Die Kontrollen werden dokumentiert und die freigegebenen Chargen entsprechend gekennzeichnet.

Positivkontrolle

- *VRE. faecalis* ATCC® 51299 (malvenfarben, klein)

Mögliche Negativkontrollen:

- *E. faecalis* ATCC® 29212
- *E. coli* ATCC® 25922
- *C. tropicalis* ATCC® 1369
- *S. aureus* ATCC® 25923
- *E. casseliflavus* ATCC® 700327

Sterilitätskontrolle:

- Unbeimpfte CHROMagar™VRE-Platte

1.4.3 ESBL-bildende Bakterien

Parameter-spezifische Chemikalien, Materialien und Geräte

Geräte

- Brutschränke 36 °C, 42 °C

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

- CHROMagar™ESBL, Fa. MAST Diagnostica GmbH, Reinfeld, Art.-Nr.: 201470*
- Chromocult-Coliformen-Agar*, Fa. Merck, Art.-Nr.: 1.10426.0500, ggf. versetzt mit *E. coli*/Coliformen Selektiv-Supplement*, Fa. Merck, Art.-Nr.: 1.00898.0010
- King's B-Medium (SchrägA)*, Fa. Heipha, Art.-Nr. 1460990020
- Nähragar nach Trinkwasserverordnung, Fa. Oxoid, Art.-Nr. PO5025A, (Fertigagarplatte)*
- Neßler's Fertig-Reagenz*, Fa. Sifin, Art.-Nr. TN1515
- Pseudomonas-Cetrimid-Agar (CN-Agar), Fa. Oxoid Art.-Nr.: PO7076A (Fertigplatte)*
- Acinetobacter-CHROMagar, Fa. Mast Diagnostica, Art.-Nr.: 15AC092 (Pck. 5L Powder Base inkl. Supplement) *
- XLD-Agar
- MacConkey-Agar*
- Bactident® Oxidase-Teststreifen, Firma: Merck, Art.-Nr.: 1.13300.0001
- Katalase-Test, Test auf Indol-Bildung, OF-Test

*Zusammensetzung und Zubereitung der Nährmedien s. Herstellerangaben

Durchführung

Die Bebrütung erfolgt bei 42 ± 1 °C für 24 ± 3 h unter aeroben Bedingungen.

Auswertung

Die gewachsenen Kolonien werden wie folgt ausgewertet. Verdächtige Kolonien (Tabelle 1.1) mit derselben Morphologie werden zu einer Gruppe zusammengefasst. Mindestens eine Kolonie pro Gruppe muss zur Bestätigung weiter untersucht werden. Dabei lassen sich die Bakterien wie folgt unterscheiden:

Tabelle 1.1: Merkmale von *E. coli*, *KEC*, *Proteus*, *Pseudomonas* und *Acinetobacter* auf CHROMagar™ESBL

Bakterium	Farbe	Morphologie / Geruch
ESBL <i>E. coli</i>	Dunkelpink/lila bis rötlich (sehr variabel)	Schwärmend/ausgefranst und nicht schwärmend, meist matt(sehr variabel), leicht säuerlicher und kotiger Geruch
ESBL KEC	<i>Citrobacter</i> : Metallisch blau teilweise mit rosa Hof, <i>Klebsiella</i> : tief türkis oder türkis-blau, <i>Enterobacter</i> : tief türkis oder türkis-blau, auch metallisch blau	Kotig-jauchiger Geruch, Kolonien glänzend und erhaben, scharf abgegrenzt
ESBL <i>Proteus</i> spp.	Bräunlich, dunkelgelb	Schwärmend, stechender Geruch, brauner Hof
<i>Pseudomonas</i> spp. mit Wachstum auf ESBL-Agar	Transparent, weißlich bis gelb-champagner, teilweise mit hellgrünlichem Schimmer	Schwärmend bis umgrenzt (sehr variabel)
<i>Acinetobacter</i> spp. mit Wachstum auf ESBL-Agar	Weißlich, cremefarben	Eher abgegrenzt, erhaben glänzend, z.T. Kolonierand ungleichmäßig gelappt

Außerdem wächst *Stenotrophomonas* als farblose Kolonien und *Aeromonas* als türkisene Kolonie. Das Wachstum Gram-positiver Bakterienstämme und nicht resistenter anderer, gram-negativer Bakterienstämme soll laut Hersteller gehemmt werden. Es wachsen jedoch zahlreiche Sporenbildner und auch Actinomyceten mit auf, welche eine Auswertung erschweren. Die meisten AmpC-produzierenden Bakterien werden inhibiert, aber einige können ein gewisses Wachstum zeigen. Ebenso ist das Wachstum von Hefen meist inhibiert.

Für eine weitergehende Resistenztestung und Typisierung werden einzeln liegende als ESBL-resistent identifizierte Isolate der relevanten Zielspezies (Tabelle 1.1) auf Blutagar überimpft und als Reinkultur an das IMMIP gegeben.

ESBL *E. coli*

Kolonien mit einer dunkelpink/lila bis rötliche Färbung werden als *E. coli* verdächtig gezählt. Bestätigung möglich über:

- Typisches Wachstum bei 37 ± 1 °C über Nacht auf Blutagar (Vorsicht! *E. coli* haben viele morphologische Typen)
- Typisches Wachstum bei 37 ± 1 °C über Nacht auf Selektivnährboden für *E. coli*, z.B. CC (Chromocult-Coliformen) -Agar, alternativ VRB (Violet Red Bile)-Agar oder Endo (Lactose-Fuchsin-Sulfit) -Agar; Kolonien von *E. coli* sind auf CC-Agar purpurn, auf VRB-Agar rot mit rötlichem Hof und auf Endo-Agar tiefviolett mit Fuchsinglanz.
- Physiologische Reaktionen: *E. coli* ist Oxidase-negativ, Katalase-positiv, Indol-positiv.

ESBL KEC

Kolonien mit einer metallisch blauen Färbung (und ggf. +/- rötlichem Hof) werden als KEC (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp.) verdächtig gezählt. Bestätigung möglich über:

- Typisches Wachstum bei 37 ± 1 °C über Nacht auf Blutagar
- Typisches Wachstum bei 37 ± 1 °C über Nacht auf einem Selektivnährboden für coliforme Bakterien, z.B. CC-Agar, VRB-Agar oder Endo-Agar; Kolonien von KEC sind auf CC-Agar pink, auf VRB-Agar rosa bis farblos und auf Endo-Agar tiefviolett ohne Fuchsinglanz.
- Physiologische Reaktionen: KEC sind Oxidase-negativ, Katalase-positiv, Indol-negativ.

ESBL Proteus spp.

Kolonien mit einem braunen Hof werden als *Proteus* spp. verdächtig. Bestätigung möglich über:

- Typisches Wachstum bei 37 ± 1 °C über Nacht auf Blutagar; *Proteus* spp. zeigt ein deutliches Schwärmverhalten und hat einen stechend scharfen Geruch.
- Typisches Wachstum bei 37 ± 1 °C über Nacht auf Selektivnährboden, z.B. XLD-Agar; *Proteus* spp. färbt XLD-Agar gelb und bildet Kolonien mit schwarzem Zentrum
- Physiologische Reaktionen: *Proteus* ist Oxidase-negativ, Katalase-positiv, Urease-positiv.

Pseudomonas spp. und *P. aeruginosa* mit Wachstum auf ESBL-Agar

Kolonien mit einem transparenten Erscheinungsbild (+/-cremefarbener bis grüne Pigmentierung, ggf. fluoreszierend unter UV-Lampe) werden als *Pseudomonas* spp. bzw. *P. aeruginosa* verdächtig gezählt. Bestätigung möglich über:

- Typisches Wachstum bei 37 ± 1 °C über Nacht (24h) auf Blutagar
- Typisches Wachstum bei 37 ± 1 °C über 2 Tage (48h) auf Selektivnährboden, z.B. Cetri-mid-Agar. *Pseudomonas* spp. ist auf Cetri-mid-Agar blaugrün oder gelbgrün fluoreszierend unter UV (selten rötlichbraun). *P. aeruginosa* hat zudem einen „lindenblütenartigen“ Geruch.
- Physiologische Reaktionen: Oxidase-positiv, Katalase-positiv, im OF-Test oxidativ.

Acinetobacter spp. mit Wachstum auf ESBL-Agar

Kolonien mit einer cremefarbenen/weißen Färbung werden als *Acinetobacter* spp. verdächtig gezählt. Bestätigung möglich über:

- Typisches Wachstum bei 37 ± 1 °C über Nacht auf Columbia Blutagar
- Typisches Wachstum bei 37 ± 1 °C über Nacht auf Acinetobacter-Selektivnährboden
- Physiologische Reaktionen: *Acinetobacter* spp. ist Oxidase-negativ, Katalase-positiv, im OF-Test nicht-fermentativ.
- ggf. zusätzlich typisches Wachstum bei 37 ± 1 °C über Nacht auf MacConkey-Agar; *A. baumannii* bildet auf MacConkey-Agar bräunlich, glänzende Kolonien.

Qualitätssicherungsmaßnahmen

Eine Positiv- und Negativ-Kontrolle werden vor der Verwendung jeder neuen Charge Chemikalien oder Nährmedien durchgeführt. Die Kontrollen werden dokumentiert und die freigegebenen Chargen entsprechend gekennzeichnet.

Positivkontrollen:

- ESBL *E. coli* CIP 103982
- ESBL *K. pneumoniae* ATCC® 700603

Mögliche Negativkontrollen:

- *E. faecalis* ATCC® 29212
- *P. aeruginosa* ATCC® 10145
- *E. coli* ATCC® 25922
- *C. albicans* ATCC® 60193
- *S. aureus* ATCC® 25923

Sterilitätskontrolle:

- Unbeimpfte CHROMagar™ ESBL Platte

1.5 Indikatorparametern

Zusätzlich zu den antibiotika-resistenten Bakterien wurden kulturell einige als Indikator-Parameter bezeichnete Spezies unabhängig vom Resistenzstatus bestimmt, um Informationen über die grundsätzliche Belastung der jeweiligen Wasserprobe mit hygienisch-relevanten Mikroorganismen zu erhalten. Hierfür wurden zum einen die in vielen Verordnungen und Regelwerken für Grenzwerte herangezogenen Fäkalindikatoren *Escherichia coli* und Intestinale Enterokokken ausgewählt, zum anderen die Gattungen *Acinetobacter* spp. und *Pseudomonas* spp., wobei letztere optional weiter in *P. aeruginosa* oder andere Arten unterschieden werden können.

1.5.1 *Escherichia coli*, Enterokokken, Pseudomonaden

Die Untersuchung der Indikatorparameter wurde weitgehend analog zu den entsprechenden unten genannten Normen durchgeführt. Für notwendige Parameter-spezifische Chemikalien, Materialien und Geräte sowie Durchführung und Auswertung siehe dort.

Coliforme Bakterien und *Escherichia coli* (DIN EN ISO 9308-1) wird durch die Verwendung von Antibiotika-Supplement, mit 2,5 mg Vancomycin und 2,5 ml Cefsulodine für 500 mL Nährboden modifiziert. Vancomycin hemmt dabei die Gram-positive Begleitflora, während Cefsulodin vor allem Pseudomonaden und Aeromonaden unterdrückt. Außerdem wird je nach zu erwartender Konzentration entsprechende Verdünnungen direkt ausplattiert statt über Membranfiltration zu konzentrieren.

Der Parameter intestinale Enterokokken wird analog zu DIN EN ISO 7899-2 durchgeführt.

Pseudomonas spp. bzw. *Pseudomonas aeruginosa* folgt DIN EN ISO 16266, jedoch für Abwasser modifiziert, indem Verdünnungsreihen als Direktausstrich untersucht werden. Zudem werden nur auf Ceftrimid-Agar blau-grüne und fluoreszierende Kolonien als verdächtig in die Auswertung einbezogen.

1.5.2 *Acinetobacter* spp.

Parameter-spezifische Chemikalien, Materialien und Geräte

Geräte

- Brutschrank 42 °C

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

- CHROMagar™ *Acinetobacter*, Fa. Mast Diagnostica, Art.-Nr.: 15AC092 (Pck. 5 L Powder Base inkl. Supplement)
- Bactident® Oxidase-Teststreifen, Firma: Merck, Art.-Nr.: 1.13300.0001
- Katalase-Test, Test auf Indol-Bildung, OF-Test

Herstellung des Nährmediums

Der CHROMagar™ *Acinetobacter* wird nach Herstellerangabe angesetzt. Nach dem Trocknen können leichte Farbunterschiede bei den Platten auftreten, von gelblich bis hell orange. Haltbarkeitsdaten sind den entsprechenden Herstellerangaben zu entnehmen.

Durchführung

Die Bebrütung erfolgt auf dem CHROMagar™ *Acinetobacter* bei $42 \pm 1^\circ\text{C}$ für 21 ± 3 h unter aeroben Bedingungen.

Auswertung

Alle Kolonien mit einer roten Färbung werden als *Acinetobacter* spp. gezählt. Das Wachstum anderer gramnegativer und grampositiver Bakterien, sowie Hefen soll laut Hersteller meistens gehemmt werden. Eine ausführliche Morphologie Beschreibung für die verwendeten Nährmedien sind in Tabelle 1.2 angegeben.

Verdächtige Kolonien werden zum Nachweis auf Columbia-Blutagar ausgestrichen und bei $42 \pm 1^\circ\text{C}$ aerob über Nacht inkubiert. Anschließend wird die verdächtige Kolonie morphologisch

bewertet und dazu ggf. mit einem Referenzstamm verglichen werden. Zusätzlich muss zur Bestätigung ein Oxidase- und Katalase-Test durchgeführt werden. *Acinetobacter* spp. ist Oxidase-negativ, Katalase-positiv.

Tabelle 1.2: Morphologie von *A. baumannii* auf CHROMagar™ *Acinetobacter* und Columbia-Blutagar.

Bakterium	CHROMagar™ <i>Acinetobacter</i>	Columbia-Blutagar
<i>Acinetobacter</i> spp.	altrosa bis rötliche Färbung, goldschimmernde Strahlen	Inhomogenes Bild: 1-2 mm, rund, erhaben, Mitte weiß-gräulich und transparent, zum Rand hin transparent, abgegrenzter Rand, schleimig glänzende Oberfläche
<i>A. baumannii</i>	rund, oft unregelmäßiger, gelappter Rand, begrenzt, altrosa, in der Mitte dunkler (wie Spiegelei), transparenter Rand, teilweise schwärmend (wenn dichter), goldschimmernde Strahlen, unter der Lupe dunkelrote zackige Strahlen	1-2 mm, rund, erhaben, Mitte weiß, zum Rand hin transparent, glatter Rand, schleimig glänzende Oberfläche („Perlen-artig“)

Qualitätssicherungsmaßnahmen

Eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle werden vor der Verwendung jeder neuen Charge Chemikalien oder Nährmedien durchgeführt. Die Kontrollen werden dokumentiert und die freigegebenen Chargen entsprechend gekennzeichnet.

Positivkontrollen:

- *Acinetobacter baumannii* ATCC® 19606 (rot)
- *Acinetobacter calcoaceticus* ATCC® 51432 (rot)

Negativkontrolle:

- *E. faecalis* ATCC® 29212
- *C. tropicalis* ATCC® 1369

Sterilitätskontrolle:

- Unbeimpfte CHROMagar™ *Acinetobacter* Platte

1.6 Angabe des Ergebnisses und Dokumentation

Mit jeder Probe wird ein Probeninformationsblatt (Laborjournal) mitgeführt. Das Ergebnis wird unter Angabe des untersuchten Volumens und des Datums der Auswertung festgehalten und unter Verwendung einer eindeutigen Proben-ID in die Projektdatenbank HyReKA eingetragen.

Die Angabe des Ergebnisses erfolgt als Zahlenwert, z.B. 12 KBE/100 mL bzw. bei negativem Befund als 0 KBE/100 mL.

Aus allen auswertbaren Ansätzen wird das Ergebnis durch Berechnung des gewichteten Mittels gebildet. Die verwendeten Probenvolumina sind im Laborjournal zu dokumentieren und bei der Angabe des Ergebnisses zu berücksichtigen. Die Angabe des Ergebnisses erfolgt umgerechnet auf Koloniebildende Einheiten (KBE) pro 100 mL ($\text{KBE} / 100 \text{ mL}$).

Beispiel:

Auswertbar sind die Platten mit -1 (1:10-Verdünnung), -2 (1:100-Verdünnung), -3 (1:1000-Verdünnung). Das Ergebnis berechnet sich aus (Zahl entsprechender Kolonie auf Platte -1 + Zahl entsprechender Kolonie auf Platte -2 + Zahl entsprechender Kolonie auf Platte -3) / (1,11) * 1000 mL.

1.6.1 Validierung

Die Validierung der Verfahren bzw. der Tätigkeit der damit betrauten Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen erfolgt sofern möglich über die Teilnahme an offiziellen Ringversuchen, zudem als Abschätzung durch eigene 10-fache Wiederholungsmessungen zur Bestimmung der Wiederfindung und Messunsicherheit.

Häufigkeit: jährlich

Qualitätsziel: Wiederfindung $\geq 50 \%$ und Messunsicherheit $\leq 0,5 \log$

1.6.2 Abweichende Methodik für Proben des Fallbeispiels Flughafenabwässer:

Damit trotz der im Abwasser aus Flugzeugen vorhandenen Störstoffe wie Desinfektionsmittel zumindest 24 *E. coli* aus jeder Probe isoliert werden konnten, wurden diese in entsprechenden Verdünnungen auf mFC agar (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) ausplattiert. Nach 18 ± 2 Stunden Inkubation bei 44 °C wurden blaue Kolonien auf Brilliance Agar (Oxoid, Wesel, Germany) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Danach wurde eine Kolonie-PCR des *yccT* Genes durchgeführt, um *E. coli* sicher zu verifizieren (Hess et al 2018).

1.6.3 Abweichende Methodik für Proben des Fallbeispiels agro-industrielle Abwässer:

Für den Nachweis von MRSA in Prozess- und Abwässern aus Geflügel- und Schweineschlachthöfen werden zusätzliche Voranreicherungs- und Selektionsschritte nach Empfehlung des Nationalen Referenzlabors für koagulasepositive Staphylokokken einschließlich *Staphylococcus aureus* des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) mit folgenden Modifikationen durchgeführt. 100 ml der Probe aus dem Ablauf der Kläranlage werden durch einen Cellulosenitrat-Membranfilter (Porengröße 0,45 µm, Ø 47 mm) filtriert. Die Zulauf-Proben (100 ml) werden 15 min bei 5.000×g gekühlt auf 4°C abzentrifugiert. Die Membran wird vorsichtig 2-3-mal gefaltet und in einen sterilen 250 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml Müller-Hinton-Bouillon

(MHB) supplementiert mit 6,5% NaCl überführt. Das Pellet wird ebenfalls in 100 ml MHB mit 6,5% NaCl resuspendiert. Anschließend erfolgt eine aerobe Inkubation für 24 h bei 150 rpm und 36°C. Nach der Voranreicherung, wird 1 ml der Probe in 9 ml Trypton-Soja-Boullion (TSB) versetzt mit Aztreonam (50 mg/L) und Cefoxitin (3,5 mg/L) überführt. Nach 24 h aerober Inkubation bei 36°C werden 10 µl bzw. 100 µl der selektiven Anreicherungsbouillon auf CHROMagar MRSA ausplattiert und 24 h bei 42°C aerob inkubiert. Zur endgültigen Farbentwicklung der verdächtigen Kolonien werden die Platten bei Raumtemperatur für 24 h stehen gelassen.

1.6.4 Artbestimmung der Antibiotika-resistenten Bakterien

Benötigtes Gerät: Massenspektrometer mit der passenden Software, Targets und Matrix je nach verwendetem Hersteller

Die Artbestimmungen wurden über matrixgestützten Laser-Desorptions-/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) unter Verwendung eines VITEK R MS-Massenspektrometers (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der zugehörigen Myla-Software. Frische Kolonien von Columbia-Blutagarplatten wurden dazu auf Einmal-Targets geschmiert (# 410 893, bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) und mit der VITEK R MS-CHCA-Matrix (# 411 071, bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) überschichtet. Ein Gerät der Fa. Bruker kann mit entsprechenden Targets und entsprechender Software auch eingesetzt werden.

Isolate, die zum *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (ACB)-Komplex gehören, wurden durch Typisierung (Multilocus Sequence Typing) von PubMLST (<https://pubmlst.org/abaumannii/>) identifiziert.

1.6.5 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen

Benötigtes Gerät: Mikrotiterplatten-Photometer beliebiger Hersteller

Nur Bakterien die zum ACB-Komplex gehören, sowie *P. aeruginosa*, Enterobacterales, MRSA und VRE wurden in die Resistenzbestimmung einbezogen. Die Empfindlichkeit für Antibiotika wurde mit einem „dry broth“-Verfahren getestet, das eine Standard-Mikrodilution erlaubt (Micronaut-S MDR MRGN-Screening 3-System, MERLIN, Gesellschaft für mikrobiologische Diagnostika GmbH, Bornheim-Hersel, Deutschland). Dabei wurde nach Anleitung des Herstellers vorgegangen.

Folgende Antibiotika wurden für Gram-negative Bakterien getestet: Temocillin, Piperacillin, Piperacillin/Tazobactam, Cefotaxim, Ceftazidim, Imipenem, Meropenem, Amikacin, Tigecyclin, Chloramphenicol, Fosfomycin, Trimethoprim/Sulfamethoxazol, Ciprofloxacin, Levofloxacin und Colistin. Durch das Micronaut-S MDR MRGN-Screening 3-System werden auch phänotypische Hinweise auf mögliche Metallo- β -Laktamasen gegeben, diese Ergebnisse wurden für die Carbapenemasen aber immer über PCR verifiziert und ohne molekularbiologischen Nachweis nicht verwendet.

Gram-positive Bakterien wurden mit dem MRSA/GP System (MERLIN, Gesellschaft für mikrobiologische Diagnostika GmbH, Bornheim-Hersel, Germany) getestet. Das System enthält

folgende Substanzen: Oxacillin, Teicoplanin, Penicillin G, Fusidinsäure, Linezolid, Moxifloxacin, Clindamycin, Daptomycin, Erythromycin, Erythromycin/Clindamycin, Cefoxitin, Ceftarolin, Vancomycin, Rifampicin, Synercid (Quinupristin/ Dalfopristin) und Gentamicin.

Nach einer Bebrütung von 18-24 h bei 35-37 °C wurden die Platten in einem Mikrotiterplattenphotometer ausgemessen oder visuell abgelesen. Die Ergebnisse wurden nach EUCAST bewertet. Als Software wurde MCN-6 verwendet (MERLIN, Gesellschaft für mikrobiologische Diagnostika GmbH, Bornheim-Hersel, Germany).

1.7 Während des HyReKA-Projekts entstandene Veröffentlichungen zur weiterführenden Information

- Zacharias N., Essert S. M., & C. Schreiber (submitted): Performance of Retention Soil Filters for the Reduction of Antibiotic-resistant Bacteria and Other Pathogenic Microorganisms in Raw and Treated Wastewater before Being Discharged into Surface Waters. *Water Science and Technology*.
- Voigt, A.M.*, Zacharias, N.*, Timm, C., Wasser, F., Sib, E., Skutlarek, D., Parcina, M., Schmithausen, R.M., Schwartz, T., Hembach, N., Tiehm, A., Stange, C., Engelhart, S., Bierbaum, G., Kistemann, T., Exner, M., Faerber, H.A.** & C. Schreiber** (2019): Association between antibiotic residues, antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in anthropogenic wastewater – an evaluation of clinical influences. *Chemosphere* 241: 125032 *geteilte Erstautorenschaft, **geteilte Letztautorenschaft
- Voigt, A. M., Skutlarek, D., Timm, C., Schreiber, C., Felder, C., Exner, M. & H.A. Faerber (2019): Liquid chromatography-tandem mass spectrometry as a fast and simple method for the determination of several antibiotics in different aqueous matrices. *Environmental Chemistry*: <https://doi.org/10.1071/EN19115>.
- 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., & R.M. Schmithausen (2019): Antibiotic resistant bacteria and resistance genes in biofilms in clinical wastewater networks. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 222 (4): 655–662 bzw. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.03.006>.
- Müller, H., Zacharias, N., Timm, C., Schmithausen, R., Engelhart, S., Exner, M., Kistemann, T., Gajdiss, M., Bierbaum, G., Sib, E., Parcina, M. & C. Schreiber (2019): Antibiotika-resistente Bakterien im Abwasser von Patienten-Nasszellen. *Hygiene & Medizin Special* 44 -Supplement (Sonderausgabe - Ulmer Symposium): 43-45.
- Schreiber, C., Zacharias, N., Müller, H., Essert, S., Timm, C., Kistemann, T., Sib, E., Gajdiss, M., Parcina, M., Voigt, A., Färber, H., Exner, M., Schmithausen, R.M. & G. Bierbaum (2019): Einfluss von Krankenhausabwasser auf die Verbreitung von Antibiotika-Resistenzen in der aquatischen Umwelt, In: Pinnekamp, J. (Hrsg.): 52. Essener Tagung für Wasserwirtschaft (=Gewässerschutz - Wasser - Abwasser 250): 19/1-19/15
- Exner, M., Schmithausen, R., Schreiber, C., Bierbaum, G., Parcina, M., Engelhart, S., Kistemann, T., Sib, E., Walger, P. & T. Schwartz (2018): Zum Vorkommen und zur vorläufigen hygienisch-medizinischen Bewertung von Antibiotika-resistenten Bakterien mit humanmedizinischer Bedeutung in Gewässern, Abwässern, Badegewässern sowie zu möglichen Konsequenzen für die Trinkwasserversorgung. *Hygiene & Medizin* 43(5): D46-D54.
- Müller, H.*, Sib, E.*, Gajdiss, M.*, Klanke, U., Lenz-Plet, F., Barabasch, V., Albert, C., Schallenberg, A., Timm, C., Zacharias, N., Schmithausen, R., Engelhart, S., Exner, M., Parcina, M.**, Schreiber, C.** & G. Bierbaum** (2018): Dissemination of multi-resistant Gram-negative bacteria into German wastewater and surface waters. *FEMS Microbiology Ecology* 94 (5). *geteilte Erstautorenschaft, **geteilte Letztautorenschaft

1.8 Literatur

- Christoffels, E., Mertens, F. M., Kistemann, T. & C. Schreiber (2014): Retention of pharmaceutical residues and microorganisms at the Altendorf retention soil filter. *Water Science and Technology* 70 (9): 1503-1509.
- Franke et al. (2009): The emission potential of different land use patterns for the occurrence of coliphages in surface water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 212: 338-345.
- Hess, S., Berendonk, T.U., Kneis, D. (2018): Antibiotic resistant bacteria and resistance genes in the bottom sediment of a small stream and the potential impact of remobilization. *FEMS Microbiology Ecology* 94 (9): doi: 10.1093/femsec/fiy128.
- Kistemann, T., Christoffels, E., Franke, C., Rechenburg, A., Willkomm, M. & M. Exner (2008): Mikrobielle Belastung der Fließgewässer aus diffusen Eintragspfaden am Beispiel der Swist („Swist III“). Abschlussbericht. Bonn, Bergheim. https://www.lanuv.nrw.de/landesamt/forschungsvorhaben/gewaesser?tx_cartproducts_products%5Bproduct%5D=353&cHash=30041eb7a1c3f3feff642e653c73488f
- Mertens, F.M., Schreiber, C., Brunsch, A.F., Zacharias, N., Knorz, K., Grasser, N., Heinkel, S.-B., J., Kistemann, T. & E. Christoffels (2018): Überprüfung innovativer Maßnahmen zur Reduzierung von Spurenstoffen und Mikroorganismen in Fließgewässern (ReSMo). Abschlussbericht. Bergheim, Bonn.
- Mertens, F.M., Brunsch, A.F., Wunderlich-Pfeiffer, J., Christoffels, E., Kistemann, T. & C. Schreiber (2017): Mikroschadstoffe im eingeleiteten Wasser aus einem Regenwasser-kanal im Einzugsgebiet der Swist. *KW Korrespondenz Wasserwirtschaft* 10 (3): 145-150.
- Mertens, F.M., Schreiber, C., Heinkel, S.-B., Kistemann, T. & E. Christoffels (2013): Überprüfung und Bewertung von Maßnahmen zur Reduzierung der chemisch-physikalischen und hygienisch-mikrobiologischen Belastungen von Fließgewässern am Beispiel der Swist (2009-2012). („Swist IV“). Abschlussbericht. Bergheim, Bonn. https://www.lanuv.nrw.de/landesamt/forschungsvorhaben/gewaesser?tx_cartproducts_products%5Bproduct%5D=361&cHash=ca6964919d8bc0c83d405a39a48df05b
- Mertens, F.M., Christoffels, E., Schreiber, C. & T. Kistemann (2012): Rückhalt von Arzneimitteln und Mikroorganismen am Beispiel des Retentionsbodenfilters Altendorf. *Korrespondenz Abwasser Abfall* 59 (12): 1137-1143.
- Schreiber, C.*, Heinkel, S.-B.*, Zacharias, N., Mertens, F.-M., Christoffels, E., Gayer, U., Koch, C. & T. Kistemann (2019): Infectious rain? - Evaluation of human pathogen concentrations in stormwater in separate sewer systems. *Water Science and Technology* wst2019340. <https://doi.org/10.2166/wst.2019.340> *geteilte Erstautorenschaft
- Schreiber, C. (2019): Antibiotikaresistenzen in Abwasser und Gewässern. Einträge, Vorkommen, Verbreitung und gesundheitliche Bedeutung antibiotikaresistenter Bakterien in der aquatischen Umwelt (= Geographische Gesundheitsforschung - Geographical Health Research Band 4). Shaker-Verlag. Bonn/Berlin. ISBN 978-3-8440-6875-7.
- Schreiber, C., Rechenburg, A., Rind, E. & T. Kistemann (2015): The impact of land use on microbial surface water pollution. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 218: 181-187.

1.9 Anhang

Tabelle S1.3: *organo-leptischer Vor-Ort-Parameter bei Gewässern und Abwasser.*

Farbe	Trübung	Geruchsart	Geruchsintensität
farblos	klar	geruchslos	sehr schwach
weiß	trüb	leicht brackig	schwach
gelblich	milchig	brackig	mittel
gelb		abgestanden	mittel-stark
rost-rot		modrig	stark
violett		erdig	sehr stark
blau		fäkal	
grün		rapsig	
bräunlich			
braun			
ocker			
gräulich			
grau			
grau-schwarz			
schwarz			

2 Säule: Typisierung von Bakterienisolaten und Bestimmung der Resistenzgene über Taqman-PCR

G. Bierbaum, K. Kehl, C. Alberts, A. Schallenberg, M. Gajdiss

Typisierungslabor Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie, Universitätsklinikum Bonn, Universität Bonn, Venusberg-Campus 1, 53127 Bonn

M. Parčina, F. Lenz, R. Jozić, E. Sib

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie, Universitätsklinikum Bonn, Universität Bonn, Venusberg-Campus 1, 53127 Bonn

2.1 Kurze Einführung in die Messprinzipien

Typisierungsmethoden werden eingesetzt um festzustellen, ob ein Zusammenhang zwischen unterschiedlichen Isolaten einer Spezies besteht oder ob Stämme isoliert wurden, die zu einem bereits bekannten multiresistenten Epidemiestamm gehören. Prinzipiell werden bestimmte DNA-Fragmente per PCR amplifiziert (siehe auch Kapitel zur Säule 3) und die Amplifikate nach Aufreinigung per Sanger-Sequenzierung analysiert. Diese untersuchten Fragmente können hochvariable Sequenzen betreffen (*spa* bei *S. aureus*, DLST bei *Pseudomonas*) oder eine Kombination von 6-8 Housekeeping Genen im Falle der MLST-Typisierung.

Im Falle der Resistenzgene werden nur bestimmte DNA-Fragmente aus den Resistenzgenen nachgewiesen. In diesem Falle wurden spezielle unterschiedliche Farbsonden eingesetzt, die einen Multiplex-Einsatz erlauben.

2.2 Allgemeines Vorgehen

2.2.1 Benötigte Geräte für alle Typisierungen

- Brutschrank 37 °C
- Wasserbad oder Heizblock, 95°C
- Nanodrop zum Vermessen der DNA-Konzentration
- PCR-Gerät
- Agarose-Gelelektrophorese
- GeneJET Gel Extraction Kit
- Zentrifuge, geeignet für Eppendorf-Reaktionsgefäße
- Pipetten und Spitzen (steril), es ist günstig gestopfte Spitzen zu verwenden
- Computer inclusive eines Programms, mit dem DNA-Sequenzen inklusive der Elektropherogramme ausgewertet werden können, sowie das Programm zur Auswertung der Spa-Typen (Ridom, Münster).

2.2.2 DNA-Aufreinigung

Alle Stämme am Abend vorher auf Columbia-Blutagar frisch überimpfen.

Am nächsten Morgen 1-3 Kolonien (je nach Größe) von einer frischen Columbia-Agarplatte in 80 µl PCR-Wasser resuspendieren und 10 min bei 95 °C inkubieren, anschließend 5 min bei 13500 rpm und Raumtemperatur zentrifugieren. 40 µl Überstand vorsichtig abnehmen und die DNA-Konzentration vermessen (z. B. Nanodrop, ThermoFisher Scientific).

2.2.3 PCR

Die PCR wird, falls unten nicht anders angegeben, nachfolgendem Ansatz mit 100 ng DNA durchgeführt:

Reagenz	Menge
dNTPs [10 mM]	1 µl
jeweiliger Hin-Primer [10µM]	1 µl
jeweiliger Rück-Primer [10 µM]	1 µl
5x Phusion™ HF Puffer (NEB)	10 µl
DNA 100 ng	x µl
Phusion™ HF DNA Polymerase (NEB)	0,5 µl
DMSO (optional)	2,5 µl
Gereinigtes Wasser	ad 50 µl

Primer und PCR Bedingungen sind nachfolgend für die verschiedenen Gene und Organismen dieser Vorschrift zu entnehmen oder können auf den angegebenen Webseiten eingesehen werden. In seltenen Fällen wurde eine andere Polymerase eingesetzt, das ist dann dort vermerkt. Da manchmal Änderungen vorgenommen werden, ist es günstig, sich die Webseiten vorher anzusehen.

2.2.4 Agarosegelelektrophorese und Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte werden über eine einprozentige Agarosegelelektrophorese von den Ansätzen getrennt, die Banden ausgeschnitten und über das GeneJET Gel Extraction Kit (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) aufgereinigt und nach den Instruktionen der ausgewählten Sequenzierfirma zum Sequenzieren geschickt. Wenn nicht anders vermerkt, wird ein PCR-Primer zum Sequenzieren verwendet. Die Sequenzen werden über ein geeignetes Programm geöffnet und wenn nötig miteinander verglichen (z. B. Geneious, <https://www.geneious.com/>, kostenpflichtig). Die Auswertung der Sequenzen erfolgt über die oben genannten Webseiten.

2.3 Typisierungsmethoden nach Organismen geordnet

2.3.1 Spa-Typisierung *Staphylococcus aureus* (Harmsen et al., 2003)

Bei der *spa*-Typisierung werden die Repeats des Protein A-Gens von *Staphylococcus aureus* sequenziert. Die Repeats sind eine Abfolge von ca. 24 Basen, die direkt hintereinander angeordnet sind. Die Anzahl der Repeats schwankt und die Sequenzen der einzelnen Repeats sind auch variabel.

Jede Repeatsequenz wird nach der Sequenzierung über ein Computerprogramm einer bereits bekannten Sequenz zugeordnet, die eine Nummer besitzt, z. B.

```
>r01 GAGGAAGACAACAACAAGCCTAGC
>r02 AAAGAAGACAACAAAAACCTGGC
>r03 GAGGAAGACAATAACAAACCTGGT
>r04 GAGGAAGACAATAACAAGCCTGGT
>r05 AAAGAAGACAACAAAAAGCCTGGC
>r06 AAAGAAGACGGCAAAAAACCTGGC
>r07 GAGGAAGACAACAACAACCTGGT
```

Im nächsten Schritt werden die Repeats zusammengefügt und es entsteht eine Abfolge von Nummern, die den Spa-Typ t00x ausmacht:

t001, 26-30-17-34-17-20-17-12-17-16
 t002, 26-23-17-34-17-20-17-12-17-16
 t003, 26-17-20-17-12-17- 17-16
 t004, 09-02-16-13-13-17-34-16-34
 t005, 26-23-13-23-31-05-17-25-17-25-16-28
 t006, 26-23-13-23-31-05-17-17-25-16-28
 t007, 15-12-16-16-16-16-02-25-17
 t008, 11-19-12-21-17-34-24-34-22-25
 t009, 11-12-21-17-34-24-34-22-24-34-22-33-25

Durchführung

Abweichend von der Anleitung wurde im Projekt folgendermaßen vorgegangen: 1 Kolonie von einer frischen Columbia-Agarplatte in 80 µl PCR-Wasser resuspendieren und 10 min bei 95 °C inkubieren, bei 15300 rpm und Raumtemperatur zentrifugieren. 40 µl Überstand vorsichtig abnehmen und die DNA vermessen. Die PCR mit 100 ng DNA als Template durchführen.

Primer und PCR-Bedingungen sind unter <https://www.ridom.de/staphtype/update/> als pdf Dokument hinterlegt. Diese Bedingungen sollten eingehalten werden. Für die Aufreinigung der DNA sind dort ebenfalls Anweisungen hinterlegt, im Projekt wurde jedoch gemäß Punkt 2.2. vorgegangen:

Nach Aufreinigung der erhaltenen PCR-Produkte und deren Sequenzierung erfolgt die Auswertung der Sequenzen über das Programm „Ridom StaphType“ (kostenpflichtig), eine Datenbank ist unter <https://spa.ridom.de/index.shtml> einzusehen.

2.3.2 MLST-Typisierungen

Das Messprinzip ist die Vervielfältigung und Sequenzierung von für die Art spezifischen Housekeeping-Genen, von denen jeweils ca. 500 bp sequenziert werden. Jede unterschiedliche Variante dieser Sequenzen bekommt eine Nummer, die Kombination der Nummern ergibt einen Sequenztyp.

Verwendeter PCR Ansatz:

Reagenz	Menge
dNTPs [10 mM]	1 µl
jeweiliger hin-Primer [10µM]	1 µl
jeweiliger rück-Primer [10 µM]	1 µl
5x Phusion™ HF Puffer	10 µl
DNA	x µl
Phusion™ HF DNA Polymerase	0,5 µl
DMSO (optional)	2,5 µl
Gereinigtes Wasser	ad 50 µl

Die Primer und PCR-Bedingungen sind folgenden Veröffentlichungen bzw. Webseiten zu entnehmen. Dabei haben wir die Formatierung der Primer nicht verändert. Es ist zu empfehlen, die Primer direkt von der Website in die Bestellung zu kopieren, da sich sonst beim Abschreiben leicht Fehler einschleichen.

2.3.3 *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* cplx

(Diancourt et al. 2010)

➔ <https://pubmlst.org/abaumannii/>

<i>cpn60:F:cpn60F</i> <i>cpn60:F:cpn60R</i>	5'-ACTGTACTTGCTCAAG-3' 5'-TTCAGCGATGATAAGAAGTGG-3'
<i>fusA:F:fusA7</i> <i>fusA:R:fusA8</i>	5'-ATCGGTATTTCTGCKCACATYGAT-3' 5'-CCAACATACTGTGWACACCTTTGTT-3'
<i>gltA:F:gltAF</i> <i>gltA:R:gltAR</i>	5'-AATTTACAGTGGCACATTAGGTCCC-3' 5'-GCAGAGATACCAGCAGAGATACACG-3'
<i>pyrG:F:pyrG7</i> <i>pyrG:R:pyrG8</i>	5'-GGTGTGTTGTTTCATCACTAGGWAAAGG-3' 5'-ATAAATGGTAAAGAYTCGATRTCACCM-3'
<i>recA:F:RA1</i> <i>recA:R:RA2</i>	5'-CCTGAATCTTCYGGTAAAAC-3' 5'-GTTTCTGGGCTGCCAAACATTAC-3'
<i>rplB:F:rplB7</i> <i>rplB:R:rplB8</i>	5'-GTAGAGCGTATTGAATACGATCCTAACC-3' 5'-CACCACCACRTGYGGGTGATC-3'
<i>rpoB:F:Vic4</i> <i>rpoB:R:Vic6</i>	5'-GGCGAAATGGC(AGT)GA(AG)AACCA-3' 5'-GA(AG)TC(CT)TCGAAGTTGTAACC-3'
Optional <i>8fA: Ac696F</i> <i>8rA:Ac1093R</i>	5'-TAYCGYAAAGAYTTGAAAGAAG-3' 5'-CMACACCYTTGTTMCCRTGA-3'

PCR-Parameter

Reaktion	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	2 min	
Denaturierung	94 °C	20 sec	35
Annealing	50 °C	30 sec	35
Elongation	72 °C	30 sec	35
Finale Elongation	72 °C	5 min	
	4 °C	∞	

2.3.4 *Citrobacter freundii*

➔ <https://pubmlst.org/cfreundii/>

Primer

<i>aspC-f</i> <i>aspC-r</i>	5'-GTTTCGTGCCGATGAACGTC-3' 5'-AAACCCTGGTAAGCGAAGTC-3'
<i>clpX-f</i> <i>clpX-r</i>	5'-CTGGCGGTGCGGGTATACAA-3' 5'-GACAACCGGCAGACGACCAA-3'
<i>fadD-f</i> <i>fadD-r</i>	5'-GCTGCCGCTGTATCACATTT-3' 5'-GCGCAGGAATCCTTCTTCAT-3'
<i>mdh-f</i> <i>mdh-r</i>	5'-GTCGATCTGAGCCATATCCCTAC-3' 5'-TACTGACCGTCGCCTTCAAC-3'
<i>arcA-f</i> <i>arcA-r</i>	5'-GACAGATGGCGCGGAAATGC-3' 5'-TCCGGCGTAGATTTCGAAATG-3'
<i>dnaG-f</i> <i>dnaG-r</i>	5'-ACCGCCGATCACATACAACT-3' 5'-TGCACCAGCAACCCTATAAG-3'
<i>lysP-f</i> <i>lysP-r</i>	5'-GCTACGTCGTGAACTGAAGG-3' 5'-TGTCCCCTGGAAGGAGAAGC-3'

PCR-Parameter

Reaktion	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	5 min	
Denaturierung	98 °C	60 sec	30
Annealing	60 °C	30 sec	30
Elongation	72 °C	30 sec	30
Finale Elongation	72 °C	10 min	
	4 °C	∞	

2.3.5 *Enterobacter cloacae* complex

➔ <https://pubmlst.org/ecloacae/>

Primer

<i>dnaA-f2</i> <i>dnaA-r</i>	5'-AYAACCCGCTGTTCTBTATGGCGGCAC-3' 5'-KGCCAGCGCCATCGCCATCTGACGCGG-3'
<i>fusA-f2</i> <i>fusA-r2</i>	5'-TCGCGTTCGTTAACAAAATGGACCGTAT-3' 5'-TCGCCAGACGGCCCAGAGCCAGACCCAT-3'
<i>gyrB-f</i> <i>gyrB-r</i>	5'-TCGACGAAGCGCTCGCGGGTCACTGTAA-3' 5'-GCAGAACCGCCCCGCGGAGTCCCCTTCCA-3'
<i>leuS-f2</i> <i>leuS-r</i>	5'-GATCARCTSCCGGTKATCCTGCCGGAAG-3' 5'-ATAGCCGCAATTGCGGTATTGAAGGTCT-3'
<i>pyrG-f</i> <i>pyrG-r</i>	5'-AYCCBGAYGTBATTGCRCAYMAGGCGAT-3' 5'-GCRCGRATYTCVCCCTSHTCGTCCCAGC-3'
<i>rplB-f</i> <i>rplB-r</i>	5'-GTAAACCGACATCTCCGGGTCGTCGCCA-3' 5'-ACCTTTGGTCTGAACGCCCCACGGAGTT-3'
<i>rpoB-f</i> <i>rpoB-r2</i>	5'-AAAAACGTATTTCGTAAGGATTTTGGTAA-3' 5'-CCAGCAGATCCAGGCTCAGCTCCATGTT-3'

PCR-Parameter

Reaktion	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	5 min	
Denaturierung	94 °C	30 sec	35
Annealing	60 °C	30 sec	35
Elongation	72 °C	30 sec	35
Finale Elongation	72 °C	7 min	
	4 °C	∞	

2.3.6 *Enterococcus faecium*

➔ <https://pubmlst.org/efaecium/>

Primer

<i>adk1</i> <i>adk2</i>	5'-TATGAACCTCATTTTAATGGG-3' 5'-GTTGACTGCCAAACGATTTT-3'
<i>atpA1</i> <i>atpA2</i>	5'-CGGTTTCATACGGAATGGCACA-3' 5'-AAGTTCACGATAAGCCACGG-3'
<i>ddl1</i> <i>ddl2</i>	5'-GAGACATTGAATATGCCTTATG-3' 5'-AAAAAGAAATCGCACCG-3'
<i>gdh1</i> <i>gdh2</i>	5'-GGCGCACTAAAAGATATGGT-3' 5'-CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA-3'
<i>gyd1</i> <i>gyd2</i>	5'-CAAAGTCTTAGCTCCAATGGC-3' 5'-CATTTTCGTTGTCATACCAAGC-3'
<i>purK1</i> <i>purK2</i>	5'-GCAGATTGGCACATTGAAAGT-3' 5'-TACATAAATCCCGCCTGTTTC/T-3'
<i>pstS1</i> <i>pstS2</i>	5'-TTGAGCCAAGTCGAAGCTGGAG-3' 5'-CGTGATCACGTTCTACTTCC-3'

PCR-Parameter

Die PCR mit dem Primerpaar *atpA1* und *atpA2* ist mit AmpliTaq™ DNA Polymerase und 10x AmpliTaq™ Puffer I durchzuführen.

Reaktion	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	2 min	
Denaturierung	98 °C	20 sec	35
Annealing	65 °C	30 sec	35
Elongation	72 °C	30 sec	35
Finale Elongation	72 °C	5 min	
	4 °C	∞	

2.3.7 *Escherichia coli*

(Wirth et al. 2006)

➔ <http://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/ecoli>

Primer (die F1 und R1 Primer wurden später als alternative Primer angegeben)

<i>adkF</i> <i>adkR</i> <i>adkF1</i> <i>adkR1</i>	5'-ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG-3' 5'-CCGTCAACTTTCGCGTATTT-3' 5'-TCATCATCTGCACTTTCGCG-3' 5'-CCAGATCAGCGCGAACTTCA-3'
<i>fumCR1</i> <i>fumCF</i> <i>fumCR</i>	5'-TCCCCGGCAGATAAGCTGTGG-3' 5'-TCACAGGTCGCCAGCGCTTC-3' 5'-GTACGCAGCGAAAAAGATTC-3'
<i>gyrBF</i> <i>gyrBR1</i> <i>gyrBR</i>	5'-TCGGCGACACGGATGACGGC-3' 5'-GTCCATGTAGGCGTTCAGGG-3' 5'-ATCAGGCCTTCACGCGCATC-3'
<i>icdF</i> <i>icdR</i>	<i>i</i> 5'-ATGGAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA-3' 5'-GGACGCAGCAGGATCTGTT-3'
<i>mdhF</i> <i>mdhR</i> <i>mdhF1</i> <i>mdhR1</i>	5'-ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTGCTGGCGG-3' 5'-TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT-3' 5'-AGCGCGTTCTGTTCAAATGC-3' 5'-CAGGTTCAGAACTCTCTCTGT-3'
<i>purAF1</i> <i>purAF</i> <i>purAR</i>	5'-TCGGTAACGGTGTGCTG-3' 5'-CGCGCTGATGAAAGAGATGA-3' 5'-CATACGGTAAGCCACGCAGA-3'
<i>recAR1</i> <i>recAF</i> <i>recAF1</i> <i>recAR</i>	5'-AGCGTGAAGGTAAAACCTGTG-3' 5'-CGCATTGCTTTACCCTGACC-3' 5'-ACCTTTGTAGCTGTACCACG-3' 5'-TCGTCGAAATCTACGGACCGGA-3'

PCR-Parameter

Reaktion	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	2 min	
Denaturierung	98 °C	20 sec	30
Annealing	60 °C	30 sec	30
Elongation	72 °C	30 sec	30
Finale Elongation	72 °C	5 min	
	4 °C	∞	

2.3.8 *Klebsiella pneumoniae*

➔ (Diancourt et al. 2005)

➔ <http://bigsdbs.web.pasteur.fr/klebsiella/>

PCR-Primer

<i>F:rpoB</i> <i>R:rpoB</i>	5'-GGCGAAATGGCWGAGAACCA-3' 5'-GAGTCTTCGAAGTTGTAACC-3'
<i>F:gapA173</i> <i>R:gapA181</i>	5'-TGAAATATGACTCCACTCACGG-3' 5'-CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT-3'
<i>F:mdh130</i> <i>R:mdh867</i>	5'-CCCAACTCGCTTCAGGTTCAG-3' 5'-CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG-3'
<i>F:pgi1F</i> <i>R:pgi1R</i>	5'-GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC-3' 5'-CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT-3'
<i>F:phoE604.1</i> <i>R:phoE604.2</i>	5'-ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG-3' 5'-TGATCAGAACTGGTAGGTGAT-3'
<i>F:infB1F</i> <i>R:infB1R</i>	5'-CTCGCTGCTGGACTATATTTCG-3' 5'-CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC-3'
<i>F:tonB1F</i> <i>R:tonB2R</i>	5'-CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT-3' 5'-ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG-3'

PCR-Parameter

Reaktion	Temperatur	Dauer	Zyklen	Temperatur gap A	Temperatur tonB
Initiale Denaturierung	98 °C	2 min		94 °C	94 °C
Denaturierung	98 °C	20 sec	35	94 °C	94 °C
Annealing	50 °C	30 sec	35	60 °C	45 °C
Elongation	72 °C	30 sec	35	72 °C	72 °C
Finale Elongation	72 °C	5 min		72 °C	72 °C
	4 °C	∞			

Die PCR mit dem Primerpaar F:mdh130 und R:mdh867 ist mit AmpliTaq™ DNA Polymerase und 10x AmpliTaq™ Puffer I durchzuführen.

Sequenzierprimer

<i>infB2F</i>	5'-ACTAAGGTTGCCTCCGGCGAAGC-3'
<i>pgi2F</i>	5'-CTGCTGGCGCTGATCGGCAT-3'
<i>pgi2R</i>	5'-TTATAGCGGTTAATCAGGCCGT-3'

2.3.9 *Klebsiella oxytoca*

(Herzog et al. 2014)

➔ <https://pubmlst.org/koxytoca/>

Primer

<i>F:rpoB</i> <i>R:rpoB</i>	5'-GGCGAAATGGCWGAGAACCA-3' 5'-GAGTCTTCGAAGTTGTAACC-3'
<i>F:gap</i> <i>R:gap</i>	5'-TGAAATATGACTCCACTCACGG-3' 5'-CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT-3'
<i>F:mdh</i> <i>R:mdh</i>	5'-CCCAACTGCCTTCAGGTTCAG-3' 5'-CCTTCCACGTAGGCGCATTCC-3'
<i>F:pgi</i> <i>R:pgi</i>	5'-GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC-3' 5'-CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT-3'
<i>F:phoE</i> <i>R:phoE</i>	5'-ACCTGGCGCAACACCGATTTCTTC-3' 5'-TTCAGTCGTTGATTTTGTAAATCCAC-3'
<i>F:infB</i> <i>R:infB</i>	5'-CTCTCTGCTGGACTACATTCG-3' 5'-CGCTTTCAGCTCCAGAACTTC-3'
<i>F:tonB</i> <i>R:tonB</i>	5'-CTCTATACTTCGGTACATCAGGTT-3' 5'-CCTGTTTGGCGGCCAGCACCTGGT-3'

PCR-Parameter

Reaktion	Temperatur	Dauer	Zyklen	Temperatur gap A	Temperatur tonB
Initiale Denaturierung	98 °C	2 min		94 °C	94 °C
Denaturierung	98 °C	20 sec	35	94 °C	94 °C
Annealing	50 °C	30 sec	35	60 °C	40 °C
Elongation	72 °C	30 sec	35	72 °C	72 °C
Finale Elongation	72 °C	5 min		72 °C	72 °C
	4 °C	∞			

2.3.10 *Pseudomonas aeruginosa*

(Basset and Blanc 2014; Curran et al. 2004)

➔ <https://pubmlst.org/paeruginosa>

Primer

<i>acsA-F</i> <i>acsA-R</i>	5'-ACCTGGTGTACGCCTCGCTGAC-3' 5'-GACATAGATGCCCTGCCCTTGAT-3'
<i>aroE-F</i> <i>aroE-R</i>	5'-TGGGGCTATGACTGGAAACC-3' 5'-TAACCCGGTTTTGTGATTCCTACA-3'
<i>guaA-F</i> <i>guaA-R</i>	5'-CGGCCTCGACGTGTGGATGA-3' 5'-GAACGCCTGGCTGGTCTTGTGGTA-3'
<i>mutL-F</i> <i>mutL-R</i>	5'-CCAGATCGCCGCCGGTGAGGTG-3' 5'-CAGGGTGCCATAGAGGAAGTC-3'
<i>nuoD-F</i> <i>nuoD-R</i>	5'-ACCGCCACCCGTAAGT-3' 5'-TCTCGCCCATCTTGACCA-3'
<i>ppsA-F</i> <i>ppsA-R</i>	5'-GGTCGCTCGGTCAAGGTAGTGG-3' 5'-GGGTTCTCTTCTTCCGGCTCGTAG-3'
<i>trpE-F</i> <i>trpE-R</i>	5'-GCGGCCCAGGGTCGTGAG-3' 5'-CCCGGCGCTTGTTGATGGTT-3'

PCR-Bedingungen

Alle PCRs sind mit AmpliTaq™ DNA Polymerase und 10x AmpliTaq™ Puffer I durchzuführen.

Reaktion	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	
Denaturierung	95 °C	20 sec	35
Annealing	55 °C	30 sec	35
Elongation	72 °C	30 sec	35
Finale Elongation	72 °C	5 min	
	4 °C	∞	

Sequenzierprimer:

<i>acsA-F</i> <i>acsA-R</i>	5'-GCCACACCTACATCGTCTAT-3' 5'-AGGTTGCCGAGGTTGTCCAC-3'
<i>aroE-F</i> <i>aroE-R</i>	5'-ATGTCACCGTGCCGTTCAAG-3' 5'-TGAAGGCAGTCGGTTCCTTG-3'
<i>guaA-F</i> <i>guaA-R</i>	5'-AGGTCGGTTCCTCCAAGGTC-3' 5'-GACGTTGTGGTGCGACTTGA-3'
<i>mutL-F</i> <i>mutL-R</i>	5'-AGAAGACCGAGTTCGACCAT-3' 5'-GGTGCCATAGAGGAAGTCAT-3'
<i>nuoD-F</i> <i>nuoD-R</i>	5'-ACGGCGAGAACGAGGACTAC-3' 5'-TGGCGGTCTGGTGAAGGTGAA-3'
<i>ppsA-F</i> <i>ppsA-R</i>	5'-GGTGACGACGGCAAGCTGTA-3' 5'-GTATCGCCTTCGGCACAGGA-3'
<i>trpE-F</i> <i>trpE-R</i>	5'-TTCAACTTCGGCGACTTCCA-3' 5'-GGTGTCCATGTTGCCGTTCC-3'

2.3.11 DLST *Pseudomonas aeruginosa*

(Cholley et al. 2015)

P. aeruginosa kann alternativ auch über die Sequenzierung von zwei hochvariablen Loci (ms172 und ms217) typisiert werden. Das spart 5 Sequenzierungen pro Stamm. Deshalb wurde diese Methode im Projekt vorzugsweise eingesetzt. Teilweise sind die DLST-Typen den MLST-Typen bereits zugeordnet. Alternativ wurde sonst ein Vertreter einer eines DLST-Typs, der öfter isoliert worden war, nach MLST typisiert. Achtung: Diese loci sind keine Housekeeping-Gene. Es gibt Stämme, in denen einer der beiden Loci fehlt.

➔ <http://www.dlst.org>

Primer

<i>ms172.forward</i> <i>ms172.reverse</i>	5'-GGATTCTCTCGCACGAGGT-3' 5'-TACGTGACCTGACGTTGGTG-3'
<i>ms217.forward</i> <i>ms217.reverse</i>	5'-TTCTGGCTGTCGCGACTGAT-3' 5'-GAACAGCGTCTTTTCCTCGC-3'

PCR-Bedingungen

Reaktion	Temperatur ms172	Temperatur ms217	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	94 °C	5 min	
Denaturierung	94 °C	94 °C	30 sec	35
Annealing	60 °C	64 °C	30 sec	35
Elongation	72 °C	72 °C	45 sec	35
Finale Elongation	72 °C	72 °C	10 min	
	4 °C	4 °C	∞	

Für die Auswertung mit Hilfe der angegebenen Datenbank müssen die erhaltenen Sequenzen zunächst mit den Sequenzen ACGATGCTGGADCCA für den ms172 Locus und CAGCAT-GGCG für den ms217 Locus abgeglichen und von diesen Startpunkten auf 400 bp für den ms172 Locus und 350 bp für den ms217 Locus gekürzt werden. Die gekürzten Sequenzen werden im Anschluss hochgeladen, die Kombination beider erhaltenen Nummern ergibt den Typen.

2.4 Bestimmung von Resistenzgenen aus kultivierten Antibiotika-resistenten Bakterien

2.4.1 DNA Extraktion aus bakteriellen Kolonien

Material:

- PCR-grade H₂O
- sterile Eppendorf Tubes
- Heizblock
- Cycler für qPCR, z. B. Bio-Rad CFX96

Für die direkte Isolation (crude prep) wird mit einer Impföse eine Einzelkolonie von einer Platte gepickt und in 100µl sterilem Wasser suspendiert. Die Bakterienlösung wird bei 95°C für 15 Minuten aufgekocht und danach abzentrifugiert (5 min, 10000 rpm). Der Überstand mit der DNA wird in ein 1.5ml Eppendorf Tube überführt und bis zur Nutzung bei -20°C gelagert.

2.4.2 Real-time PCR

Material:

- Primer und Sonden (Microsynth, Balgach, Schweiz)
- Mastermix (Biozym 2 x qPCR Mastermix, Hessisch Oldendorf, Deutschland)
- PCR-grade H₂O
- Real-Time PCR Cycler
- Sterile Eppendorf Tubes
- PCR Cycler

Die PCR wird als 4-Plex PCR mit genspezifischen Sonden durchgeführt, die bei Amplifikation der Zielsequenz verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe freisetzen. So ist eine simultane Detektion von vier verschiedenen Resistenzgenen in einem PCR-Lauf möglich. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind ROX (6-Carboxyl-X-Rhodamine), FAM (Fluorescein), HEX (Hexachloro-Fluorescein) und Cy5 (Cyanine 5).

2.4.3 Mastermix Präparation

Der Mastermix der 4Plex PCR wird angesetzt wie in der folgenden Tabelle beschrieben:

Tabelle 3.1: Zusammensetzung des Mastermixes pro PCR Reaktion

Pro Reaktion (20 µl)		Endkonzentration
Biozym 2 x qPCR Mastermix (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland)	10 µl	
Vorwärtsprimer 10µM (Gen 1 bis 4)	je 0.5µl	je 0.25µM
Rückwärtsprimer 10µM (Gen 1 bis 4)	je 0.5µl	je 0.25µM
Sonde 10µM (Gen 1 bis 4)	je 0.25µl	je 0.125µM
PCR-grade H ₂ O	3µl	
DNA template	2µl	

2.4.4 Primer und Sonden

Tabelle 3.2: Primer und Sonden zur Detektion der Resistenzgene

KPC-F	GCA GCG GCA GCA GTT TGT TGA TT	Swayne <i>et al.</i> (2013)	PCR 1
KPC-R	GTA GAC GGC CAA AAT AGG TGC	Swayne <i>et al.</i> (2013)	
KPC-Probe	FAM -CAG TCG GAG ACA AAA CCG GAA CCT GC- BHQ1	Swayne <i>et al.</i> (2013)	
OXA48-F	TTC GGC CAC GGA GCA AAT CAG	Swayne <i>et al.</i> (2013)	
OXA48-R	GAT GTG GGC ATA TCC ATA TTC ATC GCA	Swayne <i>et al.</i> (2013)	
OXA48-Probe	HEX -CTG GCT GCG CTC CGA TAC GTG TAA CTT ATT G- BHQ1	Swayne <i>et al.</i> (2013)	
SME-F	TGT AGG TGA CAA RAC TGG GAG CTG TG	Swayne <i>et al.</i> (2013)	
SME-R	GCA ATA CGT GAT GCT TCC GCA ATA G	Swayne <i>et al.</i> (2013)	
SME-Probe	ROX -CGG CAT AAT CAT TCG CA- BHQ2	Swayne <i>et al.</i> (2013)	
IMP-F	CCC ACG TAT GCA TCT GAA TTA ACA AA	Swayne <i>et al.</i> (2013)	
IMP-R	CCA AAC CAC TAC GTT ATC TTG AGT G	Swayne <i>et al.</i> (2013)	
IMP-Sonde	Cy5 -CAA GCT AMA WAT TCA TTT AGC GGR GYT ARC TAT T- BHQ2	Swayne <i>et al.</i> (2013)	

VIM-F	GAT GAG TTG CTT TTG ATT GAT ACA GC	Swayne <i>et al.</i> (2013)	PCR 2
VIM-R	CCG ACK CGR TCG TCA T	Swayne <i>et al.</i> (2013)	
VIM-Sonde	FAM -TCG CGG AGA TTG ARA AGC AAA TTG GA- BHQ1	Swayne <i>et al.</i> (2013)	
SIM-F	CGG AAG AAG CCC AGC	Swayne <i>et al.</i> (2013)	
SIM-R	GTT TTT TAA CGA TGC CGA ATC CCT TG	Swayne <i>et al.</i> (2013)	
SIM-Sonde	HEX -AAG GGA TCT ATC TTC ATA CAT CTT TTC AAG A- BHQ1	Swayne <i>et al.</i> (2013)	
NDM-F	CCC GAC GAT TGG CCA	Swayne <i>et al.</i> (2013)	
NDM-R	ATC CAG TTG AGG ATC TGG GC	Swayne <i>et al.</i> (2013)	
NDM-Sonde	ROX -ACC GAA TGT CTG GCA GCA CAC TTC- BHQ2	Swayne <i>et al.</i> (2013)	
IMI-F	GCG ATG AAC GTG ACA CAT CT	Marijo Parcina	
IMI-R	ATC GCT TGG TAC GCT AGC AC	Marijo Parcina	PCR 3
IMI-Sonde	Cy5 -GAA AAC CCT TGC ACT GGG TA- BHQ2	Marijo Parcina	
SPM-F	AGG CAA GGT CTT CTC GTT TT	Swayne <i>et al.</i> (2013)	
SPM-R	GCA TCT CCC AGA TAA CCA AGT T	Swayne <i>et al.</i> (2013)	
SPM-Sonde	FAM -TCG CCC GAT AAT GTC GTC GTA TAT T- BHQ1	Swayne <i>et al.</i> (2013)	
OXA-24-F	TTG GCC CCC TTA AAA TTA CAC	Marijo Parcina	
OXA-24-R	AAC ACC CAT TAC CCA TCC AC	Marijo Parcina	
OXA-24-Sonde	HEX -TGA CCT TGC ACA TAA CCG AT- BHQ1	Marijo Parcina	
GIM-F	TTG GTC TGA AGA AGA CAC GAA G	Swayne <i>et al.</i> (2013)	
GIM-R	GTA GGA ACC GGC TTT CCT T	Swayne <i>et al.</i> (2013)	
GIM-Sonde	ROX -ATC GCA CTG CTG GTA TCA AGT TGC TA- BHQ2	Swayne <i>et al.</i> (2013)	PCR 4
OXA-58_F	CAC GCA TTT AGA CCG AGC A	Marijo Parcina	
OXA-58-R	TGG CTT TCC ATC CCA CTT	Marijo Parcina	
OXA-58-Sonde	Cy5 -AAA ACA GCT TAT ATT CCT GCA TCT- BHQ2	Marijo Parcina	
OXA-23-F	GAA GGG CGA GAA AAG GTC A	Marijo Parcina	
OXA-23-R	TCA GCA TTA CCG AAA CCA ATA C	Marijo Parcina	
OXA-23-Sonde	FAM -CGG TCT TGA TCT CAT GCA AA- BHQ1	Marijo Parcina	

OXA-48-like-F	CAA TGG YGA CTA TAT TAT TCG GGC	Lee <i>et al.</i> (2015)	
OXA-48-like-R	CCA CAC ATT ATC ATC MAG TTC AAC C	Lee <i>et al.</i> (2015)	
OXA-48-like-Sonde	HEX - CTA AGA TTG GCT GGT GGG T- BHQ1	Lee <i>et al.</i> (2015)	
OXA-51-F	TTT TAT TTC AGC CTG CTC ACC	Marijo Parcina	
OXA-51-R	ATA CTC GGT CGA AGC ACG AG	Marijo Parcina	
OXA-51-Sonde	ROX -CAA ATC ACA GCG CTT CAA AA- BHQ2	Marijo Parcina	
MCRScreen-F	ACA TCG ACG GCG TAT TCT GT	Marijo Parcina	
MCRScreen-R	TCC ATC ACG CCT TTT GAG TC	Marijo Parcina	
MCRScreen-Sonde	Cy5 -TGA TGT CGA TAC CGC CAA ATA CC- BHQ2	Marijo Parcina	

Abkürzungen: *BHQ*, Black Hole Quencher, *ROX*, (6-Carboxyl-X-Rhodamine), *FAM* (Fluorescein), *HEX* (Hexachloro-Fluorescein), *Cy5* (Cyanine 5).

2.4.5 Temperaturprofil

Die PCR wurde unter folgenden Zykluskonditionen durchgeführt.

Tabelle 3.3: Zykluskonditionen der multiplex qPCR

95°C	2 min	Denaturierung, Enzymaktivierung	1 x
95°C	5 s	Denaturierung	35 x (crude prep)
60°C	30 s	Annealing + Elongation	

2.5 Literatur

- Basset P, Blanc DS. Fast and simple epidemiological typing of *Pseudomonas aeruginosa* using the double-locus sequence typing (DLST) method. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2014, 33, 927-32.
- Cholley P, Stojanov M, Hocquet D *et al.* Comparison of double-locus sequence typing (DLST) and multilocus sequence typing (MLST) for the investigation of *Pseudomonas aeruginosa* populations. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2015, 82, 274-7.
- Curran B, Jonas D, Grundmann H *et al.* Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*, 2004, 42, 5644-9.
- Diancourt L, Passet V, Verhoef J *et al.* Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol*, 2005, 43, 4178-82.
- Diancourt L, Passet V, Nemec A *et al.* The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One*, 2010, 5, e10034.
- Harmsen D, Claus H, Witte W *et al.* Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting using a novel software for spa-repeat determination and database management. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41, 5442-8.
- Herzog KA, Schneditz G, Leitner E *et al.* Genotypes of *Klebsiella oxytoca* isolates from patients with nosocomial pneumonia are distinct from those of isolates from patients with antibiotic-associated hemorrhagic colitis. *J Clin Microbiol*, 2014, 52, 1607-16.
- Swayne R, Ellington MJ, Curran MD, Woodford N, Aliyu SH. Utility of a novel multiplex TaqMan PCR assay for metallo- β -lactamase genes plus other TaqMan assays in detecting genes encoding serine carbapenemases and clinically significant extended-spectrum β -lactamases. *Int J Antimicrob Agents*. 2013 42, 352-6.
- Wirth T, Falush D, Lan R *et al.* Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol*, 2006, 60, 1136-51.

2.6 Während des HyReKA-Projekts entstandene Veröffentlichungen zur weiterführenden Information

- Voigt, A.M.*, Zacharias, N.*, Timm, C., Wasser, F., Sib, E., Skutlarek, D., Parcina, M., Schmithausen, R.M., Schwartz, T., Hembach, N., Tiehm, A., Stange, C., Engelhart, S., Bierbaum, G., Kistemann, T., Exner, M., Faerber, H.A.** & C. Schreiber** (2019): Association between antibiotic residues, antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in anthropogenic wastewater – an evaluation of clinical influences. *Chemosphere* 241: 125032 *geteilte Erstautorenschaft, **geteilte Letztautorenschaft
- 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., & R.M. Schmithausen (2019): Antibiotic resistant bacteria and resistance genes in biofilms in clinical wastewater networks. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 222 (4): 655–662 bzw. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.03.006>.
- Müller, H., Zacharias, N., Timm, C., Schmithausen, R., Engelhart, S., Exner, M., Kistemann, T., Gajdiss, M., Bierbaum, G., Sib, E., Parcina, M. & C. Schreiber (2019): Antibiotika-resistente Bakterien im Abwasser von Patienten-Nasszellen. *Hygiene & Medizin Special 44 -Supplement (Sonderausgabe - Ulmer Symposium): 43-45.*
- Schreiber, C., Zacharias, N., Müller, H., Essert, S., Timm, C., Kistemann, T., Sib, E., Gajdiss, M., Parcina, M., Voigt, A., Färber, H., Exner, M., Schmithausen, R.M. & G. Bierbaum (2019): Einfluss von Krankenhausabwasser auf die Verbreitung von Antibiotika-Resistenzen in der aquatischen Umwelt, In: Pinnekamp, J. (Hrsg.): 52. Essener Tagung für Wasserwirtschaft (=Gewässerschutz - Wasser - Abwasser 250): 19/1-19/15
- Exner, M., Schmithausen, R., Schreiber, C., Bierbaum, G., Parcina, M., Engelhart, S., Kistemann, T., Sib, E., Walger, P. & T. Schwartz (2018): Zum Vorkommen und zur vorläufigen hygienisch-medizinischen Bewertung von Antibiotika-resistenten Bakterien mit humanmedizinischer Bedeutung in Gewässern, Abwässern, Badegewässern sowie zu möglichen Konsequenzen für die Trinkwasserversorgung. *Hygiene & Medizin* 43(5): D46-D54.
- Müller, H.*, Sib, E.*, Gajdiss, M.*, Klanke, U., Lenz-Plet, F., Barabasch, V., Albert, C., Schallenberg, A., Timm, C., Zacharias, N., Schmithausen, R., Engelhart, S., Exner, M., Parcina, M.**, Schreiber, C.** & G. Bierbaum** (2018): Dissemination of multi-resistant Gram-negative bacteria into German wastewater and surface waters. *FEMS Microbiology Ecology* 94 (5). *geteilte Erstautorenschaft, **geteilte Letztautorenschaft

3 Säule: Kulturunabhängige molekularbiologische Identifizierung und Quantifizierung von Antibiotikaresistenzgenen und von Genen fakultativ-pathogener Bakterienspezies (qPCR/ddPCR)

T. Schwartz, J. Alexander, N. Hembach

Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG), Hermann-von Helmholtz Platz 1, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen

T. Berendonk, S. Hess

Technische Universität Dresden, Institut für Hydrobiologie, Drudebau, Zellescher Weg 40, 01062 Dresden

A. Tiehm, C. Stange

TZW Karlsruhe, DVGW-Technologiezentrum Wasser, Umweltbiotechnologie und Altlasten, Karlsruher Straße 84, 76139 Karlsruhe

3.1 Vorbereitung: DNA Extraktion aus Wasser- und Feststoffproben

Materialien

- Schöpfer mit Teleskopstange und Winkelbecher
- Sterile Plastikgefäße (z. B. Sarstedt, 75.9922.813, HD-PE/PP)
- Polycarbonatmembran (Whatman Nucleopore Track-Etched, 47 mm, 0,2 μm , WHA111106, Sigma-Aldrich oder PES Supor®-Membran, Pall Laboratories, 47 mm, 0,2 μm , 60301)
- Vakuumpumpe
- Filtrationseinheit mit Druckausgleichsgefäß und Manometer (Trichter, Fritte, Plastikringe, Halterung)
- Reaktionsgefäße/Eppendorf Tubes (1,5 und 2 mL)
- DNA-Extraktionskit (FastDNA SPIN kit for soil, MP Biomedicals, 116560200)
- DNA-Konzentrationsbestimmung, Qubit (Thermo Fisher Scientific, Q33217 + Q32853) oder Pico Green (Thermo Fisher Scientific, P1149), oder Nanodrop (Thermo Fisher Scientific)

3.1.1 Probenahme

Wenn die Wasserentnahme mit einem Betreten des Gewässers verbunden ist, erfolgt die Probenahme flussaufwärts vom Eintrittsort, um aufgewirbeltes Sediment in der Wasserprobe zu vermeiden. Der Winkelbecher wird 1-2-mal mit dem Probenwasser gespült. Die finale Wasserprobe wird in sterilen Plastikgefäßen gesammelt und gekühlt (4-7°C) transportiert. Eine zeitnahe Aufarbeitung der Wasserprobe ist angezeigt (innerhalb von 24 h).

3.1.2 Lebend/Tot Diskriminierung mittels PMA

Propidiummonoazid (PMA) ist eine zweifach positiv geladene Substanz und kann deshalb nicht in Zellen mit einer intakten Membran eindringen. In tote bzw. membrangeschädigte Zellen dringt PMA ein und lagert sich in die DNA ein. Durch Bestrahlung mit Licht von einer Wellenlänge von 464 nm bildet sich eine kovalente Bindung zwischen dem PMA und der DNA aus. DNA, die auf diese Weise gebunden ist steht für nachfolgende molekularbiologische Analysen nicht mehr zur Verfügung.

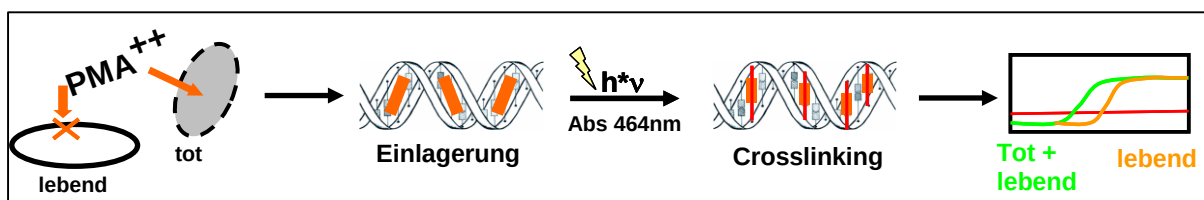


Abbildung 4.1: Wirkmechanismus von PMA

Materialien

- Propidiummonoazid (PMA, 20 mM in 20% DMSO, Biotium, 40013)
- PMA-Lite LED Photolysis Device (Biotium, E90002)
- Reaktionsgefäße (Roth, 7080.1)

Durchführung

Da PMA eine lichtaktive Substanz ist, sollten alle Schritte, in denen mit PMA gearbeitet wird im Dunkeln durchgeführt werden. Bei geringen Zelldichten bzw. schwer zu pelletierendem Material größere Volumen einsetzen und das PMA-Volumen entsprechend angleichen. Als Kontrolle bzw. Vergleichswert wird die Prozedur für eine Probe ohne PMA durchgeführt.

- 500 µL bis 1,5 mL Probe oder Polycarbonatmembran in ein Reaktionsgefäß geben
- PMA (1,25 µL/500 µL Probe bzw. Membran) zugeben
- 15 min im Dunkeln inkubieren
- Reaktionsgefäße in das PMA-Lite LED Photolysis stellen und 10 min bestrahlen
- Die Probe bzw. Membran kann eingefroren oder direkt für eine DNA-Extraktion genutzt werden (FastDNA SPIN kit for Soil, MP Biomedicals).

Da die lebend/Tot Diskriminierung mit PMA auf der Zerstörung der bakteriellen Membran beruht, ist sie bei Desinfektionsmethoden wie UV-Bestrahlung, welche die Membranen nicht beeinflusst, nicht zwingend erforderlich. Es resultiert allerdings ebenfalls kein Nachteil aus der zusätzlichen Behandlung (Nocker et al. 2007).

Zur besseren Vergleichbarkeit sollte mit allen Proben gleich verfahren werden!

3.1.3 Extraktion genomischer DNA aus Wasserproben

Materialien

- Ribolyser/FastPrep-24 (MP Biomedicals, 116004500)
- FastDNA SPIN kit for Soil (MP Biomedicals, 116560200)
- 2 mL Reaktionsgefäße
- Ethanol (absolut, HPLC geeignet)

Durchführung

Niedriger Trübungsgrad (bsp. geklärtes Abwasser, Fluss- und Seewasser)

- Geeignetes Wasservolumen (trübungsabhängig, u. U. schrittweise über mehrere kleinen Teilvolumen) filtrieren.
- Filtermembran mit einer sterilen Pinzette zusammengerollt in ein Eppendorf-Tube überführen (optional: „1.2 lebend/Tot Diskriminierung“)
- Aufbewahrung des Membranfilters bis zur DNA-Extraktion bei -20°C möglich.
- Weiter mit nach dem Herstellerprotokoll des FastDNA SPIN kit for Soil

Hoher Trübungsgrad (bsp. Rohabwasser)

- Wasserprobe aufschütteln und bis zu 50 mL bei 20.000 g für 20 min zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Maximal 500 mg des Pellet in die Lysingmatrix E überführen
- Weiter nach dem Herstellerprotokoll des FastDNA SPIN kit for Soil

3.1.4 Extraktion genomischer DNA aus Feststoffproben

Feststoffmaterial kann abgewogen und direkt in die Lysingmatrix eingesetzt werden. Um eine hohe DNA-Ausbeute für die nachfolgenden molekularbiologischen Untersuchungen zu gewährleisten sollte das maximal mögliche Volumen der Lysingmatrix Tubes ausgenutzt werden, jedoch nicht viel mehr als 500 mg Feststoff (Herstellerangabe). Anschließend wird die DNA-Extraktion nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

3.1.5 Überprüfung der DNA Integrität und DNA-Konzentration

Materialien

- Fluorometrische Quantifizierung (Qubit 4, Thermo Fisher Scientific, Q33238),
- dsDNA HS (high sensitivity) und/oder BR (broad range) Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Q33230, Q32850)
- Qubit Assay Tubes (Thermo Fisher Scientific, Q32856)
- Reaktionsgefäße
- Alternative: Nanodrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific)

Qubit Messprinzip (verlässlich Detektionslimit bis 0,01 ng/μL DNA)

Das Qubit Fluorometer verwendet einen, an doppelsträngige DNA bindenden Farbstoff, der nur als DNA-Farbstoff-Komplex fluoresziert. Dadurch wird es möglich, besonders geringe DNA-Konzentrationen präzise zu erfassen. Gerade bei geringen DNA-Konzentrationen liefert das Qubit-Messprinzip deutlich präzisere Ergebnisse als die direkte photometrische Vermessung. Die Durchführung erfolgt nach Herstellerangaben.

Nanodrop ND-2000 Messprinzip (verlässliches Detektionslimit bis 2 ng/μL DNA)

Die Nanodrop DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgt über die Messung der Absorption von UV-Licht (260 nm) durch die doppelsträngige DNA. Die Durchführung erfolgt nach Herstellerangaben.

3.2 Quantitative Analyse mittels quantitativer Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR, auch qPCR genannt, ist eine molekularbiologische Methode um die Konzentration eines spezifischen DNA-Abschnitts in einer Probe zu bestimmen. Das Grundprinzip der PCR-Reaktion, das auch der qPCR zugrunde liegt, ist das Vervielfältigen einer speziellen DNA-Sequenz. Bei erfolgreicher Amplifikation verdoppelt sich die Anzahl der ursprünglichen DNA-Sequenz mit jedem Zyklus nach der Formel 2^n (n = Anzahl der Zyklen). Die Vervielfältigung wird entweder mit einem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff oder mit einer Fluoreszenzsonde gemessen.

Die PCR-Reaktion erzeugt dadurch eine exponentiell ansteigende und messbare Menge an DNA. Damit lässt sich eine lineare Beziehung zwischen der Anzahl der Zyklen und dem Logarithmus der Menge an erzeugter DNA herstellen. Der erste Zyklus, bei dem der Detektor das bei der Amplifikation erzeugte Fluoreszenzsignal als oberhalb des Hintergrundsignals erkennt, wird als Schwellenwert-Zyklus (C_t = threshold cycle), oder Zyklus der Quantifizierung (C_q = cycle of quantification) bezeichnet. Wird der Schwellenwert in der exponentiellen Phase festgelegt, kann die tatsächliche Ausgangsmenge der Moleküle berechnet werden, da die Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Menge des PCR-Produkts in der exponentiellen Phase ist. Der C_q -Punkt ist umgekehrt proportional zu der Menge an Ausgangs-Ziel-DNA in der Probe. D.h. je mehr Ausgangsmaterial, desto niedriger ist der C_q -Wert für diese Probe. Der gemessene C_q -Wert für eine Probe kann mit einer Standardkurve verglichen werden, um die exakte Kopienzahl der Originalkonzentration zu berechnen.

3.2.1 Molekularbiologische Nachweissysteme für Antibiotikaresistenzgene und fakultativ pathogene Bakterien

Als Vertreter von Erregern, die eine Resistenz gegen Reserveantibiotika besitzen, sind Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) und *Staphylococcus aureus* (VRSA) zu nennen. Sie stellen ein ernsthaftes Problem in allen Einrichtungen der Gesundheitspflege dar. Aufgrund dieser Problematik ist das Vancomycin-Resistenzgen *vanA*, das auf einer Vielzahl an mobilen genetischen Elementen lokalisiert sein kann (Tn-1546-like Transposons), ein wichtiger Parameter für eine mikrobiologische Bewertung von Abwasser (Gagnon et al. 2011, Starikova et al. 2013, Wardal et al. 2014). Das Unterbinden der Verbreitung des *vanA* Gens ist umso wichtiger, da frühere Arbeiten gezeigt haben, dass das *vanA* Gen auch unter Abwesenheit von Enterokokken in Biofilmen aus autochthonen Trinkwasserbakterien zu finden ist (Schwartz et al. 2003).

Ebenfalls zu den klinisch relevanten Resistenzgenen ist das mobile/übertragbare Colistinresistenzgen *mcr-1* zu nennen. Dieses Resistenzgen ist von besonderer Relevanz, da Colistin eines der letzten Mittel bei der Behandlung von multiresistenten Gram-negativen Bakterien darstellt (Reserveantibiotika). Das *mcr-1* Gen ist eines von zwei Plasmid-vermittelten Colistinresistenzgenen und wurde ursprünglich in *Escherichia coli* nachgewiesen. Aufgrund von genetischen Transferereignissen wurde es später auch bei Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* und *Klebsiella pneumoniae* festgestellt. Eine weitere Verbreitung dieses Resistenzgens wird in der Humanmedizin als äußerst kritisch angesehen.

Einen weiteren Schwerpunkt bildet die Gruppe der ESBL-Keime (erweitertes Spektrum an beta-Lactamase produzierenden Bakterien) aufgrund der aktuellen Infektionslage im Klinikbereich. Dafür wurden molekularbiologische Marker für die Resistenzgene *bla*_{CTX-M15}, *bla*_{CTX-M32}, *bla*_{NDM-1} und *bla*_{CMY-2}, die gegen beta-Lactame und Cephalosporine der 3. Generation wirken, sowie *bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC-3} und *bla*_{VIM-2} die eine Resistenz gegen Carbapeneme (Reserveantibiotika) vermitteln, ausgewählt. Weiterhin wurde *bla*_{TEM}, das gegen Ampicilline gerichtet ist, mit aufgenommen. Zusätzlich wurde die gegen Tetracyclin gerichtete Resistenz-Determinante *tet*(M) und das Sulfonamid-Resistenzgen *sul1* berücksichtigt.

Streptococcus pneumoniae ist ein weiterer Vertreter fakultativ pathogener Bakterien und kann schwere Atemwegserkrankungen hervorrufen. Infektionen mit *S. pneumoniae* werden häufig mit Makrolidantibiotika behandelt. Eine Resistenzzunahme gegen Makrolidantibiotika führte in den letzten 10 Jahren zu einer Erhöhung der Sterblichkeitsrate bei *S. pneumoniae* Infektionen (Wardal et al. 2014). Das Makrolidresistenzgen gegen Erythromycin (*ermB*) ist zudem häufig auf Transposons (mobile genetische Elemente) lokalisiert (Okitsu et al. 2005).

Tabelle 4.1: Real-Time Primersysteme zur Detektion von klinisch relevanten Antibiotikaresistenzgenen und fakultativ pathogenen Bakterien.

	Zielgen	Primer	Amplicon	°C	Referenz
Antibiotikaresistenzgene	<i>bla</i> _{TEM}	For TTCCTGTTTTTGCTCACCCAG Rev CTCAAGGATCTTACCGCTGTTG	112bp	60	Rocha et al. 2018)
	<i>ermB</i>	For TGAATCGAGACTTGAGTGTGCAA Rev GGATTCTACAAGCGTACCTT	71bp	60	Alexander et al. 2015
	<i>tet</i> (M)	For GGTTTCTCTTGGATACTTAAATCAATCR Rev CCAACCATAYAATCCTTGTTTCRC	88bp	60	Peak et al. 2007
	<i>sul1</i>	For CGCACCGGAAACATCGCTGCAC Rev TGAAGTTCCGCCGCAAGGCTCG	161bp	60	Rocha et al. 2018
	<i>bla</i> _{CMY-2}	For CGTTAATCGCACCATCACCC Rev CGTCTTACTAACCGATCCTAGC	172bp	62	Kurpiel and Hanson 2011
	<i>bla</i> _{CTX-M15}	For CGCTTTGCGATGTGCAG Rev ACCGCGATATCGTTGGT	551bp	60	Paterson et al. 2003, Rocha et al. 2018
	<i>bla</i> _{CTX-M32}	For CGTCACGCTGTTGTTAGGAA Rev CGCTCATCAGCACGATAAAG	155bp	60	Rocha et al. 2018
	<i>bla</i> _{OXA-48}	For TGTTTTTGGTGGCATCGAT Rev GTAAMRATGCTTGGTTCGC	177bp	60	Monteiro et al. 2012
	<i>mecA</i>	For CGCAACGTTCAATTTAATTTTGTTAA Rev TGGTCTTTCTGCATTCTGGA	91bp	60	Volkman et al. 2004
	<i>bla</i> _{NDM-1}	For TTGGCCTTGCTGTCCTTG Rev ACACCAGTGACAATATCACCG	82 bp	60	Monteiro et al. 2012
	<i>vanA</i>	For TCTGCAATAGAGATAGCCGC Rev GGAGTAGCTATCCAGCATT	376bp	60	Klein et al. 1998
	<i>mcr-1</i>	For GGGCCTGCGTATTTTAAGCG Rev CATAGGCATTGCTGTGCGTC	183bp	60	Hembach et al. 2017
	<i>bla</i> _{KPC-3}	For CAGCTCATTCAAGGGCTTTC Rev GGCGGCGTTATCACTGTATT	196bp	60	Szczepanowski et al. 2009
	<i>bla</i> _{VIM-2}	For GAGATTCCACGCACTCTCTAGA Rev AATGCGCAGCACCAGGATAG probe ACGCAGTGCGCTTCGGTCCAGT	93bp	60	van der Zee et al. 2014
Taxonomie	<i>E. faecalis</i> (<i>ddl</i>)	For CACCTGAAGAAACAGGC Rev ATGGCTACTTCAATTTACAG	475bp	60	Depardieu et al. 2004
	<i>E. coli</i> (<i>yccT</i>)	For GCATCGTGACCACCTTGA Rev CAGCGTGGTGGCAAAA	59bp	60	Clifford et al. 2012
	<i>P. aeruginosa</i> (<i>ecfX</i>)	For AGCGTTCGTCCTGCACAAGT Rev TCCACCATGCTCAGGGAGAT	81bp	60	Clifford et al. 2012
	<i>K. pneumoniae</i> (<i>gltA</i>)	For ACGGCCGAATATGACGAATTC Rev AGAGTGATCTGCTCATGAA	68bp	60	Clifford et al. 2012
	<i>A. baumannii</i> (<i>secE</i>)	For GTTGTGGCTTTAGGTTTATTATACG Rev AAGTTACTCGACGCAATTCCG	94bp	60	Clifford et al. 2012
	Enterokokken (23S)	For AGAAATTCCAAACGAACCTTG Rev CAGTGCTCTACCTCCATCATT	93bp	60	Volkman et al. 2004

3.2.2 Durchführung der quantitative Real-Time PCR

Materialien

- qPCR-Reagenzien (Maxima SYBR Green, Thermo Fisher Scientific, oder K0221, SsoFast EvaGreen Supermix, Bio-Rad, 1725200)
- DNase-freies PCR Wasser (Sigma-Aldrich, W1754-1L)
- qPCR Cycler (CFX Serie, Bio-Rad oder Rotor-Gene Q, Qiagen)
- PCR-Gefäße (abhängig vom qPCR-Gerät; z.B. 96-Well Platten und selbstklebende Verschlussfolien, peqLAB, AB0800 und 732-3212 für Geräte der CFX Serie von Bio-Rad)
- Referenzsystem (Bakterienstamm oder Plasmidstandard)

Hier ist in Kürze das Vorgehen unter Nutzung des Maxima SYBR Green von Thermo Fisher Scientific und einem qPCR Cycler der CFX Serie von Bio-Rad beschrieben. Für andere Reagenzien und qPCR Cycler bitte die Herstellerangaben berücksichtigen.

Die Reaktion wird im Triplikat mit 200 nM Endkonzentration je Primer in 20 µL Ansätzen gefahren. Das verwendete Temperaturprofil erfolgte im 2-Step Verfahren und startet mit 95°C für 10 min zur initialen Denaturierung der extrahierten Gesamt-DNA und Enzymaktivierung. Es folgen 40 Zyklen a 30 s mit Primer-spezifischer Annealing-Temperatur, bei gleichzeitiger Elongation. Die spezifischen Annealing-Temperaturen können Tabelle 4.1 entnommen werden. Während jedes Zyklus wird eine Fluoreszenzmessung durchgeführt. Zur Überprüfung der PCR-Produkte wird nach jedem qPCR-Lauf eine Schmelzkurvenanalyse und/oder eine Gelelektrophorese durchgeführt, um die korrekte Identität des Amplicons zu bestätigen. Zur Fehlerdiagnose und qPCR-Validierung wird auf die Troubleshooting Guides des Herstellers verwiesen.

Alternativ und zum Nachweis bestimmter Resistenzgen-Determinanten können auch TaqMan-Systeme statt SYBR Green bzw. EVAGreen Analysen genutzt werden. Eine Anpassung der Temperaturprofile ist dann zu berücksichtigen und nach Herstellerangaben zu nutzen.

3.2.3 Generierung einer Kalibriergeraden

Die Detektion und Quantifizierung von klinisch relevanten Antibiotikaresistenzgenen innerhalb einer nativen Bakterienpopulation erfordert eine Kalibrierung des Detektionssystems auf dessen Grundlage die Genkopien in der untersuchten Abwasserprobe errechnet werden kann. Das hierfür verwendete Standardprotokoll wird im Folgenden erläutert.

Referenzorganismen werden über Nacht, aerob bei 37 °C unter Schütteln (120 rpm) bis zu einer optischen Dichte (OD) > 1 kultiviert. Nach Extraktion der genomischen DNA mit dem „FastDNA SPIN kit for soil“ (MP Biomedicals) wird eine Verdünnungsreihe über 7-8 Log-Stufen erstellt und anschließend die DNA-Konzentration per Qubi (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Aufgrund des Detektionslimit des Qubit können nur Verdünnungen bis zu einer DNA-Konzentration von 0,01 ng/µL gemessen werden. Die Konzentrationen der übrigen Verdünnungen werden darauf basierend errechnet. Die Anzahl der Zelläquivalente der Verdünnungs-

reihe wird auf Grundlage der recherchierten Genom-Größen und der gemessenen DNA-Konzentrationen mit Hilfe des URL Genomics & Sequencing Center (<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>) auf Basis folgender Formel bestimmt:

Formel 1: Formel zur Berechnung der eingesetzten Zelläquivalente zur Erstellung der Kalibriergeraden.

$$\text{Zelläquivalente} = \frac{(\text{DNA Menge [ng]}) * 6,022 \times 10^{23}}{(\text{Durchschnittliche Genomgröße [bp]}) * 10^9 * 650}$$

Der Hauptanteil an Mikroorganismen in einer natürlichen Population besteht aus weitestgehend uncharakterisierten Bakterien mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund sowie autochthonen Bakterien, die ebenfalls Empfänger und als Überträger von Antibiotikaresistenzgenen fungieren können. Daher werden die Zellzahlen, die mit Hilfe der jeweiligen Kalibrierfunktion berechnet wurden, als Zelläquivalente aus einer Mischpopulation bezeichnet.

Die kalkulierten Zelläquivalente einer Probe werden den resultierenden Cq-Werten zugeordnet. Von der sich, aus der vollständigen Verdünnungsreihe, ergebenden Trendlinie wird die Geradengleichung der Kalibriergerade abgeleitet.

Die Identitätsprüfung der Amplifikation wird über eine Schmelzkurvenanalyse festgestellt und beruht auf dem GC-Nucleotid Gehalt in der amplifizierten DNA. Dieser ist hoch spezifisch und wird als Kontrolle beim Vergleich mit Umweltproben herangezogen.

Alternativ können auch Plasmid-Standards zur Quantifizierung genutzt werden. Hierbei handelt es sich um Klonierungsvektoren (wie z.B. pGEM-T®), in die ein entsprechendes PCR-Produkt eingefügt wurde. Diese veränderten Vektoren werden in kompetente Zellen eingebracht, und durch die Kultivierung dieser Bakterien vermehrt. Nach der Extraktion der Plasmid-DNA steht eine ausreichende Menge DNA-Material zur Verfügung. Die Plasmid-DNA wird durch einen enzymatischen Verdau linearisiert, aufgereinigt und photometrisch vermessen. Über die bekannte Länge des Vektors und Inserts sowie des Molekulargewichtes von doppelsträngiger DNA kann die definierte Kopienzahl pro Volumen eingestellt werden. Von den Plasmid-Standards werden Verdünnungen hergestellt, die dann als Standards in die real-time PCR eingesetzt werden können.

Formel 2: Formel zur Berechnung der eingesetzten Genkopienzahl zur Erstellung der Kalibriergeraden.

$$\text{Kopienzahl pro } \mu\text{L} = \frac{(\text{DNA Konzentration [g/}\mu\text{L]})}{(\text{Plasmidlänge [bp]} + \text{Insertlänge [bp]}) * 660} * 6,022 \times 10^{23}$$

3.2.4 Quantitative Analyse einer Probe

Zur quantitativen Auswertung einer unbekannten Probe wird der in der qPCR gemessenen Cq-Wert mit Hilfe der Funktionsgleichung der vorher erzeugten Kalibriergeraden der Anzahl an Zelläquivalenten bzw. Genkopien zugeordnet. Bei der direkten Verwendung der Kalibriergeraden ergeben sich die Zelläquivalente/Kopienzahl als Zehnerpotenz. Zur Berechnung der Zelläquivalente/Kopienzahl als natürliche Zahl ohne Normierung wird Formel 3 verwendet.

Formel 3: Berechnung der Zelläquivalente je Reaktion einer qPCR. m : Steigung-, n : y-Achsenabschnitt der Kalibriergeraden.

$$\frac{\text{Zelläquivalente}}{\text{Reaktion}} = 10^{\frac{'Cq-Wert'-n}{m}}$$

Für Vergleichende Analysen ist eine Normierung der verschiedenen Proben auf einen Referenzwert unumgänglich. Im Rahmen des HyReKA-Projektes wurde hierzu eine absolute Normierung auf 100 mL des nativen Abwasservolumens verwendet. Nach Einbeziehen des eingesetzten Volumens aus der DNA Extraktion in der qPCR Reaktion V_R [μL], dem filtrierten oder abzentrifugierten Probenvolumen V_A [mL] und dem Volumen nach DNA Extraktion V_E [μL] ergeben sich die Zelläquivalente/100 mL Wasserprobenvolumen (absolute Normierung) nach Formel 4.

Formel 4: Berechnung der Zelläquivalente/100 mL Probe ausgehend vom Cq- Wert der qPCR.

$$\begin{aligned} \text{I} \quad & \frac{\text{Zelläquivalente}}{\mu\text{L Extraktionseluat}} = 10^{\frac{'Cq-Wert'-n}{m}} / V_R \\ \text{II} \quad & \frac{\text{Zelläquivalente}}{100 \text{ mL Probe}} = \frac{\text{Zellequivalente} \cdot V_E}{V_A} * 100 \text{ mL} \end{aligned}$$

Eine absolute Normierung auf 100 mL Wasservolumen erlaubt zu bewerten, in welchen Mengen das Zielgen in der ursprünglichen Probe vorhanden war. Obwohl die absolute Normierung einen schnellen und leicht verständlichen Einblick in die Belastungssituation gibt, können mit ihr keine Änderungen in der Zusammensetzung der Gesamtpopulation abgebildet werden.

3.3 Quantitative Analyse mittels digitaler droplet PCR

Die digitale droplet PCR (ddPCR) stellt eine Weiterentwicklung der qPCR dar. Während die qPCR zur absoluten Quantifizierung eine Standardgerade für die zu quantifizierende DNA-Sequenz benötigt, kommt die Quantifizierung in der ddPCR ohne aus. Dies ist möglich, weil der Reaktionsansatz, anders als bei der qPCR, nicht aus einem einzigen Volumen besteht, sondern auf viele kleine Partitionen verteilt wird. Dadurch erhält man Partitionen, die eine oder mehrere Kopien der DNA-Zielsequenz enthalten und Partitionen, die keine Ziel-Sequenz enthalten. Nach der Verteilung/Partitionierung der zu quantifizierenden DNA-Zielsequenz wird eine Standard PCR (auch Endpunkt-PCR genannt) mit interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff oder Fluoreszenzsonde, analog zur qPCR, in jeder Partition/Droplet durchgeführt. Durch den Fluoreszenzanstieg ergibt sich ein positives Signal für Droplets, die die DNA-Zielsequenz enthalten und durch das Ausbleiben der Fluoreszenz ein negatives sSignal, für die droplets ohne DNA-Zielsequenz. Diese ja/nein bzw. 1/0 Detektion führt zur Bezeichnung „digitale droplet PCR“. Die absolute Konzentration der DNA-Zielsequenz wird über das Verhältnis zwischen positiven und negativen droplets berechnet. Über die Poisson-Korrektur wird berücksichtigt, dass in einigen droplets mehr als eine Ursprungs-Kopie der DNA-Zielsequenz vorhanden sein kann.

3.3.1 Durchführung der Quantifizierung molekularbiologischer Parameter ohne Kalibriergerade mit Hilfe der Digitalen Droplet PCR (ddPCR)

Materialien

- ddPCR Mastermix (Supermix for Probes, Bio-Rad, 186-3026; EvaGreen Supermix, Bio-Rad, 1864033; Supermix for residual DNA, Bio-Rad, 1864037)
- QX200 Droplet Generator oder Automated Droplet Generator (Bio-Rad, 1864002 oder 1864101)
- Droplet Generator Oil für EvaGreen (Bio-Rad, 1864112) oder Probes (Bio-Rad, 1864110)
- Für den Automated Droplet Generator werden Spitzen benötigt (Bio-Rad, LHF790101BR) und Cartridges (Bio-Rad, 18641008)
- QX200 Droplet Reader (Bio-Rad, 1864003)
- Droplet Reader Oil (Bio-Rad, 1863004)
- PCR-Cycler für deep-well bzw. Semi-skirted 96 well plates (Bio-Rad C1000 Touch, 1861197)
- 96-well plates, semi-skirted (Bio-Rad, 12001925)
- PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad, 1814000)
- PCR Plate heat Seal (Bio-Rad, 1814040)
- DNase-free PCR Water
- Optional Restriktionsenzym

Die Vorbereitung geschieht analog zur qPCR. Die Zusammenstellung des Mastermix erfolgt je nach verwendetem Detektionssystem (EvaGreen, Probes) nach Herstellerangaben des jeweiligen Mastermixes. Zur internen Kontrolle wird empfohlen mindestens eine Verdünnung je

Probe zusätzlich zu analysieren, um das Ergebnis in der Quantifizierung abzusichern. Es ist darauf zu achten, dass im PCR-Cycler ein Volumen von 40 µL eingestellt und die Ramp Time auf 2°C/sec festgesetzt wird.

3.4 Während des HyReKA-Projekts entstandene Veröffentlichungen zur weiterführenden Information

- Alexander J, Hembach N., Schwartz T.(2019) "Die Problematik der Antibiotika-resistenten Bakterien", *wwt Sonderausgabe Modernisierungsreport 2019/20*, 52-57
- Hiller C, Hübner U, Fajnorova, Schwartz T, Drewes J (2019) Antibiotic microbial resistance (AMR) removal efficiencies and advanced wastewater treatment processes: A review. *Science of the Total Environment* 685, 596-608.
- 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“, *nature scientific reports*, volume 9, Article number: 12843
- Jäger T, Hembach N, Elpers C, Wieland A, Alexander J, Hiller C, Krauter G, Schwartz T (2018) "Reduction of Antibiotic Resistant Bacteria During Conventional and Advanced Wastewater Treatment, and the Disseminated Loads Released to the Environment", *Frontiers in microbiology*, 9, 2599
- Jäger T, Alexander J, Kirchen S, Dötsch A, Wieland A, Hiller C, Schwartz T (2018). „Live-dead discrimination analysis , qPCT assessment for opportunistic pathogens, and population analysis at ozone wastewater treatment plants". *Environment Pollution* 232, 571-579.
- Hembach N, Schmid F, Alexander J, Hiller C., Rogall ET, 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" *Frontiers in Microbiology* vol. 8 1282. 11 Jul. 2017
- Hembach N, Alexander J, Wieland A, Hiller C, Schwartz T(2018) "Investigation of the elimination performance of various advanced wastewater treatment processes to reduce facultative-pathogenic bacteria" *Vom Wasser - Das Journal*, 2/18, 2018
- Schwartz T, 2018 "Verbreitung antibiotikaresistenter Bakterien durch Abwasser: Erste Erkenntnisse aus dem BMBF Verbundprojekt HyReKA" *Journal für Arbeitsschutz und Umwelt*, Regierungspräsidium Darmstadt 2018
- Alexander J, Hembach N, Schmid F, Hiller G, Wieland C, Schwartz T. (2017) Reduktion von Krankheitserregern und Antibiotikaresistenzen durch verschiedene Prozesse der 4. Reinigungsstufe als Grundlage für ein mikrobiologisches Bewertungskonzept. *Vom Wasser – Das Journal* 115 (3), 101-105.
- Kneis D, Berendonk TU, Heß S. High prevalence of colistin resistance genes in German municipal wastewater. *Science of The Total Environment*. 2019 Dec;694:133454.
- Hess S, Berendonk TU, Kneis D. Antibiotic resistant bacteria and resistance genes in the bottom sediment of a small stream and the potential impact of remobilization. *FEMS MICROBIOLOGY ECOLOGY*. 2018 Sep;94(9).

3.5 Literatur

- Alexander, J., Bollmann, A., Seitz, W. and Schwartz, T. (2015) Microbiological characterization of aquatic microbiomes targeting taxonomical marker genes and antibiotic resistance genes of opportunistic bacteria. *Science of The Total Environment* 512-513, 316-325.
- Clifford, R.J., Milillo, M., Prestwood, J., Quintero, R., Zurawski, D.V., Kwak, Y.I., Waterman, P.E., Lesho, E.P. and Mc Gann, P. (2012) Detection of Bacterial 16S rRNA and Identification of Four Clinically Important Bacteria by Real-Time PCR. *PLOS ONE* 7(11), e48558.
- Depardieu, F., Perichon, B. and Courvalin, P. (2004) Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology* 42(12), 5857-5860.
- Gagnon, S., Lévesque, S., Lefebvre, B., Bourgault, A.-M., Labbé, A.-C. and Roger, M. (2011) vanA-containing *Enterococcus faecium* susceptible to vancomycin and teicoplanin because of major nucleotide deletions in Tn 1546. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66(12), 2758-2762.
- Hembach, N., Schmid, F., Alexander, J., Hiller, C., Rogall, E.T. and 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), 1282.
- Klein, G., Pack, A. and Reuter, G. (1998) Antibiotic Resistance Patterns of Enterococci and Occurrence of Vancomycin-Resistant Enterococci in Raw Minced Beef and Pork in Germany. *Applied and Environmental Microbiology* 64(5), 1825-1830.
- Kurpiel, P.M. and Hanson, N.D. (2011) Association of IS5 with divergent tandem blaCMY-2 genes in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66(8), 1734-1738.
- Monteiro, J., Widen, R.H., Pignatari, A.C.C., Kubasek, C. and Silbert, S. (2012) Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67(4), 906-909.
- Nocker, A., Sossa, K.E. and Camper, A.K. (2007) Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. *Journal of Microbiological Methods* 70(2), 252-260.
- Okitsu, N., Kaieda, S., Yano, H., Nakano, R., Hosaka, Y., Okamoto, R., Kobayashi, T. and Inoue, M. (2005) Characterization of ermB gene transposition by Tn1545 and Tn917 in macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates. *Journal of clinical microbiology* 43(1), 168-173.
- Paterson, D.L., Hujer, K.M., Hujer, A.M., Yeiser, B., Bonomo, M.D., Rice, L.B., Bonomo, R.A. and Group, t.I.K.S. (2003) Extended-Spectrum β -Lactamases in *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Isolates from Seven Countries: Dominance and Widespread Prevalence of SHV- and CTX-M-Type β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47(11), 3554-3560.
- Peak, N., Knapp, C.W., Yang, R.K., Hanfelt, M.M., Smith, M.S., Aga, D.S. and Graham, D.W. (2007) Abundance of six tetracycline resistance genes in wastewater lagoons at cattle feedlots with different antibiotic use strategies. *Environmental Microbiology* 9(1), 143-151.

- Rocha, J., Cacace, D., Kampouris, I., Guilloteau, H., Jäger, T., Marano, R.B.M., Karaolia, P., Manaia, C.M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Berendonk, T.U. and Schwartz, T. (2018) Inter-laboratory calibration of quantitative analyses of antibiotic resistance genes. *Journal of Environmental Chemical Engineering*.
- Schwartz, T., Obst, U., Jansen, B. and Kohnen, W. (2003) Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiology Ecology* 43(3), 325-335.
- Starikova, I., Al-Haroni, M., Werner, G., Roberts, A.P., Sørum, V., Nielsen, K.M. and Johnsen, P.J. (2013) Fitness costs of various mobile genetic elements in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68(12), 2755-2765.
- Szczepanowski, R., Linke, B., Krahn. (2009) Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. *Microbiology* 155, 2306–2319.
- van der Zee, A., Roorda, L., Bosman, G., Fluit, A.C., Hermans, M., Smits, P.H., van der Zanden, A.G., Te Witt, R., Bruijnesteijn van Coppenraet, L.E., Cohen Stuart, J., Ossewaarde, J.M. (2014) Multi-centre evaluation of real-time multiplex PCR for detection of carbapenemase genes OXA-48, VIM, IMP, NDM and KPC. *BMC Infect Dis.* 14;14:27.
- Volkman, H., Schwartz, T., Bischoff, P., Kirchen, S. and Obst, U. (2004) Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). *Journal of Microbiological Methods* 56(2), 277-286.
- Wardal, E., Markowska, K., Żabicka, D., Wróblewska, M., Giemza, M., Mik, E., Połowniak-Pracka, H., Woźniak, A., Hryniewicz, W. and Sadowy, E. (2014) Molecular analysis of vanA outbreak of *Enterococcus faecium* in two Warsaw hospitals: the importance of mobile genetic elements. *BioMed Research International* 2014.

3.6 Anhang

3.6.1 Fallbeispiel 1: Erstellung einer Kalibriergeraden

Für die Erstellung der Kalibriergeraden des *E. coli* spezifischen Zielgens *yccT* wird die DNA einer ÜN-Kultur des Referenzstammes extrahiert. Der Konzentrationsbestimmung des Eluats ergab 24 ng/μL DNA. Unter Einbeziehen der durchschnittlichen Genomgröße des Referenzbakteriums von 5.198.270 bp (siehe Kapitel 4.1) und Formel 1 ergibt sich mit 1 μL der Referenz nach:

$$\text{Zelläquivalente} = \frac{24 \text{ [ng]} * 6,022 \times 10^{23} \left[\frac{\text{Zelläquivalente}}{\text{Mol}} \right]}{5.198.270 \text{ [bp]} * 10^9 \left[\frac{\text{ng}}{\text{g}} \right] * 650 \left[\frac{\text{g}}{\text{Mol}} \right]} = 4,28 \times 10^6 \text{ Zelläquivalente}$$

eine Anzahl von $4,28 \times 10^6$ Zelläquivalenten in der qPCR Reaktion des ersten (unverdünnten) Punktes der Kalibriergerade.

Diese Abundanz wird mit dem resultierenden Cq-Wert dieser Verdünnungsstufe von 13,65 korreliert. Analog wird mit den übrigen Verdünnungsstufen verfahren, sodass durch die einzelnen Messpunkte eine Trendlinie mit der Geradengleichung $F_{(x)} = m \cdot x + n$ gelegt werden kann. Hierbei stellt m die Steigung der Geraden und n der Y-Achsenabschnitt dar. Die Geradengleichung $F_{(x)} = -3,361x + 35,797$ beschreibt die Kalibriergerade für das *E. coli* spezifische *yccT*-Gen und kann verwendet werden um jedem Cq-Wert des *yccT*-Gens einer unbekannten Probe, einer eindeutigen Abundanz an Zelläquivalenten von *E. coli* in der Reaktion zuzuordnen.

3.6.2 Fallbeispiel 2: Quantitative Analyse einer unbekannten Probe

Die qPCR- Analyse von 1 µL unbekannter Probe, ergab für das *E. coli* spezifische *yccT*-Gen einen Cq-Wert von 17,6. Unter Verwendung der angefertigten Kalibriergeraden für das *yccT*-Gen mit der Geradengleichung $F(x) = -3,361x + 35,797$, kann mittels Formel 2 die Abundanz von Zelläquivalenten an *E. coli* in der qPCR Reaktion berechnet werden:

$$\frac{E. coli \text{ Zelläquivalente}}{\text{Reaktion}} = 10^{\frac{17,6-35,797}{-3,361}} = 2,6 \times 10^5 \frac{\text{Zelläquivalente}}{\text{Reaktion}}$$

Für eine Normierung auf 100 mL des Ursprungswasservolumens muss weiterhin das eingesetzte Volumen in die qPCR Reaktion (V_R), Das filtrierte Probenvolumen (V_A) und das Volumen des Eluats der DNA-Extraktion (V_E) mit einbezogen werden. Wurden für die Probe des Fallbeispiels 75 mL der Originalprobe filtrierte und die DNA in 150 µL extrahiert ergibt sich nach Formel 3:

$$\text{I: } \frac{\text{Zelläquivalente}}{\mu\text{L Extraktionseluat}} = \frac{10^{\frac{17,6-35,797}{-3,361}}}{1[\mu\text{L}]} = 2,6 \times 10^5 \frac{\text{Zelläquivalente}}{\mu\text{L Eluats der DNA Extraktion}}$$

und:

$$\text{II: } \frac{\text{Zelläquivalente}}{100\text{mL Probe}} = \frac{2,6 \times 10^5 \left[\frac{\text{Zelläquivalente}}{\mu\text{L Eluats der DNA Extraktion}} \right] * 150 [\mu\text{L}]}{75[\text{mL}]} * 100[\text{mL}] = 5,19 \times 10^7 \frac{\text{Zelläquivalente}}{100\text{mL}}$$

Bei einem filtrierte Volumen von 75 mL und einem Eluatvolumen der DNA- Extraktion von 150 µL entspricht ein Cq-Wert des *yccT* Gens von 17,6 einer Abundanz von $5,19 \times 10^7$ Zelläquivalenten/100 mL an *E. coli* in der nativen Probe.

3.6.3 Fallbeispiel 3: Quantitative Analyse einer Probe mittels ddPCR

Für die Auswertung einer ddPCR wurde Die Konzentration des Carbapenemase-Gens *bla_{VIM} 2* im Referenzbakterium *P. aeruginosa* bestimmt. Als Nachweis wurde ein Sonden-basiertes Detektionssystem mit dazugehörigem Mastermix verwendet. Für DNA Extrakte aus Reinkulturen (Referenzbakterien, Plasmidisolate) wird eine Konzentration von weniger als 66 ng pro 20 µL Reaktionsvolumen empfohlen, um die zur Quantifizierung nötige Clusterbildung zwischen positiven und negativen droplets nicht negativ zu beeinträchtigen. Zur Überprüfung der Quantifizierung wurde eine 1:1 Verdünnung hergestellt und analysiert.

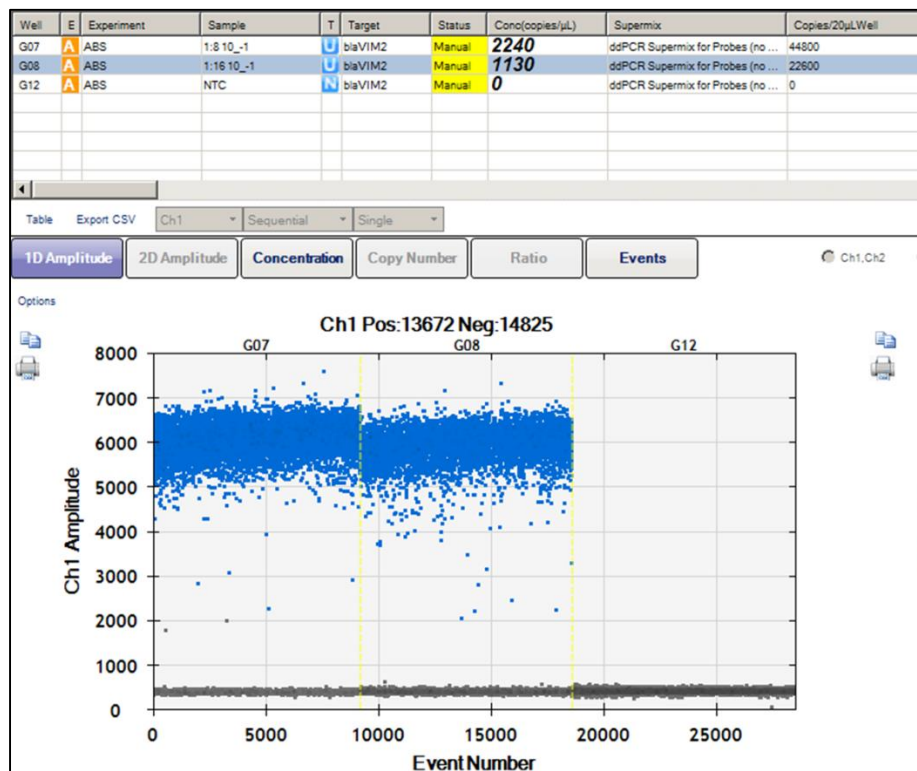


Abbildung 4.2: Auswertung der ddPCR über die Software QuantaSoft.

Die Fluoreszenzsignalintensität (Ch1 Amplitude) ist gegen die Gesamt-droplet Anzahl (Event Number) aufgetragen und zeigen eine deutliche Trennung zwischen dem grauen negativen Cluster (droplets enthalten keine DNA-Zielsequenz) und dem blauen positiven Cluster (droplets enthalten amplifizierte DNA-Zielsequenz). Die Antibiotikaresistenzgenkonzentration in Position G07 wird mit 2.240 Kopien/µL angegeben. Die Konzentration der 1:1 Verdünnung in Position G08 wird mit 1.130 Kopien/µL angegeben. Durch das korrekte Verhältnis der Verdünnungen wird die Quantifizierung abgesichert. Zur Absicherung von falsch-positiven Ergebnissen sollte ebenfalls eine Negativkontrolle mitgeführt werden (Position G12).

4 Säule: Chemisch-analytische Rückstandsanalyse von Antibiotika: Quantitative Bestimmung von Antibiotikarückständen in wässrigen Matrices mittel LC-MS/MS

H. Färber, D. Skutlarek, A. Voigt, C. Felder

Labor für Wasserchemie am Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit, Universitätsklinikum Bonn, Universität Bonn, Venusberg-Campus 1, 53127 Bonn

Vorwort

Anwender dieser Anweisung sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Dieses Verfahren gibt nicht vor, alle unter Umständen mit der Anwendung des Verfahrens verbundenen Sicherheitsaspekte anzusprechen. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, angemessene Sicherheits- und Schutzmaßnahmen zu treffen und sicherzustellen, dass diese mit nationalen Festlegungen übereinstimmen.

Die hier vorgestellte Analysenmethode wurde bereits *peer-reviewed* in der Fachzeitschrift *Environmental Chemistry* von Voigt et al. (2019) publiziert.^[1]

4.1 Anwendungsbereich

Dieses HyReKA-Verbund-Verfahren legt eine Methode zur Bestimmung von Antibiotikarückständen in Trink-, Grund-, Oberflächen- und Abwasser fest. Die Eignung dieser Methode wurde anhand von Leermatrizes untersucht, deren Eigenschaften und Zusammensetzung durch die in Tabelle 5.1 aufgeführten Parameter charakterisiert wurden. Ferner wurde zur Bestimmung der Leistungsfähigkeit der Methode für Abwasser simulierte Abwassermatrix der Firma Sigma-Aldrich verwendet. Der untere Anwendungsbereich entspricht je nach Analyt und Matrix dem unteren ng/L-Bereich (LOD: 1,1 ng/L – 76 ng/L ; LOQ: 3,3 ng/L – 190 ng/L) und ist der Originalarbeit zu entnehmen.^[1] Die Anwendbarkeit des Verfahrens auf andere Matrizes beziehungsweise die Erweiterung des Untersuchungsspektrums um weitere Zielanalyten ist nicht ausgeschlossen; sie muss jedoch im Einzelfall geprüft werden. Exemplarisch ist der Einfluss der untersuchten Leermatrizes auf die Wiederfindung (ohne Einbezug des internen Standards) in Tabelle 5.A1-4.A4 angegeben.

Tabelle 5.1 Charakterisierung der Leermatrizes Trinkwasser (TW), Grundwasser (GW) und Oberflächenwasser (OFG) nach Voigt et al. (2019).^[1]

Parameter	TW	OFG	GW
pH	8.0 ± 0.1	8.3	6.9
TOC [mg/L]	0.6 ± 0.2	6.8	0.64
Leitfähigkeit (25°C , µS/cm)	340 ± 40	579	565
Chlorid [mg/L]	32 ± 3	61	49
Gesamtphosphat [mg/L]	< 0.01	< 0.03	0.07
Sulfat [mg/L]	30 ± 2	64	66
Calcium [mg/L]	35.7 ± 4.5	59	60
Magnesium [mg/L]	7.5 ± 0.9	13	14
Trübung [FNU]	< 0.10	13	0.69

Legende: TOC = total organic carbon

4.2 Begriffe

Für die Anwendung dieser Anweisung gelten die folgenden Begriffsbestimmungen:

- **Antibiotikarückstände:**
Rückstände an nicht metabolisierten Ausgangssubstanzen, Abbauprodukte und Konjugaten antibiotisch wirksamer Substanzen, die nach ihrer Applikation beim Patienten beziehungsweise beim behandelten Tier über zum Beispiel Exkremente, Sekrete sowie nicht fachgerecht entsorgte Flüssigkeiten oder Lösungen in die Umwelt eingetragen wurden.
- **Direktinjektion:**
Injektion einer verdünnten und filtrierten Probe ohne vorherige Anreicherung und Reinigung via Festphasenextraktion oder anderen Aufreinigungsverfahren.

4.3 Grundlage des Verfahrens

Die zu untersuchenden Proben werden in einem „*dilute-and-shoot*“-Verfahren auf Antibiotikarückstände hin untersucht. Nach einer simplen Probenvorbereitung durch Verdünnung und Filtration erfolgt eine Direktinjektion des Filtrats in den Hochleistungsflüssigchromatographen (HPLC). Aufgrund der physiko-chemischen Eigenschaften, der Zusammensetzung der mobilen Phase und der Eigenschaften der eingesetzten Trennsäule erfolgt eine zeitliche Trennung der Analyten, welches den ersten Identifizierungspunkt der Analyten liefert – die Retentionszeit (t_R). Durch die Ionisation der chromatographisch getrennten Analyten in der Ionisationseinheit (Elektrosprayionisation im positiv Modus, ESI+) werden spezifische Vorläuferionen gebildet, welche nachfolgend im ersten Quadropol (Q1) des Massenspektrometers anhand des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses (m/z) getrennt werden. Im Q2 erfolgt anhand der festgelegten Kollisionsenergie (CE) eine Fragmentierung der Vorläuferionen in verschiedene Fragmente (Produktionen), die wiederum im Q3 anhand ihres m/z getrennt werden. Zur sicheren Bestimmung der Zielanalyten werden je Substanz die zwei intensivsten Massenübergänge (m/z (Vorläuferion) $\rightarrow$ m/z (Produktion)) zur Detektion verwendet. Der Massenübergang mit der höchsten Signalintensität wird hierbei zur Quantifizierung verwendet (*Quantifier*). Der Massenübergang mit der zweithöchsten Intensität wird zur Absicherung des Nachweises (*Qualifier*) verwendet, sodass insgesamt drei Identifizierungspunkte pro Analyt gegeben sind. Bei Bedarf dient das Ionenverhältnis zwischen *Qualifier* und *Quantifier* als weiterer Identifizierungspunkt zur Absicherung des Nachweises.

4.4 Materialien und Chemikalien

4.4.1 Chemikalien

Die zu verwendenden Chemikalien und Lösungen müssen HPLC-MS-Qualität entsprechen. Stammlösungen der Analysestandards und internen Standards (1.000 mg/L) sind in Acetonitril-Wasser (2:1 ; v/v) herzustellen und bei -20 °C zu lagern. Kalibrierstandards der zu untersuchenden Analyten (inkl. interner Standards) sind aus diesen Stammlösungen in einem Konzentrationsbereich von 0,001 µg/L bis 2,5 µg/L frisch in Lösung II herzustellen und jeweils mit einer Sollkonzentration von 0,5 µg/L an internen Standards zu spiken.

Tabelle 5.2 Benötigte Chemikalien und Lösemittel für die Probenvorbereitung und messtechnische Durchführung der vorgestellten Methode.

Chemikalien	Reinheit
Ameisensäure	99 %
Acetonitril	≥ 99,98 %
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	≥ 99 %
Wasser	Ultra LC-MS
Methanol	≥ 99,98 %
Waste Water Simulated Matrix (MMW001-250ML)	n.a.

Tabelle 5.3 Herzustellende Lösungen für die Probenvorbereitung und messtechnische Durchführung der vorgestellten Methode.

Lösung	Zusammensetzung
Eluent A	Wasser-Acetonitril-Ameisensäure (98:2:0,01 ; v/v/v)
Eluent B	Methanol-Acetonitril-Ameisensäure (80:20:0,1 ; v/v/v)
Lösung I	Wasser-Acetonitril (95:5 ; v/v) + 0,8 g/L EDTA (inkl. 1 µg/L ISTDs)
Lösung II	1:1 Mischung aus 1) Wasser-Acetonitril (95:5 ; v/v) + 0,8 g/L EDTA 2) Trinkwasser
Mischstandard	10 mg/L der Analytstandards in Acetonitril-Wasser (2:1 ; v/v)

4.4.2 Verbrauchsmaterialien

Die angegebenen Säulen und Materialien fungieren als Beispiel. Produkte anderer Hersteller mit vergleichbarer Polarität und Trennungseigenschaften können bei gleichen Leistungskenn-
daten ebenfalls verwendet werden.

- BD Discardit™ II 5 mL-Einwegspritzen
- 0,45 µm HPTFE-Spritzenvorsatzfilter (Macherey & Nagel, Düren)
- **Vorsäule:** EC 4/2 NUCLEOSHELL RP 18Plus®, 2,7 µm (Macherey & Nagel, Düren)
- **Trennsäule:** NUCLEOSHELL RP18Plus® 2 mm x 100 mm, 2,7 µm (Macherey & Nagel, Düren)

4.4.3 Geräte

- Agilent LC-System 1290 Infinity II (Agilent Technologies, Waldbronn)
- QTRAP® 6500+ Tandem Massenspektrometer (AB Sciex GmbH, Darmstadt)

4.4.4 Probenahme

Die Probeentnahme erfolgt nach den Vorgaben des Kapitels 1.

4.4.5 Durchführung

Die zuvor in Braunglasflaschen gekühlt (2-4 °C) transportierte und gelagerte Probe wird auf Raumtemperatur (20 ± 2 °C) erwärmt. Die homogene Probe wird anschließend mit Lösung I in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und anschließend über einen HPTFE-Spritzenvorsatzfilter (0,45 µm Porengröße) filtriert. Zwanzig Mikroliter des klaren Filtrats werden anschließend über den LC-Autosampler direkt injiziert und mit einem LC-Fluss von 0,4 mL/min chromatographisch getrennt. Die messbereiten Proben werden bei 10 °C im Autosampler gekühlt. Ein beispielhafter LC-Gradient ist in Voigt et al. (2019) angegeben. Die Temperatur des Säulenofens wird auf $50 \text{ °C} \pm 0,8 \text{ °C}$ festgelegt. Die Detektion erfolgt im *scheduled multiple reaction monitoring* (sMRM) Modus nach ESI+. Zu beachten ist, dass die Retentionszeiten und Messfenster für jeden Analyten in Abhängigkeit der chromatographischen Trennleistung spezifisch festgelegt werden müssen. Die für die massenspektrometrische Detektion benötigten Potentiale (zum Beispiel *Declustering*-Potential (DP), Kollisionsenergie (CE); Zellausgangspotential (CXP)) und die flussabhängigen Einstellungen (zum Beispiel Ionisationsspannung [V] oder die Einstellung des Kollisionsgas [psi]) beziehungsweise Parameter der Ionisationsquelle sind exemplarisch in Voigt et al. (2019) für die dort verwendeten Messinstrumente aufgeführt. Für eine Adaption auf Messinstrumente anderer Hersteller beziehungsweise andere Typen desselben Herstellers müssen diese Parameter speziell für die dortigen Voraussetzungen optimiert und angepasst werden.^[1]

4.5 Auswertung

Die Auswertung erfolgt über eine externe Kalibriergerade unter Verwendung der gruppenweise zugeordneten internen Standards und der so erhaltenen Konzentrations- und Peakflächenverhältnisse. Mittels der Kenndaten der externen Kalibriergerade (Steigung und Y-Achsenabschnitt) und dem Verhältnis der Peakflächen von Analyt und internem Standard in der zu untersuchenden Probe erfolgt die Berechnung der zu bestimmenden Konzentration analog nach Formel I.

$$(I) \quad \frac{Peakfläche_{Analyt}}{Peakfläche_{Interner\ Standard}} = m \cdot \frac{Konzentration_{Analyt}}{Konzentration_{Interner\ Standard}} + b$$

$$(II) \quad Konzentration_{Analyt} = \frac{Konzentration_{Interner\ Standard} \cdot \left(\frac{Peakfläche_{Analyt}}{Peakfläche_{Interner\ Standard}} - b \right)}{m}$$

mit b = Y-Achsenabschnitt
 m = Steigung der Kalibriergerade

4.6 Angabe der Ergebnisse

Die Angabe der Ergebnisse erfolgt in [$\mu\text{g/L}$] mit zwei signifikanten Stellen. Eine Einrechnung der Wiederfindungsrate zur Kompensation von Aufarbeitungsverlusten sowie von Ionenverstärkungen beziehungsweise Ionensuppressionen während der Ionisation wird nicht durchgeführt.

Die Wiederfindungsraten sind gesondert anzugeben und in vorherigen Versuchen zu ermitteln. Exemplarisch konnten in Voigt et al. (2019) Wiederfindungsraten im Bereich von $65 \pm 13 \%$ bis $117 \pm 5 \%$ bestimmt werden.^[1]

4.7 Literatur

- [1] Voigt A.M., Skutlarek D., Felder C., Exner M., Faerber H.A., 2019. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry as a fast and simple method for the determination of several antibiotics in different aqueous matrices. Environmental Chemistry. <https://doi.org/10.1071/EN19115>

4.8 Anhang

Tabelle 5.A1: Berechnete Wiederfindung $\pm$ relative Standardabweichung (RSD) ermittelt aus dotiertem Trinkwasser (0,05 $\mu\text{g/L}$, 0,1 $\mu\text{g/L}$, 0,5 $\mu\text{g/L}$, 2,0 $\mu\text{g/L}$) nach Voigt et al. (2019)^[1]

Antibiotikum	0,05 $\mu\text{g/L}$	$\pm$ RSD	0,1 $\mu\text{g/L}$	$\pm$ RSD	0,5 $\mu\text{g/L}$	$\pm$ RSD	2,0 $\mu\text{g/L}$	$\pm$ RSD	gemittelte Wiederfindung	$\pm$ RSD
Amoxicillin	107	9	103	4	98	3	101	1	102	6
Ampicillin	< LOQ	< LOQ	105	7	99	2	102	2	101	6
Azithromycin	83	2	90	5	91	2	99	3	91	7
Cefaclor	95	3	101	4	97	2	101	1	99	4
Cefotaxim	92	4	105	4	102	1	104	2	101	6
Ceftazidim	< LOQ	< LOQ	102	9	102	5	104	2	103	6
Chlortetracyclin	76	5	105	3	106	4	110	2	99	14
Ciprofloxacin	< LOQ	< LOQ	155	6	116	4	120	3	130	15
Clarithromycin	63	5	71	3	71	5	76	3	70	8
Clindamycin	101	3	105	2	100	2	103	1	102	3
Cloxacilin	85	5	99	3	95	2	100	1	95	7
Dehydratoerythromycin	77	2	91	3	92	4	101	2	90	10
Dicloxacillin	95	4	94	1	93	1	97	1	95	3
Doxycyclin	106	7	106	7	103	2	113	6	107	6
Enrofloxacin	153	5	138	5	117	3	128	2	134	11
Erythromycin	86	6	72	3	71	1	75	1	76	9
Flucloxacillin	90	5	95	3	92	1	98	1	94	4
Linezolid	107	5	110	2	107	2	115	2	110	4
Meropenem	< LOQ	< LOQ	122	3	107	3	106	2	110	7
Methicillin	88	1	90	2	89	1	94	1	90	4
Metronidazol	94	5	94	5	96	2	97	2	95	4
Mezlocillin	98	5	96	5	94	1	100	1	97	4
Moxifloxacin	< LOQ	< LOQ	128	3	112	10	115	3	117	9
N-Acetylsulfamethoxazol	< LOQ	< LOQ	94	3	89	3	96	2	93	4
Nafcillin	94	3	97	2	92	2	95	1	95	3
Ofloxacin	< LOQ	< LOQ	135	8	108	3	107	1	117	13
Oxacillin	97	5	97	2	93	2	99	1	97	4
Oxytetracyclin	< LOQ	< LOQ	109	5	100	2	104	1	104	5
Penicillin G	104	9	95	2	96	3	100	1	101	6
Penicillin V	95	2	97	2	93	1	99	1	96	3
Piperacillin	< LOQ	< LOQ	100	6	98	3	101	2	100	4
Roxithromycin	65	5	71	2	70	2	80	4	72	9
Spiramycin	116	5	111	1	107	3	112	1	111	4
Sulfachloropyridazin	96	4	102	4	89	3	100	1	97	6
Sulfadiazin	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	100	2	99	2	99	2
Sulfadimidin	85	0	87	1	86	2	90	2	87	2
Sulfadimethoxin	84	3	90	2	87	2	93	2	89	4
Sulfadoxin	68	5	76	2	72	3	75	2	73	5
Sulfaethoxypyridazin	88	3	96	2	95	1	98	1	94	4
Sulfamerazin	91	3	95	4	94	2	97	1	94	4
Sulfamethoxazol	107	4	108	1	102	2	104	2	105	3
Sulfamethoxypyridazin	96	2	98	2	90	1	92	1	94	4
Sulfathiazol	113	2	114	3	101	4	100	1	107	7
Tetracyclin	94	4	100	5	100	2	106	1	100	5
Trimethoprim	89	3	104	7	90	2	95	2	95	8
Tylosin	< LOQ	< LOQ	89	9	80	4	88	5	85	8
Vancomycin	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	101	10	95	4	98	8

Tabelle 5.A2: Berechnete Wiederfindung $\pm$ relative Standardabweichung (RSD) ermittelt aus dotiertem Oberflächenwasser (0,05 $\mu\text{g/L}$, 0,1 $\mu\text{g/L}$, 0,5 $\mu\text{g/L}$, 2,0 $\mu\text{g/L}$) nach Voigt et al. (2019)^[2]

Antibiotikum	0,05 $\mu\text{g/L}$	$\pm$ RSD	0,1 $\mu\text{g/L}$	$\pm$ RSD	0,5 $\mu\text{g/L}$	$\pm$ RSD	2,0 $\mu\text{g/L}$	$\pm$ RSD	gemittelte Wiederfindung	$\pm$ RSD
Amoxicillin	97	3	104	2	97	1	98	1	99	4
Ampicillin	< LOQ	< LOQ	106	5	94	4	100	2	100	6
Azithromycin	74	6	80	5	85	2	91	1	82	9
Cefaclor	94	3	90	1	94	1	97	1	94	3
Cefotaxim	95	1	97	7	95	1	93	1	95	4
Ceftazidim	< LOQ	< LOQ	103	3	85	4	88	1	91	9
Chlortetracyclin	105	3	106	4	91	3	94	2	99	7
Ciprofloxacin	< LOQ	< LOQ	109	7	96	3	92	2	99	9
Clarithromycin	65	6	76	6	77	2	76	1	73	8
Clindamycin	109	2	99	1	96	1	96	1	100	6
Cloxacilin	86	4	94	2	95	1	94	1	92	5
Dehydratoerythromycin	74	4	90	2	91	3	95	1	87	10
Dicloxacillin	91	5	95	1	95	1	93	1	93	3
Doxycyclin	88	2	95	1	94	4	101	2	94	5
Enrofloxacin	105	11	97	1	89	1	91	2	95	9
Erythromycin	84	5	80	1	77	3	74	1	79	6
Flucloxacillin	86	3	93	2	94	2	92	2	91	4
Linezolid	85	5	89	4	93	2	94	1	90	5
Meropenem	< LOQ	< LOQ	111	9	97	10	93	3	101	11
Methicillin	91	5	100	1	100	1	97	1	97	5
Metronidazol	98	6	93	5	96	3	92	3	95	5
Mezlocillin	89	4	96	3	95	2	93	1	93	4
Moxifloxacin	< LOQ	< LOQ	129	4	94	12	95	5	105	16
N-Acetylsulfamethoxazol	< LOQ	< LOQ	97	8	104	1	99	2	100	5
Nafcillin	101	2	95	2	94	1	93	1	95	3
Ofloxacin	< LOQ	< LOQ	112	3	103	1	98	1	98	7
Oxacillin	94	3	99	2	96	2	96	1	96	3
Oxytetracyclin	< LOQ	< LOQ	96	4	95	4	93	1	94	3
Penicillin G	101	6	101	1	98	2	98	1	99	4
Penicillin V	90	3	96	2	96	2	96	1	95	3
Piperacillin	< LOQ	< LOQ	102	5	99	3	96	2	99	4
Roxithromycin	69	9	75	1	78	3	81	2	76	7
Spiramycin	101	2	102	3	99	2	102	1	101	2
Sulfachloropyridazin	85	2	92	3	90	3	92	2	90	4
Sulfadiazin	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	94	7	96	3	95	5
Sulfadimidin	94	8	96	3	101	1	98	2	97	5
Sulfadimethoxin	89	4	95	1	98	2	97	1	95	4
Sulfadoxin	85	2	91	3	92	2	90	2	90	4
Sulfaethoxypyridazin	88	2	87	1	91	2	92	1	90	3
Sulfamerazin	96	11	103	1	96	5	97	2	97	6
Sulfamethoxazol	92	2	115	1	100	2	96	1	100	9
Sulfamethoxypyridazin	102	4	101	2	98	1	93	1	99	4
Sulfathiazol	118	10	121	7	101	1	99	2	110	11
Tetracyclin	87	5	95	8	95	2	94	1	93	5
Trimethoprim	99	7	97	3	90	3	94	3	95	6
Tylosin	< LOQ	< LOQ	82	5	88	2	88	1	86	4
Vancomycin	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	93	10	93	3	93	7

Tabelle 5.A3: Berechnete Wiederfindung $\pm$ relative Standardabweichung (RSD) ermittelt aus dotiertem Grundwasser (0,05 $\mu\text{g/L}$, 0,1 $\mu\text{g/L}$, 0,5 $\mu\text{g/L}$, 2,0 $\mu\text{g/L}$) nach Voigt et al. (2019)^[1]

Antibiotikum	0,05 $\mu\text{g/L}$	$\pm$ RSD	0,1 $\mu\text{g/L}$	$\pm$ RSD	0,5 $\mu\text{g/L}$	$\pm$ RSD	2,0 $\mu\text{g/L}$	$\pm$ RSD	gemittelte Wiederfindung	$\pm$ RSD
Amoxicillin	92	4	98	2	94	1	100	1	96	4
Ampicillin	< LOQ	< LOQ	121	0	105	5	101	2	109	9
Azithromycin	97	4	97	2	97	1	101	2	98	3
Cefaclor	< LOQ	< LOQ	95	6	96	1	97	1	96	4
Cefotaxim	88	3	101	4	102	5	101	2	98	7
Ceftazidim	59	9	64	9	69	4	72	2	68	7
Chlortetracyclin	101	4	86	8	71	3	68	3	81	17
Ciprofloxacin	< LOQ	< LOQ	118	4	89	6	101	1	103	13
Clarithromycin	82	5	86	3	84	1	83	2	84	3
Clindamycin	110	3	112	2	107	1	108	3	109	3
Cloxacilin	92	6	98	5	98	2	99	1	97	5
Dehydratoerythromycin	88	1	93	2	90	2	90	3	90	3
Dicloxacillin	94	3	96	4	93	1	94	1	94	3
Doxycyclin	96	4	88	8	83	4	86	3	85	5
Enrofloxacin	100	4	128	15	96	6	104	9	107	15
Erythromycin	95	2	100	3	99	1	97	1	98	3
Flucloxacillin	98	7	108	5	99	1	99	1	101	6
Linezolid	99	4	98	4	102	2	103	2	100	3
Meropenem	< LOQ	< LOQ	84	2	93	10	100	3	93	9
Methicillin	98	2	102	1	101	1	102	1	101	2
Metronidazol	106	2	105	12	100	8	103	1	104	7
Mezlocillin	92	5	100	1	98	1	102	1	98	5
Moxifloxacin	< LOQ	< LOQ	103	11	94	5	98	5	99	8
N-Acetylsulfamethoxazol	< LOQ	< LOQ	98	2	98	2	102	2	99	3
Nafcillin	96	1	98	4	96	2	96	1	96	2
Ofloxacin	< LOQ	< LOQ	110	13	103	5	112	9	108	9
Oxacillin	98	5	101	5	96	2	98	2	98	4
Oxytetracyclin	< LOQ	< LOQ	84	4	75	7	84	3	81	7
Penicillin G	102	5	101	6	101	2	101	1	101	4
Penicillin V	99	5	101	1	96	1	95	1	98	4
Piperacillin	< LOQ	< LOQ	106	2	100	3	99	2	101	4
Roxithromycin	74	6	83	2	83	2	80	2	80	5
Spiramycin	109	3	101	7	90	2	91	2	98	9
Sulfachloropyridazin	101	5	99	7	103	5	101	1	101	5
Sulfadiazin	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	117	3	117	4	117	3
Sulfadimidin	106	2	94	5	93	3	101	15	98	10
Sulfadimethoxin	100	1	101	2	97	1	101	1	100	2
Sulfadoxin	100	1	101	2	97	1	101	1	100	2
Sulfaethoxypyridazin	105	3	103	4	100	3	100	1	102	3
Sulfamerazin	122	2	110	4	102	2	103	1	109	7
Sulfamethoxazol	97	4	100	3	98	1	101	1	99	3
Sulfamethoxypyridazin	106	1	106	3	102	1	103	1	104	3
Sulfathiazol	95	7	100	8	104	1	110	2	102	7
Tetracyclin	106	5	89	6	79	2	81	2	90	14
Trimethoprim	70	6	87	5	93	5	97	2	87	13
Tylosin	< LOQ	< LOQ	93	4	81	4	79	4	84	9
Vancomycin	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	101	4	103	2	93	3

Tabelle 5.A4: Berechnete Wiederfindung $\pm$ relative Standardabweichung (RSD) ermittelt aus dotiertem behandeltem Abwasser (0,05 $\mu\text{g/L}$, 0,1 $\mu\text{g/L}$, 0,5 $\mu\text{g/L}$, 2,0 $\mu\text{g/L}$) nach Voigt et al. (2019)^[1]

Antibiotikum	0,05 $\mu\text{g/L}$	$\pm$ RSD	0,1 $\mu\text{g/L}$	$\pm$ RSD	0,5 $\mu\text{g/L}$	$\pm$ RSD	2,0 $\mu\text{g/L}$	$\pm$ RSD	gemittelte Wiederfindung	$\pm$ RSD
Amoxicillin	98	6	103	4	102	3	104	1	102	4
Ampicillin	< LOQ	< LOQ	95	3	98	3	95	2	96	3
Azithromycin	66	9	74	1	70	6	78	3	72	7
Cefaclor	70	3	84	3	96	1	99	1	87	14
Cefotaxim	100	7	96	4	91	2	92	2	95	6
Ceftazidim	< LOQ	< LOQ	44	7	44	4	44	3	44	4
Chlortetracyclin	124	2	99	2	82	2	81	5	96	19
Ciprofloxacin	< LOQ	< LOQ	37	8	37	5	40	6	38	7
Clarithromycin	71	5	78	4	67	5	75	6	73	7
Clindamycin	98	2	96	1	91	1	93	1	95	3
Cloxacin	76	2	90	3	95	2	100	6	90	11
Dehydratoerythromycin	68	1	71	3	65	4	70	4	69	5
Dicloxacillin	93	3	95	3	94	2	94	2	94	2
Doxycyclin	104	2	96	3	92	2	91	2	96	6
Enrofloxacin	43	8	34	7	39	5	45	10	40	13
Erythromycin	86	3	95	3	91	2	97	2	92	5
Flucloxacillin	97	5	102	3	96	2	96	2	98	4
Linezolid	91	5	97	5	92	3	94	1	94	4
Meropenem	< LOQ	< LOQ	99	1	101	4	93	4	98	5
Methicillin	98	1	102	1	100	1	100	1	100	2
Metronidazol	86	5	86	4	82	4	87	3	85	4
Mezlocillin	102	6	104	1	100	1	100	2	102	4
Moxifloxacin	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	43	6	51	7	47	11
N-Acetylsulfamethoxazol	< LOQ	< LOQ	91	13	98	5	102	5	97	9
Nafcillin	98	2	102	2	97	1	99	1	99	2
Ofloxacin	< LOQ	< LOQ	25	13	29	7	33	6	29	14
Oxacillin	98	4	96	3	95	2	98	1	97	3
Oxytetracyclin	< LOQ	< LOQ	86	4	82	2	80	3	83	5
Penicillin G	98	5	98	2	100	1	102	1	100	3
Penicillin V	101	3	99	3	98	1	99	2	100	2
Piperacillin	< LOQ	< LOQ	103	5	97	3	98	1	99	4
Roxithromycin	72	4	84	5	73	6	82	4	77	8
Spiramycin	100	4	97	2	81	5	88	3	91	9
Sulfachloropyridazin	101	6	92	2	91	1	90	1	93	6
Sulfadiazin	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	86	7	87	3	86	5
Sulfadimidin	97	4	96	4	95	2	95	3	96	3
Sulfadimethoxin	91	5	96	2	95	2	96	0	95	3
Sulfadoxin	104	6	102	1	100	2	101	1	101	3
Sulfaethoxyipyridazin	96	3	101	3	96	2	96	1	97	3
Sulfamerazin	86	4	96	5	88	3	89	2	89	5
Sulfamethoxazol	92	2	95	2	90	1	90	1	92	3
Sulfamethoxyipyridazin	90	3	93	1	91	1	90	1	91	2
Sulfathiazol	99	7	95	7	90	4	89	1	93	7
Tetracyclin	95	9	86	2	80	2	79	2	85	9
Trimethoprim	77	7	67	12	70	8	74	3	72	9
Tylosin	< LOQ	< LOQ	79	5	69	8	77	9	75	9
Vancomycin	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	95	2	99	3	97	3