

# Entwicklung von validen Verfahren zum Nachweis von Resistenzen - EVA

## Abschlussbericht

**M. Sc. Lara Stelmaszyk**

Wassermikrobiologie, TZW, Karlsruhe

**Dr. Claudia Stange**

Wassermikrobiologie, TZW, Karlsruhe

**Prof. Dr. Andreas Tiehm**

Wassermikrobiologie, TZW, Karlsruhe

**Herausgeber**

DVGW Deutscher Verein des Gas- und Wasserfaches e. V.

Technisch-wissenschaftlicher Verein

Josef-Wirmer-Straße 1–3

53123 Bonn

T +49 228 91885

F +49 228 9188990

[info@dvwg.de](mailto:info@dvwg.de)

[www.dvgw.de](http://www.dvgw.de)

# **Entwicklung von validen Verfahren zum Nachweis von Resistenzen - EVA**

## **Abschlussbericht**

Mai 2022

**DVGW-Förderkennzeichen W 201830**

Zusätzlich gefördert durch:

Trinkwasserversorgung Magdeburg GmbH

Berliner Wasserbetriebe

Rheinisch-Westfälische Wasserwerksgesellschaft mbH

Zweckverband Landeswasserversorgung



## Zusammenfassung

Die Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen in der aquatischen Umwelt ist weltweit in einer Vielzahl von Studien beschrieben worden. Aus diesem Grund rücken Antibiotikaresistenzen als neue Parameter zur Beurteilung der hygienischen Wasserqualität zunehmend in den Fokus. Daher sind verlässliche Methoden zur Erfassung von Antibiotikaresistenzen essentiell. Eine Verbesserung der Methodik für den Nachweis von Antibiotikaresistenzen ist notwendig, um den tatsächlichen Grad an Belastung erfassen zu können.

Im Rahmen des Projektes wurde die Nachweismethodik für Antibiotikaresistenzen weiterentwickelt. Die derzeitigen Kulturverfahren aus dem klinischen Bereich erfassen Bakterien, die unter Nährstoffreichen Bedingungen wachsen. Es konnte erfolgreich ein Kulturverfahren zur Erfassung von antibiotikaresistenten Umweltbakterien etabliert werden. Mit diesem Verfahren können Cephalosporin-resistente und Carbapenemase-bildende oligotrophe Bakterien in Wasserproben erfasst werden. Diese Resistenzen sind im klinischen Bereich weltweit von hoher Relevanz, da sie die Wirksamkeit der Reserve-Antibiotika einschränken. Durch die weiterführende Untersuchung der gewonnenen Isolate konnten die Bakteriengattungen identifiziert und die Expression von  $\beta$ -Laktamasen belegt werden. Auch die PCR-Methodik zum Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen wurde weiterentwickelt. Bei der konventionellen quantitativen PCR (qPCR) werden bislang 100-300 Basenpaar lange Fragmente der Antibiotikaresistenzgene nachgewiesen. Im Rahmen des Vorhabens wurde die Methodik der Long Amplicon (LA)-qPCR weiterentwickelt. Da nur vollständige Gene mit ca. 800-2000 Basenpaaren zur Entwicklung von Resistenzen führen, können somit falsch-positive Befunde minimiert werden. Insbesondere nach der Wasseraufbereitung mittels reaktiver Verfahren wie Ozonung oder UV-Behandlung entstehen kleine Genfragmente. Die Versuche zeigten, dass mittels der LA-qPCR nach der Behandlung deutlich weniger Gene erfasst werden als mit der herkömmlichen Methode. Im Projekt wurde auch der Einsatz der Propidium-Monoazid (PMA)-qPCR zur Erfassung geschädigter Zellen geprüft. Es zeigte sich allerdings, dass die benötigte PMA-Konzentration und die optimalen Inkubationsbedingungen zwischen den Umweltbakterien stark variieren und nicht vereinheitlicht werden können. Daher kann keine Standard-Methode der PMA-qPCR für die Untersuchung von Umweltproben empfohlen werden.

Mit den zur Verfügung stehenden Methoden wurde das Vorkommen von antibiotikaresistenten Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen im Rohwasser erfasst sowie das Verhalten von Antibiotikaresistenzen bei der Trinkwasseraufbereitung mittels naturnaher/ mikrobiologischer Verfahren, Filtrationsschritten und Desinfektionsverfahren untersucht. Die Untersuchungen zeigten, dass die Aufbereitung zu einer deutlichen Reduktion der antibiotikaresistenten Bakterien und Antibiotikaresistenzgene führt. Daher ist eine Gefährdung des Trinkwassers derzeit nicht zu erwarten, wenn die anerkannten Regeln der Technik eingehalten werden und das Trinkwasser den gesetzlichen hygienisch-mikrobiologischen Anforderungen entspricht. Zur Erfassung des aktuellen Ist-Zustandes und der zeitlichen Entwicklungen sowie für eine abgesicherte Bewertung der Situation wird die zukünftige Durchführung von Monitoring-Programmen mit den etablierten Methoden empfohlen.



# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
2	Zielsetzung und Aufbau des Projekts .....	2
3	Wissenschaftliche Ausgangssituation.....	3
3.1	Antibiotikaresistenzen in der Umwelt.....	3
3.1.1	Relevanz und Verbreitung.....	3
3.1.2	Nachweisverfahren .....	6
3.1.3	$\beta$ -Laktam-resistente Bakterien .....	10
3.2	Trinkwasseraufbereitung .....	11
3.2.1	Desinfektionsverfahren .....	13
3.2.2	Naturnahe Verfahren .....	14
3.2.2.1	Uferfiltration und Grundwasseranreicherung .....	14
4	Durchgeführte Arbeiten .....	16
4.1	Molekularbiologische Methoden .....	16
4.1.1	Quantitative real-time PCR .....	16
4.1.2	Entwicklung einer Long Amplicon-PCR-Methodik für den Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen zum Ausschluss von falsch-positiven Befunden.....	17
4.1.2.1	Behandlungsexperimente zum Vergleich der Short Amplicon- und Long Amplicon-qPCR .....	18
4.1.3	Entwicklung einer PMA-PCR-Methodik zur lebend/tot-Unterscheidung.....	20
4.2	Mikrobiologische Methoden.....	21
4.3	Vorkommen von Antibiotikaresistenzen im Rohwasser .....	22
4.4	Verhalten von Antibiotikaresistenzen bei der Trinkwasseraufbereitung .....	24
5	Ergebnisse und Diskussion .....	26
5.1.1	Etablierung von Long Amplicon-qPCR-Verfahren .....	26
5.1.1.1	Primer-Design .....	26
5.1.1.2	Methodenetablierung für ausgewählte ARG .....	26
5.1.2	Etablierung eines PMA-qPCR Protokolls .....	32
5.1.3	Etablierung von Kulturverfahren für $\beta$ -Laktam-resistente Umweltbakterien .....	37
5.1.3.1	Identifizierung von Umweltisolaten mit MALDI-TOF-MS .....	45
5.2	Nachweis $\beta$ -Laktam-resistenter Umweltbakterien in Oberflächenwässern.....	47
5.2.1	Nachweis von klinisch relevanten Pathogenen und resistenten Umweltbakterien im Kulturverfahren.....	47
5.2.1.1	Nachweis von enzymatisch vermittelten $\beta$ -Laktam Resistenzen bei den Umweltisolaten.....	54
5.2.2	Vergleich der phänotypischen $\beta$ -Lactam-Antibiotika Resistenzmuster mit den molekularbiologischen Analysen von Gesamt-DNA-Extrakten .....	59
5.3	Verhalten von Antibiotikaresistenzen bei der Trinkwasseraufbereitung .....	60
5.3.1	Anwendung der LA-qPCR für die Beurteilung der UV- und Chlorbehandlung (Labor) sowie Ozonung (Wasserversorger).....	60
5.3.2	Anwendung der LA-qPCR für die Beurteilung der Membranfiltration.....	65
5.4	Reduktion von Antibiotikaresistenzen bei den verschiedenen Wasserversorgern...66	
5.4.1	Reduktion von Antibiotikaresistenzen im Wasserwerk Langenau.....	67
5.4.2	Reduktion von Antibiotikaresistenzen bei der Trinkwasserversorgung Magdeburg GmbH (TWM).....	70

5.4.3	Reduktion von Antibiotikaresistenzen bei den Berliner Wasserbetrieben (BWB)	73
5.4.4	Reduktion von Antibiotikaresistenzen bei der Rheinisch-Westfälischen Wasserwerksgesellschaft (RWW)	76
6	Vergleichende Bewertung	78
7	Zusammenfassung und Empfehlungen	81
8	Danksagung	83
9	Publikationen	85
10	Schlussfolgerungen und Ausblick	86
11	Literaturverzeichnis	88
12	Abbildungsverzeichnis	103
13	Tabellenverzeichnis	105
14	Anhang	108