

Diplomarbeit

Isolation, Charakterisierung und Resistenzbestimmung von
Klebsiella spp. aus Donauwasserproben

eingereicht von

Julia Nürnberger

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor(in) der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin

unter der Anleitung von

Priv.-Doz. Mag.rer.nat. Dr.scient.med. Clemens Kittinger

Priv.-Doz. Mag. Dr.rer.nat. Gernot Zarfel

Graz, am 30.10.2019

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 30.10.2019

Julia Nürnberger eh

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinen Betreuern Priv.-Doz. Mag. Dr.rer.nat.Gernot Zarfel und Priv.-Doz. Mag.rer.nat. Dr.scient.med. Clemens Kittinger für die große Unterstützung und Geduld bedanken. Ich habe die Möglichkeit die Labortätigkeit besser kennenzulernen sehr genossen. Ein großes Dankeschön möchte ich auch an meine Laborkolleginnen und Laborkollegen aussprechen, die mich tatkräftig unterstützten und herzlich in der Arbeitsgruppe aufnahmen!

Vielen Dank, für die wunderbare, lehrreiche Zeit!

Zusammenfassung

Die Prävalenz von nosokomialen also auch „community acquired“ Infektionen mit multiresistenten Bakterien steigt stetig und stellt eine große Herausforderungen der Medizin der kommenden Jahrzehnte dar. Der gesteigerte Einsatz von Antibiotika in Medizin, Landwirtschaft und Viehzucht begünstigt das Auftreten und die Verbreitung von human generierten Antibiotikaresistenzen auch in allen Bereichen der Umwelt, beispielsweise in Oberflächengewässern. Durch den Zufluss von Abwässern in Flüsse, wie der Donau, wird die Belastung mit multiresistenten Keimen erhöht, so kann auch das ubiquitär vorkommende Bakterium *Klebsiella pneumoniae* über horizontalen Transfer zusätzliche Resistenzen erlangen.

Ziel dieser Arbeit war es *Klebsiella* spp. aus Donauwasserproben zu isolieren und bestehende Resistenzen zu untersuchen. Zur Isolation wurden verschiedene Nährmedien verwendet von denen 299 Isolate, die mittels MALDI-TOF charakterisiert wurden, isoliert werden konnten. Durch Plattendiffusionstests nach EUCAST wurden die Antibiotikaresistenzen bestimmt. 124 der Isolate zeigten Wildtypresistenzmuster der Spezies *Klebsiella* spp. Erworbene Resistenz lag bei 25 Isolaten vor, davon konnte ein Isolat als multiresistent classifiziert werden. Darüber hinaus wurden unter den resistenten Isolaten ein weiteres ESBL produzierendes Bakterium und sowie vier Betalactamase Hyperproduzenten entdeckt. Die Daten sollen dabei helfen antimikrobielle Resistenz in Umwelt und Wasser besser zu verstehen, aber die Studie ist erst am Anfang.

Abstract

Klebsiella is an ubiquitous occurring gram-negative bacteria. A habitat amongst others is surface water like the River Danube which is influenced by humans through sewage waters and agriculture. *Klebsiella* spp. becoming resistant and multi-resistant is a growing threat to public health. The increasing usage of antibiotics in medicine and livestock farming favours the occurrence of resistances against antibiotics. Such resistances can be horizontally transferred between different species creating multi-resistant bacteria. This spread also occurs in the environment, like surface waters.

Water samples of Danube River were examined for *Klebsiella* spp. using different kinds of nutrient media and characterized via MALDI-TOF. 299 *Klebsiella* spp. isolates could be identified and were then examined for antibiotic resistances using a disc diffusion test based on EUCAST criteria. 124 isolates presented a wild-type resistance pattern. Out of 25 *Klebsiella* spp. isolates with at least one acquired resistance one multi-resistant was identified. Further were one ESBL producing and four isolates able to overproduce a beta-lactamase found.

Klebsiella pneumoniae and *oxytoca* were most common among the studied *Klebsiella* spp. isolates. But this study is just at the beginning to understand antimicrobial resistance mechanisms in environment better.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	ii
Zusammenfassung	iii
Abstract	iv
Inhaltsverzeichnis	v
Glossar und Abkürzungen	vii
Abbildungsverzeichnis	ix
Tabellenverzeichnis	x
1 Einleitung	1
1.1 Klebsiella spp.	1
1.2 Antibiotika	1
1.2.1 Beta Lactam-Antibiotika	2
1.2.2 Chinolone	6
1.2.3 Aminoglykoside	6
1.2.4 Tetracycline	6
1.3 Resistenzmechanismen	7
1.3.1 Beta-Lactamasen vermittelte Resistenz	8
1.3.2 Antibiotika-Resistenzen im Abwasser	9
1.4 Klebsiella spp. in der Umwelt	10
1.5 Klinische Relevanz von Klebsiella pneumoniae	11
1.5.1 Nosokomiale Infektionen	11
1.5.2 Community acquired <i>Klebsiella pneumoniae</i> Infektionen	13
1.6 Ziel der Arbeit	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Verwendete Lösungen	15
2.2 Verwendete Nährmedien	15
2.3 Probennahme	17
2.4 Isolation von Klebsiella pneumoniae	18
2.5 Charakterisierung mittels MALDI-TOF von VITEK® MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight)	19
2.6 Konservierung und Aufbewahrung	19
2.7 EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)	20

3	Resultate	22
3.1	Isolation und Charakterisierung	22
3.2	Antibiotikaresistenzen	27
4	Diskussion	32
4.1	Isolation	33
4.2	Vergleich mit Daten von 2016	35
4.3	Konklusion	39
5	Literaturverzeichnis	40

Y

Glossar und Abkürzungen

AURES: Resistenzbericht Österreich, Bundesministerium

CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute

ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control

ESBL: extended-spectrum β -lactamase

EUCAST: The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

MALDI-TOF MS: Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry / Matrix-Laser unterstützte-Desorption/Ionisation – Massenspektrometrie mit Flugzeitanalyse

MRSA: Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*

PBP: Penicillin bindendes Protein

spp.: Spezies pluralis: mehrere, nicht im Einzelnen genannte Arten

WHO: World Health Organisation

Antibiotika: AM: Ampicillin

AMC: Amoxicillin & Clavulansäure

CL: Colistin

CTX: Cefotaxim

CXM: Cefuroxim

CN: Cefalexin

FOX: Cefoxitin

GM: Gentamicin

MXF: Moxifloxacin

SXT: Trimetoprim & Sulfamethoxazol

CIP: Ciprofloxacin

TZP: Piperacillin & Tazobactam

MEM: Meropenem

TE: Tetracyclin

AN: Amikacin

CAZ: Ceftazidim

IPM: Imipenem

C: Chloramphenicol

FEP: Cefepim

TGC: Tigecyclin

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Membranfiltration einer Donauwasserprobe	18
Abbildung 2: Mit Donauwasserproben bewachsener Orientation Agar links im Vergleich zu Coliformen Agar.	18
Abbildung 3: Anzahl der verschiedenen <i>Klebsiella</i> spp. Isolate	23
Abbildung 4: Anzahl der <i>Klebsiella</i> spp. und von welchem Nährmedium sie stammen.	24
Abbildung 5: MacConkey Agar	24
Abbildung 6: <i>Klebsiella</i> spp Verteilung	30
Abbildung 7: Orientation Agar Platte mit <i>Klebsiella</i> spp.	30
Abbildung 8: Chromocult Coliformen Agar Platte	34
Abbildung 9: Verteilung der Isolate 2016	35

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: LB Agar	16
Tabelle 2: Probennahmeorte	17
Tabelle 3: Antibiotika	21
Tabelle 4: Probennahmestellen & <i>Klebsiella</i> spp.	26
Tabelle 5: Antibiotikaresistenzen	28
Tabelle 6: Spezies der resistenten Isolate	29
Tabelle 7: Isolateinteilung nach Sites	31
Tabelle 8: Probennahmeorte & Anzahl <i>Klebsiella</i> spp	33
Tabelle 9: Joint Danube Survey 3 und 4 im Vergleich	38

1 Einleitung

1.1 *Klebsiella spp.*

Klebsiella sind gramnegative, sporenlose, unbewegliche, bekapselte Stäbchenbakterien aus der Familie der *Enterobacteriaceae*. Sie gehören zu der Klasse der Gammabakterien und sind nach dem deutschen Bakteriologen Edwin Klebs benannt. [1] Die meisten *Klebsiella* -Stämme können Stickstoff (N_2) fixieren. Dabei wird N_2 zum Beispiel zu Ammoniak (NH_3) reduziert, was für die Herstellung anderer organischer Moleküle, wie Aminosäuren notwendig ist. Diese Eigenschaft unterscheidet *Klebsiella* von anderen *Enterobacteriaceae*. [2] Außerdem kann *Klebsiella spp.* Laktose fermentieren und kommt auf der normalen Flora der Haut und im Gastrointestinaltrakt vor.[3] Bei gegebener Disposition handelt es sich um einen fakultativ pathogenen Erreger, der Infektionen auslösen kann. Der wichtigste Vertreter in diesem Zusammenhang ist *Klebsiella pneumoniae*, daneben sind *Klebsiella oxytoca* und *Klebsiella granulomatis* von Bedeutung. [1]

1.2 *Antibiotika*

Im frühen 20. Jahrhundert wird mit der Entdeckung von Antibiotika der Beginn der modernen Medizin eingeleitet und durch die fortlaufende Anwendung in der Humanmedizin werden Morbidität und Mortalität reduziert. [4,5] Die Verwendung von Antibiotika in der Humanmedizin, Veterinärmedizin und Landwirtschaft hat großen Einfluss auf die Umwelt. Manche Antibiotika werden unverändert wieder ausgeschieden, wodurch sie über Kläranlagen, beziehungsweise über Dünger in Gewässer und Böden gelangen. Das trifft nicht nur für die Antibiotikareste selbst, sondern auch antibiotikaresistente Bakterien und Antibiotikaresistenz codierende Gene können über Kläranlagen in die Umwelt gelangen. [5]

2017 wurden in Österreich 44,61 Tonnen antimikrobieller Substanzen zur Behandlung von Nutztieren verkauft, von denen über 90% systemisch verabreicht wurden. [6]

Es gibt natürlich vorkommende Antibiotika, die von Bakterien oder Pilzen gebildet werden, sie haben allerdings nur eine sehr geringe klinische Bedeutung. Einige dieser Stoffe kann man jedoch verändern, wodurch man semisynthetische, wirksamere Substanzen erhält. Diese werden heute entweder biosynthetisch oder rein synthetisch produziert. Die Zellwand, die Zytoplasmamembran, Proteinsynthese, und Lipidbiosyntheseenzyme, stellen verschiedenen Angriffspunkte für Antibiotika dar, aber auch DNA- Replikations- und Transkriptionelemente können angesteuert werden. [2,7]

1.2.1 Beta Lactam-Antibiotika

Alle Beta-Lactam-Antibiotika besitzen als gemeinsames Merkmal einen β -Lactamring, der das antibakteriell aktive Zentrum darstellt. Aufgrund weiterer Molekülkomponenten kann man mehrere Wirkstoffklassen, Penicilline, Cephalosporine, Monobactame, Carbapeneme und Beta-Lactamase-Inhibitoren, unterscheiden. [7,8] Beta Lactam-Antibiotika sind Inhibitoren der bakteriellen Zellwandsynthese in dem sie auf sogenannte Penicillin -bindenden-Proteine (PBPs), über deren Transpeptidasenaktivität Einfluss nehmen, worauf ihre Wirkungsweise beruht.[7,9] Durch die Ähnlichkeit des β -Lactamringes mit dem D-Alanyl-D-Alanin-Dipeptid der Peptidoglycansynthetase, einer Mureinsynthetase die in der Zellwand Glycanstränge durch kurze Peptidbrücken das Peptidoglycangerüst vernetzt und aufbaut, wird die Zellwandsynthese gestört. Die antibakterielle Wirkung ist von mehreren Faktoren abhängig. Einer dieser Faktoren ist, wie schnell die bakterielle Zellwand und der periplasmatische Spalt passiert werden können. Die Zellwand besteht bei grampositiven Bakterien aus einem dickeren Mureingerüst und hingegen bei gramnegativen aus einem dünneren

Mureingerüst, wobei diese noch zusätzlich eine selektiv wirkende äußere Membran besitzen. Des Weiteren hängt die Wirkungsweise davon ab, wie hoch die Affinität der Beta-Lactam-Antibiotika auf die Penicillin -bindenden-Proteine ist, da durch Mutationen die Affinität des Antibiotikums reduziert werden kann. Außerdem spielt das Vorhandensein und die Stabilität von bakteriellen Beta-Lactamasen eine wichtige Rolle. [7]

1.2.1.1 Penicilline

Die Grundstruktur von Penicillinen ist 6-Aminopenicillansäure (6-APA). Aus dieser können verschiedenste semi-synthetische Derivate hergestellt werden. [8] Man kann die heute verfügbaren Penicilline in 4 Gruppen einteilen, Penicillin G und seine direkten Derivate, Isoxazolympenicilline, Aminopenicilline, und Acylaminopenicillin.

Penicillin G und seine direkten Derivate werden bei grampositiven Bakterienarten und gramnegativen Kokken, die nicht Penicillinase produzieren und bei einigen anaeroben gramnegativen Stäbchen, wie *Spirochäten* oder *Leptospiren* wie *Borrelien* eingesetzt. Penicillin G und die direkten Derivate sind bis auf ein paar Ausnahmen wie Penicillin V säurelabil, daher ist bei den Säurelabilen eine intravenöse oder intramuskuläre Gabe notwendig.

Isoxazolympenicilline hingegen sind penicillinasefest, Flucloxacillin stellt einen bekannten Vertreter dar und wird bei leichteren Infektionen eingesetzt, kann jedoch hepatotoxisch wirken.

Aminopenicilline haben ein erweitertes Wirkspektrum und können auch bei *Haemophilus influenzae*, *Listerien* und *Enterokokken* eingesetzt werden, deshalb werden sie häufig im HNO-Bereich verwendet. Allerdings ist ihre Plasmaproteinbindung mit 20% gering und sie werden unverändert überwiegend renal ausgeschieden.

Acylaminopenicilline sind ebenfalls Breitspektrum Penicilline, sie weisen jedoch eine wesentlich höhere Aktivität gegen gramnegative Stäbchenbakterien auf, müssen allerdings intravenös oder intramuskulär verabreicht werden, da sie oral nicht resorbiert werden können. [7]

1.2.1.2 Cephalosporine

Cephalosporine sind semisynthetische Beta-lactam Antibiotika die als Basis 7-Amino-cephalosporinsäure haben. Sie können eingeteilt werden in solche, die zur parenteralen und solche die zur oralen Therapie geeignet sind, eingeteilt werden. Die Cephalosporine für die parenterale Gabe können in fünf Generationen unterteilt werden. Cefazolin der ersten Generation hat die höchste Aktivität gegen Staphylokokken und ist penicillinastabil, ist jedoch instabil gegenüber vielen Beta-Lactamasen von gramnegativen Bakterien. Die zweite Generation ist im Vergleich zur ersten Generation schwächer gegenüber grampositiven Erregern, zeigt aber eine höhere Wirksamkeit gegenüber gramnegativen. Die dritte Generation besitzt keine ausreichende Wirksamkeit gegen *Staphylokokken*, ist hingegen besser geeignet für gramnegative Bakterien, als die ersten beiden Generationen, sie besitzt Stabilität gegenüber zahlreichen Beta-Lactamasen. Ceftazidim aus der Generation 3b ist auch bei *Pseudomonas aeruginosa* wirksam. Die Generation 4a ähnelt der Generation 3b in der Wirksamkeit, besitzt aber eine höhere Aktivität bei Staphylokokken und kann aber von verschiedenen ESBL degradiert werden. Die Generation 4b ist unwirksam bei Staphylokokken und bei Carbapenemase-bildenden Erregern, besitzt jedoch eine hohe Aktivität bei *Pseudomonas aeruginosa* und erfasst in Kombination mit Tazobactam auch ESBL-bildende Bakterien. Die fünfte Generation wirkt nicht bei *Pseudomonas aeruginosa* ist aber aktiv bei MRSA und anderen grampositiven sowie gramnegativen Bakterien.

Die oralen Cephalosporine können in drei Generationen eingeteilt werden. Die erste Generation wirkt hauptsächlich im grampositiven Bereich und kann auch penicillinasebildende Staphylokokken erfassen, die zweite Generation hat eine höhere Aktivität im gramnegativen und die dritte Generation besitzt eine gesteigerte Aktivität bei gramnegativen und eine erniedrigte Aktivität bei grampositiven Bakterien.

Eine Gemeinsamkeit aller Cephalosporine ist, dass sie keine Wirkung gegen intrazellulär lokalisierte Erreger besitzen. [7] In Österreich zeigt sich eine rückläufige Tendenz der Resistenzrate von *Klebsiella pneumoniae* gegenüber Cephalosporinen der dritten Generation. [6]

1.2.1.3 Carbapeneme

Carbapeneme haben eine dem Penicillin- ähnliche Grundstruktur, jedoch mit einem Kohlenstoffatom anstelle eines Schwefelatoms und einer Doppelbindung zwischen C2 und C3. Gegenüber fast allen β -Lactamasen sind sie sehr stabil, besitzen das breiteste Aktivitätsspektrum sowohl auf grampositive, als auch gramnegative Bakterien (inklusive *Pseudomonas aeruginosa*) und werden deswegen auch als so genannte „Antibiotics of last resort“ verwendet. [7,9] Die Ausgangssubstanz für Carbapeneme ist Thienamycin, welche an PBPs bindet, allerdings ist sie sensitiv auf milde Basenhydrolyse (über pH 8.0) deswegen wurden Derivate, die Carbapeneme entwickelt. Die Schlüsselfunktion der Carbapeneme liegt darin, dass sie in der Lage sind, an mehrere verschiedene PBPs zu binden. Wenn diese PBPs inhibiert sind, findet eine Autolyse statt, das Peptidoglykangerüst wird geschwächt bis es schließlich zum Zerbersten der Zelle durch osmotischen Druck kommt. [9] Carbapeneme werden oral schlecht resorbiert, weswegen sie nur parenteral verabreicht werden. [7] Die Resistenzrate von *Klebsiella pneumoniae* in Österreich liegt derzeit bei 0,9% und 2017 wurden von 11 Carbapenemase produzierenden invasiven Isolaten von *Klebsiella pneumoniae* berichtet. [6]

1.2.1.4 Beta-Lactamase Inhibitoren

Beta-Lactamase Inhibitoren bewirken eine Enzymblockade bestimmter Lactamasen und werden daher mit Beta-Lactamase - empfindlichen Penicillinen oder Cephalosporinen angeboten. [7] Beta-Lactamase Inhibitoren können in reversible oder irreversible eingeteilt werden, wobei letztere effektiver sind, Clavulansäure, Tazobactam und Sulbactam gehören zu den Irreversiblen. [8]

1.2.2 Chinolone

Das erste Chinolonderivat Nalidixinsäure wurde 1962 entdeckt und wirkt bakterizid auf gramnegative Bakterien. Danach wird bei den Chinolonen der zweiten Generation ein Fluoridatom an Position 6 des Grundgerüsts gebunden, wodurch Fluorchinolone entstehen, was zu einer Aktivitätssteigerung führt und das Wirkungsspektrum auf einige grampositive Erreger erweitert. Durch weitere Alterationen wird die dritte Generation von Fluorchinolonen entwickelt, welche auch bei anaeroben Bakterien wirkt. [8] Fluorchinolone wirken bakterizid indem sie entweder die Topoisomerase II oder die Topoisomerase IV beeinflussen. [7] Die Topoisomerase II wird über *gyrA* und *gyrB* codiert und die Topoisomerase IV über *parC* und *parE* codiert, bei Mutationen in diesen Genen kann es zu Resistenzen kommen. [7,8] Die Resistenzrate von *Klebsiella pneumoniae* gegenüber Fluorchinolonen ist derzeit im Ansteigen (von 9,8 auf 14,2%).[6]

1.2.3 Aminoglykoside

Die Grundstruktur der Aminoglykoside ist 2-Desoxystreptamin. Sie können sowohl die Poren, als auch die Lipopolysaccharid -Doppelschicht der äußeren Membran

von gramnegativen Bakterien penetrieren. Sie binden an die 30S-Untereinheiten der Ribosomen und verursachen ein Misreading der Proteinsynthese, womit sie bakterizid wirken. Im neutralen oder alkalischen Milieu unter aeroben Bedingungen wirken sie gegen ein breites Spektrum an Erregern, wie *Staphylococcus aureus*, koagulasenegativen Staphylokokken und vielen A Streptokokken. [7]

1.2.4 Tetracycline

Tetracycline werden aus *Streptomyces* -Arten gewonnen. Sie hemmen die Proteinsynthese indem sie die Anlagerung von Aminoacyl-t-RNA an das Ribosom verhindern. Tigecyclin, das eigentlich ein Glycylcyclin und somit ein Minocyclinderivat ist, wirkt auf die gleiche Art und Weise. [7,10] Tetracycline wirken bakteriostatisch auf die meisten *Propionibakterien*, *Yersinien*, *Brucellen*, *Choleravibrionen*, *Chlamydien*, *Mykoplasmen*, *Ureaplasmen* und *Rickettsien*. Es gibt allerdings plasmidvermittelte erworbene Resistenzen gegen Tetracycline entweder durch tetracyclinspezifischen Efflux oder ribosomalen Schutz. Die Aktivität von Glycylcyclinen wird dadurch nicht beeinflusst, da sie mit einer höheren Affinität an das Ribosom binden. Es gibt aber auch hier bereits Resistenzen über unspezifische Effluxpumpen oder Mutationen am Ribosom, die aber chromosomal codiert sind. [5,7] Tigecyclin wird bei komplizierten Haut- und Weichteilinfektionen durch *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* (inklusive MRSA), *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium perfringens* und anderen eingesetzt und hat ein sehr breites Wirkungsspektrum. [7,10]

1.3 Resistenzmechanismen

Zu den verschiedenen Resistenzmechanismen zählt einerseits die natürliche Resistenz eines Bakterienstammes, wenn der Angriffspunkt eines Antibiotikums fehlt, wie bei *Mycoplasmen*, die keine Zellwand besitzen und deswegen eine natürliche Resistenz gegenüber Penicillinen haben. [2,7] Die mutationsbedingte Resistenz kann spontan entstehen, wobei bei Stress ein erhöhter Selektionsdruck ausgelöst werden kann, wodurch die Mutationsrate steigen kann, beziehungsweise gibt es für spontane Mutanten dann oft bessere Überlebenschancen. [2,7] Resistenzen können aber auch horizontal von Bakterium zu Bakterium übertragen werden. [11] Dies geschieht beispielsweise über konjugative Resistenzplasmide (R-Plasmide), die entweder ein oder mehrere Gene für Resistenzen codieren. Durch Konjugation können diese Plasmide innerhalb einer Bakterienpopulation weitergegeben werden, aber auch teilweise auf andere Spezies übertragen werden. Weitere mobile genetische Elemente, wie Transposons, Insertionssequenzen oder Bakteriophagen können ebenfalls für Resistenzmechanismen codieren.

Ein Bakterium kann auch auf biochemischen Weg eine Resistenz entwickeln, wenn zum Beispiel die Folsäuresynthese der Angriffspunkt ist, wie bei Sulfamedikamenten, kann Folsäure stattdessen aus der Umgebung aufgenommen werden. Eine weitere Möglichkeit zur Resistenz besteht durch Efflux, also darin das eingedrungene Antiinfektivum wieder herauszupumpen.[2]

1.3.1 Beta-Lactamasen vermittelte Resistenz

Beta-Lactamasen sind Enzyme die die β -Lactam-Bindung eines Antibiotikums hydrolytisch spalten. Unter anderen bei *Klebsiella* spp. können die Beta-Lactamasen Teil der natürlichen Resistenz sein. [7]

Man kann Beta-Lactamasen in vier Klassen von A bis D nach Ambler einteilen. Die Klassen A, C und D besitzen einen Serinrest im aktiven Zentrum, hingegen die Klasse B beinhaltet Metallo-Betalactamasen (MBL), die Zink als Cofaktor benötigen. [7,12]

Die frühesten bekannten Betalaktamasen bei *Enterobacteriaceae*, TEM-1 (Die Abkürzung steht für den Namen des Patienten, Temoniera bei dem sie isoliert wurde) und SHV-1 (steht für: variable Reaktion mit Sulphydrylinhibitoren) wurden in den Sechzigerjahren beschrieben, sie gehören der Klasse A an. Andere *Enterobacteriaceae* wie zum Beispiel *Enterobacter* besitzen von Natur aus Klasse C Beta-Lactamasen, die ein deutlich geringeres Molekulargewicht aufweisen. Mit der Entwicklung neuerer Beta-Lactame konnte man die von diesen Enzymen vermittelte Resistenz umgehen, so sind Cephalosporine mit erweitertem Spektrum gegenüber TEM-1 und SHV-1 Produzenten wirksam. 1985 wurde die erste Beta-Lactamase die auch Cefotaxim und andere Cephalosporine hydrolysiert entdeckt, man bezeichnet diese Betalactamasen auch als „extended spectrum β -lactamases“ (ESBL).[7,13] Die Gesamtanzahl an ESBL die heutzutage charakterisiert sind liegt bei über 200. Besteht eine Infektion durch einen ESBL – Keim können Carbapeneme eingesetzt werden, allerdings nimmt die globale Anzahl der beschriebenen Fälle von *Enterobacteriaceae* in Klinik und Umwelt, die Carbapenemasen besitzen, stetig zu. [7,11,14,15]

Der Joint Danube Survey 3 untersuchte 2016 Oberflächenwasserproben der Donau. Hier wurde der genetische Hintergrund der ESBL Resistenzen von verschiedenen *Enterobacteriaceae* analysiert, wonach die dominante ESBL Familie CTX-M war. Bei *Klebsiella pneumoniae* wurde außerdem SHV-12-ESBL

gefunden, aber auch Gene einer SHV- Variante ohne ESBL (SHV-1; SHV-11) wurden entdeckt. [16]

Carbapenemasen in *Enterobacteriaceae*, zum Beispiel KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase) gehören zu Klasse A Betalactamasen.

Clavulansäureempfindliche Betalactamasen der Klasse B sind beispielsweise IMP (Imipenem Betalactamase) oder NDM (New Delhi Metallo-Betalactamase) und OXA-48 (expanded-spectrum Oxacillinasen) Betalactamase gehören der Klasse D an. [14,15]

1.3.2 Antibiotika-Resistenzen im Abwasser

In Europa besteht bei Kläranlagen im Ländervergleich ein Nord zu Süd und West zu Ost Gradient mit einer allgemeinen Zunahme der Prävalenz der Antibiotikaresistenzen, das bedeutet in südlichen Ländern, wie zum Beispiel Portugal werden mehr Resistenzen im Abwasser entdeckt. Die Zunahme der Antibiotikaresistenzen korreliert mit der Menge des Antibiotika Konsums, so gibt es in Ländern mit erhöhtem Konsum auch vermehrt Antibiotikaresistenzen. Auch bei der Häufigkeit mit der Antibiotika in Europa verschrieben werden, gibt es geografische Unterschiede, so werden zum Beispiel in skandinavischen Ländern Antibiotika viel seltener verschrieben, als in Mitteleuropa oder Südeuropa, wo sie am häufigsten in Verwendung sind. [17] Nach der Abwasserbehandlung sind die meisten Resistenzklassen und codierenden Integrasen und Transposasen bei den vermehrt Antibiotika konsumierenden Ländern signifikant erhöht. Die Gene für Tetracycline und MLS_B , die vor der Abwasserbehandlung bei den weniger konsumierenden Ländern höher waren, werden im behandelten Abwasser weniger. [17] Kläranlagen sind sozusagen Sammelbecken in denen horizontaler Resistenztransfer stattfindet, was die Verteilung von multiresistenten gramnegativen Bakterien in Oberflächenwasser erleichtert. [11] Die Resistenzen

bei klinischen Isolaten von *Klebsiella pneumoniae* sind 2018 in südlichen Ländern, wie Italien oder Griechenland ebenfalls höher als im restlichen Europa. [18]

1.4 *Klebsiella* spp. in der Umwelt

Klebsiella spp. sind allgegenwärtig in der Umwelt, man findet sie in Abwasser, Oberflächenwasser, im Boden und auf Pflanzen und deren Wurzeln, aber auch auf der Schleimhaut von Menschen und anderen Säugetieren, wie Pferden oder Schweinen. Beim Menschen findet man sie sowohl im Nasopharynx als auch auf der Darmmukosa. [19].

Da Wasser der Öffentlichkeit frei zugänglich ist, stellt es eine Quelle aus der Infektionskrankheiten hervorgehen können dar. Dies trifft sowohl für Trinkwasser als auch andere Gewässer zu und je mehr Menschen Zugang zu einer Wasserquelle haben, beziehungsweise diese nützen, desto mehr sind bei einer Kontamination mit pathogenen Mikroorganismen betroffen. [2] Hinzu kommt, dass durch den übermäßigen Gebrauch von Antibiotika in der Medizin und der Viehzucht, multiresistente Keime nicht mehr auf das Krankenhaus beschränkt sind, sondern auch bei Wildtyp-Spezies anzutreffen sind. [16]

Wasserverschmutzung wird zu einem globalen Gesundheitsproblem. Jährlich gibt es ungefähr 1,7 Milliarden Durchfallerkrankungen, wovon immunschwache Personen und Kinder betroffen sind. 90% der Tode aufgrund Durchfallerkrankungen sind direkt mit kontaminiertem Wasser assoziiert. [20]

Um die Wasserqualität eines Gewässers hinsichtlich mikrobieller Kontamination zu überprüfen, werden häufig Koliforme, vor allem Fäkalkoliforme, zu denen auch *Klebsiella* spp. gehören, herangezogen. [2] Beispielsweise Kläranlagen werden so untersucht. [17]

Wie auch bei anderen Mikroorganismen ist die Häufigkeit des Vorkommens von *Klebsiella* spp. in Flüssen mit menschlicher Aktivität, hauptsächlich durch die Zufuhr von Abwasser verbunden. Obwohl bei der Abwasserbehandlung *Klebsiella* spp. um >99% reduziert werden, sind laut einer Studie aus den Niederlanden nach

dem Zuleiten des Abwassers die Konzentrationen von *Klebsiella* spp. im Oberflächenwasser höher als vor dem Zufluss. Jedoch ist der prozentuelle Anteil an resistenten Bakterien im Abwasser vor und nach der Klärung ähnlich. Aber die Anzahl an *Klebsiella* spp. in Oberflächenwasser, dem keine Abwässer zugeführt werden, ist grundsätzlich sehr gering. [21]

Obwohl *Klebsiella* spp. ubiquitär vorkommen, gestaltet sich die Isolation aus Wasserproben schwierig. In einer deutschen Studie die sich 2001 mit der Isolation von *Klebsiella* spp. aus Oberflächenwasserproben beschäftigte, wurden bei 208 Stichproben nur in 110 *Klebsiella* spp. gefunden, das entspricht 52,9%. Insgesamt konnte man 123 *Klebsiella* spp. Stämme isolieren. Diese Zahlen wurden erst erreicht, nachdem man die untersuchte Probenmenge auf 250ml erhöhte. [22] 2016 wurde in Malaysia ebenfalls aus 50ml Ästuar Oberflächenwasserproben *Klebsiella* spp. isoliert. In 47% der Stichproben wurden *Klebsiella* spp. gefunden, insgesamt wurden 55 Isolate entdeckt. [23]

1.5 Klinische Relevanz von *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae kann den Gastrointestinaltrakt, die Haut und andere Körperregionen von hospitalisierten Patientinnen und Patienten besiedeln und somit als opportunistischer Erreger Infektionen auslösen. [6] *Klebsiella pneumoniae* steht als Auslöser für Harnwegsinfekte bei älteren Personen an zweiter Stelle.[3,24]

In einer Liste der World Health Organisation (WHO), in der antibiotikaresistente Bakterien nach Priorität zur Erforschung und Entwicklung von effektiven antibiotischen Therapien eingestuft werden, sind *Enterobacteriaceae*, wie *Klebsiella pneumoniae*, die Carbapenem-resistent oder resistent gegen Cephalosporine der dritten Generation sind, in der höchsten und somit einer kritischen Prioritätsstufe eingeteilt. [25]

1.5.1 Nosokomiale Infektionen

Eine nosokomiale Infektion bezeichnet eine Infektion die im Rahmen eines Krankenhausaufenthaltes erworben wird. Es kann sich hierbei sowohl um lokale als auch systemische Infektionen handeln und wird durch ein geschwächtes Immunsystem und längere Aufenthalte begünstigt. Ungefähr 5% der Patientinnen und Patienten, die sich stationär in einer Gesundheitseinrichtung befinden, sind davon betroffen. Die Übertragung kann als Querinfektion von Patientinnen und Patienten zu Patientinnen und Patienten als auch über Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern stattfinden, hinzukommt, dass in einem Krankenhaus durch den Einsatz von Antibiotika resistente Pathogene selektiert werden und am Leben bleiben können. Außerdem werden durch invasive Eingriffe leichtere Eintrittspforten für Pathogene geschaffen und bestimmte Medikamente, wie beispielsweise Glukokortikoide wirken immunsuppressiv und können somit das Infektionsrisiko steigern. [2] Auch Leitungswasser und Umgebungen, die damit in Berührung kommen, wie Waschbecken, Armaturen, Duschen oder Vasen stellen Reservoirs für Pathogene dar. [26]

Nosokomial erworbene *Klebsiella pneumoniae* Bakteriämien sind am häufigsten mit neoplastischen Erkrankungen assoziiert.[27] Grundsätzlich stellt *Klebsiella pneumoniae* den zweithäufigsten gramnegativen Erreger von Bakteriämien nach *Escherichia coli* dar. Aber im Gegensatz zu *Escherichia coli* Bakteriämien sind Männer häufiger betroffen, als Frauen. [6] Auch in neonatologischen Intensivstationen kann *Klebsiella pneumoniae* ein großes Risiko für Sepsis, Harnwegsinfekte, Pneumonien und Weichteilinfektionen darstellen, speziell für immungeschwächte Neugeborene. [28] Zwischen 2012 und 2013 wurde in Deutschland bei 13 Neugeborenen ein multiresistenter ESBL produzierender Stamm von *Klebsiella oxytoca* gefunden. Dieser Keim breitete sich auch auf ein älteres Kind einer anderen Station aus. Als Reservoir dieses Keimes wurde die Gummidichtung der Tür einer Haushaltswaschmaschine, mit der Mützen und

Waschlappen der Neugeborenen gewaschen wurden und zwei Waschbecken gefunden. Da man vorerst von einer Übertragung durch das Krankenhauspersonal ausging, wurde die Quelle erst nach über einem Jahr gefunden. In dieser Zeit konnte man insgesamt bei 27 Kindern eine Kolonisation mit diesem Keim nachweisen. Derartige persistierende Kolonisationen mit multiresistenten Bakterien im Gesundheitsektor stellen ein hohes Risiko speziell für immunschwache Patientinnen und Patienten dar. [29] In Österreich wurde im Winter von 2010 auf 2011 erstmalig bei fünf Patientinnen und Patienten ein *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) produzierender *Klebsiella oxytoca* Stamm gefunden, der sich innerhalb eines Vierbettzimmers einer Intensivstation horizontal verbreitete. Während Ausbrüche von KPC produzierenden *Klebsiella pneumoniae* bereits beschrieben wurden, war dies für *Klebsiella oxytoca* die Erstbeschreibung in Österreich. [30]

1.5.2 Community acquired *Klebsiella pneumoniae* Infektionen

„Community acquired“ bezeichnet eine außerhalb des Krankenhauses erworbene Infektion, oder auch eine ambulant erworbene. Die meisten ambulant erworbenen *Klebsiella pneumoniae* Bakteriämien sind mit chronischen Lebererkrankungen oder Diabetes Mellitus assoziiert. [27] Zwischen 1981 und 1985 wird erstmalig in Ostasien von pyogenen Leberabszessen, denen eine ambulant erworbene Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* zugrunde liegt, berichtet. Seitdem tritt *Klebsiella pneumoniae* in Ostasien als eine der führenden Ursachen für pyogene Leberabszesse hervor. In den USA wird zum ersten Mal 1999 davon berichtet und in zwei Krankenhäusern in New York wird *Klebsiella pneumoniae* zwischen 1993 und 2003 als die häufigste Ursache für pyogene Leberabszesse identifiziert. In Europa wird von vereinzelten Fällen in Spanien, Belgien, den Niederlanden, Schweden und Italien berichtet. In Frankreich werden 2011 sieben Fälle von invasiven Leberabszessen, die durch hypervirulente *Klebsiella pneumoniae*

verursacht werden, veröffentlicht und in Irland wird 2013 von drei Fällen berichtet. Bei allen drei irischen Fällen liegt Diabetes mellitus als Grunderkrankung vor. [31]

1.6 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es aus Flusswasserproben der Donau auf *Klebsiella* spp. zu isolieren und diese auf mögliche Antibiotikaresistenzen zu untersuchen und mögliche Veränderungen entlang des Flusses festzuhalten. Im ersten Schritt sollte eine suffiziente Anzahl von Isolaten aus den Proben gewonnen werden.

Im nächsten Teil der Arbeit wurden die gefundenen und bestätigten Stämme von *Klebsiella* spp. darauf untersucht, ob welche von klinischer Relevanz dabei sind. Außerdem sollen mit statistischen Methoden Vergleiche zwischen unterschiedlichen Probennahmestellen und Isolaten von vorangegangenen Studien durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Lösungen

- Physiologische Kochsalzlösung:

Eine 0,9% NaCl Lösung wurde hergestellt, indem 9g NaCl in 1000ml destilliertem Wasser gelöst, in eine sterile verschließbare Glasflasche gefüllt und bei 121°C autoklaviert wurden.

- 50% Glycerinlösung:

500ml Glycerin und 500ml destilliertes Wasser werden in eine sterile verschließbare Glasflasche gefüllt und bei 121° C autoklaviert.

2.2 Verwendete Nährmedien

- Orientation Agar:

BD™ CHROMagar™ Orientation Medium (Fertigplatten Becton Dickinson GmbH, Deutschland) ist ein nichtselektives Nährmedium, welches zur Identifizierung und Differenzierung verschiedener Bakterien über unterschiedliche Färbungen herangezogen werden kann. Die unterschiedlichen Färbungen entstehen durch verschiedenfarbige Verbindungen, die beim Abbau der enthaltenen Chromogene durch spezifische Enzyme entstehen.

- Coliformen Agar:

Chromocult® Coliformen-Agar Fertigplatten von Merck KGaA Deutschland, dienen dem Nachweis und der Auszählung von *Escherichia coli* und coliformen Bakterien aus Wasserproben.

- MacConkey Agar:

Ist ein Selektivnährmedium für *Enterobacteriaceae*. Aus einem fertigen Trockennährmedium (Trockenkultur MacConkey-Agar-Basis, Difco™, BD, Deutschland) wurden MacConkey Platten zu 15ml/Platte gegossen, hierzu wurde zuvor 50g/l der Fertigmischung in destilliertem Wasser eingerührt und bei 120°C autoklaviert.

- Blut Agar:

BBL™ Columbia + 5% Sheep Blood (Col-S BD, Deutschland) Fertigplatten

- LB - Agar:

Ein häufig verwendetes Vollnährmedium, engl. lysogeny broth, wird aus Trypton, Hefeextrakt, NaCl, destilliertes Wasser und Agar Agar hergestellt. Die Komponenten müssen vermischt und anschließend bei 120°C autoklaviert werden, damit die Suspension verwendet und die Platten gegossen werden können.

LB-Agar	
Komponenten	Mengen
Trypton	10g/l
Hefeextrakt	5g/l
NaCl	5g/l
Agar-Agar	17g/l

Tabelle 1: Komponenten und quantitative Mengen zur Herstellung von LB-Agar.

- Müller-Hinton Agar:

Müller - Hinton Agar 2 Trockennährmediumbasis (Merck KGaA, Deutschland) wurde mit 38g/l destilliertem Wasser bei 120°C autoklaviert und zu je 15ml/ Platte abgefüllt.

2.3 Probennahme

Im Juni und Juli 2019 wurden entlang der Donau jeweils am linken und am rechten Ufer, als auch in der Mitte des Flusses an verschiedenen Stellen Wasserproben entnommen. Hierbei wurden 500ml Wasser 30cm unter der Wasseroberfläche in eine sterile Plastikflasche (VWR International, Deutschland) gefüllt und gekühlt bei 4-7°C in ein nahegelegenes Labor zur Weiterverarbeitung gebracht.

Probennahmeorte	Labor	Datum
Kelheim, gauging station (1)	Regensburg	30.Jun.19
Oberloiben (6)	Wien	02.Jul.19
Downstream Vienna (8)	Wien	03.Jul.19
Bratislava (9)	Wien	04.Jul.19
DS Budapest -M0 (13)	Budapest	06.Jul.19
Dunaföldvar (14)	Budapest	06.Jul.19
Upstream Drava (15)	Belgrad	08.Jul.19
Downstream Drava (17)	Belgrad	08.Jul.19

Tabelle 2: Probennahmeorte und Labore in denen die ersten Arbeitsschritte durchgeführt wurden

Im nächsten Schritt wurden von dem nächstgelegenen Labor jeweils 0,5 ml des Wassers auf Orientation Agar und Coliforme-Agar Platten pipettiert und mit einem Drygalskispatel gleichmäßig auf der Agaroberfläche verteilt. Für jede

Probennahmestelle wurden jeweils 10 Orientation Agar Platten und 10 Coliformen Agar Platten so bearbeitet. Zusätzlich wurde eine Membranfiltration durchgeführt, hierbei wurde ein bestimmtes Probenvolumen des Donauwassers mit einer Vakuumpumpe durch eine sterile Membran filtriert, welche man dann auf Orientation Agar legte (Hierfür wurden eine EZ-Stream™ Vakuumpumpe, eine EZ-Fit™ Filtrationsleiste, und EZ-Pak® Membranen von Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland verwendet.). Diesen Prozess führte man zweimal mit 20ml und zweimal mit 50ml durch (Abbildung 1). Anschließend wurden alle Platten bei 37°C für 12-16h bebrütet. Danach wurden die Platten in Parafilm (VWR International, Deutschland) verpackt und verwahrt bei 4°C zur Weiterverarbeitung nach Graz transportiert.

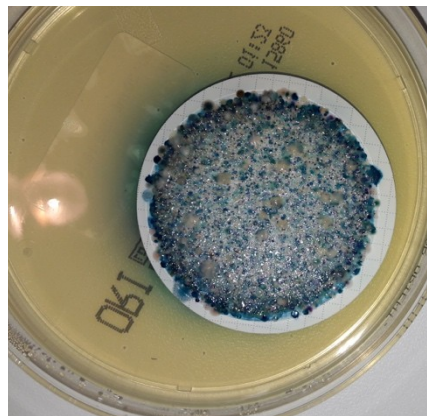


Abbildung 1: Membranfiltration einer Donauwasserprobe

2.4 Isolation von *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae zeigte auf Orientation Agar Platten eine dunkelblaue Färbung mit rundem, erhabenem und mukösem Erscheinungsbild, hingegen auf Coliformen Agar waren die Kolonien lavendelfarbig bis kräftig dunkelviolet,

fliederfarbig. Derartige Kolonien wurden von den Platten heruntergepickt, auf Mac Conkey Agar übertragen und für 24 Stunden bei 37° C bebrütet.

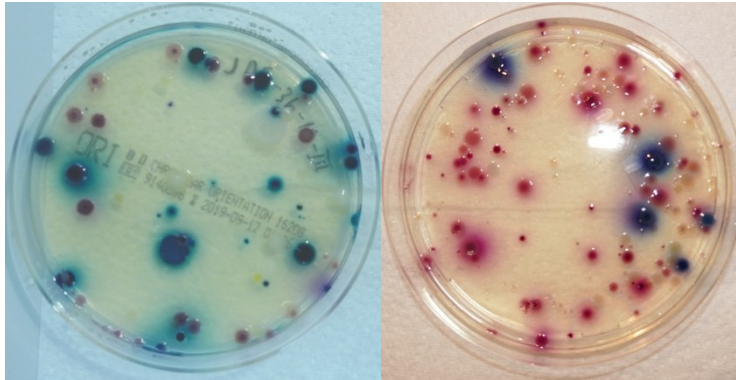


Abbildung 2: Mit Donauwasserproben bewachsener Orientation Agar links im Vergleich zu Coliformen Agar.

2.5 Charakterisierung mittels MALDI-TOF von VITEK® MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight)

Um *Klebsiella pneumoniae* als solche zu identifizieren wurde MALDI-TOF von VITEK® MS, Biomerieux Austria verwendet.

Zuerst übertrug man die potentiellen *Klebsiella pneumoniae* von Mac Conkey auf LB-Agar und bebrütete diese nochmals für 24h bei 37°C. Von diesen Platten wurden dann kleinste Mengen an Zellmaterial jeweils einer Kolonie auf einen Spot mit einem sterilen Zahnstocher auf vorgefertigte Träger, VITEK® MS Einweg-Targets, aufgetragen. Anschließend wurde auf das Zellmaterial 1 Mikroliter VITEK® MS CHCA Matrix pipettiert und bei Raumtemperatur getrocknet. Um die Bestimmung der potentiellen *Klebsiella spp.* zu erleichtern wurde bei LB-Agar eine dunklere Oberfläche unter die Platte gelegt, da so die im Vergleich zu anderen Bakterien weißlichere Färbung leichter zu erkennen war. Als Referenzwert wurde

auf drei dafür vorgesehenen Spots ein *Escherichia coli* – Stamm aufgetragen. Die Targets wertete die Bakteriologie der Medizinischen Universität Graz aus.

2.6 Konservierung und Aufbewahrung

Die bestätigten *Klebsiella* spp wurden mit 1 ml 50% Glycerinlösung in verschließbare sterile 2ml Plastikröhrchen (VWR International, Deutschland) gefüllt, mit einem Vortexmischer (Mini-Vortex-Schüttler, VWR International, Deutschland) vermischt und bei -70° C eingefroren.

2.7 EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)

Um die Antibiotikaresistenzen auszutesten, wurde ein Plattendiffusionstest, also ein Agardiffusionstest nach EUCAST beziehungsweise CLSI (The Clinical & Laboratory Standards Institute) durchgeführt.

Zunächst wurde mit einem sterilen Zahnstocher an der Oberfläche der eingefroren, bestätigten Proben Zellmaterial entnommen, auf LB-Agar ausgestrichen und bei 37°C für 24h bebrütet. Eine Suspension in einer Kunststoffeprouvette mit 3ml einer sterilen 0,9% NaCl Lösung und reiner Zellkultur wurde mit Hilfe eines DensiCHEK™ Plus auf eine optische Dichte von 0.5 McFarland ein. Mit einem sterilen Tupfer wurde diese Suspension auf Müller Hinton Agar mittels Rotator ausplattiert (Etest® Inoculator Retro C80, bioMerieux). Auf diese Platten stempelte man als nächstes Antibiotika Testplättchen, was innerhalb der nächsten 30 Minuten nach dem Auftragen geschehen musste, (BD BBL™ Sensi-Disc™ antimicrobial susceptibility test disc) und inkubierte dieses anschließend für 16 – 24h bei 37°C. Insgesamt wurden 20 verschiedene

Antibiotika getestet (Tabelle 2). Anhand der Hemmhofgröße wurde nach EUCAST, beziehungsweise CLSI bestimmt, ob eine Bakterienkultur auf ein Antibiotikum sensibel ist oder eine Resistenz besitzt.

Antibiotikum	Kürzel	Konz.	Antibiotikaklassen	Breakpoints in mm		Referenz
				S ≥.	R <	
Ampicilin	AM	10 µg	Beta-Laktam: Aminopenicillin	14	14	EUCAST
Amoxicilin/ Clavulansäure	AMC	20 µg/10 µg	Beta-Laktam: Aminopenicillin & Beta- Lactamase Inhibitor	19	19	EUCAST
Cefotaxim	CTX	5 µg	Beta-Laktam: Cephalosporin	20	17	EUCAST
Cefoxitin	FOX	30 µg	Beta-Laktam Cephalosporin	19	19	EUCAST
Cefuroxim	CXM	30 µg	Beta-Laktam: Cephalosporin	19	19	EUCAST
Cefalexin	CN	30 µg	Beta-Laktam: Cephalosporin	14	14	EUCAST
Gentamicin	GM	10 µg	Aminoglykosid	17	14	EUCAST
Moxifloxacin	MXF	5 µg	Chinolon	22	22	EUCAST
Colistin	CL	10 µg	Polymyxin	11	11	Boyen
Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	SXT	1,25 µg/ 23,75 µg	Antifolat	14	11	EUCAST
Ciprofloxacin	CIP	5 µg	Chinolon	25	22	EUCAST
Piperacillin/ Tazobactam	TZP	30 µg/6 µg	Beta-Laktam: Acylaminopenicillin & Beta-Lactamase Inhibitor	20	17	EUCAST
Meropenem	MEM	10 µg	Beta-Laktam: Carbapenem	22	16	EUCAST
Tetracyclin	TE	30 µg	Tetracyclin	16	4	CLSI
Amikacin	AN	30 µg	Aminoglykosid	18	15	EUCAST
Ceftazidim	CAZ	10 µg	Beta-Laktam: Cephalosporin	22	19	EUCAST
Imipenem	IPM	10 µg	Beta-Laktam: Carbapenem	22	17	EUCAST
Chloramphenicol	C	30 µg	Chloramphenicol	17	17	CLSI
Cefepim	FEP	30 µg	Beta-Laktam: Cephalosporin	27	24	EUCAST
Tigecyclin	TGC	15 µg	Tetracyclin	18	18	EUCAST

Tabelle 3: verwendete Antibiotika inkl. Konzentrationen, Hemmhofgrößen und nach welchen Kriterien man sich richtete. [32–34]

3 Resultate

3.1 Isolation und Charakterisierung

Zwischen 30. Juni und 8. Juli 2019 wurden an acht verschiedenen Probennahmeorten entlang der Donau, beginnend mit Kelheim (Deutschland), jeweils drei Oberflächenwasserproben entnommen, wie bereits in Abschnitt 2.3 beschrieben (Tabelle 2).

Man erhielt insgesamt 24 Oberflächenwasserproben, da jeweils acht Probennahmestellen am linken Ufer waren, acht am rechten Ufer und acht in der Mitte des Flusses. Diese wurden in weiterer Folge auf das Vorhandensein von *Klebsiella* spp. untersucht. In 21 von 24 Proben konnten *Klebsiella* spp. nachgewiesen werden, das entspricht einer Trefferquote von 87,5% der Proben. In zehn der Oberflächenwasserproben wurden zwei verschiedene *Klebsiella* Spezies gefunden, in sieben weiteren wurden drei verschiedene Spezies gefunden. Insgesamt konnten 299 *Klebsiella* spp. Isolate separiert werden. Davon war *Klebsiella pneumoniae* am häufigsten vertreten (n=169; 56,52%), gefolgt von *Klebsiella oxytoca* (n=104; 34,78%), an dritter Stelle war *Klebsiella aerogenes* (n=7; 2,34%) und zuletzt *Klebsiella variicola* (n=5; 1,67%) (Abb.3). Im Mittel wurden gerundet je Probe 12 Isolate gefunden.

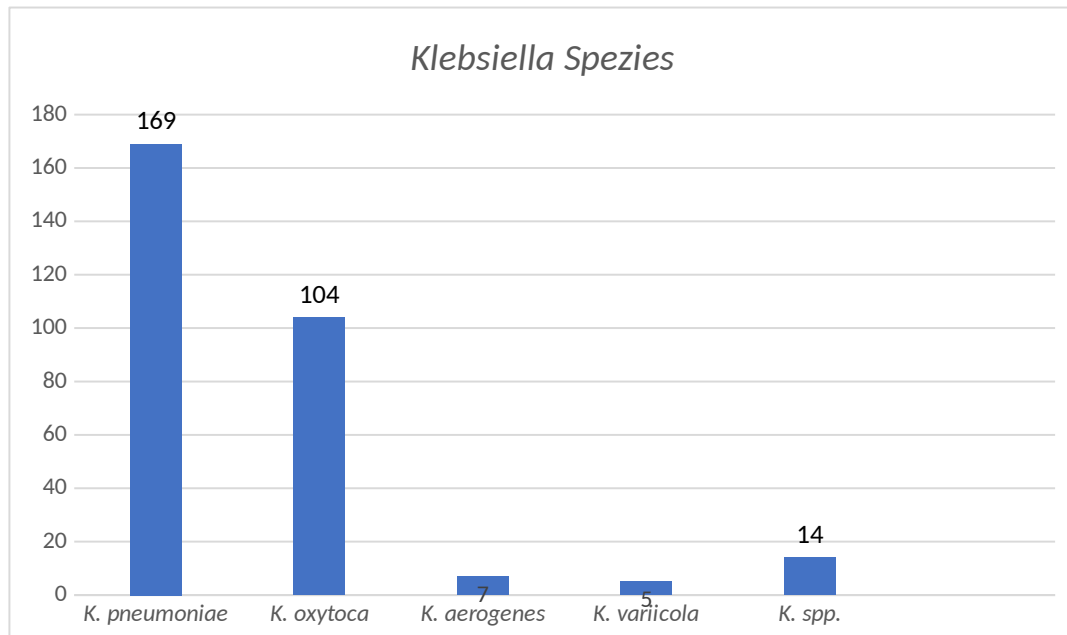


Abbildung 3: Anzahl der verschiedenen *Klebsiella* spp. Isolate; unter *Klebsiella* spp im Diagramm sind jene zusammengefasst, deren Zuordnung mittels MALDI-TOF nicht eindeutig möglich war (*Klebsiella pneumoniae/Klebsiella oxytoca/Klebsiella/variicola*)

Bei 189 der Isolate wurde ebenfalls untersucht von welchem Nährmedium sie stammen. Der Großteil wurde hierbei auf Orientation Agar gefunden (n=105; 55,56%) gefolgt von Coliformen-Agar (n=55; 29,1%). Die Membranfiltration wurde ebenfalls auf Orientation Agar durchgeführt, aber separat berechnet, da es sich um eine andere untersuchte Wasserprobenmenge und Behandlung der Probe (Filtration) handelte (n=29; 15,34%) (Abb. 4).

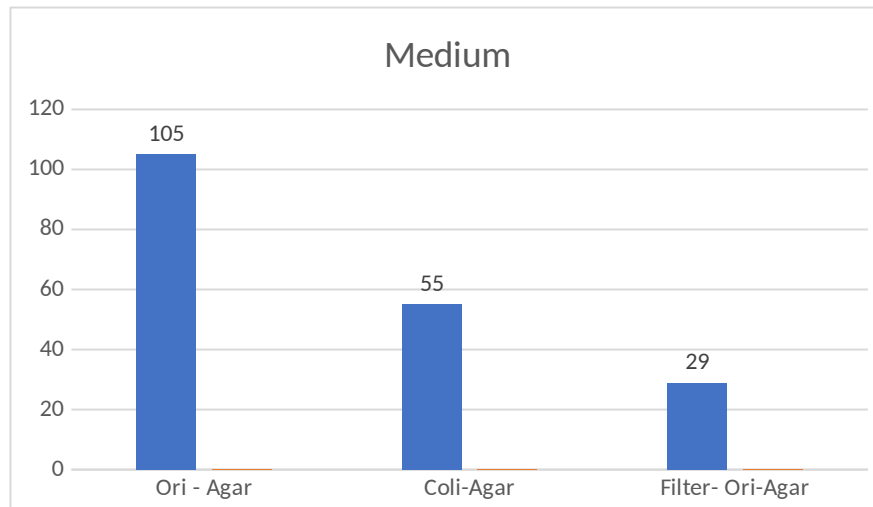


Abbildung 4: Anzahl der *Klebsiella* spp. und von welchem Nährmedium sie ursprünglich stammen. (von Orientation Agar, beziehungsweise Chromocult Coliformen Agar, beziehungsweise Membranfilter auf Orientation Agar)

Zur Charakterisierung von potentiellen *Klebsiella pneumoniae*, wurden Kolonien gewählt, die auf Orientation Agar dunkelblau waren, aber auch solche die ein metallisch blaues Aussehen hatten und teilweise einen pinken Hof, sofern sie mukös erschienen. Von Coliformen Agar, wurden jene Kolonien gewählt, die eine lavendel bis fliederartige Färbung aufwiesen und ebenfalls einen mukösen Charakter hatten. Diese Proben wurden auf MacConkey Agar übertragen, um sie mittels MALDI-TOF zu charakterisieren. (Abb. 5)

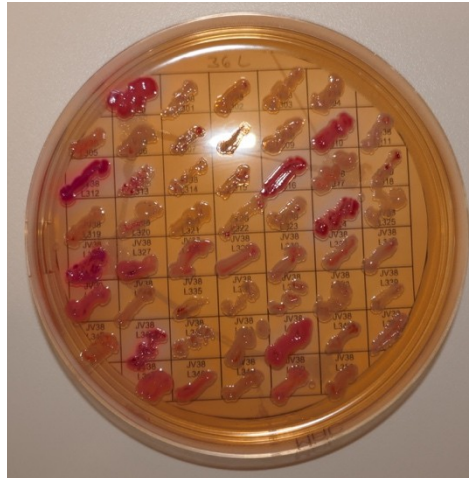


Abbildung 5: MacConkey Agar mit potentiellen *Klebsiella pneumoniae* Isolaten.

Da durch die übermäßige Schleimbildung auf MacConkey Agar einige Spots nicht identifizierbar waren, weil das Spektrum fehlerhaft war, wurden potentielle *Klebsiella pneumoniae* auf LB - Agar überimpft. Hier wurde die Anzahl der tatsächlich getesteten Isolate nochmals durch visuelle Kriterien (Schleimbildung, Farbe: blassrosa auf MacConkey; weißlich hellgelb auf LB) verringert. Insgesamt wurden so 3328 von 7263 MacConkey Agar Isolaten auf 3328 LB -Agar übertragen und getestet, woraufhin man im Mittel gerundet 12 *Klebsiella* spp. erhielt. Durchschnittlich konnten 3,89% von den Isolaten auf MacConkey Agar als *Klebsiella* spp. identifiziert werden und 9,20% der Isolate auf LB Agar (Tabelle 4).

Site *	pot. K** auf MCK	pot. K auf LB	bestätigte K	% von MCK	% von LB
1 R	61	61	2	3,28%	3,28%
1 M	51	51	1	1,96%	1,96%
1 L	52	52	0	0,00%	0,00%
6 R	258	108	7	2,71%	6,48%
6 M	297	101	10	3,37%	9,90%
6 L	295	97	9	3,05%	9,28%
8V R	402	127	32	7,96%	25,20%
8V M	351	101	17	4,84%	16,83%
8V L	312	102	13	4,17%	12,75%
9 R	312	130	21	6,73%	16,15%
9 M	297	130	13	4,38%	10,00%
9 L	281	191	14	4,98%	7,33%
13 R	293	118	24	8,19%	20,34%
13 M	340	156	21	6,18%	13,46%
13 L	313	157	17	5,43%	10,83%
14 R	480	181	36	7,50%	19,89%
14 M	337	198	7	2,08%	3,54%
14 L	378	184	14	3,70%	7,61%
15 R	353	182	4	1,13%	2,20%
15 M	324	143	6	1,85%	4,20%
15 L	274	172	0	0,00%	0,00%
17 R	315	156	30	9,52%	19,23%
17 M	468	219	0	0,00%	0,00%
17 L	419	211	1	0,24%	0,47%
Gesamt	7263	3328	299		
Mittelwert	302,63	138,67	12,46	3,89%	9,20%
Median	312,5	136,5	11,5	3,94%	9,59%
Standardabweichung	111,17	48,69	10,63	2,78%	7,44%

Tabelle 4: Die Tabelle zeigt die einzelnen Probennahmestellen, *Klebsiella* spp. pro Probennahmestelle, beziehungsweise Sites. Ob und wie viele *Klebsiella* spp. gefunden wurden, wie viele potentielle *Klebsiella* spp. auf MacConkey und LB-Agar übertragen wurden und den Anteil bestätigter *Klebsiella* spp. in Prozent in Bezug auf die ursprüngliche Probenanzahl von MacConkey oder LB wird veranschaulicht. (* Abkürzung der Site laut Tabelle 2; ** K= *Klebsiella* spp.)

3.2 Antibiotikaresistenzen

Bei 148 Isolaten wurden die Resistenzen nach EUCAST, CLSI beziehungsweise Boyen et al. [32–34] gegen 20 verschiedene Antibiotika ausgetestet (siehe Tabelle 3) dabei wurden Antibiotika die in der Klinik verwendet werden, als auch solche, die in der Viehzucht im Einsatz sind, untersucht.

Alle Isolate waren resistent gegen Ampicillin, was der natürlichen Resistenz des Wildtyps von *Klebsiella* spp. entspricht, bei 124 (83,87%) Isolaten waren keine weiteren Resistenzen feststellbar. Bei vierzehn *Klebsiella* spp. Stämmen konnten Resistenzen gegen Ampicillin & Clavulansäure festgestellt werden. Fünf Stämme wiesen Resistenzen gegen Cefoxitin auf, weitere drei gegen Cefuroxim, zwei gegen Cefalexin und einer gegen Ceftazidim. Sieben waren resistent gegen Moxifloxacin und drei gegen Ciprofloxacin. Bei fünf Isolaten bestand eine potentielle Resistenz gegen Colistin, die noch nicht endgültig abgeklärt wurde. Bei jeweils einem Isolat wurde eine Resistenz gegenüber Chloramphenicol beziehungsweise Trimethoprim & Sulfamethoxazol gefunden. Zwei der Isolate waren resistent gegen Piperacillin & Tazobactam. Es wurde bei keinem der Stämme eine Resistenz gegen Meropenem oder Imipenem gefunden, allerdings waren drei bei Meropenem im Intermediärbereich. Ebenso bestand bei keinem getesteten Isolat eine Resistenz für Gentamicin, wobei auch hier zwei im Intermediärbereich waren. Gegen Tetracyclin und Amikacin konnte ebenfalls keine Resistenz gefunden werden, jedoch war jeweils ein Isolat im Intermediärbereich. Für Cefepim und Tigecyclin wurden weder Resistenzen noch Isolate im Intermediärbereich gefunden. Außerdem waren siebenundzwanzig der Isolate bei Piperacillin & Tazobactam im Intermediärbereich (Tabelle 5).

Der Großteil der Isolate (n=88) gehörte der Spezies *Klebsiella pneumoniae* an, gefolgt von *Klebsiella oxytoca* (n=50). Der Anteil an Resistenzen war bei der Spezies *Klebsiella pneumoniae* höher als bei *Klebsiella oxytoca*, die Anzahl der

Isolate der weiteren Spezies war zu gering, als dass man darüber eine Aussage formulieren hätte können. (Tabelle 6).

AB	<i>Klebsiella</i> spp. total					
	R	R(%)	I	I(%)	S	S(%)
AM	148	100,00 %	0	0,0%	0	0,00%
AM C	14	9,46%	0	0,0%	134	90,54%
CTX	0	0,00%	1	0,68%	147	99,32%
FOX	5	3,38%	0	0,0%	143	96,62%
CXM	3	2,03%	0	0,0%	145	97,97%
CN	2	1,35%	0	0,0%	146	98,65%
GM	0	0,0%	2	1,35%	146	98,65%
MXF	7	4,73%	0	0,0%	141	95,27%
CL	5	3,38%	0	0,0%	143	96,62%
SXT	1	0,68%	0	0,0%	147	99,32%
CIP	3	2,03%	3	2,03%	142	95,95%
TZP	2	1,35%	27	18,24%	119	80,41%
ME M	0	0,0%	3	2,03%	145	97,97%
TE	0	0,0%	1	0,68%	147	99,32%
AN	0	0,0%	1	0,68%	147	99,32%
CAZ	1	0,68%	1	0,68%	146	98,65%
IPM	0	0,0%	0	0,0%	148	100,00 %
C	1	0,68%	0	0,0%	147	99,32%
FEP	0	0,0%	0	0,0%	148	100,00 %
TGC	0	0,0%	0	0,0%	148	100,00 %

Tabelle 5: Antibiotikaresistenzen: Resistente, sensible und Stämme im Intermediärbereich der getesteten Antibiotika inklusive ihrer prozentuellen Anteile.

AB	<i>K.pneumonia</i> e	<i>K.oxytoc</i> a	<i>K.variicol</i> a	<i>K.aerogene</i> s
AM	88	50	2	3
AMC	10	1	1	2
CTX	0	0	0	0
FOX	2	1	0	2
CXM	2	1	0	0
CN	0	1	0	1
GM	0	0	0	0
MXF	7	0	0	0
CL	3	0	0	0
SXT	1	0	0	0
CIP	2	0	1	0
TZP	2	0	0	0
MEM	0	0	0	0
TE	0	0	0	0
AN	0	0	0	0
CAZ	1	0	0	0
IPM	0	0	0	0
C	1	0	0	0
FEP	0	0	0	0
TGC	0	0	0	0

Tabelle 6: Anzahl der resistenten Stämme eingeteilt nach Spezies

Der Großteil der Isolate entspricht dem Wildtyp von *Klebsiella* spp. (n=124, 83,87%). Es wurde ein ESBL produzierender Stamm gefunden.

Fünf Isolate waren nach phänotypischer Beurteilung der Resistenz, Hyperproduzenten einer Betalactamase, wodurch sie gegen mehrere Beta-Laktam Antibiotika resistent waren.

Ein Isolat wurde als multiresistent klassifiziert, da dieses gegen drei oder mehr Antibiotikaklassen resistent war. Das Isolat gehörte zur Spezies *Klebsiella pneumoniae*. (Abbildung 6; Tabelle 7).

Es handelte sich dabei um ein multiresistentes Isolat der Probennahmestelle Downstream Budapest links mit der Nummer 15. Dieses Isolat besaß neben der natürlichen Resistenz, Resistenzen gegen Moxifloxacin und Ciprofloxacin, und war im Intermediärbereich von Gentamicin und Meropenem.

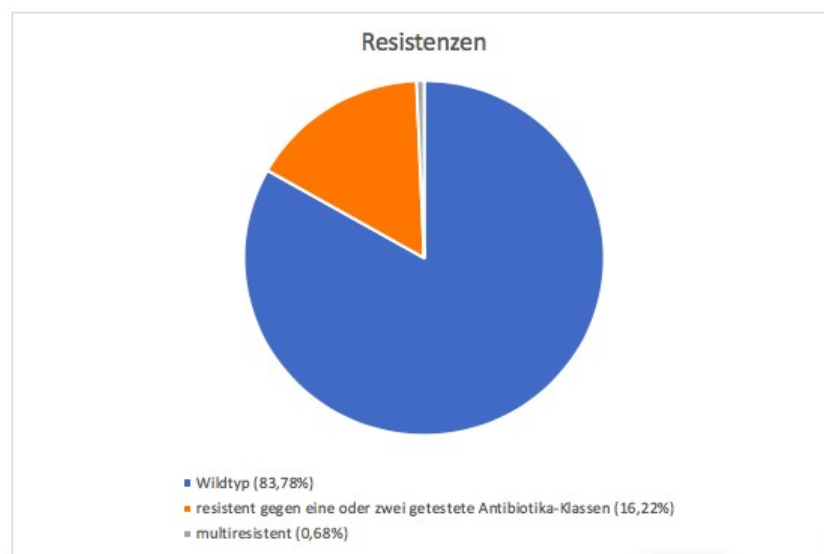


Abbildung 6: Anteile von Wildtyp *Klebsiella* spp.(blau) erworbene Resistenz gegen eine oder mehr der getesteten Antibiotikaklassen (orange) und multiresistente Isolate (grau).

Das Isolat der Probennahmestelle Bratislava mitte mit der Nummer 10 wies Resistenzen gegen Ampicillin, Amoxicillin & Clavulansäure, Cefuroxim, Tazobactam & Piperacillin, Amikacin und Ceftazidim auf. Aus der Verteilung der Resistenzen konnte man schließen, dass es sich um ein ESBL produzierendes Isolat handelte, da sowohl eine Resistenz gegen Cefuroxim, als auch eine Resistenz gegen Ceftazidim, ein Cephalosporin der dritten Generation, vorhanden war.

ISOLAT	AM	AMC	CTX	FOX	CXM	CN	GM	MXF	CL	SXT	CIP	TZP	MEM	TE	AN	CAZ	IPM	C	FEP	TGC	
6L1	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6L5	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6L6	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8R1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8R3	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8R5	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8R10	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8R23	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
9M13	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
9M10	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	I	R	S	S	S	S	S
9M5	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
9L14	R	R	S	R	R	S	S	R	S	S	I	I	I	S	S	I	S	S	S	S	S
13 R5	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
13 M9	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
13 M18	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
13 M3	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
13 L1	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
13 L4	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
13L5	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
13L11	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
13L15	R	S	S	S	S	S	I	R	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
14R5	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
14R23	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
14L1	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
14L2	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
15M3	R	R	I	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Tabelle 7: Isolatnummern und Einteilung nach Sites mit mehreren Resistenzen (R), Hemmhofgröße im Intermediärbereich (I) und Sensibilitäten im Überblick.

4 Diskussion

Wasser stellt für Bakterien ein wichtiges Milieu dar. In diesem Medium kommt es zur horizontalen Verbreitung und Durchmischung von antimikrobiellen Resistenzen zwischen Bakterien. [35] Die Untersuchungen im Rahmen des Joint Danube Survey 4 sollen dabei robuste Daten über Resistenzen in einzelnen Spezies finden, um damit Mechanismen der Resistenz- Ausbreitung besser verstehen zu können. Dabei ist in dieser Hinsicht ein besorgniserregender Aspekt die Verbreitung von ESBL und Carbapenemase Produzenten in der Umwelt. Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Isolate wurde nur eine ESBL produzierende Spezies gefunden. Jedoch wurde bereits in mehreren Arbeiten über das Vorkommen besagter Mikroorganismen in Gewässern Europas berichtet. [16,35,36]

Die Verteilung und das Vorhandensein von Resistenzen in der Umwelt stellt eine Bedrohung für die Gesundheit des Menschen dar und die Erforschung von Flüssen als potentielle Reservoirs für Resistenzen sollte vorangetrieben werden. [36,37]

Von den bis jetzt untersuchten Isolaten der Donau konnten nur vereinzelt multiresistentes Spezies und ein ESBL produzierendes Isolat isoliert werden, jedoch keine Carbapenemase Produzenten. Doch auch wenn in diesem Rahmen keine gefunden wurden, besteht nach wie vor ein gewisses Risiko der Verbreitung derartiger Pathogene über und im Donauwasser, das nicht vernachlässigt werden sollte. Hinzu kommt, dass die Prävalenz von „community acquired“ Infektionen mit mehrfach oder multiresistenten Keimen im Steigen begriffen ist. Das kann zwar auf den steigenden Einsatz von Antibiotika in der Medizin, als auch der Viehzucht zurückgeführt werden, aber die mögliche Verbreitung multiresistenter Keime über die Umwelt muss als potentieller Verbreitungsweg besser untersucht werden. Speziell in urbanen Gebieten mit großen Abwassermengen und schlechter

Abwasserbehandlung werden Flüsse einer großen Keimbelastung ausgesetzt.

[12,17,21,38]

Eine erhöhte Keimbelastung mit *Klebsiella* spp. ist bis jetzt anhand der untersuchten Proben noch nicht beurteilbar. Allerdings konnte man an Probennahmeorten, die nach größeren Städte waren, mehr *Klebsiella* spp. Isolate finden. (Tabelle 8)

Probennahmeort	Anzahl <i>Klebsiella</i> spp.
Kelheim, gauging station (1)	3
Oberloiben (6)	26
Downstream Vienna (8)	62
Bratislava (9)	48
DS Budapest -M0 (13)	62
Dunaföldvár (14)	57
Upstream Drava (15)	10
Downstream Drava (17)	31

Tabelle 8: Probennahme und Anzahl der *Klebsiella* spp Isolate.

4.1 Isolation

Die Isolation von *Klebsiella pneumoniae* und spp stellte sich aus Umweltproben als äußerst schwierig dar. Im Vergleich zu anderen Studien konnte man zwar bei 87,5% der Proben zumindest ein Isolat von *Klebsiella* spp isolieren, allerdings war

für eine statistisch gute Auswertung zufriedenstellende Anzahl an Isolaten pro Oberflächenwasserprobe, mit der untersuchten Wasserprobenmenge nicht möglich, da die Trefferquote mit durchschnittlich 12 Isolaten zu gering war. Das lag einerseits daran, dass auf Orientation Agar nicht nur *Klebsiella* spp, die laut BD beschriebene Charakteristik aufwiesen, sondern auch andere Bakterien, wie zum Beispiel *Aeromonas* spp. oder *Citrobacter* spp. Zusätzlich war zu beobachten, dass die Wildtyp-Isolate von *Klebsiella* spp. selbst auch stark vom beschriebenen Erscheinungsbild differieren. So war bei einigen *Klebsiella* spp. Kolonien ein pinker Hof erkennbar und bei anderen wiederum nicht. Allen gemein war das muköse Erscheinungsbild, das allerdings auch unterschiedlich stark ausgeprägt sein konnte. (Abb. 7)

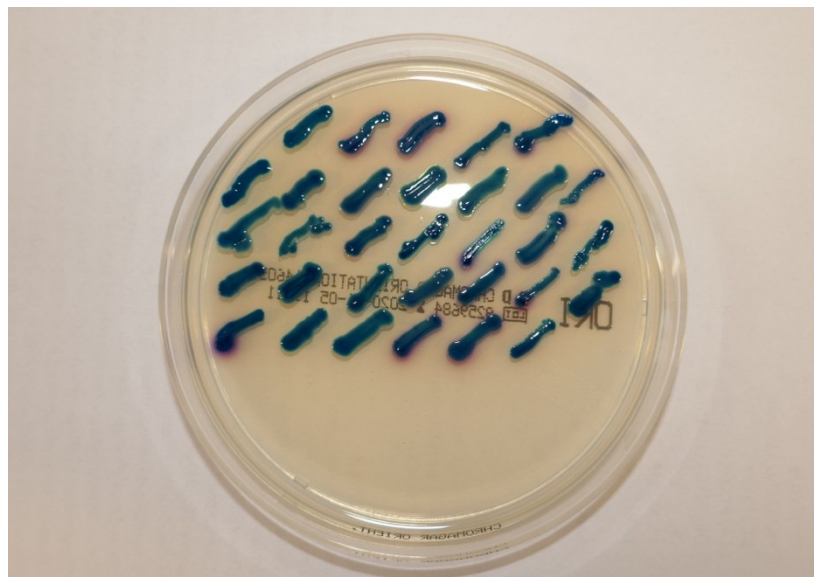


Abbildung 7: Orientation Agar Platte mit über MALDI-TOF bestätigten *Klebsiella* spp. Isolaten. Einige der Isolate weisen einen pinken Hof auf.

Die beschriebene Charakteristik für *Klebsiella* spp. von lachsfarben bis rot auf Chromocult Coliformen Agar von Merck Millipore, traf auf sehr viele der Kolonien die aus den Oberflächenwasserproben anwachsen zu, dies ließ sehr viel Raum für subjektive Interpretation zu. So wurden potentielle *Klebsiella* spp. Kolonien in dieser Arbeit als lavendel bis fliederfärbig beschrieben, da in den untersuchten

Proben sehr oft Violettfarbtöne, die im Zentrum der Kolonie dunkler wurden, beobachtet wurden (Abb. 8)

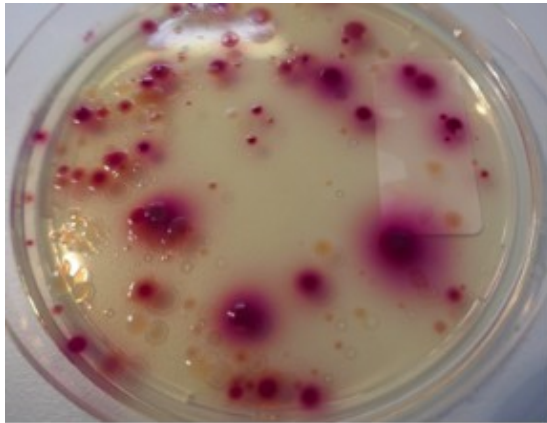


Abbildung 8: Chromocult Coliformen Agar Platte, auf der 0,5 Milliliter Donauwasser ausgestrichen wurden.

Neben den zuvor erwähnten Schwierigkeiten, haben auch sicher äußere Einflüsse, wie zum Beispiel das Wetter und die Temperatur während der Probenentnahme, Einfluss auf die vorhandenen Mikroorganismen gehabt. Nachdem es im Winter 2018 auf 2019 in den Alpen von Nordtirol und Salzburg einen der niederschlagsreichsten Winter seit der Messgeschichte gab, ist es auch möglich, dass das Wasser der Schneeschmelze einen Einfluss auf die Proben hatte. Der Höhepunkt der Schneeschmelze fand in diesem Jahr auch erst im Juli statt. [39] Um derartige saisonale Unterschiede interpretieren zu können, müssten Oberflächenwasserproben über einen längeren Zeitraum untersucht werden.

4.2 Vergleich mit Daten von 2016

Die Oberflächenwasserproben, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, waren Teil der Probensammlung, die dieses Jahr im Rahmen des Joint Danube Survey 4 gesammelt wurde. Es handelte sich dabei um Proben, die im oberen Drittel der Donau entnommen wurden. 2016 wurden an den gleichen Probennahmestellen bereits Proben entnommen, die unter anderem ebenfalls hinsichtlich *Enterobacteriaceae*, wie *Klebsiella pneumoniae* und deren Antibiotikaresistenzen untersucht wurden. [16]

2016 konnten an sämtlichen Probennahmestellen insgesamt 319 *Klebsiella* spp. isoliert werden (238 *Klebsiella pneumoniae* und 81 *Klebsiella oxytoca*). *Klebsiella* spp. war 2016 resistent gegen bis zu 12 von 20 getesteten Antibiotika und gegen fünf von sieben Antibiotikaklassen. [16] 2019 wurden 299 Isolate im oberen Drittel und den ersten beiden Probennahmeorten des mittleren Drittels der Donau gefunden (169 *Klebsiella pneumoniae*, 104 *Klebsiella oxytoca* und 26 andere *Klebsiella* spp.). Es konnten Resistenzen gegen vier Antibiotikaklassen nachgewiesen werden (fünf Isolate die nach ihrer Hemmhofgröße an der Grenze der Resistenz gegen Colistin waren [34], müssen noch mit Hilfe eines Epsilometertests als resistent bestätigt werden). Insgesamt bestanden bei den getesteten Isolaten 2019 Resistenzen gegenüber 12 der getesteten Antibiotika.

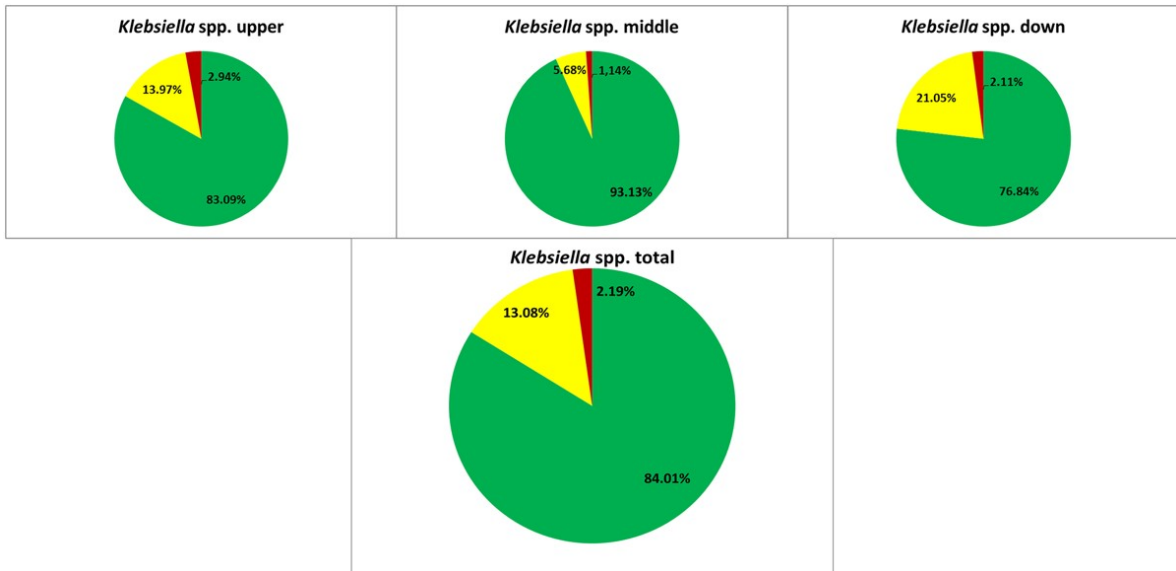


Abbildung 9: Verteilung der Isolate vom Wildtyp (grün), der Isolate mit Resistenzen gegen eine oder zwei Antibiotikaklassen (gelb) und multiresistenter Isolate (rot) [16]

2016 konnten bei 268 (84,01 %, Abbildung 9) der *Klebsiella spp.* keine erworbenen Resistenzen gefunden werden, dieser prozentuelle Anteil ist etwas niedriger als der von 2019 (88,51%). Bei 13,08% konnte eine Resistenz gegen eine oder zwei der getesteten Antibiotikaklassen festgestellt werden, 2019 lag der Anteil bei 10,14%. Multiresistent waren 2016 2,19% der Isolate, dieses Jahr waren es nur 1,35%. Die häufigste Resistenz 2016 neben Ampicillin lag bei Cefoxitin und Amoxicillin & Clavulansäure mit jeweils 8,82%. Resistenzen gegen Cefalexin, Tetracyclin und Nalidixinsäure (diese wurde 2016 ebenfalls ausgetestet) lagen ebenfalls über 5 %. Außerdem konnte man zwei ESBL produzierende Isolate identifizieren. [16] 2019 lag die am häufigsten gefundene Resistenz, neben jener für *Klebsiella spp.* natürlichen gegen Ampicillin-Resistenz, bei Amoxicillin & Clavulansäure mit 10,29%. Bei den Isolaten aus dem oberen Drittel der Donau, lag ansonsten nur die Resistenz gegen Moxifloxacin über fünf Prozent.

Resistenzen gegen Tetracyclin wurden 2019 gar nicht gefunden und gegen Cefalexin resistente Isolate lagen bei 1,35%. (Tabelle 9)

	JDS 3	%	JDS 4	%	JDS 4	%
	<i>K. spp. up</i>		<i>K. spp. up tested</i>		<i>K. spp. total tested</i>	
Total	136		136		148	
AM	136	100,00%	136	100,00%	148	100,00%
AMC	12	8,82%	14	10,29%	14	9,46%
CTX	2	1,47%	0	0,00%	0	0,00%
FOX	12	8,82%	5	3,68%	5	3,38%
CXM	2	1,47%	3	2,21%	3	2,03%
CN	7	5,15%	2	1,47%	2	1,35%
GM	2	1,47%	0	0,00%	0	0,00%
MXF	2	1,47%	7	5,15%	7	4,73%
CL	1	0,74%	5	3,68%	5	3,38%
SXT	4	2,94%	1	0,74%	1	0,68%
CIP	1	0,74%	3	2,21%	3	2,03%
TZP	1	0,74%	2	1,47%	2	1,35%
MEM	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
TE	9	6,62%	0	0,00%	0	0,00%
AN	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
CAZ	1	0,74%	1	0,74%	1	0,68%
IPM	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
C	6	4,41%	1	0,74%	1	0,68%
FEP	1	0,74%	0	0,00%	0	0,00%
TGC	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%

Tabelle 8: Vergleich der Ergebnisse der Resistenzen zwischen Joint Danube Survey 3 und 4. Ergebnisse von Isolaten im Intermediärbereich oder sensible Isolate wurden nicht berücksichtigt. In der letzten Spalte werden nochmals die Gesamtergebnisse, der in dieser Arbeit untersuchten Isolate aufgelistet.

Für die Isolate dieser Arbeit wurde der genetische Hintergrund für mögliche ESBL codierende Gene noch nicht analysiert, das wäre in weiterer Folge noch zu untersuchen. Außerdem sollte untersucht werden, ob in den gefundenen Isolaten

Carbapenemase Produzenten dabei sind. Carbapenemase wird zum Beispiel vom *bla_{NDM-1}* Gen, das das New Dehli metallo-Betalactamase (NDM-1) Enzym kodiert, produziert. Dieses Gen kann zwischen verschiedensten Typen von Bakterien transferiert werden. [40,41]

Bei genauerer Betrachtung der auf Resistenzen getesteten Isolate von 2019, konnte man fünf Hyperproduzenten einer Betalactamase identifizieren. Sie sollten noch genetisch untersucht werden, um die codierenden Gene zu bestimmen.

4.3 Konklusion

Von den *Enterobacteriaceae* ist *Escherichia coli* das am genauesten untersuchte, unter anderem da die Isolation statistisch zufriedenstellende Ergebnisse liefert. Die Erforschung von *Klebsiella* spp. sollte jedoch noch weiter vertieft werden, da die Spezies als Pathogen von medizinischer Bedeutung ist, ubiquitär vorkommt und wie *Escherichia coli* sowohl multiresistent sein kann, als auch ESBL kodierende Gene besitzen kann. Außerdem wird durch das Untersuchen mehrerer unterschiedlicher Bakterien ein breiteres Bild der Resistenzlage geschaffen. Da auch *Klebsiella* spp. die Carbapenemasen produzieren, bereits beschrieben wurden. Aber im Gegensatz zu *Escherichia coli* sind *Klebsiella* spp. seltener multiresistent. Wenn jedoch in der Umwelt gewonnene multiresistente Isolate gefunden werden, so weisen diese oft gleiche Eigenschaften wie klinische multiresistente Isolate auf. [12,16,20,36] Die komplizierte Isolation stellt allerdings ein Hindernis dar, das zuerst überwunden werden muss. Die Erforschung dieses Bakteriums und anderer *Enterobacteriaceae* wird im Joint Danube Survey 4 weitergeführt werden, um antimikrobielle Resistenz deren Stabilität und deren kodierenden Gene in Umwelt und Wasser besser zu verstehen.

5 Literaturverzeichnis

1. Hof H, Schlüter D. Medizinische Mikrobiologie. 7. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; (Duale Reihe).
2. Madigan MT, Brock TD. Brock Mikrobiologie. 13., aktualisierte Aufl.. München ua: Pearson; 2013. xxx+1648. (Biologie).
3. Sumathy J. A Study on The Enterobacteriaceae Pathogen Klebsiella Pneumoniae Isolated From Sewage And Drinking Water Environment. 20. November 2018;4:1–5.
4. van Hoek A, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts A, Aarts H. Acquired Antibiotic Resistance Genes: An Overview. Front Microbiol. 2011;2:203.
5. Reis AC, Kolvenbach BA, Nunes OC, Corvini PFX. Biodegradation of antibiotics: The new resistance determinants – part I. New Biotechnol. 25. Januar 2020;54:34–51.
6. AURES: Resistenzberichte Österreich [Internet]. AGES - Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit. [zitiert 21. Oktober 2019]. Verfügbar unter: <https://www.ages.at/themen/ages-schwerpunkte/antibiotika-resistenzen/resistenzberichte/>
7. Aktories K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: begründet von W. Forth, D. Henschler und W. Rummel. 12. Auflage. München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, Ann Arbor; 2017.
8. van Hoek A, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts H. Acquired Antibiotic Resistance Genes: An Overview. Frontiers Microbiology. 2011 Verfügbar

unter: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2011.00203/full>

9. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrob Agents Chemother*. November 2011;55(11):4943.
10. Lance R P. A review of tigecycline--the first glycylycycline. - PubMed - NCBI *Int J Antimicrob Agents*. 2008 Dec;32 Suppl 4:S215-22. doi: 10.1016/S0924-8579(09)70005-6.
11. Müller H, Sib E, Gajdiss M, Klanke U, Lenz-Plet F, Barabasch V, u. a. Dissemination of multi-resistant Gram-negative bacteria into German wastewater and surface waters. *FEMS Microbiology Ecology*. 6. April 2018 ; 10.1093/femsec/fiy057
12. Galler H, Feierl G, Petternel C, Reinthaler FF, Haas D, Grisold AJ, Luxner J, Zarfel G. KPC-2 and OXA-48 carbapenemase-harboring Enterobacteriaceae detected in an Austrian wastewater treatment plant. *Clin Microbiol Infect*. 1. Februar 2014;20(2):O132–4.
13. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. *Clin Microbiol Rev*. 1. Oktober 2005;18(4):657–86.
14. Bedenić B, Zujčić-Atalić V, Jajić I, Djuras-Cuculić B, Godič-Torkar K, Vraneš J, u. a. Clonal spread of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 beta-lactamase in Croatian University Hospital. *Journal of Chemotherapy*. August 1, 2015; 10.1179/1973947814Y.0000000191
15. Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas M-V, Wisell KT, Carmeli Y, u. a. Worldwide Diversity of *Klebsiella pneumoniae* That Produce β -Lactamase blaKPC-

2 *Gene. Emerg Infect Dis.* September 2010;16(9):1349.

16. Kittinger C, Lipp M, Folli B, Kirschner A, Baumert R, Galler H, u. a. Enterobacteriaceae Isolated from the River Danube: Antibiotic Resistances, with a Focus on the Presence of ESBL and Carbapenemases. *PLOS ONE*. 3. November 2016;11(11):e0165820.

17. Pärnänen KMM, Narciso-da-Rocha C, Kneis D, et al. Antibiotic resistance in European wastewater treatment plants mirrors the pattern of clinical antibiotic resistance prevalence. *Sci Adv.* 2019;5(3):eaau9124. Published 2019 Mar 27. doi:10.1126/sciadv.aau9124

18. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance Atlas of Infectious Diseases [Internet]. [zitiert 31. Oktober 2019]. Verfügbar unter: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Dataset=27&HealthTopic=4>

19. Podschun R, Ullmann U. Klebsiella spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clin Microbiol Rev.* Oktober 1998;11(4):589–603.

20. Poonia S, Singh TS, Tsering DC. Antibiotic susceptibility profile of bacteria isolated from natural sources of water from rural areas of East sikkim. *Indian J Community Med Off Publ Indian Assoc Prev Soc Med.* Juli 2014;39(3):156–60.

21. Verburg I, García-Cobos S, Hernández Leal L, Waar K, Friedrich AW, Schmitt H. Abundance and Antimicrobial Resistance of Three Bacterial Species along a Complete Wastewater Pathway. *Microorganisms.* September 2019;7(9):312.

22. Podschun R, Pietsch S, Höller C, Ullmann U. Incidence of Klebsiella Species in Surface Waters and Their Expression of Virulence Factors. *Appl Environ Microbiol.* Juli 2001;67(7):3325–7.
23. Barati A, Ghaderpour A, Chew LL, Bong CW, Thong KL, Chong VC, u. a. Isolation and Characterization of Aquatic-Borne Klebsiella pneumoniae from Tropical Estuaries in Malaysia. *Int J Environ Res Public Health.* 15. April 2016;13(4):426–426.
24. Caneiras C, Lito L, Melo-Cristino J, Duarte A. Community- and Hospital-Acquired Klebsiella pneumoniae Urinary Tract Infections in Portugal: Virulence and Antibiotic Resistance. *Microorganisms.* 16. Mai 2019;7(5):138.
25. WHO | Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics [Internet]. WHO. [zitiert 21. Oktober 2019]. Verfügbar unter: <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>
26. Kanamori H, Weber DJ, Rutala WA. Healthcare Outbreaks Associated With a Water Reservoir and Infection Prevention Strategies. *Clin Infect Dis.* 1. Juni 2016;62(11):1423–35.
27. Kang C-I, Kim S-H, Bang J-W, Kim H-B, Kim N-J, Kim E-C, u. a. Community-Acquired versus Nosocomial Klebsiella pneumoniae Bacteremia: Clinical Features, Treatment Outcomes, and Clinical Implication of Antimicrobial Resistance. *J Korean Med Sci.* Oktober 2006;21(5):816–22.
28. Gupta A. Hospital-acquired infections in the neonatal intensive care unit--Klebsiella pneumoniae. *Semin Perinatol.* Oktober 2002;26(5):340–5.

29. Schmithausen RM, Sib E, Exner M, Hack S, Rösing C, Ciorba P, u. a. The washing machine as a reservoir for transmission of extended spectrum beta-lactamase (CTX-M-15)-producing *Klebsiella oxytoca* ST201 in newborns. *Appl Environ Microbiol.* 27. September 2019;AEM.01435-19.
30. Hoenigl M, Valentin T, Zarfel G, Wuerstl B, Leitner E, Salzer HJF, u. a. Nosocomial Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *Klebsiella oxytoca* in Austria. *Antimicrob Agents Chemother.* April 2012;56(4):2158.
31. Moore R, O'Shea D, Geoghegan T, Mallon PWG, Sheehan G. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: an emerging infection in Ireland and Europe. *Infection.* 1. Juni 2013;41(3):681–6.
32. Clinical & Laboratory Standards Institute: CLSI Guidelines [Internet]. Clinical & Laboratory Standards Institute. [zitiert 31. Oktober 2019]. Verfügbar unter: <https://clsi.org/>
33. EUCAST: EUCAST [Internet]. [zitiert 7. Oktober 2019]. Verfügbar unter: <http://www.eucast.org/>
34. Boyen F, Vangroenweghe F, Butaye P, De Graef E, Castryck F, Heylen P, u. a. Disk prediffusion is a reliable method for testing colistin susceptibility in porcine *E. coli* strains. *Vet Microbiol.* 26. August 2010;144(3):359–62.
35. Taylor NGH, Verner-Jeffreys DW, Baker-Austin C. Aquatic systems: maintaining, mixing and mobilising antimicrobial resistance? *Trends Ecol Evol.* Juni 2011;26(6):278–84.
36. Zurfluh K, Hächler H, Nüesch-Inderbinnen M, Stephan R. Characteristics of

Extended-Spectrum β -Lactamase- and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae Isolates from Rivers and Lakes in Switzerland. *Appl Environ Microbiol.* 1. Mai 2013;79(9):3021–6.

37. Chen H, Shu W, Chang X, Chen J, Guo Y, Tan Y. The profile of antibiotics resistance and integrons of extended-spectrum beta-lactamase producing thermotolerant coliforms isolated from the Yangtze River basin in Chongqing. *Environ Pollut Barking Essex* 1987. Juli 2010;158(7):2459–64.

38. van Duin D, Paterson D. Multidrug Resistant Bacteria in the Community: Trends and Lessons Learned. *Infect Dis Clin North Am.* Juni 2016;30(2):377–90.

39. Bundesministerium Bildung, Wissenschaft, Forschung Österreich. Zentralanstalt für Meteorologie und Geodynamik; Winter 2018/2019 [Internet]. [zitiert 30. Oktober 2019]. Verfügbar unter: <https://www.zamg.ac.at>

40. Isozumi R, Yoshimatsu K, Yamashiro T, Hasebe F, Nguyen BM, Ngo TC, u. a. blaNDM-1–positive *Klebsiella pneumoniae* from Environment, Vietnam. *Emerg Infect Dis.* August 2012;18(8):1383–5.

41. Novovic K, Filipic B, Veljovic K, Begovic J, Mirkovic N, Jovcic B. Environmental waters and blaNDM-1 in Belgrade, Serbia: Endemicity questioned. *Sci Total Environ.* 1. April 2015;511:393–8.