

# **Langzeitpersistenz und Evolution von multi-resistenten *Enterobacterales* in abwasserführenden Systemen**

## **Dissertation**

Zur Erlangung des akademischen Grades Doctor rerum  
naturalium (Dr. rer. nat.)

Im Fachbereich Biologie

Eingereicht an der

Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

der Universität Hamburg

von

**Laura Carlsen**

geboren am 16. Februar 1996 in Hamburg

Hamburg 2023

1. Dissertationsgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Streit
2. Dissertationsgutachter: Prof. Dr. Johannes Knobloch  
(Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf)

Tag der Disputation: 02. Februar 2024

## **Eidesstattliche Erklärung (*declaration on oath*)**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

I hereby declare, on oath, that I have written the present dissertation by my own and have not used other than the acknowledged resources and aids.

Hamburg, den 22.09.2023

Laura Carlsen

## **Eigener Beitrag zu den zitierten Artikeln (*Contribution to the quoted articles*)**

**Carlsen L**, Büttner H, Christner M, Franke G, Indenbirken D, Knobling B, Lütgehetmann M, Knobloch J (2022) **High burden and diversity of carbapenemase-producing *Enterobacterales* observed in wastewater of a tertiary care hospital in Germany.** *Int J Hyg Environ Health.* 2022(242) 113968.

- Co-Planung des weiteren Experiments nach Vorliegen erster Daten
- Biofilm Assay
- DNA-Extraktion und *Library Preparation* zur Vorbereitung der Sequenzierung
- Verarbeitung der Sequenzierdaten mit Analyse von cgMLST, klassischem MLST und Verwandtschaftsanalyse
- Analyse der Resistenzen, Plasmid-Replikons und Punktmutationen
- Auswertung der Daten und Erstellen der Grafiken
- Schreiben der Erstversion des Manuskripts und weitere Überarbeitung

**Carlsen L**, Büttner H, Christner M, Cordts L, Franke G, Hoffmann A, Knobling B, Lütgehetmann M, Nakel J, Werner T, Knobloch J (2023) **Long time persistence and evolution of carbapenemase-producing *Enterobacterales* in the wastewater of a tertiary care hospital in Germany.** *J Infect Public Health.* 2023 Aug;16(8):1142-1148.

- Planung des Experiments
- Probenahme der Abwasserproben
- Selektion und Identifizierung der Isolate und DNA-Extraktion
- *Library Preparation* zur Vorbereitung der Sequenzierung
- Verarbeitung der Sequenzierdaten mit Analyse von cgMLST, klassischem MLST und Verwandtschaftsanalyse
- Analyse der Resistenzen, Plasmid-Replikons und Punktmutationen
- Auswertung der Daten und Erstellen der Grafiken
- Schreiben der Erstversion des Manuskripts und weitere Überarbeitung

**Carlsen L**, Wellbrock K, Grottker M, Knobloch J (2023) **Multi-resistant bacteria in the wastewater systems of Schleswig-Holstein.** Manuscript under preparation

- Co-Planung der weiteren Auswertung nach Vorliegen der Daten
- Auswertung der vorhandenen, sequenzierten Daten
- Verarbeitung der Sequenzierdaten mit Analyse von cgMLST, klassischem MLST und Verwandtschaftsanalyse
- Analyse der Resistenzen, Plasmid-Replikons und Punktmutationen
- Erstellen der Grafiken
- Schreiben der Erstversion des Manuskripts

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Abstract .....	III
1. Einleitung .....	1
1.1 Antibiotika-Resistenzen bei <i>Enterobacterales</i> und im globalen Kontext .....	2
1.2 Krankenhausabwasser.....	6
1.3 Abwasser von Kläranlagen.....	8
1.4 Ziele der Arbeit .....	10
2. High burden and diversity of carbapenemase-producing <i>Enterobacterales</i> observed in wastewater of a tertiary care hospital in Germany.....	13
3. Long time persistence and evolution of carbapenemase-producing <i>Enterobacterales</i> in the wastewater of a tertiary care hospital in Germany .....	21
4. Multi-resistant <i>E. coli</i> in the wastewater systems of Schleswig-Holstein.....	29
5. Diskussion.....	51
5.1 Die Persistenz klonaler CRE Linien und horizontaler Gentransfer im Krankenhausabwasser .....	51
5.2 Klonale resistente <i>E. coli</i> Linien in Zu- und Ablauf von Kläranlagenabwasser mit einem hohen Anteil Fluorchinolon-resistenter Stämme .....	63
Danksagung.....	70
Literaturverzeichnis .....	71

## Zusammenfassung

Multi-resistente *Enterobacterales* gelten als eine der wachsenden Herausforderungen des *One Health* Ansatzes. Insbesondere  $\beta$ -Laktamasen und Carbapenemasen verkomplizieren oft die Behandlung von Patienten mit bakteriellen Infektionen. Diese Enzyme gehören zu den Hydrolasen und sind in der Lage, verschiedene  $\beta$ -Laktam-Antibiotika zu hydrolysieren. Trotz der relevanten Bedeutung von Abwassersystemen für die mögliche Verbreitung von multi-resistenten Bakterien und Resistenzgenen ist wenig über evolutionäre Prozesse und mögliche persistente klonale Linien von multi-resistenten *Enterobacterales* in dieser Umgebung bekannt.

Im Verlauf der hier vorgestellten Arbeit wurden Abwasserproben des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) als Krankenhaus der Maximalversorgung im Abstand von 2,5 Jahren gesammelt. Es wurden insgesamt 299 Drittgenerations-Cephalosporin-resistente *Enterobacterales* mittels Gesamtgenomsequenzierung untersucht und die Persistenz, sowie das Resistom identifizierter klonaler Linien analysiert.

In fünf von sechs untersuchten Spezies konnten dabei trotz diverser klassischer Sequenztypen (ST) mittels *core genome Multilocus Sequence Typing* (cgMLST) klonale Linien identifiziert werden, die teilweise nicht mit Sequenztypen aus klinischen Isolaten in Verbindung gebracht werden konnten. Verschiedene Cluster aus Plasmid-Replikons und Resistenzgenen innerhalb einzelner klonaler Linien geben Hinweise auf einen im Abwassersystem stattfindenden horizontalen Gentransfer. Neben den  $\beta$ -Laktamase-Genen konnte außerdem ein in allen Spezies hoher Prozentsatz an Carbapenemase-positiven Isolaten mit teilweise multiplen Carbapenemase-Genen innerhalb einzelner Isolate festgestellt werden. Für einzelne Linien wie dem hier häufig identifizierten, in mehrere klonale Linien unterteilten *Escherichia coli* ST635 konnte eine langfristige Persistenz im Abwasser bestätigt werden. Einzelne Klone dieses ST wiesen zudem eine besonders große Varianz der Resistenzgene, sowie vermehrt multiple Carbapenemase-Gene auf, was eine gesteigerte Fähigkeit zur Plasmid-Aufnahme einzelner klonaler Linien dieses ST nahelegt.

Weiterhin wurden insgesamt 172 Drittgenerations-Cephalosporin-resistente *E. coli* aus Zu- und Ablauf mehrerer jeweils aufeinander folgender Tage von vier ländlich gelegenen Kläranlagen in Norddeutschland mittels Gesamtgenomsequenzierung analysiert. Es

konnte in allen Kläranlagen trotz der enormen Durchflussmenge an Abwasser eine Persistenz einzelner klonaler Linien über mehrere Tage hinweg beobachtet werden. Die Eintragungsquellen einzelner klonaler Linien konnten dabei nur in Ausnahmefällen nachvollzogen werden, ließen sich jedoch an einem Punkt stromaufwärts der Kläranlagen verorten, da innerhalb der Kläranlagen selbst keine Anreicherung einzelner klonaler Linien beobachtet werden konnte. Auch eine Elimination bestimmter klonaler Linien durch den Reinigungsprozess innerhalb der Kläranlagen konnte nicht nachgewiesen werden. Diverse Resistenzgene und mit phänotypischer Fluorchinolon-Resistenz assoziierte Punktmutationen konnten in mehreren Isolaten identifiziert werden, wobei die variierenden Resistenzgene und Plasmid-Replikons in eng verwandten Isolaten in mehreren Fällen auf einen horizontalen Gentransfer stromaufwärts der Kläranlagen schließen lassen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen das Vorkommen von persistenten multi-resistenten, klonalen Linien in Abwassersystemen in Norddeutschland und liefern Hinweise auf evolutionäre Prozesse, wie horizontalen Gentransfer, die innerhalb der abwasserführenden Systeme stattfinden.

## Abstract

Multi-resistant *Enterobacterales* are considered one of the growing challenges of the One Health approach. In particular,  $\beta$ -lactamases and carbapenemases often complicate the treatment of patients with bacterial infections. These enzymes belong to the hydrolases and are capable of hydrolyzing various  $\beta$ -lactam antibiotics. Despite the relevant importance of wastewater systems for the potential spread of multi-resistant bacteria and resistance genes, little is known about evolutionary processes and possible persistent clonal lineages of multi-resistant *Enterobacterales* in this environment.

During the work presented here, wastewater samples from the University Medical Center Hamburg-Eppendorf (UKE) as a maximum care hospital were collected at intervals of 2.5 years. A total of 299 3<sup>rd</sup> generation cephalosporin-resistant *Enterobacterales* were investigated by whole genome sequencing (WGS) and the persistence, as well as the resistome of identified clonal lineages were analyzed.

In five out of six species examined, clonal lineages were identified by core genome multilocus sequence typing (cgMLST) despite diverse classical sequence types (ST), some of which could not be associated with sequence types from clinical isolates. Various clusters of plasmid replicons and resistance genes within individual clonal lineages provide evidence for horizontal gene transfer occurring in the wastewater system. In addition to  $\beta$ -lactamase genes, a high percentage of carbapenemase-positive isolates, some with multiple carbapenemase genes within individual isolates, was also detected in all species. For individual lineages such as *Escherichia coli* ST635, which is frequently identified here and subdivided into several clonal lineages, long-term persistence in wastewater could be confirmed. Individual clones of this ST also exhibited a particularly high variance in resistance genes, as well as increased multiple carbapenemase genes, suggesting an increased ability for plasmid uptake of individual clonal lineages of this ST.

Furthermore, a total of 172 3<sup>rd</sup> generation cephalosporin-resistant *E. coli* from influent and effluent of several consecutive days from four rural wastewater treatment plants (WWTPs) in northern Germany were analyzed by WGS. Persistence of individual clonal lineages over several days was observed in all WWTPs despite the enormous flow of effluent. The sources of individual clonal lineages could only be traced in exceptional cases, but could be located at a point upstream of the WWTPs, as no enrichment of individual clonal

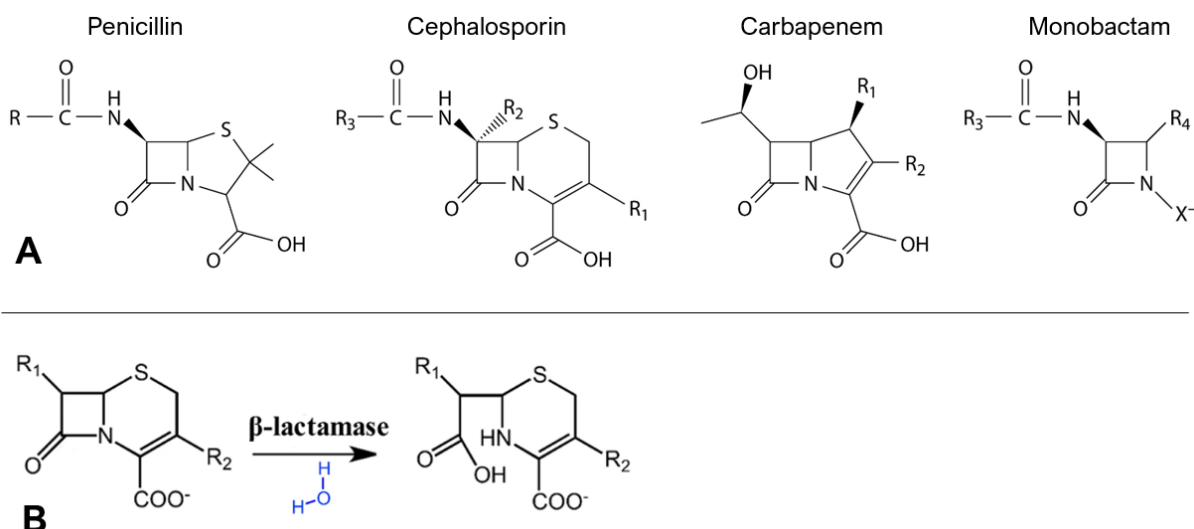


lineages could be observed within the WWTPs themselves. Also an elimination of certain clonal lineages by the cleaning process within the WWTPs could not be detected. Diverse resistance genes and point mutations associated with phenotypic fluoroquinolone resistance were identified in several isolates, with the varying resistance genes and plasmid replicons in closely related isolates suggesting horizontal gene transfer upstream of the WWTPs in several cases.

The results of this work confirm the presence of persistent multi-resistant clonal lineages in wastewater systems in northern Germany and provide evidence for evolutionary processes, such as horizontal gene transfer, occurring within wastewater systems.

# 1. Einleitung

Antibiotika-resistente Bakterien gewinnen in der Human- und Veterinärmedizin weltweit zunehmend an Bedeutung. *Enterobacterales* wie *Escherichia coli* oder *Klebsiella pneumoniae* gehören zu den häufigsten Bakterien im menschlichen Gastrointestinaltrakt. Durch multi-resistente *Enterobacterales*-Stämme verursachte Infektionen des Gastrointestinaltraktes stellen dabei ein erhebliches gesundheitliches Risiko dar und führen oftmals zu einer Sepsis oder zum Tod des Patienten (Ordonez *et al.*, 2021). Die weltweit zurzeit am meisten genutzte Antibiotikagruppe bei bakteriellen Infektionskrankheiten sind  $\beta$ -Laktam-Antibiotika wie Penicilline und Cephalosporine, welche den Aufbau der bakteriellen Zellwand blockieren und mit vergleichsweise wenig Nebenwirkungen beim Patienten verbunden sind. Namensgebend für diese Antibiotika ist dabei der  $\beta$ -Laktam-Ring, den alle  $\beta$ -Laktam-Gruppen gemeinsam haben (Bush & Bradford, 2016) (Abb. 1A). Cephalosporine werden anhand ihres Entdeckungszeitraumes sowie mikrobiologischer und struktureller Charakteristika aktuell in fünf Generationen eingeteilt (Fernandez *et al.*, 2021), von denen besonders die Cephalosporine ab der dritten Generation eine höhere Wirksamkeit gegenüber gramnegativen Bakterien zeigen (W. Liu *et al.*, 2014).



**Abb. 1: A)** Strukturformeln der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika mit dem namensgebenden  $\beta$ -Laktam-Ring in der Mitte (Abbildung nach Bush & Bradford, 2020). **B)** Hydrolyse des  $\beta$ -Laktam-Rings durch eine  $\beta$ -Laktamase am Beispiel eines Cephalosporins (Abbildung modifiziert nach He *et al.*, 2020).

Neben  $\beta$ -Laktamen werden bei Infektionen mit *Enterobacterales* auch Fluorchinolone wie Ciprofloxacin verabreicht, welche die bakterielle DNA-Synthese inhibieren (Redgrave *et al.*, 2014). Eine Ausnahme innerhalb der  $\beta$ -Laktame bilden zudem Carbapeneme, welche mit ihrem breiten Wirkungsspektrum trotz einer bakteriellen Resistenz gegen Penicilline und Drittgenerations-Cephalosporine zur Therapie genutzt werden können (Halat & Moubareck, 2020). Aufgrund der vergleichsweise starken Nebenwirkungen von Carbapenemen werden sie in der Regel jedoch nur als letzte Instanz bei einem besonders schweren Krankheitsverlauf oder einer vorliegenden Resistenz der Bakterien gegen andere Antibiotika verabreicht (Armstrong *et al.*, 2021).

## **1.1 Antibiotika-Resistenzen bei *Enterobacterales* und im globalen Kontext**

Mit dem häufigen Gebrauch von  $\beta$ -Laktam-Antibiotika steigt auch der Anteil an  $\beta$ -Laktam-Resistenzen bei gramnegativen Bakterien stetig an (Bush & Bradford, 2016). Eine solche Resistenz kann durch verschiedene Mechanismen wie veränderte Membranporine oder eine Überexprimierung von Effluxpumpen zum aktiven Ausscheiden der Antibiotika aus der Zelle vermittelt werden. Die häufigste Ursache sind jedoch  $\beta$ -Laktamasen, welche den  $\beta$ -Laktam-Ring der Antibiotika hydrolysieren (De Angelis *et al.*, 2020) (Abb. 1B). Neben der Resistenz gegenüber Penicillinen und Cephalosporinen der ersten Generationen besitzen *Extended Spektrum Beta-Laktamasen* (ESBL) hierbei eine erweiterte Resistenz gegenüber Cephalosporinen ab der dritten Generation (Bush, 2018). Insgesamt sind heute knapp 2.800 verschiedene  $\beta$ -Laktamasen bekannt (Bush, 2018), von denen die Enzyme der CTX-M-Familie weltweit am häufigsten vorkommen (Castanheira *et al.*, 2021).

Alle  $\beta$ -Laktamasen lassen sich ihrer Struktur nach in verschiedene Gruppen einteilen, wobei die beiden Einteilungen nach Ambler und Bush am geläufigsten sind (Bush, 2018). Bei der Einteilung nach Ambler werden je nach Aminosäuresequenz die Klassen A, B, C und D unterschieden. Unter ihnen gehören die Klassen A, C und D zu den Serin- $\beta$ -Laktamasen, von denen die Klasse A die größte Gruppe mit den am weitesten gestreuten Aktivitätsspektren bildet. Zu ihnen gehören unter anderem CTX-M, SHV und KPC. Die Enzyme der Klasse C schließen hauptsächlich chromosomale  $\beta$ -Laktamasen wie AmpC oder auch CMY ein, während Klasse D die Oxacillinasen umfasst (Bush, 2018), die sich in

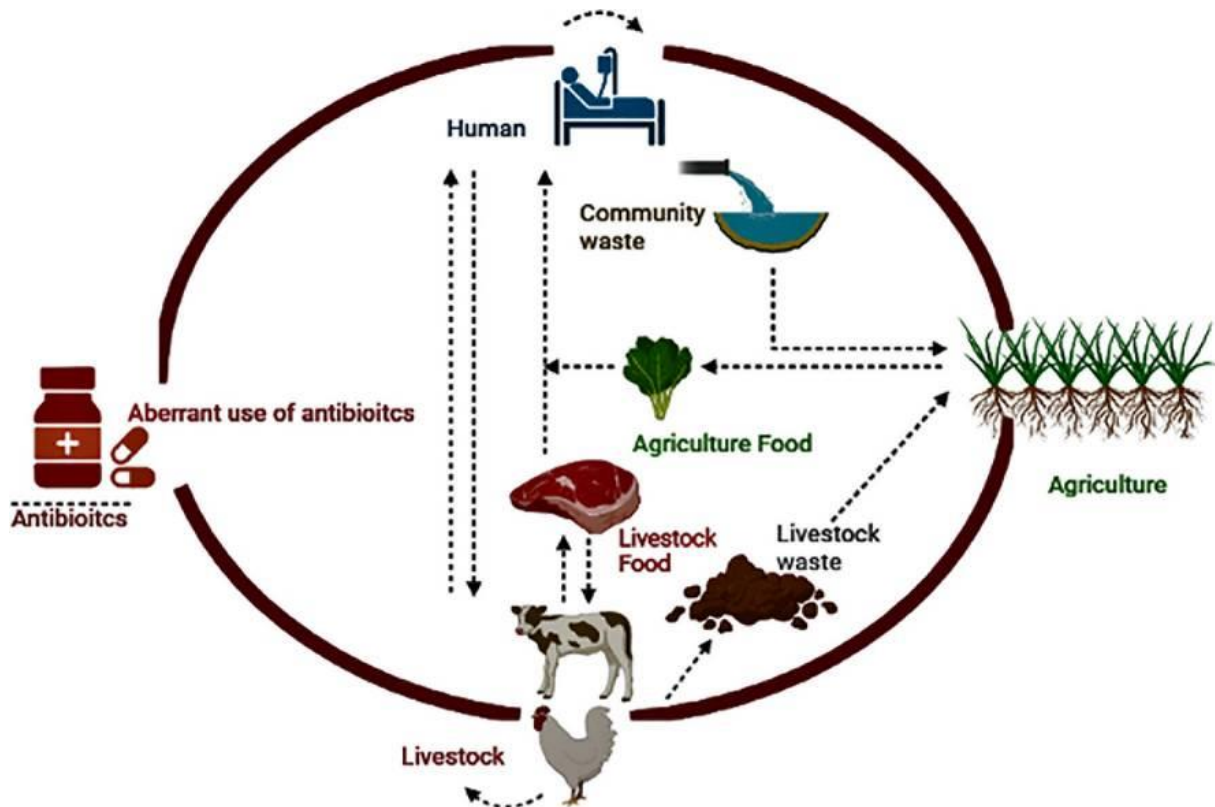
OXA- $\beta$ -Laktamasen (Evans & Amyes, 2014; Logan & Weinstein, 2017) und Carbapenemasen vom OXA-48-Typ (Tacão *et al.*, 2018) unterteilen. Häufige Vertreter der Metallo- $\beta$ -Laktamasen aus Klasse B sind VIM und NDM. Die Eingruppierung nach Bush umfasst aktuell 17 Gruppen, welche sich zusätzlich am jeweiligen Substratspektrum der  $\beta$ -Laktamasen orientieren (Bush, 2018). Neben den regulären  $\beta$ -Laktamasen wurden zudem kürzlich promiske Enzyme aus der Gruppe der Hydrolasen identifiziert, die eine den Metallo- $\beta$ -Laktamasen ähnliche Proteinstruktur aufweisen und denen ebenfalls eine  $\beta$ -Laktamase-Aktivität nachgewiesen werden konnte (Perez-Garcia *et al.*, 2021).

Neben der Resistenz gegenüber Penicillinen und Drittgenerations-Cephalosporinen werden auch Resistenzen gegenüber Fluorchinolonen und Carbapenemen zunehmend relevanter (Nordmann & Poirel, 2019; Redgrave *et al.*, 2014). Eine Resistenz gegen Fluorchinolone kann dabei nicht nur über Resistenzgene, sondern ebenfalls über chromosomale Punktmutationen vermittelt werden. Solche Punktmutationen führen zu Veränderungen in den bakteriellen Ziel-Enzymen der Fluorchinolone und sind inzwischen als Ursache für Resistenzen bei *E. coli* und anderen Arten bekannt (Afsharikhah *et al.*, 2023). Für eine Resistenz gegen Carbapeneme sind in der Regel Carbapenemasen notwendig, da AmpC- $\beta$ -Laktamasen und ESBL Carbapeneme im Gegensatz zu den anderen  $\beta$ -Laktam-Gruppen nicht hydrolysieren (Halat & Moubareck, 2020). Carbapenemasen können je nach ihrer molekularen Struktur zur Klasse A, B oder D des Ambler-Klassifikationssystems für  $\beta$ -Laktamasen gehören, wobei KPC, OXA-48, NDM, VIM und IMP die wichtigsten und klinisch relevantesten Carbapenemasen in *Enterobacterales* sind (Bonnin *et al.*, 2021; Cantón *et al.*, 2020; Kopotsa *et al.*, 2019; Lasko & Nicolau, 2020; Tan *et al.*, 2021). Die mit Abstand häufigste Carbapenemase in klinischen Isolaten in Deutschland ist OXA-48, gefolgt von NDM-1 (*RKI Epidemiologisches Bulletin 27/23 - NRZ-Bericht 2022: Gramnegative Krankenhauserreger*).

Je nach Anzahl ihrer Resistenzen gegen einzelne Antibiotika oder Antibiotikagruppen können Bakterien spezifischer unterteilt werden. International wird zwischen *multidrug-resistant*, *extensively drug-resistant* und *pandrug-resistant* unterschieden (Magiorakos *et al.*, 2012). Bei einer Resistenz gegen mindestens je ein Antibiotikum aus mindestens drei Antibiotikagruppen gilt ein Bakterium als *multidrug-resistant*. Als *extensively drug-resistant* werden Bakterien bei einer Resistenz gegen mindestens je ein Antibiotikum aus allen bis auf maximal zwei Antibiotikagruppen bezeichnet. Als *pandrug-resistant* gelten Bakterien ausschließlich bei einer Resistenz gegen alle Test-Antibiotika aus allen Gruppen

(Magiorakos *et al.*, 2012). Innerhalb der *Enterobacterales* existiert zudem die an der Resistenz gegen spezifische Antibiotikagruppen ausgerichtete Unterteilung in Drittgenerations-Cephalosporin-resistente *Enterobacterales* (3GCRE) und Carbapenem-resistente *Enterobacterales* (CRE) sowie Carbapenemase-produzierende *Enterobacterales* (CPE) (Iovleva & Doi, 2017; Shnaiderman-Torban *et al.*, 2021). In Deutschland werden multi-resistente gramnegative Bakterien zudem abhängig von dem Grad ihrer Resistenz gegen die vier Antibiotikagruppen Penicilline, Cephalosporine ab der dritten Generation, Fluorchinolone und Carbapeneme benannt. Bei einer vorliegenden Resistenz gegen drei der vier Antibiotikagruppen wird von 3MRGN (dreifach multi-resistente Gramnegative) gesprochen, wobei meistens noch eine Sensitivität gegenüber Carbapenemen vorliegt. Besteht eine Resistenz gegen alle vier Antibiotikagruppen, wird der Begriff 4MRGN (vierfach multi-resistente Gramnegative) genutzt (J. Müller *et al.*, 2015).

Insbesondere CRE und CPE stellen ein Risiko im Gesundheitswesen dar, da durch diese Bakterien verursachte Infektionen nur wenige Behandlungsmöglichkeiten offenlassen. Auch sind Reserve-Antibiotika, welche in solchen Fällen als letztes Mittel zur Behandlung bleiben, häufig mit stärkeren Nebenwirkungen verbunden (Hoffman *et al.*, 2021; Manquat *et al.*, 2020). Aufgrund der hohen Wahrscheinlichkeit des Therapieversagens bei kalkulierter Antibiotikatherapie liegt die Sterblichkeit von Patienten mit durch CRE verursachten Infektionen in Deutschland bei bis zu 72 % (Borer *et al.*, 2009; Hirsch & Tam, 2010). Die bedeutsamsten CRE im deutschen Gesundheitswesen sind *K. pneumoniae*, *E. coli* und *Enterobacter cloacae* (Mischnik *et al.*, 2015; RKI Epidemiologisches Bulletin 27/23 - NRZ-Bericht 2022: Gramnegative Krankenhauserreger), wobei insbesondere Carbapenem-resistente *K. pneumoniae* als die in Europa am schnellsten wachsende Bedrohung im Bereich der Antibiotika-Resistenzen hervorgehoben wurden (David *et al.*, 2019). Carbapenemase-Gene befinden sich in der Regel auf Plasmiden, wobei auch mehrere Resistenzgene auf demselben Plasmid liegen können. Da Plasmide durch horizontalen Gentransfer auch spezieübergreifend übertragen werden (Kopotsa *et al.*, 2019) und ökologische Nischen einzelner Linien verlassen können, entsteht so ein Risiko zur Ausbreitung von Antibiotika-Resistenzen.



**Abb. 2:** Der *One Health* Kreislauf, in dem Menschen, Tiere und Umwelt in einen unmittelbaren Zusammenhang gestellt sind. Antibiotika-Resistenzen und Antibiotika-resistente Bakterien können sich über die eingezeichneten Pfade verbreiten (Abbildung nach Aslam *et al.*, 2021).

Um diese Problematik möglichst effizient zu beschreiben, wurde ein globaler, interdisziplinärer *One Health* Ansatz entwickelt, welcher die Gesundheit von Mensch, Tier und Umwelt als untrennbar miteinander verbunden betrachtet (Aslam *et al.*, 2021) (Abb. 2). Über die Nahrungsmittel aus Landwirtschaft und Nutztierhaltung gelangt die mikrobielle Flora der Tiere zum Menschen und in die Umwelt, wobei besonders die steigende Menge an in der Nutztierhaltung verabreichten Antibiotika ein Risiko für die Verbreitung von Antibiotika-Resistenzen birgt (Aslam *et al.*, 2021). Auch durch Haustiere, sowie Wildtiere, die in Ballungsgebieten immer wieder in Kontakt mit Menschen kommen, können Übertragungswege für Mikroorganismen entstehen (Aslam *et al.*, 2021; Laborda *et al.*, 2022; Overgaauw *et al.*, 2020). Gleichzeitig steigt durch die Globalisierung auch länderübergreifend die zwischenmenschliche Übertragung von Bakterien und Antibiotika-Resistenzen stetig an (Aslam *et al.*, 2021). Neben der Antibiotika-Nutzung in der Landwirtschaft nehmen hierbei vor allem auch die in der Humanmedizin genutzten Antibiotika für den Menschen eine relevante Rolle ein, da sie die Resistenzbildung besonders bei humanpathogenen Bakterien fördern (Llor & Bjerrum, 2014). Innerhalb Deutschlands wurden zu diesem Zweck diverse Überwachungsprojekte wie beispielsweise

die vom Robert-Koch-Institut genutzte Antibiotika-Verbrauchs-Surveillance (AVS) und Antibiotika-Resistenz-Surveillance (ARS) ins Leben gerufen (A. Hoffmann, 2023), um die Vergabe von Antibiotika, sowie die Bildung und Verbreitung von Antibiotika-Resistenzen überwachen und in einen Zusammenhang stellen zu können. Die Bakterien und Resistenzgene aus dem Umfeld des Menschen gelangen dabei wiederum zu Tieren und in die Umwelt, indem sie über direkten Kontakt weitergegeben oder über Abwasserwege in angrenzende Gewässer und die umgebende Umwelt transportiert werden (Aslam *et al.*, 2021).

## 1.2 Krankenhausabwasser

Antibiotika-resistente Bakterien und Resistenzgene kommen weltweit in den verschiedensten Gewässerarten wie Krankenhaus- und Gemeindeabwässern, Trinkwasser und natürlichen Gewässern vor (Mills & Lee, 2019). Vor kurzem wurde eine intensive Analyse der Unterschiede verschiedener Gewässerarten in Deutschland durch Kehl *et al.* durchgeführt, bei der ein erhöhtes Vorkommen an CRE im Krankenhausabwasser verglichen mit anderen Gewässerarten nachgewiesen werden konnte (Kehl *et al.*, 2022). In der Studie wurden 490 Bakterienisolate an zehn verschiedenen Probenahmestellen entlang eines Abwasserpfades genommen, beginnend in den Abflüssen von Patientenbadezimmern eines Krankenhauses über das Krankenhausabwasser bis hin zum Ablauf der kommunalen Kläranlage. Repräsentative Sequenztypen (ST) einzelner Spezies wurden sequenziert und weiter analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass von neun nachgewiesenen ST bei *K. pneumoniae* sechs im Krankenhausabwasser und nur drei an anderen Probenahmestellen gefunden wurden (Kehl *et al.*, 2022).

Kürzlich konnten zudem krankenhausspezifische, hoch resistente Klone nachgewiesen werden, die sowohl im Krankenhaus- als auch im Kläranlagenabwasser des selben Abwasserstrangs gefunden werden konnten, jedoch nicht in Kläranlagen ohne räumliche Verbindung zum Krankenhausabwasser (M. Hoffmann *et al.*, 2023). Dabei lässt sich die vermehrte Belastung des Krankenhausabwassers mit Antibiotika-resistenten Bakterien trotz des Zusammenhangs zwischen dem gehäuften Auftreten von Carbapenemasen und dem verstärkten Einsatz von Carbapenemen nicht allein auf den Eintrag durch klinische Stämme zurückführen. Vielmehr ist eine deutliche Differenz zwischen dem geringen Anteil

Carbapenem-resistenter Stämme in klinischen Isolaten und dem vergleichsweise hohen Anteil im Krankenhausabwasser erkennbar (Perry *et al.*, 2021).

Gestützt werden diese Erkenntnisse auch durch mehrere Studien anderer europäischer Länder, in welchen gezeigt werden konnte, dass die Belastung durch multi-resistente *Enterobacterales*, insbesondere CPE, in Krankenhäusern und in Krankenhausabwässern höher ist als in gemischten kommunalen oder auch landwirtschaftlichen und industriellen Abwässern (Cahill *et al.*, 2019; Hocquet *et al.*, 2016; Huijbers *et al.*, 2020; Sib *et al.*, 2020). Darüber hinaus konnte eine starke Selektion für Antibiotika-resistente Stämme in Krankenhausabwässern im Vergleich zu anderen Abwasserarten in einem experimentellen Versuch nachgewiesen werden (Krapner *et al.*, 2021). Im Verlauf dieses Versuchs wurde steril gefiltertes Abwasser eines Krankenhauses in Schweden sowie Zu- und Abfluss einer kommunalen Kläranlage einer Mischung aus Antibiotika-resistenten und -sensiblen *E. coli* Stämmen ausgesetzt. Dabei konnte ein bakterizider Effekt nachgewiesen werden, den das Krankenhausabwasser auf die Antibiotika-sensiblen, nicht jedoch auf die resistenten Stämme hatte (Krapner *et al.*, 2021). Auch wurde im Krankenhausabwasser im Vergleich zu kommunalem Abwasser eine erhöhte Rate des horizontalen Gentransfers bei *E. coli* Isolaten nachgewiesen, die besonders im Bereich der Sulfonamid-Resistenzen zu einem deutlichen Anstieg an Resistenzdeterminanten geführt hat (Hutinel *et al.*, 2021). Die globale Relevanz der besonderen Umgebung von Krankenhausabwässern für die *One Health* Thematik wird durch zahlreiche ähnliche Nachweise höherer CPE/CRE-Belastungen in Krankenhausabwässern verglichen mit anderen Abwässern in diversen Ländern weltweit bestätigt (Zhang *et al.*, 2020).

Der Einfluss von Krankenhausabwasser zeigt sich dabei zunehmend auch in kommunalem Abwasser und weist auf eine Verbreitung von multi-resistenten Bakterien und Resistenzgenen hin. Sib *et al.* etwa konnten zeigen, dass in einem gemischten Abwasser der Anteil des Wasservolumens aus Krankenhausabwasser nur 6 % betrug, der Anteil an Carbapenemase-Genen aus dem Krankenhausabwasser jedoch mit 90 % deutlich höher ausfiel (Sib *et al.*, 2020). Obwohl die größte Menge an CRE in Krankenhausabwässern gefunden wird, ergibt sich somit auch ein wahrnehmbarer Trend des CRE-Transports in kommunale Abwässer und sogar Oberflächengewässer. So konnte in einer großflächigen Studie in Deutschland nachgewiesen werden, dass die festgestellte CRE Belastung in kommunalen Abwässern unter dem Einfluss von Krankenhausabwässern deutlich höher war (28,4 %) als in ländlichen Abwässern (0,4 %) ohne Krankenhauseinfluss. Diese CRE



konnten durch Kläranlagen nicht vollständig entfernt werden, was eine Freisetzung von CRE in die Umwelt zur Folge haben kann (Exner *et al.*, 2018).

Einzelne Studien in Europa haben im Sinne der Früherkennung von Krankheitsausbrüchen bereits Versuche zum experimentellen Monitoring von Krankenhausabwässern nach multi-resistenten gramnegativen Bakterien durchgeführt, wobei erste Hinweise auf persistierende Stämme innerhalb des Abwassersystems gefunden werden konnten (White *et al.*, 2016). Weiterhin konnten auch Unterschiede in der Menge der Carbapenemase-Gene in Krankenhausabwasser zu verschiedenen Probenahmezeitpunkten festgestellt werden (Majlander *et al.*, 2021). In einer weiteren Studie wurde Krankenhausabwasser über einen Zeitraum von zwei Jahren beobachtet und mittels *Whole Genome Sequencing* (WGS) geprüft, ob hierdurch möglicherweise ein Frühwarnsystem für Krankenausbrüche entwickelt werden könnte. Da die im Krankenhausabwasser gefundenen Stämme und Resistenzgene jedoch nicht exakt die Situation innerhalb des Krankenhauses darstellen oder voraussagen konnten, sollte ein solches Frühwarnsystem mit Vorsicht betrachtet werden (Flach *et al.*, 2021).

### **1.3 Abwasser von Kläranlagen**

Die Abwässer von Kläranlagen gelten als eine der wichtigsten Quellen für die Einführung von Resistenzgenen und multi-resistenten Bakterien in angrenzende Gewässer und Ökosysteme (Jäger *et al.*, 2018). Zunehmend werden multi-resistente Bakterien durch den Eintrag von menschlichen und tierischen Fäkalien in den Wasserkreislauf eingebracht (Bürgmann, 2014) und können innerhalb der Bakterienpopulationen im Wasser weiter selektiert werden. In diesem Zusammenhang liegen auch Hinweise auf eine Wechselwirkung zwischen Antibiotika und der Entwicklung von Resistenzen in aquatischen Ökosystemen vor (Westphal-Settele *et al.*, 2018).

In Deutschland sind über 95 % der Bevölkerung an die öffentliche Kanalisation angeschlossen, wodurch ein jährlicher Umsatz von ca. 9,4 Milliarden Kubikmeter Abwasser in über 10.000 Kläranlagen entsteht (BMUV *Kurzinfo Abwasser - Kläranlage*, 2014). In den Kläranlagen muss dabei Abwasser aus Krankenhäusern, Industrie, Landwirtschaft und Wohngebieten möglichst effizient gereinigt werden, um das Risiko einer Kontamination der Umwelt zu minimieren und das Abwasser wiederverwerten zu können. In annähernd 100%

der deutschen Kläranlagen werden dabei drei aufeinanderfolgende Reinigungsstufen angewendet (BMUV *Kurzinfo Abwasser - Kläranlage*, 2014). Die erste Reinigungsstufe umfasst die mechanische Reinigung und besteht aus einem Rechen zum Abfangen großer Feststoffe, einem Sandfang, in dem sich grobe Partikel wie Sand bei langsamer Fließgeschwindigkeit am Boden absetzen und einem Vorklärbecken, in welchem das Abwasser für eine begrenzte Zeit stillsteht und sich Schwebstoffe als Schlamm am Boden ablagern (BMUV *Kurzinfo Abwasser - Kläranlage*, 2014). In der zweiten, biologischen Reinigungsstufe werden in einem Belebtschlammbecken flockenbildende, oxidierende Mikroorganismen zum Abbau organischer und anorganischer Verbindungen genutzt (BMUV *Kurzinfo Abwasser - Kläranlage*, 2014). Die biologische Reinigung ist unterteilt in die aerobe Nitrifizierung zur Oxidation von Ammonium zu Nitrat und die anaerobe Denitrifizierung zur Reduktion von Nitrat zu molekularem Stickstoff (Thakur & Medhi, 2019). In der dritten Reinigungsstufe werden Nährstoffe wie Phosphor in einem Flockungsbecken durch Zugabe von Fällmitteln in eine wasserunlösliche, flockenbildende Verbindung gebracht, welche sich am Boden des Beckens absetzt (BMUV *Kurzinfo Abwasser - Kläranlage*, 2014). Zunehmend werden auch verschiedene vierte Reinigungsstufen, wie Ultra-Filtration oder die Behandlung mit UV-Licht, Ozon oder Aktivkohle (Hembach *et al.*, 2019; Pistocchi *et al.*, 2022) zur gezielten Elimination von Spurenstoffen und Bakterien an Kläranlagen getestet. Solche vierten Reinigungsstufen erfordern jedoch in der Regel einen erheblichen finanziellen Aufwand (Pistocchi *et al.*, 2022), sowie zusätzlichen Platz und bilden bisher in Deutschland die Ausnahme.

Frühere Studien haben gezeigt, dass Drittgenerations-Cephalosporin-resistente *E. coli* (3GCREC) und andere resistente *Enterobacterales* weltweit auch in Oberflächengewässer gelangen können (Jäger *et al.*, 2018). In Deutschland wurden bereits resistente *E. coli*-Isolate mit verschiedenen Resistenzgenen im Ablauf von Kläranlagen nachgewiesen (Hembach *et al.*, 2017). Auch konnten in einem direkten Vergleich verschiedener Kläranlagen 134 CPE in städtischem und nur acht in ländlichem Abwasser nachgewiesen werden, wobei CPE auch im Ablauf der Kläranlagen detektiert werden konnten (H. Müller *et al.*, 2018). Über ähnliche Erfahrungen wurde auch in den USA berichtet, wo gezeigt werden konnte, dass 62 % aller gesammelten Carbapenem-resistenten *E. coli* aus dem Abwasser von Kläranlagen sogar positiv für mehr als eine Carbapenemase waren, was auf ein Risiko nicht nur für die Ausbreitung in der Umwelt, sondern auch für den Genaustausch in Kläranlagen hinweist (Hoelle *et al.*, 2019). Auch Gene, die eine Resistenz gegen

Fluorchinolone vermitteln, sowie Punktmutationen in den Genen *gyrA* und *parC* konnten bereits im Zu- und Ablauf von Kläranlagen in *Enterobacterales* nachgewiesen werden (Kurasam *et al.*, 2018).

In einigen Fällen konnten 4MRGN auch in den an Kläranlagen angrenzenden Gewässern nach der Abwasserreinigung gefunden (Exner *et al.*, 2018) und Resistenzgene mittels PCR in einer Kläranlage noch nach einer vierten Reinigungsstufe mittels Ozonbehandlung nachgewiesen werden (Jäger *et al.*, 2018). Zudem wurde in Kroatien beobachtet, dass der prozentuale Anteil Carbapenem-resistenter Bakterien an der gesamten Bakterienpopulation im Ablauf einer Kläranlage mehr als dreimal so hoch war wie im Zulauf (Hrenovic *et al.*, 2017), was auf eine selektive Anreicherung resistenter Stämme hindeutet. Die Freisetzung solcher Carbapenem-resistenten Bakterien durch Kläranlagen kann dabei nicht nur die Gesundheit der Mitarbeitenden der Kläranlagen gefährden (Zieliński *et al.*, 2021), sondern stellt ein Risiko für die potentielle Kontamination von Trinkwasserreservoirien dar (Voigt *et al.*, 2020).

## 1.4 Ziele der Arbeit

Bei der Untersuchung der Verbreitung von multi-resistenten Bakterien und Resistenzgenen im Sinne des *One Health* Konzepts sind Abwässer von besonderer Bedeutung. Zu den relevantesten Stationen innerhalb der Abwassersysteme gehören Krankenhausabwässer mit einem vergleichsweise erhöhten Vorkommen multi-resistenter Bakterien, sowie Kläranlagen, welche die letzte Barriere vor der Freisetzung in die Umwelt darstellen und bekanntermaßen nicht alle Bakterien eliminieren können.

Erste Studien, die sich mit dem Monitoring von Antibiotika-resistenten Erregern in Krankenhausabwässern beschäftigen, konzentrieren sich vor allem auf den Aspekt der Patientensicherheit und suchen beispielsweise nach Möglichkeiten, die Detektion von multi-resistenten Erregern im Abwasser als Frühwarnsystem zu nutzen, um Ausbrüche innerhalb des Krankenhauses möglichst schnell zu erkennen. Evolutionäre Prozesse innerhalb des Krankenhausabwassers, wie horizontaler Gentransfer oder die selektive Persistenz einzelner Klone, wurden dabei nach bestem Wissen der Autorin vor der hier entstandenen Arbeit nur selektiv und über kurze Zeiträume hinweg untersucht, obwohl die Aufnahme und Weitergabe von Resistenzgenen innerhalb der Abwassersysteme relevante

Faktoren für die Verbreitung von Antibiotika-Resistenzen sind. Besonders in Krankenhausabwässern mit ihrem vergleichsweise hohen Anteil an CRE und CPE kann ein besseres Verständnis dieser evolutionären Prozesse dazu beitragen, Lösungsansätze zu entwickeln, mit denen die Verbreitung multi-resistenter Organismen in die Umwelt reduziert werden kann.

Im Hinblick auf die globale Relevanz der Verbreitung von multi-resistenten *Enterobacterales* wurde der Fokus dieser Arbeit auf die Resistenzforschung mit besonderem Hinblick auf zwei Aspekte der Abwassersysteme gelegt.

1. Um die evolutionären Prozesse im Krankenhausabwasser besser verstehen zu können, wurde im Verlauf dieser Arbeit in zwei groß angelegten Probenahmen in einem zeitlichen Abstand von zweieinhalb Jahren das Abwasser des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) am selben Abwasserstrang untersucht. Hierfür wurden im Jahr 2019 an vier aufeinanderfolgenden Tagen, sowie 2022 an einem Tag insgesamt bis zu dreihundert phänotypische 3GCRE per WGS analysiert und miteinander verglichen. Um die Bedeutung der Eintragung weitgehend resistenter *Enterobacterales* in das kommunale Abwassersystem besser zu verstehen, wurde die genetische Diversität der Isolate, sowie mögliche, im Abwasser persistierende Klone anhand von *core genome Multilocus Sequence Typing* (cgMLST) festgestellt. Weiterhin wurden die Isolate im Hinblick auf ihre Resistenzgene untersucht, mit besonderer Berücksichtigung von  $\beta$ -Laktamasen, Carbapenemasen und Fluorchinolon-Resistenzen. Gerade Carbapenemase-Gene finden sich in der Regel auf Plasmiden, weshalb zusätzlich auch die Plasmid-Replikons der Isolate analysiert und mit den gefundenen Carbapenemase-Genen abgeglichen wurden. Da besonders bei persistierenden Klonen der Verdacht auf eine Biofilmbildung im Abwassersystem naheliegt, wurde in einem Biofilm-Assay außerhalb des Abwassers die grundsätzliche Fähigkeit zur Biofilmbildung der Isolate getestet.
2. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit bezieht sich auf *Enterobacterales* in Kläranlagen am Beispiel von *E. coli* und soll ein besseres Verständnis zu den Verbreitungswegen Antibiotika-resistenter Bakterien über die Abwassersysteme bis zur Freisetzung in die Umwelt liefern. Es wurden 172 phänotypische 3GCREC Isolate neu ausgewertet und analysiert, welche an vier Tagen im Jahr 2017 in Zu- und Ablauf jeweils aufeinander folgender Tage von vier Kläranlagen in

Norddeutschland gesammelt wurden. Die Probenahmen der einzelnen Kläranlagen waren dabei zeitlich voneinander unabhängig. Um eine mögliche Elimination oder Akkumulation bestimmter Klone innerhalb der Kläranlagen zu erkennen, wurden die mittels WGS sequenzierten Isolate bezüglich ihrer genetischen Verwandtschaft miteinander verglichen. Dabei wurde auch geprüft, ob einzelne Klone in mehreren Kläranlagen vorkommen und ob sich dominante Klone auf eine spezifische Eintragsquelle zurückführen lassen. Zudem wurden Resistenzgene und spezifische Punktmutationen bestimmt, um Antibiotika-Resistenzen zu finden, die über eine Drittgenerations-Cephalosporin-Resistenz hinausgehen. Um die Möglichkeit von horizontalem Gentransfer innerhalb der klonalen Linien zu prüfen, wurden zudem die Plasmid-Replikons von dominanten Clustern genetisch eng verwandter Isolate bestimmt und verglichen.

### **3. High burden and diversity of carbapenemase-producing *Enterobacterales* observed in wastewater of a tertiary care hospital in Germany**

Laura Carlsen<sup>a</sup>, Henning Büttner<sup>a</sup>, Martin Christner<sup>a</sup>, Gefion Franke<sup>a</sup>, Daniela Indenbirken<sup>b</sup>, Birte Knobling<sup>a</sup>, Marc Lütgehetmann<sup>a</sup>, Johannes Knobloch<sup>\*a</sup>

<sup>a</sup>Institute of Medical Microbiology, Virology, and Hygiene, University Medical Center Hamburg–Eppendorf, Martinistraße 52, 20246 Hamburg, Germany

<sup>b</sup>Virus Genomics, Heinrich-Pette-Institute, Leibniz Institute for Experimental Biology, Martinistraße 52, 20251 Hamburg, Germany

\*Corresponding author:

University Medical Center Hamburg-Eppendorf

Institute for Microbiology, Virology and Hygiene,

Martinistraße 52,

20251 Hamburg, Germany;

phone: (+49) 40/741051720;

mailto: j.knobloch@uke.de

Veröffentlicht in: *Int J Hyg Environ Health*. 2022(242) 113968.

DOI: 10.1016/j.ijheh.2022.113968

Die Publikation und das *Supplementary Material* sind im *Open Access* zu finden unter:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438463922000517>



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Hygiene and Environmental Health

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijheh](http://www.elsevier.com/locate/ijheh)



## High burden and diversity of carbapenemase-producing *Enterobacterales* observed in wastewater of a tertiary care hospital in Germany

Laura Carlsen<sup>a</sup>, Henning Büttner<sup>a</sup>, Martin Christner<sup>a</sup>, Gefion Franke<sup>a</sup>, Daniela Indenbirken<sup>b</sup>, Birte Knobling<sup>a</sup>, Marc Lütgehetmann<sup>a</sup>, Johannes Knobloch<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Medical Microbiology, Virology, and Hygiene, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52, 20246, Hamburg, Germany

<sup>b</sup> Virus Genomics, Heinrich-Pette-Institute, Leibniz Institute for Experimental Biology, Martinistraße 52, 20251, Hamburg, Germany

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Hospital wastewater  
Multi-resistant bacteria  
Antibiotic resistance  
Carbapenemase  
*Enterobacterales*

### ABSTRACT

Hospitals are one of the main reservoirs of multi-resistant *Enterobacterales* (MRE). As MRE are resistant to the most frequently used antibiotics, therapy for patients with MRE infections is challenging. It has been previously described that MRE from hospital wastewater can pass into municipal wastewater and even surface water. In this study, we investigated the diversity and epidemiology of MRE in the wastewater of a large tertiary care hospital. Wastewater samples were collected for a four-day period and tested for the presence of *Enterobacterales* resistant to 3rd gen. cephalosporins. Representative isolates were further characterized by whole genome sequencing. In 120  $\beta$ -glucuronidase-producing isolates, 68 *Escherichia coli* and, interestingly, also 52 *Citrobacter freundii* were identified. In 120  $\beta$ -glucosidase-producing isolates 45 *Serratia marcescens*, 34 *Klebsiella oxytoca*, 32 *Enterobacter cloacae* and 9 *Klebsiella pneumoniae* were observed. For all species various MLST sequence types and different clusters of resistance genes were determined, showing a great diversity within the different *Enterobacterales*, further corroborated by clonal analysis performed by cgMLST. The most prominent clone was wastewater associated *E. coli* ST635, which accounted for 47.1% of all *E. coli* isolates. Interestingly, 45.6% of *E. coli*, 88.5% of *C. freundii*, 95.6% of *S. marcescens*, 91.2% of *K. oxytoca*, 96.9% of *E. cloacae* and 88.9% of *K. pneumoniae* isolates carried a carbapenemase gene, indicating a high burden with carbapenemase-producing *Enterobacterales*. Comparison with clinical isolates from the same hospital displayed few clonal matches. One wastewater isolate of *K. pneumoniae* was identified to be closely related compared to a clone that had been introduced into the hospital during an outbreak four years earlier. One *E. coli* isolate was identified as identical to an isolate from a patient, with inpatient stay during the sampling period. The data obtained in this study highlight the problem of antibiotic resistance of *Enterobacterales* in hospital wastewater. In particular, the clustered occurrence of carbapenemase genes is of great concern and underscores the problem of increasingly scarce antibiotic options against these bacteria.

### 1. Introduction

Multidrug-resistant *Enterobacterales* have become more important in the last years. Especially since these bacteria continuously develop strategies to become resistant to frequently used antibiotics, they represent a serious health risk (Davido et al., 2018). Next to 3rd generation cephalosporin-resistant *Enterobacterales* (3GCRE), carbapenem-resistant (CRE) and carbapenemase-producing *Enterobacterales* (CPE) are of particular concern in healthcare (Elsa et al., 2020; Hoffman et al., 2021), since therapeutic options are significantly

limited and last resort antibiotics are not used in the first line in the calculated therapy of even life-threatening infections. Such isolates can also spread into the community from healthcare settings (Kelly et al., 2017). Infections caused by CRE can be community- as well as hospital-acquired and are associated with significant mortality up to 72% (Borer et al., 2009; Hirsch and Tam, 2010).

A simple and effective way to detect multi-resistant bacteria in environmental or clinical samples is growth on selective media. Selective chromogenic media can achieve high sensitivity to 3GCRE (Göttig et al., 2020) and simultaneously a simple separation of clinically

\* Corresponding author. University Medical Center Hamburg-Eppendorf Institute for Microbiology, Virology and Hygiene, Martinistraße 52, 20251, Hamburg, Germany.

E-mail address: [j.knobloch@uke.de](mailto:j.knobloch@uke.de) (J. Knobloch).

<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2022.113968>

Received 20 December 2021; Received in revised form 10 March 2022; Accepted 28 March 2022

Available online 4 April 2022

1438-4639/© 2022 The Authors. Published by Elsevier GmbH. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



relevant *Enterobacterales* from other bacteria by chromogenic reaction for  $\beta$ -glucuronidase and  $\beta$ -glucosidase-producing *Enterobacterales*. The presence of  $\beta$ -glucuronidase is associated with *E. coli*, whereas genera within the KESG group (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* and *Citrobacter*) are characterized by  $\beta$ -glucosidase production (Huang et al., 2010; McLellan et al., 2001).

Within the carbapenemases in *Enterobacterales* the most important as well as clinically relevant ones are KPC, OXA-48, NDM, VIM and IMP, with worldwide variances between different regions (Bonnin et al., 2021; Cantón et al., 2020; Lasko and Nicolau, 2020; Tan et al., 2021). The most prominent carbapenemase-producing *Enterobacterales* in Germany are *K. pneumoniae*, *E. coli* and *E. cloacae* (Mischnik et al., 2015; Pfennigwerth and Schauer, 2017). Of all species, carbapenem-resistant *K. pneumoniae* is the most clinically relevant representative of CRE and has been highlighted as the fastest-growing resistance threat in Europe (David et al., 2020). The predominant carbapenemases in Europe in the different species vary: In *K. pneumoniae* the most prominent carbapenemase is OXA-48 (43%), followed by KPC-2 (23%) and KPC-3 (23%). In *E. coli* it is also OXA-48 (44%), but followed by VIM-1 (28%), whereas in *E. cloacae* VIM-1 (71%) is the predominant carbapenemase (Cantón et al., 2012; David et al., 2019). In Germany, the carbapenemase OXA-48 is particularly common among all *Enterobacterales*. Carbapenemase genes are often located on plasmids in the bacteria and can be transferred between different strains of *Enterobacterales*. One plasmid can carry multiple resistance genes at once (Kopotsa et al., 2019).

Carbapenemases can belong to class A, B, or D of the Ambler classification system of  $\beta$ -lactamases, depending on their molecular structure. Class A includes KPC, GES, IMI, NMC-A, SME and SFC, of which KPCs are the most abundant in *Enterobacterales* worldwide (Logan and Weinstein, 2017). KPC has been originally reported in *K. pneumoniae*, but later also in other *Enterobacterales* and *P. aeruginosa* (Bassetti and Peghin, 2020). Class B  $\beta$ -lactamases are metallo- $\beta$ -lactamases (MBLs), including IMP, VIM and NDM. Class D are OXA  $\beta$ -lactamases that can be divided into *A. baumannii*-derived OXA- $\beta$ -lactamases (Evans and Amyes, 2014; Logan and Weinstein, 2017) and *Shewanella*-derived OXA-48-type carbapenemases (Tacião et al., 2018). Not all  $\beta$ -lactamases of the OXA family are carbapenemases as well. Carbapenemases have the ability to render a wide range of  $\beta$ -lactams, including carbapenems, cephalosporins and penicillin, harmless by hydrolysis (Halat and Moubareck, 2020).

Carbapenemase genes occur in the environment on almost all continents. Reservoirs of carbapenemase-producing bacteria and resistance genes can be located in hospital and community wastewater, drinking water and natural waterways (Mills and Lee, 2019). Although the highest amount of CRE continues to be found in hospital effluents, previous studies have already shown an alarming trend of CRE transport into municipal wastewaters and even surface waters. Exner et al. demonstrated an impact of CPE contaminated hospital wastewater on the water environment in Germany. The load of CRE found in urban wastewater with the influence of hospital effluents was significantly higher (28.4%) compared to rural wastewater (0.4%) with no hospital influence. Those CRE could also not completely be removed by wastewater treatment plants, resulting in the release of CRE into the environment (Exner et al., 2018). Similar results were shown by Müller et al. finding 134 CPE in urban and only eight in rural wastewater analyzed by real-time PCR, detecting CRE even in the effluent of wastewater treatment plants (WWTPs) (Müller et al., 2018). Similar issues have also been reported in the USA, where Hoelle et al. demonstrated that 62% of all collected carbapenem-resistant *E. coli* from the wastewater treatment plant effluent were even positive for more than one carbapenemase, highlighting a risk not only for environmental spread but also for gene exchange in WWTPs (Hoelle et al., 2019).

The impact of hospitals on the spread of CRE and CPE in Germany becomes more evident by a direct comparison of urban wastewater and hospital effluent. Sib et al. could demonstrate, that influent hospital wastewater accounted for 6% of the total wastewater in the system but

90% of the carbapenemase genes (Sib et al., 2020). This situation is reflected in several European countries, proving that the burden of multi-resistant *Enterobacterales*, especially CPE, is higher in hospitals and in hospital wastewater than in mixed urban wastewater (Cahill et al., 2019; Hocquet et al., 2016; Huijbers et al., 2020). To improve the understanding of the significance of the introduction of widely resistant *Enterobacterales* into the urban wastewater system, the clonal relationship of clinically relevant species was further investigated in this study. Detailed genetic characterization by whole genome sequencing of 240 bacterial isolates selected for 3rd gen. cephalosporin resistance from wastewater and comparison with clinical isolates was performed.

## 2. Material and methods

### 2.1. Sampling and identification of wastewater isolates

Representative 24 h wastewater samples were taken with a Buehler 3010 Stationary Automatic Sampler (Hach, Düsseldorf, Germany) for four days from 05th to 08th November 2019. The sampler was programmed to take 50 mL water samples every 10 min, resulting in a 7.2 l mixed wastewater sample per 24 h. 100  $\mu$ L of the mixed wastewater of each day was spread out onto chromID® ESBL agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and incubated at 37 °C overnight. 120  $\beta$ -glucuronidase-producing (red) and 120  $\beta$ -glucosidase-producing (green) colonies were picked and isolated on chromID® ESBL agar. The plates with subcultures from glucuronidase producing strains were incubated at 42 °C overnight, to support the selection for *E. coli*. Plates with subcultures from glucosidase producing strains were incubated at 37 °C. The species of all strains were determined by mass spectrometry with MALDI Biotyper® MBT smart instrument (Bruker, Bremen, Germany) and the associated MALDI Biotyper® database. Since MALDI is unable to definitively distinguish between the different species of the *Enterobacter cloacae* complex and the *Klebsiella oxytoca* complex, all isolates belonging to the *E. cloacae* complex were subsequently designated as *E. cloacae* and all isolates belonging to the *K. oxytoca* complex were designated as *K. oxytoca*.

### 2.2. Whole genome sequencing and genomic analysis

The DNA of all isolates was extracted with a QIASymphony SP Instrument and the QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands). The DNA concentration was measured with the Qubit dsDNA High Sensitivity Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) and adjusted to 5–8 ng/ $\mu$ L. 60  $\mu$ L of the DNA were sheared by ultrasound in a bioruptor pico (diagenode, Seraing, Belgium) 10 times for 30 s with 30 s pausing in between. The library preparation was performed using the NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina and the NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (NEB, Ipswich, USA). The PCR was set with 6 cycles.

Concentration of the library pool was measured again with Qubit and fragment length distribution of the final libraries was analyzed with the DNA High Sensitivity Chip on an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). The library pool was normalized to 2 nM DNA and sequenced on the NextSeq500 (Illumina, San Diego, USA) with 2x151 bp in the mid output format. Samples had 1.3 to 4.7 mio reads per sample. The resulting FASTQ files were uploaded to the pipeline of Ridom SeqSphere+ (Ridom, Münster, Germany), assembled with Velvet (version 1.1.04) and analyzed for their sequence type and their relationship to other isolates. For this purpose, core genome Multi Locus Sequence Typing (cgMLST) was performed for all species with the published cgMLST schemes (*E. coli* and *K. pneumoniae*) or *ad hoc* cgMLST schemes calculated in Ridom SeqSphere+ with reference strains *C. freundii* FDAARGOS\_61 (Accession nr.: NZ\_CP026045.1; core genome: 2527 alleles) *S. marcescens* CAV1492 (Accession nr.: NZ\_CP011642.1; core genome: 3177 alleles), *K. oxytoca* AR\_0028 (Accession nr.: NZ\_CP026715.1; core genome: 3175 alleles) and *E. cloacae* ATCC13047



(Accession nr.: CP001918.1; core genome: 523 alleles). The threshold for identical isolates for each species was set at 15 different alleles for *K. pneumoniae* and at 10 different alleles for all other species according to the guidelines of Ridom SeqSphere+ (Francisco et al., 2009). To ensure international comparability, the sequence types of classical MLST schemes were used for strain designation, if available. For *E. coli* the Warwick MLST scheme was used for analysis (Wirth et al., 2006). Information about quality sequencing and typing is displayed in Supplementary Table 1. Sequences of all isolates are available in BioProject Nr. PRJNA764050 at NCBI BioProject. The sequences were uploaded to the bacterial pipeline of the Center for Genomic Epidemiology (CGE; Thomsen et al., 2016) to identify the presence of resistance and virulence genes in all isolates (Bortolaia et al., 2020; Camacho et al., 2009; Joensen et al., 2014; Malberg Tetzschner et al., 2020; Zankari et al., 2017). Additional to the designation by MLST sequence types the presence of one or more carbapenemase genes was used to distinguish within clonally related isolates, if applicable. Descriptive statistics were performed using R (version 3.6.2) and RStudio (version 1.2.5033) with the library *dplyr* activated (Wickham et al., 2019).

2.3. Selection of clinical isolates for comparative analysis

The data of wastewater samples were compared to genomes of relevant clinical isolates sequenced as part of the hospital's resistance surveillance strategy (3GCRE with additional resistance against fluoroquinolones from ICUs and oncology wards or isolates causing outbreaks in other wards, as well as CPE from all wards) during a defined comparison period of 12 months (1<sup>st</sup> February 2019 to 31<sup>st</sup> January 2020; Supplementary Table 2). Additionally, clonally related sequenced MRE isolates associated with former outbreaks were included regardless of time period. In total 988 *E. coli*, 50 *C. freundii*, 25 *S. marcescens*, 18 *K. oxytoca*, 306 *E. cloacae* and 253 *K. pneumoniae* clinical isolates were used for the comparison. For the defined time period a patient-adjusted relative rate of CRE within all detected *Enterobacteriales* with phenotypic resistance against cefotaxime (CTX-R) was calculated for comparison with the wastewater samples cultivated on selective media.

2.4. Biofilm assay

To investigate the principal capability of the strains to attach to solid surfaces and to express intercellular adhesion, a biofilm assay was performed, modified from the method described by Fiamengo et al. (2020) (Fiamengo et al., 2020). In brief, one colony of each isolate was mixed into 5 mL LB medium (TH Geyer, Renningen, Germany) and incubated overnight at 37 °C. 20 µL of the culture were transferred into 2 mL DMEM medium (1% glucose; TH Geyer, Renningen, Germany). After mixing the solution thoroughly, 200 µL were transferred into wells of a 96 well NUNClon delta plate (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) and incubated overnight at 37 °C. Subsequently, plates were inverted and tapped firmly to remove the media and were incubated for an additional 1 h at 37 °C to fix remaining cells or biofilms. 50 µL Gentiana violet (Roth, Karlsruhe, Germany) were added to each well, incubated for 15 min, and washed out by carefully draining water over the plate surface. The stain absorbed by adhering bacteria was dissolved in 100 µL of 70% isopropanol for 15 min before analysis using a Spark (Tecan, Männedorf, Switzerland) with an adjusted wavelength of 570 nm and a reference wavelength of 405 nm. One permanent positive and one permanent negative wastewater strain were used as positive and negative controls, respectively, for biofilm forming bacteria on each plate. For each isolate, the biofilm assay was performed in two independent experiments with four replicates per isolate. The mean value of the negative control was subtracted from the mean value of all eight wells to obtain the final value. A value of <0.1 was defined as biofilm-negative, 0.1 to 0.5 as weak biofilm-positive and >0.5 as biofilm-positive.

3. Results

The 120 β-glucuronidase-producing isolates from hospital wastewater were identified as *E. coli* (n = 68), and *C. freundii* (n = 52). The 120 β-glucosidase-producing isolates were identified as *S. marcescens* (n = 45), *K. oxytoca* (n = 34), *E. cloacae* (n = 32), and *K. pneumoniae* (n = 9). Out of the 240 isolates, all except two *S. marcescens* isolates (99.17%) were β-lactamase-positive (Fig. 1) and 191 isolates (79.58%) were also carbapenemase-positive. Additionally, resistance genes against aminoglycosides, trimethoprim, sulfonamides, fluoroquinolones, tetracyclines and phenicols were present in all species. MLS (macrolides, lincosamides, streptogramins) resistance genes occurred only in *E. coli*, *C. freundii* and *E. cloacae*, whereas fosfomycin resistance genes occurred in all *E. cloacae* and *K. pneumoniae*, but in no other species. Rifampicin resistance occurred in all species except *K. oxytoca* and *K. pneumoniae*.

The most prominent carbapenemase gene was *bla<sub>OXA-48</sub>* (n = 112) detected in *E. coli* (n = 20), *C. freundii* (n = 36), *S. marcescens* (n = 11), *K. oxytoca* (n = 18), *E. cloacae* (n = 21) and *K. pneumoniae* (n = 6). In *E. coli* 29 isolates (45.6%) were positive for at least one carbapenemase

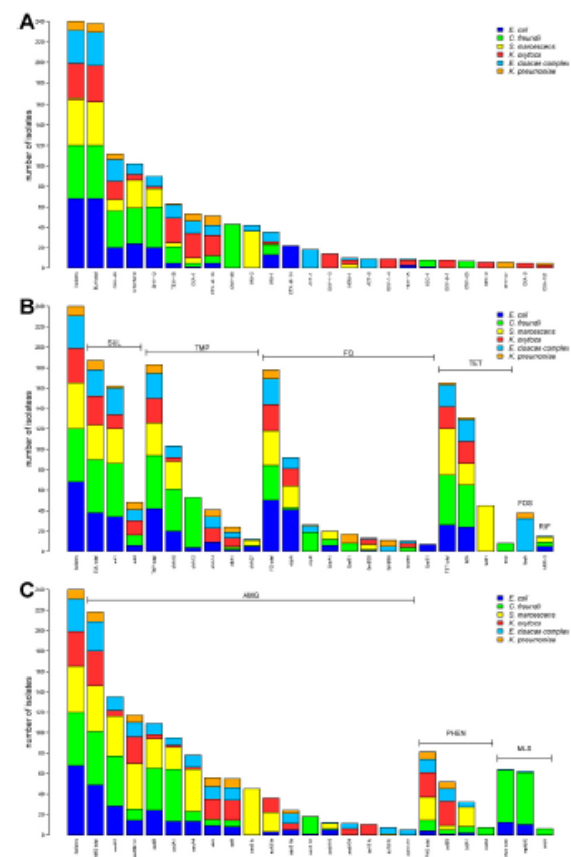


Fig. 1. Resistance genes detected individual species. Genes encoding resistance against β-lactams (A), sulfonamides (SUL), trimethoprim (TMP), fluoroquinolones (FQ), tetracyclines (TET), fosfomycin (FOS), and rifampicin (RIF) (B) as well as aminoglycosides (AMG), phenicols (PHEN) and MLS (macrolides, lincosamides, streptogramins) (C) are displayed. Colors represent the different species. The first bar represents the total number of analyzed isolates. Only genes that occurred at least five times are displayed. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

gene with two isolates displaying each two carbapenemase genes (Supplementary Table 3). Beside *bla*<sub>OXA-48</sub> in *E. coli* only *bla*<sub>VIM-1</sub> (n = 13) could be detected (supplementary figure 1.2). 88.5% of the *C. freundii* isolates were carbapenemase-positive, with 45 isolates containing one and one isolate containing two carbapenemase genes (Supplementary Table 3). The genes *bla*<sub>VIM-1</sub> (n = 10) and *bla*<sub>OXA-232</sub> (n = 1) were detected in this species beside the dominant *bla*<sub>OXA-48</sub> gene (Supplementary Fig. 2B). Out of the *S. marcescens* isolates 95.6% were carbapenemase-positive. 33 isolates contained one and ten isolates contained each two carbapenemase genes (Supplementary Table 3). In *S. marcescens* *bla*<sub>VIM-2</sub> was the most often identified carbapenemase gene (n = 36). In this species *bla*<sub>OXA-48</sub> was the second most frequent carbapenemase gene and *bla*<sub>NDM-1</sub> (n = 4), *bla*<sub>GES-5</sub> (n = 1) and *bla*<sub>VIM-1</sub> (n = 1) genes were also observed in this species (Supplementary Fig. 3B). *K. oxytoca* includes 91.2% carbapenemase-positive isolates with 29 isolates containing one and two isolates containing each two carbapenemase genes (Supplementary Table 3). Beside the dominant *bla*<sub>OXA-48</sub> gene, *bla*<sub>KPC-2</sub> (n = 6), *bla*<sub>NDM-1</sub> (n = 4), *bla*<sub>OXA-181</sub> (n = 3), and *bla*<sub>VIM-1</sub> (n = 2) were observed (Supplementary Fig. 4B). Out of the *E. cloacae* isolates 96.9% were carbapenemase-positive, of which 24 isolates contained one and seven isolates contained two carbapenemase genes (Supplementary Table 3). Next to *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub> (n = 9), *bla*<sub>VIM-2</sub> (n = 6) and *bla*<sub>NDM-1</sub> (n = 1) were detected (Supplementary Fig. 5B). 88.9% of the *K. pneumoniae* isolates were also carbapenem-resistant, each of them containing one single carbapenemase gene (Supplementary Table 3), either a *bla*<sub>OXA-48</sub> or a *bla*<sub>OXA-181</sub> (n = 2) (Supplementary Fig. 6B).

Clonal analysis using cgMLST was performed for all species as well as automated determination of classical MLST sequence types, except of *S. marcescens*. For *E. coli* 15 MLST sequence types (STs) were observed with eight singleton STs identified only once (SSTs; Supplementary Table 1). In *E. coli* ST635 was the most prominent ST (n = 32), constituting 47.1% of all isolates in this species. Using cgMLST five clonally distinct subgroups were identified (Fig. 2A). Even within clonally closely related strains, as detected by cgMLST, different presence of carbapenemase genes was observed (supplementary fig. 1.2). The next most frequent STs were ST1722 (n = 10) and ST23 (n = 8). Both revealed to be identical or closely related within the group as detected by cgMLST. The remaining 10 non SST *E. coli* isolates were identified as STs ST38 (n = 4), ST501 (n = 2), ST744 (n = 2) and ST2967 (n = 2). Except for ST744, all isolates of the respective sequence types were clonally identical or closely related according to cgMLST. For *C. freundii* four MLST STs with two SSTs observed only once were identified (Supplementary Fig. 2A). The predominant ST22 (n = 43) could be further divided into

three subgroups by cgMLST. While in the largest subgroup (n = 34) all isolates carry a *bla*<sub>OXA-48</sub> gene locus, the two smaller clonally related groups displayed variable carbapenemase gene carriage. In *C. freundii* ST91 (n = 7) all isolates carried a *bla*<sub>VIM-1</sub> gene. However, one isolate displayed 18 differing alleles in cgMLST, indicating a separate clone. *S. marcescens* is divided into seven genotypes (GT) depending on the cluster threshold, as MLST for this species is not available (Supplementary Fig. 3A). The only clonally related group of strains in cgMLST (n = 39) displayed different carriage of carbapenemase genes (Supplementary Fig. 3B). *K. oxytoca* splits into six STs, which could not be further subdivided by cgMLST (Supplementary Fig. 4A). ST98 (n = 14) was the most prominent ST with all isolates carrying *bla*<sub>OXA-48</sub>. ST170 (n = 6) and ST143 (n = 4) displayed a variable carriage of carbapenemase genes, with three ST170 isolates lacking the presence of a carbapenemase gene and three isolates carrying *bla*<sub>OXA-181</sub>, whereas ST143 isolates carried *bla*<sub>OXA-48</sub> with two strains displaying an additional *bla*<sub>NDM-1</sub> gene. ST371 (n = 6), ST183 (n = 2) and ST319 (n = 2) carried *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub> and *bla*<sub>VIM-1</sub>, respectively. *E. cloacae* displayed six STs, of which ST24 (n = 18) and ST54 (n = 2) are each divided into two, subgroups according to cgMLST (Supplementary Fig. 5A). The other three STs were SSTs. *K. pneumoniae* splits into three STs with one SST and no further cgMLST division of ST45 (n = 6) and ST147 (n = 2) into subgroups (Fig. 2B).

Out of the wastewater isolates 131 displayed the capacity to form a strong biofilm under the investigated condition while another 47 were weak biofilm-positive, constituting 74.2% of the cultivated wastewater samples. In *E. coli* 33 wastewater isolates were biofilm-positive, 14 weak biofilm-positive and 21 biofilm-negative (supplementary figure 1.3). Two of the biofilm-positive *E. coli* wastewater isolates (one ST635, one ST501) could be determined as typical enteroaggregative *E. coli* (EAEC) carrying the marker gene *aggR* (Supplementary Table 1) as well as other virulence factors of EAEC. *C. freundii* had 13 biofilm-positive, four weak biofilm-positive and 35 biofilm-negative isolates (Supplementary Fig. 2C). In *S. marcescens* 24 isolates were biofilm-positive, 16 were weak biofilm-positive and five were biofilm-negative (Supplementary Fig. 3C). There were no biofilm-negative and only two weak biofilm-positive isolates in *K. oxytoca* (Supplementary Fig. 4C). *E. cloacae* had 20 biofilm-positive, 11 weak biofilm-positive and one biofilm-negative isolate (Supplementary Fig. 5C). All *K. pneumoniae* displayed a strong biofilm-positive phenotype.

The cefotaxime-resistant (CTX-R) clinical isolates from the selected time period contained 0.6% CRE in *E. coli*, 6.0% in *C. freundii*, 4.0% in *S. marcescens*, 0% in *K. oxytoca*, 3.3% in *E. cloacae* and 7.1% in *K. pneumoniae* (Table 1). A comparison of wastewater and selected

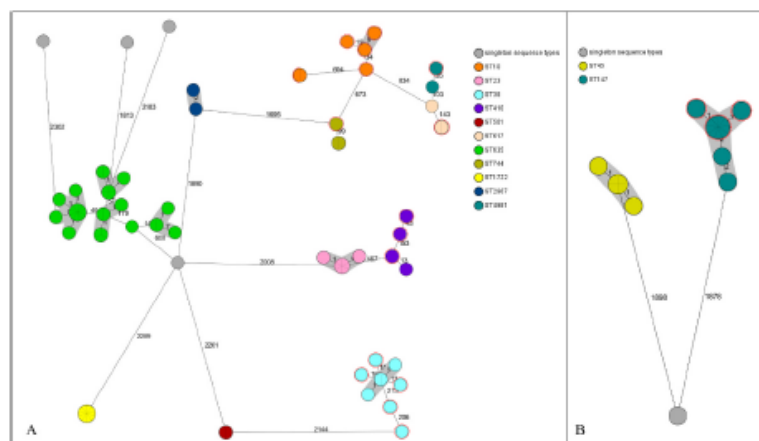


Fig. 2. cgMLST analysis of clonal relations in *E. coli* (A) and *K. pneumoniae* (B) wastewater isolates and related clinical isolates. Isolates are colored depending on their sequence type. Grey shaded clusters show clonally related subgroups according to cgMLST. Clinical isolates are marked with a dotted red circle. Numbers represent the allele differences (*E. coli*: 2513 alleles; *K. pneumoniae*: 2358 alleles). Additional information about carbapenemase genes, biofilm formation and clinical isolates are displayed in the supplementary figures. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)



**Table 1**  
comparison of wastewater CPE and clinical CRE.

	wastewater isolates (CPE/3GCRE)	Clinical CTX-R isolates (CRE/3GCRE)
<i>E. coli</i>	31/60 (45.6%)	6/903 (0.6%)
<i>C. freundii</i>	46/52 (88.5%)	3/50 (6.0%)
<i>S. marcescens</i>	43/45 (95.6%)	1/25 (4.0%)
<i>K. oxytoca</i>	31/34 (91.2%)	0/18 (0.0%)
<i>E. cloacae</i>	31/32 (96.9%)	10/306 (3.3%)
<i>K. pneumoniae</i>	0/9 (0.0%)	18/253 (7.1%)

sequenced clinical isolates displayed matches for *E. coli* (Fig. 2A and supplementary figure 1.1) and *K. pneumoniae* (Fig. 2B and Supplementary Fig. 6A). For all other species there was no genetic accordance with clinical isolates.

#### 4. Discussion

In the presented study the diversity of 3rd generation cephalosporin resistant *E. coli* and other *Enterobacteriales* in hospital wastewater were characterized. The *E. coli* isolates were highly diverse with 15 different STs and showed resistance against nine different antibiotic groups, including carbapenems. Since all strains were isolated from selective agar containing  $\beta$ -lactams, the presence of  $\beta$ -lactamases in all species was expectable. Interestingly 45.6% of the *E. coli* isolates were positive for at least one carbapenemase gene too. This is of particular concern, because usually less than 0.1% of pathogenic *E. coli* are CPE (Schulz-Stübner, 2017). These data are confirmed by the fact that an additional carbapenem-resistant phenotype only occurred at low frequency (0.6%) in the clinical CTX-R *E. coli* isolates examined. The most prominent *E. coli* ST635 found in this study is known to be adapted to wastewater and is described as wastewater treatment resistant, but has already been found in hospital sinks as well (Constantinides et al., 2020; Zhi et al., 2019). In our study all except four of the carbapenemase-positive *E. coli* isolates belong to ST635, resulting in 87.5% of the ST635 isolates being CPE. In *E. coli* the high proportion of CPE in wastewater is therefore mainly justifiable by the presence of this wastewater adapted clone. Even clonal identical isolates, lacking different alleles in cgMLST, carried different carbapenemase genes (Supplementary Table 1). This led to the assumption, that ST635 might frequently underlie horizontal transfer of plasmids.

*Bla*<sub>OXA-48</sub>-type carbapenemase genes (including *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>OXA-181</sub> and *bla*<sub>OXA-232</sub>) were the most common carbapenemase type, which were detected in this study. It must be noted that the selected medium contains cefpodoxime as selective agent. Since carbapenemases of the OXA-48-type have low hydrolytic activity against 3rd generation cephalosporins (Pitout et al., 2020), isolates lacking an additional  $\beta$ -lactamase could be missed. Therefore, despite the already very high rate of carbapenemase positive isolates under 3GCRE in this study, there may still be an underestimation of the presence of carbapenemase positive isolates in the investigated wastewater.

The principle ability to attach to solid surfaces and to express intercellular adhesion may contribute to the persistence of this clone in wastewater. However, due to the differences between environmental conditions in wastewater and experimental verification, it is still not sure that ST635 persists in the drainage system fixed in biofilms. Interestingly, one ST635 was identified to carry plasmid encoded virulence factors present in tEAEC, suggesting that this strain acquired a virulence plasmid, indicating that a primary environmentally adapted clonal lineage can turn to be pathogenic for humans.

In a direct comparison of wastewater and clinical isolates one single *E. coli* ST10 was also found in the wastewater and was determined by cgMLST to be clonal identical to a clinical isolate from the same day. *E. coli* ST10 is a known pathogen for humans as well as animals and the third most common extra intestinal pathogenic *E. coli* worldwide (García-Meniño et al., 2018; Manges et al., 2019), that has already been

described as multidrug-resistant (dos Anjos et al., 2019; Mohsin et al., 2018). The fact that this clone was detected in wastewater only once and simultaneously with the presence of a carrier of this clone in the hospital, indicates that an incidental finding of a clinical isolate was observed and a constant presence of this clone in wastewater is not assumed. The other less common *E. coli* STs underline the microbial diversity of *E. coli* in hospital wastewater.

On chromID ESBL agar, one expects  $\beta$ -glucuronidase-producing species to be primarily *E. coli*. In this study, interestingly, we identified almost half (n = 52) of the  $\beta$ -glucuronidase-producing isolates as *C. freundii*. There are already single descriptions of  $\beta$ -glucuronidase-producing *C. freundii* (McDaniels et al., 1996; Tapscott and McIver, 1995) and one *C. freundii* was also observed to grow in an unexpected color on chromID ESBL agar (Régliez-Poupet et al., 2008). Usually, *C. freundii* are described as  $\beta$ -glucosidase-producing strains, but no *C. freundii* were found in the 120 strains examined in this study, what is a remarkable observation. However, the lack of  $\beta$ -glucosidase-positive *C. freundii* might still be caused by a sampling bias. One possible explanation would be the chosen selective medium primarily manufactured for the use in human diagnostics.

The *C. freundii* isolates also split into different clonal groups, meaning there is not just one single  $\beta$ -glucuronidase-producing clone present in the investigated wastewater. In contrast to CTX-R clinical isolates the vast majority (88.5%) of *C. freundii* isolates carried a carbapenemase gene. The two most common STs (ST22 and ST91) have been previously described as carbapenemase-producing strains in hospitals (Villa et al., 2017). As we observed different carbapenemase genes present even in clonally closely related strains (cgMLST) the diversity of this species is underlined. Under the investigated artificial conditions for most *C. freundii* no intercellular adhesion could be observed. As it has been demonstrated, that environmental stress can trigger biofilm formation in different species (Chu et al., 2018; Knobloch et al., 2001; Knobloch et al., 2004; Nickerson and Faherty, 2018; Yin et al., 2019), strains tested biofilm-negative under laboratory conditions might still be capable of biofilm formation in the stressful environment of wastewater.

Two *S. marcescens* isolates lacked the identification of a known  $\beta$ -lactamase gene, but *S. marcescens* can also display a resistant phenotype against  $\beta$ -lactams by differential expression of outer membrane porins (Weindorf et al., 1998). In contrast to only 4.0% phenotypic resistance against carbapenems in CTX-R clinical *S. marcescens* isolates, 95.6% of the wastewater isolates were carbapenemase-producing. For *S. marcescens* no classic MLST scheme is published, but using cgMLST the isolates could be split into seven different clonal groups. In the only major clonally related group in this species, several different carbapenemase genes were observed indicating a high diversity in *S. marcescens* with the potential capability of horizontal transfer of plasmids as well.

The high amount of carbapenemase-positive *K. oxytoca* isolates in the wastewater is especially concerning as there were no carbapenem-resistant clinical *K. oxytoca* isolates detected in the investigated hospital during the study period (Table 1). As upstream of the sampling point only buildings of the hospital drain into the wastewater system and backflow of wastewater is very unlikely due to the existing slope, the presence of carbapenemase-producing *K. oxytoca* isolates indicates long term residence of individual clones or acquisition of plasmids from other species inside the wastewater system. Again the amount of carbapenem-resistant phenotypes among the CTX-R clinical isolates (3.3%; Table 1) was strikingly lower compared to wastewater isolates with 96.9%. *E. cloacae* ST24 as the most prominent *E. cloacae* ST found in this study has earlier been described as the cause for a CPE outbreak in an Australian hospital (Marmor et al., 2020). In our study the 18 ST24 isolates could be divided in two clonal groups by cgMLST. However, all isolates of this ST carried at least one carbapenemase gene.

*K. pneumoniae* was the species with the lowest number of isolates identified in this study, but still could be divided into three clonal groups. Even though CTX-R clinical isolates had the highest amount of

phenotypic carbapenem-resistance in *K. pneumoniae* (7.19%), while wastewater isolates displayed again a clearly higher rate (88.9%) of isolates being positive for a carbapenemase gene. According to cgMLST, *K. pneumoniae* was the second species in our study where a clonally relationship between wastewater and clinical isolates was observed. During winter season 2014/2015, there was a noticeable outbreak of *K. pneumoniae* ST147, with isolates closely related to the ST147 wastewater isolates (2 of 2358 alleles difference in cgMLST). *K. pneumoniae* ST147 has earlier been reported as the cause for a hospital outbreak in Portugal (Guerra et al., 2020) and also could be detected in wastewater isolates (Nüesch-Inderbinnen et al., 2018). This ST is also known to carry an OXA-48-type carbapenemase and is designated as a high risk clone (Peirano et al., 2020; Pitout et al., 2020). In our study, we observed an *bla*<sub>OXA-181</sub> gene in this genetic background. As this strain is known to be associated with medical care, a repeated introduction into the hospital sewage system by different patients over time is possible. However, the very low number of different alleles in cgMLST also raises the possibility of long-term persistence of this clone without significant chromosomal variation in the wastewater system. Thereby, it is unclear in which part of the hospital drainage system this clone might reside, including the possibility of persistence in sink siphons with the potential re-transmission to patients. In this study we observed the loss of some resistance genes compared to the original outbreak isolates (Supplementary Tables 1 and 3), but the presence of the *bla*<sub>OXA-181</sub> gene didn't change.

Despite the cultural selection only for resistance against 3rd generation cephalosporins in this study, the proportion of carbapenemase-positive *Enterobacterales* was significantly higher compared to CTX-R clinical samples and clearly indicates an unexpected high burden of carbapenemase genes in the hospital wastewater. The high diversity of carbapenemase genes even within clonally related strains supports the hypothesis of horizontal transfer of plasmids, which might occur also in the wastewater system. Our study indicates that individual clones might persist for long periods in the wastewater, leading to a continuous release of these carbapenemase-positive strains into the communal wastewater system. Because *Enterobacterales* could not be completely removed from community wastewater, and individual isolates are released to natural water reservoirs, resistance genes liberated from hospitals might reenter human beings by the food and water chain (one health). Further studies should be conducted to understand the relative enrichment of carbapenemase-producing *Enterobacterales* compared to the expected release from the patients' flora.

Declaration of competing interest

None.

Acknowledgements

The authors want to thank Tatjana Kostenko for her excellent technical assistance as well as Hamburg Wasser for their support with the sampling.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2022.113968>.

References

Bassotti, M., Peghin, M., 2020. How to manage KPC infections. *Therapeut. Adv. Infect. Dis.* 7 (May), 1–12. <https://doi.org/10.1177/2049936120912049>.  
 Bonnin, R.A., Jousset, A.B., Emeraud, C., Oueslati, S., Dortet, L., Naas, T., 2021. Genetic diversity, biochemical properties, and detection methods of minor carbapenemases in enterobacterales. *Front. Med.* 7 (January), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.616490>.

Borer, A., Saidel-Odes, L., Riesenberg, K., Bakira, S., Peled, N., Nativ, R., Schlaeffer, F., Sherf, M., 2009. Attributable mortality rate for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 30 (10), 972–976. <https://doi.org/10.1096/605922>.  
 Bortolais, V., Kaas, R.S., Ruppe, E., Roberts, M.C., Schwarz, S., Cattoir, V., Philippon, A., Allesoe, R.L., Rebelo, A.R., Florensa, A.F., Fagelbauer, L., Chakraborty, T., Neumann, B., Werner, G., Bender, J.K., Stingl, K., Nguyen, M., Coppens, J., Xavier, B. B., Aarestrup, F.M., 2020. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J. Antimicrob. Chemother.* 75 (12), 3491–3500. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>.  
 Cahill, N., O'Connor, L., Mahon, B., Varley, Á., McGrath, E., Ryan, P., Cormican, M., Brehony, C., Jolley, K.A., Maiden, M.C., Brisse, S., Morris, D., 2019. Hospital effluent: a reservoir for carbapenemase-producing *Enterobacterales*? *Sci. Total Environ.* 672, 618–624. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.423>.  
 Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden, T.L., 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinform.* 10, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>.  
 Cantón, R., Akova, M., Carmeli, Y., Giske, C.G., Glupczynski, Y., Oniadakowski, M., Livermore, D.M., Miriagou, V., Naas, T., Rossolini, G.M., Samuelsen, Geifert, H., Woodford, N., Nordmann, P., Poirel, L., Bogaerts, P., Navon-Venezia, S., Comaglia, G., 2012. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 16 (5), 413–431. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03821.x>.  
 Cantón, R., Gijón, D., Ruiz-Garbajosa, P., 2020. Antimicrobial resistance in ICU: an update in the light of the COVID-19 pandemic. *Curr. Opin. Crit. Care* 26 (5), 433–441. <https://doi.org/10.1097/MCC.0000000000000755>.  
 Chu, E.K., Kiliç, O., Cho, H., Groisman, A., Levchenko, A., 2018. Self-induced mechanical stress can trigger biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Commun.* 9 (1) <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06552-z>.  
 Constantinides, B., Chau, K.K., Phuong Quan, T., Rodger, G., Anderson, M.I., Jeffery, K., Lipworth, S., Oweon, H.S., Peniket, A., Pike, G., Millo, J., Byukunenge, M., Holdaway, M., Gibbons, C., Mathers, A.J., Crook, D.W., Peto, T.E.A., Sarah Walker, A., Stoesser, N., 2020. Genomic surveillance of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in hospital sink drains and patients. *Microb. Genom.* 6 (7), 4–16. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000391>.  
 David, S., Cohen, V., Reuter, S., Sheppard, A.E., Giani, T., Parkhill, J., Rossolini, G.M., Feil, E.J., Grundmann, H., Amann, D.M., 2020. Integrated chromosomal and plasmid sequence analyses reveal diverse modes of carbapenemase gene spread among *Klebsiella pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117 (40), 25043–25054. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003407117>.  
 David, S., Reuter, S., Harris, S.R., Glanzer, C., Felwell, T., Argimón, S., Abudshab, K., Coater, R., Giani, T., Enrico, G., Aspbury, M., Sjunnebo, S., 2019. Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nature* 4 (11), 1919–1929. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0492-8>.  
 Davido, B., Mousniqt, A., Dinh, A., Bouchard, F., Matt, M., Senard, O., Deconinck, L., Espinasse, F., Lawrence, C., Fortineau, N., Saleh-Mghir, A., Caballero, S., Bocaut, L., Salomon, J., 2018. Germs of thrones - spontaneous decolonisation of carbapenem-resistant enterobacteriaceae (CRE) and vancomycin-resistant Enterococci (VRE) in Western Europe: is this myth or reality? *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 7 (1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0090-5>.  
 doe Anjos, C., Sabino, C.P., Bueris, V., Fernandes, M.R., Pogliani, F.C., Lincopan, N., Sellaera, P.P., 2019. Antimicrobial blue light inactivation of international clones of multidrug-resistant *Escherichia coli* ST10, ST131 and ST648. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 27 (May), 51–53. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.05.014>.  
 Elza, M., Mathieu, L.D., De Ponfily Gauthier, P., Hanna, B., Rishma, A., Emmanuel, C., Benjamin, S., Glenn, C.B., Hervé, J., 2020. Impact of systematic screening for AmpC hyper-producing *Enterobacterales* intestinal carriage in intensive care unit patients. *Ann. Intensive Care* 10 (1). <https://doi.org/10.1186/s13613-020-00754-9>.  
 Evans, B.A., Amyes, S.G.B., 2014. OXA  $\beta$ -lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 27 (2), 241–263. <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-13>.  
 Exner, M., Schmithausen, R., Schreiber, C., Bierbaum, G., Parcina, M., Engelhart, S., Kistemann, T., Sib, E., Walger, P., Schwartz, T., 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. *Hyg. + Med.* 43 (5), D46–D54.  
 Fiamengo, T.E., Runcan, E.E., Premasandhan, C., Blawut, B., Coutinho da Silva, M.A., 2020. Evaluation of biofilm production by *Escherichia coli* isolated from clinical cases of canine pyometra. *Top. Companion Anim. Med.* 39, 100429. <https://doi.org/10.1016/j.tcam.2020.100429>.  
 Francico, A.P., Bugalho, M., Ramirez, M., Carriço, J.A., 2009. Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matrix approach. *BMC Bioinform.* 10, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-152>.  
 García-Meniño, I., García, V., Mora, A., Díaz-Jiménez, D., Plament-Simon, S.C., Alonso, M.P., Blanco, J.E., Blanco, M., Blanco, J., 2018. Swine enteric colibacillosis in Spain: pathogenic potential of mcr-1 ST10 and ST131 *E. Coli* Isolates. *Front. Microbiol.* 9 (NOV), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02659>.  
 Göttig, S., Walker, S.V., Saleh, A., Korolik, F., Sommer, J., Stelzer, Y., Steinmann, J., Hamprecht, A., 2020. Comparison of nine different selective agars for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacterales* (CPE). *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 39 (5), 923–927. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03786-7>.  
 Guerra, A.M., Lira, A., Lameirão, A., Selaru, A., Abreu, G., Lopes, P., Mota, M., Novais, Á., Peixe, L., 2020. Multiplicity of carbapenemase-producers three years after a kpc-3-producing *k. pneumoniae* st147-t64 hospital outbreak. *Antibiotics* 9 (11), 1–11. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110306>.



# High burden and diversity of carbapenemase-producing *Enterobacterales* observed in wastewater of a tertiary care hospital in Germany

L. Carlsen et al.

International Journal of Hygiene and Environmental Health 242 (2022) 113960

- Halat, D.H., Moubareck, C.A., 2020. The current burden of carbapenemases: review of significant properties and dissemination among gram-negative bacteria. *Antibiotics* 9 (4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040136>.
- Hirsch, E.B., Tam, V.H., 2010. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J. Antimicrob. Chemother.* 65 (6), 1119–1125. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq100>.
- Hocquet, D., Müller, A., Bertrand, X., 2016. What happens in hospitals does not stay in hospitals: antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater systems. *J. Hosp. Infect.* 93 (4), 395–402. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2016.01.010>.
- Hoelle, J., Johnson, J.R., Johnston, B., Kinkle, B., Boczek, L., Ryu, H., Hayes, S., 2019. Survey of US wastewater for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *J. Water Health* 23(17) (2), 219–226. <https://doi.org/10.2166/wh.2019.165>.
- Hoffman, T., Lellouche, J., Nutman, A., Temkin, E., Frenk, S., Harbarth, S., Carevic, B., Cohen-Percia, S., Kariv, Y., Fallach, N., Klausner, J., Carmeli, Y., 2021. The effect of prophylaxis with ertapenem versus cefuroxime/metronidazole on intestinal carriage of carbapenem-resistant or third-generation-cephalosporin-resistant *Enterobacterales* after colorectal surgery. *Clin. Microbiol. Infect.* 27 (10), 1481–1487. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.02.002>.
- Huang, T.D., Bogaerts, P., Berhin, C., Guisset, A., Glupczynski, Y., 2010. Evaluation of brilliance EGBL agar, a novel chromogenic medium for detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* 48 (6), 2091–2096. <https://doi.org/10.1128/JCM.02342-09>.
- Huijbers, P.M.C., Larson, D.G.J., Flach, C.P., 2020. Surveillance of antibiotic resistant *Escherichia coli* in human populations through urban wastewater in ten European countries. *Environ. Pollut.* 261, 114200. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114200>.
- Joensen, K.G., Scheute, P., Lund, O., Hasman, H., Kaas, R.S., Nielsen, E.M., Aarestrup, F.M., 2014. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 52 (5), 1501–1510. <https://doi.org/10.1128/JCM.03617-13>.
- Kelly, A.M., Mathema, B., Larson, E.L., 2017. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in the community: a scoping review. *Int. J. Antimicrob. Agents* 50 (2), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.03.012>.
- Knobloch, J.K., Bartsch, K., Sabotche, A., Rohde, H., Feucht, H.H., Mack, D., 2001. Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RobU, an activator of the *sigB* operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *J. Bacteriol.* 183 (5), 2624–2633. <https://doi.org/10.1128/JB.183.5.2624-2633.2001>.
- Knobloch, J.K., Jäger, S., Hordt, M.A., Rohde, H., Mack, D., 2004. RobU-dependent regulation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation is mediated via the alternative sigma factor  $\sigma^B$  by repression of the negative regulator gene *icaR*. *Infect. Immun.* 72 (7), 3039–3049. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.7.3039-3049.2004>.
- Kopota, K., Osei Selgyere, J., Mbelle, N.M., 2019. Plasmid evolution in carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: a review. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1457 (1), 61–91. <https://doi.org/10.1111/nyas.14223>.
- Laalo, M.J., Nicolau, D.P., 2020. Carbapenem-resistant enterobacterales: considerations for treatment in the era of new antimicrobials and evolving epidemiology. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 22 (3). <https://doi.org/10.1007/s11908-020-0716-3>.
- Logan, L.K., Weinstein, R.A., 2017. The epidemiology of Carbapenem-resistant enterobacterales: the impact and evolution of a global menace. *WJ (J. Infect. Dis.)* 215 (Suppl 1), S28–S36. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw282>.
- Malberg Tetzchner, A.M., Johnson, J.R., Johnston, B.D., Lund, O., Scheute, P., 2020. In Silico genotyping of *Escherichia coli* isolates for extraintestinal virulence genes by use of whole-genome sequencing data. *J. Clin. Microbiol.* 58 (10), 1–13. <https://doi.org/10.1128/JCM.01269-20>.
- Manges, A.R., Geum, H.M., Guo, A., Edens, T.J., Fible, C.D., Pitout, J.D.D., 2019. Global extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) lineages. *Clin. Microbiol. Rev.* 32 (3), 1–25. <https://doi.org/10.1128/CMR.00135-18>.
- Marmor, A., Davison, K., Harley, D., Coatsworth, N., Kennedy, K., 2020. Two carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* outbreaks detected retrospectively by whole-genome sequencing at an Australian tertiary hospital. *Infect. Dis. Health* 25 (1), 30–33. <https://doi.org/10.1016/j.idh.2019.03.005>.
- McDaniels, A.E., Rice, E.W., Reyes, A.L., Johnson, C.H., Haugland, R.A., Stelm, J., 1996. Erratum: confirmational identification of *Escherichia coli*, a comparison of genotypic and phenotypic assays for glutamate decarboxylase and  $\beta$ -D-glucuronidase (Applied and Environmental Microbiology (1996) 62:9 (3350–3354)). *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (10), 4113. <https://doi.org/10.1128/aem.64.10.4113-4113.1996>.
- McLellan, S.L., Daniels, A.D., Salmore, A.K., 2001. Clonal populations of thermotolerant enterobacteriaceae in recreational water and their potential interference with fecal *Escherichia coli* counts. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (10), 4934–4938. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.10.4934-4938.2001>.
- Mills, M.C., Lee, J., 2019. The threat of carbapenem-resistant bacteria in the environment: evidence of widespread contamination of reservoirs at a global scale. *Environ. Pollut.* 255 (1). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113143>.
- Mischuk, A., Kaase, M., Lübbert, C., Seifert, H., Kern, W.V., 2015. Carbapenem-Resistenz bei Enterobakterien, *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii*, Srd140. *Dtsch Med Wochenschr.* pp. 172–176.
- Mohsin, J., Pál, T., Petersen, J.E., Darwish, D., Ghazawi, A., Ashraf, T., Soumevend, A., 2018. Plasmid-Mediated colistin resistance gene *mcr-1* in an *Escherichia coli* ST10 bloodstream isolate in the sultanate of Oman. *Microb. Drug Resist.* 24 (3), 278–282. <https://doi.org/10.1009/mdr.2017.0131>.
- Müller, H., Sib, E., Gajdas, M., Klanke, U., Lenz-Plet, F., Barabaach, V., Albert, C., Schallenberg, A., Timm, C., Zacharias, N., Schmidhausen, R.M., Engelhart, S., Exner, M., Parcina, M., Schreiber, C., Bierbaum, G., 2018. Dissemination of multi-resistant Gram-negative bacteria into German wastewater and surface waters. *FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Ecol.* 94 (5), 1–11. <https://doi.org/10.1093/femsec/fy057>.
- Nickerson, K.P., Faherty, C.S., 2018. Bile salt-induced biofilm formation in enteric pathogens: techniques for identification and quantification. *JoVE* 2018 (135), 1–10. <https://doi.org/10.3791/57322>.
- Nüesch-Inderbinen, M., Zurfluh, K., Stevens, M.J.A., Stephan, R., 2018. Complete and assembled genome sequence of an NDM-9- and CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* ST147 wastewater isolate from Switzerland. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 13, 53–54. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.03.001>.
- Peirano, G., Chen, L., Kueiwürth, B.N., Pitout, J.D.D., 2020. Emerging antimicrobial-resistant high-risk *Klebsiella pneumoniae* clones ST307 and ST147. *Antimicrob. Agents Chemother.* 64 (10), 1–14. <https://doi.org/10.1128/AAC.01148-20>.
- Pfennigwerth, N., Schauer, J., 2017. Bericht des Nationalen Referenzentrums (NRZ) für gramnegative Krankheitserreger Zeitraum 1. Januar 2016 – 31. Dezember 2016. *Krankenhaus-Hygiene + Infekt.* 39 (4), 149–151. <https://doi.org/10.1016/j.khin.2017.03.006>.
- Pitout, J.D.D., Peirano, G., Kock, M.M., Strydom, K.-A., Matsumura, Y., 2020. The global ascendancy of OXA-48-type carbapenemases. *Clin. Microbiol. Rev.* 33 (1), 1–48. <https://doi.org/10.1128/CMR.00102-19>.
- Réglier-Poupet, H., Naas, T., Carer, A., Cady, A., Adam, J.M., Fortineau, N., Poyart, C., Nordmann, P., 2008. Performance of chromID EGBL, a chromogenic medium for detection of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *J. Med. Microbiol.* 57 (3), 310–315. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47625-0>.
- Schulz-Stübner, S., 2017. Spezielle Erreger und Infektionen. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-54000-8>.
- Sib, E., Lenz-Plet, F., Barabaach, V., Klanke, U., Savin, M., Hembach, N., Schallenberg, A., Kehl, K., Albert, C., Gajdas, M., Zacharias, N., Müller, H., Schmidhausen, R.M., Exner, M., Kreyenschmidt, J., Schreiber, C., Schwartz, T., Parcina, M., Bierbaum, G., 2020. Bacteria isolated from hospital, municipal and slaughterhouse wastewaters show characteristic, different resistance profiles. *Sci. Total Environ.* 746. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140894>.
- Tacio, M., Araújo, S., Venâz, M., Alves, A., Henriques, I., 2018. *Shewanella* species as the origin of blaOXA-48 genes: insights into gene diversity, associated phenotypes and possible transfer mechanisms. *Int. J. Antimicrob. Agents* 51 (3), 340–348. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.05.014>.
- Tan, X., Kim, H.S., Baugh, K., Huang, Y., Kadiyala, N., Wences, M., Singh, N., Wenzler, E., Bulman, Z.P., 2021. Therapeutic options for metallo- $\beta$ -lactamase-producing enterobacterales. *Infect. Drug Resist.* 14, 125–142. <https://doi.org/10.2147/IDR.S246174>.
- Tapscott, J.W., McIver, C.J., 1995.  $\beta$ -d-Glucuronidase activity among prototrophic and auxotrophic variants of *Escherichia coli* and other *Enterobacteriaceae* commonly implicated in urinary tract infections. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 22 (3), 261–266. [https://doi.org/10.1016/0732-3893\(95\)00097-T](https://doi.org/10.1016/0732-3893(95)00097-T).
- Thomzen, M.C.F., Ahrenfeldt, J., Gimero, J.L.B., Jurts, V., Larsen, M.V., Hasman, H., Aarestrup, F.M., Lund, O., 2016. A bacterial analysis platform: an integrated system for analysing bacterial whole genome sequencing data for clinical diagnostics and surveillance. *PLoS One* 11 (6), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157718>.
- Villa, J., Arana, D.M., Viedma, E., Peres-Montarelo, D., Chaves, F., 2017. Characterization of mobile genetic elements carrying VIM-1 and KPC-2 carbapenemases in *Citrobacter freundii* isolates in Madrid. *Int. J. Med. Microbiol.* 307 (6), 340–345. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.07.001>.
- Weindorf, H., Schmidt, H., Martin, H.H., 1990. Contribution of overproduced chromosomal  $\beta$ -lactamase and defective outer membrane porins to resistance to extended-spectrum  $\beta$ -lactam antibiotics in *Serratia marcescens*. *J. Antimicrob. Chemother.* 41 (2), 189–195. <https://doi.org/10.1093/jac/41.2.189>.
- Wickham, H., François, R., Henry, L., Müller, K., 2019. Dplyr: A Grammar of Data Manipulation. *R package version 0.8.3*. <https://cran.r-project.org/package=dplyr>.
- Wirth, T., Palush, D., Lan, R., Colles, F., Menza, P., Wieler, L.H., Karch, H., Reeves, P.R., Maiden, M.C.J., Ochman, H., Achtman, M., 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol. Microbiol.* 60 (5), 1136–1151. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x>.
- Yin, W., Wang, Y., Liu, L., He, J., 2019. Biofilms: the microbial “protective clothing” in extreme environments. *Int. J. Mol. Sci.* 20 (14). <https://doi.org/10.3390/ijms20143423>.
- Zankari, E., Allesø, R., Joensen, K.G., Cavaco, L.M., Lund, O., Aarestrup, F.M., 2017. PointFinder: a novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. *J. Antimicrob. Chemother.* 72 (10), 2764–2768. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx217>.
- Zhi, S., Banting, G., Stothard, P., Ashbolt, N.J., Checkley, S., Meyer, K., Otto, S., Neumann, N.F., 2019. Evidence for the evolution, clonal expansion and global dissemination of water treatment-resistant naturalized strains of *Escherichia coli* in wastewater. *Water Res.* 156, 208–222. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.03.024>.

## 4. Long time persistence and evolution of carbapenemase-producing *Enterobacterales* in the wastewater of a tertiary care hospital in Germany

Laura Carlsen<sup>a</sup>, Henning Büttner<sup>a</sup>, Martin Christner<sup>b</sup>, Lukas Cordts<sup>d</sup>, Gefion Franke<sup>a</sup>, Armin Hoffmann<sup>a</sup>, Birte Knobling<sup>a</sup>, Marc Lütgehetmann<sup>b</sup>, Jacqueline Nakel<sup>c</sup>, Thomas Werner<sup>d</sup>, Johannes K. Knobloch<sup>\*a</sup>

<sup>a</sup>Institute of Medical Microbiology, Virology, and Hygiene, department for infection prevention and control, University Medical Center Hamburg–Eppendorf, Martinistraße 52, 20246 Hamburg, Germany

<sup>b</sup>Institute of Medical Microbiology, Virology, and Hygiene, University Medical Center Hamburg–Eppendorf, Martinistraße 52, 20246 Hamburg, Germany

<sup>c</sup>Virus Genomics, Heinrich-Pette-Institute, Leibniz Institute for Experimental Biology, Martinistraße 52, 20251 Hamburg, Germany

<sup>d</sup>HAMBURG WASSER, Billhorner Deich 2, 20539 Hamburg

\*Corresponding author:

University Medical Center Hamburg-Eppendorf

Institute for Microbiology, Virology and Hygiene,

Martinistraße 52,

20251 Hamburg, Germany;

phone: (+49) 40/741051720;

mailto: j.knobloch@uke.de

Veröffentlicht in: *J Infect Public Health*. 2023 Aug;16(8):1142-1148.

DOI: 10.1016/j.jiph.2023.05.029

Die Publikation und das *Supplementary Material* sind im *Open Access* zu finden unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187603412300182X?via%3Dihub>



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Infection and Public Health

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jiph](http://www.elsevier.com/locate/jiph)



## Long time persistence and evolution of carbapenemase-producing *Enterobacterales* in the wastewater of a tertiary care hospital in Germany



Laura Carlsen<sup>a</sup>, Henning Büttner<sup>a</sup>, Martin Christner<sup>b</sup>, Lukas Cordts<sup>d</sup>, Gefion Franke<sup>a</sup>, Armin Hoffmann<sup>a</sup>, Birte Knobling<sup>a</sup>, Marc Lütgehetmann<sup>b</sup>, Jacqueline Nakel<sup>c</sup>, Thomas Werner<sup>d</sup>, Johannes K. Knobloch<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Institute of Medical Microbiology, Virology, and Hygiene, Department for Infection Prevention and Control, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52, 20246 Hamburg, Germany

<sup>b</sup>Institute of Medical Microbiology, Virology, and Hygiene, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52, 20246 Hamburg, Germany

<sup>c</sup>Virus Genomics, Heinrich-Pette-Institute, Leibniz Institute for Experimental Biology, Martinistraße 52, 20251 Hamburg, Germany

<sup>d</sup>HAMBURG WASSER, Billhomer Deich 2, 20539 Hamburg, Germany

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 13 February 2023

Received in revised form 15 May 2023

Accepted 22 May 2023

#### Keywords:

Hospital wastewater  
Multi-resistant bacteria  
Antibiotic resistance  
Carbapenemase  
*Enterobacterales*  
Persistence

### ABSTRACT

**Background:** Worldwide observations revealed increased frequencies of multi-resistant *Enterobacterales* and resistance genes in hospital wastewater compared to any other type of wastewater. Despite the description of clonal lineages possibly adapted to hospital wastewater, little is known about long term persistence as well as evolution of these lineages.

**Methods:** In this study, wastewater isolates of different *Enterobacterales* species from a tertiary care hospital were investigated with 2.5 years distance. Whole Genome Sequencing (WGS) and resistance gene identification were performed for *E. coli*, *C. freundii*, *S. marcescens*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, and *E. cloacae* isolates (n = 59), isolated in 2022 and compared with strains isolated from the same wastewater pipeline in 2019 (n = 240).

**Results:** Individual clonal lineages with highly related isolates could be identified in all species identified more than once in 2022 that appear to persist in the wastewater drainage. A common motif of all persistent clonal lineages was the carriage of mobile genetic elements encoding carbapenemase genes with hints for horizontal gene transfer in persistent clones in this environment observed over the 2.5-year period. Multiple plasmid replicons could be detected in both years. In 2022 isolates *bla*<sub>AVIM-1</sub> replaced *bla*<sub>CKA-48</sub> as the most common carbapenemase gene compared to 2019. Interestingly, despite a similar abundance of carbapenemase genes (>80% of all isolates) at both time points genes encoding extended spectrum  $\beta$ -lactamases decreased over time.

**Conclusions:** This data indicates that hospital wastewater continuously releases genes encoding carbapenemases to the urban wastewater system. The evolution of the resident clones as well as the reasons for the selection advantage in this specific ecological niche needs to be further investigated in the future.

© 2023 The Author(s). Published by Elsevier Ltd on behalf of King Saud Bin Abdulaziz University for Health Sciences. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### Introduction

Multi-resistant *Enterobacterales* are becoming increasingly important in human and veterinary medicine. In particular,

carbapenem-resistant (CRE) and carbapenemase-producing *Enterobacterales* (CPE) are associated with reduced treatment options and side effects of last-resort antibiotics [1,2] as well as a significant mortality of up to 72% [3,4]. Carbapenem-resistant *K. pneumoniae* in particular has been highlighted as the fastest growing antibiotic resistance threat in Europe [5,6]. Carbapenemase genes are most often found on plasmids, which can be transferred between different strains of *Enterobacterales* and thus spread antibiotic resistance [7].

\* Correspondence to: University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Institute for Microbiology, Virology and Hygiene, Martinistraße 52, 20251 Hamburg, Germany.  
E-mail address: [j.knobloch@uke.de](mailto:j.knobloch@uke.de) (J.K. Knobloch).

<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2023.05.029>

1876-0341/© 2023 The Author(s). Published by Elsevier Ltd on behalf of King Saud Bin Abdulaziz University for Health Sciences. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Recently, a discrepancy of the observed amount of CPE in hospital wastewater compared to the expected frequency of samples from patients carrying these isolates was described [8]. Although a relationship between the clustered occurrence of carbapenemases and the increased use of carbapenems has been demonstrated in the UK, the resistance gene abundance within hospital wastewater did not reflect resistance patterns in clinical isolates [9]. Additionally, higher amounts of CPE were observed in hospital wastewater compared to other wastewater types [10]. Kehl et al. collected 490 isolates at multiple sampling sites in a wastewater pathway starting in the drains of a tertiary care hospital and ending at the effluent of the municipal wastewater treatment plant [11]. In this study it was demonstrated that out of 9 detected *K. pneumoniae* clonal lineages 6 could be found in hospital wastewater and only 3 in other sampling sites and that different clones seem to prefer different parts of the hospital wastewater system. Interestingly, eight *K. pneumoniae* of the sequence type ST147 isolated along the entire wastewater pathway displayed a low genetic diversity, as observed by whole genome sequencing [11], indicating that the wastewater adapted strains are able to persist at least for some days.

Strong selection for antibiotic-resistant strains in hospital wastewater could be shown in an experimental trial in Sweden, in which hospital wastewater as well as influent and effluent of a municipal wastewater treatment plant was exposed to antibiotic-resistant and -susceptible *E. coli* [12]. Also, an increased rate of horizontal gene transfer was demonstrated within isolates of hospital wastewater [13]. The previous results are supported by studies performed in a wide variety of countries around the world, where the load of CPE/CRE was consistently higher in hospital wastewater than in other wastewater types [14].

First projects in Europe have performed experimental monitoring of hospital wastewater for multi-resistant gram-negative bacteria, where hints for persisting strains could be found [15] as well as differences in the amount of carbapenemase genes at different sampling time points [16]. Both studies covered periods from nine weeks and two months, respectively. A recent study comprising the observation of hospital wastewater during a 2 year period used WGS to analyze if wastewater monitoring could be useful as an hospital outbreak warning system [17]. However, persistence as well as possible evolution of CPE inside the hospital wastewater system was not investigated.

In 2019 we characterized 3rd generation cephalosporin resistant *Enterobacterales* (3GCRE) in a large-scale sampling over 4 days in a tertiary care hospital with 240 isolates characterized by WGS [8]. Several clonal lineages were observed as persistent at least during the four-day observation period. To gain a better understanding of the persistence and possible evolution of resistant *Enterobacterales* in hospital wastewater we analyzed 2.5 years later wastewater from the identical pipeline.

## Material and methods

### Sampling and identification of wastewater isolates

On July 1st 2022, a qualified wastewater sample of hospital wastewater from a tertiary care hospital, in a city of over a million people, serving about 90,000 inpatients and 400,000 outpatients per year was collected at the same sewage pipe analyzed in 2019 [8]. Six individual 50 mL samples taken manually 15 min apart were mixed to generate a representative qualified wastewater spot sample. Further processing for cultivation and species identification was performed as described recently [8] with isolation of 30  $\beta$ -glucuronidase producing and 30  $\beta$ -glucosidase producing isolates. Different species of the *Enterobacter cloacae* complex and the *Klebsiella oxytoca* complex, were designated as *E. cloacae* and *K. oxytoca*, respectively.

### Whole genome sequencing and genomic analysis

Whole Genome Sequencing (WGS) and genomic analysis was performed as described recently [8]. Information on sequencing and typing quality is provided in supplementary table A. Sequences for the 2022 isolates are available in BioProject No. PRJNA906350 at NCBI BioProject, sequences for the 2019 isolates are available in BioProject No. PRJNA764050. The exact species of all *E. cloacae* complex and *K. oxytoca* complex isolates from 2022 and 2019 was identified using the Center for Genomic Epidemiology [18] pipeline KmerFinder (version 3.0.2) [19–21] and is given in supplementary table B. Sequences were uploaded to the Center for Genomic Epidemiology [18] pipelines ResFinder (version 4.1) [22–24] and PlasmidFinder (version 2.0.1) [20,23,25] to identify the presence of resistance genes and plasmid replicons. Isolates collected in 2019 were reanalyzed. If single bases in contigs were missing and leading to multiple identified similar carbapenemases on the same position of the contig, the most probable result was taken. The resistance gene *aac(6)-Ib-cr*, that confers resistance to aminoglycosides as well as fluoroquinolones, was included only in the AMG resistance genes in the analysis to avoid duplications. Point mutations associated with fluoroquinolone resistance were determined only for *E. coli* and *Klebsiella* sp. using the ResFinder pipeline because there is no corresponding database for the other species. Descriptive statistics were performed using R (version 4.2.1) and RStudio (version 2022.07.1 +554) with the dplyr library enabled [26]. A comparison of carbapenemase genes and plasmid replicons was developed in form of a heat map with Python (version 3.9.15) [27] and the libraries Pandas (version 1.3.4), Matplotlib (version 3.5.3) and Seaborn (version 0.12.0) in Spyder (version 5.3.3). In the hospital since 2019 clinical isolates of 3GCRE isolated from patients under intensive care as well as all 3GCRE isolated from blood cultures of other patients were characterized using WGS. A database of sequenced clinical *E. coli* isolated between February 1st 2019 and October 1st 2022 was used for comparison to the 2019 and 2022 isolates.

## Results

Phenotypically  $\beta$ -glucuronidase-positive isolates were identified as *Escherichia coli* (n = 22) or *Citrobacter freundii* (n = 8). Isolates expressing  $\beta$ -glucosidase were identified as *Serratia marcescens* (n = 16), *Klebsiella pneumoniae* (n = 7), *Klebsiella oxytoca* (n = 5), *Enterobacter cloacae* (n = 1), and *Yokenella regensburgei* (n = 1). *Y. regensburgei* was excluded as it was not identified in 2019. Of the 59 isolates sequenced in this study, all were  $\beta$ -lactamase positive (Fig. 1A) and 49 isolates (83.1%) were positive for at least one carbapenemase gene. The most frequently observed carbapenemase gene was *bla<sub>VIM-1</sub>* (n = 21; 35.6% of isolates, Fig. 1A), which was present in *E. coli* (n = 8), *C. freundii* (n = 8), *S. marcescens* (n = 4), and *K. oxytoca* (n = 4). In contrast, in 2019 *bla<sub>OXA-48</sub>* was the predominant carbapenemase gene (Fig. 1A). In 2022 isolates the carbapenemase genes *bla<sub>OXA-48</sub>* (n = 14; 23.72% of isolates), *bla<sub>NDM-1</sub>* (n = 13; 22.0%), *bla<sub>VIM-2</sub>* (n = 6; 10.2%), *bla<sub>CES-5</sub>* and *bla<sub>OXA-181</sub>* (each n = 5; 8.5%), *bla<sub>KPC-2</sub>* (n = 3; 5.1%), as well as *bla<sub>OXA-232</sub>* and *bla<sub>OXA-484</sub>* (each n = 1; 1.7%) were identified, additionally. Interestingly, in contrast to a similar abundance of isolates carrying carbapenemase genes in 2022 compared to 2019 the relative abundance of the most frequent genes encoding extended spectrum  $\beta$ -lactamases (*bla<sub>CTX-M-9</sub>*, *bla<sub>SHV-12</sub>*, and *bla<sub>CTX-M-15</sub>*) decreased in 2022 (Fig. 1A).

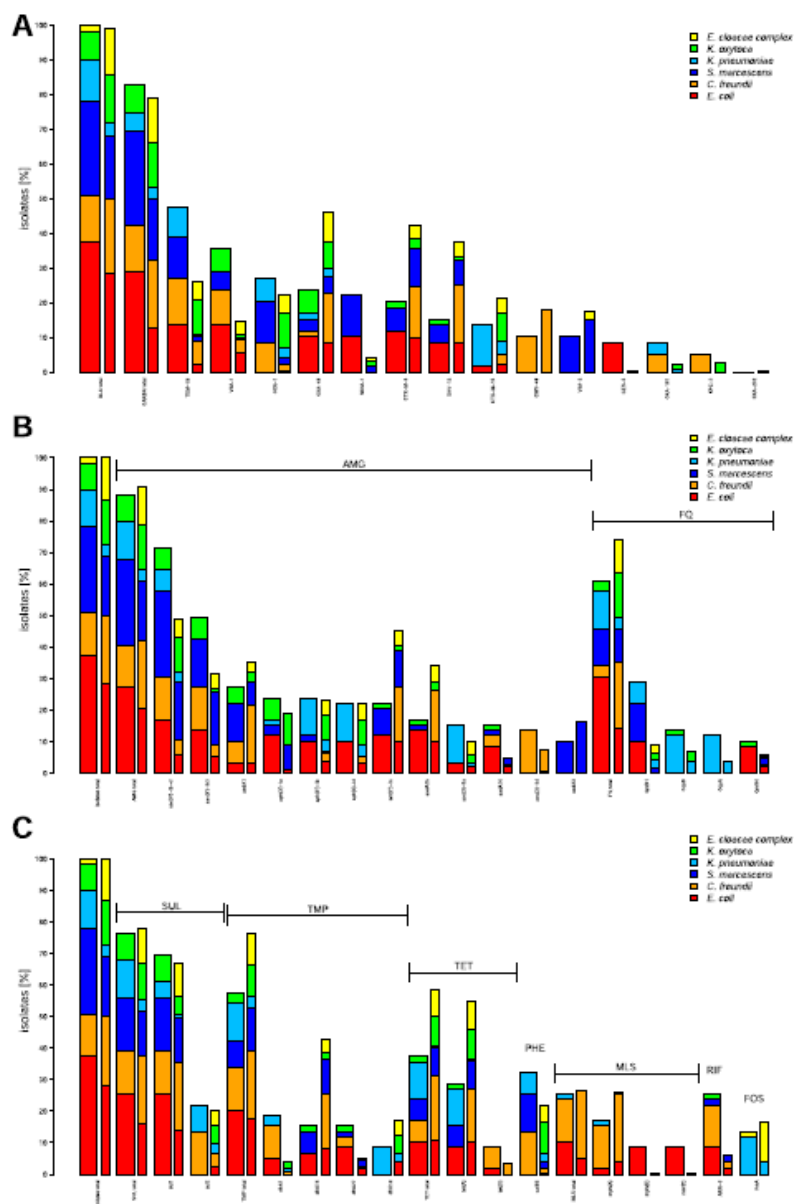
Of the *E. coli* isolates, 17 (77.3%) were carbapenemase positive, with two isolates carrying two carbapenemase genes and three isolates carrying three carbapenemase genes (supplementary figure A.1). Determination of classical MLST sequence types (STs) revealed seven STs for *E. coli* in 2022 (supplementary figure A.2). The most frequent STs were ST635 (n=9), ST409 (n=6), ST224 (n=2) and ST401 (n=2), whereas STs ST38, ST127 and ST131 were identified



# Long time persistence and evolution of carbapenemase-producing *Enterobacterales* in the wastewater of a tertiary care hospital in Germany

L. Carlsen, H. Böttner, M. Christner et al.

Journal of Infection and Public Health 16 (2023) 1142–1148



**Fig. 1.** Relative abundance of resistance genes detected in individual species in 2022 (100%–59, wide bars) and 2019 (100%–240, slim bars). Genes encoding resistance against  $\beta$ -lactams (A), aminoglycosides (AMG), fluoroquinolones (FQ) (B), as well as sulfonamides (SUL), trimethoprim (TMP), tetracyclines (TET), phenicols (PHE), MLS (macrolides, lincosamides, streptogramines), rifampicin (RIF) and fosfomycin (FOS) (C) are displayed. Colors represent the different species. The first bar represents the total number of analyzed isolates. Genes that occurred at least five times in 2022 as well as all detected carbapenemases are displayed.

only once. ST38, ST131, ST401, and ST635 were also observed in 2019. Analysis of clonal relationship by cgMLST revealed three ST635 isolates to be assigned to pre-existing 2019 clusters (Fig. 2A). Six ST635 isolates in 2022 were distinct from preexisting subgroups. Five isolates formed a new cluster with 33 allelic differences and one isolate displayed a distance of 50 alleles to the most closely related isolates, respectively. Interestingly, all isolates of the new cluster carried a *bla*<sub>GES-5</sub> gene, which was not identified in 2019 *E. coli* isolates. The two ST401 isolates of 2022 clustered as a clonal complex

with an isolate from 2019, with only the 2022 isolates possessing *bla*<sub>VIM-1</sub>. Comparison with clinical isolates from the same time period showed no matching clinical isolates to ST635 and ST401 (supplementary figure B). The proportion of *E. coli* ST635 and ST401 in wastewater was 45.6% and 3.3%, respectively, while they were not identified in 193 investigated clinical isolates. The proportion of the common clinical ST131 was 1.1% in the wastewater and 27.5% in the clinical isolates. All other *E. coli* isolates were not clonally related to isolates identified in 2019. The six *bla*<sub>NDM-1</sub>-positive ST409 isolates



figure G.1). The dominant sequence type ST143 (n = 4) was closely related to four isolates from 2019 (Fig. 2D). All ST143 isolates carried a *bla*<sub>CKA-48</sub> gene, with some isolates having another carbapenemase gene, which varies between *bla*<sub>NDM-1</sub> in 2019 and *bla*<sub>VIM-1</sub> in 2022. The fifth *K. oxytoca* isolate in 2022 belonged to ST319 and was clonally closely related to two isolates from 2019 (supplementary figure G.2). Compared to the 2019 isolates, the ST143 2022 isolates had less detectable plasmid replicons, but replicon IncN was only detected in three 2022 isolates (Supplementary Figure C.9). In all three *K. oxytoca* isolates from 2019 with a *bla*<sub>CKA-181</sub> the gene was found on the same contig as the ColKP3 replicon.

The one carbapenemase-negative *E. cloacae* isolate belonged to ST24 (Fig. 2 E; supplementary figure H.1 + H.2), which was the dominant ST in this species in 2019. However, the isolate showed 39 allelic differences to the next related isolate from 2019 and was thus considered genetically distinct. No plasmid replicons could be detected in the 2022 isolate. However, the ST24 isolates from 2019 show diverse replicons as observed for genetically related isolates in other species (Supplementary Figure C.10).

Genes associated with resistance to aminoglycosides, trimethoprim, sulfonamides, fluoroquinolones, and tetracyclines were present in all multiply identified species (Fig. 1 B + C). As detected genes associated with fluoroquinolone resistance mediate only a low level resistance, species with available databases (*E. coli*, *Klebsiella* spp.) were analyzed for the presence of chromosomal mutations associated with fluoroquinolone resistance. Such point mutations could be detected in 52 *E. coli* (57.8%), all *K. pneumoniae* and 20 *K. oxytoca* (51.3%) isolates in both years (supplementary table A). In *E. coli* the most common point mutation was *gyrA*<sub>S80L</sub> (n = 52), followed by *parC*<sub>S80I</sub> (n = 15) and *gyrA*<sub>D87N</sub> (n = 11). In *K. pneumoniae* all 2022 isolates showed the same combination of nine different *acrR* point mutations with 2019 isolates containing additional *ompK36/ompK37* mutations. No point mutations could be detected in the *K. oxytoca* isolates from 2022, whereas 19 isolates from 2019 have multiple *ompK36* mutations and one isolate has a *gyrA*<sub>S83I</sub> point mutation.

Genes indicating resistance against phenicols were observed in all species except *K. oxytoca* and *E. cloacae*, and genes mediating resistance to rifampicin were observed in all species except *K. pneumoniae* and *E. cloacae* (Fig. 1C). Genes associated with resistance against macrolides, lincosamides, and streptogramins (MLS) occurred only in *E. coli*, *C. freundii*, and *K. pneumoniae* (Fig. 1C). Marker genes for fosfomycin resistance were observed only in *K. pneumoniae* and *E. cloacae* (Fig. 1C). Fluctuations in the frequency of individual resistance genes other than carbapenemases between the sampling years were examined more closely and could be attributed to the different individual clones (data not shown).

## Discussion

In the present study, 3rd generation cephalosporin resistant *Enterobacterales* from an identical hospital wastewater source were compared with strains isolated 2.5 years earlier to investigate diversity and evolution. As previously observed, a strong predominance of carbapenemase-producing organisms was observed despite selection only for 3rd generation cephalosporin resistance. Interestingly, the three most common genes encoding extended spectrum β-lactamases in 2019, *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub> and *bla*<sub>CTX-M-15</sub> were observed in a decreased relative abundance in 2022. Additionally, a frequency shift of carbapenemase genes was detected with predominant *bla*<sub>VIM-1</sub> in this study (2022: 37.3%; 2019: 14.6%) replacing *bla*<sub>CKA-48</sub> as the most frequently observed gene before (2019: 46.3%; 2022: 23.7% in).

In *E. coli* ST635 clones were identified as dominant clones at both time points indicating that ST635 might have an advantage and can remain permanently in the wastewater system of the investigated

hospital. ST635 is known to be adapted to wastewater and hospital sinks [28–30], but has also been detected in patients, rivers as well as beef [31–33]. Within ST635 five clusters of clonally closely related isolates with allelic distances of 33 to several hundred different alleles were identified. Two clusters included strains isolated with 2.5 years in distance. As this clone was detected multiple times in hospital wastewater in both sampling years, but was never found in clinical isolates despite consistent routine sequencing of representative clinical 3GCRE, it can be assumed that this clone does not repeatedly enter wastewater from patients as a source. Additionally, as the hospital is the starting point of this sewage line it is more likely that single time points of introduction of ST635 into the wastewater can lead to constant establishment of well adapted ST635 sub-lineages in the wastewater site with obviously low pressure for genetic modification in the genetic backbone. However, in both clusters not all isolates shared identical carbapenemase genes and plasmid replicons within the respective clonally related sub-clusters, indicating loss and/or acquisition of mobile genetic elements. In one cluster of five isolates identified only in 2022 *bla*<sub>CES-5</sub> was observed the first time in *E. coli* isolates at this sampling location. As for this cluster the narrowest distance to the next closest related cluster was only 33 allelic differences this sub-cluster might result from local evolution within the investigated sewer line. If other clusters with up to 179 allelic differences to the next closest strains represent independent introduction to the sewer line or reflects long term local evolution could not be answered. Another clonal complex is formed by two ST401 isolates from 2022 and one closely related 2019 isolate, with only the 2022 isolates possessing a carbapenemase gene. As ST401 was not identified in representative clinical isolates and this sequence type is known to be present in wastewater and hospital sinks [28,29], persistence in the wastewater with uptake of a carbapenemase gene seems to be possible. Other clonal clusters of non-ST635 were detected only at one time point, indicating intermediate introduction of these strains without further persistence. This is corroborated by the observation of unrelated ST38, ST131 and ST224 in 2022 as well as ST10, ST38, ST131 and ST410, which are considered as international epidemic *E. coli* clonal lineages [34].

A second constant motif between the two time points was an unusually high proportion of *C. freundii* in the group of β-glucuronidase positive *Enterobacterales* [8]. However, it remains an open question if the phenotypic expression of β-glucuronidase is itself associated with the observed enrichment of this phenotype, or whether other selection drivers occurring in parallel lead to the enrichment of these clones. Cluster analysis revealed that six *C. freundii* ST22 isolates of 2022 matched to two 2019 isolates, indicating long term persistence of this clone. Interestingly, in this cluster a variable content of carbapenemase genes with up to three different genes in single isolates was observed, indicating horizontal gene transfer in a clone consistent with the location. This was confirmed by the detectable plasmid replicons, which were different in all eight isolates of this cluster, providing evidence for plasmid gain and loss over time. Thereby, three of the ST22 strains isolated in 2022 carried a *bla*<sub>KPC-2</sub> carbapenemase gene, observed the first time in *C. freundii* at this sampling location. Both *bla*<sub>CKA-181</sub> and *bla*<sub>CKA-232</sub> could be located on a ColKP3 plasmid in all *bla*<sub>CKA-181/232</sub>-carrying isolates. As *bla*<sub>CKA-181</sub> and *bla*<sub>CKA-232</sub> each had the same base pair distance from the replicon, the genes are probably located on identical plasmids with one having a point mutation in the *bla*<sub>CKA-181</sub> gene. As a *bla*<sub>CKA-181</sub> gene was also found on the same contig as ColKP3 in the seven *bla*<sub>CKA-181</sub>-carrying isolates from other species, all *bla*<sub>CKA-181/232</sub> genes found in this study could be located on a ColKP3 plasmid, which confirms the 100% association of *bla*<sub>CKA-181</sub> and ColKP3 (supplementary document A).

Six *S. marcescens* isolates could be assigned to the genetically closely related GT1, which was already dominant in 2019. Despite



the 2.5-year time shift, two isolates even lacked allelic differences compared to related isolates from 2019, indicating a high adaption of this clone to the local wastewater with low pressure for genetic modification in the core genome. However, as observed for other species variations in the content of carbapenemase genes indicate horizontal transfer, what could be proven by a wide variety of detectable replicons within closely related and even identical isolates in the GT1 cluster in both years. While *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>VIM-2</sub> and *bla*<sub>OXA-48</sub> were common in both years, *bla*<sub>GES-5</sub> observed in a single isolate in 2019 was lacking in 2022. With comparison of the two populations three new clusters (designated GT2 to GT4) were identified with two clusters (GT2 and GT4) containing isolates from both time points, indicating that also minor clones are persistent in the ecologic niche of this wastewater pipe.

Two *K. pneumoniae* ST147 isolates displayed close clonal relation with two 2019 isolates. This cluster was also described at this hospital as causative for an outbreak in 2014 [8]. *K. pneumoniae* ST147 is a worldwide evolving strain with described occurrence in wastewater [35,36]. Despite the observation of low genetic diversity of ST147 isolates [37], the close relation between clinical isolates from 2014 and 2015 and wastewater isolates from 2019 and 2022 indicate a likely entry in 2014 with persistence for over 7 years. As international described *K. pneumoniae* ST147 strains carry a variety of different carbapenemase genes in epidemiologic studies [11,38] the stable presence of a *bla*<sub>OXA-181</sub> gene in all isolates further corroborates long term persistence of this clone. A loss of plasmids compared to the 2019 isolates was observed, but these plasmids did not appear to confer antibiotic resistance, as all isolates nevertheless possessed the same resistance genes. The *bla*<sub>OXA-181</sub> gene could be located on a ColKP3 replicon in both years.

All *K. oxytoca* isolates identified in 2022 were related to clonal clusters preexisting in 2019. Four ST143 isolates clustered with another four isolates of 2019 carrying at least a *bla*<sub>OXA-48</sub> carbapenemase gene. Three of four 2022 isolates harbored an additional *bla*<sub>VIM-1</sub> gene, whereas two of the 2019 isolates displayed a *bla*<sub>NDM-1</sub> gene as a second determinant, indicating horizontal gene transfer. Overall, fewer replicons were detected in the 2022 isolates than in the 2019 isolates. However, it is noticeable that all three isolates with an additional *bla*<sub>VIM-1</sub> also possessed an additional IncN replicon that was not detected in 2019. It is therefore probable that the *bla*<sub>VIM-1</sub> gene in this clone is localized on an IncN plasmid. The fifth 2022 *K. oxytoca* isolate was clonally related to two ST319 isolates observed in 2019 and all isolates carried a *bla*<sub>VIM-1</sub> gene. For three clonal clusters identified with at least six isolates in 2019 (ST98, ST170, and ST371) no corresponding isolate was observed in 2022, suggesting that although all of these strains were introduced into the wastewater over several days in 2019, this source of introduction was no longer present or at least strongly reduced. In three ST371 isolates from 2019 a *bla*<sub>OXA-181</sub> gene could be detected and located on a ColKP3 plasmid. The single identified *E. cloacae* isolate belonged to ST24, but had 39 different alleles to the next most closely related ST24 from 2019 and thus cannot be considered closely related. Since this ST is known to be pathogenic to humans [39], it can therefore be speculated that the 2022 isolate was introduced into wastewater independently. Yet, a horizontal gene transfer could also be detected in the 2019 isolates with one big cluster of identical isolates that had four different variations of replicon combinations.

Next to  $\beta$ -lactamases, there were also species-specific differences in the frequencies of other antibiotic resistance genes between 2019 and 2022 (Fig. 1B + C). However, those differences can be explained by the different individual clonal lineages in each species, that were either newly added in 2022 or were not identified again. A distinct increase or decrease of these antibiotic resistance genes within clonal clusters could not be observed, so these fluctuations cannot be considered an additional indication of horizontal gene transfer.

This study has some limitations. As all isolates were obtained from selective agar containing cefpodoxime as selective ingredient, this might result in underrepresentation of isolates carrying *bla*<sub>OXA-48</sub>-type carbapenemases without additional cefpodoxime hydrolyzing  $\beta$ -lactamase genes. Also, it must be considered that in 2022 only a qualified sample at one day was analyzed with less included isolates compared to the four sampling days in 2019. Therefore, day-dependent fluctuations as well as persistent isolates of low abundance might have been missed. It has to be noted though that the detected plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes only mediate low-level resistance to the antibiotics and additional point mutations associated with decreased susceptibility against fluoroquinolones could not be analysed for all species. Nevertheless, both a high prevalence of carbapenemase genes as well as the long time persistence of individual clones could be confirmed with our study.

In summary, this study demonstrated that in all *Enterobacterales* species with more than one isolate in 2022 at least one clonal lineage could be confirmed to be persistent over 2.5 years without undergoing major genetic changes in the core genome. A common motif of persistent hospital wastewater adapted clonal lineages appears to be the carriage of plasmids encoding carbapenemase genes. In some persistent clonal lineages, a brisk exchange of resistance genes as well as different plasmid replicon patterns were observed over time, indicating the occurrence of horizontal gene transfer in this environment. A trend for isolates to harbor more than one carbapenemase gene in 2022 was detected, even though no general increase in replicons was detected in the isolates. Hospital wastewater of this tertiary care hospital obviously releases mobile genetic elements encoding carbapenemases continuously to the urban wastewater system. The mechanisms and influencing factors for the evolution of the resident clones as well as the reasons for the selection advantage for individual clonal lineages in the specific ecological niche of hospital wastewater needs to be further investigated in the future.

#### Declaration of Competing Interest

Authors declare no conflict of interest.

#### Acknowledgements

We acknowledge financial support from the Open Access Publication Fund of UKE - Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf and DFG – German Research Foundation.

#### Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.jiph.2023.05.029.

#### References

- [1] Elsa M, Matthieu LD, De Ponfilly Gauthier P, Hanaa B, Rishma A, Emmanuelle C, et al. Impact of systematic screening for AmpC- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacterales* intestinal carriage in intensive care unit patients. *Ann Intensive Care* 2020;10. <https://doi.org/10.1186/s13613-020-00754-9>
- [2] Hoffman T, Lellouche J, Nutman A, Temkin E, Frenk S, Harbarth S, et al. The effect of prophylaxis with ertapenem versus cefuroxime/metronidazole on intestinal carriage of carbapenem-resistant or third-generation-cephalosporin-resistant *Enterobacterales* after colorectal surgery. *Clin Microbiol Infect* 2021;27:1481–7. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.02.002>
- [3] Borer A, Saidel-Odes I, Riesenberk K, Eskira S, Peled N, Nativ R, et al. Attributable Mortality Rate for Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009;30:972–6. <https://doi.org/10.1086/605922>
- [4] Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:1119–25. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq108>
- [5] Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:413–31. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03821.x>

# Long time persistence and evolution of carbapenemase-producing *Enterobacterales* in the wastewater of a tertiary care hospital in Germany

L. Carlsen, H. Böttner, M. Christner et al.

Journal of Infection and Public Health 16 (2023) 1142–1148

- [6] David S, Reuter S, Harris SR, Glasner C, Feltwell T, Argimon S, et al. Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nature* 2019;4:1919–29. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0492-8>.Epidemic
- [7] Kopotsa K, Osei Selyere J, Mbelle NM. Plasmid evolution in carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: a review. *Ann N Y Acad Sci* 2019;1457:61–91. <https://doi.org/10.1111/nyas.14223>
- [8] Carlsen L, Büttner H, Christner M, Franke G, Indenbirken D, Knobling B, et al. High burden and diversity of carbapenemase-producing *Enterobacterales* observed in wastewater of a tertiary care hospital in Germany. *Int J Hyg Environ Health* 2022;242. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2022.113968>
- [9] Perry MR, Lepper HC, McNally L, Wee BA, Munk P, Warr A, et al. Secrets of the hospital underbelly: patterns of abundance of antimicrobial resistance genes in hospital wastewater vary by specific antimicrobial and bacterial family. *Front Microbiol* 2021;12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.703560>
- [10] Sib E, Lenz-Piet F, Barabasch V, Klanke U, Savin M, Hembach N, et al. Bacteria isolated from hospital, municipal and slaughterhouse wastewaters show characteristic, different resistance profiles. *Sci Total Environ* 2020;746. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140894>
- [11] Kehl K, Schallenberg A, Szekat C, Albert C, Sib E, Exner M, et al. Dissemination of carbapenem resistant bacteria from hospital wastewater into the environment. *Sci Total Environ* 2022;806. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151339>
- [12] Kraupner N, Hutinel M, Schumacher K, Gray DA, Genheden M, Fick J, et al. Evidence for selection of multi-resistant *E. coli* by hospital effluent. *Environ Int* 2021;150. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106436>
- [13] Hutinel M, Fick J, Larsson DGJ, Flach CF. Investigating the effects of municipal and hospital wastewaters on horizontal gene transfer. *Environ Pollut* 2021;276. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116733>
- [14] Zhang S, Huang J, Zhao Z, Cao Y, Li B. Hospital wastewater as a reservoir for antibiotic resistance genes: a meta-analysis. *Front Public Health* 2020;8. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.574968>
- [15] White L, Hopkins KL, Meunier D, Perry CL, Pike R, Wilkinson P, et al. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in hospital wastewater: a reservoir that may be unrelated to clinical isolates. *J Hosp Infect* 2016;93:145–51. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2016.03.007>
- [16] Majlander J, Anttila VJ, Nurmi W, Seppälä A, Tiedje J, Muziari W. Routine wastewater-based monitoring of antibiotic resistance in two Finnish hospitals: focus on carbapenem resistance genes and genes associated with bacteria causing hospital-acquired infections. *J Hosp Infect* 2021;117:157–64. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2021.09.008>
- [17] Flach CF, Hutinel M, Razavi M, Ahrén C, Larsson DGJ. Monitoring of hospital sewage shows both promise and limitations as an early-warning system for carbapenemase-producing *Enterobacterales* in a low-prevalence setting. *Water Res* 2021;200. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117261>
- [18] Thomsen MCF, Ahrenfeldt J, Cisneros JLB, Jurtz V, Larsen MV, Hasman H, et al. A bacterial analysis platform: an integrated system for analysing bacterial whole genome sequencing data for clinical diagnostics and surveillance. *PLoS One* 2016;11:1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157718>
- [19] Larsen MV, Cosentino S, Lukjancenko O, Saputra D, Rasmussen S, Hasman H, et al. Benchmarking of methods for genomic taxonomy. *J Clin Microbiol* 2014;52:1529–39. <https://doi.org/10.1128/JCM.02981-13>
- [20] Clausen PTL, Aarestrup FM, Lund O. Rapid and precise alignment of raw reads against redundant databases with KMA. *BMC Bioinforma* 2018;19:307. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2336-6>
- [21] Hasman H, Saputra D, Sichert-Ponten T, Lund O, Svendsen CA, Frimodt-Møller N, et al. Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. *J Clin Microbiol* 2014;52:139–46. <https://doi.org/10.1128/JCM.02452-13>
- [22] Bortolonia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother* 2020;75:3491–500. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>
- [23] Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, et al. BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinforma* 2009;10. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- [24] Zankari E, Allesøe R, Joensen KG, Cavaco LM, Lund O, Aarestrup FM. PointFinder: a novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. *J Antimicrob Chemother* 2017;72:2764–8. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx217>
- [25] Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, et al. In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:3895–903. <https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14>
- [26] Wickham H, François R, Henry L, Müller K. 2019. dplyr: A Grammar of Data Manipulation. R package version 0.8.3 2019.
- [27] van Rossum G, de Boer J. Interactively testing remote servers using the phyton programming language. *CWI Q* 1991;4:283–304.
- [28] Behrznia M, Gordon DM. Molecular and metabolic characteristics of wastewater associated *Escherichia coli* strains. *Environ Microbiol Rep* 2022;14:646–54. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.13076>
- [29] Constantinides B, Chau KK, Phuong Quan T, Rodger G, Andersson MI, Jeffery K, et al. Genomic surveillance of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in hospital sink drains and patients. *Micro Genom* 2020;6:4–16. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000391>
- [30] Zhi S, Banting G, Stothard P, Ashbolt NJ, Checkley S, Meyer K, et al. Evidence for the evolution, clonal expansion and global dissemination of water treatment-resistant naturalized strains of *Escherichia coli* in wastewater. *Water Res* 2019;156:208–22. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.03.024>
- [31] Delgado-Blas JF, Ovejero CM, David S, Montero N, Calero-Caceres W, Garcillan-Barcia MP, et al. Population genomics and antimicrobial resistance dynamics of *Escherichia coli* in wastewater and river environments. *Commun Biol* 2021;4. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01949-x>
- [32] Ludden C, Coll F, Gouliouris T, Restif O, Blane B, Blackwell GA, et al. Defining nosocomial transmission of *Escherichia coli* and antimicrobial resistance genes: a genomic surveillance study. *Lancet Microbe* 2021;2:e472–80. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00117-8](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00117-8)
- [33] Yang X, Tran F, Zhang P, Wang H. Genomic and phenotypic analysis of heat and sanitizer resistance in *Escherichia coli* from beef in relation to the locus of heat resistance. *Appl Environ Microbiol* 2021;87. <https://doi.org/10.1128/AEM.01574-21>
- [34] Fuga B, Sellera FP, Cerdeira L, Esposito F, Cardoso B, Fontana H, et al. 2022. WHO Critical Priority *Escherichia coli* as One Health Challenge for a Post-Pandemic Scenario: Genomic Surveillance and Analysis of Current Trends in Brazil. 2022.
- [35] Guerra AM, Lira A, Lameirão A, Selaru A, Abreu G, Lopes P, et al. Multiplicity of carbapenemase-producers three years after a kpc-3-producing *k. pneumoniae* st147-k64 Hosp Outbreak *Antibiot* 2020;9:1–11. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110806>
- [36] Nüesch-Inderbinen M, Zurfluh K, Stevens MJA, Stephan R. Complete and assembled genome sequence of an NDM-9- and CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* ST147 wastewater isolate from Switzerland. *J Glob Antimicrob Resist* 2018;13:53–4. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.03.001>
- [37] Biedrzycka M, Urbanowicz P, Guzek A, Brisse S, Gniadkowski M, Izdebski R. Dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST147 NDM-1 in Poland, 2015–19. *J Antimicrob Chemother* 2021;76:2538–45. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab207>
- [38] Peirano G, Chen L, Kreiswirth BN, Pitout JDD. Emerging antimicrobial-resistant high-risk *klebsiella pneumoniae* clones ST307 and ST147. *Antimicrob Agents Chemother* 2020;64(1–14).
- [39] Marmor A, Daveson K, Harley D, Coatsworth N, Kennedy K. Two carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* outbreaks detected retrospectively by whole-genome sequencing at an Australian tertiary hospital. *Infect Dis Health* 2020;25:30–3. <https://doi.org/10.1016/j.idh.2019.08.005>

## 5. Multi-resistant *E. coli* in the wastewater systems of Schleswig-Holstein

Laura Carlsen<sup>a</sup>, Kai Wellbrock<sup>b</sup>, Matthias Grottker<sup>b</sup>, Johannes K. Knobloch<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Institute of Medical Microbiology, Virology, and Hygiene, Department for Infection Prevention and Control, University Medical Center Hamburg–Eppendorf, Martinistraße 52, 20246 Hamburg, Germany

<sup>b</sup>Technische Hochschule Lübeck – University of Applied Sciences, Laboratory for Urban Water and Waste Management, Mönkhofer Weg 239, 23562 Lübeck, Germany

\*Corresponding author:

University Medical Center Hamburg-Eppendorf

Institute for Microbiology, Virology and Hygiene,

Martinistraße 52,

20251 Hamburg, Germany;

phone: +4940 7410 51720

mailto: j.knobloch@uke.de

Manuskript ist in Bearbeitung und wird voraussichtlich bis zum 30.11.2023 eingereicht.

## Abstract

The increasing spread of multidrug-resistant bacteria of human or livestock origin via urban waterways can lead to re-transmission to humans through the food chain. However, the influence of the sewage treatment process in wastewater treatment plants (WWTP) on the elimination of specific bacterial clonal lineages and resistance genes is not understood. Therefore, in this study we performed a detailed molecular comparison of 3<sup>rd</sup> generation cephalosporin-resistant *E. coli* (3GCREC) from influent and effluent treated wastewater from four representative municipal WWTPs to further improve the understanding of dissemination pathways. Representative 3GCREC isolated from influent and effluent wastewater in four different WWTPs in northern Germany were characterized in detail by whole genome sequencing. Clonal relatedness was determined using multi locus sequence typing (MLST) as well as core genome MLST. Presence of resistance genes mediating resistance against antibiotics frequently used in human and veterinary treatment as well as plasmid replicons and point mutations mediating resistance to fluoroquinolones were determined from the genomic data. In 172 sequenced isolates 68 different classical sequence types could be determined, with ST10, ST38, ST131 and ST48 being most common. Few clusters with clonally closely related isolates were found within single WWTPs as well as across different WWTPs, but no difference between influent and effluent could be confirmed. Overall resistance genes to eight different antibiotic groups could be detected. A  $\beta$ -lactamase gene was present in 91.9% of the isolates, with members of the *bla*<sub>CTX-M</sub> family being most prominent. Out of 54 phenotypically fluoroquinolone (FQ) resistant isolates, only 11 carried an FQ resistance gene, while a point mutation associated with FQ resistance could be detected in the other 43 isolates. Several plasmid replicons could be determined in isolates from all four WWTPs, with differing replicons even in clonally closely related clusters, giving hint for plasmid uptake and/or loss. Overall the analysis by cgMLST showed a high genetic diversity in all WWTPs with few clonal lineages found in all four WWTPs. The distribution path of individual lines could only be traced in exceptional cases, while the origin of most other clonal lines could not be determined. Neither an enrichment nor an elimination of certain clonal lines could be detected. Various resistance genes and point mutations associated with FQ resistance were detected. Evidence for horizontal gene transfer was also found, which poses an issue with regard to the One Health concept.

## Introduction

The continuous release of antibiotic-resistant bacteria even after the wastewater treatment process is considered a critical One Health issue. The concept of One Health focuses on the emergence, development and spread of antibiotic-resistant microorganisms on a local and global scale. The microbial link between humans, animals and the environment poses a global health risk, as resistance can accumulate and adapt to different niches [1]. Wastewater treatment plant (WWTP) effluents are considered one of the most relevant sources for the introduction of resistance genes and multi-resistant bacteria into adjacent waters and ecosystems [2]. Increasingly, multi-resistant bacteria are introduced into the water cycle through the input of human and animal feces and may be further selected within bacterial populations in the aquatic ecosystem through introduction of antibiotics from different origins. Several studies show that there appears to be an interaction between antibiotics and the development of resistance in aquatic ecosystems [3,4].

Previous studies have shown that 3<sup>rd</sup> generation cephalosporin-resistant *E. coli* (3GCREC) and other resistant *Enterobacterales* can be detected in municipal wastewater and even surface water worldwide [2]. Also in Germany, both resistant *E. coli* isolates carrying various resistance genes and even carbapenem-resistant *Enterobacterales* (CRE) have already been detected in the effluent of wastewater treatment plants [5–7]. In some cases, these resistance genes were still detected after post-treatment by a fourth treatment step (ozone treatment) and were also found in adjacent water systems [2,8]. Even an increase of the abundance of multi-resistant bacteria, including 3GCREC, in wastewater treatment plants was demonstrated in some studies, posing a potential risk not only to the immediate environment and adjacent water systems, but also to WWTP workers [9,10].

In addition to resistance to 3<sup>rd</sup> generation cephalosporins, further resistance to antibiotic groups like fluoroquinolones is also becoming increasingly important [11]. Fluoroquinolones such as ciprofloxacin are usually given for infections with bacteria with existing resistance to 3<sup>rd</sup> generation cephalosporins, so additional resistance in this direction poses a further health risk [12]. In this regard, in some cases, specific resistance genes are not even necessary for bacteria to develop phenotypic resistance to fluoroquinolones. Several point mutations in the genes encoding the target proteins for fluoroquinolone antimicrobial activity are now known to cause resistance in *E. coli* and other species, the majority of which affect the *gyrA*, *parC*, and *parE* genes [13,14]. Genes



mediating resistance to fluoroquinolones as well as resistance mediating point mutations have already been detected in the influent and effluent of wastewater treatment plants [15].

WWTP influent and effluent are increasingly being analyzed for resistance genes and multidrug-resistant bacteria using various methods in order to understand spread of antimicrobial resistance between humans, animals and the environment in the spirit of the One Health concept. However, it is not yet understood how bacterial clonal lineages behave during the wastewater treatment process and whether specific clones can individually accumulate or persist within WWTPs. Therefore, in this study, 3GCREC from four representative WWTPs were characterized on a large scale from both influent and effluent treated wastewaters by whole genome sequencing and investigated for clonal relatedness and the presence of resistance determinants.

## **Material and methods**

### **Selection of representative wastewater treatment plants**

Four municipal wastewater treatment plants were selected whose treatment processes represent a large part of the existing wastewater treatment plants in Schleswig-Holstein and which were located in different regions of the federal state. The selection was made in such a way that after the biological stage (Acc. to the activated sludge process), further process stages (e.g. trickling filters, fixed bed reactors, polishing lagoons) were operated before the effluent wastewater was released into receiving water bodies. Detailed information on each WWTP is provided in Table 1.

**Table 1:** characteristics of the analyzed WWTPs

location	Characteristics of WWTP						
	Design size <sup>1</sup> (PE – population equivalent)	Connection size <sup>2</sup> (PE – population equivalent)	Daily COD-load (kg/d)	Type of treatment	Hydraulic retention time (hours)	Sludge retention time in AST <sup>3</sup> (days)	MLSS <sup>4</sup> (kg/m <sup>2</sup> )
WWTP1	82,500	40,089	4,811	Step-feed denitrification - solid bed reactor – sand filtration	19.3	17.7	2.99
WWTP2	12,600	6,660	663	Sequencing Batch Reactor (SBR) – polishing lagoons	14.5 (SBR)+ 30.7 (polishing lagoons)	25-30	4.34
WWTP3	25,500	10,480	1,253	Step-feed denitrification - solid bed reactor – sand filtration (UV treatment from May to Oct.)	27.2	18.2	3.08
WWTP4	220,000	68,043	8,168	Pre-anoxic zone denitrification process incl. biological P-removal and post-precipitation – sand filtration	20.1	20.3	3.21

<sup>1</sup> Refers to design capacity of WWTP. <sup>2</sup> Refers to actual COD-loading (for 120 g/(COD \* d)). <sup>3</sup> AST – Activated sludge tank. <sup>4</sup> Mixed liquor suspended solids in AST.

### Sampling, identification and antimicrobial susceptibility testing

Investigation of the individual WWTP was performed at different time periods during the study period July 20<sup>th</sup> 2017 to September 27<sup>th</sup> 2017. During seven-day periods for each selected WWTP 24-hour composite samples of influent water (raw sewage) as well as the effluent water were taken using Buehler 3010 stationary automatic water samplers (Hach, Düsseldorf, Germany) at days 1, 2, 5, and 6, as well as days 2, 3, 6 and 7, respectively. The

shift of 24 h between influent and effluent wastewater samples were used to mimic the mean hydraulic retention time of wastewater within the treatment process.

For influent wastewater 100 µl were plated directly on chromID® ESBL agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), whereas for effluent wastewater 50 mL were enriched by filtration using a 0.45 µm cellulose mixed ester filter with 47 mm diameter (EZ-PAK 020, Merck Milipore, Darmstadt, Germany) which was subsequently placed on chromID® ESBL agar. Inoculated media were incubated at 42 °C for 24 h to select the growth of *E. coli*. Pure cultures of up to ten randomly selected β-glucuronidase-producing colonies from each sample were generated and identified by MALDI-TOF mass spectroscopy using a Microflex LT mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) and the BioTyper™ database (Bruker Daltonics). From plates with less than 10 β-glucuronidase-producing colonies all available colonies were purified. An orientational antibiotic susceptibility testing was performed by agar diffusion assays with discs containing ciprofloxacin (CIP, 5 µg), gentamycin (CN, 10 µg), tetracycline (TE, 30 µg) and trimethoprim (TMP, 5 µg) (all antibiotic discs were produced by Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). Inhibition zone diameters were evaluated according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST clinical breakpoints, v 7.1) limits. All 3GCREC isolates were assigned to one of 15 observed resistance phenotypes (Supplementary Table 1).

### **Whole Genome Sequencing and data analysis**

The selection strategy for representative isolates for detailed molecular analysis was to choose one isolate from each resistance type per day and sampling site, if available. In total, 172 3GCREC isolates were included in the genomic analysis (WWTP 1: n = 49; WWTP 2: n = 39; WWTP 3: n = 33; WWTP 4: n = 51). Bacterial genomic DNA from pure cultures was purified using the QIAasymphony® DSP Virus/Pathogen Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) and a QIAasymphony® (Qiagen) instrument. Chromosomal DNA was sheared using a Bioruptor® Pico device (diagenode, Seraing, Belgium). DNA library preparation for sequencing was performed using the NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina (NEB, Ipswich, USA) and NEB Next Multiplex Oligos for Illumina. Concentration of the library pool was measured again with Qubit and fragment lengths distribution of the final libraries was analyzed with the DNA High Sensitivity Chip on an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). The library pool was normalized to 2 nM and

sequenced on the NextSeq500 (Illumina, San Diego, USA) with 2x151 bp in the mid output format. Samples had 1.1 to 4.6 mio reads per sample. Detailed information about sequencing quality can be found in Supplementary Table 2.

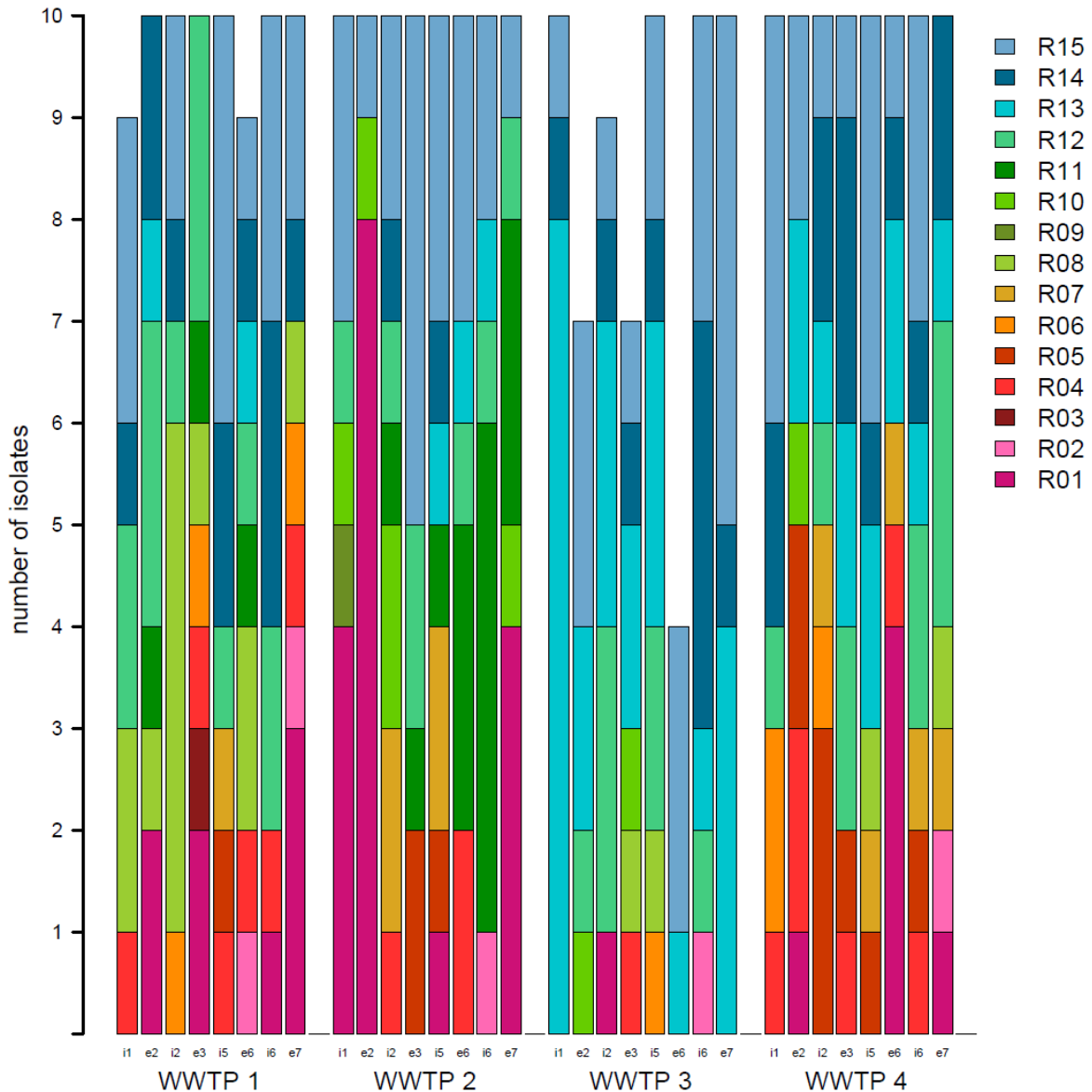
Assembly of sequenced genomes was performed using a Velvet assembler integrated in SeqSphere software (version 1.1.04) (Ridom, Münster, Germany). Analysis by classical multilocus sequence typing (MLST) using the Warwick scheme [16] and core genome multilocus sequence typing (cgMLST) with the published cgMLST scheme was automated after assembly in the software. The threshold for identical isolates was set at 10 different alleles according to the guidelines of Ridom SeqSphere+ [17]. To ensure international comparability, the sequence types of classical Warwick MLST scheme were used for strain designation. Sequences of all isolates are available at BioProject Nr. PRJNA832938.

The sequences were uploaded to the ResFinder [18–20] and Virulence Finder [20–22] pipelines of the Center for Genomic Epidemiology (CGE) [23] to identify the presence of resistance and virulence genes as well as point mutations for fluoroquinolones in all isolates. Also, all isolates that formed genetically closely related clusters were tested for their plasmid replicons using the CGE pipeline PlasmidFinder [20,24]. Descriptive statistics were performed using R (version 3.6.2) and RStudio (version 1.2.5033) with the library dplyr activated [25].

## Results

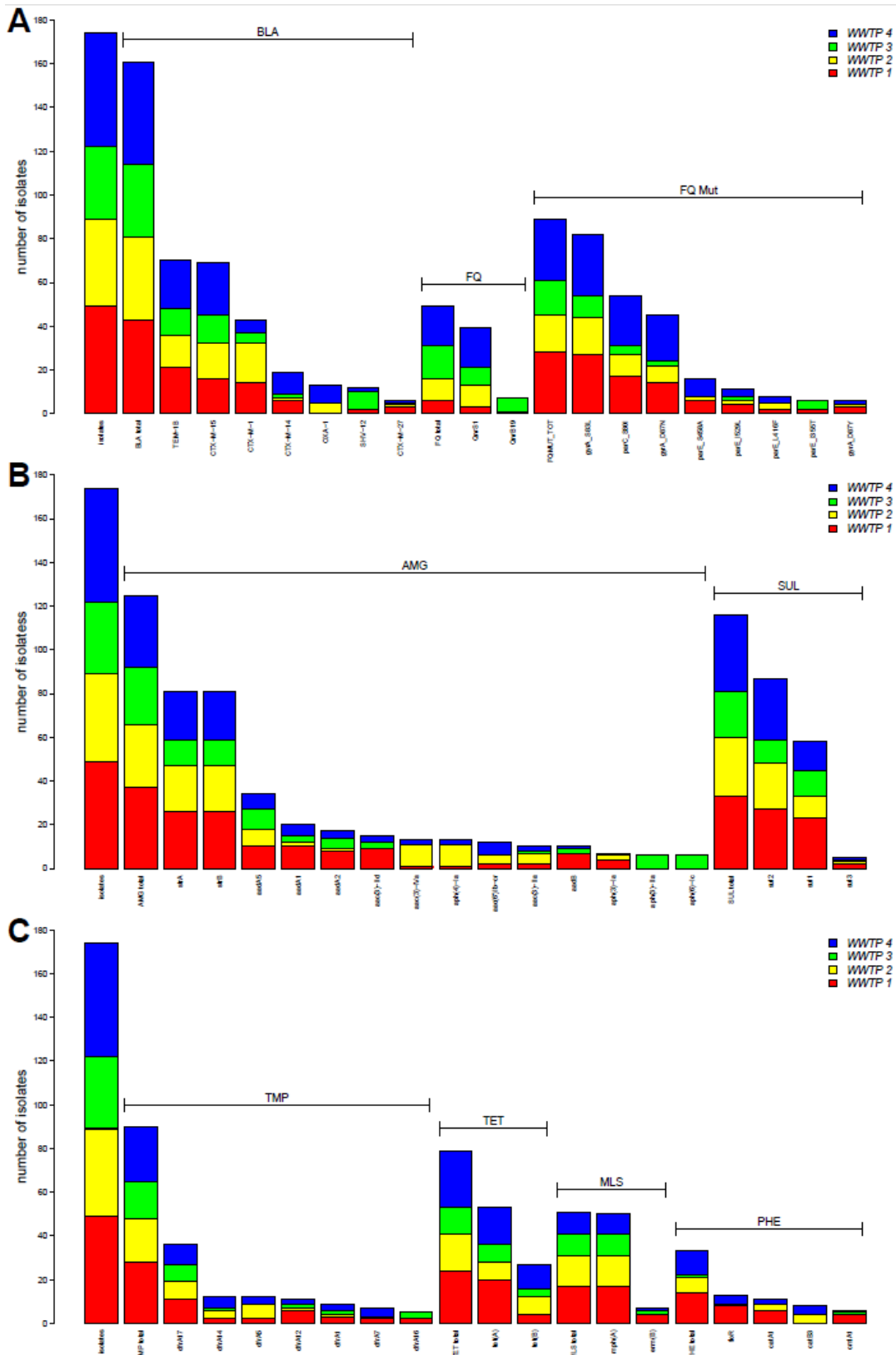
A total of 307 representative  $\beta$ -glucuronidase positive 3<sup>rd</sup> generation cephalosporin-resistant isolates (WWTP 1: n = 78, WWTP 2: n = 80, WWTP 3: n = 67, WWTP 4: n = 80) were randomly isolated. In WWTPs 1 and 3 only 39 and 28  $\beta$ -glucuronidase producing colonies were observed in effluent wastewater samples, respectively. Each one isolate from the influent samples of WWTP 1 and WWTP 3 were identified as *C. freundii* despite the presence of a  $\beta$ -glucuronidase and were therefore excluded from further evaluation. Phenotypic screening of the enclosed 305 *E. coli* revealed additional resistance against trimethoprim, tetracycline, fluoroquinolones (ciprofloxacin) and aminoglycosides (gentamycin) with 154 (50.5 %), 153 (50.2 %), 83 (27.2 %) and 80 (26.2 %) isolates displaying resistant phenotypes, respectively. Depending on the combination of phenotypically resistance, 3GCREC could be divided into 15 different resistance types (R01 to R15). Several resistance types were observed in all tested water samples (Figure

1). Resistance type R15 (lacking additional resistance in 3GCREC) was the most common (n=70) and also was the most frequent phenotype in WWTPs 1 (n=15), 2 (n=20) and 4 (n=16) and the second most common phenotype in WWTP 3 (n=19). Most frequently, a combined resistance against two antibiotic groups at once was detected against trimethoprim and tetracycline (n=36). Isolates with resistance to all antibiotic groups tested (R01) were found 32 times.



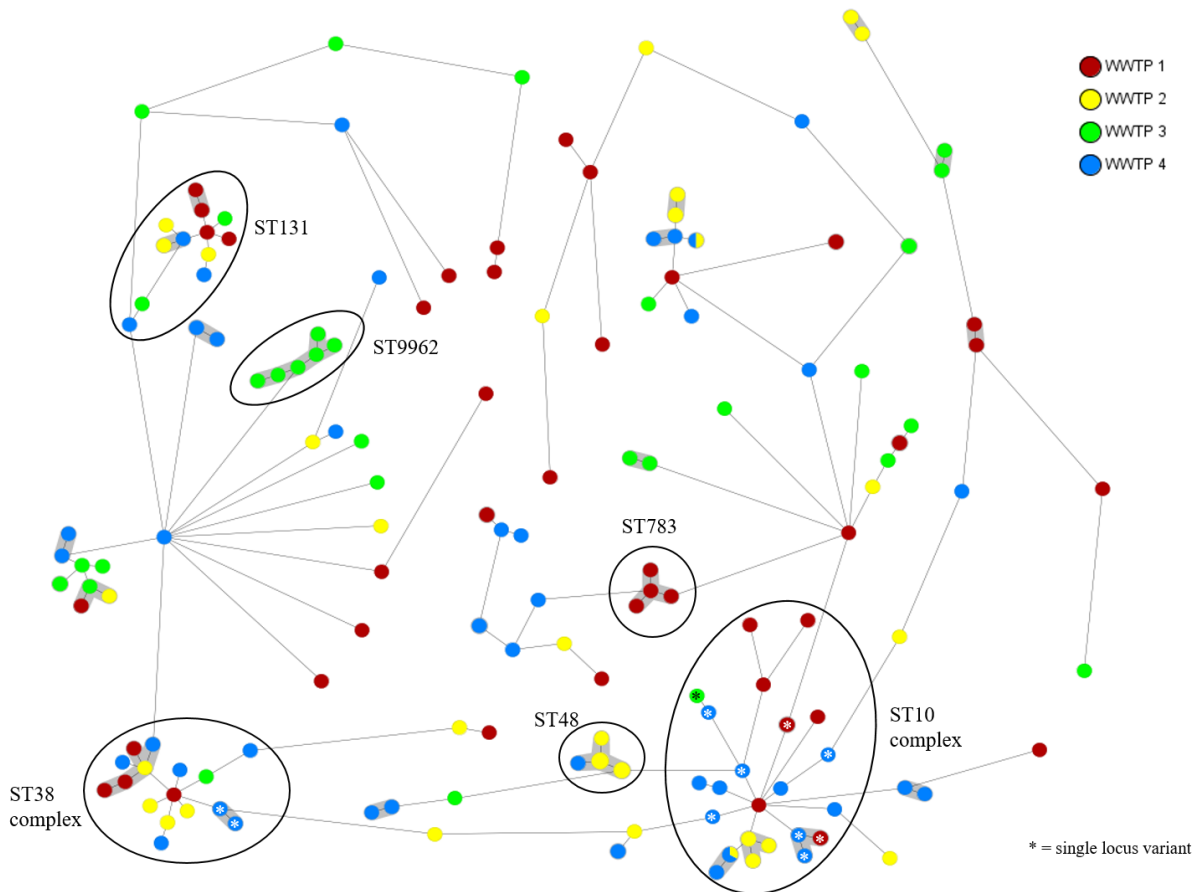
**Figure 1:** Subdivision of all isolates into phenotypic resistance types. If available, ten isolates per day from each WWTP and sampling site were analyzed for their resistance type (R01 – R15). Resistance types displayed in red shades (R01 through R07) contain at least one resistance gene against fluoroquinolones. Missing isolates were either identified as non-*E. coli* (influent) or there were no 10  $\beta$ -glucuronidase producing colonies (effluent).

In the sequenced representative isolates known  $\beta$ -lactamase resistance genes could be detected in 158 (91.9 %) isolates (Figure 2). No carbapenemase genes were observed. Aminoglycoside resistance genes were observed in 123 (71.5 %) isolates, sulfonamide resistance genes in 113 (65.7 %) isolates. Resistance genes for resistance to trimethoprim or Tetracycline were found in 88 (51.2 %) or 77 (44.8 %) isolates, respectively. Genes encoding resistance mechanism against MLS (macrolides, lincosamides, and streptomycins), fluoroquinolones and phenicols were evident in 51 (29.7 %), 47 (27.3 %) and 33 (19.2 %) of the isolates, respectively. Of the isolates with fluoroquinolone resistance genes, 36 showed no phenotypic resistance to ciprofloxacin. Only in 11 of 54 sequenced isolates displaying phenotypic resistance against fluoroquinolones a gene encoding known resistance mechanisms could be detected. Of the other 43 phenotypically resistant isolates, all showed point mutations associated with the occurrence of resistance to fluoroquinolones. With only one exception a combination of at least three different mutations was detected in each isolate. Among these, the most frequently occurring combination of point mutations (n=35) was parC(S80I), gyrA(S83L), and gyrA(D87N), with an additional point mutation of parE(L416F/S458T/S458A/I355T/I529L) in 23 of the isolates. Of the phenotypically fluoroquinolone susceptible isolates (n=119), 40 (33.6%) also displayed at least one point mutation. However, only one of these isolates had the combination of parC(S80I), gyrA(S83L), and gyrA(D87N). The other isolates showed a maximum of 2 point mutations simultaneously.



**Figure 3:** Resistance genes detected in all *E. coli*. Genes encoding resistance against  $\beta$ -lactams, fluoroquinolones (FQ), point mutations associated with FQ resistance (A), aminoglycosides (AMG), sulfonamides (SUL) (B), trimethoprim (TMP), tetracyclines (TET), MLS (macrolides, lincosamides, streptogramins) and phenicols (PHEN) (C) are displayed. Different colors represent the different WWTPs. The first bar represents the total number of analyzed isolates. Only genes that occurred at least five times are displayed.

Seven of all sequenced isolates didn't have any detected resistance genes at all. However, the occurrence of combinations of resistance mechanisms was observed for all substance classes. Among the  $\beta$ -lactamase genes, the blaCTX-M extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) family was observed most frequently (n=146) with blaCTX-M-15 (n=69), blaCTX-M-1 (n=43), blaCTX-M-14 (n=19), blaCTX-M-27 (n=6), blaCTX-M-9 (n=4), blaCTX-M-14b (n=4) and blaCTX-M-55 (n=1). The determination of potential virulence factors in the isolates analyzed by whole genome sequencing showed a specific combination of virulence factors including aggR in four isolates (2.3 %), so that these isolates can be assigned to the group of intestinal pathogenic *E. coli* and the subgroup of enteroaggregative *E. coli* (EAEC).



**Figure 3:** cgMLST analysis of clonal relations in *E. coli* isolates from all WWTPs. Isolates are colored depending on their WWTP origin. Grey shaded clusters show clonally related subgroups according to cgMLST. Single Locus Variants to ST10 and ST38 are marked with a star. Additional information about phenotypic resistance types and genetic distances is displayed in the Supplementary Figure 1.

Typing of sequenced isolates using cgMLST displayed a wide diversity of the isolates (Figure 3) with even several subclusters within the most frequent classical MLST sequence types. In total, 68 different STs (Supplementary Table 2) were detected, with 35 STs



observed only once (singleton sequence types; SSTs). The most common sequence types identified were ST10 (n=16), ST38 (n=14), ST131 (n=12) and ST48 (n=10). Several sequence types were found to be single locus variants (SLVs) to ST10 and ST38 and were further described as ST10 and ST38 complex, respectively. Only few closely related isolates, as determined by cgMLST (less than 10 different alleles; Supplementary Figure 1), were identified in different WWTPs. Five subclusters were identified to have clonal related isolates in two different WWTPs within the ST10 complex (2 subclusters) as well as in ST48, ST131 and ST58, although the isolates in ST58 were completely identical. Two subclusters within the sequence types ST38 and ST69 were identified in three different WWTP. There were seven other pairs of genetically closely related isolates, but each came from the same WWTP. In contrast, other isolates belonging to the same classical ST sometimes showed very strong genetic differences by cgMLST with up to 1051 different alleles in ST10 (Supplementary Figure 1). In most cases, the closely related isolates from the individual wastewater treatment plants originated from the influent and associated effluent (Supplementary Figure 2). Only in a few cases did two closely related isolates belong either exclusively to the influent or effluent. Isolates from the ST10 complex were found in all four WWTPs, with four isolates (ST209) of two different WWTPs being closely related. Isolates from different WWTPs were also determined to be clonally closely related within the ST38 complex and in ST131. Isolates of both sequence types were also found in all four WWTPs. The three sequence types ST48, ST783, and ST9962 all showed very low genetic diversity within their STs according to cgMLST. ST48 occurred only in WWTP 2, displaying two different resistance gene clusters. ST783 and ST9962 were found exclusively in WWTP 1 and WWTP 3, respectively. Of ST9962, exactly one sample was found on each of three of four sampling days in the influent and the associated effluent of the following day (Supplementary Figure 2). Also within the other sequence types no remarkable separation in influent and effluent samples is recognizable.

Resistance genes within ST10 were highly diverse (Supplementary Table 2). Of the ten phenotypically fluoroquinolone-resistant isolates, only three had a resistance gene to fluoroquinolones, but all had the combination of point mutations *parC*(S80I), *gyrA*(S83L), and *gyrA*(D87N). ST38 also shows diverse resistance genes, while ST131 can be divided into two groups with resistance. Both STs have combinations of point mutations in the phenotypically fluoroquinolone-resistant isolates without fluoroquinolone resistance gene. In ST48, two different combinations of resistance genes show up, with five of the isolates

having resistance genes to fluoroquinolones, but also showing up phenotypically non-resistant. All isolates with resistance genes to fluoroquinolones also possessed resistance genes to sulfonamides and trimethoprim. In both ST783 and ST9962, resistance genes are very homogeneously distributed, with ST9962 having fluoroquinolone resistance genes throughout, but phenotypically showing up as non-resistant.

Within the ST10 complex, two clusters were formed from ST10 isolates, as well as two further clusters from the SLVs ST209 and ST44. The isolates of both clusters of ST10 showed homogeneous plasmid replicons (Supplementary Table 2). While four different replicons were detected in the cluster from WWTP 2, the isolates from the WWTP 4 cluster had only one replicon each. The ST209 cluster also showed a difference between the isolates from WWTP 4 with 3 replicons each and the isolates from WWTP1 with one additional replicon. Of the two isolates from the ST44 cluster, one possessed one more replicon than the other. Within the ST38 complex, there were two clusters. For the ST38 isolates, with one exception, no replicons could be identified and the two ST2003 isolates differed in one replicon. In the ST131 two different clusters appeared, one cluster with two isolates from different WWTPs homogeneous replicons, while within the WWTP 1 cluster isolates there was a difference in one replicon. The WWTP 2 specific ST48 formed an entire cluster of all isolates, which could be divided into two clearly distinct groups based on the replicons. In four isolates, which were all genetically identical, the same six replicons were identified, while in all remaining isolates only two replicons could be detected. In the two sequence types ST58 and ST69, three clusters each could be identified, which, with one exception, were homogeneous but different from the other clusters. The clusters of ST783 and ST9962, with one exception, each possessed no, or homogeneous replicons, respectively. The isolates of the clusters of ST46, ST93, ST182, ST226, ST541, and ST3873 each had different replicons, but the clusters consisted of only two or three isolates. All other small clusters with two isolates each belonged to ST90, ST120, ST216, ST410, ST453, ST2067, and ST4981 and each had homogeneous replicons.

## Discussion

In this study, the clonal relation of 3<sup>rd</sup> generation cephalosporin-resistant *E. coli* (3GCREC) was analyzed in comparison of isolates from the influent wastewater and the purified effluent wastewater. During the isolation of  $\beta$ -glucuronidase producing resistant bacteria

*C. freundii* was observed to express  $\beta$ -glucuronidase activity in the influent of two WWTPs, as it can be expected as rare events [26,27]. In contrast, recently a study described a high proportion of  $\beta$ -glucuronidase-producing *C. freundii* in hospital specific wastewater [28].

It should be noted, however, that the isolates were grown on a selective medium from the beginning, which precluded the growth of non-resistant bacteria. The most common non- $\beta$ -lactam phenotypic resistance was observed against trimethoprim and tetracycline, most frequently in combination with each other. Since both groups of antibiotics are used in human and veterinary medicine [29,30], it can be assumed that resistance to these antibiotic groups accumulates upstream of the WWTPs.

Of the 172 isolates sequenced, a  $\beta$ -lactamase gene was identified in only 158, although all isolates were phenotypically 3GCREC. This can be justified by the fact that *E. coli* can also display a resistant phenotype against  $\beta$ -lactams by differential expression of outer membrane porins [31]. Other studies demonstrated an increased load of multiple resistant 3GCREC and even CRE in WWTPs [6,32,33], which could not be confirmed in this study, as a carbapenemase gene could not be detected in any isolate. Nevertheless, resistance genes against aminoglycosides, sulfonamides, trimethoprim, tetracyclines, MLS, phenicols, and fluoroquinolones were observed in addition to  $\beta$ -lactamases, so that overall there is a high diversity in resistance genes. The occurrence of fluoroquinolone resistance is particularly significant as fluoroquinolones such as ciprofloxacin are usually the antibiotic of choice for infections caused by bacteria with existing resistance to 3<sup>rd</sup> generation cephalosporins [12]. For this reason, the separate classification of fluoroquinolone resistant gram-negative bacteria as so-called 3MRGN (triple multidrug-resistant gram-negative) exists in Germany and 3MRGN are being monitored [34]. Of 55 phenotypically fluoroquinolone-resistant isolates, only 12 showed a corresponding resistance gene, while the others (with one exception) showed a combination of point mutations associated with fluoroquinolone resistance. The most commonly found combination of parC(S80I), gyrA(S83L), and gyrA(D87N) is already known to be able to develop phenotypic resistance to ciprofloxacin and has already been detected in *E. coli* both upstream and downstream of a sewage treatment plants [13,14]. Thus, many of the identified 3GCREC show evidence of developing fluoroquinolone resistance despite the absence of resistance genes. Point mutations of the corresponding genes were also detected in some of the phenotypically non-fluoroquinolone-resistant isolates, so that despite the lack of resistance, these isolates can no longer be called wild types and may develop fluoroquinolone resistance more easily

after these first step mutations. Interestingly, of the isolates carrying fluoroquinolone resistance genes, 36 did not show phenotypic resistance to ciprofloxacin, suggesting that these resistance genes may not be expressed in the isolates. *Enterobacterales* with fluoroquinolone resistance genes and susceptible phenotype have been described previously and it has been demonstrated that those different phenotypes are influenced by the linkage or lack of linkage of the according resistance genes to integrons [35].

The clustered occurrence of combined resistance genes to different antibiotic groups again suggests the presence of several different plasmids. Combinations of  $\beta$ -lactamases and aminoglycoside resistance genes, which have already been described as frequent combinations of antibiotic group resistance [36], were particularly common. However, the selective medium must also be considered at this point. Because multiple resistance genes are often located on one plasmid [37], selection for 3GCREC is associated with an increased likelihood for other resistance genes. At the same time, isolates resistant to only one of the other antibiotic groups but not to  $\beta$ -lactams were not considered. In the search for virulence factors, virulence factors associated with biofilm formation were detected in four isolates. Since biofilm formation is common, especially in wastewater [38], there is a possibility that these strains may persist permanently in wastewater, although no evidence of this was found in this study. Longer-term sampling would be required to demonstrate this possibility.

All isolates were analyzed for relatedness using cgMLST. However, to ensure international comparability, the sequence types of the classical MLST scheme were used for strain designation. The occurrence of a total of 66 different sequence types in 172 isolates indicates a high genetic diversity in wastewater associated 3GCREC. Three sequence types and their respective single locus variants (SLV) were identified in all of the investigated WWTPS (ST131, ST10 complex, ST38 complex). In these isolates, the strains could be clearly subdivided by cgMLST with some isolates displaying a distance of several hundred different alleles (Supplementary Figure 1), corroborating the high diversity in wastewater. An analysis by classical MLST without consideration of cgMLST therefore seems to be insufficient for a detailed analysis of wastewater samples along the water pathways. ST10 has been described to be highly diverse [39–41]. Analysis with cgMLST revealed two clusters inside ST10 from two different WWTPs with a difference of 69 alleles to each other (Supplementary Figure 1). Each of those clusters consisted of isolates with homogenous resistance genes and detected plasmid replicons, with the cluster containing

more resistance genes also showing more replicons and thus giving proof for the uptake of plasmid-mediated resistance genes. Since both clusters differ from each other while they show no heterogeneity inside their isolates, the plasmid uptake presumably took place in the catchment of the WWTPs. A similar separation could be observed for the ST10-variant ST209 cluster with varying resistance genes and replicons depending on the WWTP, also indicating a horizontal gene transfer upstream of these WWTPs. In ST10, the combination of point mutations *parC*(S80I), *gyrA*(S83L), and *gyrA*(D87N) was detected in all ten phenotypically fluoroquinolone resistance-positive isolates as well as in all but two non-ST10 isolates of the ST10 complex, which may indicate that this ST is particularly capable of achieving fluoroquinolone resistance through point mutations. Isolates of ST38 were detected in all four WWTPs and showed diverse resistance genes, what fits the description of this sequence type as a global high risk clone [42]. Interestingly, resistance genes against fluoroquinolones could not be detected in any of the phenotypically fluoroquinolone resistant isolates, whereas the two isolates containing resistance genes were phenotypically susceptible, meaning that in this clone the phenotypical resistance to fluoroquinolones seems to be stronger associated with point mutations than with resistance genes. Despite multiple resistance genes inside all ST38 isolates, only for one isolate of the tested clonal cluster a replicon could be identified, meaning the resistance genes are either located on the chromosome or the existing plasmid replicons could not be detected. ST131 is considered the most common extraintestinal pathogenic *E. coli* [43], so the wide distribution in rural Schleswig-Holstein is not surprising. In contrast, this clone was not identified in a recent study investigating 68 3GCREC in hospital wastewater in the neighboring non-rural state of Hamburg [28]. Interestingly, in Hamburg hospital wastewater, wastewater-adapted ST635 was identified as the dominant clone [28], which was not observed in the Schleswig-Holstein WWTP samples. However, it must also be kept in mind that a WWTP has a much larger volume of wastewater than a single hospital and that only single isolates were sequenced. Thus, it cannot be ruled out that ST635 could also be found in a more intensive sequencing of *E. coli* in the WWTPs. Two clonal clusters could be identified in this sequence type, which differ in their resistance genes and replicons but have each homogenous isolates, making a plasmid uptake in the catchment of the WWTP likely for the cluster of WWTP 1 isolates. The sequence types ST48, ST783 and ST9962 were identified for several days only in WWTP 2, WWTP 1, and WWTP 3, respectively. ST48 has been described as pathogenic to humans and animals and has been found in agriculture [44,45], so it can be assumed that there is a specific source of

input for this ST in the catchment of the WWTP. Since all isolates originated from the same WWTP and are genetically closely related, but can be divided into two clearly delineated resistance gene/replicon groups, plasmid uptake by individual isolates of the clone can be assumed. As both detected resistance gene patterns and replicon combinations were found in influent and effluent of the WWTP, horizontal gene transfer in an upstream input source is likely. ST783 has already been found in cattle and sheep [46]. Even if usually no agricultural wastewater should enter municipal wastewater pipes, an exceptional entry cannot be completely ruled out. It has already been demonstrated that there are clonal lineages of *E. coli* that can persist in wastewater permanently without any apparent permanent source of entry [28]. Accordingly, it would be possible that even a single entry of a clone into a wastewater pipe upstream of the wastewater treatment plant would lead to this clone remaining there permanently and being released into the wastewater over long time periods. ST9962 is a SLV of *E. coli* ST738, which was also mainly described in animals.

In ST9962 and ST48, it is notable that both STs have complete and partial resistance genes to fluoroquinolones, respectively, but phenotypically consistently did not show fluoroquinolone resistance. This suggests that these STs may not express some resistance. Nevertheless, it is possible that they can pass their plasmids to other bacteria that express these resistances.

Since all ST48, ST783 and ST9962 were found both in influent and effluent of the respective WWTPs, neither elimination nor relative enrichment of certain STs is observed within the WWTPs. However, due to the sample size of sequenced strains per WWTP, it is not possible to determine whether there may be a slight enrichment of some strains. This would require more intensive screening of influent and effluent samples. Tracing back individual clonal lines back to their entry into the effluent seems to be difficult. However, the sequence types associated with a continuous upstream source of release (ST48, ST783 and ST9962) seem to be more likely associated with livestock as it could be expected for a rural federal state. A high diversity in the presence of resistance determinants has been shown throughout. Particularly striking is the frequent occurrence of point mutations associated with fluoroquinolone resistance, which appear to have resulted in fluoroquinolone resistance in some isolates despite the absence of resistance genes.

#### **Declaration of competing interest**

The project was funded by the Schleswig-Holstein Ministry for Energy Transition, Agriculture, Environment, Nature and Digitalization (MELUND).

### **Acknowledgements**

The authors thank the operating personnel of the participating wastewater treatment plants for their support of the sampling program and for providing data. The authors also thank Malika Heim for organizing the sampling program and data acquisition and analysis, and Frank Blöcker, Sebastian Schlauß, and Crista Villatoro for sampling and sample preparation.

## References

- [1] Aslam B, Khurshid M, Arshad MI, Muzammil S, Rasool M, Yasmeen N, *et al.* Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. *Front Cell Infect Microbiol* 2021;11:771510. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.771510>.
- [2] Jäger T, Hembach N, Elpers C, Wieland A, Alexander J, Hiller C, *et al.* Reduction of Antibiotic Resistant Bacteria During Conventional and Advanced Wastewater Treatment, and the Disseminated Loads Released to the Environment. *Front Microbiol* 2018;9:1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02599>.
- [3] Bürgmann H. Eintrag von Antibiotika und Antibiotika-Resistenzen in Wassersysteme der Schweiz Ein Überblick über die Lage in Bezug auf Antibiotika-Resistenzen und ihre Ausbreitung in die Umwelt. *Prävent Gesundheitsförderung* 2014;185–90. <https://doi.org/10.1007/s11553-014-0444-3>.
- [4] Westphal-Settele K, Konradi S, Balzer F, Schönfeld J, Schmithausen R. The environment as a reservoir for antimicrobial resistance: A growing problem for public health? *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 2018;61:533–42. <https://doi.org/10.1007/s00103-018-2729-8>.
- [5] Hembach N, Schmid F, Alexander J, Hiller C, Rogall ET, Schwartz T. 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 2017;8:1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01282>.
- [6] Müller H, Sib E, Gajdiss M, Klanke U, Lenz-Plet F, Barabasch V, *et al.* Dissemination of multi-resistant Gram-negative bacteria into German wastewater and surface waters. *FEMS Microbiol Ecol* 2018;94:1–11. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy057>.
- [7] Hoffmann M, Fischer MA, Neumann B, Kiesewetter K, Hoffmann I, Werner G, *et al.* Carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in hospital wastewater, wastewater treatment plants and surface waters in a metropolitan area in Germany, 2020. *Sci Total Environ* 2023;890:164179. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164179>.
- [8] Exner M, Schmithausen R, Schreiber C, Bierbaum G, Parcina M, Engelhart S, *et al.* 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. *Hyg Med* 2018;43:D46–54.
- [9] Zielinski W, Korzeniewska E, Harnisz M, Drzymala J, Felis E, Bajkacz S. Wastewater treatment plants as a reservoir of integrase and antibiotic resistance genes – An epidemiological threat to workers and environment. *Environ Int* 2021;156. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106641>.
- [10] Voigt AM, Ciorba P, Döhla M, Exner M, Felder C, Lenz-Plet F, *et al.* The investigation of antibiotic residues, antibiotic resistance genes and antibiotic-resistant organisms in a drinking water reservoir system in Germany. *Int J Hyg Environ Health* 2020;224:113449. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113449>.
- [11] Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJ V. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol* 2014;22:438–45. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.007>.
- [12] Azimi A, Rezaei F, Yaseri M, Jafari S, Rahbar M. Emergence of fluoroquinolone resistance and possible mechanisms in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* from Iran. *Sci Rep* 2021:1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88977-z>.
- [13] Johnning A, Kristiansson E, Fick J, Weijdegard B, Larsson DGJ. Resistance Mutations in *gyrA* and *parC* are Common in *Escherichia* Communities of both Fluoroquinolone-Polluted and Uncontaminated Aquatic Environments. *Front Microbiol* 2015;6:1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01355>.



- [14] Yu X, Zhang D, Song Q. Profiles of *gyrA* Mutations and Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in *Shigella* Isolates with Different Levels of Fluoroquinolone Susceptibility. *Infect Drug Resist* 2020;13:2285–90.
- [15] Kurasam J, Sihag P, Mandal PK, Sarkar S. Presence of fluoroquinolone resistance with persistent occurrence of *gyrA* gene mutations in a municipal wastewater treatment plant in India. *Chemosphere* 2018;211:817–25. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.011>.
- [16] Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, *et al.* Sex and virulence in *Escherichia coli*: An evolutionary perspective. *Mol Microbiol* 2006;60:1136–51. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x>.
- [17] Francisco AP, Bugalho M, Ramirez M, Carriço JA. Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC Bioinformatics* 2009;10:1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-152>.
- [18] Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, *et al.* ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother* 2020;75:3491–500. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>.
- [19] Zankari E, Allesøe R, Joensen KG, Cavaco LM, Lund O, Aarestrup FM. PointFinder: A novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. *J Antimicrob Chemother* 2017;72:2764–8. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx217>.
- [20] Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, *et al.* BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 2009;10. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>.
- [21] Joensen KG, Scheutz F, Lund O, Hasman H, Kaas RS, Nielsen EM, *et al.* Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2014;52:1501–10. <https://doi.org/10.1128/JCM.03617-13>.
- [22] Malberg Tetzschner AM, Johnson JR, Johnston BD, Lund O, Scheutz F. In Silico Genotyping of *Escherichia coli* Isolates for Extraintestinal Virulence Genes by Use of Whole-Genome Sequencing Data 2020;58:1–13. <https://doi.org/10.1128/JCM.01269-20>.
- [23] Thomsen MCF, Ahrenfeldt J, Cisneros JLB, Jurtz V, Larsen MV, Hasman H, *et al.* A bacterial analysis platform: An integrated system for analysing bacterial whole genome sequencing data for clinical diagnostics and surveillance. *PLoS ONE* 2016;11:1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157718>.
- [24] Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, *et al.* In Silico Detection and Typing of Plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:3895–903. <https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14>.
- [25] Wickham H, François R, Henry L, Müller K. dplyr: A Grammar of Data Manipulation. R package version 0.8.3 2019.
- [26] McDaniels AE, Rice EW, Reyes AL, Johnson CH, Haugland RA, Stelma J. Erratum: Confirmational identification of *Escherichia coli*, a comparison of genotypic and phenotypic assays for glutamate decarboxylase and  $\beta$ -D- glucuronidase (*Applied and Environmental Microbiology* (1996) 62:9 (3350- 3354)). *Appl Environ Microbiol* 1996;64:4113. <https://doi.org/10.1128/aem.64.10.4113-4113.1998>.
- [27] Tapsall JW, Mclver CJ.  $\beta$ -d-Glucuronidase activity among prototrophic and auxotrophic variants of *Escherichia coli* and other *Enterobacteriaceae* commonly implicated in urinary tract infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995;22:261–6. [https://doi.org/10.1016/0732-8893\(95\)00097-T](https://doi.org/10.1016/0732-8893(95)00097-T).
- [28] Carlsen L, Büttner H, Christner M, Franke G, Indenbirken D, Knobling B, *et al.* High burden and diversity of carbapenemase-producing *Enterobacterales* observed in wastewater of a tertiary care hospital in Germany. *Int J Hyg Environ Health* 2022;242. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2022.113968>.

- [29] Haulisah NA, Hassan L, Bejo SK, Jajere SM. High Levels of Antibiotic Resistance in Isolates From Diseased Livestock Descriptive Analysis of Clinical Samples 2021;8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.652351>.
- [30] Granados-Chinchilla F, Rodríguez C. Tetracyclines in Food and Feedingstuffs : From Regulation to Analytical Methods , Bacterial Resistance , and Environmental and Health Implications 2017;2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1315497>.
- [31] Khalifa SM, Id AMAE, Hassan R, Abdelmegeed ES.  $\beta$ -lactam resistance associated with  $\beta$ -lactamase production and porin alteration in clinical isolates of *E. coli* and *K. pneumoniae* 2021:1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251594>.
- [32] Czekalski N, Imminger S, Salhi E, Veljkovic M, Kle K, Drissner D, *et al.* Inactivation of Antibiotic Resistant Bacteria and Resistance Genes by Ozone: From Laboratory Experiments to Full-Scale Wastewater Treatment 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02640>.
- [33] Reinke RA, Quach-Cu J, Allison N, Lynch B, Crisostomo C, Padilla M. A method to quantify viable carbapenem resistant gram-negative bacteria in treated and untreated wastewater. *J Microbiol Methods* 2020;179:106070. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106070>.
- [34] Hoffmann M, Kiesewetter K, Hoffmann I, Herbarth O, Lübbert C. Gram-negative bacteria with 3MRGN resistance phenotype in hospital wastewater, receiving water channels, and sewage plant outlets in the Leipzig metropolitan area. *Dtsch Ärztebl Int* 2022. <https://doi.org/10.3238/arztebl.m2022.0278>.
- [35] Andres P, Lucero C, Soler-Bistué A, Guerriero L, Albornoz E, Tran T, *et al.* Differential Distribution of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Clinical Enterobacteria with Unusual Phenotypes of Quinolone Susceptibility from Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:2467–75. <https://doi.org/10.1128/AAC.01615-12>.
- [36] Bodendoerfer E, Marchesi M, Imkamp F, Courvalin P, Böttger EC, Mancini S. in aminoglycoside-non-susceptible *Escherichia coli* isolated in the. *Int J Antimicrob Agents* 2020;56:106019. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106019>.
- [37] Kopotsa K, Osei Sekyere J, Mbelle NM. Plasmid evolution in carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: a review. *Ann N Y Acad Sci* 2019;1457:61–91. <https://doi.org/10.1111/nyas.14223>.
- [38] Huang H, Peng C, Peng P, Lin Y, Zhang X, Ren H. Towards the biofilm characterization and regulation in biological wastewater treatment 2019:1115–29.
- [39] Matamoros S, Hattem JM Van, Arcilla MS, Willemsse N, Melles DC, Penders J, *et al.* Global phylogenetic analysis of *Escherichia coli* and plasmids carrying the mcr-1 gene indicates bacterial diversity but plasmid restriction 2017:1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15539-7>.
- [40] Kamal SM, Lee ACC, Li F, Zaira AJM, Afasizhev R, Tesfaye H, *et al.* RESEARCH ARTICLE A recently isolated human commensal *Escherichia coli* ST10 clone member mediates enhanced thermotolerance and tetrathionate respiration on a P1 phage-derived IncY plasmid 2021:255–71. <https://doi.org/10.1111/mmi.14614>.
- [41] dos Anjos C, Sabino CP, Bueris V, Fernandes MR, Pogliani FC, Lincopan N, *et al.* Antimicrobial blue light inactivation of international clones of multidrug-resistant *Escherichia coli* ST10, ST131 and ST648. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2019;27:51–3. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.05.014>.
- [42] Pitout JDD, Peirano G, Kock MM, Strydom K-A, Matsumura Y. The Global Ascendancy of OXA-48-Type Carbapenemases. *Clin Microbiol Rev* 2020;33:1–48.
- [43] Nicolas-Chanoine M-H, Bertrand X, Madec J. *Escherichia coli* ST131, an Intriguing Clonal Group. *Clin Microbiol Rev* 2014;27:543–74. <https://doi.org/10.1128/CMR.00125-13>.
- [44] Liu Z, Xiao X, Li Y, Liu Y, Li R, Wang Z, *et al.* Emergence of IncX3 Dominated by *Escherichia coli* ST48 in a Goose Farm in Jiangsu , China 2019;10:1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02002>.

- [45] Wang Y, Liu H, Wang Q, Du X, Yu Y, Jiang Y. Journal of Global Antimicrobial Resistance Coexistence of bla KPC-2 – IncN and mcr-1 – IncX4 plasmids in a ST48 *Escherichia coli* strain in China 2020;23:149–53. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.08.023>.
- [46] Wu G, Ehricht R, Mafura M, Stokes M, Smith N, Pritchard GC, *et al.* *Escherichia coli* isolates from extraintestinal organs of livestock animals harbour diverse virulence genes and belong to multiple genetic lineages. Vet Microbiol 2012;160:197–206. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.05.029>.

## 6. Diskussion

### 5.1 Die Persistenz klonaler CRE Linien und horizontaler Gentransfer im Krankenhausabwasser

In der vorliegenden Arbeit wurden die phänotypischen 3GCRE Isolate aus dem Abwasser eines Krankenhauses der Maximalversorgung im Abstand von zwei Jahren im Hinblick auf ihre genetische Diversität und Verwandtschaft, die Persistenz einzelner Klone, sowie vorhandene Antibiotika-Resistenzen hin untersucht und miteinander verglichen.

In beiden Probenahmejahren wurden die Spezies *E. coli*, *C. freundii*, *S. marcescens*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* und *E. cloacae* gefunden, wobei *C. freundii* in beiden Jahren unerwartet als  $\beta$ -Glucuronidase-produzierend auftrat, obwohl auf dem verwendeten Selektivmedium nach Herstellerangaben ausschließlich *E. coli* als  $\beta$ -Glucuronidase-produzierende Spezies zu erwarten gewesen wäre. In einzelnen Fällen sind *C. freundii* mit nachgewiesener  $\beta$ -Glucuronidase (McDaniels *et al.*, 1996; Tapsall & McIver, 1995), sowie mit ungewöhnlichem Farb-Wachstum auf dem hier verwendeten Agar (Réglier-Poupet *et al.*, 2008) bereits beschrieben worden, stellten dabei jedoch Ausnahmen dar. In dieser Arbeit betrug der Anteil von *C. freundii* an allen  $\beta$ -Glucuronidase-produzierenden Isolaten hingegen 43,3 % im Jahr 2019 und 26,7 % im Jahr 2022. Eine mögliche Erklärung ist das gewählte, hauptsächlich für den Einsatz in der Humandiagnostik entwickelte Selektivmedium für die Anzucht von Umweltproben. Weiterhin konnten keine  $\beta$ -Glucosidase-produzierenden *C. freundii* identifiziert werden, welche eigentlich zu erwarten gewesen wären. Es ist jedoch denkbar, dass in diesem Fall lediglich keine  $\beta$ -Glucosidase-produzierenden *C. freundii* von dem Selektivmedium isoliert wurden, da in späteren Analysen abwasserführender Systeme des gleichen Krankenhauses (Daten nicht publiziert) auch  $\beta$ -Glucosidase-produzierende *C. freundii* gefunden wurden. Unklar ist, ob die phänotypische Expression von  $\beta$ -Glucuronidase einen Vorteil für die beobachtete Anreicherung dieser Isolate im Krankenhausabwasser bietet.

In beiden Jahren wurden Resistenzgene gegen elf Antibiotikagruppen gefunden, darunter auch Resistenzgene gegen Fluorchinolone und Carbapeneme. Wie aufgrund der Anzucht der Stämme auf dem gewählten Selektivmedium zu erwarten war, besaßen dabei bis auf zwei Ausnahmen aus dem Jahr 2019 alle Isolate ein  $\beta$ -Laktamase-Gen. Interessanterweise konnte in 79,6 % der Isolate aus 2019 und in 83,1 % der Isolate aus 2022 zudem auch

mindestens ein Carbapenemase-Gen detektiert werden, was besonders im Vergleich mit den deutlich geringeren prozentualen Anteilen Carbapenem-resistenter klinischer Isolate auffällt. So sind beispielsweise regulär weniger als 0,1 % der pathogenen *E. coli* Isolate Carbapenemase-positiv (Schulz-Stübner, 2017) und auch bei den parallel zur Probenahme 2019 untersuchten klinischen 3GCREC konnte nur in 0,6 % der Isolate eine zusätzliche, phänotypische Carbapenem-Resistenz beobachtet werden (Carlsen *et al.*, 2022).

Die drei 2019 häufigsten  $\beta$ -Laktamase-Gene, *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub> und *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, konnten im Jahr 2022 in geringerer relativer Häufigkeit beobachtet werden, während das 2022 häufigste  $\beta$ -Laktamase-Gen, *bla*<sub>TEM-1B</sub>, 2019 deutlich seltener gefunden werden konnte. Auch innerhalb einzelner klonaler Linien konnte diese Verschiebung der Häufigkeiten beobachtet werden, was einen ersten Hinweis auf horizontalen Gentransfer im Abwasser des Krankenhauses liefert. Darüber hinaus wurde eine Häufigkeitsverschiebung der Carbapenemase-Gene festgestellt, wobei *bla*<sub>VIM-1</sub> (2019: 14,6 %; 2022: 37,3 %) im Jahr 2022 *bla*<sub>OXA-48</sub> als zuvor häufigstes Carbapenemase-Gen ablöste (2019: 46,3 %; 2022: 23,7 %). Dabei ist jedoch zu beachten, dass das gewählte Medium Cefpodoxim als selektives  $\beta$ -Laktam-Antibiotikum enthält. Da Carbapenemasen aus der OXA-48 Familie (inklusive OXA-181 und OXA-232) eine geringere hydrolytische Aktivität gegen Drittgenerations-Cephalosporine aufweisen (Pitout *et al.*, 2020), könnten *bla*<sub>OXA-48</sub>-positive Isolate ohne zusätzliche  $\beta$ -Laktamase in dieser Arbeit nicht detektiert worden sein. Somit könnte der beobachtete Rückgang an *bla*<sub>OXA-48</sub>-positiven Isolaten auch durch einen Rückgang an zusätzlichen  $\beta$ -Laktamasen innerhalb *bla*<sub>OXA-48</sub>-positiver Isolate bedingt sein, ohne dass sich der tatsächliche Anteil von *bla*<sub>OXA-48</sub>-positiven Isolaten geändert hat. Zudem besteht die Möglichkeit, dass trotz der bereits sehr hohen Rate an CPE unter 3GCREC in dieser Studie das generelle Vorhandensein von CPE in dem untersuchten Abwasser noch höher ausfällt.

Auch innerhalb der Resistenzgene gegen andere Antibiotikagruppen gab es artspezifische Unterschiede in den Häufigkeiten zwischen beiden Probenahmejahren, welche sich jedoch durch die unterschiedlichen Sequenztypen (ST) jeder Spezies 2019 und 2022 erklären lassen. Eine offensichtliche Zunahme oder Abnahme dieser Resistenzgene innerhalb einer klonalen Linie konnte nicht festgestellt werden. Im Hinblick auf die Fluorchinolone-Resistenzen ist zudem zu beachten, dass die nachgewiesenen plasmidalen Resistenzgene gegen Fluorchinolone nur eine geringe Resistenz gegen diese Antibiotika vermitteln (Gibson *et al.*, 2010) und eine Analyse der mit Fluorchinolone-Resistenz assoziierten Punktmutationen und eventueller Häufigkeitsverschiebungen nur für drei der sechs

Spezies möglich war. Durch die in den Arbeiten gewonnenen Ergebnisse können keine Aussagen zu tagesabhängigen Schwankungen oder Variationen in den Häufigkeiten der Resistenzgene zwischen den beiden Probenahmezeitpunkten getroffen werden. Auch wurden ausschließlich die Resistenzgene der sequenzierten Isolate analysiert. Für eine detailliertere Auswertung möglicher veränderter Häufigkeiten der Carbapenemase-Gene und weiterer Resistenzgene im gesamten Abwasser ist die Etablierung einer quantitativen PCR (qPCR) eine angedachte Lösung. Zukünftig sollen Proben des Krankenhausabwassers über verschiedene Zeiträume und zu unterschiedlichen Tageszeiten entnommen und das Metagenom dieser Abwasserproben mittels qPCR auf die Frequenz einzelner Carbapenemase-Gene, sowie möglicher weiterer Resistenzgene untersucht werden. Denkbar wäre zudem auch eine Metagenom-Sequenzierung des Krankenhausabwassers zu einzelnen, festgelegten Zeitpunkten, um mögliche seltene Carbapenemase-Gene, sowie Resistenzgene nicht kultivierbarer Bakterien finden zu können. Neben den Resistenzgenen gegen verschiedene Antibiotika könnten so auch weitere Gene identifiziert werden, welche mit einer Resistenz oder erhöhten Toleranz von Bakterien gegenüber anderen Stressfaktoren oder Substanzen wie Schwermetallen assoziiert sind.

In beiden Arbeiten konnte ST635 als dominanter Sequenztyp innerhalb der Spezies *E. coli* identifiziert werden, was auf einen möglichen evolutionären Vorteil innerhalb des Abwassersystems hindeutet, durch den ST635 Isolate dauerhaft im Abwassersystem des untersuchten Krankenhauses verbleiben können. Im Jahr 2019 gehörten dabei bis auf vier alle der Carbapenemase-positiven *E. coli* Isolate zu ST635 und auch 2022 machte dieser Sequenztyp mit 52,9 % den überwiegenden Teil der Carbapenemase-positiven *E. coli* Isolate aus. Der hohe Anteil an CPE innerhalb dieser Spezies lässt sich somit zum großen Teil auf das Vorhandensein von ST635 Isolaten zurückführen. Dieser Sequenztyp ist bekanntermaßen an Abwasser und Waschbecken in Krankenhäusern angepasst und zeigt sich als resistent gegen die Abwasserbehandlung in Kläranlagen (Behruznia & Gordon, 2022; Constantinides *et al.*, 2020; Zhi *et al.*, 2019), konnte aber auch in anderen Umgebungen wie klinischen Isolaten, Flüssen und Rindfleisch nachgewiesen werden (Delgado-Blas *et al.*, 2021; Ludden *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2021). Da dieser ST in beiden Probenahmejahren dominant im Krankenhausabwasser nachgewiesen wurde, trotz durchgängiger routinemäßiger Sequenzierung klinischer 3GCRE aus demselben Krankenhaus jedoch nicht in klinischen Isolaten gefunden werden konnte, ist eine

wiederholte Eintragung durch Patienten in das Abwassersystem unwahrscheinlich. Mit dem Krankenhaus als Ausgangspunkt dieses Abwassersystems ist es wahrscheinlicher, dass einzelne Eintragungen von ST635 in das Abwasser zu einer Persistenz von ST635-Klonen innerhalb des Abwassersystems geführt haben, in welchem sie einem geringeren selektiven Druck ausgesetzt sind als andere klonale Linien von *E. coli*.

Innerhalb der ST635 Isolate konnte eine hohe genetische Diversität mit bis zu 179 unterschiedlichen Allelen zwischen zwei Isolaten festgestellt werden. Trotz dieser Diversität ließen sich die meisten Isolate fünf Clustern zuordnen, welche jeweils in sich eine enge klonale Verwandtschaft aufwiesen, sodass eine Selektion einzelner klonaler Linien innerhalb des Sequenztyps möglich ist. Zwei dieser Cluster umfassten Isolate aus beiden Probenahmejahren, welche aufgrund ihrer unterschiedlichen Carbapenemase-Gene und Plasmid-Replikons einen Hinweis auf den Verlust und/oder Erwerb von Plasmiden geben. In einem Cluster von fünf ST635 Isolaten aus 2022 konnte das Carbapenemase-Gen *bla<sub>GES-5</sub>* gefunden werden, welches 2019 nicht in *E. coli* vorkam. Aufgrund der geringen genetischen Differenz von 33 unterschiedlichen Allelen zum nächst verwandten Cluster könnte dieser Cluster auf eine lokale Evolution innerhalb des Abwassersystems zurückzuführen sein. Ob andere Cluster mit bis zu 179 Allel-Unterschieden zu den nächstgelegenen Stämmen eine unabhängige Einführung in die Kanalisation darstellen oder eine langfristige lokale Evolution widerspiegeln, ist unklar. Bereits 2019 konnten in diesem Sequenztyp diverse Carbapenemase-Gene und einzelne Isolate mit zwei Carbapenemase-Genen identifiziert werden. Diese Diversität der Resistenzgene konnte auch 2022 erneut bestätigt und zudem durch die Identifizierung von drei Isolaten mit jeweils drei Carbapenemase-Genen aus verschiedenen Klassen des Ambler-Systems bekräftigt werden. Ein solches gleichzeitiges Auftreten von drei verschiedenen Carbapenemase-Genen innerhalb eines Stamms kommt regulär nur selten vor (Mataseje *et al.*, 2022) und deutet somit auf eine mögliche Akkumulation von Resistenzgenen in den Isolaten des ST635 dieser Studie hin. Durch die möglicherweise verstärkte Affinität zur Plasmidaufnahme dieses Sequenztyps ist es denkbar, dass einzelne Klone des ST635 als eine Art Plasmidreservoir im Abwasser des Krankenhauses verbleiben und eine kontinuierliche Abgabe von Resistenzdeterminaten in das Abwasser zur Folge haben. Eine solche Weitergabe von Resistenzgenen besitzt dabei eine über das Krankenhausabwasser hinausgehende Relevanz, da sie in der aquatischen Umwelt verbreitet werden und auf andere humanpathogene Sequenztypen oder andere Spezies

übertragen werden können. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zu der Resistenz von *E. coli* ST635 konnten anschließend in einer ähnlichen Arbeit in Norddeutschland bestätigt werden, in welcher ebenfalls auffällige *E. coli* ST635 Isolate mit diversen Carbapenemase-Genen im Abwasser mehrerer Krankenhäuser detektiert werden konnten (M. Hoffmann *et al.*, 2023), sodass davon auszugehen ist, dass der auffallend hohe Anteil an Carbapenem-resistenten Isolaten innerhalb des ST635 kein lokales Phänomen des hier untersuchten Krankenhauses darstellt.

In einem direkten Vergleich konnten ein einzelner *E. coli* ST10 aus dem Abwasser und ein klinisches Isolat vom selben Tag als genetisch identisch identifiziert werden. Da dieser Sequenztyp den weltweit dritthäufigsten extraintestinalen, pathogenen *E. coli* (Manges *et al.*, 2019) darstellt, ist eine wiederholte Eintragung in das Krankenhausabwasser zu erwarten. Da dieser ST jedoch nur einmalig und in Übereinstimmung mit einem klinischen Isolat im Abwasser nachgewiesen werden konnte, ist von einem Zufallsfund auszugehen und eine Persistenz dieses ST im Abwasser trotz der erwarteten mehrfachen Eintragungen als nicht wahrscheinlich zu betrachten.

Auch *E. coli* ST401 bildet einen klonalen Komplex mit Isolaten aus beiden Probenahmejahren, von denen ausschließlich die Isolate aus dem Jahr 2022 ein Carbapenemase-Gen und unterschiedliche Plasmid-Replikons besitzen und somit auf einen horizontalen Gentransfer innerhalb des Klons hinweisen. Da ST401 bekanntermaßen in Abwässern und Waschbecken in Krankenhäusern vorkommt (Behruznia & Gordon, 2022; Constantinides *et al.*, 2020), jedoch nicht in repräsentativen klinischen Isolaten im selben Krankenhaus identifiziert werden konnte, ist eine Persistenz im Abwasser mit Plasmid-Aufnahme bzw. -Verlust in der Zeit zwischen 2019 und 2022 wahrscheinlich. Aufgrund der niedrigen Anzahl an Isolaten (ein Isolat 2019, zwei 2022) dieses ST können endgültige Aussagen jedoch nicht getroffen werden. Andere klonale Cluster von weiteren Sequenztypen wurden nur in jeweils einem der beiden Probenahmejahre nachgewiesen, was auf eine zwischenzeitliche Einführung dieser Stämme ohne weitere Persistenz hindeutet.

Innerhalb der *C. freundii* Isolate konnte eine Unterteilung in mehrere Sequenztypen und klonale Linien beobachtet werden, womit mehrere Klone mit ungewöhnlicher  $\beta$ -Glucuronidase parallel im untersuchten Abwasser existieren. Im Gegensatz zu den klinischen 3GCRE Isolaten besaß die große Mehrheit (88,5 % 2019 und 100% 2022) der *C. freundii* Isolate beider Jahre ein Carbapenemase-Gen, wobei die beiden häufigsten



Sequenztypen, ST22 und ST91, bereits als Carbapenemase-produzierende Stämme in Krankenhäusern beschrieben wurden (Villa *et al.*, 2017). Die klonale Verwandtschaft von sechs *C. freundii* ST22-Isolaten aus 2022 und zwei Isolaten aus 2019 lässt auf eine langfristige Persistenz dieses Klons innerhalb des Abwassers schließen. In einem dieser Isolate konnten drei verschiedene Carbapenemase-Genen identifiziert werden, was auf eine hohe Fähigkeit zur Plasmidaufnahme dieses Klons schließen lassen. Im Jahr 2022 wurde in drei ST22 Isolaten zudem ein *bla*<sub>KPC-2</sub>-Gen detektiert, welches 2019 in klonal eng mit dem Isolat verwandten *C. freundii* nicht gefunden werden konnte und vermutlich in der Zeitspanne zwischen beiden Probenahmejahren innerhalb des Abwassers erworben wurde. Sowohl *bla*<sub>OXA-181</sub> als auch *bla*<sub>OXA-232</sub> konnten in allen *bla*<sub>OXA-181/232</sub>-tragenden Isolaten auf einem ColKP3-Plasmid lokalisiert werden. Beide Gene wiesen jedoch jeweils den gleichen Basenpaar-Abstand vom Replikon auf, womit die Möglichkeit von identischen Plasmiden mit einer Punktmutation im *bla*<sub>OXA-181</sub>-Gen besteht. Da sich das *bla*<sub>OXA-181</sub>-Gen ebenfalls in allen sieben *bla*<sub>OXA-181</sub>-tragenden Isolaten anderer Spezies auf demselben *contig* wie das ColKP3-Replikon befand, konnten alle in dieser Studie gefundenen *bla*<sub>OXA-181/232</sub>-Gene auf einem ColKP3-Plasmid lokalisiert werden. Eine weitere Bestätigung dieser Lokalisation ergibt sich zudem durch die errechnete Assoziation von 100 % für die Replikon/Gen-Kombination. Die Kombination aus verschiedenen Carbapenemase-Genen und den detektierten, in allen acht Isolaten verschiedenen Plasmid-Replikons in *C. freundii* ST22 stellen dabei ein deutliches Indiz für eine hohe Rate an Gentransfer innerhalb des Abwassers dar, zumal keine klinischen ST22 Isolate in dem Krankenhaus identifiziert werden konnten und ein wiederholter Eintrag in das Abwasser durch Patienten daher unwahrscheinlich ist.

Auch bei *S. marcescens* konnte ein vielfach höherer Prozentsatz an Isolaten mit zusätzlicher Carbapenem-Resistenz im Abwasser als in den klinischen Isolaten des Krankenhauses festgestellt werden, sodass sich auch hier Hinweise auf eine Akkumulation resistenter Stämme im Abwasser ergeben. Für *S. marcescens* lag zum Zeitpunkt der Auswertung der hier entstandenen Arbeiten kein klassisches MLST-Schema veröffentlicht vor, sodass die Isolate aus beiden Jahren mit Hilfe von cgMLST in neun verschiedene klonale Gruppen aufgeteilt und als Genotypen (GT) bezeichnet wurden. Dem größten klonal verwandten Cluster dieser Spezies, GT1, konnten insgesamt 45 Isolate aus 2019 und 2022 zugeordnet werden, welche teilweise genetisch identisch waren, jedoch mehrere verschiedene Kombinationen an Carbapenemase-Gene besaßen. Es ist daher

anzunehmen, dass sich dieser Klon ohne einen hohen Selektionsdruck zu genetischen Veränderungen über längere Zeit in der Umwelt des Krankenhausabwassers hält und hier Plasmide erwirbt und/oder verliert. Aufgrund der variierenden Resistenzgene nicht nur zwischen den einzelnen Probejahren, sondern ebenso bereits an den einzelnen Tagen 2019, lässt sich zudem auf eine generell erhöhte Rate an horizontalem Gentransfer innerhalb dieses Klons schließen, was auch durch eine Vielzahl von nachweisbaren Replikons innerhalb eng verwandter und sogar identischer Isolate beider Jahre im GT1-Cluster bekräftigt werden konnte. Während *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>VIM-2</sub> und *bla*<sub>OXA-48</sub> in beiden Jahren verbreitet waren, konnte ein Verlust von *bla*<sub>GES-5</sub> im Jahr 2022 im Vergleich zur vorigen Probenahme festgestellt werden. Alle detektierten Replikons des *bla*<sub>GES-5</sub>-positiven Isolats konnten jedoch auch 2022 erneut identifiziert und das Gen somit nicht mit einem spezifischen Plasmid assoziiert werden.

Obwohl die klinischen 3GCRE Isolate im Vergleich mit den anderen Spezies bei *K. pneumoniae* den höchsten Anteil an phänotypischer Carbapenem-Resistenz aufwiesen, war der Anteil an CRE innerhalb der Abwasserisolate vielfach höher. Die identifizierten ST147 Isolate aus beiden Probenahmen und mehreren Probenahmetagen 2019 konnten dabei einem klonalen Cluster aus klinischen Isolaten zugeordnet werden, welche im Zuge eines *K. pneumoniae* Ausbruchs im Winter 2014/2015 innerhalb des untersuchten Krankenhauses gewonnen wurden. *K. pneumoniae* ST147 ist auch bereits in anderen Krankenhäusern als Ausbruchsstamm, sowie als Träger von OXA-48-Carbapenemasen aufgetreten und wird daher auch als Hochrisiko-Klon bezeichnet (Guerra *et al.*, 2020; Peirano *et al.*, 2020; Pitout *et al.*, 2020), konnte aber auch in Abwasserisolaten bereits nachgewiesen und dort mit einer möglichen Persistenz in Verbindung gebracht werden (Kehl *et al.*, 2022; Marutescu *et al.*, 2023; Nüesch-Inderbinnen *et al.*, 2018). Trotz der bekanntermaßen geringen genetischen Vielfalt von ST147-Isolaten (Biedrzycka *et al.*, 2021) deutet die klonale Verwandtschaft mit nur wenigen Allel-Unterschieden zwischen klinischen Isolaten aus den Jahren 2014 und 2015 und Abwasserisolaten aus den Jahren 2019 und 2022 in dieser Arbeit auf einen wahrscheinlichen Eintrag im Jahr 2014 mit einer Persistenz von über 7 Jahren hin. Auch eine wiederholte Einschleppung in das Krankenhausabwassersystem durch verschiedene Patienten kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Dabei ist unklar, in welchem Teil des Krankenhausabwassersystems sich dieser Klon im Falle einer Persistenz befinden könnte, womit auch die Möglichkeit einer Persistenz in Siphons mit der potenziellen Übertragung

auf Patienten nicht endgültig ausgeschlossen werden kann. Die Vermutung einer Langzeit-Persistenz wird auch durch das stabile Vorkommen eines *bla*<sub>OXA-181</sub>-Gens in allen klinischen und allen Abwasser-Isolaten des ST147 bestärkt, da ST147 Stämme weltweit für diverse unterschiedliche Carbapenemase bekannt sind (Kehl *et al.*, 2022; Peirano *et al.*, 2020) und bei multiplen, durch Patienten eingetragenen Isolaten somit auch variierende Carbapenemase-Gene zu erwarten wären. Im Vergleich zu den Isolaten aus dem Jahr 2019 wurde zwar ein Verlust von Plasmiden beobachtet, welche jedoch aufgrund der unveränderten Resistenzgene nicht mit einer vermittelten Antibiotika-Resistenz assoziiert werden können. Das *bla*<sub>OXA-181</sub>-Gen konnte sowohl in den *K. pneumoniae* Isolaten des Abwassers, wie auch in allen klinischen *bla*<sub>OXA-181</sub>-positiven ST147 Isolaten des Ausbruchs (Daten nicht publiziert) auf einem ColKP3-Plasmid lokalisiert werden, sodass es möglich ist, dass sich dieses Plasmid stabil innerhalb des Klons hält. Unklar ist, ob das Plasmid selbst dabei einen Selektionsvorteil für die Persistenz des Klons im Abwasser vermittelt oder ob der Vorteil durch andere Faktoren gegeben ist.

Da im untersuchten Krankenhaus während des Untersuchungszeitraums keine Carbapenem-resistenten klinischen *K. oxytoca* Isolate nachgewiesen wurden, ist der hohe Anteil an Carbapenemase-positiven Isolaten im Abwasser umso auffälliger. Da stromaufwärts der Probenahmestelle nur das Abwasser krankenhauserinterner Gebäude in das Abwassersystem einfließt und ein Rückfluss des Abwassers aufgrund des vorhandenen Gefälles sehr unwahrscheinlich ist, deutet das Vorhandensein von Carbapenemase-produzierenden *K. oxytoca* Isolaten darauf hin, dass entweder einzelne Klone seit ihrer Eintragung sehr langfristig im Abwassersystem verbleiben oder dass Plasmide mit Resistenzgenen von anderen Spezies innerhalb des Abwassersystems erworben wurden. Im Jahr 2022 konnten alle identifizierten *K. oxytoca* Isolate bereits bestehenden klonalen Clustern aus 2019 zugeordnet werden, wobei die Carbapenemase-Gene innerhalb eines Clusters aus ST143 Isolaten zwischen 2019 und 2022 variierten, was sowohl die Aufnahme als auch den Verlust eines Plasmids innerhalb des Klons vermuten lässt. Insgesamt wurden bei den Isolaten aus dem Jahr 2022 weniger Replikons nachgewiesen als bei den Isolaten aus dem Jahr 2019, auffallend ist jedoch, dass alle drei Isolate aus 2022 mit einem zusätzlichen *bla*<sub>VIM-1</sub>-Gen auch ein zusätzliches IncN-Replikon besaßen, welches 2019 nicht nachgewiesen werden konnte. Es ist daher denkbar, dass das *bla*<sub>VIM-1</sub>-Gen in diesem Klon mit einem IncN-Plasmid assoziiert ist. Isolate aus drei klonalen Clustern konnten 2019 jeweils über mehrere Tage hinweg gefunden werden,

wurden jedoch 2022 nicht erneut beobachtet, was nicht auf eine langfristige Persistenz, sondern eine 2019 fortlaufende Eintragungsquelle hinweist, welche 2022 nicht mehr vorhanden war.

2019 konnte der dominante Sequenztyp in *E. cloacae* Komplex als der als Ausbruchsstamm bekannte ST24 (Marmor *et al.*, 2020) identifiziert und in zwei klonale Cluster unterteilt werden. Dabei konnten in beiden Clustern Hinweise auf horizontalen Gentransfer durch das Vorhandensein von zwei bzw. drei verschiedenen Carbapenemase-Gene/Genkombinationen gefunden werden. In dem größeren Cluster konnten Indizien für sowohl eine Plasmid-Aufnahme als auch einen Plasmid-Verlust durch das parallele Vorkommen von *bla*<sub>OXA-48</sub> und *bla*<sub>VIM-1</sub> sowohl in Kombination als auch jeweils einzeln beobachtet werden. Auch in den genetisch identischen Isolaten des ST339 konnte eine Variation im Vorkommen von *bla*<sub>OXA-48</sub> und *bla*<sub>NDM-1</sub> beobachtet werden. Die zeitliche Einordnung von Erwerb und Verlust der Plasmide können in beiden ST jedoch nicht nachvollzogen werden, da die Gene tagesabhängige, unterschiedliche Variationen aufweisen. Unabhängig vom Sequenztyp konnte in allen *E. cloacae* Komplex Isolaten mit einem *bla*<sub>OXA-48</sub>-Gen ein IncL-Plasmid identifiziert werden, welches in den Isolaten ohne *bla*<sub>OXA-48</sub>-Gen nicht vorhanden war, sodass sich *bla*<sub>OXA-48</sub> innerhalb dieser Spezies möglicherweise mit einem IncL-Plasmid assoziieren lässt. Zu der Langzeitpersistenz oder langfristigen Evolution von Carbapenemase-Genen bei *E. cloacae* Komplex lassen sich in dieser Arbeit keine Aussagen treffen, da im zweiten Probenahmejahr nur ein einzelnes *E. cloacae* Komplex Isolat des ST24 ohne Carbapenemase-Gene identifiziert werden konnte, welches keine enge klonale Verwandtschaft zu den Isolaten aus 2019 aufweist. Da der Stamm bekanntermaßen humanpathogen ist (Marmor *et al.*, 2020) und daher in klinischen Isolaten wiederholt zu erwarten ist, ist von einer unabhängigen Eintragung in das Abwasser im Jahr 2022 auszugehen.

Der vermutete horizontale Gentransfer in mehreren der in dieser Arbeit sequenzierten Spezies wird auch durch eine direkte Assoziation von Plasmid-Replikons und Carbapenemase-Genen verdeutlicht. So waren die insgesamt am häufigsten mit *bla*<sub>OXA-48</sub> assoziierten Plasmide in dieser Studie IncL-Plasmide, welche auch bei *E. cloacae* Komplex speziesintern bereits einen deutlichen Zusammenhang zu *bla*<sub>OXA-48</sub> aufzeigten und bekanntermaßen die häufigsten *bla*<sub>OXA-48</sub>-tragenden Plasmide sind (Pitout *et al.*, 2020). Auch das für *bla*<sub>OXA-48</sub> am zweitstärksten assoziierte Plasmid mit IncHI2A-Replikon wurde bereits als bekannter Träger dieses Gens beschrieben (Samuelsen *et al.*, 2018). Das

Fehlen dieser Replikons in einigen der Isolaten lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass *bla*<sub>OXA-48</sub> auch durch IS-Elemente vermittelt chromosomal vorliegen kann (Harada *et al.*, 2021) und dementsprechend nicht zwangsläufig in allen Isolaten auf Plasmiden lokalisiert sein muss. Die höchsten Assoziationen für *bla*<sub>VIM-1</sub>, zwei Plasmide mit IncFIB(K)- und IncM1-Replikon, sind beide bereits als Träger dieses Gens bekannt (Bitar *et al.*, 2023; Heiden *et al.*, 2021), auch wenn in dieser Arbeit die höchste Assoziation lediglich 48 % betrug und eine eindeutige Aussage somit schwer zu treffen ist. Auffällig ist jedoch, dass IncM1 in Isolaten ohne *bla*<sub>VIM-1</sub> nicht gefunden werden konnte und somit möglicherweise eine spezifische Assoziation zu diesem Gen besitzt. Im Gegensatz hierzu konnte das Plasmid mit IncP6-Replikon trotz 85 %-iger Assoziation mit *bla*<sub>VIM-2</sub> auch bei Isolaten ohne *bla*<sub>VIM-2</sub> und auch bei komplett Carbapenemase-negativen Isolaten nachgewiesen werden. Da bei den anderen Carbapenemase-Genen keine oder nur eine niedrige Assoziation (< 20 %) mit diesem Replikon besteht und es somit nicht generell häufig in allen Isolaten vorkommt, ist jedoch trotzdem von einem Zusammenhang des Plasmids und des Gens auszugehen. Interessant ist dabei, dass Plasmide vom IncP6-Typ mit einem *bla*<sub>VIM-2</sub>-Gen zwar bereits in *Pseudomonas* gefunden wurden (Lopes *et al.*, 2022; Urbanowicz *et al.*, 2021), generell aber eher mit *bla*<sub>KPC-2</sub> in Verbindung gebracht werden (Ghiglione *et al.*, 2021; Hu *et al.*, 2019; Ota *et al.*, 2022). Eine falsch positive Kreuz-Assoziation von *bla*<sub>KPC-2</sub>-tragenden IncP6-Plasmiden mit *bla*<sub>VIM-2</sub> kann an dieser Stelle jedoch ebenfalls ausgeschlossen werden, da keine Isolate dieser Arbeit die beiden Gene *bla*<sub>VIM-2</sub> und *bla*<sub>KPC-2</sub> gleichzeitig besaßen. Das *bla*<sub>NDM-1</sub> Gen zeigt hauptsächlich Assoziationen zu Inc-Replikons, mit einer deutlich ausgeprägten Assoziation zu IncFIB(pQil) und IncFII(K), was zu früheren Arbeiten passt, in denen *bla*<sub>NDM-1</sub> bereits auf beiden Plasmiden nachgewiesen werden konnte (H. O. Khalifa *et al.*, 2020; Spaziante *et al.*, 2021). Eine 100 %-ige Assoziation konnte für *bla*<sub>OXA-181</sub> zu ColKP3 festgestellt werden, auf dem das Gen bereits in früheren Arbeiten nachgewiesen wurde (Ragheb *et al.*, 2022). Da *bla*<sub>OXA-181</sub> bei den hier analysierten Isolaten aller Spezies auf dem ColKP3-Plasmid lokalisiert werden konnte, stellen die Assoziationen zu anderen Replikons wahrscheinlich falsch positive Kreuz-Assoziationen dar. Die stärksten Assoziationen für *bla*<sub>KPC-2</sub> waren IncFIB(K) und IncFII(K) mit jeweils 67 %, von denen beide Plasmide bereits als Träger des *bla*<sub>KPC-2</sub>-Gens bekannt sind (Kuzina *et al.*, 2023). Mit Betrachtung der einzelnen Isolate lassen sich hier jedoch keine weiteren Aussagen treffen, da beide Replikons auch häufig in Isolaten ohne *bla*<sub>KPC-2</sub>-Gen detektiert wurden. Für *bla*<sub>GES-5</sub> lassen sich aufgrund der multiplen 83 %-igen

Assoziationen, sowie dem fehlenden Vorkommen eines alleinstehenden *bla*<sub>GES-5</sub>-Gens innerhalb eines Isolats ebenfalls keine eindeutigen Rückschlüsse ziehen.

Da mithilfe der in dieser Arbeit genutzten Methodik der *Short Read* Sequenzierung die zirkuläre DNA von Plasmiden in der Regel nicht vollständig in geschlossener Form zusammengesetzt werden kann (Berbers *et al.*, 2023), können Resistenzgene in den meisten Fällen nicht eindeutig auf Plasmiden lokalisiert werden. Durch die Analyse der nachweisbaren Replikons können jedoch die Anzahl der in den einzelnen Stämmen vorhandenen Plasmide bestimmt und mögliche Übereinstimmungen durch Korrelation von Replikons und Resistenzgenen gefunden werden. Da *bla*<sub>OXA-181</sub> in dieser Studie auf ColKP3 lokalisiert werden konnte, ist davon auszugehen, dass dieses Plasmid vermutlich keine mobilen genetischen Elemente wie IS-Elemente im Bereich zwischen dem Replikon und dem Resistenzgen besitzt, sodass eine Rekonstruktion des Plasmidabschnitts trotz *Short Read* Sequenzierung als Ausnahme möglich war. Für die meisten anderen Gene ergab sich keine 100 %-ige Assoziation mit einem Replikon, was darauf hindeutet, dass diese Gene von mehreren verschiedenen Plasmiden vermittelt werden können. Aufgrund der teilweise niedrigen Anzahl an Genen ist dabei jedoch auch zu beachten, dass sowohl fehlende als auch zufällige Assoziationen bei der Berechnung stärker ins Gewicht fallen. Auch wurde in dieser Arbeit der Übersichtlichkeit halber nur ein Abgleich der Carbapenemase-Gene vorgenommen, während Assoziationen zwischen den Replikons und weiteren Resistenzgenen sowie anderen Genen nicht berücksichtigt wurden. Die eindeutige Zuordnung einzelner Gene zu den Plasmiden wird auch durch das mögliche Vorkommen von Hybridplasmiden oder Plasmiden mit multiplen Replikons (C. Liu *et al.*, 2022; X. Wang *et al.*, 2021), sowie durch mögliche mobile genetische Elemente mit wechselnder Lokalisierung erschwert. In zukünftigen, auf den Ergebnissen dieser Arbeit aufbauenden Untersuchungen des Krankenhausabwassers wird aus diesem Grund die zusätzliche *Long Read* Sequenzierung ausgewählter Isolate als sinnvolles Mittel zur tiefergehenden Analyse der Plasmide und eindeutigen Lokalisierung einzelner Resistenzgene, speziell von Carbapenemase-Genen, betrachtet. Hierbei sollen im ersten Schritt bereits analysierte Isolate mit bekannten Carbapenemase-Genen und Replikons ausgewählt und erneut sequenziert werden. Besonders interessant ist hier die genaue Lokalisation von 2022 neu aufgetretenen, sowie multiplen Carbapenemase-Genen, wie sie bei *E. coli* und *C. freundii* 2022 identifiziert werden konnten. Auch sollen speziesübergreifend mehrfach beobachtete Replikons wie ColKP3 mit Bezug zu einem



möglichen horizontalen Gentransfer zwischen den Spezies neu sequenziert werden. Eine routinemäßige *Long Read* Sequenzierung aller Isolate künftiger Probenahmen des Krankenhausabwassers ist mit Hinblick auf mehrere identifizierte klonale Linien ohne Anzeichen für horizontalen Gentransfer und nicht persistente Linien jedoch nicht uneingeschränkt sinnvoll. Besonders in *E. coli* konnten hauptsächlich klonale Linien eines einzelnen Sequenztyps (ST635) mit einer Persistenz im Abwasser und diversen Carbapenemase-Genen identifiziert werden, während die Isolate anderer Sequenztypen in geringerem Anteil Carbapenemase-Gene besaßen. Ideal wäre daher eine Kombination aus *Short Read* Sequenzierung aller Isolate mit einer zusätzlichen *Long Read* Sequenzierung spezifischer klonaler CPE Linien.

Da bei der nachgewiesenen Persistenz einiger Klone eine Fähigkeit zur Biofilmbildung innerhalb des Abwassersystems naheliegt, wurde ein Biofilm-Assay mit allen Isolaten aus der ersten Abriet 2019 durchgeführt. Ein Großteil der Isolate, darunter auch die meisten *E. coli* ST635 Isolate, zeigte eine leichte oder starke Fähigkeit zur Biofilmbildung. Aufgrund der unterschiedlichen Bedingungen des Laborversuchs und den realen Umweltbedingungen im Abwasser bieten die Ergebnisse des Biofilm-Assays jedoch keine endgültigen Aussagen zur Biofilmausprägung innerhalb des Abwassers. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass *in vitro* biofilm-positive Stämme unter den Bedingungen im Abwasser keinen Biofilm ausbilden. Auch eine Biofilmbildung im Abwasser von *in vitro* biofilm-negativen Stämmen ist möglich, da Umweltstress bekanntermaßen die Biofilmbildung bei verschiedenen Bakterienspezies auslösen kann (Chu *et al.*, 2018; Knobloch *et al.*, 2001, 2004; Nickerson & Faherty, 2018; Yin *et al.*, 2019). Eine solche Stress-induzierte Biofilmbildung wäre eine mögliche Erklärung für die Persistenz der *C. freundii* Isolate, welche im Biofilm-Assay größtenteils als biofilm-negativ aufgefallen sind. Eine künftige Möglichkeit zur weiteren Abklärung einer Stress-induzierten Biofilmbildung wäre eine Wiederholung des Biofilm-Assays unter verschiedenen simulierten Stressbedingungen.

Bei dem Vergleich der beiden Arbeiten muss generell berücksichtigt werden, dass im Jahr 2022 nur eine qualifizierte Stichprobe eines einzelnen Tages genommen und weniger Isolate als im Jahr 2019 analysiert wurden. Tagesabhängige Schwankungen fallen daher 2022 stärker auf und persistente Klone, die nur in geringer Häufigkeit ins Abwasser abgegeben werden, können übersehen werden. Dennoch konnten mehrere klonale Linien mit geringer genetischer Veränderung sowohl kurzzeitig über vier Tage 2019 als auch

langzeitig über einen Zeitraum von 2,5 Jahren hinweg nachgewiesen werden. Dabei konnten deutliche Hinweise auf einen verstärkten horizontalen Gentransfer innerhalb des Krankenhausabwassers durch eine Veränderung der Resistenzgene wie auch der Plasmid-Replikons in mehreren persistenten klonalen Linien gefunden werden. Insgesamt lassen die Ergebnisse dieser beiden Arbeiten den Schluss zu, dass kontinuierlich Resistenzgene in das ablaufende Abwasser abgegeben werden. Da *Enterobacterales* trotz Abwasserreinigung nicht immer vollständig aus dem Abwasser entfernt werden können (Jäger *et al.*, 2018) und einzelne Isolate somit in Oberflächengewässer und von hier über die Lebensmittel- und Wasserkette wieder in den Menschen gelangen können, stellen die nachgewiesenen persistenten CPE Linien und die kontinuierliche genetische Evolution innerhalb des Krankenhausabwassers einen relevanten Faktor für Verbreitung von Antibiotika-Resistenzen in der Umwelt dar. Zur weiteren Analyse der CPE des hier untersuchten Krankenhausabwassers im zeitlichen Verlauf sind weitere Probenahmen angedacht, welche auch erneut Zeiträume von 24h umfassen sollen. In Kombination mit der bereits erwähnten tiefergehenden Analyse von Plasmiden mittels *Long Read* Sequenzierung sowie einer routinemäßigen Überprüfung ausgewählter Resistenzgene des Abwasser-Metagenoms durch qPCR sollen so Ergebnisse zur langfristigen Entwicklung persistenter klonaler CPE Linien innerhalb des Krankenhausabwassers gewonnen werden.

## **5.2 Klonale resistente *E. coli* Linien in Zu- und Ablauf von Kläranlagenabwasser mit einem hohen Anteil Fluorchinolon-resistenter Stämme**

Die klonale Verwandtschaft und Antibiotika-Resistenz von 3GCREC Isolaten aus Zulauf und gereinigtem Ablauf von vier kommunalen, ländlich gelegenen Kläranlagen wurden an vier Tagen analysiert. Dabei wurden trotz selektiver Suche nach *E. coli* auch einzelne  $\beta$ -Glucuronidase-produzierende *C. freundii* auf dem Selektivmedium identifiziert. Die geringe Anzahl entspricht dabei jedoch bereits beschriebenen einzelnen Vorkommen  $\beta$ -Glucuronidase-produzierender *C. freundii* (McDaniels *et al.*, 1996; Tapsall & McIver, 1995) und spiegelt nicht die in den anderen Teilen der Arbeit im Krankenhausabwasser gefundenen hohen Mengen an  $\beta$ -Glucuronidase-produzierenden *C. freundii* (Carlsen *et al.*, 2022, 2023) wieder.

Da nur bei 158 der sequenzierten 172 *E. coli* ein  $\beta$ -Laktamase-Gen identifiziert werden konnte, obwohl alle Isolate eine phänotypisch  $\beta$ -Laktam-Resistenz aufwiesen, ist eine

erworbene phänotypische Resistenz durch andere Resistenzmechanismen, wie die bei *E. coli* bereits beschriebene veränderte Expression von Membranporinen (S. M. Khalifa *et al.*, 2021), wahrscheinlich. Die in mehreren anderen Analysen von 3GCREC in Kläranlagen nachgewiesene erhöhte Belastung mit CRE (H. Müller *et al.*, 2018; Reinke *et al.*, 2020) konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, da in keinem sequenzierten Isolat ein Carbapenemase-Gen identifiziert werden konnte. Dennoch wurden neben  $\beta$ -Laktamasen auch diverse Resistenzgene gegen Aminoglykoside, Sulfonamide, Trimethoprim, Tetracycline, MLS (Makrolide, Lincosamide und Streptogramin), Phenicolle und Fluorchinolone identifiziert, so dass insgesamt eine über 3GCREC hinausgehende Resistenz mehrerer Isolate als 3MRGN sowie variierende Resistenzgene nachgewiesen werden konnte. Von Interesse ist besonders die Identifikation von Fluorchinolon-Resistenzen, da Fluorchinolone in der Regel bei Infektionen mit 3GCREC verordnet werden (Azimi *et al.*, 2021). Dabei konnte in nur zwölf der 55 phänotypisch Fluorchinolon-resistenten Isolaten ein entsprechendes Resistenzgen identifiziert werden, während mit nur einer Ausnahme alle anderen Isolate Punktmutationen besaßen, welche mit einer Resistenz gegen Fluorchinolone assoziiert sind. Die am häufigsten gefundene Kombination an Punktmutationen der Gene *parC*(S80I), *gyrA*(S83L) und *gyrA*(D87N) ist bereits dafür bekannt, dass sie eine phänotypische Resistenz gegen das hier zur phänotypischen Resistenztestung verwendete Antibiotikum Ciprofloxacin vermitteln kann, und konnte bereits in *E. coli* aus Zu- und Ablauf einer anderen Kläranlage nachgewiesen werden (Johnning *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2020). Auch in einigen der phänotypisch nicht Fluorchinolon-resistenten Isolate konnten Punktmutationen der entsprechenden Gene nachgewiesen werden, weshalb sie trotz fehlender Resistenz nicht mehr als Wildtypen bezeichnet werden können. Es ist davon auszugehen, dass diese Isolate mit den vorhandenen Mutationen leichter eine phänotypische Fluorchinolon-Resistenz entwickeln können. Umgekehrt zeigten 36 der Isolate mit nachgewiesenen Fluorchinolon-Resistenzgenen keine phänotypische Resistenz gegen Ciprofloxacin. Möglicherweise ist in diesen Isolaten die durch die Resistenzgene vermittelte Resistenz nicht stark genug, um einen entsprechenden Phänotyp auszubilden.

Neben dem generell hohen Anteil an Isolaten mit weiterführenden Resistenzen fiel zudem das gehäufte Auftreten von kombinierten Resistenzgenen gegen verschiedene Antibiotikagruppen auf, mit der besonders häufigen Kombination von  $\beta$ -Laktamasen und Aminoglykosid-Resistenzgenen, welche auch außerhalb dieser Arbeit bereits als häufige

Kombinationen von Antibiotikagruppen-Resistenzen beschrieben wurden (Bodendoerfer *et al.*, 2020). Jedoch muss das genutzte Selektivmedium berücksichtigt werden, welches spezifisch nach  $\beta$ -Laktamase-positiven Stämmen selektiert und somit jede weitere Gruppe an Resistenzgenen erwartungsgemäß auch die höchste Ko-Existenz mit  $\beta$ -Laktamasen aufweist, während Isolate, die nur gegen eine der anderen Antibiotikagruppen, nicht aber gegen  $\beta$ -Laktame, resistent sind, nicht berücksichtigt wurden. Da sich häufig mehrere Resistenzgene auf einem Plasmid befinden (Kopotsa *et al.*, 2019), ist die Selektion von 3GCREC zudem mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für die gleichzeitige Detektion anderer Resistenzgene verbunden.

Zusätzlich zu den Resistenzgenen konnten bei vier Isolaten Virulenzfaktoren nachgewiesen werden, die mit der Fähigkeit zur Biofilmbildung in Verbindung gebracht werden. Auch wenn in dieser Arbeit nur einzelne Hinweise auf eine Persistenz gefunden werden konnten, ist eine Persistenz durch Biofilmbildung somit dennoch denkbar, zumal Biofilmbildung insbesondere in Abwässern häufig vorkommt (Huang *et al.*, 2019). Zur Abklärung einer vorliegenden Fähigkeit zur Biofilmbildung wäre die künftige Durchführung eines Biofilm-Assays denkbar, wie er auch in der Arbeit zum Krankenhausabwasser (Carlsen *et al.*, 2022) durchgeführt wurde. Die Ergebnisse eines solchen *in vitro* Biofilm-Assays könnten nicht uneingeschränkt auf die Bedingungen im Kläranlagenabwasser übertragen werden, würden jedoch Hinweise zur generellen Fähigkeit der Bakterien zur phänotypischen Biofilmbildung liefern.

Insgesamt konnte eine hohe genetische Vielfalt der abwasserassoziierten 3GCREC mit 66 verschiedenen Sequenztypen in 172 sequenzierten Isolaten festgestellt werden, von denen drei Sequenztypen (ST10 Komplex, ST38 Komplex, ST131) inklusive ihrer jeweiligen *Single Locus Variants* (SLV) in allen vier untersuchten Kläranlagen gefunden werden konnten. Auch innerhalb einzelner Sequenztypen existierten bis zu 1051 unterschiedliche Allele zwischen zwei Isolaten desselben ST, was die Notwendigkeit einer Analyse mittels cgMLST zusätzlich zur Unterteilung in klassische MLST Schemata hervorhebt. Der am häufigsten gefundene ST10 wurde bereits als hoch divers beschrieben (dos Anjos *et al.*, 2019; Kamal *et al.*, 2021; Matamoros *et al.*, 2017), dennoch konnten neben mehreren Isolaten ohne engen genetischen Bezug zueinander auch zwei Cluster mit drei bzw. vier genetisch eng verwandten Isolaten aus jeweils einer Kläranlage identifiziert werden. In beiden Clustern konnten in den Isolaten jeweils homogene Resistenzgene und Plasmid-Replikons identifiziert werden, wobei der Cluster mit der größeren Anzahl

Resistenzgene auch mehr Replikons besaß, was auf eine größtenteils plasmidvermittelte Resistenz in diesen Isolaten hinweist. Da die Resistenzgene und Replikons der Isolate eines Clusters jeweils homogen auftreten, fand die Plasmid-Aufnahme vermutlich im Einzugsgebiet der Kläranlagen statt. Ein ähnlicher Hinweis auf einen horizontalen Gentransfer stromaufwärts der Kläranlage konnte bei ST209, einem SLV zu ST10, beobachtet werden, bei dem ebenfalls eine kläranlagenspezifische Homogenität der Resistenzgene und Replikons nachgewiesen wurden.

Es konnte eine Kombination der mit Fluorchinolon-Resistenz assoziierten Punktmutationen der Gene *parC*(S80I), *gyrA*(S83L) und *gyrA*(D87N) in allen zehn phänotypisch Fluorchinolon-resistenten ST10 Isolaten sowie in allen bis auf zwei weiteren Isolaten des ST10-Komplexes nachgewiesen werden, obgleich Resistenzgene gegen Fluorchinolone in diesen Isolaten nur sporadisch identifiziert werden konnten. Auch besaßen 21 Isolate mit Fluorchinolon-Resistenzgenen keine phänotypische Resistenz gegenüber Ciprofloxacin, sodass innerhalb dieses Sequenztyps eine phänotypische Fluorchinolon-Resistenz stärker mit Punktmutationen als mit Resistenzgenen assoziiert ist. Eine solche verstärkt durch Punktmutationen vermittelte Fluorchinolon-Resistenz konnte ebenfalls in den Isolaten des ST38 festgestellt werden, welche zudem in allen vier Kläranlagen verschiedene Resistenzgene aufwiesen und somit ihrer Beschreibung als Hoch-Risiko-Klon (Pitout *et al.*, 2020) entsprechen. Trotz multipler Resistenzgene in allen ST38-Isolaten konnte jedoch nur in einem Isolat des untersuchten klonalen Clusters ein Plasmid-Replikon identifiziert werden, weshalb die Resistenzgene innerhalb dieses Klons entweder chromosomal oder durch mobile genetische Elemente vermittelt vorliegen oder die vorhandenen Plasmid-Replikons nicht nachgewiesen werden konnten. Für die erste Möglichkeit spricht dabei die bereits bekannte hauptsächlich chromosomale Lokalisation des in diesem Sequenztyp dominanten  $\beta$ -Laktamase-Gens *bla*<sub>CTX-M-15</sub> in aus Gewässern isolierten *E. coli* (Gomi *et al.*, 2022).

Ein weiterer häufig identifizierter Sequenztyp dieser Arbeit war ST131, welcher als der häufigste extraintestinale pathogene *E. coli* gilt (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2014) und die weite Verbreitung innerhalb der Kläranlagen somit erklärt. Innerhalb des ST131 scheint für den Cluster aus Isolaten der Kläranlage 1 eine Plasmid-Aufnahme im Einzugsgebiet dieser Kläranlage wahrscheinlich, da beide Isolate homogene Resistenzgene und Replikons aufweisen, welche sich im Vergleich mit den Isolaten des zweiten ST131 Clusters jedoch unterscheiden. Interessanterweise konnte dieser ST in dem Krankenhausabwasser der

beiden anderen Arbeiten nicht entdeckt werden (Carlsen *et al.*, 2022, 2023), obwohl dort die Eintragung an humanpathogenen Stämmen erwartungsgemäß deutlich größer sein müsste als in ländlichen Kläranlagen. Gleichzeitig konnte der im Krankenhausabwasser dominante ST635 in dieser Arbeit nicht identifiziert werden, obwohl er spezifisch mit Kläranlagen assoziiert wird (Behruznia & Gordon, 2022; Constantinides *et al.*, 2020; Zhi *et al.*, 2019). Es muss jedoch bedacht werden, dass das Abwasser einer Kläranlage ein bedeutend größeres Volumen umfasst als das Abwasser eines einzelnen Krankenhauses. Auch wurden nur einzelne Isolate sequenziert, sodass nicht auszuschließen ist, dass ST635 bei einer intensiveren Sequenzierung von *E. coli* in den Kläranlagen gefunden werden könnte.

In den drei Sequenztypen ST48, ST783 und ST9962 konnten Hinweise auf kläranlagenspezifische, persistente klonale Linien gefunden werden, da jeweils eng verwandte Isolate über mehrere Tage hinweg in jeweils nur einer einzelnen Kläranlage identifiziert werden konnten. *E. coli* ST783 wurde bei Rindern und Schafen beschrieben (Wu *et al.*, 2012) und konnte in dieser Arbeit nur in Kläranlage 1 gefunden werden, was auf einen Viehbetrieb im Einzugsgebiet dieser Kläranlage als Eintragsquelle hindeutet. Auch wenn regulär keine landwirtschaftlichen Abwässer in kommunale Abwasserleitungen gelangen sollten, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass in Ausnahmefällen eine Eintragung erfolgt. So konnte in der ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Analyse des Krankenhausabwassers (Carlsen *et al.*, 2022, 2023) bereits nachgewiesen werden, dass einzelne klonale Linien von *E. coli* auch ohne dauerhafte Eintragsquelle die Fähigkeit zur langfristigen Persistenz in Abwassersystemen besitzen können. Demnach wäre ein einziger Eintrag eines Klons in eine Abwasserleitung stromaufwärts der Kläranlage möglicherweise ausreichend, um diesem Klon eine dauerhafte Persistenz innerhalb der Kläranlage zu ermöglichen.

Auch für den in Kläranlage 2 gefundenen ST48 kann eine spezifische Eintragsquelle aus dem ländlich geprägten Einzugsgebiet der Kläranlage nicht ausgeschlossen werden, da er als für Mensch und Tiere pathogener Stamm bekannt ist und ebenfalls in der Landwirtschaft gefunden wurde (Z. Liu *et al.*, 2019; Y. Wang *et al.*, 2020). Alle Isolate wurden in derselben Kläranlage identifiziert und weisen eine enge klonale Verwandtschaft mit zwei klar differenzierbaren Mustern unterschiedlicher Resistenzgene und Replikons auf, womit Hinweise auf einen horizontalen Gentransfer gegeben sind. Als Ort dieses Gentransfers ist dabei eine der Kläranlage vorgelagerte Stelle des Abwassersystems zu



vermuten, da beide nachgewiesenen Muster von Resistenzgenen und Replikons sowohl im Zulauf, als auch im Ablauf der Kläranlage gefunden wurden und ein Plasmid-Transfer innerhalb der Kläranlage somit unwahrscheinlich ist.

Bei allen ST48 und ST9962 Isolaten konnten Resistenzgene gegen Fluorchinolone detektiert werden, obwohl die Isolate keine phänotypische Fluorchinolon-Resistenz aufwiesen. Die detektierten Resistenzgene vermitteln jedoch bekanntermaßen nur eine gering ausgeprägte phänotypische Fluorchinolon-Resistenz (Gibson *et al.*, 2010). Zudem konnte die in den Isolaten des Krankenhausabwassers mit einer phänotypischen Resistenz assoziierte Kombination an Punktmutationen (Carlsen *et al.*, 2023) in keinem der Isolate identifiziert werden.

Da alle kläranlagenspezifischen Klone sowohl im Zufluss als auch im Abfluss der jeweiligen Kläranlagen identifiziert werden konnten, ist weder eine deutliche Eliminierung noch eine relative Anreicherung bestimmter Sequenztypen innerhalb der Kläranlagen zu beobachten. Ob möglicherweise eine leichte Anreicherung einiger Stämme vorliegt, lässt sich aufgrund des Stichprobenumfangs der sequenzierten Stämme pro Kläranlage nicht sagen. Um eine solche leichte Anreicherung nachzuweisen, wäre ein intensiveres Screening von Zu- und Ablaufproben der jeweiligen Kläranlage notwendig. Ein Screening mit weiteren Probenahmestellen stromaufwärts der Kläranlagen könnte zudem auch weitere Rückschlüsse zur Rückverfolgung einzelner klonaler Linien sowie den Ursprüngen des horizontalen Gentransfers innerhalb der Abwassersysteme zulassen. Aufgrund der zeitlichen Differenz wären weitere Probenahmen jedoch nur in Kombination mit einer erneuten Beprobung der Kläranlagen selbst zu kombinieren. Eine weitere Alternative für weiterführende Analysen des Kläranlagenabwassers ist eine mögliche Vorselektion der zu sequenzierenden Gesamtgenome anhand einer MLST-Bestimmung der Isolate wie bei Kehl *et al.* (Kehl *et al.*, 2022), um eine spezifischere Fokussierung auf wiederholt vorkommende Sequenztypen zu gewährleisten.

Bei der Analyse der Kläranlagen wurde ausschließlich *E. coli* als Modellorganismus zur Analyse von möglichen Multi-Resistenzen bei *Enterobacterales* betrachtet. In Anbetracht der Ergebnisse aus der Analyse des Krankenhausabwassers (Carlsen *et al.*, 2022, 2023) stellt sich jedoch die Frage, ob *E. coli* für die Detektion möglicher Carbapenemasen als Modellorganismus optimal geeignet ist. Innerhalb des Krankenhausabwassers zeigte *E. coli* von allen Spezies den niedrigsten Anteil an Carbapenemase-positiven Isolaten, von denen zudem der große Teil einem einzigen Sequenztyp, ST635, zugeordnet werden

konnte. Außerhalb dieses im Krankenhausabwasser dominanten ST besaßen hingegen die meisten *E. coli* Isolate keine Resistenzgene gegen Carbapeneme, während alle anderen untersuchten Spezies eine sehr hohe Rate an Carbapenemase-positiven Isolaten besaßen. Es ist daher denkbar, dass das vollständige Fehlen von Carbapenemase-Genen bei der Analyse des Kläranlagenabwassers auf das Fehlen von ST635 Isolaten in dieser Studie zurückzuführen ist und möglicherweise keine repräsentative Übersicht über das Vorkommen von Carbapenemase-Genen in anderen *Enterobacterales* Spezies innerhalb dieser Kläranlagen bietet. Bei zukünftigen Analysen von multi-resistenten *Enterobacterales* innerhalb abwasserführender Systeme sollte deshalb in Betracht gezogen werden, eine weitere Spezies neben *E. coli* ebenfalls zu analysieren, um speziesabhängige Unterschiede feststellen zu können.

In den hier entstandenen Arbeiten konnten mehrere persistente, klonale Linien multi-resistenter *Enterobacterales* in Abwassersystemen identifiziert werden. Besonders die zahlreichen Hinweise auf horizontalen Gentransfer und multiple Carbapenemase-Gene liefern dabei relevante Erkenntnisse zur Resistenzforschung in abwasserführenden Systemen Norddeutschlands. Basierend auf den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen sind weitere Probenahmen des Krankenhausabwassers mit besonderem Hinblick auf die nachgewiesenen persistenten CPE Linien angedacht. Auch ist geplant, die Plasmide einzelner Isolate mittels *Long Read* Sequenzierung zu analysieren und plasmidale Resistenzgene zu lokalisieren. Weiterhin soll eine quantitative PCR etabliert werden, um ausgewählte Resistenzgene im Krankenhausabwasser im zeitlichen Verlauf quantifizieren und Veränderungen in Vorkommen und Häufigkeit detektieren zu können.

## Danksagung

Im Verlauf dieser Arbeit haben mich zahlreiche Menschen auf verschiedenste Weise unterstützt und so zu der Entstehung dieser Arbeit beigetragen. Mein größter Dank geht an meinen Betreuer Prof. Dr. Johannes Knobloch, der mir die Durchführung meiner Arbeit in seiner Arbeitsgruppe ermöglicht hat und mir bei jeder Frage und jedem Problem mit seinem Rat und mit immer guter Laune zur Seite stand. Auch bei Prof. Dr. Wolfgang Streit möchte ich mich herzlich dafür bedanken, dass er sich bereit erklärt hat, meine Arbeit von der Universität Hamburg aus zu betreuen und dass er sich immer die Zeit für beratende Gespräche genommen hat.

Dem gesamten Team der Krankenhaushygiene am UKE möchte ich für die unglaublich herzliche Aufnahme ins Team und die tolle Arbeitsatmosphäre danken. Besonders Birte Knobling danke ich für ihren fachlichen Rat und dafür, dass sie sich meine Sorgen auch noch bei der zehnten Wiederholung angehört hat. Tatjana Dill und Rieke Hinrichs möchte ich gerne für die großartige Unterstützung bei den praktischen Arbeiten im Labor danken. Leider kann ich nicht alle Team-Mitglieder namentlich nennen, aber auch allen anderen Kolleginnen und Kollegen aus dem Labor und dem Büro möchte ich für ihre vielfältige Hilfe während der letzten vier Jahre danken.

Ein besonderer Dank geht auch an meine Familie und meine Freunde, die mich während der gesamten Zeit emotional unterstützt, von Freude bis Frustration alle Gemütszustände mit mir durchlebt und trotzdem immer an mich geglaubt haben.

## Literaturverzeichnis

- Afsharikhah, S., Ghanbarpour, R., Mohseni, P., Adib, N., Bagheri, M., & Jajarmi, M. (2023). High prevalence of  $\beta$ -lactam and fluoroquinolone resistance in various phylotypes of *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in Jiroft city, Iran. *BMC Microbiology*, *23*(1), 114. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02860-7>
- Armstrong, T., Fenn, S. J., & Hardie, K. R. (2021). Carbapenems: A broad-spectrum antibiotic. *Journal of Medical Microbiology*, *70*(12). <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001462>
- Aslam, B., Khurshid, M., Arshad, M. I., Muzammil, S., Rasool, M., Yasmeen, N., Shah, T., Chaudhry, T. H., Rasool, M. H., Shahid, A., Xueshan, X., & Baloch, Z. (2021). Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*, 771510. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.771510>
- Azimi, A., Rezaei, F., Yaseri, M., Jafari, S., Rahbar, M., & Douraghi, M. (2021). Emergence of fluoroquinolone resistance and possible mechanisms in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* from Iran. *Scientific Reports*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88977-z>
- Behruznia, M., & Gordon, D. M. (2022). Molecular and metabolic characteristics of wastewater associated *Escherichia coli* strains. *Environmental Microbiology Reports*, *14*(4), 646–654. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.13076>
- Berbers, B., Vanneste, K., Roosens, N. H. C. J., Marchal, K., Ceysens, P.-J., & De Keersmaecker, S. C. J. (2023). Using a combination of short- and long-read sequencing to investigate the diversity in plasmid- and chromosomally encoded extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in clinical *Shigella* and *Salmonella* isolates in Belgium. *Microbial Genomics*, *9*(1). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000925>
- Biedrzycka, M., Urbanowicz, P., Guzek, A., Brisse, S., Gniadkowski, M., & Izdebski, R. (2021). Dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST147 NDM-1 in Poland, 2015–19. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *76*(10), 2538–2545. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab207>
- Bitar, I., Papagiannitsis, C. C., Kraftova, L., Marchetti, V. M., Petinaki, E., Finianos, M., Chudejova, K., Zemlickova, H., & Hrabak, J. (2023). Implication of different replicons in the spread of the VIM-1-encoding integron, In110, in *Enterobacterales* from Czech hospitals. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 993240. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.993240>
- Bodendoerfer, E., Marchesi, M., Imkamp, F., Courvalin, P., Böttger, E. C., & Mancini, S. (2020). Co-occurrence of aminoglycoside and  $\beta$ -lactam resistance mechanisms in aminoglycoside- non-susceptible *Escherichia coli* isolated in the Zurich area, Switzerland. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *56*(1). <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106019>
- Bonnin, R. A., Jousset, A. B., Emeraud, C., Oueslati, S., Dortet, L., & Naas, T. (2021). Genetic Diversity, Biochemical Properties, and Detection Methods of Minor Carbapenemases in *Enterobacterales*. *Frontiers in Medicine*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.616490>
- Borer, A., Saidel-Odes, L., Riesenber, K., Eskira, S., Peled, N., Nativ, R., Schlaeffer, F., & Sherf, M. (2009). Attributable Mortality Rate for Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, *30*(10), 972–976. <https://doi.org/10.1086/605922>
- Bürgmann, H. (2014). Eintrag von Antibiotika und Antibiotikaresistenzen in Wassersysteme der Schweiz: Ein Überblick über die Lage in Bezug auf Antibiotikaresistenzen und ihre Ausbreitung in die Umwelt. *Prävention und Gesundheitsförderung*, *9*(3), 185–190. <https://doi.org/10.1007/s11553-014-0444-3>
- Bush, K. (2018). Past and Present Perspectives on  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *62*(10), e01076-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01076-18>
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2016).  $\beta$ -lactams and  $\beta$ -lactamase inhibitors: An overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *6*(8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2020). Epidemiology of  $\beta$ -Lactamase-Producing Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, *33*(2), e00047-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00047-19>
- Cahill, N., O'Connor, L., Mahon, B., Varley, Á., McGrath, E., Ryan, P., Cormican, M., Brehony, C., Jolley, K. A., Maiden, M. C., Brisse, S., & Morris, D. (2019). Hospital effluent: A reservoir for carbapenemase-producing *Enterobacterales*? *Science of the Total Environment*, *672*, 618–624. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.428>

- Cantón, R., Gijón, D., & Ruiz-Garbajosa, P. (2020). Antimicrobial resistance in ICUs: An update in the light of the COVID-19 pandemic. *Current Opinion in Critical Care*, 26(5), 433–441. <https://doi.org/10.1097/MCC.0000000000000755>
- Carlsen, L., Büttner, H., Christner, M., Cordts, L., Franke, G., Hoffmann, A., Knobling, B., Lütgehetmann, M., Nakel, J., Werner, T., & Knobloch, J. K. (2023). Long time persistence and evolution of carbapenemase-producing *Enterobacterales* in the wastewater of a tertiary care hospital in Germany. *Journal of Infection and Public Health*, 16(8), 1142–1148. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2023.05.029>
- Carlsen, L., Büttner, H., Christner, M., Franke, G., Indenbirken, D., Knobling, B., Lütgehetmann, M., & Knobloch, J. (2022). High burden and diversity of carbapenemase-producing *Enterobacterales* observed in wastewater of a tertiary care hospital in Germany. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 242. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2022.113968>
- Castanheira, M., Simner, P. J., & Bradford, P. A. (2021). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: An update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC-Antimicrobial Resistance*, 3(3), dlab092. <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab092>
- Chu, E. K., Kilic, O., Cho, H., Groisman, A., & Levchenko, A. (2018). Self-induced mechanical stress can trigger biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli*. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06552-z>
- Constantinides, B., Chau, K. K., Phuong Quan, T., Rodger, G., Andersson, M. I., Jeffery, K., Lipworth, S., Gweon, H. S., Peniket, A., Pike, G., Millo, J., Byukusenge, M., Holdaway, M., Gibbons, C., Mathers, A. J., Crook, D. W., Peto, T. E. A., Sarah Walker, A., & Stoesser, N. (2020). Genomic surveillance of *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* in hospital sink drains and patients. *Microbial Genomics*, 6(7), 4–16. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000391>
- David, S., Reuter, S., Harris, S. R., Glasner, C., Feltwell, T., Argimon, S., Abudahab, K., Goater, R., Giani, T., Errico, G., Aspbury, M., & Sjunnebo, S. (2019). Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nature*, 4(11), 1919–1929. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0492-8>. Epidemic
- De Angelis, G., Del Giacomo, P., Posteraro, B., Sanguinetti, M., & Tumbarello, M. (2020). Molecular Mechanisms, Epidemiology, and Clinical Importance of  $\beta$ -Lactam Resistance in *Enterobacteriaceae*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 5090. <https://doi.org/10.3390/ijms21145090>
- Delgado-Blas, J. F., Ovejero, C. M., David, S., Montero, N., Calero-Caceres, W., Garcillan-Barcia, M. P., de la Cruz, F., Muniesa, M., Aanensen, D. M., & Gonzalez-Zorn, B. (2021). Population genomics and antimicrobial resistance dynamics of *Escherichia coli* in wastewater and river environments. *Communications Biology*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01949-x>
- dos Anjos, C., Sabino, C. P., Bueris, V., Fernandes, M. R., Pogliani, F. C., Lincopan, N., & Sellera, F. P. (2019). Antimicrobial blue light inactivation of international clones of multidrug-resistant *Escherichia coli* ST10, ST131 and ST648. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 27(May), 51–53. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.05.014>
- Evans, B. A., & Amyes, S. G. B. (2014). OXA  $\beta$ -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(2), 241–263. <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-13>
- Exner, M., Schmithausen, R., Schreiber, C., Bierbaum, G., Parcina, M., Engelhart, S., Kistemann, T., Sib, E., Walger, P., & Schwartz, T. (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.
- Fernandez, J., Jimenez-Rodriguez, T. W., & Blanca-Lopez, N. (2021). Classifying cephalosporins: From generation to cross-reactivity. *Current Opinion in Allergy & Clinical Immunology*, Publish Ahead of Print. <https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000755>
- Flach, C. F., Hutinel, M., Razavi, M., Åhrén, C., & Larsson, D. G. J. (2021). Monitoring of hospital sewage shows both promise and limitations as an early-warning system for carbapenemase-producing *Enterobacterales* in a low-prevalence setting. *Water Research*, 200. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117261>
- Ghiglione, B., Haim, M. S., Penzotti, P., Brunetti, F., D'Amico González, G., Di Conza, J., Figueroa-Espinosa, R., Nuñez, L., Razzolini, M. T. P., Fuga, B., Esposito, F., Vander Horden, M., Lincopan, N., Gutkind, G., Power, P., & Dropa, M. (2021). Characterization of Emerging Pathogens Carrying *bla*<sub>KPC-2</sub> Gene in IncP-6 Plasmids Isolated From Urban Sewage in Argentina. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 722536. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.722536>

- Gibson, J. S., Cobbold, R. N., Heisig, P., Sidjabat, H. E., Kyaw-Tanner, M. T., & Trott, D. J. (2010). Identification of Qnr and AAC(6')-1b-cr plasmid-mediated fluoroquinolone resistance determinants in multidrug-resistant *Enterobacter* spp. Isolated from extraintestinal infections in companion animals. *Veterinary Microbiology*, 143(2–4), 329–336. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.11.031>
- Gomi, R., Yamamoto, M., Tanaka, M., & Matsumura, Y. (2022). Chromosomal integration of *bla*<sub>CTX-M</sub> genes in diverse *Escherichia coli* isolates recovered from river water in Japan. *Current Research in Microbial Sciences*, 3, 100144. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100144>
- Guerra, A. M., Lira, A., Lameirão, A., Selaru, A., Abreu, G., Lopes, P., Mota, M., Novais, Â., & Peixe, L. (2020). Multiplicity of carbapenemase-producers three years after a kpc-3-producing *K. Pneumoniae* st147-k64 hospital outbreak. *Antibiotics*, 9(11), 1–11. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110806>
- Halat, D. H., & Moubareck, C. A. (2020). The current burden of carbapenemases: Review of significant properties and dissemination among gram-negative bacteria. In *Antibiotics* (Vol. 9, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040186>
- Harada, S., Suzuki, M., Sasaki, T., Sakurai, A., Inaba, M., Takuya, H., Wakuda, M., & Doi, Y. (2021). Transmission of NDM-5-Producing and OXA-48-Producing *Escherichia coli* Sequence Type 648 by International Visitors without Previous Medical Exposure. *Microbiology Spectrum*, 9(3), e01827-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01827-21>
- He, Y., Lei, J., Pan, X., Huang, X., & Zhao, Y. (2020). The hydrolytic water molecule of Class A  $\beta$ -lactamase relies on the acyl-enzyme intermediate ES\* for proper coordination and catalysis. *Scientific Reports*, 10(1), 10205. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66431-w>
- Heiden, S. E., Sydow, K., Schaefer, S., Klempien, I., Balau, V., Bauer, P., Hübner, N.-O., & Schaufler, K. (2021). Nearly Identical Plasmids Encoding VIM-1 and Mercury Resistance in *Enterobacteriaceae* from North-Eastern Germany. *Microorganisms*, 9(7), 1345. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071345>
- 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. *Scientific Reports*, 9(1), 12843. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49263-1>
- Hembach, N., Schmid, F., Alexander, J., Hiller, C., Rogall, E. T., & Schwartz, T. (2017). Occurrence of the mcr-1 Colistin Resistance Gene and other Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in Microbial Populations at Different Municipal Wastewater Treatment Plants in Germany. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1282. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01282>
- Hirsch, E. B., & Tam, V. H. (2010). Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): An emerging cause of multidrug-resistant infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(6), 1119–1125. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq108>
- Hocquet, D., Muller, A., & Bertrand, X. (2016). What happens in hospitals does not stay in hospitals: Antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater systems. *Journal of Hospital Infection*, 93(4), 395–402. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2016.01.010>
- Hoelle, J., Johnson, J. R., Johnston, B., Kinkle, B., Boczek, L., Ryu, H., & Hayes, S. (2019). Survey of US wastewater for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *J Water Health*, 2317(2), 219–226. <https://doi.org/10.2166/wh.2019.165>
- Hoffman, T., Lellouche, J., Nutman, A., Temkin, E., Frenk, S., Harbarth, S., Carevic, B., Cohen-Percia, S., Kariv, Y., Fallach, N., Klausner, J., & Carmeli, Y. (2021). The effect of prophylaxis with ertapenem versus cefuroxime/metronidazole on intestinal carriage of carbapenem-resistant or third-generation-cephalosporin-resistant *Enterobacteriales* after colorectal surgery. *Clinical Microbiology and Infection*, 27(10), 1481–1487. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.02.002>
- Hoffmann, A. (2023). ARVIA Surveillanceprotokoll. <https://ars.rki.de/Content/ARVIA/Main.aspx> (letzter Zugriff am 18.08.2023)
- Hoffmann, M., Fischer, M. A., Neumann, B., Kiesewetter, K., Hoffmann, I., Werner, G., Pfeifer, Y., & Lübbert, C. (2023). Carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in hospital wastewater, wastewater treatment plants and surface waters in a metropolitan area in Germany, 2020. *Science of The Total Environment*, 890, 164179. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164179>
- Hrenovic, J., Ivankovic, T., Ivekovic, D., Repec, S., Stipanicev, D., & Ganjto, M. (2017). The fate of carbapenem-resistant bacteria in a wastewater treatment plant. *Water Research*, 126, 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.09.007>

- Hu, X., Yu, X., Shang, Y., Xu, H., Guo, L., Liang, Y., Kang, Y., Song, L., Sun, J., Yue, F., Mao, Y., & Zheng, B. (2019). Emergence and Characterization of a Novel IncP-6 Plasmid Harboring *bla*<sub>KPC-2</sub> and *qnrS2* Genes in *Aeromonas taiwanensis* Isolates. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 2132. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02132>
- Huang, H., Peng, C., Peng, P., Lin, Y., Zhang, X., & Ren, H. (2019). Towards the biofilm characterization and regulation in biological wastewater treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*(3), 1115–1129. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9511-6>
- Huijbers, P. M. C., Larsson, D. G. J., & Flach, C. F. (2020). Surveillance of antibiotic resistant *Escherichia coli* in human populations through urban wastewater in ten European countries. *Environmental Pollution*, *261*, 114200. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114200>
- Hutinel, M., Fick, J., Larsson, D. G. J., & Flach, C. F. (2021). Investigating the effects of municipal and hospital wastewaters on horizontal gene transfer. *Environmental Pollution*, *276*. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116733>
- Iovleva, A., & Doi, Y. (2017). Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Clinics in Laboratory Medicine*, *37*(2), 303–315. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2017.01.005>
- 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*(October), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02599>
- Johnning, A., Kristiansson, E., Fick, J., Weijdegård, B., & Larsson, D. G. J. (2015). Resistance Mutations in *gyrA* and *parC* are Common in *Escherichia* Communities of both Fluoroquinolone-Polluted and Uncontaminated Aquatic Environments. *Frontiers in Microbiology*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01355>
- Kamal, S. M., Cimdin-Ahne, A., Lee, C., Li, F., Martín-Rodríguez, A. J., Seferbekova, Z., Afasizhev, R., Wami, H. T., Katikaridis, P., Meins, L., Lünsdorf, H., Dobrindt, U., Mogk, A., & Römling, U. (2021). A recently isolated human commensal *Escherichia coli* ST10 clone member mediates enhanced thermotolerance and tetrathionate respiration on a P1 phage-derived IncY plasmid. *Molecular Microbiology*, *115*(2), 255–271. <https://doi.org/10.1111/mmi.14614>
- Kehl, K., Schallenberg, A., Szekat, C., Albert, C., Sib, E., Exner, M., Zacharias, N., Schreiber, C., Parčina, M., & Bierbaum, G. (2022). Dissemination of carbapenem resistant bacteria from hospital wastewater into the environment. *Science of the Total Environment*, *806*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151339>
- Khalifa, H. O., Soliman, A. M., Saito, T., Kayama, S., Yu, L., Hisatsune, J., Sugai, M., Nariya, H., Ahmed, A. M., Shimamoto, T., Matsumoto, T., & Shimamoto, T. (2020). First Report of Foodborne *Klebsiella pneumoniae* Coharboring *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, and *mcr-9*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *64*(9), e00882-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.00882-20>
- Khalifa, S. M., Abd El-Aziz, A. M., Hassan, R., & Abdelmegeed, E. S. (2021).  $\beta$ -lactam resistance associated with  $\beta$ -lactamase production and porin alteration in clinical isolates of *E. coli* and *K. pneumoniae*. *PLoS ONE*, *16*(5 May). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251594>
- Knobloch, J. K. M., Bartscht, K., Sabottke, A., Rohde, H., Feucht, H. H., & Mack, D. (2001). Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the sigB operon: Differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *Journal of Bacteriology*, *183*(8), 2624–2633. <https://doi.org/10.1128/JB.183.8.2624-2633.2001>
- Knobloch, J. K. M., Jäger, S., Horstkotte, M. A., Rohde, H., & Mack, D. (2004). RsbU-dependent regulation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation is mediated via the alternative sigma factor  $\sigma$ B by repression of the negative regulator gene *icaR*. *Infection and Immunity*, *72*(7), 3838–3848. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.7.3838-3848.2004>
- Kopotsa, K., Osei Sekyere, J., & Mbelle, N. M. (2019). Plasmid evolution in carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: A review. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1457*(1), 61–91. <https://doi.org/10.1111/nyas.14223>
- Krapner, N., Hutinel, M., Schumacher, K., Gray, D. A., Genheden, M., Fick, J., Flach, C. F., & Larsson, D. G. J. (2021). Evidence for selection of multi-resistant *E. coli* by hospital effluent. *Environment International*, *150*. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106436>
- Kurasam, J., Sihag, P., Mandal, P. K., & Sarkar, S. (2018). Presence of fluoroquinolone resistance with persistent occurrence of *gyrA* gene mutations in a municipal wastewater treatment plant in India. *Chemosphere*, *211*, 817–825. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.011>



- Kurzinfo Abwasser—Kläranlage. (2014, October 14). Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, nukleare Sicherheit und Verbraucherschutz. <https://www.bmu.de/themen/wasser-ressourcen-abfall/binnengewasser/abwasser/klaeranlage-kurzinfo> (letzter Zugriff: 18.08.2023)
- Kuzina, E. S., Kislichkina, A. A., Sizova, A. A., Skryabin, Y. P., Novikova, T. S., Ershova, O. N., Savin, I. A., Khokhlova, O. E., Bogun, A. G., & Fursova, N. K. (2023). High-Molecular-Weight Plasmids Carrying Carbapenemase Genes *bla<sub>NDM-1</sub>*, *bla<sub>KPC-2</sub>*, and *bla<sub>OXA-48</sub>* Coexisting in Clinical *Klebsiella pneumoniae* Strains of ST39. *Microorganisms*, 11(2), 459. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020459>
- Laborda, P., Sanz-García, F., Ochoa-Sánchez, L. E., Gil-Gil, T., Hernando-Amado, S., & Martínez, J. L. (2022). Wildlife and Antibiotic Resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 873989. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.873989>
- Lasko, M. J., & Nicolau, D. P. (2020). Carbapenem-Resistant *Enterobacterales*: Considerations for Treatment in the Era of New Antimicrobials and Evolving Enzymology. *Current Infectious Disease Reports*, 22(3). <https://doi.org/10.1007/s11908-020-0716-3>
- Liu, C., Dong, N., Zeng, Y., Lu, J., Chen, J., Wang, Y., Cai, C., Chen, K., Chen, G., Shen, Z., Chen, S., & Zhang, R. (2022). Co-transfer of last-line antibiotic resistance and virulence operons by an IncFIBk-FII-X3-ColKP3 hybrid plasmid in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 77(7), 1856–1861. <https://doi.org/10.1093/jac/dkac121>
- Liu, W., Neidert, M. C., Groen, R. J. M., Woernle, C. M., & Grundmann, H. (2014). Third-generation cephalosporins as antibiotic prophylaxis in neurosurgery: What's the evidence? *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 116, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2013.10.015>
- Liu, Z., Xiao, X., Li, Y., Liu, Y., Li, R., & Wang, Z. (2019). Emergence of IncX3 Plasmid-Harboring *bla<sub>NDM-5</sub>* Dominated by *Escherichia coli* ST48 in a Goose Farm in Jiangsu, China. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02002>
- Llor, C., & Bjerrum, L. (2014). Antimicrobial resistance: Risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. *Therapeutic Advances in Drug Safety*, 5(6), 229–241. <https://doi.org/10.1177/2042098614554919>
- Logan, L. K., & Weinstein, R. A. (2017). The epidemiology of Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: The impact and evolution of a global menace. *Journal of Infectious Diseases*, 215(Suppl 1), S28–S36. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw282>
- Lopes, R., Furlan, J. P. R., & Stehling, E. G. (2022). Acquisition of *bla<sub>IMP-13</sub>* on a novel IncP-7 plasmid in XDR VIM-2–positive *Pseudomonas aeruginosa* belonging to the global high-risk clone ST235 in an agricultural ecosystem. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 30, 403–405. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2022.07.020>
- Ludden, C., Coll, F., Gouliouris, T., Restif, O., Blane, B., Blackwell, G. A., Kumar, N., Naydenova, P., Crawley, C., Brown, N. M., Parkhill, J., & Peacock, S. J. (2021). Defining nosocomial transmission of *Escherichia coli* and antimicrobial resistance genes: A genomic surveillance study. *The Lancet Microbe*, 2(9), e472–e480. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00117-8](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00117-8)
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Majlander, J., Anttila, V. J., Nurmi, W., Seppälä, A., Tiedje, J., & Muziasari, W. (2021). Routine wastewater-based monitoring of antibiotic resistance in two Finnish hospitals: Focus on carbapenem resistance genes and genes associated with bacteria causing hospital-acquired infections. *Journal of Hospital Infection*, 117, 157–164. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2021.09.008>
- Manges, A. R., Geum, H. M., Guo, A., Edens, T. J., Fibke, C. D., & Pitout, J. D. D. (2019). Global Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) Lineages. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(3), 1–25.
- Manquat, E., Le Dorze, M., De Ponfily, G. P., Benmansour, H., Rishma, R., Cambau, E., Soyer, B., Chousterman, B. G., & Jacquier, H. (2020). Impact of systematic screening for AmpC-hyperproducing *Enterobacterales* intestinal carriage in intensive care unit patients. *Annals of Intensive Care*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13613-020-00754-9>
- Marmor, A., Daveson, K., Harley, D., Coatsworth, N., & Kennedy, K. (2020). Two carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* outbreaks detected retrospectively by whole-genome

- sequencing at an Australian tertiary hospital. *Infection, Disease and Health*, 25(1), 30–33. <https://doi.org/10.1016/j.idh.2019.08.005>
- Marutescu, L. G., Popa, M., Gheorghe-Barbu, I., Barbu, I. C., Rodríguez-Molina, D., Berglund, F., Blaak, H., Flach, C.-F., Kemper, M. A., Spießberger, B., Wengenroth, L., Larsson, D. G. J., Nowak, D., Radon, K., De Roda Husman, A. M., Wieser, A., Schmitt, H., Pircalabioru Gradisteanu, G., Vrancianu, C. O., & Chifiriuc, M. C. (2023). Wastewater treatment plants, an “escape gate” for ESCAPE pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1193907. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1193907>
- Matamoros, S., Van Hattem, J. M., Arcilla, M. S., Willemsse, N., Melles, D. C., Penders, J., Vinh, T. N., Thi Hoa, N., Bootsma, M. C. J., Van Genderen, P. J., Goorhuis, A., Grobusch, M., Molhoek, N., Oude Lashof, A. M. L., Stobberingh, E. E., Verbrugh, H. A., De Jong, M. D., & Schultsz, C. (2017). Global phylogenetic analysis of *Escherichia coli* and plasmids carrying the mcr-1 gene indicates bacterial diversity but plasmid restriction. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15539-7>
- Mataseje, L. F., Chen, L., Peirano, G., Fakharuddin, K., Kreiswith, B., Mulvey, M., & Pitout, J. D. D. (2022). *Klebsiella pneumoniae* ST147: And then there were three carbapenemases. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 41(12), 1467–1472. <https://doi.org/10.1007/s10096-022-04514-4>
- McDaniels, A. E., Rice, E. W., Reyes, A. L., Johnson, C. H., Haugland, R. A., & Stelma, J. (1996). Erratum: Confirmational identification of *Escherichia coli*, a comparison of genotypic and phenotypic assays for glutamate decarboxylase and  $\beta$ -D-glucuronidase (Applied and Environmental Microbiology (1996) 62:9 (3350- 3354)). *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 4113. <https://doi.org/10.1128/aem.64.10.4113-4113.1998>
- Mills, M. C., & Lee, J. (2019). The threat of carbapenem-resistant bacteria in the environment: Evidence of widespread contamination of reservoirs at a global scale. *Environmental Pollution*, 255(1). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113143>
- Mischnik, A., Kaase, M., Lübbert, C., Seifert, H., & Kern, W. V. (2015). Carbapenem-Resistenz bei Enterobakterien, *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii*. *Infektiologie*, 172–176. <https://doi.org/10.1055/s-0041-100105>
- Müller, H., Sib, E., Gajdiss, M., Klanke, U., Lenz-Plet, F., Barabasch, V., Albert, C., Schallenberg, A., Timm, C., Zacharias, N., Schmithausen, R. M., Engelhart, S., Exner, M., Parcina, M., Schreiber, C., & Bierbaum, G. (2018). Dissemination of multi-resistant Gram-negative bacteria into German wastewater and surface waters. *FEMS Microbiology Ecology*, 94(5), 1–11. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy057>
- Müller, J., Voss, A., Köck, R., Sinha, B., Rossen, J. W., Kaase, M., Mielke, M., Daniels-Haardt, I., Jurke, A., Hendrix, R., Kluytmans, J. A., Kluytmans-van Den Bergh, M. F., Pulz, M., Herrmann, J., Kern, W. V., Wendt, C., & Friedrich, A. W. (2015). Cross-border comparison of the Dutch and German guidelines on multidrug-resistant Gram-negative microorganisms. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 4(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s13756-015-0047-6>
- Nickerson, K. P., & Faherty, C. S. (2018). Bile salt-induced biofilm formation in enteric pathogens: Techniques for identification and quantification. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(135), 1–10. <https://doi.org/10.3791/57322>
- Nicolas-Chanoine, M. H., Bertrand, X., & Madec, J. Y. (2014). *Escherichia coli* st131, an intriguing clonal group. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3), 543–574. <https://doi.org/10.1128/CMR.00125-13>
- Nordmann, P., & Poirel, L. (2019). Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, 69(Supplement\_7), S521–S528. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz824>
- Nüesch-Inderbilen, M., Zurfluh, K., Stevens, M. J. A., & Stephan, R. (2018). Complete and assembled genome sequence of an NDM-9- and CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* ST147 wastewater isolate from Switzerland. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 13, 53–54. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.03.001>
- Ordóñez, A. A., Wintaco, L. M., Mota, F., Restrepo, A. F., Ruiz-Bedoya, C. A., Reyes, C. F., Uribe, L. G., Abhishek, S., D'Alessio, F. R., Holt, D. P., Dannals, R. F., Rowe, S. P., Castillo, V. R., Pomper, M. G., Granados, U., & Jain, S. K. (2021). Imaging *Enterobacteriales* infections in patients using pathogen-specific positron emission tomography. *Science Translational Medicine*, 13(589), eabe9805. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abe9805>

- Ota, Y., Prah, I., Nukui, Y., Koike, R., & Saito, R. (2022). *bla*<sub>KPC-2</sub>-Encoding IncP-6 Plasmids in *Citrobacter freundii* and *Klebsiella variicola* Strains from Hospital Sewage in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(8), e00019-22. <https://doi.org/10.1128/aem.00019-22>
- Overgaaauw, P. A. M., Vinke, C. M., Van Hagen, M. A. E., & Lipman, L. J. A. (2020). A One Health Perspective on the Human–Companion Animal Relationship with Emphasis on Zoonotic Aspects. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(11), 3789. <https://doi.org/10.3390/ijerph17113789>
- Peirano, G., Chen, L., Kreiswirth, B. N., & Pitout, J. D. D. (2020). Emerging Antimicrobial-Resistant High-Risk *Klebsiella pneumoniae* Clones ST307 and ST147. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(10), 1–14.
- Perez-Garcia, P., Kobus, S., Gertzen, C. G. W., Hoepfner, A., Holzscheck, N., Strunk, C. H., Huber, H., Jaeger, K.-E., Gohlke, H., Kovacic, F., Smits, S. H. J., Streit, W. R., & Chow, J. (2021). A promiscuous ancestral enzyme's structure unveils protein variable regions of the highly diverse metallo- $\beta$ -lactamase family. *Communications Biology*, 4(1), 132. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01671-8>
- Perry, M. R., Lepper, H. C., McNally, L., Wee, B. A., Munk, P., Warr, A., Moore, B., Kalima, P., Philip, C., de Roda Husman, A. M., Aarestrup, F. M., Woolhouse, M. E. J., & van Bunnik, B. A. D. (2021). Secrets of the Hospital Underbelly: Patterns of Abundance of Antimicrobial Resistance Genes in Hospital Wastewater Vary by Specific Antimicrobial and Bacterial Family. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.703560>
- Pistocchi, A., Andersen, H. R., Bertanza, G., Brander, A., Choubert, J. M., Cimbritz, M., Drewes, J. E., Koehler, C., Krampe, J., Launay, M., Nielsen, P. H., Obermaier, N., Stanev, S., & Thornberg, D. (2022). Treatment of micropollutants in wastewater: Balancing effectiveness, costs and implications. *Science of The Total Environment*, 850, 157593. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157593>
- Pitout, J. D. D., Peirano, G., Kock, M. M., Strydom, K.-A., & Matsumura, Y. (2020). The Global Ascendancy of OXA-48-Type Carbapenemases. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(1), 1–48.
- Ragheb, S. M., Govinden, U., & Osei Sekyere, J. (2022). Genetic support of carbapenemases: A One Health systematic review and meta-analysis of current trends in Africa. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1509(1), 50–73. <https://doi.org/10.1111/nyas.14703>
- Redgrave, L. S., Sutton, S. B., Webber, M. A., & Piddock, L. J. V. (2014). Fluoroquinolone resistance: Mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in Microbiology*, 22(8), 438–445. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.007>
- Réglie-Poupet, H., Naas, T., Carrer, A., Cady, A., Adam, J. M., Fortineau, N., Poyart, C., & Nordmann, P. (2008). Performance of chromID ESBL, a chromogenic medium for detection of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Journal of Medical Microbiology*, 57(3), 310–315. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47625-0>
- Reinke, R. A., Quach-Cu, J., Allison, N., Lynch, B., Crisostomo, C., & Padilla, M. (2020). A method to quantify viable carbapenem resistant gram-negative bacteria in treated and untreated wastewater. *Journal of Microbiological Methods*, 179(July), 106070. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106070>
- RKI Epidemiologisches Bulletin 27/23—NRZ-Bericht 2022: Gramnegative Krankenhauserreger. Robert-Koch-Institut. [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2023/Ausgaben/27\\_23.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2023/Ausgaben/27_23.pdf?__blob=publicationFile) (letzter Zugriff: 18.08.2023)
- Samuelsen, Ø., Hansen, F., Aasnæs, B., Hasman, H., Lund, B. A., Leiros, H.-K. S., Lilje, B., Janice, J., Jakobsen, L., Littauer, P., Søes, L. M., Holzknecht, B. J., Andersen, L. P., Stegger, M., Andersen, P. S., & Hammerum, A. M. (2018). Dissemination and Characteristics of a Novel Plasmid-Encoded Carbapenem-Hydrolyzing Class D  $\beta$ -Lactamase, OXA-436, Found in Isolates from Four Patients at Six Different Hospitals in Denmark. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(1), e01260-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01260-17>
- Schulz-Stübner, S. (2017). *Spezielle Erreger und Infektionen*. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-54000-8>
- Shnaiderman-Torban, A., Marchaim, D., Navon-Venezia, S., Lubrani, O., Paitan, Y., Arielly, H., & Steinman, A. (2021). Third Generation Cephalosporin Resistant *Enterobacterales* Infections in Hospitalized Horses and Donkeys: A Case–Case–Control Analysis. *Antibiotics*, 10(2), 155. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020155>

- Sib, E., Lenz-Plet, F., Barabasch, V., Klanke, U., Savin, M., Hembach, N., Schallenberg, A., Kehl, K., Albert, C., Gajdiss, M., Zacharias, N., Müller, H., Schmithausen, R. M., Exner, M., Kreyenschmidt, J., Schreiber, C., Schwartz, T., Parčina, M., & Bierbaum, G. (2020). Bacteria isolated from hospital, municipal and slaughterhouse wastewaters show characteristic, different resistance profiles. *Science of the Total Environment*, 746. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140894>
- Spaziante, M., Venditti, C., Butera, O., Messina, F., Di Caro, A., Tonziello, G., Lanini, S., Cataldo, M. A., & Puro, V. (2021). Importance of Surveillance of New Delhi Metallo- $\beta$ -Lactamase *Klebsiella pneumoniae*: Molecular Characterization and Clonality of Strains Isolated in the Lazio Region, Italy. *Infection and Drug Resistance*, Volume 14, 3659–3665. <https://doi.org/10.2147/IDR.S318717>
- Tacão, M., Araújo, S., Vendas, M., Alves, A., & Henriques, I. (2018). *Shewanella* species as the origin of *bla*<sub>OXA-48</sub> genes: Insights into gene diversity, associated phenotypes and possible transfer mechanisms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 51(3), 340–348. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.05.014>
- Tan, X., Kim, H. S., Baugh, K., Huang, Y., Kadiyala, N., Wences, M., Singh, N., Wenzler, E., & Bulman, Z. P. (2021). Therapeutic options for metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriales*. *Infection and Drug Resistance*, 14, 125–142. <https://doi.org/10.2147/IDR.S246174>
- Tapsall, J. W., & McIver, C. J. (1995).  $\beta$ -d-Glucuronidase activity among prototrophic and auxotrophic variants of *Escherichia coli* and other *Enterobacteriaceae* commonly implicated in urinary tract infections. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 22(3), 261–266. [https://doi.org/10.1016/0732-8893\(95\)00097-T](https://doi.org/10.1016/0732-8893(95)00097-T)
- Thakur, I. S., & Medhi, K. (2019). Nitrification and denitrification processes for mitigation of nitrous oxide from waste water treatment plants for biovalorization: Challenges and opportunities. *Bioresource Technology*, 282, 502–513. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.069>
- Urbanowicz, P., Bitar, I., Izdebski, R., Baraniak, A., Literacka, E., Hrabák, J., & Gniadkowski, M. (2021). Epidemic Territorial Spread of IncP-2-Type VIM-2 Carbapenemase-Encoding Megaplasms in Nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* Populations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(4), e02122-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.02122-20>
- Villa, J., Arana, D. M., Viedma, E., Perez-Montarelo, D., & Chaves, F. (2017). Characterization of mobile genetic elements carrying VIM-1 and KPC-2 carbapenemases in *Citrobacter freundii* isolates in Madrid. *International Journal of Medical Microbiology*, 307(6), 340–345. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.07.001>
- Voigt, A. M., Ciorba, P., Döhla, M., Exner, M., Felder, C., Lenz-Plet, F., Sib, E., Skutlarek, D., Schmithausen, R. M., & Faerber, H. A. (2020). The investigation of antibiotic residues, antibiotic resistance genes and antibiotic-resistant organisms in a drinking water reservoir system in Germany. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 224, 113449. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113449>
- Wang, X., Zhao, J., Ji, F., Chang, H., Qin, J., Zhang, C., Hu, G., Zhu, J., Yang, J., Jia, Z., Li, G., Qin, J., Wu, B., & Wang, C. (2021). Multiple-Replicon Resistance Plasmids of *Klebsiella* Mediate Extensive Dissemination of Antimicrobial Genes. *Frontiers in Microbiology*, 12, 754931. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.754931>
- Wang, Y., Liu, H., Wang, Q., Du, X., Yu, Y., & Jiang, Y. (2020). Coexistence of *bla*<sub>KPC-2</sub>-IncN and *mcr-1*-IncX4 plasmids in a ST48 *Escherichia coli* strain in China. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 23, 149–153. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.08.023>
- Westphal-Settele, K., Konradi, S., Balzer, F., Schönfeld, J., & Schmithausen, R. (2018). The environment as a reservoir for antimicrobial resistance: A growing problem for public health? *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 61(5), 533–542. <https://doi.org/10.1007/s00103-018-2729-8>
- White, L., Hopkins, K. L., Meunier, D., Perry, C. L., Pike, R., Wilkinson, P., Pickup, R. W., Cheesbrough, J., & Woodford, N. (2016). Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in hospital wastewater: A reservoir that may be unrelated to clinical isolates. *Journal of Hospital Infection*, 93(2), 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2016.03.007>
- Wu, G., Ehricht, R., Mafura, M., Stokes, M., Smith, N., Pritchard, G. C., & Woodward, M. J. (2012). *Escherichia coli* isolates from extraintestinal organs of livestock animals harbour diverse virulence genes and belong to multiple genetic lineages. *Veterinary Microbiology*, 160(1–2), 197–206. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.05.029>

- Yang, X., Tran, F., Zhang, P., & Wang, H. (2021). Genomic and phenotypic analysis of heat and sanitizer resistance in *Escherichia coli* from beef in relation to the locus of heat resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(23). <https://doi.org/10.1128/AEM.01574-21>
- Yin, W., Wang, Y., Liu, L., & He, J. (2019). Biofilms: The microbial “protective clothing” in extreme environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14). <https://doi.org/10.3390/ijms20143423>
- Yu, X., Zhang, D., & Song, Q. (2020). Profiles of gyrA Mutations and Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in *Shigella* Isolates with Different Levels of Fluoroquinolone Susceptibility. *Infection and Drug Resistance*, Volume 13, 2285–2290. <https://doi.org/10.2147/IDR.S257877>
- Zhang, S., Huang, J., Zhao, Z., Cao, Y., & Li, B. (2020). Hospital Wastewater as a Reservoir for Antibiotic Resistance Genes: A Meta-Analysis. *Frontiers in Public Health*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.574968>
- Zhi, S., Banting, G., Stothard, P., Ashbolt, N. J., Checkley, S., Meyer, K., Otto, S., & Neumann, N. F. (2019). Evidence for the evolution, clonal expansion and global dissemination of water treatment-resistant naturalized strains of *Escherichia coli* in wastewater. *Water Research*, 156, 208–222. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.03.024>
- Zieliński, W., Korzeniewska, E., Harnisz, M., Drzymała, J., Felis, E., & Bajkacz, S. (2021). Wastewater treatment plants as a reservoir of integrase and antibiotic resistance genes – An epidemiological threat to workers and environment. *Environment International*, 156, 106641. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106641>