

Forekomst av antibiotikaresistensgener og fjerning av antibiotikaresistente *E. coli* i to norske avløpsrensaneanlegg

Av Carsten Ulrich Schwermer, Pawel Krzeminski og Wolfgang Uhl

Carsten U. Schwermer (MSc) og Pawel Krzeminski (PhD) er forskere i Seksjon for systemer og teknologi ved Norsk institutt for vannforskning (NIVA). Wolfgang Uhl (PhD, Prof.) er forskningsleder ved NIVA og Prof. II ved NTNU, Institutt for bygg og miljøteknologi.

Summary

Abundance of antibiotic resistance genes and removal of antibiotic resistant E. coli in two Norwegian wastewater treatment plants. The effectivity of different treatment stages at two wastewater treatment plants (WWTPs) to remove cultivable antibiotic resistant *E. coli* from municipal wastewater from Oslo City was investigated. The WWTPs were effective in reducing total cultivable *E. coli*, however, full hygienization was not achieved. The *E. coli* in WWTP samples were partly resistant to ampicillin and co-trimoxazole, and to a lesser extent, tetracycline and ciprofloxacin. The plants showed different patterns with respect to the removal of resistant *E. coli*. Analysis of selected antibiotics maker genes in samples from WWTP effluent revealed the presence of resistance against commonly used groups of antibiotics, but also to such that are rarely used and belong to critically important antibiotics, including carbapenemes, colistin and cephalosporines. By membrane filtration of WWTP effluents, using lab-scale ultra- and nanofiltration, all cultivable *E. coli*, including antibiotic resistant ones, were removed completely.

Sammendrag

Effektiviteten av de ulike behandlingstrinnene for fjerning av antibiotikaresistente *E. coli* i av-

løpsvann fra to store avløpsrensaneanlegg i Oslo ble undersøkt. Rensaneanleggene reduserer den totale mengden kultiverbare *E. coli* fra avløpsvannet effektivt, men fjerningen av disse bakteriene var ufullstendig i begge anleggene. Bakteriene var delvis resistente mot ampicillin og cotrimoxazole, og i mindre grad tetracyclin og ciprofloxacin. Med hensyn til fjerning av resistente *E. coli* viste anleggene forskjellige mønstre utover i behandlingsprosessen. Analysen av et utvalg markørgener i utslippsvannet viser forekomst av resistens mot antibiotika som brukes hyppig i Norge, men også svært sjelden brukte og kritisk viktige antibiotika, inkludert karbapenemer, colistin og cefalosporiner. Gjennom ultra- og nanofiltrering på laboratorieskala av utslippsvannet fra avløpsrensaneanleggene, ble alle kultiverbare *E. coli*, inkludert resistente *E. coli*, fullstendig fjernet.

Introduksjon

Utvikling av resistens mot antibiotika hos sykdomsfremkallende bakterier er en global utfordring som forventes å medføre store negative helsemessige, sosiale og økonomiske konsekvenser (WHO 2014). Økt antimikrobiell resistens (AMR) forårsaket av mennesker anses også som et økologisk problem. Selv om Norge fortsatt er et lavprevalensland sammenlignet med

andre land, er antall infeksjoner med antibiotika-resistente bakterier (ARB) økende (ECDC 2014; NORM/NORM-VET 2015). Helsemyndighetene frykter at situasjonen raskt kan forverre seg på grunn av faktorer som økt antibiotikaforbruk, reisevirksomhet, import av kontaminert mat og spredning av ARB i matproduksjonen (NORM/NORM-VET 2015). Gjennom en nasjonal strategi og handlingsplaner, har staten og myndigheter iverksatt tiltak mot utvikling av AMR (HOD 2015, 2016). Utviklingen av AMR har blitt fulgt opp nøye i mange år gjennom landsomfattende meldings- og overvåkningsprogrammer (MSIS ; NORM-VET ; NORM). Men både nasjonalt og internasjonalt har fokus historisk vært på overvåkning av klinisk-relevante ARB fra mennesker og dyr. Først i fjor inkluderte EU begrepet «miljø» som tredje ledd i «One-Health tilnærmingen» i EU-kommisjonens tiltaksplan mot spredning av AMR, som betrakter helsen til både mennesker og dyr samt det ytre miljøet i en helhetlige sammenheng (COM 2017). Blant tiltakene mot AMR i miljøet skal kunnskapshull vedrørende det ytre miljøets rolle i spredning av AMR tettes, risikoen ved AMR i miljøet evalueres, nye analyseverktøy etableres, og nye, effektive teknologier for fjerning av antibiotika og ARB utvikles. Som en del av den nasjonale tiltaksplanen mot spredning av AMR ble det nylig gjennomført studier (NVI 2017; HI 2018; NIBIO 2018; NVI 2018) for å kartlegge AMR i en rekke indikatororganismer.

Sentrale kommunale avløpsrensplanlegg er viktige utslippskilder av ARB og antibiotika til det akvatiske miljøet (Thomas *et al.* 2007b; Rizzo *et al.* 2013). Forekomst av store mengder av ulike bakterier sammen med kontinuerlig tilførsel av sub-terapeutiske konsentrasjoner av resistensdrivende antibiotika, metaller og biocider, skaper kompetitive betingelser blant bakteriepopulasjonene i det biologiske trinnet som fører til seleksjon av antibiotikaresistente gener (ARG), utvikling av nye ARB og spredning av AMR til resipienten (Berendonk *et al.* 2015). For tiden vet man lite om forekomst av ARB og ARG, transport av og skjebnen til ARB & ARG i de ulike behandlingstrinnene, samt

påvirkningen av driftsbetingelsene på dette. Rutinemessige målinger for ARB og ARG gjennomføres ikke ved avløpsrensplanlegg, og systematiske undersøkelser har kun nylig begynt i forbindelse med internasjonale overvåkingsprogrammer (NORMAN Network¹, NEREUS COST Action², StARE-prosjektet³).

Fordi konvensjonelle avløpsrensplanlegg ikke ble designet og dimensjonert for å fjerne AMR, skaper uhindrede utslipp av ARB og ARG til det akvatiske miljøet en utfordring for implementeringen av Norges bærekraftsmål for å sikre rent vann og trygg hygiene i fremtiden (UD 2016). Samtidig krever løpende endringer i EUs vanndirektiv at store kommunale avløpsplanlegg skal investere i avanserte behandlingstrinn. Derfor er det stort behov for å kartlegge AMR-skjebnen i full-skala anlegg, hvilken risiko som utgår fra utslipp av AMR til det akvatiske miljøet, og hvordan man kan forhindre det.

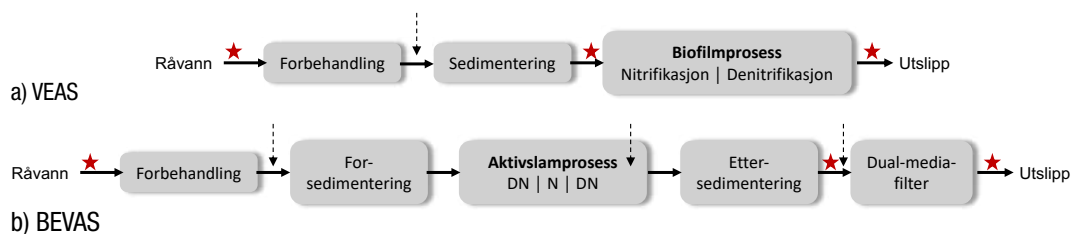
Undersøkelsens første mål var å kvantifisere kultiverbare *E. coli* som er resistente mot fire utvalgte og vanlig brukte antibiotika, ampicillin (Amp), ciprofloxacin (Cip), tetracyclin (Tet) og cotrimoxazole (Tmp/Smx), i vannprøver tatt fra Vestfjorden Avløpsplanlegg (VEAS) og Bekkelaget Vann AS (BEVAS) avløpsrensplanleggene. I tillegg skulle ni forskjellige ARG i utslippsvannprøver kvantifiseres med hjelp av kvantitativ sanntids-PCR (qPCR). Dette tillater å vurdere effektiviteten av vannbehandlingsprosessen for fjerning av ARB og ARG, samt risikopotensialet for spredning av antibiotikaresistens fra avløpsplanlegg til Indre Oslofjord.

For å oppnå en mer effektiv fjerning av ARB og ARG i konvensjonelle avløpsplanlegg, trengs det en forbedring eller etter-installasjon av en avansert behandling og hygienisering nedstrøms det biologiske behandlingstrinnet. Fra spektret av tilgjengelige metoder, er membranfiltrering en aktuell løsning for å fjerne ARB og

¹ Network of reference laboratories, research centers and related organizations for monitoring of emerging environmental substances, <http://www.norman-network.net>

² New and emerging challenges and opportunities in wastewater reuse (ES 1403), <http://www.nereus-cost.eu>

³ Water JPI Stopping antibiotic resistance revolution, <https://stareurope.wordpress.com>



Figur 1. Prinsipp av prosessen ved (a) VEAS og (b) BEVAS avløpsrensaneanlegg. Markeringer viser tilsetningspunkter for kjemikalier (stipulerte piler) og prøvetakingspunkter (stjerne).

Tabell 1. Membranegenskaper. UF= Ultrafiltrering; NF=Nanofiltrering; Da= Dalton.

Membran	Molekylarvekt (Da)	Produsent	Materiale
UF	10.000	Alfa Laval, UFX-10pHt	Permanent hydrofilt polysylfon
NF#1	200-400	DOW, NF270	Polyamid tynnfilmkomposit
NF#2	150	Toray, TM600	Piperazin polyamidkomposit

ARG gjennom filtrering og hygienisering av avløpsvannet. Siden det foreligger lite informasjon om ytelse av membranfiltrering med hensyn til fjerning av ARB og ARG, var studiens andre mål å undersøke virksomhetsgraden av ultrafiltrering (UF) og nanofiltrering (NF) for å fjerne kultiverbare antibiotikaresistente *E. coli* fra utslippsvannet fra anleggene.

Materiale og metoder

Avløpsrensaneanlegg. Vannprøver ble tatt ved VEAS og BEVAS avløpsrensaneanlegg, der avløpsvann fra Oslo-Akershus behandles mekanisk, kjemisk og biologisk (Figur 1). En detaljert prosessbeskrivelse finnes i Schwermer *et al.* (2018). Mens VEAS tar imot avløpsvann fra fem store sykehus i Oslo-området, får ikke BEVAS noe avløpsvann fra sykehus. Det biologiske trinnet hos VEAS består av en biofilmprosess (fiksert-filmprosess for nitrifikasjon og denitrifikasjon med metanoltilførsel i denitrifikasjon), mens hos BEVAS benyttes en aktivslamprosess. Begge anleggene slipper ut det behandlede vannet på 30-55 m i Indre oslofjord.

Prøvetaking. Døgnblandingsprøver ble tatt med automatiserte prøvetakere fra råvannet, nedstrøms sedimentasjon / aktivert slam og sedimentasjon samt før utslippet (Figur 1) i okto-

ber 2014 (VEAS og BEVAS) og i februar 2015 (BEVAS).

Membranfiltrering. Utslippsvannet fra anleggene ble filtrert gjennom UF- og NF-membraner (Tabell 1) ved hjelp at et membranestellanlegg i laboratorieskala, som er detaljbeskrevet i Krzeminski *et al.* (2017) og Schwermer *et al.* (2018).

Resistensanalyse. Resistens mot antibiotika ble målt ved bruk av membranfiltrering som beskrevet i Watkinson *et al.* 2007. *E. coli* ble dyrket på sterile Difco MI agarplater uten og med tilsett antibiotika. Konsentrasjonene tilsvarte breakpoint / minste hemmende konsentrasjon (MIC) som skiller følsomme fra resistente organismer, dvs. Tmp/Smx: 4/76 µg/mL, Cip: 4 µg/mL, Amp: 32 µg/mL og Tet: 16 µg/mL. Totalkonsentrasjon *E. coli* ble i noen prøver kvantifisert ved bruk av «Most Probable Number» (MPN) Colilert-metoden (LOQ: 1 organisme/100 mL; IDEXX Laboratories, Inc.) etter ISO 9308-2:2012.

Molekylærbiologi. Utslippsprøver (0.15L volum) ble filtrert i triplikat gjennom filtre av polykarbonatmembran (0,2 µm porestørrelse; Whatman), og DNA ble ekstrahert (PowerWater DNA Isolation Kit; MOBIO Laboratories Inc., Carlsbad, CA). DNA fra tre filtre ble samlet, og utvalgte gener (Tabell 2) ble kvantifisert

Tabell 2. Gener brukt ved genanalysen. Relevans: 1 = persistent; 2 = prevalent; 3 = problematisk

Gen	Produkt	Resistensmål/Funksjon	Relevans
16S rRNA	Ribosomale proteiner	---	2
bla _{TEM-10}	Bredspektrede β -laktamaser (ESBL) klasse A	Penicilliner	1
bla _{CTX-M-15}		β -laktamer: penicilliner og cefalosporiner ¹	3
bla _{CTX-M-32}			
bla _{KPC-3}	Karbapenem-hydrolyserende klasse A β -laktamase	Karbapenem-antibiotika ² , penicilliner	3
bla _{OXA-48}	Karbapenem-hydrolyserende klasse D β -laktamaser (oxacillinaser)		
bla _{OXA-58}			
int1	Integrase-gen av klasse 1 integroner, plattform for ulike resistensgener	Ulike antibiotika (aminoglycosider, trimetoprim, β -laktamer og erythromycin)	3
mcr-1	Phosphatidylethanolamin transferase	Polymyxiner, som colistin ¹	3
sul1	Dihydropteroat syntase	Sulfonamider	2
tetM	Tetracyclinresistent protein	Tetracyclin	2

¹ Reserveantibiotika (WHO 2017); ² WHO watch group antibiotika

med qPCR (Universal Master Mix M3003 fra New England BioLabs Inc.) ved Teknisk Universitet Dresden, Institutt for hydrobiologi, i Tyskland. Referanser for primere er ikke angitt på grunn av begrenset plass.

Resultater og diskusjon

Antibiotikaresistente *E. coli* og ARG i renseanlegg

Den totale konsentrasjonen av dyrkbare *E. coli* ble redusert med over 2,2 log i begge avløpsanleggene, som er vanlig for konvensjonelle anlegg (Figur 2). Hos VEAS ble de fleste *E. coli* fjernet gjennom biofilmprosessen, mens graden av fjerning hos BEVAS var jevnere gjennom hele behandlingen. Andelen kultiverbare *E. coli* resistent mot de fire antibiotika som ble testet var omtrent like høy i råvannet ved begge anleggene (Figur 2). Siden kun VEAS får avløp fra fem store sykehus (totalt 2100 senger) i Oslo-Akershusområdet, mens BEVAS ikke får avløp fra sykehus, antyder det at hovedkilden til ARB ikke nødvendigvis er sykehus, men andre kilder. Dette viser også studier i andre land (EPA 2015). Det antas faktisk at de fleste ARB i kloakken kommer fra husholdninger og ikke fra sykehus, fordi sykehus vanligvis bidrar mindre enn 1% til

det totale avløpsvolumet (Kümmerer 2004). Unntaket er multiresistente kliniske bakterier, som er mest problematiske og som primært slippes ut fra sykehus. I kloakken ved VEAS ble bidraget av resistens-drivende substanser fra sykehus kvantifisert som generelt liten, unntatt noen sykehus-spesifikke stoffer som finnes sporadisk i høye konsentrasjoner (Thomas *et al.* 2007a). Samtidig brukes 85% av de totale solgte humanantibiotika i Norge i primærhelsetjeneste, det vil si utenfor sykehuset, og bidrag av antibiotika fra veterinærsektoren er ubetydelig (ECDC 2014; NORM/NORM-VET 2015). Dermed er det sannsynlig at husholdninger bidrar betydelig til seleksjon og videre til utslipp og spredning av ARB i både avløpssystemet og avløpsanlegg, som målingene av råvannet ved anleggene antyder.

Siden kommunale avløpsanlegg er sentrale punkter der de største avløpsstrømmene belastet med ARB, ARG og resistens-induserende stoffer fra ulike kilder møtes, er det plausibelt å etablere kontrollerende tiltak mot disse faktorene i anleggene. Per i dag er konvensjonelle anlegg ikke egnet til fjerning av slike faktorer. For å oppnå mer effektiv hygienisering av ARB og destruksjon av ARG, kreves derfor en oppgrade-

ring av eksisterende anlegg med et egnet avansert behandlingstrinn. I Tyskland er det beregnet at en teknisk optimalisering av store anlegg til dette formålet vil ha årlige kostnader på 1,3 milliarder euro, dvs. 16 euro per innbygger og år (Baars & Lambrecht 2018).

I råvannsprøver var *E. coli* delvis resistente mot Amp (6–27%) og Tmp/Smx (5–24%), og mindre mot Cip (<7%) (Figur 2). Dette samsvarer med trenden i kliniske studier, hvor *E. coli*-isolater fra urin viste høy resistens mot Amp (34%) og Tmp/Smx (21%), og lavere resistens mot Cip (7%) (NORM/NORM-VET 2015). Ved VEAS ble andelen resistente *E. coli* mest redusert i løpet av den fysiske og kjemiske behandlingen, mens proporsjonen ble uforandret gjennom den biologiske prosessen (Figur 2). I BEVAS' tilfelle var reduksjonen av andelen resistente *E. coli* mindre og jevnere over hele behandlingsprosessen. Til tross for en signifikant nedgang av den totale konsentrasjonen kultiverbare *E. coli* og en simultan nedgang av den relative andelen av de fleste antibiotikaresistente organismer, var hygieniseringen ufullstendig ved begge anleggene.

Resultatene fra qPCR-kvantifisering av utvalgte ARG og et integron i utslippsvannet fra VEAS viser at 16S rRNA, Int1 og Sull1 er de tre mest dominerende genene (Figur 3). Dette korrelerer med resultater fra utslippsundersøkelser ved avløpsanlegg i tre andre europeiske land (Rocha et al. 2018). Hyppig forekomst av Sull1 og noen β -laktamase-gener (bla_{TEM-1D} , bla_{OXA-48} , bla_{OXA-58} og $bla_{CTX-M-32}$) i utslippsvannet korrelerer med resultater fra kultivering, der en høy andel av *E. coli* viser resistens mot stoffgruppene sulfonamider/trimetoprim (Tmp/Smx; JO1E) og β -laktamer (Amp). Analog med det er 20–25 % av *E. coli*-isolater fra urin i Norge resistent mot Tmp/Smx (FUNL 2018). Funnet av genene bla_{TEM-1D} og Int1 samt tetM gjenspeiler resistens mot antibiotika i gruppen penicilliner og tetracycliner, som er de mest brukte gruppene av humanantibiotika i Norge. En slik korrelasjon mellom antibiotikaforbruk og genforekomst i vannet er derimot ikke tilfelle for stoffgruppen sulfonamider og trimetoprim (JO1E), hvor

resultatene fra kultivering og qPCR viser høy resistens mot denne stoffgruppen, mens forbruket av sulfonamider og trimetoprim er relativt lavt (NORM/NORM-VET 2015).

Vi fant relativt høye konsentrasjoner av karbapenemasegene OXA-48 og OXA-58 i avløpsprøvene, som indikerer høy forekomst av ulike typer karbapenemaser, sannsynligvis fra *Enterobacteriaceae* (bla_{OXA-48}) og *Acinetobacter spp.* (bla_{OXA-58}) (Figur 3). Karbapenemaser gir resistens mot de mest bredspektrede β -laktamene, karbapenemer. Dette er bekymringsfullt, siden karbapenem-antibiotika er blant de viktigste last-resort antibiotika (WHO 2017). I Norge brukes disse bare på sykehus og til pasienter med alvorlige infeksjoner som er vanskelige å behandle. Oxa-48 har også vært problematisk å detektere på sykehus, fordi dette enzymet i motsetning til de fleste andre karbapenemaser ikke bryter ned cefalosporiner. Antallet pasienter infisert med karbapenemase-produserende *Enterobacteriaceae* (CRE), *P. aeruginosa* og *Acinetobacter spp.*, som er de mest kritiske bakteriegruppene ifølge WHO, har økt i løpet av de siste 10 årene fra <5 tilfeller til 22 (*P. aeruginosa* og *Acinetobacter spp.*) og 37 (*Enterobacteriaceae*) tilfeller i Norge per år (NORM/NORM-VET 2016). Blant CRE isolert fra pasienter er *E. coli* og *K. pneumoniae* de dominerende artene.

Funn av høye konsentrasjoner av bla_{OXA-48} og bla_{OXA-58} i forhold til bla_{KPC-3} (Figur 3) passer med at det er beskrevet en raskere spredning av genene bla_{OXA-48} og bla_{OXA-58} verden over sammenlignet med bla_{KPC-3} (Bakthavatchalam et al. 2016). Lave konsentrasjoner av KPC-3 kan antyde at dette ikke er så hyppig i avløpsvannet og at det ennå ikke har spredt seg ut fra sykehusmiljøet, der det har vist stor evne til spredning i form av KPC-3-produserende *K. pneumoniae* som tradisjonelt er en sykehusbakterie.

Resultatet fra qPCR viser en relativt høy konsentrasjon av genet mcr-1 i utslippsvannet (Figur 3). Dette genet koder mot colistin (et polymyxin), som er et av få av siste valg antibiotika til human bruk (WHO 2017). I utlandet brukes colistin hyppig i intensivt dyrehold (fjærfe og gris) (RESET 2017). I Norge brukes

colistin derimot svært sjelden (0.005 DDD/1.000 mennesker/dag) til mennesker og ikke til dyr (NORM/NORM-VET 2016). Selv om *mcr-1* ikke ble oppdaget blant human-kliniske karbapenemaseproduserende *E. coli*-isolater fra hele landet i løpet av NORM-VET-overvåkingen mellom 2007-2014, fant man *mcr-1* for første gang i Norge i 2014 i avføring fra en reisende fra India (Solheim *et al.* 2016). *Mcr-1* har opprinnelse fra en gris i Kina og sprer seg raskt i *Enterobacteriaceae* over hele verden (Liu *et al.* 2016; RESET 2017). Genet forekommer i økende grad i kombinasjon med CTX-M, som da gir koresistens mot både colistin og cefalosporiner. *Mcr-1* ble også påvist tidligere i ESBL-produserende *E. coli* isolert fra prøver tatt på en badestrand på Kalvøya i Indre Oslofjord (Jørgensen *et al.* 2017a). Kombinerte resultater fra vår og den sist nevnte studien impliserer at gener for colistinresistens forekommer mye hyppigere i det akvatiske miljøet enn NORM/NORM-VET-overvåkingen antyder. Samtidig viser vår studie at avløpsanlegg er en av kildene til *mcr-1*, selv om det tidligere det antatt at *mcr-1* kommer fra kontaminasjon fra båttoaletter, dyrehold, jordbruk og trekkfugler (Jørgensen *et al.* 2017a).

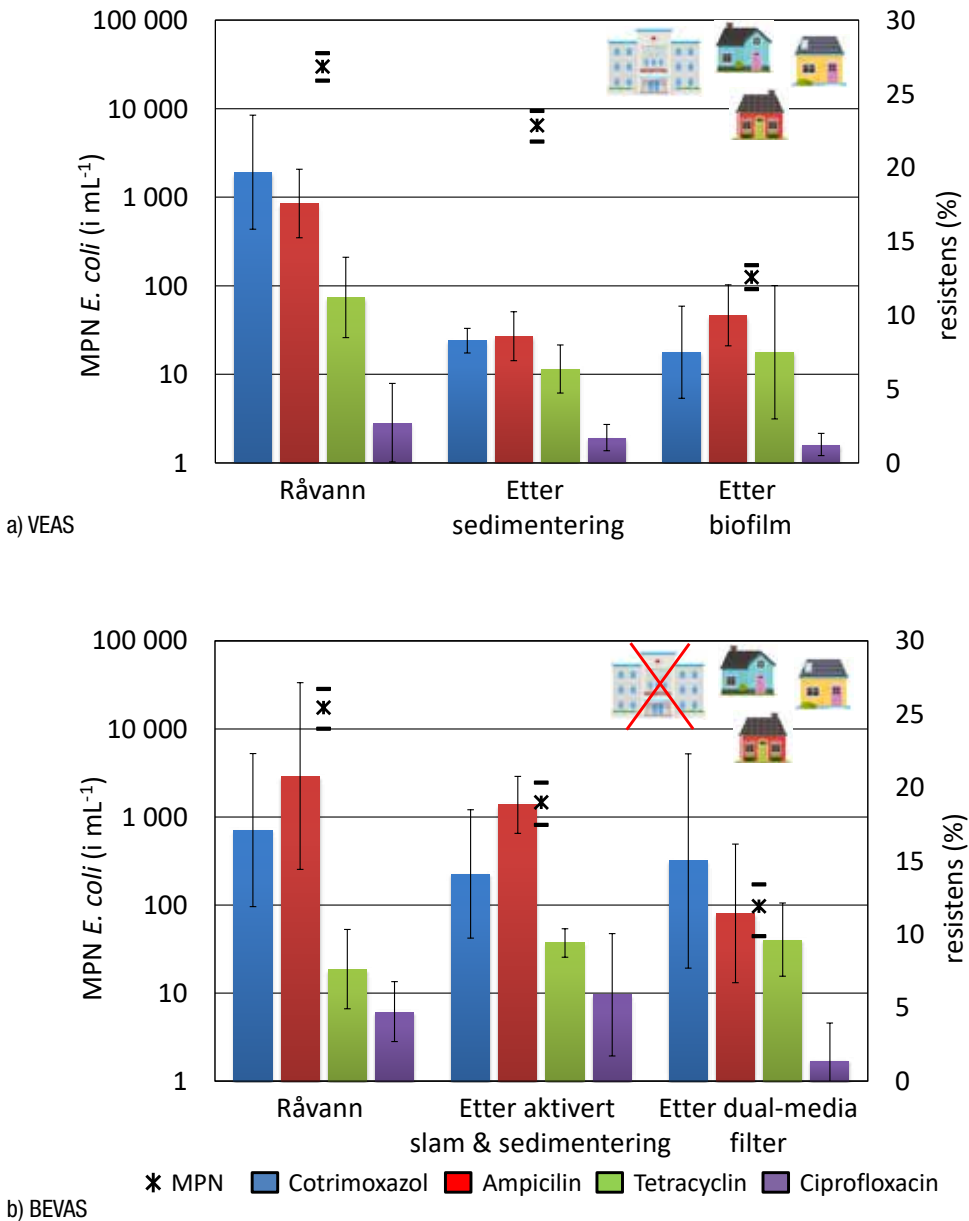
Vi identifiserte genene *bla*_{CTX-M-32} og *bla*_{CTX-M-15} for de bredspektrede β -laktamasene med aktivitet mot cefalosporiner, samt *bla*_{TEM-1D} som bare hydrolyserer penicilliner (Figur 3). Dette viser forekomst av resistens mot både penicillin β -laktamantibiotika, men også mot cefalosporiner, som er kritisk viktige antibiotika. CTX-M-15 ble påvist i en nylig utgitt studie av utslippsvann fra VEAS og ved en badestrand i Bærum (Jørgensen *et al.* 2017b) og har i de siste årene blitt det mest forekommende ESBL i *E. coli* i mange andre land (Dhanji *et al.* 2010). CTX-M-15 er et hyppig forekommende gen i humane isolater i Norge (Søraas *et al.* 2013; Jørgensen *et al.* 2017b), og det er overraskende at dette ble funnet i lavere konsentrasjon i vannet enn *bla*_{OXA-48}, som er svært sjeldent forekommende i kliniske isolater i Norge. For tiden har vi ingen forklaring på denne relasjonen.

Relatert til forekomst av resistens mot karbapenem-antibiotika og colistin, er resultatene

våre i samsvar med en nylig gjennomført miljøundersøkelse i Tyskland, der det ble påvist kontaminasjon med genene *mcr-1* og *bla*_{OXA-58} av vannprøver tatt fra resipienten nedstrøms et kommunalt avløpsanlegg og et sykehus (Baars & Lambrecht 2018). I likhet med vår studie, ble det samtidig funnet betydelige konsentrasjoner av bredspektrede β -laktamase (ESBL) gener (*bla*_{TEM-1D}, *bla*_{CTX-M-32}) i disse vannkildene. Dette antyder at forekomsten av resistens mot disse antibiotika er mye mer utbredt i vannmiljøet enn antatt.

Det mest dominerende genet ved qPCR-analysen (Figur 3), *IntI1*, er et klasse 1 integron-integrase-gen. Integroner kan ta opp ulike gener fra miljøet, som aktiveres som respons på stressfaktorer. Integroner inneholder genkassetter som koder for resistens mot ulike antibiotika, særlig aminoglykosider, trimetoprim, β -laktamer og erytromycin, og dermed representerer de molekylære indikatorer for antropogene påvirkninger (referanser i Gatica *et al.* 2016). Integroner forekommer i økende grad i avløpssystemer på grunn av forekomst av stress-drivende substanser, for eksempel antibiotika, som utøver seleksjonstrykk. Vannbehandling minker imidlertid ikke andelen av bakterieceller med klasse 1 integroner, og den forandrer ikke integriteten av ARG assosiert med integron (Gillings 2018).

En tidligere undersøkelse (Gatica *et al.* 2016) av sammensetning av *IntI1*-assosierte gener i utslippsprøver fra VEAS viser at resistens mot aminoglykosider var den mest dominere integron-assosierte antibiotikaresistensmekanismen. Ifølge (FUNL 2018) er resistens mot aminoglykosider i Skandinavia og i klinisk sammenheng foreløpig lite utbredt sammenlignet med andre land, men det er likevel problematisk fordi aminoglykosider tradisjonelt har vært hjørnesteinen i empirisk sepsisbehandling. Aminoglykosider gis intravenøst, og 60-90% av dosen gjenfinnes i aktiv form i urinen det første døgnet, og dette havner i kloakken der det sannsynligvis bidrar til spredning av resistens. Både bruk (i Norge mest gentamicin og tobramycin) og resistens mot aminoglykosider, særlig i noen

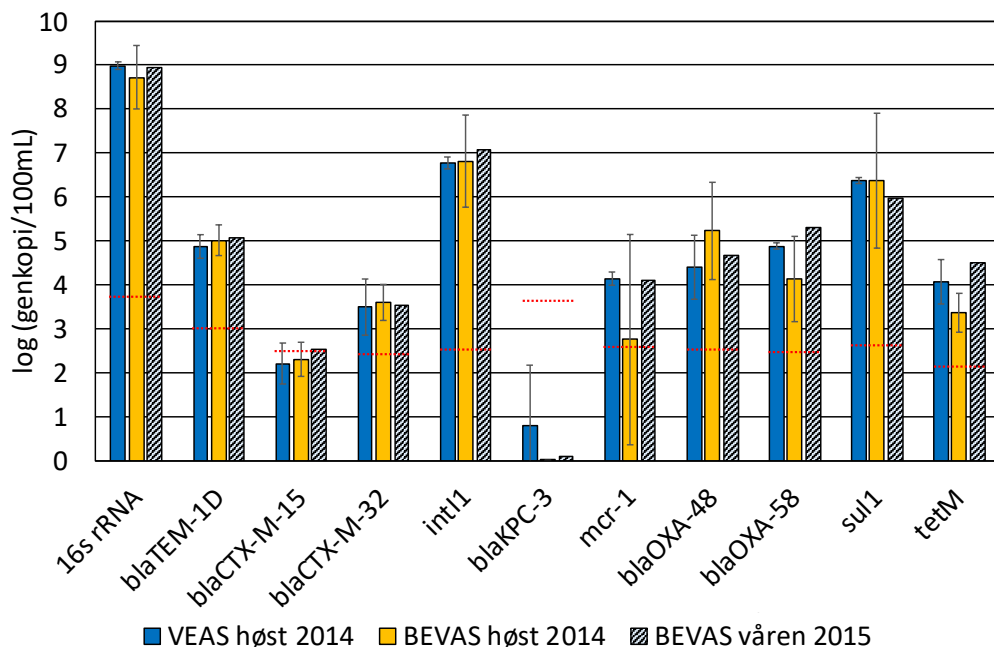


Figur 2. Totalkonsentrasjon av kultiverbare (som Most Probable Number, MPN; stjerner; akse t.v.) og prosentandel resistente *E. coli* (søyler; akse t.h.) i prøver fra (a) VEAS og (b) BEVAS. Feillinjene representer 95% og 33% konfidensintervall ved bakteriekonsentrasjon og andel resistens, respektivt.

Enterobacteriaceae og pneumokokker, viser en sterkt økende tendens de siste årene, selv om aminoglykosider utgjør en relativt liten (<3% av totalt solgte definerte døgndoser, DDD) andel av alle humanantibiotika brukt i Norge (NORM/NORM-VET 2015). Denne påstanden og utvik-

lingen men hensyn til rask spredning anses som bekymringsfulle.

Blant de undersøkte β -laktamase-genene som var Intl1-assosierte, dominerte klasse D β -laktamaser og bla_{OXA}-genene (Gatica et al. 2016). Dette resultatet bekreftes også gjennom



Figur 3. Forekomst av ARG i utslippsvann fra VEAS og BEVAS høsten 2014, og fra BEVAS våren 2015. Feillinjer viser standardavvik fra $n = 3$ målinger på tre etterfølgende døgn. Stipulerte røde linjer indikerer LOQ.

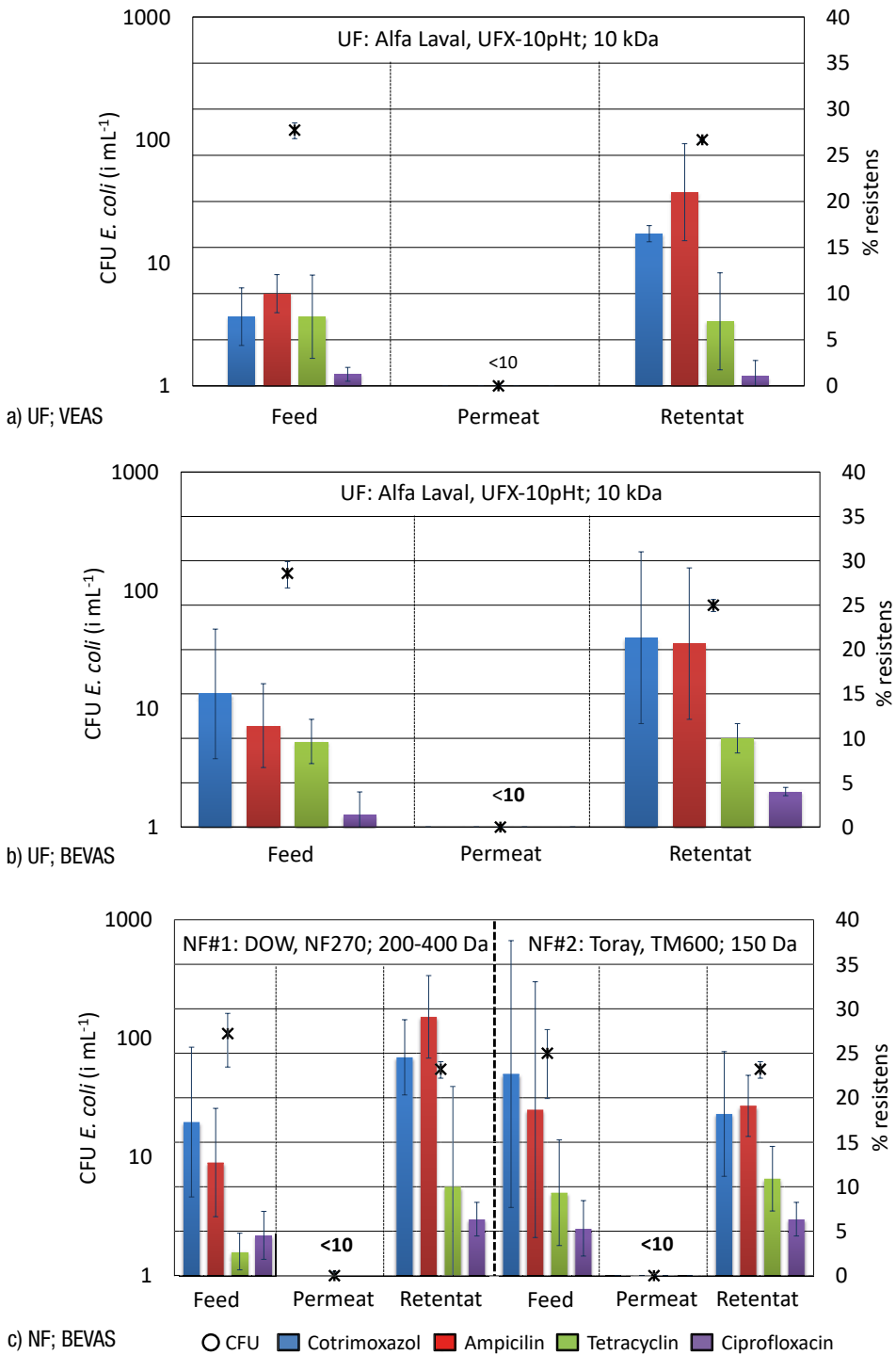
deteksjon av β -laktamase-genene bla_{OXA-48} og bla_{OXA-58} i qPCR-analysen (Figur 3). Resultatene våre er i stil med en studie (Jørgensen *et al.* 2017b) der 78% og 65% av ESBL-produserende *E. coli*-isolater i prøver tatt fra utslippsvannet ved VEAS og ved badestrender i Indre Oslofjord viser ervervet resistens mot aminoglykosider.

Variasjonen i relative konsentrasjoner av genene i prøver tatt på tre etterfølgende døgn i løpet av samme uke var lav i begge anlegg (Figur 3). Når det gjelder mønstret av genkonsentrasjoner i prøver tatt i løpet av samme sesong (høsten 2014) er det ingen forskjell mellom anleggene. I tillegg, når det gjelder prøver fra BEVAS, er mønstret av forekomst likt for de fleste genene uavhengig årstiden (høst 2014 og vår 2015). Dette antyder at det er lite forskjell i konsentrasjoner av de undersøkte genene mellom anleggene, i løpet av en uke og mellom årstider. Men fordi andre studier (Berendonk *et al.* 2016) som gikk over en lengre tidsperiode, tyder på at relative konsentrasjoner av ARG kan variere mellom årstider, trengs langtidsundersøkelser også for norske renseanlegg.

Membranfiltrering

Når det gjelder effektiviteten for å fjerne ARB fra utslippsvannet fra renseanlegg ved bruk av UF- og NF-membraner i et testanlegg for membranfiltrering, viser undersøkelsen at alle membranene fjernet kultiverbare *E. coli* til under deteksjonsnivået av platteringsmetoden (10 CFU/mL). Dermed ble også alle antibiotikaresistente *E. coli* fjernet. Disse resultatene ble bekreftet gjennom MPN-metoden (LOQ: 1 MPN/ 100 mL). Den totale effektiviteten for å fjerne *E. coli* fra ubehandlet vann via renseanlegget kombinert med UF utgjorde >4.2 log, uavhengig anlegget. Etter filtrering inneholdt retentatet nesten samme konsentrasjon av *E. coli* som var i feed-strømmen, dvs. at bakteriene ble akkumulert i retentatet. Differanser mellom måleverdiene forklares med metodenes presisjon (Figur 4). Prinsippet av fjerningen ved filtrering skjer sannsynligvis på grunnen av separering basert på størrelse og celle-kolloid interaksjoner.

Resultatene antyder at membranfiltrering vil kunne brukes som en tilleggsbarriere i vann-



Figur 4. Total konsentrasjon levende (CFU; stjerne) og prosentandel (søyler) resistente *E. coli* i feed (dvs. utslippsvann fra anlegg), permeat og retentat etter behandling med enten UF- eller med NF-membraner av utslippsvann fra (a) VEAS og (b, c) BEVAS. Feed-prøver ble tatt fra anleggene på ulike tidspunkter. Feillinjene representer 95% konfidensintervall for bakteriekonsentrasjon og 33% (n=2) konfidensintervall for andel resistens.

rensingen for å oppnå hygienisering av ARB ved avløpsbehandling. I forhold til andre metoder er fordelene at prosessen produserer vann med høy kvalitet, det trengs ingen kontinuerlig tilførsel av desinfeksjonsmiddel, det er ingen biprodukter av desinfeksjonen og det selekteres ikke for resistente organismer, samt at prosessen trenger lite plass, er fleksibel, robust og stabil over lang tid. Ved siden av funksjon som hygieniseringsbarriere er det også mulig å fjerne andre mikroforurensinger (Krzeminski *et al.* 2017). Blant teknologiens utfordringer er håndtering av retentatet og høyt energiforbruk i fullskala.

Konklusjoner

Studien viser at kultiverbare *E. coli* med resistens mot de undersøkte fire antibiotika forekommer i like høye konsentrasjoner i råvannet til både BEVAS og VEAS, selv om kun VEAS tar imot avløp fra sykehus. Samtidig viser resultatene fra genanalysen like høye konsentrasjoner for de 10 undersøkte i utslippsvannet fra begge anleggene. Dette impliserer at husholdninger i Oslo er en viktig kilde for antibiotikaresistens i avløpssystemet. Disse funnene bør bekreftes i mer detaljerte studier som dekker flere gener og med hyppigere prøvetaking over et lengre tidsrom.

Undersøkelsen av utslippsprøver viser høy forekomst av resistens mot de mest brukte antibiotikagruppene i Norge, nemlig penicilliner og tetracycliner. Samtidig viser den også resistens mot stoffgruppen sulfonamider og trimetoprim (J01E) samt aminoglykosider, som er mindre brukt. I tillegg til resistens mot disse vanlig brukte antibiotika, fant vi gener som koder for resistens mot antibiotika, som ifølge WHO er kategorisert enten som kritisk med hensyn til human helse eller som last-resort antibiotika. Dette inkluderer resistens mot karbapenemer, colistin og cefalosporiner. Sammen med andre ferske studier (Jørgensen *et al.* 2017b; Baars & Lambrecht 2018), antyder det at gener som koder for disse sjeldne typene antibiotikaresistens finnes i mye større grad i det akvatiske miljøet enn man ville ha antatt basert på kliniske/veteri-

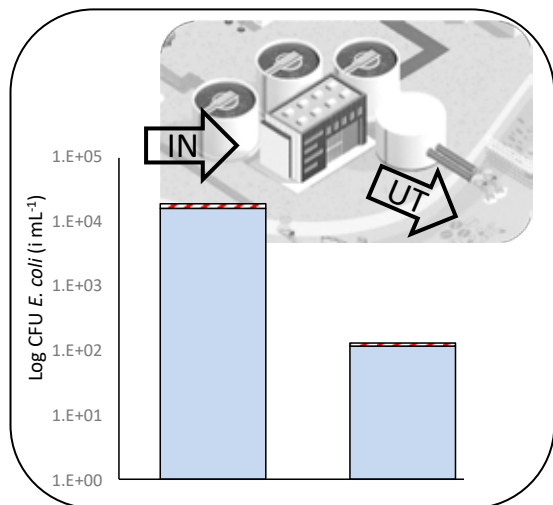
nærmedisinske overvåkinger. Det betyr at den økende spredningen av disse genene som registreres i hele verden også skjer her i Norge, til tross for at karbapenemer, colistin og cefalosporin-antibiotika generelt sett sjelden er brukt til mennesker (administreres kun på helseinstitusjoner) og ikke til dyr i Norge (NORM/NORM-VET 2016).

Målingene våre gir ikke informasjon om bakteriene er resistente mot flere antibiotika (multiresistens). Uten videre analyser er det også umulig å korrelere forekomst av de undersøkte genene til enkelte bakteriearter. Likevel registreres det i økende grad forekomst av multiresistente *E. coli* i avløpsvann og akvatiske resipienter, ofte i tilknytning til avløpsanlegg og sykehus (Jørgensen *et al.* 2017b; Baars & Lambrecht 2018). Samtidig forekommer flere av genene (CTX-M og OXA) vi undersøkte først og fremst på resistensplasmider og er dermed sterkt assosiert med multiresistens. Særlig karbapenemaseproduserende isolater er ofte multieller ekstremresistente og kan føre til høy dødelighet på grunn av begrensede behandlingsmuligheter (NORM/NORM-VET 2016). På grunn av risikoen multiresistente sykdomsfremkallende bakterier utgjør og overføringspotensialet av multiresistens til miljøbakterier, bør denne tematikken undersøkes videre.

Til tross for en betydelig reduksjon av den totale mengden kultiverbare *E. coli*, og dermed fraksjonen av antibiotikaresistente *E. coli* i begge avløpsanlegg, var hygienisering gjennom konvensjonell behandling ufullstendig (Figur 5). Dette kan være kritisk når ARB og ARG sammen med periodevis betydelige mengder av resistensdrivende substanser (Thomas *et al.* 2007b) slipper ut til økosystemet i Indre Oslofjord der det både kan medføre konflikter mellom brukere (bading, fiske, rekreasjon) og kan ha helsemessige konsekvenser. Hvilket akutte helserisiko og langsiktige økologiske konsekvenser går ut ifra utslipp fra avløpsrensingsanlegg er for tiden ukjent og er vanskelig å vurdere. Det er mange faktorer som spiller en rolle; genforekomst alene er ikke nok for å kunne si noe om risiko for AMR. Likevel finnes det studier som antyder en

direkte sammenheng mellom forekomst av AMR i det akvatiske miljøet og negativ påvirkning på helse (Jørgensen *et al.* 2017b; Leonard *et al.* 2018). For eksempel, i Jørgensen *et al.* (2017b) ble det påvist ESBL-produserende *E. coli* i alle prøver fra utslippsvannet fra VEAS samt ved en rekke badestrender i Indre Oslofjord. Isolatene var i mange tilfeller svært like kliniske isolater fra samme tidsperiode og område. Forfatterene konkluderte med at det ikke kunne utelukkes at pasienter hadde blitt smittet av resistente bakterier ved bading. I en annen artikkel (Søraas *et al.* 2013) ble det påvist en assosiasjon mellom bading i Indre Oslofjord og forekomst av urinveisinfeksjon med resistente bakterier i pasienter som bor i VEAS sitt område.

For å få en bedre forståelse rundt AMR-problematikken, en eventuelt nødvendig etablering av tekniske tiltak for bedre kontroll, samt potensiell tilpasning av regelverk avhengig av risikoen, kreves systematiske langtidsundersøkelser med hensyn til spredning av AMR i fjorden. Siden resistensproblematikken er sammensatt av mange faktorer og er kompleks, kreves en bedre og helhetlig forståelse med hensyn til «One-Health»-tilnærming. Dette oppnås gjennom økt og tettere interdisiplinært samarbeid og helhetlig politisk styring på tvers av landegrenser.



Figur 5. Illustrasjon for fjerning av totale kultiverbare (blå) og Amp-resistente (stipulert rød) *E. coli* i avløpsanlegg før utslipp til resipient.

Resultatene antyder at fjerning av ARB fra kommunalt avløpsvann primært bør gjennomføres i de sentrale renseanleggene der de største avløpsstrømmene belastet med ARB, ARG og resistensinduserende stoffer fra ulike kilder møtes. Imidlertid utelukker dette ikke lokal punktbehandling ved institusjoner der utslippet er intensivt belastet med multiresistente, helse-truende kliniske ARB og ARG samt sykehus-spesifikke resistensdrivende substanser.

Denne studien viser at fjerning av alle kultiverbare *E. coli*, dvs. inkludert antibiotikaresistente *E. coli* under målemetodens kvantifiseringsgrense, først ble oppnådd etter at utslippsvannet fra anleggene ble videre behandlet ved bruk av UF- og NF-membraner. Dermed konkluderes det at membranfiltrering er en effektiv løsning for etter-installasjon i konvensjonelle avløpsrenseanlegg med mål om å forbedre hygieniseringen, og dette utgjør et effektivt alternativ sammenlignet med andre metoder. Imidlertid er det umulig å konkludere om membraner er egnet til å fjerne ARG basert på denne undersøkelsen. Videre lar det seg ikke uttale om membranfiltrering, enten alene eller kombinert med andre teknologier, er en effektiv metode for å fjerne ARB og spesielt ARG fra avløpsvann i storskala.

Takksgelser

Forfatterne takker VEAS og BEVAS for prøvene og konstruktivt samarbeid. Teknisk Universitet Dresden, Institutt for hydrobiologi i Tyskland takkes for gjennomføring av qPCR-analysen. Prosjektet ble stimulert av COST Action ES1403 NEREUS programmet 'New and emerging challenges and opportunities in wastewater reuse', som ble støttet av COST (European Cooperation in Science and Technology, www.cost.eu). Arbeidet ble støttet fra NIVAs strategiske forskningsinitiativ SIS (NFR, kontrakt nr. 208430). Arne Vasli Lund Søraas (Oslo universitetssykehus) og Marc Anglès d'Auriac (NIVA) takkes for kritisk vurdering av og konstruktivt bidrag til manuskriptet.

Referanser

- Baars C. and Lambrecht O. (2018). Gefährliche Keime in Bächen, Flüssen und Seen. <https://www.ndr.de/nachrichten/niedersachsen/Gefaehrliche-Keime-in-Baechen-Fluessen-und-Seen,keime302.html> (accessed 06/02/2018).
- Bakthavatchalam Y. D., Anandan S. and Veeraraghavan B. (2016). Laboratory Detection and Clinical Implication of Oxacillinase-48 like Carbapenemase: The Hidden Threat. *Journal of Global Infectious Diseases* 8(1), 41-50.
- Berendonk T., Caucci S., Cacace D. and Dusi E. (2016). Saisonale Dynamik der Antibiotikaresistenzgene im Abwasser. In: 49. ESSENER TAGUNG für Wasser- und Abfallwirtschaft „Wasserwirtschaft 4.0“ Pinnekamp J (ed.), Ges. z. Förderung d. Siedlungswasserwirtschaft an der RWTH.
- Berendonk T. U., Manaia C. M., Merlin C., Fatta-Kassinos D., Cytryn E., Walsh F., Burgmann H., Sorum H., Norstrom M., Pons M. N., Kreuzinger N., Huovinen P., Stefani S., Schwartz T., Kisand V., Baquero F. and Martinez J. L. (2015). Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nat Rev Microbiol.*
- COM (2017). *The new EU One Health action plan against antimicrobial resistance*, European Commission, Brussels.
- ECDC (2014). *Surveillance of antimicrobial consumption in Europe 2012*, European Centre for Disease Prevention and Control Stockholm.
- EPA (2015). *Hospital effluent: impact on the microbial environment and risk to human health*, Environmental Protection Agency, Wexford, Ireland.
- FUNL (2018). Norsk legemiddelhåndbok. <http://legemiddelhandboka.no/> (accessed 01/02/2018).
- Gatica J., Tripathi V., Green S., Manaia C. M., Berendonk T., Cacace D., Merlin C., Kreuzinger N., Schwartz T., Fatta-Kassinos D., Rizzo L., Schwermer C. U., Garelick H., Jurkevitch E. and Cytryn E. (2016). High Throughput Analysis of Integron Gene Cassettes in Wastewater Environments. *Environ Sci Technol* 50(21), 11825-36.
- Gillings M. R. (2018). DNA as a Pollutant: the Clinical Class I Integron. *Current Pollution Reports*.
- HI (2018). *Kartlegging av antibiotikaresistente bakterier i marine skjell – Antibiotikaresistens i akvatisk miljø*, Report 10-2018, Havforskningsinstituttet.
- HOD (2015). *Nasjonal strategi mot Antibiotikaresistens 2015–2020*. Helse- og omsorgsdepartementet, Oslo, Norge.
- HOD (2016). *Handlingsplan mot antibiotikaresistens i helsetjenesten*. Helse- og omsorgsdepartementet, Oslo, Norge.
- Jørgensen S. B., Søråas A., Arnesen L. S., Leegaard T., Sundsfjord A. and Jenum P. A. (2017a). First environmental sample containing plasmid-mediated colistin-resistant ESBL-producing *Escherichia coli* detected in Norway. *APMIS* 125(9), 822-5.
- Jørgensen S. B., Søråas A. V., Arnesen L. S., Leegaard T. M., Sundsfjord A. and Jenum P. A. (2017b). A comparison of extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* from clinical, recreational water and wastewater samples associated in time and location. *Plos One* 12(10), e0186576.
- Krzeminski P., Schwermer C., Wennberg A., Langford K. and Vogelsang C. (2017). Occurrence of UV filters, fragrances and organophosphate flame retardants in municipal WWTP effluents and their removal during membrane post-treatment. *J Hazard Mater* 323, 166-76.
- Kümmerer K. (2004). Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54(2), 311-20.
- Leonard A. F. C., Zhang L., Balfour A. J., Garside R., Hawkey P. M., Murray A. K., Ukoumunne O. C. and Gaze W. H. (2018). Exposure to and colonisation by antibiotic-resistant *E. coli* in UK coastal water users: Environmental surveillance, exposure assessment, and epidemiological study (Beach Bum Survey). *Environment International*.
- Liu Y.-Y., Wang Y., Walsh T. R., Yi L.-X., Zhang R., Spencer J., Doi Y., Tian G., Dong B., Huang X., Yu L.-F., Gu D., Ren H., Chen X., Lv L., He D., Zhou H., Liang Z., Liu J.-H. and Shen J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases* 16(2), 161-8.
- MSIS Meldesystem for smittsomme sykdommer. <https://www.fhi.no/hn/helseregistre-og-registre/msis/> (accessed 16.01.2018).
- NIBIO (2018). *Forekomst av antibiotikaresistensmarkørgenet nptII i norsk natur*, Norsk Institutt For Bioøkonomi.
- NORM-VET Overvåkingsprogrammet for antibiotikaresistens. <https://www.vetinst.no/overvaking/antibiotikaresistens-norm-vet> (accessed 16.01.2018).
- NORM Norsk overvåkingsssystem for antibiotikaresistens hos mikrober <https://www.fhi.no/hn/helseregistre-og-registre/norm/> (accessed 16.01.2018).

NORM/NORM-VET (2015). *Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway*, Tromsø / Oslo.

NORM/NORM-VET (2016). *Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway*, Tromsø / Oslo.

NVI (2017). *Antimicrobial resistance in the Norwegian environment - red fox as an indicator*, Report 11-2017, Norwegian Veterinary Institute.

NVI (2018). *Antibiotic resistance in terrestrial wild mammal species in Norway- roe deer and wild reindeer as indicators species*, Report 6-2018, Norwegian Veterinary Institute.

RESET (2017). *Resistenzen bei Tier und Mensch - gemeinsame Forschung in Deutschland*. <http://www.reset-verbund.de>.

Rizzo L., Manaia C., Merlin C., Schwartz T., Dagot C., Ploy M. C., Michael I. and Fatta-Kassinos D. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Science of the Total Environment* **447**, 345-60.

Rocha J., Cacace D., Kampouris I., Guilloteau H., Jäger T., Marano R. B. M., Karaolia P., Manaia C. M., Merlin C., Fatta-Kassinos D., Cytryn E., Berendonk T. U. and Schwartz T. (2018). Inter-laboratory calibration of quantitative analyses of antibiotic resistance genes. *Journal of Environmental Chemical Engineering; in press*.

Schwermer C. U., Krzeminski P., Wennberg A. C., Vogel-sang C. and Uhl W. (2018). Removal of antibiotic resistant *E. coli* in two Norwegian wastewater treatment plants and by nano- and ultrafiltration processes. *Water Science and Technology* **77**(4), 1115-26.

Solheim M., Bohlin J., Ulstad C. R., Schau Slettemeas J., Naseer U., Dahle U. R. and Wester A. L. (2016). Plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* detected from 2014 in Norway. *Int J Antimicrob Agents* **48**(2), 227-8.

Søraas A., Sundsfjord A., Sandven I., Brunborg C. and Jenum P. A. (2013). Risk factors for community-acquired urinary tract infections caused by ESBL-producing enterobacteriaceae-a case-control study in a low prevalence country. *Plos One* **8**(7).

Thomas K. V., Dye C., Schlabach M. and Langford K. H. (2007a). Source to sink tracking of selected human pharmaceuticals from two Oslo city hospitals and a wastewater treatment works. *Journal of Environmental Monitoring* **9**(12), 1410-8.

Thomas K. V., Langford K. H., Grung M., Schlabach M. and Dye C. (2007b). *Occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluents from hospitals (Ullevål and Rikshospitalet) and VEAS wastewater treatment works (TA-2246/2007)*, Norwegian Environment Agency, Oslo, Norway.

UD (2016). *Norges oppfølging av FNs bærekraftsmål*, Utenriksdepartementet.

WHO (2014). *Antimicrobial Resistance - Global Report on surveillance*, World Health Organization, Geneva.

WHO (2017). *WHO Model List of Essential Medicines 20th list*, World Health Organization.