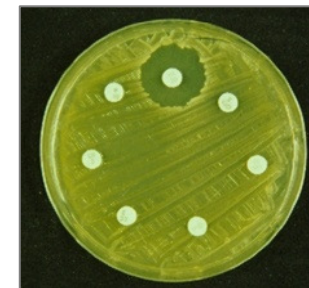


Resistenz-Entwicklung gegen Desinfektionsmittel in der Lebensmittelkette



Uwe Rösler



Einleitung

- R&D wird weltweit als wichtigste Maßnahme zur Infektkettenunterbrechung in der Primärproduktion aber auch in der Lebensmittelverarbeitung gesehen.
- neben klassischen Zoonose-Erregern sind zunehmend auch kommensale, antibiotikaresistente Erreger (z.B. MRSA & ESBL) ein Problem in der Nutztierhaltung, dem Lebensmittelsektor und der Humanmedizin.
- deutlich verbesserte Hygiene-Maßnahmen gelten hier als Mittel der Wahl
 - R&D
 - Isolation (Humanmedizin)
- Es gibt ein ständig wachsende Zahl von Berichten über Desinfektionsmittel-Resistenzen, auch mit co-Induction von Antibiotika-Resistenzen

Resistenzen gegen Desinfektionsmittel

Wirkprinzip vs. Desinfektionsmittelresistenz:

Wirkmechanismus	Stoffgruppe	Besonderheiten
<p>Chemische Reaktion/kovalente Bindung</p> <ul style="list-style-type: none"> •Oxidation/Oxidierung, insb. von thiolhaltigen Proteinen und Enzymen •Alkylierungsreaktionen von Amino-, Imino-, Amid-, Carboxyl- und Thiolgruppen •Zerstörung von Zytoplasma-membranen und Denaturierung von Proteinen und DNA 	<p>Hypochlorite, O₂-Abspalter</p> <p>Aldehyde (Glutaraldehyd, Formaldehyd)</p> <p>Laugen, Org. Säuren</p>	<p>Weitgehend Konzentrations-unabhängig</p>
<p>Ionische Interaktion/Bindung</p> <ul style="list-style-type: none"> •Elektrostatische Interaktion mit Phospholipiden der Zellmembran 	<p>QAVs, Chlorhexidin, Biguanide</p>	<p>Stark Konzentrations-abhängig</p>
<p>Physikalische Interaktion</p> <ul style="list-style-type: none"> •Trennung/Auflösung der Phospholipid-doppelschicht 	<p>Alkohole, Phenole, Tenside</p>	

Resistenzen gegen Desinfektionsmittel

Intrinsische Resistenz:

- natürliche, chromosomal codierte Resistenz
 - determiniert das prinzipielle Wirkungsspektrum eines Desinfektionsmittels
 - Spezialform: “Phänotypische Resistenz” zB in Biofilmen

Erworbene (extrinsische) Resistenz:

- durch Mutation
- durch Aufnahme mobiler genetischer Elemente (= horizontaler Gentransfer)
 - sehr leicht übertragbar (Plasmide)
 - oft gemeinsam mit Antibiotika- und Metall-Resistenzen
 - Mögliche wechselseitige Co-Selektion

Resistenzen gegen Desinfektionsmittel

Co-Selektion

Journal of Antimicrobial Chemotherapy Advance Access published March 27, 2012
Journal of Antimicrobial Chemotherapy

J Antimicrob Chemother
 doi:10.1093/jac/dks108

Escherichia coli producing VIM-1 carbapenemase isolated on a pig farm

Jennie Fischer¹, Irene Rodriguez¹, Silvia Schmoeger¹, Anika Friese², Uwe Roesler², Reiner Helmuth¹ and Beatriz Guerra^{1*}

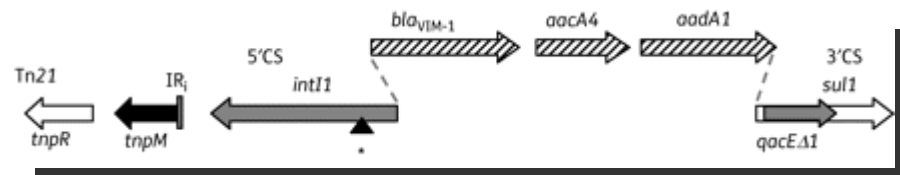
¹Federal Institute for Risk Assessment, BfR, Department for Biological Safety, Max-Dahm Strasse 8-10, D-10589 Berlin, Germany; ²Free University Berlin, FU, Institute of Animal Hygiene and Environmental Health, Philippstr. 13, D-10115 Berlin, Germany

*Corresponding author. Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Didersdorfer Weg 1, D-12277 Berlin, Germany. Tel: +49-30-8412-2082; Fax: +49-30-8412-2953; E-mail: beatriz.guerra@bfr.bund.de

Keywords: livestock, carbapenems, class 1 integrons, antimicrobial resistance, plasmids

florfenicol (30 µg), amikacin (30 µg), gentamicin (10 µg), kanamycin (30 µg), streptomycin (10 µg), spectinomycin (100 µg), nalidixic acid (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), tetracycline (30 µg), trimethoprim (5 µg), sulfamethoxazole (300 µg), trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg) and colistin (10 µg). The results were interpreted using both CLSI clinical breakpoints (M100-S21) and, when available, the EUCAST epidemiological cut-off values (ECOFFs), which consider isolates with an acquired or mutational resistance mechanism to the drug in question as the non-wild-type population (www.eucast.org). In all isolates, the characterization of the β-lactamase-encoding genes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CARB}*, *bla_{CTXβ}*, *bla_{SH}*, *bla_{ACC}*, *bla_{CTP}*, *bla_{SH}*, *bla_{EBL}*, *bla_{OXA}* and *bla_{MOX}*, additional resistance genes, and class 1 integrons was conducted as previously described.⁶ The phylogenetic group, and for selected isolates the multilocus sequence type (MLST; <http://mist.ucc.ie/mist/dbs/Ecoli>), was also determined.

One of the *Escherichia coli* isolates tested, R178, showed resistance to all penicillins, cephamycins, cephalosporins and amoxicillin/clavulanic acid, but was susceptible to aztreonam. R178 also showed a zone diameter of 22 mm for imipenem (intermediate by the CLSI clinical breakpoint and non-wild-type by the EUCAST ECOFF), 24 mm for ertapenem (susceptible by the CLSI clinical breakpoint and non-wild-type by the EUCAST



Resistenz/Co-Selektion: Penicilline, Cephalosporine, Streptomycin/Spektinomycin, Sulphonamide, Carapeneme, QAVs

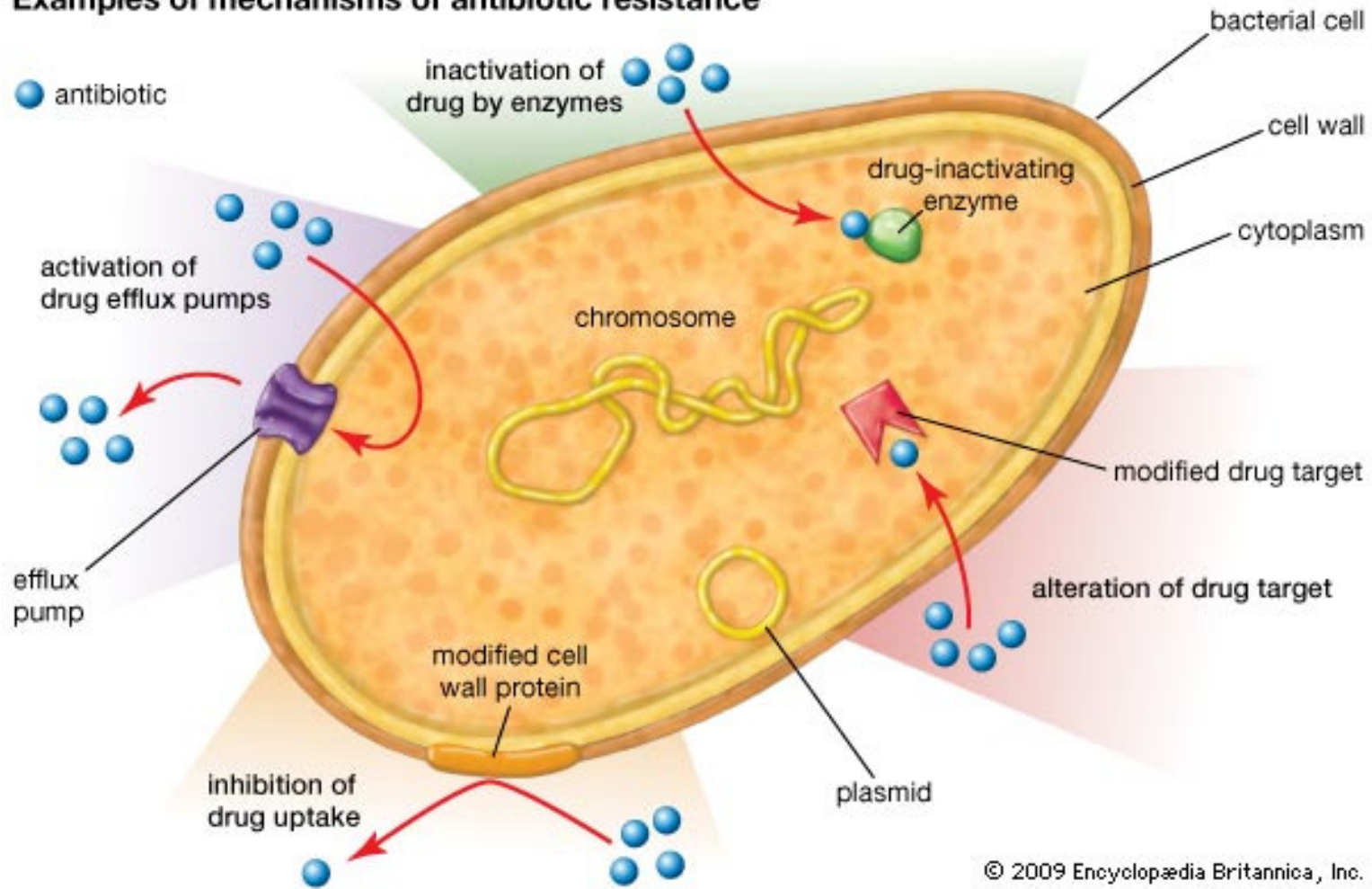
Resistenzen gegen Desinfektionsmittel

Drei prinzipielle Mechanismen:

- **Enzymatische Inaktivierung** (der Desinfektionsmittel & Antibiotika)
 - chemische Modifikation der Wirkstoffe
 - enzymatische Spaltung der Wirkstoffe
- **Verminderte Intrazelluläre Konzentration** (der Desinfektionsmittel & Antibiotika)
 - verminderter Influx der Wirkstoffe (modifizierte Zellwände, downregulierte Porine)
 - gesteigerter Eflux der Wirkstoffe (durch spezifische Transporter oder “Multidrug Transporter”)
- **Modifizierte Zielstrukturen** (für Desinfektionsmittel & Antibiotika)
 - chemische Modifikation der Zielstruktur (oft durch Punktmutationen)
 - Schutz der Zielstruktur (zB. Kapselbildung, Biofilme)
 - “Ersatz” der Zielstruktur durch funktionelles, “resistentes” Analogon

Resistenzen gegen Desinfektionsmittel

Examples of mechanisms of antibiotic resistance



Resistenzen gegen Desinfektionsmittel

Antibiotika- vs. Desinfektionsmittelresistenz:

- Antibiotika haben meist nur eine spez. Targetstruktur
 - einzelne Mutation kann bereits Resistenz hervorrufen (z.B. Pbp2b bei MRSA)
 - Co-Induktion von Desinfektionsmittelresistenzen unwahrscheinlich/selten

- Desinfektionsmittel haben meist mehrere Targetstrukturen
 - mehrere Mutationen für Resistenzbildung erforderlich (Mehrschrittresistenz)
 - Co-Induktion von Antibiotikaresistenzen häufig



Resistenzen gegen Desinfektionsmittel

Resistenzen bei folgenden Stoffklassen:

- Triclosan
 - Überexpression von Multidrug-Effluxpumpen
 - Starke Co-Induktion von AB-Resistenzen,
- QAV, insbesondere Benzalkoniumchlorid
 - Inaktivierung/down-Regulation von Porinen, Überexpression von Effluxpumpen
 - Häufige Co-Induktion von Antibiotikaresistenzen
- Chlorhexidin
 - Inaktivierung/Modifikation von Porinen, Überexpression von Effluxpumpen
 - Co-Induktion von Desinfektionsmittelresistenzen
- selten auch Aldehyde und Sauerstoffabspalter
 - Formaldehyd → Formaldehyddehydrogenase
 - Sauerstoffabspalter → Proteine mit antioxidativer Wirkung plus Endonuklease IV zur Reparatur radikalinduzierter DNA-Schäden

Resistenzen gegen Desinfektionsmittel

Was bedeutet das praktisch?

Table I Increases in MIC of CHX seen in *P. aeruginosa* and *E. coli* exposed to gradually increasing concentrations of CHX

Number of subcultures (at 48 h intervals)	MIC ($\mu\text{g/mL}$) of CHX vs.	
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
0	8–10†	0.2‡
1	> 14	0.5
2	22	0.7
3	28*	0.2
4	> 40*	–‡
5	> 50*	–‡
6	70*	–‡

*These cultures were found to be stable after 15 subcultures in CHX-free nutrient broth and used for further experimentation;

† Original MIC;

‡ Not done (see text).

Table IV MICs of *P. aeruginosa* cultures following repeated exposure to CHX (5 $\mu\text{g/mL}$)

Culture number	Original MIC ($\mu\text{g/mL}$ CHX) before multiple exposure to CHX (5 $\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$ CHX) after five subcultures in CHX (5 $\mu\text{g/mL}$)
1*	8–10	> 70‡
2	28†	> 70‡
3	> 40†	> 70‡
4	> 50†	> 70‡
5	70†	> 70‡

*Standard parent strain;

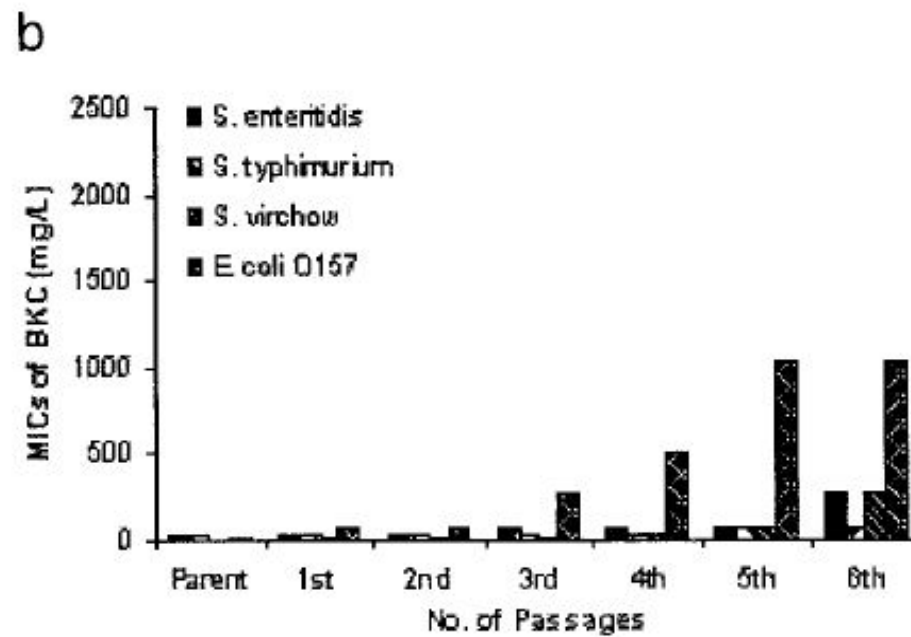
† Cultures from step-wise training method, trained to higher MIC than standard parent strain;

‡ These cultures were found to be stable after 15 subcultures in CHX-free nutrient broth.

Thomas et al. (2000): *J Hosp Inf*, 46, 297-303

Resistenzen gegen Desinfektionsmittel

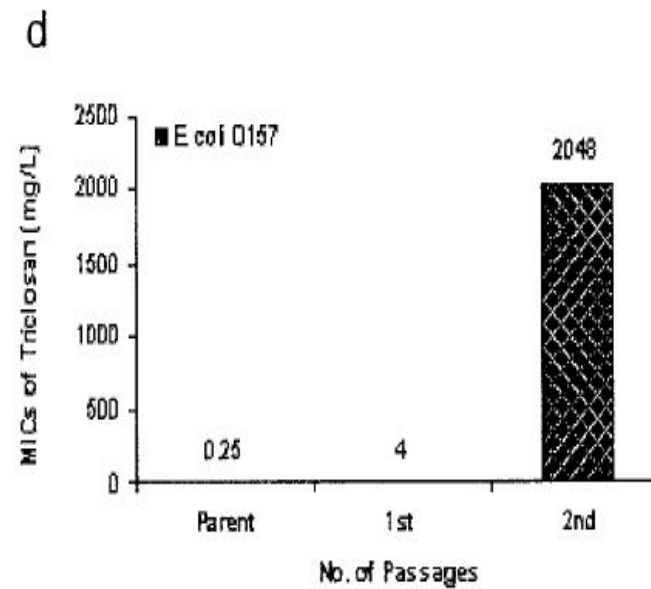
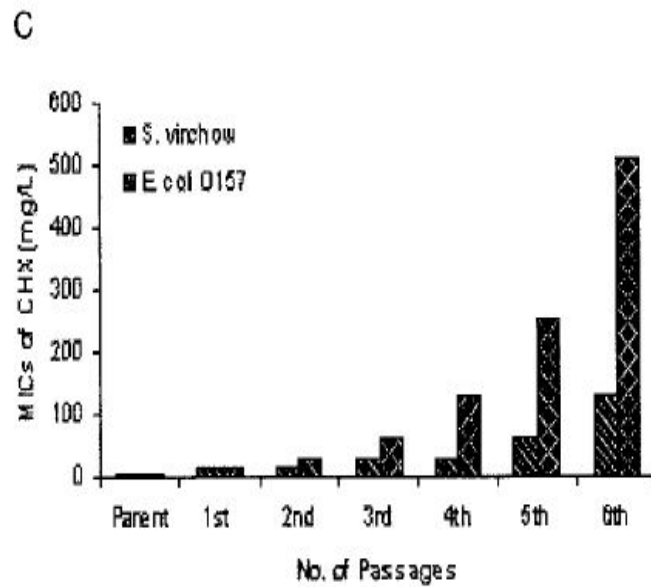
Was bedeutet das?



Braoudaki et al. (2004): *J Clin Microb*, 42, 73-78

Resistenzen gegen Desinfektionsmittel

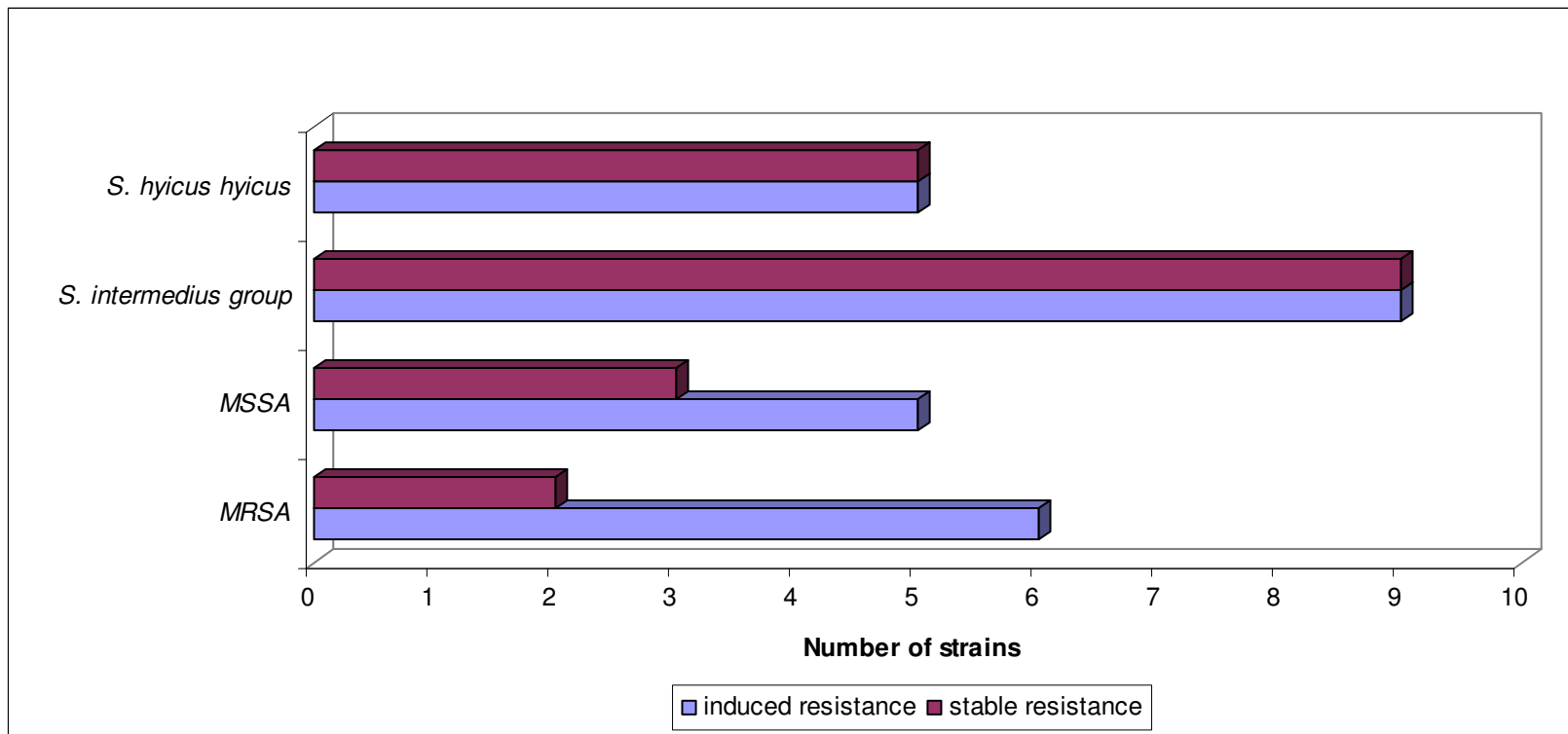
Was bedeutet das?



Braoudaki et al. (2004): *J Clin Microb*, 42, 73-78

Resistenzen gegen Desinfektionsmittel

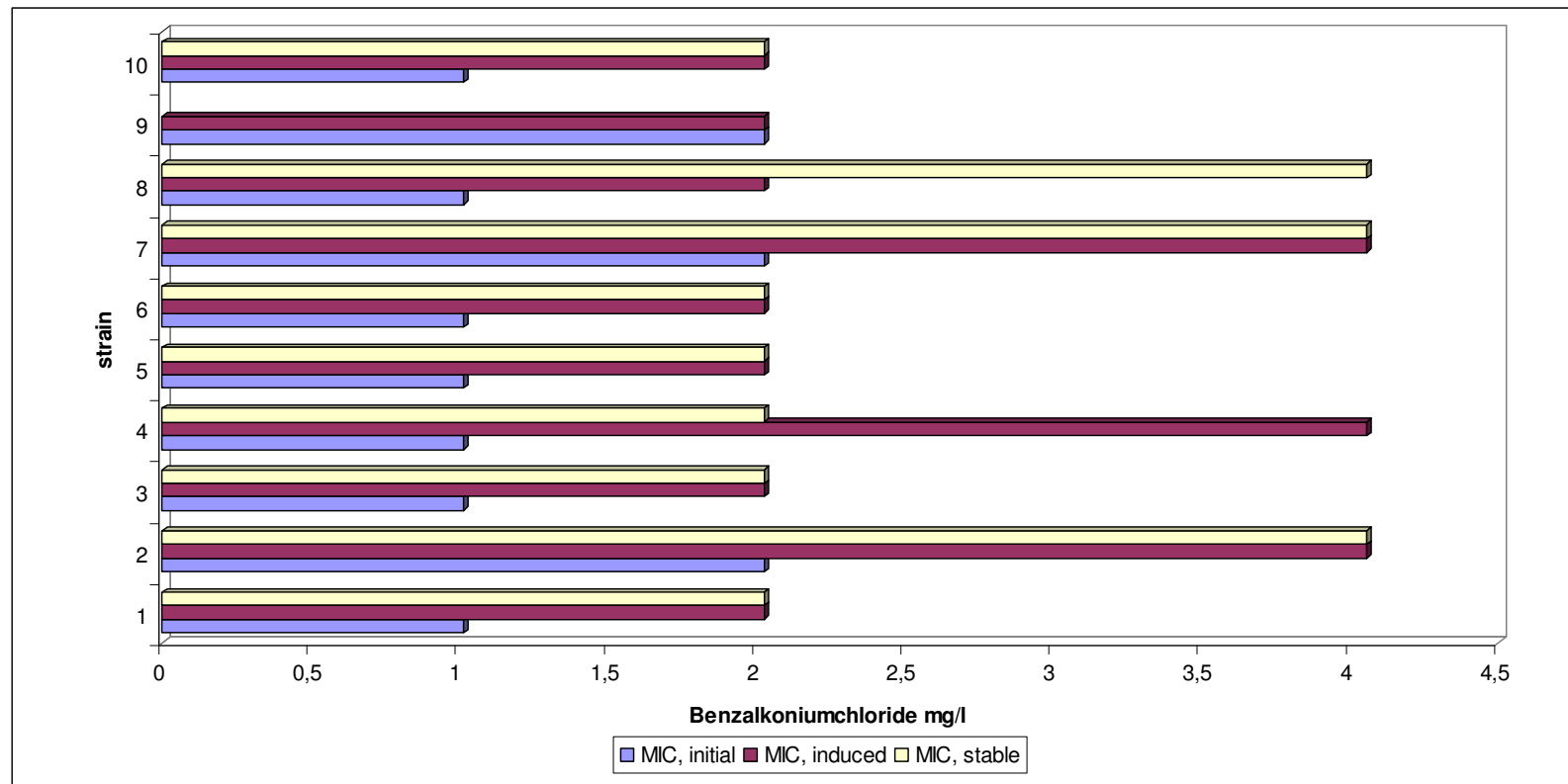
Benzalkoniumchlorid



Resistenzen gegen Desinfektionsmittel

Benzalkoniumchlorid

S. intermedius



Resistenzen gegen Desinfektionsmittel

Was bedeutet das *praktisch*?

Table 1. Identification and level of resistance found in bacterial samples from three commercial hatcheries.

Sample		Disinfectant type		
Origin	Bacteria species	Glutaraldehyde	Phenol	Quarternary ammonia
Hatchery 1				
Tray rinse	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	—	Moderate ^a	—
Hatchery 2				
Pull room	<i>Enterobacter agglomerans</i>	—	—	Moderate
Hatcher	<i>Bacillus badius</i>	High	High	—
Eggshell	<i>Bacillus cereus</i>	High	High	—
Eggshell	<i>Bacillus cereus</i>	High	—	—
Eggshell	<i>Bacillus thuringiensis</i>	High	High	—
Wash room	<i>Serratia marcescens</i>	—	—	Moderate
Hatcher	<i>Serratia marcescens</i>	—	—	Moderate
Hatchery 3				
Chick trachea	<i>Enterococcus faecalis</i>	High	—	—
Egg truck	<i>Bacillus cereus</i>	High	High	—
Hatcher	<i>Bacillus cereus</i>	High	Moderate	—
Chick bus	<i>Bacillus cereus</i>	High	—	—
Egg rack	<i>Bacillus thuringiensis</i>	High	Moderate	—
Pull room	<i>Enterococcus faecalis</i>	Moderate	—	—
Wash room	<i>Enterococcus faecalis</i>	Moderate	—	—
Egg truck	<i>Enterococcus faecalis</i>	Low ^c	—	—
Chick bus	<i>Enterococcus faecalis</i>	Low	—	—
Wash room	<i>Enterococcus faecalis</i>	Low	—	—
Egg truck	<i>Enterococcus faecium</i>	Low	—	—

^aResistance at the manufacturer's recommended dilution for up to 15 min.

^bResistance above the manufacturer's recommended dilution for up to 15 min.

^cResistance after less than 15 min of exposure at levels below the manufacturer's recommended dilution.

Willinghan et al. (1996): *Avian Diseases*, 40, 510-515.

Resistenzen gegen Desinfektionsmittel

Kreuzresistenzen zu Antibiotika?

- Triclosan
 - Beta-Laktame, Chloramphenicol, Tetracycline, Fluorochinolone, Imipenem
- QAV, insbesondere Benzalkoniumchlorid
 - Beta-Laktame, Chloramphenicol, Tetracyclin, Imipenem
- Chlorhexidin
 - Beta-Laktame, Polymyxin B, Gentamycin, Fluorochinolone



Resistenzen gegen Desinfektionsmittel

Kreuzresistenzen zu Antibiotika

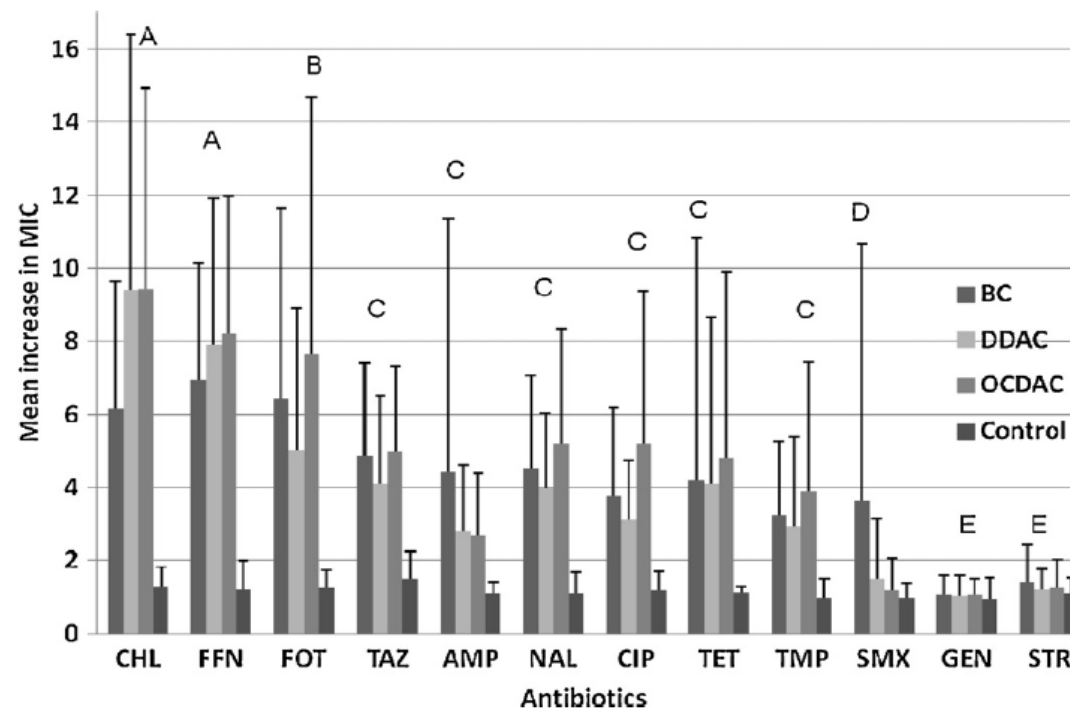


Fig. 2. Mean increase in MIC to antibiotics observed after exposure to benzalkonium chloride (BC), didecyl dimethyl ammonium chloride (DDAC), dioctyl dimethyl ammonium chloride (OCDAC) and to culture broth without disinfectant (control) in 10 *E. coli* strains. MIC tests were done twice. Letters (A-E) over each group of tested QACs (excluding the control) indicate a statistically significant difference among antibiotics ($p < 0.05$). Error bars represent standard deviation.

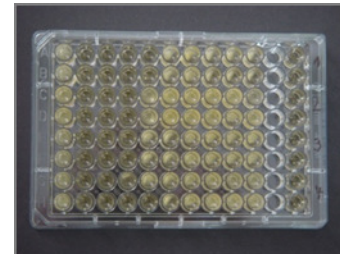
Buffet et al. (2012): *Vet Mic*, ahead of print.

Konsequenzen/Schlussfolgerungen

- Quaternäre Amoniumverbindungen, Chlorhexidin und Triclosan sind teilweise problematische Desinfektionsmittel:
 - Eingeschränktes Wirkungsspektrum
 - Teils starke Resistenzbildung
 - Teils Co-Induktion von Antibiotikaresistenzen
 - **Problem:** mehr als 2/3 der Desinfektionsmittel im Lebensmittelbereich sind QAVs (z.B. DVG-Liste)
 - Alternativen?: Chlor- und Sauerstoffabspalter, EtOH, Säuren
 - **Frage:** Anteil an der AB-Resistenzproblematik in KH und der Tierhaltung?
- Unsachgemäßer Einsatz kann ebenso wie bei Antibiotika ein sich ausbreitendes Resistenzproblem verursachen.

Konsequenzen/Schlussfolgerungen

- Nur Einsatz geprüfter/gelisteter Desinfektionsmittel (DVG) mit den vorgeschriebenen Konzentrationen und Einwirkzeiten!!!
- Routinemäßige MHK-Bestimmungen und Präparatewechsel?
- Festlegung von MIC-Werten zur Desinfektionsmittel-Resistenztestung (epidem. Cutoff, “hygienischer” Cutoff)



Acknowledgements



R. v. Ostertag

**Danke
für Ihre Aufmerksamkeit!**