

Aus dem Institut für Tier- und Umwelthygiene  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Induktion von Desinfektionsmittelresistenzen und  
Co-Induktion von Antibiotikaresistenzen bei *Escherichia coli*  
und *Enterococcus spp.* aus Nutztierhaltungen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
KatrIn Zimmermann (geb. Lohmann)  
Tierärztin  
aus Berlin

Berlin, 2012

Journal-Nr.: 3625

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Thomas Alter  
Dritter Gutachter: PD Dr. Rüdiger Hauck

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

disinfectants, resistance, *Escherichia coli*, *Enterococcus*, antibiotics, drug resistance

Tag der Promotion: 26.06.2013

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-335-6

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2012**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2013

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

[verlag@menschundbuch.de](mailto:verlag@menschundbuch.de) – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

# Inhalt

<b>Inhalt</b>	<b>3</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>5</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>7</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>9</b>
<b>2. Literaturübersicht</b>	<b>11</b>
2.1 Desinfektion in der Tierhaltung	11
2.1.1 Definitionen	11
2.1.2 Rechtliche Grundlagen	12
2.1.3 Praktische Durchführung	13
2.1.4 Wirkungsweise von Desinfektionsmitteln	14
2.1.4.1 Peressigsäure	15
2.1.4.2 Glutaraldehyd	16
2.1.4.3 Ameisensäure	17
2.1.5 Einflussfaktoren auf die Wirkung von Desinfektionsmitteln	18
2.2 Resistenzen gegen Desinfektionsmittel	21
2.2.1 Definitionen	21
2.2.2 Resistenzmechanismen	22
2.2.3 Kreuzresistenzen zwischen Antibiotika und Desinfektionsmitteln	24
2.2.4 Epidemiologie von Desinfektionsmittelresistenzen	27
2.2.4.1 Humanmedizin	28
2.2.4.2 Tierhaltung	29
2.3 Epidemiologie von Resistenzen der untersuchten Erreger	31
2.3.1 <i>Enterococcus spp.</i>	31
2.3.2 <i>Escherichia coli</i>	32
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>35</b>
3.1 Allgemeiner Versuchsaufbau	35
3.2 Bakterien	37
3.2.1 Verwendete Keime	37
3.2.2 Isolierung der Keime aus Kotproben	37
3.2.3 Identifikation der Isolate	38
3.2.4 ESBL-Multiplex-PCR	38
3.2.5 Asservierung der Isolate	39
3.3 Desinfektionsmittel	40
3.3.1 Verwendete Desinfektionsmittel	40
3.3.2 Wasser standardisierter Härte	40
3.3.3 Verdünnungsstufen der Desinfektionsmittel	41
3.4 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration der Desinfektionsmittel	42
3.5 Passagen der Bakterien bei subinhibitorischen Desinfektionsmitteldosen	44
3.6 Passagen ohne Zusatz von Desinfektionsmittel (Stabilitätspassagen)	46
3.7 Agardiffusionstest mit ausgewählten Antibiotika	47

3.7.1	<i>Enterococcus spp.</i>	47
3.7.2	<i>E. coli</i>	48
3.7.3	Durchführung	49
3.8	Statistische Auswertung	51
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>52</b>
4.1	Verwendete Isolate	52
4.1.1	Identifizierung der Bakterien-Spezies	52
4.1.2	Untersuchung der <i>E. coli</i> -Isolate mittels PCR	53
4.2	Toleranzinduktion gegen Peressigsäure	54
4.2.1	MHK vor den Passagen	54
4.2.2	MHK nach den Passagen	54
4.2.3	MHK nach den Stabilitätspassagen ohne Peressigsäurezusatz	55
4.3	Toleranzinduktion gegen Glutaraldehyd	58
4.3.1	MHK vor den Passagen	58
4.3.2	MHK nach den Passagen	58
4.3.3	MHK nach den Stabilitätspassagen ohne Glutaraldehydzusatz	59
4.4	Toleranzinduktion gegen Ameisensäure	60
4.4.1	MHK vor den Passagen	60
4.4.2	MHK nach den Passagen	60
4.4.3	MHK nach den Stabilitätspassagen ohne Ameisensäurezusatz	61
4.5	Agardiffusionstest mit ausgewählten Antibiotika	62
4.5.1	<i>Enterococcus spp.</i>	62
4.5.2	<i>E. coli</i>	63
4.5.3	ESBL-bildende <i>E. coli</i>	64
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>66</b>
5.1	Resistenzentwicklung der Testkeime gegen die verschiedenen Desinfektionsmittel	67
5.1.1	Peressigsäure	68
5.1.2	Glutaraldehyd	69
5.1.3	Ameisensäure	71
5.1.4	Gegenüberstellung der verschiedenen Bakterienisolate und Desinfektionsmittel	72
5.1.5	Betrachtung der Methodik	73
5.2	Verhalten der Testkeime gegen Antibiotika	76
5.3	Praktische Relevanz für Tierhaltung	78
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>81</b>
<b>7.</b>	<b>Summary</b>	<b>83</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>85</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang</b>	<b>95</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>107</b>
	<b>Eigenständigkeitserklärung</b>	<b>108</b>

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bakterielle Resistenzmechanismen gegen Desinfektionsmittel [21]	24
Tabelle 2: Beispiele von Kreuzresistenzen zwischen Desinfektionsmitteln und Antibiotika	26
Tabelle 3: Pipettierschema für die ESBL-Multiplex-PCR nach Monstein et al. [138]	38
Tabelle 4: Wirkstoffe und Wirkstoffkonzentrationen der verwendeten Desinfektionsmittel	40
Tabelle 5: Bestandteile von Wasser standardisierter Härte	41
Tabelle 6: Desinfektionsmittelkonzentrationen für die MHK-Bestimmung	41
Tabelle 7: Gegen <i>Enterococcus spp.</i> getestete Antibiotika	48
Tabelle 8: Gegen <i>E. coli</i> getestete Antibiotika	49
Tabelle 9: Übersicht über die isolierten und anschließend in den Versuchen verwendeten <i>Enterococcus spp.</i>	52
Tabelle 10: ESBL-Genfamilien der verwendeten ESBL-bildenden <i>E. coli</i> -Isolate	53
Tabelle 11: MHK der Testkeime vor den Passagen mit Wofasteril <sup>®</sup> E400	54
Tabelle 12: MHK der <i>Enterococcus spp.</i> im Verlauf der Passagen mit Wofasteril <sup>®</sup> E400	56
Tabelle 13: MHK der <i>E. coli</i> im Verlauf der Passagen mit Wofasteril <sup>®</sup> E400	56
Tabelle 14: MHK der ESBL-bildenden <i>E. coli</i> im Verlauf der Passagen mit Wofasteril <sup>®</sup> E400	57
Tabelle 15: MHK der Testkeime vor den Passagen mit Permanent Neu <sup>®</sup>	58
Tabelle 16: MHK der <i>Enterococcus spp.</i> im Verlauf der Passagen mit Permanent Neu <sup>®</sup>	59
Tabelle 17: MHK der Testkeime vor den Passagen mit Organosept Neu <sup>®</sup>	60
Tabelle 18: MHK der <i>Enterococcus spp.</i> im Verlauf der Passagen mit Organosept Neu <sup>®</sup>	61
Tabelle 19: Hemmhofdurchmesser ausgewählter <i>Enterococcus</i> -Isolate vor und nach den Passagen mit Peressigsäure, Glutaraldehyd und Ameisensäure	63
Tabelle 20: Hemmhofdurchmesser ausgewählter <i>E. coli</i> -Isolate vor und nach den Passagen mit Peressigsäure, Glutaraldehyd und Ameisensäure	64
Tabelle 21: Hemmhofdurchmesser ausgewählter ESBL-bildender <i>E. coli</i> -Isolate vor und nach den Passagen mit Peressigsäure, Glutaraldehyd und Ameisensäure	65
Tabelle 22: MHK der <i>E. coli</i> im Verlauf der Passagen mit Permanent Neu <sup>®</sup>	95
Tabelle 23: MHK der ESBL-bildenden <i>E. coli</i> im Verlauf der Passagen mit Permanent Neu <sup>®</sup>	95
Tabelle 24: MHK der <i>E. coli</i> im Verlauf der Passagen mit Organosept Neu <sup>®</sup>	95
Tabelle 25: MHK der ESBL-bildenden <i>E. coli</i> im Verlauf der Passagen mit Organosept Neu <sup>®</sup>	96
Tabelle 26: Hemmhofdurchmesser für den zur Kontrolle des Agardiffusionstests mitgeführten <i>S. aureus</i> ATCC 25923	96
Tabelle 27: Hemmhofdurchmesser für den zur Kontrolle des Agardiffusionstests mitgeführten <i>E. coli</i> ATCC 25922	97
Tabelle 28: Hemmhofdurchmessergrößen im Doppelansatz von <i>E. faecium</i> DSM 2918 vor und nach den Passagen	98
Tabelle 29: Hemmhofdurchmessergrößen im Doppelansatz von <i>E. hirae</i> (Bestand 2) vor und nach den Passagen	99
Tabelle 30: Hemmhofdurchmessergrößen im Doppelansatz von <i>E. faecium</i> (Bestand 9) vor und nach den Passagen	100
Tabelle 31: Hemmhofdurchmessergrößen im Doppelansatz von <i>E. coli</i> DSM 682 vor und nach den Passagen	101
Tabelle 32: Hemmhofdurchmessergrößen im Doppelansatz von <i>E. coli</i> aus Bestand 1 vor und nach den Passagen	102
Tabelle 33: Hemmhofdurchmessergrößen im Doppelansatz von <i>E. coli</i> aus Bestand 2 vor und nach den Passagen	103

Tabelle 34: Hemmhofdurchmessergrößen im Doppelansatz des ESBL-bildenden <i>E. coli</i> 09E915 vor und nach den Passagen	104
Tabelle 35: Hemmhofdurchmessergrößen im Doppelansatz des ESBL-bildenden <i>E. coli</i> aus Bestand 1 vor und nach den Passagen	105
Tabelle 36: Hemmhofdurchmessergrößen im Doppelansatz des ESBL-bildenden <i>E. coli</i> aus Bestand 2 vor und nach den Passagen	106

## Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	destilliertes Wasser (Aqua destillata)
AMC	Amoxicillin/Clavulansäure
AMP	Ampicillin
ATCC	American Type Culture Collection
B	Bacitracin
C	Chloramphenicol
CEN	europäisches Komitee für Normung (Comité Européen de Normalisation)
CEN/TC	technisches Komitee (technical committee) des CEN
CIP	Ciprofloxacin
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CN	Gentamicin
CT	Colistin
CTX	Cefotaxim
Da	Dalton
DIN	Deutsches Institut für Normung
DLG	Deutsche Landwirtschaftsgesellschaft
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
E	Erythromycin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>E. hirae</i>	<i>Enterococcus hirae</i>
EG	Europäische Gemeinschaft
EHEC	enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EN	Europäische Norm
ENR	Enrofloxacin
ESBL	Beta-Laktamasen mit erweiterten Wirkungsspektrum (Extended Spectrum Beta-Lactamase)
ETEC	enterotoxische <i>Escherichia coli</i>
EU	Europäische Union

G	Gramm
H	Stunde
HHD	Hemmhofdurchmesser
KbE	Koloniebildende Einheiten
MHK	Minimale Hemmkonzentration
Min	Minute
ml	Milliliter
Mm	Millimeter
NA	Nalidixinsäure
NaCl	Natriumchlorid
Nm	Nanometer
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
RL	Richtlinie
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
S	Streptomycin
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>sp.</i>	eine Spezies
<i>spp.</i>	mehrere Spezies ( <i>species pluralis</i> )
STEC	shigatoxinbildende <i>Escherichia coli</i>
SXT	Sulphamethoxazole/Trimethoprim
TE	Tetrazyklin
TEC	Teicoplanin
TSB	Trypton-Soja-Bouillon
VA	Vancomycin
VRE	vancomycinresistente <i>Enterococcus spp.</i>
WG	Arbeitsgruppe (working group)
WSH	Wasser standardisierter Härte
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer



# 1. Einleitung

Mikroorganismen passen sich kontinuierlich an wechselnde Gegebenheiten an. So postuliert Chapman (1998), dass keine antimikrobielle bzw. chemische Substanz existiert, gegen die nicht über kurz oder lang eine Resistenzentwicklung stattfindet [1]. Dies beinhaltet auch Desinfektionsmittel, welche eine herausragende Rolle bei der Bekämpfung und Prophylaxe von Infektionen spielen. So gehen etwa White et al. (2001) davon aus, dass, wenn bekanntermaßen der Einsatz von Antibiotika zur Resistenzentwicklung gegen diese führt, die Verwendung von Desinfektionsmitteln Desinfektionsmittelresistenzen zur Folge haben muss [2]. In der Tierhaltung birgt dabei die Entstehung von Desinfektionsmittelresistenzen die beiden großen potentiellen Gefahren der Beeinträchtigung der Herdenproduktivität durch vermehrte klinische und subklinische Infektionen der Tiere und einer Gefährdung des Menschen [3]. Diese könnte sowohl durch die Übertragung pathogener resistenter Bakterien z.B. entlang der Lebensmittelkette auf den Menschen oder durch den Transfer von Resistenzgenen apathogener Bakterien aus Lebensmitteln auf pathogene Bakterien des Menschen erfolgen [4].

Bezugnehmend auf die Problematik der Resistenzentwicklung von Bakterien gegen Desinfektionsmittel wirft Russel (2002) verschiedene Fragen auf:

1. Bleiben antibiotikaresistente Bakterien empfindlich gegen Desinfektionsmittel?
2. Sind desinfektionsmittelresistente Bakterien ebenfalls gegen Antibiotika resistent?
3. Können Desinfektionsmittel für Antibiotikaresistenzen bei Bakterien selektieren?
4. Kann dies Probleme im klinischen Alltag erzeugen? [5]

Da die verschiedenen Mikroorganismen sich den unterschiedlichen Desinfektionsmitteln gegenüber keinesfalls einheitlich verhalten, müssen diese Fragen für den jeweiligen Einzelfall immer wieder neu untersucht werden.

Ein Ausbruch mit einem chlorhexidinresistenten *Proteus mirabilis*-Stamm in einem Krankenhaus Anfang der 1980er Jahre, an welchem 90 Patienten erkrankten von denen zwei in der Folge verstarben, verdeutlicht zwei Probleme: so können einerseits desinfektionsmittelresistente Bakterien zugleich eine Vielzahl von Antibiotikaresistenzen aufweisen und andererseits können sie Ausbrüche signifikanter Morbidität verursachen [6]. Es gibt inzwischen zahlreiche Berichte über Desinfektionsmittelresistenzen bei verschiedenen Wirkstoffen, von denen viele zudem mit Kreuzresistenzen gegen dritte Substanzen, wie Antibiotika, einhergehen [5, 7]. Dabei wurde insbesondere in der Krankenhausumgebung wiederholt von Toleranzentwicklungen verschiedener Bakterien gegen unterschiedliche Desinfektionsmittel berichtet [8, 9].

Neben der gut untersuchten Krankenhausumgebung finden jedoch Desinfektionsmittel auch in anderen Bereichen, wie z.B. der Nutztierhaltung, routinemäßig Anwendung. Für die Beantwortung der Frage, inwieweit von Desinfektionsmitteln mit den in der Tierhal-

tung weit verbreiteten Wirkstoffen Peressigsäure, Glutaraldehyd und Ameisensäure ein ähnliches Risiko ausgeht, soll diese Arbeit einen Beitrag leisten. Dafür wurden Feldisolate und die entsprechenden Referenzstämme aus der Desinfektionsmittelprüfung von *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Enterococcus*-Spezies als ubiquitäre Bakterien aus Nutztierhaltungen auf ihr Potential, Resistenzen gegen die untersuchten Wirkstoffe zu entwickeln, untersucht. Dabei soll für diese Mikroorganismen ebenfalls ermittelt werden, inwieweit sich vorhandene Antibiotikaresistenzen auf die Desinfektionsmittelsensibilität der Bakterien auswirken bzw. ob induzierte Empfindlichkeitsverluste gegen diese Desinfektionsmittel die Wirksamkeit von Antibiotika beeinträchtigen können.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Desinfektion in der Tierhaltung

In der modernen Intensivtierhaltung, bei der eine hohe Tierzahl auf relativ geringem Raum gehalten wird, kommt der Gesunderhaltung des Bestandes ein herausragender Stellenwert zu. Neben einer guten Nährstoffversorgung sind auch die Umweltbedingungen von besonderer Wichtigkeit. Pathogene Mikroorganismen können sich bei der hohen Tierdichte in der modernen Intensivtierhaltung mit erheblicher Geschwindigkeit ausbreiten und die Leistung der Tiere lange vor dem Auftreten erster Krankheitssymptome maßgeblich beeinträchtigen. Deshalb spielt die Prävention von Erkrankungen eine übergeordnete Rolle, wobei insbesondere die Hygiene, d.h. die Reinigung und Desinfektion, ein wichtiges Mittel darstellt [10].

Neben der direkten Übertragung durch Tier-zu-Tier-Kontakt ist die indirekte Übertragung einer der Haupttransmissionswege von Mikroorganismen. Pathogene und apathogene Mikroorganismen können in der Umwelt zum Teil sehr lange persistieren. Oberflächen dienen pathogenen Mikroorganismen dabei als Reservoir mit dem Potential der Ausbreitung von Krankheiten [11]. Bei der Desinfektion in der Tierhaltung handelt es sich somit um eine Prophylaxemaßnahme mit dem Ziel, den Infektionsdruck in der Tierumgebung zu senken und die Notwendigkeit von Behandlungen zu minimieren [12].

Während der Stallbelegung können sich große Mengen von Mikroorganismen akkumulieren, so dass diese durch gründliche Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen, vor beispielsweise dem nächsten Mastdurchgang, entfernt werden müssen [10]. Die Desinfektion von Oberflächen ist somit ein wichtiges Mittel zur Unterbrechung von Infektionsketten [11]. Dabei steht bei der Desinfektion in der Tierhaltung neben der Gesundheit der Tiere auch der vorbeugende Verbraucherschutz im Fokus [13]. Zusätzlich zur Infektionsprophylaxe kommt der Desinfektion gleichermaßen im Seuchenfall eine herausragende Bedeutung zu [14, 15].

#### 2.1.1 Definitionen

Als Desinfektion bezeichnet man einen Prozess, der vermehrungsfähige Mikroorganismen auf einem Gegenstand oder in einem Bereich dergestalt hemmt oder abtötet, dass keine Infektionsgefährdung mehr von ihm ausgehen kann [2, 16]. Dies führt zu einer Reduktion des Keimgehaltes um mindestens fünf Größenordnungen [17], wobei Cerf et al. (2010) betonen, dass man, im Gegensatz zur Sterilisation, bei desinfizierten Gegenständen nicht davon ausgehen darf, dass sie vollständig frei von lebenden Mikroorganismen sind [18].

Die Begriffe der Antiseptik und der Sterilisation müssen von dem der Desinfektion abgegrenzt werden. So benennt man Maßnahmen als Antiseptik, welche eine derartige Keimreduktion an oder im lebenden Gewebe durchführen [19]. Hingegen bezeichnet man als

Sterilisation einen Prozess, welcher jegliche Form lebensfähiger Mikroorganismen vollständig entfernt oder zerstört [18, 20].

Desinfektionsmittel sind dementsprechend Produkte zur Anwendung auf unbelebten Objekten oder Oberflächen, welche Bakterien zerstören oder ihr Wachstum hemmen. Antibiotika sind indessen Substanzen synthetischer oder natürlicher Herkunft, welche genutzt werden um bakterielle Infektionen bei Menschen und Tieren zu bekämpfen [21]. Sie sind darauf ausgerichtet in sehr niedrigen Konzentrationen gegen eine limitierte Anzahl verschiedener Organismen in oder auf lebendem Gewebe zu wirken [2]. Die Intention bei der Verwendung von Desinfektionsmitteln und Antibiotika ist jedoch dieselbe, obwohl sich ihre Wirkmechanismen deutlich unterscheiden: die Zerstörung oder Hemmung pathogener bzw. unerwünschter Mikroorganismen [2].

### **2.1.2 Rechtliche Grundlagen**

In der Europäischen Union (EU) ist durch die Richtlinie 98/8/EG eine Regulation des Desinfektionsmitteleinsatzes durch die Mitgliedsstaaten vorgegeben, mit dem Ziel maximale Sicherheit für Mensch und Umwelt zu gewährleisten. Für die Umsetzung der Bestrebungen innerhalb der EU, die gegenseitige Anerkennung von Zulassungen zu erreichen, soll eine gemeinsame Liste von zugelassenen Wirkstoffen geschaffen werden [22].

Die meisten europäischen Länder verfügen bereits über eine Regelung zur Prüfung von Desinfektionsmitteln, welche es für das Ziel der gegenseitigen Anerkennung von Zulassungen und somit für einen funktionierenden Binnenmarkt zu vereinheitlichen gilt [23]. Aus diesem Grund wurde zur Ergänzung der Richtlinie 98/8/EG durch das Europäische Komitee für Normung (CEN) die Norm CEN/TC 216 geschaffen, welche in verschiedenen Arbeitsgruppen (WG) Materialien, Methoden und Vorgehen bei der Desinfektionsmittelprüfung innerhalb der EU vereinheitlichen soll. Die WG 2 ist als veterinärmedizinische Arbeitsgruppe dafür zuständig, einheitliche Normen für den veterinärmedizinischen Bereich zu erstellen [23].

Die nationale Umsetzung dieser europäischen Normen erfolgt in Deutschland gemäß den Richtlinien der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), welche die Wirksamkeit für Desinfektionsmittel der Tierhaltung und im Lebensmittelbereich nach einheitlichen, über die europäischen Vorgaben hinausgehenden Richtlinien prüft [13, 24]. Diejenigen Desinfektionsmittel, welche von der DVG erfolgreich getestet wurden, sind zusammen mit den Anwendungsempfehlungen den Desinfektionsmittellisten der DVG entnehmbar [25]. Neben einer Prüfung auf Wirksamkeit werden die Desinfektionsmittel zusätzlich auf Materialverträglichkeit und Anwendbarkeit begutachtet, was jedoch nicht durch die DVG, sondern durch die Deutsche Landwirtschaftsgesellschaft (DLG) vorgenommen wird.

Sowohl die europäischen als auch die Deutschen Richtlinien unterliegen kontinuierlichen Veränderungen, da sie fortwährend neuen wissenschaftlichen Erkenntnissen angepasst und weiterentwickelt werden [13, 23].

### 2.1.3 Praktische Durchführung

In der Tierhaltung spielt die Desinfektion in vier unterschiedlichen Bereichen eine wichtige Rolle. So nimmt die Reinigung und Desinfektion von Gebäuden, z.B. zwischen aufeinanderfolgenden Mastdurchgängen, eine wichtige Stellung ein. Des Weiteren wird die Desinfektion zur Bildung von Barrieren eingesetzt, wie beispielsweise Desinfektionswannen vor Gebäuden oder bei der Desinfektion von Fahrzeugen. Ein dritter Bereich von Desinfektionsmaßnahmen stellt die Keimreduktion direkt auf Oberflächen von Tieren dar, wofür das Zitzendippen im Anschluss an den Melkprozess ein typisches Beispiel ist. Schließlich finden Desinfektionsmittel auch bei der Konservierung bestimmter tierischer Produkte, wie Eier oder Sperma, Anwendung [21].

Auch wenn für eine Desinfektion grundsätzlich die drei großen Gruppen der physikalischen, biologischen und chemischen Desinfektionsverfahren zur Verfügung stehen, so wird aus Gründen der Materialverträglichkeit und der Praktikabilität in der Tierhaltung, wie auch in vielen anderen Bereichen, nahezu ausschließlich die chemische Desinfektion durchgeführt.

Reinigung und Desinfektion sind in der Tierhaltung untrennbar miteinander verbunden [12]. Als Reinigung bezeichnet man sowohl die physikalische als auch chemische Entfernung von Verunreinigungen, damit das Desinfektionsmittel unmittelbar auf der Oberfläche wirken kann. Der Prozess der Reinigung erfolgt, ebenso wie die anschließende Desinfektion, in mehreren Arbeitsschritten. So unterteilen sich die Arbeitsschritte der Reinigung in Vorreinigung, Einweichen, Reinigung und Trocknung [26]. Dabei bedient man sich in der Tierhaltung häufig der Hochdruckreinigung, die allerdings mit dem Nachteil einer vermehrten Aerosolbildung einhergeht, was insbesondere bei bekanntem Krankheitsausbruch oder bei Vorhandensein von Zoonoseerregern ein Problem darstellt [12].

Für die Ausbringung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Oberflächen unterscheidet man Gieß-, Sprüh-, Feinsprüh- und Aerosolverfahren. Wichtig dabei ist, dass die Oberflächen während der Einwirkzeit nicht abtrocknen, was vor allem bei unebenen Oberflächen und porösen Materialien problematisch sein kann, denn gerade in der Tierhaltung sind auch viele potentiell schwer zu desinfizierende Materialien wie Beton oder Holz im Einsatz. Zusätzlich wird dabei die Desinfektion stellenweise trotz vorher erfolgter Reinigung durch eine hohe Belastung mit organischen Verunreinigungen und durch niedrige Temperaturen erschwert. Weitere Schwierigkeiten entstehen, wenn im Falle eines Seuchenausbruchs die Gülle- bzw. Mistdesinfektion notwendig wird, aber auch bei der Reinigung und Desinfektion von Transportfahrzeugen [12].

#### 2.1.4 Wirkungsweise von Desinfektionsmitteln

Denyer et al. (1998) unterteilen die Angriffsstellen vegetativer Bakterien für Biozid-Interaktionen in die drei unterschiedlichen Regionen Zellwand, Zytoplasmamembran und Zytoplasma [27], wobei sich die Haupttargets meist im Zellinneren befinden [28, 29]. Auf dem Weg des Biozids zum Target trifft es auf eine Vielzahl intervenierender Strukturen, die je nach Ausgeprägtheit die Empfindlichkeit eines Mikroorganismus bestimmen. So stellt beispielsweise die Lipopolysaccharidschicht gramnegativer Bakterien eine zusätzliche Penetrationsbarriere für antimikrobielle Substanzen dar, was deren geringere Sensibilität im Gegensatz zu grampositiven Bakterien bedingt [30].

Um die Haupttargets im Bakterieninneren zu erreichen, muss das Desinfektionsmittel zunächst nach der Adsorption an der Zelloberfläche mit der äußeren Zellschicht in Interaktion treten bis es zur Aufnahme in die Zelle kommt. Im Zytoplasma erfolgt daraufhin die Passage des Desinfektionsmittels zu einem bzw. mehreren zellulären Targets und die Konzentration an diesen, bevor es zur Schädigung des Bakteriums kommt [28, 30].

Das Agieren der mikrobiellen Zelloberfläche als Aufnahmehindernis ist ein typischer Mechanismus, welcher die Sensibilität eines Mikroorganismus maßgeblich mitbestimmt [28]. Je nach Substanzeigenschaften gibt es drei verschiedene Aufnahmewege in die Zelle. Kleine, hydrophile Moleküle (< 600 Da) können wassergefüllte Porine passieren, während hydrophobe Moleküle, durch lokal destabilisierende Effekte assistiert, die Membran durchdringen. Für andere Wirkstoffe, wie z.B. Chlorhexidin, besteht durch Schädigung der äußeren Zellmembran die Möglichkeit der selbst-vermittelten Aufnahme in die Zelle [27, 29].

Vor Eintritt der bakteriziden Wirkung von Desinfektionsmitteln, welche durch irreversible Schädigungen lebenswichtiger zellulärer Strukturen und Funktionen ausgelöst wird, kommt es zunächst zur Bakteriostase. Diese entsteht durch die Störung metabolischer Prozesse, welche zunächst noch reversibel ist. Der Eintritt der Biozidwirkung ist also nie augenblicklich und es besteht stets noch eine kurze Zeitspanne in der diese noch reversibel ist [30].

Die Wirkmechanismen von Bioziden können dabei nach verschiedenen Kriterien eingeteilt werden. So kann man Substanzen, welche chemische (kovalente) oder physikalische (ionische) Bindungen mit den Zielzellen eingehen, voneinander abgrenzen. Die ersteren sind weitgehend konzentrationsunabhängig, zu ihnen gehören u.a. oxidierenden Desinfektionsmittel und Aminogruppen-Reaktoren. Die letzteren verlieren dagegen bei Verdünnung sehr schnell ihre Wirksamkeit, zu ihnen zählen z.B. Alkohole und Phenole [27, 31].

Die Wirkung von Desinfektionsmitteln unterscheidet sich grundlegend von der von Antibiotika, welche pharmakologisch präzise wirken, d.h. sie greifen genau ein spezifisches zelluläres Target, oft nur eines bestimmten Organismus, an, welches vom Wirt nicht

geteilt wird [32]. Desinfektionsmittel wirken im Gegensatz zu Antibiotika häufig gegen eine Vielzahl verschiedener Mikroorganismen, trotz derer oftmals fundamentaler Unterschiede in Zellstruktur, Physiologie und Replikation [33]. Dies beruht darauf, dass sie nicht nur ein einzelnes, sondern eine große Anzahl unterschiedlicher zellulärer Targets angreifen. Es ist also keine fehlende Targetspezifität, sondern das Vorhandensein einer Vielzahl unterschiedlicher spezifischer zellulärer Targets, welche die unselektive Toxizität der Desinfektionsmittel begründet [34].

#### **2.1.4.1 Peressigsäure**

Peressigsäure ist seit ca. 1955 als Desinfektionsmittel in Gebrauch [5]. Aufgrund ihrer zahlreichen Vorteile ist Peressigsäure mittlerweile in vielfältigen Anwendungsbereichen der Human-, Veterinär- und Militärmedizin, aber auch in anderen Bereichen wie z.B. der Abwasserdesinfektion im Einsatz [35, 36].

Neben ihrer Wirkung als organische Säure, wobei vor allem die Zellmembran angegriffen wird (siehe Abschnitt 2.1.4.3), verfügt Peressigsäure zusätzlich über oxidierende Eigenschaften, welche in der Freisetzung von Hydroxylradikalen resultiert. Diese denaturieren durch Oxidation von Thiolgruppen Enzyme und andere Proteine. Zusätzlich kommt es zur Zerteilung der 70S-Ribosomen in ihre Untereinheiten, sowie zur Veränderung der Zelloberfläche und zur Zerstörung der DNA. Ein klassisches Angriffsziel für Peroxide sind überdies die ungesättigten Fettsäuren der Zellmembranen [28]. Die Hemmung zytoplasmatischer Enzyme und die Interaktion mit funktionellen Biomolekülen führen somit zur Hemmung katabolischer und anabolischer Prozesse der Zelle [30].

Mit ihren sehr guten bakteriziden, fungiziden, viruziden und sporiziden Eigenschaften verfügt Peressigsäure über ein breites Anwendungsspektrum und ist damit gegen nahezu alle für Mensch und Tier relevanten Erreger, mit Ausnahme der Prionen, wirksam [37, 38]. Zudem verfügt sie über eine sehr schnelle Wirksamkeit, welche sich auch durch niedrige Temperaturen nicht maßgeblich beeinträchtigen lässt. Weiterhin ist Peressigsäure ausgesprochen umweltfreundlich, da sie in sichere Nebenprodukte (Essigsäure, Wasser und Sauerstoff) zerfällt, welche ohnehin in der Umwelt vorkommen [39-42]. Ein weiterer Vorteil von Peressigsäure gegenüber anderen Desinfektionsmitteln ist, dass von ihr keine Allergiegefahr ausgeht, da ihr die Kopplungsfähigkeit an Proteine fehlt und sie somit nicht als Antigen wirken kann [35].

Nachteilig bei der Anwendung von Peressigsäure, vor allem bei der Verwendung in geschlossenen Räumen, sind potentiell starke Geruchsbelastungen und damit einhergehend Schleimhautreizungen [35, 38]. Zudem weist Peressigsäure besonders bei unedlen Metallen eine hohe Korrosivität auf [35]. Für ihre Anwendung in der Tierhaltung sind besonders ihr schlechtes Eindringvermögen und damit ihre schlechte Wirksamkeit auf porösen Oberflächen und ihre starke Beeinflussbarkeit durch organische Verschmutzungen von Bedeu-

tung [35, 38]. Die hohe Reaktivität von Peressigsäure resultiert in einer starken Interaktion mit der bakteriellen Glykokalyx, was einen massiven Wirkungsverlust Biofilmen gegenüber zur Folge hat [43]. Ebenso lässt sich die Wirkung von Peressigsäure durch den pH-Wert beeinflussen, so ist ihre Effektivität ab einem pH-Wert von 8 bereits deutlich reduziert [37]. Zudem ist ihre relativ hohe Instabilität und damit verringerte Lagerfähigkeit ein Problem für die praktische Anwendung [35, 44].

Vielen der Nachteile von Peressigsäure kann man mit bestimmten Produktformulierungen, insbesondere der Alkalisierung, begegnen. So lassen sich etwa ihre Lagerfähigkeit und ihre Korrosivität durch bestimmte Formulierungen verbessern [38, 44]. Ebenso kann man die Geruchsbelastung durch Alkalisierung senken und zusätzlich eine bessere Benetzung von Flächen erreichen. Allerdings werden dadurch auch die notwendigen Konzentrationen und Einwirkzeiten erhöht und der Temperaturfehler steigt, wobei er gleichwohl geringer bleibt, als der anderer Desinfektionsmittel [35].

#### **2.1.4.2 Glutaraldehyd**

Glutaraldehyd ist weltweit eines der am häufigsten eingesetzten Desinfektionsmittel, wobei es in der Tierhaltung seit vielen Jahren beispielsweise in Brütereien Verwendung findet [45]. Wegen seiner guten mikrobioziden Wirksamkeit wird es nicht nur als Desinfektionsmittel sondern auch als chemisches Sterilisationsmittel z.B. für Endoskope angewendet [46, 47]. Neben Glutaraldehyd sind auch andere Aldehyde, wie Formaldehyd, Orthophthalaldehyd oder Succinaldehyd als Desinfektionsmittel im Einsatz [46].

Die Wirkung von Glutaraldehyd basiert auf verschiedenen Mechanismen. Glutaraldehyd bildet Bindungen mit unprotonierten Aminen der äußeren Zellwand, so dass es zur Bildung von starken Querverbindungen unter den Aminogruppen in Zellwand bzw. Sporenhülle kommt. Da dies durch das vermehrte Vorliegen unprotonierter Aminogruppen bei basischen pH-Werten begünstigt wird, resultiert daraus die starke pH-Abhängigkeit der Desinfektionswirkung von Aldehyden [20, 33]. Im Zellinneren verursacht Glutaraldehyd u.a. die Denaturierung von Proteinen, die Hemmung von Enzymen und die Hemmung der DNA-, RNA- und Proteinsynthese [20, 48].

Glutaraldehyd verfügt über ein breites Wirkungsspektrum und eine schnelle Aktivität [44, 48]. Mit Einschränkungen für hohe Konzentrationen bakterieller Sporen, hat es eine gute mikrobiozide Wirkung gegen alle Gruppen von Mikroorganismen [46, 47]. Die geringe Korrosivität und damit gute Materialverträglichkeit gehört zu den weiteren Vorteilen von Glutaraldehyd [46, 47]. Für die Anwendung in der Tierhaltung ist seine hohe Unempfindlichkeit gegenüber interferierenden organischen Verschmutzungen von Bedeutung [44, 46]. Sowohl in der Tierhaltung als auch in anderen Bereichen spielt Glutaraldehyd bei der Bekämpfung von Biofilmen eine wichtige Rolle, da es einerseits diese gut penetriert und



die Mikroorganismen abtöten und sie andererseits sogar aus den Biofilmen herauslösen kann [48].

Die Wirkung von Glutaraldehyd unterliegt denselben Einflussfaktoren, welche die Wirkung aller Desinfektionsmittel beeinträchtigen, wobei die Auswirkung unterschiedlicher pH-Werte besonders deutlich ausgeprägt ist [48]. Ebenso lässt sich die Wirkung von Glutaraldehyd durch Temperaturveränderungen stark beeinflussen. Bei steigenden Temperaturen hat Glutaraldehyd eine deutlich verbesserte Wirksamkeit, was im Umkehrschluss einen raschen Wirkungsverlust bei sinkenden Temperaturen zur Folge hat [48]. So erfordert ein Temperaturabfall von 20°C auf 10°C für eine gleichbleibende Wirksamkeit von Glutaraldehyd eine Verdreifachung der Konzentration. Gerade bei der Desinfektion in der Tierhaltung ist dies von großer Bedeutung, so stellt beispielsweise die Reinigung und Desinfektion von Transportfahrzeugen im Winter ein großes Problem dar [12]. Ein weiterer erheblicher Nachteil von Glutaraldehyd sind seine hohe Toxizität, seine sensibilisierenden Eigenschaften und seine potentiell mutagene und karzinogene Wirkung, wobei diese aber deutlich geringer als die von Formaldehyd sind [44, 47, 49].

#### **2.1.4.3 Ameisensäure**

Ameisensäure ist in die Gruppe der organischen Säuren einzuordnen. Nachdem diese ursprünglich als Konservierungsmittel und in der Lebensmittelherstellung sowie -verarbeitung eingesetzt wurden, macht man sich ihre guten mikrobioziden Eigenschaften inzwischen auch in Desinfektionsmitteln zunutze [50].

Als membranaktive Biozide greifen organische Säuren entweder die Integrität oder die Funktion der Zytoplasmamembran an [51]. Laut Chapman (2003) kommt es durch Interkation in diese zur Destabilisierung der Phospholipiddoppelmembran, so dass die Fähigkeit der Zellmembran, das genaue pH-Gleichgewicht aufrecht zu erhalten, gestört wird und es zur Ansäuerung des Zellinneren kommt [51]. Damit geht der Verlust des elektrochemischen Protonengradientens einher und darüber die Hemmung von Transportprozessen [33]. Das Resultat ist der Verlust der metabolischen Speicher und der Belastbarkeit der Zelle [30]. Durch den sauren pH-Wert im Zellinneren kommt es zudem zur Denaturierung säureempfindlicher Proteine und der DNA [28, 50].

Ameisensäure gehört zu den wenigen zur Desinfektion eingesetzten Wirkstoffen, welche neben einer hohen Wirksamkeit gegen Bakterien, Viren, Sporen und Pilze auch eine gute Effektivität gegen Prionen aufweisen [52]. Neben ihrem breiten Wirkungsspektrum zählen ihre geringe Toxizität für Mensch und Tier, ihre gute Umweltverträglichkeit und ihre niedrige Korrosivität zu den Vorteilen beim Einsatz von Ameisensäure.

Nachteile bei der Anwendung von organischen Säuren zur Desinfektion sind ihre hohe Abhängigkeit vom pH-Wert und von den Temperaturen. So kommt es beim Absinken der

Temperaturen von 20° auf 10°C bereits zu einem Wirkungsverlust von 50% bei organischen Säuren. Bereits unterhalb von 10°C ist die Wirkung von Ameisensäure für eine Desinfektion unzureichend [12].

### 2.1.5 Einflussfaktoren auf die Wirkung von Desinfektionsmitteln

Es existiert ein komplexes Geflecht aus Faktoren, welche den Erfolg einer Desinfektion beeinflussen. Diese lassen sich in drei große Gruppen unterteilen, welche jedoch untrennbar miteinander verwoben sind. So spielen sowohl das Desinfektionsmittel, die zu inaktivierenden Mikroorganismen, als auch die Umwelt eine entscheidende Rolle.

Gerade die Gruppe der Umwelteinflüsse unterliegt in der Tierhaltung einer enormen Variationsbreite, so sind etwa je nach Jahreszeit und Haltungsförm sehr unterschiedliche Temperaturen vorherrschend, bei denen eine Desinfektion durchgeführt wird. Auch muss in der Tierhaltung teilweise von der Anwesenheit großer Mengen organischer Verschmutzungen ausgegangen werden, welche die Wirkung chemischer Desinfektionsmittel massiv beeinträchtigen können, wie beispielsweise in Desinfektionswannen zur Stiefeldesinfektion [18, 53, 54]. Aber auch pH-Wert und der mechanische und chemische Einfluss einer vorangegangenen Reinigung können einen Desinfektionserfolg stark beeinflussen [53, 54].

Die Wirkung verschiedener Desinfektionsmittel kann unter dem Einfluss der vielfältigen Umweltfaktoren sehr stark beeinträchtigt werden [45], so zeigt z.B. die Gruppe der Aldehyde bei sinkenden Temperaturen einen deutlichen Wirkungsverlust [12, 48]. Je nach vorherrschendem pH-Wert, welcher in der Tierhaltung u.a. stark durch die zur vorangegangenen Reinigung eingesetzten Detergenzien beeinflusst werden kann, kann ebenfalls die Wirkung der eingesetzten Desinfektionsmittel vermindert oder begünstigt werden. So wirken beispielsweise organische Säuren in einem sauren Milieu besser als in einem alkalischen [28], welches wiederum die Wirkung von Aldehyden begünstigen würde [20, 48]. Kontaktzeit mit der zu desinfizierenden Oberfläche und die Konzentration des verwendeten Desinfektionsmittels sind zudem von entscheidender Bedeutung für eine erfolgreiche Desinfektion. So kommt es überall dort zur Verdünnung des Desinfektionsmittels, wo z.B. aufgrund der Oberflächenbeschaffenheit Flächen im Anschluss an die Reinigung nicht komplett abgetrocknet sind [18].

Darüber hinaus muss für eine erfolgreiche Desinfektion bedacht werden, dass die verschiedenen Gruppen von Mikroorganismen sehr unterschiedliche Toleranzen gegenüber den hemmenden Einflüssen von Desinfektionsmitteln aufweisen. So sind Mykoplasmen und behüllte Viren am sensibelsten, gefolgt von den meisten vegetativen Bakterien, wobei die grampositiven in der Regel empfindlicher sind als die gramnegativen. Unbehüllte Viren, säurefeste Bakterien und Bakteriosporen weisen hingegen eine hohe Stabilität gegenüber widrigen Bedingungen auf [2, 29, 33]. Jedoch existieren auch innerhalb dieser Gruppen noch deutliche Differenzierungen, so sind *Enterococcus spp.* signifikant unempfindli-

cher als *Staphylococcus spp.*, obwohl es sich bei beiden um Vertreter grampositiver Kokken handelt [55]. Ausnahmen davon sowie eine aufgetretene Toleranzentwicklung von Mikroorganismen gegen bestimmte Desinfektionsmittel, dürfen keinesfalls unberücksichtigt bleiben [31, 56]. Neben der Art der Mikroorganismen spielt auch ihre Anzahl für den Desinfektionserfolg eine Rolle. Des Weiteren hat auch das Alter bzw. das Entwicklungsstadium der Mikroorganismen Einfluss auf ihre Empfindlichkeit. So beobachteten Brown et al. (1990), dass Bakterien, welche sich in der stationären Phase befinden, erheblich robuster gegenüber widrigen Einflüssen sind als Bakterien, welche sich in einer exponentiellen Wachstumsphase befinden [57]. Ferner ist die Lebensform einer Bakterienpopulation entscheidend für ihre Empfindlichkeit. So ist gezeigt worden, dass Bakterien, welche an Oberflächen angeheftet sind, 100- bis 1000-fach höheren Desinfektionsmittelkonzentrationen standhalten können, als planktonische Zellen [12, 34]. Als Sonderform des Bakterienwachstums stellen Biofilme besondere Anforderungen an eine erfolgreiche Desinfektion.

Gerade in der Tierhaltung gibt es viele Flächen, auf denen immer wieder für längere Zeiträume Feuchtigkeit steht, so dass dort die Bildung von Biofilmen begünstigt ist, insbesondere wenn Reinigung und Desinfektion nur in großen zeitlichen Abständen zueinander erfolgen, wie etwa zwischen aufeinanderfolgenden Mastdurchgängen. Dabei bezeichnet Biofilm eine funktionale Vereinigung unterschiedlicher Zellen innerhalb einer exopolymeren Matrix, welche eine wesentlich höhere Resistenz aufweist als die einzelnen Mikroorganismen, aus denen sie besteht [32, 58]. Ein Schutzmechanismus von Biofilmen ist die stark beeinträchtigte Penetration von antimikrobiellen Substanzen in sein Inneres, was Resultat von verminderter Diffusion, Absorption und Reaktion von Bestandteilen der exopolymeren Matrix mit dem Desinfektionsmittel ist [59]. Die Matrix wirkt dabei sowohl als Adsorbant als auch als Reaktant [60] und kann zusätzlich vielfältige Enzyme, wie z.B. Aldehydlyasen oder Aldehyddehydrogenasen enthalten, welche das eingesetzte Desinfektionsmittel deaktivieren können [58, 61].

Die Empfindlichkeit von Bakterien gegenüber Antibiotika und Desinfektionsmitteln reflektiert ihren physiologischen Status [58]. So verhalten sich Bakterien je unempfindlicher gegenüber feindlichen Einflüssen, desto niedriger ihre Wachstumsrate ist [45, 54, 57]. Diese kann, bedingt durch eine Limitierung des Nährstoffangebots oder des Gasaustausches, wie es beispielsweise im Inneren eines Biofilms der Fall ist, widrige Temperaturen oder die Anwesenheit antimikrobieller Substanzen, bis auf nahezu null absinken [57]. Daraus resultiert eine physiologische phänotypische Veränderung, welche mit einem starken Verlust der bakteriellen Empfindlichkeit einhergeht [57, 60, 62].

Verschiedene Ursachen können zur Exprimierung von im Bakteriengenom enthaltenen Resistenzgenen führen. So kann z.B. die Adhäsion von Bakterien an Oberflächen [60] oder Stress, u.a. durch die Limitierung von Nährstoffen, wie sie im Inneren von Biofilmen auftritt, in der vermehrten Expression von Efflux-Pumpen resultieren [63, 64].

Bei den vielfältigen Faktoren, welche eine optimale Desinfektion in der Tierhaltung beeinträchtigen können, darf jedoch nicht vergessen werden, dass sich selbst bei einer bestmöglichen Desinfektion immer sowohl ein zeitlicher als auch ein räumlicher Gradient des Desinfektionsmittels zwischen der Wirkkonzentration und null bildet. Entlang diesem wird theoretisch für jeden Mikroorganismus irgendwann eine Konzentration erreicht, bei der das Desinfektionsmittel nicht mehr letal wirkt und somit einen Selektionsdruck ausübt [65].

## 2.2 Resistenzen gegen Desinfektionsmittel

Die Relevanz und die Prävalenz vom Auftreten von Desinfektionsmittelresistenzen von Bakterien werden immer wieder diskutiert [46, 65-68]. Auch wenn aktuell der Bildung von Resistenzen gegen Desinfektionsmittel nicht der herausragende Stellenwert wie der Antibiotikaresistenzentwicklung zukommt [2], so handelt es sich doch um ein bedeutendes klinisches Phänomen [46].

Die steigende Prävalenz und Verbreitung von Bakterien mit Resistenzen gegen antimikrobielle Substanzen ist die natürliche Folge der genetischen bakteriellen Evolution. Je mehr ein antimikrobieller Wirkstoff Verwendung findet, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit einer Resistenzbildung dagegen [2]. Auch wenn innerhalb der EU bzw. innerhalb Deutschlands nicht erfasst wird in welchem Umfang Desinfektionsmittel eingesetzt werden, so kann man jedoch davon ausgehen, dass jährlich erhebliche Mengen nicht nur in der Tierhaltung Verwendung finden [21]. Bedenken bezüglich der Desinfektionsmittelresistenzbildung entstehen nicht nur unmittelbar durch ihren Einsatz, sondern ebenfalls durch den ungeklärten Einfluss ihrer Rückstände [5].

1994 gaben bei einer Umfrage 21,2% der befragten Institutionen (u.a. Medizinaluntersuchungsämter, Universitätsinstitute und Desinfektionsmittelhersteller) an, Probleme mit desinfektionsmittelresistenten Bakterien zu haben, wobei besonders Resistenzen gegen Aldehyde und quaternäre Ammoniumverbindungen als problematisch angesprochen wurden [66]. Unter der Annahme, dass das vermehrte Marktwachstum von Bioziden von 4-5% jährlich ihrem Einsatz entspricht [21], so kann für das Vorkommen desinfektionsmittelresistenter Bakterien ebenfalls ein deutlicher Anstieg postuliert werden.

### 2.2.1 Definitionen

Allgemein beschreibt Resistenz die relative Empfindlichkeit eines Mikroorganismus gegen eine bestimmte Behandlung unter klar definierten Bedingungen [67].

Im Zusammenhang des Antibiotikaeinsatzes spricht man von einer Resistenz, sobald keine Antibiotikakonzentration im Organismus mehr erreicht werden kann, gegen die die betrachteten Bakterien empfindlich sind [65].

Im Gegensatz dazu ist es schwer abzugrenzen, ab wann man bei einem Desinfektionsmittel von einer Resistenz sprechen kann, da keine Grenzwerte für die Empfindlichkeit von Bioziden existieren [55]. Resistenz im Zusammenhang mit Desinfektionsmitteln ist ein relativer Begriff, da er oft auf Vergleichen basiert, wie mit anderen Mikroorganismen, anderen Stämmen desselben Mikroorganismus oder anderen Desinfektionsmitteln [18]. So spricht Russell (1999) von einer Desinfektionsmittelresistenz eines Stammes wenn dieser entweder unempfindlich gegen die Gebrauchskonzentration ist oder von einer Desinfektionsmittelkonzentration nicht mehr inaktiviert wird, welche die Mehrheit der Stämme die-

ses Organismus inaktivieren würde [29]. Die Beeinträchtigung des Behandlungs- bzw. Desinfektionserfolges erscheint somit als sinnvolles Kriterium für die Bildung einer Desinfektionsmittelresistenz [67].

Je nach Ursprung unterscheidet man intrinsische und erworbene Resistenzen. Dabei bezeichnet man als intrinsische Resistenz die natürliche, chromosomal codierte Fähigkeit, antimikrobiellen Substanzen zu widerstehen [69]. Als phänotypische Resistenz, welche der intrinsischen Resistenz zuzuordnen ist, bezeichnet man die transiente verminderte Empfindlichkeit, die entsteht, wenn Bakterien unter nicht optimalen Wachstumsbedingungen kultiviert werden, wie sie beispielsweise im Inneren eines Biofilms entstehen [69, 70]. Im Gegensatz dazu bezeichnet man als erworbene Resistenz die Fähigkeit von Mikroorganismen Resistenzen über Mutationen oder über die Aufnahme transferabler genetischer Elemente zu erwerben [69].

Eine Kreuzresistenz mit anderen antimikrobiellen Substanzen kann dabei auftreten, wenn verschiedene Wirkstoffe am selben zellulären Target angreifen oder einen gemeinsamen Zugang zum Angriffsort in der Zelle teilen. Im Gegensatz dazu spricht man bei der Assoziation multipler Resistenzgene auf einem einzelnen beweglichen Element von einer Co-Resistenz [70, 71]. Das Resultat, dass die Resistenzentwicklung gegen eine antimikrobielle Substanz vom Auftreten von Resistenzen gegen andere Agentien begleitet wird, wie z.B. zwischen Substanzen verschiedener Antibiotikagruppen, ist jedoch das gleiche [70].

Um die Aktivität von antibakteriellen Wirkstoffen zu quantifizieren wird sich häufig der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) bedient. Bei der MHK handelt es sich dabei um die niedrigste Konzentration eines antimikrobiellen Wirkstoffes, die ausreichend ist, um das Wachstum des Zielorganismus zu unterbinden [67].

### **2.2.2 Resistenzmechanismen**

Desinfektionsmittelresistenzen bei Bakterien können unterschiedlicher Herkunft sein, wobei zwischen intrinsischen und erworbenen Resistenzmechanismen unterschieden wird. Im Gegensatz zu Antibiotikaresistenzen, wo erworbene Resistenzmechanismen vorherrschend sind, dominieren bei den Desinfektionsmitteln die intrinsischen Resistenzen [2]. Dabei spielt etwa die Barrierefunktion der äußeren Zellhülle eine wichtige Rolle. Vor allem die relative Unempfindlichkeit von Sporen und Mykobakterien ist Folge einer verminderten zellulären Permeabilität, aber auch die Resistenz gramnegativer Bakterien ist oftmals das Resultat des zusätzlichen Schutzes der äußeren Zellmembran [20, 55]. Neben dem Permeabilitätsverlust, welcher der bedeutendste intrinsische Resistenzmechanismus ist, spielen auch Efflux oder der enzymatische Abbau von antimikrobiellen Wirkstoffen eine Rolle [55].

Entsteht eine Resistenz auf Grundlage einer genetischen Veränderung des Bakteriums, spricht man von einer erworbenen oder extrinsischen Resistenz [29]. Diese kann infolge einer Mutation oder durch die Aufnahme fremder Resistenzgene zustande kommen, sofern zwei Bedingungen erfüllt sind: das genetische Potential des betreffenden Mikroorganismus und ein Selektionsdruck müssen vorhanden sein [72]. Mutationen können z.B. dadurch induziert werden, dass Bakterien an steigende Konzentrationen von Desinfektionsmitteln gewöhnt werden [29]. Mutationen sind die langwierigsten Veränderungen des Bakteriengenoms, da sie zufällig erfolgen und häufig einen für das Bakterium letalen Ausgang haben. Ein Gentransfer, wie bei dem Erwerb extrachromosomaler Genelemente in Form von Transposons oder Plasmiden, kann dagegen innerhalb einiger Stunden erfolgen [55, 73]. Tattawasart et al. (1999) beschrieben bislang einmalig auch die Resistenzbildung durch Transformation [74].

Genetische Veränderungen, welche zur Resistenzbildung bei Bakterien führen, können ganz unterschiedliche Auswirkungen haben. So können dieselben Mechanismen, welche intrinsisch agieren, auch durch die Aufnahme von Resistenzgenen erworben werden. Zudem kann es zu Mutationen eines spezifischen zellulären Targets kommen, wobei es unwahrscheinlich ist, dass einzelne Target-Mutationen für hochgradige Desinfektionsmittelresistenzen verantwortlich sind, da Desinfektionsmittel meist eine Vielzahl zellulärer Targets attackieren und damit eine Reihe von Mutationen notwendig wäre um einen bedeutenden Wirkungsverlust zu erreichen [32, 75]. In dieser Hinsicht sind Desinfektionsmittel den Antibiotika überlegen [33]. Die verschiedenen Resistenzmechanismen, welche zur Bildung von Desinfektionsmittelresistenzen führen können, sind in der folgenden Tabelle 1 dargestellt [21].

**Tabelle 1: Bakterielle Resistenzmechanismen gegen Desinfektionsmittel [21]**

Mechanismus	Art des Resistenzmechanismus	Beeinflussung der Wirksamkeit anderer Desinfektionsmittel	Kreuzresistenzen gegen andere antimikrobielle Wirkstoffe
Permeabilität	intrinsisch (erworben)	nein	ja
Efflux	intrinsisch/erworben	reduziert	ja
Degradierung	erworben/intrinsisch	reduziert	nein
Target-Mutation	erworben	reduziert	nein (Ausnahmen)
phänotypische Veränderungen	nach Exposition	reduziert	ja

### 2.2.3 Kreuzresistenzen zwischen Antibiotika und Desinfektionsmitteln

Die Meinungen zu der Bedeutung von Desinfektionsmitteln als Auslöser für Antibiotikaresistenzen gehen sehr weit auseinander. Dabei muss jedoch bedacht werden, dass die Hauptursache für Antibiotikaresistenzen beim Antibiotikaeinsatz selbst zu suchen ist [76]. Werden Antibiotika eingesetzt, so wirken sie nicht nur gegen die pathogenen Zielbakterien am Infektionsort sondern auch gegen die kommensale Flora, was zur Folge hat, dass jede Behandlung mit Antibiotika somit auch unweigerlich zur Selektion von Antibiotikaresistenzen führt [18]. Dass auch der Einsatz von Desinfektionsmitteln zur Selektion von Antibiotikaresistenzen beitragen kann, ist inzwischen bekannt, auch wenn umstritten ist, wie viel Bedeutung dem beizumessen ist [5, 34].

Aufgrund ähnlicher Resistenzmechanismen von Antibiotika und Desinfektionsmitteln kann ein Zusammenhang zwischen Resistenzen von beiden Substanzgruppen vermutet werden, wobei diese Mechanismen zwar ähnlich aber nicht zwangsläufig identisch sind [46, 77].

Es wird immer wieder betont, dass es zu einer Beeinträchtigung der Antibiotikaempfindlichkeit kommen kann, obwohl die Desinfektionsmittelsensibilität kaum beeinträchtigt ist [34]. Werden Desinfektionsmittel in so geringen Konzentrationen wie der MHK eingesetzt, so wird nur noch das empfindlichste zelluläre Target der Mikroorganismen angesprochen. Kommt es daraufhin zu Veränderungen dieses Targets, kann dies zu Kreuzresistenzen gegen Antibiotika führen, die dieses Target teilen, wohingegen die Wirkung des



Desinfektionsmittels kaum beeinträchtigt wird, da dieses noch andere zelluläre Targets attackiert [32]. Eine MHK-Erhöhung eines Desinfektionsmittels führt somit meist nicht zur Unwirksamkeit dieses, sondern ist ein Indikator für die Veränderung mindestens eines zellulären Targets oder für die Induktion von Efflux-Pumpen. Beide Mechanismen bergen das Potential einer Resistenzinduktion gegen andere Substanzen, wie beispielsweise Antibiotika [76]. Dabei kann jedoch davon ausgegangen werden, dass sowohl die Ausbildung von Resistenzen als auch von Kreuzresistenzen zwischen den verschiedenen Bakterien nicht einheitlich, sondern sehr speziesspezifisch stattfindet [78].

Inzwischen ist bekannt, dass Resistenzentwicklungen gegen Desinfektionsmittel mit den Wirkstoffen Triclosan, Chlorhexidin und quaternäre Ammoniumverbindungen mit der Ausbildung von Kreuzresistenzen gegen Antibiotika einhergehen kann [5]. Eine Übersicht dieser ist in der folgenden Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2: Beispiele von Kreuzresistenzen zwischen Desinfektionsmitteln und Antibiotika**

	Triclosan	Chlorhexidin	Quaternäre Ammoniumverbindungen
<i>E. coli</i>	Amoxicillin, Chloramphenicol, Erythromycin, Imipenem, Tetrazyklin, Trimethoprim, Ampicillin, Fluorchinolone, Ciprofloxacin [7, 79-81]	Gentamicin, Streptomycin [82]	Amoxicillin, Chloramphenicol, Imipenem, Tetrazyklin, Trimethoprim, Gentamicin, Tobramycin, Amikacin, Neomycin, Kanamycin, Ciprofloxacin, Ceftazidim, Polymyxin B [79, 83]
<i>Salmonella spp.</i>	Ampicillin, Tetrazyklin, Chloramphenicol [7]	Tetrazyklin [79]	Amoxicillin, Chloramphenicol, Imipenem, Trimethoprim [79]
<i>Pseudomonas spp.</i>	Ciprofloxacin, Polymyxin B, Gentamicin, Nalidixinsäure, Erythromycin, Ampicillin [56, 84]	Polymyxin B, Gentamicin, Ampicillin, Nalidixinsäure, Rifampicin, Erythromycin, Norfloxacin, Tetrazyklin, Chloramphenicol, Streptomycin, Carbenicillin [56, 74, 85-87]	Norfloxacin, Tetrazyklin, Chloramphenicol, Streptomycin, Erythromycin, Carbenicillin, Polymyxin B, Gentamicin, Nalidixinsäure, Ampicillin [56, 86, 87]
<i>Staphylococcus spp.</i>		Gentamicin, Kanamycin, Tobramycin, Trimethoprim, Amikacin [2, 88]	$\beta$ -Laktamantibiotika: Cloxacillin, Moxalactam, Flomoxef, Cefmetazol, Oxacillin, Ofloxacin, Trimethoprim, Gentamicin, Kanamycin, Tobramycin [70, 88, 89]
<i>Mycobacterium spp.</i>	Isoniazid [80, 81]		

Wobei es auch bei anderen Desinfektionswirkstoffen Berichte über Kreuzresistenzen zu Antibiotika gibt. So beobachteten Moken et al. (1997), dass der Einsatz von Kiefernöl zu Resistenzen gegen die antibiotischen Wirkstoffe Tetrazyklin, Ampicillin, Chloramphenicol und Nalidixinsäure führte [90].

Es ist nicht möglich, allgemeingültige Aussagen zu dem Potential von Desinfektionsmitteln, Kreuzresistenzen gegen Antibiotika auszulösen, zu treffen, da die verschiedenen Bakterienspezies eine große Variabilität in ihrem Verhalten antimikrobiellen Wirkstoffen

gegenüber zeigen. Eine mögliche Ursache dafür könnten unterschiedliche Targets in den verschiedenen Bakterienspezies sein [91]. Nichtsdestotrotz gibt es eine Reihe von Antibiotikaresistenzen, welche durch Desinfektionsmittel induziert werden können, und es ist zu vermuten, dass diese nicht nur im Labor, sondern auch in der Umwelt vorkommen [92].

#### 2.2.4 Epidemiologie von Desinfektionsmittelresistenzen

Je häufiger ein antimikrobieller Wirkstoff Verwendung findet, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit der Resistenzentwicklung von Mikroorganismen dagegen. Wenn der Einsatz von Antibiotika zur Bildung von Antibiotikaresistenzen führt, so ist zu erwarten, dass der Einsatz von Desinfektionsmitteln zur Resistenzinduktion gegen diese führt [2]. Des Weiteren wird vermutet, dass eine Zelle, die einmal eine Resistenz erworben hat diese auch beibehalten wird, da ihr kein Nachteil daraus entsteht, solange der Erwerb der Resistenzfaktoren nicht mit ihren normalen physiologischen Wachstumsprozessen interferiert [75]. Bei Abwesenheit des Selektionsdrucks kann es zwar zum Absinken von Resistenzen in der Bakterienpopulation kommen, wobei aber ein Reservoir resistenter Stämme erhalten bleibt, welches bei wiedereinsetzendem Selektionsdruck schnell dominierend wird [73]. Auch wenn Desinfektionsmittelresistenzen bei Bakterien bislang kein massives Problem in der Praxis darstellen, kann sich dies jederzeit ändern, gerade in Anbetracht der Tatsache, dass es Berichte über eine beträchtliche Anzahl von Desinfektionsmittelresistenzen bei Bakterienisolationen aus der Umwelt gibt [66, 93, 94].

Die Ausbreitung von Desinfektionsmittelresistenzen ist ebenso wie die von Antibiotikaresistenzen vertikal und horizontal möglich. So können Resistenzen, welche auf Chromosomen codiert sind, nur an Tochterzellen weitergegeben werden [4, 72]. Im Gegensatz dazu können Resistenzen, welche auf transmissiblen DNA-Elementen codiert sind, zudem über horizontalen Gentransfer eine weite Verbreitung auch zwischen unterschiedlichen Bakterienspezies finden [4]. So geht Salyers (2002) davon aus, dass, wenn einmal eine Resistenz auf einem beweglichen Genelement aufgetaucht ist, sich diese auch zwischen anderen Bakterien verbreiten wird [73]. Beispielsweise verfügen *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) und einige koagulasenegative Streptokokken über einen gemeinsamen Pool an Resistenzdeterminanten, welche u.a. auch Resistenzen gegen quaternäre Ammoniumverbindungen codieren [95]. Potentiell problematisch ist dabei die Übertragung von Resistenzgenen von harmlosen auf pathogene Bakterien [96]. Gerade an Orten hoher Bakterien-dichte, wie z.B. im Gastrointestinaltrakt oder auf der Haut von Tieren oder Menschen, haben die Bakterien Zugang zu einem großen Genpool aus welchem sie Resistenzen übernehmen können [71, 97]. Dabei sind die Lokalisation der Resistenzgene auf mobilen genetischen Elementen und der enge Kontakt zwischen unterschiedlichen Bakterien in einer polymikrobiellen Umwelt Schlüsselfaktoren für eine schnelle Verbreitung von Resistenzen [71].

Bei einer Resistenzverbreitung zwischen verschiedenen Wirtsspezies, entweder durch direkten oder indirekten Kontakt mit kontaminiertem Material, kommt es zur Kolonisation und Infektion oder nur zum kurzfristigen Verbleib der Bakterien in der neuen Umgebung. In jedem Fall kann es zum Genaustausch mit Bakterien aus der neuen Umwelt kommen. Bislang sind nur wenige antibiotikaresistente Zoonoseerreger (*Salmonella*, *Campylobacter* und *Enterococcus*) zweifelsfrei nachgewiesen worden, wobei noch eine weitaus größere Anzahl wahrscheinlich ist [71].

Resistenzen gegen kationische Agentien, wie quaternäre Ammoniumverbindungen oder Chlorhexidin, und gegen Metalle bzw. Metallsalze werden häufig durch Plasmide codiert und können mittels Konjugation oder Transduktion auch zwischen verschiedenen Bakterienspezies transferiert werden [20, 29]. Dabei zeigt Benzalkoniumchlorid, als Vertreter der quaternären Ammoniumverbindungen, bei verschiedenen Bakterienisolaten aus Klinik, Lebensmittelbereich und Tierhaltungen sehr unterschiedlich gute Wirksamkeiten, wobei *S. aureus*- und *E. faecalis*-Isolate die unempfindlichsten der untersuchten Bakterienspezies waren [69]. Aber auch gegen andere Vertreter der quaternären Ammoniumverbindungen kommt es nach Exposition von subinhibitorischen Desinfektionsmittelkonzentrationen zu Wirksamkeitsverlusten, wobei die Effektivität der Gebrauchskonzentration noch nicht beeinträchtigt ist [98].

Die oftmals beobachtete Co-Inzidenz von Glutaraldehyd- und Formaldehydresistenz legt die Vermutung nahe, dass diese auf einem ähnlichen Wirkmechanismus beruhen, wobei man jedoch weiß, dass eine Resistenz gegen Glutaraldehyd bei verschiedenen Spezies auf unterschiedlichen Mechanismen basiert [66, 70]. Auch für den Schutz gegen oxidierenden Stress, wie er beispielsweise durch Wasserstoffperoxid oder Peressigsäure hervorgerufen wird, gibt es unterschiedliche und einander ergänzende Mechanismen. So erfolgt bei *E. coli* die Adaptation an oxidativen Stress über die Hochregulation vielfältiger Proteine mit antioxidativer Wirkung, die das intrazelluläre Level toxischer Substanzen niedrig halten, und einer Endonuklease, welche radikalinduzierte Schäden repariert [99].

#### **2.2.4.1 Humanmedizin**

In der Humanmedizin spielen desinfektionsmittelresistente Bakterien vor allem in der Krankenhausumgebung eine bedeutende Rolle. So verstarben in Folge eines Ausbruchs mit einem chlorhexidinresistenten *Proteus mirabilis*-Stamm in einem Krankenhaus Anfang der 1980er Jahre sogar zwei Menschen [6].

Gerade die Fähigkeit von Chlorhexidin Kreuzresistenzen gegen Antibiotika auszulösen, wird in der Krankenhausumgebung stark gefürchtet. So beobachtete Stickler (1983), dass mindestens fünf unterschiedliche Antibiotikaresistenzen bei Bakterien aus Harnwegsinfektionen auf den übermäßigen Gebrauch von Chlorhexidin zurückzuführen waren [8]. Aber auch bei der Fluorchinolonresistenz von *E. coli*-Krankenshausisolaten wird eine Ver-

bindung zu einer Cyclohexantoleranz vermutet [9]. Dabei wurde mehrfach beobachtet, dass sich Krankenhausisolate unempfindlicher gegen Desinfektionsmittel verhalten als ihre Äquivalente aus der Umwelt [5].

Massive Besorgnis verursacht zudem die Isolierung von *Mycobacterium chelonae*-Isolaten aus Endoskopreinigungsanlagen, bei denen sich eine 60-minütige Desinfektion mit 2% Glutaraldehyd als unzureichend herausgestellt hat [100].

Die Bedeutung der Resistenzselektion durch den Einsatz verschiedener Desinfektionsmittel in Privathaushalten ist anhand einer Studie als sehr gering eingestuft worden. Dabei sind in Bakterienanzahl und Vorkommen von Resistenzen sowohl gegen Desinfektionsmittel als auch gegen Antibiotika in Haushalten mit und ohne täglichen Desinfektionsmitteleinsatz verglichen worden, wobei keine Unterschiede in der Prävalenz von Resistenzen der untersuchten Bakterien feststellbar waren [101]. Im Gegensatz dazu gehen andere Untersuchungen davon aus, dass Anwendungsfehler bei der Verwendung von Triclosan für eine umfassendere Resistenzselektion u.a. bei *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* und *Salmonella enterica* verantwortlich sind [78].

#### 2.2.4.2 Tierhaltung

Berichte über das Vorkommen desinfektionsmittelresistenter Bakterien in Tierhaltungen sind schlecht vergleichbar, was darauf zurückzuführen ist, dass die Abgrenzung von Empfindlichkeitsverlusten und Resistenzen gegen Desinfektionsmittel häufig nicht einheitlich erfolgt.

43,8%  $\beta$ -hämolytisierender *E. coli*-Isolate aus neonatalen Schweinen mit Diarrhoe zeigten verminderte Empfindlichkeiten gegen das Desinfektionsmittel Chlorhexidin, häufig einhergehend mit Antibiotikaresistenzen gegen Gentamicin und Streptomycin [82]. Diese Zahl aus den USA entspricht nahezu den 46,5% verminderter Chlorhexidinempfindlichkeit von *Salmonella*-Isolaten aus Schweine- und Geflügelhaltungen in Thailand, wobei jedoch nur 3,2% dieser Isolate tatsächlich eine Chlorhexidinresistenz aufwiesen [84].

Eine Cyclohexanresistenz, welche mit dem Empfindlichkeitsverlust gegen zahlreiche Antibiotika und Desinfektionsmittel über die Expression verschiedener Resistenzgene assoziiert wird [102], konnte in *E. coli*-Isolaten aus Geflügelställen nur in einem von 389 Fällen festgestellt werden [103]. Zuvor wurden *Salmonella*-Isolate aus der Umwelt auf ihre Cyclohexanempfindlichkeit untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass von Tieren stammende cyclohexanresistente Stämme mit 1-5% eine geringere Prävalenz hatten, als die Gesamtheit der *Salmonella*-Isolate mit 10,6%, welche zu großen Anteilen der humanen Umgebung entstammten [102].

Trotz 75,8% Empfindlichkeitsverlusten gegen Benzalkoniumchlorid bei *Salmonella*-Isolaten aus Geflügel- und Schweinehaltungen, haben Chuanchuen et al. (2008) keine Resistenzen gegen dieses gefunden [84]. Im Gegensatz dazu stehen Berichte von einer hohen Prävalenz von Resistenzen gegen die Gruppe der quaternären Ammoniumverbindungen in Geflügel-Schlachthäusern, welche möglicherweise auch auf den übermäßigen Einsatz dieser Desinfektionsmittel in der Lebensmittelindustrie zurückgeführt werden könnte [104]. In Sammelmilchproben bei Milchrindern und Milchziegen aus Norwegen hat man bei 21,2% der Rinder und 10% der Ziegen *Staphylococcus*-Isolate gefunden, welche eine effluxbasierte Resistenz gegen quaternäre Ammoniumverbindungen aufweisen, die häufig in Zusammenhang mit einer Penicillinresistenz stehen, was auf die weite Verbreitung von Benzalkoniumchlorid und Cetyltrimethylammoniumbromid als Zitzendip zurückgeführt wird [105].

Die Wirksamkeit 18 verschiedener Desinfektionsmittel aus der Geflügelindustrie gegen verschiedene *S. aureus*-Isolate von Wirtschaftsgeflügel war bei Abwesenheit von organischen Verunreinigungen ausnahmslos gegeben, ließ sich jedoch durch organische Verschmutzungen stark beeinträchtigen. So verloren fünf der 18 Desinfektionsmittel bei Anwesenheit von organischem Material trotz Einsatz gemäß Herstellerangaben ihre Wirksamkeit, wovon besonders chlorhaltige Desinfektionsmittel und amphoterische Verbindung betroffen waren [104]. In einer anderen Studie von Willingham et al. (1996) wird von 8% desinfektionsmittelresistenten Bakterienisolaten aus Brütereien berichtet, welche u.a. Resistenzen gegen Glutaraldehyd zeigten [45]. Wiederum bei anderen aus Brütereien isolierten Bakterienstämmen fiel auf, dass deren Empfindlichkeit gegen unterschiedliche kommerzielle Desinfektionsmittel sehr unterschiedliche Toleranzen gegen diese hatten, obwohl sie teilweise demselben Genus oder derselben Spezies angehört haben [3].

*Campylobacter*-Spezies, welche aus Geflügelschlachthäusern vor und nach der Reinigung und Desinfektion isoliert wurden, zeigten keinerlei Unterschiede ihrer Sensibilität Antibiotika und Desinfektionsmitteln gegenüber. Betont werden muss aber, dass auch die Prävalenz von *Campylobacter jejuni* bzw. *Campylobacter coli* nach der Reinigung und Desinfektion ebenfalls identisch waren [106].

## 2.3 Epidemiologie von Resistenzen der untersuchten Erreger

### 2.3.1 *Enterococcus spp.*

Der Genus *Enterococcus*, als Mitglied der Familie *Enterococcaceae*, umfasst zahlreiche Spezies, u.a. *Enterococcus faecium* (*E. faecium*), *Enterococcus hirae* (*E. hirae*) und *Enterococcus faecalis*, welches der häufigste Vertreter ist. Enterokokken sind bis 2,5 µm große, runde bis ovoide Zellen, welche in Flüssigkeit paarweise oder im Verbund kurzer Ketten vorliegen. Es handelt sich um grampositive, fakultativ anaerobe Bakterien, von denen einige Spezies bedingt durch Flagellen mobil sind. Enterokokken sind Kommensale im Gastrointestinaltrakt von Warmblütern und einigen anderen Tieren, und finden über deren Ausscheidungen in der Umwelt eine weite Verbreitung [107].

*Enterococcus spp.* weisen eine sehr hohe Tenazität auf. So können sie sich bei einer Salzkonzentration von 6,5%, bei 40% Galle oder bei pH-Werten bis 9,6 vermehren. Des Weiteren sind sie sehr resistent gegen Austrocknung und hohe Temperaturen [107], wobei sie kurzzeitig bis zu 80°C standhalten können, was insbesondere für ihre Ausbreitung entlang der Lebensmittelkette von Bedeutung ist [17]. Zudem können die verschiedenen *Enterococcus spp.* eine große Vielzahl von Plasmiden und Transposons als Träger zahlreicher Resistenzen und Virulenzfaktoren besitzen [107, 108]. Dies und ihre Fähigkeit widrigen Umwelteinflüssen zu trotzen, lässt eine hohe Widerstandskraft gegen die physischen und chemischen Einflüsse einer Desinfektion erwarten. Mutanten mit verringerten Empfindlichkeiten gegen die Wirkstoffe Triclosan, Chlorhexidin und Benzalkoniumchlorid können *in vitro* unschwer generiert werden, jedoch existieren bislang keine Berichte über ausgeprägte Desinfektionsmittelresistenzen bei *Enterococcus spp.* aus der Umwelt [46].

Über den Erwerb extrachromosomaler DNA können *Enterococcus spp.* neben ihren intrinsischen Resistenzen noch eine Vielzahl weiterer Antibiotikaresistenzen erwerben. Dabei kommt besonders der Vancomycinresistenz aus der Gruppe der Glykopeptidantibiotika eine besondere Bedeutung zu, welche ein weltweites Problem darstellt [46]. Sie unterliegt einer großen phänotypischen und genotypischen Heterogenität [109], wobei sowohl plasmidvermittelte induzierbare als auch chromosomal codierte konstitutiv transkribierte Resistenzen von Bedeutung sind [110]. Die Übertragung von plasmidgetragenen Resistenzgenen auf andere Spezies, wie etwa *S. aureus*, ist möglich [109, 111], wobei dies unter suboptimalen Bedingungen in der Umwelt um bis zu sechs Größenordnungen seltener der Fall ist als *in vitro* [112].

Die Ursache der hohen Prävalenz vancomycinresistenter *Enterococcus spp.* (VRE) in Europa kann auf den langjährigen Einsatz subtherapeutischer Dosen des Antibiotikums Avoparcin als Wachstumsförderer in der Tierhaltung zurückgeführt werden. Die Ausbildung von Resistenzen gegen dieses ging mit der Entstehung von Kreuzresistenzen gegen die verwandten Antibiotika Vancomycin und Teicoplanin einher. Seit dem Verbot des Ein-

satzes von Antibiotika als Leistungsförderer in der Landwirtschaft ist die Prävalenz von VRE in der gesunden Bevölkerung signifikant zurück gegangen [72, 113, 114].

Auch wenn die *Enterococcus spp.* normalerweise nur eine geringe Pathogenität aufweisen [115], so kommt ihnen doch als einer der wenigen antibiotikaresistenten bakteriellen Zoonoseerreger, bei denen eine Übertragung vom Tier auf den Menschen nachgewiesen wurde, Bedeutung zu [71]. Die Transmission antibiotikaresistenter Bakterien auf den Menschen kann dabei nicht nur durch die Verbreitung individueller resistenter *Enterococcus*-Klone erfolgen, sondern auch durch den Transfer beweglicher genetischer Elemente auf andere Bakterien [116]. *Enterococcus spp.* sind vor allem Verursacher von Harnwegsinfektionen, Wundinfektionen oder Sepsis [108, 115], jedoch führte 1998 in China ein Ausbruch mit einem glykopeptidresistenten *E. faecium*-Stamm zum Verenden tausender Schweine an hämorrhagischen Schock, sowie zur Erkrankung 40 lokaler Bauern, von denen zwölf verstarben [72].

Obwohl bei VRE-Isolaten aus der Umwelt häufig ein deutlicher Sensibilitätsverlust dem Desinfektionsmittel Triclosan gegenüber beobachtet wurde [117], konnte bislang kein Zusammenhang zwischen Antibiotika- und Desinfektionsmittelresistenzen bei *Enterococcus spp.* nachgewiesen werden, wie er beispielsweise von *Staphylococcus spp.* bekannt ist [17, 118, 119].

### 2.3.2 *Escherichia coli*

Von dem Genus *Escherichia*, welcher der Familie der *Enterobacteriaceae* zuzuordnen ist, hat die Spezies *E. coli* die weitaus größte Bedeutung. Die gramnegativen stäbchenförmigen Bakterien erreichen eine maximale Länge von 6  $\mu\text{m}$  und sind aufgrund peritricher Flagellen meist beweglich. Das fakultativ anaerobe Bakterium verfügt über eine hohe Tenazität, was ihm eine lange Überdauerung in der Umwelt ermöglicht, wo es ubiquitär vorkommt, da *E. coli* mit dem Fäzes nahezu aller Warmblüter ausgeschieden wird. Als kommensales Darmbakterium gehört *E. coli* der Normalflora des Intestinaltraktes von Mensch und Tier an, ist aber zudem auch ein wichtiger Krankheitserreger für diese [120, 121].

Eine Serotypisierung anhand verschiedener Antigengruppen dient der Charakterisierung der vielzähligen *E. coli*-Stämme, welche große Unterschiede in Virulenz und epidemiologischer Bedeutung aufweisen. Adhäsionsfaktoren und Endo-, Entero- und Zytotoxine determinieren die pathogene Wirkung der einzelnen Stämme von *E. coli*. Diese können sowohl septikämische als auch lokale Infektionen hervorrufen, wobei bei letzteren enteral und extraintestinal differenziert werden. Dabei kann eine weitere Unterteilung der darmpathogenen *E. coli* in sieben Gruppen erfolgen, von denen beispielsweise die enterotoxischen *E. coli* (ETEC) u.a. die neonatale Diarrhö bei Kälbern und Ferkeln auslösen, oder shiga-toxinbildende *E. coli* (STEC) u.a. die Ödemkrankheit der Schweine verursachen. Von den extraintestinalen Erkrankungen sind z.B. Septikämien verschiedenster Tierarten oder die



Colimastitis der Rinder von großer Bedeutung. Ebenso wie Tiere kann auch der Mensch an zahlreichen enteralen und extraintestinalen *E. coli*-Infektionen erkranken, wobei bislang nur die STEC, welche auch als enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) bezeichnet werden, als Zoonoseerreger nachgewiesen wurden [120].

Durch ihre zum Teil sehr hohe Pathogenität und weite Verbreitung kommt der Sensibilität von *E. coli* antimikrobiellen Wirkstoffen gegenüber eine große Bedeutung zu. Vergleicht man die Resistenzsituation von Bakterienisolaten aus Schweinehaltungen, so fällt eine sehr heterogene Verteilung der Effektivität der einzelnen Antibiotika auf, welche nicht nur national, sondern bereits regional sichtbar ist. Insbesondere bei enterischen Bakterien wie *E. coli* gab es Fälle, bei denen kein einziger antibiotischer Wirkstoff mehr gefunden werden konnte, der gegen die untersuchten Bakterien wirksam gewesen wäre [122].

Von den zahllosen Antibiotikaresistenzen, welche *E. coli* ausbilden können, spielt die Bildung von Beta-Laktamasen mit erweitertem Wirkungsspektrum, den sogenannten Extended-Spectrum  $\beta$ -Laktamasen (ESBL), eine herausragende Rolle. Der fortwährende Einsatz von  $\beta$ -Laktam-Antibiotika resultiert in einer kontinuierlichen und dynamischen Produktion von  $\beta$ -Laktamasen, die durch substratspektrumerweiternde Mutationen auch Cephalosporine der dritten oder vierten Generation hydrolysieren können. Die Anzahl identifizierter ESBL-Varianten, welche sich evolutionär in neun Familien unterteilen lassen, von denen TEM, SHV und CTX, die bedeutendsten sind, nimmt kontinuierlich zu. Dabei treten ESBL nicht nur bei *E. coli*, sondern bei vielen gramnegativen Pathogenen, insbesondere Mitgliedern der Familie der *Enterobacteriaceae*, auf. Durch ihre häufige Lokalisation auf Plasmiden kommt es nicht nur zur klonalen Verbreitung von ESBL-bildenden Bakterien, sondern zudem zum horizontalen Transfer ESBL-codierender Plasmide auch zwischen verschiedenen Bakterienspezies. Bedingt durch die durch ESBL-bildende Bakterien hervorgerufene starke Limitierung der therapeutischen Optionen und deren weite Verbreitung, haben diese bereits eine große Bedeutung erlangt [123, 124].

Dass ESBL-bildende *E. coli* auch jenseits der Krankenhausumgebung eine Gefahr darstellen, wurde durch den jüngsten Ausbruch mit ESBL-bildenden EHEC deutlich, bei dem im vergangenen Jahr in Norddeutschland mehr als 3800 Personen an enterohämorrhagischer Colitis oder dem hämolytisch-urämischem Syndrom erkrankten, von denen 53 in Folge der Erkrankung verstarben [125]. Auch wenn sie meist nicht zu Beschwerden führen, werden immer häufiger ESBL-bildende *E. coli* in Tierhaltungen Lebensmittel liefernder Tiere nachgewiesen [126, 127]. In einer aktuellen Studie wurden in Deutschland Prävalenzen ESBL-verdächtiger *E. coli* von 88% in Schweine- und 100% der Geflügelhaltungen ermittelt [128]. Dabei können nicht nur in der Nutztierhaltung, sondern auch bei den Begleittieren [129] und zu geringeren Anteilen auch in der Wildtierpopulation ESBL-bildende *E. coli* nachgewiesen werden [130-132].

*E. coli* kann aber nicht nur gegen Antibiotika, sondern auch gegen Desinfektionsmittel Resistenzen entwickeln. So ist es möglich, bereits durch eine viermalige Unterdosierung von Triclosan eine hochgradige Resistenz gegen dieses zu induzieren [78, 79]. Triclosan wirkt dabei u.a. auf das Enzym Enoyl-Reduktase, welches essentiell für die Fettsäurebiosynthese der Bakterienzelle ist. Diese Wirkung kann von *E. coli* entweder durch eine Überexpression von *fabI*, welche das Enzym reguliert, oder durch die Expression von Multidrug-Efflux-Pumpen über *acrAC*, *marA* oder *soxS*, welche zudem die Kreuzresistenzen induzieren, umgangen werden [81, 133]. Der Mechanismus, mit dem *E. coli* einer Desinfektion mit Kiefernöl trotzen kann, ist ebenfalls über die Überexpression von *marA* (*soxS*, *robA*), welches über *acrAB* eine protonenabhängige Multidrug-Efflux-Pumpe eine Vielzahl lipophiler Substanzen aus der Zelle transportiert [90].

Eine Formaldehydesistenz bei *E. coli* und anderen Vertretern der *Enterobacteriaceae* kann durch eine plasmidgetragene Formaldehyddehydrogenase hervorgerufen werden [134]. Die Mechanismen welche *E. coli* helfen oxidativen Stress zu widerstehen, sind im Gegensatz dazu wesentlich komplexer. Bei Anwesenheit nicht-toxischer Konzentrationen superoxiderzeugender redoxzyklischer Substanzen zeigen *E. coli* eine gravierende Veränderung ihrer Proteinzusammensetzung, bedingt durch zwei voneinander unabhängige Multigen Responses. Dabei führt die Expressierung des *oxyR*-Gens zur Synthese zahlreicher Proteine, u.a. der Katalasehydroperoxidase oder der Alkylhydroperoxidase-Reduktase, welche u.a. zur Hemmung der spontanen Mutagenese unter aeroben Bedingungen führen [135]. Des Weiteren reguliert der Genlokus *soxR* zusätzliche Proteine mit antioxidativer Wirkung. So sorgt die Superoxid-Dismutase für die Zerstörung von Superoxidradikalen, und Endonuklease IV repariert radikalinduzierte DNA-Schäden [99, 135]. Dabei besteht eine starke Abhängigkeit der zellulären Reaktion auf oxidativen Stress und der Wachstumsphase der Bakterien. Werden *E. coli* während ihrer exponentiellen Wachstumsphase Wasserstoffperoxid ausgesetzt, so sorgen auf Grundlage von *oxyR* verschiedene Proteine wie Katalasen oder Reduktasen für die zelluläre Abwehr, hingegen werden während der stationären Wachstumsphase eher schützende Proteine induziert [136].

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Allgemeiner Versuchsaufbau

In den hier durchgeführten Untersuchungen sollten drei typische, zur Desinfektion in der Tierhaltung eingesetzte Wirkstoffe auf ihr Potential Resistenzen bei Bakterien auszulösen untersucht werden. Da aus der Humanmedizin bekannt ist, dass einige Desinfektionsmittel bei verschiedenen Bakterien Wirkungsverluste gegen bestimmte Wirkstoffe, sowie Resistenzen gegen andere Substanzen, wie z.B. Antibiotika, induzieren können, sollte in dieser Arbeit ermittelt werden, inwieweit dieses Risiko für die Wirkstoffe Peressigsäure, Ameisensäure und Glutaraldehyd als klassische Desinfektionsmittel der Tierhaltung ebenfalls bestehen könnte.

Die Versuche wurden mit Erregern der Spezies *E. faecium*, *E. hirae* und *E. coli* durchgeführt, welche ubiquitär in Tierhaltungen vorkommen. Dabei ist von *E. coli* bekannt, dass sich durch verschiedene andere Desinfektionsmittel, wie beispielsweise Triclosan oder Chlorhexidin, sowohl Resistenzen gegen diese Desinfektionsmittel als auch Kreuzresistenzen gegen unterschiedliche Antibiotika induzieren lassen. Mit der Wahl dieser beiden Bakteriengruppen wurde sowohl ein grampositiver als auch ein gramnegativer Keim in die Untersuchung einbezogen, wobei zusätzlich das Verhalten ESBL-bildender *E. coli* betrachtet wurde. Damit ist eine Vergleichsmöglichkeit zwischen *E. coli*, welche bereits multiple Resistenzgene exprimieren, und ihren sensibleren Pendanten gegeben. Aus jeder Keimgruppe, Enterokokken, *E. coli* und ESBL-bildende *E. coli*, wurden sowohl Umweltisolate aus konventionellen Tierhaltungen als auch die Referenzstämme aus der Desinfektionsmittelprüfung nach DIN- und EN-Normen bzw. DVG-Richtlinien untersucht.

In Anlehnung an die Richtlinien der Desinfektionsmittelprüfung der DVG [137] wurde die Sensibilität aller Keime gegen die verschiedenen Desinfektionsmittel anhand der MHK ermittelt. Im Anschluss wurden sie an zehn aufeinanderfolgenden Tagen subinhibitorischen Desinfektionsmittelkonzentrationen ausgesetzt und eine erneute MHK-Bestimmung angeschlossen. Sofern die Bakterien nach den zehn Desinfektionsmittelpassagen eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber dem Desinfektionsmittel zeigten, wurden weitere Passagen ohne Desinfektionsmittelzusatz durchgeführt woraufhin anhand einer weiteren MHK-Bestimmung ermittelt wurde, inwieweit ein dauerhafter Wirkungsverlust des Desinfektionsmittels eingetreten ist. Alle Versuche wurden im Doppelansatz durchgeführt.

Um zu ermitteln, inwieweit sich die Empfindlichkeit der Bakterien gegenüber verschiedenen Antibiotika verändert, wurde mit den Testkeimen sowohl vor als auch nach den Passagen ein Agardiffusionstest durchgeführt. Dies erfolgte jedoch nicht mit allen Bakterien und allen Desinfektionsmitteln, sondern stichprobenartig mit jeweils dem Referenzkeim und einigen ausgewählten Feldisolaten, vorzugsweise welchen, bei denen sich zuvor eine Desinfektionsmittelresistenz induzieren ließ. Der Agardiffusionstest diente zur Beurtei-

lung, ob sich die Empfindlichkeit der Bakterien vor und nach den Passagen gegenüber Antibiotika unterschiedlicher Wirkstoffgruppen verändert.

## 3.2 Bakterien

### 3.2.1 Verwendete Keime

Ziel der Untersuchung war es, ausgewählte Desinfektionsmittel gegen Bakterien zu testen, um zu ermitteln inwieweit sie die Fähigkeit besitzen Resistenzen gegen die untersuchten Desinfektionsmittel bzw. eine Auswahl von Antibiotika auszubilden. Dabei sollte es sich um Bakterienspezies handeln, welche eine hohe Relevanz in Tierhaltungen haben. Des Weiteren sollten grampositive und gramnegative Keime vergleichend untersucht werden. Dafür wurden Vertreter der Gattungen *Enterococcus* und *Escherichia* ausgewählt. Von der Gattung *Enterococcus* fanden die beiden Spezies *E. hirae* und *E. faecium* Verwendung, aus der Gattung *Escherichia* die Spezies *E. coli*. Dabei wurden für letztere sowohl eine Gruppe mit phänotypisch und genotypisch ESBL-bildenden *E. coli*-Stämmen, als auch eine mit ihren ESBL-negativen Äquivalenten verglichen.

Für die Versuche wurden Feldisolate, welche aus Kotproben mehrerer konventioneller Schweinehaltungen isoliert wurden, verwendet. Zusätzlich wurden die entsprechenden Referenzkeime, *E. faecium* DSM 2918 und *E. coli* DSM 682, aus der Desinfektionsmittelprüfung nach DIN-/EN-Normen und DVG-Richtlinien mitgeführt. Da in der Desinfektionsmittelprüfung kein ESBL-bildender *E. coli* Verwendung findet, wurde alternativ auf den ESBL-bildenden *E. coli* 09E 915 (Herkunft: Bundesinstitut für Risikobewertung) als Referenzstamm zurückgegriffen.

### 3.2.2 Isolierung der Keime aus Kotproben

Ausgangsbasis für die Isolierung der gesuchten Bakterien waren Sammelkotproben aus 25 verschiedenen konventionellen Schweinezucht- und -mastbetrieben.

Für deren Isolierung wurde zuerst eine Voranreicherung der in den Kotproben enthaltenen Keime durchgeführt. Dazu wurden jeweils 10 g Sammelkot aus jedem Schweinebestand mit 90 ml Peptonwasser (Merck KGaA, Darmstadt) 2 min highspeed im Stomacher (Stomacher® 400 Circulator, Seward, Sussex, England) durchmischt und anschließend 24 h bei 37°C im Brutschrank (Thermo Scientific®, Waltham, England) aerob inkubiert. Nach der Inkubation wurde eine dekadische Verdünnungsreihe der Kotsuspension mit 0,9% NaCl-Lösung angelegt. Von den Verdünnungsstufen  $10^{-3}$  und  $10^{-5}$  wurden jeweils 100 µl auf ChromoCult® Enterokokken Agar (Merck KGaA, Darmstadt), ChromoCult® Coli Agar (Merck KGaA, Darmstadt) und ESBL Chromagar™ (Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld) ausgespatelt und weitere 24 h aerob bei 37°C inkubiert.

Es wurden die Bestände ausgewählt, deren Probe auf allen drei Selektivagarböden ein Bakterienwachstum zeigte. Zur Gewinnung von Reinkulturen wurden anschließend verdächtige Kolonien der *E. coli* und *Enterococcus spp.* auf Columbia Agar mit Schafsblutzusatz (Oxoid Deutschland GmbH, Wesel) transferiert woraufhin eine aerobe Inkubation

über 24 h bei 37°C folgte. Die ursprünglich vom ChromoCult® Coli Agar stammenden Isolate wurden dann auf ESBL Chromagar® überimpft, um zusätzlich zu den ESBL-bildenden Stämmen *E. coli*-Isolate zu finden, welche auf diesem kein Wachstum, und somit nicht den ESBL-Phänotyp zeigen.

Ziel war es, aus jedem Bestand je einen *E. hirae*- oder *E. faecium*-, einen ESBL-negativen *E. coli*- und einen ESBL-bildenden *E. coli*-Stamm zu isolieren.

### 3.2.3 Identifikation der Isolate

Eine Identifizierung der Isolate wurde anhand von Kolonien von frisch überimpften und bebrüteten Columbia Agarplatten mit Schafsblutzusatz mittels MALDI-TOF (microflex™ LT, Bruker Daltonics, Bremen) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

### 3.2.4 ESBL-Multiplex-PCR

Alle isolierten Stämme von *E. coli*, welche den ESBL-Phänotyp exprimierten, wurden mit Hilfe einer Multiplex-PCR auf die ESBL-Resistenzgene <sup>bla</sup>SHV, <sup>bla</sup>TEM und <sup>bla</sup>CTX-M untersucht. *E. coli*-Isolate, welche sowohl den ESBL-Phänotyp als auch den Genotyp zeigten, wurden als ESBL-bildende *E. coli* für die weiteren Versuche verwendet. Die Multiplex-PCR wurde mit dem Mastermix und den Primern der Firma biomers.net GmbH (Ulm), wie von Monstein et al. [138] beschrieben, nach dem in Tabelle 3 aufgeführten Pipettierschema durchgeführt.

**Tabelle 3: Pipettierschema für die ESBL-Multiplex-PCR nach Monstein et al. [138]**

Ansatzvolumen		25 µl
Mastermix		18 µl
Forward Primer		
-	<sup>bla</sup> SHV	1 µl
-	<sup>bla</sup> TEM	1 µl
-	<sup>bla</sup> CTX-M	1 µl
Reverse Primer		
-	<sup>bla</sup> SHV	1 µl
-	<sup>bla</sup> TEM	1 µl
-	<sup>bla</sup> CTX-M	1 µl
DNA		1 µl

Die der PCR vorausgegangene DNA-Extraktion der verschiedenen Bakterienisolate erfolgte jeweils mit Hilfe des Genomic DNA Isolation Kit for Bacteria (Biozym Scientific GmbH, Oldenburg), nach dem vom Hersteller beigefügten Protokoll.

### **3.2.5 Asservierung der Isolate**

Sowohl die isolierten, identifizierten Keime als auch zu späteren Zeitpunkten die passierten Keime wurden mithilfe einer Cryobank™ (Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld) bei Temperaturen von  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Gemäß der Gebrauchsinformation des Herstellers wurden die Bakterien in den Kryoröhrchen in der mit Borosilikatglasperlen versetzten Konservierungslösung suspendiert. Im Anschluss wurde die Flüssigkeit mit Hilfe einer sterilen Pipette entfernt und das Röhrchen mit den enthaltenen Borosilikatglasperlen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Rekultivierung der Bakterien erfolgte jeweils durch Ausstreichen einer Perle auf einer Trypton-Soja-Agarplatte (Oxoid Deutschland GmbH, Wesel) mit anschließender aerober Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3 Desinfektionsmittel

#### 3.3.1 Verwendete Desinfektionsmittel

Die Versuche wurden mit den Wirkstoffen Peressigsäure, Ameisensäure und Glutaraldehyd durchgeführt. Die Wahl fiel dabei auf gebrauchsfertige Desinfektionsmittellösungen und nicht auf die ausgewählten Reinsubstanzen. Es wurden dabei ausschließlich Präparate ausgewählt, welche in der Liste der nach den Richtlinien der DVG geprüften und als wirksam befundenen Desinfektionsmittel für die Tierhaltung enthalten sind [25].

Als peressigsäurehaltiges Präparat wurde Wofasteril<sup>®</sup> E 400 (Kesla Pharma Wolfen GmbH, Bitterfeld-Wolfen) gewählt. Des Weiteren fand das Produkt Permanent Neu<sup>®</sup> (H. Wilhelm Schaumann GmbH, Pinneberg), welches Glutaraldehyd als Wirkstoff enthält und als ameisensäurehaltiges Präparat das Desinfektionsmittel Organosept Neu<sup>®</sup> (H. Wilhelm Schaumann GmbH, Pinneberg) Verwendung. Die Wirkstoffkonzentrationen und die laut Hersteller ausgewiesenen Gebrauchskonzentrationen sind Tabelle 4 zu entnehmen.

**Tabelle 4: Wirkstoffe und Wirkstoffkonzentrationen der verwendeten Desinfektionsmittel**

Desinfektionsmittel	Wirkstoffkonzentration (pro 100 g)	Gebrauchskonzentration laut Hersteller
Wofasteril <sup>®</sup> E 400	40 g Peroxyessigsäure, Wasserstoffperoxid, Essigsäure	0,5 %
Permanent Neu <sup>®</sup>	20 Glutaraldehyd, 12 g oligomeres Pentaerythritose-Kondensat	1 %
Organosept Neu <sup>®</sup>	55 g Ameisensäure	1 %

#### 3.3.2 Wasser standardisierter Härte

Den DVG-Richtlinien entsprechend wurde für die Verdünnung der eingesetzten Desinfektionsmittel Wasser standardisierter Härte (WSH) verwendet [137]. Diese wurde unmittelbar vor der Verwendung aus den beiden Lösungen A und B und destilliertem Wasser (A. dest.) hergestellt.

Wie in Tabelle 5 beschrieben, wurden für Lösung A  $MgCl_2$  und  $CaCl_2$  in A. dest. gelöst und durch Autoklavieren sterilisiert, wohingegen Lösung B nach dem Lösen von  $NaHCO_3$  mittels eines Membranfilters (Rotilabo<sup>®</sup>-Spritzenfilter, Porengröße 0,22  $\mu m$ , Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe) sterilisiert wurde.



**Tabelle 5: Bestandteile von Wasser standardisierter Härte**

	Lösung A	Lösung B
in 1000 ml A. dest. gelöst	19,84 g MgCl <sub>2</sub> 46,24 g CaCl <sub>2</sub>	35,02 g NaHCO <sub>3</sub>
Sterilisationsmethode	Autoklavieren	Sterilfiltration (0,22 µm)
Maximale Verwendbarkeit bei 2-8°C	1 Monat	1 Woche

Für die Herstellung von WSH wurden 6,0 ml Lösung A und 8,0 ml Lösung B mit A. dest. auf 1000 ml aufgefüllt. Das so hergestellte WSH durfte maximal 12 h Verwendung finden.

### 3.3.3 Verdünnungsstufen der Desinfektionsmittel

Die Festlegung der verschiedenen Konzentrationsabstufungen für die MHK-Bestimmung erfolgte empirisch. Ausgehend von der Gebrauchskonzentration der Desinfektionsmittel wurden Verdünnungsstufen gewählt, welche die maximale Genauigkeit des Verfahrens berücksichtigen bei der sich einerseits reproduzierbare Resultate erzielen ließen und die andererseits eine möglichst präzise Aussage ermöglichten.

Es wurden die in Tabelle 6 gezeigten Konzentrationsabstufungen der verschiedenen Wirkstoffe gewählt.

**Tabelle 6: Desinfektionsmittelkonzentrationen für die MHK-Bestimmung**

Wirkstoff	Peressigsäure	Glutaraldehyd	Ameisensäure
Gebrauchskonzentration	0,500%	1,000%	1,000%
Konzentrationsabstufungen für die MHK-Bestimmung	0,500%	2,000%	0,500%
	0,250%	1,000%	0,250%
	0,100%	0,500%	0,100%
	0,050%	0,250%	0,050%
	0,010%	0,100%	0,010%
	0,005%	0,050%	0,005%

Da bekannt ist, dass die Wirkung von Desinfektionsmitteln temperaturabhängig sein kann, und dies insbesondere bei dem Wirkstoff Glutaraldehyd eine bedeutende Rolle spielt, sind die Desinfektionsmittel prinzipiell bei Raumtemperatur aufbewahrt und verwendet worden. Alle eingesetzten Desinfektionsmittel wurden vor Verwendung jeweils auf dem Vortexer (lab dancer, IKA<sup>®</sup>-Werke GmbH & Co.KG) intensiv durchmischt und damit homogenisiert.

### 3.4 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration der Desinfektionsmittel

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration der verschiedenen Desinfektionsmittel wurde gemäß den von der DVG definierten „Methoden zur Bestimmung der minimal hemmenden Konzentration von chemischen Desinfektionsmitteln“ durchgeführt [137].

Alle verwendeten Keime wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und vor Gebrauch auf Trypton-Soja-Agarplatten rekultiviert. Gemäß den DVG-Richtlinien wurde für die Versuche jeweils die zweite oder dritte Subkultur, ebenfalls auf Trypton-Soja-Agar, genutzt. Da die Empfindlichkeit von Bakterien je nach Wachstumsphase variieren kann, wurden die Gebrauchskulturen stets genau 21 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  aerob bebrütet. Nach der Inkubation wurde mit Trypton-NaCl-Lösung (Trypton, Oxoid Deutschland GmbH, Wesel) eine Testkeimsuspension hergestellt, welche photometrisch (BioPhotometer, Eppendorf® AG, Wesseling-Berzdorf) auf die geforderte Keimzahl von  $1 \times 10^8$  bis  $1 \times 10^9$  pro ml eingestellt wurde. Dabei lag der OD-Wert bei einer Wellenlänge von 595 nm bei 0,1. Die Testkeimsuspension fand unmittelbar nach Einstellung der Keimzahl Anwendung.

Die verschiedenen Verdünnungsstufen der zu testenden Desinfektionsmittel wurden zuvor mit WSH angefertigt. Dafür wurde das jeweilige Desinfektionsmittel auf die doppelten Konzentrationen der gewünschten Endkonzentrationen verdünnt. Daraufhin wurden je 5 ml der jeweiligen Verdünnungsstufe des Desinfektionsmittels zu 5 ml doppelt konzentrierter Trypton-Soja-Bouillon (TSB, Oxoid Deutschland GmbH, Wesel) gegeben. Als Positivkontrolle und damit zur Überprüfung des Keimwachstums wurde für jeden Testkeim zudem jeweils 5 ml WSH zu 5 ml doppelt konzentrierter TSB gegeben. Zu diesen vorbereiteten Nährbouillon-Desinfektionsmittel-Mischungen und zu der Wachstumskontrolle wurden jeweils 100 µl der frisch eingestellten Testkeimsuspension hinzugefügt und auf dem Vortexer gründlich durchmischt. Hierauf folgte eine 72-stündige aerobe Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$ .

Zusätzlich wurden bei jedem Versuchsansatz zwei Sterilitätskontrollen mitgeführt. Dafür wurden je 5 ml doppelt konzentrierte TSB mit 5 ml WSH bzw. mit 5 ml Trypton-NaCl-Lösung versetzt, durchmischt und gemeinsam mit den anderen Proben 72 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  aerob inkubiert. Sofern sich in mindestens einer der beiden Sterilitätskontrollen nach der Bebrütung eine Trübung zeigte, wurde von einer Kontamination ausgegangen und der jeweilige Versuchsansatz vollständig wiederholt.

Das Ablesen der MHK erfolgte nach dreitägiger Inkubation visuell anhand der Trübung. Diese diente als Indikator für ein erfolgtes Bakterienwachstum. So wurde visuell ermittelt, bis zu welcher Desinfektionsmittelkonzentration eine Trübung des Nährbouillon-Desinfektionsmittel-Gemisches erkennbar war. Dabei entsprach die letzte Konzentration bei der keine Trübung des Bouillongemisches und somit kein Bakterienwachstum mehr erkennbar war der MHK des jeweiligen Desinfektionsmittels für dieses Isolat.

Für alle MHK-Werte wurde eine Doppelbestimmung vorgenommen. In Fällen wo die MHK-Bestimmung der Ausgangs-MHK voneinander abweichende Resultate erzielte, wurde sie ein zusätzliches Mal wiederholt.

### 3.5 Passagen der Bakterien bei subinhibitorischen Desinfektionsmitteldosen

Ziel war es, die verschiedenen Testkeime über einen längeren Zeitraum Desinfektionsmittelkonzentrationen auszusetzen, welche unterhalb des inhibitorischen Bereichs liegen, um auf diese Art einen Selektionsdruck auf die Bakterien auszuüben. So sollte ermittelt werden, inwieweit das Risiko besteht, dass bei zu geringen Dosierungen der untersuchten Desinfektionsmittel es zu einer Desinfektionsmittelresistenzentwicklung oder gar zur Induktion von Kreuzresistenzen gegen andere Substanzen, wie beispielsweise Antibiotika, kommt.

Der Zeitraum, über den die Bakterien den subinhibitorischen Desinfektionsmittelkonzentrationen ausgesetzt wurden, wurde auf zehn aufeinanderfolgende Tage festgelegt. Die Konzentration der Desinfektionsmittel dafür wurde auf eine Verdünnungsstufe unterhalb der ermittelten MHK festgelegt und somit immer auf die letzte Konzentration, bei der noch ein Bakterienwachstum, und somit eine Trübung des Nährbouillon-Desinfektionsmittel-Gemisches, zu beobachten war. Dabei stellte sich jedoch heraus, dass bei Glutaraldehyd, im Gegensatz zu den Wirkstoffen Peressigsäure und Ameisensäure, nach einigen Tagen Passage keine Trübung mehr zu erkennen war. Die Bakterien starben trotz einer Glutaraldehydkonzentration, welche unterhalb der ermittelten MHK lag, nach ca. drei bis fünf Tagen ab. Somit war es für Glutaraldehyd erforderlich, abweichend zu Peressigsäure und Ameisensäure, die Konzentration für die Passagen auf zwei Verdünnungsstufen unterhalb der ermittelten MHK festzulegen.

Das Vorgehen für die Passagen wurde möglichst ähnlich dem der MHK-Bestimmung gehalten. Es wurden 5 ml doppelt konzentrierter TSB mit 5 ml der festgelegten Desinfektionsmittelverdünnung, welche ebenfalls doppelt konzentriert war, gemischt. Für die erste Passage wurde die Keimsuspension identisch zu der für die MHK-Bestimmung hergestellt: von 21 h bebrüteten Trypton-Soja-Agarplatten wurde mit einer Trypton-NaCl-Lösung eine Keimsuspension mit einer Keimdichte von  $1 \times 10^8$  bis  $1 \times 10^9$  pro ml eingestellt. Von dieser wurden wieder unmittelbar nach der Herstellung 100  $\mu$ l zu der TSB-Desinfektionsmittel-Mischung gegeben und nach gründlicher Durchmischung 24 h bei 37°C aerob inkubiert. Anschließend erfolgte die nächste Passage. Die Passagen zwei bis neun wurden genauso wie die erste durchgeführt, wobei jedoch anstelle der ursprünglichen Testkeimsuspension 100  $\mu$ l der Suspension der vorausgegangenen Passage zu dem Nährbouillon-Desinfektionsmittel-Gemisch gegeben wurden. Als Sterilitätskontrolle wurde stets eine Mischung aus TSB und WSH mitgeführt.

Die zehnte und letzte Desinfektionsmittelpassage wurde davon abweichend auf festem Nährmedium durchgeführt, um eine erneute Bestimmung der MHK analog der ursprünglichen MHK-Bestimmung und eine Kryokonservierung der passagierten Keime ohne eine Abweichung vom festgelegten Vorgehen zu ermöglichen. Dafür wurden Trypton-Soja-Agarplatten, welche die gewünschte Desinfektionsmittelkonzentration aufwiesen, verwendet. Hierfür wurde das Agarmedium nach den Vorgaben des Herstellers angefertigt und

autoklaviert. Nach Abkühlen auf 50°C wurde vor dem Gießen der Agarplatten die entsprechende Desinfektionsmittelmenge hinzugegeben und gründlich durchmischt. Dasjenige Volumen, welches als Desinfektionsmittel dem Trypton-Soja-Agar zugesetzt wurde, wurde vorher bei Herstellung des Agarmediums dem Wasservolumen abgezogen. Dass Peressigsäure als Peroxidverbindung eine gewisse Hitzelabilität aufweist, wurde berücksichtigt und bei Herstellung der Nährböden durch eine empirisch ermittelte Konzentrationserhöhung um 20% Desinfektionsmittel ausgeglichen.

Zur zehnten Passage wurden die vorher gut durchmischten Suspensionen der neunten Passage jeweils mit einer Einmalimpföse auf einer Trypton-Soja-Agarplatte mit Desinfektionsmittelzusatz fraktioniert ausgestrichen. Die anschließende aerobe Inkubation bei 37°C erfolgte wiederum nur für 21 h, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der anschließenden MHK-Bestimmung zu gewährleisten. Die so passagierten Keime wurden abschließend, wie unter Abschnitt 3.2.5 beschrieben, kryokonserviert.

### **3.6 Passagen ohne Zusatz von Desinfektionsmittel (Stabilitätspassagen)**

Es war vorgesehen, im Anschluss an die zehn Desinfektionsmittelpassagen zehn weitere Passagen ohne Desinfektionsmittelzusatz zur TSB-Nährbouillon durchzuführen, um mittels einer erneuten MHK-Bestimmung im Anschluss zu bestimmen, inwieweit die aufgetretenen MHK-Erhöhungen stabil sind. Dabei wurde zusätzlich nach der ersten und dritten Passage ohne Desinfektionsmittel je eine MHK-Bestimmung durchgeführt und abhängig vom Ergebnis die weiteren Rückpassagen fortgeführt.

Die Stabilitätspassagen wurden auf Trypton-Soja-Agarplatten durchgeführt, so dass nach 21-stündiger aerober Inkubation bei 37°C unmittelbar eine MHK-Bestimmung angeschlossen werden konnte. Von einer Kryoasservierung der rückpassagierten Keime wurde abgesehen.

### 3.7 Agardiffusionstest mit ausgewählten Antibiotika

Der Agardiffusionstest wurde gemäß der CLSI-Richtlinie M02-A10 durchgeführt [139]. Dabei wurden aus den Testkeimgruppen jeweils der Referenzkeim der Desinfektionsmittelprüfung und zwei Feldisolate, bei welchen nach Möglichkeit im Anschluss an die Passagen eine MHK-Erhöhung zu beobachten war, auf eine potentiell veränderte Antibiotikempfindlichkeit geprüft, um eine eventuell ebenfalls induzierte Antibiotikaresistenz abzuklären. Im Doppelansatz wurde jedes der ausgewählten Bakterienisolate sowohl im unpassagierten Zustand als auch jeweils nach zehn Passagen mit Peressigsäure, Glutaraldehyd und Ameisensäure untersucht.

Die Auswahl der Antibiotika erfolgte in der Abwägung verschiedener Kriterien. Es sollte möglichst die Empfindlichkeit gegen Antibiotika untersucht werden, welche auch in der Praxis Anwendung gegen die entsprechenden Bakterienspezies finden. Zudem wurde versucht, antibiotische Wirkstoffe zu wählen, von welchen bekannt ist, dass die entsprechenden Bakterienspezies gegen diese in der Lage sind, Resistenzen zu bilden. Sofern es Kenntnisse zu gegen andere Desinfektionsmittel gebildeten Kreuzresistenzen gab, wurde versucht, die betreffenden antibiotischen Wirkstoffe ebenfalls einzubeziehen. Unter Berücksichtigung dieser Kriterien sollten dabei möglichst zahlreiche Antibiotikaklassen mit verschiedenen Wirkmechanismen getestet werden.

Zusätzlich wurde als Negativkontrolle jeweils ein Antibiotikum mitgeführt, gegen welches die betreffenden Bakterienspezies eine intrinsische Resistenz aufweisen. Damit wurde die Wirksamkeit der ausgewählten Bakterien im Agardiffusionstest jeweils gegen zwölf Antibiotika getestet, wovon eines als Negativkontrolle diente.

#### 3.7.1 *Enterococcus spp.*

Aus der Gruppe der Enterokokken wurde der Referenzstamm *E. faecium* DSM 2918 aus der Desinfektionsmittelprüfung und von den Feldisolaten jeweils ein Vertreter der Spezies *E. hirae* und einer der Spezies *E. faecium* getestet (*Enterococcus*-Isolate 2 und 9). Mit diesen beiden Feldisolaten wurde jeweils ein Vertreter der beiden untersuchten *Enterococcus*-Spezies gewählt, welche zuvor nach den Desinfektionsmittelpassagen gegen alle drei getesteten Präparate einen temporären Empfindlichkeitsverlust gezeigt hatten. Diese wurden jeweils im unpassagierten Zustand und nach zehn Passagen mit Peressigsäure, Glutaraldehyd und Ameisensäure verglichen.

Zusätzlich wurde gemäß den CLSI-Vorgaben *S. aureus* ATCC 25923 zur Validierung eines korrekt durchgeführten Versuchs mitgeführt.

Die dabei getesteten Antibiotika (alle Oxoid Deutschland GmbH, Wesel) sind aus der nachfolgenden Tabelle 7 zu entnehmen.

**Tabelle 7: Gegen *Enterococcus spp.* getestete Antibiotika**

Antibiotikum	Wirkstoffmenge	Wirkstoffklasse
Amoxicillin/Clavulansäure (AMC)	20/10 µg	β-Laktame
Ampicillin (AMP)	10 µg	β-Laktame
Bacitracin (B)	10 µg	Polypeptide
Chloramphenicol (C)	30 µg	Phenicol
Enrofloxacin (ENR)	5 µg	Fluorchinolone
Erythromycin (E)	15 µg	Makrolide
Gentamicin (CN)	10 µg	Aminoglykoside
Sulphamethoxazol/Trimethoprim (SXT)	23,75/1,25 µg	Sulfonamide/ Folsäureinhibitor
Teicoplanin (TEC)	30 µg	Glykopeptide
Tetrazyklin (TE)	30 µg	Tetrazykline
Vancomycin (VA)	30 µg	Glykopeptide
Colistin (CT) (Negativkontrolle)	10 µg	Polymyxine

### 3.7.2 *E. coli*

Bei den beiden *E. coli*-Gruppen wurde analog zu den *Enterococcus spp.* verfahren: Jeweils der Referenzstamm und zwei Feldisolate der *E. coli*-Gruppe und der ESBL-bildenden *E. coli* wurden dem Agardiffusionstest unterzogen. Die gewählten Feldisolate waren dabei ebenfalls welche, deren Wirksamkeit sich möglichst gut durch subinhibitorische Desinfektionsmittelkonzentrationen beeinflussen ließ. Damit wurden für die Gruppe der *E. coli* neben dem Referenzstamm aus Desinfektionsmittelprüfung *E. coli* DSM 682 noch die beiden Feldisolate 1 und 2 und für die Gruppe der ESBL-bildenden *E. coli* neben *E. coli* 09E 915 als Referenz noch die beiden Feldisolate 1 und 2 gewählt. Zur Validierung der Versuche wurde jeweils *E. coli* ATCC 25922 mitgeführt.

Ebenso wie in der *Enterococcus*-Gruppe wurde wieder eine Auswahl von elf Antibiotika, bei welchen eine Wirkung zu erwarten wäre und einem antibiotischen Wirkstoff, gegen welchen eine intrinsische Resistenz vorhanden sein sollte, als Negativkontrolle getroffen. Damit wurden auch die *E. coli* und die ESBL-bildenden *E. coli* jeweils gegen zwölf verschiedene antibiotische Wirkstoffe getestet.



Die dafür getroffene Antibiotika-Auswahl (alle Oxoid Deutschland GmbH, Wesel) ist in der folgenden Tabelle 8 dargestellt.

**Tabelle 8: Gegen *E. coli* getestete Antibiotika**

Antibiotikum	Wirkstoffmenge	Wirkstoffklasse
Ampicillin (AMP)	10 µg	β-Laktame
Cefotaxim (CTX)	30 µg	Cephalosporine (3a)
Chloramphenicol (C)	30 µg	Phenicol
Ciprofloxacin (CIP)	5 µg	Fluorchinolone
Colistin (CT)	10 µg	Polymyxine
Enrofloxacin (ENR)	5 µg	Fluorchinolone
Gentamicin (CN)	10 µg	Aminoglykoside
Nalidixinsäure (NA)	30 µg	Chinolone
Streptomycin (S)	10 µg	Aminoglykoside
Sulfamethoxazol/Trimethoprim (SXT)	23,75/1,25 µg	Sulfonamide/ Folsäureinhibitor
Tetrazyklin (TE)	30 µg	Tetrazykline
Bacitracin (B) (Negativkontrolle)	10 µg	Polypeptide

### 3.7.3 Durchführung

Die Durchführung des Agardiffusionstests mit den ausgewählten Bakterienstämmen erfolgte strikt nach der CLSI-Richtlinie M02-A10 [139].

Von den ausgewählten Bakterienstämmen wurden Kulturen, die 21 h bei 37°C aerob auf Columbia Agarplatten kultiviert wurden, mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Oxoid Deutschland GmbH, Wesel) abgeschwemmt und mittels Photometer auf die geforderte Keimzahl von 1 bis  $2 \times 10^8$  KBE/ml verdünnt. Bei einer Wellenlänge von 595 nm lag der OD-Wert dafür bei 0,1. Unmittelbar im Anschluss wurde ein steriler Wattetupfer in die Keimsuspension getaucht, vorsichtig am Rand ausgedrückt und danach dreimal, jeweils um 60° versetzt, auf einer Müller-Hinton-Agarplatte (Oxoid Deutschland GmbH, Wesel) ausgestrichen. Mit einer abgeflamten Pinzette wurden anschließend jeweils vier Antibiotika-Testplättchen pro Platte auf den frisch beimpften Müller-Hinton-Agar gelegt und vorsichtig angedrückt. Nach einer 16-18-stündigen aeroben Inkubation bei 37°C wurden die

Hemmhofdurchmesser, d.h. die Zone, in der kein Bakterienwachstum mehr stattfand, bis auf einen Millimeter genau abgelesen. Sofern ein Wachstum bis an das Testplättchen heran stattfand, entsprach der Hemmhofdurchmesser dem Durchmesser des Antibiotika-Testplättchens, d.h. 6 mm.

Zur Überprüfung der korrekten Durchführung der Versuche wurde gemäß der CLSI-Richtlinie M02-A10 für die Versuche mit den *Enterococcus spp.* jeweils *S. aureus* ATCC 25923 bzw. für die Versuche mit den verschiedenen *E. coli*-Isolaten stets *E. coli* ATCC 25922 mitgeführt, um anhand der Referenzwerte aus CLSI-Richtlinie M100-S20 und den abgelesenen Hemmhofdurchmessern das Vorgehen zu validieren [139, 140]. Bei mangelnder Übereinstimmung wurde der betreffende Versuchsansatz wiederholt. Kontamination, eine Überschneidung der Hemmhöfe oder ein nicht gleichmäßig gewachsener Bakterienrasen führten ebenfalls zur Wiederholung des betreffenden Versuchsansatzes.

### **3.8 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests. Um die unterschiedlichen Desinfektionsmittel und die verschiedenen Testkeimgruppen zu vergleichen, wurden dafür die Häufigkeiten der induzierbaren MHK-Erhöhungen gegenüber gestellt. Das Signifikanzniveau dabei wurde auf  $p \leq 0,05$  festgelegt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Verwendete Isolate

#### 4.1.1 Identifizierung der Bakterien-Spezies

Sammelkotproben 25 verschiedener konventioneller Schweinezucht- und -mastbetriebe wurden auf ESBL-bildende *E. coli* gescreent, wobei 18 der 25 untersuchten Betriebe positiv für ESBL-bildende *E. coli* waren. Aus möglichst vielen dieser Betriebe sollten zusätzlich ESBL-negative *E. coli* und *Enterococcus*-Vertreter der Spezies *E. hirae* oder *E. faecium* isoliert werden. Limitierend dafür war die Isolierung von Enterokokken einer der beiden gesuchten Spezies mittels Selektivnährmedium, da nur die Gattung *Enterococcus*, nicht aber die *Enterococcus*-Spezies anhand des Phänotyps vorselektiert werden konnte. Innerhalb der einzelnen Bestände zeigte sich eine erstaunliche Homogenität bezüglich der auftretenden *Enterococcus spp.* So wurden bis zu 20 *Enterococcus*-Kolonien, welche oftmals alle derselben Art angehörten, vom Selektivnährmedium ChromoCult® Enterokokken Agar gepickt und anschließend mittels MALDI-TOF identifiziert. Dabei konnte jedoch nur bei 50% der getesteten ESBL-positiven Bestände ein Stamm einer der beiden gesuchten *Enterococcus*-Spezies isoliert werden.

Im Gegensatz dazu stellte sich die Vorauswahl der *E. coli*-Isolate anhand des Phänotyps auf ChromoCult® Coli Agar bzw. ESBL Chromagar™ generell als zutreffend heraus. Letztendlich ist es mit dem unter 3.2.2 beschriebenen Vorgehen gelungen, von neun der 25 untersuchten Bestände alle drei der gewünschten Bakterienspezies zu isolieren. Die verwendeten *Enterococcus*-Spezies sind in Tabelle 9 dargestellt.

**Tabelle 9: Übersicht über die isolierten und anschließend in den Versuchen verwendeten *Enterococcus spp.***

Bestandsisolat	<i>Enterococcus spp.</i>
1	<i>E. faecium</i>
2	<i>E. hirae</i>
3	<i>E. faecium</i>
4	<i>E. hirae</i>
5	<i>E. hirae</i>
6	<i>E. hirae</i>
7	<i>E. faecium</i>
8	<i>E. hirae</i>
9	<i>E. faecium</i>
Referenzstamm	<i>E. faecium</i> DSM 2918

#### 4.1.2 Untersuchung der *E. coli*-Isolate mittels PCR

Mit allen isolierten, phänotypisch ESBL-positiven *E. coli* wurde eine Multiplex-PCR durchgeführt um abzuklären, inwieweit die verwendeten *E. coli*-Isolate über die Resistenzgene <sup>bla</sup>SHV, <sup>bla</sup>TEM und <sup>bla</sup>CTX-M verfügen. Für die Versuche sollten ESBL-bildende *E. coli* verwendet werden, welche neben dem ESBL-Phänotyp auch den ESBL-Genotyp aufwiesen. Die in den verwendeten *E. coli*-Isolaten auftretenden ESBL-Genfamilien sind in der nachfolgenden Tabelle 10 dargestellt.

**Tabelle 10: ESBL-Genfamilien der verwendeten ESBL-bildenden *E. coli*-Isolate**

Bestandsisolate	Resistenzgenotyp der phänotypisch ESBL-positiven <i>E. coli</i> -Isolate
1	<sup>bla</sup> TEM
2	<sup>bla</sup> TEM
3	<sup>bla</sup> TEM
4	<sup>bla</sup> CTX-M
5	<sup>bla</sup> TEM
6	<sup>bla</sup> TEM
7	<sup>bla</sup> CTX-M
8	<sup>bla</sup> CTX-M
9	<sup>bla</sup> CTX-M

## 4.2 Toleranzinduktion gegen Peressigsäure

### 4.2.1 MHK vor den Passagen

Je nach Einsatzgebiet und Einwirkdauer liegt die Anwendungskonzentration gemäß DVG-Liste für das verwendete peressigsäurehaltige Präparat Wofasteril® E400 zwischen 0,2% und 0,5% [25].

Die Konzentration, bei der bei allen drei getesteten Bakteriengruppen kein Wachstum mehr möglich war, lag konstant jeweils bei 0,1% Wofasteril® E400. Dies war sowohl in der Gruppe der Enterokokken, der ESBL-negativen als auch der ESBL-bildenden *E. coli* der Fall. Dabei waren keine Unterschiede zwischen Referenzstämmen und Feldisolaten zu beobachten. Die einheitlich für alle Keime ermittelte MHK von 0,1% Desinfektionsmittel entspricht einer Konzentration von 0,04% Peressigsäure. In Tabelle 11 sind die MHK-Werte der Doppelbestimmung der Testkeime mit dem peressigsäurehaltigen Desinfektionsmittel Wofasteril® E400 dargestellt.

**Tabelle 11: MHK der Testkeime vor den Passagen mit Wofasteril® E400**

Bestandsisolat	<i>Enterococcus spp.</i>	<i>E. coli</i>	ESBL-bildende <i>E. coli</i>
Referenzstamm	0,10%	0,10%	0,10%
1	0,10%	0,10%	0,10%
2	0,10%	0,10%	0,10%
3	0,10%	0,10%	0,10%
4	0,10%	0,10%	0,10%
5	0,10%	0,10%	0,10%
6	0,10%	0,10%	0,10%
7	0,10%	0,10%	0,10%
8	0,10%	0,10%	0,10%
9	0,10%	0,10%	0,10%

### 4.2.2 MHK nach den Passagen

Nach der Passagierung der Testbakterien mit Konzentrationen von 50% der ermittelten MHK Wofasteril® E400 konnte bei 43 von insgesamt 60 Versuchen mit dem peressigsäurehaltigen Desinfektionsmittel eine MHK-Erhöhung der Testkeime im Anschluss an die Passagen beobachtet werden. Das Ausmaß der Sensibilitätsverluste der Bakterien gegenüber Peressigsäure umfasste dabei stets eine MHK-Stufe. Somit betrug die MHK in den 43 Fällen in denen sich die Empfindlichkeit verringert hatte 0,25% Wofasteril® E400, was einer 0,1%igen Konzentration Peressigsäure entsprach. Dabei erhöhte sich die MHK bei allen untersuchten *Enterococcus*-Isolaten infolge der Passagierung mit subinhibitorischen Peressigsäurekonzentrationen (Tabelle 12). Bei den *E. coli*-Isolaten hingegen war dieser Empfindlichkeitsverlust nur in reichlich der Hälfte der Fälle (57,5%) induzierbar, wobei mit einer Häufigkeit von 75% bei den ESBL-negativen *E. coli* eine MHK-Erhöhung signi-

fikant öfter als bei den ESBL-bildenden *E. coli*, wo dies nur in 40% der Fälle stattfand, auftrat ( $p \leq 0,05$ ) (Tabelle 13 und Tabelle 14). Dabei war zu beobachten, dass ein Teil der Bakterienisolate im Doppelansatz ein unterschiedliches Verhalten an den Tag legte, insofern als dass sich nur nach einer von beiden im Doppelansatz durchgeführten Desinfektionsmittelpassagen eine MHK-Erhöhung zeigte. Bei den restlichen 17 *E. coli*-Stämmen ist die MHK unverändert bei 0,1% Wofasteril® E400 bzw. bei 0,04% Peressigsäure geblieben.

#### 4.2.3 MHK nach den Stabilitätspassagen ohne Peressigsäurezusatz

In den Fällen, in denen sich die MHK der Bakterien nach den Passagen mit subinhibitorischen Desinfektionsmittelkonzentrationen erhöht hatte, wurden Stabilitätspassagen ohne Desinfektionsmittelzusatz durchgeführt um zu überprüfen, inwieweit die beobachteten Sensibilitätsverluste der Keime gegenüber den verschiedenen Präparaten stabil sind. Ebenso wie die Passagen mit Desinfektionsmittel, sollten auch die Rückpassagen über eine Dauer von zehn Tagen durchgeführt werden. Dabei wurden bereits nach dem ersten und dritten desinfektionsmittelfreien Tag zusätzliche MHK-Bestimmungen durchgeführt. Im Fall von Peressigsäure zeigte sich bereits nach dem ersten Tag der durchgeführten Stabilitätspassagen, dass die beobachteten Empfindlichkeitsverluste der Bakterien nicht stabil waren und die ursprüngliche MHK der verwendeten Testkeime gegen das verwendete Desinfektionsmittel wieder vorlag. Als Folge dessen wurde von den restlichen neun Tagen Stabilitätspassage abgesehen.

Bei den untersuchten *Enterococcus*-Isolaten, bei welchen nach den Passagen mit Peressigsäure durchweg ein Sensibilitätsverlust von einer MHK-Stufe beobachtbar war, ist dieser bereits nach einem Tag in TSB ohne Zusatz des Desinfektionsmittels Wofasteril® E400 nicht mehr beobachtbar gewesen. Eine Übersicht der MHK-Werte der *Enterococcus spp.* im Verlauf der Versuche ist in Tabelle 12 dargestellt.

**Tabelle 12: MHK der *Enterococcus spp.* im Verlauf der Passagen mit Wofasteril® E400**

	MHK vor Passagen	MHK nach Passagen mit Peressigsäure		MHK nach Passage ohne Peressigsäure	
<i>E. faecium</i>					
DSM 2918	0,10%	0,25%	0,25%	0,10%	0,10%
1	0,10%	0,25%	0,25%	0,10%	0,10%
2	0,10%	0,25%	0,25%	0,10%	0,10%
3	0,10%	0,25%	0,25%	0,10%	0,10%
4	0,10%	0,25%	0,25%	0,10%	0,10%
5	0,10%	0,25%	0,25%	0,10%	0,10%
6	0,10%	0,25%	0,25%	0,10%	0,10%
7	0,10%	0,25%	0,25%	0,10%	0,10%
8	0,10%	0,25%	0,25%	0,10%	0,10%
9	0,10%	0,25%	0,25%	0,10%	0,10%

Ein ähnliches Verhalten zeigten die Bakterien der beiden Gruppen der *E. coli* und der ESBL-bildenden *E. coli* unter dem Einfluss des peressigsäurehaltigen Desinfektionsmittels Wofasteril® E400. In den Fällen, in denen sich die MHK als Folge der Passagen mit Peressigsäure um eine Stufe erhöht hat, war diese Veränderung bereits nach einer desinfektionsmittelfreien Passage nicht mehr beobachtbar, wie auch aus Tabelle 13 und Tabelle 14 ablesbar ist.

**Tabelle 13: MHK der *E. coli* im Verlauf der Passagen mit Wofasteril® E400**

	MHK vor Passagen	MHK nach Passagen mit Peressigsäure		MHK nach Passage ohne Peressigsäure	
<i>E. coli</i>					
DSM 682	0,10%	0,25%	0,10%	0,10%	-
1	0,10%	0,25%	0,25%	0,10%	0,10%
2	0,10%	0,25%	0,25%	0,10%	0,10%
3	0,10%	0,25%	0,25%	0,10%	0,10%
4	0,10%	0,25%	0,25%	0,10%	0,10%
5	0,10%	0,10%	0,25%	-	0,10%
6	0,10%	0,10%	0,10%	-	-
7	0,10%	0,10%	0,25%	-	0,10%
8	0,10%	0,10%	0,25%	-	0,10%
9	0,10%	0,25%	0,25%	0,10%	0,10%



**Tabelle 14: MHK der ESBL-bildenden *E. coli* im Verlauf der Passagen mit Wofasteril® E400**

	MHK vor Passagen	MHK nach Passagen mit Peressigsäure		MHK nach Passage ohne Peressigsäure	
<i>E. coli</i>					
09E915	0,10%	0,10%	0,25%	-	0,10%
1	0,10%	0,25%	0,25%	0,10%	0,10%
2	0,10%	0,10%	0,25%	-	0,10%
3	0,10%	0,10%	0,10%	-	-
4	0,10%	0,10%	0,25%	-	0,10%
5	0,10%	0,10%	0,10%	-	-
6	0,10%	0,10%	0,25%	-	0,10%
7	0,10%	0,10%	0,10%	-	-
8	0,10%	0,10%	0,25%	-	0,10%
9	0,10%	0,10%	0,25%	-	0,10%

### 4.3 Toleranzinduktion gegen Glutaraldehyd

#### 4.3.1 MHK vor den Passagen

Für das verwendete glutaraldehydhaltige Desinfektionsmittel Permanent Neu<sup>®</sup> wird vom Hersteller eine Gebrauchskonzentration von 1% angegeben. Diese war ausreichend um bei allen verwendeten Keimen ein Bakterienwachstum zu unterbinden. Der für die *Enterococcus*-Gruppe als Referenzstamm mitgeführte *E. faecium* DSM 2918 zeigte dabei eine höhere Empfindlichkeit als die *Enterococcus*-Feldisolate, so dass für diesen Stamm die MHK bereits bei 0,5% des Desinfektionsmittels Permanent Neu<sup>®</sup> bzw. bei 0,1% des Wirkstoffs Glutaraldehyd lag. Die getesteten *Enterococcus*-Feldisolate erwiesen sich mit MHK-Werten von 1% Permanent Neu<sup>®</sup> als etwas toleranter gegenüber diesem Präparat. Die Wirkstoffkonzentration, welche ein Bakterienwachstum unterband, lag somit für die *Enterococcus*-Feldisolate bei 0,2% Glutaraldehyd.

Im Gegensatz dazu zeigten alle Isolate der beiden Gruppen der *E. coli* und der ESBL-bildenden *E. coli* eine einheitliche MHK von 1% Permanent Neu<sup>®</sup> bzw. 0,2% Glutaraldehyd. Diese galt sowohl für die beiden Referenzstämme als auch gleichermaßen für die Feldisolate (Tabelle 15).

**Tabelle 15: MHK der Testkeime vor den Passagen mit Permanent Neu<sup>®</sup>**

Isolat	<i>Enterococcus spp.</i>	<i>E. coli</i>	ESBL-bildende <i>E. coli</i>
Referenzstamm	0,50%	1,00%	1,00%
1	1,00%	1,00%	1,00%
2	1,00%	1,00%	1,00%
3	1,00%	1,00%	1,00%
4	1,00%	1,00%	1,00%
5	1,00%	1,00%	1,00%
6	1,00%	1,00%	1,00%
7	1,00%	1,00%	1,00%
8	1,00%	1,00%	1,00%
9	1,00%	1,00%	1,00%

#### 4.3.2 MHK nach den Passagen

Die drei verschiedenen Keimgruppen verhielten sich unter dem Einfluss von zehntägigen Passagen mit subinhibitorischen Konzentrationen des glutaraldehydhaltigen Desinfektionsmittels Permanent Neu<sup>®</sup> unterschiedlich. Sowohl die ESBL-negativen *E. coli* als auch die ESBL-bildenden *E. coli* zeigten durch den Einfluss subinhibitorischer Glutaraldehydkonzentrationen keine Veränderungen in ihren Empfindlichkeiten gegenüber dem Desinfektionsmittel (Tabelle 22 und Tabelle 23 im Anhang).

Im Gegensatz zu den *E. coli* wiesen einige Isolate der *Enterococcus*-Gruppe im Anschluss an die Passagen mit subinhibitorischen Glutaraldehydkonzentrationen eine erhöhte MHK auf. Der Referenzstamm *E. faecium* DSM 2918 zeigte im Anschluss an die Desinfektionsmittelpassagen, mit einer MHK von 1% Permanent Neu<sup>®</sup> bzw. 0,2% Glutaraldehyd, eine MHK-Erhöhung um eine Stufe und damit eine Angleichung an die MHK-Werte der unpassagierten *Enterococcus*-Feldisolat. Deren Empfindlichkeiten verringerten sich wiederum ebenfalls in acht von 18 Fällen. So war bei sieben von neun *Enterococcus*-Feldisolaten im Doppelansatz mindestens einmal ein Sensibilitätsverlust, welcher einer MHK-Erhöhung auf 2% Permanent Neu<sup>®</sup> bzw. auf 0,4% Glutaraldehyd entsprach, zu beobachten (Tabelle 16).

#### 4.3.3 MHK nach den Stabilitätspassagen ohne Glutaraldehydzusatz

Ebenso wie bei Peressigsäure war auch für das glutaraldehydhaltige Desinfektionsmittel Permanent Neu<sup>®</sup> bereits eine einmalige Stabilitätspassage ohne Desinfektionsmittelzusatz ausreichend, um die erhöhte Toleranz der Bakterien wieder auf ihr Ausgangsniveau absinken zu lassen. So sank bei den *Enterococcus*-Isolaten, welche im Anschluss an die Passagen mit Glutaraldehyd einen Sensibilitätsverlust zeigten, die MHK durchgehend bereits nach einer Passage mit glutaraldehydfreier TSB wieder auf ihren Ausgangswert ab (Tabelle 16).

**Tabelle 16: MHK der *Enterococcus spp.* im Verlauf der Passagen mit Permanent Neu<sup>®</sup>**

	MHK vor Passagen	MHK nach Passagen mit Glutaraldehyd		MHK nach Passage ohne Glutaraldehyd	
<i>E. faecium</i>					
DSM 2918	0,50%	1,00%	1,00%	0,50%	0,50%
1	1,00%	1,00%	1,00%	-	-
2	1,00%	2,00%	2,00%	1,00%	1,00%
3	1,00%	1,00%	2,00%	-	1,00%
4	1,00%	2,00%	1,00%	1,00%	-
5	1,00%	1,00%	1,00%	-	-
6	1,00%	2,00%	1,00%	1,00%	-
7	1,00%	2,00%	1,00%	1,00%	-
8	1,00%	2,00%	1,00%	1,00%	-
9	1,00%	2,00%	1,00%	1,00%	-

Da sich in den beiden Gruppen der *E. coli* deren Empfindlichkeit nach den Desinfektionsmittelpassagen mit Glutaraldehyd nicht verändert hatte, entfielen hier die Stabilitätspassagen.

## 4.4 Toleranzinduktion gegen Ameisensäure

### 4.4.1 MHK vor den Passagen

Für das Präparat Organosept Neu<sup>®</sup>, welches als ameisensäurehaltiges Desinfektionsmittel verwendet wurde, gibt der Hersteller eine Gebrauchskonzentration von 1% an. Die höchste Konzentration, welche notwendig war, um bei den eingesetzten Testkeimen ein Bakterienwachstum zu unterbinden, liegt mit 0,25% Desinfektionsmittel deutlich unterhalb dieser. Dabei waren 0,25% Desinfektionsmittellösung ausreichend, um bei beiden *E. coli*-Gruppen ein Wachstum der Bakterien zu unterbinden. Hier wiesen sowohl die ESBL-negativen als auch die ESBL-bildenden *E. coli* bei allen getesteten Stämmen eine einheitliche MHK von 0,25% Organosept Neu<sup>®</sup> auf, was einer Konzentration von 0,1375% Ameisensäure entspricht.

Innerhalb der Gruppe der Enterokokken konnte ebenfalls eine einheitliche MHK ermittelt werden. Diese lag jedoch mit 0,01% Organosept Neu<sup>®</sup> um mehr als eine Größenordnung unterhalb der MHK beider *E. coli*-Gruppen. Damit sind bereits Wirkstoffkonzentrationen von 0,0055% Ameisensäure ausreichend, um ein Keimwachstum der getesteten *Enterococcus*-Isolate zu unterbinden. Eine abweichende Sensibilität der verschiedenen Referenzkeime im Vergleich zu den Feldisolaten war innerhalb aller drei Gruppen nicht feststellbar (Tabelle 17).

**Tabelle 17: MHK der Testkeime vor den Passagen mit Organosept Neu<sup>®</sup>**

Isolat	<i>Enterococcus spp.</i>	<i>E. coli</i>	ESBL-bildende <i>E. coli</i>
Referenzstamm	0,010%	0,250%	0,250%
1	0,010%	0,250%	0,250%
2	0,010%	0,250%	0,250%
3	0,010%	0,250%	0,250%
4	0,010%	0,250%	0,250%
5	0,010%	0,250%	0,250%
6	0,010%	0,250%	0,250%
7	0,010%	0,250%	0,250%
8	0,010%	0,250%	0,250%
9	0,010%	0,250%	0,250%

### 4.4.2 MHK nach den Passagen

Ebenso wie nach den Passagen mit Glutaraldehyd verhielten sich die Bakterien der verschiedenen Gruppen nach zehntägiger Passage mit Ameisensäure unterschiedlich. So zeigten die beiden Gruppen *E. coli* und der ESBL-bildenden *E. coli* keinerlei Veränderungen ihrer Empfindlichkeiten gegenüber dem Desinfektionsmittel Organosept Neu<sup>®</sup> (siehe Tabelle 24 und Tabelle 25 im Anhang).

Im Gegensatz zu diesen waren in der *Enterococcus*-Gruppe in mehreren Fällen Sensibilitätsverluste gegenüber dem verwendeten Desinfektionsmittel zu beobachten. Bei 13 von 20 *Enterococcus*-Isolaten stieg die Toleranz gegenüber dem Ameisensäurehaltigen Desinfektionsmittel um eine MHK-Stufe an. So lag die MHK in sieben Fällen unverändert bei 0,01% des Desinfektionsmittels während sie in den restlichen 13 Fällen auf 0,05% Organosept Neu<sup>®</sup> anstieg bzw. von 0,0055% auf 0,0275% Ameisensäure (Tabelle 18). Wobei die MHK der *Enterococcus*-Stämme, bei denen ein Sensibilitätsverlust gegen Ameisensäure zu verzeichnen war, immer noch deutlich unterhalb der MHK der getesteten *E. coli* lag und somit auch deutlich unterhalb der vom Hersteller angegebenen Gebrauchskonzentration von 1% Desinfektionsmittel.

#### 4.4.3 MHK nach den Stabilitätspassagen ohne Ameisensäurezusatz

Da als Folge der Passagen mit Ameisensäure nur in der *Enterococcus*-Gruppe ein MHK-Anstieg einiger Stämme beobachtbar war, wurden auch nur mit diesen Stabilitätspassagen ohne Desinfektionsmittelzusatz durchgeführt. Wie bereits bei den anderen beiden Desinfektionsmitteln beschrieben, war auch hier bereits nach einer einmaligen Passage mit TSB ohne Zusatz von Ameisensäure die MHK der betreffenden Isolate wieder auf ihr Ausgangsniveau abgesunken (Tabelle 18).

**Tabelle 18: MHK der *Enterococcus spp.* im Verlauf der Passagen mit Organosept Neu<sup>®</sup>**

	MHK vor Passagen	MHK nach Passagen mit Ameisensäure		MHK nach Passage ohne Ameisensäure	
<i>E. faecium</i>					
DSM 2918	0,01%	0,01%	0,01%	-	-
1	0,01%	0,01%	0,05%	-	0,01%
2	0,01%	0,05%	0,05%	0,01%	0,01%
3	0,01%	0,05%	0,01%	0,01%	-
4	0,01%	0,05%	0,05%	0,01%	0,01%
5	0,01%	0,05%	0,05%	0,01%	0,01%
6	0,01%	0,05%	0,01%	0,01%	-
7	0,01%	0,05%	0,01%	0,01%	-
8	0,01%	0,05%	0,01%	0,01%	-
9	0,01%	0,05%	0,05%	0,01%	0,01%

## 4.5 Agardiffusionstest mit ausgewählten Antibiotika

Um eine mögliche Veränderung der Antibiotika-Sensibilität der verschiedenen Mikroorganismen vor und nach den Passagen mit subinhibitorischen Desinfektionsmittelkonzentrationen zu beurteilen, wurde ein Agardiffusionstest mit verschiedenen antibiotischen Wirkstoffen durchgeführt. Dabei wurde im Doppelansatz jeweils überprüft, inwieweit sich die Hemmhofdurchmesser (HHD) eines getesteten Bakterienstammes nach zehn Passagen mit subinhibitorischen Konzentrationen von Peressigsäure, Glutaraldehyd bzw. Ameisensäure gegenüber dem unpassagierten Zustand verändert. Von einer Veränderung der Empfindlichkeit eines Bakteriums gegen ein Antibiotikum wurde in Anlehnung an Braoudaki et al. (2004) bei einer Größendifferenz von mehr als 2 mm Hemmhofdurchmesser ausgegangen [78, 79].

Die Hemmhofdurchmesser der zur Qualitätssicherung eines korrekt durchgeführten Agardiffusionstest mitgeführten Referenzkeime *S. aureus* ATCC 25923 und *E. coli* ATCC 25922 mussten in den in der CLSI-Richtlinie M 100 vorgegebenen Spannen liegen (siehe Tabelle 26 und Tabelle 27 im Anhang) [141].

### 4.5.1 *Enterococcus spp.*

Von den zwölf verschiedenen Antibiotika deren Wirksamkeit gegen drei ausgewählte *Enterococcus*-Isolate mittels Agardiffusionstest ermittelt wurde, diente eines als Negativkontrolle. Zudem existieren für die beiden Antibiotika Bacitracin und Enrofloxacin bislang keine Referenzwerte für die Hemmhofdurchmessergrößen für den Agardiffusionstest für *Enterococcus spp.* Damit konnte nur für neun der zwölf getesteten Antibiotika eine Aussage zur potentiellen Wirksamkeit *in vivo* im Falle einer Antibiotika-Behandlung getroffen werden. Da nur für sechs der zwölf für Enterokokken ausgewählten Antibiotika in der CLSI-Richtlinie M100 Referenzwerte existieren, wurde für die fehlenden Referenzwerte auf die Werte der DIN-Norm 58940-3 zurückgegriffen, sofern diese dort aufgeführt sind [140, 142].

Es fiel auf, dass die drei ausgewählten *Enterococcus*-Isolate teilweise sehr unterschiedliche Empfindlichkeiten gegenüber den verschiedenen Antibiotika zeigten. Der Referenzstamm *E. faecium* DSM 2918 aus der Desinfektionsmittelprüfung war im Gegensatz zu den beiden untersuchten Feldisolaten gegen keines der neun Antibiotika, für die eine Prognose zur *in vivo*-Wirksamkeit getroffen werden konnte, resistent, wobei aber bei Erythromycin und Gentamicin eine intermediäre Empfindlichkeit ermittelt wurde. Das Feldisolat *E. faecium* (Bestand 9) zeigte dagegen eine Resistenz gegenüber Erythromycin und intermediäre Ergebnisse für Amoxicillin/Clavulansäure und Gentamicin. Dem entgegen zeigte das untersuchte Feldisolat von *E. hirae* (Bestand 2) sogar eine Resistenz gegen Erythromycin, Gentamicin und Tetrazyklin und damit gegen drei der neun vergleichbaren Antibiotika.

Im Gegensatz zu der deutlichen Heterogenität der drei verschiedenen mittels Agar-diffusionstest untersuchten *Enterococcus*-Isolate, zeigte sich innerhalb der einzelnen Isolate ein sehr homogenes Bild. Bei keinem der zwölf getesteten Antibiotika konnte nach den Passagen mit einem der drei verschiedenen Desinfektionsmittel eine Veränderung der Antibiotikaempfindlichkeit festgestellt werden. So waren im Doppelansatz keine Abweichungen von mehr als 2 mm zwischen den originären Bakterien-Stämmen und ihren jeweils zehnmal passagierten Pendanten feststellbar. In Tabelle 19 sind für die ausgewählten *Enterococcus*-Isolate die Bereiche dargestellt, in denen sich die Größen der einzelnen Hemmhofdurchmesser im Doppelansatz vor und nach den Passagen mit den drei verschiedenen Desinfektionsmitteln bewegten (detaillierte Werte in Tabelle 28, Tabelle 29 und Tabelle 30 im Anhang).

**Tabelle 19: Hemmhofdurchmesser ausgewählter *Enterococcus*-Isolate vor und nach den Passagen mit Peressigsäure, Glutaraldehyd und Ameisensäure**

Antibiotikum	HHD-Grenzen in mm			Richtlinie	ermittelte HHD in mm*		
	sensibel	intermediär	resistent		<i>E. faecium</i> DSM 2918	<i>E. hirae</i> (Bestand 2)	<i>E. faecium</i> (Bestand 9)
AMC	28	21-27	20	DIN	30-31	33-34	26-27
AMP	17	-	16	CLSI	25-27	27-28	23-24
B				Keine	16-17	21-22	11-12
C	18	13-17	12	CLSI	25-27	24-26	26-27
ENR				Keine	18	25-26	19-20
E	23	14-22	13	CLSI	20-21	6	11-12
CN	21	15-20	14	DIN	18-19	13-15	16-17
SXT	16	11-15	10	DIN	27-28	30-31	24-25
TEC	14	11-13	10	CLSI	17-18	20-21	18-19
TE	19	15-18	14	CLSI	30-31	11-12	30-32
VA	17	15-16	14	CLSI	22-23	21-22	22-23
CT	Negativkontrolle				6	6	6

\* beinhaltet alle im Doppelansatz ermittelten HHD: vor den Passagen, nach zehn Passagen mit Peressigsäure, nach zehn Passagen mit Glutaraldehyd und nach zehn Passagen mit Ameisensäure

#### 4.5.2 *E. coli*

In beiden *E. coli*-Gruppen wurde, ebenso wie bei den *Enterococcus spp.*, anhand von jeweils drei Stichproben untersucht, inwieweit die durchgeführten Desinfektionsmittelpassagen Einfluss auf ihre Empfindlichkeiten gegenüber Antibiotika haben. Wie bei den Enterokokken wurden dafür zwölf verschiedene Antibiotika ausgewählt, wovon eines als Negativkontrolle diente. Auch hier entstand die Situation, dass bislang keine Referenzwerte für *Enterobacteriaceae* für zwei Wirkstoffe (Colistin und Enrofloxacin) existieren, so dass für diese beiden Antibiotika keine Rückschlüsse auf eine mögliche Wirksamkeit *in vivo* gezogen werden können. Eine Aussage zur Wirksamkeit der antibiotischen Wirkstoffe kann somit wieder nur für neun der getesteten zwölf Antibiotika getroffen werden.

Die ESBL-negativen *E. coli*-Isolate zeigten je nach Herkunft eine sehr unterschiedliche Sensibilität gegen die getesteten Antibiotika. So zeigte der Referenzstamm *E. coli* DSM 682 aus der Desinfektionsmittelprüfung gegen keinen der getesteten Wirkstoffe eine Resistenz, wohingegen die Feldisolate gegen drei (Bestand 2) bzw. vier (Bestand 1) der neun Antibiotika Resistenzen aufwiesen. Damit waren gegen das *E. coli*-Isolat aus Bestand 1 nur 55 % der Antibiotika wirksam, wohingegen es beim Referenzstamm 100% waren.

Auf die Antibiotikasensibilität von *E. coli* hatten die Passagen mit subinhibitorischen Konzentrationen von Peressigsäure, Glutaraldehyd und Ameisensäure jedoch keinerlei Einfluss. Auch hier waren die Abweichungen bei der Größe der ermittelten Hemmhofdurchmesser vor und nach den Passagen mit den unterschiedlichen Desinfektionsmitteln genauso groß wie innerhalb eines Doppelansatzes. Damit konnte durch die subinhibitorische Gabe von Peressigsäure, Glutaraldehyd und Ameisensäure keine Toleranzerhöhung gegenüber einem der getesteten Antibiotika induziert werden. Die Hemmhofdurchmessergrößen, welche für die ausgewählten *E. coli*-Isolate im Doppelansatz vor und nach den Passagen mit den drei verschiedenen Desinfektionsmitteln erzielt wurden, sind in Tabelle 20 dargestellt (detaillierte Werte in Tabelle 31, Tabelle 32 und Tabelle 33 im Anhang).

**Tabelle 20: Hemmhofdurchmesser ausgewählter *E. coli*-Isolate vor und nach den Passagen mit Peressigsäure, Glutaraldehyd und Ameisensäure**

Antibiotikum	HHD-Grenzen in mm			Richtlinie	ermittelte HHD in mm*		
	sensibel	intermediär	resistent		<i>E. coli</i> DSM 682	<i>E. coli</i> (Bestand 1)	<i>E. coli</i> (Bestand 2)
AMP	17	14-16	13	CLSI	21-22	6	17-18
CTX	26	23-25	22	CLSI	37-38	33-34	32-33
C	18	13-17	12	CLSI	30	24-25	23-24
CIP	21	16-20	15	CLSI	38-39	36-37	34-35
CT				Keine	15	13-14	13-14
ENR				Keine	35	30-31	31
CN	15	13-14	12	CLSI	21-22	21	20-21
NA	19	14-18	13	CLSI	29-30	25-26	24-25
S	15	12-14	11	CLSI	18-19	6	10-11
SXT	16	11-15	10	CLSI	31-32	6	6
TE	15	12-14	11	CLSI	25-26	6	6
B	Negativkontrolle				6	6	6

\* beinhaltet alle im Doppelansatz ermittelten HHD: vor den Passagen, nach zehn Passagen mit Peressigsäure, nach zehn Passagen mit Glutaraldehyd und nach zehn Passagen mit Ameisensäure

#### 4.5.3 ESBL-bildende *E. coli*

Wie bei den anderen beiden untersuchten Bakteriengruppen, zeigten auch die ESBL-bildenden *E. coli* kein einheitliches Bild bezüglich ihrer Antibiotikasensibilität. Erwar-



tungsgemäß ließen Ampicillin, als Vertreter der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, und Cefotaxim, als Vertreter der Cephalosporine, bei allen drei untersuchten ESBL-positiven *E. coli* keine Wirkung erkennen. Der ESBL-bildende Referenzstamm *E. coli* 09E 915 war zudem noch gegen die Kombination Sulfamethoxazol/Trimethoprim resistent und zeigte unter Einfluss von Streptomycin ein intermediäres Testergebnis. Das Feldisolat aus Bestand 2 wies insgesamt vier Antibiotika-Resistenzen auf (zusätzlich gegen Streptomycin und Tetrazyklin) und das Isolat aus Bestand 1 zeigte sogar fünf Resistenzen (zusätzlich gegen Streptomycin, Sulfamethoxazol/Trimethoprim und Tetrazyklin).

Durch subinhibitorische Konzentrationen von Peressigsäure, Glutaraldehyd oder Ameisensäure ließ sich dieses Ergebnis jedoch nicht beeinflussen. So ist in Tabelle 21 für ausgewählte ESBL-bildende *E. coli* der Bereich, in welcher die Durchmesser der ermittelten Hemmhöfe der verschiedenen Antibiotika vor und nach den Passagen mit den Desinfektionsmitteln Wofasteril<sup>®</sup>, Permanent Neu<sup>®</sup> und Organosept Neu<sup>®</sup> lagen, dargestellt (detaillierte Werte in Tabelle 34, Tabelle 35 und Tabelle 36 im Anhang).

**Tabelle 21: Hemmhofdurchmesser ausgewählter ESBL-bildender *E. coli*-Isolate vor und nach den Passagen mit Peressigsäure, Glutaraldehyd und Ameisensäure**

Antibiotikum	HHD-Grenzen in mm			Richtlinie	ermittelte HHD in mm*		
	sensibel	intermediär	Resistent		<i>E. coli</i> 09E 915	<i>E. coli</i> (Bestand 1)	<i>E. coli</i> (Bestand 2)
AMP	17	14-16	13	CLSI	6	6	6
CTX	26	23-25	22	CLSI	19-20	12-13	11-12
C	18	13-17	12	CLSI	22-23	25-26	21-22
CIP	21	16-20	15	CLSI	32-33	32-33	32-33
CT				Keine	13	13	13
ENR				Keine	30-31	28-29	29-30
CN	15	13-14	12	CLSI	19-20	20	19-20
NA	19	14-18	13	CLSI	24-25	22-23	21-22
S	15	12-14	11	CLSI	13-14	6	7
SXT	16	11-15	10	CLSI	6	6	27-28
TE	15	12-14	11	CLSI	23-24	6	6
B	Negativkontrolle				6	6	6

\* beinhaltet alle im Doppelansatz ermittelten HHD: vor den Passagen, nach zehn Passagen mit Peressigsäure, nach zehn Passagen mit Glutaraldehyd und nach zehn Passagen mit Ameisensäure

## 5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit sollte verifizieren inwieweit der Einsatz der drei in der Tierhaltung weit verbreiteten Desinfektionswirkstoffe Peressigsäure, Ameisensäure und Glutaraldehyd von Relevanz für eine Resistenzselektion von Bakterien gegen diese oder andere antimikrobielle Wirkstoffe ist. Der Hypothese von Chapman (1998) folgend, dass der Einsatz jeder antimikrobiellen Substanz langfristig zur Resistenzentwicklung gegen diese führt, wäre in Anbetracht der enormen Mengen Desinfektionsmittel, die jährlich nicht nur in der Tierhaltung Verwendung finden, die Entstehung von Desinfektionsmittelresistenzen von höchster Signifikanz [1, 21]. Die beiden Hauptgefahren, die dabei von einer Resistenzentwicklung in der Tierhaltung ausgehen, sind einerseits eine verminderte Herdenproduktivität, infolge vermehrter klinischer und subklinischer Infektionen der Tiere, und andererseits das potentielle Erkrankungsrisiko des Menschen durch eine Übertragung resistenter Mikroorganismen beispielsweise entlang der Lebensmittelkette [3]. Es besteht nicht nur die Gefahr der Resistenzselektion durch Desinfektionsmittelrückstände in den zu desinfizierenden Stallungen, sondern auch bei ubiquitären Mikroorganismen der Umwelt. Resistenzgene in apathogenen Bakterien stellen dabei ein Reservoir für den Transfer dieser auf pathogene Mikroorganismen dar [143].

Im Screening auf ESBL-bildende *E. coli* in 25 konventionellen Schweinezucht- und -mastbetrieben wurden diese in 18 Betrieben und somit mit einer Häufigkeit von 72% gefunden. Diese hohe Prävalenz multiresistenter Bakterien zeigt, dass Resistenzen ein hoher Stellenwert in der Tierhaltung zukommt. Insbesondere bei *E. coli* sind dabei einerseits ihre fakultativ pathogene Wirkung, einhergehend mit einer starken Limitierung der therapeutischen Optionen in den Tierbeständen, und andererseits ihr Potential als Zoonoseerreger von Bedeutung.

Für die Bekämpfung multiresistenter Mikroorganismen kommt der Desinfektion eine herausragende Bedeutung zu. Dafür muss jedoch ausgeschlossen werden können, dass dieser Vorgang selbst zur Resistenzentstehung gegen Desinfektionsmittel oder im ungünstigsten Fall auch gegen dritte Substanzen, insbesondere Antibiotika, beiträgt. Eine Unterdosierung des betreffenden Desinfektionsmittels ist in Anbetracht der zahlreichen Faktoren, die den Desinfektionserfolg beeinträchtigen können (siehe Abschnitt 2.1.5), aber auch bei optimaler Durchführung als Folge eines zeitlichen und räumlichen Wirkstoffkonzentrationsgradientens, eine realistische Gefahr. Inwieweit subinhibitorische Desinfektionsmittelkonzentrationen zur Resistenzentwicklung beitragen können, sollte anhand der durchgeführten Untersuchungen ermittelt werden.

## 5.1 Resistenzentwicklung der Testkeime gegen die verschiedenen Desinfektionsmittel

Nach zehn Passagen mit subinhibitorischen Konzentrationen verschiedener Desinfektionsmittel kam es bei allen drei untersuchten Wirkstoffen (Peressigsäure, Glutaraldehyd und Ameisensäure) bei einem Teil der Testkeime zu MHK-Erhöhungen. Da es für den Desinfektionsmitteleinsatz keine limitierenden Höchstkonzentrationen wie für Antibiotika gibt, besteht die Schwierigkeit in der Differenzierung, ab wann man bei einem induzierten Sensibilitätsverlust von Mikroorganismen gegen ein Desinfektionsmittel von einer Resistenz sprechen kann [55]. Dabei gibt es viele verschiedene Ansichten, welche teilweise kontrovers sind. So wird die Aussage von Lewis (2001), welcher von einer Resistenz spricht, sobald ein Mikroorganismus die Fähigkeit erwirbt, bei erhöhten Leveln einer antimikrobiellen Substanz zu wachsen [61], von anderen Autoren kritisch betrachtet [76]. Russell (1997) ist stattdessen bei seinen Studien erst bei einer achtfach erhöhten MHK von einer Resistenzinduktion ausgegangen [144]. Alternativ haben Braoudaki et al. (2004) bei ihren Untersuchungen eine MHK-Steigerung von mindestens einer logarithmischen Stufe als signifikant angesehen [78]. Die Korrelation der Desinfektionsmittelsensibilität eines Bakterienstammes zur Empfindlichkeit der Mehrheit der Stämme derselben Spezies, ist eine weitere Möglichkeit der Abgrenzung einer Desinfektionsmittelresistenzentwicklung [29].

In der vorliegenden Arbeit ist für die Beurteilung einer möglichen Resistenz gegen Desinfektionsmittel der Definition von Gilbert et al. (2003) gefolgt worden, welche von einer solchen ausgehen, sobald der Behandlungserfolg mit dem jeweiligen Präparat nicht mehr gewährleistet ist [67]. Einschränkend ist dabei für die Beurteilung einer induzierten Desinfektionsmittelresistenz hervorzuheben, dass eine eindeutige Aussage nur im positiven Fall getroffen werden kann, wenn die ermittelte MHK die vom Hersteller angegebene Gebrauchskonzentration übersteigt. Liegt die MHK im gleichen Bereich oder unwesentlich darunter, kann nur mit großen Einschränkungen auf eine Wirksamkeit des jeweiligen Präparates geschlossen werden.

Die MHK stellt somit einen sinnvollen Ausgangspunkt für die Untersuchung von Desinfektionsmittelresistenzen dar, jedoch nicht für die Festlegung der Gebrauchskonzentration eines Desinfektionsmittels [93]. Denn im Gegensatz zum Antibiotikaeinsatz ist bei einer Desinfektion die durch die MHK induzierte Bakteriostase nicht ausreichend, da verbliebene Mikroorganismen nicht wie bei einer Antibiose durch die wirtseigene Abwehr eliminiert werden [67]. Des Weiteren ist die Zeit eine zusätzliche Dimension, welche bei der Desinfektion von Relevanz ist, da für sie oftmals nur Minuten zur Verfügung stehen, wohingegen eine Behandlung mit Antibiotika über Tage bis Wochen hinweg stattfindet [18]. Da die MHK in keine sinnvolle Korrelation zur minimalen bakteriziden Konzentration zu bringen ist und um eine schnelle Abtötung der Mikroorganismen zu gewährleisten, sollte die Gebrauchskonzentration eines Desinfektionsmittels immer deutlich oberhalb der MHK liegen [18, 70, 77].

### 5.1.1 Peressigsäure

Vor den Passagen mit Peressigsäure zeigten alle in die Versuche einbezogenen Bakterien gegenüber dem Desinfektionsmittel die gleiche Sensibilität, wobei 0,1% Wofasteril® E400 jeweils ausreichend waren, um ein Bakterienwachstum zu unterbinden. Die Annahme, dass *E. coli* als gramnegative Bakterien eine höhere Toleranz gegen das Desinfektionsmittel haben als die grampositive *Enterococcus*-Gruppe wurde dabei nicht erfüllt. Interessanterweise zeigten auch die verschiedenen Umweltisolate der einzelnen Keimgruppen ausnahmslos identische MHK-Werte.

Nachdem die verschiedenen Testkeime zehnmals einer Konzentration von 0,05% Wofasteril® E400 ausgesetzt waren, zeigte ein großer Teil eine MHK-Erhöhung auf 0,25%. Dies ließ sich in der *Enterococcus*-Gruppe in allen Fällen, in der *E. coli*-Gruppe in 15 von 20 Fällen und in der Gruppe der ESBL-bildenden *E. coli* immer noch in acht von 20 Fällen beobachten. Da die vom Hersteller empfohlene Gebrauchskonzentration bei 0,5% des Produkts liegt, ist dieser Sensibilitätsverlust von einer MHK-Stufe nach Gilbert et al. (2003) nicht als Ausbildung einer Resistenz zu beurteilen [67], ebenso wenig wie nach Braoudaki et al. (2004) oder Russell (1997) [78, 144]. Zudem ist bemerkenswert, dass bei den ESBL-bildenden *E. coli* signifikant seltener eine Toleranzinduktion gegen das Desinfektionsmittel Wofasteril® E400 zu beobachten war als bei ihren ESBL-negativen Äquivalenten ( $p \leq 0,05$ ).

Da durch die Verwendung von Reinkulturen ein horizontaler Gentransfer ausgeschlossen werden kann, müssen als Ursachen für die Toleranzentwicklung gegen das peressigsäurehaltige Desinfektionsmittel phänotypische Veränderungen oder eine Mutation im Bakteriengenom vermutet werden.

Um die Stabilität der erzeugten MHK-Erhöhrungen zu beurteilen, wurden die Bakterienstämme, welche eine Reduktion ihrer Sensibilität gegenüber dem peressigsäurehaltigen Desinfektionsmittel gezeigt haben, erneut in reiner TSB-Nährbouillon ohne Desinfektionsmittelzusatz passagiert. Es war zu beobachten, dass bereits eine einzige Passage in Abwesenheit von Peressigsäure ausreichend war, um die originären Empfindlichkeiten gegen dieses Desinfektionsmittel wieder herzustellen. Im Vergleich dazu zeigten sich in anderen Studien Resistenzen, welche bei einigen *Salmonella*-Spezies und bei *E. coli* durch eine Unterdosierung der Desinfektionsmittel Triclosan und Chlorhexidin ausgelöst wurden auch nach 30 Tagen Passage ohne das jeweilige Desinfektionsmittel noch stabil [79].

Damit liegt der Schluss nahe, dass der beobachtete Sensibilitätsverlust nicht die Folge einer dauerhaften Mutation im Genom der Bakterien ist, sondern vermutlich auf phänotypische Veränderungen, hervorgerufen durch Umweltstressoren, zurückzuführen ist. Als Stressoren bezeichnet man dabei alle Faktoren, die eine Abweichung von den idealen Wachstumsbedingungen, wie etwa eine Nährstofflimitierung oder die Anwesenheit von antimikrobiellen Agentien, darstellen [75]. Dies führt zu einer verminderten Wachstumsra-

te einhergehend mit einer Veränderung der Genexpression [28]. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass im Gegensatz zu den hoch metabolischen Bakterienzellen, mit denen die ursprüngliche MHK-Bestimmung durchgeführt wurde, durch den Einsatz subinhibitorischer Peressigsäurekonzentrationen die Wachstumsbedingungen der Bakterien verschlechtert wurden, was vermutlich die Ursache für die Reduktion ihrer Sensibilität ist.

Sowohl vor als auch nach der Passagierung mit subinhibitorischen Peressigsäurekonzentrationen ist jedoch auffällig, dass die geforderte Differenz der Gebrauchskonzentration, mit 0,5% Wofasteril<sup>®</sup> E400, zur minimalen Hemmkonzentration, mit 0,1% vor bzw. 0,25% nach den Passagen, von mindestens einer Größenordnung nicht gegeben ist [70]. Damit ist die Sicherheitsspanne für eine optimale Desinfektion mit dem Präparat Wofasteril<sup>®</sup> E400 sehr gering und es stellt sich die Frage, inwieweit möglicherweise bereits im Vorfeld eine Toleranzentwicklung der Feldisolate gegen dieses Desinfektionsmittel erfolgt ist bzw. die bei der Festlegung der Gebrauchskonzentration des Präparats eingesetzten Referenzstämme unempfindlich genug gegenüber Peressigsäure sind.

### 5.1.2 Glutaraldehyd

Die getesteten Bakterien zeigten gegenüber dem glutaraldehydhaltigen Desinfektionsmittel Permanent neu<sup>®</sup> mit einer MHK von 1% eine einheitliche Sensibilität, mit Ausnahme des *Enterococcus*-Referenzstammes *E. faecium* DSM 2918 aus der DVG-Desinfektionsmittelprüfung, dessen MHK bei 0,5% Permanent neu<sup>®</sup> und damit eine MHK-Stufe darunter lag. Somit wurde auch hier eine unerwartet niedrige intra- und interspezifische Variabilität der Desinfektionsmittelsensibilitäten beobachtet. Die Beobachtung, dass der Referenzstamm *E. faecium* DSM 2918 aus der Desinfektionsmittelprüfung die höchste Empfindlichkeit gegenüber dem Desinfektionsmittel Permanent neu<sup>®</sup> aufwies, bestätigt andere Berichte, bei denen Laborstämme eine höhere Empfindlichkeit als die Umweltisolate derselben Bakterienart zeigten [20, 75].

Bemerkenswert ist, dass die ermittelte MHK nahezu aller Isolate der vom Hersteller bzw. DVG-Liste empfohlenen Gebrauchskonzentration entsprach. Die gewünschte deutliche Differenz von mehreren Größenordnungen zwischen MHK und Gebrauchskonzentration [70] war somit nicht gegeben. Schließlich handelt es sich bei der MHK lediglich um die Konzentration, die ein Bakterienwachstum unterbindet und es ist durchaus möglich, dass eine bakterizide Wirkung des Desinfektionsmittels erst bei wesentlich höheren Konzentrationen als der MHK, welche hier der Gebrauchskonzentration entsprach, einsetzt [31].

Ursprünglich war es vorgesehen, analog zu den beiden anderen Präparaten, die Desinfektionsmittelpassagen mit Glutaraldehyd einheitlich zum Versuchsaufbau mit der letzten Konzentrationsstufe, bei der in der MHK-Bestimmung anhand der Trübung ein Bakterienwachstum beobachtet werden konnte, durchzuführen. Da jedoch nach einer Dauer von zwei bis vier Tagen kein Bakterienwachstum mehr stattgefunden hat, wurde auf die

nächstniedrigere Verdünnungsstufe der MHK-Bestimmung ausgewichen, so dass die Passagierung mit 0,25% Permanent neu<sup>®</sup> erfolgte, mit Ausnahme des *Enterococcus*-Referenzstammes, welcher mit 0,1% glutaraldehydhaltigem Desinfektionsmittel passagiert wurde. Offenbar konnten bereits subinhibitorische Glutaraldehydkonzentrationen eine nachhaltige Zellschädigung hervorrufen, was nach wenigen Tagen zur vollständigen Stagnation des Bakterienwachstums führte. Werden Bakterien subinhibitorischer Konzentrationen hemmender Agentien ausgesetzt, so kann dies entweder zu einer Toleranzentwicklung gegen diese oder, wie es im vorliegenden Fall offenbar geschehen ist, in einer Zellschädigung resultieren [75].

Trotz der Schädigung der Zellen bei Konzentrationen des Präparates Permanent neu<sup>®</sup> unmittelbar unterhalb der MHK, stieg die Toleranz in der *Enterococcus*-Gruppe als Folge der Passagierung mit geringeren Dosen des glutaraldehydhaltigen Desinfektionsmittels in 50% der Fälle an. Damit konvergierte die MHK des Referenzstammes *E. faecium* DSM 2918 nach den Passagen mit subinhibitorischen Konzentrationen glutaraldehydhaltigem Desinfektionsmittel mit 1% Permanent neu<sup>®</sup> gegen die originäre MHK der Feldisolate. In den restlichen acht Fällen, bei denen eine Erhöhung der Toleranz für Glutaraldehyd beobachtet werden konnte, wurden nach den Passagen sogar MHK-Werte von 2% ermittelt. Da die vom Hersteller vorgegebene Gebrauchskonzentration für das Produkt Permanent neu<sup>®</sup> nur mit 1% angegeben ist, und somit der Desinfektionserfolg bei einer Anwendung maßgeblich beeinträchtigt wäre, kann man laut Gilbert et al. (2003) von einer Resistenzinduktion gegen das Desinfektionsmittel Permanent neu<sup>®</sup> sprechen [67]. Dass es sich dabei lediglich um eine instabile Resistenz handelte, wurde bereits nach der ersten Rückpassage ohne Desinfektionsmittelzusatz deutlich, bei der die erhöhte MHK wieder auf ihren Ausgangswert absank.

Ebenso wie bei den Toleranzerhöhungen nach Passagen mit subinhibitorischen Peressigsäurekonzentrationen, kann für das glutaraldehydhaltige Präparat Permanent neu<sup>®</sup> daher ebenfalls postuliert werden, dass es sich lediglich um eine phänotypische Sensibilitätsveränderung der Bakterien handelt. Prinzipiell wäre auch eine Mutation als Ursache möglich, wobei auch hier das sofortige Absinken auf die originären MHK-Werte für eine phänotypische Resistenzbildung der Bakterien spricht. Die Aussage, dass bei 1% Permanent neu<sup>®</sup>, und somit bei der Gebrauchskonzentration des Desinfektionsmittels, ein Bakterienwachstum noch möglich ist, lässt sich mit Gewissheit treffen, wobei vermutlich noch eine genauere Abstufung der MHK für eine noch exaktere Beurteilung des Ausmaßes der Resistenzentwicklung möglich wäre.

Im Unterschied zu den untersuchten *Enterococcus*-Isolaten konnte in beiden Gruppen der *E. coli* keine Erhöhung der MHK und dementsprechend auch keine Desinfektionsmittelresistenz induziert werden. Identische MHK-Werte, sowohl vor als auch nach den Passagen mit subinhibitorischen Konzentrationen von Permanent neu<sup>®</sup>, legen die Vermutung

nahe, dass vorhandene Antibiotikaresistenzen auch auf die Wirksamkeit des glutaraldehydhaltigen Desinfektionsmittels gegen *E. coli* keinen Einfluss haben.

Eine unterschiedliche Desinfektionsmittelsensibilität innerhalb einer Spezies, wie sie bei *E. faecium* zwischen dem Referenzstamm DSM 2918 aus der Desinfektionsmittelprüfung und den *E. faecium*-Feldisolaten 1, 3, 7 und 9 aufgetreten ist, ist Indikator dafür, dass unterschiedliche zelluläre Targets angesprochen werden. Die geringere MHK des Referenzstammes impliziert die Wirkung von Glutaraldehyd an einem zusätzlichen empfindlicheren zellulären Target, was bei den äquivalenten Feldisolaten nicht mehr angesprochen wird. Es kann vermutet werden, dass bei den *Enterococcus*-Umweltisolaten zuvor bereits eine Toleranzentwicklung gegen das Desinfektionsmittel stattgefunden haben könnte. Dies wäre auf Grundlage einer Target-Veränderung, der Induktion von Efflux-Pumpen oder der verstärkten Bildung abbauender Enzyme wie Aldehyddehydrogenasen denkbar, was bei Umweltisolaten sowohl die Folge einer Mutation im Bakteriengenom als auch eines horizontalen Gentransfers sein könnte [21].

### 5.1.3 Ameisensäure

Die originären MHK-Werte lagen bei allen Isolaten der *Enterococcus*-Gruppe bei 0,01% Organosept neu<sup>®</sup>, wohingegen sie bei den Isolaten beider *E. coli*-Gruppen einheitlich 0,25% betragen. Damit war die Intraspeziesvariabilität der Desinfektionsmittelsensibilität der Testkeime erneut minimal. Jedoch zeigten sich unter dem Einfluss des ameisensäurehaltigen Desinfektionsmittels erstmalig die vermuteten Sensibilitätsunterschiede zwischen grampositiven und gramnegativen Bakterien. Dabei waren die getesteten *E. coli* erwartungsgemäß toleranter gegen das Desinfektionsmittel als die untersuchten Enterokokken, was wahrscheinlich eine Folge der Lipopolysaccharidschicht als zusätzliche Permeabilitätsbarriere gramnegativer Bakterien ist [30]. Die Gebrauchskonzentration nach Herstellervorgaben bzw. DVG-Richtlinie von 1% Organosept neu<sup>®</sup> liegt jedoch in beiden Fällen deutlich oberhalb dieser ermittelten Empfindlichkeiten.

Als Folge von zehntägigen Passagen mit subinhibitorischen Konzentrationen von Organosept neu<sup>®</sup> kam es innerhalb der *Enterococcus*-Gruppe in 13 von 20 Fällen zu einer Erhöhung der MHK um eine Stufe, von 0,01% auf 0,05% Desinfektionsmittel. Da auch nach Erhöhung der Toleranz gegen das ameisensäurehaltige Desinfektionsmittel die MHK-Werte mehr als eine Größenordnung unterhalb der Gebrauchskonzentration lagen, kann man zwar von einem Sensibilitätsverlust dem Desinfektionsmittel gegenüber, jedoch nicht von einer Resistenzbildung sprechen. Die Ursache hierfür könnte, wie bei den beiden anderen Desinfektionsmitteln auch, grundsätzlich eine phänotypische Veränderung der Bakterien oder eine Mutation im Bakteriengenom sein. Ebenso wie die durch die anderen beiden untersuchten Desinfektionsmittel hervorgerufenen Empfindlichkeitsverluste, wurden auch die durch Ameisensäure induzierten bereits nach einer Stabilitätspassage wieder verloren.

Somit ist auch hier die Wahrscheinlichkeit groß, dass diese aus phänotypischen Veränderungen aufgrund suboptimaler Wachstumsbedingungen resultieren.

In beiden *E. coli*-Gruppen ließen sich hingegen keine Sensibilitätsverluste durch subinhibitorische Konzentrationen Organosept neu<sup>®</sup> induzieren. Hierbei konnten, ebenso wie bei Unterdosierung der beiden anderen Desinfektionsmittel, keine Unterschiede zwischen den *E. coli*, welche multiple Antibiotikaresistenzen exprimieren und ihren empfindlicheren Pendanten, festgestellt werden. Das legt die Vermutung nahe, dass das Vorhandensein von Antibiotikaresistenzen gegen  $\beta$ -Laktamantibiotika die Wirkung der getesteten Desinfektionsmittel, zumindest bei *E. coli*, nicht negativ beeinflusst. Dies stellt die große Bedeutung der Desinfektion für die Bekämpfung (multi-)resistenter Bakterien heraus.

#### 5.1.4 Gegenüberstellung der verschiedenen Bakterienisolate und Desinfektionsmittel

Im Vergleich der drei verschiedenen untersuchten Desinfektionsmittel fiel auf, dass durch das peressigsäurehaltige Präparat Wofasteril<sup>®</sup> E400 signifikant häufiger eine Erhöhung der MHK induziert werden konnte als bei den Desinfektionsmitteln auf Glutaraldehyd- bzw. Ameisensäurebasis ( $p \leq 0,05$ ). Jedoch überstieg nur bei dem glutaraldehydhaltigem Präparat Permanent neu<sup>®</sup> die induzierte MHK-Erhöhung bei einigen Bakterien die Gebrauchskonzentration des Desinfektionsmittels, was als Resistenzbildung zu deuten ist.

Bei der Ausbildung phänotypischer Empfindlichkeitsverluste von Bakterien handelt es sich um eine veränderte Genexpression als Adaptation an Stressoren. Daraus können verschiedene physiologische Veränderungen des Bakterienphänotyps resultieren, wie eine verminderte Permeabilität, ein erhöhter Efflux oder die Expressierung abbauender Enzyme [55]. Wie auch von McDonnell et al. (1999) und von Russell (2001) beschrieben, könnten die geringen Empfindlichkeitsverluste, welche bei allen drei untersuchten Desinfektionsmitteln beobachtbar waren, auf einer Verminderung der Permeabilität der Zellmembran beruhen, so dass die schädigenden antimikrobiellen Wirkstoffe schlechter ihre Targets im Zellinneren erreichen konnten [20, 55]. Die Expressierung von Efflux-Pumpen oder abbauenden Enzymen hätte vermutlich substratabhängig stärker variierende Auswirkungen unter dem Einfluss der drei unterschiedlichen Desinfektionsmittel gehabt. Wobei es durchaus möglich ist, dass unterschiedliche Mechanismen, oder Kombinationen daraus, die Sensibilitätsverluste gegen die verschiedenen antimikrobiellen Wirkstoffe bedingen bzw. im Fall von Peressigsäure, dass uneinheitliche Mechanismen bei den verschiedenen Bakterienspezies greifen [79].

Insgesamt ließen sich bei den *Enterococcus*-Isolaten durch den Einsatz subinhibitorischer Desinfektionsmittelkonzentrationen signifikant häufiger als in den beiden *E. coli*-Gruppen Sensibilitätsverluste induzieren ( $p \leq 0,05$ ). Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass bei den verschiedenen Spezies unterschiedliche Gene bei einer phänotypi-



schen Stressadaptation exprimiert werden können, wobei diese Anpassung bei den *Enterococcus spp.* den vorliegenden Untersuchungsergebnissen nach besser erfolgen kann.

Die teilweise auftretenden Abweichungen bei der Durchführung der Versuche im Doppelansatz könnte jedoch ebenso ein Indikator sein, dass die beobachteten temporären Sensibilitätsverluste als Resultat von Mutationen aufgetreten sind. Da Mutationen zufällig erfolgen und für die Bakterien oftmals tödlich verlaufen [73], könnten beim Doppelansatz voneinander abweichende Ergebnisse auch als Indiz für erfolgte Mutationen zu deuten sein. Dagegen spricht jedoch die große Instabilität der induzierten Sensibilitätsverluste der Testbakterien, die ausnahmslos bereits nach der ersten desinfektionsmittelfreien Rückpassage nicht mehr nachweisbar waren. So können uneinheitliche Versuchsergebnisse ebenfalls darauf zurückzuführen sein, dass die induzierten Sensibilitätsverluste sehr dicht an der Nachweisgrenze des angewandten Verfahrens der MHK-Bestimmung lagen.

Abgesehen von der Ausnahme des *Enterococcus*-Referenzstammes *E. faecium* DSM 2918, welcher sich gegen das glutaraldehydhaltige Desinfektionsmittel empfindlicher zeigte als die Umweltisolate der *Enterococcus*-Gruppe, war bei den durchgeführten Versuchen stets eine sehr geringe Intraspeziesvariabilität innerhalb der Testkeimgruppen auffällig. Wie jedoch Untersuchungen von Bridier et al. (2011) zeigten, ist dies bei den verschiedenen Bakterienspezies sehr unterschiedlich, war aber insbesondere bei *Enterococcus spp.* und *Escherichia coli* auffällig. Im Gegensatz dazu zeigten z.B. unterschiedliche *S. aureus*-Isolate eine wesentlich höhere Varianz ihrer Empfindlichkeiten gegenüber Desinfektionsmitteln [69].

Hinweise für einen Zusammenhang zwischen Desinfektionsmittel- und Antibiotikaisensibilität konnten bei den mit Peressigsäure, Glutaraldehyd und Ameisensäure durchgeführten Untersuchungen nicht festgestellt werden. Die ESBL-bildenden *E. coli* verhielten sich gegenüber den drei getesteten Desinfektionsmitteln sehr ähnlich wie die *E. coli*-Isolate, welche keine ESBL-Bildner waren. Diese Beobachtung darf jedoch keinesfalls verallgemeinert werden, da bei anderen Bakterienspezies bzw. Desinfektionsmitteln Zusammenhänge gefunden wurden. So berichten Fischer et al. (2012) jüngst von einem ESBL-bildenden *E. coli*-Umweltisolat, welches u.a. carbapenemasecodierende Gene und Resistenzgene gegen quaternäre Ammoniumverbindungen auf demselben Integron trug [145].

### 5.1.5 Betrachtung der Methodik

Für Untersuchungen der Resistenzproblematik gegen Desinfektionsmittel muss immer die Abwägung getroffen werden zwischen den divergierenden Anforderungen einer gut standardisierbaren Durchführbarkeit im Labor, die den Vergleich verschiedener Einflussfaktoren zulässt, und einer möglichst hohen Praxisrelevanz. Der Schwerpunkt bei der hier durchgeführten Untersuchung lag auf der Fragestellung, inwieweit es überhaupt möglich

ist, gegen die betrachteten gängigen Desinfektionswirkstoffe aus der Tierhaltung Resistenzen zu induzieren.

Mit der hierbei verwendeten Makrodilutionsmethode wurde sich eines Suspensions-tests bedient, welcher wegen der Vorteile einer einfachen Durchführbarkeit, der hohen Reproduzierbarkeit, aber vor allem wegen der Möglichkeit eine Vielzahl an variablen Bedingungen, wie Kontaktzeit des Desinfektionsmittels, Temperatur, Art der Mikroorganismen, interferierende Substanzen etc., zu vergleichen, für diese Problematik gut geeignet ist [146]. Die in Anlehnung an die DVG-Richtlinien durchgeführte MHK-Bestimmung erlaubt dabei den unmittelbaren Vergleich der Empfindlichkeiten der verschiedenen Mikroorganismen gegen die unterschiedlichen Wirkstoffe vor und nach einer Passagierung mit subinhibitorischen Desinfektionsmittelkonzentrationen.

Problematisch dabei ist jedoch, dass das Vorliegen der Bakterien in Suspension in den meisten Fällen nicht der Realität entspricht, da die nach einer Reinigung verbleibenden Mikroorganismen im Wesentlichen an Oberflächen angeheftet sind und sich nicht durch Besprühen oder Eintauchen in Desinfektionsmittel in Suspension bringen lassen [146]. Um jedoch an Oberflächen adhäsierende Mikroorganismen abzutöten, sind oftmals signifikant höhere Desinfektionsmittelkonzentrationen notwendig [34], wobei nicht nur deswegen die Gebrauchskonzentration immer um mindestens eine Größenordnung oberhalb der MHK liegen sollte [18, 70].

Bei einer MHK-Bestimmung im Labor herrschen für die Testbakterien ideale Wachstumsbedingungen, welche konträr dazu in der Umwelt nahezu nie anzutreffen sind. Durch u.a. ideale Nährstoffversorgung und Temperatur handelte es sich bei der originären MHK-Bestimmung um hoch metabolische Zellen, welche Desinfektionsmitteln gegenüber relevant sensibler sind, als Bakterienzellen, die unter suboptimalen Umweltbedingungen gewachsen sind [28, 54]. Aber nicht nur für die Bakterien herrschen im Labor optimale Wachstumsbedingungen, sondern insbesondere die beiden stark temperaturabhängigen Wirkstoffe Ameisensäure und Glutaraldehyd können bei 37°C Inkubationstemperatur wesentlich besser wirken als in der deutlich kälteren Stallumgebung [12, 48]. Ebenso findet während der dreitägigen Inkubation bei der MHK-Bestimmung keinerlei Limitierung der Einwirkdauer der Desinfektionsmittel statt, wohingegen bei der praktischen Anwendung nur eine kurze Zeitdauer zur Verfügung steht.

Daraus resultiert, dass die Gebrauchskonzentration immer um Größenordnungen oberhalb der MHK liegen muss, um eine erfolgreiche Desinfektion gewährleisten zu können [18, 70]. Die MHK-Bestimmung stellt nur einen ersten Anhaltspunkt für das Verhalten des jeweiligen Desinfektionsmittels dar, wobei sich dabei die Auswirkungen variabler Testeinflüsse gut vergleichen lassen. Für Rückschlüsse auf eine sinnvolle Gebrauchskonzentration sind oberflächenbasierte Testverfahren, wie beispielsweise der Keimträgertest, besser geeignet [146].

Im Gegensatz dazu betont Russell (1994), dass MHK-Bestimmungen mit dem Wirkstoff Glutaraldehyd deutlich zu hohe Werte ergeben, da es zu Interaktionen von Glutaraldehyd mit Bestandteilen der Bouillon kommen kann [48]. Andererseits können auch bei der Anwendung in der Stallumgebung der Tierhaltung interferierende Substanzen die Desinfektion beeinträchtigen.

Des Weiteren sind im Versuch Bakterien-Reinkulturen verwendet worden, was definitiv nicht der Situation in der Umwelt entspricht. Mutationen bzw. eine veränderte Genexpression sind nur ein Teil der Möglichkeiten, wie eine Resistenzentwicklung bei Bakterien erfolgen kann. Die durchaus realistische Option der Aufnahme von Resistenzgenen anderer Bakterien(-spezies) wird dabei vernachlässigt.

Für die Detektierung von bakteriellen Sensibilitätsverlusten gegen Desinfektionsmittel, resultierend aus Wirkstoffunterdosierungen, ist die Methodik der MHK-Bestimmung jedoch hervorragend geeignet. Nicht zuletzt, da eine Erhöhung der MHK ein Indikator für die Veränderung von bakteriellen Targets oder der Induktion von Effluxpumpen ist, was beides zur Entstehung von Kreuzresistenzen gegen dritte Substanzen führen kann [76].

Es muss beachtet werden, dass es verhältnismäßig schwierig ist, stabile Resistenzen gegen Desinfektionsmittel bei Bakterien zu induzieren. So haben Walsh et al. (2003) beobachtet, dass sich bei der Verwendung identischer Bakterienstämme und Biozide nur mit zwei von sechs durchgeführten Methoden, stabile Resistenzen induzieren ließen [83]. Dies bedeutet, dass es durchaus möglich ist, dass die untersuchten Bakterienstämme stabile Resistenzen gegen die getesteten Desinfektionsmittel entwickeln können, aber auch, dass die Übertragbarkeit von erzielten Laborergebnissen auf die praktische Anwendung immer kritisch zu beurteilen ist.

## 5.2 Verhalten der Testkeime gegen Antibiotika

Auch wenn die Hauptursache für die Entstehung von Antibiotikaresistenzen mit Sicherheit der Einsatz von Antibiotika ist [76], so weiß man inzwischen, dass einige Desinfektionsmittel ebenfalls für Antibiotikaresistenzen selektieren bzw. co-selektieren können [5]. Die MHK-Erhöhung eines Bakteriums gegen ein bestimmtes Desinfektionsmittel führt aufgrund dessen Fähigkeit verschiedene zelluläre Targets zu attackieren in den seltensten Fällen zu dessen Unwirksamkeit. Jedoch kann bereits eine geringe MHK-Erhöhung Kennzeichen für die Veränderung eines zellulären Targets oder für die Expressierung von Efflux-Pumpen sein. Beide Mechanismen bergen das Potential für eine Resistenzinduktion gegenüber unverwandten antimikrobiellen Substanzen, wie z.B. Antibiotika [76].

Die Beurteilung des Agardiffusionstests erfolgte zunächst auf Grundlage der CLSI-Richtlinie M100-S20 [141]. Es können sich jedoch zudem, unabhängig vom potentiellen Behandlungserfolg *in vivo*, Sensibilitätsveränderungen der Bakterien gegenüber den verschiedenen Antibiotika eingestellt haben. Dadurch, dass die Größe der Hemmhofdurchmesser unmittelbar mit der Sensibilität der Bakterienisolate gegen die verschiedenen Antibiotika korreliert, können diese direkt miteinander verglichen werden. Daher wurde sich dem Vorgehen von Braoudaki et al. (2004) angeschlossen, welche eine Abweichung von mindestens 2 mm Hemmhofdurchmessergröße als Grenze für die Notwendigkeit für weitere Untersuchungen angesehen haben [78, 79]. Auch wenn eine prozentualer Gegenüberstellung der Differenzen der Hemmhofgrößendurchmesser eine bessere Vergleichbarkeit implizieren würde, so ist die Präzision des Agardiffusionstests auf 1 mm Genauigkeit beschränkt. Dies würde beispielsweise für die von Cottel et al. (2009) vorgenommene Signifikanzgrenze von 5% Hemmhofgrößendurchmesserabweichung bedeuten [147], dass erst eine Beurteilung von Hemmhöfen, welche eine Mindestgröße von 20 mm haben, möglich wäre.

Gegenüber den verschiedenen Desinfektionsmitteln zeigten die originären Testbakterien nur eine ausgesprochen niedrige Intraspeziesvariabilität ihrer Empfindlichkeiten. Bei stichprobenartiger Untersuchung ihrer Antibiotikasensibilitäten veränderte sich dies jedoch deutlich, so wiesen sowohl die Feldisolate als auch die Referenzstämme der Desinfektionsmittelprüfung ganz eigene und teilweise deutlich voneinander abweichende Resistenzmuster gegen die unterschiedlichen Antibiotika auf. Dabei war es auffällig, dass von den mittels Agardiffusionstest untersuchten Bakterienisolaten die Referenzstämme jeweils gegen eine geringere Anzahl Antibiotika Resistenzen aufwiesen als die äquivalenten Feldisolate (siehe Abschnitt 4.5).

Im Vergleich des Agardiffusionstests vor und nach den Passagen mit subinhibitorischen Desinfektionsmittelkonzentrationen zeigte jedoch kein einziger Testkeim eine Veränderung der Hemmhofdurchmessergröße von mehr als 2 mm. Da diese maximale Abweichung gleichzeitig der maximalen Größendifferenz innerhalb eines Doppelansatzes entspricht, kann man davon ausgehen, dass sich bei keinem der Bakterienisolate unter dem

Einfluss der subinhibitorischen Desinfektionsmittelkonzentrationen, trotz teilweise temporär erhöhter MHK-Werte, die Empfindlichkeit den untersuchten Antibiotika gegenüber verändert hat.

Das Ausbleiben von Kreuzresistenzen gegen die untersuchten antibiotischen Wirkstoffe kann dabei jedoch nicht für Rückschlüsse auf die Mechanismen der verringerten Desinfektionsmittelempfindlichkeiten herangezogen werden. Bakterien können Toleranzen gegen Desinfektionsmittel sowohl durch die Mutation eines zellulären Targets, die Induktion von Effluxpumpen als auch durch phänotypische Veränderungen ausbilden, wobei in allen Fällen die Möglichkeit der Bildung von Kreuzresistenzen gegeben ist. So kann auch ein durch Stress induzierter Permeabilitätsverlust der Zellmembran die Wirksamkeit verschiedener Antibiotika reduzieren [65].

### 5.3 Praktische Relevanz für Tierhaltung

Die Frage, inwieweit Unterdosierungen von Desinfektionsmitteln, wie sie durch zahlreiche Anwendungsfehler entstehen können (siehe Absatz 2.1.5), mit den in der Tierhaltung weit verbreiteten Wirkstoffen Peressigsäure, Glutaraldehyd und Ameisensäure, zu einer Entwicklung von Resistenzen gegen diese beitragen können, kann anhand dieser Untersuchungen nicht eindeutig beantwortet werden. Für Erreger der Gattungen *Enterococcus* und *Escherichia* scheint anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine Induktion hochgradiger oder stabiler Resistenzen gegen die untersuchten Präparate mit den Wirkstoffen Peressigsäure, Glutaraldehyd und Ameisensäure durch eine Unterdosierung dieser unwahrscheinlich. Alle beobachteten Sensibilitätsveränderungen der Testbakterien gegen diese Desinfektionsmittel umfassten maximal eine MHK-Stufe und waren zudem instabil. Als potentiell problematisch muss jedoch das beobachtete Überschreiten der Gebrauchskonzentration betrachtet werden. Wenn unter den optimierten Bedingungen der MHK-Bestimmung die Wirkung des glutaraldehydhaltigem Desinfektionsmittels Permanent neu<sup>®</sup> zum Teil nicht mehr gegeben ist, so ist zu vermuten, dass auch unter den wesentlich schwierigeren Voraussetzungen in der Stallumgebung der Erfolg der Desinfektion mit diesem Präparat maßgeblich beeinträchtigt ist.

Auch wenn direkte Rückschlüsse von der MHK auf die Gebrauchskonzentration nur mit großen Einschränkungen zulässig sind (siehe Abschnitt 5.1.5), so kann davon ausgegangen werden, dass der Desinfektionserfolg beeinträchtigt ist, wenn sich die MHK und die vom Hersteller angegebene Gebrauchskonzentration in derselben Größenordnung befinden [18, 70]. Das Überschreiten der Gebrauchskonzentration durch die MHK im Fall des glutaraldehydhaltigen Desinfektionsmittels Permanent neu<sup>®</sup> lässt eine ausreichende Wirkung dieses als unwahrscheinlich erscheinen. In Anbetracht der stark temperaturabhängigen Wirkung von Glutaraldehyd ist bei den niedrigen Temperaturen in der Stallumgebung noch eine signifikant schlechtere Wirksamkeit dieses Desinfektionsmittels zu erwarten [12, 48]. Aber auch die Wirksamkeit des peressigsäurehaltigem Desinfektionsmittels Wofasteril<sup>®</sup> E400 unter den Bedingungen der Tierhaltung kann angezweifelt werden, da z.B. an Oberflächen adhäsierende *E. coli* bis zu 20-mal unempfindlicher gegen Peressigsäure sind als ihre planktonischen Äquivalente [43].

Für mindestens zwei der drei untersuchten Desinfektionsmittel bedeutet das, dass die Gebrauchskonzentration für eine sichere Anwendung unter den schwierigen Bedingungen in der Tierhaltung sehr gering oder gar zu gering gewählt ist. Bereits bei kleineren Abweichungen von den optimalen Laborbedingungen, wie sie in der Stallumgebung zu erwarten sind, kann die Desinfektion nicht mehr ausreichend ihrer Funktion der Senkung des Infektionsdrucks nachkommen, was sich unmittelbar negativ auf die Herdenproduktivität auswirken kann. Auch wenn eine Resistenzentwicklung von *Enterococcus spp.* und *E. coli* den vorliegenden Untersuchungsergebnissen zufolge nicht unmittelbar zu erwarten ist, so kann dies bei anderen Mikroorganismen durchaus befürchtet werden. So gibt es etwa Be-

richte über Mykobakterien aus der Krankenhausumgebung, welche eine hochgradige Glutaraldehydresistenz erworben haben [100]. Dies ist eine Entwicklung, die sich in der Tierhaltung durchaus wiederholen könnte.

Da die Resistenzentwicklung bei Bakterien auf spezifischen statt generischen Resistenzmechanismen der unterschiedlichen Bakterienspezies beruht [79], darf aus den gewonnenen Erkenntnissen keine allgemeingültige Aussage abgeleitet werden. Anhand der durchgeführten Untersuchungen kann jedoch gesagt werden, dass von den untersuchten Desinfektionsmitteln das Ameisensäurehaltige Präparat Organosept neu® die größte Sicherheit bei der Anwendung, auch bei Abweichungen von den Idealbedingungen, bietet. Konzentrationserhöhungen von Desinfektionsmitteln sind, im Gegensatz zu einer Antibiotikaverwendung, welche durch den Wirtsorganismus strikt limitiert wird [32], grundsätzlich möglich. Jedoch sind diese untrennbar mit den Nachteilen einer steigenden toxikologischen Bedeutung, einer zunehmenden Umweltbelastung und höheren Kosten verbunden [146].

Insbesondere da es sich bei den untersuchten Desinfektionsmitteln um DVG-geprüfte Präparate handelt, welche nach den derzeit international strengsten Bedingungen getestet werden und die eine sichere Anwendung gewährleisten sollten, ist natürlich auch die Option in Betracht zu ziehen, dass eine bereits erfolgte Resistenzentwicklung für die im Verhältnis zur Gebrauchskonzentration hohen MHK-Werte der beiden Desinfektionsmittel Wofasteril® E400 und Permanent neu® verantwortlich ist. Ähnlich wie Berichte über eine hohe Prävalenz von Bakterienisolaten aus Tierhaltungen mit einer verminderten Chlorhexidinempfindlichkeit existieren [82, 84], könnte dies auch bei diesen beiden Desinfektionsmitteln der Fall sein. Die MHK-Differenz innerhalb der *Enterococcus*-Gruppe bei dem glutaraldehydhaltigen Desinfektionsmittel Permanent neu® zwischen dem Referenzstamm und den Feldisolaten könnte ein Indiz dafür sein. Wobei sich jedoch diese Beobachtung weder bei den beiden *E. coli*-Gruppen noch bei dem Desinfektionsmittel Wofasteril® E400 wiederholt hat.

Ein weiterer schlecht einschätzbarer Einflussfaktor auf den Desinfektionserfolg in der Tierhaltung sind die Auswirkungen der vorausgegangenen Reinigung. So postulieren Holah et al. (1998), dass die chemischen und mechanischen Einflüsse der Reinigung eine synergistische Wirkung auf die Desinfektion haben, welche durch eine Vorschädigung der Bakterien entsteht und eine höhere bakterielle Empfindlichkeit bedingt, im Gegensatz zu den hoch vitalen Teststämmen, welche bei Versuchen im Labor Verwendung finden [69, 146].

Die unmittelbar aufeinanderfolgende zehnmalige Exposition von Mikroorganismen an subinhibitorischen Desinfektionsmittelkonzentrationen ist unter den Bedingungen der Tierhaltung nur bei wenigen speziellen Anwendungen, wie z.B. dem Zitzendippen oder der Stiefeldesinfektion, zu befürchten. Unter anderem deshalb ist grundsätzlich die Verwen-

dung reaktiver Desinfektionsmitteln vorzuziehen, da sie im Gegensatz zu stabileren Wirkstoffen nach der Anwendung nicht so lange als Rückstände unterhalb der Gebrauchskonzentration in der Umwelt verbleiben, was das Risiko einer Resistenzinduktion senkt [34]. Von den in dieser Studie untersuchten Desinfektionsmitteln, würde das Präparat Wofasteril® E400, mit Peressigsäure als hoch reaktiven Wirkstoff, dieser Anforderung am besten entsprechen.

Auch wenn es Desinfektionsmittel gibt, für welche eine Entwicklung von Resistenzen und teilweise auch von Kreuzresistenzen gegen dritte Substanzen, wie Antibiotika, nachgewiesen werden konnte [5, 79, 81], so ist deren Bedeutung für ihre praktische Verwendung doch umstritten. Neben einer Reihe von Autoren, welche die Gefahr einer Resistenzselektion durch den Einsatz von Desinfektionsmitteln für realistisch halten [92], gibt es auch Gegenmeinungen. So haben Gilbert et al. (2002) die Hypothese aufgestellt, dass unter den Mikroorganismen neben der natürlichen Konkurrenz u.a. um Nährstoffangebot oder Platz, der Evolutionsvorteil durch den Erwerb von Desinfektionsmittelresistenzen in den Hintergrund tritt [34]. Nicht nur damit wird angezweifelt, welcher Stellenwert der Resistenzentwicklung zugemessen werden darf. Denn keinesfalls sind durch den Menschen eingesetzte antimikrobielle Substanzen alleinige Verursacher eines Selektionsdruckes, sondern auch natürlich vorkommende Substanzen wie Chili oder Senf können ebenfalls Resistenzen und sogar Kreuzresistenzen gegen Antibiotika induzieren [34]. Ebenso wurden Antibiotikaresistenzen gegen teilweise hochmoderne antibiotische Wirkstoffe bei Bakterien beobachtet, welche definitiv nie einem Antibiotikakontakt ausgesetzt waren [143, 148]. Jedoch ist zu berücksichtigen, dass gezeigt werden konnte, dass Desinfektionsmittelresistenzgene, insbesondere gegen quaternäre Ammoniumverbindungen oder Chlorhexidin, auf denselben mobilen genetischen Elementen, wie z.B. Plasmiden, lokalisiert sein können auf denen auch Resistenzgene für wichtige Antibiotikawirkstoffgruppen liegen [145]. In diesen Fällen kann der Einsatz dieser Desinfektionsmittel in der Tierhaltung oder der Lebensmittelkette zu einer Co-Selektion dieser antibiotikaresistenten Keime führen.

Der Desinfektion kommt jedoch nach wie vor eine überragende Rolle sowohl bei der Infektionsprophylaxe als auch im Seuchenfall zu [68]. Dabei ist sie auch ein wichtiges Mittel bei der Bekämpfung pathogener oder auch multiresistenter Mikroorganismen. Die immanente Gefahr durch den Einsatz von Desinfektionsmitteln Resistenzen gegen diese auszulösen, darf dabei jedoch nicht vernachlässigt werden, so dass auf eine gewissenhafte Durchführung und einen verantwortungsbewussten Umgang mit den verschiedenen Wirkstoffen der Desinfektion hingewiesen werden muss [65, 68]. Unter den schwierigen Bedingungen der Tierhaltung (siehe Abschnitt 2.1.3) kann ein unzureichender Desinfektionserfolg, neben einer fehlerhaften Durchführung der Desinfektion, grundsätzlich auch das Resultat einer Resistenzentwicklung gegen das eingesetzte Präparat sein [18].



## 6. Zusammenfassung

Im Rahmen der Infektionsprophylaxe und der Bekämpfung von Krankheitsausbrüchen werden in der Tierhaltung jährlich enorme Mengen von Desinfektionsmitteln eingesetzt. Da es nicht nur in der Humanmedizin eine wachsende Anzahl von Berichten über Desinfektionsmittelresistenzen gegen bestimmte Wirkstoffe gibt, welche zudem teilweise mit Antibiotikaresistenzen einhergehen, gilt diese Befürchtung auch für den Einsatz von Desinfektionsmitteln in der Tierhaltung. Im Fokus der durchgeführten Untersuchungen stand somit die Frage, inwieweit subinhibitorische Konzentrationen von Desinfektionsmitteln, wie sie durch zahlreiche beeinträchtigende Faktoren in der Tierhaltung entstehen können, zu einer Induktion von Resistenzen gegen diese bzw. zu einer Co-Induktion von Antibiotikaresistenzen führen können.

Um dieser Frage nachzugehen, wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK) von drei typischerweise in der Tierhaltung eingesetzten Desinfektionsmitteln (Peressigsäure, Glutaraldehyd und Ameisensäure) von *Escherichia coli* als gramnegative und *Enterococcus spp.* als grampositive, ubiquitäre Bakterien aus Nutztierhaltungen, bestimmt. Dies erfolgte im Doppelansatz nach den DVG-Richtlinien der Desinfektionsmittelprüfung sowohl bei den jeweiligen Referenzstämmen als auch bei je neun Feldisolaten aus Nutztierhaltungen jeder Gruppe. Zudem wurden ESBL-bildende und ESBL-negative *E. coli* im Vergleich untersucht, um die Auswirkungen bereits vorhandener Antibiotikaresistenzgene auf eine Desinfektionsmittelresistenz bei *E. coli* einschätzen zu können.

Nachdem alle Testkeime zehnmals subinhibitorischen Desinfektionsmittelkonzentrationen ausgesetzt wurden, wurde eine erneute MHK-Bestimmung durchgeführt um zu ermitteln, inwieweit sich diese verändert hat. Nach anschließend durchgeführten Stabilitätspassagen ohne Desinfektionsmittelzusatz wurde wieder anhand der MHK bestimmt, wie stabil die beobachteten Sensibilitätsveränderungen gegen die Desinfektionsmittel waren.

Es wurden ausschließlich temporäre Toleranzerhöhungen, welche nie mehr als eine MHK-Stufe umfassten induziert, was auf ein verhältnismäßig geringes Resistenzrisiko bei dem Einsatz der untersuchten Desinfektionsmittel hindeutet. Im Gegensatz dazu konnte jedoch ein Konvergieren bzw. sogar zeitweises Überschreiten der MHK im Vergleich zu den vorgeschriebenen Gebrauchskonzentrationen bei zwei von drei getesteten Desinfektionsmitteln beobachtet werden. Im letzteren Fall kann man von der Induktion einer instabilen Resistenz sprechen, welche bei dem glutaraldehydhaltigen Desinfektionsmittel Permanent neu<sup>®</sup> bei mehreren *Enterococcus*-Isolaten beobachtet wurde. Durch die Erhöhung der MHK unter den idealen Bedingungen im Labor kann man darauf schließen, dass es unter den schwierigeren Gegebenheiten in der Stallumgebung vermutlich ebenfalls schnell zu einer Beeinträchtigung des Desinfektionserfolgs kommen kann. Zudem ist bemerkenswert, dass in den Versuchen mit dem glutaraldehydhaltigen Präparat die *Enterococcus*-

Feldisolate eine höhere Toleranz gegen den Wirkstoff zeigten als der entsprechende *Enterococcus*-Referenzstamm aus der Desinfektionsmittelprüfung.

Das äquivalente Verhalten der ESBL-negativen und der ESBL-bildenden *E. coli* zeigt, dass zumindest das Vorhandensein dieser multiplen Resistenzen gegen  $\beta$ -Laktamantibiotika bei *E. coli* keinen Wirkungsverlust der untersuchten Desinfektionsmittel (Peressigsäure, Glutaraldehyd und Ameisensäure) erwarten lassen.

Um einen Einfluss der veränderten MHK der Desinfektionsmittel auf die Antibiotikempfindlichkeit der Bakterien zu untersuchen, wurde vor und nach den Passagen mit subinhibitorischen Desinfektionsmittelkonzentrationen mit ausgewählten Vertretern der einzelnen Testkeimgruppen zudem ein Agardiffusionstest mit jeweils zwölf verschiedenen antibiotischen Wirkstoffen durchgeführt. Dabei konnten jedoch in keinem Fall Hinweise gefunden werden, die auf eine Korrelation zwischen den beobachteten MHK-Erhöhungen der Desinfektionsmittel und einem Sensibilitätsverlust der untersuchten Antibiotika hindeutet hätten. Jedoch fiel auf, dass die Feldisolate der einzelnen Bakteriengruppen stets mehr Resistenzen gegen die untersuchten antibiotischen Wirkstoffe aufwiesen als die entsprechenden Referenzstämme.

Da die Ausbildung von Resistenzen der einzelnen Bakterienspezies wahrscheinlich auf spezifischen statt auf generischen Resistenzmechanismen basiert, kann man aus den durchgeführten Untersuchungen lediglich schließen, dass eine Induktion stabiler oder hochgradiger Resistenzen der untersuchten Keimgruppen gegen die getesteten Desinfektionsmittel Peressigsäure, Glutaraldehyd und Ameisensäure in der Stallumgebung eher unwahrscheinlich ist. Jedoch kann dies nicht völlig ausgeschlossen werden, da es möglich ist, dass sich dies bei einem anderen Versuchsaufbau anders darstellen würde.

In Anbetracht der teilweise sehr geringen Sicherheitsspannen der Präparate ist ein Versagen der Desinfektion unter den schwierigen Bedingungen in der Tierhaltung jedoch ein realistisches Szenario. Somit bleibt die Wichtigkeit eines fehlerfreien und verantwortungsbewussten Desinfektionsmitteleinsatzes hervorzuheben.

## 7. Summary

### **Induction of resistances against disinfectants and co-induction of antibiotic resistances in *Escherichia coli* and *Enterococcus spp.* from livestock husbandry**

For infection prophylaxis and to fight outbreaks of diseases animal husbandry utilizes enormous amounts of disinfectants each year. Not only humane medicine finds itself confronted with a growing number of reports about resistances against specific disinfectant agents, which additionally are partially accompanied by resistances against antibiotics. This apprehension is shared as well by disinfectant use in animal husbandry. Focus of this thesis was therefore to research to what extent subinhibitory concentrations of disinfectants, which are likely to be caused by numerous interfering factors in animal husbandry, will lead to the induction of resistances against those agents, or co-induction of resistances against antibiotics.

To research this question the minimum inhibition concentration (MIC) of three typical disinfectants used in animal husbandry (peracetic acid, glutaraldehyde and formic acid) of *Escherichia coli* as gram-negative and *Enterococcus spp.* as gram-positive ubiquitous bacteria found in livestock husbandry was determined. Duplicate measurement following DVG guidelines for disinfectant review was employed for both the corresponding reference microbial strains and the nine field isolates from livestock husbandry of each group. Additionally, for comparison, ESBL-producing and ESBL-negative *E. coli* were tested to research the influence of preexisting resistance genes against antibiotics on resistances of *E. coli* against disinfectants.

After all tested germs had been exposed ten times to subinhibitory concentrations of disinfectants a second MIC determination was conducted in order to find out how the MIC changed. After a following period of unexhibited growth the MIC was again determined in order to find out the stability of the observed change in sensibility.

Only temporary changes in levels of tolerance were observed, never amounting to more than one MIC level, which suggests a relatively low risk of inducing resistances against the researched disinfectants. Contrary to that a convergence, respectively a temporary transgression of the MIC in comparison to the concentrations ready to use for two of the three disinfectants was observed. The latter case can be labeled as an induction of an instable resistance, which was observed using the glutaraldehyde based disinfectant Permanent neu<sup>®</sup> for several *Enterococcus* isolates. By aligning the MIC to the concentrations ready to use under ideal laboratory conditions it can be deduced that under the harsh conditions of a barn environment disinfectant effectivity will presumably quickly deteriorate. Additionally, it is alarming that in the experiments using the glutaraldehyde based disin-

fectant the *Enterococcus* field isolates showed a higher tolerance against that agent than the corresponding *Enterococcus* reference strain from disinfectant review.

The equivalent behavior of ESBL-negative and ESBL-producing *E. coli* shows that at least the existence of multiresistances against  $\beta$ -lactam antibiotics in *E. coli* will not lead to reduced sensibility against disinfectants (peracetic acid, glutaraldehyde, formic acid).

To analyze the influence of the changed MIC of the disinfectants on antibiotic sensibility of the bacteria an additional agar diffusion test with twelve different antibiotic agents was made before and after each exhibition of selected test germs to subinhibitory concentrations of disinfectants. In doing so no indication of a correlation between the observed rise of the MIC of the disinfectants and a loss of sensibility against the tested antibiotics was found. Nonetheless, it was noticed that the field isolates of the different groups of bacteria always showed a higher resistance against the tested antibiotic agents than the corresponding reference strains.

Since the development of resistances of the different species of bacteria is most likely based on specific rather than generic resistance mechanisms, it can only be deduced from the conducted research that an induction of stable or highly effective resistances against the disinfectants peracetic acid, glutaraldehyde and formic acid in the researched group of test germs is unlikely in a barn environment. Such a development of a resistance can still not be completely ruled out since it is deemed possible that a different setup of the experiment might lead to a different conclusion.

In consideration of the partially rather small safety margins of the products used in this thesis a failure of disinfection under the difficult conditions in animal husbandry is a realistic danger. Therefore, the importance of a correct and responsible application of disinfectants should be especially noted.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Chapman, J.S., *Characterizing bacterial resistance to preservatives and disinfectants*. International Biodeterioration & Biodegradation, 1998. 41(3-4): p. 241-245.
2. White, D.G. and P.F. McDermott, *Biocides, drug resistance and microbial evolution*. Current Opinion in Microbiology, 2001. 4(3): p. 313-317.
3. Sander, J.E., C.L. Hofacre, I.-H. Chengm and R.D.Wyatt, *Investigation of Resistance of Bacteria from Commercial Poultry Sources to Commercial Disinfectants*. Avian Diseases, 2002. 46(4): p. 997-1000.
4. Piddock, L.J., *Does the use of antimicrobial agents in veterinary medicine and animal husbandry select antibiotic-resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial chemotherapy?* The Journal of antimicrobial chemotherapy, 1996. 38(1): p. 1-3.
5. Russell, A.D., *Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria*. Symp Ser Soc Appl Microbiol, 2002(31): p. 121S-135S.
6. Dance, D.A.B., A.D. Pearson, D.V. Seal and J.A. Lowes, *A hospital outbreak caused by a chlorhexidine and antibiotic-resistant Proteus mirabilis*. Journal of Hospital Infection, 1987. 10(1): p. 10-16.
7. Karatzas, K.A.G., M.A. Webber, F. Jorgensen, M.J. Woodward, L.J.V. Piddock and T.J. Humphrey, *Prolonged treatment of Salmonella enterica serovar Typhimurium with commercial disinfectants selects for multiple antibiotic resistance, increased efflux and reduced invasiveness*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2007. 60(5): p. 947-955.
8. Stickler, D.J., *Studies on the genetic basis of chlorhexidine resistance*. British journal of clinical practice. Supplement 1983.
9. Oethinger, M., W.V. Kern, J.D. Goldman and S.B. Levy, *Association of organic solvent tolerance and fluoroquinolone resistance in clinical isolates of Escherichia coli*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1998. 41(1): p. 111-114.
10. Band, D.E., *The use of a phenolic disinfectant in animal husbandry*. International Biodeterioration, 1990. 26(2): p. 217-223.
11. Cozad, A. and R.D. Jones, *Disinfection and the prevention of infectious disease*. Am J Infect Control, 2003. 31(4): p. 243-54.
12. Böhm, R., *Disinfection and hygiene in the veterinary field and disinfection of animal houses and transport vehicles*. International Biodeterioration & Biodegradation, 1998. 41(3): p. 217-224.
13. DVG, *Vorwort zur 4. Auflage RL 2007*
14. Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, *Verordnung über hygiene Anforderungen beim Halten von Schweinen (Schweinehaltungshygieneverordnung - SchHaltHygV)*. 2009, BGBl.
15. *Tierseuchengesetz*, Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, BMELV, Editor. 2011, BGBl.

16. Robert-Koch-Institut, *Anforderungen an die Hygiene bei der Reinigung und Desinfektion von Flächen*. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 2004. 2004 47: p. 51-61.
17. Bradley, C.R. and A.P. Fraiese, *Heat and chemical resistance of enterococci*. Journal of Hospital Infection, 1996. 34(3): p. 191-196.
18. Cerf, O., B. Carpentier, and P. Sanders, *Tests for determining in-use concentrations of antibiotics and disinfectants are based on entirely different concepts: Resistance has different meanings*. International Journal of Food Microbiology, 2010. 136(3): p. 247-254.
19. Russell, A.D., *Biocides and pharmacologically active drugs as residues and in the environment: Is there a correlation with antibiotic resistance?* American Journal of Infection Control, 2002. 30(8): p. 495-498.
20. McDonnell, G. and A.D. Russell, *Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance*. Clin Microbiol Rev, 1999. 12(1): p. 147-79.
21. SCENIHR, Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, *Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides*, E. Commission, Editor. 2009.
22. *Richtlinie 98/8/EG des europäischen Parlaments und des Rates*, Europ. Gemeinschaften, 1998.
23. Holah, J.T., *CEN/TC 216: its role in producing current and future European disinfectant testing standards*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2003. 51(4): p. 239-243.
24. DVG, *Einleitung*. 2008.
25. DVG, *Liste der nach den Richtlinien der DVG geprüften und als wirksam befundenen Desinfektionsmittel in der Tierhaltung*. April 2010.
26. Link, D.M., *Tiergesundheit und Arzneimitteleinsatz in der ökologischen Schweinehaltung*, in *Tagesseminar Bioland NRW*. 2002.
27. Denyer, S.P. and G.S.A.B. Stewart, *Mechanisms of action of disinfectants*. International Biodeterioration & Biodegradation, 1998. 41(3-4): p. 261-268.
28. Russell, A.D., *Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2003. 52(5): p. 750-763.
29. Russell, A.D., *Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems*. Journal of Hospital Infection, 1999. 43(Supplement 1): p. S57-S68.
30. Denyer, S.P., *Mechanisms of action of antibacterial biocides*. International Biodeterioration & Biodegradation, 1995. 36(3-4): p. 227-245.
31. Russell, A.D. and G. McDonnell, *Concentration: a major factor in studying biocidal action*. J Hosp Infect, 2000. 44(1): p. 1-3.
32. Gilbert, P. and A.J. McBain, *Biocide Usage in the Domestic Setting and Concern about Antibacterial and Antibiotic Resistance*. Journal of Infection, 2001. 43(1): p. 85-91.
33. Russell, A.D., J.R. Furr, and J.Y. Maillard, *Microbial susceptibility and resistance to biocides*. Am Soc Microbiol, 1997.

34. Gilbert, P., D.G. Allison, and A.J. McBain, *Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance?* Symp Ser Soc Appl Microbiol, 2002(31): p. 98S-110S.
35. Steffler, R. and M. Daute, *Probleme und Lösungsansätze der Desinfektion bei außer-gewöhnlichen Seuchengeschehen (Biologischen Lagen/B-Lagen)*. Krankenhaus-Hygiene + Infektionsverhütung, 2008. 30(5): p. 163-173.
36. De Luca, G., R.Sacchetti, F. Zanetti and E. Leoni, *Comparative study on the efficiency of peracetic acid and chlorine dioxide at low doses in the disinfection of urban wastewaters*. Ann Agric Environ Med, 2008. 15(2): p. 217-24.
37. Baldry, M.G., *The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid*. J Appl Bacteriol, 1983. 54(3): p. 417-23.
38. Steffler, R., et al., *Peressigsäure - Ein Desinfektionsmittel für den Katastrophenschutz im außergewöhnlichen Seuchenfall*. Bevölkerungsschutz, 2003(1/2003).
39. Crebelli, R., L. Conti, S. Monarca, D. Feretti, I. Zerbini, C. Zani, E. Veschetti, D. Cutilli and M. Ottaviani, *Genotoxicity of the disinfection by-products resulting from peracetic acid- or hypochlorite-disinfected sewage wastewater*. Water Research, 2005. 39(6): p. 1105-1113.
40. Koivunen, J. and H. Heinonen-Tanski, *Inactivation of enteric microorganisms with chemical disinfectants, UV irradiation and combined chemical/UV treatments*. Water Research, 2005. 39(8): p. 1519-1526.
41. Koivunen, J. and H. Heinonen-Tanski, *Peracetic acid (PAA) disinfection of primary, secondary and tertiary treated municipal wastewaters*. Water Research, 2005. 39(18): p. 4445-4453.
42. *Wofasteril E 400 Desinfektionsperessigsäure für die Ernährungs- und Landwirtschaft Konzentrat*. 2009.
43. Das, J.R., M. Bhakoo, M.V. Jones and P. Gilbert, *Changes in the biocide susceptibility of Staphylococcus epidermidis and Escherichia coli cells associated with rapid attachment to plastic surfaces*. Journal of Applied Microbiology, 1998. 84(5): p. 852-858.
44. Espigares, E., A. Bueno, M. Fernández-Crehuet and M. Espigares, *Efficacy of some neutralizers in suspension tests determining the activity of disinfectants*. Journal of Hospital Infection, 2003. 55(2): p. 137-140.
45. Willingham, E.M., J.E. Sander, S.G. Thayer and J.L. Wilson, *Investigation of Bacterial Resistance to Hatchery Disinfectants*. Avian Diseases, 1996. 40(3): p. 510-515.
46. Fraise, A.P., *Susceptibility of antibiotic-resistant cocci to biocides*. Symp Ser Soc Appl Microbiol, 2002(31): p. 158S-162S.
47. Burge, P.S., *Occupational risks of glutaraldehyde*. Bmj, 1989. 299(6695): p. 342.
48. Russell, A.D., *Glutaraldehyde: Current Status and Uses*. Infection Control and Hospital Epidemiology, 1994. 15(11): p. 724-733.
49. *Glutardialdehyd [MAK Value Documentation 2006]*, in *The MAK-Collection for Occupational Health and Safety*. 2002, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
50. Ricke, S.C., *Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials*. Poultry Science, 2003. 82(4): p. 632-639.

51. Chapman, J.S., *Biocide resistance mechanisms*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2003. 51(2): p. 133-138.
52. Taylor, D.M., J.M. Brown, K. Fernie and I. McConnell, *The effect of formic acid on BSE and scrapie infectivity in fixed and unfixed brain-tissue*. Veterinary Microbiology, 1997. 58(2-4): p. 167-174.
53. Gibson, H., J.H. Taylor, K.E. Hall and J.T. Holah, *Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms*. Journal of Applied Microbiology, 1999. 87(1): p. 41-48.
54. Berg, J.D., A. Matin, and P.V. Roberts, *Effect of antecedent growth conditions on sensitivity of Escherichia coli to chlorine dioxide*. Appl Environ Microbiol, 1982. 44(4): p. 814-819.
55. Russell, A.D., *Mechanisms of bacterial insusceptibility to biocides*. American Journal of Infection Control, 2001. 29(4): p. 259-261.
56. Russell, A.D., U. Tattawasart, J.-Y. Maillard and J.R. Furr, *Possible Link between Bacterial Resistance and Use of Antibiotics and Biocides*. Antimicrob Agents Chemother, 1998. 42(8): p. 2151-.
57. Brown, M.R., P.J. Collier, and P. Gilbert, *Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: modification of the cell envelope and batch and continuous culture studies*. Antimicrob Agents Chemother, 1990. 34(9): p. 1623-8.
58. Gilbert, P. and A.J. McBain, *Biofilms: Their impact on health and their recalcitrance toward biocides*. American Journal of Infection Control, 2001. 29(4): p. 252-255.
59. Stewart, P.S., *Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms*. International Journal of Medical Microbiology, 2002. 292(2): p. 107-113.
60. Davies, D., *Understanding biofilm resistance to antibacterial agents*. Nat Rev Drug Discov, 2003. 2(2): p. 114-122.
61. Lewis, K., *Riddle of Biofilm Resistance*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. 45(4): p. 999-1007.
62. Gilbert, P., P.J. Collier, and M.R. Brown, *Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response*. Antimicrob Agents Chemother, 1990. 34(10): p. 1865-8.
63. Ma, D., D.N. Cook, J.E. Hearst and H. Nikaido, *Efflux pumps and drug resistance in Gram-negative bacteria*. Trends in Microbiology, 1994. 2(12): p. 489-493.
64. Maira-Litrán, T., D.G. Allison, and P. Gilbert, *Expression of the multiple antibiotic resistance operon mar during growth of Escherichia coli as a biofilm*. Journal of Applied Microbiology, 2000. 88(2): p. 243-247.
65. Beumer, D.R., *Microbial resistance and biocides*. Scientific Forum on Home Hygiene, 2000.
66. Hingst, V., K.M. Klippel, and H.G. Sonntag, *Untersuchungen zur Epidemiologie mikrobieller Biozidresistenzen*. Zentralblatt für Hygiene, 1995. 197: p. 232-51.
67. Gilbert, P. and A.J. McBain, *Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance*. Clin Microbiol Rev, 2003. 16(2): p. 189-208.



68. Bloomfield, S.F., *Significance of biocide usage and antimicrobial resistance in domiciliary environments*. Journal of Applied Microbiology, 2002. 92: p. 144S-157S.
69. Bridier, A., R. Briandet, V. Thomas and F. Dubois-Brissonnet, *Comparative biocidal activity of peracetic acid, benzalkonium chloride and ortho-phthalaldehyde on 77 bacterial strains*. Journal of Hospital Infection, 2011. 78(3): p. 208-213.
70. Chapman, J.S., *Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2003. 51(4): p. 271-276.
71. Schwarz, S., C. Kehrenberg, and T.R. Walsh, *Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2001. 17(6): p. 431-437.
72. Klare, I., C. Konstabel, D. Badstübner, G. Werner and W. Witte, *Occurrence and spread of antibiotic resistances in Enterococcus faecium*. International Journal of Food Microbiology, 2003. 88(2): p. 269-290.
73. Salyers, A.A., *An overview of the genetic basis of antibiotic resistance in bacteria and its implications for agriculture*. Anim Biotechnol, 2002. 13(1): p. 1-5.
74. Tattawasart, U., J.-Y. Maillard, J.R. Furr and A.D. Russell, *Development of resistance to chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride in Pseudomonas stutzeri and changes in antibiotic susceptibility*. Journal of Hospital Infection, 1999. 42(3): p. 219-229.
75. Russell, A.D., *Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations*. The Lancet Infectious Diseases, 2003. 3(12): p. 794-803.
76. Gilbert, P., A.J. McBain, and S.F. Bloomfield, *Biocide abuse and antimicrobial resistance: being clear about the issues*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2002. 50(1): p. 137-139.
77. Russell, A.D., *Mechanisms of antimicrobial action of antiseptics and disinfectants: an increasingly important area of investigation*. J Antimicrob Chemother, 2002. 49(4): p. 597-9.
78. Braoudaki, M. and A.C. Hilton, *Low level of cross-resistance between triclosan and antibiotics in Escherichia coli K-12 and E. coli O55 compared to E. coli O157*. FEMS Microbiology Letters, 2004. 235(2): p. 305-309.
79. Braoudaki, M. and A.C. Hilton, *Adaptive resistance to biocides in Salmonella enterica and Escherichia coli O157 and cross-resistance to antimicrobial agents*. J Clin Microbiol, 2004. 42(1): p. 73-8.
80. McBain, A.J., A.H. Rickard, and P. Gilbert, *Possible implications of biocide accumulation in the environment on the prevalence of bacterial antibiotic resistance*. J Ind Microbiol Biotechnol, 2002. 29(6): p. 326-30.
81. McMurry, L.M., M. Oethinger, and S.B. Levy, *Overexpression of marA, soxS, or acrAB produces resistance to triclosan in laboratory and clinical strains of Escherichia coli*. FEMS Microbiology Letters, 1998. 166(2): p. 305-309.
82. Beier, R.C., K.M. Bischoff, R.L. Ziprin, T.L. Poole and D.J. Nisbet, *Chlorhexidine susceptibility, virulence factors, and antibiotic resistance of beta-hemolytic Esche-*

- richia coli isolated from neonatal swine with diarrhea*. Bull Environ Contam Toxicol, 2005. 75(5): p. 835-44.
83. Walsh, S.E., J.-Y. Maillard, A.D. Russell, C.E. Catrenich, D.L. Charbonneau and R.G. Bartolo, *Development of bacterial resistance to several biocides and effects on antibiotic susceptibility*. Journal of Hospital Infection, 2003. 55(2): p. 98-107.
  84. Chuanchuen, R., P. Pathanasophon, S. Khemtong, W. Wannaprasat and P. Padungtod, *Susceptibilities to Antimicrobials and Disinfectants in Salmonella Isolates Obtained from Poultry and Swine in Thailand*. The Journal of Veterinary Medical Science, 2008. 70(6): p. 595-601.
  85. Tattawasart, U., J.-Y. Maillard, J.R. Furr and A.D. Russell, *Outer membrane changes in Pseudomonas stutzeri resistant to chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2000. 16(3): p. 233-238.
  86. Morita, Y., T. Murata, T. Mima, S. Shiota, T. Kuroda, T. Mizushima, N. Gotoh, T. Nishino and T. Tsuchiya, *Induction of mexCD-oprJ operon for a multidrug efflux pump by disinfectants in wild-type Pseudomonas aeruginosa PAO1*. J Antimicrob Chemother, 2003. 51(4): p. 991-4.
  87. Poole, K., *Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria*. Clinical Microbiology and Infection, 2004. 10(1): p. 12-26.
  88. Suller, M.T.E. and A.D. Russell, *Antibiotic and biocide resistance in methicillin-resistant staphylococcus aureus and vancomycin-resistant enterococcus*. Journal of Hospital Infection, 1999. 43(4): p. 281-291.
  89. Akimitsu, N., H. Hamamoto, R. Inoue, M. Shoji, A. Akamine, K. Takemori, N. Hamasaki and K. Sekimizu, *Increase in Resistance of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus to beta -Lactams Caused by Mutations Conferring Resistance to Benzalkonium Chloride, a Disinfectant Widely Used in Hospitals*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. 43(12): p. 3042-3043.
  90. Moken, M.C., L.M. McMurry, and S.B. Levy, *Selection of multiple-antibiotic-resistant (mar) mutants of Escherichia coli by using the disinfectant pine oil: roles of the mar and acrAB loci*. Appl Environ Microbiol, 1997. 41(12): p. 2770-2772.
  91. Ledder, R.G., et al., *Effects of chronic triclosan exposure upon the antimicrobial susceptibility of 40 ex-situ environmental and human isolates*. Journal of Applied Microbiology, 2006. 100(5): p. 1132-1140.
  92. Schweizer, H.P., *Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics*. FEMS Microbiology Letters, 2001. 202(1): p. 1-7.
  93. Russell, A.D., *Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon*. J Hosp Infect, 2004. 57(2): p. 97-104.
  94. Russell, A.D., M.T. Suller, and J.Y. Maillard, *Do antiseptics and disinfectants select for antibiotic resistance?* J Med Microbiol, 1999. 48(7): p. 613-5.
  95. Leelaporn, A., T. Paulsen, J.M. Tennet, T.G. Littlejohn and R.A. Skurray, *Multidrug resistance to antiseptics and disinfectants in coagulase-negative staphylococci*. Journal of Medical Microbiology, 1994. 40(3): p. 214-220.
  96. Ferber, D., *New hunt for the roots of resistance*. Science, 1998. 280(5360): p. 27.

97. Feuerpfeil, I., J. López-Pila, E. Schneider and R. Szewzyk, *Antibiotikaresistente Bakterien und Antibiotika in der Umwelt*. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 1999. 42(1): p. 37-50.
98. Walsh, S.E., J.-Y. Maillard, A.D. Russell, C.E. Catrenich, D.L. Charbonneau and R.G. Bartolo, *Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria*. Journal of Applied Microbiology, 2003. 94(2): p. 240-247.
99. Greenberg, J.T., P. Monach, J.H. Chou, P.D. Josephy and B. Demple, *Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in Escherichia coli*. PNAS, 1990. 87(16): p. 6181-6185.
100. Griffiths, P.A., J.R. Babb, C.R. Bradley and A.P. Fraise, *Glutaraldehyde-resistant Mycobacterium chelonae from endoscope washer disinfectors*. Journal of Applied Microbiology, 1997. 82(4): p. 519-526.
101. Cole, E.C., R.M. Addison, J.R. Rubino, K.E. Leese, P.D. Dulaney, M.S. Newell, J. Wilkins, D.J. Gaber, T. Wineinger and D.A. Criger, *Investigation of antibiotic and antibacterial agent cross-resistance in target bacteria from homes of antibacterial product users and nonusers*. Journal of Applied Microbiology, 2003. 95(4): p. 664-676.
102. Randall, L.P., S.W. Cooles, A.R. Sayers and M.J. Woodward, *Association between cyclohexane resistance in Salmonella of different serovars and increased resistance to multiple antibiotics, disinfectants and dyes*. Journal of Medical Microbiology, 2001. 50(10): p. 919-924.
103. Randall, L.P., C.S. Clouting, K.O. Gradel, F.A. Clifton-Hadley, R.D. Davies and M.J. Woodward, *Farm disinfectants select for cyclohexane resistance, a marker of multiple antibiotic resistance, in Escherichia coli*. Journal of Applied Microbiology, 2005. 98(3): p. 556-563.
104. Rodgers, J.D., J.J. McCullagh, P.T. McNamee, J.A. Smyth and H.J. Ball, *An investigation into the efficacy of hatchery disinfectants against strains of Staphylococcus aureus associated with the poultry industry*. Veterinary Microbiology, 2001. 82(2): p. 131-140.
105. Bjorland, J., T. Steinum, B. Kvitle, S. Waage, M. Sunde and E. Heir, *Widespread Distribution of Disinfectant Resistance Genes among Staphylococci of Bovine and Caprine Origin in Norway*. Journal of Clinical Microbiology, 2005. 43(9): p. 4363-4368.
106. Peyrat, M.B., C. Soumet, P. Maris and P. Sanders, *Phenotypes and genotypes of campylobacter strains isolated after cleaning and disinfection in poultry slaughterhouses*. Veterinary Microbiology, 2008. 128(3): p. 313-326.
107. Whitman, W.B., *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Vol. 3. 2009: Bergey's Manual Trust.
108. Abriouel, H., N.B. Omar, A.C. Molinos, R.L. López, M.J. Grande, P. Martínez-Viedma, E. Ortega, M.M. Canamero, A. Galvez, *Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples*. International Journal of Food Microbiology, 2008. 123(1-2): p. 38-49.

109. Arthur, M. and P. Courvalin, *Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci*. Antimicrob Agents Chemother, 1993. 37(8): p. 1563-71.
110. Arthur, M., P.E. Reynolds, F. Depardieu, S. Evers, S. Dutka-Malen, R. Quintiliani and P. Courvalin, *Mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci*. Journal of Infection, 1996. 32(1): p. 11-16.
111. Bell, J.M., J.C. Paton, and J. Turnidge, *Emergence of Vancomycin-Resistant Enterococci in Australia: Phenotypic and Genotypic Characteristics of Isolates*. Journal of Clinical Microbiology, 1998. 36(8): p. 2187-2190.
112. Marcinek, H., R. Wirth, A. Muscholi-Silberhorn and M. Gauer, *Enterococcus faecalis Gene Transfer under Natural Conditions in Municipal Sewage Water Treatment Plants*. Appl Environ Microbiol, 1998. 64(2): p. 626-632.
113. Goossens, H., *Spread of Vancomycin-Resistant Enterococci: Differences between the United States and Europe*. Infection Control and Hospital Epidemiology, 1998. 19(8): p. 546-551.
114. Bonten, M.J.M., R. Willems, and R.A. Weinstein, *Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from?* The Lancet Infectious Diseases, 2001. 1(5): p. 314-325.
115. Wallrauch, C., E. Elsner, D. Milatovic, J. Cremer and I. Braveny, *Antibiotikaresistenz der Enterokokken in Deutschland*. Medizinische Klinik, 1997. 92(8): p. 464-468.
116. McDonald, L.C., M.J. Kuehnert, F.C. Tenover and W.R. Jarvis, *Vancomycin-resistant enterococci outside the health-care setting: prevalence, sources, and public health implications*. Emerg Infect Dis, 1997. 3(3): p. 311-7.
117. Beier, R.C., S.E. Duke, R.L. Ziprin, R.B. Harvey, M.E. Hume, T.L. Poole, H.M. Scott, L.D. Highfield, W.Q. Alali, K. Andrews, R.C. Anderson and D.J. Nisbet, *Antibiotic and disinfectant susceptibility profiles of vancomycin-resistant Enterococcus faecium (VRE) isolated from community wastewater in Texas*. Bull Environ Contam Toxicol, 2008. 80(3): p. 188-94.
118. Alqurashi, A.M., M.J. Day, and A.D. Russell, *Susceptibility of some strains of enterococci and streptococci to antibiotics and biocides*. J Antimicrob Chemother, 1996. 38(4): p. 745.
119. Anderson, R.L., J.H. Carr, W.W. Bond and M.S. Favero, *Susceptibility of Vancomycin-Resistant Enterococci to Environmental Disinfectants*. Infection Control and Hospital Epidemiology, 1997. 18(3): p. 195-199.
120. Rolle, M. and A. Mayr, *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, ed. Enke. Vol. 8. 2007.
121. Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry and M.A. Pfaller, *Manual of clinical microbiology*. 9 ed. A.S.f. Microbiology. 2007.
122. Aarestrup, F.M., C. Oliver Duran, and D.G. Burch, *Antimicrobial resistance in swine production*. Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases, 2008. 9(2): p. 135-48.
123. Shah, A.A., F. Hasan, S. Ahmed and A. Hameed, *Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum beta-lactamases*. Research in Microbiology, 2004. 155(6): p. 409-421.

124. Witte, W. and M. Mielke, *β-Laktamasen mit breitem Wirkungsspektrum*. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 2003. 46(10): p. 881-890.
125. Rosner, B., H. Bernard, D. Werber, M. Faber, K. Stark and G. Krause, *Epidemiologie des EHEC O104:H4/HUS-Ausbruchs in Deutschland, Mai bis Juli 2011*. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2011. 6(4): p. 473-481.
126. Blanc, V., R. Mesa, M. Saco, S. Lavilla, G. Prats, E. Miró, F. Navarro, P. Cortés, M. Llagostera, *ESBL- and plasmidic class C β-lactamase-producing E. coli strains isolated from poultry, pig and rabbit farms*. Veterinary Microbiology, 2006. 118(3&4): p. 299-304.
127. Meunier, D.I., E. Jouy, C. Lazizzera, M. Kobisch and J.-Y. Madec, *CTX-M-1- and CTX-M-15-type β-lactamases in clinical Escherichia coli isolates recovered from food-producing animals in France*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2006. 28(5): p. 402-407.
128. RESET Forschungsverbund, *Ergänzende Informationen zu vorläufigen Ergebnissen aus dem Forschungsverbund RESET*. 2012, ESBL and (fluoro-)quinolone resistance in Enterobacteriaceae.
129. Ewers, C., M. Grobbel, I. Stamm, P.A. Kopp, I. Diehl T. Semmler, A. Fruth, J. Beutlich, B. Guerra, L.H. Wieler and S. Guenther, *Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum-β-lactamase-producing Escherichia coli among companion animals*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2010. 65(4): p. 651-660.
130. Guenther, S., M. Grobbel, J. Beutlich, A. Bethe, N.D. Friedrich, A. Goedecke, A. Lübke-Becker, B. Guerra, L.H. Wieler and C. Ewers, *CTX-M-15-type extended-spectrum beta-lactamases-producing Escherichia coli from wild birds in Germany*. Environmental Microbiology Reports, 2010. 2(5): p. 641-645.
131. Literak, I., M. Doleska, T. Radimersky, J. Klimes, M. Freidman, F.M. Aarestrup, H. Hasman and A. Cizek, *Antimicrobial-resistant faecal Escherichia coli in wild mammals in central Europe: multiresistant Escherichia coli producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars*. Journal of Applied Microbiology, 2009. 108(5): p. 1702-1711.
132. Pomba, C.a., et al., *Detection of the Pandemic O25-ST131 Human Virulent Escherichia coli CTX-M-15-Producing Clone Harboring the qnrB2 and aac(6')-Ib-cr Genes in a Dog*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. 53(1): p. 327-328.
133. McMurry, L.M., M. Oethinger, and S.B. Levy, *Triclosan targets lipid synthesis*. Nature, 1998. 394(6693): p. 531-532.
134. Kümmerle, N., H.H. Feucht, and P.M. Kaulfers, *Plasmid-mediated formaldehyde resistance in Escherichia coli: characterization of resistance gene*. Antimicrob Agents Chemother, 1996. 40(10): p. 2276-9.
135. Greenberg, J.T. and B. Demple, *A global response induced in Escherichia coli by redox-cycling agents overlaps with that induced by peroxide stress*. Journal of Bacteriology, 1989. 171(7): p. 3933-3939.
136. Dukan, S. and D. Touati, *Hypochlorous acid stress in Escherichia coli: resistance, DNA damage, and comparison with hydrogen peroxide stress*. Journal of Bacteriology, 1996. 178(21): p. 6145-50.

137. DVG, *Methoden zur Bestimmung der minimal hemmenden Konzentration (MHK) von chemischen Desinfektionsmitteln und zur Auswahl geeigneter Neutralisierungsmittel*, Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, 2007.
138. Monstein, H.J., A. Östholm-Balkhed, M.V. Nilsson, M. Nilsson, K. Dornbusch and L.E. Nilsson, *Multiplex PCR amplification assay for the detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in Enterobacteriaceae*. APMIS, 2007. 115(12): p. 1400-1408.
139. CLSI, M02-A10, *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Tenth Edition*. 2009.
140. CLSI, M100-S20, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 2009.
141. CLSI, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 2010.
142. DIN 58940-3, *Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika*. 2000.
143. Bhullar, K., N. Waglechner, A. Pawlowski, K. Koteva, E.D. Banks, M.D. Johnston, H.A. Barton and G.D. Wright, *Antibiotic Resistance Is Prevalent in an Isolated Cave Microbiome*. PLoS ONE, 2012. 7(4): p. e34953.
144. Russell, A.D., *Plasmids and bacterial resistance to biocides*. Journal of Applied Microbiology, 1997. 83(2): p. 155-165.
145. Fischer, J., I. Rodríguez, S. Schmöger, A. Freise, U. Rösler, R. Helmuth and B. Guerra., *Escherichia coli producing VIM-1 carbapenemase isolated on a pig farm*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2012. 67(7): p. 1793-1795.
146. Holah, J.T., A. Lavaud, W. Peters and K.A. Dye, *Future techniques for disinfectant efficacy testing*. International Biodeterioration & Biodegradation, 1998. 41(3-4): p. 273-279.
147. Cottell, A., S.P. Denyer, G.W. Hanlon, D. Ochs, J.-Y. Maillard, *Triclosan-tolerant bacteria: changes in susceptibility to antibiotics*. Journal of Hospital Infection, 2009. 72(1): p. 71-76.
148. Dancer, S.J., P. Shears, and D.J. Platt, *Isolation and characterization of coliforms from glacial ice and water in Canada's High Arctic*. Journal of Applied Microbiology, 1997. 82(5): p. 597-609.

## 9. Anhang

**Tabelle 22: MHK der *E. coli* im Verlauf der Passagen mit Permanent Neu®**

	MHK vor Passagen	MHK nach Passagen mit Glutaraldehyd	
Referenz	1,00%	1,00%	1,00%
1	1,00%	1,00%	1,00%
2	1,00%	1,00%	1,00%
3	1,00%	1,00%	1,00%
4	1,00%	1,00%	1,00%
5	1,00%	1,00%	1,00%
6	1,00%	1,00%	1,00%
7	1,00%	1,00%	1,00%
8	1,00%	1,00%	1,00%
9	1,00%	1,00%	1,00%

**Tabelle 23: MHK der ESBL-bildenden *E. coli* im Verlauf der Passagen mit Permanent Neu®**

	MHK vor Passagen	MHK nach Passagen mit Glutaraldehyd	
Referenz	1,00%	1,00%	1,00%
1	1,00%	1,00%	1,00%
2	1,00%	1,00%	1,00%
3	1,00%	1,00%	1,00%
4	1,00%	1,00%	1,00%
5	1,00%	1,00%	1,00%
6	1,00%	1,00%	1,00%
7	1,00%	1,00%	1,00%
8	1,00%	1,00%	1,00%
9	1,00%	1,00%	1,00%

**Tabelle 24: MHK der *E. coli* im Verlauf der Passagen mit Organosept Neu®**

	MHK vor Passagen	MHK nach Passagen mit Ameisensäure	
Referenz	0,25%	0,25%	0,25%
1	0,25%	0,25%	0,25%
2	0,25%	0,25%	0,25%
3	0,25%	0,25%	0,25%
4	0,25%	0,25%	0,25%
5	0,25%	0,25%	0,25%
6	0,25%	0,25%	0,25%
7	0,25%	0,25%	0,25%
8	0,25%	0,25%	0,25%
9	0,25%	0,25%	0,25%

**Tabelle 25: MHK der ESBL-bildenden *E. coli* im Verlauf der Passagen mit Organo-sept Neu®**

	MHK vor Passagen	MHK nach Passagen mit Ameisensäure	
Referenz	0,25%	0,25%	0,25%
1	0,25%	0,25%	0,25%
2	0,25%	0,25%	0,25%
3	0,25%	0,25%	0,25%
4	0,25%	0,25%	0,25%
5	0,25%	0,25%	0,25%
6	0,25%	0,25%	0,25%
7	0,25%	0,25%	0,25%
8	0,25%	0,25%	0,25%
9	0,25%	0,25%	0,25%

**Tabelle 26: Hemmhofdurchmesser für den zur Kontrolle des Agardiffusionstests mitgeführten *S. aureus* ATCC 25923**

Antibiotikum	akzeptable Spanne HHD in mm <i>S. aureus</i> ATCC 25923	ermittelte HHD in mm <i>S. aureus</i> ATCC 25923	
AMC	28-36	36	36
AMP	27-35	35	35
B		13	14
C	19-26	26	24
ENR	27-31	30	28
E	22-30	27	25
CN	19-27	26	26
SXT	24-32	32	29
TEC		18	18
TE	24-30	30	27
VA	17-21	20	19
CT		6	6



**Tabelle 27: Hemmhofdurchmesser für den zur Kontrolle des Agardiffusionstests mitgeführten *E. coli* ATCC 25922**

Antibiotikum	akzeptable Spanne HHD in mm <i>E. coli</i> ATCC 25922	ermittelte HHD in mm in <i>E. coli</i> ATCC 25922			
AMP	16-22	16	17	16	16
CTX		34	34	32	32
C	21-27	26	27	27	26
CIP		38	37	35	35
CT		15	15	14	14
ENR	32-40	34	35	33	33
CN	19-26	22	22	20	21
NA		25	25	24	25
S		16	16	16	16
SXT	23-29	28	27	27	28
TE	18-25	25	25	24	24
B		6	6	6	6

**Tabelle 28: Hemmhofdurchmessergrößen im Doppelansatz von *E. faecium* DSM 2918 vor und nach den Passagen**

Antibiotikum	Hemmhofdurchmesser in mm			Richtlinie	Hemmhofdurchmesser in mm von <i>E. faecium</i> DSM 2918 vor und nach den Passagen mit Peressigsäure, Glutaraldehyd und Ameisensäure							
	sensibel (≥)	intermediär	resistent (≤)		unpassagierter Stamm	nach Peressigsäure		nach Glutaraldehyd		nach Ameisensäure		
AMC	28	21-27	20	DIN	30	31	31	31	31	31	30	30
AMP	17	-	16	CLSI	25	27	26	27	25	26	26	27
B				Keine	17	17	17	16	17	17	16	16
C	18	13-17	12	CLSI	26	25	26	26	27	26	26	26
ENR				Keine	18	18	18	18	18	18	18	18
E	23	14-22	13	CLSI	21	21	21	21	21	21	20	21
CN	21	15-20	14	DIN	19	19	19	18	18	18	19	19
SXT	16	11-15	10	DIN	28	27	27	27	27	27	28	28
TEC	14	11-13	10	CLSI	18	18	17	18	18	18	18	18
TE	19	15-18	14	CLSI	30	30	30	30	31	30	31	31
VA	17	15-16	14	CLSI	23	22	22	22	23	22	22	22
CT		Negativkontrolle			6	6	6	6	6	6	6	6

**Tabelle 29: Hemmhofdurchmessergrößen im Doppelansatz von *E. hirae* (Bestand 2) vor und nach den Passagen**

Antibiotikum	Hemmhofdurchmesser in mm			Richtlinie	Hemmhofdurchmesser in mm von <i>E. hirae</i> (Bestand 2) vor und nach den Passagen mit Peressigsäure, Glutaraldehyd und Ameisensäure							
	sensibel (≥)	intermediär	resistent (≤)		unpassagierter Stamm	nach Peressigsäure		nach Glutaraldehyd		nach Ameisensäure		
AMC	28	21-27	20	DIN	33	34	33	33	33	33	34	34
AMP	17	-	16	CLSI	27	28	27	28	28	28	27	28
B				Keine	21	21	22	22	21	21	21	21
C	18	13-17	12	CLSI	26	24	26	25	26	26	25	26
ENR				Keine	25	25	25	26	26	26	25	25
E	23	14-22	13	CLSI	6	6	6	6	6	6	6	6
CN	21	15-20	14	DIN	15	13	15	14	15	14	15	14
SXT	16	11-15	10	DIN	30	30	30	30	31	30	30	30
TEC	14	11-13	10	CLSI	21	21	20	21	20	20	21	20
TE	19	15-18	14	CLSI	11	12	12	12	10	11	11	12
VA	17	15-16	14	CLSI	22	21	22	21	22	22	21	22
CT		Negativkontrolle			6	6	6	6	6	6	6	6

**Tabelle 30: Hemmhofdurchmessergrößen im Doppelansatz von *E. faecium* (Bestand 9) vor und nach den Passagen**

Antibiotikum	Hemmhofdurchmesser in mm			Richtlinie	Hemmhofdurchmesser in mm von <i>E. faecium</i> (Bestand 9) vor und nach den Passagen mit Peressigsäure, Glutaraldehyd und Ameisensäure							
	sensibel (≥)	intermediär	resistent (≤)		unpassagierter Stamm	nach Peressigsäure		nach Glutaraldehyd		nach Ameisensäure		
AMC	28	21-27	20	DIN	27	27	26	27	27	27	27	27
AMP	17	-	16	CLSI	24	24	23	23	23	24	23	24
B				Keine	11	11	11	12	12	11	11	11
C	18	13-17	12	CLSI	27	26	26	26	27	27	26	26
ENR				Keine	20	19	20	20	20	20	20	20
E	23	14-22	13	CLSI	11	12	12	12	11	12	11	12
CN	21	15-20	14	DIN	16	16	16	16	17	16	16	16
SXT	16	11-15	10	DIN	24	25	25	24	24	24	25	25
TEC	14	11-13	10	CLSI	19	18	19	18	19	18	19	18
TE	19	15-18	14	CLSI	32	30	31	30	31	30	31	29
VA	17	15-16	14	CLSI	23	23	23	22	23	23	23	22
CT		Negativkontrolle			6	6	6	6	6	6	6	6

**Tabelle 31: Hemmhofdurchmessergrößen im Doppelansatz von *E. coli* DSM 682 vor und nach den Passagen**

Antibiotikum	Hemmhofdurchmesser in mm			Richtlinie	Hemmhofdurchmesser in mm von <i>E. coli</i> DSM 682 vor und nach den Passagen mit Peressigsäure, Glutaraldehyd und Ameisensäure							
	sensibel (≥)	intermediär	resistent (≤)		unpassagierter Stamm	nach Peressigsäure		nach Glutaraldehyd		nach Ameisensäure		
AMP	17	14-16	13	CLSI	21	21	22	22	22	21	22	22
CTX	26	23-25	22	CLSI	37	38	38	37	37	37	37	37
C	18	13-17	12	CLSI	30	30	30	30	30	30	30	30
CIP	21	16-20	15	CLSI	39	38	39	39	38	38	38	38
CT				Keine	15	15	15	15	15	15	15	15
ENR				Keine	35	35	35	35	35	35	35	35
CN	15	13-14	12	CLSI	21	21	22	21	22	22	21	22
NA	19	14-18	13	CLSI	29	29	30	30	29	29	29	29
S	15	12-14	11	CLSI	18	18	19	19	18	18	18	19
SXT	16	11-15	10	CLSI	31	31	31	32	32	31	31	31
TE	15	12-14	11	CLSI	25	25	25	26	26	25	26	26
B		Negativkontrolle			6	6	6	6	6	6	6	6

**Tabelle 32: Hemmhofdurchmessergrößen im Doppelansatz von *E. coli* aus Bestand 1 vor und nach den Passagen**

Antibiotikum	Hemmhofdurchmesser in mm			Richtlinie	Hemmhofdurchmesser in mm <i>E. coli</i> (Bestand 1) vor und nach den Passagen mit Peressigsäure, Glutaraldehyd und Ameisensäure							
	sensibel (≥)	intermediär	resistent (≤)		unpassagierter Stamm	nach Peressigsäure		nach Glutaraldehyd		nach Ameisensäure		
AMP	17	14-16	13	CLSI	6	6	6	6	6	6	6	6
CTX	26	23-25	22	CLSI	33	33	34	34	33	33	33	33
C	18	13-17	12	CLSI	24	24	24	24	25	25	25	24
CIP	21	16-20	15	CLSI	36	37	37	36	37	37	37	37
CT				Keine	13	14	14	14	14	14	13	13
ENR				Keine	30	30	31	30	31	31	30	31
CN	15	13-14	12	CLSI	21	21	21	21	21	21	21	21
NA	19	14-18	13	CLSI	25	25	26	26	26	25	25	25
S	15	12-14	11	CLSI	6	6	6	6	6	6	6	6
SXT	16	11-15	10	CLSI	6	6	6	6	6	6	6	6
TE	15	12-14	11	CLSI	6	6	6	6	6	6	6	6
B		Negativkontrolle			6	6	6	6	6	6	6	6

**Tabelle 33: Hemmhofdurchmessergrößen im Doppelansatz von *E. coli* aus Bestand 2 vor und nach den Passagen**

Antibiotikum	Hemmhofdurchmesser in mm			Richtlinie	Hemmhofdurchmesser in mm <i>E. coli</i> (Bestand 2) vor und nach den Passagen mit Peressigsäure, Glutaraldehyd und Ameisensäure							
	sensibel (≥)	intermediär	resistent (≤)		unpassagierter Stamm	nach Peressigsäure		nach Glutaraldehyd		nach Ameisensäure		
AMP	17	14-16	13	CLSI	18	18	17	18	17	17	17	17
CTX	26	23-25	22	CLSI	33	33	32	32	32	32	32	33
C	18	13-17	12	CLSI	24	24	24	24	23	24	23	23
CIP	21	16-20	15	CLSI	35	34	35	35	35	35	35	34
CT				Keine	13	13	13	14	14	14	14	14
ENR				Keine	31	31	31	31	31	31	31	31
CN	15	13-14	12	CLSI	21	20	21	21	21	21	21	20
NA	19	14-18	13	CLSI	25	25	25	24	25	25	24	25
S	15	12-14	11	CLSI	10	10	11	10	11	11	10	10
SXT	16	11-15	10	CLSI	6	6	6	6	6	6	6	6
TE	15	12-14	11	CLSI	6	6	6	6	6	6	6	6
B		Negativkontrolle			6	6	6	6	6	6	6	6

**Tabelle 34: Hemmhofdurchmessergrößen im Doppelansatz des ESBL-bildenden *E. coli* 09E915 vor und nach den Passagen**

Antibiotikum	Hemmhofdurchmesser in mm			Richtlinie	Hemmhofdurchmesser in mm ESBL-bildender <i>E. coli</i> 09E915 vor und nach den Passagen mit Peressigsäure, Glutaraldehyd und Ameisensäure							
	sensibel (≥)	intermediär	resistent (≤)		unpassasierter Stamm	nach Peressigsäure		nach Glutaraldehyd		nach Ameisensäure		
AMP	17	14-16	13	CLSI	6	6	6	6	6	6	6	6
CTX	26	23-25	22	CLSI	20	19	19	20	20	20	20	20
C	18	13-17	12	CLSI	23	22	23	23	23	22	23	23
CIP	21	16-20	15	CLSI	32	32	32	33	32	32	33	33
CT				Keine	13	13	13	13	13	13	13	13
ENR				Keine	31	30	30	31	30	31	31	31
CN	15	13-14	12	CLSI	19	20	20	19	19	19	20	19
NA	19	14-18	13	CLSI	25	24	24	25	25	24	25	25
S	15	12-14	11	CLSI	14	14	14	14	14	14	13	14
SXT	16	11-15	10	CLSI	6	6	6	6	6	6	6	6
TE	15	12-14	11	CLSI	24	24	24	24	24	24	23	24
B		Negativkontrolle			6	6	6	6	6	6	6	6



**Tabelle 35: Hemmhofdurchmessergrößen im Doppelansatz des ESBL-bildenden *E. coli* aus Bestand 1 vor und nach den Passagen**

Antibiotikum	Hemmhofdurchmesser in mm			Richtlinie	Hemmhofdurchmesser in mm ESBL-bildender <i>E. coli</i> Bestand 1 vor und nach den Passagen mit Peressigsäure, Glutaraldehyd und Ameisensäure							
	sensibel (≥)	intermediär	resistent (≤)		unpassagierter Stamm	nach Peressigsäure		nach Glutaraldehyd		nach Ameisensäure		
AMP	17	14-16	13	CLSI	6	6	6	6	6	6	6	6
CTX	26	23-25	22	CLSI	13	13	12	13	12	13	12	12
C	18	13-17	12	CLSI	25	26	25	25	25	25	25	25
CIP	21	16-20	15	CLSI	32	32	33	33	32	32	33	33
CT				Keine	13	13	13	13	13	13	13	13
ENR				Keine	29	29	28	29	28	29	29	29
CN	15	13-14	12	CLSI	20	20	20	20	20	20	20	20
NA	19	14-18	13	CLSI	23	22	22	22	22	22	22	23
S	15	12-14	11	CLSI	6	6	6	6	6	6	6	6
SXT	16	11-15	10	CLSI	6	6	6	6	6	6	6	6
TE	15	12-14	11	CLSI	6	6	6	6	6	6	6	6
B		Negativkontrolle			6	6	6	6	6	6	6	6

**Tabelle 36: Hemmhofdurchmessergrößen im Doppelansatz des ESBL-bildenden *E. coli* aus Bestand 2 vor und nach den Passagen**

Antibiotikum	Hemmhofdurchmesser in mm			Richtlinie	Hemmhofdurchmesser in mm ESBL-bildender <i>E. coli</i> Bestand 2 vor und nach den Passagen mit Peressigsäure, Glutaraldehyd und Ameisensäure							
	sensibel (≥)	intermediär	resistent (≤)		unpassagierter Stamm	nach Peressigsäure		nach Glutaraldehyd		nach Ameisensäure		
AMP	17	14-16	13	CLSI	6	6	6	6	6	6	6	6
CTX	26	23-25	22	CLSI	12	11	11	11	11	12	11	11
C	18	13-17	12	CLSI	21	22	22	22	22	22	22	22
CIP	21	16-20	15	CLSI	32	32	32	32	33	33	32	32
CT				Keine	13	13	13	13	13	13	13	13
ENR				Keine	29	30	30	30	30	30	30	30
CN	15	13-14	12	CLSI	19	20	20	20	19	19	20	19
NA	19	14-18	13	CLSI	22	21	22	22	22	22	21	21
S	15	12-14	11	CLSI	7	7	7	7	7	7	7	7
SXT	16	11-15	10	CLSI	27	28	27	27	27	28	27	27
TE	15	12-14	11	CLSI	6	6	6	6	6	6	6	6
B		Negativkontrolle			6	6	6	6	6	6	6	6

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich während der Zeit meiner Promotion begleitet und unterstützt haben.

Allen voran danke ich Herrn Professor Dr. Rösler für die Bereitstellung und die wissenschaftliche Betreuung des Themas und für das Bewusstsein, dass auch Doktoranden von irgendetwas leben müssen.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Tier- und Umwelthygiene möchte ich für die stets angenehme Arbeitsatmosphäre und das gute Miteinander danken.

Dabei gebührt besonderer Dank Dr. Anika Friese für kontinuierliche Hilfe und Unterstützung bei jeder Art von Problemen, für aufbauende Worte und liebevolles Antreiben.

Für ein stets angenehmes Arbeiten im Labor danke ich Karin Fiedler, Heike Jansen, Susan Sellenthin und Maja Thieck. Ebenso wie für die kontinuierliche Unterstützung bei der Bewältigung aller falsch ausgefüllter Formulare und Anträge danke ich Marlene Senthin.

Allen Mitdoktoranden danke ich ganz herzlich für das überaus gute Miteinander, gemeinsames Tupfer-Schwingen auf langen Ausfahrten und einfach eine schöne Zeit. Laura, Britta, Jenny, Henriette, Nils, Christina und Alexandra, ich wünsche euch alles Gute für die Zukunft!

Da Arbeit nur das halbe Leben ist, möchte ich auch für Unterstützung bei allen möglichen und unmöglichen Problemen meiner Familie und Freunden danken. Besonderer Dank gilt dabei für die souveräne Lösung größerer Katastrophen und die Unterstützung Christian Zimmermann und Nicolas Noffke.

## **Eigenständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Lütjenburg, den 01.12.2012