

Aus dem
Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Untersuchungen zur wirksamen Desinfektion von bedeutenden gegen Antibiotika
multiresistenten Erregern (MRE) in der Human- und Veterinärmedizin**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Anne Theresa Köhler
aus Dresden

Leipzig, 2020

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp

Betreuer: Prof. Dr. Uwe Truyen

Gutachter: Prof. Dr. Uwe Truyen, Institut für Tierhygiene und Öffentliches
Veterinärwesen, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Uwe Rösler, Institut für Tier- und Umwelthygiene, Freie Universität
Berlin

Tag der Verteidigung: 5. November 2019

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Literatur.....	3
2.1	Desinfektion.....	3
2.1.1	Allgemeines	3
2.2	Wirksamkeitsprüfung chemischer Desinfektionsmittel	3
2.2.1	Allgemeines	3
2.2.2	VAH-Richtlinie.....	4
2.2.3	Minimale Hemmkonzentration	5
2.2.4	Qualitativer Suspensionstest.....	6
2.2.5	Quantitativer Suspensionstest	6
2.2.6	Quantitativer Keimträgertest	6
2.3	Bakterielle Resistenzen gegenüber Antibiotika.....	7
2.3.1	Allgemeines	7
2.3.2	Nosokomiale Infektionen	10
2.3.3	<i>Acinetobacter</i> spp.....	11
2.3.4	<i>Klebsiella</i> spp.....	12
2.3.5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
2.4	Bakterielle Resistenzen gegenüber Bioziden.....	13
2.4.1	Allgemeines	13
3	Veröffentlichungen	16
3.1	Veröffentlichung 1	16
	Efficacy of sodium hypochlorite against multidrug-resistant Gram-negative bacteria.....	16
3.2	Veröffentlichung 2	42
	Evaluation of disinfectant-efficacy against multidrug-resistant bacteria: A comprehensive analysis of different methods	42
4	Diskussion.....	70
5	Zusammenfassung.....	76
6	Summary	78
7	Referenzen	80

Inhaltsverzeichnis

7.1	Literaturverzeichnis	80
7.2	Tabellenverzeichnis	89
8	Danksagung	90

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
≅	entspricht
AB	Antibiotikum
<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
Anon.	Anonym
<i>A. nosocomialis</i>	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>
<i>A. pittii</i>	<i>Acinetobacter pittii</i>
BAC	Benzalkoniumchlorid
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CEN	Europäisches Komitee für Normung (Comité Européen de Normalisation)
CEN/TC 216	Europäisches Komitee für Normung, Technisches Komitee 216: chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika
d. h.	das heißt
DIN	Deutsches Institut für Normung
DM	Desinfektionsmittel
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e. V.
EARS-Net	European Antimicrobial Resistance Surveillance Network
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EN	Europäische Norm
ESBL	Extended-Spectrum-Beta-Lactamase
ETH	Ethanol
et al.	und andere
e. V.	eingetragener Verein
g	Gramm
h	Stunde(n)
IfSG	Infektionsschutzgesetz
<i>K. oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase

Abkürzungsverzeichnis

KRINKO	Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention
log ₁₀	dekadischer Logarithmus
LPS	Lipopolysaccharide
MHK	Minimale Hemmkonzentration
min	Minute(n)
MRGN	Multiresistente Gram-Negative Erreger
MRE	(gegen Antibiotika) multiresistente Erreger
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
n. a.	nicht angegeben
n. a. w.	nicht anwendbar
NDM	Neu-Dehli-Metallo-Beta-Laktamase
NH	Natriumhypochlorit
NI	nosokomiale Infektion
NRZ	nationales Referenzzentrum
o. g.	oben genannte(n)
OXA	Oxacillinase
<i>P</i>	P-Wert (Signifikanzwert)
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PES	Peressigsäure
pH	Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung
<i>qac</i>	quaternary ammonium compounds
Prof.	Professor
R	resistent
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
S	sensibel
spp.	mehrere Spezies/Arten
u. a.	unter anderem
VAH	Verbund für Angewandte Hygiene e.V.
VIM	Verona-Integron-Metallo-Beta-Laktamase
VR	Vancomycin-Resistenz
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Die Entdeckung des Penicillins im Jahr 1928 durch Alexander Fleming ermöglichte über Jahrzehnte eine zuverlässige Bekämpfung lebensbedrohlicher bakterieller Infektionskrankheiten (DE LA BEDOYERE 2005). Resistenzen gegenüber antimikrobiellen Substanzen wurden bereits im 20. Jahrhundert als natürliche Entwicklung in Form von Mutation und Adaption beschrieben (JAWETZ et al. 1963). Durch den übermäßigen Antibiotikagebrauch in der medizinischen Behandlung von Mensch und Tier und dem daraus resultierenden Selektionsdruck hat sich die Verbreitung von Resistenzen drastisch zugespitzt (ANON. 2017). Die Behandlungsmöglichkeiten für Infektionen mit gegen Antibiotika (AB) multiresistenten Bakterien wie beispielsweise Extended-Spectrum-Beta-Lactamase (ESBL)-bildenden *Klebsiella* Spezies oder Carbapenem-resistenten *Pseudomonas (P.) aeruginosa* werden immer limitierter. Dies kann zu Komplikationen während oder infolge von Krankenhausaufenthalten sowie einem Anstieg der Mortalitätsrate führen (RKI 2013). Surveillance-Studien zu nosokomialen Infektionen (NI) ergaben, dass häufig AB-resistente Mikroorganismen die Ursache darstellen. NI mit *Acinetobacter* spp., *P. aeruginosa* und *Klebsiella* spp. sind europaweit auf dem Vormarsch (ECDC 2018). Insbesondere 3- und 4-fach Multiresistente Gram-Negative (MRGN) stellen eine Herausforderung für das Gesundheitssystem dar (ANON. 2012, RKI 2016). Zudem stagniert die Erforschung neuer AB-Klassen u. a. aus wirtschaftlichen Gründen und es werden folglich weniger neue Therapeutika zugelassen (ANON. 2018). Vor diesem Hintergrund spielt die Infektionsprävention in Form von Umweltdekontamination eine zentrale Rolle. Da viele Keime in der Lage sind auf unbelebten Oberflächen monatelang zu überleben, stellt dieses Reservoir eine stetige Infektionsquelle dar (KRAMER et al. 2006). Infektionsprävention kann durch Hygienemaßnahmen wie effektive Reinigung und Desinfektion erreicht werden. Ziel der Desinfektion ist es, die Menge pathogener Mikroorganismen auf patientennahen Oberflächen so zu reduzieren, dass die Infektionskette unterbrochen wird (SINGBEIL-GRISCHKAT 2008). Die mikrobizide Wirkung eines Desinfektionsmittels (DM) ist abhängig von der Konzentration des Mittels, der Einwirkzeit, der Temperatur und dem pH-Wert. Den Desinfektionserfolg beeinträchtigen können Tenside und Eiweiße, aber auch das Vorliegen von bakteriellen Biofilmen oder bakteriellen Resistenzmechanismen. Standardisierte Wirksamkeitsprüfungen nach Richtlinien der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e. V. (DVG) bzw. dem Verbund für Angewandte Hygiene e. V. (VAH) für chemische DM erlauben eine Einschätzung der Effizienz der aktiven Substanzen in der Praxis. Einsatzgebiete sowie Konzentrations-Zeit-Relationen für qualitätsgeprüfte DM werden in entsprechenden Listen veröffentlicht (ANON. 2018). Als Prüforganismen werden standardisierte Bakterienstämme verwendet. Berichte über DM-Resistenzen und Ko-Resistenzen gegenüber AB und Bioziden wurden veröffentlicht (CHAPMAN 2003, CHUANHUEN et al. 2001, JOYNSON et al. 2002). Es stellte sich die Frage,

Einleitung

ob multiresistente Erreger (MRE) prinzipiell auch DM-resistent sind und ob für MRE spezifische Konzentrations-Zeit-Relationen bei der Desinfektion anzuwenden sind.

Im Rahmen meiner Dissertation wurden vier aktive Substanzen, die in gängigen chemischen DM-Formulierungen enthalten sind, auf ihre Effektivität gegenüber multiresistenten Isolaten von *A. baumannii*, *A. pittii*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae* und *P. aeruginosa* im Vergleich zu Referenzstämmen getestet. Diese Testsubstanzen umfassten Ethanol (ETH), Peressigsäure (PES), Benzalkoniumchlorid (BAC) und Natriumhypochlorit (NH). Die Wirksamkeit wurde gemäß den Richtlinien des VAH in einer vierphasigen DM-Testung überprüft (ANON. 2015c). Zuerst wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK) und somit die bakteriostatische Wirksamkeit der DM bestimmt. Zudem wurde ein geeignetes Neutralisationsmittel für jede aktive Substanz determiniert. Fortführend wurden der qualitative sowie der quantitative Suspensionstest durchgeführt, um die bakterizide Wirksamkeit zu bestimmen. Abgeschlossen wurden die Untersuchungen mit der Bestimmung bakterizider Konzentrationen im Keimträgertest, welcher praxisnahe Bedingungen auf einer nicht-porösen Oberfläche simuliert. Die Testung zielte auf die Determinierung wirksamer Konzentrations-Zeit-Relationen für jeden Teststamm und jede aktive Substanz ab. Zudem wurde der Einfluss von organischer Belastung auf die Effizienz der DM untersucht.

2 Literatur

2.1 Desinfektion

2.1.1 Allgemeines

Unter Desinfektion versteht man die gezielte Reduktion eines definierten Anteils unerwünschter Mikroorganismen auf Flächen, Gegenständen oder der Haut durch chemische, physikalische oder biologische Inaktivierung. Innerhalb der Infektionsprophylaxe ermöglicht sie die Unterbrechung von Infektionsketten und verhindert eine Transmission von Mikroorganismen (MCDONNELL und RUSSELL 1999). Abzugrenzen ist der Begriff der Sterilisation, der eine vollständige Abtötung von Erregern beschreibt (SINGBEIL-GRISCHKAT 2008). Einer wirksamen Desinfektion geht eine gründliche Reinigung voraus, deren Zweck es ist, Verunreinigungen zu entfernen. Für die Desinfektion stehen Verfahren physikalischer, chemischer und biologischer Natur zur Verfügung. Für die DM-Testung als Zielstellung dieser Dissertation sind chemische Flächen-DM von Belang. Deren Wirksamkeit ist abhängig vom Wirkspektrum des DM, der Virulenz der abzutötenden Mikroorganismen, dem Verschmutzungsgrad der zu desinfizierenden Flächen sowie von äußeren Bedingungen wie Temperatur, Wasserhärte und pH-Wert. Die Formulierung und synergistische Effekte bei kommerziellen DM beeinflussen den Desinfektionsgrad zusätzlich. Ideale DM erfüllen folgende Voraussetzungen: breites Wirkspektrum, Stabilität der Gebrauchslösung, Unschädlichkeit für Mensch, Tier und Umwelt, Materialverträglichkeit, geringe Kosten und hohe Ergiebigkeit (STRAUCH und BÖHM 2002). DM finden heutzutage routinemäßige Anwendung in Krankenhäusern u. a. Gesundheitseinrichtungen, in der Lebensmittelbranche, der Tierhaltung und Veterinärmedizin, aber auch in der breiten Öffentlichkeit. Eine große Bandbreite an Bioziden steht zur Desinfektion, Antisepsis und Konservierung zur Verfügung. Die Wirkung von DM kann bakteriostatisch (wachstumshemmend) oder bakterizid (abtötend) sein und bezieht sich auf nicht lebende Objekte bzw. Oberflächen. Antiseptika inaktivieren Mikroorganismen auf lebendigen Geweben wie z. B. Händen, während Konservierungsmittel verhindern die bakterielle Vermehrung z. B. in Kosmetika. Im Vergleich zu AB erzielen Biozide ein breiteres Wirkspektrum (MCDONNELL und RUSSELL 1999).

2.2 Wirksamkeitsprüfung chemischer Desinfektionsmittel

2.2.1 Allgemeines

Standardisierte und praxisorientierte DM-Prüfungen haben den Zweck, die Wirksamkeit von Bioziden festzustellen und daraus abgeleitet Anwendungsempfehlungen auszusprechen. Es werden Menge, Art, Konzentration und Einwirkzeit gegenüber Testorganismen determiniert. Werden die Anforderungen für ein spezifisches Anwendungsgebiet erfüllt, gilt die Effizienz als bestätigt.

Auf europäischer Ebene werden Standardprüfverfahren für DM durch die Normierungsinstitution Comité Européen de Normalisation (CEN) verabschiedet. Durch die Arbeitsgruppe des CEN/TC 216 werden einheitliche Normen erarbeitet, welche eine phasenweise Wirksamkeitsprüfung bestehend aus Suspensionsversuchen *in vitro* und praxisnahen Versuchen vorsehen (HOLAH 2003). Daraus können auf nationaler Ebene harmonisierte Normen in Arbeitsausschüssen erarbeitet werden (DIN-EN).

Gemäß CEN beginnt Phase 1 der DM-Testung mit dem qualitativen Suspensionstest. Dieser stellt einen Basistest dar, welcher allgemein bestätigt, dass ein Produkt eine bakterizide Wirkung hat, ohne dabei auf den späteren Einsatzbereich einzugehen. In Phase 2 werden DM für den jeweiligen Einsatzbereich geprüft. Somit ist eine Aussage über die praktische Dienlichkeit möglich. Diese Phase wird in zwei Stufen unterteilt. In Phase 2/Stufe 1 werden der quantitative Suspensionstest unter Einwirkung organischer Belastung durchgeführt und die bakterizide Konzentration bei unterschiedlichen Einwirkzeiten ermittelt. Diese Standardmethode entspricht der europäischen Norm EN 13727 (ANON. 2015b). Sie simuliert praktische Bedingungen durch den Einfluss von Proteinen und weist eine Inaktivierung von Bakterien in Suspensionen nach. Phase 2/Stufe 2 sieht den quantitativen Keimträgerstest vor, welcher Rückschlüsse auf die Praxistauglichkeit eines DM zulässt (EN 13697, ANON. 2015a). Auf einer Oberfläche angetrocknete Mikroorganismen werden für eine definierte Expositionszeit unter Einfluss organischen Materials mit DM überschichtet. Phase 3 beinhaltet Feldversuche für verschiedene Anwendungsbereiche, die sich an die *in vitro*-Tests anschließen (GEBEL und CARTER 2016, HOLAH 2003).

2.2.2 VAH-Richtlinie

Der VAH ist ein Fachgremium, welches sich mit Hygienefragen und Infektionsprävention beschäftigt. Die Desinfektionsmittelkommission des VAH veröffentlicht Verfahren zur Validierung der Eignung von DM sowie für deren Zertifizierung. In den „Anforderungen und Methoden zur VAH-Zertifizierung chemischer Desinfektionsverfahren“ werden Standardverfahren zur Hände-, Haut-, Flächen-, Instrumenten- und Wäschedesinfektion definiert (ANON. 2015c). Die Prüfmethode enthält Anweisungen für die Stammhaltung der Testorganismen, Herstellung der Medien und DM-Lösungen sowie die Versuchsanordnungen. Die Referenzstämme für die Prüfung sind vorgegeben. Die VAH-Methoden stellen im Vergleich zu europäischen Vorgaben gleichwertige bzw. höhere Ansprüche an den Wirksamkeitsnachweis (ANON. 2016). Für die Zertifizierung von Bioziden für den Anwendungsbereich Oberflächendesinfektion sind die MHK-Bestimmung im Reihenverdünnungstest sowie der qualitative Suspensionstest optional durchzuführen, währenddessen es sich beim quantitativen Suspensionstest und dem quantitativen Keimträgerstest um obligate Tests handelt (ANON. 2015c). Die Prüfverfahren (Phase 2/Stufe 1 und 2) ergeben Gebrauchskonzentrationen und entsprechende Einwirkzeiten. In der VAH-

Liste veröffentlicht werden aktuell geprüfte Mittel mit den Wirkspektren Bakterizidie, Tuberkulozidie, Mykobakterizidie, Levurozidie, Fungizidie, begrenzte Viruzidie, Viruzidie, begrenzte Viruszidie PLUS. Zwei Gutachten inklusive Prüfberichte zweier unabhängiger, akkreditierter Laboratorien werden von der VAH-Kommission geprüft und bei hinreichender Wirksamkeit erfolgen die Ausstellung eines VAH-Zertifikates und die Listung des Produktes für drei Jahre (ANON. 2018). Die jährlich aktualisierte VAH-Liste gilt als Standard für die Auswahl von DM für die medizinische und nicht-medizinische Routinedesinfektion. Werden Produkte aus der VAH-Liste den Empfehlungen entsprechend ausgewählt und adäquat angewandt, gilt eine bakterizide Wirkung einschließlich gegenüber MRE gesichert (ANON. 2018). Bei gehäuftem Auftreten bestimmter MRE sollten Untersuchungen mit diesen Isolaten als Testorganismen durchgeführt werden, um sicher zu stellen, dass die gelisteten Konzentrations-Zeit-Relationen auch hier wirksam sind. CHOJECKA et al. (2015) haben vorgeschlagen, die Effizienz aktiver Substanzen generell unter Zuhilfenahme AB-resistenter Standardstämme zu beurteilen.

2.2.3 Minimale Hemmkonzentration

Unter der MHK versteht man die niedrigste antimikrobielle Konzentration, die *in vitro* die bakterielle Vermehrung verhindert. Diese sogenannte Bakteriostase ist durch Reversibilität gekennzeichnet, d. h. ein Wachstum ist nach Entfernung des antimikrobiellen Wirkstoffes möglich (STRAUCH und BÖHM 2002, SUERBAUM et al. 2016). Die MHK-Bestimmung wird standardmäßig in der AB-Resistenztestung durchgeführt, aber sie findet auch orientierend Anwendung in der DM-Testung. Vorteilhaft sind die einfache Durchführung und die Möglichkeit der parallelen Testung mehrerer DM und Mikroorganismen (LANGSRUD et al. 2003).

Die MHK ist gemäß VAH die niedrigste Konzentration eines DM, welche nach einer Inkubationszeit von 48 h bei 37°C das sichtbare Bakterienwachstum so unterdrückt, dass keine Trübung der Testsuspension entsteht (VAH Methode 7, ANON. 2015c). Im sogenannten Reihenverdünnungstest können Konzentrationen ermittelt werden, die die Ausbildung von Resistenzen vermeiden. Den Testorganismen wird Zeit eingeräumt, sich während der Inkubationszeit an die Anwesenheit des DM anzupassen. Dadurch lässt sich eine Listung unterhalb des MHK-Wertes vermeiden. Nährstoffreiche Testbedingungen in der Bouillon bedingen jedoch eine Einschränkung der Effektivität des zu testenden DM, sodass Bakterien vielfach höhere Konzentrationen überleben (MEYER und COOKSON 2010). Die Bestimmung der MHK eignet sich daher als Screening-Methode und nicht als Grundlage für die Auswahl von Anwendungskonzentrationen (KLEIN 2008, RUSSELL 2003). Die Bestimmung bakterizider DM-Konzentrationen ist notwendig, um Gebrauchskonzentrationen für die Praxis ableiten zu können. Dabei handelt es sich um solche Konzentrationen, die eine irreversible Abtötung der

Bakterien nach sich ziehen (STRAUCH und BÖHM 2002, SUERBAUM et al. 2016). Diese liegen oftmals deutlich unterhalb des MHK-Niveaus.

Neben der Bestimmung der MHK stellt die Ermittlung eines geeigneten Neutralisationsmittels für das jeweilige DM einen weiteren Vorversuch einer Wirksamkeitsprüfung dar (STRAUCH und BÖHM 2002). Der Zweck eines Neutralisationsmittels besteht in der Inaktivierung des DM nach Ablauf einer definierten Einwirkzeit. Die Nichttoxizität sowie Effektivität des Neutralisationsmittels müssen nachgewiesen werden (ANON. 2015c).

2.2.4 Qualitativer Suspensionstest

VAH Methode 8 (\cong Phase 1) beinhaltet die Exposition von Bakteriensuspensionen gegenüber DM-Lösungen, um Aussagen über die mikrobiziden Eigenschaften des DM treffen zu können. Als bakterizide Konzentration wird diejenige Konzentration bei einer definierten Expositionszeit gewertet, bei der nach Neutralisation und 48 h Inkubationszeit in einem Nährmedium bei 37°C kein Bakterienwachstum sichtbar ist. Dieser Test wird orientierend durchgeführt, kann aber gegebenenfalls arbeitserleichternd für die Bestimmung der wirksamen Konzentrationen im Rahmen der obligaten Prüfungen sein (ANON. 2015c).

2.2.5 Quantitativer Suspensionstest

VAH Methode 9 (\cong Phase 2/Stufe 1) erlaubt den Vergleich von Bioziden untereinander und den Einfluss von Verschmutzung auf die Inaktivierungskinetik. Das DM wird im Verdünnungs-Neutralisationsverfahren mit und ohne organische Belastung (bovines Serumalbumin - BSA) auf seine Wirksamkeit gegenüber den Bakterienstämmen untersucht. Zur Quantifizierung der überlebenden Testkeime wird das Oberflächenspatelverfahren angewendet. Ein DM hat dann nachweislich eine bakterizide Wirkung, wenn bei einer definierten Konzentrations-Zeit-Relation eine Reduktion der Ausgangskoloniezahl um fünf \log_{10} -Stufen erfolgt (\cong 99,999 % Reduktion, ANON. 2015c).

In DM-Lösungen suspendierte Keime stellen Idealverhältnisse dar, wie sie in der Praxis nicht vorliegen. Das Verhältnis zwischen DM und dem zu desinfizierenden Objekt stimmt nicht mit den Anwendungsgegebenheiten überein und somit ist die Relevanz für die Beurteilung des Desinfektionserfolges eingeschränkt (STRAUCH und BÖHM 2002). Allgemein lassen die Ergebnisse der *in vitro*-Tests allein nicht auf die Effizienz in der Praxis schließen. Sie liefern jedoch Informationen, welche Konzentrations-Zeit-Relationen in den praxisnahen Tests getestet werden sollten (ANON. 2015c).

2.2.6 Quantitativer Keimträgerstest

Tests zur Simulation einer praxisnahen Prüfsituation (\cong Phase 2/Stufe 2) werden in der VAH Methode 14.1 beschrieben. Die Methode Flächendesinfektion ohne Mechanik simuliert die

Sprühdesinfektion. Nicht-poröse Oberflächen (z. B. Metallplättchen) werden mit Erregern kontaminiert und anschließend für unterschiedliche Einwirkzeiten mit DM überschichtet. Das Biozid hat unter organischer Belastung eine Reduktionsleistung von fünf \log_{10} -Stufen zu erbringen (ANON. 2015c). Die Versuche lassen eine bessere Beurteilung der Wirksamkeit zu, da sie deutlicher die Anwendungsart des DM berücksichtigen. Beruhend auf diesen Tests können Anwendungskonzentrationen empfohlen werden.

2.3 Bakterielle Resistenzen gegenüber Antibiotika

2.3.1 Allgemeines

Der Begriff antimikrobielle Resistenz beschreibt eine bakterielle Unempfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Mitteln. Es handelt sich um eine stressbedingte Antwort auf für Bakterien ungünstige Umweltbedingungen (SCHWARZ et al. 2013).

Resistenzen können intrinsischer oder erworbener Natur sein. Intrinsische Resistenz wird bedingt durch den natürlichen Aufbau der Zelle und kommt bei Sporenbildnern, Mykobakterien und gramnegativen Bakterien vor. Die aus Phospholipiden und Lipopolysacchariden bestehende äußere Membran gramnegativer Bakterien ist verantwortlich für die verringerte Aufnahme antimikrobieller Substanzen. Aber auch Effluxsysteme und Biofilmbildung vermindern oder verhindern eine Akkumulation toxischer Stoffe innerhalb der Zelle (MCDONNELL und RUSSELL 1999, RUSSELL 2001).

Erworbene Resistenzen können durch Mutationen oder die Übertragung von Resistenzgenen (Plasmide, Transposons) entstehen (ANON. 2012, RUSSELL 2001). Die erworbene Resistenz muss vom Phänomen der Adaption unterschieden werden, welche nur den Phänotyp betrifft und nicht an Folgegenerationen weitergegeben wird bzw. erlischt sobald der Selektionsdruck verschwindet (MEYER und COOKSON 2010).

Zu den Resistenzmechanismen zählen gemäß MUNITA und ARIAS (2016) Enzyminaktivierung (z. B. durch Beta-Lactamasen, die den Beta-Lactam-Ring von Penicillinen hydrolysieren), resistente Zielmoleküle (23S rRNA-Methylasen) und veränderte Membranpermeabilität (verringertes Influx oder gesteigerter Efflux bedingen eine geringere Anhäufung mikrobizider Substanzen in der Bakterienzelle). Antibakterielle Resistenz stellt ein globales Problem dar. Wenn AB nicht als Therapieoption zur Verfügung stehen, sinken die Heilungschancen und ernsthafte Infektionen können lebensbedrohliche Folgen haben (ANON. 2012). Eine Studie der Paul-Ehrlich-Gesellschaft aus dem Jahr 2013 ergab in der Untersuchung von 3.646 Krankenhausisolaten das in Tabelle 1 dargestellte Keim- und Resistenzspektrum (KRESKEN et al. 2016). Carbapenem-Resistenzen entwickeln sich bei gramnegativen Erregern besorgniserregend (RKI 2013). Die Resistenz gegenüber Carbapenemen, die als Reserve-AB gelten, ist meistens vergesellschaftet mit der Resistenz gegenüber anderen AB-Gruppen. Die

Literatur

Verbreitung von Resistenzen und das Fehlen wirksamer AB stellt Mediziner vor ein wachsendes Problem. Das Nationale Referenzzentrum (NRZ) für gramnegative Krankenhauserreger berichtete von einer speziesabhängigen Resistenz-Verteilung unter den gramnegativen Bakterien im Jahr 2014. Dabei fiel besonders *A. baumannii* mit einem Anteil von 93,1 % Carbapenemase-produzierender Isolate auf, gefolgt von *K. pneumoniae* mit 53,9 % und *E. coli* mit 44,4 %. *P. aeruginosa* wies einen Anteil von 24,2 % auf. Die am häufigsten vorkommende Carbapenemase wies den Genotyp OXA 48 auf, gefolgt von KPC-2, VIM-1 und NDM-1 (RKI 2016).

Tabelle 1: Prävalenz multiresistenter Keime an deutschen, schweizerischen und österreichischen Krankenhäusern im Jahr 2013.

Bakterienspezies (Anzahl getesteter Stämme)	Resistenter Phänotyp in % (Anzahl)			
	ESBL- bildend	Carba- penem- resistenz	MRSA	VR
<i>Escherichia coli</i> (596)	14,9 (89)	0 (0)	n. a. w.	n. a. w.
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (304)	17,4 (53)	1,3 (4)	n. a. w.	n. a. w.
<i>Klebsiella oxytoca</i> (132)	8,3 (11)	0 (0)	n. a. w.	n. a. w.
<i>Pseudomonas mirabilis</i> (216)	2,3 (5)	0 (0)	n. a. w.	n. a. w.
<i>Acinetobacter baumannii</i> (88)	n. a.	30,7 (27)	n. a. w.	n. a. w.
<i>Acinetobacter pittii</i> (85)	n. a.	1,8 (1)	n. a. w.	n. a. w.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (733)	n. a.	11,3 (83)	n. a. w.	n. a. w.
<i>Staphylococcus aureus</i> (748)	n. a. w.	n. a. w.	13,5 (101)	n. a. w.
<i>Enterococcus faecium</i> (320)	n. a. w.	n. a. w.	n. a. w.	16,6 (53)
<i>Enterococcus faecalis</i> (424)	n. a. w.	n. a. w.	n. a. w.	0,2 (1)

VR – Vancomycin-Resistenz; n. a. - nicht angegeben; n. a. w. – nicht anwendbar

Die Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) hat Empfehlungen zur Handhabung von Patienten, die von einer Infektion oder Besiedelung mit MRGN betroffen sind, herausgegeben (ANON. 2012). Sie enthalten Maßnahmen zur Infektionsprophylaxe in Einzelfällen. Mit der Veröffentlichung der Empfehlungen definierte die KRINKO MRGN anhand phänotypischer Merkmale. Die Kategorisierung erfolgte

Literatur

entsprechend der Resistenz gegenüber den Leitsubstanzen von vier verschiedenen Antibiotikagruppen (Breitspektrumpenicilline, Cephalosporine, Gyrasehemmer und Carbapeneme, siehe Tabelle 2). Da der klinische Fokus und damit AB, die bei schweren Infektionen eingesetzt werden, im Mittelpunkt stehen, wurden andere Therapeutika nicht in die Bewertung einbezogen (ANON. 2012).

Tabelle 2: Klassifizierung von multiresistenten gramnegativen Bakterien (MRGN) laut KRINKO.

Bakterien	Antibiotikagruppe	Leitsubstanz	2MRGN	3MRGN	4MRGN
<i>A. baumannii</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>	Acylureido- penicilline	Piperacillin	R	R	R
	3./4. Generations- cephalosporine	Ceftazidim und/oder Cefepim	R	R	R
	Carbapeneme	Imipenem und/oder Meropenem	S	S	R
	Fluorchinolone	Ciprofloxacin	S	R	R
<i>P. aeruginosa</i>	Acylureido- penicilline	Piperacillin	R	nur eine der 4 Anti- biotika- gruppen sensibel	R
	3./4. Generations- cephalosporine	Ceftazidim und/oder Cefepim	R		R
	Carbapeneme	Imipenem und/oder Meropenem	S		R
	Fluorchinolone	Ciprofloxacin	S		R

R = resistent, S = sensibel

Die Kategorisierung leitet sich ab aus der Resistenz gegenüber drei von vier (Multiresistente gramnegative Stäbchen mit Resistenz gegen drei der vier Antibiotikagruppen, 3MRGN) bzw. vier von vier (Multiresistente gramnegative Stäbchen mit Resistenz gegen vier der vier Antibiotikagruppen, 4MRGN) Antibiotikagruppen.

KRESKEN et al. (2015) untersuchten die Entwicklung von MRGN-Isolaten in Deutschland in der Zeitspanne von 1995 bis 2013 und stellten einen Anstieg von 3MRGN (*K. pneumoniae*: 1,26 % 1995; 13,48 % 2013) und 4MRGN (*K. pneumoniae*: 0,84 % 1995; 1,5 % 2013; *A. baumannii* 20,21 % 2010; 28,57 % 2013) fest.

2.3.2 Nosokomiale Infektionen

Gemäß Infektionsschutzgesetz (IfSG, ANON. 2000) ist eine nosokomiale Infektion (NI) eine „Infektion mit lokalen oder systemischen Infektionszeichen als Reaktion auf das Vorhandensein von Erregern oder ihrer Toxine, die im zeitlichen Zusammenhang mit einer stationären oder einer ambulanten medizinischen Maßnahme steht, soweit die Infektion nicht bereits vorher bestand“. NI treten oft als Komplikation einer Grunderkrankung auf, da es sich häufig um fakultativ pathogene Erreger handelt. Besonders anfällig sind immunsupprimierte, geriatrische Patienten oder Patienten, die einer Operation unterzogen wurden (ANON. 2004). Überwiegend kommen Lungenentzündungen, Wundinfektionen, Harnwegsinfektionen und Septikämien vor (GAYNES et al. 2005). Die wichtigsten nosokomialen Erreger auf Intensivstationen sind *Escherichia coli*, Enterokokken, *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. und *Acinetobacter* spp. (BREIER et al. 2009, GAYNES et al. 2005, KHAN et al. 2015). NI durch MRGN stellen ein ernst zu nehmendes Problem für das Gesundheitswesen dar. Lückenhaftes Hygienemanagement ist meist ausschlaggebend für Ausbrüche in Krankenhäusern. NI sind oft mit Behandlungsversagen, erhöhter Mortalitätsrate, einem verlängerten Krankenhausaufenthalt und somit erhöhten Kosten verbunden (COSGROVE 2006). Kolonisierte Patienten bilden ein Reservoir und die Weiterverbreitung erfolgt z. B. über die Hände des Pflegepersonals (DANCER 2014). Neben dem direkten Kontakt kann eine Infektion auch von Oberflächen, Instrumenten oder kontaminierten Lebensmitteln ausgehen (KHAN et al. 2015). KRAMER et al. (2006) beschrieben die Persistenz von infektiösen Pathogenen auf unbelebten Flächen. Dabei sind patientennahe Oberflächen und Flächen, die häufig Kontakt mit dem medizinischen Personal haben, besonders risikobehaftet (ANON. 2004, HOTA 2004). Siphons in Waschbecken beherbergen oft biofilmbildende Keime, insbesondere *P. aeruginosa*, und können zur Infektionsquelle für Krankenhausausbrüche werden (SALM et al. 2016).

Aber nicht nur in der Humanmedizin spielen Kolonisation und Infektion mit multiresistenten Bakterien eine Rolle, sondern auch in der Veterinärmedizin (MÜLLER et al. 2014, WALTHER et al. 2017). In Tierkliniken wurden erhöhte Prävalenzen sowie Ausbrüche von ESBL-produzierenden *Enterobacteriaceae* dokumentiert (EWERS et al. 2012, GUARDABASSI et al. 2004, VO et al. 2007, WALTHER et al. 2014, WALTHER et al. 2018, WIELER et al. 2011). Durch die enge Mensch-Tierbeziehung ist das zoonotische Potenzial dieser Pathogene nicht zu unterschätzen. Nutztiere stehen im Verdacht, nach AB-Behandlung MRE über die Lebensmittelkette als auch über direkten Kontakt auf den Menschen zu übertragen (CHANG

et al. 2015, CUNY et al. 2017, ECONOMOU und GOUSIA 2015). Gemäß des One-Health-Konzepts sollten Human-, Veterinärmedizin und Landwirtschaft ganzheitlich zusammenarbeiten, um das Problem der Multiresistenzen zu bewältigen (ROBINSON et al. 2016).

2.3.3 *Acinetobacter* spp.

Im Genus *Acinetobacter* sind anspruchslose, gramnegative, aerobe, nicht-fermentative, kokkoide Stäbchenbakterien zusammengefasst, die ubiquitär in der Umwelt (Wasser, Boden) vorkommen. Ein Nachweis auf der Haut ist bei 25 bis 40 % der gesunden Menschen und bei bis zu 75 % der Krankenhauspatienten möglich. Die *A. baumannii*-Gruppe umfasst die drei klinisch wichtigsten opportunistischen Infektionserreger *A. baumannii*, *A. pittii* und *A. nosocomialis* (HAHN et al. 2009). Die zunehmende AB-Resistenz (gegenüber Ampicillin, Cephalosporinen, Chinolonen, Carbapenemen), verminderte Therapieoptionen und steigende NI-Raten stellen ein ernst zu nehmendes Problem dar. Dabei stehen Atemwegsinfektionen, insbesondere beatmungsassoziierte Pneumonien, katheterassoziierte Bakteriämien, Harnwegsinfektionen und Wundinfektionen im Vordergrund (MARAGAKIS und PERL 2008). Zu den Risikofaktoren zählen Immunsuppression, Verbrennungen, künstliche Beatmung, vorangegangene AB-Therapie sowie ein langer Krankenhausaufenthalt (ECDC 2018). Besonders auf Intensivstationen wurden zahlreiche Ausbrüche mit *A. baumannii* dokumentiert (KOHLENBERG et al. 2009, MOLTER et al. 2016, TOUATI et al. 2009). Auf Grund der Umweltpersistenz stellt sich die Eradikation von *Acinetobacter* spp. problematisch dar. Das Überleben unter trockenen Bedingungen in der Umwelt wird als Faktor bei der Ausbreitung in Kliniken gesehen (KRAMER et al. 2006). Eine Transmission erfolgt über die Hände des Medizinpersonals, kontaminierte Gerätschaften und in großem Maße über die Reservoirs in der unbelebten patientennahen Umgebung (ANON. 2012). Die intrinsische Resistenz gegenüber antimikrobiellen Substanzen ist bedingt durch selektive Impermeabilität der äußeren Membran, aber auch erworbene Resistenzmechanismen (Effluxpumpen, Oxacillinasen) spielen eine Rolle. Laut dem EARS-Net Report 2017 waren 55 % der *Acinetobacter* spp.-Isolate resistent gegenüber mindestens einer AB-Gruppe, die regulär unter Beobachtung stehen - Fluorchinolone, Aminoglykoside und Carbapeneme (ECDC 2018). Die in Europa häufig auftretende kombinierte Resistenz (28,4 % der Isolate) lässt wenige Behandlungsoptionen offen, sodass auch auf Reserveantibiotika (Colistin) zurückgegriffen werden muss. Diese Situation betrifft vor allem das Baltikum, Süd- und Südosteuropa. In Deutschland wurden 2017 1,3 % der Stämme resistent gegenüber den o.g. drei AB-Klassen getestet. Die Carbapenem-Resistenz ist stärker ausgeprägt als bei *K. pneumoniae* und der Anstieg von 4MRGN stellt eine Problemlage in der Patientenversorgung dar (ANON. 2012, ECDC 2018).

2.3.4 Klebsiella spp.

K. pneumoniae und *K. oxytoca* gehören zu den *Enterobacteriaceae* und sind gekennzeichnet durch Kapselbildung und Fimbrien. Als fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien kommen sie ubiquitär in Wasser und Erde vor, aber auch bei 30 % der gesunden Bevölkerung als Kommensalen im Gastrointestinaltrakt und oberen Respirationstrakt. *K. pneumoniae* und seltener *K. oxytoca* sind als Hospitalismuskeme assoziiert mit opportunistischen Infektionen bei immungeschwächten Patienten sowie mit Krankenhausausschüben (ECDC 2018, LOWE et al. 2012, STEINMANN et al. 2011, WENDT et al. 2010). Vor allem *K. pneumoniae* ist verantwortlich für Septikämien und Pneumonien (Anteil bis 10 %), Harnwegsinfektionen und Peritonitiden, die auf Grund der vielfachen Resistenzausbildung schwierig zu behandeln sind. Eine vorausgegangene Therapie mit AB stellt einen Risikofaktor für eine Infektion mit *Klebsiella* spp. dar (ANON. 2012). *K. pneumoniae* weist eine intrinsische Resistenz gegenüber Aminopenicillinen auf. Neben ESBL-Bildung kommt auch die Bildung von Carbapenemasen (z. B. Genotyp OXA-48, KPC) vor, die zur Resistenz gegenüber verschiedenen AB-Gruppen (Cephalosporine der 3. Generation, Fluorchinolone, Aminoglycoside, Carbapeneme) führt. Die Bildung von Kapsel-Polysacchariden wird ebenfalls als wichtiger Faktor bei der Resistenzausbildung gesehen. Etwa 50 % der ESBL-bildenden *K. pneumoniae* sind auch Ciprofloxacin-resistent und müssen gemäß KRINKO-Richtlinie als 3MRGN erfasst werden (PFEIFER et al. 2013)

3MRGN-*Klebsiella* sind an lokalen Krankenhausausschüben mit steigender Tendenz beteiligt, während die Prävalenz für 4MRGN bisher gering ist. Mit *Klebsiella* spp. besiedelte Patienten und die lange Persistenz dieser Spezies in der Umwelt erleichtern eine schnelle Transmission auf empfängliche Patienten, welche vorrangig über direkten oder indirekten Kontakt durch das Personal stattfindet. Das Risiko für ein Behandlungsversagen und eine erhöhte Mortalität ist bei einer Infektion mit 4MRGN-*K. pneumoniae* höher als bei einer Infektion mit einer 3MRGN-Klebsielle (ANON. 2012).

2.3.5 Pseudomonas aeruginosa

Diese aeroben Non-Fermenter sind ubiquitär in der Umwelt (Wasser, Boden) als Saprophyten verbreitet. Niedrige Keimzahlen sind aber auch im Darm gesunder Personen zu finden. *P. aeruginosa* ist ein Opportunist und kann Infektionen bei Menschen und Tieren hervorrufen. Besonders bei hospitalisierten Patienten kommen beatmungsassoziierte Pneumonien, Septikämien und Harnwegsinfektionen vor. *P. aeruginosa* zählt zu den bedeutendsten Erregern von NI und trägt zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität bei (ANON. 2012, ECDC 2018). Eine vorangegangene AB-Therapie prädisponiert für eine Infektion mit diesem Keim (ANON. 2012). Ausbruchsgeschehen wurden ebenfalls dokumentiert (SANCHEZ-CARILLO et al. 2009, YAPICIOGLU et al. 2012). Infektionsquellen im Krankenhaus stellen zum Beispiel

Waschbecken, Beatmungsgeräte und Inhalatoren dar. Eine Übertragung erfolgt über direkten Kontakt, Inhalation oder über unbelebte Oberflächen (ANON. 2012, KRAMER et al. 2006). Biofilmbildung erhöht die Umweltpersistenz und Resistenz gegenüber antimikrobiellen Substanzen, da Biozide z. B. erschwert zu den Bakterienzellen durchdringen können (MCDONNELL und RUSSELL 1999). Eine herabgesetzte Permeabilität der äußeren Membran führt zur intrinsischen Resistenz. Auch erworbene Resistenzmechanismen wurden beschrieben (Effluxpumpen, Metallo-Beta-Lactamasen). Resistenzen gegenüber verschiedenen AB (Carbapeneme, Fluorchinolone, Aminoglykoside, 3. Generations-Cephalosporine) sowie gegenüber Bioziden wie quartären Ammoniumverbindungen sind dokumentiert (ADAIR et al. 1969). Der EARS-Net Report 2017 berichtete, dass 30,8 % der *P. aeruginosa*-Isolate wenigstens gegen eines der oben genannten AB resistent waren; 18,3 % der getesteten Isolate wiesen eine Multiresistenz auf (EDEC 2018).

2.4 Bakterielle Resistenzen gegenüber Bioziden

2.4.1 Allgemeines

AB werden als Therapeutika eingesetzt, während Biozide als DM, Antiseptika oder Konservierungsmittel in zunehmendem Maße angewendet werden. Während AB Stoffwechselprozesse sich vermehrender Zellen stören (Störung der Zellwand-, Protein-, Nukleinsäure- oder Metabolitensynthese), zeichnen sich DM durch eine unspezifische Wirkungsweise auf mehrere Zielkomponenten der Zelle aus (Interaktion mit Membranen, Proteinen). Zudem werden auch Erreger im Ruhezustand erfasst (MEYER und COOKSON 2010, POOLE 2002).

MCDONNELL und RUSSELL (1999) beschrieben, dass der Desinfektionserfolg abhängig vom strukturellen Aufbau und der Art der Bakterien ist. Intrinsische Resistenz wird chromosomal gesteuert und äußert sich in der relativen Impermeabilität der äußeren Membran wie sie bei Mykobakterien, gramnegativen Bakterien und Sporen auftritt. Dabei limitiert die Membran den Eintritt chemischer Substanzen. Eine so gesteuerte Unempfindlichkeit gegenüber quartären Ammoniumverbindungen, Triclosan und Diaminen wurde beschrieben. Besonders resistente Mikroorganismen stellen *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* und *Proteus* spp. dar, bei denen ein hoher Gehalt an Magnesium-Ionen zu starken LPS-Verbindungen in der äußeren Membran führt. Andere Resistenzmechanismen umfassen Porine, Effluxpumpen und Biozid-spaltende Enzyme (MAILLARD 2007).

Der physiologische Status der Mikroorganismen ist ausschlaggebend für die Empfindlichkeit gegenüber Bioziden. So sind biofilmbildende Bakterien im Vergleich zu planktonischen Zellen in ihrem speziellen Mikromilieu besser vor mikrobizidem Einfluss geschützt. Die Passage der Membran wird erschwert, Enzyme degradieren DM oder es erfolgt ein resistenzsteigernder

Austausch von genetischem Material (MCDONNELL und RUSSELL 1999). Von „schlafenden Zellen“ als hochresistenter Phänotyp berichtete MAILLARD (2007). Innerhalb des Biofilms variiert die Nährstoffverfügbarkeit je nach Lokalisation der Bakterien (MAILLARD 2007). Bakterien, die im Labor suboptimalen Bedingungen ausgesetzt werden, können in Folge von Adaption an diese Umweltbedingungen toleranter gegenüber antimikrobiellen Einflüssen sein (RUSSELL 2003). Es wurde eine Modulation intrinsischer Fähigkeiten als Stressantwort beschrieben. Dazu zählen beispielsweise die Veränderung der Wachstumsgeschwindigkeit oder die Expression von Hitzeschockproteinen (MAILLARD 2007). Es wurde angenommen, dass in Gesundheitseinrichtungen wenige Nährstoffe zur Verfügung stehen und daher der metabolische Status der Mikroorganismen verändert sei (MAILLARD 2007). Daher sind DM-Testungen in nährstoffreichen Medien wenig aussagekräftig hinsichtlich des zu erwartenden Desinfektionserfolgs.

Erworbene Resistenz wird durch Mutation und Gentransfer realisiert und äußert sich in Effluxmechanismen oder Enzyymbildung (MAILLARD 2007). Belegte Plasmid-gesteuerte Resistenz (*qac* Gene) gegenüber quartären Ammoniumverbindungen existiert bei *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* spp. und *Enterobacteriaceae* (FRAISE 2002). Dadurch kann eine Kreuzresistenz zu AB begünstigt werden (MEYER und COOKSON 2010). Die Resistenz kann stabil, aber auch reversibel sein, wenn der selektive Druck nicht mehr vorhanden ist. Die Ausbildung zusätzlicher Effluxpumpen oder Porine nach Wegfall der Störfaktoren stellt nach MAILLARD (2007) eine Energieverschwendung dar. Eine Unterscheidung von natürlichen und erworbenen Mechanismen ist nicht immer möglich. Generell können Mutationen vorkommen, aber auch die Expression von bereits vorhandenen Genen muss in Betracht gezogen werden (MAILLARD 2007).

DM-Resistenz liegt vor, wenn einzelne Stämme durch die Anwendungskonzentration eines DM nicht inaktiviert werden oder eine DM-Konzentration unwirksam ist, die bei anderen Stämmen dieser Spezies mikrobizid wirkt. Als Synonyme werden die Bezeichnungen Unempfindlichkeit und Toleranz verwendet (MAILLARD 2007, MEYER und COOKSON 2010, RUSSELL 2003). Kreuzresistenz ist die Resistenz von Bakterien gegenüber mehreren AB oder AB-Gruppen. Biozid-AB-Kreuzresistenz wurde bei gramnegativen Bakterien nachgewiesen. Beispielsweise weisen Triclosan-resistente *P. aeruginosa* über unspezifische Effluxpumpen ebenso Resistenzen gegenüber AB auf (CHUANCHUEN et al. 2001).

Zahlreiche Studien beschäftigen sich mit DM-Resistenzen bzw. Adaption *in vitro* (CHAPMAN 1998, DAVIN-REGLI und PAGES 2012, RUSSELL 1999, RUSSELL 2004). Dabei darf eine erhöhte MHK nicht als Resistenz fehlinterpretiert werden. Bakterien mit erhöhter MHK werden immer noch zuverlässig von Anwendungskonzentrationen eliminiert, die um ein Vielfaches höher liegen als die MHK. Zudem ist die Übertragbarkeit von Laborstudien auf die Praxis kritisch zu

Literatur

bewerten (MAILLARD 2007, MCDONNELL und RUSSELL 1999, RUSSELL 2003). Es müsse das tatsächliche Produkt in dem anzuwendenden Milieu erprobt werden.

Krankenhausisolate gramnegativer Keime sind weniger sensitiv als Laborstämme (RUSSELL 2002). Ursächlich sind Selektion auf Grund subinhibitorischer AB- oder DM-Konzentrationen sowie Mutation zu sehen (RUSSELL 1999, RUSSELL 2003). MARTRO et al. (2003) untersuchten Ausbruchsstämme und konnten zwar multiple AB-Resistenzen nachweisen, jedoch keinerlei Toleranz gegenüber Bioziden. Dies deckt sich mit Aussagen von RUSSELL (2002), der keine Toleranz von MRE gegenüber Anwendungskonzentrationen von Bioziden beschrieb. KAWAMURA-SATO et al. (2008) dagegen zeigten, dass der Einfluss organischer Substanz zu einer geringeren Effizienz von DM gegenüber *A. baumannii* führt.

Bei der Anwendung von DM mit breitem Wirkspektrum mit den zertifizierten Konzentrations-Zeit-Relationen wird die Selektion DM-toleranter Bakterien unterbunden (ANON. 2004). REICHEL et al. (2014) zeigten, dass Flächen-DM grundsätzlich gegen MRGN wirksam sind. Bei fehlerhafter Handhabung jedoch können Bakterien adaptieren (REISS et al. 2000, MAILLARD 2007). Klinische Isolate erfordern daher eine kontinuierliche Surveillance, um bei Ausbrüchen geeignete DM einsetzen zu können.

3 Veröffentlichungen

3.1 Veröffentlichung 1

Efficacy of sodium hypochlorite against multidrug-resistant Gram-negative bacteria

A.T. Köhler, A.C. Rodloff, M. Labahn, M. Reinhardt, U. Truyen, S. Speck

Journal of Hospital Infection 2018;100:e40-e46

Eigenanteil

Die Autorin dieser Arbeit hat in folgenden Anteilen zur Publikation „Efficacy of sodium hypochlorite against multidrug-resistant Gram-negative bacteria“ beigetragen:

Das der Publikation zugrundeliegende Projekt „Untersuchungen zur wirksamen Desinfektion von bedeutenden gegen Antibiotika multiresistente Erreger (MRE) in der Human- und Veterinärmedizin“ wurde im Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. vet. Uwe Truyen durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Prof. Dr. med. vet. Uwe Truyen und Frau Dr. med. vet. Stephanie Speck in Zusammenarbeit mit dem Sächsischen Staatsministerium für Soziales und Verbraucherschutz, welches die Studie finanzierte.

Die Methodik war durch die VAH vorgegeben. Das Versuchsdesign wurde in Absprache mit Frau Dr. Speck festgelegt. Sämtliche Laborversuche wurden von der Autorin der Dissertation eigenständig geplant und mit der Unterstützung von Frau Manja Labahn sowie Herrn Mario Reinhardt durchgeführt. Es erfolgte eine regelmäßige Datenauswertung und Anpassung des Versuchsablaufes mit Frau Dr. Speck. Die statistische Auswertung der Datenerhebung erfolgte durch die Autorin.

Die Literaturrecherche erfolgte durch die Autorin. Das Manuskript für die Publikation wurde unter Anleitung von Frau Dr. Speck selbständig durch die Autorin verfasst und in Zusammenarbeit mit den Koautoren fertig gestellt. Es wurden keine weiteren als die angegebenen Quellen verwendet.

Running title: NaOCl and multidrug-resistant bacteria

EFFICACY OF SODIUM HYPOCHLORITE AGAINST MULTIDRUG-RESISTANT GRAM-NEGATIVE BACTERIA

Anne T. Köhler^a, Arne C. Rodloff^b, Manja Labahn^{a,b}, Mario Reinhardt^a, Uwe Truyen^a, Stephanie Speck^{a*}

^a Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig, Germany

^b Institute of Medical Microbiology and Epidemiology of Infectious Diseases, University of Leipzig, Liebigstraße 21, 04103 Leipzig, Germany

*** Corresponding author:**

Dr. Stephanie Speck

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen

Universität Leipzig

An den Tierkliniken 1

04103 Leipzig

stephanie.speck@vetmed.uni-leipzig.de

0049 – 341 9738 153

Key words: disinfection efficacy, sodium hypochlorite, multidrug-resistant bacteria, minimum inhibitory concentration, suspension test, practical test

Summary

Background: Increased antimicrobial resistance has been observed among many bacteria leading to treatment failures in human and veterinary medicine. Disinfection is a prerequisite for infection control and prevention in healthcare settings. Chlorine compounds are cost-effective and accessible worldwide.

Aim: To determine the efficacy of sodium hypochlorite (NaOCl) against multidrug-resistant Gram-negative bacteria (MDR-GNB).

Methods: Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined using broth macrodilution. Bactericidal efficacy was measured by qualitative and quantitative suspension tests followed by practical tests without mechanical action on stainless steel carriers. The guidelines of the German Association for Applied Hygiene were followed.

Findings: Results remarkably varied depending on the method. MICs were 0.1% or 0.2% NaOCl. Qualitative suspension tests revealed up to 500-fold lower bactericidal concentrations. *P. aeruginosa* ($P = 0.0025$) was significantly less susceptible in these tests whereas quantitative suspension tests revealed no significant differences between strains ($P > 0.05$). Practical tests determined bactericidal concentrations of 0.8-0.32% NaOCl at 1 min of contact and even lower concentrations for longer contact times. At 1 min, five *Klebsiella* were significantly less susceptible ($P = 0.0124$), whereas the lower susceptibility of *P. aeruginosa* was not confirmed. Organic load inhibited bactericidal activity significantly, whereas contact time had a marginal effect. Differing test results underline that MIC determination and qualitative suspension tests may be insufficient approaches to evaluate bacterial susceptibility or resistance.

Conclusion: NaOCl efficiently reduced *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., and *Klebsiella* spp. most notably in the absence of organic matter. Strain- and species-specific differences in susceptibility were noticed, but in general MDR-GNB revealed no higher tolerance to NaOCl.

Introduction

Disinfection is essential in disease prevention and control. However, there is justified concern about the efficacy of disinfectants relating to bacterial mechanisms that affect both antibiotics and biocides as was shown e.g. for *Pseudomonas (P.) aeruginosa* with quaternary ammonium compounds, and triclosan [1,2]. Mechanisms include expression of efflux pumps and lowered permeability of the bacterial outer membrane [3,4]. Moreover, bacterial biocide adaptation and resistance have been reported [5].

Acinetobacter baumannii, *P. aeruginosa*, and *Klebsiella* spp. are examples of ubiquitous environmental Gram-Negative bacteria that can be multidrug-resistant (MDR-GNB) [6-8]. These bacteria can be isolated from water outlets in hospitals; for example, sinks in intensive care units have been implicated in MDR *P. aeruginosa* [9,10]. Furthermore, these bacteria can survive on inanimate surfaces for months, providing a continuous source of transmission [11-13]. Nosocomial outbreaks of MDR *K. pneumoniae* and *A. baumannii* occurring over prolonged periods illustrate the difficulties in controlling these pathogens in the hospital setting [14-19].

Sodium hypochlorite (NaOCl) is a strong oxidizing agent with a broad-spectrum antimicrobial effect. According to the Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR), NaOCl is classified as a low- or intermediate-level biocide depending on the applied concentration [20]. Nevertheless, NaOCl is a widely used and accessible product in terms of cost and benefit and has been used for disinfection of equipment, surfaces, and laundry, and for drinking-water disinfection [13,21,22]. Although possessing a broad-spectrum bactericidal activity, bacterial resistance to chlorine-releasing compounds has been described [23].

In this study, NaOCl was assessed for its bactericidal efficacy *in vitro* against selected strains of MDR *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, and *Klebsiella* spp. collected at a hospital setting, as well as reference strains. All the species tested are important nosocomial pathogens in human and veterinary medicine that may be associated with outbreaks of infection [14-19,24-27].

Methods

Test organisms

Sixteen bacterial isolates comprising *A. pittii*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. oxytoca*, and *K. pneumoniae* were included in this study (Table I). Based on phenotypic resistance characteristics they were classified as 3MDR-GNB or 4MDR-GNB [6]. *P. aeruginosa* strain DSM 939 was used as a species-specific reference strain but is also required as test organism by the Association for Applied Hygiene (VAH) Disinfectant Commission [28]. As no reference strains for the genera *Klebsiella* and *Acinetobacter* are provided by the VAH, the corresponding

species-specific type strains were chosen [28]. Reference and type strains were obtained from the Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, Germany). Antibiotic susceptibility of all strains were determined prior to disinfectant testing (Supplementary Table I). As the type strain of *A. baumannii* (DSM 30007) was identified as 3MDR-GNB, a clinical *A. baumannii* isolate with species-specific wild-type resistance patterns was used as a control.

Susceptibility testing

Disinfectant testing was performed according VAH, equivalent to European standards but included minimum inhibitory concentration (MIC) determination and qualitative suspension tests as ancillary methods [28,29]. Bacteria were grown from stock cultures biweekly on Columbia sheep blood agar^{PLUS} (Oxoid GmbH, Wesel, Germany) at 37°C, 24 h. Bacterial test suspensions contained 1.5–5.0 x 10⁸ colony-forming units (cfu)/mL, except for the practical tests on steel carriers (1.5–5.0 x 10⁹ cfu/mL). Serial arithmetic dilutions of NaOCl (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany; 10.0–14.0% active chlorine according to the manufacturer's declaration) were prepared in water of standardized hardness (WSH) starting at 0.4%. Free chlorine (mg/L) was determined using AquaChek test strips (Hach Company, Loveland, CO, USA). Growth controls were conducted using WSH instead of NaOCl. MICs were assessed by broth macrodilution (VAH method 7) [28]. Equal volumes of double-concentrated NaOCl and tryptic soy broth (TSB; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) were mixed and 0.05 mL of bacterial suspensions (diluted 1:10 in TSB) were added.

Bactericidal concentrations were determined by qualitative suspension tests (VAH method 8) [28]. One hundred microlitres of bacterial suspensions were inoculated into 10 mL of appropriately diluted NaOCl and, after the respective exposure times at 20°C, 100 µL aliquots were transferred to 10 mL of neutralizer (TSB containing polysorbate 80 (3%), lecithin (0.3%), L-histidine (0.1%), sodium thiosulfate (0.5%)). After 48 h of incubation at 37°C, bacterial growth in both tests was evaluated visually.

To further evaluate the bactericidal activity of NaOCl, quantitative suspension tests with and without organic load (0.3% bovine serum albumin (BSA) solution; Albumin Fraktion V, Carl Roth) were performed at 20°C using exposure times of 1, 5, and 15 min (VAH method 9, equivalent to EN 13727) [28]. Briefly, NaOCl (8 mL) was mixed with WSH or BSA (1 mL; final concentration 0.03%) and 1 mL bacterial suspension was added. After the appropriate exposure time, 500 µL were transferred to 4.5 mL neutralizer for 5 min. The spread-plate method was used to quantify bacteria and to calculate logarithmic reductions (LR) in viable counts [30]. For sufficient bactericidal efficacy, LR ≥ 5 in viable counts was requested [28]. Biocide efficacy under practical conditions with organic load (i.e. surface disinfection without chemical action, VAH method 14.1, equivalent to EN 13697) was evaluated using stainless

steel carriers (GK-Formblech GmbH, Berlin, Germany) [28]. A 50 µL drop of bacterial suspensions was dried (37°C, 60 min) on stainless steel carriers and covered with 100 µL NaOCl for the respective exposure time (1, 5, 15, 30 min at 20°C). Subsequently carriers were transferred to 10 mL neutralizer and bacteria were detached using a horizontal shaking device. LR values were calculated as described above. All tests were carried out in independent duplicates.

Statistical analysis

Differences in bacteriostatic and bactericidal values for bacterial genera as well as for MDR-GNB strains and reference strains were evaluated using Fisher's exact test. An influence of exposure time and organic load was assessed using Mann–Whitney U-test. Differences were regarded as significant for $P < 0.05$ (two-sided). Analyses were done using SPSS, Version 22 (IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Germany).

Results

Minimum inhibitory concentrations

Minimum inhibitory concentrations of NaOCl were determined as 0.2% for all *Pseudomonas* strains and three out of seven *K. pneumoniae* strains, whereas growth of the remaining strains was inhibited at 0.1% NaOCl (Supplementary Table II). Overall, MDR-GNB strains had no significantly higher tolerance towards NaOCl ($P > 0.05$) as compared to reference strains. The group of *Pseudomonas* strains was significantly less susceptible ($P = 0.0058$) compared with strains of other genera.

Suspension tests

Qualitative suspension tests revealed up to 500-fold lower bactericidal concentrations compared with MICs (Supplementary Table II). A concentration of 0.0005% NaOCl was effective against the majority of strains, irrespective of exposure time. The highest difference (10-fold) in bactericidal concentrations was seen between *Pseudomonas* and *Acinetobacter* strains. Between *A. pittii* and *A. baumannii* a difference of as much as fivefold was noticed, whereas among strains of a respective species, in general, only a doubling of concentration was found. Compared to the other Gram-negative bacteria, *Pseudomonas* revealed a significantly lower susceptibility to NaOCl ($P = 0.0025$).

Without organic load, NaOCl achieved $LR \geq 5$ at 0.004% at all contact times for most strains in the quantitative suspension tests (Table II). *Pseudomonas* and two *Klebsiella* strains required 0.008% at short exposure (Table II). Antimicrobial efficacy was significantly reduced

($P < 0.00001$) in the presence of BSA, necessitating 20–40-fold higher concentrations at all contact times. There was no significant difference between strains ($P > 0.05$). Compared with the qualitative suspension test (Supplementary Table II) without organic load, a higher concentration up to 20-fold was needed to achieve $LR \geq 5$ at the same exposure time.

Practical tests on stainless steel carriers

Sodium hypochlorite concentrations that achieved $LR \geq 5$ in practical tests are presented in Table III. With the exception of 1 min exposure time, there was no significant difference between species or strains. Bactericidal values were similar to those from quantitative suspension tests with organic load (Table II) at 1 min exposure time except for *A. baumannii* AB 3 (twofold lower concentration) and five *Klebsiella* strains (KO 1, KP 1–3, KP 5; twofold higher values). At 1 min, the latter were significantly less susceptible ($P = 0.0124$) compared to other strains. A significant increase in bactericidal efficacy over time was found ($P < 0.00001$), notably with *Klebsiella* strains. $LR \geq 5$ at 5 and 15 min of exposure were achieved by two- to fourfold lower concentrations compared to the qualitative suspension tests.

Discussion

The efficacy of NaOCl was assessed by MIC determination, qualitative and quantitative suspension tests, and practical tests on surfaces (i.e. stainless steel carriers) without mechanical action. Test results markedly differed depending on the method applied which has also been described elsewhere [31,32]. MICs determined for NaOCl did not differ between MDR-GNB and reference strains. All MICs were lower than the in-use concentration of commercial products. Similar MIC values were published for *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp., only our results for *Klebsiella* strains were two- to fourfold lower as reported by others [33–37]. As growth media can influence susceptibility testing, the use of cation-supplemented Mueller–Hinton broth in the respective studies may explain the different results [37–39]. The group of *Pseudomonas* strains was significantly less susceptible to NaOCl as compared to the other genera in this test, which might be attributed to the high intrinsic resistance of *P. aeruginosa* against many disinfectants [40].

Bactericidal concentrations decreased considerably in the qualitative suspension tests most probably due to the method applied, i.e. exposure to NaOCl diluted in nutritive TSB (MIC determination) compared with NaOCl suspended in WSH (suspension tests), and with exposure times. Considerable species-specific differences in bactericidal concentrations were noticed for three *P. aeruginosa* strains (PA 1–3) and one *A. pittii* strain (AP 1). At 1 min exposure time, the latter was efficiently reduced at a 10-fold lower concentration whereas other strains differed only fourfold at the most. Overall, exposure time had no influence on

bactericidal concentrations. Comparative studies are few, but one reported similar bactericidal concentrations for *P. aeruginosa* [41,42].

Sodium hypochlorite efficacy is highly dependent on organic load; this was most striking in the quantitative suspension tests and in the practical tests in our study [13,32,43,44]. Without organic load, LR ≥ 5 was achieved at 0.008% NaOCl (1 min, 5 min) and 0.004% NaOCl (any exposure time) in the quantitative suspension test whereas a 20–40-fold higher concentration was needed in the presence of organic load. Differences between species and strains were only twofold and in disagreement with the findings for PA 1–PA 3 in the qualitative suspension test. In other studies without organic load, inadequate inactivation of *P. aeruginosa* using 0.05% and 0.02% NaOCl to LR > 5 after 2 min of exposure to 0.0005% was described [43,45,46]. The *A. baumannii* strains tested in our study seemed to be more susceptible to NaOCl compared with imipenem-resistant outbreak strains; however, the lowermost concentration tested in that study was 0.05% [47]. Similar variation was noticed in studies performed in the presence of organic load [32,43,48]. The results obtained for *K. pneumonia* were in accordance to other reports [42].

Though suspension tests serve well as exploratory tests, practical tests on surfaces (e.g. using stainless steel carriers) are more suitable to predict the efficacy of a disinfectant in conditions under which it would be used. It is known that bacteria attached on surfaces have a different phenotype and more readily resist antimicrobial treatment than cells in suspension [44,46,49,50]. Depending on the disinfectant and the attachment time, this might result in higher disinfectant concentrations needed. Accordingly, significantly higher concentrations (three- to 10-fold) of a chlorine-releasing compound were needed in practical surface tests compared with quantitative suspension tests [51]. In our study, comparable results were obtained for five *Klebsiella* strains, but only at 1 min exposure time. In contrast to other reports, a two- or fourfold lower NaOCl concentration was sufficient in practical surface tests as compared to quantitative suspension tests at 5 min and 15 min of exposure [44,51]. Moreover, tests on steel surfaces conducted elsewhere required a much higher exposure time to achieve LR > 5 at similar NaOCl concentrations [44]. This might be due to different methods for steel carrier preparation, i.e. drying of bacterial suspensions overnight (30°C) versus 60 min (37°C). Bactericidal efficacy against MDR-GNB and reference strains was similar and the significantly lower susceptibility of *P. aeruginosa* noticed at MIC determination was not confirmed by quantitative suspension tests and practical tests. With regard to surface disinfection, all NaOCl values determined in this study were well below typical in-use concentrations of commercial products.

In the course of this study the question arose as to which test method would apply best to evaluate the efficacy of NaOCl for drinking-water disinfection. According to the German drinking-water regulation, 1.2 mg/L free chlorine is allowed in order to maintain a free

chlorine concentration of 0.2 mg/L in household water [52]. Based on our results for MIC determination, quantitative suspension tests, and practical carrier tests, all strains tested including reference strains would be classified as resistant (i.e. bacterial survival at in-use concentrations of a biocide) against NaOCl under those conditions [1]. Suspension tests most likely reflect the application of NaOCl for drinking-water disinfection. Bactericidal concentrations determined by qualitative suspension tests without organic load at ≥ 5 min of exposure were < 1.2 mg/L, but values for all *P. aeruginosa* and two *A. baumannii* strains were close to this value (Supplementary Table II). For all strains tested, bactericidal concentrations were always > 0.2 mg/L irrespective of contact time. Disinfection is of high importance in the supply of safe drinking-water, and chlorination has been an effective treatment against the majority of bacteria transmitted through drinking-water [9]. Nevertheless, our results highlight the necessity to proof the efficiency of disinfection measurements under specific circumstances (e.g. waterborne infections in intensive care units, biofilm formation, pipes of stagnant water, water pipe breakage or leakage, flooding).

In conclusion, NaOCl efficiently reduced *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, and *Klebsiella* spp. strains, notably in the absence of organic matter. We noticed strain- and species-specific differences in bactericidal concentrations, but in general MDR-GNB showed no greater tolerance to NaOCl. The strong influence of organic load on the efficacy of NaOCl highlights the importance of proper cleaning prior to disinfection using chlorine-releasing compounds. Because of recurring isolates of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* from water pipes and taps, the control of disinfection measurements using NaOCl in this field is of great importance.

Conflict of interest statement

None declared.

Funding source

This study was funded by the Saxon State Ministry of Social Affairs and Consumer Protection. The funder had no role in study design, data collection, analysis and interpretation, writing of the report, or in the decision to submit the article for publication.

Acknowledgements

We greatly appreciate the funding of this study by the Saxon State Ministry of Social Affairs and Consumer Protection.

References

- [1] Russell AD. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Lancet Infect Dis* 2003;3:794–803.
- [2] Chuanchuen R, Beinlich K, Hoang TT, Becher A, Karkhoff-Schweizer RR, Schweizer HP. Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects nfxB mutants overexpressing MexCD-OprJ. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:428–32.
- [3] Li X-Z, Nikaido H, Williams KE. Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag⁺ and are deficient in porins. *J Bacteriol* 1997;179:6127–32.
- [4] Russell AD. Mechanisms of bacterial insusceptibility to biocides. *Am J Infect Control* 2001;29:259–61.
- [5] Russell AD. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. *J Hosp Infect* 2004;57:97–104.
- [6] Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut (RKI). Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen. *Bundesgesundheitsbl* 2012;55:1311–54 [German].
- [7] Goel S, Bouwer EJ. Factors influencing inactivation of *Klebsiella pneumoniae* by chlorine and chloramine. *Water Res* 2004;38:301–8.
- [8] McGowan JE. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am J Med* 2006;119:29–36.
- [9] World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality. 4th ed. 2011 Available at: http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/9789241548151_toc.pdf [last accessed March 2018].
- [10] Salm F, Deja M, Gastmeier, P, Kola, A, Hansen, S, Behnke, et al. Prolonged outbreak of clonal MDR *Pseudomonas aeruginosa* on an intensive care unit: contaminated sinks and contamination of ultra-filtrate bags as possible route of transmission? *Antimicrob Resist Infect Control* 2016;5:53.
- [11] Hirai Y. Survival of bacteria under dry conditions; from a viewpoint of nosocomial infection. *J Hosp Infect* 1991;19:191–200.
- [12] Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis* 2006;6:318.

Veröffentlichungen

- [13] Rutala DW, Weber DJ. Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:597–610.
- [14] Ducomble T, Faucheux S, Helbig U, Kaisers U, König B, Knaust A, et al. Large hospital outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae*: investigating mortality and the impact of screening for KPC-2 with polymerase chain reaction. *J Hosp Infect* 2015;89:179–85.
- [15] Lübbert C, Lippmann N, Busch T, Kaisers UX, Ducomble T, Eckmanns T, et al. Long-term carriage of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2-producing *K. pneumoniae* after a large single-center outbreak in Germany. *Am J Infect Control* 2014;42:376–80.
- [16] Steinmann J, Kaase M, Gatermann S, Popp W, Steinmann E, Damman M, et al. Outbreak due to a *Klebsiella pneumoniae* strain harbouring KPC-2 and VIM-1 in a German university hospital, July 2010 to January 2011. *Euro Surveill* 2011;16:pii=19944.
- [17] Wendt C, Schütt S, Dalpke AH, Konrad M, Mieth M, Trierweiler-Hauke B, et al. First outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* in Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010;29:563–70.
- [18] Kohlenberg A, Brummer S, Higgins PG, Sohr D, Piening BC, Grahl C, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the carbapenemase OXA-23 in a German university medical centre. *J Med Microbiol* 2009;58:1499–507.
- [19] Zollner-Schwetz I, Zechner E, Ullrich E, Luxner J, Pux C, Pichler G, et al. Colonization of long term care facility patients with MDR-Gram-negatives during an *Acinetobacter baumannii* outbreak. *Antimicrob Resist Infect Control* 2017;6:934.
- [20] SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks). Assessment of the antibiotic resistance effects of biocides. Available at: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihr/docs/scenihr_o_021.pdf [last accessed March 2018].
- [21] Pereira SS, Oliveira HM, Turrini RN, Lacerda RA. Disinfection with sodium hypochlorite in hospital environmental surfaces in the reduction of contamination and infection prevention: a systematic review. *Rev Esc Enferm USP* 2015;49:681–8.
- [22] DIN EN 901:2013-12. Chemicals used for treatment of water intended for human consumption – sodium hypochlorite. German version; 2013.
- [23] Chapman JS. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. *Int Biodeterior Biodegradation* 2003;51:271–6.

Veröffentlichungen

- [24] Müller S, Janßen T, Wieler LH. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* in veterinary medicine – emergence of an underestimated pathogen? Berl Munch Tierarztl Wochenschr 2014;127:435–46.
- [25] Walther B, Tedin K, Lübke-Becker A. Multidrug-resistant opportunistic pathogens challenging veterinary infection control. Vet Microbiol 2017;200:71–8.
- [26] Visca P, Seifert H, Towner KJ. *Acinetobacter* infection – an emerging threat to human health. IUBMB Life 2011;63:1048–54.
- [27] Xia J, Gao J, Tang W. Nosocomial infection and its molecular mechanisms of antibiotic resistance. BioScience Trends 2016;10:14–21.
- [28] Association for Applied Hygiene (VAH) Disinfectants Commission. Requirements and methods for VAH certification of chemical disinfection procedures. 1st ed. Wiesbaden: mhp-Verlag GmbH; 2015.
- [29] Exner M, Gebel J. Mitteilung der Desinfektionsmittel-Kommission im VAH zur Äquivalenz der Desinfektionsmittel-Testung gemäß VAH-Methoden und der Testung gemäß den aktuellen europäischen Normen. Hyg. Med. 2016;41–3 [German].
- [30] DIN EN 13727:2014-01. Chemical disinfectants and antiseptics – quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity in the medical area – test method and requirements (phase 2, step 1). German version; 2014.
- [31] Thomas L, Russel AD, Maillard J-Y. Antimicrobial activity of chlorhexidine diacetate and benzalkonium chloride against *Pseudomonas aeruginosa* and its response to biocide residues. J Appl Microbiol 2005;98:533–43.
- [32] Van Klinger B. Disinfectant testing on surfaces. J Hosp Infect 1995;30 (Suppl):397–408.
- [33] Penna TCV, Mazzola PG, Martins AMS. The efficacy of chemical agents in cleaning and disinfection programs. BMC Infect Dis 2001;1:16.
- [34] Gomes IB, Simões M, Simões LC. The effects of sodium hypochlorite against selected drinking water-isolated bacteria in planktonic and sessile states. Sci Total Environ 2016;56:540–8.
- [35] Pagedar A, Singh J. Evaluation of antibiofilm effect of benzalkonium chloride, iodophore and sodium hypochlorite against biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* of dairy origin. J Food Sci Technol 2015;52:5317–22.

Veröffentlichungen

- [36] Banovic F, Lemo N. In vitro evaluation of the use of diluted sodium hypochlorite (bleach) against *Staphylococcus pseudintermedius*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Malassezia pachydermatis*. *Vet Dermatol* 2014;25:233–4.
- [37] Morrissey I, Oggioni MR, Knight D, Curiao T, Coque T, Kalkanci A, et al. Evaluation of epidemiological cut-off values indicates that biocide resistant subpopulations are uncommon in natural isolates of clinically-relevant microorganisms. *PLoS One* 2014;9(1).
- [38] Brill F, Goroncy-Bermes P, Sand W. Influence of growth media on the sensitivity of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* to cationic biocides. *Int J Hyg Environ Health* 2006;209:89–95.
- [39] Huys G, D’Haene K, Swings J. Influence of the culture medium on antibiotic susceptibility testing of food-associated lactic acid bacteria with the agar overlay disc diffusion method. *J Appl Microbiol* 2002;34:402–6.
- [40] McDonnell G, Russel AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:147–79.
- [41] Coetzee E, Whitelaw A, Kahn D. The use of topical, un-buffered sodium hypochlorite in the management of burn wound infection. *Burns* 2012;38:529–33.
- [42] Ozkurt Z, Altoparlak U, Erol S, Celebi S. Activity of frequently used disinfectants and antiseptics against nosocomial bacterial types. *Mikrobiyol Bul* 2003;37(2-3):157–62 [Turkish].
- [43] Coates D. A comparison of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate products. *J Hosp Infect* 1985;6:31–40.
- [44] Grönholm L, Wirtanen G, Ahlgren K, Nordström K, Sjöberg A-M. Screening of antimicrobial activities of disinfectants and cleaning agents against foodborne spoilage microbes. *Z Lebensm Unters Forsch* 1999;208:289–98.
- [45] Sagripanti J-L, Eklund CA, Trost PA, Jinneman KC, Abeyta Jr. C, Kaysner AC, et al. Comparative sensitivity of 13 species of pathogenic bacteria to seven chemical germicides. *Am J Infect Control* 1997;25:335–9.
- [46] Eginton PJ, Holah J, Allison DG, Handley PS, Gilbert P. Changes in the strength of attachment of micro-organisms to surfaces following treatment with disinfectants and cleansing agents. *Lett Appl Microbiol* 1998;27:101–5.
- [47] Liu W-L, Liang H-W, Lee M-F, Lin H-L, Lin Y-H, Chen C-C, et al. The impact of inadequate terminal disinfection on an outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit. *PLoS ONE* 2014;9(9).

Veröffentlichungen

- [48] Hinenoya A, Awasthi SP, Yasuda N, Shima A, Morino H, Koizumi T, et al. Chlorine dioxide is a better disinfectant than sodium hypochlorite against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii*. Jpn J Infect Dis 2015;68:276–9.
- [49] Carpentier B, Cerf O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. J Appl Microbiol 1993;75:499–511.
- [50] LeChevallier MW, Cawthon CD, Lee RG. Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. Appl Environ Microbiol 1988;54:649–54.
- [51] Van Klinger B, Koller W, Bloomfield SF, Böhm R, Cremieux A, Holah J, et al. Assessment of the efficacy of disinfectants on surfaces. Int Biodeterior Biodegradation 1998;41:289–96.
- [52] Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 10. März 2016 (BGBl. I S. 459), die durch Artikel 2 des Gesetzes vom 17. Juli 2017 (BGBl. I S. 2615) geändert worden ist). Available at: https://www.gesetze-im-internet.de/trinkwv_2001/TrinkwV.pdf [last accessed March 2018].

Veröffentlichungen

Table I. Characteristics of bacterial strains used in this study.

Species	Acronym	Strain number	Origin	Characteristics
<i>A. pittii</i>	AP1	4/1/1/20	University Hospital Leipzig	species-specific wild type resistance pattern
<i>A. pittii</i>	AP2	4/1/13/37	University Hospital Leipzig	3MDR-GNB
<i>A. pittii</i>	AP3	DSM 25618 (ATCC 19004)	DSMZ	type strain
<i>A. baumannii</i>	AB1	4/1/13/47	University Hospital Leipzig	4MDR-GNB, MBL
<i>A. baumannii</i>	AB2	4/1/13/38	University Hospital Leipzig	4MDR-GNB, MBL
<i>A. baumannii</i>	AB3	DSM 30007 (ATCC 19606)	DSMZ	type strain, 3MRGN
<i>A. baumannii</i>	AB4	4/1/13/39	University Hospital Leipzig	species-specific wild type resistance pattern
<i>P. aeruginosa</i>	PA1	4/1/13/23	University Hospital Leipzig	3MDR-GNB, MBL
<i>P. aeruginosa</i>	PA2	4/1/13/15	University Hospital Leipzig	4MDR-GNB, MBL
<i>P. aeruginosa</i>	PA3	4/1/13/72	University Hospital Leipzig	3MDR-GNB, MBL
<i>P. aeruginosa</i>	PA4	DSM 939 (ATCC 15442)	DSMZ	reference strain required by VAH
<i>K. oxytoca</i>	KO1	4/1/15/65B	University Hospital Leipzig	3MDR-GNB, ESBL
<i>K. oxytoca</i>	KO2	4/2/4/10	University Hospital Leipzig	3MDR-GNB, ESBL

Veröffentlichungen

<i>K. oxytoca</i>	KO3	DSM 5175 (ATCC 13182)	DSMZ	type strain
<i>K. pneumoniae</i>	KP1	4/1/9/72	University Hospital Leipzig	3MDR-GNB, ESBL
<i>K. pneumoniae</i>	KP2	4/2/9/76	University Hospital Leipzig	3MDR-GNB, ESBL
<i>K. pneumoniae</i>	KP3	4/2/9/58A	University Hospital Leipzig	3MDR-GNB, ESBL
<i>K. pneumoniae</i>	KP4	4/2/9/58B	University Hospital Leipzig	3MDR-GNB, ESBL
<i>K. pneumoniae</i>	KP5	4/1/13/30	University Hospital Leipzig	4MDR-GNB, ESBL
<i>K. pneumoniae</i>	KP6	4/2/2/27	University Hospital Leipzig	4MDR-GNB, ESBL
<i>K. pneumoniae</i>	KP7	DSM 30104 (ATCC 13883)	DSMZ	type strain

Reference and type strains are given in bold. DSMZ - Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures; 3MDR-GNB, 4MDR-GNB - Multidrug-Resistant Gram-Negative bacteria resistant against three or four classes of antibiotics according to the Commission for Hospital Hygiene and Infection Prevention [6]; ESBL - extended-spectrum β -lactamase; MBL - metallo β -lactamase.

Table II. Quantitative suspension test: NaOCl concentrations that achieved a LR \geq 5.

Strain	Bactericidal concentration at different exposure times											
	w/o BSA						w BSA (f. c. 0.03%)					
	1 min		5 min		15 min		1 min		5 min		15 min	
	%	mg/L	%	mg/L	%	mg/L	%	mg/L	%	mg/L	%	mg/L
AP 1	0.004	4	0.004	4	0.004	4	0.16	160	0.16	160	0.08	80
AP 2	0.004	4	0.004	4	0.004	4	0.16	160	0.08	80	0.08	80
AP 3	0.004	4	0.004	4	0.004	4	0.08	80	0.08	80	0.08	80
AB 1	0.004	4	0.004	4	0.004	4	0.16	160	0.16	160	0.08	80
AB 2	0.004	4	0.004	4	0.004	4	0.16	160	0.16	160	0.08	80
AB 3	0.004	4	0.004	4	0.004	4	0.16	160	0.16	160	0.08	80
AB 4	0.008	8	0.008	8	0.004	4	0.16	160	0.08	80	0.08	80
PA 1	0.008	8	0.004	4	0.004	4	0.16	160	0.16	160	0.08	80
PA 2	0.008	8	0.008	8	0.004	4	0.16	160	0.16	160	0.08	80
PA 3	0.008	8	0.008	8	0.004	4	0.16	160	0.16	160	0.08	80

Veröffentlichungen

PA 4	0.004	4	0.004	4	0.004	4	0.16	160	0.08	80	0.08	80
KO 1	0.004	4	0.004	4	0.004	4	0.16	160	0.16	160	0.08	80
KO 2	0.008	8	0.004	4	0.004	4	0.16	160	0.16	160	0.08	80
KO 3	0.004	4	0.004	4	0.004	4	0.16	160	0.16	160	0.08	80
KP 1	0.004	4	0.004	4	0.004	4	0.16	160	0.16	160	0.08	80
KP 2	0.004	4	0.004	4	0.004	4	0.16	160	0.08	80	0.08	80
KP 3	0.008	8	0.008	8	0.004	4	0.16	160	0.16	160	0.08	80
KP 4	0.004	4	0.004	4	0.004	4	0.16	160	0.16	160	0.08	80
KP 5	0.004	4	0.004	4	0.004	4	0.16	160	0.16	160	0.08	80
KP 6	0.004	4	0.004	4	0.004	4	0.16	160	0.16	160	0.08	80
KP 7	0.004	4	0.004	4	0.004	4	0.16	160	0.16	160	0.08	80

Reference and type strains are given in bold. w – with BSA, w/o – without BSA; f. c. – final concentration

Table III. NaOCl concentrations that achieved a LR \geq 5 in practical tests with organic load.

Strain	Bactericidal concentration at a contact time of							
	1 min		5 min		15 min		30 min	
	%	mg/L	%	mg/L	%	mg/L	%	mg/L
AP 1	0.16	160	0.04	40	0.02	20	0.02	20
AP 2	0.16	160	0.04	40	0.02	20	0.02	20
AP 3	0.08	80	0.04	40	0.02	20	0.02	20
AB 1	0.16	160	0.08	80	0.04	40	0.02	20
AB 2	0.16	160	0.04	40	0.04	40	0.02	20
AB 3	0.08	80	0.04	40	0.02	20	0.02	20
AB 4	0.16	160	0.08	80	0.02	20	0.02	20
PA 1	0.16	160	0.08	80	0.04	40	0.02	20
PA 2	0.16	160	0.04	40	0.02	20	0.02	20
PA 3	0.16	160	0.08	80	0.02	20	0.02	20
PA 4	0.16	160	0.04	40	0.04	40	0.02	20
KO 1	0.32	320	0.04	40	0.04	40	0.02	20
KO 2	0.16	160	0.04	40	0.04	40	0.02	20
KO 3	0.16	160	0.04	40	0.04	40	0.02	20
KP 1	0.32	320	0.08	80	0.02	20	0.02	20
KP 2	0.32	320	0.04	40	0.02	20	0.02	20
KP 3	0.32	320	0.08	80	0.02	20	0.02	20
KP 4	0.16	160	0.04	40	0.02	20	0.02	20
KP 5	0.32	320	0.08	80	0.02	20	0.02	20
KP 6	0.16	160	0.04	40	0.02	20	0.01	10

Veröffentlichungen

KP 7	0.16	160	0.04	40	0.02	20	0.01	10
-------------	-------------	------------	-------------	-----------	-------------	-----------	-------------	-----------

Reference and type strains are given in bold.

Supplementary Table I. Results of antibiotic susceptibility testing.

Antibiotic substances	Bacterial strains																				
	<i>A. pittii</i> 4/1/1/20	<i>A. pittii</i> 4/1/13/37	<i>A. pittii</i> DSM 25618	<i>A. baumannii</i> 4/1/13/47	<i>A. baumannii</i> 4/1/13/38	<i>A. baumannii</i> DSM 30007	<i>A. baumannii</i> 4/1/13/39	<i>P. aeruginosa</i> 4/1/13/23	<i>P. aeruginosa</i> 4/1/13/15	<i>P. aeruginosa</i> 4/1/13/72	<i>P. aeruginosa</i> DSM 939	<i>K. oxytoca</i> 4/1/15/65B	<i>K. oxytoca</i> 4/2/4/10	<i>K. oxytoca</i> DSM 5175	<i>K. pneumoniae</i> 4/1/9/72	<i>K. pneumoniae</i> 4/2/9/76	<i>K. pneumoniae</i> 4/2/9/58A	<i>K. pneumoniae</i> 4/2/9/58B	<i>K. pneumoniae</i> 4/1/13/30	<i>K. pneumoniae</i> 4/2/2/27	<i>K. pneumoniae</i> DSM 30104
ESBL	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	+	+	n	+	+	+	+	+	+	n
MRGN	n	3	n	4	4	3	n	3	4	3	n	3	3	n	3	3	3	3	4	4	n
Amoxicillin	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ampicillin	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	(-)
Amoxicillin/ clavulan acid	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	(-)	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
Ampicillin/ Sulbactam	S	S	S	R	R	R	S	(-)	R	(-)	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
Piperazillin	S	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Veröffentlichungen

Piperazillin/ sulbactam	(-)	(-)	(-)	R	R	R	(-)	R	(-)	R	(-)	R	R	(-)	R	R	R	R	R	R	(-)
Piperazillin/ tazobactam	S	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	I	R	R	R	I
Cefalexin	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	R	R	(-)	R	R	R	R	R	R	(-)
Cefalotin	R	R	R	R	R	R	R	R	(-)	R	(-)	R	R	(-)	R	R	R	R	R	R	(-)
Cefazolin	R	R	R	R	R	R	R	(-)	(-)	(-)	(-)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	(-)
Loracarbef	R	R	R	R	R	R	R	R	(-)	R	(-)	R	R	(-)	R	R	R	R	R	R	(-)
Cefuroxime	(-)	(-)	(-)	(-)	R	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	(-)
Cefuroxime- Axetil	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	(-)
Cefoxitin	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	R	R	R	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Cefixime	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	(-)	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
Cefpodoxime	(-)	(-)	(-)	(-)	R	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
Ceftibuten	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	R	R	R	(-)	I	R	S	R	R	R	R	R	R	S
Cefotaxime	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	S	R	R	R	R	R	R	S

Veröffentlichungen

Ceftazidime	S	I	S	R	R	R	I	S	R	R	S	S	R	S	I	R	R	R	R	R	S
Ceftriaxone	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	(-)	I	R	S	R	R	R	R	R	R	S
Cefepime	(-)	(-)	(-)	(-)	R	(-)	(-)	S	R	S	(-)	(-)	R	S	R	R	R	R	R	R	S
Aztreonam	(-)	(-)	(-)	(-)	R	(-)	(-)	I	R	I	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	S
Ertapenem	(-)	(-)	(-)	(-)	R	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S
Imipenem	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I	S
Meropenem	S	S	S	R	R	S	S	I	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I	S
Amikacin	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	S	R	S	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	S
Gentamicin	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S
Tobramycin	(-)	(-)	(-)	(-)	R	(-)	(-)	R	R	S	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	S
Ciprofloxacin	S	R	S	R	R	I	R	R	R	S	S	I	I	S	I	I	R	R	R	R	S
Levofloxacin	S	R	S	R	R	I	R	R	I	S	(-)	I	I	S	I	I	R	R	R	R	S
Moxifloxacin	(-)	(-)	(-)	(-)	R	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
Doxycycline	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	R	(-)	R	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Tigecycline	IE	IE	IE	(-)	(-)	IE	IE	(-)	(-)	(-)	R	S	S	S	S	I	R	R	R	R	S

Veröffentlichungen

Colistin	(-)	(-)	(-)	(-)	S	(-)	(-)	S	R	S	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	S
Trimethoprim	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R	(-)	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S
Trimethoprim/ Sulfameth- oxazole	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	S	(-)	(-)

S – sensitive, I – intermediary, R – resistant, IE – insufficient evidence for species being an adequate target for antibiotic therapy, (-) not tested, MRGN – multi-resistant Gram-negative bacteria, ESBL – extended-spectrum beta-lactamase, n – negative

Supplementary Table II. Results of MIC determination and qualitative suspension tests.

Strain	MIC after 48 h of incubation		Bactericidal concentration determined by qualitative suspension tests at a contact time of					
			1 min		5 min		15 min	
	%	mg/L	%	mg/L	%	mg/L	%	mg/L
AP 1	0.1	100	0.00025	0.25	0.00025	0.25	0.00025	0.25
AP 2	0.1	100	0.0005	0.5	0.0005	0.5	0.0005	0.5
AP 3	0.1	100	0.0005	0.5	0.0005	0.5	0.0005	0.5
AB 1	0.1	100	0.001	1	0.001	1	0.0005	0.5
AB 2	0.1	100	0.0005	0.5	0.0005	0.5	0.0005	0.5
AB 3	0.1	100	0.0005	0.5	0.0005	0.5	0.0005	0.5
AB 4	0.1	100	0.001	1	0.001	1	0.001	1
PA 1	0.2	200	0.002	2	0.001	1	0.001	1
PA 2	0.2	200	0.002	2	0.001	1	0.001	1
PA 3	0.2	200	0.002	2	0.001	1	0.001	1
PA 4	0.2	200	0.001	1	0.001	1	0.001	1
KO 1	0.1	100	0.0005	0.5	0.0005	0.5	0.0005	0.5
KO 2	0.1	100	0.0005	0.5	0.0005	0.5	0.0005	0.5
KO 3	0.1	100	0.0005	0.5	0.0005	0.5	0.0005	0.5
KP 1	0.1	100	0.0005	0.5	0.0005	0.5	0.0005	0.5
KP 2	0.1	100	0.0005	0.5	0.0005	0.5	0.0005	0.5
KP 3	0.2	200	0.0005	0.5	0.0005	0.5	0.0005	0.5
KP 4	0.2	200	0.0005	0.5	0.0005	0.5	0.0005	0.5
KP 5	0.1	100	0.0005	0.5	0.0005	0.5	0.0005	0.5

Veröffentlichungen

KP 6	0.2	200	0.0005	0.5	0.0005	0.5	0.0005	0.5
KP 7	0.1	100	0.0005	0.5	0.0005	0.5	0.0005	0.5

Reference and type strains are given in bold.

3.2 Veröffentlichung 2

Evaluation of disinfectant-efficacy against multidrug-resistant bacteria: A comprehensive analysis of different methods

Anne T. Köhler VD, Arne C. Rodloff MD, Prof. Dr., Manja Labahn, Mario Reinhardt, Uwe Truyen VD, Prof. Dr., Stephanie Speck VD, Dr.

American Journal of Infection Control 2019, im Druck, Artikelreferenz YMIC 5167

Eigenanteil

Die Autorin dieser Arbeit hat in folgenden Anteilen zur Publikation „Evaluation of disinfectant-efficacy against multidrug-resistant bacteria: A comprehensive analysis of different methods“ beigetragen:

Das der Publikation zugrundeliegende Projekt „Untersuchungen zur wirksamen Desinfektion von bedeutenden gegen Antibiotika multiresistente Erreger (MRE) in der Human- und Veterinärmedizin“ wurde im Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. vet. Uwe Truyen durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Prof. Dr. med. vet. Uwe Truyen und Frau Dr. med. vet. Stephanie Speck in Zusammenarbeit mit dem Sächsischen Staatsministerium für Soziales und Verbraucherschutz, welches die Studie finanzierte.

Die Methodik war durch die VAH vorgegeben. Das Versuchsdesign wurde in Absprache mit Frau Dr. Speck festgelegt. Sämtliche Laborversuche wurden von der Autorin der Dissertation eigenständig geplant und mit der Unterstützung von Frau Manja Labahn sowie Herrn Mario Reinhardt durchgeführt. Es erfolgte eine regelmäßige Datenauswertung und Anpassung des Versuchsablaufes mit Frau Dr. Speck. Die statistische Auswertung der Datenerhebung erfolgte durch die Autorin.

Die Literaturrecherche erfolgte durch die Autorin. Das Manuskript für die Publikation wurde unter Anleitung von Frau Dr. Speck selbständig durch die Autorin verfasst und in Zusammenarbeit mit den Koautoren fertig gestellt. Es wurden keine weiteren als die angegebenen Quellen verwendet.

Running title: Disinfection of multidrug-resistant bacteria

Evaluation of disinfectant-efficacy against multidrug-resistant bacteria: A comprehensive analysis of different methods.

Anne T. Köhler VD^a, Arne C. Rodloff MD, Prof. Dr.^b, Manja Labahn^{a,b}, Mario Reinhardt^a, Uwe Truyen VD, Prof. Dr.^a, Stephanie Speck VD, Dr.^{a*}

^a Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig, Germany; a.koehler@gmx.de; reinhardt@vetmed.uni-leipzig.de; truyen@vetmed.uni-leipzig.de; stephanie.speck@vetmed.uni-leipzig.de

^b Institute of Medical Microbiology and Epidemiology of Infectious Diseases, University of Leipzig, Liebigstraße 21, 04103 Leipzig, Germany; acr@medizin.uni-leipzig.de; manja.labahn@medizin.uni-leipzig.de

* Corresponding author:

Dr. Stephanie Speck

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen

Universität Leipzig

An den Tierkliniken 1

04103 Leipzig

stephanie.speck@vetmed.uni-leipzig.de

0049 – 341 9738 153 (business)

0049 – 341 33134441 (home)

Keywords

disinfection, ethanol, peracetic acid, benzalkonium chloride, multidrug-resistant bacteria

Highlights

- Comparison of four methods used to test surface disinfectant efficacy.
- PAA, ETH, and BAC were effective against MDR-GNB.
- *Acinetobacter* were more susceptible to 1 min BAC than *Klebsiella* or *Pseudomonas*.
- Efficacy determination markedly depended on the test method used.
- Surface tests should be used to evaluate disinfectants used on healthcare surfaces.

Abstract

Background: Multidrug-resistant Gram-negative bacteria (MDR-GNB) constitute a threat to health care worldwide. Disinfectants are used to prevent and control spread of MDR-GNB in a hospital setting but their efficacy might be impaired by bacterial mechanisms that may act on both antimicrobials and disinfectants. MIC-determination is mainly used to determine bacterial susceptibility against disinfectants but practical tests on surfaces might be more suitable to predict in use-conditions.

Objective: To compare and evaluate four different methods widely used to assess surface disinfectant efficacy.

Methods: Efficacy of Benzalkonium chloride (BAC), peracetic acid (PAA), and ethanol (ETH) against MDR *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, and *Klebsiella* strains was assessed by MIC-determination, quantitative suspension test, qualitative suspension test, and carrier tests. Test results were compared to ascertain the most appropriate method.

Results: ETH, PAA, and BAC were highly effective against MDR-GNB but marked differences up to 100-fold in efficacious concentrations were noticed as a function of the test method applied. MIC-determination was not reliable to evaluate susceptibility or resistance to BAC.

Conclusion: Surface tests should be used to determine bacterial susceptibility against disinfectants. Moreover, suitable guidelines are needed that allow for standardization and comparison of bactericidal values obtained by different investigators.

Background

Multidrug-resistant Gram-negative bacteria (MDR-GNB) constitute an important threat to healthcare worldwide.¹ Recent German surveillance data revealed a prevalence of MDR-GNB up to 3.6% in patients at hospital admission. Moreover, several reports about nosocomial outbreaks of multidrug-resistant (MDR) *Klebsiella (K.) pneumoniae* and *Acinetobacter (A.) baumannii* partly over long periods of time underline the essential role of infection prevention and control interventions.²⁻⁹ Apart from identifying patients colonized with MDR-GNB, isolation of cases, strict barrier precautions and hand hygiene of health care workers, the identification and eradication of environmental reservoirs (e.g. contaminated healthcare surfaces) is of utmost importance as they play a significant role in pathogen transmission. Most nosocomial pathogens including MDR-GNB can persist on dry inanimate surfaces for months.^{1,9,10} Guidelines for the control of MDR-GNB in Germany as well as in other countries have been established including cleaning and disinfection as important interventions.¹⁰⁻¹⁴ Nevertheless, more research has been required regarding strategies ensuring reliable decontamination.¹ Surface disinfectants are regularly used in infection control and should conform to standards e.g. the European standards for chemical disinfectants and biocides or comparable national standards. In Germany, the “List of Disinfectants” issued by the Disinfectants Commission in the Association for Applied Hygiene (VAH) serves as the basis for selection of appropriate disinfection procedures for routine and prophylactic disinfection in the medical area. The VAH further provides requirements and methods for certification of chemical disinfection procedures. Using VAH listed products meets the quality assurance requirements stipulated by infection control regulations at federal state level.

There has been justified concern about the efficacy of disinfectants in relation to bacterial mechanisms that impair biocide action.¹⁵⁻¹⁷ These mechanisms include for example expression of efflux pumps and lowered permeability of the bacterial outer membrane. Bacterial biocide adaptation and resistance have also been reported.¹⁸⁻²⁰ Numerous studies on bacterial susceptibility to biocides have already been conducted including MDR bacteria.²¹⁻²⁹ Compared to antimicrobial susceptibility testing, there is no definition of biocide resistance based on breakpoints^{15,25} but it was defined as bacterial survival at in-use concentrations of disinfectants.¹⁵ Many studies determined minimum inhibitory concentrations (MICs) or minimum bactericidal concentrations (MBCs) to evaluate biocide susceptibility or resistance as these provide simple procedures.^{30,31} However, these tests do not consider that surface disinfectants applied to healthcare surfaces are expected to be effective within short contact times.³² Therefore, practical tests on surfaces more closely represent in-use conditions and might be more suitable to predict disinfectant-efficacy. Moreover, it has been described that test method significantly influences test outcome, thus also the interpretation of susceptibility or resistance against disinfectants.³³ There are several groups of active substances used for

biocide products including disinfectants. The present study was conducted to compare methods commonly used to evaluate surface disinfectant efficacy. The aim was to determine the most suitable method to assess bacterial resistance against surface disinfectants. The efficacy of ethanol, benzalkonium chloride, and peracetic acid against selected strains of MDR *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella* spp., and corresponding reference strains was assessed *in vitro* by MIC-testing, qualitative and quantitative suspension tests, and practical surface tests without mechanical action. These active substances are widely used in healthcare settings, veterinary medicine, animal husbandry, and food industry.

Material and Methods

Test organisms

Sixteen bacterial isolates comprising *A. pittii*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. oxytoca*, and *K. pneumoniae* were included in this study (Table 1). They were cultured from diagnostic samples during the year 2015 at the university hospital of Leipzig, Germany. Isolates originated from different patients (except KP3 and KP4; Table 1) and several different hospital sections. Based on phenotypic resistance characteristics (i.e. resistance against three or four classes of antibiotics), most of them were classified as 3MDR-GNB or 4MDR-GNB.¹¹ Reference and type strains were obtained from the Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, Germany). *P. aeruginosa* strain DSM 939 was used as a species-specific reference strain but is also required as test organism by the German Association for Applied Hygiene (VAH) Disinfectants Commission.³⁴ As no reference strains for the genera *Klebsiella* and *Acinetobacter* are provided by the VAH, the corresponding species-specific type strains were chosen.³⁴ Antibiotic susceptibilities (data can be offered upon request) of all strains were determined prior to disinfectant testing using the VITEK®2 technology (bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen, Germany). As the type strain of *A. baumannii* (DSM 30007) was unexpectedly identified as 3MDR-GNB, a clinical *A. baumannii* isolate with species-specific wild-type resistance patterns was used as a control.

Susceptibility testing

Disinfectant testing was performed according to the VAH guidelines³⁴, which are equivalent to European standards³⁵, but included MIC-testing and qualitative suspension tests as ancillary methods. We assumed a disinfectant efficacy at concentrations below 1% with the exception of ethanol and benzalkonium chloride. Concentration ranges were chosen according to VAH guidelines and a preceding study and were adjusted step-wise where necessary.^{34,36} Bacteria were grown (37°C, 24 h) from stock cultures biweekly on Columbia sheep blood agar^{PLUS} (Oxoid GmbH, Wesel, Germany). Bacterial test suspensions contained 1.5–5.0×10⁸ colony-forming

units (cfu)/ml, except for the practical tests on steel carriers ($1.5\text{--}5.0 \times 10^9$ cfu/ml). Ethanol (99.8%, CAS-No. 64-17-5, AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany), peracetic acid (15%, CAS-No. 79-21-0, AppliChem GmbH), and benzalkonium chloride ($\geq 99.9\%$, CAS-No. 63449-41-2, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, Germany) were tested as single active substances. Disinfectant dilutions were prepared in water of standardized hardness (WSH) immediately before testing.³⁴ With the exception of ethanol (ETH) serial dilutions were two-fold. Ethanol was diluted at 1%-steps (MIC-testing) or 5%-steps (suspension tests, carrier tests). Growth controls were conducted using WSH instead of disinfectant. The neutralizer used for quenching disinfectant activity was tryptic soy broth (TSB; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) containing polysorbate 80 (30g/l), lecithin (3 g/l), l-histidine (1 g/l), and sodium thiosulfate (5 g/l).

MICs were assessed by broth macrodilution (VAH method 7).³⁴ Screw-cap tubes were filled with equal volumes of double-concentrated disinfectant and TSB, mixed and 50 μ l of bacterial test suspensions (diluted 1:10 in TSB) were added. After 48 h of incubation at 37°C, bacterial growth was evaluated visually.

Bactericidal concentrations were determined by qualitative suspension tests (VAH method 8).³⁴ One hundred microliter of bacterial test suspensions were inoculated into 10 ml of the respective disinfectant dilution and gently mixed. After the respective exposure time recommended by VAH (i.e. 1, 5, 15, 30, and 60 min) at 20°C, 100 μ l aliquots were transferred to 10 ml of neutralizer, incubated for 48 h at 37°C and evaluated as described above.³⁴

To further evaluate the bactericidal activity of disinfectants, quantitative suspension tests with and without organic load (0.3% bovine serum albumin (BSA) solution; Albumin Fraktion V, Carl Roth) were performed at 20°C. Out of the suggested exposure times 1, 5, and 15 min were chosen (VAH method 9, equivalent to EN 13727).³⁴ Briefly, disinfectant dilutions (8 ml) were mixed with WSH or BSA (1 ml; final concentration 0.03%) and 1 ml bacterial suspension was added. After the appropriate exposure time, 500 μ l were transferred to 4.5 ml neutralizer for 5 min. An aliquot of 100 μ l was subsequently plated on agar and incubated for 48 h at 37°C. Bacteria were counted and logarithmic reductions (LR) in viable counts calculated as described by DIN EN 13727:2014-01.³⁷ For sufficient bactericidal efficacy, a $\text{LR} \geq 5$ in viable counts was requested.³⁴ Biocide-efficacy under practical conditions with organic load (i.e. surface disinfection without mechanical action, VAH method 14.1, equivalent to EN 13697) was evaluated using stainless steel carriers (GK-Formblech GmbH, Berlin, Germany).³⁴ A 50 μ l drop of bacterial suspensions was dried (37°C, 60 min) on stainless steel carriers and covered with 100 μ l of disinfectant for the respective exposure time suggested by VAH guidelines (i.e. 1, 5, 15, 30 min at 20°C).³⁴ Subsequently carriers were transferred to 10 ml neutralizer and bacteria were detached using a horizontal shaking device. Bacteria were counted and LR values were

calculated as described above. In all tests each disinfectant concentration was tested in duplicates and all tests were independently repeated once.

Statistical analyses

Differences in bacteriostatic and bactericidal values for bacterial genera as well as for MDR-GNB strains and reference strains were evaluated using Fisher's exact test. A one-dilution difference between values was regarded as within the error of the test. The influence of exposure time and organic load was assessed using Mann–Whitney U-test. Differences were regarded as significant for $P < 0.05$ (two-sided). Analyses were done using SPSS, Version 22 (IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Germany).

Results

Minimum inhibitory concentrations

MICs determined after 48 h contact time ranged from 4% to 6% (v/v) for ETH, 0.003% to 0.025% for peracetic acid (PAA), and 0.001% to 0.01% for benzalkonium chloride (BAC) (data can be offered upon request). Among strains of a single species MICs varied up to four times but between species differences up to 40-fold were observed. Overall, the group of *Acinetobacter* strains displayed the highest susceptibility to PAA ($P = 0.0001$) and BAC ($P = 0.0039$) compared with *Pseudomonas* and *Klebsiella* strains. *P. aeruginosa* isolates were significantly less susceptible to BAC ($P = 0.0002$).

Qualitative suspension tests

When compared with MICs, bactericidal concentrations for ETH were up to ten times higher in qualitative suspension tests (data can be offered upon request). Differences among and between species were 10% ETH at maximum. PAA and BAC revealed results similar to MICs, however, up to ten times higher values were obtained at a certain contact time (e.g. strain AB 4, BAC, 1 min). At most contact times bactericidal PAA values differed up to fourfold among species. When compared with all other strains, *Klebsiella* strains KO2, KP5, KP6, and KP7 revealed a significantly higher susceptibility to PAA ($P = 0.0002$). Moreover, *Klebsiella* strains KO2, KP6, and KP7 were eliminated by significantly lower bactericidal concentrations at 5 min contact time ($P = 0.0008$) which was also the case for strains KO2 and KP 7 at 15 min contact time ($P = 0.0048$). In tests using BAC the group of *P. aeruginosa* strains was significantly less susceptible ($P < 0.05$) compared with *Klebsiella* and *Acinetobacter* strains. Increasing contact time from 1 min to 15 min had a significant influence on bactericidal PAA values ($P < 0.05$) while enhancing contact time overall had an influence on bactericidal BAC values ($P < 0.05$).

Quantitative suspension tests

Efficacious bactericidal concentrations were recorded if a LR ≥ 5 in viable counts was achieved. Overall, bactericidal values determined by this test method were mainly similar to those from qualitative suspension tests. ETH-values determined at a respective contact time differed only marginally among as well as between species. Compared with all other strains, a significantly lower bactericidal PAA concentration was determined for *K. oxytoca* strain KO2 without BSA and *Pseudomonas* strain PA4 with BSA at 15 min contact time, respectively ($P = 0.0476$). In concordance with qualitative suspension tests *Pseudomonas* strains were significantly less susceptible to BAC at all exposure times compared with other strains ($P < 0.05$). A decrease in bactericidal values up to eight-fold was noticed for single strains after increasing contact time from 1 min to 15 min. Organic soiling had no significant influence on the efficacy of any of the disinfectants tested ($P > 0.05$). Results are given in Table 2.

Carrier test

Bactericidal ETH values were similar to those obtained from qualitative and quantitative suspension tests. Values determined for PAA and BAC were at maximum 16-fold and 64-fold higher compared to those obtained from quantitative suspension tests (Table 3, e.g. PAA at 1 min, strain KO1; BAC at 1 min: strains AP1 and PA1) and exceeded 100-fold for BAC compared to qualitative suspension tests. *K. pneumoniae* strain KP7 displayed the highest susceptibility ($P < 0.05$) to PAA. Compared to other KP strains as well as to other species a LR ≥ 5 was achieved at up to 16 times lower PAA concentrations. Overall, the lowest PAA concentrations were needed to eliminate *P. aeruginosa* strains at all contact times. Carrier tests confirmed the significantly lowest susceptibility of *P. aeruginosa* strains against BAC as well as the higher sensitivity of *Acinetobacter* spp. compared to *Klebsiella* spp. ($P < 0.05$). Contact time had no pronounced effect on bactericidal concentrations with the exception of BAC at 1 min contact time. Compared with all contact times, significantly higher bactericidal concentrations were needed to efficiently reduce viable counts of all strains at that time ($P < 0.05$). Results are displayed in Table 3.

Discussion

Disinfection is essential for the control of infectious diseases. With growing reports on MDR bacteria concern has been raised regarding the development of disinfectant resistance, in particular cross-resistance to antibiotics.³⁸ Therefore, it is important to ensure the efficacy of chemical surface disinfectants especially in nosocomial disease events. In the study at hand, efficacy testing was performed according to the guidelines of the VAH Disinfectants Commission, one of the most important German reference institutions for issuance of

certificates and listing of disinfection procedures. These guidelines are equivalent to European Standards but include additional exploratory tests.³⁵ Test guidelines from other countries differ e.g. in reference strains or methodology.^{39,40} Reference strains are recommended for disinfectant testing but in Germany no reference values exist for standardized quality control.³⁴ This is mainly because testing is generally performed on commercial disinfectants with concentrations and application processes specified by the manufacturer for a respective product. Concurrent testing of reference substances (corresponding to the class of active substances) is not compulsory for bactericidal efficacy testing according to VAH or European Standards. Moreover, compared to antimicrobial susceptibility testing, there is no definition of bacterial disinfectant resistance based on breakpoints.^{15,25} Resistance against biocides was defined as bacterial survival at in-use concentrations of a biocide. In addition, a bacterial strain is characterized as biocide-resistant at a concentration that inactivates other strains of that organism.¹⁵ There are numerous studies on bacterial susceptibility to biocides including MDR isolates.²¹⁻²⁹ However, comparison of results is difficult or even unfeasible due to differences in test methods which markedly influence test outcome.^{30,33,41} Many authors used MIC-determination as it is routine in antibiotic susceptibility testing. However, as disinfectants are used to sufficiently reduce bacteria from surfaces within a short period of time, the assessment of minimum bactericidal concentrations at least is more trustworthy.^{17,32} Moreover, values may differ vastly depending on the disinfectant and the test method used, as has been described for sodium hypochlorite with a 500-fold difference between MIC and suspension test results and was also noticed for BAC in the present study.³³ Thus, practical tests on surfaces with or without mechanical action are more suitable to predict the efficacy of a disinfectant because they mimic in-use conditions.

We focused on single active substances that are classified as high- (PAA), intermediate- to low- (ETH) and low-level disinfectant (BAC) according to their level of inactivation reached.⁴² A wide range of dilutions was tested at the same contact time to determine the efficacious range. Commercial products often contain additional ingredients which may enhance activity but allow no conclusion regarding the activity of a particular substance. Time frames from 1 min to 60 min were selected according to the VAH guidelines.³⁴ Short contact times appear to be most suitable for prophylactic routine surface disinfection in healthcare. However, cleaning and disinfection measures should also be appropriate for risk areas (e.g. intensive care units, surgical departments, isolation ward) or a specific pathogen which may require higher concentrations and longer contact time compared to routine disinfection.⁴³ Users must ensure that the surface is evenly wetted by the disinfectant which must remain there for the duration of the required contact time (concentration-time-ratio), possibly by reapplying the product more than once.

MICs and bactericidal concentrations determined by qualitative suspension tests revealed that these values mainly lay well below in-use concentrations of commercial products at a given contact time. Overall, our results were similar to those reported elsewhere.^{24-29,44,45} Quantitative suspension test results were mainly similar to those from qualitative suspension tests. Compared to other studies using quantitative suspension tests only few are in concordance with our results.^{27,46-51} Up to 25-fold less (BAC) as well as up to 33-fold higher concentrations (PAA) at identical contact times have been reported.^{47,49,50} Organic soiling (i.e. 0.3% BSA) had no significant influence on the efficacy of any of the disinfectants tested ($P > 0.05$) which is in contrast to other studies using BAC.^{52,53}

Significantly higher concentrations of PAA (of as much as 16-fold) and BAC (up to 64-fold) were determined in practical surface tests compared with quantitative suspension tests ($P = 0.00001$). This might be attributed to the fact that bacteria attached on surfaces have a different phenotype and more readily resist antimicrobial treatment than cells in suspension which, depending on disinfectant and attachment time, might result in higher disinfectant concentrations needed.⁵⁴⁻⁵⁷ This has also been demonstrated for dry surface biofilms which are almost ubiquitous on hospital surfaces, despite regular cleaning and disinfection.^{58,59} However, standardized efficacy tests against biofilm do not exist in Germany or the EU. These findings imply that MIC-testing or suspension tests may reveal putatively efficacious concentrations and this is supported by our results for BAC. Commercially available surface disinfectant concentrates contain up to > 20 g BAC/100 g and the lowermost contact time usually given is 15 min. Assuming BAC as single ingredient, most products would sufficiently kill *Acinetobacter*, *Klebsiella*, and *P. aeruginosa* strains within 15 min. Nevertheless, values determined at 15 min for all *P. aeruginosa* strains and for *P. aeruginosa* strain PA4 at 30 min exceeded in-use concentrations of certain commercial products containing BAC, hence these strains would have been classified as resistant whereas all strains were fully susceptible based on MICs and suspension tests. Overall, similar results but lower as well as higher bactericidal values were described by other authors.^{46,60-64}

Comparing all methods applied in the current study, inter- and intra-species susceptibility to disinfectants varied depending on the method. BAC gave concordant results throughout all tests in that *P. aeruginosa* strains were least susceptible whereas *Acinetobacter* strains were most susceptible. Noteworthy, bactericidal BAC values nevertheless differed up to more than 100-fold compared to MICs. It has been suggested that high concentrations of nutrient salts in MIC-test media lower the effective concentration of BAC hence MIC-testing does not give a true reflection of the intrinsic activity of BAC.⁶⁵ As determined by MICs *Acinetobacter* species were highest susceptible to PAA whereas individual *Klebsiella* strains revealed significantly highest susceptibility in suspension and carrier tests. This was also noticed for *P. aeruginosa* strain PA4 at 15 min contact time with organic soiling in the quantitative suspension test.

Differences in bactericidal concentrations were highest when comparing quantitative suspension and carrier tests. ETH values differed 10-fold at maximum between MICs and qualitative suspension tests but overall variation between strains as well as between methods was less pronounced. Culture media influence test outcome^{51,66} and this may also account for varying results as MIC-determination was carried out by broth-macrodilution using TSB. Although no distinct differences in susceptibility against ETH, PAA, and BAC were detected between reference strains and MDR-GNB, single strains required higher bactericidal values for individual disinfectants as e.g. seen for *K. oxytoca* strain KO1 and PAA. Moreover, although the active substances tested here were effective against MDR-GNB, some biocides currently used in hospitals can be ineffective against nosocomial pathogens growing as wet or dry biofilms attached to surfaces. This strengthens the need to test for disinfectant susceptibility if MDR isolates are recurring in order to prevent severe infections and fatal outcomes as has been described elsewhere.^{27,28,67,68}

Conclusion

Overall, we found that ETH, PAA, and BAC were effective against clinically relevant MDR-GNB. Nevertheless, according to carrier test results *P. aeruginosa* strains used in this study could be classified as resistant to BAC depending on the product used. Strain- and species-specific differences in bactericidal concentrations were seen, but in general, MDR-GNB revealed no higher insensitivity to the disinfectants tested. Marked differences in efficacious concentrations were noticed as a function of the test method applied leading to the conclusion that MIC-determination might not be the best approach to evaluate susceptibility or resistance to biocides. Practical surface tests are laborious but are most suitable to test for in-use efficacy and should be used to evaluate disinfectants used on healthcare surfaces. Moreover, suitable guidelines are strongly needed to ensure standardized disinfectant susceptibility testing and to allow for the comparison of results obtained by different investigators.

Acknowledgments

The authors are thankful to the Saxon State Ministry of Social Affairs and Consumer Protection for funding the study.

Declaration of interest:

None.

Source of funding:

This study was funded by the Saxon State Ministry of Social Affairs and Consumer Protection. The funder had no role in study design, data collection, analysis and interpretation, writing of the report, or in the decision to submit the article for publication.

References

1. Gray JW, Mahida N. How do you solve a problem like multidrug-resistant Gram-negative bacteria? *J Hosp Infect* 2016;92:1-2.
2. Stolaroff-Pépin A, Arvand M, Mielke M. Bericht zum Treffen der Moderatoren der regionalen MRE-Netzwerke am Robert Koch-Institut. *Epid Bull* 2017;41:465-70. German.
3. Ducombe T, Fauchoux S, Helbig U, Kaisers U, König B, Knaust A, et al. Large hospital outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae*: investigating mortality and the impact of screening for KPC-2 with polymerase chain reaction. *J Hosp Infect* 2015;89:179-85.
4. Lübbert C, Lippmann N, Busch T, Kaisers UX, Ducombe T, Eckmanns T, et al. Long-term carriage of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2-producing *K. pneumoniae* after a large single-center outbreak in Germany. *Am J Infect Control* 2014;42:376-80.
5. Steinmann J, Kaase M, Gatermann S, Popp W, Steinmann E, Damman M, et al. Outbreak due to a *Klebsiella pneumoniae* strain harbouring KPC-2 and VIM-1 in a German university hospital, July 2010 to January 2011. *Euro Surveill* 2011;16:19944.
6. Wendt C, Schütt S, Dalpke AH, Konrad M, Mieth M, Trierweiler-Hauke B, et al. First outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* in Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010;29:563-70.
7. Kohlenberg A, Brummer S, Higgins PG, Sohr D, Piening BC, Grahl C, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the carbapenemase OXA-23 in a German university medical centre. *J Med Microbiol* 2009;58:1499-507.
8. Zollner-Schwetz I, Zechner E, Ullrich E, Luxner J, Pux C, Pichler G, et al. Colonization of long term care facility patients with MDR-Gram-negatives during an *Acinetobacter baumannii* outbreak. *Antimicrob Resist Infect Control* 2017;6:934.

Veröffentlichungen

9. Molter G, Seifert H, Mandraka F, Kasper G, Weidmann B, Hornei B, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in the intensive care unit: a multi-level strategic management approach. *J Hosp Infect* 2016;92:194-8.
10. Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases* 2006;6:130.
11. Commission for hospital hygiene and infection prevention (KRINKO) at the Robert Koch Institute (RKI). [Hygiene measures for infection or colonization with multidrug-resistant gram-negative bacilli. Commission recommendation for hospital hygiene and infection prevention (KRINKO) at the Robert Koch Institute (RKI)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2012;55:1311-54. German. Erratum in: *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2013;56:1342.
12. Otter JA, Mutters NT, Tacconelli E, Gikas A, Holmes AH. Controversies in guidelines for the control of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in EU countries. *Clin Microbiol Infect* 2015;21:1057-66.
13. Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L, the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Management of Multidrug-Resistant Organisms In Healthcare Settings, 2006. Available from: <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/mdro/> (last accessed December 28th 2018).
14. Wilson APR, Livermore DM, Otter JA, Warren RE, Jenks P, Enoch DA, et al. Prevention and control of multi-drug-resistant Gram-negative bacteria: recommendations from a Joint Working Party. *J Hosp Infect* 2016;92:S1-44.
15. Russell AD. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Lancet Infect Dis* 2003;3:794-803.
16. Chuanchuen R, Beinlich K, Hoang TT, Becher A, Karkhoff-Schweizer RR, Schweizer, HP. Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects nfxB mutants overexpressing MexCD-OprJ. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:428-32.
17. Maillard J-Y. Emergence of bacterial resistance to microbicides and antibiotics. *Microbiol Aust* 2010;31,159-64.
18. Li X-Z, Nikaido H, Williams KE. Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag⁺ and are deficient in porins. *J Bacteriol* 1997;179:6127-32.
19. Russell AD. Mechanisms of bacterial insusceptibility to biocides. *Am J Infect Control* 2001;29:259-61.

20. Russell AD. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. *J Hosp Infect* 2004;57:97-104.
21. Pinon A, Alexandre V, Cupferman S, Crozier A, Vialette M. Growth, survival and inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* strains of various origin in the presence of ethanol. *Int J Cosmet Sci* 2007;29,111-9.
22. Spoering AL, Lewis K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bakteriol* 2001;183:6746-51.
23. Jaglic Z, Červinková D, Vlková H, Michu E, Kunová G, Babák V. Bacterial biofilms resist oxidizing agents due to the presence of organic matter. *Czech J Food Sci* 2012;30:178-87.
24. Hammond SA, Morgan JR, Russel AD. Comparative susceptibility of hospital isolates of Gram-negative bacteria to antiseptics and disinfectants. *J Hosp Infect* 1987;9:255-64.
25. Morrissey I, Oggioni MR, Knight D, Curiao T, Coque T, Kalkanci, et al. Evaluation of epidemiological cut-off values indicates that biocide resistant subpopulations are uncommon in natural isolates of clinically-relevant microorganisms. *PLoS One* 2014;9(1).
26. Lear JC, Maillard J-Y, Dettmar PW, Goddard PA, Russell AD. Chloroxyleneol- and triclosan-tolerant bacteria from industrial sources – susceptibility to antibiotics and other biocides. *Int Biodeterior Biodegradation* 2006;57:51-6.
27. Kawamura-Sato K, Wachino J, Kondo T, Ito H, Arakawa Y. Reduction of disinfectant bactericidal activities in clinically isolated *Acinetobacter* species in the presence of organic material. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:568-76.
28. Kawamura-Sato K, Wachino J, Kondo T, Ito H, Arakawa Y. Correlation between reduced susceptibility to disinfectants and multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter* species. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:1975-83.
29. Özkurt Z, Altoparlak Ü, Erol S, Çelebi S. Efficacy of widely used disinfectants and antiseptics against nosocomial bacterial isolates. *Mikrobiyol Bült* 2003;37:157-62. Turkish.
30. Thomas L, Russel AD, Maillard J-Y. Antimicrobial activity of chlorhexidine diacetate and benzalkonium chloride against *Pseudomonas aeruginosa* and its response to biocide residues. *J Appl Microbiol* 2005;98:533-43.
31. Langsrud S, Sundheim G. Factors influencing a suspension test method for antimicrobial activity of disinfectants. *J Appl Microbiol* 1998;85:1006-12.

Veröffentlichungen

32. Omidbakhsh N. Theoretical and Experimental Aspects of Microbicidal Activities of Hard Surface Disinfectants: Are Their Label Claims Based on Testing Under Field Conditions? *J AOAC Int* 2010;93:1944-51.
33. Köhler AT, Rodloff AC, Labahn M, Reinhardt M, Truyen U, Speck S. Efficacy of sodium hypochlorite against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *J Hosp Infect* 2018;pii:S0195-6701(18)30381-5.
34. Association for Applied Hygiene (VAH) Disinfectants Commission. Requirements and methods for VAH certification of chemical disinfection procedures. Wiesbaden: mhp-Verlag GmbH; 2015.
35. Exner M, Gebel J. Mitteilung der Desinfektionsmittel-Kommission im VAH zur Äquivalenz der Desinfektionsmittel-Testung gemäß VAH-Methoden und der Testung gemäß den aktuellen europäischen Normen. *Hyg Med* 2016;41-3. German.
36. Feßler AT, Schug AR, Geber F, Scholtzek AD, Merle R, Brombach J et al. Development and evaluation of a broth macrodilution method to determine the biocide susceptibility of bacteria. *Vet Microbiol* 2018;223:59-64.
37. DIN EN 13727:2014-01. Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity in the medical area - Test method and requirements (phase 2, step 1); German version, 2014.
38. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999;12(1):147-179. Review. Erratum in: *Clin. Microbiol. Rev* 2001;14:227.
39. Anonymous. Product Performance Test Guideline, OCSPP 810.2200: Disinfectants for Use on Environmental Surfaces, Guidance for Efficacy Testing, EPA 712-C-17-004, 2018.
40. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official Methods of Analysis, 15th edition, 1990. Arlington, VA.
41. Van Klinger B. Disinfectant testing on surfaces. *J Hosp Infect* 1995;30 (Supplement):397-408.
42. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR). Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides. European Commission, Brussels, Belgium; 2009. Available from: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihr/docs/scenihr_o_021.pdf (last accessed March 28th 2019).

43. Working Group "Hygiene in Hospital and Practice" of AWMF (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, Association of the Scientific Medical Societies) House cleaning and surface disinfection. AWMF-Register 029/030; 2015. Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/029-030l_S1_Hygiene_Hausreinigung_Flaechendesinfektion_2015-09.pdf (last accessed March 28th 2019).
44. Ohta S, Misawa Y, Miyamoto H, Makino M, Nagai K, Shiraishi T, et al. A comparative study of characteristics of current-type and conventional-type cationic bactericides. *Biol Pharm Bull* 2001;24:1093-6.
45. Kampf G, Meyer B, Goroncy-Bermes P. Comparison of two test methods for the determination of sufficient antimicrobial activity of three commonly used alcohol-based hand rubs for hygienic hand disinfection. *J Hosp Infect* 2003;55:220-5.
46. Abd El Aal SF, Hunsinger B, Böhm R. Determination of the bactericidal activity of chemical disinfectants against bacteria in dairies according to the DVG-guidelines. *Hyg Med* 2008;33:463-71.
47. Bridier A, Briandet R, Thomas V, Dubois-Brissonnet F. Comparative biocidal activity of peracetic acid, benzalkonium chloride and *ortho*-phthalaldehyde on 77 bacterial strains. *J Hosp Infect* 2011;78:208-13.
48. Akinbobola AB, Sherry L, Mckay WG, Ramage G, Williams C. Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in in-vitro biofilms to high-level peracetic acid disinfection. *J Hosp Infect* 2017;97:162-8.
49. El-Azizi M, Farag N, Khardori N. Efficacy of selected biocides in the decontamination of common nosocomial bacterial pathogens in biofilm and planktonic forms. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2016;47:60-71.
50. Thomas L, Russel AD, Maillard J-Y. Antimicrobial activity of chlorhexidine diacetate and benzalkonium chloride against *Pseudomonas aeruginosa* and its response to biocide residues. *J Appl Microbiol* 2005;98:533-43.
51. Brill F, Goroncy-Bermes P, Sand W. Influence of growth media on the sensitivity of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* to cationic biocides. *Int J Hyg Environ-Health* 2006;209:89-95.
52. Simões M, Pereira MO, Machado I, Simões LC, Vieira MJ. Comparative antibacterial potential of selected aldehyde-based biocides and surfactants against planktonic *Pseudomonas fluorescens*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2006;33:741-9.

Veröffentlichungen

53. Araújo PA, Lemos M, Mergulhão F, Melo L, Simões M. The influence of interfering substances on the antimicrobial activity of selected quaternary ammonium compounds. *Int J Food Sci* 2013;Article ID 237581, 9 pages.
54. Carpentier B, Cerf O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J Appl Microbiol* 1993;75:499-511.
55. Grönholm L, Wirtanen G, Ahlgren K, Nordström K, Sjöberg A-M. Screening of antimicrobial activities of disinfectants and cleaning agents against foodborne spoilage microbes. *Z Lebensm Unters Forsch* 1999;208:289-98.
56. Eginton PJ, Holah J, Allison DG, Handley PS, Gilbert P. Changes in the strength of attachment of micro-organisms to surfaces following treatment with disinfectants and cleansing agents. *Lett Appl Microbiol* 1998;27:101-5.
57. LeChevallier MW, Cawthon CD, Lee RG. Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. *Appl Environ Microbiol* 1988;54:649-54.
58. Almatroudi A, Gosbell IB, Hu H, Jensen SO, Espedido BA, Tahir S, et al. *Staphylococcus aureus* dry-surface biofilms are not killed by sodium hypochlorite: implications for infection control. *J Hosp Infect* 2016;93(3):263-70.
59. Ledwoch K, Dancer SJ, Otter JA, Kerr K, Roposte D, Rushton L, et al. Beware biofilm! Dry biofilms containing bacterial pathogens on multiple healthcare surfaces; a multi-centre study. *J Hosp Infect* 2018;100(3):e47-e56.
60. Holah JT, Taylor JH, Dawson DJ, Hall KE. Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol* 2002;92:111-20S.
61. Chiang S-R, Jung F, Tang H-J, Chen C-H, Chen C-C, Chou H-Y. Desiccation and ethanol resistance of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* embedded in biofilm: The favorable antiseptic efficacy of combination chlorhexidine gluconate and ethanol. *J Microbiol Immunol Infect* 2017;xx:1-8.
62. Sabbah S, Springthorpe S, Sattar SA. Mixture of surrogates for infectious bioagents in a standard approach to assessing disinfection of environmental surfaces. *Appl Environ Microbiol* 2010;76:6020-2.
63. Buckingham-Meyer K, Goeres DM, Hamilton MA. Comparative evaluation of biofilm disinfectant efficacy tests. *J Microbiol Methods* 2007;70:236-44.

Veröffentlichungen

64. Steinhauer K, Hofmann A, Ebert KP, Kaase M, Jürs U. Desinfektionsmittelprüfung von MRD-*Acinetobacter baumannii* unter praxisnahen Bedingungen. Hyg Med 2012;37:10-5. German.
65. Tomlinson E, Brown MR, Davis SS. Effect of colloidal association on the measured activity of alkylbenzyltrimethylammonium chlorides against *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Chem 1977;20(10):1277-82.
66. Oosterik LH, Peeters L, Mutuku I, Goddeeris BM, Butaye P. Susceptibility of avian pathogenic *Escherichia coli* from laying hens in Belgium to antibiotics and disinfectants and integron prevalence. Avian Dis 2014;58:271-8.
67. Reiss I, Borkhardt A, Fussle R, Sziegoleit A, Gortner L. Disinfectant contaminated with *Klebsiella oxytoca* as a source of sepsis in babies. Lancet 2000;356:310.
68. Gebel J, Sonntag HG, Werner HP, Vacata V, Exner M, Kistemann T. The higher disinfectant resistance of nosocomial isolates of *Klebsiella oxytoca*: how reliable are indicator organisms in disinfectant testing? J Hosp Infect 2002;50:309-11.

Veröffentlichungen

Table 1 Characteristics of bacteria used for disinfectant testing

Species	Acronym	Strain number	Source	Characteristics
<i>A. pittii</i>	AP1	4/1/1/20	UHL; throat swab	species-specific wild type resistance pattern
<i>A. pittii</i>	AP2	4/1/13/37	UHL; faeces	3MDR-GNB
<i>A. pittii</i>	AP3	DSM 25618, ATCC 19004	DSMZ; cerebrospinal fluid	type strain
<i>A. baumannii</i>	AB1	4/1/13/47	UHL; wound swab	4MDR-GNB, MBL
<i>A. baumannii</i>	AB2	4/1/13/38	UHL; faeces	4MDR-GNB, MBL
<i>A. baumannii</i>	AB3	DSM 30007, ATCC 19606	DSMZ; urine	type strain, 3MDR-GNB
<i>A. baumannii</i>	AB4	4/1/13/39	UHL; faeces	species-specific wild type resistance pattern
<i>P. aeruginosa</i>	PA1	4/1/13/23	UHL; blood culture	3MDR-GNB, MBL
<i>P. aeruginosa</i>	PA2	4/1/13/15	UHL; faeces	4MDR-GNB, MBL
<i>P. aeruginosa</i>	PA3	4/1/13/72	UHL; wound swab	3MDR-GNB, MBL
<i>P. aeruginosa</i>	PA4	DSM 939, ATCC 15442	DSMZ; animal room water bottle	test organism for disinfectant testing
<i>K. oxytoca</i>	KO1	4/1/15/65B	UHL; faeces	3MDR-GNB, ESBL
<i>K. oxytoca</i>	KO2	4/2/4/10	UHL; urine	3MDR-GNB, ESBL

Veröffentlichungen

<i>K. oxytoca</i>	KO3	DSM 5175, ATCC 13182	DSMZ; pharyngeal tonsil	type strain
<i>K. pneumoniae</i>	KP1	4/1/9/72	UHL; faeces	3MDR-GNB, ESBL
<i>K. pneumoniae</i>	KP2	4/2/9/76	UHL; faeces	3MDR-GNB, ESBL
<i>K. pneumoniae</i>	KP3	4/2/9/58A	UHL; faeces	3MDR-GNB, ESBL
<i>K. pneumoniae</i>	KP4	4/2/9/58B	UHL; faeces	3MDR-GNB, ESBL
<i>K. pneumoniae</i>	KP5	4/1/13/30	UHL; urine	4MDR-GNB, VIM
<i>K. pneumoniae</i>	KP6	4/2/2/27	UHL; faeces	4MDR-GNB, VIM
<i>K. pneumoniae</i>	KP7	DSM 30104, ATCC 13883	DSMZ; no further information	type strain

UHL - University Hospital Leipzig; DSMZ - Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures; 3MDR-GNB, 4MDR-GNB - Multidrug-Resistant Gram-Negative bacteria MDR-GNB resistant against three or four classes of antibiotics according to the Commission for Hospital Hygiene and Infection Prevention¹¹; ESBL - extended-spectrum β -lactamase; MBL - metallo β -lactamase; VIM - Verona integron-encoded metallo- β -lactamase

Table 2 Bactericidal concentrations (%) resulting in a LR \geq 5 without (w/o) and with (w) organic soiling determined by the quantitative suspension test

Strain	Ethanol (%)						Peracetic acid (%)						Benzalkonium chloride (%)					
	1 min		5 min		15 min		1 min		5 min		15 min		1 min		5 min		15 min	
	w/o	w	w/o	w	w/o	w	w/o	w	w/o	w	w/o	w	w/o	w	w/o	w	w/o	w
AP1	40	40	35	35	30	35	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.01	0.01	0.005	0.01	0.005	0.005
AP2	40	40	35	35	35	35	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.01	0.01	0.005	0.005	0.0025	0.005
AP3	35	35	30	35	30	30	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.005	0.01	0.0025	0.005	0.0025	0.005
AB1	40	40	35	35	35	35	0.012	0.024	0.012	0.012	0.012	0.012	0.01	0.02	0.005	0.005	0.0025	0.005
AB2	40	40	35	35	35	35	0.012	0.012	0.012	0.012	0.006	0.006	0.01	0.01	0.005	0.005	0.0025	0.005
AB3	40	40	35	35	30	30	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.01	0.01	0.005	0.005	0.005	0.005
AB4	35	35	35	35	30	35	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.003	0.005	0.01	0.0025	0.005	0.0025	0.005
PA1	35	35	30	30	30	30	0.006	0.006	0.006	0.006	0.003	0.003	0.08	0.08	0.04	0.04	0.04	0.04
PA2	35	35	30	30	30	30	0.012	0.012	0.006	0.006	0.006	0.003	0.08	0.08	0.04	0.04	0.04	0.04
PA3	35	35	30	30	30	30	0.012	0.012	0.006	0.006	0.006	0.003	0.08	0.08	0.04	0.04	0.04	0.04
PA4	35	35	30	30	30	30	0.006	0.006	0.006	0.003	0.003	0.0015	0.08	0.08	0.04	0.08	0.04	0.04

Veröffentlichungen

KO1	35	35	30	30	30	30	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.02	0.04	0.01	0.02	0.005	0.005
KO2	35	35	30	30	30	30	0.006	0.006	0.003	0.003	0.0015	0.003	0.02	0.04	0.01	0.02	0.005	0.01
KO3	35	35	30	30	30	30	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.02	0.04	0.01	0.02	0.005	0.01
KP1	35	35	30	30	30	30	0.012	0.012	0.006	0.006	0.006	0.006	0.02	0.04	0.01	0.02	0.01	0.01
KP2	35	35	30	30	30	30	0.012	0.012	0.006	0.006	0.006	0.006	0.02	0.04	0.01	0.02	0.01	0.01
KP3	35	35	35	35	30	30	0.012	0.012	0.006	0.006	0.006	0.006	0.02	0.04	0.01	0.02	0.01	0.02
KP4	35	35	35	35	30	30	0.006	0.012	0.006	0.006	0.003	0.006	0.02	0.04	0.01	0.02	0.01	0.01
KP5	35	35	35	30	30	30	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.02	0.02	0.01	0.01	0.005	0.005
KP6	35	35	30	30	30	30	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.005
KP7	35	35	30	30	30	30	0.012	0.012	0.003	0.003	0.003	0.003	0.02	0.04	0.01	0.02	0.005	0.01

AP – *A. pittii*, AB – *A. baumannii*, PA – *P. aeruginosa*, KO – *K. oxytoca*, KP – *K. pneumoniae*, w/o – without organic soiling, w – with organic soiling (i.e. 0.3% BSA); reference and type strains are shaded in grey

Veröffentlichungen

Table 3 Disinfectant concentrations (%) resulting in a LR \geq 5 in practical tests on steel carriers with organic soiling

Strain	Ethanol (%)				Peracetic acid (%)				Benzalkonium chloride (%)			
	1 min	5 min	15 min	30 min	1 min	5 min	15 min	30 min	1 min	5 min	15 min	30 min
AP1	50	40	30	30	0.096	0.096	0.048	0.048	0.64	0.08	0.02	0.02
AP2	50	40	40	40	0.096	0.096	0.096	0.096	0.64	0.04	0.02	0.02
AP3	40	30	30	30	0.096	0.096	0.024	0.024	0.64	0.08	0.02	0.02
AB1	50	40	40	40	0.096	0.096	0.048	0.048	0.32	0.08	0.02	0.02
AB2	40	40	40	40	0.096	0.048	0.048	0.048	0.16	0.04	0.04	0.02
AB3	40	40	30	30	0.048	0.048	0.024	0.024	0.64	0.04	0.04	0.02
AB4	50	40	40	40	0.048	0.048	0.048	0.048	0.32	0.08	0.04	0.02
PA1	40	30	30	30	0.048	0.024	0.024	0.024	5.12	0.32	0.16	0.08
PA2	40	30	30	30	0.024	0.024	0.024	0.024	5.12	0.16	0.16	0.08
PA3	40	30	30	30	0.048	0.024	0.024	0.024	1.28	0.32	0.16	0.08
PA4	40	40	30	30	0.048	0.024	0.024	0.024	5.12	0.64	0.16	0.16
KO1	40	40	30	30	0.192	0.096	0.096	0.096	1.28	0.16	0.04	0.02

Veröffentlichungen

KO2	40	40	30	30	0.048	0.048	0.048	0.048	1.28	0.16	0.04	0.04
KO3	40	40	30	30	0.096	0.096	0.096	0.096	2.56	0.16	0.04	0.04
KP1	40	40	30	30	0.096	0.096	0.096	0.096	2.56	0.16	0.08	0.04
KP2	40	40	30	30	0.096	0.096	0.096	0.048	2.56	0.16	0.08	0.04
KP3	40	40	30	30	0.096	0.096	0.096	0.096	2.56	0.16	0.08	0.04
KP4	40	40	30	30	0.096	0.048	0.048	0.048	2.56	0.16	0.08	0.04
KP5	40	40	40	30	0.096	0.048	0.048	0.048	1.28	0.08	0.02	0.02
KP6	50	30	30	30	0.096	0.096	0.048	0.048	2.56	0.16	0.02	0.02
KP7	40	30	30	30	0.024	0.012	0.006	0.006	2.56	0.16	0.08	0.04

AP – *A. pittii*, AB – *A. baumannii*, PA – *P. aeruginosa*, KO – *K. oxytoca*, KP – *K. pneumoniae*; reference and type strains are shaded in grey

Supporting information

Table S1 Minimum inhibitory concentrations determined after 48 h of contact time

Strain	Minimum inhibitory concentration (%)		
	Ethanol	Peracetic acid	Benzalkonium chloride
AP1	4	0.006	0.001
AP2	4	0.006	0.001
AP3	4	0.006	0.001
AB1	5	0.0125	0.001
AB2	5	0.006	0.0025
AB3	4	0.003	0.001
AB4	5	0.025	0.001
PA1	4	0.025	0.04
PA2	4	0.025	0.04
PA3	4	0.025	0.02
PA4	4	0.0125	0.02
KO1	5	0.0125	0.0025
KO2	6	0.0125	0.005
KO3	5	0.025	0.005
KP1	6	0.0125	0.0025
KP2	6	0.0125	0.0025
KP3	6	0.0125	0.01
KP4	6	0.0125	0.005
KP5	6	0.0125	0.01

Veröffentlichungen

KP6	6	0.0125	0.005
KP7	6	0.0125	0.0025

AP – *A. pittii*, AB – *A. baumannii*, PA – *P. aeruginosa*, KO – *K. oxytoca*, KP – *K. pneumoniae*;
reference and type strains are shaded in grey

Veröffentlichungen

Table S2 Bactericidal concentrations (%) at different contact times determined by qualitative suspension tests

Strain	Ethanol					Peracetic acid					Benzalkonium chloride				
	1 min	5 min	15 min	30 min	60 min	1 min	5 min	15 min	30 min	60 min	1 min	5 min	15 min	30 min	60 min
AP1	40	35	35	30	25	0.012	0.012	0.006	0.003	0.003	0.005	0.0025	0.0025	0.001	0.001
AP2	40	40	35	35	35	0.012	0.012	0.012	0.006	0.006	0.005	0.0025	0.0025	0.001	0.001
AP3	40	35	30	30	25	0.012	0.006	0.006	0.003	0.003	0.005	0.0025	0.0025	0.0025	0.001
AB1	35	35	30	30	25	0.024	0.012	0.006	0.003	0.003	0.005	0.005	0.0025	0.0025	0.0025
AB2	35	35	35	30	30	0.024	0.012	0.003	0.003	0.0015	0.01	0.005	0.005	0.0025	0.0025
AB3	40	35	35	30	30	0.012	0.006	0.003	0.0015	0.0015	0.005	0.005	0.005	0.0025	0.0025
AB4	40	35	30	30	25	0.024	0.006	0.006	0.003	0.003	0.01	0.005	0.005	0.0025	0.0025
PA1	35	35	30	30	30	0.012	0.012	0.006	0.0015	0.0015	0.05	0.05	0.025	0.025	0.025
PA2	35	35	35	30	25	0.024	0.006	0.006	0.006	0.003	0.05	0.025	0.025	0.01	0.01
PA3	35	30	30	30	25	0.012	0.006	0.006	0.006	0.003	0.05	0.05	0.05	0.025	0.025
PA4	35	30	30	30	25	0.012	0.006	0.003	0.003	0.003	0.05	0.05	0.025	0.025	0.01
KO1	35	35	30	25	25	0.012	0.006	0.006	0.003	0.003	0.025	0.01	0.005	0.005	0.0025

Veröffentlichungen

KO2	35	35	30	30	30	0.006	0.003	0.0015	0.0015	0.0015	0.025	0.01	0.005	0.005	0.0025
KO3	40	35	35	35	30	0.012	0.012	0.012	0.006	0.006	0.025	0.01	0.005	0.005	0.0025
KP1	35	35	35	30	30	0.012	0.006	0.006	0.003	0.0015	0.025	0.025	0.005	0.005	0.005
KP2	40	35	30	30	30	0.012	0.006	0.003	0.0015	0.0015	0.025	0.01	0.005	0.005	0.0025
KP3	35	35	35	35	25	0.012	0.006	0.003	0.003	0.0015	0.025	0.01	0.005	0.005	0.005
KP4	35	35	30	30	25	0.012	0.006	0.003	0.0015	0.0015	0.025	0.01	0.01	0.005	0.005
KP5	35	35	30	30	30	0.006	0.006	0.003	0.003	0.003	0.025	0.01	0.005	0.0025	0.0025
KP6	35	35	30	30	30	0.006	0.003	0.003	0.0015	0.0015	0.025	0.01	0.005	0.005	0.0025
KP7	35	30	30	30	30	0.006	0.003	0.0015	0.0015	0.0015	0.025	0.01	0.005	0.005	0.0025

AP – *A. pittii*, AB – *A. baumannii*, PA – *P. aeruginosa*, KO – *K. oxytoca*, KP – *K. pneumoniae*; reference and type strains are shaded in grey

4 Diskussion

Eine effektive Desinfektion ist für die Bekämpfung von Infektionskrankheiten unerlässlich. Das zunehmende Auftreten von MRE und die verbreitete Verwendung von Bioziden löste Bedenken hinsichtlich der Entwicklung von DM-Resistenzen oder Kreuzresistenzen aus. Daher ist es von großer Wichtigkeit, die Wirksamkeit chemischer DM mittels standardisierter Testverfahren sicherzustellen. Zertifizierte Konzentrations-Zeit-Relationen werden in den DM-Listen des VAH und der DVG veröffentlicht. Für die prophylaktische und Routinedesinfektion im Gesundheitswesen sind VAH-gelistete Verfahren anzuwenden. Die Fragestellung dieser Studie war, ob spezifische Desinfektionsprotokolle für MRGN notwendig sind. Im Rahmen meiner Untersuchungen wurden dafür die aktiven Substanzen BAC, ETH, NH und PES auf ihre bakterizide Wirksamkeit gegenüber klinischen MRGN-Isolaten von *A. baumannii*, *A. pittii*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae* und *P. aeruginosa* im Vergleich zu entsprechenden Referenzstämmen unter Laborbedingungen gemäß den „Anforderungen und Methoden zur VAH-Zertifizierung chemischer Desinfektionsverfahren“ getestet (ANON. 2015c). Die ausgewählten Testsubstanzen repräsentieren Wirkstoffgruppen, die häufig Anwendung in der Praxis finden. Die Methoden des vierstufigen Verfahrens sind äquivalent zur DM-Testung nach europäischen Normen und beinhalten neben der Durchführung von Suspensionstests und Keimträgerversuchen die Bestimmung der MHK (ANON. 2016). Für DM-Prüfungen sind Referenzstämmen vorgeschrieben. Diese ausgewählten Testorganismen stehen repräsentativ für die meisten Bakterien und müssen über entsprechend widerstandsfähige Merkmale verfügen. Verglichen mit AB-Empfindlichkeitsprüfungen gibt es keine „Breakpoints“ oder Höchstgrenzen (cut-off), die eine Resistenz gegenüber DM definieren (MORRISSEY et al. 2014).

Biozide finden seit Jahrzehnten verbreiteten Einsatz und bakterielle Resistenz bzw. Adaption stellen kein Phänomen der Neuzeit dar (CHAPMAN 1998, DAVIN-REGLI und PAGES 2012, RUSSELL 1999, RUSSELL 2004). Von DM-Resistenz spricht man, wenn Bakterien die Anwendungskonzentration eines Biozids überleben bzw. einzelne Stämme einer Bakterienspezies höhere Konzentrationen eines DM tolerieren, während andere Stämme dieser Spezies inaktiviert werden (RUSSELL 2003). Resistenzen können intrinsischer oder erworbener Art sein, und zugrundeliegende Mechanismen umfassen beispielsweise Adaption, Mutation, die Aufnahme genetischer Elemente, enzymatische Inaktivierung oder Permeabilitätsmodifikation (MCDONNELL und RUSSELL 1999). Durch Anwendungsfehler entstandene, subletale DM-Konzentrationen oder der Einfluss von bakterieller Biofilmbildung können die Selektion von Stämmen mit erhöhter Toleranz bedingen (phänotypische Adaption, REISS et al. 2000). Unspezifische Effluxsysteme und Impermeabilität der Zellwand können Bakterien gegenüber AB und DM unempfindlich machen (FRAISE 2002, ORTEGA MORENTE et al. 2013). Bakterielle Resistenz gegenüber Bioziden kann durch die Ermittlung der bakteriziden Wirksamkeit bestimmt werden (CERF et al. 2010).

Diskussion

Die Empfindlichkeit von Bakterien, einschließlich MRE, gegenüber Bioziden war der Gegenstand zahlreicher Studien (CHAPMAN 1998, DAVIN-REGLI und PAGES 2012, MAILLARD 2007, MARTRO et al. 2003, MEYER und COOKSON 2010, REICHEL et al. 2014, RUSSELL 1999, RUSSELL 2003, RUSSELL 2004). Einige Autoren kommen zu der Schlussfolgerung, dass AB-resistente Bakterien nicht zwingend eine erhöhte Toleranz gegenüber DM aufweisen (KAWAMURA-SATO et al. 2010, MARTRO et al. 2003, REICHEL et al. 2014). Andere Studien widerlegen dies (CHUANCHUEN et al. 2001, GEBEL et al. 2002). Jedoch ist eine vergleichende Interpretation von Ergebnissen verschiedener, internationaler Arbeitsgruppen schwierig aufgrund unterschiedlicher, länderspezifischer Testrichtlinien, die die Ergebnisse deutlich beeinflussen. Die Werte können je nach DM und Testmethode erheblich variieren (THOMAS et al. 2005).

Viele Studien basieren auf der MHK-Bestimmung, welche routinemäßig bei AB-Empfindlichkeitstests zum Einsatz kommt (LAMBERT 2004, RUSSELL 1999). Diese Methode erlaubt einen Vergleich der den Bioziden ausgesetzten Mikroorganismen. In den Untersuchungen dieser Studie wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen MRGN und Referenzstämmen bezüglich der bakteriostatischen Konzentrationen festgestellt. *P. aeruginosa*-Stämme waren toleranter gegenüber BAC und NH im Vergleich zu den anderen getesteten Spezies. Gegenüber PES und BAC reagierten *Acinetobacter*-Spezies am empfindlichsten im Vergleich zu den anderen Bakterienspezies.

Bei der Durchführung der qualitativen Suspensionsversuche wurden für ETH und BAC im Vergleich zur MHK bis zu zehnfach höhere bakterizide Werte erzielt. Bei Versuchen mit NH wurden im Vergleich zur MHK unabhängig von der Einwirkzeit bis zu 500-fach geringere bakterizide Konzentrationen bestimmt. Ursächlich hierfür kann die Testmethodik sein, da im Vergleich zur MHK-Bestimmung keine nährstoffreiche Caseinpepton-Sojabohnenmehl-pepton-Bouillon verwendet wurde. MHK und bakterizide Konzentrationen für PES waren annähernd identisch. *P. aeruginosa* tolerierte die höchsten NH- und BAC-Konzentrationen. Signifikante Unterschiede zwischen 3MRGN, 4MRGN und den jeweiligen Referenzstämmen wurden nicht beobachtet. Die Bestimmung der MHK und der bakteriziden Konzentrationen in den qualitativen Suspensionsversuchen ergab, dass die Werte die Anwendungskonzentrationen kommerzieller Produkte unterschreiten. Insgesamt waren die erzielten Ergebnisse mit denen anderer Studien vergleichbar (z.B. KAWAMURA-SATO et al. 2008, MORRISSEY 2014).

Zur Bestimmung bakterizider Konzentrationen in quantitativen Suspensionsversuchen ist laut VAH eine Reduktion der Ausgangskeimzahl um 99,999 % (fünf \log_{10} -Stufen Reduktion, $LR \geq 5$) gefordert. Die erzielten bakteriziden Werte für BAC, ETH und PES ähnelten im Wesentlichen den Ergebnissen der qualitativen Suspensionsversuche. Bakterizide Konzentrationen von NH lagen zehnfach höher als im qualitativen Suspensionstest. *Pseudomonas*-Stämme waren in

Diskussion

diesen Versuchen am unempfindlichsten für BAC, während *Acinetobacter*-Stämme am empfindlichsten reagierten. Multiresistenz gegenüber AB beeinflusste die Empfindlichkeit gegenüber den ausgewählten DM nicht. Vergleichbare Studien lieferten sowohl ähnliche als auch niedrigere bzw. höhere bakterizide Testkonzentrationen (BRIDIER et al. 2011, THOMAS et al. 2005).

Im Vergleich zu quantitativen Suspensionsversuchen wurden in den praxisnahen Keimträgertests auf Edelstahlkeimträgern signifikant höhere Konzentrationen an PES (bis zu 16-fach) und BAC (bis zu 64-fach) ermittelt, um die geforderte $LR \geq 5$ zu erzielen. Für ETH waren die bakteriziden Konzentrationen ähnlich denen, die in den Suspensionstests bestimmt wurden. Bakterizide Konzentrationen für NH ähnelten denen aus dem quantitativen Suspensionstest mit organischer Belastung. Die Keimträgerversuche bestätigten die geringere Empfindlichkeit von *P. aeruginosa* gegenüber BAC sowie die stärkere Empfindlichkeit von *Acinetobacter* und *Klebsiella*. Eine geringere Empfindlichkeit von *P. aeruginosa* gegenüber NH konnte in den quantitativen Suspensionstests und Keimträgertests nicht bestätigt werden. MRGN und Referenzstämmen wiesen keine Unterschiede in ihrer Empfindlichkeit gegenüber den getesteten DM auf. Eine mögliche Erklärung für die im Keimträgertest ermittelten deutlich höheren DM-Konzentrationen könnte sein, dass an Oberflächen adsorbierte Mikroorganismen einen anderen Phänotyp aufweisen als planktonische Zellen und daher einer antimikrobiellen Behandlung leichter widerstehen als Zellen in Suspension. Dies kann je nach DM und Anhaftungszeit zu höheren DM-Konzentrationen führen (CARPENTIER und CERF 1993, LECHEVALLIER et al. 1988). Zudem können im Keimträgerversuch höhere Konzentrationen notwendig sein, da im Gegensatz zum Suspensionstest kein Überschuss an DM vorliegt und die Zellen nicht ringsum angegriffen werden können. Dieses zeigt, dass die Ergebnisse der Suspensionstests nicht ohne weiteres auf die Praxis übertragen werden können. Zur Bestimmung von Gebrauchskonzentrationen und Einwirkzeiten eignen sich Oberflächentests besser, da sie realistische Konditionen widerspiegeln.

Die Anwesenheit von klinisch relevanter organischer Belastung (hier: 0,3 % BSA, geringe Belastung) kann die Effizienz von DM deutlich vermindern. In meiner Studie konnte ein signifikanter Einfluss organischer Belastung auf die Wirksamkeit von NH nachgewiesen werden. Der Prozess der Chlorzehrung bewirkt eine verminderte Oxidationswirkung des DM (RUTALA und WEBER 1997). Dadurch waren im quantitativen Suspensionstest mit organischer Belastung 20- bis 40-fach höhere Konzentrationen notwendig, um eine Reduktion von mindestens fünf \log_{10} -Stufen zu erreichen. Dieses hebt die Bedeutung einer manuellen Entfernung organischen Materials in Form einer Reinigung vor der Desinfektion hervor. Im Unterschied zu anderen Studien konnte für BAC keine Effizienzminderung durch eine geringe organische Belastung bestätigt werden (ARAUJO et al. 2013). Trotzdem kann das Auftreten eines Eiweißfehlers bei Anwendung von DM unter hoher organischer Belastung anhand dieser

Studie nicht ausgeschlossen werden. Die MRGN-Isolate unterschieden sich auch in Versuchen mit BSA nicht von den Referenzstämmen.

Der Einfluss der Kontaktzeit auf die Wirksamkeit war im Allgemeinen nicht signifikant. Bei Versuchen mit PES und BAC im qualitativen Suspensionstest verringerte sich die bakterizide Konzentration im Verlauf der Einwirkdauer, während bei ETH und NH eine verlängerte Expositionsdauer nicht zu einer Reduktion der bakteriziden Konzentration führte. Im quantitativen Suspensionstest war kein oder nur ein geringer Einfluss der Einwirkzeit bei allen DM zu beobachten. Dies war auch bei den Keimträgerversuchen mit PES und ETH der Fall. Jedoch konnte bei Keimträgertests mit BAC eine längere Expositionsdauer die bakterizide Konzentration um bis zu 64-fach vermindern. Auch bei NH führte die verlängerte Einwirkzeit zu einer maximal 16-fachen Absenkung der bakteriziden Wirkkonzentration. Schlussfolgernd lässt sich daraus ableiten, dass der Desinfektionserfolg maßgeblich vom Einsatz der wirksamen DM-Konzentration abhängig ist und weniger von der Expositionsdauer.

Beim Vergleich aller in der aktuellen Studie angewandten Methoden variierte die Empfindlichkeit für die getesteten DM zwischen und innerhalb der Spezies je nach Methode. Da die Flächendesinfektion darauf abzielt, Bakterien auf Oberflächen innerhalb kurzer Zeit zu reduzieren, sind Suspensions- und vor allem Keimträgertests besser zur Bestimmung von Anwendungskonzentrationen geeignet als die MHK-Bestimmung, da sie praktische Bedingungen simulieren (MAILLARD 2010). Suspensionstests stellen eine einfache und standardisierte Prüfmethode dar. Es können unterschiedliche Parameter wie Testorganismen, Einwirkzeiten und Belastungssubstanzen in die Testung einbezogen werden. Eine Aussage über die Wirksamkeit eines DM auf Oberflächen kann jedoch nur mit Hilfe von praxisnahen Methoden wie dem Keimträgertest getroffen werden. Bei allen Tests mit BAC waren die *P. aeruginosa*-Stämme am tolerantesten, während die *Acinetobacter*-Stämme am empfindlichsten reagierten. Zwischen klinischen 3MRGN, 4MRGN und den jeweiligen Referenzstämmen wurden keine signifikanten Unterschiede in der DM-Toleranz festgestellt. Daraus kann geschlossen werden, dass eine AB-Resistenz nicht zwingend mit einer DM-Resistenz einhergeht.

GUPTA et al. (2018) führten eine ähnliche Studie mit MRE im Vergleich zu Referenzstämmen durch. Sie stellten höhere MHK-Werte für MRE im Test mit quartären Ammoniumverbindungen und ETH fest. Höhere bakterizide Konzentrationen wurden bei Untersuchungen mit NH und ETH determiniert; allerdings wurden keine Suspensions- oder Keimträgertests durchgeführt. Dieses Beispiel verdeutlicht, dass die Vergleichbarkeit von Studien durch die uneinheitlichen Testmethoden problematisch ist. Daher sind standardisierte Richtlinien erforderlich, um eine einheitliche DM-Wirksamkeitsprüfung zu gewährleisten und einen internationalen Vergleich der Ergebnisse verschiedener Studien zu ermöglichen.

Diskussion

Für diese Studie wurden aktive Substanzen ausgewählt, welche je nach Konzentration als gering- bis hochwirksam eingestuft wurden (SCENIHR 2009). Auf die Testung kommerzieller Produkte wurde verzichtet, da zugesetzte Hilfsstoffe die Effizienz steigern können und so kein Rückschluss auf die Potenz der einzelnen aktiven Substanzen gezogen werden kann. Die VAH-Vorgaben verlangen die Darstellung des Übergangs von unwirksamen zu wirksamen DM-Konzentrationen. Dementsprechend erfolgte die Auswahl der DM-Verdünnungen. Obwohl kurze Einwirkzeiten zur Routinedesinfektion im klinischen Umfeld pragmatisch erscheinen, sind in den VAH-Methoden Testzeiten von bis zu 240 min vorgegeben. Um längere Kontaktzeiten für spezielle Desinfektionsvorhaben (spezifische Pathogene, Desinfektion von Intensivstationen, Quarantänebereiche) einhalten zu können, kann es notwendig sein, eine Oberfläche wiederholt mit einem Flüssigkeitsfilm zu befeuchten, um die Benetzung der Fläche während der Kontaktzeiten zu garantieren.

ETH erzielt eine schnelle Wirksamkeit gegenüber vielen Bakterien, Viren und Pilzen. Die Wirkung wird über Membranschäden und Denaturierung von Proteinen realisiert. Das Anwendungsoptimum liegt bei 60 % bis 90 %; bei geringeren Konzentrationen ist der antimikrobielle Effekt gemindert (MCDONNELL und RUSSELL 1999). Die in dieser Studie determinierten bakteriziden Konzentrationen von ETH unterschieden sich maximal um das zehnfache von den MHKs und liegen unterhalb der Anwendungskonzentrationen. PES wirkt bakterizid, viruzid, fungizid und sporozid bei Konzentrationen unter 0,3 % über die Erhöhung der Membranpermeabilität durch Zerstörung von Thiolgruppen. Es zerfällt in ungefährliche Nebenprodukte und organische Belastung führt nicht zum Wirkverlust (MCDONNELL und RUSSELL 1999). Die schnelle und effiziente Wirksamkeit ohne Eiweißfehler konnte in dieser Studie bestätigt werden. BAC gehört zu den oberflächenaktiven, kationischen DM. Die Wirkung entfaltet sich über Schäden an der Zytoplasmamembran (MCDONNELL und RUSSELL 1999). Kommerzielle Produkte enthalten bis zu 0,2 % BAC als Wirkkomponente. Bei einer Kontaktzeit von 5 bis 15 min mit 0,2 % BAC als Reinsubstanz kann von einer Inaktivierung der getesteten MRGN ausgegangen werden. Bei kürzeren Einwirkzeiten oder geringeren Konzentrationen kann eine effektive Erregerelimination nicht gewährleistet werden. Daher ist BAC zur Verwendung im klinischen Umfeld, besonders bei Problemen mit Pseudomonaden, nicht empfehlenswert. Die intrinsische Resistenz von *P. aeruginosa* gegenüber BAC ist begründet durch eine reduzierte Zellpermeabilität aufgrund eines erhöhten Anteils an Phospholipiden (MCDONNELL und RUSSELL 1999, ORTEGA MORENTE et al. 2013, SAKAGAMI et al. 1989). Triclosan-resistente *P. aeruginosa* verfügen über unspezifische Effluxpumpen und weisen Resistenzen gegenüber AB auf (CHUANHUEN et al. 2001). NH gehört zu den Chlor- abspaltenden DM und entfaltet seine Wirkung über sein Oxidationspotenzial. Die als bakterizid bestimmten Konzentrationen für NH unterschreiten gängige Anwendungskonzentrationen (5,25 % NH in Haushaltsbleiche, RUTALA und WEBER 1997).

Diskussion

Obwohl keine signifikanten Unterschiede in der Empfindlichkeit zwischen Referenzstämmen und MRGN gegenüber BAC, ETH, NH und PES festgestellt wurden, wurden Stamm- und Spezies-spezifische Unterschiede in den bakteriziden Konzentrationen beobachtet. Einzelne Isolate benötigten im Speziesvergleich höhere DM-Konzentrationen. Insgesamt konnte in dieser Arbeit eine bakterizide Wirksamkeit der Grundsubstanzen gegenüber klinisch relevanten MRGN nachgewiesen werden. PES und ETH zeigten in allen Tests eine zuverlässige Effizienz. Auch wenn niedrigere bakterizide Konzentrationen determiniert wurden, darf das Anwendungsoptimum trotzdem nicht unterschritten werden. Es kann geschlussfolgert werden, dass zertifizierte DM eine ausreichende Wirkung gegenüber MRGN innehaben. Auch andere Studien belegen, dass klinische Isolate durch die Applikation zertifizierter Anwendungskonzentrationen sicher eliminiert werden (LANGSRUD et al. 2003, REICHEL et al. 2014). Die unspezifische Wirkungsweise von DM erschwert eine bakterielle Resistenzentwicklung erheblich. MEYER und COOKSON (2010) schlussfolgerten zudem, dass DM-Resistenzen nur eine geringe Auswirkung auf die Krankenhaushygiene haben und sahen in der Anwendung von Bioziden einen sinnvollen Beitrag zum Hygienemanagement. Die Kombination aktiver Substanzen in einer Formulierung sowie die Anwendung von DM im Rotationsprinzip stellen Möglichkeiten dar, einer Biozidtoleranz entgegen zu wirken. Bei Anwendung von DM mit breitem Wirkspektrum unter Berücksichtigung zertifizierter Konzentrations-Zeit-Relationen wird die Selektion DM-toleranter Bakterien unterbunden (ANON. 2004). Oxidierende DM haben ein breiteres Wirkspektrum gegenüber Mikroorganismen und sind weniger von bakterieller Toleranz betroffen (GUPTA et al. 2018, ORTEGA MORENTE et al. 2013). LAMBERT (2004) berichtete hingegen von einer negativen Korrelation zwischen AB und DM-Resistenz.

PIDOT et al. (2018) konnten bei multiresistenten *Enterococcus faecium* nachweisen, dass ab dem Jahr 2010 isolierte Keime eine zehnfach höhere genotypische Toleranz gegenüber alkoholischen DM zeigten als Vergleichsstämme. Dieses Beispiel zeigt, dass bei gehäuftem Auftreten von MRE die Notwendigkeit bestehen kann, eine Wirksamkeitsprüfung durchzuführen. Um NI wirksam zu verhindern, können ergebnisabhängig entsprechende Dekontaminationsmaßnahmen eingeleitet werden.

Zur Beantwortung der Fragestellung, ob für MRGN spezifische Desinfektionsmaßnahmen ergriffen werden müssen, lässt sich basierend auf meiner Arbeit feststellen, dass gegen AB multiresistente Bakterien nicht *per se* eine Biozidresistenz aufweisen. Beim Einsatz von DM in zertifizierten Konzentrations-Zeit-Relationen kann von einer ausreichenden Wirkung gegenüber MRGN ausgegangen werden.

5 Zusammenfassung

Anne Theresa Köhler

Untersuchungen zur wirksamen Desinfektion von bedeutenden gegen Antibiotika multiresistenten Erregern (MRE) in der Human- und Veterinärmedizin

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im Mai 2019

79 Seiten, 2 Tabellen, 92 Literaturangaben

Schlüsselwörter: Multiresistente Gram-Negative Erreger, Desinfektionsmittelwirksamkeit, Minimale Hemmkonzentration, Suspensionstest, Keimträgerstest

Einleitung: Der generalisierte Einsatz von Antibiotika im medizinischen Sektor erzeugt einen hohen Selektionsdruck auf Bakterien. Daher weisen bakterielle Resistenzen gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen eine zunehmende Inzidenz auf. Gegen Antibiotika multiresistente Erreger (MRE), insbesondere Multiresistente Gram-Negative Erreger (MRGN), stellen in Krankenhäusern, aber auch in Tierkliniken ein ernstzunehmendes Problem dar. Das Therapieversagen bei der Behandlung von Infektionen mit 3MRGN oder 4MRGN gefährdet die Gesundheitsversorgung. Die Bedeutung effektiver Kontrollmaßnahmen in der Unterbrechung nosokomialer Infektionsketten rückt in den Fokus. Infektionsprophylaxe wird durch eine Umweltdekontamination in Form von Reinigung und Desinfektion durchgeführt. Zertifizierte Biozide werden routinemäßig eingesetzt. Jedoch weisen einigen Studien auf eine Toleranz von Bakterien gegenüber Desinfektionsmitteln hin. Spezifische Dekontaminationsmaßnahmen könnten daher für die Bekämpfung von MRGN notwendig sein.

Ziel der Untersuchung: Es sollte evaluiert werden, ob klinische 3MRGN und 4MRGN im Vergleich zu nicht resistenten Referenzstämmen unempfindlicher gegenüber Desinfektionsmitteln reagieren und Desinfektionsprotokolle gegebenenfalls angepasst werden müssen.

Material und Methoden: Sechzehn klinische Stämme der Gattungen *Acinetobacter*, *Pseudomonas* und *Klebsiella* wurden mit fünf korrespondierenden Referenzstämmen *in vitro* auf deren Empfindlichkeit gegenüber den gängigen Desinfektionsmitteln Natriumhypochlorit, Ethanol, Peressigsäure und Benzalkoniumchlorid untersucht. Die Effizienz wurde anhand von vier aufeinander aufbauenden Testverfahren gemäß den Richtlinien des Verbunds für angewandte Hygiene (VAH, 2015) beurteilt. Diese beinhalten die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) und die Durchführung von Suspensionstests und

Zusammenfassung

Keimträgerversuchen. Zum Vergleich bakteriostatischer und bakterizider Werte zwischen den Bakteriengenera wurde der exakte Test nach Fisher angewandt. Der Einfluss von Einwirkzeit und organischer Belastung wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests bestimmt. Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe von SPSS, Version 22 (IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Germany), wobei die Signifikanz bei $P < 0.05$ definiert wurde (zweiseitiger Test).

Ergebnisse: Es wurden wirksame Konzentrations-Zeit-Relationen für jeden Teststamm und jede aktive Substanz determiniert. Die Ergebnisse der Suspensionstests überbeziehungsweise unterschreiten die Werte der MHK-Bestimmung um ein Vielfaches. *P. aeruginosa* tolerierte die höchsten Benzalkoniumchlorid-Konzentrationen, während *Acinetobacter*-Stämme am empfindlichsten reagierten. Im Vergleich zu Suspensionstests wurden in den praxisnahen Keimträgerversuchen signifikant höhere Konzentrationen an Peressigsäure und Benzalkoniumchlorid ermittelt. Die geringere Empfindlichkeit von *P. aeruginosa* gegenüber Benzalkoniumchlorid wurde bestätigt. Signifikante Unterschiede zwischen klinischen 3MRGN, 4MRGN und den jeweiligen Referenzstämmen in ihrer Sensitivität gegenüber Bioziden wurden - unabhängig von der angewandten Testmethodik - nicht festgestellt. Im Vergleich der Bakterienspezies wiesen Pseudomonaden eine geringere Sensibilität gegenüber Benzalkoniumchlorid auf, jedoch lagen die bakteriziden Konzentrationen in jedem Fall unterhalb der gelisteten Anwendungskonzentrationen. Der Einfluss organischer Belastung auf die Wirksamkeit von Natriumhypochlorit war signifikant. Die Expositionsdauer führte zu keiner signifikanten Absenkung der Wirkkonzentrationen.

Schlussfolgerung: Die Annahme, dass antibiotikaresistente Bakterien zwangsläufig biozidresistent sind, konnte anhand unserer Ergebnisse nicht bestätigt werden. Spezielle Desinfektionsprotokolle sind nicht notwendig, solange eine konsequente Einhaltung der durch den Hersteller vorgeschriebenen Konzentrations-Zeit-Relationen gegeben ist. Die Höhe der Desinfektionsmittelkonzentration ist für den Desinfektionserfolg ausschlaggebend, während der Einfluss der Einwirkzeit vernachlässigbar ist. Die MHK-Bestimmung eignet sich im Gegensatz zu praxisnahen Keimträgerversuchen nicht zur Ableitung von Anwendungskonzentrationen von Desinfektionsmitteln.

6 Summary

Anne Theresa Köhler

Effective disinfection of multidrug-resistant bacteria in human and veterinary medicine

Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Leipzig

Submitted in May 2019

79 pages, 2 tables, 92 references

Keywords: multidrug-resistant Gram-negative bacteria, disinfectant efficacy, minimum inhibitory concentrations, suspension test, carrier test

Introduction: The generalized antibiotic use in the medical sector generates a high selection pressure on bacteria. Therefore, bacterial resistance to antimicrobial agents is marked by an increasing incidence. Antibiotic multidrug-resistant pathogens, in particular multidrug-resistant Gram-negative bacteria (MDR-GNB), pose a serious problem in hospitals as well as veterinary clinics. Treatment failure in the therapy of infections with MDR-GNB endangers health care. The importance of effective control measures in the interruption of nosocomial chains of infection is in focus. Infection prophylaxis is carried out by environmental decontamination in the form of cleaning and disinfection. Certified biocides are routinely used. However, some studies indicate bacterial tolerance to disinfectants. Specific decontamination measures may therefore be necessary for the control of MDR-GNB.

Objective: The aim of this study was to evaluate the susceptibility of MDR-GNB isolates to disinfectants in direct comparison to non-resistant reference strains and to adjust disinfection protocols, if necessary.

Material and Methods: Sixteen clinical isolates of the genera *Acinetobacter*, *Pseudomonas* and *Klebsiella* as well as corresponding reference strains were tested for their susceptibility to the commonly used disinfectants sodium hypochlorite, ethanol, peracetic acid and benzalkonium chloride. Efficiency was assessed by four consecutive test procedures according to the guidelines of the Association for Applied Hygiene (VAH, 2015). These include the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and the performance of suspension tests and carrier tests. Differences in bacteriostatic and bactericidal values for bacterial genera were evaluated using Fisher's exact test. An influence of exposure time and organic load was assessed using Mann-Whitney-U-test. Analyses were done using SPSS, Version 22 (IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Germany), wherein the significance was defined at $P < 0.05$ (two-sided test).

Summary

Results: Effective concentration-time-relations were determined for each test strain and each active substance. The results of the suspension tests are several times higher or lower than the values of the MIC determination. *P. aeruginosa* tolerated the highest benzalkonium chloride concentrations, while *Acinetobacter* strains were the most sensitive. Compared to suspension tests, significantly higher concentrations of peracetic acid and benzalkonium chloride were determined in the practical carrier tests. The lower sensitivity of *P. aeruginosa* to benzalkonium chloride was confirmed. Significant differences between clinical MDR-GNB and the respective reference strains regarding their sensitivity to biocides were obtained, regardless of the test methodology used. In comparison of the bacterial species, pseudomonads had a lower sensitivity to benzalkonium chloride, but in each case the bactericidal concentrations were below the listed in-use concentrations. The influence of organic load on the efficacy of sodium hypochlorite was significant. The exposure time did not lead to a significant reduction in the active concentrations.

Conclusion: The assumption that antibiotic-resistant bacteria are necessarily biocide-resistant could not be confirmed by our findings. Special disinfection protocols are not required assuming a consistent compliance with the concentration-time-relations prescribed by the manufacturer. The level of the disinfectant concentration is crucial for the disinfection success, while the influence of the exposure time is negligible. In contrast to practical carrier tests, the MIC determination is not suitable for deriving in-use concentrations.

7 Referenzen

7.1 Literaturverzeichnis

Adair FW, Geftic SG, Gelzer J. Resistance of *Pseudomonas* to quaternary ammonium compounds. I. Growth in benzalkonium chloride solution. Appl Microbiol. 1969;18(3):299-302.

Anon. Infektionsschutzgesetz (IfSG) vom 20. Juli 2000 (BGBl. I S. 1045), das zuletzt durch Artikel 6 des Gesetzes vom 11. Dezember 2018 (BGBl. I S. 2394) geändert worden ist (zitiert vom 4. 2. 2019):5, <<https://www.gesetze-im-internet.de/ifsg/ifsg.pdf>>.

Anon. Anforderungen an die Hygiene bei der Reinigung und Desinfektion von Flächen. Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention beim Robert Koch-Institut (RKI). Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz. 2004;47:51-61. doi: 10.1007/s00103-003-0752-9.

Anon. Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedelung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen. Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut. Bundesgesundheitsbl. 2012;55:1311-54. doi: 10.1007/s00103-012-1549-5.

Anon. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika - Quantitativer Oberflächen-Versuch nicht poröser Oberflächen zur Bestimmung der bakteriziden und/oder fungiziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel in den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche Einrichtungen - Prüfverfahren und Anforderungen ohne mechanische Behandlung (Phase 2, Stufe 2; DIN EN 13697:2015-06). Berlin: Beuth Verlag GmbH. 2015a. doi: 10.31030/2159324

Anon. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika - Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der bakteriziden Wirkung im humanmedizinischen Bereich - Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1; DIN EN 13727:2015-12). Berlin: Beuth Verlag GmbH. 2015b. doi: 10.31030/2361838

Anon. Verbund für angewandte Hygiene (VAH) Desinfektionskommission. Anforderungen und Methoden zur VAH-Zertifizierung chemischer Desinfektionsverfahren. Wiesbaden: mhp-Verlag GmbH; 2015c.

Anon. Mitteilung der Desinfektionsmittel-Kommission im VAH zur Äquivalenz der Desinfektionsmittel-Testung gemäß VAH-Methoden und der Testung gemäß den aktuellen europäischen Normen. Hyg Med. 2016;41(3):83-4.

Literaturverzeichnis

- Anon. Gemeinsame Stellungnahme des VAH und des IHO. Zur Bedeutung von Desinfektionsmitteln im Zeitalter der zunehmenden Antibiotika-Resistenz und der globalen Ausbreitung gefährlicher Viruserkrankungen. Hyg Med. 2017;42:1/2.
- Anon. Mitteilung der Desinfektionsmittel-Kommission des VAH zum Stellenwert des Desinfektionsmittel-Liste des VAH vor dem Hintergrund der Biozidprodukte-Verordnung. Hyg Med. 2018;43:1/2.
- Araújo PA, Lemos M, Mergulhão F, Melo L, Simões M. The influence of interfering substances on the antimicrobial activity of selected quaternary ammonium compounds. Int J Food Sci Vol. 2013, Article ID 237581, 9 pages. doi: 10.1155/2013/237581.
- Breier A, Sohr D, Geffers C, Gastmeier P. Erreger nosokomialer Infektionen auf Intensivstationen. Intensivmed. 2009;46:220-7. doi: 10.1007/s00390-009-0058-8.
- Bridier A, Briandet R, Thomas V, Dubois-Brissonnet F. Comparative biocidal activity of peracetic acid, benzalkonium chloride and *ortho*-phthalaldehyde on 77 bacterial strains. J Hosp Infect. 2011;78(3):208-13. doi: 10.1016/j.jhin.2011.03.014.
- Carpentier B, Cerf O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. J Appl Microbiol. 1993;75:499-511. doi: 10.1111/j.1365-2672.1993.tb01587.x.
- Cerf O, Carpentier B, Sanders P. Tests for determining in-use concentrations of antibiotics and disinfectants are based on entirely different concepts: "resistance" has different meanings. Int J Food Microbiol. 2010;136(3):247-54. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.002.
- Chang Q, Wang W, Regev-Yochay G, Lipsitch M, Hanage WP. Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? Evol Appl. 2015;8:240-5. doi: 10.1111/eva.12185.
- Chapman JS. Characterizing bacterial resistance to preservatives and disinfectants. Int Biodeterior Biodegradation. 1998;41:241-5.
- Chapman JS. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance and co-resistance. Int Biodeterior Biodegradation. 2003;51:271-6. doi: 10.1016/S0964-8305(03)00044-1.
- Chojecka A, Wiercińska O, Röhm-Rodowald E, Kanclerski K, Jakimiak B. Glucoprotamin antimicrobial activity against selected standard antibiotic-resistant bacteria and reference strains used in the assessment of disinfection efficacy. Roczniki Państwowego Zakładu Higieny. 2015;66(3):281-8.

Literaturverzeichnis

- Chuanchuen R, Beinlich K, Hoang TT, Becher A, Karkhoff-Schweizer RR, Schweizer HP. Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects nfxB mutants overexpressing MexCD-OprJ. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:428-32. doi: 10.1128/AAC.45.2.428-432.2001.
- Cosgrove SE. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. *Clin Infect Dis.* 2006;42:S82-9. doi: 10.1086/499406.
- Cuny C, Pfeifer Y, Witte W. MRE bei Mensch und Tier: Übertragungswege und Infektionsrisiko. *Hyg Med.* 2017;42(1):D22-9. doi: 10.25646/2927.
- Dancer SJ. Controlling hospital-acquired infection: focus on the role of the environment and new technologies for decontamination. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(4):665-90. doi:10.1128/CMR.00020-14
- Davin-Regli A, Pages J-M. Cross-resistance between biocides and antimicrobials: an emerging question. *Rev sci tech Off int Epiz.* 2012;31(1):89-104.
- De la Bedoyere G. The discovery of penicillin. London: Evans Brothers Limited; 2005. p. 4-5.
- Economou V, Gousia P. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infect Drug Resist.* 2015;8:49-61. doi: 10.2147/IDR.S55778.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) 2018. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe – Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017 (zitiert vom 17. 2. 2019): <<https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/EARS-Net-report-2017-update-jan-2019.pdf>>
- Ewers C, Bethe A, Semmler T, Guenther S, Wieler LH. Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(7):646-55. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03850.x.
- Fraise AP. Biocide abuse and antimicrobial resistance – a cause for concern? *J Antimicrob Chemother.* 2002;49:11-2. doi: 10.1093/jac/49.1.11.
- Gaynes R, Edwards JR; National Nosocomial Infections Surveillance System. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis.* 2005;41(6):848-54. doi: 10.1086/432803.

Literaturverzeichnis

Gebel J, Sonntag HG, Werner HP, Vacata V, Exner M, Kistemann T. The higher disinfectant resistance of nosocomial isolates of *Klebsiella oxytoca*: how reliable are indicator organisms in disinfectant testing? J Hosp Infect. 2002;50(4):309-11. doi: 10.1053/jhin.2002.1201.

Gebel J, Carter A. Vorbedingungen für und Anforderungen an die Reinigung und Desinfektion. In: Kramer A, Assadian O, Exner M, Hübner N-O, Simon A (Hrsg.) Krankenhaus- und Praxishygiene. 3. Auflage. München: Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag; 2016, p. 24-9.

Guardabassi L, Schwarz S, Lloyd DH. Pet animals as reservoir of antimicrobial-resistant bacteria. J Antimicrob Chemother. 2004;54(2):321-2. doi: 10.1093/jac/dkh332.

Gupta P, Bhatia M, Gupta P, Omar BJ. Emerging biocide resistance among multidrug-resistant bacteria: myth or reality? A pilot study. J Pharm Bioallied Sci. 2018;10(2):96-101. doi: 10.4103/JPBS.JPBS_24_18.

Hahn H, Kaufmann SHE, Schulz TF, Suerbaum S. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 6. Auflage. Heidelberg: Springer-Verlag; 2009. p. 284-5.

Holah JT. CEN/TC 216: its role in producing current and future European disinfectant testing standards. Int Biodeterior Biodegradation. 2003;51(4):239-43. doi: 10.1016/S0964-8305(03)00045-3.

Hota B. Contamination, disinfection, and cross-colonization: are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection? Clin Infect Dis. 2004;39(8):1182-9. doi: 10.1086/424667.

Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. Medizinische Mikrobiologie. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 1963. p. 117-9.

Joynson JA, Forbes B, Lambert RJ. Adaptive resistance to benzalkonium chloride, amikacin and tobramycin: the effect on susceptibility to other antimicrobials. J Appl Microbiol. 2002;93(1):96-107. doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01667.x.

Kawamura-Sato K, Wachino J, Kondo T, Ito H, Arakawa Y. Reduction of disinfectant bactericidal activities in clinically isolated *Acinetobacter* species in the presence of organic material. J Antimicrob Chemother. 2008;61(3):568-76. doi: 10.1093/jac/dkm498.

Kawamura-Sato K, Wachino J, Kondo T, Ito H, Arakawa Y. Correlation between reduced susceptibility to disinfectants and multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter* species. J Antimicrob Chemother. 2010;65(9):1975-83. doi: 10.1093/jac/dkq227.

Khan HA, Ahmad A, Mehboob R. Nosocomial infections and their control strategies. Asian Pac J Trop Biomed. 2015;5(7):509-14. doi: 10.1016/j.apjtb.2015.05.001.

Literaturverzeichnis

Klein DA. Microbiological testing of disinfectants and decontamination for critical surfaces. In: Manivannan, G. (Ed.), *Disinfection and Decontamination: Principles, Applications and Related Issues*. CRC Press, Boca Raton (Florida); 2008, p. 215-29.

Kohlenberg A, Brümmer S, Higgins PG, Sohr D, Pienig BC, de Grahl C, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the Carbapenemase OXA-23 in a German university medical centre. *J Med Microbiol*. 2009;58:1499-507. doi: 10.1099/jmm.0.012302-0.

Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis*. 2006;6:130. doi: 10.1186/1471-2334-6-130.

Kresken M, Körber-Irrgang B, Hafner D. Occurrence of multidrug-resistant isolates (3MRGN, 4MRGN) among Gram-negative rods obtained from patients in German hospitals, 1995-2013: results of the PEG study. Annual Meeting of DGHM, Münster, Deutschland, September 27-30 2015: 189/PRP.

Kresken M, Körber-Irrgang B, Hafner D, Kaase M, Pfeifer Y, Layer F, Klare I, Werner G, Seifert H, Working Party "Antimicrobial Resistance" of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy. Prevalence of multidrug resistance among bacterial pathogens obtained from patients in hospitals and the role of tigecycline: results of the PEG 2013 study. 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Amsterdam, Netherlands, April 9-12, 2016: P0326.

Lambert RJW. Comparative analysis of antibiotic and antimicrobial biocide susceptibility data in clinical isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* between 1989 and 2000. *J Appl Microbiol*. 2004;97:699-711. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02345.x.

Langsrud S, Sidhu MS, Heir E, Holck AL. Bacterial disinfectant resistance – a challenge for the food industry. *Int Biodeterior Biodegradation*. 2003;51(4):283-90. doi: 10.1016/S0964-8305(03)00039-8.

LeChevallier MW, Cawthon CD, Lee RG. Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. *Appl Environ Microbiol*. 1988;54(3):649-54.

Lowe C, Willey B, O'Shaughnessy A, Lee W, Lum M, Pike K, et al. Outbreak of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella oxytoca* infections associated with contaminated handwashing sinks. *Emerging Infect Dis*. 2012;18(8):1242-7. doi: 10.3201/eid1808.111268.

Maillard J-Y. Bacterial resistance to biocides in the healthcare environment: should it be of genuine concern? *J Hosp Infect.* 2007;65(Suppl2):60-72. doi: 10.1016/S0195-6701(07)60018-8.

Maillard J-Y. Emergence of bacterial resistance to microbicides and antibiotics. *Microbiol Aust.* 2010;31,159-64.

Martró E, Hernández A, Ariza J, Domínguez MA, Matas L, Argerich MJ, et al. Assessment of *Acinetobacter baumannii* susceptibility to antiseptics and disinfectants. *J Hosp Infect.* 2003;55(1):39-46. doi: 10.1016/S0195-6701(03)00220-2.

McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(1):147-79. doi: 10.1128/CMR.12.1.147.

Meyer B, Cookson B. Does antimicrobial resistance or adaption to biocides create a hazard in infection prevention and control? *J Hosp Infect.* 2010;76(3):200-5. doi: 10.1016/j.jhin.2010.05.020.

Molter G, Seifert H, Mandraka F, Kasper G, Weidmann B, Hornei B, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in the intensive care unit: a multi-level strategic management approach. *J Hosp Infect.* 2016;92(2):194-8. doi: 10.1016/j.jhin.2015.11.007.

Morrissey I, Oggioni MR, Knight D, Curiao T, Coque T, Kalkanci A, et al. Evaluation of epidemiological cut-off values indicates that biocide resistant subpopulations are uncommon in natural isolates of clinically-relevant microorganisms. *PLoS ONE.* 2014;9(1): e86669. doi: 10.1371/journal.pone.0086669.

Müller S, Janßen T, Wieler LH. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* in veterinary medicine – emergence of an underestimated pathogen? *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2014;127:435-46. doi: 10.2476/0003-9466-127-443.

Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol Spectr.* 2016;4(2). doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.

Ortega Morente E, Fernandet-Fuentes MA, Grande Burgos MJ, Abriouel H, Perez Pulido R, Galvez A. Biocide tolerance in bacteria. *J Food Microbiol.* 2013;162:13-25. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.028.

Pfeifer Y, Eller C, Leistner R, Valenza G, Nickel S, Guerra B, et al. ESBL-Bildner als Infektionserreger beim Menschen und die Frage nach dem zoonotischen Reservoir. *Hyg Med.* 2013;38:294-9. doi: 10.25646/1735.

Literaturverzeichnis

Pidot SJ, Gao W, Buultjens AH, Monk IR, Guerillot R, Carter GP, et al. Increasing tolerance of hospital *Enterococcus faecium* to handwash alcohols. *Sci Transl Med*. 2018;10(452).pii:eaar6115. doi: 10.1126/scitranslmed.aar6115.

Poole K. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *J Appl Microbiol*. 2002;92:55-64S. doi: 10.1046/j.1365-2672.92.5s1.8.x.

Reichel M, Schlicht A, Ostermeyer C, Kampf G. Efficacy of surface disinfectant cleaners against emerging highly resistant gram-negative bacteria. *BMC Infect Dis*. 2014;14:292. doi: 10.1186/1471-2334-14-292.

Reiss I, Borkhardt A, Füssle R, Sziegoleit A, Gortner L. Disinfectant contaminated with *Klebsiella oxytoca* as a source of sepsis in babies. *Lancet*. 2000;356(9226):310. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02509-5.

Robert Koch-Institut (RKI) 2013. Zur aktuellen Situation bei Carbapenemase-bildenden gramnegativen Bakterien. *Epidemiologisches Bulletin* 19/2013 (zitiert vom 17. 2. 2019):1-5, <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2013/Ausgaben/19_13.pdf?__blob=publicationFile>.

Robert Koch-Institut (RKI) 2016. Bericht des Nationalen Referenzzentrums (NRZ) für gramnegative Krankenhauserreger. Zeitraum 1. Januar 2014 bis 31. Dezember 2014. *Epidemiologisches Bulletin* 2/2016 (zitiert vom 17. 2. 2019):1-4, <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2016/Ausgaben/02_16.pdf?__blob=publicationFile>.

Robinson TP, Bu DP, Carrique-Mas J, Fèvre EM, Gilbert M, Hay SI, et al. Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2016;110(7):377-80. doi: 10.1093/trstmh/trw048.

Russell AD. Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. *J Hosp Infect*. 1999;43(Suppl):S57-68. doi: 10.1016/S0195-6701(99)90066-X.

Russell AD. Mechanisms of bacterial insusceptibility to biocides. *Am J Infect Control*. 2001;29(4):259-61. doi: 10.1067/mic.2001.115671.

Russell AD. Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria. *J Appl Microbiol*. 2002;91. doi: 10.1046/j.1365-2672.92.5s1.12.x.

Russell AD. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Lancet Infect Dis*. 2003;3(12):794-803. doi: 10.1016/S1473-3099(03)00833-8.

Literaturverzeichnis

Russell AD. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. *J Hosp Infect.* 2004;57:97-104. doi: 10.1016/j.jhin.2004.01.004.

Rutala WA, Weber DJ. Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(4):597-610.

Sakagami Y, Yokoyama H, Nishimura H, Ose Y, Tashima T. Mechanism of resistance to benzalkonium chloride by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* 1989;55(8):2036-40.

Salm F, Deja M, Gastmeier P, Kola A, Hansen S, Behnke, et al. Prolonged outbreak of clonal MDR *Pseudomonas aeruginosa* on an intensive care unit: contaminated sinks and contamination of ultra-filtrate bags as possible route of transmission? *Antimicrob Resist Infect Control.* 2016;5:53. doi: 10.1186/s13756-016-0157-9.

Sánchez-Carrillo C, Padilla B, Marín M, Rivera M, Cercenado E, Vigil D, et al. Contaminated feeding bottles: The source of an outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a neonatal intensive care unit. *Am J Infect Control.* 2009;37(2):150-4. doi: 10.1016/j.ajic.2008.04.259.

Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR). Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides. European Commission, Brussels, Belgium; 2009 (zitiert vom 4. 2. 2019), <http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihhr/docs/scenihhr_o_021.pdf>.

Singbeil-Grischkat V. Desinfektion. In: Klischies R, Panther U, Singbeil-Grischkat V. *Hygiene und Medizinische Mikrobiologie.* Stuttgart: Schattauer GmbH; 2008. p. 184-203.

Steinmann J, Kaase M, Gatermann S, Popp W, Steinmann E, Damman E, et al. Outbreak due to a *Klebsiella pneumoniae* strain harbouring KPC-2 and VIM-1 in a German university hospital, July 2010 to January 2011. *Euro Surveill.* 2011;16(33):pii=19944. doi: 10.2807/ese.16.33.19944-en.

Strauch D, Böhm R. *Reinigung und Desinfektion in der Nutztierhaltung und Veredelungswirtschaft.* 2. Auflage. Stuttgart: Enke Verlag; 2002. p. 19-61.

Suerbaum S, Burchard G-D, Kaufmann SHE, Schulz TF. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie.* 8. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2016. p. 709-15.

Thomas L, Russel AD, Maillard J-Y. Antimicrobial activity of chlorhexidine diacetate and benzalkonium chloride against *Pseudomonas aeruginosa* and its response to biocide residues. *J Appl Microbiol.* 2005;98:533-43. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02402.x.

Literaturverzeichnis

Touati A, Achour W, Cherif A, Hmida HB, Afif FB, Jabnoun S, et al. Outbreak of *Acinetobacter baumannii* in a neonatal intensive care unit: antimicrobial susceptibility and genotyping analysis. *Ann Epidemiol.* 2009;19(6):372-8. doi: 10.1016/j.annepidem.2009.03.010.

Vo ATT, van Duijkeren E, Fluit AC, Gaastra W. Characteristics of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from horses. *Vet Microbiol.* 2007;124(3-4):248-55. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.04.027.

Walther B, Lübke-Becker A, Stamm I, Gehlen H, Barton AK, Janssen T, et al. Suspected nosocomial infections with multi-drug resistant *E. coli*, including extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing strains, in an equine clinic. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2014;127(11-12):421-7. doi: 10.2376/0005-9366-127-421.

Walther B, Tedin K, Lübke-Becker A. Multidrug-resistant opportunistic pathogens challenging veterinary infection control. *Vet Microbiol.* 2017;200:71-8. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.05.017.

Walther B, Klein KS, Barton AK, Semmler T, Huber C, Wolf SA, et al. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Acinetobacter baumannii* among horses entering a veterinary teaching hospital: The contemporary "Trojan Horse". *PLoS ONE.* 2018;13(1):e0191873. doi: 10.1371/journal.pone.0191873.

Wendt C, Schütt S, Dalpke AH, Konrad M, Mieth M, Trierweiler-Hauke MA, et al. First outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* in Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010;29(5):563-70. doi: 10.1007/s10096-010-0896-0.

Wieler LH, Ewers C, Guenther S, Walther B, Lübke-Becker A. Methicillin-resistant staphylococci (MRS) and extended-spectrum-beta-lactamases (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in companion animals: nosocomial infections as one reason for the rising prevalence of these potential zoonotic pathogens in clinical samples. *Int J Med Microbiol.* 2011;301(8):635-41. doi: 10.1016/j.ijmm.2011.09.009.

Yapicioglu H, Gokmen TG, Yildizdas D, Koksall F, Ozlu F, Kale-Cekinmez, Mert K, Mutlu B, Satar M, Narli N, Candevir A. *Pseudomonas aeruginosa* infections due to electronic faucets in a neonatal intensive care unit. *J Paediatr Child Health.* 2012;48(5):430-4. doi: 10.1111/j.1440-1754.2011.02248.x.

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Prävalenz multiresistenter Keime an deutschen, schweizerischen und österreichischen Krankenhäusern im Jahr 2013 (Quelle: Kresken M, Körber-Irrgang B, Hafner D, Kaase M, Pfeifer Y, Layer F, Klare I, Werner G, Seifert H, Working Party "Antimicrobial Resistance" of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy. Prevalence of multidrug resistance among bacterial pathogens obtained from patients in hospitals and the role of tigecycline: results of the PEG 2013 study. 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Amsterdam, Netherlands, April 9-12, 2016: P0326.).....8

Tabelle 2: Klassifizierung von multiresistenten gramnegativen Bakterien (MRGN) laut KRINKO. (Quelle: Anon. Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedelung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen. Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut. Bundesgesundheitsbl. 2012;55:1311-54. doi: 10.1007/s00103-012-1549-5.).....9

8 Danksagung

Ich möchte die Gelegenheit nutzen und allen ganz herzlich danken, die mich bei der Durchführung der Studie und der Niederschrift der Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Für die Bereitstellung des Themas und die exzellente wissenschaftliche Betreuung möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Uwe Truyen sowie bei Frau Dr. Stephanie Speck bedanken. Besonders Frau Dr. Speck hat mich immer unterstützt, alles in die richtigen Bahnen gelenkt und einen siebten Sinn für die Publikationen gehabt. Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Arne Rodloff vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie für die Bereitstellung der bakteriellen Isolate aus dem Uniklinikum Leipzig. Ich bedanke mich beim Sächsischen Staatsministerium für Soziales und Verbraucherschutz für die Finanzierung des Projektes.

Manja Labahn und Mario Reinhardt möchte ich für die tatkräftige Hilfe im Labor danken. Ihr hattet immer ein offenes Ohr und wart stets zuverlässig an meiner Seite, um das Arbeitspensum zu bewältigen. In Manja habe ich eine liebe Freundin gefunden und ich hoffe, der Kontakt bleibt weiterhin bestehen. Schließlich danke ich allen Mitarbeitern des Institutes für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen für das familiäre Arbeitsklima und die schöne und unvergessliche Zeit.

Ich bin so glücklich auf eine wunderbare Doktorandenzeit zurückblicken zu können. Dazu wesentlich beigetragen haben meine Freunde und Mitdoktoranden der Veterinärmedizinischen Fakultät: Dr. Cindy Wenke, Franziska Geber, Tina Rocktäschel, Lisa Eisenlöffel, Anika Krätzig, Lisa Baaske, Karoline Rieckmann, Carola Schedlbauer, Janine Starzonek, Dominique Blaue, Marie-Luise Fischer, Benjamin Oehme.

Ganz besonders danken möchte ich auch meiner ehemaligen Mitbewohnerin Dr. Aline Hillmann, die mich zwar gemeinsam mit Tigger und Lilli des Öfteren in den Wahnsinn getrieben hat, aber immer ein offenes Ohr hatte und mich in allen Lebenslagen unterstützt hat. Dafür kann ich dir nicht genug danken. Ich hoffe, wir erhalten diese Freundschaft!

Besonderer Dank gebührt natürlich meiner Familie - liebe Mutti, lieber Vati, liebe Großeltern, liebe Maja, Nelly, Gerry, Kasper und Merlin- ohne euch wäre diese Dissertation vermutlich nie zustande gekommen und ich bin so froh, dass ihr immer für mich da seid! Danke für euren Zuspruch, eure Zuversicht und Geduld mit mir.