

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

**Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Testmethoden
auf die Beurteilung der Desinfektionsmittelempfindlichkeit
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
Franziska Geber geb. Kirchner
aus Halle (Saale)

Leipzig, 2021

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Dr. Thomas W. Vahlenkamp

Betreuer: Prof. Dr. Uwe Truyen

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

Prof. Dr. Ludwig E. Hölzle, Institut für Nutztierwissenschaften, Fakultät
Agrarwissenschaften der Universität Hohenheim

Tag der Verteidigung: 22.06.2021

Für meine Eltern, Hannes & Malte

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Multiresistente Erreger (MRE)	3
2.1.1	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA).....	3
2.1.2	<i>Enterobacteriaceae</i>	4
2.1.3	Vorkommen von MRE in der Veterinärmedizin, der Humanmedizin und im Lebensmittel.....	6
2.2	Biozidresistenz	8
2.3	Prüfrichtlinien.....	9
2.3.1	Prinzip der Desinfektionsmittelprüfung nach DVG	9
2.3.2	weitere Prüfrichtlinien/ Desinfektionsmittellisten	12
2.3.3	verwendete chemische Grundsubstanzen.....	14
2.3.4	Wirkungsweise von Desinfektionsmitteln.....	15
2.4	Beschreibung der ausgewählten Bakterienstämme	16
3	Veröffentlichung	19
3.1	Eigenanteil.....	19
3.2	Fremdanteil	19
3.3	veröffentlichter Zeitschriftenartikel.....	20
4	Diskussion	31
5	Zusammenfassung	37
6	Summary	39
	Literaturverzeichnis	41
	Tabellenverzeichnis	49
	Abbildungsverzeichnis	50
	Danksagung	51

Abkürzungsverzeichnis

BAC	Benzalkoniumchlorid
BSA.....	bovines Serumalbumin
CEN	Comité Européen de Normalisation = Europäisches Komitee für Normung
CSA.....	Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Agar
CSL	Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung
DM.....	Desinfektionsmittel
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DVG.....	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V.
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESBL	Extended-Spectrum β -Lactamasen = erweitertes Spektrum an β -Lactamasen
et al.....	Lateinisch, entspricht dem deutschen Kürzel u.a. = und andere
ETH.....	Ethanol
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GA	Glutaraldehyd
GKZ	Gesamtkeimzahl
IHO.....	Industrieverband Hygiene und Oberflächenschutz
IMISE.....	Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie
KbE.....	Koloniebildende Einheit
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KRINKO	Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention
log ₁₀ /lg.....	Logarithmus zur Basis 10 (dekadischer Logarithmus)
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
NaCl	Natriumchlorid

Abkürzungsverzeichnis

PA.....	peracetic acid = Peressigsäure
QC.....	quality control = Qualitätskontrolle
RKI.....	Robert Koch-Institut
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SHO.....	sodium hypochlorite = Natriumhypochlorit
<i>S. Typhimurium</i>	<i>Salmonella</i> Typhimurium
subsp.	Subspezies (Unterart)
TC.....	Comité technique = Technisches Komitee
VAH.....	Verbund für angewandte Hygiene e.V.
WSH.....	Wasser standardisierter Härte

1 Einleitung

Reinigung und Desinfektion sind wichtige Instrumente zur Bekämpfung der Ausbreitung und Verschleppung von Infektionserregern wie Viren, Bakterien und Pilzen in den verschiedensten Lebensbereichen (Gesundheitswesen, Tierproduktion, Haushalt etc.). Ein besonderes Augenmerk ist dabei auf multiresistenten Erregern zu legen. Die jährlichen Neuinfektionen mit Methicillin-resistenten *Staphylococcus (S.) aureus* (MRSA) sind kontinuierlich rückläufig, wohingegen Extended-Spectrum β -Lactamase produzierende *Enterobacteriaceae* (ESBL) weiterhin steigende Tendenzen in Deutschland aufweisen (RKI 2019). Um eine sichere Wirksamkeit der Desinfektionsmittel für den entsprechenden Anwendungsbereich zu gewährleisten, gibt es sowohl in der Human- wie auch in der Veterinärmedizin Institutionen, die spezielle Prüfverfahren zur Testung von Handelspräparaten herausgeben und diese dann bei nachgewiesener erfolgreicher Prüfung in den entsprechenden Desinfektionsmittel-Listen veröffentlichen (DVG 2020, VAH 2020). Aufgrund unterschiedlicher Ursachen kann es zu einer erhöhten Unempfindlichkeit gegenüber den chemischen Substanzen kommen. Beispiele sind der vermehrte Einsatz von Desinfektionsmitteln auch in alltäglichen Produkten wie Putzmitteln, Handseifen oder Kosmetika (RUTALA et al. 2000, MAILLARD 2007). Auch Anwenderfehler, wie das Aufbringen zu geringer (subinhibitorischer) Konzentration oder das Nichteinhalten der angegebenen Einwirkzeiten, können zur vorübergehenden oder dauerhaften Adaptation einiger Stämme führen (SPECK et al. 2020). Das Vorhandensein von Desinfektionsmittelresistenzen bei verschiedenen Bakterienspezies ist daher kein neues Phänomen (CHAPMAN 2003, RUSSELL 2004).

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde untersucht, inwiefern die zugrundeliegende Methode der Desinfektionsmitteltestung Einfluss auf eine fundierte Aussage hinsichtlich Desinfektionsmittel-Resistenzen bei Bakterien hat. Dabei wurden Antibiotika-sensible und (multi-)resistente Stämme verglichen. Weiterhin wurde eruiert, ob es signifikante Unterschiede zwischen grampositiven und gramnegativen Stämmen gibt. Außerdem erfolgten Untersuchungen zum Einfluss auf die Desinfektionswirksamkeit durch organische Belastung und bei unterschiedlichen Kontaktzeiten.

Dafür wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation fünf aktive Substanzen, die in gängigen chemischen Desinfektionsmittel-Formulierungen enthalten sind, auf ihre Effektivität gegenüber (multi-)resistenten Isolaten von *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* und *S. Typhimurium* im Vergleich zu sensiblen Referenz-Stämmen getestet. Diese Testsubstanzen umfassten Benzalkoniumchlorid (BAC), Glutaraldehyd (GA), Ethanol (ETH), Peressigsäure (PA), und Natriumhypochlorit (SHO). Die Wirksamkeit wurde gemäß den Richtlinien der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG) in einer dreistufigen Desinfektionsmittel-Testung überprüft (DVG 2017). Zuerst wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK) und

somit die bakteriostatische Wirksamkeit der Desinfektionsmittel bestimmt und ein geeignetes Neutralisationsmittel für jede aktive Substanz determiniert (DVG 2017a). Fortführend erfolgte die Durchführung des qualitativen Suspensionstests, um die bakterizide Wirksamkeit nach vier Zeitpunkten zu bestimmen. Abgeschlossen wurden die Untersuchungen mit der Bestimmung bakterizider Konzentrationen im Keimträgertest an zwei Zeitpunkten (DVG 2017b). Der Keimträgertest simuliert praxisnahe Bedingungen auf einer nicht-porösen Oberfläche. Die Testung zielte auf die Ermittlung wirksamer Konzentrations-Zeit-Relationen für jeden Teststamm und jede aktive Substanz ab. Zudem wurde der Einfluss von geringer organischer Belastung auf die Effizienz der Desinfektionsmittel untersucht.

2 Literaturübersicht

2.1 Multiresistente Erreger (MRE)

Der Begriff multiresistente Erreger (MRE) bezeichnet Krankheitserreger, die eine Unempfindlichkeit gegenüber mehreren Wirkstoffgruppen von Antibiotika haben. Dabei unterscheidet man zwischen intrinsischer und erworbener Resistenz. Bei den erworbenen Genen, welche zur Unempfindlichkeit führen, kann man wiederum drei Hauptkategorien unterscheiden (SCHWARZ et al. 2013):

1. Inaktivierung von Enzymen (z.B. β -Lactamasen)
2. Reduktion der intrazellulären Anreicherung des Wirkstoffes (reduzierter Einstrom in die Zelle, z.B. durch Änderung der Lipopolysaccharide der äußeren Zellmembran oder vermehrter Ausstrom aus der Zelle durch aktive Prozesse, wie z.B. durch spezifische oder unspezifische Exporter)
3. Veränderung der Zielstruktur (z.B. das *mecA*-Gen bei MRSA, welches zur Ausbildung eines alternativen Penicillin-Bindungsprotein führt)

Es gibt eine Vielzahl an Bakterienspezies, die Resistenzmechanismen ausgebildet haben und diese im Erbgut weitergeben können:

- Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA)
- *Enterobacteriaceae* der Spezies *E. coli*, *K. pneumoniae* und *S. Typhimurium*, welche ein erweitertes Spektrum an β -Laktamase produzieren (ESBL)
- Vancomycin-resistenter *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis* (VRE)

Darüber hinaus sind in der Literatur viele Fälle beschrieben, wo neben der Antibiotikaresistenz auch Resistenzen gegenüber Desinfektionsmitteln vorhanden sind (CHAPMAN 2003, MEYER und COOKSEN 2010).

2.1.1 Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Staphylokokken sind grampositive kokkenförmige Bakterien von 0,5 bis 1,5 μm Durchmesser, welche einzeln, in kurzen Ketten oder traubenförmig angeordnet sind. Sie sind mit wenigen Ausnahmen (*S. aureus* subsp. *anaerobius* und *S. saccharolyticus*) katalasepositiv und besitzen den typischen Zellwandaufbau grampositiver Bakterien (HERMANS et al. 2004). Ein wichtiger Vertreter dieser Gattung ist *S. aureus*. Er verursacht sowohl beim Menschen (z.B. eitrige Hautveränderungen, Weichteil- und Organabszesse, Sepsis, toxinvermittelte Erkrankungen durch Enterotoxine) wie auch bei Tieren (z.B. Staphylokokkenmastitis der Wiederkäuer, chronische Hautinfektionen beim Pferd, eitrige Entzündungen bei Hund und Katze, Nabel- und Dottersackentzündungen mit septikämischen Verläufen und Arthritis beim Geflügel) schwerwiegende Krankheitsbilder (VALENTIN-WEIGAND 2015).

Eine Staphylokokkenart, welche durch eine Veränderung des Penicillin-Bindungs-Proteins (PBP 2a) verursacht durch das *mecA*-Gen eine Unempfindlichkeit gegenüber β -Laktam Antibiotika (z.B. Methicillin, Oxacillin) entwickelt hat, wird als Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) bezeichnet (BECKER 2004). Dabei unterscheidet man zwischen drei verschiedenen MRSA-Varianten. Die initial Anfang der 60er-Jahre aufgetretenen Isolate, welche weiterhin häufig in medizinischen Einrichtungen bei Patienten vorkommen, werden als HA-MRSA (für „healthcare-associated“ bzw. „healthcare-acquired“) bezeichnet. Betroffene Personen weisen klassische Risikofaktoren wie Antibiotikaeinnahme oder invasive medizinische Eingriffe für eine Infektion oder Besiedlung mit MRSA auf. MRSA, die in der normalen Umgebung auftreten und nicht mit medizinischen Einrichtungen in Verbindung stehen, werden als "community-acquired MRSA" (CA-MRSA) bezeichnet. MRSA-Stämme, die in der Tierzucht eine Rolle spielen, heißen gemäß ihrem Reservoir „livestock-associated“-MRSA (LA-MRSA). Die am häufigsten vorkommenden LA-MRSA gehören in Deutschland dem klonalen Komplex (CC) 398 an. (DAWSON et al. 2015).

Zum Nachweis der Methicillinresistenz gibt es eine Vielzahl an Methoden. Als Testsubstanz kam früher Methicillin als Leitantibiotikum zum Einsatz, welches durch Oxacillin bzw. Cefoxitin abgelöst wurde. Zu den klassischen Nachweismethoden zählen der Bouillonverdünnungstest mit standardisierten Breakpoints bei der MHK-Bestimmung, der Agarverdünnungstest, der Agardiffusionstest mit Oxacillin-Plättchen bei welchem die Hemmhofgröße bestimmt wird und der Agglutinationstest mit monoklonalen Antikörpern gegen das PBP2a. Außerdem gibt es automatisierte kommerzielle Testsysteme, wie z.B. die Vitek-Kartensystem von bioMérieux. Als molekulare Methoden zum Nachweis der Methicillinresistenz stehen Gensonden und alternative Nukleinsäuren-Nachweistechiken zur Verfügung (BECKER 2004).

2.1.2 Enterobacteriaceae

Zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehören Bakterien, die gramnegativ, fakultativ anaerob, stäbchenförmig und bis zu 3 μm lang sind. Zu den weiteren gemeinsamen Eigenschaften gehört, dass sie Oxidase-negativ und Katalase-positiv sind, auf nicht angereichertem Medium und MacConkey-Agar wachsen, sowie die meisten aufgrund von peritrich angeordneten Flagellen beweglich sind. Zu den *Enterobacteriaceae* gehören über 40 Gattungen und über 180 Spezies (QUINN et al. 2011). Sie sind weit verbreitet im Darm von Säugetieren und häufige Erreger von Zoonosen. Viele Vertreter können ebenfalls in der Umwelt überleben und haben auch eine Bedeutung als Fischpathogen (WIELER et al. 2015).

Die für diese Arbeit relevanten Gattungen sind *Escherichia* (*E. coli*), *Klebsiella* (*K. pneumoniae*) und *Salmonella* (*S. Typhimurium*).

E. coli-Bakterien sind Auslöser von intestinalen Erkrankungen, wie der Colidiarrhoe bei Ferkeln und Kälbern, der Ödemkrankheit der Absatzferkel, intestinale *E. coli*-Infektionen mit starkem

Durchfall bei Haus- und Nutztieren sowie auch Septikämien. Sie können aber auch extra-intestinale Erkrankungen hervorrufen, wie Septikämien beim Rind und Lamm, Mastitiden bei Rindern, Harnwegsinfektionen bei Hund und Katze oder Colibakteriosen beim Wirtschaftsgeflügel.

Klebsiellen sind unbewegliche Bakterien und weisen eine Kapsel auf. Durch Klebsiellen hervorgerufene Erkrankungen sind oft sehr hartnäckig und therapeutisch schwer zu beeinflussen. Es treten Atemwegs- und Harnwegsinfektionen bei Hunden und Katzen, Mastitiden bei Kühen sowie Septikämien auf.

Bei der Gattung *Salmonella* gibt es mehr als 2.500 Serovare mit unterschiedlicher Virulenz und Wirtsanpassung. Salmonellenisolate vom Tier sind immer als potentielle Zoonoseerreger zu betrachten. Man unterscheidet zwischen Erregern fieberhafter Allgemeininfektionen (typhoider Salmonellosen) und enteritischer Salmonellosen. Salmonelleninfektionen sind beim Rind anzeigepflichtig und bei den meisten anderen Tierarten (Schwein, Schaf, Pferd, Hund, Katze, Pute, Taube, Wassergeflügel, Zoo- und Wildtiere) meldepflichtig. Beim Schwein und Geflügel gibt es spezielle Salmonellen-Verordnung (Geflügel-Salmonellen-VO, Schweine-Salmonellen-VO), welche die Betreiber verpflichtet, präventiv eigene Kontrollen durchzuführen und positive Befunde zu melden. Auch beim Menschen besteht Meldepflicht. Es wird zwischen als Allgemeininfektion verlaufende Krankheitsbilder des Typhus und Paratyphus und den Salmonellenenteritiden unterschieden (WIELER et al. 2015).

Durch die Bildung von Extended-Spectrum β -Lactamasen (ESBL) können β -Lactam-Resistenzen bei gramnegativen Infektionserregern auftreten. Da die ESBL-Gene auf Plasmiden liegen, kommt es zu einer schnellen Weiterverbreitung der Resistenz sowohl innerhalb einer Spezies als auch zwischen den verschiedenen gramnegativen Spezies. Beim Menschen dominieren in Deutschland bei *E. coli*- und *K. pneumoniae*-Isolaten die ESBL-Typen mit den Enzymvarianten CTX-M-15 (Cefotaximasen) und CTX-M-1 und beim Nutztier die Variante CTX-M-1 (PFEIFER et al. 2013).

Die Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert-Koch-Institut (RKI) klassifiziert multiresistente gramnegative Stäbchen auf Basis ihrer phänotypischen Resistenzeigenschaften. Dabei sind 3MRGN **M**ultiresistente **g**ramnegative Stäbchen mit Resistenz gegen **drei** von vier häufig eingesetzten Antibiotikagruppen (1. Acylureidopenicilline (Leitsubstanz: Piperacillin), 2. Cephalosporine der 3./4. Generation (Ceftazidim und/oder Cefotaxim) und 3. Fluorchinolone (Ciprofloxacin)) und 4MRGN dementsprechend **M**ultiresistente **g**ramnegative Stäbchen mit Resistenz gegen **vier** der vier Antibiotikagruppen (zusätzliche Resistenz gegenüber Carbapenemen (Imipenem und /oder Meropenem) (KRINKO 2012).

2.1.3 Vorkommen von MRE in der Veterinärmedizin, der Humanmedizin und im Lebensmittel

Um einen Überblick über das Vorkommen von MRE im humanmedizinischen Bereich zu erhalten, gibt es nationale und internationale Surveillance-Systeme. Das EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) bündelt Informationen auf europäischer Ebene, wohingegen das nationale Surveillance-System ARS (Antibiotika-Resistenz-Surveillance) vom RKI deutschlandweit Daten ermittelt. Des Weiteren gibt es das Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (KISS) mit verschiedenen Modulen, wie z.B. das MRSA-KISS, welches MRSA auf Krankenhausebene erfasst (PFEIFER und ELLER 2012). Für nachgewiesene MRSA in Blutkulturen und im Liquor gilt laut Infektionsschutzgesetz (IfSG, ANON. 2000) in Deutschland Meldepflicht. Auf Länderebene hat beispielsweise das Sächsische Staatsministerium für Soziales und Gesellschaftlichen Zusammenhalt das MRE-Netzwerk Sachsen 2010 ins Leben gerufen. Ziel der Fachgruppe Surveillance und Antibiotika-Strategie ist es, unter anderem flächendeckende Daten zum Auftreten von Resistenzen bei ausgewählten Erregern in Sachsen zu erheben und den Ärzten in Krankenhäusern und ambulanten Praxen zur Verfügung zu stellen (ANON. 2020).

In Tabelle 1 ist zu erkennen, dass das Auftreten von MRSA rückläufig ist. In Deutschland lag der Anteil von MRSA an allen *S. aureus*-Isolaten in der stationären Versorgung bei 23,8% im Jahr 2010 und sank 2018 auf 12,7%. In der ambulanten Versorgung fiel der Anteil von 13% im Jahr 2010 auf 7,5% im Jahr 2018 (RKI 2019a).

Tabelle 1: Resistenzdaten laut ARS von *S. aureus*-Isolaten gegenüber Oxacillin, Datenstand 23.08.2019, abgerufen am 07.09.2020 (RKI 2019a)

Intervall	stationäre Versorgung		ambulante Versorgung	
	Resistent [%]	gesamte Anzahl der Testungen	Resistent [%]	gesamte Anzahl der Testungen
2018	12,7	96.443	7,5	93.141
2017	13,2	92.789	7,5	92.263
2016	14,9	94.111	8,7	86.885
2015	16,3	82.698	10,1	62.933
2014	15,2	44.084	10,1	33.484
2013	16,2	56.517	10,6	35.366
2012	19,2	50.901	11,5	34.214
2011	21,6	28.712	12,0	24.392
2010	23,8	26.115	13,0	19.301
2009	24,2	21.542	13,5	15.652
2008	22,5	14.115	12,3	13.928

Das Nationale Referenzzentrum (NRZ) für Staphylokokken und Enterokokken typisiert eingesandte Isolate. Die vorherrschenden epidemischen MRSA in deutschen Krankenhäusern (HA-MRSA) sind Isolate der klonalen Linien ST225/„Rhein-Hessen-Epidemiestamm“ und ST22/„Barnim-Epidemiestamm“ und gehören dem klonalen Komplex CC22 (45%) und CC5 (17%) an. Im europäischen Durchschnitt ist der Anteil von 18% im Jahr 2013 auf 16,9% im Jahr 2017 gesunken. Jedoch gibt es weiterhin eine starke Diskrepanz zwischen Niedrigprävalenzländern (u.a. Norwegen, Dänemark, Niederlande) und den Hochprävalenzländern im süd-europäischen Raum (u.a. Portugal, Griechenland). In Letzteren lag der Anteil im Jahr 2017 weiterhin bei über 35% (RKI 2019).

Im Gegensatz dazu wird deutschland- und europaweit ein Anstieg der Nachweishäufigkeit von ESBL verzeichnet. Insbesondere der Anteil von *E. coli* mit Resistenz gegenüber Drittgenerations-Cephalosporinen (z.B. Cefotaxim) ist wie in Tabelle 2 zu sehen in den letzten Jahren auf über 10% gestiegen (CUNY et al. 2017, RKI 2019a).

Tabelle 2: Resistenzdaten laut ARS von *E. coli*-Isolaten gegenüber Cefotaxim, Datenstand 23.08.2019, abgerufen am 07.09.2020 (RKI 2019a)

Intervall	stationäre Versorgung		ambulante Versorgung	
	Resistent [%]	gesamte Anzahl der Testungen	Resistent [%]	gesamte Anzahl der Testungen
2018	11,7	218.993	7,9	190.526
2017	12,0	187.600	7,8	150.838
2016	11,6	155.245	7,0	124.885
2015	11,1	13.6451	6,9	83.117
2014	11,0	87.962	7,2	58.905
2013	11,1	113.722	7,2	49.584
2012	10,0	108.986	6,2	57.978
2011	9,2	58.121	4,6	49.612
2010	8,8	50.650	4,0	40.945
2009	7,6	41.068	3,5	32.938
2008	6,6	25.705	2,8	30.329

Es gibt ebenfalls einen vermehrten Nachweis von vor allem ESBL/AmpC-bildender *E. coli* in Lebensmittel-liefernden Tieren (EWERS et al. 2012). Die Verbreitung und Übertragung von ESBL-Bakterien und MRE, z.B. über Tierkontakte oder die Lebensmittelkette ist vielfältig möglich (PFEIFER et al. 2013). Es wurde belegt, dass MRSA von Nutztieren über direkten oder indirekten Tierkontakt auf Landwirte und deren Familien oder Veterinäre übertragen werden können. Insbesondere der MRSA-Klon ST398 ist europaweit in Nutztierbeständen (Rind, Schwein und Geflügel) vorhanden und wurde auch beim Menschen nachgewiesen. MRSA-

Stämme der klonale Linie ST22 besiedeln meist Katzen, sind aber auch häufige krankenhausessoziierte MRSA beim Menschen (KÖCK et al. 2013).

ESBL-bildende *Salmonella enterica* verschiedenster Serovare aus Lebensmitteln und Viehbeständen zeigen am Häufigsten die Variante CTX-M-1, die auch in humanen nosokomialen *E. coli* und *Klebsiella*-Isolaten vorkommt (PFEIFER et al. 2013).

Des Weiteren gibt es Fallberichte von Carbapenem-resistenten (VM-1) *E. coli*- und *S. enterica* subsp. *enterica*-Isolaten aus Schweine- und Geflügelhaltungen in Deutschland. Diese sind auch ein großes therapeutisches und krankenhaushygienisches Problem beim Menschen (FISCHER et al. 2012, FISCHER et al. 2013).

Ein Risikofaktor für die Übertragung von ESBL-bildenden *E. coli* auf den Menschen ist über die Nahrungskette gegeben. Untersuchungen von KOLA et al. (2012) haben eine Nachweisrate von 44% auf Hähnchenfleisch aus deutschen Supermärkten ergeben. Um eine Übertragung zu vermeiden, muss eine strikte Küchenhygiene eingehalten werden.

Andererseits ist auch eine Mensch-Tier-Übertragung durch engen Kontakt mit Haustieren möglich. EWERS et al. (2010) beschreiben, dass human-assoziierte CTX-M-15 bildende *E. coli* der klonalen Linie O25:H4-ST131 ebenfalls bei Haustieren identifiziert wurden.

2.2 Biozidresistenz

Unter Bioziden werden laut der Verordnung (EU) Nr. 528/2012 (Biozidverordnung, ANON. 2012) jegliche Stoffe bezeichnet, die dazu bestimmt sind, auf andere Art als durch bloße physikalische oder mechanische Einwirkung Schadorganismen zu zerstören, abzuschrecken, unschädlich zu machen, ihre Wirkung zu verhindern oder sie in anderer Weise zu bekämpfen. Dabei werden vier Hauptgruppen unterschieden: Desinfektionsmittel, Schutzmittel, Schädlingsbekämpfungsmittel und sonstige Biozidprodukte.

Handelsübliche Desinfektionsmittel enthalten oft eine Mischung aus verschiedenen Verbindungen, die auf mehrere zelluläre Zielstrukturen wirken, so dass eine Resistenz gegen diese Produkte meist ungewöhnlich ist (KARATZAS et al. 2008, McDONNELL und RUSSELL 1999). Dennoch sind Resistenzen gegenüber jodfreisetzungsfähigen Verbindungen, quaternären Ammoniumverbindungen, Oxidationsmitteln, Phenolen, chlorfreisetzende Verbindungen und Aldehyden längst bekannt (CHAPMAN 2003). Biozide sind weit verbreitet und werden breit eingesetzt. Dies kann zu Anpassungen bei Bakterien führen, welche zur Entwicklung einer geringeren Anfälligkeit gegenüber antibakteriellen Mitteln führt. Die bakteriellen Resistenzmechanismen sind für antimikrobielle Substanzen als auch für Biozide ähnlich, so dass die Exposition gegenüber Bioziden zu einer Kreuzresistenz gegenüber antibakteriellen Mitteln führen kann und umgekehrt (DAVIN-REGLI und PAGÈS 2012).

Laut RUSSELL (2003) gibt es zwei Definitionen, um eine Resistenz gegenüber Desinfektionsmitteln zu beschreiben. Zum einen, wenn es zu einer Unempfindlichkeit der Stämme bei Überschreitung der „in-use“-Konzentration (Konzentration, wie vom Hersteller empfohlen) kommt und zum zweiten, wenn ein Stamm bei einer bestimmten Desinfektionsmittel-Konzentration resistenter ist als die anderen Stämme der gleichen Spezies. Bei einer Unempfindlichkeit, die aufgrund intrinsischer Mechanismen entsteht, spricht man laut McDONNELL und RUSSELL (1999) besser von „Toleranz“ statt von „Resistenz“. Diese kommen am häufigsten vor. Beispiele dafür sind Sporenbildung (z.B. bei den Gattungen *Bacillus* und *Clostridien*), eine komplexe Zellwand bei Mykobakterien oder die Bildung von schützenden Biofilmen.

Erworbene Resistenz ist das Erlangen einer neuen Eigenschaft durch die Mikroorganismen und kann durch Mutation aber auch durch den Transfer von Resistenz verleihenden Genen erfolgen. Diese äußert sich in Effluxmechanismen oder Enzyymbildung (MAILLARD 2007). Belegte Plasmid-gesteuerte Resistenz (*qac* Gene) gegenüber quarternären Ammoniumverbindungen existieren bei *S. aureus*, *Pseudomonas* spp. und einigen *Enterobacteriaceae* (FRAISE 2002).

Heutzutage sind MRSA und ESBL-produzierende Bakterien von großer Bedeutung in der humanmedizinischen Versorgung, treten aber auch in der Tierproduktion und in tiermedizinischen Kliniken auf (CUNY et al. 2017, EWERS et al. 2012, WALTHER et al. 2014). Bei *S. aureus* wurden chromosomale und plasmidcodierte Multiresistenz-übertragende Efflux-Pumpen identifiziert, und in vitro-Studien an Efflux-Mutanten bei einzelnen Bioziden zeigten eine Co-Selektion für eine reduzierte Fluorchinolon-Empfindlichkeit (HUET et al. 2008). In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die EmrAB-Efflux-Pumpe eine Unempfindlichkeit gegenüber einigen Bioziden sowie dem Fluorchinolon-Antibiotikum Nalidixinsäure verleiht (RUSSELL 1999).

Daher werden Bedenken geäußert, dass multiresistente Bakterien ebenfalls unempfindlich gegen Biozide werden könnten (SCENIHR 2010, WALES und DAVIES 2015). Darüber hinaus wird angenommen, dass die Selektion resistenter Bakterien durch Desinfektionsmittel erfolgen kann (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) 2001).

2.3 Prüfrichtlinien

2.3.1 Prinzip der Desinfektionsmittelprüfung nach DVG

Die Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V. (DVG) ist ein Zusammenschluss aus Tierärzten/innen aus Hochschulen, Praxis, Industrie, Behörden, Ministerien und Forschungsinstituten als wissenschaftliche Gesellschaft der Veterinärmedizin. Gegründet wurde diese Organisation bereits 1951. Aktuell gibt es 40 Fachgruppen, sowie spezielle Arbeitskreise und Ausschüsse (DVG 2020a). Einer davon ist der Ausschuss „Desinfektion in der Veterinär-

medizin“, welcher unter anderem Desinfektionsmittellisten für die Bereiche Lebensmittelproduktion und Lebensmittelverarbeitung inklusive Großküchen, Tierhaltung sowie Tierärztliche Praxis und Tierheime herausgibt. Darin werden Handelspräparate gelistet und veröffentlicht, welche nach den Richtlinien der DVG geprüft und als wirksam befunden wurden. Die aktuell gelisteten Präparate können online abgefragt werden (DVG 2020). Die vorliegenden Ergebnisse in dieser Dissertation wurden auf Grundlage der Prüfrichtlinien vom 21.02.2015 (MHK-Bestimmung) bzw. vom 17.02.2013 (qualitativer Suspensionstest und Keimträgerstest) mit kleinen Modifikationen erstellt. Die aktuellen Versionen der Richtlinien sind auf der Website der DVG abrufbar (DVG 2017a, DVG 2017b).

Im ersten Schritt wird die bakteriostatische Wirkung der Desinfektionsmittel mittels Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) im Bouillon-Makrodilutionstest ermittelt (Ablauf s. Abbildung 1). In diesem Schritt wird auch ein passender Enthemmer für das jeweilige Desinfektionsmittel selektiert, um die Interaktion zwischen Desinfektionsmittel und Erreger in den kommenden Tests nach einer bestimmten Reaktionszeit effektiv unterbrechen zu können.

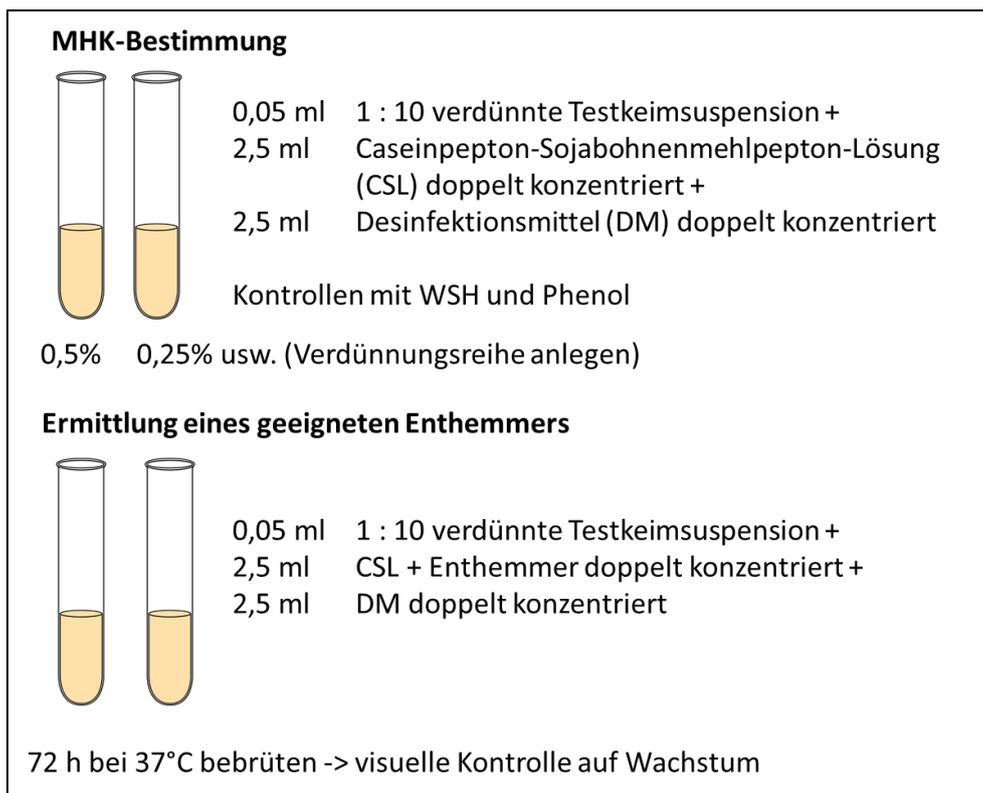


Abbildung 1: Schematische Darstellung MHK-Test nach DVG: Erstellung einer Testkeimsuspension in Trypton-NaCl-Lösung mit $1,0 \times 10^8$ – $1,0 \times 10^9$ KbE/ml mit anschließender Verdünnung 1:10 in Wasser standartisierter Härte (WSH), Verdünnungsreihe der Desinfektionsmittel in WSH anlegen, Positivkontrolle mit WSH, Negativkontrolle mit Phenol

Nachfolgend werden die Reagenzgläser für 72 h bei 37°C inkubiert. Zur Beurteilung des Testergebnisses wird im Anschluss die Trübung visuell ermittelt. Ist das Gemisch im Reagenz-

glas weiterhin klar, war die Hemmung des Bakterienwachstums durch die entsprechende Desinfektionsmittel-Konzentration erfolgreich (positives Testergebnis). Ist das Gemisch jedoch eingetrübt, konnte die Desinfektionsmittel-Konzentration das Bakterienwachstum nicht unterbinden (negatives Testergebnis). Die MHK ist dabei die höchste Desinfektionsmittelverdünnung, die das sichtbare Keimwachstum noch unterdrückt.

Der anschließende zweite Schritt des Testverfahrens ist der qualitative Suspensionstest (s. Abbildung 2), bei dem die bakterizide Wirkung der Desinfektionsmittel in Abhängigkeit des Zeitfaktors an vier Zeitpunkten (5, 15, 30 und 60 min) und unter Einfluss einer geringen organischen Belastung (3 g/l Bovines Serumalbumin (BSA)) bzw. ohne organische Belastung ermittelt wird.

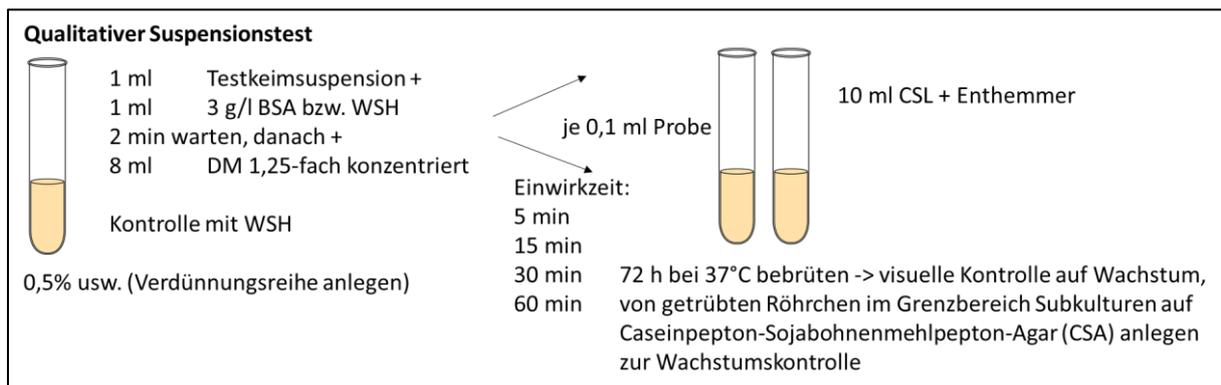


Abbildung 2: Schematische Darstellung qualitativer Suspensionstest nach DVG: Erstellung einer Testkeimsuspension in Trypton-NaCl-Lösung mit $1,5 - 5,0 \times 10^8$ KbE/ml, Test von vier Desinfektionsmittel-Konzentrationen im Doppelansatz nach vier Einwirkzeiten mit geringer und ohne Eiweißbelastung, Positivkontrolle mit WSH

Im letzten Schritt erfolgt die Bestimmung der bakteriziden Wirkung im praxisnahen Keimträgertest auf Edelstahlplättchen an zwei Zeitpunkten mit geringer Eiweißbelastung, d.h. 3 g/l BSA (s. Abbildung 3).

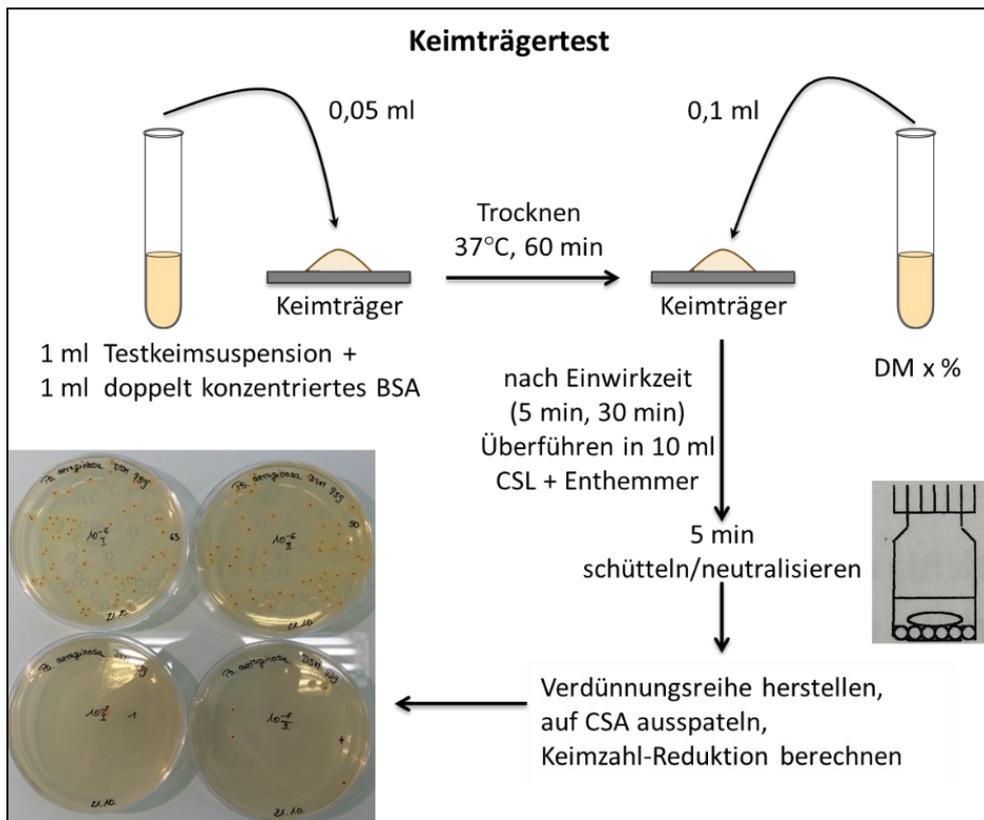


Abbildung 3: Schematische Darstellung Keimträgertest nach DVG: Testkeimsuspension in Trypton-NaCl-Lösung mit $1,5 - 5 \times 10^9$ KbE/ml, DM = Desinfektionsmittel

Die Berechnung der Keimzahl-Reduktion erfolgt entsprechend folgender Gleichungen:

$$N = \frac{c}{(n_1 + 0,1n_2)} \times \frac{0,025}{d} \times 10$$

$$N_a \text{ (oder } N_w, B, C) = \frac{c}{(n_1 + 0,1n_2)} \times \frac{10}{d} \times 10$$

$$\lg R = \lg N_w - \lg N_a$$

(N = Testkeimsuspension, c = Summe der einbezogenen Viable Count (V_c)-Werte, n_1/n_2 = Summe der einbezogenen V_c -Werte der niedrigeren bzw. höheren Verdünnungsstufe, die in die Berechnung einbezogen wurden, d = Verdünnungsfaktor der niedrigeren Verdünnung, N_a = Testansatz, N_w = Wasser-Kontrollwert, B = Toxizitätskontrolle, C = Neutralisationskontrolle, R = Reduktion)

Als erfolgreiche Desinfektion der Testkeime gilt eine Reduktion der Keimmenge um $\geq 4 \log_{10}$ -Stufen.

2.3.2 weitere Prüfrichtlinien/ Desinfektionsmittellisten

Um eine Harmonisierung der Prüfverfahren in Europa zu erreichen, hat das Europäische Komitee für Normung (Comité Européen de Normalisation, abgekürzt **CEN**) ebenfalls

Prüfrichtlinien etabliert. Diese gelten als Grundlage für alle Staaten und sind Mindestanforderungen für die nationalen Vorgaben. Die EN 14885 stellt dabei die Übersichtsnorm über Testverfahren und Zulassungsvoraussetzungen für chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika dar. Die Normen werden im CEN technischen Komitee (TC) 216 erarbeitet und sind wie folgt strukturiert:

- Phase 1: Ermittlung der grundsätzlichen Wirksamkeit im Suspensionsversuch ohne Belastungssubstanzen
- Phase 2: Stufe 1: Suspensionsversuche unter anwendungsrelevanten Bedingungen (z.B. organische Belastung, Einwirkzeit)
Stufe 2: Keimträgertests
- Phase 3: Praxisversuche für verschiedene Anwendungsbereiche

(BÖHM 2002, HOLAH 2003, MEYER 2008)

Auf nationaler Ebene gibt es in Deutschland neben den bereits oben beschriebenen Prüfrichtlinien nach **DVG** weitere Organisationen, welche Handelspräparate nach verschiedenen Desinfektionsverfahren für die entsprechenden Einsatzgebiete testen (s. Tabelle 3). Präparate, die nach Richtlinien des Verbunds für angewandte Hygiene e.V. (**VAH**) geprüft wurden, sind für die routinemäßige und prophylaktische Desinfektion zur Verhütung von Infektionen im Krankenhaus, in der ärztlichen und zahnärztlichen Praxis und in öffentlichen Bereichen (Kindertagesstätten, Schulen, Sportstätten etc.) geeignet. Dabei wird unterschieden zwischen hygienischer Händewaschung, Händedesinfektion, Hautantiseptik, Flächendesinfektion, Instrumentendesinfektion und Wäschedesinfektion (ANON. 2013).

Tabelle 3: Überblick über die in Deutschland bestehenden Desinfektionsmittellisten und deren Einsatzgebiete

Organisation	Einsatzgebiet
Desinfektionsmittellisten der DVG	Anwendung für den Veterinär- und Lebensmittelbereich
Desinfektionsmittellisten des VAH	für prophylaktische Desinfektion im medizinischen Bereich und in öffentlichen Einrichtungen
Liste des Robert Koch-Institut (RKI)	bei behördlich angeordneter Desinfektion laut IfSG Paragraf 18 Abs. 1,2 im Seuchenfall (ANON. 2000)

Organisation	Einsatzgebiet
Desinfektionsmittelliste des Industrieverband Hygiene & Oberflächenschutz (IHO)	<p>online einsehbare Listen für folgende Bereiche:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Händedesinfektion - Flächendesinfektion (mit und ohne Mechanik) - Instrumentendesinfektion (maschinelle und manuelle Aufbereitung) - Wäschedesinfektion - Lebensmittelhygiene, öffentlicher und industrieller Bereich - Tierhygiene (Flächen- und Sitzendesinfektion) <p>Wirksamkeitsergebnisse werden eigenverantwortlich von den Herstellern eingestellt, umfangreich und aktuell (IHO 2019) Achtung! Hier keine unabhängige Bewertung!</p>

2.3.3 verwendete chemische Grundsubstanzen

Die getesteten Grundsubstanzen mit der entsprechenden Wirkstoffgruppe und ihren Einsatzgebieten sind in Tabelle 4 aufgeführt (ANON. 2013, BÖHM 2002).

Tabelle 4: in der Studie verwendete Grundsubstanzen

Referenzsubstanz	Wirkstoffgruppe	Einsatz
Benzalkoniumchlorid	Quaternäre Ammoniumverbindung (Quats)	Lebensmittelindustrie, Flächen-, Haut- und Schleimhautdesinfektion
Natriumhypochlorit	Chlor- und Jodverbindungen/chlorabspaltende Verbindungen	Wasser- und Instrumentendesinfektion
Peressigsäure	Peroxidverbindungen/oxidierende Substanzen (Sauerstoffabspalter)	Instrumenten-, Flächen- und Wäschedesinfektion
Glutaraldehyd	Aldehyde	Flächen-, Instrumenten-, Wäsche- und Raumdesinfektion
Ethanol	Alkohole	Händedesinfektion, Hautantiseptik, Oberflächen (Klinik)

2.3.4 Wirkungsweise von Desinfektionsmitteln

Laut DENYER und STEWARD (1998) sind die drei wichtigsten Grundmechanismen der Reaktion von Desinfektionsmitteln mit den Zielstrukturen chemische Reaktionen, ionische Wechselwirkungen und physikalische Wechselwirkungen. Angriffsorte der Desinfektionsmittel sind bei Alkoholen, Quats und Amininen die Zellmembran (Durchschlagen oder Veränderung der Struktur), bei den Aldehyden und Peroxiden eine unspezifische Reaktion mit Proteingruppen der Zielorganismen und bei den Halogenen und Aldehyden setzt der zerstörende Effekt durch eine unspezifische Reaktion mit dem genetischen Material ein (MEYER und COOKSON 2010).

Die Empfindlichkeit der Mikroorganismen gegen Desinfektionsmittel variiert. Die in nachfolgender Abbildung 4 obenstehenden Organismen sind dabei am empfindlichsten.

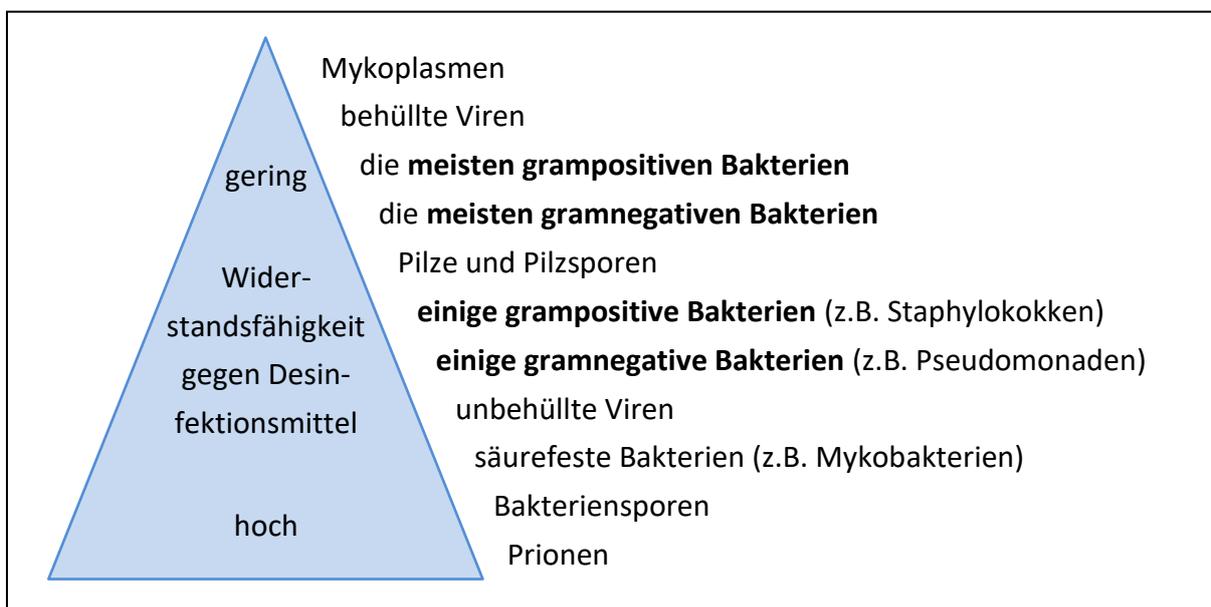


Abbildung 4: Resistenzskala von Mikroorganismen gegenüber Chemikalien (nach BÖHM 2002, McDONNELL und RUSSEL 1999)

Bei Pilzen und noch wichtiger bei Bakterien ist die Unterscheidung zwischen vegetativen Formen und Sporen, wobei letztere unempfindlicher sind. Die Lipopolysaccharidschicht gramnegativer Bakterien stellt eine zusätzliche Penetrationsbarriere für antimikrobielle Substanzen dar, was deren geringere Sensibilität im Gegensatz zu grampositiven Bakterien bedingt (DENYER 1995).

Für eine erfolgreiche Desinfektion spielen mehrere Faktoren eine Rolle: unter anderem korrekte Dosierung/Anwendung des Desinfektionsmittels, Verschmutzungsgrad der Oberflächen (Einfluss von organischer Belastung → vorab sorgfältige Reinigung wichtig), Art und Beschaffenheit der zu desinfizierenden Materialien, Höhe der Ausgangsbelastung, Umgebungstemperatur/Einwirktemperatur (Kältefehler) und die Wasserhärte des Verdünnungswassers (BÖHM 2002).

Nachfolgend sind die in dieser Studie verwendeten Grundsubstanzen und deren Wirkungsweise detaillierter aufgeführt:

Benzalkoniumchlorid

Die Wirkungsweise von Quats liegt zum einen in der Bildung von Poren in die Zellmembran und einer damit verbundenen Störung des Zellmilieus. Zum anderen können Quats in die Zelle eindringen und führen dann zur Denaturierung von Proteinen (BÖHM 2002).

Natriumhypochlorit

Chlorabspalter bilden in wässriger Lösung unterchlorige Säure (HOCl), welche die Zellwand der Mikroorganismen durchdringt und seine Wirkung als starkes Oxidationsmittel durch die Freisetzung von naszierendem Sauerstoff entwickelt (Oxidation von Zellproteinen und Nukleinsäuren). Außerdem reagiert dieser mit Sulfhydryl (SH)-Gruppen von Zellenzymen und inhibiert diese (BÖHM 2002).

Peressigsäure

In wässriger Lösung zerfällt Peressigsäure in Essigsäure und Wasserstoffperoxid und setzt dabei atomaren Sauerstoff frei, welcher die Zellproteine und Nukleinsäuren der Mikroorganismen oxidiert (MÜLLER et al. 2011).

Glutaraldehyd

Aldehyde haben eine sehr reaktive Aldehydgruppe, welche mit den Amino- und Amidgruppen der Zellproteine reagiert und dadurch irreversible Methylbrücken bildet. Dies führt zur Zerstörung der Zellwand und einer daraus folgenden Störung des osmotischen Gleichgewichts der Zellen. Ein weiterer Wirkmechanismus ist die Inhibierung von Zellenzymen, was eine Behinderung des Zellstoffwechsels zur Folge hat (BÖHM 2002).

Ethanol

Alkohole führen zur Denaturierung von Proteinen, wobei dafür ein bestimmter Anteil an Wasser nötig ist, da sonst ein konservierender Effekt eintritt. Außerdem kommt es durch physikalische Interaktionen bei aliphatischen Alkoholen zu einer Lösung von Phospholipiden mit der Folge einer gestörten Membran-Integrität (BÖHM 2002).

2.4 Beschreibung der ausgewählten Bakterienstämme

Das Spektrum der untersuchten Keime umfasst Problemkeime aus Krankenhäusern und Tierhaltungen, deren Übertragung zwischen Tier und Mensch bekannt oder möglich ist.

In dieser Studie wurden zwölf grampositive *S. aureus*-Stämme (zwei MSSA, neun MRSA und ein MRSA-QC Stamm) und 13 gramnegative *Enerobacteriaceae* (z.T. ESBL-positiv, drei 3MRGN) der Gattung *E. coli*, *K. pneumoniae* und *S. Typhimurium* untersucht.

Es handelt sich dabei um sechs Referenzstämme aus dem Leibniz-Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, DSM-Stämme). Davon dienen zwei als DVG-Referenzstämme, einer als Typstamm, zwei sind European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Quality control (QC)-Stämme und einer wird als QC-Stamm für die Testung von Medien verwendet. Die verbliebenen 19 Stämme sind Feldisolate unterschiedlicher Herkunft (Mensch, Tiere und Umwelt, Infektion oder Kolonisation).

In Tabelle 5 sind die verwendeten Bakterienstämme, dessen Herkunft und zusätzliche Informationen wie *spa*-Gen-Typisierung, Zuordnung zum klonalen Komplex und Klassifikation der β -Lactamasen detailliert aufgeführt.

Tabelle 5: in der Studie verwendete Bakterienstämme

Abk.	Strangnummer	Spezies	Herkunft	Zusätzliche Informationen
SA 1	DSM 799, ATCC 6538	<i>S. aureus</i>	Mensch; Wunde	DVG-Referenzstamm
SA 2	DSM 2569, ATCC 29213	<i>S. aureus</i>	Wunde	EUCAST QC-Stamm
SA 3	08-00537	<i>S. aureus</i>	Pute; septische Arthritis; Punktat	MSSA; t034, CC398
SA 4	11-03182-1	<i>S. aureus</i>	Mensch; septische Blutkultur	MRSA; t034, CC398
SA 5	09-01136	<i>S. aureus</i>	Mastschwein; nasale Besiedlung; Abstrich	MRSA; t571, CC398
SA 6	09-02832	<i>S. aureus</i>	Mensch; Wundinfektion; Abstrich	MRSA; t1255, CC398
SA 7	09-02988	<i>S. aureus</i>	Schwein; Stallstaub	MRSA; t011, CC398
SA 8	08-00775	<i>S. aureus</i>	Absatzferkel; nasale Besiedlung; Abstrich	MRSA; t034, CC398
SA 9	09-02960	<i>S. aureus</i>	Mensch; Brandwunde; Abstrich	MRSA; t108, CC398
SA 10	09-00711	<i>S. aureus</i>	Ferkel; nasale Besiedlung; Abstrich	MRSA; t034, CC398

2 Literaturübersicht

Abk.	Strangnummer	Spezies	Herkunft	Zusätzliche Informationen
SA 11	13-00869	<i>S. aureus</i>	Mensch; nasale Besiedlung; Abstrich	MRSA; t011, CC398
SA 12	14-01263	<i>S. aureus</i>	Ferkel; nasale Besiedlung; Abstrich	MRSA; t034, CC398
EC 1	DSM 682, ATCC 10536	<i>E. coli</i>	Nicht bekannt	DVG-Referenzstamm
EC 2	249/11	<i>E. coli</i>	Hühnerbrust	ESBL positiv (SHV-12), (B1) ¹
EC 3	189/11	<i>E. coli</i>	Mensch; Harnwegsinfektion	ESBL positiv (CTX-M-15), (A) ¹ , 3MRGN
EC 4	112/13	<i>E. coli</i>	Mensch; Trachealsekret; Ausbruchsisolat	ESBL positiv (CTX-M-1), (D) ¹ , 3MRGN
EC 5	258/11	<i>E. coli</i>	Hühnerbrust	ESBL positiv (CTX-M-1), (B1) ¹
EC 6	305/11	<i>E. coli</i>	Hühnerbrust	ESBL positiv (CTX-M-1, TEM-135), (A) ¹
EC 7	277/11	<i>E. coli</i>	Hühnerbrust	ESBL positiv (TEM-52), (D) ¹
EC 8	314/11	<i>E. coli</i>	Hühnerbrust	ESBL positiv (CTX-M-2), (B1) ¹
KP 1	DSM 30104, ATCC 13883	<i>K. pneumoniae</i>	Nicht bekannt	Typstamm
KP 2	DSM 26371, ATCC 700603	<i>K. pneumoniae</i>	hospitalisierter Mensch; Urin	EUCAST QC-Stamm; SHV-18
KP 3	175/13	<i>K. pneumoniae</i>	Mensch; Ausbruchsisolat	ESBL positiv (CTX-M-15, SHV-1), 3MRGN
ST 1	DSM 19587, ATCC 14028	<i>S. Typhimurium</i>	Küken; Herz- und Lebergewebe	QC-Stamm für Medien
ST 2	28/12	<i>S. Typhimurium</i>	Mensch	ESBL positiv (CTX-M-1)

¹ PCR-basierte phylogenetische Gruppierung gemäß CLERMONT et al. (2000)

3 Veröffentlichung

3.1 Eigenanteil

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 der Universität Leipzig unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Uwe Truyen und Frau Dr. Stephanie Speck durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte durch die oben genannten Personen in Zusammenarbeit mit dem Sächsischen Staatsministerium für Soziales und Gesellschaftlichen Zusammenhalt (Abteilung Gesundheits- und Veterinärwesen, Verbraucherschutz), welches die Studie finanzierte.

Die Laborversuche wurden eigenständig auf Grundlage der Prüfrichtlinien von chemischen Desinfektionsmitteln der DVG von der Autorin dieser Dissertation geplant und durchgeführt. Fachliche Unterstützung und Rücksprachen zum Versuchsaufbau erhielt die Autorin durch ihre Betreuer Frau Dr. Stephanie Speck und Herrn Prof. Dr. Uwe Truyen. Praktische Hilfe während der Versuche sowie beim Aufbereiten der Materialien wurde durch medizinisch-technische Assistenten des Institutes (Herr Mario Reinhardt, Frau Evelin Brumme, Frau Dana Rüster) geleistet. Die Versuche umfassten die fachgerechte Bestimmung der MHK, die Durchführung der Suspensionstests und der Keimträgertests, sowie deren Vor- (Kultivierung der Bakterien, Abfüllen der Medien, eindeutige Beschriftung der Reagenzröhrchen und Agarplatten vor Versuchsbeginn) und Nacharbeiten (Auszählung der Kolonien, Reinigung und Desinfektionen der verwendeten Materialien, Autoklavieren des infektiösen Materials). Die Anfertigung der Protokolle und Berechnung der Keimzahlen bzw. der Reduktionsfaktoren erfolgte eigenständig. Die Auswertung und Darstellung der Ergebnisse erfolgten durch die Autorin unter Rücksprache mit Frau Dr. Stephanie Speck. Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach vorheriger Beratung und mit Unterstützung durch Herrn Dr. Markus Kreuz aus dem Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie (IMISE).

Die in diesem Rahmen gewonnenen Ergebnisse werden nur für diese Dissertationsschrift und die darin eingebundene Veröffentlichung verwendet. Die Autorin versichert, das Manuskript selbstständig verfasst und in Zusammenarbeit mit den Koautoren fertiggestellt zu haben. Es wurden keine weiteren als die angegebenen Quellen verwendet.

3.2 Fremdanteil

Die Bestimmung der Antibiotikaresistenzen und Erstellung von Antibiogrammen der Testkeime erfolgte durch zwei Fremdlabore (human- und veterinärmedizinisch orientiert) auf Grundlage von Systemkarten im VITEK®2 System (bioMérieux).

Außerdem erfolge die Bestimmung der zusätzlichen Informationen über die Testkeime, wie die Zuordnung des klonalen Komplexes oder die Bestimmung der phylogenetischen Gruppe durch Fremdlaboratorien.

3.3 veröffentlichter Zeitschriftenartikel

Die in der Dissertation erhobenen Befunde wurden veröffentlicht in:

Titel: **A comparison of different methods to determine disinfectant susceptibility of multidrug-resistant bacteria**

Autoren: Franziska Geber, Mario Reinhardt, Markus Kreuz, Christiane Cuny, Yvonne Pfeifer, Uwe Truyen, Stephanie Speck

Veröffentlicht in: Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift 132, Heft 7/8 (2019),
Seiten 367-376

doi: 10.2376/0005-9366-18047

Berl Münch Tierärztl Wochenschr
DOI 10.2376/0005-9366-18047

© 2019 Schlütersche
Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG
ISSN 0005-9366

Korrespondenzadresse:
stephanie.speck@vetmed.uni-leipzig.de

Eingegangen: 27.06.2018
Angenommen: 05.11.2018

Online first: 12.03.2019
<http://vetline.de/facharchiv/158/3222>

Summary

Zusammenfassung

U.S. Copyright Clearance Center
Code Statement:
0005-9366/2019/18047 \$ 15.00/0

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Universität Leipzig, Leipzig, Germany¹
Institut für medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie (IMISE) der Universität Leipzig, Leipzig, Germany²
Robert Koch-Institut, FG 13, Nosokomiale Infektionserreger und Antibiotikaresistenzen, Wernigerode, Germany³

A comparison of different methods to determine disinfectant susceptibility of multidrug-resistant bacteria

Ein Vergleich verschiedener Methoden zur Bestimmung der Desinfektionsmittelempfindlichkeit von multiresistenten Bakterien

Franziska Geber¹, Mario Reinhardt¹, Markus Kreuz², Christiane Cuny³, Yvonne Pfeifer³, Uwe Truyen¹, Stephanie Speck¹

The efficacy of Benzalkonium chloride (BAC), sodium hypochlorite, peracetic acid, glutaraldehyde, and ethanol against multidrug-resistant bacteria was assessed in a comprehensive three-step test series according to the guidelines of the German Veterinary Society. Bacteriostatic minimum inhibitory concentrations (MICs) and bactericidal concentrations were determined by broth macro-dilution, qualitative suspension tests and practical tests on stainless steel carriers without mechanical action. We examined whether the test method influences outcome with regard to bacterial biocide susceptibility or resistance. Marked differences in efficacious concentrations were noticed as a function of the test method and disinfectant applied resulting in increasing or decreasing values. This was most obvious for BAC as bactericidal values obtained by qualitative suspension tests were up to 100 times higher as compared to MICs whereas practical test results exceeded MICs 1,500-fold at maximum. Moreover, incubation time had a significant influence on bactericidal potency in practical tests. The effect of organic soiling on bactericidal concentrations was most striking for BAC and sodium hypochlorite. Our results underline that MIC determination and qualitative suspension tests are insufficient approaches to evaluate biocide susceptibility or resistance considerably regarding BAC. This highlights the necessity for standard methods that are suitable to assess biocide resistance for a broad range of disinfectants and allow for comparison between different studies.

Keywords: disinfection, bacteria, MIC, qualitative suspension test, carrier test

Die Wirksamkeit von Benzalkoniumchlorid (BAC), Natriumhypochlorit, Peressigsäure, Glutaraldehyd und Ethanol gegenüber multiresistenten Bakterien wurde in einem dreistufigen Verfahren nach Vorgabe der Deutschen veterinärmedizinischen Gesellschaft umfassend untersucht. Zur Bestimmung der bakteriostatischen minimalen Hemmkonzentration (MHK) wurde die Bouillon-Makrodilution eingesetzt, während die bakteriziden Konzentrationen mittels qualitativen Suspensionstests und praxisnahen Keimträgertests auf Edelstahlkeimträgern ohne Mechanik ermittelt wurden. Es wurde untersucht, inwiefern das Testverfahren das Ergebnis hinsichtlich der Beurteilung bakterieller Empfindlichkeit oder Resistenz gegenüber Bioziden beeinflusst. Es ergaben sich maßgebliche Unterschiede hinsichtlich der wirksamen Konzentration, die in Abhängigkeit von der Testmethode und dem Desinfektionsmittel höher oder niedriger lagen. Dieses war am deutlichsten für BAC, dessen bakterizide Konzentration im qualitativen Suspensionstest bis zu 100-fach höher lag als der MHK-Wert, wohingegen die Ergebnisse des Keimträgertests im Maximum 1.500-fach über dem MHK-Wert lagen. Darüber hinaus hatte die Inkubationszeit einen deutlichen Einfluss auf die bakterizide Wirksamkeit in den Keimträgertests und der Effekt von organischer Belastung wurde vor allem in den Tests mit BAC und Natriumhypochlorit deutlich. Unsere Ergebnisse unterstreichen, dass MHK-Bestimmung und qualitative Suspensions-

tests hinsichtlich der Beurteilung, ob Bakterien empfindlich oder Biozid-resistent sind, vor allem im Hinblick auf BAC ungeeignete Methoden sind. Dieses verdeutlicht, dass geeignete und standardisierte Methoden für die Bestimmung der Empfindlichkeit oder Resistenz von Bakterien gegenüber einer breiten Auswahl von Desinfektionsmitteln notwendig sind, die darüber hinaus den Vergleich zwischen verschiedenen Studien erlauben.

Schlüsselwörter: Desinfektion, Bakterien, MHK, qualitativer Suspensionstest, Keimträgertest

Introduction

Disinfection is the mainstay of a good hygiene management, which is essential to prevent and control infectious diseases. Commercial disinfectants often contain a mixture of different compounds that act on multiple cellular target sites hence resistance to these products is usually uncommon (Karatzas et al. 2008, McDonnell and Russell 1999). Nevertheless, bacterial resistance to iodine releasing compounds, quaternary ammonium compounds, oxidants, phenols, chlorine releasing compounds and aldehydes has long since been reported (Chapman 2003). Recently, concerns have been raised that multi-drug-resistant bacteria might likewise become unsusceptible to biocides (SCENIHR 2010, Wales and Davies 2015). Moreover, it has been assumed that selection of resistant bacteria may occur through disinfectants (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) 2011). Therefore, it is important to ensure the efficacy of chemical disinfectants. Compared to antimicrobial susceptibility testing, there is no definition of biocide resistance based

on breakpoints (Russell 2003, Morrissey et al. 2014) but it was defined as bacterial survival at in-use concentrations of disinfectants (Russell 2003). Many studies determined minimum inhibitory concentrations (MICs) to evaluate biocide susceptibility or resistance as this provides the simplest procedure (Langsrud and Sundheim 1998, Thomas et al. 2005). Methods comprised agar diffusion assays (He et al. 2017) or were adopted from CLSI guidelines for antimicrobial susceptibility testing (Aarestrup and Hasman 2004, Hasanvand et al. 2015, Morrissey et al. 2014, Oosterik et al. 2014). Others applied European standard (Reichel et al. 2014) or country-specific evaluation methods for the bactericidal activity of chemical disinfectants (Couto et al. 2013, Espigares et al. 2017, Schwaiger et al. 2014, Wieland et al. 2017). Hence, results are not necessarily comparable as they vary in test methods, culture media, contact time, and incubation time. Moreover, results on biocide resistance are contradictory (Ortega Morente et al. 2013).

In the present study we investigated whether multi-drug-resistant bacteria isolated from food, environment,

TABLE 1: Bacteria used for disinfectant testing

Code	Strain number	Species	Origin	Additional strain information
SA 1	DSM 799, ATCC 6538	<i>S. aureus</i>	human; wound	DVG recommended reference strain
SA 2	DSM 2569, ATCC 29213	<i>S. aureus</i>	wound	EUCAST QC strain
SA 3	08-00537	<i>S. aureus</i>	turkey; septic arthritis	MSSA; t034, CC398
SA 4	11-03182-1	<i>S. aureus</i>	human blood culture; sepsis	MRSA; t034, CC398
SA 5	09-01136	<i>S. aureus</i>	fattener; nasal colonization	MRSA; t571 CC398
SA 6	09-02832	<i>S. aureus</i>	human; wound infection	MRSA; t1255, CC398
SA 7	09-02988	<i>S. aureus</i>	pig stable; dust	MRSA; t011 CC398
SA 8	08-00775	<i>S. aureus</i>	piglet; nasal colonization	MRSA; t034, CC398
SA 9	09-02960	<i>S. aureus</i>	human; burn	MRSA; t108, CC398
SA 10	09-00711	<i>S. aureus</i>	piglet; nasal colonization	MRSA; t034, CC398
SA 11	13-00869	<i>S. aureus</i>	human; nasal colonization	MRSA; t011, CC398
SA 12	14-01263	<i>S. aureus</i>	piglet; nasal colonization	MRSA; t034, CC398
EC 1	DSM 682, ATCC 10536	<i>E. coli</i>	not specified	DVG recommended reference strain
EC 2	249/11	<i>E. coli</i>	chicken meat	ESBL positive (SHV-12), (B1) ¹
EC 3	189/11	<i>E. coli</i>	human; urinary tract infection	ESBL positive (CTX-M-15), (A) ¹ , 3MRGN*
EC 4	112/13	<i>E. coli</i>	human; outbreak strain; tracheal fluid	ESBL positive (CTX-M-1), (D) ¹ , 3MRGN
EC 5	258/11	<i>E. coli</i>	chicken meat	ESBL positive (CTX-M-1), (B1) ¹
EC 6	305/11	<i>E. coli</i>	chicken meat	ESBL positive (CTX-M-1, TEM-135), (A) ¹
EC 7	277/11	<i>E. coli</i>	chicken meat	ESBL positive (TEM-52), (D) ¹
EC 8	314/11	<i>E. coli</i>	chicken meat	ESBL positive (CTX-M-2), (B1) ¹
KP 1	DSM 30104, ATCC 13883	<i>K. pneumoniae</i>	not specified	Type strain
KP 2	DSM 26371, ATCC 700603	<i>K. pneumoniae</i>	hospitalized human, urine	EUCAST QC strain; SHV-18
KP 3	175/13	<i>K. pneumoniae</i>	human; outbreak strain	ESBL positive (CTX-M-15, SHV-1), 3MRGN
ST 1	DSM 19587, ATCC 14028	<i>S. Typhimurium</i>	chicken; heart and liver tissue	QC strain for media
ST 2	28/12	<i>S. Typhimurium</i>	human	ESBL positive (CTX-M-1)

* 3MRGN = Multidrug-Resistant Gram-Negative rods that show resistance to penicillins (piperacillin), third generation cephalosporins (cefazidime and/or cefotaxime) and fluoroquinolones (ciprofloxacin) (Commission for Hospital Hygiene and Infection Prevention 2012); QC = quality control; ¹ PCR-based phylogenetic grouping according to Clermont et al. (2000)

TABLE 2: Composition of neutralizers used for quenching disinfectant activity

Tryptic soy broth supplemented with	Neutralizer		
	N _{BAC}	N _{GA}	N _{OX}
Tween 80	30 g/l	na	30 g/l
Lecithin	1 g/l	na	3 g/l
Histidine	1 g/l	7.5 g/l	1 g/l
Sodium thiosulfate	3 g/l	na	3 g/l
Saponin	na	na	30 g/l

N_{BAC} = neutralizer for benzalkonium chloride, N_{GA} = neutralizer for glutaraldehyde, N_{OX} = neutralizer for peracetic acid and sodium hypochlorite; na = not applicable. Tween 80, histidine, and sodium thiosulfate were purchased from AppliChem GmbH, and lecithin was obtained from Carl Roth GmbH + Co. KG.

humans and livestock are less susceptible to active substances commonly used for disinfection compared to reference strains. Test procedures followed the guidelines of the German Veterinary Medical Society (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, DVG), an important reference institution for issuance of certificates and listing of disinfection procedures in Germany. Disinfectant efficacy was assessed in a three-step process: At first MICs were determined followed by the assessment of bactericidal concentrations using qualitative suspension tests, and finally practical tests on surfaces (i.e. stainless steel carriers) without mechanical action were performed. Results of the different methods were compared with regard to suitability of the method to determine biocide susceptibility or resistance. We provide comprehensive data showing that the test method significantly influences test outcome, thus also the interpretation of susceptibility or resistance against disinfectants.

Materials and methods

Bacterial strains

Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus (S.) aureus* (LA-MRSA) (n = 9), methicillin-sensitive *S. aureus* (n = 1), Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia (E.) coli* (n = 7), *Salmonella (S.) Typhimurium* (n = 1) and *Klebsiella (K.) pneumoniae* ssp. *pneumoniae* (n = 1), were provided from different laboratories in Germany (Table 1). Reference strains were obtained from the Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ; Table 1). Antibiotic susceptibilities of all bacterial strains were laboratory-confirmed (VITEK[®]2, bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen, Germany) at an established laboratory diagnostics company (amedes MVZ Leipzig/Halle GmbH, Halle, Germany) prior to disinfectant testing. The reference strains *S. aureus* DSM 799 and *E. coli* DSM 682 recommended for disinfectant testing (Anonymous 2017a, 2017b) were fully susceptible to all antibiotics tested. The remaining reference strains revealed species-specific (wildtype) resistance patterns (data not shown).

Microorganisms were stored on beads in CRYO-BANK[™] tubes (MAST Diagnostika GmbH, Reinfeld, Germany) at -80 °C. Stock cultures were recovered from beads every two weeks using Columbia agar with sheep blood^{PLUS} (Oxoid Deutschland GmbH/Thermo Scientific, Wesel, Germany). Working cultures were prepared on tryptone soy agar (TSA; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany). *S. Typhimurium* 28/12 (ST 2) was

grown on TSA + ampicillin (0.1 µg/ml). According to the DVG guidelines (Anonymous 2017a, b) the second sub-culture was used for all further experiments.

Preparation of disinfectants and neutralizing agents

Benzalkonium chloride (BAC; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, Germany), sodium hypochlorite (SH), peracetic acid (PA), ethanol (ETH; all from AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany), and glutaraldehyde (GA; Carl Roth GmbH + Co. KG) were diluted in water of standardized hardness (WSH) to the final test concentrations. All tests were performed according to the guidelines for disinfectant testing provided by the DVG (Anonymous 2017a, 2017b). Neutralizers (Table 2) were prepared in tryptic soy broth (TSB; Carl Roth GmbH + Co. KG) at double strength. ETH was neutralized by a 1 : 2-dilution in TSB. In all experiments, the neutralizer used was effective in quenching disinfectant activity and was not toxic to the bacterial cells.

Bactericidal activity of disinfectants

Determination of minimum inhibitory concentrations

Minimum inhibitory concentrations (MICs) were assessed using the broth macro-dilution method (Anonymous 2017a) with minor modifications. We assumed a disinfectant efficacy at concentrations below 1% with the exception of ETH. Accordingly, we tested 0.1%, 0.25%, 0.5%, 0.75%, and 1% as recommended by the DVG (Anonymous 2017a). Whenever MIC was below 0.1%, the following concentrations were tested in addition: 0.05%, 0.01%, 0.005%, and 0.001%. ETH was tested at concentrations of 1.5%–4% at 0.5%-steps and from 5%–15% at 1%-steps. Briefly, screw cap tubes containing 2.5 ml double concentrated TSB or neutralizing agent were filled with 2.5 ml of double concentrated disinfectant. Bacterial test suspensions (10⁸–10⁹ cfu/ml) were prepared and 50 µl were added to each tube. Controls were prepared according to DVG guidelines (Anonymous 2017a). In addition, toxicity of the neutralizers was tested by inoculation of 50 µl of the bacteria test suspension into 5 ml of neutralizer. Tubes were agitated and incubated at 37 °C. After 72 h of incubation, turbidity was measured as an indicator of bacterial growth. The MIC was defined as the lowest concentration of disinfectant where no visible growth occurred. Each concentration was tested in duplicates at two independent test series.

Qualitative suspension test (dilution-neutralization method)

Based on MIC results, disinfectant concentrations were adjusted for the qualitative suspension tests. Briefly, 1 ml of bacteria (1.5 × 10⁸–5 × 10⁸ cfu/ml) was mixed with 1 ml BSA (3 g/l; Carl Roth GmbH + Co. KG) and incubated for 2 min (Anonymous 2017b). In experiments without organic load, BSA was replaced by WSH. Thereafter, 8 ml of the respective disinfectant were added. The resulting suspensions were gently mixed and incubated at room temperature for 5 min, 15 min, 30 min and 60 min, respectively. 100 µl of these suspensions were then transferred to 10 ml neutralizing solution and incubated at 37 °C. After 72 h tubes were checked for bacterial growth. Each disinfectant was tested in duplicate in two independent series. These tests were performed using seven *S. aureus* (SA 1–7), four *E. coli* (EC 1–4), three *K. pneumoniae* (KP 1–3), and both *S. Typhimurium* (ST 1–2).

Drying control

Prior to the carrier tests the effect of drying on viability and reduction of bacterial numbers was exemplarily tested on five strains (SA 1, SA 7, EC 1, ST 1, and KP 1). 50 µl of the respective bacteria suspension were allowed to dry on a stainless steel carrier at 37 °C for maximum 60 min. Thereafter, bacteria were recovered as described below and the logarithm of total bacterial counts before and after drying was compared.

Practical test without mechanical action on stainless steel carriers

Carrier tests (Anonymous 2017b) were performed with organic load (i.e. 3 g/l BSA). Disinfectant concentrations were deduced from MIC results. Briefly, 50 µl of bacteria (1.5×10^9 – 5.0×10^9 cfu/ml) were placed onto a stainless steel carrier and incubated at 37 °C until dried (maximum 60 min). Subsequently, the surface of the carrier was covered with 100 µl of the disinfectant. The reaction was stopped using 10 ml of the respective neutralizer after 5 min and 30 min of contact time, respectively. Bacterial numbers were determined by the spread-plate method using 100 µl/plate. Plates were inoculated in duplicates and incubated at 37 °C for 48 h. A logarithmic reduction (LR) in viable counts of ≥ 4 (LR ≥ 4) confirmed sufficient bactericidal activity (Anonymous 2017b). Experiments included a WSH control (disinfectant replaced by WSH), a neutralizer toxicity control, and a neutralization control. Each disinfectant was tested in two independent test series.

Statistical analysis

The Mann-Whitney U test was used to compare MICs determined for a respective disinfectant between Gram-positive and Gram-negative bacteria. The results of the carrier tests were likewise compared. For comparison of the two points in time (5 min vs. 30 min) in the suspension test (with organic load) and in the carrier test, respectively, the exact Wilcoxon signed-rank test was applied. Moreover, MIC test results were compared with carrier test results. Analyses were calculated using IBM SPSS, Version 22 (IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Germany) and R version 3.3.1. Differences between groups were regarded as significant for p-values < 0.05 (two-sided).

Results**MIC determination**

Results are displayed in Table 3. All *S. aureus* strains revealed identical MICs for BAC which also applied for the Gram-negative bacteria. *S. aureus* were significantly more susceptible to BAC compared to Gram-negative bacteria ($p = 0.00000019$) whereas the latter were significantly more susceptible to ETH ($p = 0.00000019$) and SHO ($p = 0.0149$). Compared to the reference strains individual *E. coli* and all *S. aureus* isolates tolerated marginally higher (1.125–1.25-fold) ETH values. In addition, a twofold increase in MICs for GA and SHO was noticed for individual MRSA and ESBL-producing isolates compared to the reference strains. In contrast, two MRSA and seven ESBL-producing strains with lower MICs for ETH, PA, and SHO in comparison to the reference strains were also identified.

TABLE 3: Minimum inhibitory concentrations for a total of 25 strains determined for five disinfectants

Strain	MIC (%) of				
	BAC	GA	ETH	PA	SHO
SA 1*	< 0.001	0.25	8	0.05	0.1
SA 2	< 0.001	0.25	10	0.05	0.1
SA 3	< 0.001	0.5	9	< 0.01	0.1
SA 4	< 0.001	0.25	9	0.05	0.1
SA 5	< 0.001	0.25	10	0.05	0.1
SA 6	< 0.001	0.25	9	0.05	0.1
SA 7	< 0.001	0.5	9	0.05	0.1
SA 8	< 0.001	0.25	9	0.05	0.1
SA 9	< 0.001	0.25	9	0.01	0.1
SA 10	< 0.001	0.25	10	0.05	0.1
SA 11	< 0.001	0.25	10	0.05	0.1
SA 12	< 0.001	0.25	10	0.05	0.1
EC 1*	0.005	0.25	6	0.05	0.05
EC 2	0.005	0.25	6	0.05	0.05
EC 3	0.005	0.25	7	0.05	0.1
EC 4	0.005	0.25	7	0.01	0.1
EC 5	0.005	0.25	6	0.01	0.1
EC 6	0.005	0.5	6	0.01	0.05
EC 7	0.005	0.25	6	0.05	0.05
EC 8	0.005	0.25	6	0.01	0.05
KP 1*	0.005	0.25	7	0.05	0.1
KP 2	0.005	0.25	6	0.05	0.1
KP 3	0.005	0.25	6	0.05	0.1
ST 1*	0.005	0.25	6	0.05	0.1
ST 2	0.005	0.25	6	0.05	0.05

MRSA and ESBL strains are shaded in light grey

BAC = benzalkonium chloride, GA = glutaraldehyde, ETH = ethanol, PA = peracetic acid, SHO = sodium hypochlorite, SA = *S. aureus*, EC = *E. coli*, KP = *K. pneumoniae*, ST = *S. Typhimurium*

* Indicates reference strains for disinfectant testing according to DVG

* Indicates the *K. pneumoniae* type strain and a reference strain for *Salmonella*.

Qualitative suspension test**Benzalkonium chloride**

Without (w/o) organic soiling, BAC (Table 4) resulted in identical bactericidal concentrations for all *S. aureus* strains independent of time. In the presence of BSA a higher bactericidal concentration was measured with strain-specific differences at 5 min and 15 min of exposure. For strain SA 1, a 20-fold higher concentration was needed at 5 min of exposure compared to 5 min w/o BSA. With (w) organic soiling the difference in bactericidal concentrations between strains was up to fivefold and a decrease of concentrations over time was noticed for all strains. With the exception of strain EC 3 comparable low bactericidal concentrations w/o BSA were determined within the group of Gram-negative bacteria and strain-specific rather than species-specific variation was also noticed. Bactericidal concentrations w/o BSA slightly decreased with exposure time in all Gram-negative strains tested. The maximum decrease was tenfold (strain EC 3). With organic load results were identical among all Gram-negative strains and no decrease over time was seen with the exception of strain EC 1 and KP 1. Overall, values obtained at 5 min and 30 min were significantly different ($p = 0.007812$). Values were identical or five- to 100-fold higher as compared to MICs.

Sodium hypochlorite

Bactericidal concentrations of SHO (Table 4) were similar for Gram-positive and Gram-negative bacteria in tests

TABLE 4: Bactericidal concentrations determined by qualitative suspension test without (w/o) and with (w) organic soiling

Strain	BAC (%)								SHO (%)							
	5 min		15 min		30 min		60 min		5 min		15 min		30 min		60 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
SA 1*	0.005	0.1	0.005	0.05	0.005	0.01	0.005	0.01	0.01	0.25	0.01	0.25	0.005	0.25	0.005	0.1
SA 2	0.005	0.05	0.005	0.05	0.005	0.01	0.005	0.01	0.01	0.1	0.01	0.1	0.005	0.1	0.005	0.1
SA 3	0.005	0.05	0.005	0.01	0.005	0.01	0.005	0.01	0.01	0.25	0.005	0.25	0.005	0.1	0.005	0.05
SA 4	0.005	0.05	0.005	0.01	0.005	0.01	0.005	0.01	0.01	0.25	0.01	0.25	0.01	0.25	0.005	0.25
SA 5	0.005	0.05	0.005	0.01	0.005	0.01	0.005	0.01	0.01	0.25	0.01	0.25	0.01	0.25	0.005	0.1
SA 6	0.005	0.05	0.005	0.05	0.005	0.01	0.005	0.01	0.01	0.1	0.005	0.1	0.005	0.1	0.005	0.05
SA 7	0.005	0.05	0.005	0.01	0.005	0.01	0.005	0.01	0.01	0.25	0.01	0.25	0.01	0.25	0.005	0.1
EC 1*	0.01	0.05	0.005	0.05	0.005	0.05	0.005	0.01	0.005	0.25	0.005	0.25	0.005	0.1	0.001	0.05
EC 2	0.01	0.05	0.005	0.05	0.005	0.05	0.005	0.05	0.01	0.1	0.01	0.1	0.005	0.1	0.005	0.1
EC 3	0.05	0.05	0.01	0.05	0.005	0.05	0.005	0.05	0.01	0.5	0.005	0.25	0.005	0.1	0.005	0.1
EC 4	0.01	0.05	0.005	0.05	0.005	0.05	0.005	0.05	0.005	0.1	0.005	0.1	0.005	0.05	0.005	0.05
KP 1*	0.01	0.1	0.01	0.05	0.005	0.05	0.005	0.05	0.01	0.25	0.01	0.25	0.005	0.25	0.005	0.05
KP 2	0.01	0.05	0.005	0.05	0.005	0.05	0.005	0.05	0.01	0.25	0.01	0.25	0.005	0.25	0.005	0.1
KP 3	0.01	0.05	0.01	0.05	0.01	0.05	0.005	0.05	0.01	0.25	0.01	0.25	0.01	0.25	0.005	0.05
ST 1*	0.01	0.05	0.01	0.05	0.005	0.05	0.005	0.05	0.01	0.25	0.01	0.25	0.005	0.1	0.005	0.1
ST 2	0.01	0.05	0.01	0.05	0.005	0.05	0.005	0.05	0.01	0.25	0.01	0.25	0.005	0.1	0.005	0.1

MRSA and ESBL strains are shaded in light grey

BAC = benzalkonium chloride, GA = glutaraldehyde, ETH = ethanol, PA = peracetic acid, SHO = sodium hypochlorite, SA = *S. aureus*, EC = *E. coli*, KP = *K. pneumoniae*, ST = *S. Typhimurium*

* indicates reference strains for disinfectant testing according to DVG

† indicates the *K. pneumoniae* type strain and a reference strain for *Salmonella*.

w/o and w BSA. In comparison to results obtained w/o BSA, a ten–50-fold increase in bactericidal SHO values was noticed w BSA. The highest increase was seen for strains SA 1 (30 min), SA 3 (15 min), SA 4 (60 min), EC 1 (5 min and 15 min), EC 3 (15 min), KP 1 and KP 2 (30 min). Over time bactericidal values decreased up to fivefold w/o BSA and w BSA, respectively, with the exception of strains SA 2, SA 4, EC 2 (w BSA) and EC 4 (w/o BSA). A significant variation in values determined at 5 min and 30 min was seen ($p = 0.03125$). Compared to MICs ten to 50 times lower values were determined depending on contact time w/o BSA. With BSA, identical or up to fivefold higher concentrations were measured.

Ethanol

ETH (Table 5) yielded only minor differences in bactericidal concentrations between Gram-positive and Gram-negative bacteria in general as well as between individual strains. Moreover, organic soiling had only a narrow effect on disinfectant efficacy. Time had a significant influence on bactericidal concentrations ($p = 0.001953$). Values were up to approximately six times higher compared to MICs.

Peracetic acid

Mainly, a bactericidal concentration of 0.005% was determined for *S. aureus* and most of the Gram-negative strains irrespective of contact time and organic soiling

TABLE 5: Bactericidal concentrations determined by qualitative suspension test without (w/o) and with (w) organic soiling

Strain	ETH (%)								PA (%)							
	5 min		15 min		30 min		60 min		5 min		15 min		30 min		60 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
SA 1*	40	40	35	35	35	35	35	35	0.005	0.005	0.005	0.005	0.001	0.005	0.001	0.005
SA 2	40	40	40	40	40	40	30	35	0.005	0.005	0.005	0.005	0.001	0.005	0.0005	0.005
SA 3	45	45	35	35	35	35	35	35	0.005	0.005	0.001	0.005	0.0005	0.005	0.0005	0.005
SA 4	40	45	40	40	35	35	30	35	0.005	0.01	0.005	0.005	0.005	0.005	0.001	0.005
SA 5	45	45	35	35	35	35	35	35	0.005	0.01	0.005	0.005	0.001	0.005	0.001	0.005
SA 6	40	40	35	40	35	35	30	35	0.005	0.005	0.005	0.005	0.001	0.005	0.001	0.005
SA 7	45	40	35	40	35	35	30	35	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.001	0.005
EC 1*	35	35	30	35	30	35	30	30	0.005	0.005	0.001	0.005	0.001	0.005	0.0005	0.005
EC 2	35	35	35	35	30	35	30	35	0.005	0.005	0.001	0.005	0.001	0.005	0.0005	0.005
EC 3	35	45	35	35	30	35	30	30	0.005	0.005	0.001	0.005	0.0005	0.005	0.0005	0.005
EC 4	35	35	35	35	30	35	30	30	0.005	0.005	0.0005	0.005	0.0005	0.005	0.0005	0.005
KP 1*	35	35	30	30	30	30	25	30	0.005	0.005	0.001	0.005	0.001	0.005	0.001	0.005
KP 2	30	30	30	30	25	30	25	30	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
KP 3	30	30	30	30	30	30	25	30	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
ST 1*	30	35	30	30	30	30	25	30	0.005	0.01	0.001	0.005	0.001	0.005	0.0005	0.005
ST 2	35	35	30	30	30	30	25	30	0.005	0.005	0.001	0.005	0.001	0.005	0.0005	0.005

MRSA and ESBL strains are shaded in light grey

BAC = benzalkonium chloride, GA = glutaraldehyde, ETH = ethanol, PA = peracetic acid, SHO = sodium hypochlorite, SA = *S. aureus*, EC = *E. coli*, KP = *K. pneumoniae*, ST = *S. Typhimurium*

* indicates reference strains for disinfectant testing according to DVG

† indicates the *K. pneumoniae* type strain and a reference strain for *Salmonella*.

(Table 5). Overall, an up to tenfold reduction of bactericidal concentrations was seen for *S. aureus* and most of the Gram-negative strains over time, however, the comparison of results obtained at 5 min and 30 min revealed no significant difference ($p = 0.25$). Two ESBL-producing *K. pneumoniae* (KP 2, KP 3) revealed identical results for all contact times w/o and w BSA. Compared to all other strains, these two required ten- up to 100-fold higher bactericidal values at a given contact time. Concentrations differed up to 50 times in comparison to the remaining *K. pneumoniae* KP 1 and the other Gram-negative strains. Values obtained w/o BSA were up to 100-fold lower compared to MICs but adding BSA resulted in ten times lower values at maximum.

Glutaraldehyde

Results obtained for GA (Table 6) were similar for all bacteria with the exception of strain SA 1 and EC 1 at 5 min and 15 min contact time w/o and w BSA. In half of the strains organic soiling resulted in two- to tenfold higher bactericidal values at all contact times whereas organic soiling had no influence on bactericidal values in the remaining half of the strains at a respective contact time. Comparing bactericidal values (5 min with 30 min) resulted in a significant decrease over time ($p = 0.00006104$). In contrast, a 50-fold higher value was determined for SA 1 and a 100-fold increase was noticed for EC 1 at the 15 min contact time w BSA. Depending on contact time values were up to 250 times lower (SA 1, 60 min, w/o BSA) in comparison to MICs but w BSA identical as well as up to 50-fold lower concentrations (SA 3, 60 min) were determined.

Practical tests without mechanical action on steel carriers

Drying loss

Drying losses in bacterial numbers varied and were lowest for *S. aureus* and highest for *E. coli* and *K. pneumoniae*. The following LR in viable numbers was found: SA 7 LR = 0.29, SA 1 LR = 0.36, EC 1 and KP 1 LR = 1.09, and ST 1 LR = 0.78. For all tests the WSH control requirements ($\log_{10} N_W \geq 6.27$; Anonymous 2017b) were fulfilled.

Benzalkonium chloride

Among the tested *S. aureus* strains an up to 15-fold difference in bactericidal BAC values was noticed at 5 min of incubation (Table 7). At 30 min, only one strain (SA 1) differed (fivefold, i.e. one concentration step) from the others. Bactericidal concentrations determined for the Gram-negative strains varied fourfold at 5 min, but at 30 min EC 1 revealed an up to 50-fold higher BAC value than all other Gram-negative strains. Results obtained at 5 min and 30 min were not significantly different (5 min $p = 0.827$,

TABLE 6: Bactericidal concentrations determined by qualitative suspension test without (w/o) and with (w) organic soiling

Strain	GA (%)							
	5 min		15 min		30 min		60 min	
	w/o	w	w/o	w	w/o	w	w/o	w
SA 1*	0.1	0.25	0.005	0.25	0.005	0.05	0.001	0.01
SA 2	0.05	0.1	0.05	0.05	0.005	0.05	0.005	0.05
SA 3	0.05	0.1	0.01	0.05	0.005	0.05	0.005	0.01
SA 4	0.05	0.1	0.05	0.05	0.01	0.05	0.01	0.01
SA 5	0.05	0.1	0.01	0.05	0.01	0.05	0.005	0.01
SA 6	0.05	0.25	0.01	0.1	0.01	0.05	0.005	0.01
SA 7	0.05	0.05	0.05	0.05	0.01	0.01	0.01	0.01
EC 1*	0.5	0.5	0.005	0.5	0.005	0.05	0.005	0.01
EC 2	0.05	0.1	0.01	0.05	0.005	0.01	0.005	0.01
EC 3	0.05	0.1	0.01	0.1	0.005	0.01	0.005	0.01
EC 4	0.05	0.05	0.05	0.05	0.005	0.01	0.005	0.01
KP 1#	0.05	0.1	0.01	0.05	0.005	0.05	0.005	0.01
KP 2	0.05	0.1	0.01	0.05	0.005	0.05	0.005	0.01
KP 3	0.05	0.25	0.01	0.05	0.005	0.05	0.005	0.01
ST 1#	0.05	0.05	0.01	0.05	0.01	0.05	0.01	0.01
ST 2	0.05	0.05	0.01	0.05	0.01	0.01	0.01	0.01

MRSA and ESBL strains are shaded in light grey

BAC = benzalkonium chloride, GA = glutaraldehyde, ETH = ethanol, PA = peracetic acid, SHO = sodium hypochlorite, SA = *S. aureus*, EC = *E. coli*, KP = *K. pneumoniae*, ST = *S. Typhimurium*

* indicates reference strains for disinfectant testing according to DVG

indicates the *K. pneumoniae* type strain and a reference strain for *Salmonella*

30 min $p = 0.491$) between Gram-positive and Gram-negative bacteria. Bactericidal concentrations significantly decreased with increase of time ($p = 0.000031$) with markedly differences between strains, e.g. a twofold decrease seen for strain SA 7 compared to a 150-fold decrease noticed for strain KP 2 (Table 7). Compared to the bactericidal concentrations determined by the suspension tests at 5 min of incubation w BSA, bactericidal concentrations assessed by the carrier tests were twofold (SA 7) to 30-fold (SA 2) higher for *S. aureus* strains and fivefold (KP 1) to 40-fold (EC 1) higher for Gram-nega-

TABLE 7: Bactericidal concentrations that achieved a LR ≥ 4 in practical tests without mechanical action on stainless steel carriers

Strain	Bactericidal concentration (%)									
	BAC		SHO		PA		GA		ETH	
	5 min	30 min	5 min	30 min	5 min	30 min	5 min	30 min	5 min	30 min
SA 1*	1.0	0.01	0.25	0.05	0.05	0.01	0.05	0.01	50	50
SA 2	1.5	0.05	0.25	0.05	0.01	0.005	0.1	0.01	55	45
SA 3	0.5	0.05	1.0	0.1	0.01	0.005	0.05	0.01	50	55
SA 4	0.75	0.05	0.5	0.05	0.01	0.005	0.05	0.01	50	45
SA 5	1.0	0.05	0.25	0.1	0.01	0.01	0.05	0.01	50	45
SA 6	1.0	0.05	0.5	0.05	0.01	0.01	0.1	0.01	55	50
SA 7	0.1	0.05	0.25	0.1	0.05	0.01	0.05	0.01	50	50
EC 1*	2.0	0.5	0.05	0.005	0.01	0.005	0.05	0.01	45	45
EC 2	0.5	0.01	0.25	0.05	0.005	0.005	0.05	0.005	50	40
EC 3	0.75	0.05	0.25	0.05	0.005	0.005	0.05	0.01	50	50
EC 4	0.75	0.05	0.05	0.01	0.01	0.005	0.1	0.005	45	40
KP 1#	0.5	0.01	0.25	0.05	0.05	0.005	0.05	0.005	45	40
KP 2	1.5	0.01	0.25	0.05	0.05	0.05	0.05	0.01	55	45
KP 3	0.5	0.01	0.25	0.05	0.05	0.05	0.05	0.01	50	40
ST 1#	1.5	0.05	0.25	0.05	0.005	0.005	0.1	0.05	50	50
ST 2	1.0	0.05	0.5	0.05	0.01	0.005	0.05	0.05	50	45

MRSA and ESBL strains are shaded in light grey

BAC = benzalkonium chloride, GA = glutaraldehyde, ETH = ethanol, PA = peracetic acid, SHO = sodium hypochlorite,

SA = *S. aureus*, EC = *E. coli*, KP = *K. pneumoniae*, ST = *S. Typhimurium*

* indicates reference strains for disinfectant testing according to DVG

indicates the *K. pneumoniae* type strain and a reference strain for *Salmonella*

tive strains. Identical or fivefold higher BAC concentrations were effective against *S. aureus* at 30 min contact time whereas all of the Gram-negative bacteria required identical or fivefold less BAC values except strain EC 1. The latter required a tenfold higher BAC concentration in practical tests. By contrast with MICs, bactericidal values were up to 1,500-fold higher for *S. aureus* and achieved up to 400 times higher concentrations for the Gram-negative strains.

Sodium hypochlorite

Results obtained for SHO (Table 7) were more homogenous compared to variations seen for BAC. Values obtained at 5 min and 30 min varied twofold to fourfold (SA 3 at 5 min) among *S. aureus* strains. Variations up to tenfold occurred among the Gram-negatives at both incubation times. At 30 min the Gram-negative strains were significantly more susceptible to SHO ($p = 0.029$) than the Gram-positive strains but no difference was seen at 5 min ($p = 0.095$). An increase in incubation time resulted in decreased bactericidal concentrations (\leq tenfold) and the differences between 5 min and 30 min were highly significant ($p = 0.000031$). Compared to the suspension tests w BSA, bactericidal concentrations obtained for SHO in the carrier tests after 5 min of incubation were less (three strains), identical (seven strains) or higher (six strains), which is in contrast to BAC. At 30 min a LR ≥ 4 was achieved by \leq fivefold lower bactericidal concentrations with the exception of strains SA 3 (identical concentrations) and EC 1 (20-fold less values). When compared to MICs identical or 2.5–ten times higher bactericidal values were determined at 5 min contact time whereas at 30 min contact time identical or two–ten times less values were measured.

Peracetic acid

PA and GA revealed the lowermost effective bactericidal concentrations of all disinfectants tested. Variation in bactericidal PA concentrations among *S. aureus* strains was fivefold at 5 min and twofold at 30 min whereas the Gram-negative strains revealed a \leq tenfold difference at both incubation times. Differences between Gram-positive and Gram-negative strains were not significant (5 min $p = 0.576$, 30 min $p = 0.435$). Nine strains required twofold to \leq tenfold less bactericidal concentrations after 30 min of incubation whereas time had no effect on bactericidal PA values in the remaining strains. Overall, variation in bactericidal concentrations determined after 5 min and 30 min of contact time was significant ($p = 0.004$). In comparison to the suspension tests w BSA five strains revealed identical bactericidal results, another ten strains required \leq tenfold higher concentrations whereas strain ST 1 required a twofold lower concentration in the carrier tests after 5 min of incubation. In contrast, results obtained after 30 min contact time were identical in both tests for all *E. coli* and *S. Typhimurium* strains, 2/3 *K. pneumoniae* strains and 3/7 *S. aureus* strains. For the remaining strains a two- up to fivefold higher bactericidal concentration was determined in carrier tests. Comparison to MICs revealed identical or at maximum tenfold lower values that efficiently reduced bacterial numbers at both incubation times.

Glutaraldehyde

A GA concentration of 0.05% achieved a LR ≥ 4 for most strains (12/16) at 5 min contact time whereas at

30 min 0.01% GA killed most bacteria (11/16). Differences among Gram-positive and Gram-negative strains were only marginal (5 min $p = 1.0$, 30 min $p = 0.714$) but a significant difference in bactericidal concentrations determined at 5 min and 30 min contact time was found ($p = 0.000061$). The maximum difference was a 20-fold decrease after 30 min for strain EC 4. In contrast to BAC, SHO, and PA, predominantly \leq tenfold lower bactericidal values were determined in carrier tests compared to suspension tests (w BSA) irrespective of time. In contrast, MICs were 2.5- up to 50-fold higher.

Ethanol

Regarding ETH there were no significant differences between Gram-positive and Gram-negative strains at both contact times tested (5 min $p = 0.232$, 30 min $p = 0.052$). Moreover, variation within the respective group of strains was only marginal. Differences seen in bactericidal concentration between 5 min and 30 min of incubation were significant ($p = 0.008$) but did not exceed $\pm 10\%$ of ETH. Irrespective of time, the carrier tests revealed constantly higher bactericidal concentrations compared to the suspension test results and MICs which is in contrast to the results obtained for the other disinfectants tested.

Discussion

Susceptibility against widely used disinfectants was determined for multidrug-resistant bacteria that are important pathogens in human and veterinary medicine and might be spread along the food chain. Three different methods which are routinely used to determine disinfectant activity were applied with distinct outcomes regarding efficacious concentrations, the influence of organic soiling, and contact time. All strains were susceptible to the disinfectants tested which largely corresponds to reports from other studies (e.g. Aarestrup and Hasman 2004, Couto et al. 2015, Espigares et al. 2017, Morrissey et al. 2014, Wieland et al. 2017). In addition, our data confirm that MRSA and multidrug-resistant species of the family Enterobacteriaceae are not per se more resistant to a wide range of biocides (Kücken et al. 2000, Lambert 2004, Oosterik et al. 2014). Nevertheless, strain-specific variation in disinfectant susceptibility was seen.

MICs determined in our study were lower than (BAC, ETH, PA, SHO) or corresponded (GA) to the recommended in-use concentrations of commercially available products which is in accordance with other studies (Couto et al. 2013, Espigares et al. 2017, Schwaiger et al. 2014). Moreover, MIC results confirmed, that *S. aureus* were significantly more susceptible to BAC compared to Gram-negative strains (Aarestrup and Hasman 2004, Morrissey et al. 2014) whereas the latter were significantly more susceptible to ETH and SHO than *S. aureus*. When applying suspension tests five- (w/o BSA) to 100-fold (w BSA) higher BAC values as compared to MICs were needed to inactivate *S. aureus* at respective points in time. Gram-negative strains also required higher values at 5 min w/o BSA (up to tenfold) and in all suspension tests w BSA (up to 20-fold) but, in contrast to *S. aureus*, bactericidal values were identical to MICs at 15 min, 30 min, and 60 min w/o BSA for most strains. Contrary to BAC, mainly lower concentrations of SHO (w/o BSA), PA (w and w/o BSA), and GA (w and w/o BSA) were necessary to inactivate bacteria in suspension tests compared

to MICs whereas higher amounts of ETH (w and w/o BSA) were needed. Nevertheless, all bactericidal concentrations were below in-use concentrations of commercial products at the respective contact time. Distinct strain-specific differences were noticed for PA and two ESBL-producing *K. pneumoniae* (strain KP 2 and KP 3) which required ten- to 100-fold higher bactericidal values at a given contact time as compared to all other strains.

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. In our practical tests much higher concentrations of BAC were determined compared to MICs and bactericidal values obtained from suspension tests, which is in accordance to previous findings (Thomas et al. 2005, Van Klingeren 1995). By contrast with suspension tests values needed to sufficiently reduce bacterial numbers (i.e. $LR \geq 4$) at 5 min contact time were up to 40-fold higher. Compared to MICs efficacious values were at most 400-fold (strain EC 1) and 1,500-fold (strain SA 2) higher at 5 min and up to 50-fold higher at 30 min contact time. This phenomenon was less pronounced for SHO (5 min), PA (5 min), and ETH (both contact times) whereas for GA (both contact times), SHO and PA at 30 min contact time mainly slightly lower concentrations were determined. Values were up to tenfold higher compared to MICs with the exception of GA and PA, and SHO (30 min). Interestingly, corresponding to the findings from MIC determination carrier tests revealed that Gram-negative strains were significantly more susceptible to SHO at 30 min contact time compared to *S. aureus*. With the exception of BAC at 5 min contact time, all bactericidal concentrations determined in practical tests were lower than in-use concentrations of commercially available products.

The effect of organic soiling was most striking for BAC and SHO as has also been described elsewhere (Araújo et al. 2013, Bloomfield and Uso 1985, Köhler et al. 2018) with a very pronounced increase of concentrations up to 50-fold. This underlines the necessity for proper cleaning before disinfection. Increasing contact time from 5 min to 30 min had significant effect on bactericidal concentrations in the suspension tests except for PA ($p = 0.25$). Moreover, bactericidal concentrations of all disinfectants significantly decreased with contact time in the practical test on stainless steel carriers.

In agreement with others (Thomas et al. 2005, Van Klingeren 1995) our findings confirm that results obtained from MIC determination, qualitative suspension tests and practical carrier tests markedly differ. Most probably differences between MICs and bactericidal concentrations obtained by suspension tests are due to the test procedure. In the first, disinfectants were diluted in TSB which in addition constitutes the growth medium. This is supported by the finding that culture media influence test outcome and account for higher or lower resistance to biocides (Brill et al. 2006, Oosterik et al. 2014). Moreover, it has been suggested that high concentrations of nutrient salts in MIC tests lower the effective concentration of BAC, hence the MIC test does not give a true reflection of the intrinsic activity of this compound (Tomlinson et al. 1977). When comparing MICs with carrier test results obtained at 5 min and 30 min contact time values were significantly different for each tested disinfectant (all $p < 0.01$). Interestingly, MICs for BAC and ETH were significantly lower com-

pared with carrier test results, which was contrary for GA and PA. MICs determined for SHO were between carrier test results for 5 min and 30 min. Comparing suspension tests and practical tests it has been stated that the biocide-to-cell ratio in the respective method might be responsible for the different results and that rehydration of dried bacterial cells is an important factor (Van Klingeren 1995). Drying losses in our experiments were only marginal. Moreover, we strictly followed the DVG guidelines regarding time and conditions of drying. Therefore, bacteria becoming more firmly adherent or even producing biofilms that are less susceptible to disinfectants (Van Klingeren 1995) can be excluded.

Overall, our findings underline that MIC determination and suspension tests are insufficient approaches to assess biocide susceptibility or resistance considerably when using BAC. Our practical carrier tests with BAC revealed that approximately half of the strains were sufficiently reduced at the in-use concentration recommended for several commercial products or at even higher values and hence the latter would have been classified as “resistant” whereas results of MIC and suspension tests implied full susceptibility. To the authors best knowledge this is the first study that comprehensively describes how different test methods influence the outcome of disinfectant efficacy and thus bacterial “resistance” against disinfectants. As indicated at the beginning, results of other studies on biocide susceptibility are not necessarily comparable. Consequently, our data were within range of other studies (Aarestrup and Hasman 2004, Corcoran et al. 2014, Hasanvand et al. 2015, Jang et al. 2017, Oosterik et al. 2014), lower or even much higher (Espigares et al. 2017, Holah et al. 2002, Lambert 2004, Morrissey et al. 2014, Penna et al. 2001). This strengthens the need for suitable guidelines which ensure standard methods to evaluate bacterial resistance against biocides and allow for the comparison of results obtained by different investigators.

Acknowledgement

We are thankful to Dana Rüster and Evelin Brumme for their valuable technical assistance.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest, or non-financial interest in the subject matter or materials discussed in this manuscript.

Ethical approval

Not applicable.

Funding

This study was funded by the Saxon State Ministry of Social Affairs and Consumer Protection.

Authors contribution

Conceptualisation: SS, UT; Funding acquisition: SS, UT; Methodology: SS, UT; Provision of bacterial strains: CC, YP; Investigation: FG, MR; Data curation and formal analysis: FG, MK, MR, SS. Writing and editing: CC, FG, MK, YP, SS, UT.

References

- Aarestrup FM, Hasman H (2004):** Susceptibility of different bacterial species isolated from food animals to copper sulphate, zinc chloride and antimicrobial substances used for disinfection. *Vet Microbiol* 100: 83–89.
- Anonymous (2017a):** DVG guidelines for MIC: http://www.desinfektion-dvg.de/fileadmin/FG_Desinfektion/Dokumente/Fuer_Gutachter/Pruefrichtlinien/4-RL-MHK_21Feb2015.pdf (accessed 17.03.2017).
- Anonymous (2017b):** DVG guidelines for suspension and carrier test: http://www.desinfektion-dvg.de/fileadmin/FG_Desinfektion/Dokumente/Fuer_Gutachter/Pruefrichtlinien/6-RL-TAEPrax-2013-02-17.pdf (accessed 17.03.2017).
- Araújo PA, Lemos M, Mergulhão F, Melo L, Simões M (2013):** The influence of interfering substances on the antimicrobial activity of selected quaternary ammonium compounds. *Int J Food Sci: Article ID 237581*. doi:10.1155/2013/237581.
- Bloomfield SF, Uso EE (1985):** The antibacterial properties of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate as hospital disinfectants. *J Hosp Infect* 6: 20–30.
- Brill F, Goroncy-Bermes P, Sand W (2006):** Influence of growth media on the sensitivity of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* to cationic biocides. *Int J Hyg Environ Health* 209: 89–95.
- Chapman JS (2003):** Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. *Int Biodeterior Biodegradation* 51: 271–276.
- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E (2000):** Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 66(10): 4555–4558.
- Commission for Hospital Hygiene and Infection Prevention (Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionssprävencion, KRINKO) (2012):** Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 55: 1311–1354.
- Corcoran M, Morris D, De Lappe N, O'Connor J, Lalor P, Dockery P, Cormican M (2014):** Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella enterica* biofilms from food contact surface materials. *J Appl Environ Microbiol* 80: 1507–1514.
- Couto N, Belas A, Kadlec K, Schwarz S, Pomba C (2015):** Clonal diversity, virulence patterns and antimicrobial and biocide susceptibility among human, animal and environmental MRSA in Portugal. *J Antimicrob Chemother* 70: 2483–2487.
- Couto N, Belas A, Tilley P, Couto I, Gama LT, Kadlec K, Schwarz S, Pomba C (2013):** Biocide and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant staphylococcal isolates from horses. *Vet Microbiol* 166: 299–303.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) (2011):** Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals. *EFSA Journal* 9(8):2322. [95 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2011.2322.
- Espigares E, Moreno Roldan E, Espigares M, Abreu R, Castro B, Dib AL, Arias A (2017):** Phenotypic resistance to disinfectants and antibiotics in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from pigs. *Zoonoses Public Health* 64: 272–280.
- Hasanvand A, Ghafourian S, Taherikalani M, Jalilian FA, Sadeghifard N, Pakzad I (2015):** Antiseptic resistance in methicillin sensitive and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates from some major hospitals, Iran. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 10: 105–112.
- He X-F, Zhang H-J, Cao J-G, Liu F, Wang J-K, Ma W-J, Yin W (2017):** A novel method to detect bacterial resistance to disinfectants. *Genes Dis* 4: 163–169.
- Holah JT, Taylor JH, Dawson DJ, Hall KE (2002):** Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol* 92:111S–120S.
- Jang Y, Lee K, Yun S, Lee M, Song J, Chang B, Choe N (2017):** Efficacy evaluation of commercial disinfectants by using *Salmonella enterica* serovar Typhimurium as a test organism. *J Vet Sci* 18: 209–216.
- Köhler AT, Rodloff AC, Labahn M, Reinhardt M, Truyen U, Speck S (2018):** Efficacy of sodium hypochlorite against multi-drug-resistant Gram-negative bacteria. *J Hosp Infect pii:S0195-6701(18)30381–30385*.
- Karatzas KA, Randall LP, Webber MA, Piddock LJ, Humphrey TJ, Woodward MJ, Coldham NG (2008):** Phenotypic and proteomic characterization of multiply antibiotic-resistant variants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium selected following exposure to disinfectants. *Appl Environ Microbiol* 74: 1508–1516.
- Kücken D, Feucht HH, Kaulfers PM (2000):** Association of *qacE* and *qacE* Δ 1 with multiple resistance to antibiotics and antiseptics in clinical isolates of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 183: 95–98.
- Lambert RJW (2004):** 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* 97: 699–711.
- Langsrud S, Sundheim G (1998):** Factors influencing a suspension test method for antimicrobial activity of disinfectants. *J Appl Microbiol* 85: 1006–1012.
- McDonnell G, Russell AD (1999) Antiseptics and disinfectants:** activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* 12: 147–179.
- Morrissey I, Oggioni MR, Knight D, Curiao T, Coque T, Kalkanci A, Martinez JL (2014):** Evaluation of epidemiological cut-off values indicates that biocide resistant subpopulations are uncommon in natural isolates of clinically-relevant microorganisms. *PLoS One* 9: 110. doi: 10.1371/journal.pone.0086669.
- Oosterik LH, Peeters L, Mutuku I, Goddeeris BM, Butaye P (2014):** Susceptibility of avian pathogenic *Escherichia coli* from laying hens in Belgium to antibiotics and disinfectants and integron prevalence. *Avian Dis* 58: 271–278.
- Ortega Morente E, Fernández-Fuentes MA, Grande Burgos MJ, Abriouel H, Pérez Pulido R, Gálvez A (2013):** Biocide tolerance in bacteria. *Int J Food Microbiol* 162(1): 13–25. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.028.
- Penna TCV, Mazzola PG, Martins AMS (2001):** The efficacy of chemical agents in cleaning and disinfection programs. *BMC Infect Dis*. doi: 10.1186/1471-2334-1-16.
- Reichel M, Schlicht A, Ostermeyer C, Kampf G (2014):** Efficacy of surgace disinfectant cleaners against emerging highly resistant gram-negative bacteria. *BMC Infect Dis*. doi: 10.1186/1471-2334-14-292.
- Russell AD (2003):** Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Lancet Infect Dis* 3: 794–803.

Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 2019, aop

- Schwaiger K, Harms KS, Bischoff M, Preikschat P, Mölle G, Bauer-Unkauf, Lindorfer S, Thalhammer S, Bauer J, Hölzel CS (2014):** Insusceptibility to disinfectants in bacteria from animals, food and humans-is there a link to antimicrobial resistance? *Front Microbiol* 5: 1–12. doi: 10.3389/fmicb.2014.00088.
- SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks) (2010):** Research strategy to address the knowledge gaps on the antimicrobial resistance effects of biocides. European Commission, Brussels, Belgium, http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenihr_o_028.pdf (accessed 13.05.2018).
- Thomas L, Russel AD, Maillard JY (2005):** Antimicrobial activity of chlorhexidine diacetate and benzalkonium chloride against *Pseudomonas aeruginosa* and its response to biocide residues. *J Appl Microbiol* 98: 533–543.
- Tomlinson E, Brown MR, Davis SS (1977):** Effect of colloidal association on the measured activity of alkylbenzyltrimethylammonium chlorides against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Chem* 20: 1277–1282.
- Van Klingeren B (1995):** Disinfectant testing on surfaces. *J Hosp Infect* 30: 397–408.
- Wales AD, Davies RH (2015):** Co-Selection of Resistance to Antibiotics, Biocides and Heavy Metals, and Its Relevance to Foodborne Pathogens. *Antibiotics (Basel)* 4: 567–604.
- Wieland N, Boss J, Lettmann S, Fritz B, Schwaiger K, Bauer J, Hölzel CS (2017):** Susceptibility to disinfectants in antimicrobial-resistant and -susceptible isolates of *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from poultry-ESBL/AmpC-phenotype of *E. coli* is not associated with resistance to a quaternary ammonium compound, DDAC. *J Appl Microbiol* 122: 1508–1517.

Author for correspondence

Dr. Stephanie Speck
Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
Universität Leipzig
An den Tierkliniken 1
04103 Leipzig
stephanie.speck@vetmed.uni-leipzig.de

4 Diskussion

In der vorliegenden Dissertation wurde die Empfindlichkeit von weit verbreiteten Desinfektionsmitteln (BAC, SHO, PA, GA und ETH) gegenüber Antibiotika-sensiblen und multiresistenten Bakterien bestimmt. Die Teststämme umfassten grampositive (*S. aureus*) und gramnegative (*E. coli*, *K. pneumoniae* und *S. Typhimurium*) Prüfstämme und Feldisolate, welche wichtige Krankheitserreger in der Human- und Veterinärmedizin sind und sich über direkten Kontakt oder entlang der Nahrungskette ausbreiten können. Dabei wurden drei Methoden, die routinemäßig zur Bestimmung der Desinfektionsmittelaktivität eingesetzt werden, angewandt. Das Ziel war es, stamm- und speziesspezifische Unterschiede bei den Testmethoden festzustellen und eine Aussage darüber zu treffen, ob diese zur Beurteilung einer Desinfektionsmittelresistenz geeignet sind. Der Versuchsaufbau orientierte sich dabei an den Prüfrichtlinien der DVG, bestehend aus MHK-Bestimmung, qualitativem Suspensionstest und praxisnahe Keimträgerstest (DVG 2017a, DVG 2017b).

Die Grundlage der vorliegenden Arbeit sind Versuche, welche im Zeitraum von Juni 2014 bis Mai 2017 durchgeführt wurden. Daher wurde der Versuchsaufbau gemäß der DVG-Prüfrichtlinien von 2013 (qualitativer Suspensionstest und Keimträgerstest) bzw. 2015 (MHK-Bestimmung) konzipiert. Im Jahr 2017 wurde eine überarbeitete Fassung veröffentlicht. In dieser Neufassung gab es folgende Änderungen:

Bei den Methoden zur MHK-Bestimmung kamen Kapitel zur Bestimmung der tuberkulostatischen Wirkung hinzu und im Anhang wurden dementsprechend die zu verwendenden Medien für Tuberkulostase ergänzt (DVG 2017a). In Bezug auf die Durchführung des qualitativen Suspensionstest gibt es keine Änderungen gegenüber der verwendeten älteren Fassung. Ein detaillierter Versuchsaufbau für die Durchführung des Keimträgerstest ist in der Neufassung von 2017 entfallen. Stattdessen ist ein Verweis auf die DIN EN 14349 enthalten. Allerdings sind in der aktualisierten Richtlinie die Prüfbedingungen wie die Erstellung der Testkeimsuspension, die Prüftemperatur, die Höhe der organischen Belastung, die Einwirkzeiten und die zu testenden Konzentrationen weiterhin angegeben. Diese Prüfbedingungen entsprechen dabei denen der vorherigen Fassung. Lediglich die Prüfung nach 5 min Einwirkzeit (Zwischendesinfektion) ist in der überarbeiteten Version fakultativ, welche zuvor obligatorisch war (DVG 2017b). In der Anforderungstabelle für die Prüfrichtlinien der Tierärztlichen Praxis gab es in den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bereichen keine Änderungen (DVG 2017). Beim Versuchsaufbau für diese Studie (siehe Kapitel 2.3.1) wurden außerdem kleine Modifikationen gegenüber der Prüfrichtlinien der DVG vorgenommen (verringerte Volumina bei der MHK-Bestimmung, Adaptation der getesteten Desinfektionsmittel-Konzentrationen, Einwirkzeiten von 5, 15, 30 und 60 min im Suspensionstest statt 1, 5, 15 und 30 min wie bei den Anforderungen für die Tierärztliche Praxis vorgegeben).

Somit unterscheidet sich die neue Fassung von 2017 in keinen für diese Studie relevanten Bereichen maßgebend von den älteren Versionen von 2013 bzw. 2015. Die Aktualisierung der Richtlinie hat daher keinen Einfluss auf die Ergebnisse dieser Studie.

Die ermittelten MHK-Werte waren niedriger (BAC, ETH, PA, SHO) oder entsprachen (GA) den empfohlenen Gebrauchskonzentrationen von kommerziell verfügbaren Produkten, was mit anderen Studien übereinstimmt (COUTO et al. 2013, ESPIGARES et al. 2017, SCHWAIGER et al. 2014). Darüber hinaus bestätigten die Ergebnisse der MHK-Bestimmung, dass *S. aureus* signifikant sensibler gegenüber BAC ist als die getesteten gramnegativen Stämme (AARESTRUP und HASMAN 2004, MORRISSEY et al. 2014). Als intrinsischer Resistenzmechanismus stellt die äußere Membran gramnegativer Bakterien eine zusätzliche Barriere dar, welche die Aufnahme von Quats verhindern kann (McDONNELL und RUSSELL 1999). Im Gegensatz dazu waren gramnegative Stämme signifikant sensibler gegenüber ETH und SHO als die geprüften *S. aureus*-Isolate.

Bei der Durchführung des Suspensionstests waren fünf- (ohne BSA) bis 100-fach (ohne BSA) höhere BAC-Konzentrationen im Vergleich zur MHK erforderlich, um *S. aureus* zu den jeweiligen Zeitpunkten zu inaktivieren. Gramnegative Stämme erreichten ebenfalls höhere Werte bei 5 min ohne BSA (bis zu Zehnfache) und bei allen Suspensionstests mit BSA (bis zu 20-fach), aber im Gegensatz zu *S. aureus* waren die bakteriziden Werte bei 15 min, 30 min und 60 min ohne BSA für die meisten Stämme identisch zur MHK. Im Gegensatz zu BAC waren generell niedrigere Konzentrationen von SHO (ohne BSA), PA (mit und ohne BSA) und GA (mit und ohne BSA) notwendig, um Bakterien in Suspensionstests im Vergleich zur MHK zu inaktivieren, während höhere Mengen an ETH (ohne BSA) benötigt wurden. Dennoch lagen alle bakteriziden Konzentrationen zur jeweiligen Kontaktzeit unter den Anwendungskonzentrationen kommerzieller Produkte. Deutliche stammspezifische Unterschiede wurden bei PA und zwei ESBL-produzierenden *K. pneumoniae* (Stamm KP 2 und KP 3) festgestellt, die bei den entsprechenden Kontaktzeiten zehn- bis 100-fach höhere bakterizide Werte erreichten im Vergleich zu allen anderen getesteten Stämmen.

Keime im Desinfektionsmittel suspendiert stellen ein artifizielles Szenario dar und repräsentieren nicht die realen Bedingungen. Daher dienen Suspensionstests zwar gut als richtungsweisende Tests, dennoch sind praxisnahe Versuche auf Oberflächen (z.B. mit Edelstahlkeimträgern) besser geeignet, um die Wirksamkeit eines Desinfektionsmittels unter den Bedingungen, unter denen es eingesetzt werden soll, vorauszusagen. Der Keimträgertest ohne mechanische Belastung simuliert dabei die Sprühdesinfektion (BÖHM 2002).

In dieser Studie wurden im Praxistests (Keimträgertest) wesentlich höhere Konzentrationen von BAC im Vergleich zur MHK und bakteriziden Werten aus den Suspensionstests bestimmt, was mit anderen Studien übereinstimmt (THOMAS et al. 2005, VAN KLINGEREN 1995). Im

Gegensatz zu Suspensionstests waren die Werte, die benötigt wurden, um die Bakterienzahlen bei 5 min Kontaktzeit ausreichend zu reduzieren (bedeutet Reduktion $\geq 4 \log_{10}$ -Stufen), bis zu 40-fach höher. Im Vergleich zur MHK lagen die wirksamen Konzentrationen bei 5 min maximal 400-fach höher bei den gramnegativen Stämmen (Stamm EC 1) und sogar bis zu 1.500-fach höher bei den grampositiven (Stamm SA 2) und bis zu 100-fach höher bei 30 min Kontaktzeit (Stamm EC 1). Dieses Phänomen war bei SHO (5 min), PA (5 min) und ETH (beide Kontaktzeiten) weniger ausgeprägt. Die ermittelten Konzentrationen lagen hier nur bis zu zehnfach höher als die MHK-Werte. Währenddessen wurden bei GA (beide Kontaktzeiten), SHO und PA (bei jeweils 30 min Kontaktzeit) hauptsächlich etwas niedrigere Konzentrationen bestimmt (bis zu zehnfach geringer im Vergleich zur MHK). Bemerkenswerterweise zeigten die Ergebnisse wie bei der MHK-Bestimmung, dass gramnegative Stämme signifikant anfälliger für SHO bei 30 min Kontaktzeit waren als *S. aureus*-Stämme. Mit Ausnahme von BAC bei 5 min Kontaktzeit waren alle in Praxistests ermittelten bakteriziden Konzentrationen niedriger als die im Gebrauch befindlichen Konzentrationen von handelsüblichen Produkten.

Der Effekt von organischer Belastung war bei BAC und SHO am auffälligsten mit einem sehr deutlichen Anstieg der wirksamen Konzentrationen um das bis zu 50-fache, was auch an anderer Stelle beschrieben wird (ARAÚJO et al. 2013, BLOOMFIELD und USO 1985, KÖHLER et al. 2018). Dieses Ergebnis unterstreicht die Notwendigkeit einer ordnungsgemäßen Reinigung vor der Desinfektion. Die Erhöhung der Kontaktzeit von 5 min auf 30 min hatte einen signifikanten Einfluss auf die bakterizide Konzentration in den Suspensionstests mit geringer organischer Belastung mit Ausnahme von PA ($p = 0,25$). Darüber hinaus haben sich die bakteriziden Konzentrationen aller Desinfektionsmittel im Praxistest an Edelstahlkeimträgern mit der Kontaktzeit signifikant verringert. Dies zeigt, wie wichtig es ist, die angegebenen Einwirkzeiten, die bei dem entsprechenden Handelspräparat angegeben sind, dringend einzuhalten. Außerdem wird dadurch deutlich, dass für eine Zwischendesinfektion andere Maßnahmen ergriffen werden müssen, als für eine Abschlussdesinfektion. Je mehr Zeit das Desinfektionsmittel hat mit den Erregern zu interagieren, umso zuverlässiger kann es wirken.

Im Einvernehmen mit anderen Veröffentlichungen (KÖHLER et al. 2019, THOMAS et al. 2005, VAN KLINGEREN 1995) konnte bestätigt werden, dass sich die Ergebnisse aus den MHK-Bestimmungen, dem qualitativen Suspensionstests und den praktischen Keimträgertests deutlich unterscheiden. Eine mögliche Ursache dafür stellt der unterschiedliche Aufbau der einzelnen Testverfahren dar. Es wurden zwar bei allen drei Tests die gleichen Nähr- und Verdünnungsmedien verwendet (CSL, Trypton-NaCl-Lösung, WSH), dennoch in unterschiedlichen Volumina (unterschiedliches Verhältnis Keimsuspension : Nährmedium : Desinfektionsmittel) und auch die Keimzahl der Testkeimsuspension variiert von $1,0 \times 10^8$ – $5,0 \times 10^9$ KbE/ml in den Testverfahren. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Kulturmedien das Testergebnis

beeinflussen und eine höhere oder niedrigere Empfindlichkeit gegenüber den Bioziden Rechnung trägt (BRILL et al. 2006, OOSTERIK et al. 2014). Darüber hinaus weisen TOMLINSON et al. (1977) darauf hin, dass hohe Konzentrationen von Nährsalzen bei MHK-Tests die effektive Konzentration von BAC senkt, weshalb die bestimmte MHK nicht die wahre intrinsische Aktivität dieser Verbindung widerspiegelt.

Beim Vergleich der MHK-Ergebnisse mit denen des Keimträgertests waren die Ergebnisse bei 5 min und 30 min Kontaktzeit für jedes getestete Desinfektionsmittel signifikant unterschiedlich (alle p-Werte < 0,01). Interessanterweise waren die MHK-Werte bei BAC und ETH im Vergleich zu Keimträger-Testergebnissen signifikant niedriger, was bei GA und PA entgegengesetzt war. Die bei SHO bestimmten MHK-Werte lagen zwischen den 5 min und 30 min Keimträger-Testergebnissen. Für die divergierenden Ergebnisse beim Suspensionstest und den Praxistests könnte das verschiedene Biozid :Zell-Verhältnis in der jeweiligen Methode verantwortlich sein. Die Rehydratation getrockneter Bakterienzellen könnte ebenfalls ein wichtiger Faktor sein (VAN KLINGEREN 1995). Trocknungsverluste waren in unseren Experimenten nur geringfügig ausgeprägt. Darüber hinaus haben wir uns strikt an die DVG-Richtlinien bezüglich der Zeit und den Bedingungen zur Trocknung der Testkeimsuspension gehalten (60 min bei 37°C). Daher können Bakterien, die fester an der Oberfläche des Edelstahlkeimträgers anhaften oder sogar Biofilme bilden, welche weniger anfällig für Desinfektionsmittel sind (VAN KLINGEREN 1995), ausgeschlossen werden.

Die Prüfbedingungen spielen bei der Beurteilung der Desinfektionsmittelempfindlichkeit eine maßgebende Rolle. Bei der MHK-Bestimmung wird das Testergebnis nach 72 h visuell abgelesen. Dies hat eine hohe individuelle Fehleranfälligkeit, welche Desinfektionsmittel-Konzentration als positiv (Trübung bzw. Vermehrung des Sediments entspricht dabei Bakterienwachstum) und welche als negativ (erfolgreiche Desinfektion) gewertet wird. Hier wäre ebenfalls eine Pflicht des Wachstumsnachweises durch Ausstreichen der Reagenzglasröhrchen im Grenzbereich, wie im qualitativen Suspensionstest verlangt, wünschenswert für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Außerdem entspricht die lange Einwirkzeit kaum realen Bedingungen im Praxis- oder Laboralltag.

Bei den nachfolgenden Tests werden diese Mängel bereits teilweise berücksichtigt, indem eine bakterizide Konzentration nach Ausstich getrüübter Röhrchen im Grenzbereich auf CSA zur Wachstumskontrolle bestimmt und ein Zeitfaktor eingebracht wird (5, 15, 30 und 60 min).

Im qualitativen Suspensionstest sind die Bakterien in einem Nährlösung-Desinfektionsmittel-Gemisch gelöst. Auch dies stellt keine realen Bedingungen dar. Dahingegen wird im Keimträgertest die auf einer Oberfläche getrocknete Testkeimsuspension nachfolgend mit Desinfektionsmittel überschichtet. Außerdem erfolgt bei diesem Test eine exakte Berechnung

der Testkeimreduktion. Von einer erfolgreichen Desinfektion spricht man dabei bei einer Reduktion der Keimmenge um $\geq 4 \log_{10}$ -Stufen.

Um eine Wertung der drei in dieser Studie durchgeführten Test abzugeben, ist damit der Keimträgertest ohne mechanische Belastung der aussagekräftigste Testaufbau in Hinsicht auf eine Wirksamkeitsprüfung am Zielort. Daher ist positiv zu bewerten, dass eine Aufnahme der Präparate in die Listen der DVG unter anderem erst erfolgt, wenn alle drei Testverfahren erfolgreich durchgeführt wurden (DVG 2015).

Weitere mögliche Tests, die eine höhere Praxisnähe verkörpern, wären je nach späterem Einsatzgebiet Keimträgertests auf anderen Materialien wie Holz, Fliesen, Beton oder auch organischen Medien wie Erde oder Mist und die Berücksichtigung einer mechanischen Aktion wie bei einer Wischdesinfektion.

Um jedoch eine endgültige Wirksamkeit der Desinfektionsmittel nachzuweisen, müssen Abstriche am Einsatzort nach erfolgtem Einsatz der entsprechenden Präparate als Erfolgskontrolle stattfinden.

Insgesamt unterstreichen die Ergebnisse, dass die alleinige Bestimmung der MHK und die Durchführung von Suspensionstests unzureichende Ansätze sind, um die Empfindlichkeit oder Resistenz von Bioziden zu beurteilen. Dies war am deutlichsten bei der Verwendung von BAC zu erkennen. Während die Ergebnisse der MHK-Bestimmung und der Suspensionstests eine volle Empfindlichkeit aller Stämme für BAC ergaben, wurde bei den praxisnahen Keimträgerversuchen für etwa die Hälfte der Stämme bei einer für mehrere kommerzielle Produkte empfohlenen Anwendungskonzentration (ca. 0,25-1%) oder bei noch höheren Konzentrationen keine ausreichende Keimzahl-Reduktion ermittelt werden. Somit können diese als "resistent" eingestuft werden.

Die im Rahmen dieser Dissertation ermittelten wirksamen Desinfektionsmittel-Konzentrationen lagen im gleichen Bereich anderer Studien (AARESTRUP und HASMAN 2004, CORCORAN et al. 2014, HASANVAND et al. 2015, JANG et al. 2017, OOSTERIK et al. 2014), waren geringer oder sogar um einiges höher (ESPIGARES et al. 2017, HOLAH et al. 2002, LAMBERT 2004, MORRISSEY et al. 2014, PENNA et al. 2001). Allerdings sind die Ergebnisse anderer Studien über Biozid-Empfindlichkeit aufgrund der Vielzahl an existierenden Testmethoden und deren Varianzen beim Versuchsaufbau nicht unmittelbar vergleichbar. Der viel zitierte Satz: „Die Methode bestimmt das Ergebnis“, trifft laut MEYER (2008) insbesondere bei der Wirksamkeitsprüfung von Desinfektionsmitteln zu. Demnach ist ein Vergleich der Präparate und Ergebnisse nur bei einer ausreichenden Standardisierung der Prüfverfahren möglich. Dies verstärkt den Bedarf an geeigneten Richtlinien, die Standardmethoden zur Bewertung der Resistenz von Bakterien gegenüber Bioziden vorschreiben und somit die Testergebnisse verschiedener Forscher besser vergleichbar machen.

Bisherige Prüfrichtlinien sind auf die Testung der Wirksamkeit eines Handelspräparates ausgerichtet und dienen nicht in erster Linie dem Zweck der Ermittlung einer Desinfektionsmittel-Resistenz bei Bakterienstämmen. FEßLER et a. (2018) haben jedoch ein Testprotokoll erstellt, welches speziell einer routinierten Testung von Bakterienstämmen dient und eine schnelle Aussage zu Desinfektionsmittel-Resistenzen liefern soll. Diese Methode wurde bereits in einem Ringversuch evaluiert.

Erschwert wird die Beurteilung einer Desinfektionsmittel-Resistenz dadurch, dass es keine „Breakpoints“ oder Höchstgrenzen (cut-off) gibt, die eine Resistenz gegenüber Desinfektionsmitteln definieren (MORRISSEY et al. 2014). Man kann sich damit behelfen, dass man der Definition von RUSSELL (2003) folgt und einzelne Stämme als resistent bezeichnet, wenn sie zum einen nicht durch handelsübliche Gebrauchskonzentrationen abgetötet werden oder zum anderen höheren Konzentrationen als Isolate der gleichen Spezies standhalten.

Nach bestem Wissen und Gewissen ist dies die erste Studie, die umfassend beschreibt, wie verschiedene Testmethoden das Ergebnis der Desinfektionsmittelwirksamkeit und damit die bakterielle "Resistenz" gegenüber Desinfektionsmitteln beeinflussen. Die Ergebnisse wiesen deutliche Stamm-spezifische Unterschiede hinsichtlich der wirksamen Konzentrationen auf. Der Einfluss von organischer Belastung war unterschiedlich stark bei den getesteten Desinfektionsmitteln ausgeprägt. Auch die Wirksamkeit bei ansteigender Kontaktzeit variierte. Alle Stämme waren empfindlich gegenüber den getesteten Desinfektionsmitteln, was weitgehend den Berichten aus anderen Studien entspricht (z.B. AARESTRUP und HASMAN 2004, COUTO et al. 2015, ESPIGARES et al. 2017, MORRISSEY et al. 2014, WIELAND et al. 2017). Darüber hinaus bestätigen die erhobenen Daten, dass MRSA und MRE der Familie *Enterobacteriaceae* nicht *per se* resistenter gegenüber einer Vielzahl von Bioziden sind im Vergleich zu Antibiotika-sensiblen Stämmen (KÜCKEN et al. 2000, LAMBERT 2004, OOSTERIK et al. 2014). Demzufolge sind bei fachgerechter Reinigung und Desinfektion keine besonderen Maßnahmen zur Desinfektion bei MRE nötig. Zertifizierte Konzentrations-Zeit-Relationen für die entsprechenden Anwendungsgebiete werden unter anderem in den Desinfektionsmittel-Listen der DVG und des VAH herausgegeben.

5 Zusammenfassung

Franziska Geber

Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Testmethoden auf die Beurteilung der Desinfektionsmittelempfindlichkeit von bedeutenden gegen Antibiotika multiresistenten Erregern (MRE) in der Human- und Veterinärmedizin

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

Eingereicht im Februar 2021

40 Seiten, 4 Abbildungen, 5 Tabellen, 78 Literaturangaben

Schlüsselwörter: Desinfektion, multiresistente Erreger, MHK, qualitativer Suspensionstest, Keimträgerstest

Einleitung: Reinigung und Desinfektion sind wichtige Instrumente zur Verhinderung der Ausbreitung von Krankheitserregern, insbesondere wenn es sich um multiresistente Bakterien handelt. MRSA und ESBL-produzierende *Enterobacteriaceae* kommen sowohl in der Human- wie auch in der Veterinärmedizin vor und sind teilweise zoonotisch. Um eine wirksame Desinfektion mit entsprechenden Handelspräparaten zu gewährleisten, gibt es standardisierte mehrschrittige Prüfverfahren, die vor einer Listung des Desinfektionsmittels erfolgreich durchlaufen werden müssen (z.B. Prüfverfahren der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG) oder dem Verbund für angewandte Hygiene e.V. (VAH)).

Ziele der Untersuchungen: Ziel dieser Studie war es zu ermitteln, inwieweit die zugrundeliegende Testmethode einen Einfluss auf die Aussage einer möglichen Desinfektionsmittel-Resistenz bei Bakterien hat. Außerdem sollten stammspezifische Unterschiede zwischen Antibiotika-sensiblen Prüfkeimen und (multi-)resistenten Stämmen untersucht werden. Ebenfalls wurde nach Unterschieden zwischen grampositiven und gramnegativen Bakterien in Bezug auf die Wirksamkeit des jeweiligen Desinfektionsmittels geschaut.

Material und Methoden: Die Desinfektionsmittelprüfung wurde in einem dreistufigen Testverfahren bestehend aus: Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK), qualitativem Suspensionstest mit und ohne geringer organischer Belastung und Keimträgerstest mit geringer organischer Belastung in Anlehnung an die Richtlinie der DVG von 2013 bzw. 2015 durchgeführt. Dabei wurden zwölf grampositive *S. aureus*-Stämme (zwei MSSA, neun MRSA und ein MRSA-QC Stamm) und 13 gramnegative *Enterobacteriaceae* (z.T. ESBL-positiv, drei 3MRGN) der Gattung *E. coli*, *K. pneumoniae* und *S. Typhimurium* getestet. Geprüft wurden fünf chemischen Grundsubstanzen, welche in gängigen Desinfektionsmitteln eingesetzt werden. Diese sind Benzalkoniumchlorid (BAC), Natriumhypochlorit (SHO),

Peressigsäure (PA), Glutaraldehyd (GA) und Ethanol (ETH). Die Ergebnisse wurden anschließend verglichen und statistisch ausgewertet.

Ergebnisse: Es besteht eine große Varianz der Ergebnisse in Bezug auf den Vergleich der drei Prüfmethode. So gab es beispielsweise deutliche Unterschiede im Vergleich der MHK-Werte und der Ergebnisse im Keimträgertest. Hier konnten im Praxistest höhere Konzentrationen wie am deutlichsten bei BAC (maximal 1.500-fach bei SA 2) zu sehen aber auch bei ETH, SHO (5 min) und PA (5 min) ermittelt werden. Andersherum reichten geringere Konzentrationen bei GA, SHO (30 min) und PA (30 min) zur Desinfektion im Keimträgertest aus.

Beim Vergleich der (multi-)resistenten Erreger (MRE) gegenüber den entsprechenden Prüfstämmen gab es ebenfalls keine homogene Richtung. So waren die Antibiotika-sensiblen Prüfstämme häufig mit geringeren Desinfektionsmittel-Konzentrationen abzutöten, dennoch nicht immer (gleiche oder höhere Konzentrationen notwendig).

Auch beim Vergleich der Sensibilität zwischen grampositiven und gramnegativen Stämmen ergab sich ein heterogenes Bild. So waren in Bezug auf die MHK-Werte die grampositiven Stämme signifikant sensibler gegenüber BAC und andererseits signifikant toleranter gegenüber ETH und SHO.

Der Effekt einer Erhöhung der wirksamen Konzentration bei geringer organischer Belastung konnte bestätigt werden und war am deutlichsten bei BAC und SHO ausgeprägt mit einer Erhöhung der wirksamen Konzentration um das bis zu 50-fache.

Zusammenfassend können wir mit unseren Ergebnissen keine *per se* vorhandene Desinfektionsmittel-Resistenz bei den getesteten MRE gegenüber den Antibiotika-sensiblen Prüfstämmen nachweisen.

Schlussfolgerungen: Die Prüfmethode hat maßgebenden Einfluss auf das Ergebnis der Desinfektionsmittelprüfung und der damit verbundenen Einstufung eines Erregers als resistent bzw. tolerant gegenüber Desinfektionsmitteln. Praxisnahe Tests sollten dabei immer mit einbezogen werden. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit anderen Studien wäre eine weitere Vereinheitlichung der Prüfmethode wünschenswert. Mit unseren Ergebnissen konnten wir zeigen, dass bei einer korrekten Anwendung der Desinfektionsmittel keine zusätzlichen Maßnahmen für MRE getroffen werden müssen. Diese werden ebenfalls zuverlässig bei der Routinedesinfektion mit gelisteten Produkten bei handelsüblichen Gebrauchskonzentrationen abgetötete.

6 Summary

Franziska Geber

Studies on the influence of different methods to determine disinfectant susceptibility 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 February 2021

40 pages, 4 illustrations, 5 tables, 78 references

Keywords: disinfection, multidrug-resistant bacteria, MIC, suspension test, carrier test

Introduction: Cleaning and disinfection are important tools to prevent the spread of pathogens, particularly of multidrug-resistant bacteria. MRSA and ESBL-producing *Enterobacteriaceae* exists in human and veterinary medicine and some are zoonotic. In order to ensure effective disinfection with appropriate commercial products, there are standardized multi-step test procedures that must be successfully completed before the disinfectant can be listed (e.g. test procedures of the German Veterinary Medical Society (DVG) or the Association for Applied Hygiene (VAH)).

Objective: The aim of this study was to determine how far the underlying test method has an influence on the statement of a possible disinfectant resistance in bacteria. Furthermore, strain-specific differences between antibiotic-sensitive test bacteria and multidrug-resistant strains were to be investigated. Likewise, differences between Gram-positive and Gram-negative bacteria with regard to the efficacy of the respective disinfectant were looked for.

Material and Methods: The disinfectant test was carried out in a three-step test procedure consisting of determination of the minimum inhibitory concentration (MIC), qualitative suspension test with and without low organic load and germ carrier test with low organic load in accordance with the DVG guidelines of 2013 and 2015. Twelve Gram-positive *S. aureus* strains (two MSSA, nine MRSA and one MRSA-QC strain) and 13 Gram-negative *Enterobacteriaceae* (partly ESBL-positive, three 3MRGN) of the genera *E. coli*, *K. pneumoniae* and *S. Typhimurium* were tested. Five chemical substances, which are used in common disinfectants, were tested. These are benzalkonium chloride (BAC), sodium hypochlorite (SHO), peracetic acid (PA), glutaraldehyde (GA) and ethanol (ETH). Then the results were compared and statistically evaluated.

Results: There is a great variance in the results regarding the comparison of the three test methods. For example, there were significant differences in the comparison of the MIC and

the results in the carrier test. In the practical test higher concentrations could be determined as most clearly seen with BAC (maximum 1,500-fold at SA 2) but also with ETH, SHO (5 min) and PA (5 min). Conversely, lower concentrations of GA, SHO (30 min) and PA (30 min) were sufficient for disinfection in the carrier test.

When comparing the multidrug-resistant pathogens with the corresponding test strains, there was also no homogeneous direction. The antibiotic-sensitive test strains were often killed with lower disinfectant concentrations, but not always (same or higher concentrations were necessary).

A comparison of the sensitivity between Gram-positive and Gram-negative strains also showed a heterogeneous picture. With regard to MIC, the Gram-positive strains were significantly more sensitive to BAC and on the other hand significantly more tolerant to ETH and SHO.

The effect of an increase of the effective concentration at low organic load was confirmed and was most pronounced in BAC and SHO with an increase of the effective concentration up to 50-fold.

In summary, we could not demonstrate a *per se* existing disinfectant resistance of the tested multidrug-resistant bacteria towards the antibiotic-sensitive test strains.

Conclusion: The test method has a decisive influence on the result of the disinfectant test and the associated classification of a pathogen as resistant or tolerant to disinfectants. Practical tests should always be included. For a better comparability of the results with other studies a further standardization of the test methods would be desirable. With our results, we were able to show that no additional measures for MRE have to be taken if the disinfectants are used correctly. These are also reliably killed during routine disinfection with listed products at commercially in-use concentrations.

Literaturverzeichnis

- Aarestrup FM, Hasman H. Susceptibility of different bacterial species isolated from food animals to copper sulphate, zinc chloride and antimicrobial substances used for disinfection. *Vet Microbiol.* 2004;100(1-2):83–9.
- Anon. Infektionsschutzgesetz (IfSG) vom 20. Juli 2000 (BGBl. I S. 1045), das zuletzt durch Artikel 5 des Gesetzes vom 19. Juni 2020 (BGBl. I S. 1385) geändert worden ist (zitiert vom 02. 10.2020): 1-60, <<https://www.gesetze-im-internet.de/ifsg/ifsg.pdf>>.
- Anon. Verordnung (EU) Nr. 528/2012 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22.05.2012 über die Bereitstellung auf dem Markt und die Verwendung von Biozidprodukten (Biozidverordnung). Amtsblatt der Europäischen Union. (zitiert vom 02.10.2020): 1-123, <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32012R0528&from=ET>>.
- Anon. Desinfektionsmittel-Kommission im Verbund für Angewandte Hygiene (VAH). Desinfektionsmittel-Liste des VAH. Wiesbaden: mhp-Verlag GmbH; 2013.
- Anon. 2020. MRE Netzwerk Sachsen, AG Surveillance und Antibiotika-Strategie (zitiert vom 07.09.2020), <<https://www.gesunde.sachsen.de/24471.html>>.
- 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;2013:1–9.
- Becker K. Diagnostik von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Stämmen: Teil 2. Nachweis der Methicillin/Oxacillin-Resistenz bei *Staphylococcus aureus*. *Mikrobiologie.* 2004;14(2):41–50.
- Bloomfield SF, Uso EE. The antibacterial properties of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate as hospital disinfectants. *J Hosp Infect.* 1985;6(1):20–30.
- Böhm R. Grundlagen der Reinigung und Desinfektion. In: Strauch D, Böhm R, Hrsg. Reinigung und Desinfektion in der Nutztierhaltung und Veredelungswirtschaft. 2., völlig neu bearb. Aufl. Stuttgart: Enke; 2002. p. 19–64.
- 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 Envir Heal.* 2006;209(1):89–95.
- Chapman JS. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. *Int Biodeter Biodegr.* 2003;51(4):271–6.

- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(10):4555–8.
- Corcoran M, Morris D, Lappe N de, O'Connor J, Lalor P, Dockery P, Cormican M. Commonly Used Disinfectants Fail To Eradicate *Salmonella enterica* Biofilms from Food Contact Surface Materials. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(4):1507–14.
- Couto N, Belas A, Kadlec K, Schwarz S, Pomba C. Clonal diversity, virulence patterns and antimicrobial and biocide susceptibility among human, animal and environmental MRSA in Portugal. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(9):2483–7.
- Couto N, Belas A, Tilley P, Couto I, Gama LT, Kadlec K, Schwarz S, Pomba C. Biocide and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant staphylococcal isolates from horses. *Vet Microbiol.* 2013;166(1-2):299–303.
- Cuny C, Pfeifer Y, Witte W. MRE bei Mensch und Tier: Übertragungswege und Infektionsrisiko. *Hyg Med.* 2017;42(1):D22–D29.
- Davin-Regli A., Pagès J.-M. Cross-resistance between biocides and antimicrobials: an emerging question. *Rev Sci Tech OIE.* 2012;31(1):89–104.
- Dawson A, Herrmann M, Schulz-Stübner S. MRSA-Infektionen. In: Schulz-Stübner S, Dettenkofer M, Mattner F, Meyer E, Mahlberg R, Hrsg. *Multiresistente Erreger: Diagnostik - Epidemiologie - Hygiene - Antibiotika-"Stewardship"*. 1. Aufl. 2016. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015.
- Denyer SP. Mechanisms of Action of Antibacterial Biocides. *Int Biodeter Biodegr.* 1995; 36(3-4):227–45.
- Denyer SP, Stewart G. Mechanisms of action of disinfectants. *Int Biodeter Biodegr.* 1998; 41(3-4):261–8.
- Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG) 2015. Übersicht zu den erforderlichen Untersuchungen für die einzelnen Anwendungsbereiche vom 21.02.2015 (zitiert vom 02.01.2021): 1, <https://www.desinfektion-dvg.de/fileadmin/FG_Desinfektion/Dokumente/Fuer_Gutachter/Pruefrichtlinien/Erforderliche_Untersuchungen_Gutachten_DVG.pdf>.
- Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG) 2017. Anforderungstabelle Prüfrichtlinien Tierärztliche Praxis und Tierheime vom 7.11.2017 (zitiert vom 02.10.2020): 1–7, <http://www.desinfektion-dvg.de/fileadmin/FG_Desinfektion/Dokumente/Fuer_Gutachter/Pruefrichtlinien/Anforderungstabelle_DVG-TH-TP_7Nov2017.pdf>.

- Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG) 2017a. DVG-Prüfrichtlinien, IV. Ermittlung der Minimalen Hemmkonzentration vom 7.11.2017 (zitiert vom 15.09.2020): 1–17, <https://www.desinfektion-dvg.de/fileadmin/FG_Desinfektion/Dokumente/Fuer_Gutachter/Pruefrichtlinien/IV_MHK_7Nov2017.pdf>.
- Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG) 2017b. DVG-Prüfrichtlinien, VI. Tierärztliche Praxis Bakterizidie, Spalte 5a/5b vom 7.11.2017 (zitiert vom 15.09.2020): 1–10, <https://www.desinfektion-dvg.de/fileadmin/FG_Desinfektion/Dokumente/Fuer_Gutachter/Pruefrichtlinien/VII.1_Bakterizidie_7Nov2017.pdf>.
- Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG). DVG-Desinfektionsmittellisten 2020 (zitiert vom 21.09.2020) <<http://www.desinfektion-dvg.de/index.php?id=1793&L=0>>
- Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG). Herzlich Willkommen bei der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft 2020a (zitiert vom 15.09.2020) <www.dvg.net>.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals. EFSA Journal. 2011;9(8):2322. [95 pp.] doi: 10.2903/j.efsa.2011.2322.
- Espigares E, Moreno Roldan E, Espigares M, Abreu R, Castro B, Dib AL, Arias A. Phenotypic Resistance to Disinfectants and Antibiotics in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Pigs. Zoonoses Public Health. 2017;64:272–80.
- 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.
- Ewers C, Grobbel M, Stamm I, Kopp PA, Diehl I, Semmler T, Fruth A, Beutlich J, Guerra B, Wieler LH, Guenther S. Emergence of human pandemic O25: H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* among companion animals. J Antimicrob Chemother. 2010;65(4):651–60.
- Feßler AT, Schug AR, Geber F, Scholtzek AD, Merle R, Brombach J, Hensel V, Meurer M, Michael GB, Reinhardt M, Speck S, Truyen U, Schwarz S. Development and evaluation of a broth macrodilution method to determine the biocide susceptibility of bacteria. Vet Microbiol. 2018;223:59–64.

- Fischer J, Rodríguez I, Schmoger S, Friese A, Roesler U, Helmuth R, Guerra B. *Escherichia coli* producing VIM-1 carbapenemase isolated on a pig farm. J Antimicrob Chemother. 2012;67(7):1793–5.
- Fischer J, Rodríguez I, Schmoger S, Friese A, Roesler U, Helmuth R, Guerra B. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* producing VIM-1 carbapenemase isolated from livestock farms. J Antimicrob Chemother. 2013;68(2):478–80.
- Fraise AP. Biocide abuse and antimicrobial resistance—a cause for concern? J Antimicrob Chemother. 2002;50(1):139–40.
- Hasanvand A, Ghafourian S, Taherikalani M, Jalilian FA, Sadeghifard N, Pakzad I. Antiseptic Resistance in Methicillin Sensitive and Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Some Major Hospitals, Iran. Recent Pat Antiinfect Drug Discov. 2015;10(2):105–12.
- Hermans K, Devriese LA, Haesebrouck F. Staphylococcus. In: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO, Hrsg. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 3rd ed. Ames, Iowa: Blackwell Pub; 2004. p. 43–55.
- Holah JT. CEN/TC 216: Its role in producing current and future European disinfectant testing standards. Int Biodeter Biodegr. 2003;51(4):239–43.
- 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(31):111S–20.
- Huet AA, Raygada JL, Mendiratta K, Seo SM, Kaatz GW. Multidrug efflux pump overexpression in *Staphylococcus aureus* after single and multiple *in vitro* exposures to biocides and dyes. Microbiology. 2008;154(10):3144–53.
- Industrieverband Hygiene & Oberflächenschutz (IHO) 2019. Die wichtigsten Desinfektionsmittellisten für das Gesundheitswesen vom 10.12.2019 (zitiert vom 25.08.2020), <<https://www.iho.de/aktuell/die-wichtigsten-desinfektionsmittellisten-fuer-das-gesundheitswesen/>>.
- Jang Y, Lee K, Yun S, Lee M, Song J, Chang B, Choe N. Efficacy evaluation of commercial disinfectants by using *Salmonella enterica* serovar Typhimurium as a test organism. J Vet Sci. 2017;18(2):209–16.

- Karatzas KAG, Randall LP, Webber M, Piddock LJV, Humphrey TJ, Woodward MJ, Coldham NG. Phenotypic and Proteomic Characterization of Multiply Antibiotic-Resistant Variants of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Selected Following Exposure to Disinfectants. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(5):1508–16.
- 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;100(3):e40–e46.
- Köhler AT, Rodloff AC, Labahn M, Reinhardt M, Truyen U, Speck S. Evaluation of disinfectant efficacy against multidrug-resistant bacteria: A comprehensive analysis of different methods. *Am J Infect Control.* 2019;47(10):1181–7.
- Kola A, Kohler C, Pfeifer Y, Schwab F, Kuhn K, Schulz K, Balau V, Breitbach K, Bast A, Witte W, Gastmeier P, Steinmetz I. High prevalence of extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in organic and conventional retail chicken meat, Germany. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(11):2631–4.
- Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut (RKI). Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen: Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut (RKI). *Bundesgesundheitsbl.* 2012;55(10):1311–54. doi: 10.1007/s00103-012-1549-5
- Kücken D, Feucht H, Kaulfers P. Association of *qacE* and *qacE Δ 1* with multiple resistance to antibiotics and antiseptics in clinical isolates of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2000;183(1):95–8.
- 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(4):699–711.
- Maillard J. Bacterial resistance to biocides in the healthcare environment: Should it be of genuine concern? *J Hosp Infect.* 2007;65:60–72.
- McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(1):147–79.
- Meyer B, Cookson B. Does microbial resistance or adaptation to biocides create a hazard in infection prevention and control? *J Hosp Infect.* 2010;76(3):200–5.

- Meyer B. Europäische und deutsche Testmethoden zur Wirksamkeitsprüfung von Desinfektionsmitteln. *Aseptica*. 2008;14:19–21.
- Morrissey I, Oggioni MR, Knight D, Curiao T, Coque T, Kalkanci A, Martinez JL. 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):1–10.
- Müller W, Schlenker G, Zucker B, Hrsg. Kompendium der Tierhygiene Gesundheits-, Tier-, Umwelt- und Verbraucherschutz. 4., vollst. überarb. und erw. Aufl. unter neuer Hrsg.-schaft. Berlin: Lehmanns Media. 2011. (Tiermedizin).
- 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(2):271–8.
- Penna TCV, Mazzola PG, Silva Martins AM. The efficacy of chemical agents in cleaning and disinfection programs. *BMC Infect Dis*. 2001;1(1):1–8.
- Pfeifer Y, Eller C. Aktuelle Daten und Trends zur β -Lactam-Resistenz bei gramnegativen Infektionserregern. *Bundesgesundheitsbl*. 2012;55(11-12):1405–9.
- Pfeifer Y, Eller C, Leistner R, Valenza G, Nickel S, Guerra B, Fischer J, Werner G. ESBL-Bildner als Infektionserreger beim Menschen und die Frage nach dem zoonotischen Reservoir. *Hyg Med*. 2013;38(7/8):294–9.
- Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Hartigan P, Fanning S, FitzPatrick ES. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. 2. Aufl. Hoboken: John Wiley & Sons; 2011.
- Robert Koch-Institut (RKI) 2019. Häufigkeit, Eigenschaften und Verbreitung von MRSA in Deutschland - Zur Situation 2017/2018. *Epidemiologische Bulletin des Robert Koch-Instituts (RKI)*. Ausgabe 42/2019:1–10. ISSN 2569-5266
- Robert Koch Institut (RKI) 2019a. Datenbank der Antibiotika Resistenz Surveillance (ARS) des Robert Koch Institutes (RKI) zur Resistenzentwicklung, Datenstand vom 23.08.2019 (abgerufen am 07.09.2020), <<https://ars.rki.de/Content/Database/ResistanceDevelopment.aspx>>.
- Russell AD. Bacterial resistance to disinfectants: Present knowledge and future problems. *J Hosp Infect*. 1999;43:S57–S68.

- 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.
- Russell AD. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. *J Hosp Infect.* 2004;57(2):97–104.
- Rutala WA, Barbee SL, Aguiar NC, Sobsey MD, Weber DJ. Antimicrobial activity of home disinfectants and natural products against potential human pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2000;21(1):33–8.
- Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR). Research strategy to address the knowledge gaps on the antimicrobial resistance effects of biocides. European Commission, Brussels, Belgium; 2010 (zitiert vom 10. 9. 2020), <http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenihr_o_028.pdf>.
- Schwaiger K, Harms KS, Bischoff M, Preikschat P, Mölle G, Bauer-Unkauf I, Lindorfer S, Thalhammer S, Bauer J, Hölzel CS. Insusceptibility to disinfectants in bacteria from animals, food and humans-is there a link to antimicrobial resistance? *Front Microbiol.* 2014;5:1–12.
- Schwarz S, Kadlec K, Silley P. Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. Steinen: ZETT-Verl.; 2013.
- Speck S, Wenke C, Feßler AT, Kacza J, Geber F, Scholtzek AD, Hanke D, Eichhorn I, Schwarz S, Rosolowski M, Truyen U. Borderline resistance to oxacillin in *Staphylococcus aureus* after treatment with sub-lethal sodium hypochlorite concentrations. *Heliyon.* 2020;6(6):1–9.
- Thomas L, Russell AD, Maillard J. Antimicrobial activity of chlorhexidine diacetate and benzalkonium chloride against *Pseudomonas aeruginosa* and its response to biocide residues. *J Appl Microbiol.* 2005;98(3):533–43.
- Tomlinson E, Brown R, Davies S. Effect of Colloidal Association on the Measured Activity of Alkybenzyltrimethylammonium Chlorides against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Chem.* 1977;20(10):1277–82.
- Verbund für Angewandte Hygiene e.V. (VAH). 2020 Desinfektionsmittel-Liste des VAH vom 15.09.2020 (zitiert vom 21.09.2020) < <https://vah-liste.mhp-verlag.de/>>.

- Valentin-Weigand P. Grampositive Kokken. In: Selbitz H, Truyen U, Valentin-Weigand P, Hrsg. Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 10., aktualisierte Auflage. Stuttgart: Enke Verlag; 2015. p. 255–68.
- van Klingeren B. Disinfectant testing on surfaces. J Hosp Infect. 1995; 30:397–408.
- Wales AD, Davies RH. Co-Selection of Resistance to Antibiotics, Biocides and Heavy Metals, and Its Relevance to Foodborne Pathogens. Antibiotics (Basel). 2015;4(4):567–604.
- Walther B, Janssen T, Gehlen H, Vincze S, Borchers K, Wieler LH, Barton AK, Lübke-Becker A. Infektionsprävention und Hygienemanagement in Pferdekliniken. Berl Münch Tierärztl Wochenschr. 2014;127(11-12):486–97.
- Wieland N, Boss J, Lettmann S, Fritz B, Schwaiger K, Bauer J, Holzel CS. Susceptibility to disinfectants in antimicrobial-resistant and -susceptible isolates of *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from poultry - ESBL / AmpC-phenotype of *E. coli* is not associated with resistance to a quaternary ammonium compound, DDAC. J Appl Microbiol. 2017;122:1508–17.
- Wieler LH., Ewers C, Selbitz HJ. Gramnegative fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien. In: Selbitz H, Truyen U, Valentin-Weigand P, Hrsg. Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 10., aktualisierte Auflage. Stuttgart: Enke Verlag; 2015. 190–247.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Resistenzdaten laut ARS von *S. aureus*-Isolaten gegenüber Oxacillin, Datenstand 23.08.2019, abgerufen am 07.09.2020 (RKI 2019a) 6

Tabelle 2: Resistenzdaten laut ARS von *E. coli*-Isolaten gegenüber Cefotaxim, Datenstand 23.08.2019, abgerufen am 07.09.2020 (RKI 2019a) 7

Tabelle 3: Überblick über die in Deutschland bestehenden Desinfektionsmittellisten und deren Einsatzgebiete 13

Tabelle 4: in der Studie verwendete Grundsubstanzen 14

Tabelle 5: in der Studie verwendete Bakterienstämme 17

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Schematische Darstellung MHK-Test nach DVG: Erstellung einer Testkeimsuspension in Trypton-NaCl-Lösung mit $1,0 \times 10^8 - 1,0 \times 10^9$ KbE/ml mit anschließender Verdünnung 1:10 in Wasser standartisierter Härte (WSH), Verdünnungsreihe der Desinfektionsmittel in WSH anlegen, Positivkontrolle mit WSH, Negativkontrolle mit Phenol..... 10
- Abbildung 2: Schematische Darstellung qualitativer Suspensionstest nach DVG: Erstellung einer Testkeimsuspension in Trypton-NaCl-Lösung mit $1,5 - 5,0 \times 10^8$ KbE/ml, Test von vier Desinfektionsmittel-Konzentrationen im Doppelansatz nach vier Einwirkzeiten mit geringer und ohne Eiweißbelastung, Positivkontrolle mit WSH 11
- Abbildung 3: Schematische Darstellung Keimträgertest nach DVG: Testkeimsuspension in Trypton-NaCl-Lösung mit $1,5 - 5 \times 10^9$ KbE/ml, DM = Desinfektionmittel..... 12
- Abbildung 4: Resistenzskala von Mikroorganismen gegenüber Chemikalien (nach BÖHM 2002, McDONNELL und RUSSEL 1999) 15

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Uwe Truyen für die Bereitstellung des Projektes und die gute Betreuung während meiner Doktorandenzeit bedanken.

Eine große Hilfe bezüglich fachlicher Beratung und Unterstützung, sowie das Erteilen vieler Ratschläge und Denkanstöße war für mich während der gesamten Zeit Frau Dr. Stephanie Speck. Dafür ein großes Dankeschön!

Für die Finanzierung des Projektes bedanke ich mich beim Sächsische Staatsministerium für Soziales und Gesellschaftlichen Zusammenhalt (Abteilung Gesundheits- und Veterinärwesen, Verbraucherschutz).

Insbesondere bei Herrn Mario Reinhardt, Frau Evelin Brumme und Frau Dana Rüster möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung bei der Laborarbeit und das gute Miteinander bedanken. Ohne eure Hilfe wären die Tests im Labor für mich alleine nicht schaffbar gewesen.

Bei Herrn Dr. Markus Kreuz bedanke ich mich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Ein großes Dankeschön gehört auch allen weiteren Institutsmitarbeitern/-innen und Mitdoktoranden/-innen (insbesondere Frau Dr. Cindy Wenke, Frau Dr. Anne T. Köhler und Frau Dr. Anna Obiegala) für die gute Zusammenarbeit und das stets harmonische Arbeitsumfeld.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Mann Hannes Geber für die Unterstützung, ständige Motivation und eure Geduld mit mir während der Erstellung dieser Arbeit danken. Danke, dass ich mich immer auf euch verlassen kann.