
„Desinfektion in der Lebensmittelkette: Probleme und Perspektiven“



Uwe Rösler

Einleitung

- R&D wird weltweit als wichtigste Maßnahme zur Infektkettenunterbrechung in der Primärproduktion und in der weiteren Lebensmittelverarbeitung gesehen.
- neben klassischen Zoonose-Erregern sind zunehmend auch kommensale, antibiotikaresistente Erreger (z.B. MRSA & ESBL) ein Problem in der Nutztierhaltung, dem Lebensmittelsektor und der Humanmedizin.
- deutlich verbesserte Hygiene-Maßnahmen gelten hier als Mittel der Wahl (siehe auch 16. AMG-Novelle)
 - R&D
 - Isolation (Humanmedizin)

Einleitung

- Es herrschen derzeit beträchtliche **Unsicherheiten** hinsichtlich
 - künftiger Zulassung und Verkehrsfähigkeit von Desinfektionsmitteln (Bioziden)
 - den notwendigen Wirksamkeitsnachweisen
 - Relevanz der “DVG-Listung” von Desinfektionsmitteln

- Es gibt eine ständig wachsende Zahl von Berichten über **Desinfektionsmittel-Resistenzen**, auch mit co-Induktion von Antibiotika-Resistenzen

Einleitung

- Es herrschen derzeit beträchtliche **Unsicherheiten** hinsichtlich
 - künftiger Zulassung und Verkehrsfähigkeit von Desinfektionsmitteln (Bioziden)
 - den notwendigen Wirksamkeitsnachweisen
 - Relevanz der “DVG-Listung” von Desinfektionsmitteln

- Es gibt eine ständig wachsende Zahl von Berichten über **Desinfektionsmittel-Resistenzen**, auch mit co-Induktion von Antibiotika-Resistenzen

Desinfektion in der Lebensmittelkette

Unsicherheiten bei Zulassung und Wirksamkeitsnachweis von Desinfektionsmitteln

Biozid-Zulassung

- gemäß Biozidprodukte-VO (EU) Nr. 528/2012
 - 2-stufiges Verfahren
 - Notifizierung und Bewertung von Wirkstoffen → ECHA, BAuA
 - für Humanmedizin, tierhaltungsbereich, Lebensmittelbereich, Häuslicher Bereich
 - Zulassung von Biozid-Produkten
 - für klassische Desinfektionsmittel etabliert, für *in situ*-Produkte noch unklar
- sehr langwieriges Verfahren, enorme Kosten
- nur für wirtschaftlich interessante Wirkstoffe mit Planungssicherheit
 - Verlust einiger Wirkstoffe
- Wirkstoffverfahren nur für Firmenkonsortien zu bewältigen → Monopolisierung

Biozid-Zulassung

- Zulassung von Biozid-Produkten
 - ECHA (Gemeinschaftszulassung), BAuA (nationale Zulassung)
 - nur für zugelassene Wirkstoffe
 - Wirksamkeitsnachweise gemäß EN-Prüfnormen
 - Getrennt nach Tierhaltungs- und Lebensmittelbereich
 - Suspensionsversuche (Phase 1-Tests)
 - Oberflächenversuche (Phase 2-Tests, nicht nicht für alle Erreger-gruppen etabliert)
 - Praxisversuche (Phase 3-Tests, noch nicht etabliert)

DVG - Listung

- auf Basis von EN-Prüfnormen, wenn etabliert
 - Tierhaltung → Bakterizidie, Levoruzidie, Fungizidie
 - Lebensmittelbereich → Bakterizidie, Levoruzidie, Fungizidie
 - Fleischbereich (gering belastet), Milchbereich, Großküche
- spezifische Prüfnormen (noch) für:
 - Tierhaltungsbereich: Viruzidie, Parasitenwirksamkeit (Kokzidien, Spulwürmer), Tuberkulozidie
 - Lebensmittelbereich: Viruzidie; Fleischbereich (belastet)

DVG - Listung

- **Unterschiede zu den “reinen” EN-Prüfnormen**
 - **Unabhängigkeit:** Begutachtung durch unabhängige Fachgutachter
 - **Wiederholbarkeit:** Versuchswiederholungen, zwei Gutachter (Eckwertprüfung)
 - **Prüfung auf Validität:** gründliche Prüfung der GA durch DVG-Ausschuss
 - **Praxisrelevanz:** z.B. Viruzidie (Keimträgertest), belasteter Fleischbereich, MHK (Biozidresistenzen)
- **Listung von Desinfektionsverfahren:**
 - keine EN-Prüfmethodik etabliert
 - je nach Fragestellung durch ein individuell durch den DVG-Ausschuss festgelegtes Prüfprozedere → **für chemische und physikalische Verfahren**
 - erstes Verfahren “DVG-gelistet”

Desinfektion in der Lebensmittelkette

Biozid-Resistenzen

Resistenzen gegen Desinfektionsmittel

Intrinsische Resistenz:

- natürliche, chromosomal codierte Resistenz (Unempfindlichkeit/Tenazität)
 - determiniert das prinzipielle Wirkungsspektrum eines Desinfektionsmittels
 - Spezialform: "Phänotypische Resistenz" z.B. in Biofilmen

Erworbene (extrinsische) Resistenz:

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

Resistenzen gegen Desinfektionsmittel

Co-Selektion bei Vorliegen von Mehrfachresistenzen gegen Mikrobiozide

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

J Antimicrob Chemother
 doi:10.1093/jac/dks108

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

Jennie Fischer¹, Irene Rodríguez², Silvia Schmöger¹, Anika Friese², Uwe Roesler², Reiner Helmuth¹ and Beatriz Guerra^{1*}

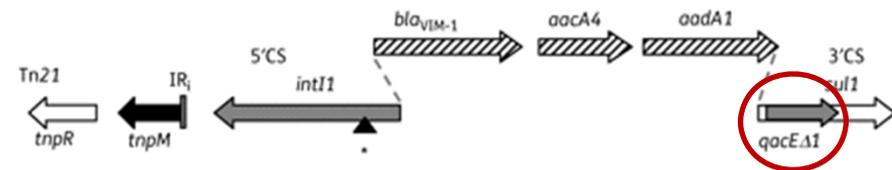
¹Federal Institute for Risk Assessment, BfR, Department for Biological Safety, Max-Dahm-Strasse 8-10, D-10589 Berlin, Germany; ²Free University Berlin, FU, Institute of Animal Hygiene and Environmental Health, Philippstr. 13, D-10115 Berlin, Germany

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

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

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

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



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

➔ Co-Selektion möglich durch Desinfektionsmittel, Schwermetalle, (Herbizide)

Resistenzen gegen Desinfektionsmittel

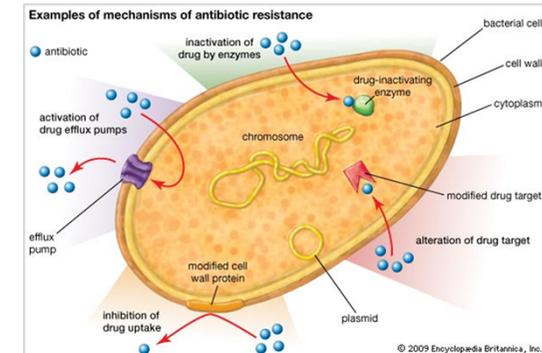
Wirkprinzip vs. Desinfektionsmittelresistenz:

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

Resistenzen gegen Desinfektionsmittel

Drei prinzipielle Mechanismen:

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



Resistenzen gegen Desinfektionsmittel

Antibiotika- vs. Desinfektionsmittelresistenz:

- Antibiotika haben meist nur eine spez. Targetstruktur
 - einzelne Mutation kann bereits Resistenz hervorrufen (z.B. P_bP₂b bei MRSA)
 - hohe Wahrscheinlichkeit einer Resistenzinduktion
 - Co-Induktion von Desinfektionsmittelresistenzen unwahrscheinlich/selten
- Desinfektionsmittel haben meist mehrere Targetstrukturen
 - mehrere Mutationen für Resistenzbildung erforderlich (Mehrschrittresistenz)
 - geringere Wahrscheinlichkeit einer Resistenzinduktion
 - Co-Induktion von Antibiotikaresistenzen häufig



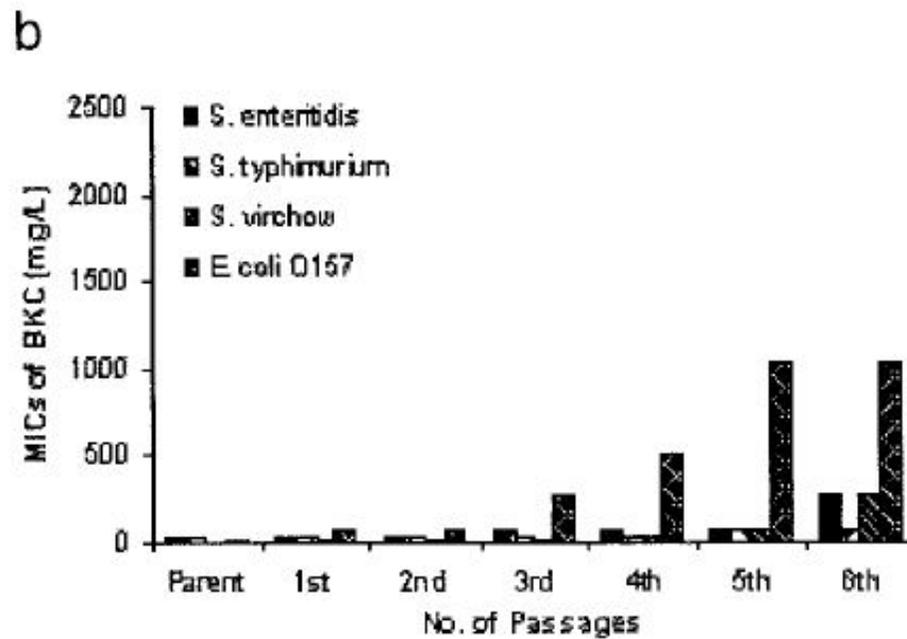
Resistenzen gegen Desinfektionsmittel

Resistenzen bei folgenden Stoffklassen:

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

Resistenzen gegen Desinfektionsmittel

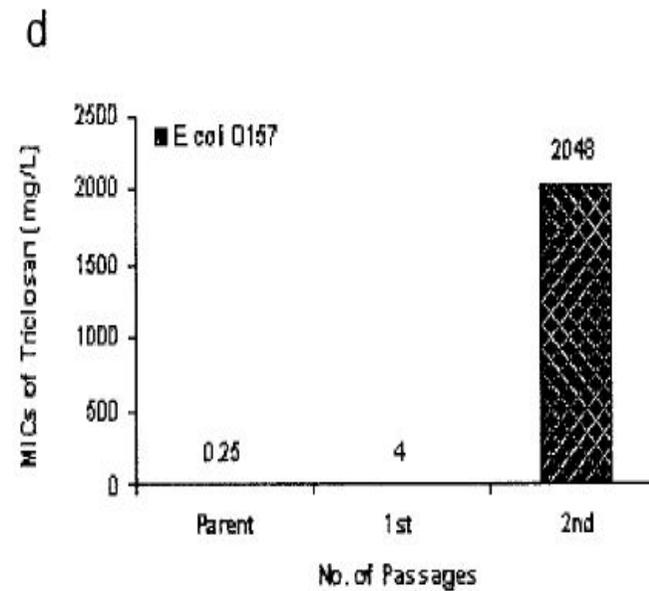
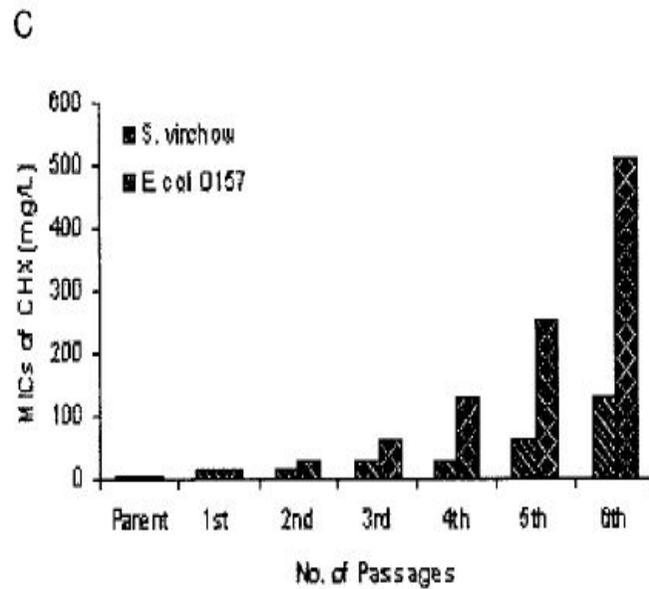
Was bedeutet das praktisch?



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

Resistenzen gegen Desinfektionsmittel

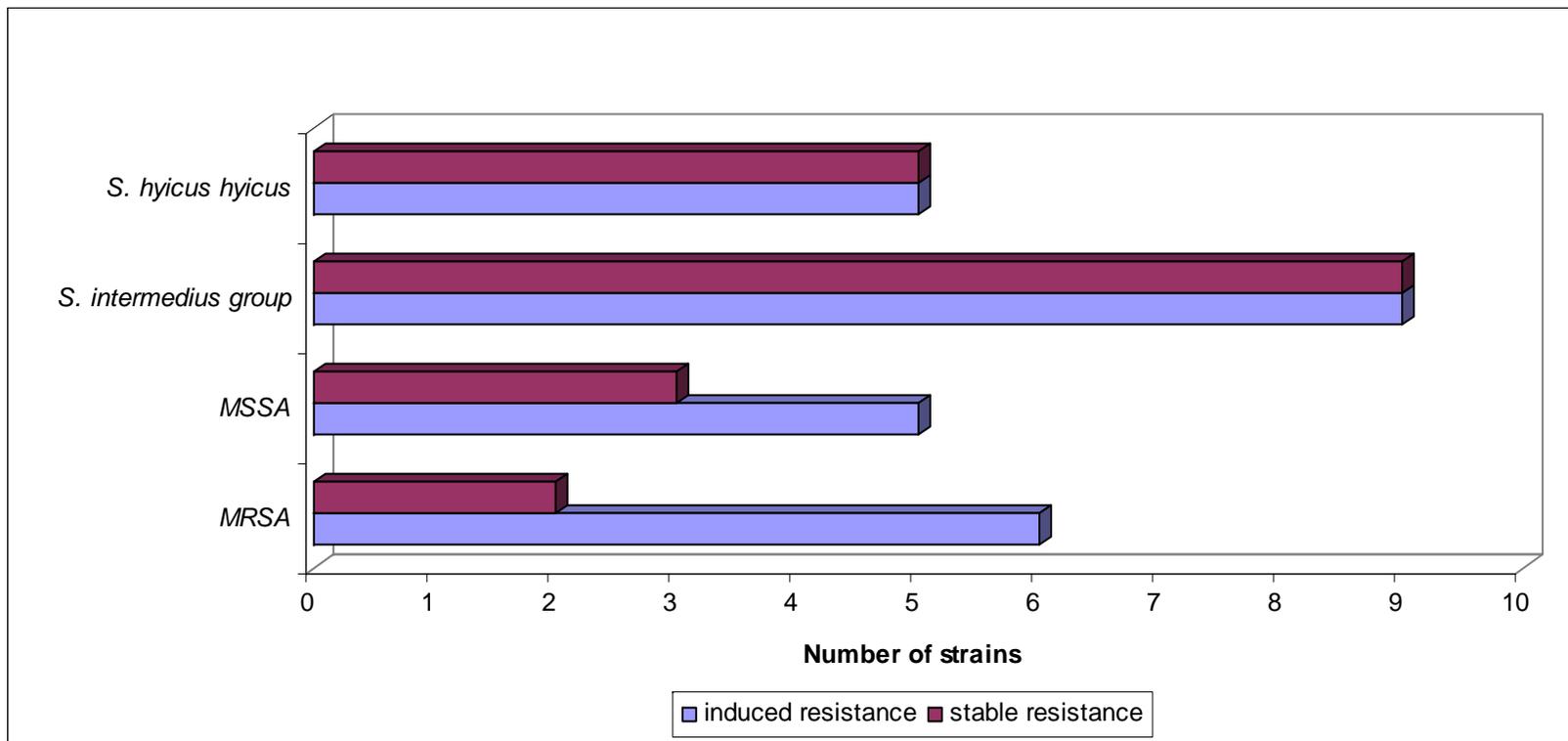
Was bedeutet das praktisch?



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

Resistenzen gegen Desinfektionsmittel

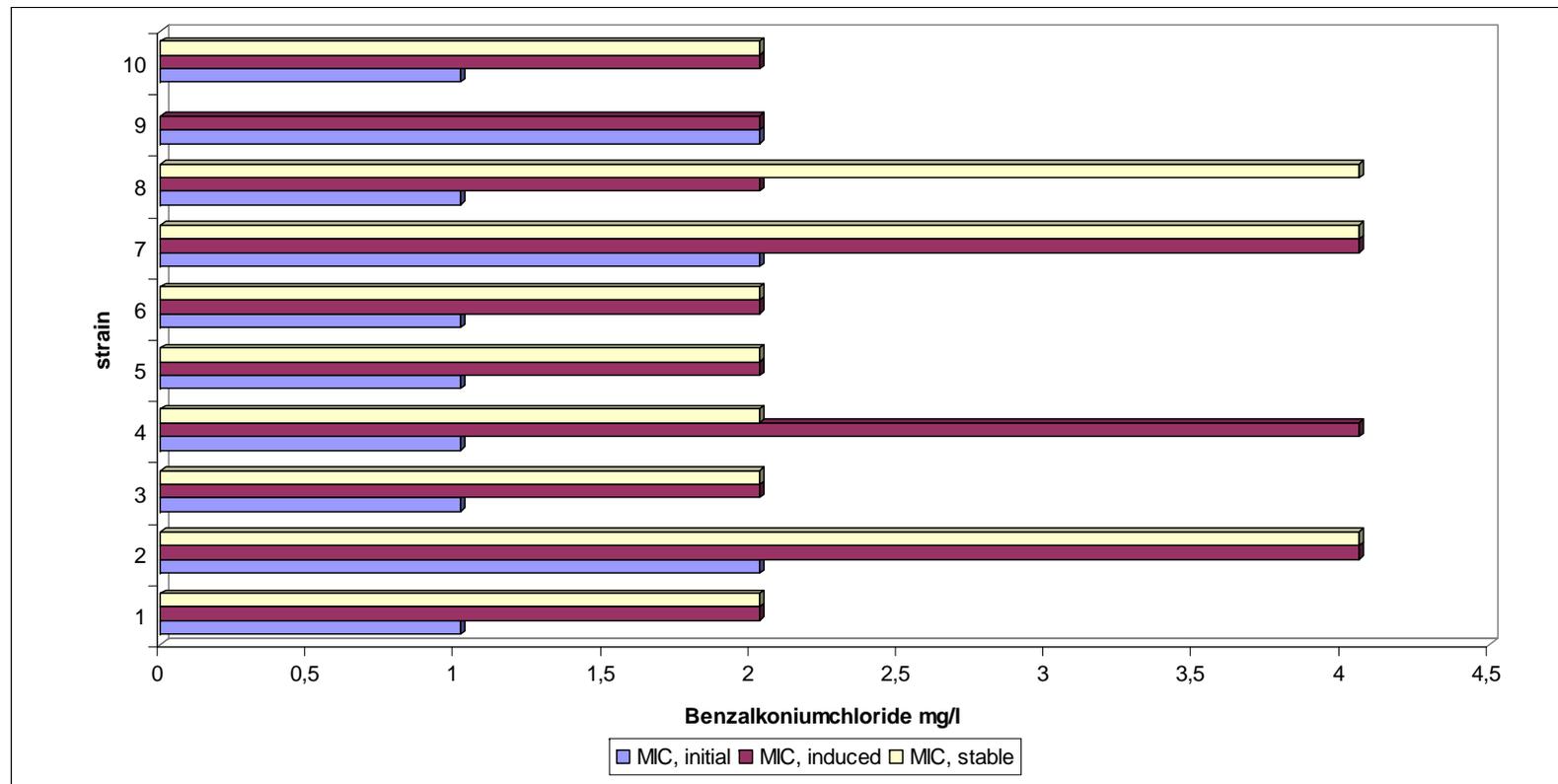
Benzalkoniumchlorid



Resistenzen gegen Desinfektionsmittel

Benzalkoniumchlorid

S. intermedius



Resistenzen gegen Desinfektionsmittel

Toleranzinduktion gegen Peressigsäure

	originäre MHK	MHK nach subinhibitorischen Desinfektionsmittelkonzentrat.		MHK nach Stabilitätspassagen	
<i>E. faecium</i> DSM 2918	0,1%	0,25%	0,25%	0,1%	0,1%
<i>E. faecium</i> B1	0,1%	0,25%	0,25%	0,1%	0,1%
<i>E. coli</i> DSM 682	0,1%	0,25%	0,1%	0,1%	-
<i>E. coli</i> B1	0,1%	0,25%	0,25%	0,1%	0,1%
<i>E. coli</i> (ESBL+) 09E915	0,1%	0,1%	0,25%	-	0,1%
<i>E. coli</i> (ESBL+) B1	0,1%	0,25%	0,25%	0,1%	0,1%

Tabelle 1: ausgewählte Testkeime im Verlauf der Passagen mit Peressigsäure

MHK-Erhöhungen insgesamt:

<i>Enterococcus spp.</i>	20/20
<i>E. coli</i>	14/20
<i>E. coli</i> (ESBL)	8/20

Resistenzen gegen Desinfektionsmittel

Kreuzresistenzen zu Antibiotika?

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



Resistenzen gegen Desinfektionsmittel

Kreuzresistenzen zu Antibiotika

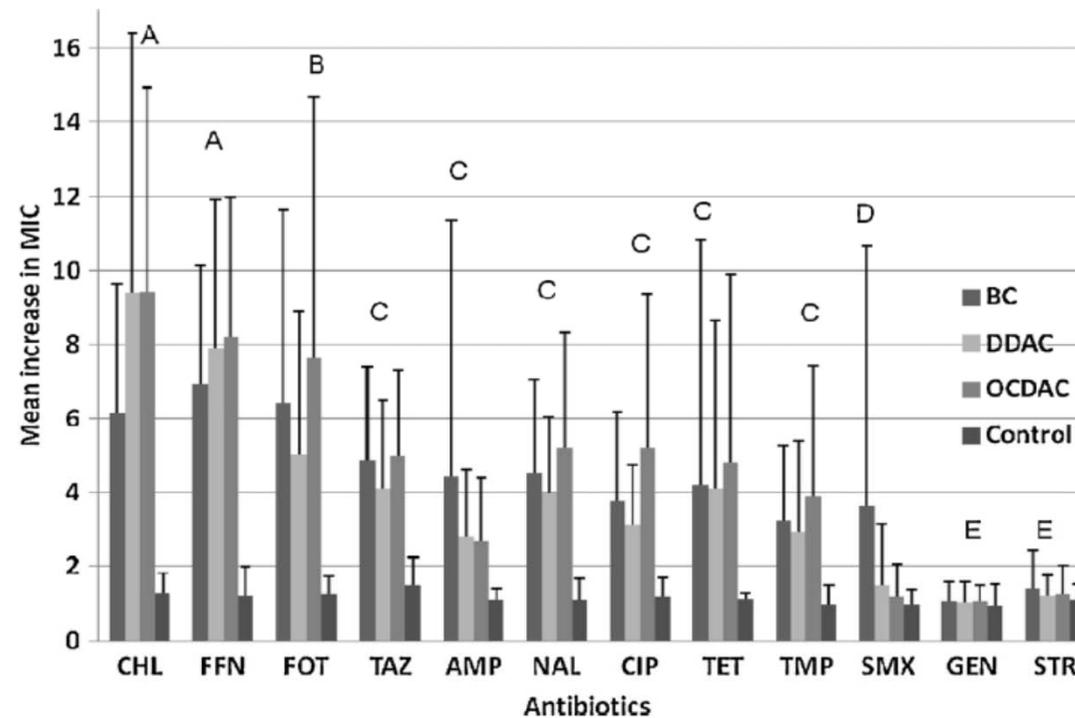


Fig. 2. Mean increase in MIC to antibiotics observed after exposure to benzalkonium chloride (BC), didecyl dimethyl ammonium chloride (DDAC), dioctyl dimethyl ammonium chloride (OCDAC) and to culture broth without disinfectant (control) in 10 *E. coli* strains. MIC tests were done twice. Letters (A-E)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

Buffet et al. (2012): *Veterinary Microbiology*

Zusammenfassung Biozid-Resistenzen

- Insbesondere Quaternäre Amoniumverbindungen, Chlorhexidin und Triclosan sind Desinfektionsmittel für erhöhter Resistenzbildung:
 - Eingeschränktes Wirkungsspektrum
 - Teils Co-Induktion von Antibiotikaresistenzen
 - **Problem:** mehr als 2/3 der Desinfektionsmittel im Lebensmittelbereich sind QAVs Alternativen?: Chlor- und Sauerstoffabspalter, EtOH, Säuren
 - **Frage:** Anteil an der AB-Resistenzproblematik in KH und der Tierhaltung?
- Gegen jedes Biozid, also auch Desinfektionsmittel kann es zu einer Resistenzbildung kommen!
 - immer richtige Einwirkzeit und Konzentration des Desinfektionsmittels beachten
 - Anwendungsinformationen/-empfehlungen müssen valide sein
- Unsachgemäßer Einsatz kann, ein sich ausbreitendes Resistenzproblem (auch hinsichtlich Antibiotikaresistenzen) verursachen.

Zusammenfassung Biozid-Zulassung

- das neue europäische Biozid-Recht wird große Auswirkungen haben:
 - Wirkstoffe
 - Produkte
 - Kosten (Marktmacht großer Hersteller)
- DVG-Listung beinhaltet:
 - EN-Konformität
 - Anwendbarkeit gemäß Desinfektions-RL (Tierseuchenfall)
 - Unabhängigkeit, Wiederholbarkeit und Validität
 - Möglichst große Sicherheit gegen Biozid-Resistenzen
 - Individuelle Wirksamkeitsprüfung von Desinfektionsverfahren

