Antibiotikaresistenz vs. Biozidtoleranz

- Eine Frage der Definition -

23/24.09.2014

Dr. Nadine Göhring
- Principal Microbiologist -
RD&E Healthcare

ECOLAB®

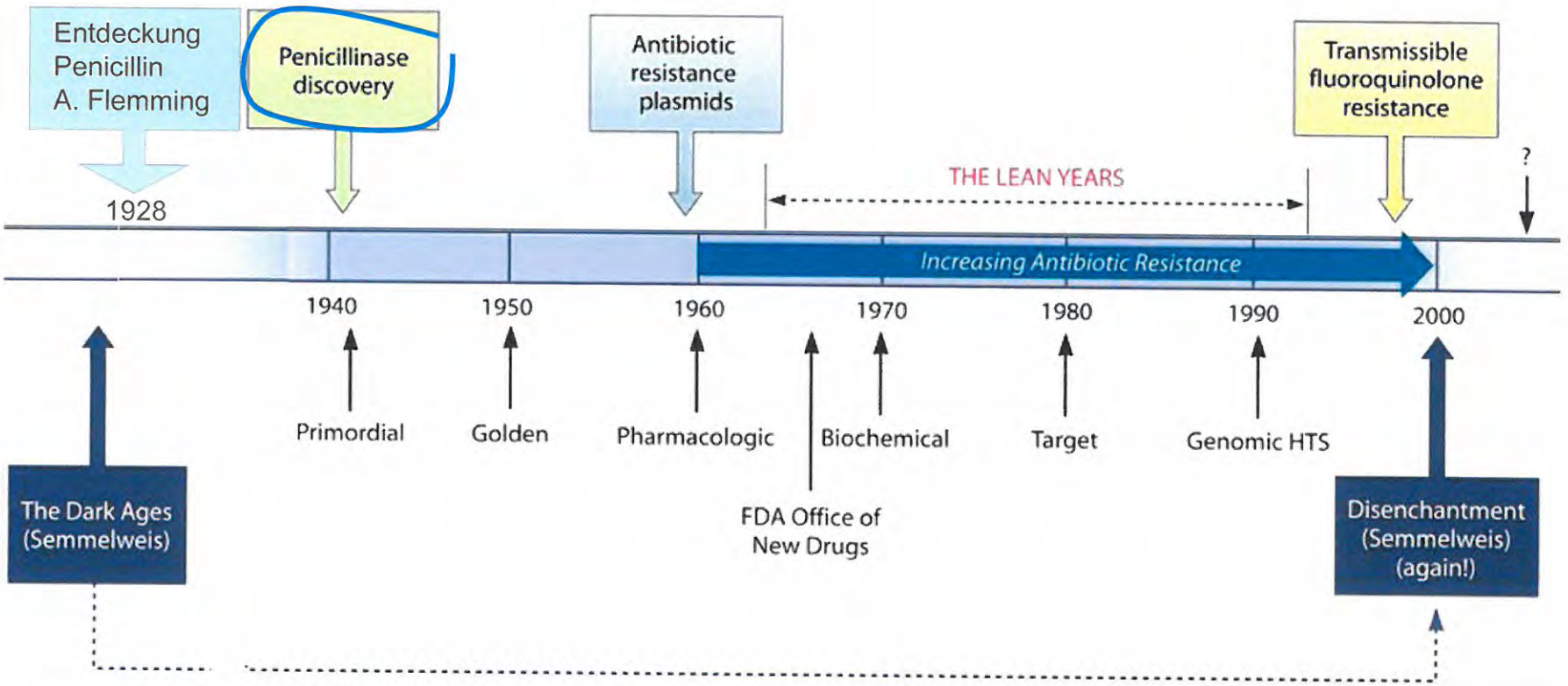
Eine Frage der Definition

- Mechanismen der Antibiotikaresistenz
- Zielstrukturen bei der Biozidwirkung
- Definitionen !
- Unterschiedliche Arten von Resistenzen
- Kreuz-Resistenzen von Bioziden und Antibiotika
- Zusammenfassung
- Was ist zu beachten !

ECOLAB®

Historischer Rückblick - Antibiotikaresistenz

- **Co-evolution**: Entdeckung und Einführung der ersten Antibiotika und gleichzeitiges Auftauchen von Resistenzen

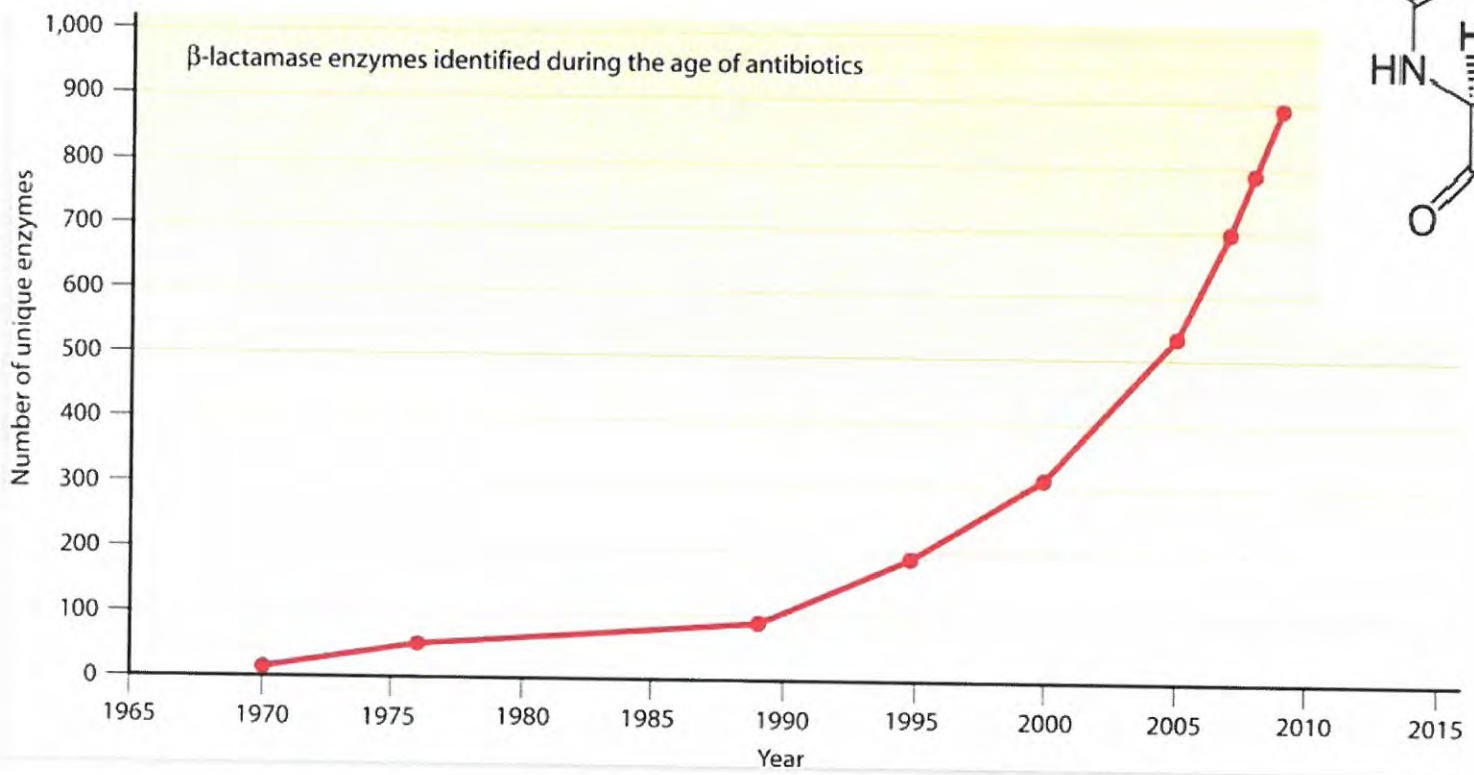


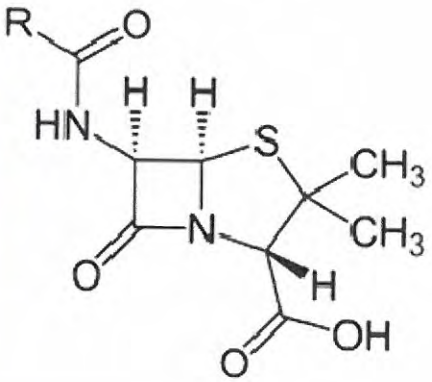
ECOLAB®

J. Davies and D. Davies, *Micro and Molec. Biol. Rev*, 2010, 74,417-33

Auftreten von Penicillin abbauenden Enzymen

- ß-Laktamasen hydrolysieren ß-Laktam-Antibiotika z.B. Penicillin



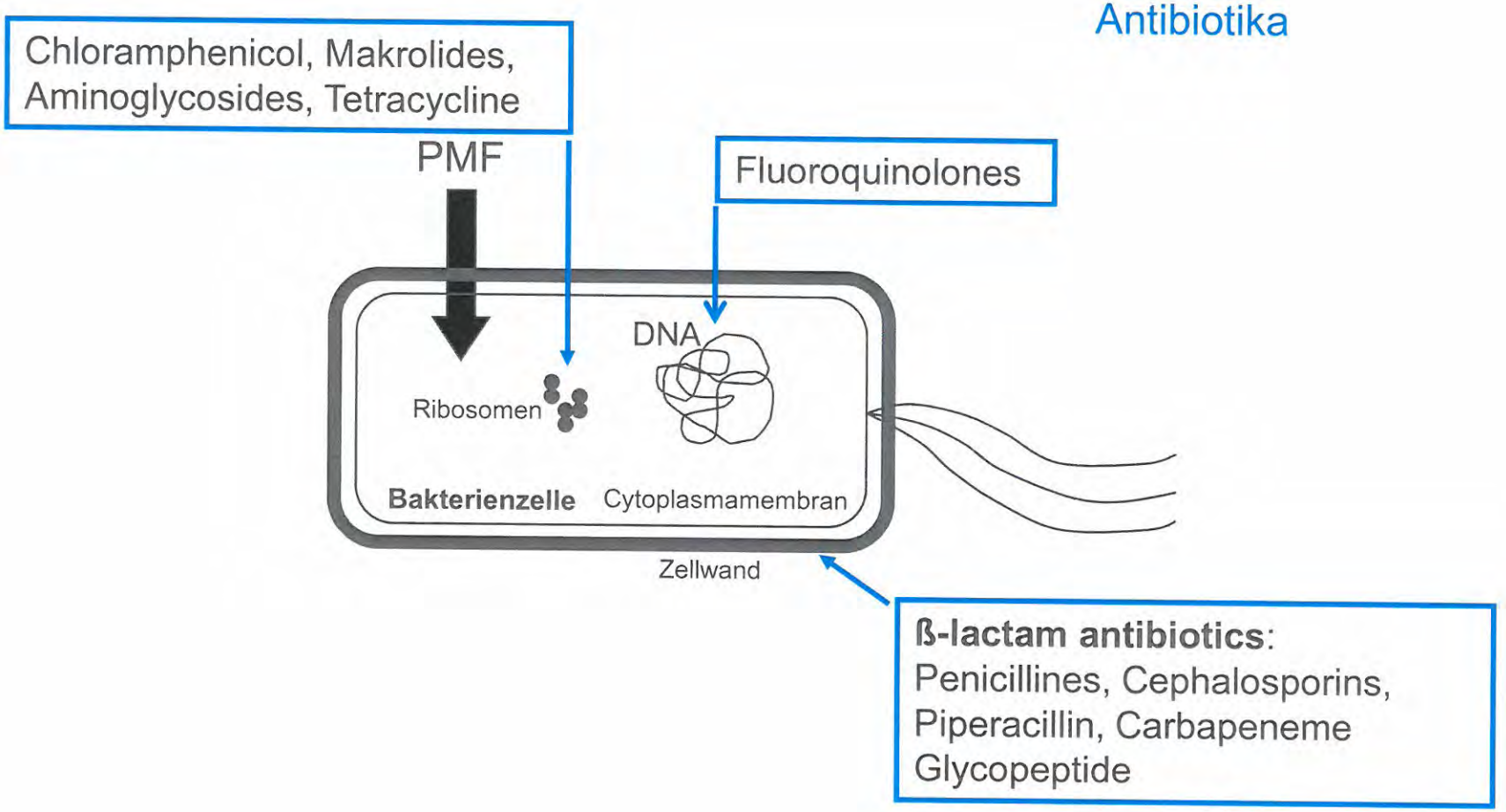


ECOLAB®

J. Davies and D. Davies, *Micro and Molec. Biol. Rev.* 2010, 74,417-33

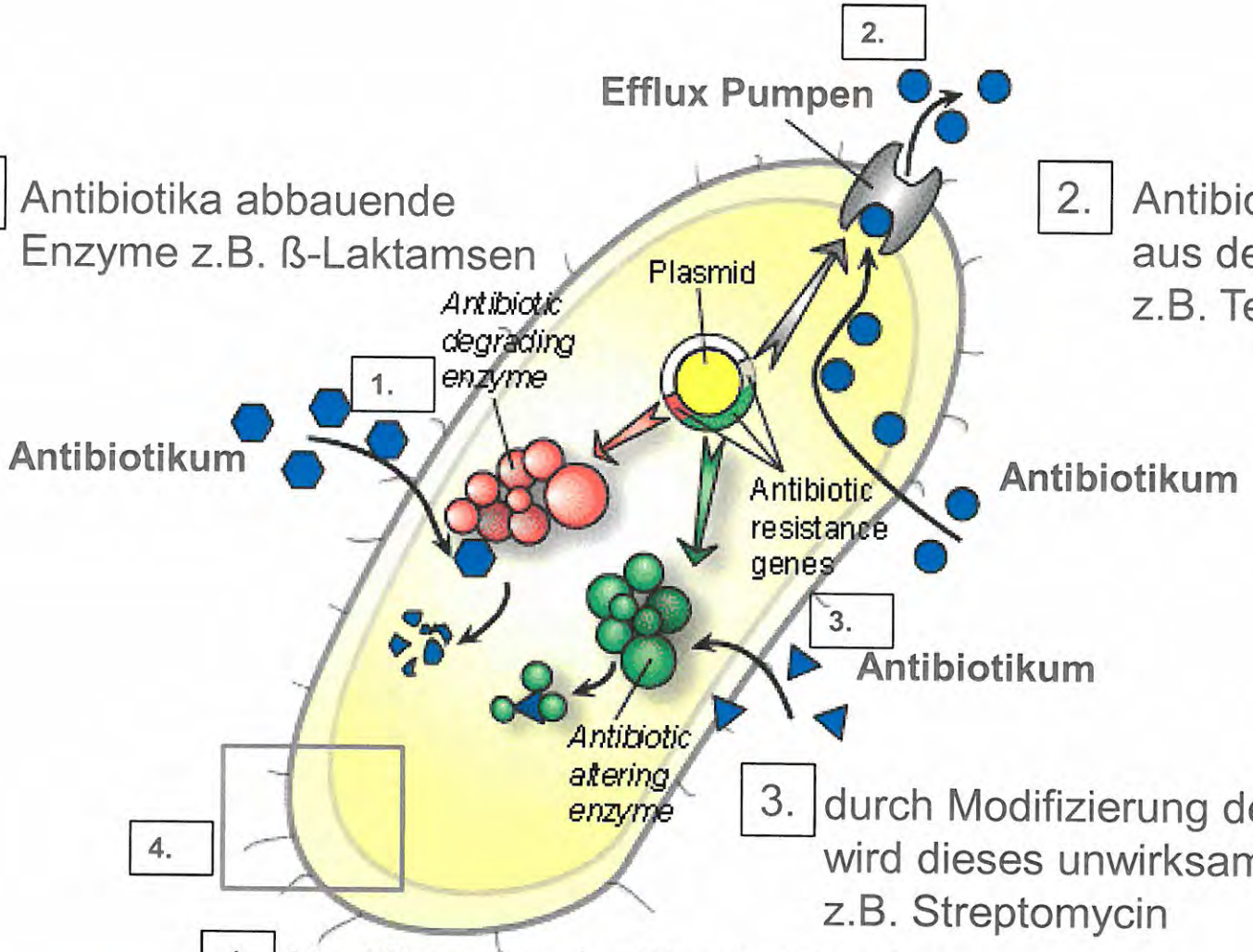
Zielstrukturen der Antibiotika

Antibiotika



ECOLAB®

Mechanismen der Antibiotikaresistenz



1. Antibiotika abbauende Enzyme z.B. ß-Laktamsen

2. Antibiotikum wird aktiv aus der Zelle befördert z.B. Tetracyclin

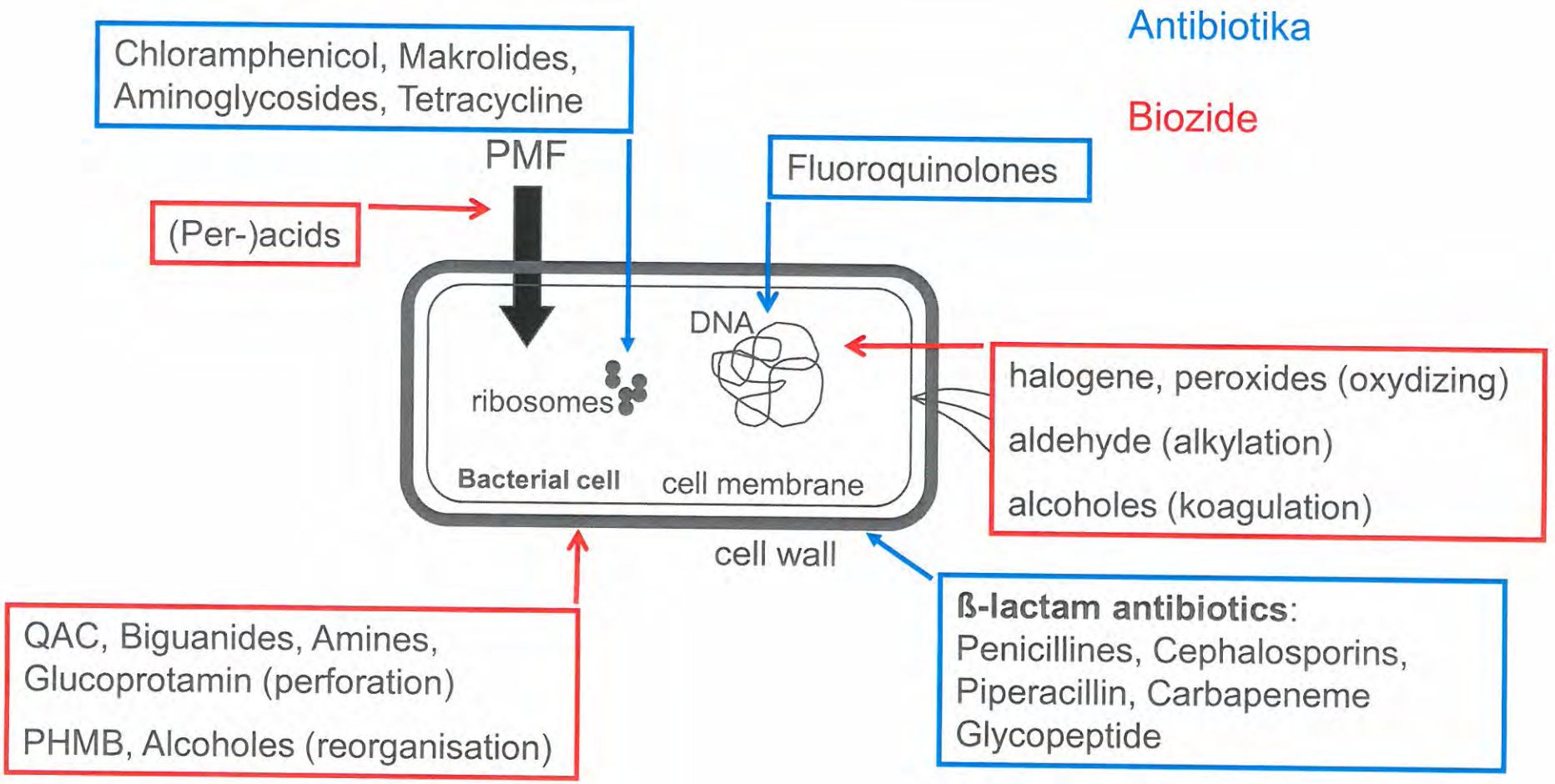
3. durch Modifizierung des Antibiotikums wird dieses unwirksam z.B. Streptomycin

4. Modifizierung der Zielstruktur des Antibiotikums z.B. Polymyxin, Fluoroquinolone

ECOLAB®

TODAR'S online textbook of bacteriology

Zielstrukturen der Biozide



ECOLAB®

Zielstrukturen der Biozide/Antibiotika

- Antibiotika wirken nach dem Schlüssel-Schloss Prinzip

Antibiotikum

Zielstruktur

- Desinfektionsmittel haben einen unspezifischen, multifaktoriellen Wirkmechanismus

Biozid

gesamte Bakterienzelle als Zielstruktur

ECOLAB®

Achtung – Definitionen beachten

Tests for determining in-use concentrations of antibiotics and disinfectants are based on entirely different concepts: "Resistance" has different meanings

O. Cerf [a,*], B. Carpentier [b], P. Sanders [c]

International Journal of Food Microbiology 136 (2010) 247–254

- 'Prüfungen zur Bestimmung der Anwendungskonzentrationen von Antibiotika und Bioziden basiert auf unterschiedlichen Konzepten: der Begriff Resistenz hat unterschiedliche Bedeutungen'

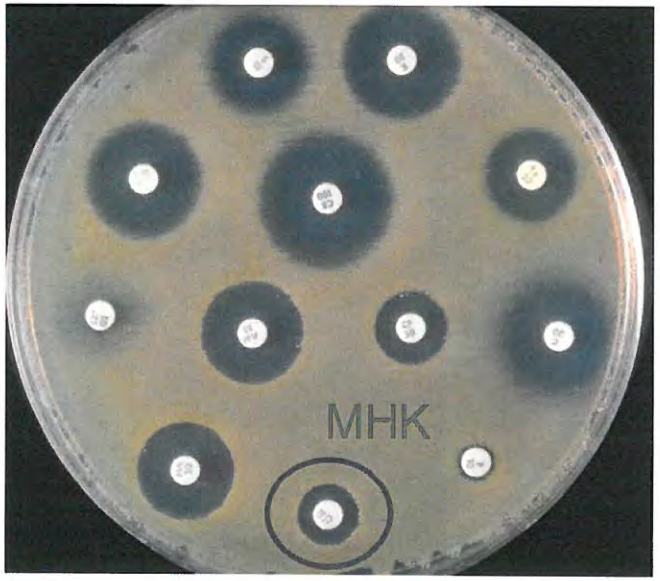
ECOLAB®

O. Cerf *et al.*, *Int. J. of Food Microbiol.* 2010, 136 247-254

Achtung – Definitionen beachten

- Bestimmung der **Antibiotikaresistenzen** erfolgt durch Ermittlung der minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK oder engl. MIC)
  - geringste Konzentration eines Hemmstoffes, bei der Vermehrung der Mikroorganismen unterbunden wird

Antibiogramm (1 od. > Antibiotika)



E-Test (1 Antibiotikum)

ECOLAB®

Achtung – Definitionen beachten

- Bestimmung der **'Biozidresistenzen'** erfolgt oft fälschlicherweise auf MHK !

- Biozide mit bakterizider Wirkung führen zu einer **irreversiblen Zerstörung** der Mikroorganismen
  - dabei werden nicht notwendigerweise alle zerstört, sondern auf ein akzeptables Maß reduziert, das weder für Gesundheit von Mensch und Tier noch für Qualität verderblicher Güter schädlich ist

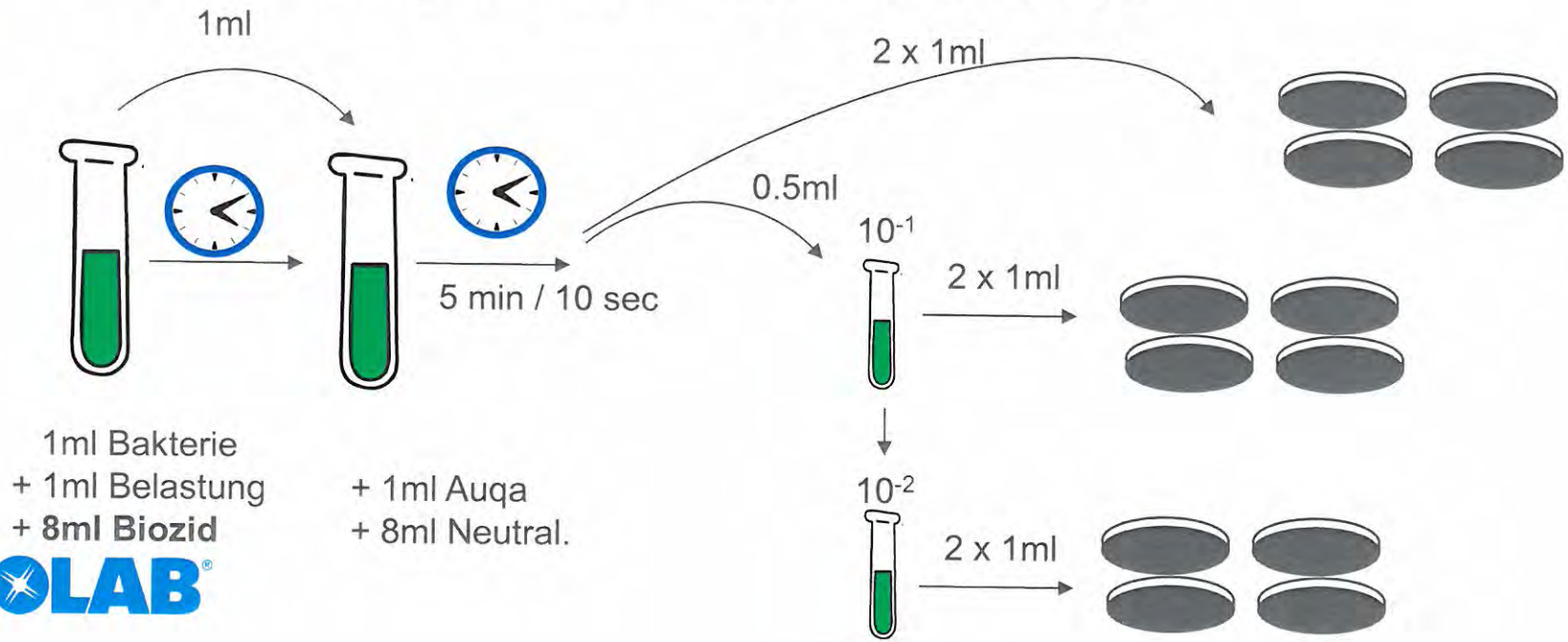
- Sinnvoller die Bestimmung der **minimalen bakteriziden** Konzentration MBK – aber auch hier unterschiedliche Methoden im Umlauf !!!

ECOLAB®

Achtung – Definitionen beachten

- Biozide mit bakterizider Wirkung führen zu einer **irreversiblen Zerstörung** der Mikroorganismen

- Wirksamkeitsprüfungen nach Europäischen Teststandard schreiben definierte Log-Reduktionen vor
  - EN 13727 – 5 Log Reduktion im Suspensionsversuch



ECOLAB®

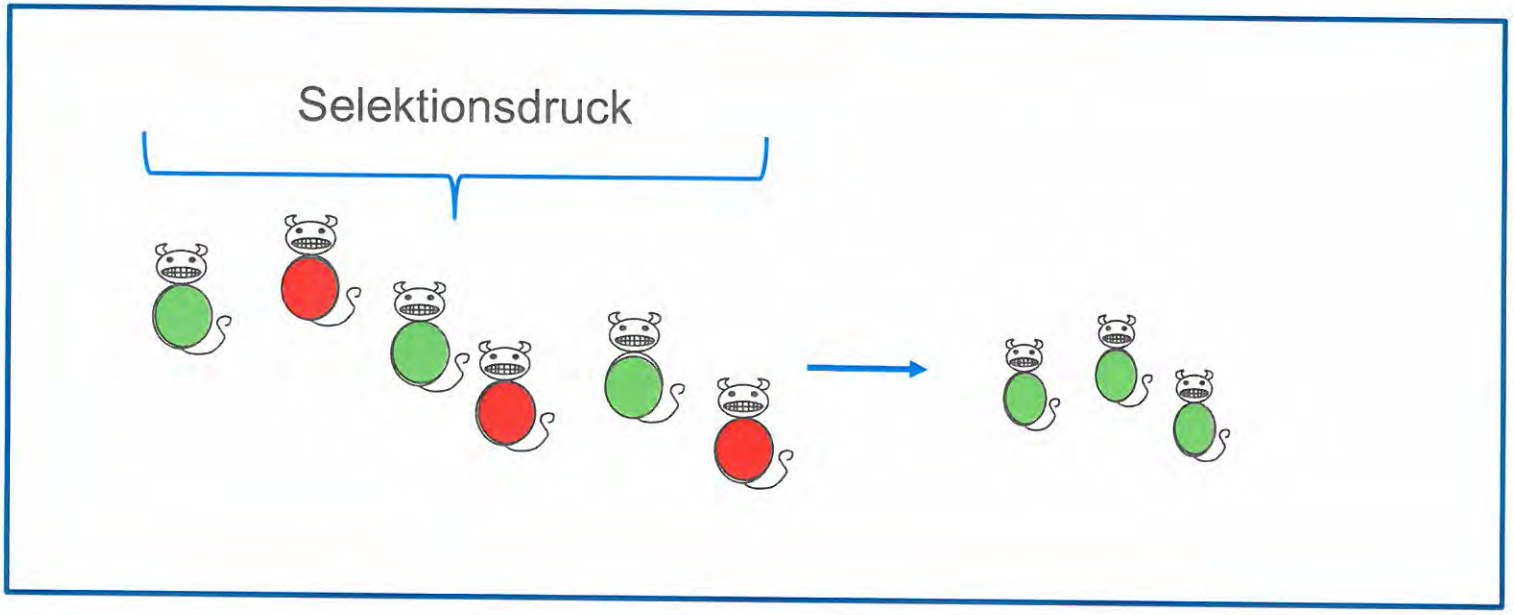
Achtung – Definitionen beachten

- drei unterschiedliche Formen von Resistenz
  - erworbene Resistenz
  - intrinsische Resistenz
  - Adaptation

ECOLAB®

Phänotypische Anpassung oder Adaptation

- phänotypische Adaptation an bestimmte Umweltfaktoren
- oft temporär, nur unter Selektionsdruck beibehalten
- nicht genetisch stabil



ECOLAB®

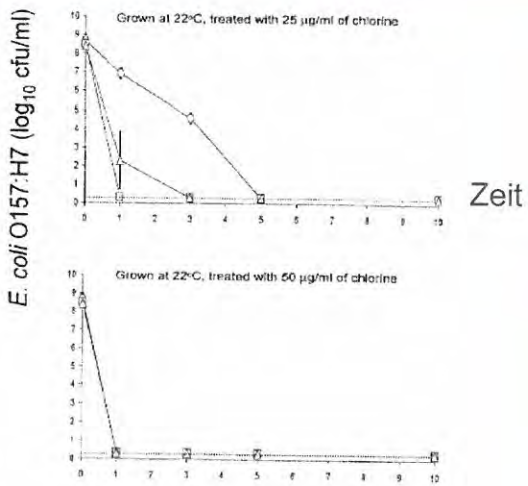
Phänotypische Anpassung oder Adaptation

- Bakterien, die in einem Biofilm leben sind 100 – 1000 x resistenter im Vergleich zu planktonisch lebenden Formen [1)]
  - 3 *E. coli* Stämme, behandelt mit einem Cl-basiertem Desinfektionsmittel [2)]

planktonisch	biofilm

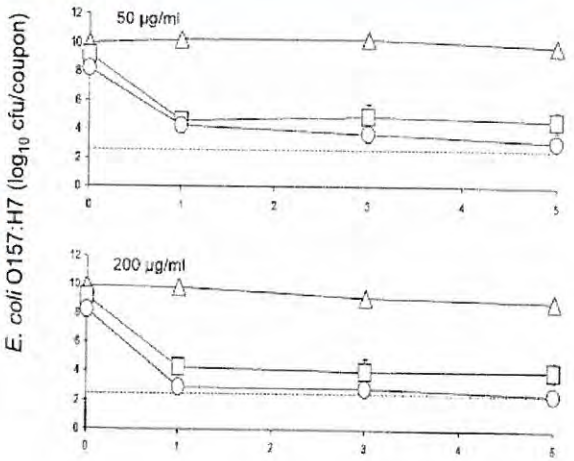
25 ppm

50 ppm



50 ppm

200 ppm



ECOLAB®

1) P. Gilbert *et al.*, *Am J Infect Contr 2001*, 29, 252-5
2) Ryu *et al.*, Appl Environm Microbiol , 2005; 71: 247-245

Phänotypische Anpassung oder Adaptation

- Lebensmittel-Pathogen *Listeria monocytogenes* zeigt **Anpassung** in zellulären Phospholipiden und Fettsäurekomposition als Stressantwort in Gegenwart von Desinfektionsmittel auf Basis von QAV (BAC) [1)]

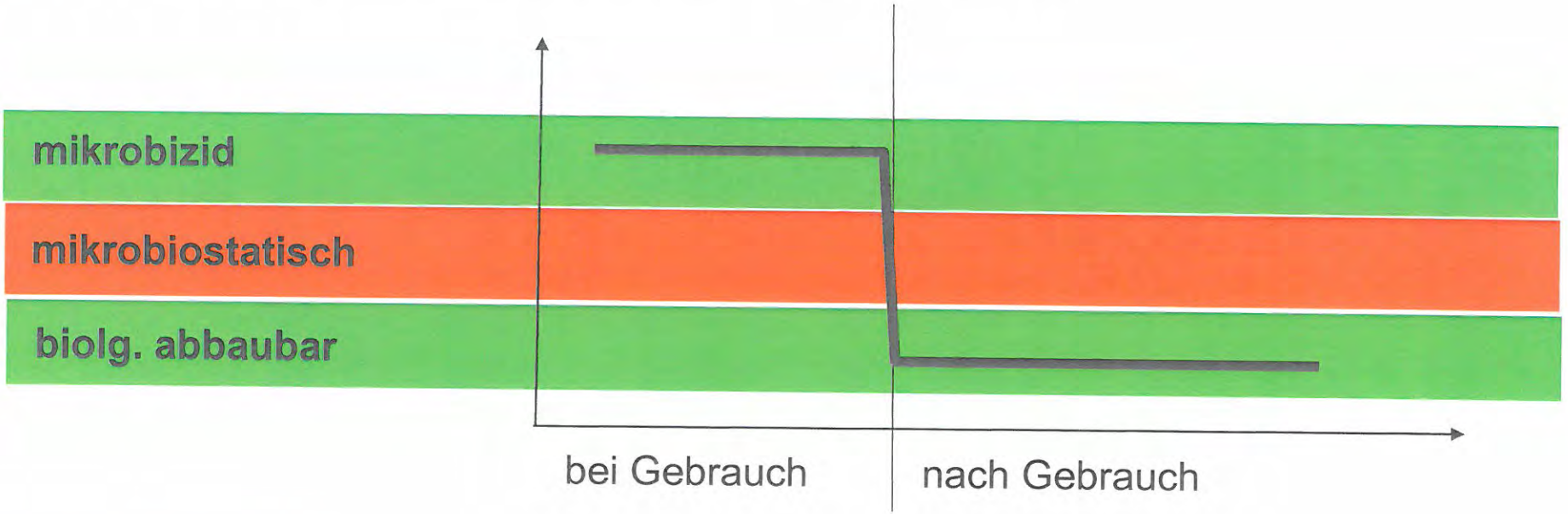
- **Zusammenfassung [1)]:**
  - verminderte Membranfluidität
  - Modifizierung von physico-chem. Parametern der Zelloberfläche
  - verminderte Zelladhäsion an abiotischen Oberflächen

ECOLAB®

1) Bisbiroulas *et al.*, *Lett. Appl. Microbiol*, 2011, 52:275-280

Phänotypische Anpassung oder Adaptation

- **Schlussfolgerungen:**
- 1. Biozide in mikrobizider Konzentration anwenden, abgesichert durch Europäische oder Nationale Testmethoden
- 2. Unterkonzentration (Selektionsdruck) vermeiden



ECOLAB®

Mögliche Adaptationsprozesse

- Biozidanwendungen, welche 'Resistenzen' hervorrufen können

Applikation	Verfügbarkeit nach der Anwendung	
	Wasser	**Wirkstoff**
Händedesinfektion	Ja	Nein (Ausnahme: bei Remanenz)
Antisepsis	Ja	Nein (Ausnahme: bei Remanenz)
Flächendesinfektion	Nein	Ja
Instrumentenaufbereitung	Ja	Ja*

* regelmäßiger Austausch des Desinfektionsbades
regelmäßige Reinigung der Desinfektionswanne

➡ vermindert Auftreten von Unterkonzentrationen durch starke org. Belastung !!!

ECOLAB®

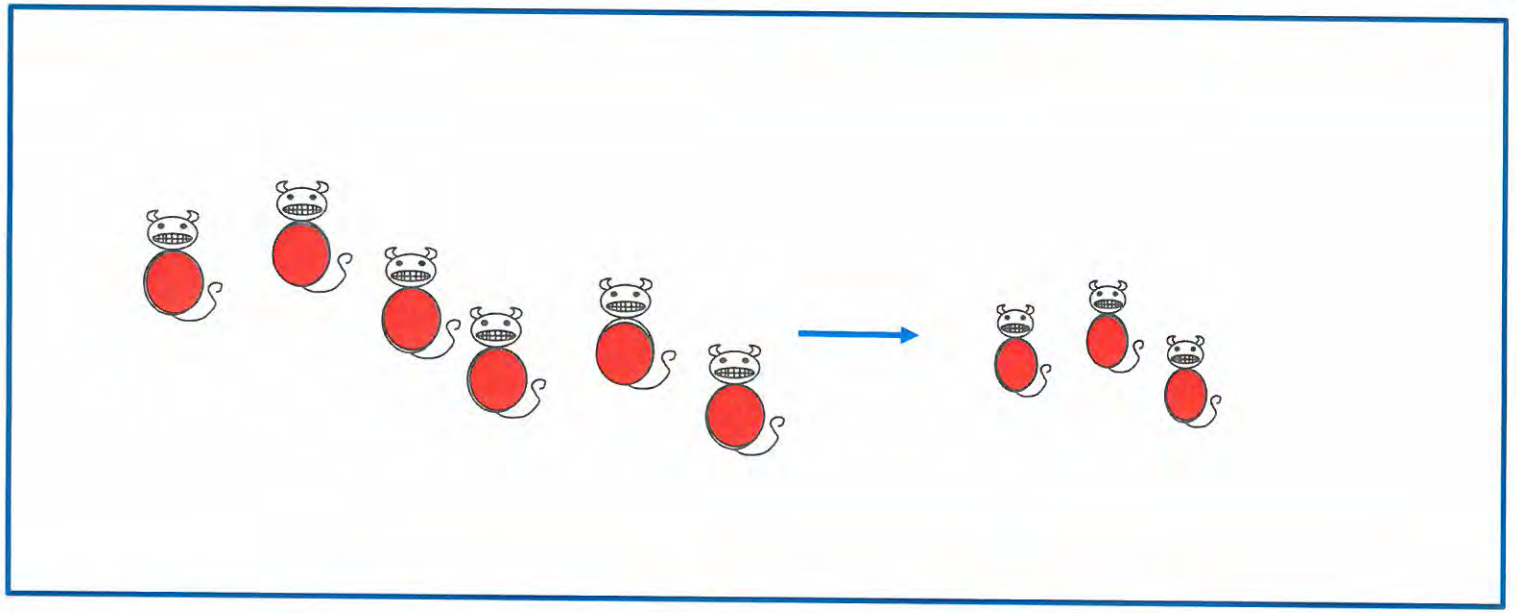
Achtung – Definitionen beachten

- drei unterschiedliche Formen von Resistenz
  - erworbene Resistenz
  - intrinsische Resistenz
  - Adaptation

ECOLAB®

Intrinsische Resistenz

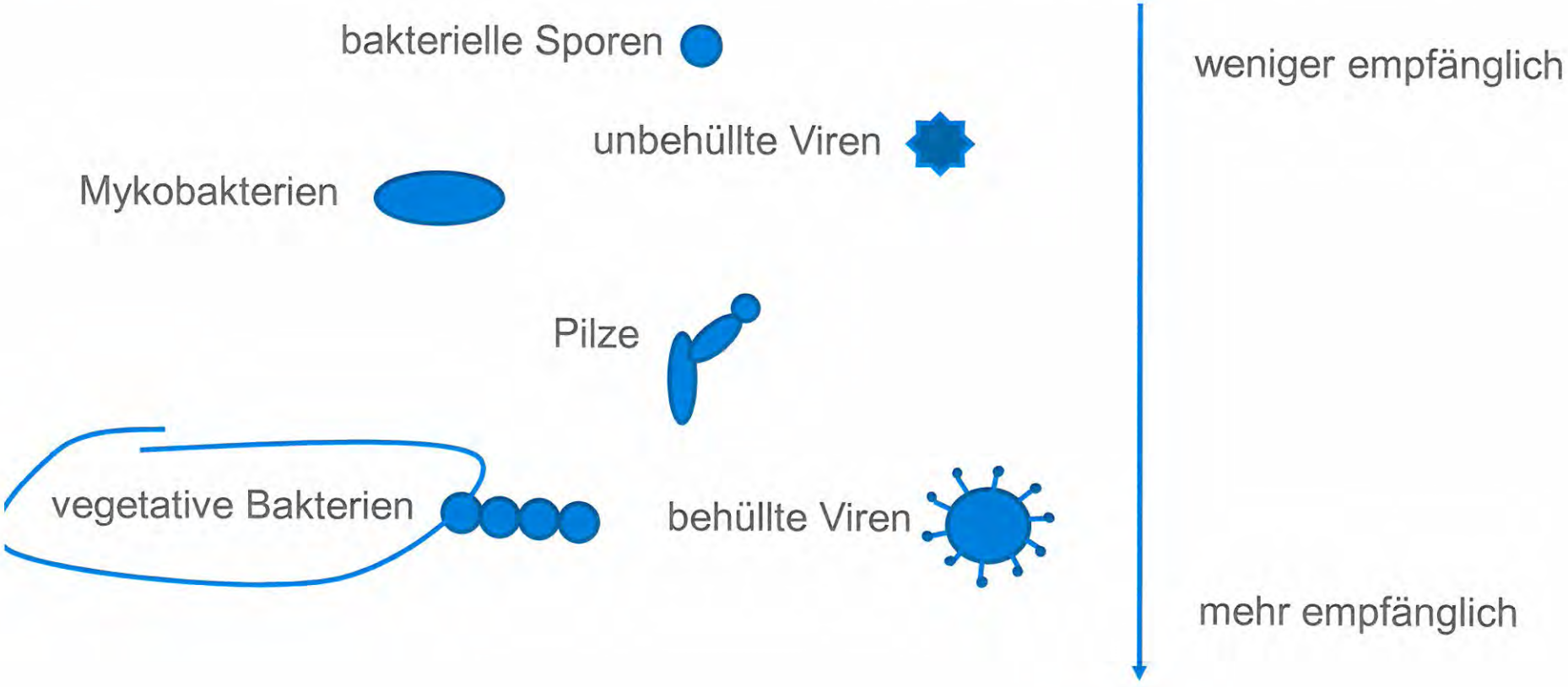
- natürlich vorkommende Eigenschaften einer Gruppe/Species
- wird an Nachkommen weitergegeben vererbbar



ECOLAB®

Intrinsische Resistenz gegenüber Bioziden

- natürliche ‘Resistenz’ einiger Mikroorganismen gegenüber Bioziden



ECOLAB®

Intrinsische Resistenz gegenüber Bioziden

- Gram-negative Bakterien haben eine geringere intrinsische Sensitivität gegenüber einer Reihe von Wirkstoffen im Vergleich zu Gram-positiven [1)]
- **Achtung:** Definition

Testorganismus	Flächendesinfektionsmittel auf Basis von QAV*	Flächendesinfektionsmittel auf Basis einer Wirkstoffkombination, u.a. QAV**
	2%, 60 min, dirty	0,25%, 5 min, dirty
S. aureus	≥ 7,68	≥ 5,17
E. hirae	≥ 7,40	≥ 5,09
P. aeruginosa	≥ 7,64	≥ 5,17

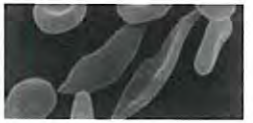
* nach DGHM Methode 9
** nach EN 13727

ECOLAB®

1) E. O. Morente *et al. Int. J. Food Micro*, 2013, 162, 13-25

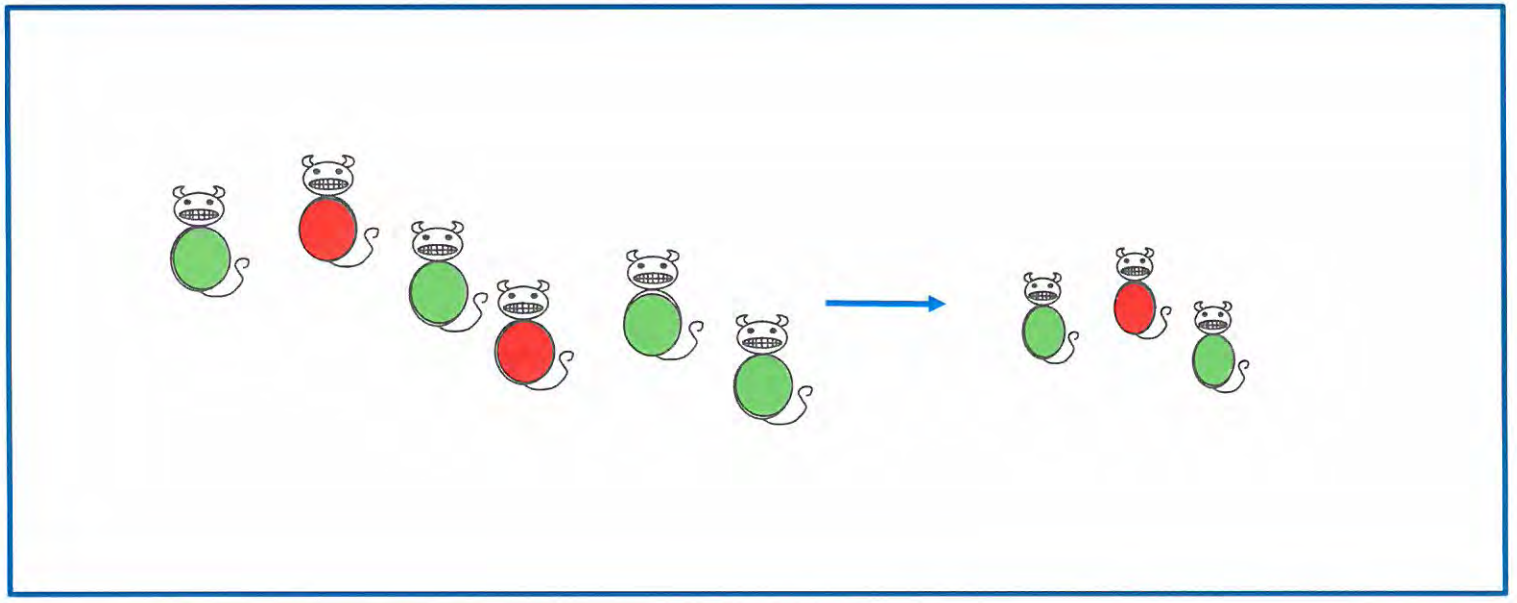
Achtung – Definitionen beachten

- drei unterschiedliche Formen von Resistenz
  - erworbene Resistenz
  - intrinsische Resistenz
  - Adaptation



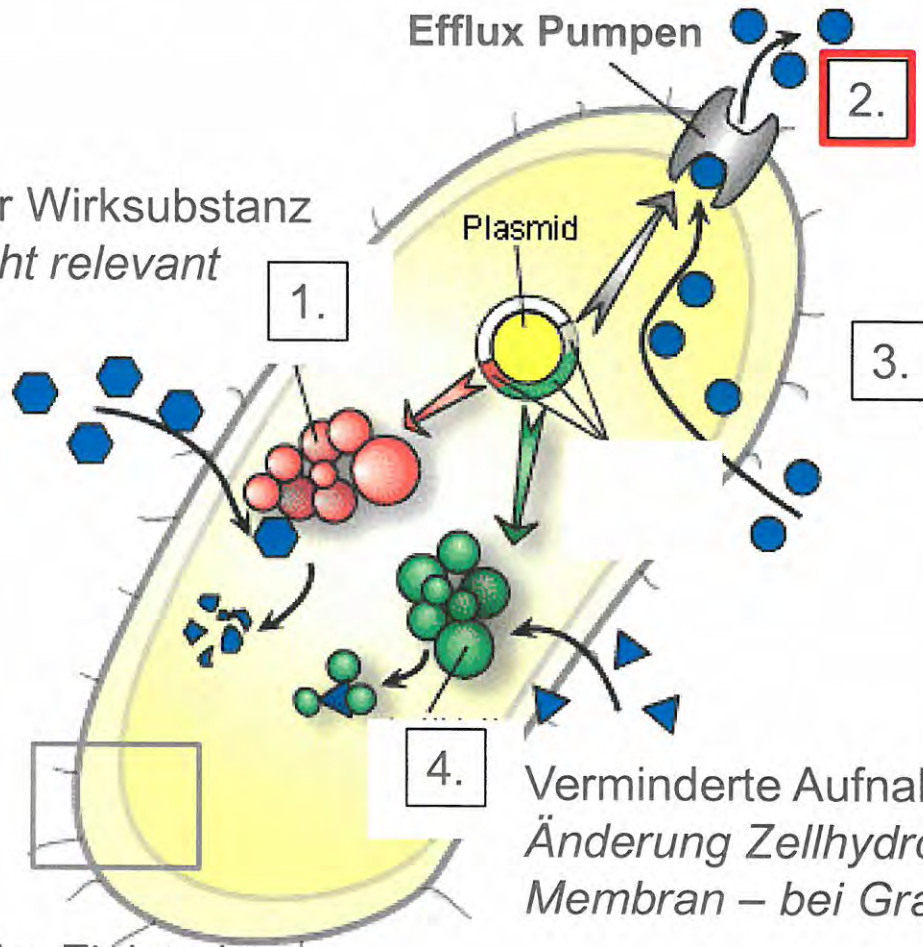
Erworbene Resistenz

- durch spontane Mutation erworben
- durch den Transfer genetischen Materials (Bakterien: Plasmide)



Erworbene Resistenz

- gründsätzlich mögliche Resistenzmechanismen



Abbau der Wirksubstanz
bisher nicht relevant

3. Ausschluss der Substanz aus der Zelle
Adaptation, intrinsisch

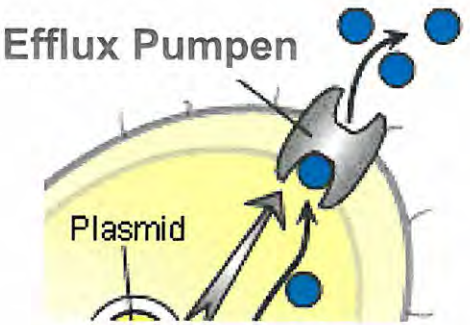
4. Verminderte Aufnahme
Änderung Zellhydrophibizität, äußere Membran – bei Gram-negativen

5. Modifizierung der Zielstruktur –
unspezifisch – selten – E. coli, fabI-Gen

ECOLAB®

1) E. O. Morente *et al. Int. J. Food Micro*, 2013, 162, 13-25

Erworbene Resistenz



- so genannte Qac Proteine = Efflux Pumpen

  nachgewiesener Export von QAV (engl. QAC) [1)]

- bestimmte Pumpen welche Antibiotikaresistenz vermitteln, zeigen Export von QAV [2)]:
  - MepA *(S. aureus)* **- QAV + CHG**
  - NorM *(Neisseria spp.)*, PmpM *(P. aeruginosa)* **- QAV**

- multifaktorieller Prozess
- **Achtung**: Nachweismethode oft auf MHK !!!

ECOLAB®

1) Brown and Skurray, *J. Mol Micro*, 2001, 3, 163-170
2) E. O. Morente *et al. Int. J. Food Micro*, 2013, 162, 13-25
3) Fernandez, Hancock, *Cl. Micro Rev*, 2012, 25/4, 661-81

‘Resistenz’ gegenüber QAV - Export

- **1602** klinische Isolate von *S. aureus* auf Empfinlichkeit gegenüber Benzalkoniumchlorid (QAV) und Chlorhexidin digluconat (Biguanide) [1)]
- **MHK und MBK** lagen zwischen 2-4 mg/l bzw. 8 mg/l
- 39 Isolate zeigten Anwesenheit von Efflux Pumpen, wie Qac-Proteine

- **Schlussfolgerung**:

  qac – Gene führten zu erhöhten MIC-Werten für BAC und CHG

  zeigten keinen Einfluss auf MBK !

ECOLAB®

1) L. Furi *et al.*, *Anti Agents & Chemoth*, *2013*, 57, 3488-97

‘Resistenz’ gegenüber Biguanide

- Führt tägliches Baden in CHG zu einer verminderten Suszeptibilität
- Untersuchung an Patienten mit Katheterinfektionen

TABLE 2. Proportion of Organisms with Reduced Chlorhexidine Gluconate (CHG) Susceptibility in Patients Who Did and Did Not Receive Daily CHG Bathing

	CHG bathing		No CHG bathing		
Organism	No. of isolates tested	No. (%) of isolates with reduced susceptibility[a]	No. of isolates tested	No. of isolates with reduced susceptibility[a]	P^b
Gram positive	16	13 (81)	65	34 (52)	.036
Gram negative	12	11 (92)	29	26 (90)	.843
Total	28	24 (86)	94	60 (64)	.028

[a] Reduced CHG susceptibility was defined as a minimum inhibitory concentration greater than or equal to 4 μg/mL.

[b] The test of 2 proportions was used to compare the proportion of organisms with reduced CHG susceptibilities in patients with and without daily CHG bathing.

- **höchste MHK – Werte** lagen für Gram+,*Enterococcus spp.* bei 16 µg/ml
- **Schlussfolgerung: MHK – Werte** deuten auf verminderte Suszeptibilität durch tägliches Baden in CHG 2%

ECOLAB®

1) N. Suwantarat *et al.*, *Inf. Contr. Hosp. Epi*, *2014*, 35/9, 1183-86

‘Resistenz’ gegenüber QAV

Bacterial resistance to disinfectants containing quaternary ammonium compounds
G. Sundheim, S. Langsrud, E. Heir, A.L. Holck, International Biodeterioration & Biodegradation 41 (1998) 235-239

- **Schlussfolgerung:** ungefähr 13% von 200 isolierten Staphylokokken aus der Norwegischen Lebensmittelindustrie hatten **MHK-Werte** zwischen 4 und 11 mg/l (ppm) Benzalkoniumchlorid …. diese Bakterien wurden als resistent bezeichnet [1)]

- **Beispiel:** Flächendesinfektionsmittel auf BAC-Basis (10% im Konzentrat) nach VAH-Liste Anwendung: 2%, 60 min = 2000 ppm Wirkstoff

ECOLAB®

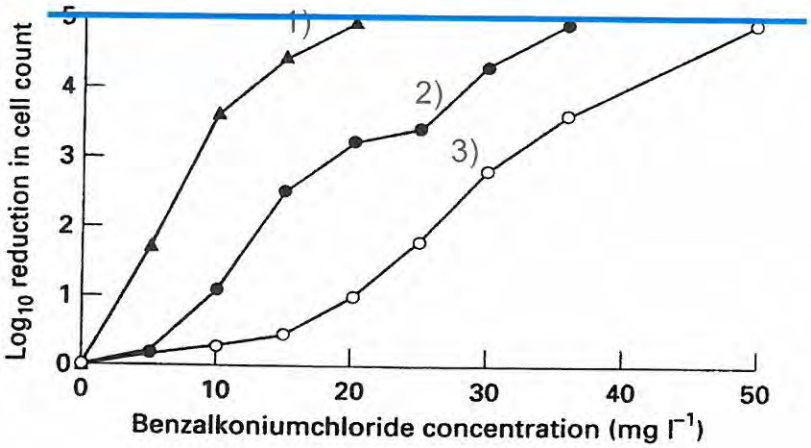
1) G. Sundheim *et al.*, *Int Biodet. & Biodegrad*, 1998, 41, 235-239

‘Resistenz’ gegenüber QAV

Bakterielle „Resistenz“ gegen QAV bedeutet nicht, dass diese Stämme nicht von entsprechenden Konzentrationen abgetötet werden!

Heir et al., J. Appl. Microbiol. 86 (1999) 378-388

- *Staphylococcus aureus*-Stämme in Gegenwart von unterschiedlichen Konzentrationen von Benzalkoniumchlorid[1)]



1 - Wildtyp, RN4220 (neg. K.)
2 - RN4220, *qacG*
3 - *RN4220,* pQG1A

ECOLAB®

1) E. Heir *et al., J. Appl Microbiol.* 1999, 86, 378-388

Gibt es Kreuz-Resistenzen - Biguanid?

- MHK und MBK gegen PHMB von MRSA und MSSA-Stämmen – 2 mg/l [1)]

Activity of antimicrobial agents against meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* ($N = 50$)

Agent	MIC (mg/L) and related susceptibility						MBC (mg/L) and related susceptibility					
	MIC_{50}	MIC_{90}	Range	S	I	R	MBC_{50}	MBC_{90}	Range	S	I	R
Polyhexanide	1	2	0.5–2	50	–	–	1	2	0.5–2	50	–	–
Gentamicin	8	>16	0.25–>16	20	–	30	16	>16	0.25–>16	18	–	32
Erythromycin	16	>16	0.25–>16	15	1	34	>16	>16	4–>16	6	4	40
Doxycycline	4	8	2–>16	–	23	27	16	>16	>16	–	–	50
Levofloxacin	8	>16	0.125–>16	3	–	47	16	>16	0.25–>16	3	–	47
Linezolid	1	4	0.25–4	50	–	–	>32	>32	>32	–	–	50
Vancomycin	1	2	0.5–4	49	–	1	2	>16	0.5–>16	35	–	15

MIC, minimum inhibitory concentration; MBC, minimum bactericidal concentration; MIC_{50}/MIC_{90}, minimum inhibitory concentration reached by 50% or 90% of the strains, respectively; MBC_{50}/MBC_{90}, minimum bactericidal concentration reached by 50% or 90% of the strains, respectively; S, susceptible; I, intermediate; R, resistant.

- signifikant geringer im Vergleich zur Anwendungskonzentration Bsp. zur MRSA Dekolonisierung von 0,1 % (1000 ppm) PHMB
- **Schlussfolgerung: keine antagonistischen Effekt** von PHMB auf die MHK und MBK-Werte der meisten getesteten Antibiotika

ECOLAB®

1) W. Fabry & HJ Kock, *J. Hosp. Infect.* 2013, in press

Gibt es Kreuz-Resistenzen - QAV?

- quant. Suspensionsversuch nach EN 13727, bakterizide Konz. eines Flächendesinfektionsmittels auf Basis, Phenoxyethanol, Amine und QAV [1)]

Anforderung nach EN 13727, 5 Log

Tabelle 2. Log Reduktion der unterschiedlichen Testorganismen bei den geprüften Kontzentrationen und Einwirkzeiten.

Testorganismus	Produktkonzentration	Log Reduktion bei Einwirkzeit 5 min	Log Reduktion bei Einwirkzeit 15 min
Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442	0,1%	<0,74	0,82
	0,25%	>5,11	>5,11
Escherichia coli K12 NCTC 10538	0,1%	4,25	>5,04
	0,25%	>5,04	>5,04
Acinetobacter baumannii OXA 58	0,1%	3,40	>5,04
	0,25%	>5,04	>5,04
Escherichia coli VIM-1	0,1%	<1,09	<1,09
	0,25%	>5,46	>5,46
Enterobacter cloacae VIM-1	0,1%	2,70	>5,49
	0,25%	>5,49	>5,49
Klebsiella pneumoniae KPC-2	0,1%	4,45	>5,03
	0,25%	>5,03	>5,03
Pseudomonas aeruginosa VIM-2	0,1%	3,06	3,49
	0,25%	>5,04	>5,04

Antibiotika-sensitive Teststämme

Antibiotika-resistente Isolate

ECOLAB®

1) F.A. Pitten *et al.*, *Krh-Hyg. + Infekt verh.* 2014, 36/2, 59-62

Gibt es Kreuz-Resistenzen - Biguanide?

- persistierende MRSA-Träger, Dekolonisierung 2001-2008:

  höheres Risiko nach komb. Behandlung Mupirocin & 4% CHG-Bad [1)]

Table 4. Independent Risk Factors Associated With Failure of Decolonization-Multivariate Analysis

Risk factor	Adjusted OR (95% CI)	*P*
Combined mupirocin and chlorhexidine resistance	3.4 (1.5–7.8)	.004
Age (per 1-year increment)	1.04 (1.02–1.1)	.001
Prior hospitalization (previous 2 years)	2.4 (1.1–5.7)	.04
Wound or pressure sore	5.7 (1.8–17.6)	.003
Exposure to MRSA-inactive antibiotic	3.1 (1.3–7.2)	.01
Central venous catheterization	5.7 (1.4–23.9)	.02

NOTE. Only risk factors found to be statistically significant on multivariate analysis are shown. CI, confidence interval; MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; OR, odds ratio.

- **Schlussfolgerung:** erhöhtes Risiko der dauerhaften Kolonisierung beim gleichzeitigen Einsatz von Mupirocin (MHK) & CHG (PCR-Methode auf Anwesenheit von qac-Genen)

ECOLAB®

1) A.S. Lee *et al.*, *CID*, 2011, 52, 1422-30

Zusammenfassung - Studien

- 'Resistenz' ist nicht gleich Resistenz !
- Definitionen und Nachweismethode beachten:

  MHK für Antibiotika

  MBK (EN-Methoden) für Biozide, wenn minimale Konzentration gefordert

  Anwendungskonzentrationen der Biozide liegen deutlich höher

- multifaktorieller Prozess [1)], der durch viele Faktoren beeinflußt wird:

  Biozidanwendung: Anwendungskonz., Biozidformulierung, Kontaktzeit, Wirkmechanismus, …

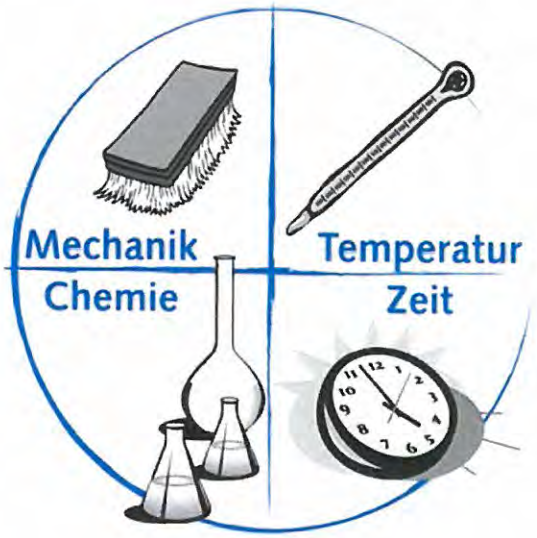
  Mikroorganismus: Fitness, Zellzahl, genetische Konstitution, Set an Exportmechanismen, …

ECOLAB®

1) M.R. Oggioni *et al.*, *Ex. Rev Ant. Infect Ther.*, 2013, 11/4, 363-66

Was ist zu beachten - Biozidanwendung

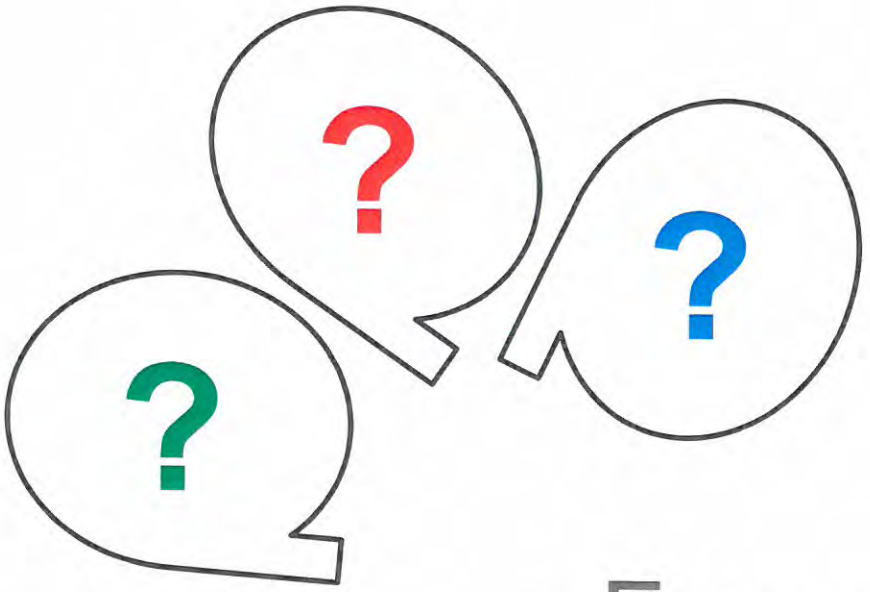
- Nur Desinfektionsmittel verwenden, welche nach anerkannten Standards abgesichert sind (EN, DGHM/VAH, …)
- **Anweisungen auf dem Label beachten**
  - **Wirkspektrum**
    - mit od. ohne Mechanik
    - Prüf/Anwendungstemperatur
    - Einwirkzeiten
    - org. Belastung



- **Unterkonzentrationen vermeiden**, führt zu Adaptatationen !

ECOLAB®

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit !



... Fragen ???

ECOLAB®