

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

Prof. Dr. med. Martin Aepfelbacher

Untersuchungen zur Epidemiologie und zu funktionellen Resistenzmechanismen gramnegativer Bakterien gegenüber Benzalkoniumchlorid und Chlorhexidin

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Tobias Spangenberg
aus Hamburg

Hamburg 2012

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 30.11.2012**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. P.M. Kaulfers

Prüfungsausschuss, zweite/-r Gutachter/-in: Prof. Dr. I. Sobottka

Prüfungsausschuss, dritte/-r Gutachter/-in: Prof. Dr. S. Günther

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	6
Abkürzungen	7
1 Einleitung.....	8
1.1 Chlorhexidingluconat	12
1.2 Benzalkoniumchlorid.....	14
1.3 Gemeinsamkeiten von Chlorhexidingluconat und Benzalkoniumchlorid	15
1.4 Resistenz	15
2 Zielsetzung der Arbeit.....	19
3 Material und Gerätschaften	20
3.1 Bakterielle Isolate	20
3.1.1 Im Screening verwendete Isolate	20
3.1.2 Zur Resistenzinduktion verwendete Isolate.....	20
3.1.3 Für die Inhibitionsversuche / SDS-Gelelektrophorese verwendete Isolate	21
3.2 Nährböden und Nährmedien	21
3.2.1 Agar	21
3.2.2 Müller-Hinton-Bouillon (MHB).....	21
3.3 Chemikalien und Pufferlösungen.....	21
3.3.1 Benzalkoniumchlorid	21
3.3.2 Chlorhexidin	22
3.3.5 E-Teststreifen mit Cefoxitin/Cefuroxim	22
3.3.6 Phenylarginin- β -Naphthylamid	22
3.3.7 1- (1-Naphthylmethyl) -piperazin	23
3.3.3 Proteinbestimmung nach Markwell	23
3.3.4 2-%-SDS-Gelelektrophorese	24
3.4. Gerätschaften	25
4 Methoden.....	26
4.1 Ausstrich/Suspension und Wachstumsbedingungen.....	26
4.1.1 Kultivierung der Proben im Screening.....	26
4.1.2 Kultivierung der Proben zur Resistenzinduktion.....	26
4.1.3 Wachstumskontrolle	27
4.1.4 Stabilitätskontrolle der induzierten Resistenz.....	28
4.1.5 Bestimmung einer Kreuzresistenz zwischen BKC und CHX.....	28
4.1.6 Bestimmung der Stoffwechseleistungen mittels BBL-Enterotube®.....	28
4.1.7 Inhibitionsversuch.....	28
4.2 Charakterisierung der Isolate.....	30
4.2.1 Identifizierung von Stoffwechseleigenschaften	30
4.2.2 Beschreibung von Antibiotikakreuzresistenzen	31
4.3 Lagerung und Erhaltung	31
4.4 Proteinbestimmung nach Markwell.....	31
4.4.1 Präparation der äußeren Membran	31
4.4.2 Einstellen des Proteingehaltes	32
4.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
4.7 MALDI/Tandem-Mass-Spectrometry	34
5 Ergebnisse.....	35
5.1 Screening auf biocidresistente Isolate	35
5.1.1 Screeninguntersuchung auf TSA-Agar.....	35
5.1.2 Screeninguntersuchung auf Iso-Sensitest-Agar.....	36
5.2 Einfluss der Nährmedien auf die Resistenztestung	36
5.2.1 Vergleichende Untersuchung mit BKC.....	36
5.2.2 Vergleichende Untersuchung mit CHX.....	37
5.3 Speciesdifferenzierung der resistenten Isolate	38
5.3.1 Wachstum auf Benzalkoniumchlorid (300 μ g/ml).....	38
5.3.2 Wachstum auf Benzalkoniumchlorid (500 μ g/ml).....	38
5.3.3 Wachstum auf Chlorhexidin (300 μ g/ml)	39

5.4	Resistenzentwicklung in den Jahren 1994-2005	40
5.5	Resistenzinduktion	41
5.5.1	Resistenzinduktion gegenüber Chlorhexidin mit <i>E. coli</i>	41
5.5.2	Resistenzinduktion gegenüber Chlorhexidin mit <i>Enterobacter spp.</i>	41
5.5.3	Resistenzinduktion gegenüber Benzalkoniumchlorid mit <i>E. coli</i>	44
5.5.4	Resistenzinduktion gegenüber Benzalkoniumchlorid mit <i>Enterobacter spp.</i>	46
5.6	Stabilität der Resistenz	48
5.7	Kreuzresistenz gegenüber BKC und CHX	49
5.8	Kreuzresistenz gegenüber Antibiotika/E-Test	51
5.8.1	Antibiotikatestung Benzalkoniumchloridresistenter Isolate	51
5.8.2	Antibiotikatestung chlorhexidinresistenter Isolate	54
5.9	Stoffwechseleigenschaften der resistenten Isolate	55
5.10	Proteinbestimmung	56
5.10.1	Auftrennung der Membranproteine/SDS-PAGE	56
5.10.2	Qualitative Proteinbestimmung	58
5.11	Inhibitionsversuche	63
5.11.1	Resistenzinhibition durch Phenylarginin-beta-Naphthylamid	63
5.11.2	Resistenzinhibition durch 1- (1-naphtylmethyl) -piperazin	63
5.11.3	Inhibition der BKC-Resistenz durch NMP	64
5.11.4	Inhibition der CHX-Resistenz durch NMP	65
6	Diskussion	66
6.1	Anstieg der Rate resistenter Isolate im Screening	66
6.2	Verteilung der resistenten Erreger	68
6.3	Einfluss der Nährmedien	68
6.4	Bakterizide Wirkung von Chlorhexidin auf <i>E. coli</i>	69
6.5	Resistenzinduktion durch serielle Passagen	70
6.5.1	Resistenzinduktion gegenüber Chlorhexidine	70
6.5.2	Resistenzinduktion gegenüber Benzalkoniumchlorid	71
6.5.3	Bedeutung	72
6.6	Stabilität der Resistenz	72
6.7	Biozidkreuzresistenz	73
6.8	Fermentation und Biozidstress	73
6.9	Biozidresistenz als Kofaktor für Antibiotikaresistenz	74
6.10	Inhibition durch Phenylarginin β -Naphthylamid	77
6.11	Inhibition durch 1- (1-methylnaphtyl) -piperazin	78
6.12	Bestimmung der Proteindifferenzen des SDS-Gels	79
6.12.1	Flagellin	79
6.12.2	Maltoporin	80
6.12.3	OMP	80
7	Zusammenfassung	83
8	Anhang	84
9	Literaturverzeichnis	86
10	Danksagung	100
11	Eidstattliche Erklärung	101

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Resistenzinduktion, verwendete Isolate.....	20
Tab. 2 Übersicht der verwendeten Geräte	25
Tab. 3 Pipettierschema Inhibitionsversuch:	29
Tab. 4 Screeninguntersuchung auf TSA-Agar.	35
Tab. 5 Screeninguntersuchung auf Iso-Sensitest-Agar.	36
Tab. 6 Charakterisierung der Species auf 300 µg/ml BKC	38
Tab. 7 Charakterisierung der Species auf 500 µg/ml BKC	39
Tab. 8 Charakterisierung der Species auf 300 µg/ml CHX	39
Tab. 9 Resistenzentwicklung (1994 bis 2005) am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf	40
Tab. 10 Resistenzinduktion <i>Enterobacter spp.</i> / CHX.....	42
Tab. 11 Resistenzinduktion <i>E. coli</i> / BKC.....	44
Tab. 12 Resistenzinduktion <i>Enterobacter spp.</i> / BKC	46
Tab. 13 Resistenzstabilität <i>Enterobacter spp.</i> / CHX.....	48
Tab. 14 Resistenzstabilität <i>Enterobacter spp.</i> / BKC	49
Tab. 15 Resistenzstabilität <i>E. coli</i> / BKC.....	49
Tab. 16 Kreuzresistenz <i>Enterobacter spp.</i> / CHX	50
Tab. 17 Kreuzresistenz <i>Enterobacter spp.</i> / BKC	50
Tab. 18 Kreuzresistenz <i>E. coli</i> / BKC	50
Tab. 19 Antibiotikatestung Benzalkoniumchloridresistenter Isolate	51
Tab. 20 Antibiotikatestung Chlorhexidinresistenter Isolate	54
Tab. 21 BKC-MHK im Vergleich mit und ohne NMP (1280µg/ml)	64
Tab. 22 CHX-MHK Im Vergleich mit und ohne NMP (1280 µg/ml)	65

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Organisation und Funktionsweise von Effluxpumpen gramnegativer Bakterien.	18
Abb. 2: Strukturformel Benzalkoniumchlorid	22
Abb. 3: Strukturformel Chlorhexidin	22
Abb. 4: Strukturformel Phenylarginin- β -Naphthylamididihydrochlorid	22
Abb. 5: Strukturformel 1- (1-Naphthylmethyl) -piperazin.....	23
Abb. 6: Keimzahlbestimmung, Pipettierschema.....	27
Abb. 7: Wachstumskontrolle, Suspensionsschema	27
Abb. 8: Schematische Darstellung der Erregerbestimmung.	30
Abb. 9: RSA-Eichkurve	32
Abb. 10: Vergleichende Untersuchung mit BKC.	37
Abb. 11: Vergleichende Untersuchung mit CHX.....	37
Abb. 12: Resistenzentwicklung (1994 bis 2005) am Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf;	40
Abb. 13: Resistenzinduktion <i>Enterobacter spp.</i> /CHX, Einzeldarstellung	43
Abb. 14: Resistenzinduktion <i>E. coli</i> / BKC, Einzeldarstellung	45
Abb. 15: Resistenzinduktion <i>Enterobacter spp.</i> / BKC, Einzeldarstellungen	47
Abb. 16: E-Test von <i>E. coli</i> 12347 und <i>Enterobacter aerogenes</i> 12807II.....	52
Abb. 17: T-Test	53
Abb. 18 Gelelektrophorese der <i>Enterobacter spp.</i> 12455, 12317 II und 12370.....	56
Abb. 19 Gelelektrophorese der <i>Enterobacter spp.</i> 12290 und 12807II.....	57
Abb. 20 Gelelektrophorese der <i>Enterobacter spp.</i> 12319, 12360, 12459 und 12495.	57
Abb. 21 Proteindifferenzierung <i>E. cloacae</i> 12455.....	58
Abb. 22 Proteindifferenzierung <i>E. cloacae</i> 12317 II.....	59
Abb. 23 Proteindifferenzierung <i>E. aerogenes</i> 12370	60
Abb. 24 Proteindifferenzierung <i>E. aerogenes</i> 12290	61
Abb. 25 Proteindifferenzierung <i>E. cloacae</i> 12495.....	62
Abb. 26: BKC-MHK in Abhängigkeit der NMP-Konzentration	64
Abb. 27: CHX-MHK in Abhängigkeit der NMP-Konzentration.....	65
Abb. 28: Einteilung der Mikroorganismen im Bezug auf ihre Suszeptibilität gegenüber Bioziden	84
Abb. 29: Eintritt von Bioziden in Mikroorganismen, verallgemeinert:.....	85

Abkürzungen

BKC	Benzalkoniumchlorid
CHX	Chlorhexidine
FX	Cefoxitin
GK	Grundkultur
h	hours/Stunden
IM	Inner-Membrane/innere Membran
K	Konzentration
KBE	koloniebildende Einheiten
kDa	Kilodalton
KZB	Keimzahlbestimmung
mA	Milliampere
MHB	Müller-Hinton-Bouillon
MHK	Minimale Hemmkonzentration
ml	Milliliter
n	Anzahl
NMP	1- (1-Naphthylmethyl) -piperazin
OD	optische Dichte
OM	Outer-Membrane/äußere Membran
OMF	Outer-Membran-Faktor (ehemals OMP)
PAßN	Phenylarginin- β -Naphthylamid-hydrochlorid
QAC's	Quarternary-Ammonium-Compounds
R	Range/Reichweite
RSA	Rinder-Serum-Albumin
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TSA	Trypton-Soja-Agar
UKE	Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
ÜN-Kultur	Übernacht-Kultur
UpM	Umdrehungen pro Minute
Vol.	Volumen
Vol.-%	Volumenprozent
XM	Cefuroxim

1 Einleitung

Noch vor weniger als zweihundert Jahren stellte jeder chirurgische Eingriff ein kaum abschätzbares Risiko für eine schwere Infektion dar. Immer wieder kam es nach den Eingriffen zu febrilen Erkrankungen, die häufig mit dem Tode endeten. Allerdings findet sich in frühen Schriftstücken wie der Ilias die Schilderung antiseptischer Behandlungen zur Vermeidung von Wundinfektionen. So existiert aus der Antike die Beschreibung wie Patroklos zur Behandlung von Wunden Kräuter mit reinigender und schmerzlindernder Wirkung verwendete [1]. Vergleichbar berichtete Hippokrates zu seiner Zeit nicht nur über Vorschriften zur Reinigung der Hände mit besonderem Augenmerk auf die Nägel, sondern auch über die Verwendung von alkoholischen Lösungen zur Behandlung von Wunden, um diese vor Fäulnis zu bewahren. Hierdurch bahnte er den Begriff der Apo- (Anti-) Septik [2, 3]. Homer und Hippokrates von Kos verband dabei, dass präzise Kenntnisse über die Übertragungsmodi von Infektionen, geschweige denn über Mikroorganismen und deren Ökologie zu dieser Zeit noch nicht verfügbar waren. Kenntnisse über das Prinzip von Infektiosität jedoch sind schon in der Bibel zu finden (3. Buch Moses, 15, 2-4).

In der Vergangenheit stellten zwei miteinander konkurrierende Konzepte über die Ursache von Krankheiten lange Zeit die gängige Anschauung dar: zum einen die Miasma-Lehre, die üble Dünste und verunreinigte Luft als *causa efficiens* verantwortlich machte, zum anderen die Lehre des *contagium animatum*, die im Mittelalter und später ein vom Körper gebildetes und dann durch Kontakt übertragenes Agens als Ursache von Erkrankungen bezichtigte [4]. Trotz aller im Folgenden erforschten Erkenntnisse benötigten die gezielte praktische Umsetzung und Anerkennung in der wissenschaftlichen Gemeinde Zeit. So starb im Krimkrieg (1853-1856) von den Soldaten, die noch lebend das Feldlazarett erreichten, wahrscheinlich jeder zweite an den Folgen einer Sepsis [5]. Des Weiteren ist davon auszugehen, dass sich in der Ära vor dem Begründer der modernen Antiseptik, dem Arzt Sir Joseph Lister, ein Großteil der Amputationswunden infizierte, was ohne Antibiotika das Todesurteil für die Hälfte der Erkrankten bedeutete [6]. Dies sind heutzutage kaum noch vorstellbare und an geltenden Maßstäben gemessen inakzeptable Statistiken, die gut illustrieren, welchen tragischen Gesetzen die Medizin und insbesondere die Chirurgie in der Vergangenheit unterlagen.

Ignatz Semmelweis (1818-1865) erkannte nach dem Tod des befreundeten Gerichtsmediziners Jakob Koletschka (1803-1847), dass letztendlich die Hände der Ärzte und Studenten verantwortlich für die hohe Infektionsrate mit Kindbettfieber im Wiener Lehrkrankenhaus sein müssten. Diese lag bei bis zu 18 %. Koletschka wurde bei der Durchführung einer Sektion an einer der Patientinnen, die zuvor am Kindbettfieber verstorben war, durch einen Studenten verletzt und erlag kurz darauf einer Sepsis mit einem dem Kindbettfieber ähnlichen Verlauf [7]. Doch auch diese Erkenntnis über einen möglichen Übertragungsweg der Puerpuralsepsis sollte noch immer zu keinem Umdenken in der Medizin führen. Das von Hippokrates und Galen beschriebene und allgemein anerkannte Konzept der schlechten Lüfte als verantwortliche Ursache für Infektionen stellte eine ideologische Festung dar – ein Konzept, dessen Anerkennung sogar in der baulichen Gestaltung von Städten zum Ausdruck kam. So wurde in der Stadtplanung auf ausreichend breite Straßen geachtet, um der Luft genügend Raum zum Austausch zu geben. Passend dazu galt räumliche Nähe zu einem Sumpf oder einer Kaserne als bewiesenes Risiko für eine erhöhte Inzidenz von Krankheiten [4]. Semmelweis führte jedoch seinen Beobachtungen entsprechend eine Händewaschpflicht mit Chlorlösung für seine Assistenten und Studenten ein, wodurch eine Reduktion des Kindbettfiebers von 12 % auf 2 % erreicht wurde [7]. Der ihm vorgesetzte Professor Klein erkannte darin nicht den Grund für die Reduktion der Infektionen [8]. Für ihn lag die Ursache vielmehr in der zeitgleichen Erneuerung des Lüftungssystems und dem nun nicht mehr vorhandenen „üblen Dunst“. Selbst eine Ausweitung der Anwendung der Chlorlösung auf Gerätschaften, worunter es zu einer weiteren Reduktion der Infektionsrate auf ca. 1 % kam, konnte Professor Klein nicht überzeugen.

Semmelweis führte das zu dieser Zeit unpopuläre Prinzip der Asepsis ein, noch bevor dezidierte Kenntnisse von bakteriellen Infektionsmodi bestanden [9]. Im Alter von 47 Jahren und nach einer Intrige verstarb Ignatz Semmelweis am 13. August 1865 in einem Sanatorium [10]. Tragischerweise nur einen Tag zuvor versuchte Sir Joseph Lister ein von ihm entwickeltes neues Verfahren in der Wundbehandlung, welches inhaltlich die Gedanken von Semmelweis weiterentwickelte.

„Nachdem aber durch die Untersuchungen Pasteurs feststeht, dass die zersetzende Wirkung der Luft nicht auf ihrem Gehalt an Sauerstoff oder einem anderen gasförmigen

gen Bestandteil beruht, sondern auf kleinen schwebenden Lebewesen, erkannte ich, dass man die Zersetzung aus verletzten Teilen verhüten kann, [...] indem man bei der Wundversorgung irgendein Mittel anwendet, dass das Leben der in ihr schwebenden Teilchen zu zerstören imstande ist. – Auf diesem Grundsatz habe ich ein Verfahren aufgebaut ...“ [11].

Lister versorgte erstmals eine offene Fraktur mit einem karbolsäurehaltigen Verband. Im Jahre 1867 publizierte er dann seine Entdeckung, möglicherweise ohne von Semmelweis' Arbeiten gewusst zu haben; Infektionen konnten durch die vorherige Anwendung von Karbolsäure (1:40) auf dem gesamten Operationsfeld, den Instrumenten und den Verbänden drastisch reduziert werden. Nach dieser Anwendung von chemischen Agenzien zur Verhinderung von Infektionen im Sinne einer primärpräventiven Maßnahme und dem Beweis, dass sie in der Lage waren, unbelebten Oberflächen ihre gefürchtete Eigenschaft der Übertragung von infektiösen Mikroorganismen zu nehmen oder aber diese zumindest deutlich zu reduzieren, relativierte sich das Risiko chirurgischer Eingriffe. Durch die um sich greifende Implikation der Erkenntnisse von Lister sanken die infektionsbezogenen Mortalitätsraten in den Krankenhäusern von 45 % auf 15 % [12, 13]. Einer der bedeutendsten Grundsteine für die Entwicklung der Medizin, besonders der chirurgischen Disziplinen und invasiven Interventionen, in der Moderne wurde gelegt: die Antiseptik.

Erst viel später, durch die Forschungen von Robert Koch, war man in der Lage einen kausalen Zusammenhang zwischen Infektionen und mikrobakteriellen Erregern als Ursache auch zu beweisen. Entsprechende Vorkehrungen, um epidemische Infektionen zu verhindern, fanden dann mit Max von Pettenkofer und den experimentellen Untersuchungen zur Cholera ihre Anwendung in der Gesellschaft [14]. Doch auch noch heute gilt den unbelebten Flächen, die als ein Reservoir für pathogene Mikroorganismen dienen und damit einen potenziellen Infektionsherd darstellen, ein besonderes Augenmerk [15]. Die logische Konsequenz der erfolgreichen Maßnahmen war es, antiseptische und desinfizierende Substanzen in einer großen Variation und Bandbreite anzuwenden [16]. Aufgrund der tadellosen Ergebnisse im Einsatz mit den Desinfektionsmitteln fanden sie schnell eine weite Verbreitung, die sich nun nicht mehr auf den professionell-medizinischen Sektor beschränkte. So ist ihre Anwendung seit geraumer Zeit nicht mehr auf die Operationssäle und Eingriffsräume der Krankenhäuser und Praxen, für die sie eigentlich vorgesehen waren, limitiert [17].

Neben einer Vielfalt von Haushaltsprodukten und Pflegeartikeln besteht heute auch die Möglichkeit, (Bekleidungs-) Textilien, Kunststoffe und Telefonapparate mit Biozidzusätzen zu erwerben [18]. Dieses erklärt sich durch wirtschaftliche Interessen und die damit einhergehenden beachtlichen Werbemaßnahmen [19].

Bis zum heutigen Tage wurde eine Vielgestalt an möglichen chemischen Verbindungen mit antiseptischen und/oder desinfizierenden Qualitäten entdeckt. Als Desinfektionsmittel werden dabei diejenigen Substanzen bezeichnet, die geeignet sind, unbelebte Oberflächen in einen keimarmen und damit nicht oder kaum infektiösen Zustand zu versetzen. Die Anwendung an Mensch und Tier hingegen ist den Antiseptika vorbehalten. Diese lassen sich z. B. nach Substanzklasse (Alkohole, Aldehyde, Phenole, oberflächenaktive Substanzen etc.), Wirkungsbereich gemäß den Angaben des Robert-Koch-Institutes (A, B, C, D) und Anwendungsgebiet (Instrumenten-, Wäsche-, Flächendesinfektion etc.) [20, 21] unterscheiden. Eine orientierende Übersicht der Suszeptibilität verschiedener Mikroorganismen gegenüber Bioziden stellten Russell et al. 1997 und in leicht geänderter Form auch Maillard im Jahre 2002 auf (Abb. 28).

Mit Ausnahme von Triclosan [22] entfalten Biozide ihre Wirkung im Gegensatz zu Antibiotika nicht an einem einzelnen Target respektive einem bestimmten Biosyntheseprozess, sondern an multiplen Zielen des einzelnen Mikroorganismus. Oftmals ist jedoch nicht bekannt, welche Strukturen ein mögliches Target darstellen [23]. Die Erforschung dieser Prozesse im Einzelnen stellte dabei in der Vergangenheit nicht immer eine beliebte Aufgabe dar [24]. Dabei ist zu beachten, dass häufig erst die Summation oder Kombination unterschiedlicher Einzeleffekte in der Summe zum beobachtbaren letalen Endergebnis führt [25]. Des Weiteren stellt auch die Abhängigkeit des Zielortes der Biozide von deren Konzentration einen fundamentalen und komplizierenden Unterschied zu der Klasse der Antibiotika dar [26].

Vereinfacht führt der Kontakt eines Mikroorganismus mit einem Biozid zunächst zur Adsorption an der Oberfläche. Nachfolgend finden eine Reaktion mit den äußeren Schichten und anschließend die Aufnahme in die Zelle statt. Intrazellulär kommt es dann zu einer weiteren Interaktion mit spezifischen Targets (s. Anhang Abb. 0.2.). Zur Überwindung der äußeren Membran (OM) nach der Adsorption lassen sich, je

nach Eigenschaft des Stoffes, in der Literatur bislang drei verschiedene Aufnahme-
wege in die Zelle unterscheiden:

- die Aufnahme für hydrophile Stoffe mit niedrigem Molekulargewicht über die hydrophile Route per diffusionem,
- eine durch Porine führende hydrophobe Route und
- eine durch Schädigung der OM selbst vermittelte Aufnahme für Stoffe wie z. B. Chlorhexidin [27-29].

Diese Arbeit konzentriert sich im Folgenden auf die zwei Agenzien Chlorhexidin und Benzalkoniumchlorid. Beide gelten als Vertreter der kationenaktiven Substanzen.

1.1 Chlorhexidingluconat

Chlorhexidingluconat zählt chemisch zu der Gruppe der 1965 eingeführten Biguanide, einer Untergruppe aus der Stoffklasse der Amidine. In neutraler wässriger Lösung liegt es zweifach positiv geladen vor, ist spiegelsymmetrisch und enthält zwei Benzolringe. Weitere Handelsformen sind Chlorhexidinacetat und -hydrochlorid. Es ist eine, vornehmlich in der Form des Gluconats, häufig in der Haut- und Händedesinfektion eingesetzte oberflächenaktive Substanz. Neben der klassischen Desinfektion von Oberflächen findet sich eine weitere Anwendungsmöglichkeit für Chlorhexidin auch in der Therapie und Prävention. In der Zahnmedizin wird es zur Therapie der Plaques eingesetzt und ist in Bezug auf die Verhinderung der Plaquebildung anderen Substanzen deutlich überlegen [30, 31]. Auch in der Behandlung der Gingivitis kommt es zum Einsatz [32]. Chlorhexidin ist aufgrund seiner ausgesprochenen Persistenz mit residualer Wirkung nach wiederholter Anwendung das Mittel der Wahl für Bereiche, in denen regelmäßiger Kontakt mit infektiösen Partikeln besteht oder aber über einen prolongierten Zeitraum Handschuhe getragen werden [33]. In der Intensivmedizin konnte gezeigt werden, dass chlorhexidinbeschichtete zentrale Venenzugänge oder Punktionsstellen, die mit chlorhexidinhaltigen Verbänden versorgt werden, zu deutlich weniger Infektionskomplikationen führten. Die aktuelle Leitlinie zur Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Sepsis von 2010 empfiehlt eine orale Anwendung von CHX (0,12-0,2 %) im Rahmen der Prävention von ventilatorassoziierten Pneumonien bei beatmeten Patienten. Zur Prävention von katheterassoziierten Infektionen ist es anderen Antiseptika überlegen [34-36]. Dabei war noch

vor wenigen Jahren die Wirkungsweise von CHX schlecht definiert und deren Erforschung lag keineswegs im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses [37].

Im Folgenden sind bisher bekannte Mechanismen der Wirkung von CHX auf nicht Sporen bildende Bakterien zusammengefasst. CHX zeigt ein konzentrationsabhängiges Wesensmerkmal seiner Wirkung. Es führt in niedrigen Konzentrationen in seiner Eigenschaft als membranaktive Substanz zu einer Lyse der Protoplasten und Sphäroplasten [38]. In höheren Konzentrationen jedoch lassen sich andere Mechanismen erkennen, in denen sich die Wirkung begründet. Kuyyakanond und Quesnel stellten die Hypothese auf, der Kollaps der Membran sei verantwortlich für den bakteriziden Effekt von Chlorhexidin [39] – eine These, die weiter untermauert wird von dem Ergebnis, zu dem Gilbert und Moore kommen [40], für deren Verständnis jedoch der grundlegende Aufbau der Membran imminent wichtig ist: Innerhalb der Membran finden sich Proteinstrukturen,

- die die Membran vollständig überbrücken, sog. integrale Proteine, oder
- die mit der Peripherie einer der Seiten assoziiert sind.

Beide Gruppen vermitteln in unterschiedlichem Ausmaß eine Vielfalt an funktionellen Eigenschaften, wie z. B. Transportprozesse oder Biosynthese. Des Weiteren stellen sie Bestandteile der strukturellen Integrität dar. Mit ihnen assoziiert finden sich divalente Kationen, deren stabilisierende Funktion in der netto negativ geladenen Membran eine weitere strukturelle Komponente bildet. Die ursächliche Wirkung von CHX wird in der Kopplung der membranständigen Phospholipide durch das CHX-Molekül und der konsekutiven Reduktion der Membranfluidität gesehen, wodurch es dann zu einer Freisetzung von divalenten Kationen, wie Ca^{2+} und Mg^{2+} , kommt [41]. Diese Affektion der Membranfluidität und der funktionelle Verlust integraler Bestandteile münden in weiteren Schritten in der Freisetzung von Kalium, Pentosen und periplasmatischen Enzymen. Darunter kommt es ebenfalls zu einer Inhibition der Atmungskette mit einem messbaren Abfall der intrazellulären ATP-Level [40, 42, 43]. Nach dieser Störung der äußeren Membran ist Chlorhexidin in der Lage, die Zelle zu penetrieren. In hohen Konzentrationen wird bereits innerhalb von 20 s eine maximale Aufnahme des Wirkstoffes beobachtet [44]. Intrazellulär kommt es durch Chlorhexidin zu einer Präzipitation und Koagulation von Zytoplasma, Proteinen und Nukleinsäuren [45-47]. Die nach der Adsorption stattfindende Schädigung der äußeren als Permeabilitätsbarriere fungierenden Zellschichten und die damit verbundene akzelebrierte Aufnahme sind als essenzieller Bestandteil des Wirkungsmechanismus zu se-

hen [46]. Er ist jedoch ebenso wie eine messbare Reduktion des Membranpotenzials und der teilweise Verlust der Membranintegrität nicht als alleiniger verantwortlicher Faktor für den Zelltod zu benennen [48]. Angesichts der verschiedenen bekannten Mechanismen, die der Wirkung von Chlorhexidin zugrunde liegen, wird davon ausgegangen, dass erst die Kombination der einzelnen Effekte zu dem letalen Ergebnis führt, dessen biochemischer Ausdruck die Koagulation und Präzipitation des Zytoplasmas sind.

1.2 Benzalkoniumchlorid

Benzalkoniumchlorid ist ein Gemisch von Alkylbenzyltrimethylammoniumchloriden, wobei der jeweilige Alkylteil von verschiedenen Ketten (C8-C18) gebildet wird. In seiner Funktion als Invertseife ist BKC den Surfactants (surface-active agents) zuzuordnen und führt in Lösung unter Schütteln zu Schaumbildung. Benzalkoniumchlorid findet in der Medizin neben der Anwendung als klassisches Antiseptikum auch seinen Einsatz als lokales Kontrazeptivum [49], Prophylaktikum für den Fußpilz und Konservierungsmittel für Salben und Tropfen mit unterschiedlichsten Indikationen. Im Bereich der Ophthalmologie gehört es zu den am häufigsten verwandten Konservierungsmitteln überhaupt. Außerhalb des medizinischen Sektors ist neben Hygieneprodukten für den Haushalt noch die kommerzielle Herstellung von Textilien mit BKC-Zusätzen zu erwähnen.

Der Wirkungsmechanismus beruht auf Adsorption der Verbindung an die auf der Oberfläche der Mikroorganismen exprimierten Phospholipide [50], was zu einer Zerstörung des Aufbaus der Zytoplasmamembran führt und dem Wirkstoff so Zugang zum Zytoplasma ermöglicht. Wesentlich für die Wirkung sind der quartäre Stickstoff und eine oder mehrere lipophile Seitenketten, die mindestens acht Kohlenstoffatome enthalten müssen. Diese sind mit zunehmender Konzentration in der Lage, sich an die sauren Phospholipide der Membran zu adsorbieren und die Fluidität der Membran zu reduzieren, was zur Bildung hydrophiler Lücken in der Membran führt. Unter Ausbildung von Mizellen aus Phospholipiden und Benzalkoniumchlorid kommt es dann zur Lyse der Zelle. [40].

Die hydrophoben Seitenketten sind für eine weitere Wechselwirkung mit den Bakterienoberflächen verantwortlich. Sie können in Membranen penetrieren und diese desintegrieren [51], sodass es ebenfalls zum Austritt von zytosolischem Material kommt. Die kationischen Köpfe können aber auch durch Ladungsneutralisation die

Denaturierung von Proteinen bewirken [52] und so auf die Funktionalität des Mikroorganismus Einfluss nehmen.

1.3 Gemeinsamkeiten von Chlorhexidingluconat und Benzalkoniumchlorid

Zusammenfassend lässt sich für die beiden Biozide Chlorhexidin und Benzalkoniumchlorid feststellen, dass sie trotz ihrer unterschiedlichen Strukturen gleich mehrere bemerkenswerte Gemeinsamkeiten aufweisen. Beide interagieren mit den Phospholipiden der Bakterienmembran und sind in der Lage, den zweiten Schritt in der Wirkungsvermittlung, die Penetration in die Bakterienzelle, durch Schädigung der OM zu beschleunigen und dadurch ihre eigene Wirkung zu potenzieren [53]. Ebenso sind eine variable Reduktion der Membranfluidität durch Interaktion mit ihr und eine Reduktion der eigenen Aktivität in Anwesenheit von organischen Materialien beschrieben. Dies und die Reduktion der Aktivität im sauren Milieu stellen die gemeinsame Schnittmenge dar [54].

1.4 Resistenz

In den letzten Jahrzehnten fanden Desinfektionsmittel auch eine zunehmende Verbreitung in öffentlichen und privaten Bereichen. Oftmals unterstützt durch die Medien [55, 56]. Vor dem Bild der ausgeweiteten Anwendung von Bioziden auch in nicht kritischen Bereichen mehren sich jedoch die Befürchtungen, was das Resistenzverhalten der exponierten Mikroorganismen betrifft [57]. So ist ein unbedarfter Einsatz von potenten Antiseptika und Bioziden nicht unkritisch zu bewerten [58]. Denn in der Vergangenheit zeigte sich bei der Wirksamkeit der Antibiotika zunehmend eine Veränderung, deren oftmals weitreichenden ökonomischen Konsequenzen sich keine Disziplin mehr entziehen kann: die Entwicklung von Resistenzmechanismen [59-62]. Nun liegt die Befürchtung nahe, dass zunehmend auch die Effektivität der Biozide in einen Wettlauf mit den Resistenzmechanismen der Bakterien geraten könnte [38, 63, 64]. Eine Entwicklung, die angesichts der steigenden Kosten im Gesundheitssystem nicht nur für das Individuum weitreichende Konsequenzen mit sich führen könnte [65]. Dabei ist zu beachten, dass insbesondere das gehäufte Auftreten von multiantibiotikaresistenten Problemkeimen im Krankenhaus und die daraus resultierenden eingeschränkten oder schlimmstenfalls sogar nahezu fehlenden antibiotischen The-

rapiermöglichkeiten zu einer Neubesinnung auf die Anwendung von Desinfektionsmitteln und Antiseptika geführt haben. Antiseptika eignen sich zwar im Regelfall nicht für eine systemische Therapie, bei der lokalen Behandlung von Wundinfektionen stellen jedoch einige Substanzen, vor allem quaternäre Ammoniumverbindungen, Guanidine und PVP-Jod, eine attraktive Lösung dar.

Mikroorganismen zeigen eine Vielfalt von möglichen Reaktionen auf die Exposition mit Bioziden. Unter dem entsprechenden Selektionsdruck lassen sich Veränderungen und Anpassungsvorgänge unter den exponierten Isolaten feststellen, aus denen immer häufiger multiresistente Keime hervorgehen. Untersuchungen in der Vergangenheit waren in der Lage, sowohl unspezifische stressinduzierte Vorgänge, wie die reduzierte Synthese von einzelnen Proteinen, wie Flagellin, als auch die vermehrte Expression von Transportproteinen und spezifischen Enzymen zu zeigen [63, 66-68].

Grundlegend wird in der Literatur zwischen Resistenzmechanismen der intrinsischen und erworbenen Art differenziert. Diese werden im Allgemeinen auf vier unterschiedlichen Wegen vermittelt:

- Verhinderung der Aufnahme,
- Veränderung des Targets,
- Efflux und
- enzymatischer Abbau des Agens.

Erst kürzlich wurde eine *Pseudomonas*-Spezies untersucht, welche eine komplexe Variation eines dieser Resistenzmechanismen zeigte. Der untersuchte Stamm war nicht nur in der Lage, das als Biozid eingestufte SDS enzymatisch zu hydrolysieren, sondern dieses auch anschließend anteilig als Nährstoff aufzunehmen. Es fand also eine enzymatische Konversion eines anderweitig schädigenden Stoffes statt, um diesen dann als Substrat für anabole Prozesse zu nutzen [69].

Als intrinsische Resistenzmechanismen werden Vorgänge beschrieben, die in ihrer Grundlage eine natürliche, angeborene Eigenschaft des Mikroorganismus darstellen und es nicht erforderlich machen, zusätzliche genetische Informationen zu erwerben. Ein Beispiel hierfür sind die äußeren Zellhüllen einiger Bakterien, die als Permeabilitätsbarriere gegenüber Antibiotika und Bioziden fungieren. *Pseudomonas aeruginosa* als einer ihrer Vertreter zeigt eine intrinsische Resistenz gegenüber CHX, da u. a. ein

hoher Gehalt an Mg^{2+} in der äußeren Membran die Bindungen zwischen den Lipopolysacchariden stabilisiert und so eine Aufnahme der Biozide respektive Penetration der Membran reduziert. Resistenten Stämmen von *Serratia marcescens*, die nicht die erwartete Kaliumfreisetzung unter CHX-Exposition zeigten, konnte eine gesteigerte Resistenz nachgewiesen werden, die durch eine Änderung der Komposition der inneren Membran erklärt wird [70]. Ebenso wie die Ausbildung eines schützenden Biofilmes einiger Spezies kann dieses dazu führen, dass antibakterielle Substanzen und schädigende Umwelteinflüsse besser toleriert werden [71, 72].

Demgegenüber steht die erworbene Resistenz, der eine Änderung der genetischen Ausstattung des Mikroorganismus zugrunde liegt. Eine übergeordnete Rolle spielen hierbei Plasmide und Transposons als Vermittler und Informationsträger dieser Resistenzen. Sowohl für *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* wie auch für *E. coli* konnte eine plasmidvermittelte Resistenz nachgewiesen werden, bei ersteren gegenüber quaternären Ammoniakverbindungen (QAC`s) und CHX sowie im letzteren Falle gegenüber Formaldehyd [64, 73, 74]. Bezüglich der Resistenz gramnegativer Bakterien gegenüber Bioziden jedoch wird einer plasmidcodierten Resistenz im Vergleich zur intrinsischen bislang nur eine untergeordnete Rolle zugesprochen [75].

Proteinbiochemischfunktioneller Ausdruck der erworbenen genetischen Informationen findet sich in Enzymsystemen (Hydrolasen, Reduktasen), veränderter Membranzusammensetzung und Transportsystemen (Multi-Drug-Effluxproteine, spezifische Transportersysteme). Effluxproteine stellen seit ihrer Entdeckung im Jahre 1980 (Tet-Protein; McMurry et al.) eine heterogene Gruppe von Transportersystemen dar, welche sowohl die erworbene als auch die intrinsische Resistenz zu vermitteln in der Lage sind [76]. Neben der klassischen Resistenz gegenüber antibakteriellen Verbindungen lässt sich ihnen jedoch auch eine Vielfalt an physiologischen Funktionen zuschreiben. Sie sind in der Lage, stoff- oder gruppenspezifisch, aber auch unspezifisch, Stoffwechselabfallprodukte aus dem Organismus zu eliminieren, die Aufnahme von Nährstoffen oder die Zell-Zell-Kommunikation zu vermitteln [77] und exogen zugeführte Schadstoffe wieder aus der Bakterienzelle zu entfernen [78]. Substrate für die Effluxtransporter sind sowohl Antiseptika und Desinfektionsmittel als auch Antibiotika [79], denen insbesondere im Fall von multiresistenten Bakterien ein besonderer Stellenwert zukommt [80].

Eine Unterteilung findet in 5 Gruppen statt, den sog. Familys, innerhalb derer sich noch weitere Untergruppen differenzieren lassen [79]. Diese einzelnen Gruppen sind die

- (ATP) -binding-Cassette (ABC) -Superfamily mit über 40 Systemen [81],
- Major-Facilitator-Family (MFS) mit 17 Untergruppen [82],
- Multidrug- and Toxic-compound-Extrusion [83] -Family [84],
- Small-MDR (SMR) -Family mit zwei verschiedenen Protein-Cluster-Gruppen [85] und
- Resistance-Nodulation-Cell-Division (RND) -Family [86].

Ein singuläres Bakterium ist dabei in der Lage, die ganze Bandbreite dieser Gruppen zu exprimieren. Im Falle von *E. coli* sind das mindestens 37 nachgewiesene Effluxtransporter, wobei 7 dem ABC, 19 MFS, 1 MATE, 5 SMR und 7 dem RND-Typ zuzuordnen sind [87]. Obwohl Effluxtransporter vom RND-Typ auch bei grampositiven Species vorkommen, sind sie doch bei gramnegativen Species häufiger anzutreffen. Typischerweise sind sie in einem Komplex organisiert, wie er auch bei MFS- oder ABC-Transportern zu sehen ist. Dabei bildet der RND-Transporter mit einem Membrane-Fusion-Protein (MFS) als periplasmatischer Komponente und einem Outer-Membrane-Faktor (OMF; ehemals OMP) einen tripartiten Komplex [88] (Abb. 1). Die Energiebereitstellung für den aktiven Transport erfolgt entweder durch die Hydrolyse von ATP oder aber unter Nutzung eines Protonengradienten (protone motion force).

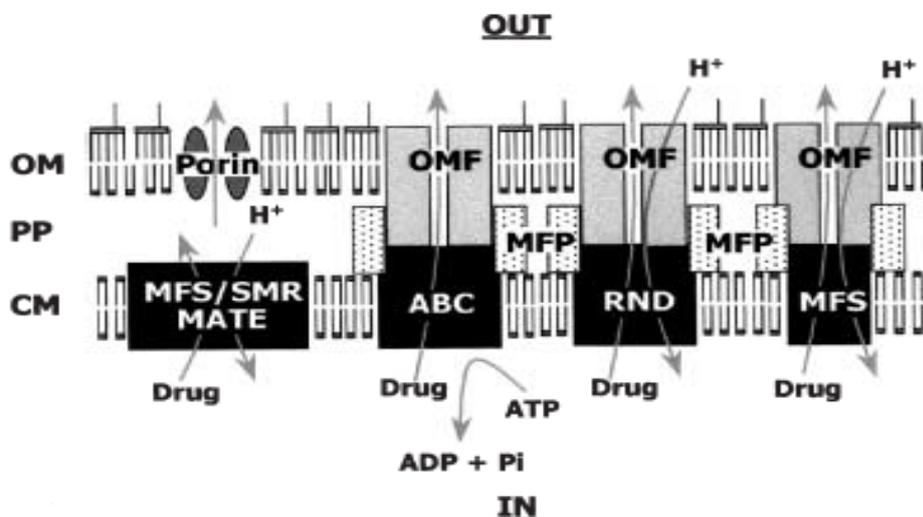


Abb. 1 Organisation und Funktionsweise von Effluxpumpen gramnegativer Bakterien.

OM: Outer-Membrane PP: Periplasmatischer Raum CM: Zytoplasmamembran
Darstellung übernommen von Poole, K. [88]

Obwohl genaue Mechanismen der Biozidresistenz nur unbefriedigend geklärt sind [89], stellte sich durch Untersuchungen an CHX-resistenten Varianten von *Klebsiella pneumoniae* heraus, dass bei diesen ein Gen (*cepA*) für eine kationische Effluxpumpe codiert, welche die in der Untersuchung beobachtete Resistenz vermittelte [90]. Eine anschließende oberflächliche Suche nach Sequenzen, die in anderen Bakterien für vergleichbare Proteine codieren, führte zu Übereinstimmungen von 45-85 % unter gramnegativen pathogenen Bakterien. Ein Effluxmechanismus für CHX als kausaler Faktor einer Resistenz bei gramnegativen Bakterien erscheint also möglich [78].

2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es einen Beitrag zur Erforschung der Epidemiologie und Mechanismen der Biocidresistenz gramnegativer Bakterien zu leisten. Vor dem Bild, dass die Häufigkeit (biozid-)resistenter Erreger in der Vergangenheit zunahm [89], wird zunächst durch eine epidemiologische Untersuchung die lokale Prävalenz Biocidresistenter gramnegativer Erreger im UKE erfasst.

An den aus der Stichprobe gewonnenen Eindruck über die Häufigkeit und das Ausmaß der Problematik, schließt sich im zweiten Teil die provozierte Beobachtung der Entwicklung einer solchen Resistenz und möglichen Kreuzresistenzen gegenüber Antibiotika und den Bioziden selbst an.

Um für die Resistenz verantwortliche Strukturen zu identifizieren, erfolgt der Vergleich von Membranbestandteilen der erzeugten, isogenen, jeweils sensiblen und resistenten Erregervarianten mittels SDS-Gelelektrophorese. Differente Proteinbanden wurden durch das MALDI-Verfahren identifiziert und verglichen.

In der Vorstellung einen Lösungsansatz unter der Annahme einer Beteiligung von Efflux-Proteinen zu erarbeiten, wurden die spezifischen Inhibitoren PAßN und NMP auf die Möglichkeit einer Inhibition der Biozidresistenz untersucht.

3 Material und Gerätschaften

3.1 Bakterielle Isolate

3.1.1 Im Screening verwendete Isolate

Um einen Eindruck über die lokale Prävalenz biocidresistenter Erreger zu erhalten, wurden 1004 konsekutive klinische Isolate aus dem Varialabor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf untersucht. Sie entstammten der Routinediagnostik und wurden als gramnegativ klassifiziert.

3.1.2 Zur Resistenzinduktion verwendete Isolate

Es wurden 20 Isolate aus der Routinediagnostik des Varialabor des Instituts für Mikrobiologie der Universitätsklinik Hamburg verwendet. Jeweils 10 der eingesetzten Proben wurden als *Enterobacter-Species* und 10 als *E. coli* identifiziert. In der nachfolgenden Tabelle sind die Isolate mit Species und Proben-Nr. aufgelistet (Tab. 1).

Proben Nr.	Species	Proben Nr.	Species
12823	<i>E. coli</i>	12370	<i>Enterobacter aerogenes</i>
12822	<i>E. coli</i>	12290	<i>Enterobacter aerogenes</i>
12309	<i>E. coli</i>	12807II	<i>Enterobacter aerogenes</i>
12317	<i>E. coli</i>	12455	<i>Enterobacter cloacae</i>
12359	<i>E. coli</i>	12459	<i>Enterobacter cloacae</i>
12454	<i>E. coli</i>	12495	<i>Enterobacter cloacae</i>
12374	<i>E. coli</i>	12360	<i>Enterobacter cloacae</i>
12347	<i>E. coli</i>	12317II	<i>Enterobacter cloacae</i>
12295	<i>E. coli</i>	12319	<i>Enterobacter cloacae</i>
12296	<i>E. coli</i>	1334	<i>Enterobacter cloacae</i>

Tab. 1 Resistenzinduktion, verwendete Isolate

3.1.3 Für die Inhibitionsversuche / SDS-Gelelektrophorese verwendete Isolate

Proben, deren MHK (Minimale Hemm-Konzentration) für entweder BKC (Benzalkoniumchlorid) und/oder CHX (Chlorhexidingluconat) erfolgreich um ein signifikantes Vielfaches im Abschnitt der Resistenzinduktion angehoben werden konnte, wurden dem Inhibitionsversuch unterzogen und ebenfalls für die Membranpräparation mit anschließender Gelelektrophorese genutzt.

3.2 Nährböden und Nährmedien

3.2.1 Agar

Verwendung fand TSA-, Iso-Sensitest- sowie DST-Agar (Firma SERVA). Die Herstellung fand gemäß den Herstellerangaben statt, gelagert wurden diese bei 3-6 °C.

Vor dem eigentlichen Gießvorgang der TSA- und Iso-Sensitest-Nährbodenplatten wurde der flüssige Agar mit entsprechenden Konzentrationen der Biozide Benzalkoniumchlorid (BKC) oder Chlorhexidin (CHX) versetzt, so dass in den Nährböden Konzentrationen von 100 µg/ml, 300 µg/ml oder 500 µg/ml erreicht wurden.

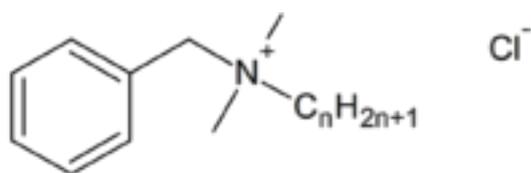
3.2.2 Müller-Hinton-Bouillon (MHB)

Für die Versuche der Resistenzinduktion und Inhibition wurde eine Müller-Hinton-Bouillon (MHB) hergestellt. Nach der Abfüllung in 100-ml-Erlenmeyerkolben erfolgten die Lagerung bei 3-6 °C.

3.3 Chemikalien und Pufferlösungen

3.3.1 Benzalkoniumchlorid

Benzalkoniumchlorid-Research-Grade (SERVA) wurde als Standard-Labor-Lösung gekauft (Abb. 2). Aus dieser Standardlösung wurden Stocklösungen verschiedener Konzentrationen durch Dilution mit Aqua dest. hergestellt.



$n = 8, 10, 12, 14, 16, 18$

Abb. 2: Strukturformel Benzalkoniumchlorid

3.3.2 Chlorhexidin

Das eingesetzte Chlorhexidindigluconat (SERVA) entstammte einem Standard-Labor-Pulver (Abb. 3). Zur Anwendung wurden die Chlorhexidin-Stocklösungen mit Aqua dest. in einer 70%-Volumen-Konzentration mit Äthanol hergestellt. Dieser Vorgang entspricht dem der klinischen Anwendung [91].

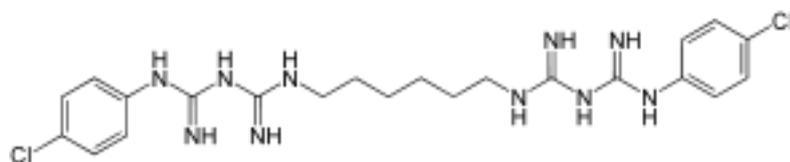


Abb. 3: Strukturformel Chlorhexidin

3.3.5 E-Teststreifen mit Cefoxitin/Cefuroxim

Die Teststreifen wurden als gebrauchsfertige Einheiten in Packungen a 10 Stück kommerziell erworben (AB Biodisk).

3.3.6 Phenylarginin- β -Naphthylamid

Für den Inhibitionsversuch wurde kommerziell erworbenes Phenylarginin- β -Naphthylamid (PA β N) verwendet (Abb. 4).

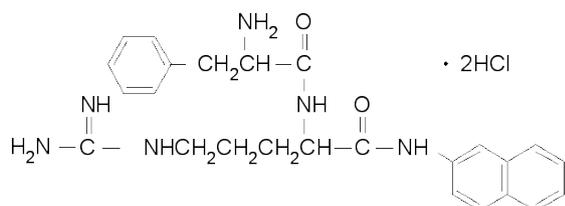


Abb. 4: Strukturformel Phenylarginin- β -Naphthylamididihydrochlorid

3.3.7 1- (1-Naphthylmethyl) -piperazin

Ebenfalls für den Inhibitionsversuch wurde kommerziell erworbenes 1- (1-Naphthylmethyl) -piperazin (NMP) verwendet (Abb. 5).

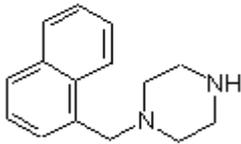


Abb. 5: Strukturformel 1- (1-Naphthylmethyl) -piperazin

3.3.3 Proteinbestimmung nach Markwell

Puffer A

10 mM Tris HCl

5 mM MgCl₂

pH 7,8

Puffer B

5 ml Puffer A

0,2 ml Triton x-100

Lösung A

10 g Na₂CO₃

0,85 g K-Na-Tartat

5 g SDS

50 ml 1N NaOH

mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen

Lösung B

4 g CuSO₄/100 ml Aqua dest.

Lösung C

100 Teile Lsg. A + 1 Teil Lsg. B

(30 ml Lsg. A + 300 µl Lsg. B)

Lösung D

1,5 ml Folius-Cicoalteus-Phenol-Reagenz

+ 1,5 ml Aqua dest.

3.3.4 2%-SDS-Gelelektrophorese

Trenngel

- 3,3 ml H₂O (ad)
- 4 ml Acrylamid 30 % (Firma ROTH)
- 2,5 ml Tris HCL 1,5 M ph 8,8
- 0,1 ml 10 % SDS
- 10 µl Temed 99 % (Firma ROTH)

Sammelgel

- 3,3 ml H₂O (ad)
- 0,91 ml Acrylamid (Firma ROTH)
- 0,57 ml Tris HCL 1 M pH 6,8
- 46 µl 10 % SDS
- 0,1 ml 10 % APS
- 10 µl Temed 99 % (Firma ROTH)
- Probe: Gesamtvolumen 10 µl (5 µl Probe + 5 µl Loading-Buffer)

Lämmli-Puffer

- 0,25 M Tris (121 g/mol)
- 1,92 M Glycin (75,07 g/mol)
- 1 % SDS
- H₂O
- pH 8,3

Färbelösung

- 0,7 g Coomassie-Blau
- 110 ml Methanol
- 110 ml Aqua dest.
- 23 ml Eisessig

Entfärbelösung

- 180 ml Methanol
- 60 ml Eisessig
- 760 ml Aqua dest.

Proteinstandard (Bio-Rad Laboratories Inc./USA)

3.4. Gerätschaften

Brutschrank	Wagner & Munz Laboratoriumsbedarf, München, Deutschland
Cryo-Bank	MAST DIAGNOSTICA, Reinfeld, Deutschland
Gel-Kit	Hoefer
Müller Hinton Broth	Becton Dickinson, Sparks, MD, USA
Halbmikro Einmalküvetten	PLASTIBRAND® 97861, Wertheim, Deutschland
Kühlschrank (4°C / -20°C)	Liebherr
Mikropipetten „Eppendorf research“	Eppendorf
Sicherheitswerkbank „Hera safe“	Kendro, Langenselbend, Deutschland
Pipettierhilfe „Pipetus“	Hirschmann Laborgeräte
Labsonic 1510 Ultraschallgerät	B.Braun
E-Test	AB BIODISK, Solna, Sweden
BBL™ Enterotube™	Becton Dickinson
Wasserbad	GFL®
Polyacrylamidgelelektrophoresekammer	Bio Rad, München, Deutschland
Ultrazentrifuge	Beckmann Model J2-21
Zentrifugen-Bottles	Beckman Coulter Bottles Litpack 361681 IN-192B

Tab. 2 Übersicht der verwendeten Geräte

4 Methoden

4.1 Ausstrich/Suspension und Wachstumsbedingungen

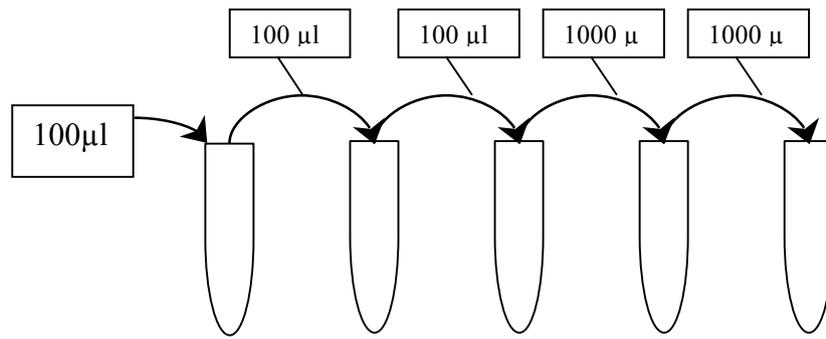
4.1.1 Kultivierung der Proben im Screening

Die Kulturen wurden mittels Tupfer auf TSA- und Iso-Sensitest-Selektivmedien mit Biocidzusatz in den Konzentrationsstufen 100 µg/ml, 300 µg/ml und 500 µg/ml ausgestrichen. Da die verwendeten Kulturen der Routinediagnostik entstammten und eine Einstellung der Konzentrationen in diesem Rahmen auf die für Resistenztestung üblichen 10^6 KBE/ml stattgefunden hatte, konnte von einer vergleichbaren Konzentration an KBE ausgegangen werden. Anschließend wurden die mit den Proben inokulierten Agar-Platten inkubiert und auf Wachstum überprüft.

4.1.2 Kultivierung der Proben zur Resistenzinduktion

Zur Induktion einer Resistenz wurden 10 *E. coli*- und 10 *Enterobacter spp.*-Isolate aus der Routinediagnostik in MHB mit aufsteigenden Konzentrationen von CHX oder BKC inkubiert. Die Biozidkonzentrationen betragen dabei 0, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 und 1280 µg/ml. Eine „Passage“ stellte jeweils den Arbeitsschritt aus Inokulation, Inkubation und Kontrolle durch Ausstrich und Bebrütung auf TSA dar. Eine vergleichbaren Anzahl von Kolonie bildenden Einheiten (KBE) /ml wurden durch Verdünnen mit NaCl 0,9 % auf 10^6 KBE/ml und konsekutives Photometrieren ($\lambda = 500$ nm / optische Dichte 0.100-0.145) erzeugt.

Begleitend wurde eine Keimzahlbestimmung (KZB) durchgeführt. Eine ÜN wurde nach dem Verdünnungsschema (Abb. 6) dilutiert. 100 µl der letzten drei Verdünnungen wurden im Folgenden auf je drei TSA-Agar-Platten ausgespatelt, zusätzlich dazu weitere drei mit 10 µl der letzten Verdünnung. Durch Division der Zahl der Kolonien durch den Verdünnungsfaktor und das in die Schale pipettierte Volumen (in ml) erhält man die Anzahl der Kolonien bildenden Einheiten.



Vorlage Vol. NaCl 0,9 %:	10	10	10	9	9
Verdünnung:	10^2	10^4	10^6	10^7	10^8

Abb. 6: Keimzahlbestimmung, Pipettierschema

4.1.3 Wachstumskontrolle

50 µl der auf 10^6 KBE/ml verdünnten ÜN-Kultur-Ausgangslösung wurden in jeweils 10 ml MHB mit Benzalkoniumchlorid (BKC) oder Chlorhexidin (CHX) gebracht und über Nacht inkubiert. Die Konzentrationsstufen verdoppelten sich dabei mit einem Ausgangswert von 5 µg/ml. Die Wachstumskontrolle erfolgte durch Spatelausstrich auf TSA-Agar. Nach Auswertung der inkubierten TSA-Agar-Platten erfolgte eine weitere Verwendung der Proben in der höchsten Konzentrationsstufe, die noch Wachstum auf den TSA-Agar-Platten zeigte (Abb. 7).

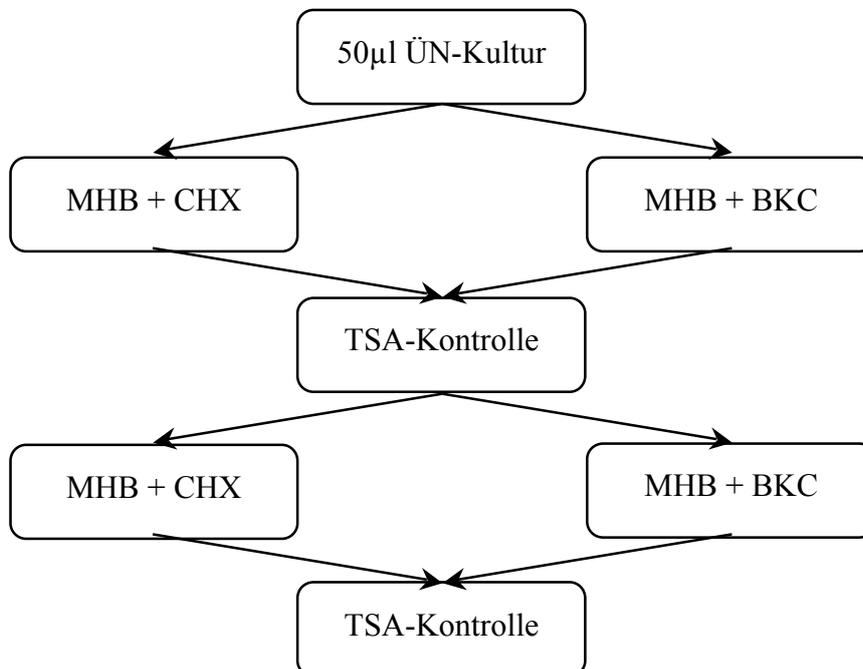


Abb. 7: Wachstumskontrolle, Suspensionsschema

4.1.4 Stabilitätskontrolle der induzierten Resistenz

Eine Stabilitätskontrolle der Resistenz erfolgte um zu klären, ob diese auch ohne permanenten Biocidstress fortbesteht. Dazu wurden 100 µl der hochgeschaukelten Kulturen in 10 ml MHB ohne Biozidzusatz inkubiert. Dieser Vorgang wiederholte sich mit entsprechender Inkubation, für insgesamt zehn Passagen. Im Anschluss wurde erneut die MHK für CHX und BKC bestimmt.

4.1.5 Bestimmung einer Kreuzresistenz zwischen BKC und CHX

Durch eine weitere MHK-Bestimmung im Anschluss an die Resistenzinduktion sollte geklärt werden, ob die Resistenz gegenüber einem der gewählten Biozide auch eine Resistenz gegenüber dem anderen vermittelt. Hierbei wurde sich der gleichen Methode wie auch schon zu Beginn der Resistenzinduktion bedient. Nährmedium war MHB, die Wachstumskontrolle erfolgte auf TSA-Agar.

4.1.6 Bestimmung der Stoffwechselleistungen mittels BBL-Enterotube®

Um mögliche Veränderungen einer Auswahl qualitativer Stoffwechselleistungen zu erfassen, erfolgte eine Objektivierung mittels Enterotube™-Test. Dabei wurde von verschiedenen Proben aus einer frischen Übernacht-Kultur eine TSA-Agar-Kultur per Spatelausstrich angefertigt, von der dann ein Enterotube® angefertigt wurde.

4.1.7 Inhibitionsversuch

Nachdem durch die vorliegende Arbeit gezeigt werden konnte, dass Biocidresistenzen sowohl zunehmen als auch unter Versuchsbedingungen erzeugbar sind, stellte sich die Frage nach einer möglichen Intervention. Im Rahmen der Annahme einer Beteiligung von Effluxproteinen wurden unterschiedliche Inhibitoren auf Ihre Wirksamkeit überprüft. Sowohl Phenylarginin-β-Naphtylamid als auch 1- (1-Naphthylmethyl) -piperazin wurden auf eine Inhibitionswirkung überprüft. Diese Überprüfung erfolgte durch Inkubation der Proben nach Resistenzinduktion mit einem der Inhibitoren und CHX oder BKC. Um eine Aussage über die Inhibitionswirkung zu treffen, wurde eine zweite parallele Versuchsreihe angesetzt, in der die induzierten Proben und MHB mit aufsteigenden Konzentrationen von entweder CHX oder BKC ohne den Zusatz von einem der Inhibitoren inkubiert wurden. Die Konzentrationen von CHX und BKC wurden aufsteigend verdoppelt mit einer minimalen Konzentration von 5 µg/ml und einer maximalen Konzentration von 640 µg/ml für

BKC und 1280 µg/ml für CHX. Um die Möglichkeit einer intrinsischen bakteriziden Wirkung der Inhibitoren zu überprüfen und auszuschließen, fand des Weiteren eine Inkubation der hochgeschaukelten Proben in einer dritten Gruppe statt. In dieser wurden die Proben in MHB nur mit aufsteigenden Inhibitorkonzentrationen ohne Bio-cid-Zusatz kultiviert.

Die auf eine mögliche Inhibitorwirkung getesteten Proben wurden zunächst durch Verdünnung mit NaCl 0,9 % auf eine OD von McFarland 0,5 entsprechend λ 500 nm 0.125 ± 0.02 eingestellt. Um einen Übergang von der stationären Phase der Bakteriensuspension in die Wachstumsphase zu ermöglichen, fand eine Inkubation bei 36 ± 1 °C im Brutschrank für 120 Minuten statt. Im Anschluss wurden die Isolate mit MHB 1:100 verdünnt. Die Mikrotiterplatten wurden mit jeweils 100 µl Gesamtvolumen befüllt. Das Gesamtvolumen setzte sich dabei aus MHB mit Zusatz von CHX bzw. BKC, Inhibitor und Bakteriensuspension (Gruppe 1) oder MHB mit Zusatz von CHX bzw. BKC und Bakteriensuspension ohne Inhibitor (Gruppe 2) zusammen (Tab. 3). Die befüllten Mikrotiterplatten wurden vor der Auswertung mit Parafilm abgedeckt und verschlossen bei 36 ± 1 °C für 24 h inkubiert.

		A	B	C	D	E	F	G	H	Vol.
1	Bakt. Susp.	Probe 1	Probe 1	Probe 1	25µl					
	MHB. + CHX od. BKC	0µg/ml	10µg/ml	20µg/ml	40µg/ml	80µg/ml	160µg/ml	320µg/ml	640µg/ml	50µl
	Inhibitor	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	25µl
2	Bakt. Susp.	Probe 1	Probe 1	Probe 1	50µl					
	MHB. + CHX od. BKC	0µg/ml	10µg/ml	20µg/ml	40µg/ml	80µg/ml	160µg/ml	320µg/ml	640µg/ml	50µl
	Inhibitor	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	0µl

Tab. 3 Pipettierschema Inhibitionsversuch:

In Gruppe 1 wurde die Bakteriensuspension in MHB mit CHX bzw. BKC und Inhibitor kultiviert, in Gruppe 2 wurde die Bakteriensuspension in MHB mit CHX bzw. BKC ohne Inhibitor kultiviert.

4.2 Charakterisierung der Isolate

4.2.1 Identifizierung von Stoffwechseleigenschaften

Die Charakterisierung der Isolate erfolgte durch verschiedene Testverfahren, welche Stoffwechselleistungen der Bakterien verifizieren. Verwendung fanden dabei der Cytochromoxidase-Test, Enterotube™, API 20E™ (BioMÉRIEUX®sa, Frankreich, RCS Lyon) und API 20NE (BioMÉRIEUX®sa, Frankreich, RCS Lyon). Ließ sich durch die erwähnten Verfahren keine klare Identifizierung vornehmen, wurde der automatisierte Vitek2-Test von bioMérieux angewendet. Nachfolgend ist eine schematisierte Darstellung der durchgeführten Differenzierungsdiagnostik zur Charakterisierung der verwendeten Erreger exklusive Vitek2-Test abgebildet (Abb. 8).

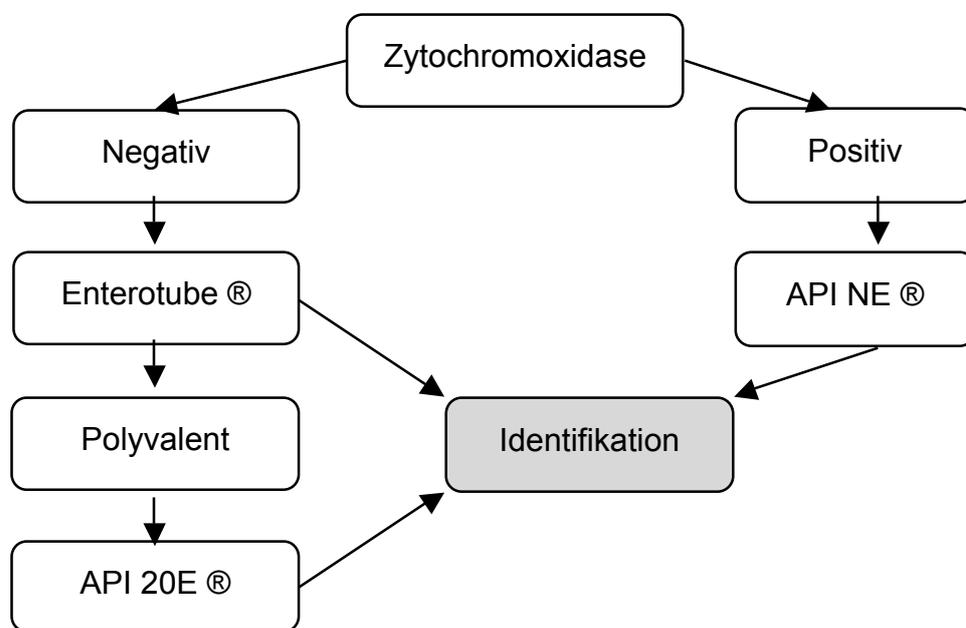


Abb. 8: Schematische Darstellung der Erregerbestimmung.

Diese erfolgte je nach Ergebnis der Zytochromoxidase durch API NE® oder Enterotube® bzw. API 20E®. Bei Bedarf erfolgte eine endgültige Differenzierung mittels Vitek2-Test.

4.2.2 Beschreibung von Antibiotikakreuzresistenzen

Um mögliche Kreuzresistenzen gegenüber ausgewählten Antibiotika zu überprüfen, wurden mit den in der Resistenzinduktion verwendeten Proben E-Tests für Cefoxitin und Cefuroxim durchgeführt. Zunächst erfolgte die Einstellung auf MC Farland 0.5 mit 0,9 % NaCl-Lösung in sterilen Reagenzröhrchen und einem Gesamtvolumen von 10 ml. Jeweils 200 µl der Bakterienlösung konnten nun per Spatelausstrich auf DST-Platten (Oxoid Deutschland GmbH) aufgebracht werden. Um eine oberflächliche Flüssigkeitsansammlung zu verhindern, wurden alle Platten für 10 Minuten bei locker aufgelegtem Deckel inkubiert. Vor dem erneuten Inkubieren bei 36 ± 1 °C für 24 Stunden wurde ein E-Teststreifen der entsprechenden Antibiotika (AB-BIODISK, Solna, Sweden) zentral auf die Agar-Oberfläche der Platten aufgebracht.

4.3 Lagerung und Erhaltung

Isolate, die bei Konzentrationen von 300 µg/ml oder 500 µg/ml der verwendeten Biozide Wachstum auf TSA- oder Iso-Sensitest-Agar-Platten zeigten, wurden mit dem Cryobank™-System (MAST DIAGNOSTICA, Reinfeld) bei -20 °C gelagert. Des Weiteren fand eine simultane Lagerung der bakteriellen Isolate auf TSA-Agar-Nährbodenplatten und in sterilen Röhrchen mit 10 ml MHB statt.

4.4 Proteinbestimmung nach Markwell

4.4.1 Präparation der äußeren Membran

Im Vorfeld der SDS-Gelelektrophorese wurde eine Bestimmung des Proteingehaltes der Proben vorgenommen. Die erfolgreich hochgeschaukelten Proben wurden dabei in einer Übernacht-Kultur in 100 ml MHB inkubiert (36 ± 1 °C für 24 h). Im Anschluss wurden diese für 15 Minuten in Beckmann-Bottles bei 6.000 UpM zentrifugiert (Beckman Zentrifuge, JA-14). Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet in 10 ml Puffer A resuspendiert und in ein 50-ml-Falcon-Röhrchen umgefüllt. Jede Probe wurde bei 160 W mit Ultraschall für 4 x 30 Sekunden im Wechsel mit 30 Sekunden Pause beschallt. Dabei erfolgte eine ständige Kühlung der Proben durch Eis. Die Säuberung des verwendeten Ultraschallkopfes zwischen den Proben erfolgte mit 70 Vol.-% Äthanol, eine Einwirkdauer von einer Minute wurde dabei streng beachtet. Der nächste Schritt bestand aus einem erneuten Zentrifugieren der Proben bei

6.000 UpM für 13 Min. Der anfallende Überstand wurde abpipettiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren, sofern nicht am selben Tag eine weitere Verwendung stattfand. Im nächsten Arbeitsschritt wurde der Überstand bei 20.000 UpM für 60 Minuten zentrifugiert, das dabei entstandene Pellet nach Dekantieren des Überstandes in 2 ml Puffer A suspendiert und 2 ml Puffer B hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur konnte dann die äußere Membran abzentrifugiert werden. Dies geschah für 60 Minuten bei 20.000 UpM. Das erhaltene Sediment wurde dann in 1 ml Aqua dest. aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

4.4.2 Einstellen des Proteingehaltes

Um in der Lage sein zu können, eine Aussage über möglicherweise stattgefundenen Veränderungen des quantitativen Proteingehaltes der äußeren Membran zu treffen, erfolgte eine quantitative Bestimmung des Proteingehaltes der untersuchten Proben mit der Methode nach Markwell [92, 93]. Unter Verwendung von bovinem Serumalbumin wurde dafür eine Eichkurve als Referenzgerade erstellt (Abb. 9) und für die weiteren Versuche der Proteingehalt der Proben photometrisch auf eine vergleichbare Menge eingestellt.

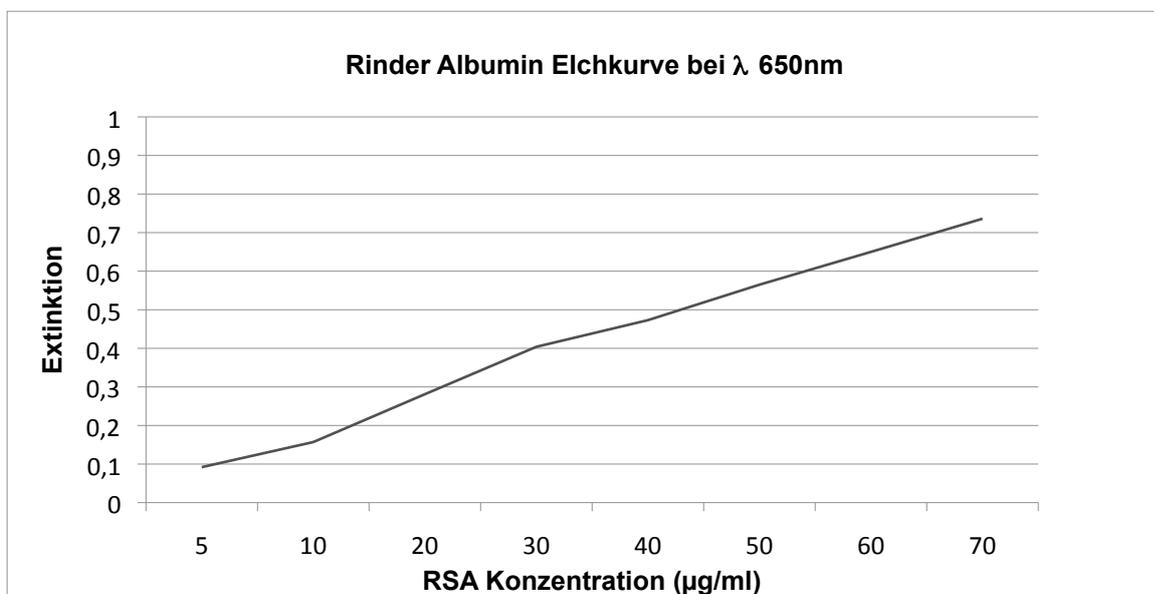


Abb. 9: RSA-Eichkurve

4.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Durch die Anwendung einer Gelelektrophorese können, nachdem durch SDS eine Maskierung der Eigenladung der Proteine erfolgt ist, diese entsprechend ihrer Größe (kDa) im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Um eine Aussage über die Größen der aufgetrennten Fraktionen zu treffen, ist ein definierter Proteinmarker (Precision plus Kaleidoscope™) als Referenz verwendet worden.

Im Vorfeld der Gelelektrophorese wurden die entsprechenden Lösungen und Puffer nach Vorgaben der in der Abteilung etablierten Methode nach Markwell et al. [92, 93] hergestellt und angesetzt. Sobald im letzten Arbeitsschritt zum Ansetzen der Lösungen das Temed dem Trenngel hinzugefügt wurde, musste dieses mit einer 1000- μ l-Pipettenspitze sofort in die vorbereitete Gelkammer eingebracht werden. Unter Beachtung eines erforderlichen Abstandes zur Oberkante zum Einbringen des Sammelgels und zum Kamm wurde die Gelkammer möglichst gleichmäßig gefüllt, anschließend mit saturiertem n-Butanol abgedichtet und der durch das Temed initiierte Polymerisierungsprozess für 40 Min. abgewartet. Nach Abgießen des n-Butanols erfolgten mehrfaches Auswaschen von losen Gelrückständen mit Aqua dest. und anschließendes Trocknen mit einem Papierstreifen. Direkt nach Befüllen der Gelkammer mit dem Sammelgel wurde der Kamm eingebracht und erneut mit n-Butanol überschichtet. Nachdem auch das Sammelgels auspolymerisiert war, wurde der Kamm wieder entfernt und die erzeugten Aussparungen nach Auswaschen mit Aqua dest. wurden mit Lämmli-Puffer geflutet. Die untersuchten Proben wurden daraufhin in der vorher berechneten äquivalenten Masse in einem Gesamtvolumen von 15 μ l mit Loading-Buffer bei 100 °C für 5 Minuten gekocht. Nun erfolgte der Aufbau der Gelkammer. In jeden Slot wurden anschließend 15 μ l Gesamtprobenansatz bzw. Proteinstandard eingefüllt. Um eine höhere Präzision bei der Auftrennung der Banden zu erlangen, wurden innerhalb des Sammelgels 15 mA, im Trenngel 35 mA verwendet. Eine Kühlung fand mittels LKB-Multitemp. statt. Sobald die Proteinbanden den Unterrand des Gels nach 2 h erreichten, wurde das Sammelgel mit dem Skalpell abgetrennt und das Trenngel für mindestens 20 Minuten unter Bewegung auf dem Rüttler in die Färbelösung eingelegt. Anschließend wurden Residuen der Färbelösung über Nacht in der Entfärbelösung ausgewaschen.

4.7 MALDI/Tandem-Mass-Spectrometry

Proben, die nach Exposition (CHX/BKC) gegenüber der isogenen, biocidsensiblen Ausgangskultur auffällige Differenzen in dem Muster der Proteinbanden aufwiesen, wurden gesondert untersucht. Die diskrepanten Banden wurden mittels Skalpell scharf aus dem Gel herausgetrennt und anschließend einer Proteindifferenzierung durch matrixassistierte Laser-Desorption-Ionisation (MALDI) und Tandem-Mass-Spectrometry zugeführt. Diese wurde gesondert als Auftragsarbeit durch das Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

5 Ergebnisse

5.1 Screening auf biocidresistente Isolate

Um einen Eindruck über die Prävalenz biocidresistenter Isolate zu gewinnen erfolgte ein Screening. Insgesamt wurden 1004 Isolate gramnegativer Spezies aus dem Jahr 2005 gescreent. Eine Unterteilung erfolgte nach den benutzten Nährboden (TSA-/Iso-Sensitest-Agar) und nach den verwendeten Bioziden (BKC/CHX).

5.1.1 Screeninguntersuchung auf TSA-Agar

Durch die Screeninguntersuchung auf TSA-Agar lassen sich zwei relevante Ergebnisse beobachten. Zum einen sinkt bei beiden Biociden die relative Häufigkeit resistenter Erreger mit zunehmender Biocidkonzentration, zum anderen sehen wir ein deutliches Übergewicht BKC-resistenter Erreger. Während bei einer Konzentration von 500µg/ml CHX kein Wachstum mehr festgestellt werden konnte, tolerierten 4,8% der Erreger die gleiche Konzentration von BKC auf TSA-Agar. Auch bei Biocidkonzentrationen von 300µg/ml besteht mit 4,8% zu 0,8% ein starkes Übergewicht BKC-resistenter Erreger auf TSA-Agar. Nachfolgend ist die relative Häufigkeit des Wachstums auf TSA-Agar, bemessen an der Anzahl der insgesamt aufgetragenen Proben, unterteilt nach Biocid (BKC/CHX) und erreichtem MHK-Wert dargestellt (Tab. 4).

Wirkstoff	MHK-Wert	Rel. Häufigkeit (n=1004)
Benzalkoniumchlorid	≥300 µg/ml	12.3 %
	≥500 µg/ml	4.8 %
Chlorhexidin	≥ 300 µg/ml	.8%
	≥ 500 µg/ml	.09 %

Tab. 4 Screeninguntersuchung auf TSA-Agar.

Dargestellt ist die relative Häufigkeit gewachsener Isolate unterteilt nach Biocid (CHX bzw. BKC) und Biocidkonzentration (300 µg/ml bzw. 500 µg/ml)

5.1.2 Screeninguntersuchung auf Iso-Sensitest-Agar

Analog zu den Ergebnissen mit TSA-Agar nimmt auch in der Screeninguntersuchung auf Iso-Sensitest-Agar die Anzahl resistenter Erreger mit steigender Biocidkonzentration ab. Im Vergleich zu TSA-Agar sehen wir zusätzlich eine insgesamt in etwa um den Faktor 4 kleinere Anzahl BKC-resistenter Erreger. Ferner ließ sich auch auf Iso-Sensitest-Agar keine relevante Anzahl CHX-resistenter Erreger finden. Bereits bei Konzentrationen von 300 µg/ml CHX zeigte sich kein Erregerwachstum mehr. Nachfolgend ist die relative Häufigkeit des Wachstums auf Iso-Sensitest-Agar, bemessen an der Anzahl der insgesamt aufgetragenen Proben, unterteilt nach Biocid (BZK/CHX) und erreichtem MHK-Wert dargestellt (Tab. 5).

Wirkstoff	MHK-Wert	Rel. Häufigkeit (n=1.004)
Benzalkoniumchlorid	≥300 µg/ml	3,2 %
	≥500 µg/ml	1,1 %
Chlorhexidin	≥300 µg/ml	0 %
	≥500 µg/ml	0 %

Tab. 5 Screeninguntersuchung auf Iso-Sensitest-Agar.

Dargestellt ist die relative Häufigkeit gewachsener Isolate unterteilt nach Biocid (CHX bzw. BKC) und Biocidkonzentration (300 µg/ml bzw. 500 µg/ml).

5.2 Einfluss der Nährmedien auf die Resistenztestung

5.2.1 Vergleichende Untersuchung mit BKC

Vergleicht man die Anzahl der im Screening gewachsenen Erreger in Abhängigkeit der Nährmedien, so zeigt sich eine deutliche Differenz zwischen TSA- und ISO-Sensitest-Agar. Auf TSA-Agar sehen wir in beiden BKC-Konzentrationsstufen einen größeren Prozentsatz von Erregern die noch ein Wachstum zeigen. Auf einem TSA-Selektivmedium mit einer BKC-Konzentration von 300 µg/ml wuchsen 12,3% der Erreger, auf dem ISO-Sensitest Selektivmedium mit der gleichen Biocidkonzentration lediglich 3,2%. Bei Biocidkonzentrationen von 500 µg/ml wird dieses Verhältnis, das in etwa dem Faktor 4 entspricht, ebenso eingehalten (4,5% auf TSA-, 1,1% auf ISO-Sensitest-Agar) (Abb. 10).

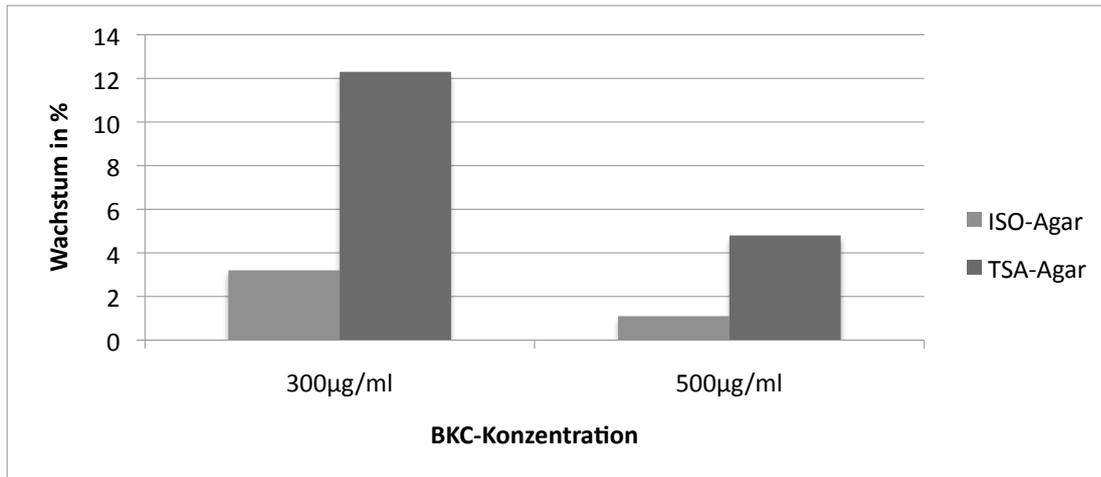


Abb. 10: Vergleichende Untersuchung mit BKC.

Darstellung der Anzahl gewachsener Proben in Prozent auf ISO-Agar und TSA-Agar mit BKC in den Konzentrationen 300 µg/ml und 500 µg/ml

5.2.2 Vergleichende Untersuchung mit CHX

Im Vergleich der Nährböden denen CHX zugesetzt worden war, sehen wir ebenfalls höhere Wachstumsraten auf TSA-Agar. Diese Wachstumsraten liegen allerdings in einem Prozentbereich <1% der getesteten Kulturen. Zusätzlich hat im Vergleich hierzu auf Iso-Sensitest-Agar kein Wachstum stattgefunden (Abb. 11).

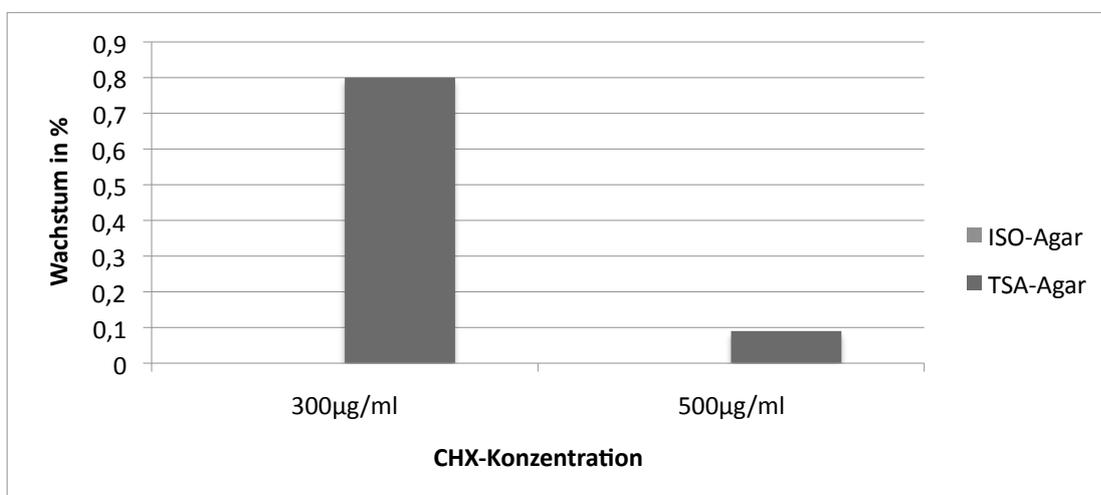


Abb. 11: Vergleichende Untersuchung mit CHX.

Darstellung der Anzahl gewachsener Proben in Prozent auf ISO-Agar und TSA-Agar mit CHX in den Konzentrationen 300 µg/ml und 500 µg/ml.

5.3 Speciesdifferenzierung der resistenten Isolate

In diesem Abschnitt der Arbeit wird die Specieszugehörigkeit der Biocidresistenten Isolate dargestellt.

5.3.1 Wachstum auf Benzalkoniumchlorid (300 µg/ml)

Von den 1004 Isolaten konnte bei 124 ein Wachstum festgestellt werden. Dabei zeigte sich in der Differenzierung mit einem Anteil von 86% an den insgesamt gewachsenen Isolaten eine deutliche Verteilung zugunsten von *Pseudomonas spp.*. Zweithäufigste Erreger war *Proteus spp.*. In der nachfolgenden Tabelle sind die Species in Prozent der auf den Screeningplatten gewachsenen Proben mit Zusatz von 300 µg/ml BKC dargestellt (Tab. 6).

n = 124

Species	300 µg/ml BKC
<i>Pseudomonas species</i>	86 %
<i>Serratia species</i>	3,5 %
<i>Proteus species</i>	6,8 %
<i>Enterobacter species</i>	1,1 %
<i>Morganella species</i>	1,1 %
<i>Klebsiella species</i>	1,1 %

Tab. 6 Charakterisierung der Species auf 300 µg/ml BKC

5.3.2 Wachstum auf Benzalkoniumchlorid (500 µg/ml)

Von den 1004 Isolaten konnte bei 49 ein Wachstum festgestellt werden. Auch hier wird die größte Gruppe der gewachsenen Proben mit 76 % durch *Pseudomonas spp.* repräsentiert. Für die Species *Serratia* und *Proteus* konnte bemerkenswerterweise eine anteilmäßige Steigerung der Wachstumshäufigkeit um den Faktor 2.2 bzw. 1.7 im Vergleich zu den Nährböden mit einer Konzentration von 300 µg/ml BKC festgestellt werden. In Tabelle 7 sind die Species in Prozent der auf den Screeningplatten gewachsenen Proben mit Zusatz von 500 µg/ml BKC dargestellt.

n = 49

Species	500 µg/ml BKC
<i>Pseudomonas species</i>	76 %
<i>Proteus species</i>	11,5 %
<i>Serratia species</i>	7,7 %
<i>Enterobacter species</i>	1,9 %
<i>Klebsiella species</i>	1,9 %
<i>Morganella species</i>	1,9 %

Tab. 7 Charakterisierung der Species auf 500 µg/ml BKC

5.3.3 Wachstum auf Chlorhexidin (300 µg/ml)

Von den 1004 Isolaten konnte bei 8 ein Wachstum festgestellt werden. Dabei lässt sich im Vergleich zu den vorangegangenen Untersuchungen eine Umverteilung der Häufigkeiten zugunsten von *Proteus spp.* erkennen. Dargestellt sind die Species in Prozent der auf den Screeningplatten gewachsenen Proben mit 300 µg/ml CHX (Tab. 8).

n = 8

Species	300 µg/ml CHX
<i>Pseudomonas species</i>	25 %
<i>Proteus species</i>	50 %
<i>Serratia marcescens</i>	12,5 %
<i>o. A.</i>	12,5 %

Tab. 8 Charakterisierung der Species auf 300 µg/ml CHX

5.4 Resistenzentwicklung in den Jahren 1994-2005

Ein Vergleich der Daten aus dem Jahr 2005 mit denen der Jahre 1994 und 2001 zeigt, dass es innerhalb des Zeitraumes von zehn Jahren zu einer signifikanten Steigerung resistenter Isolate gekommen ist (Tab. 9; Abb. 12). So hat sich die Resistenzrate gegenüber Benzalkoniumchlorid (500µg/ml) von 1994 von 0,4 % auf 4,9 % im Jahre 2005 verzehnfacht. Im selben Zeitraum stieg die Resistenzrate gegenüber Chlorhexidin (100µg/ml) um den Faktor 4 von 2,0 % auf 7,8 %. Begleitend lässt sich erkennen, dass zwischen den Jahren 2001 und 2005 lediglich für BKC noch eine Steigerung der Resistenten Erreger stattgefunden hat. Für CHX ist die Rate resistenter Erreger zwischen den beiden letzten Messpunkten stabil geblieben (Tab. 9).

	1994* n = 2173	2001* n = 2840	2005 n = 1004
Benzalkoniumchlorid (> 500 µg/ml)	0.4 %	1.0 %	4,8 %
Chlorhexidin (> 100 µg/ml)	2.0 %	7.9 %	7,8 %

Tab. 9 Resistenzentwicklung (1994 bis 2005) am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

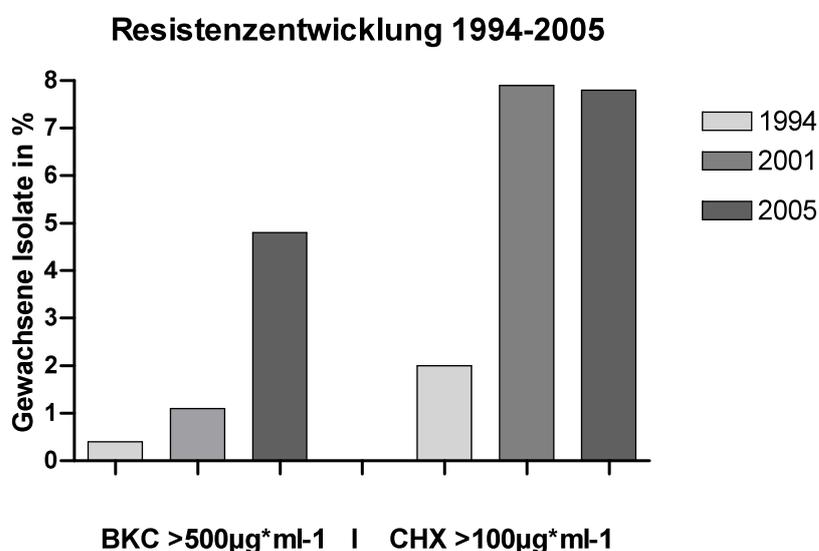


Abb. 12: Resistenzentwicklung (1994 bis 2005) am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf;

(* Diese Daten entstammen gesonderten Voruntersuchungen im Institut)

5.5 Resistenzinduktion

Die Daten der epidemiologischen Untersuchung zeigen eine klare Steigerung der Rate resistenter Erreger. Eine Möglichkeit die zu dieser Resistenz führenden Mechanismen weiter zu untersuchen bietet sich durch den Vergleich von isogenen Erregern in resistenter- und sensibler Variante. Da durch eine repetitive Exposition gegenüber subletalen Biocid-Konzentrationen eine Resistenz experimentell verursacht werden kann, bietet sich hierdurch die Möglichkeit ein solches Erregerpärchen experimentell zu erzeugen. Der anschließende Vergleich von z.B. differierenden Proteinstrukturen oder Stoffwechseleigenschaften zwischen der sensiblen Ausgangskultur und der isogenen resistenten Variante kann dann ausgeführt werden um Erklärungsansätze für die Resistenzmechanismen zu finden.

5.5.1 Resistenzinduktion gegenüber Chlorhexidin mit *E. coli*

In dem Versuch durch eine wiederholte Exposition gegenüber CHX resistente *E. coli* Erreger zu erzeugen, ließ sich weder in visueller Kontrolle der hierfür angesetzten MH-Bouillon noch im TSA-Ausstrich Wachstum feststellen. Bereits geringe Konzentrationen des Biocids Chlorhexidine entfaltete eine suffiziente Wirkung auf *E. coli*. Da bereits die geringste der gewählten Konzentrationen (5 µg/ml) kein Wachstum mehr zuließ konnte keine Resistenzinduktion erfolgen. Da somit auch kein isogenes Pärchen einer sensiblen und einer resistenten Kultur erzeugt werden konnte entfällt die weitere Untersuchungsmöglichkeit im Rahmen dieser Arbeit.

5.5.2 Resistenzinduktion gegenüber Chlorhexidin mit *Enterobacter spp.*

Durch die wiederholte Exposition der *Enterobacter*-Isolate gegenüber CHX konnte sukzessive eine Steigerung der MHK bei neun von zehn Isolaten erreicht werden. Probe 1334 war nicht in der Lage, die minimale Konzentration von 5 µg/ml zu tolerieren, respektive Wachstum zu zeigen und schied dementsprechend aus. Im weiteren Verlauf zeigten mehrere Proben eine eindrucksvolle Toleranz von Konzentrationen bis zu 1280 µg/ml, die bereits Anwendungskonzentrationen der Wirkstoffe entspricht. In Tabelle 10 sind die Isolate mit den Korrespondierenden MHK-Werten dargestellt, Abbildung 13 gibt einen Eindruck über den zeitlichen Verlauf der Resistenzinduktion.

Stamm-Nr.	Species	MHK 1. Tag (µg/ml)	MHK 10. Tag (µg/ml)	MHK 30. Tag (µg/ml)
12370	<i>E. aerogenes</i>	10	160	1280
12290	<i>E. aerogenes</i>	10	220	1280
12807II	<i>E. aerogenes</i>	5	320	1280
12455	<i>E. cloacae</i>	5	220	1280
12459	<i>E. cloacae</i>	5	200	1280
12495	<i>E. cloacae</i>	5	160	1280
12360	<i>E. cloacae</i>	5	320	1280
12317II	<i>E. cloacae</i>	5	320	640
12319	<i>E. cloacae</i>	5	320	1280

Tab. 10 Resistenzinduktion *Enterobacter spp.* / CHX

Darstellung der *Enterobacter spp.* und der MHK-Werte für CHX während der Resistenzinduktion

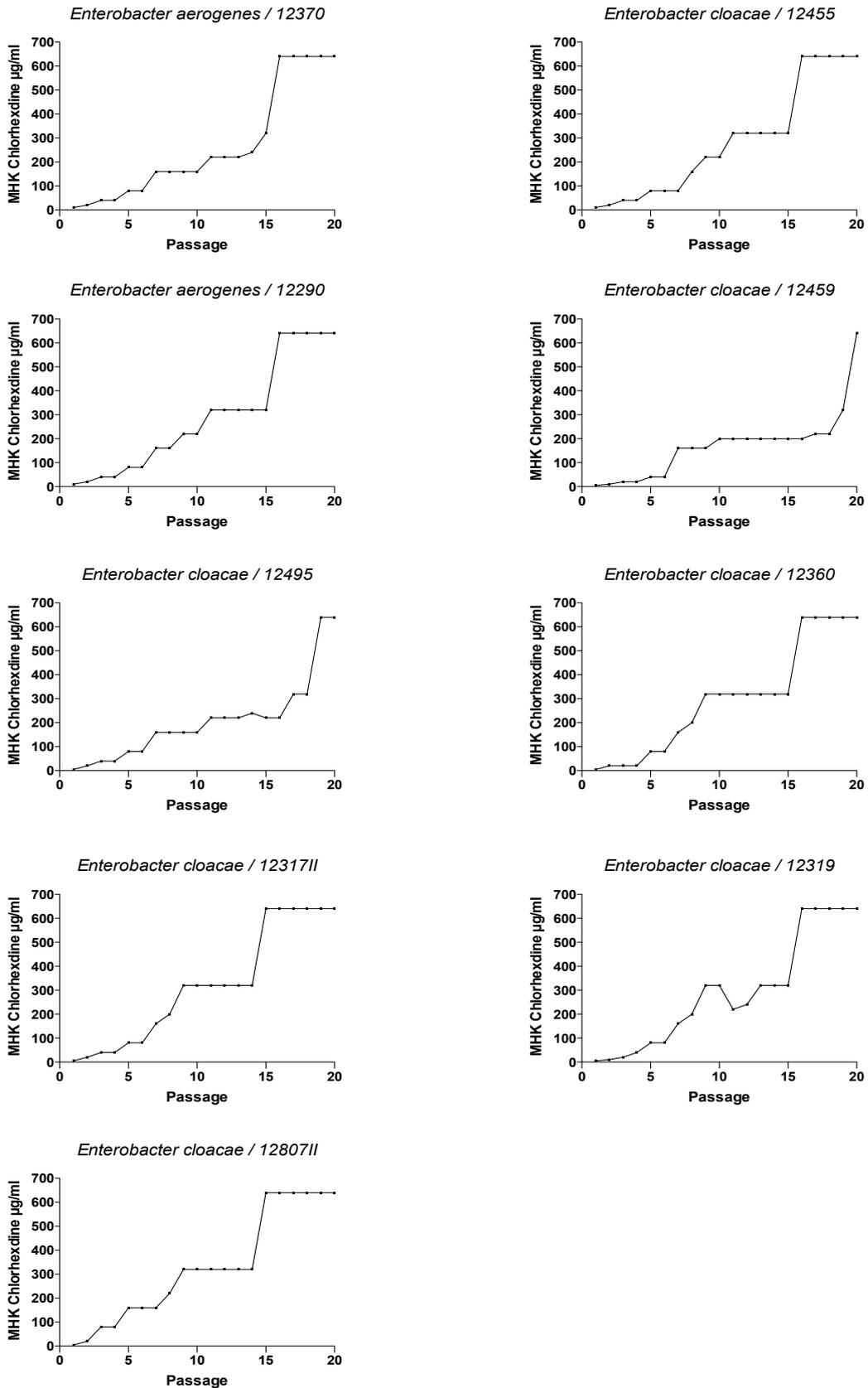


Abb. 13: Resistenzinduktion *Enterobacter* spp./CHX, Einzeldarstellung

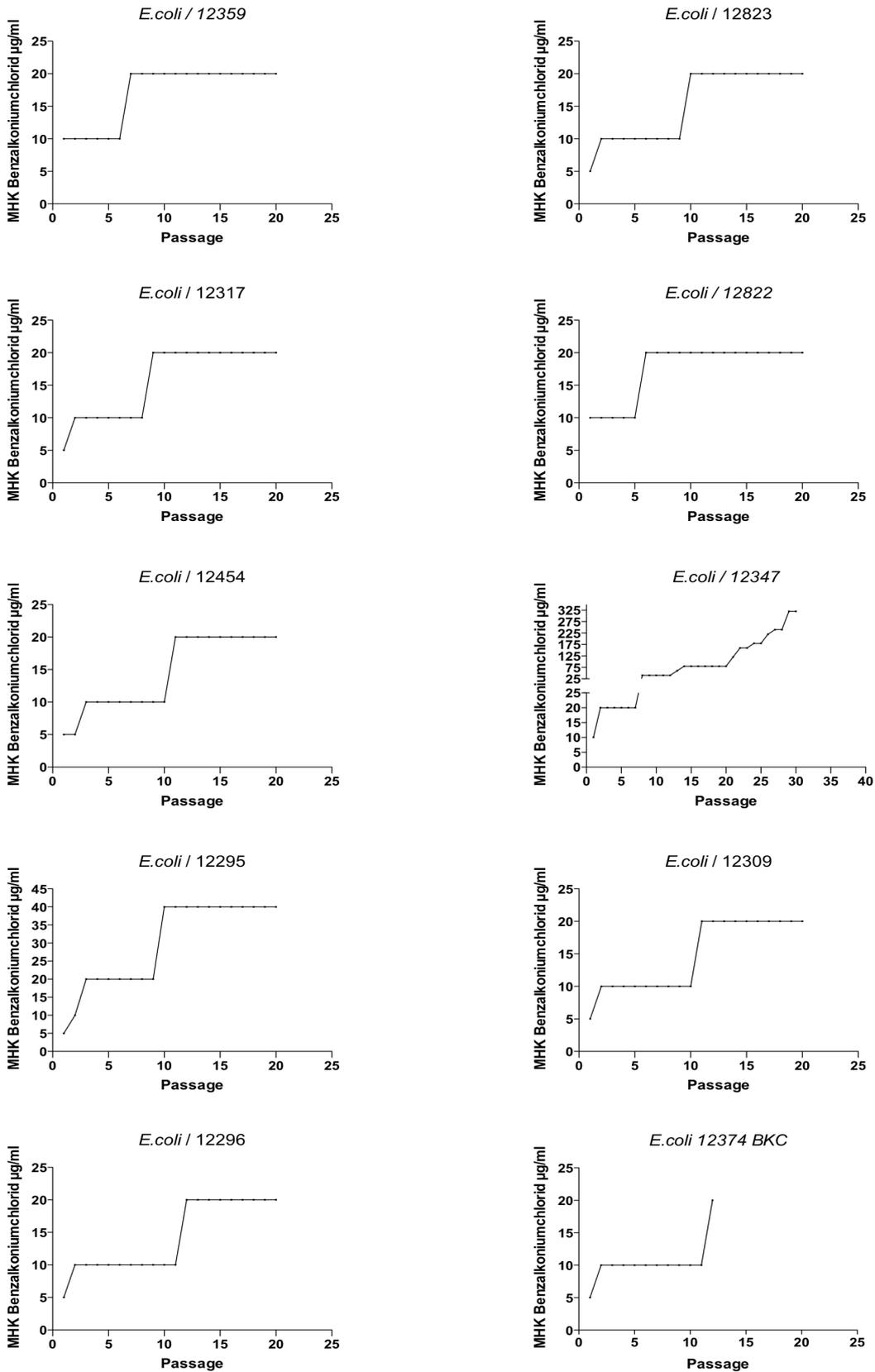
5.5.3 Resistenzinduktion gegenüber Benzalkoniumchlorid mit *E. coli*

Von den zehn verwendeten *E.-coli*-Isolaten zeigte nach 30 Passagen in Müller-Hinton-Bouillon mit BKC nur Probe Nr. 12347 eine deutliche Steigerung der tolerierten Konzentration. Alle anderen Proben schieden aufgrund der nicht eintretenden Resistenz aus. In Tabelle 11 sind die Isolate mit den Korrespondierenden MHK-Werten dargestellt, Abbildung 14 gibt einen Eindruck über den zeitlichen Verlauf der Resistenzinduktion.

Stamm-Nr.	Species	MHK 1. Tag (µg/ml)	MHK 10. Tag (µg/ml)	MHK 30. Tag (µg/ml)
12359	<i>E. coli</i>	10	20	20
12823	<i>E. coli</i>	5	20	20
12317	<i>E. coli</i>	5	20	20
12822	<i>E. coli</i>	10	20	20
12454	<i>E. coli</i>	5	10	20
12374	<i>E. coli</i>	5	10	20
12347	<i>E. coli</i>	10	40	320
12295	<i>E. coli</i>	5	40	40
12309	<i>E. coli</i>	5	10	20
12296	<i>E. coli</i>	5	10	20

Tab. 11 Resistenzinduktion *E. coli* / BKC

Darstellung der *E. coli* und der MHK-Werte für BKC während der Resistenzinduktion

Abb. 14: Resistenzinduktion *E. coli* / BKC, Einzeldarstellung

5.5.4 Resistenzinduktion gegenüber Benzalkoniumchlorid mit *Enterobacter spp.*

Bei den zehn *Enterobacter spp.* konnte schon nach zehn Tagen bei vier von ihnen eine deutliche Steigerung der tolerierten Konzentration von BKC erreicht werden. Im weiteren Verlauf erhöhte sich diese zunehmend, um bei Werten von 320 µg/ml keine weitere Steigerung mehr zu erfahren. Insgesamt erreichten zwei *Enterobacter aerogenes* und drei *Enterobacter cloacae* diese MHK-Stufe. In Tabelle 12 und Abbildung 15 sind die *Enterobacter spp.* mit den zugehörigen MHK-Werten während der Resistenzinduktion dargestellt.

Stamm-Nr.	Species	MHK 1. Tag (µg/ml)	MHK 10. Tag (µg/ml)	MHK 30. Tag (µg/ml)
12370	<i>E. aerogenes</i>	10	20	20
12290	<i>E. aerogenes</i>	20	180	320
12807II	<i>E. aerogenes</i>	40	240	320
12455	<i>E. cloacae</i>	20	200	320
12459	<i>E. cloacae</i>	10	10	10
12495	<i>E. cloacae</i>	20	80	320
12360	<i>E. cloacae</i>	40	60	60
12317II	<i>E. cloacae</i>	40	240	320
12319	<i>E. cloacae</i>	10	60	60

Tab. 12 Resistenzinduktion *Enterobacter spp.* / BKC

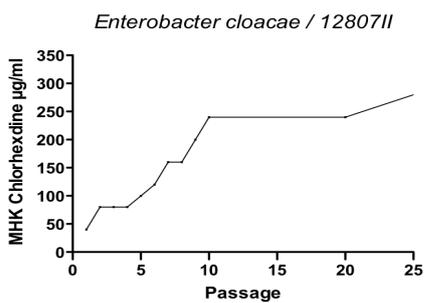
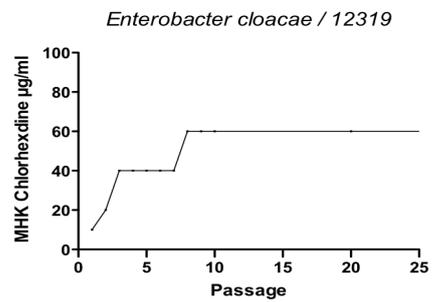
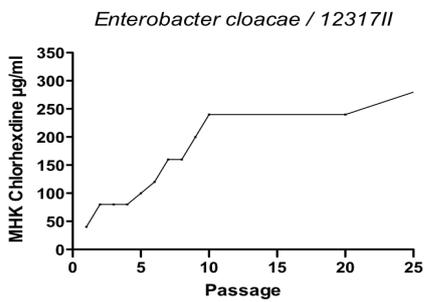
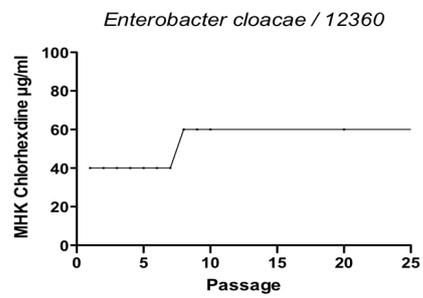
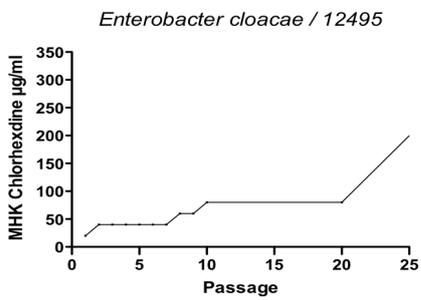
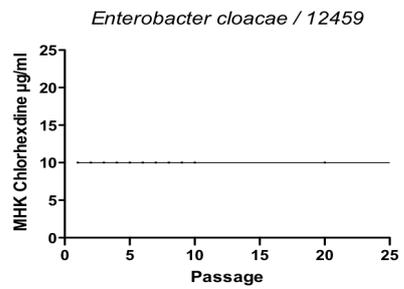
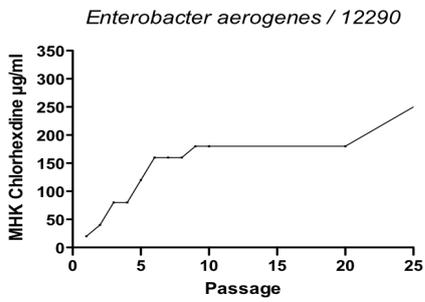
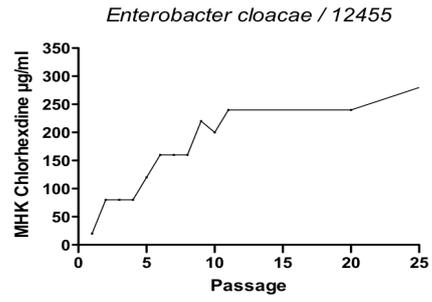
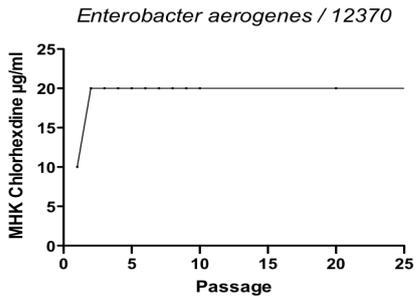


Abb. 15: Resistenzinduktion *Enterobacter* spp. / BKC, Einzeldarstellungen

5.6 Stabilität der Resistenz

Nach der Induktion der Resistenz, respektive Erzeugung isogener Isolate in resistenten und sensibler Form als Grundlage für weitere Untersuchungen, stellte sich die Frage ob es sich um eine adaptive Reaktion auf Umweltstress handelt oder aber ob eine dauerhafte Resistenz erworben wurde. Im Falle einer intrinsischen Adaptationsreaktion wäre zu erwarten, dass in biocidfreier Kultivierung nach einer Weile die entsprechenden Anpassungsvorgänge wieder aufgegeben werden, sich also erneut Suszeptibilität einstellt. Somit fand eine biocid-, respektive stressfreie Kultivierung der Proben in MHB für zehn Passagen mit anschließender Kontrolle der MHK („p10 MHK“) statt. Die CHX-resistenten *Enterobacter spp.* zeigten nach den zehn Tagen Biocidfreier Kultivierung keine Veränderung der MHK-Werte. Gleichermäßen gilt diese Beobachtung für BKC-resistente *Enterobacter spp.* und für BKC-resistente *E. coli*. Nach zehn Passagen ohne Wirkstoffstress variiert die zuvor gegenüber dem Biocid erreichte MHK nicht. Somit konnte eine Stabilität der Resistenz für den getesteten Zeitraum von 10 Passagen bei den verwendeten Isolaten bewiesen werden. Aufgetrennt nach Species und Biocid geben die Tabellen 13 bis 15 Auskunft über die Werte.

Stamm Nr.	Species	MHK CHX (µg/ml)	P ₁₀ MHK CHX (µg/ml)
12370	<i>E. aerogenes</i>	640	640
12290	<i>E. aerogenes</i>	640	640
12455	<i>E. cloacae</i>	640	640
12459	<i>E. cloacae</i>	640	640
12495	<i>E. cloacae</i>	640	640
12360	<i>E. cloacae</i>	640	640
12317II	<i>E. cloacae</i>	640	640
12319	<i>E. cloacae</i>	640	640
12807II	<i>E. cloacae</i>	640	640

Tab. 13 Resistenzstabilität *Enterobacter spp.* / CHX

P₁₀ MHK CHX: MHK für CHX nach 10 Biocidfreien Passagen

Stamm Nr.	Species	MHK BKC ($\mu\text{g/ml}$)	P ₁₀ MHK BKC ($\mu\text{g/ml}$)
12290	<i>E. aerogenes</i>	320	320
12455	<i>E. cloacae</i>	320	320
12317II	<i>E. cloacae</i>	320	320
12807II	<i>E. cloacae</i>	320	320

Tab. 14 Resistenzstabilität *Enterobacter spp.* / BKCP₁₀ MHK BKC: MHK für BKC nach 10 Biocidfreien Passagen

Stamm-Nr.	Species	MHK BKC ($\mu\text{g/ml}$)	P ₁₀ MHK BKC ($\mu\text{g/ml}$)
12347	<i>E. coli</i>	320	320

Tab. 15 Resistenzstabilität *E. coli* / BKCP₁₀ MHK BKC: MHK für BKC nach 10 Biocidfreien Passagen

5.7 Kreuzresistenz gegenüber BKC und CHX

Eine Kreuzresistenz zwischen BKC und CHX wurde überprüft, um einen Hinweis auf den Resistenzmechanismus zu erhalten. Sofern durch die Resistenz gegenüber dem einen der Biocide auch eine Resistenz gegenüber dem anderen beobachtet werden kann, wäre dies als Argument für einen gemeinsamen Resistenzmechanismus verwertbar. Im Anschluss an die Resistenzinduktion wurde hierfür von den aufgeschaukelten Kulturen ebenfalls die MHK für das nicht zum Aufschaukeln verwendete Biocid bestimmt. Eine z.B. gegenüber CHX resistente Kultur wurde also auch auf ihre MHK gegenüber BKC überprüft („_{CHX}MHK BKC“). In Tabelle 16 lässt sich erkennen, dass alle CHX-resistenten *Enterobacter spp.* BKC-sensibel sind. Den Tabellen 17 und 18 wiederum ist zu entnehmen, dass *Enterobacter spp.* und *E.coli* mit hohen MHK-Werten gegenüber BKC keine Resistenz gegenüber CHX ausgebildet haben.

Zusammenfassend lässt sich anhand der dargestellten Werte feststellen, dass es im Rahmen des Wirkstoffstresses zu keiner relevanten Kreuzresistenz gekommen ist. Eine experimentell erzeugte Resistenz für CHX oder BKC führte in dieser Arbeit nicht gleichzeitig zu einer veränderten MHK gegenüber dem anderen Biocid.

Stamm Nr.	Species	MHK CHX (µg/ml)	^{CHX} MHK BKC (µg/ml)
12807II	<i>E. aerogenes</i>	640	20
12370	<i>E. aerogenes</i>	640	20
12290	<i>E. aerogenes</i>	640	20
12360	<i>E. cloacae</i>	640	20
12459	<i>E. cloacae</i>	640	20
12455	<i>E. cloacae</i>	640	20
12317II	<i>E. cloacae</i>	640	20
12495	<i>E. cloacae</i>	640	40
12319	<i>E. cloacae</i>	640	20

Tab. 16 Kreuzresistenz *Enterobacter spp.* / CHX

^{CHX}MHK BKC: MHK für BKC der CHX-resistenten Variante
 MHK CHX: MHK für CHX der CHX-resistenten Variante

Für mit BKC hochgeschaukelte *Enterobacter spp.* zeigten sich die MHK-Werte gegenüber CHX wie folgt (Tab. 16):

Stamm Nr.	Species	MHK BKC (µg/ml)	^{BKC} MHK CHX (µg/ml)
12807II	<i>E. aerogenes</i>	320	10
12290	<i>E. aerogenes</i>	320	10
12455	<i>E. cloacae</i>	320	10
12317II	<i>E. cloacae</i>	320	<5

Tab. 17 Kreuzresistenz *Enterobacter spp.* / BKC

^{BKC}MHK CHX: MHK für CHX der BKC resistenten Variante
 MHK BKC: MHK für BKC der BKC resistenten Variante

Für mit BKC hochgeschaukelte *E. coli* zeigten sich die MHK-Werte gegenüber CHX wie folgt (Tab 17):

Stamm Nr.	Species	MHK BKC (µg/ml)	^{BKC} MHK CHX (µg/ml)
12347	<i>E. coli</i>	320	5

Tab. 18 Kreuzresistenz *E. coli* / BKC

^{BKC}MHK CHX: MHK für CHX der BKC-resistenten Variante
 MHK BKC: MHK für BKC der BKC-resistenten Variante

5.8 Kreuzresistenz gegenüber Antibiotika/E-Test

5.8.1 Antibiotikatestung Benzalkoniumchloridresistenter Isolate

Um eine Kreuzresistenz gegenüber Antibiotika aus den Gruppen 2 und 5 der Cephalosporine nach der Resistenzinduktion zu erfassen, wurde mit den Kulturen die eine Resistenz gegenüber BKC erworben hatten ein E-Test durchgeführt. Eine Gegenüberstellung erfolgt für die erste und zehnte Passage der Isolate in Tabelle 19.

Stamm-Nr. / Spezies	Passage BKC	MHK Cefoxitin (FX) (µg/ml)	MHK Cefuroxim (XM) (µg/ml)
12455 / <i>E. cloacae</i>	0	>256	>256
	10	>256	>256
12290 / <i>E. aerogenes</i>	0	>256	>256
	10	>256	>256
12495 / <i>E. cloacae</i>	0	>256	6
	10	>256	6
12.317II / <i>E. cloacae</i>	0	32	6
	10	32 (64)	32
12807II / <i>E. aerogenes</i>	0	64	4
	10	96	12
12347 / <i>E. coli</i>	0	1	0.75
	10	8	12
	25	32	32
12295 / <i>E. coli</i>	0	1.5	4
	10	24	24

Tab. 19 Antibiotikatestung Benzalkoniumchloridresistenter Isolate

Hierbei sieht man gut die für *Enterobacter spp.* typische Resistenz gegenüber Cephalosporinen. Zwei der überprüften Isolate zeigten im Rahmen der Antibiotikaresistenztestung allerdings eine ausgeprägte Veränderung in den tolerierten MHK-Werten. Bei *E. coli* 12347 kam es begleitend zur steigenden MHK für BKC nach der ersten (5 µg/ml), zehnten (40 µg/ml) und 25. (220 µg/ml) Passage zu einen korrespondierenden Anstieg der MHK sowohl für Cefuroxim von 0,75 µg/ml über 12 µg/ml auf 32 µg/ml, als auch für Cefoxitin von 1 µg/ml über 8 µg/ml auf 32 µg/ml (Abb. 16). *Enterobacter aerogenes* 12807 II fiel ebenfalls durch eine begleitend zur Toleranz von BKC nach der ersten (40 µg/ml) und zehnten Passage (240 µg/ml) steigende MHK für Cefoxitin von 64 µg/ml auf 96 µg/ml und für Cefuroxim von 4 µg/ml auf 12µg/ml auf (Abb. 16).

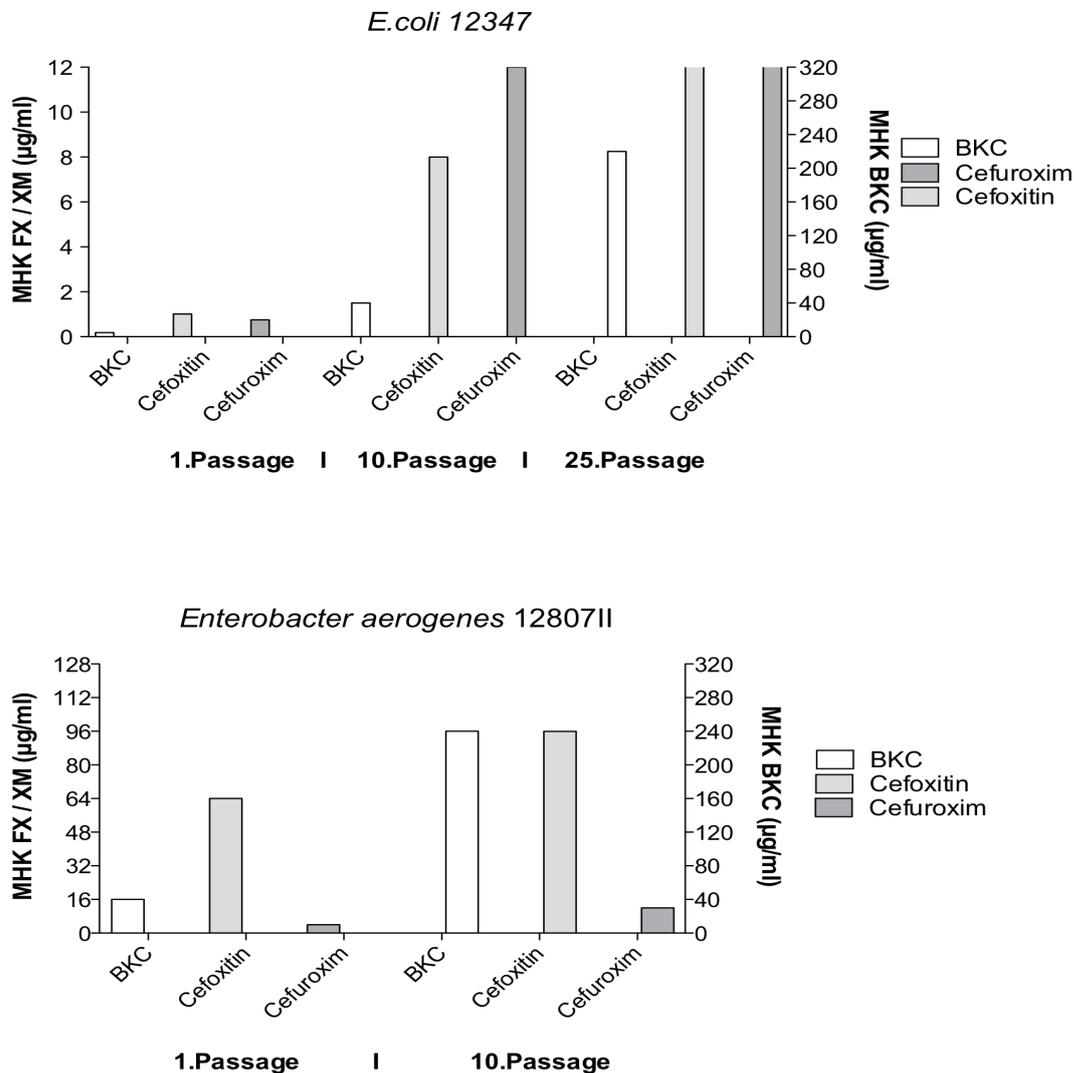


Abb. 16: E-Test von *E. coli* 12347 und *Enterobacter aerogenes* 12807II

Um den Zusammenhang zwischen der Resistenz gegenüber BKC und der gegenüber FX und XM weiter zu objektivieren, wurden diese bei den gesteigerten Proben ($n = 7$) auf einem Signifikanzniveau von 5 % geprüft. Dabei wurde ein parametrischer t-Test für verbundene Stichproben verwendet (Abb. 17).

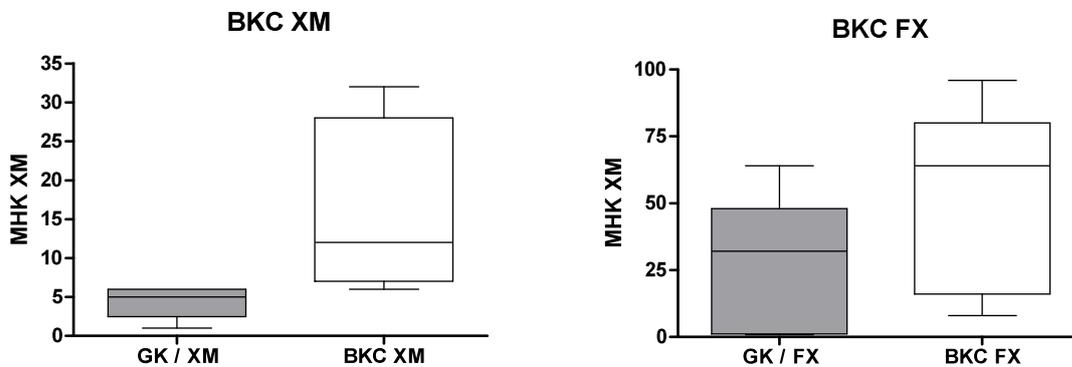


Abb. 17: T-Test

Bei den MHK-Werten für XM lag die mittlere durch die Resistenzinduktion mit BKC erreichte MHK-Differenz zur unbehandelten Kultur bei 11.17 µg/ml, für FX bei 25.15 µg/ml ($p = 0.0380$ für XM; $p = 0.0065$ für FX). Streng genommen lässt sich hieraus lediglich die Aussage ableiten, dass einzelne Isolate nach Erlangen einer Resistenz gegenüber BKC auch eine gesteigerte MHK gegenüber den getesteten Antibiotika zeigen. Ob eine Kausalität zwischen der durch wiederholte Passage induzierten Resistenz gegenüber BKC und der gesteigerten MHK für FX und XM besteht, müsste durch eine größere Untersuchung geklärt werden. Bislang kann aufgrund der geringen Probengröße ein Beobachtungsphänomen nicht ausgeschlossen werden. In Anbetracht der Tatsache, dass jedoch lediglich bei zwei der verwendeten Kulturen eine signifikante Zunahme der tolerierten Konzentration der Cephalosporine nachgewiesen werden konnte, erscheint dies zum jetzigen Zeitpunkt als nicht sehr wahrscheinlich. Diese Ergebnisse bestärken eher die bestehende Empfehlung Infektionen mit *Enterobacter spp.* nicht mit Cephalosporinen zu behandeln.

5.8.2 Antibiotikatestung chlorhexidinresistenter Isolate

Für Kulturen, die eine Resistenz gegenüber Chlorhexidin erlangten, wurden die MHK-Werte gegenüber FX und XM mittels E-Test überprüft. Eine Gegenüberstellung dieser Werte erfolgte nach der ersten und 30. Passage (Tab. 20).

Stamm Nr. / Species	Passage CHX	MHK Cefoxitin (FX) (µg/ml)	MHK Cefuroxim (XM) (µg/ml)
12459 / <i>E. cloacae</i>	0	>256	6
	30	>256	6
12360 / <i>E. cloacae</i>	0	128	4
	30	128	4
12319 / <i>E. cloacae</i>	0	>256	6
	30	>256	6
12290 / <i>E. aerogenes</i>	0	>256	>256
	30	>256	>256
12495 / <i>E. cloacae</i>	0	>256	6
	30	>256	6
12317II / <i>E. cloacae</i>	0	>256	6
	30	>256	6
12807II / <i>E. cloacae</i>	0	64	4
	30	96	4
12495 / <i>E. cloacae</i>	0	>256	6
	30	>256	6

Tab. 20 Antibiotikatestung Chlorhexidinresistenter Isolate

Zusammenfassend ist festzustellen, dass bei keiner der verwendeten Kulturen (n = 8) eine signifikante Zunahme der tolerierten Konzentration nachgewiesen werden konnte. Auch hier sehen wir erneut die ausgeprägte Resistenz von *Enterobacter spp.* gegenüber Cephalosporinen.

5.9 Stoffwechseleigenschaften der resistenten Isolate

Um funktionelle Veränderungen durch den applizierten Wirkstoffstress zu detektieren, wurde in diesem Abschnitt eine Auswahl an Stoffwechselleistungen der Isolate überprüft. Dafür fanden die Ausgangskulturen und Kulturen nach der Passage in MHB mit Biozidzusatz Verwendung. Die Stoffwechselleistung beider Gruppen wurde dann mit dem Enterotube®-Test ermittelt und erfasst. Hierbei zeigte sich, dass 12807II (*E. cloacae*) bereits nach sechs Passagen unter Biozidzusatz im Gegensatz zur Ausgangskultur nicht mehr in der Lage war, Lysin zu verstoffwechseln. Neben diesem Befund konnte nach sechsfacher Passage mit dem verwendeten Testverfahren sowohl für 12807 II (*E. cloacae*) und 12459 (*E. cloacae*) keine Fermentierung von Laktose mehr nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu jedoch wurde bei der Probe 12455 (*E. cloacae*) festgestellt, dass erst nach dem Wirkstoffstress eine Verstoffwechslung von Adonitol, Laktose oder Lysin dokumentiert werden konnte.

Zusammenfassend ließen sich jedoch keine vergleichbaren Ergebnisse in Bezug auf die überprüften Stoffwechseleigenschaften darstellen. Eine unspezifische Deviation der Fermentationsprozesse unter Wirkstoffstress erscheint zum jetzigen Zeitpunkt eher als erklärende Begründung, als dass ein gezielter Mechanismus zur Steigerung der Toleranz gegenüber Bioziden vorliegt.

5.10 Proteinbestimmung

5.10.1 Auftrennung der Membranproteine/SDS-PAGE

Durch die Resistenzinduktionsversuche wurden isogene Pärchen jeweils einer Biocidresistenten und einer Biocidsensiblen Kultur erzeugt. Entsprechend konnte nun ein direkter Vergleich der Proteinbestandteile der Membranen von sensibler und resistenter Kultur erfolgen. Zu diesem Zweck wurden die Proteinbestandteile mittels 2%-SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Ein begleitend verwendeter Proteinstandard gibt Aufschluss über die ungefähre Größe der Proteine. Von den untersuchten Proben stellten sich bei den Isolaten 12455, 12317II, 12370 (Abb. 18), 12290, 12807II, 12319 (Abb. 19) und 12360, 12459, 12495 (Abb. 20) Unterschiede in den Proteinbanden zwischen der Grundkultur („GK“), der Chlorhexidine-resistenten Variante („CHX“) und/oder der Benzalkoniumchlorid-resistenten Variante („BKC“) dar.

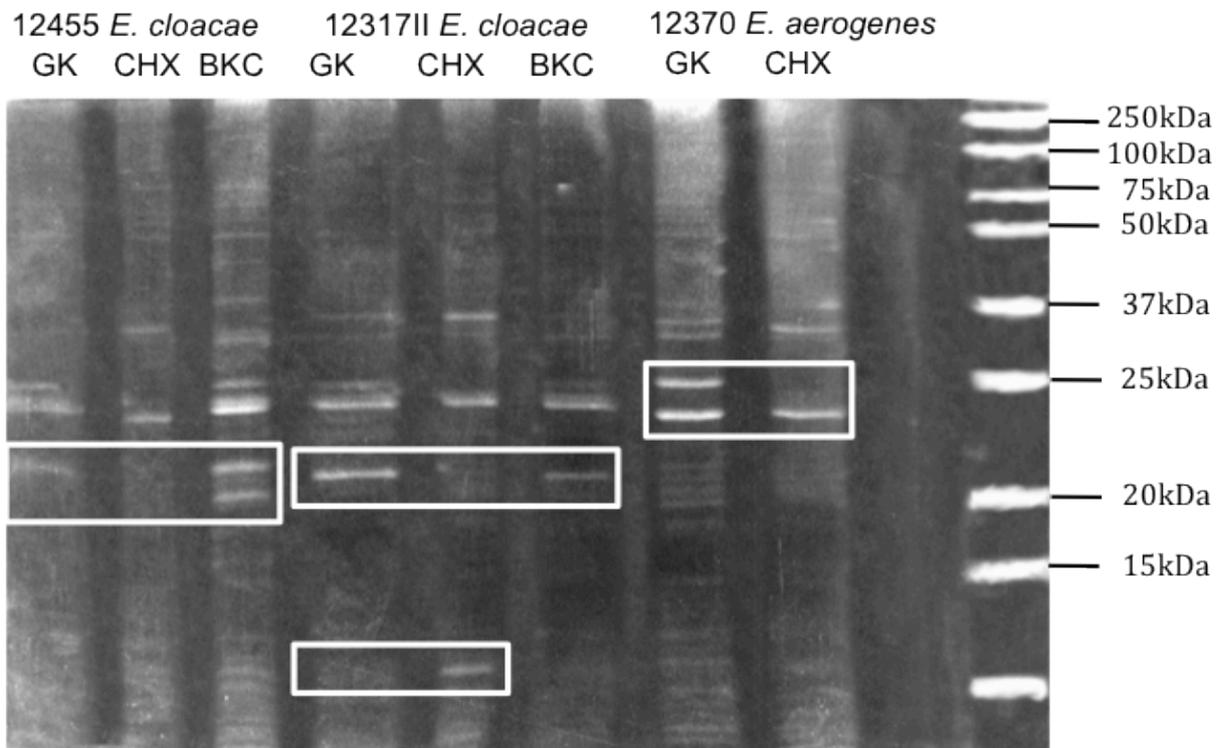


Abb. 18 Gelelektrophorese der *Enterobacter* spp. 12455, 12317 II und 12370.

Im Vergleich zur Grundkultur findet sich bei der BKC-resistenten Variante von Isolat 12455 eine zusätzliche Bande. Bei Isolat 12317 II sehen wir eine nahezu fehlende Bande in der CHX-resistenten- und deutlich weniger intensiv ausgeprägte Bande der BKC-resistenten Variante. Bei Isolat 12370 fehlt der CHX-resistenten Variante eine Bande im Vergleich zur Grundkultur.

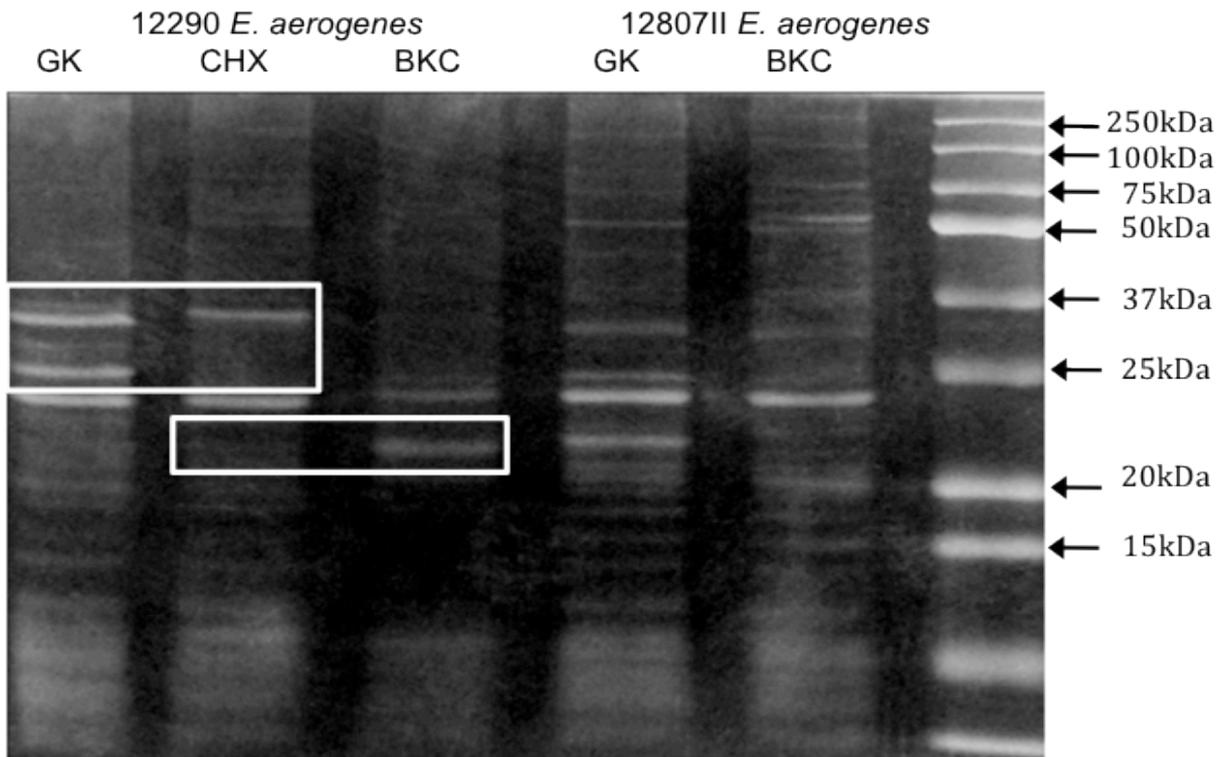


Abb. 19 Gelelektrophorese der *Enterobacter* spp. 12290 und 12807II.

Im Vergleich zur Grundkultur fehlt der CHX-resistenten Variante von Isolat 12290 eine Bande, gleichzeitig sehen wir bei der BKC-resistenten Variante eine zusätzliche Bande.

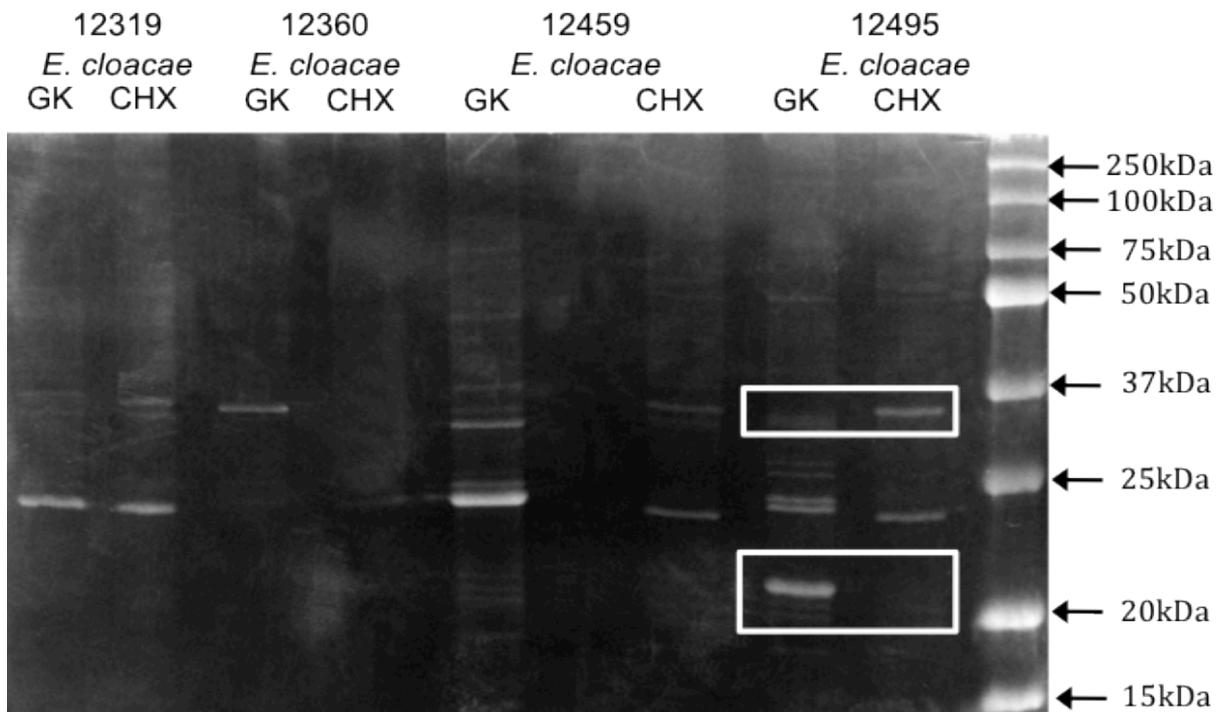


Abb. 20 Gelelektrophorese der *Enterobacter* spp. 12319, 12360, 12459 und 12495.

Hier sehen wir bei Isolat 12495 im Vergleich zur Grundkultur sowohl eine zusätzliche, als auch an anderer Position eine kleinere fehlende Proteinbande.

5.10.2 Qualitative Proteinbestimmung

Nachdem sich in der Gelelektrophorese bei mehreren isogenen Proben differierende Proteinbanden zwischen Grundkultur und Biocidresistenten Varianten darstellen ließen, erfolgte im nächsten Schritt eine qualitative Proteinbestimmung. Hierfür wurden die differierenden Proteinbanden der untersuchten Proben mit dem Skalpell aus dem Gel herausgelöst und anschließend durch eine matrixassistierte Laser-Desorption-Ionisation (MALDI) bzw. tandem-mass-spectrometry bestimmt. Folgende Proteine konnten durch das Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf identifiziert werden.

12455 *E. cloacae*

In der gelelektrophoretischen Auftrennung der Membranproteine des *E. cloacae* 12455 zeigte sich in der BKC-resistenten Variante eine zusätzliche Proteinbande im Größenbereich von ca. 20 kDa. Zeitgleich stellte sich eine zweite etwas größere Proteinfraktion in der BKC-resistenten Variante sehr viel deutlicher dar als in der isogenen, Biocidsensiblen Grundkultur. In der anschließenden Differenzierung der Proteinbanden konnte die zusätzliche Bande als MtlA-interacting MipA family protein identifiziert werden, die im Vergleich zur Grundkultur vermehrt exprimierte Proteinbande als Flaggelin (Abb 21).

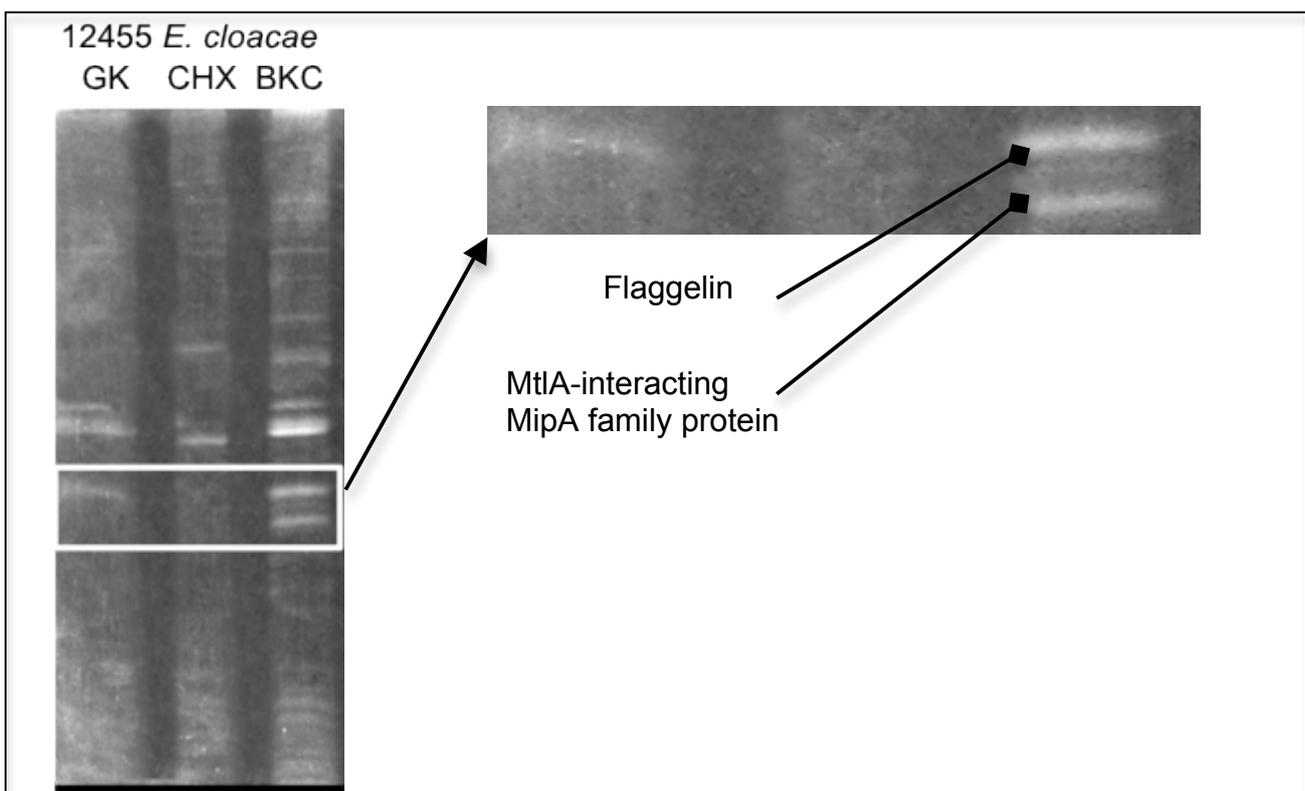


Abb. 21 Proteindifferenzierung *E. cloacae* 12455

12317 II *E. cloacae*

In den aufgetrennten Proteinbanden des *E. cloacae* 12317 II stellten sich zwei relevante Diskrepanzen dar. Eine ca. 20 kDa große Bande stellt sich in der BKC-resistenten Variante im Vergleich zur Grundkultur deutlich weniger intensiv dar. Zusätzlich sehen wir eine in der CHX-resistenten Variante neu aufgetretene Bande im Größenbereich <15 kDa. Das mutmaßlich in der BKC-resistenten Variante vermindert exprimierte Protein ließ sich als Flaggelin-domain containing protein identifizieren, die neu aufgetretene Proteinbande der CHX-resistenten Variante wird durch das outer-membrane-protein OmpX hervorgerufen (Abb. 22).

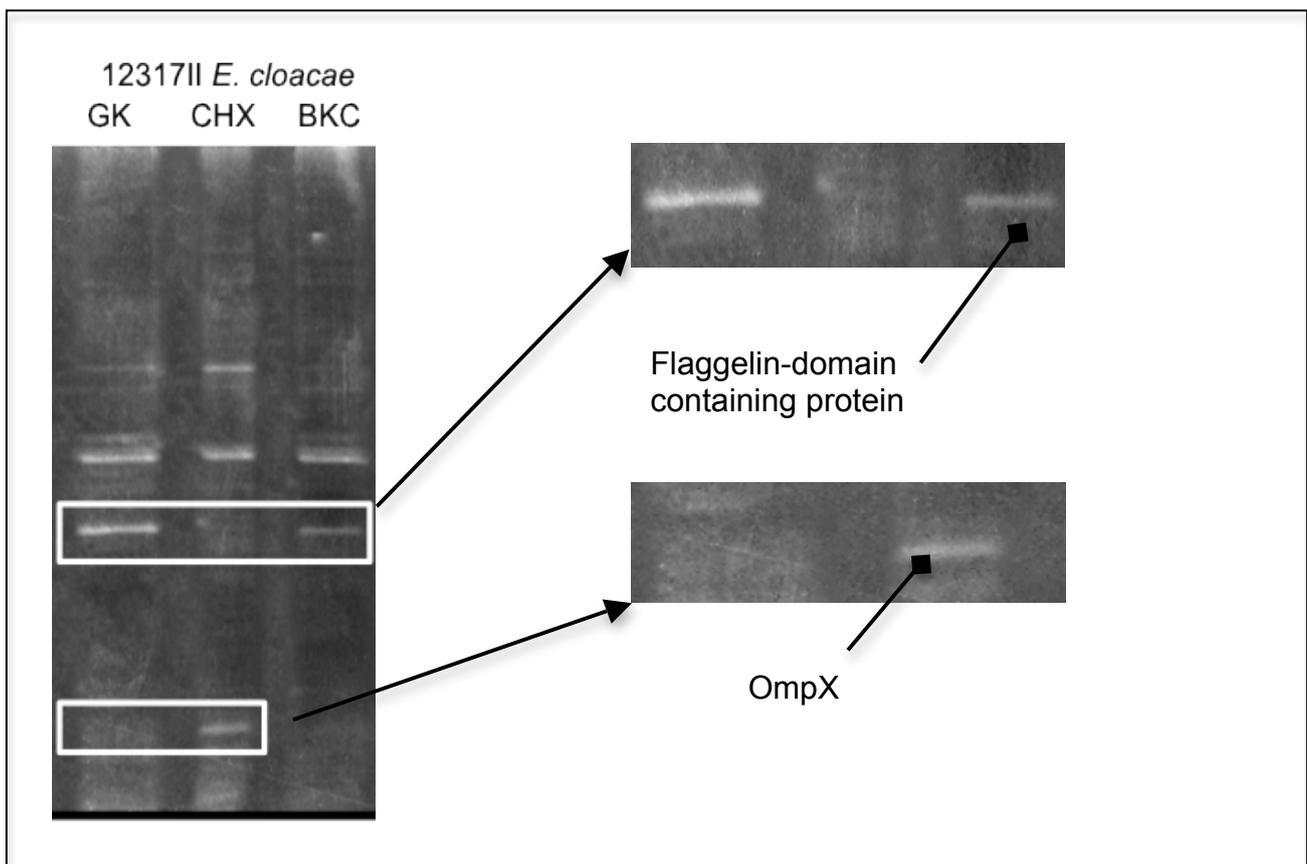


Abb. 22 Proteindifferenzierung *E. cloacae* 12317 II

12370 *E. aerogenes*

Die Auftrennung der Membranproteine des *E. aerogenes* 12370 zeigte im direkten Vergleich mit der Biocid-sensiblen Grundkultur eine in der CHX-resistenten Variante nicht mehr darstellbare Proteinfraktion im Größenbereich von 25 kDa. Diese konnte in der Biocid-sensiblen Variante als Omp E36 identifiziert werden (Abb. 23).

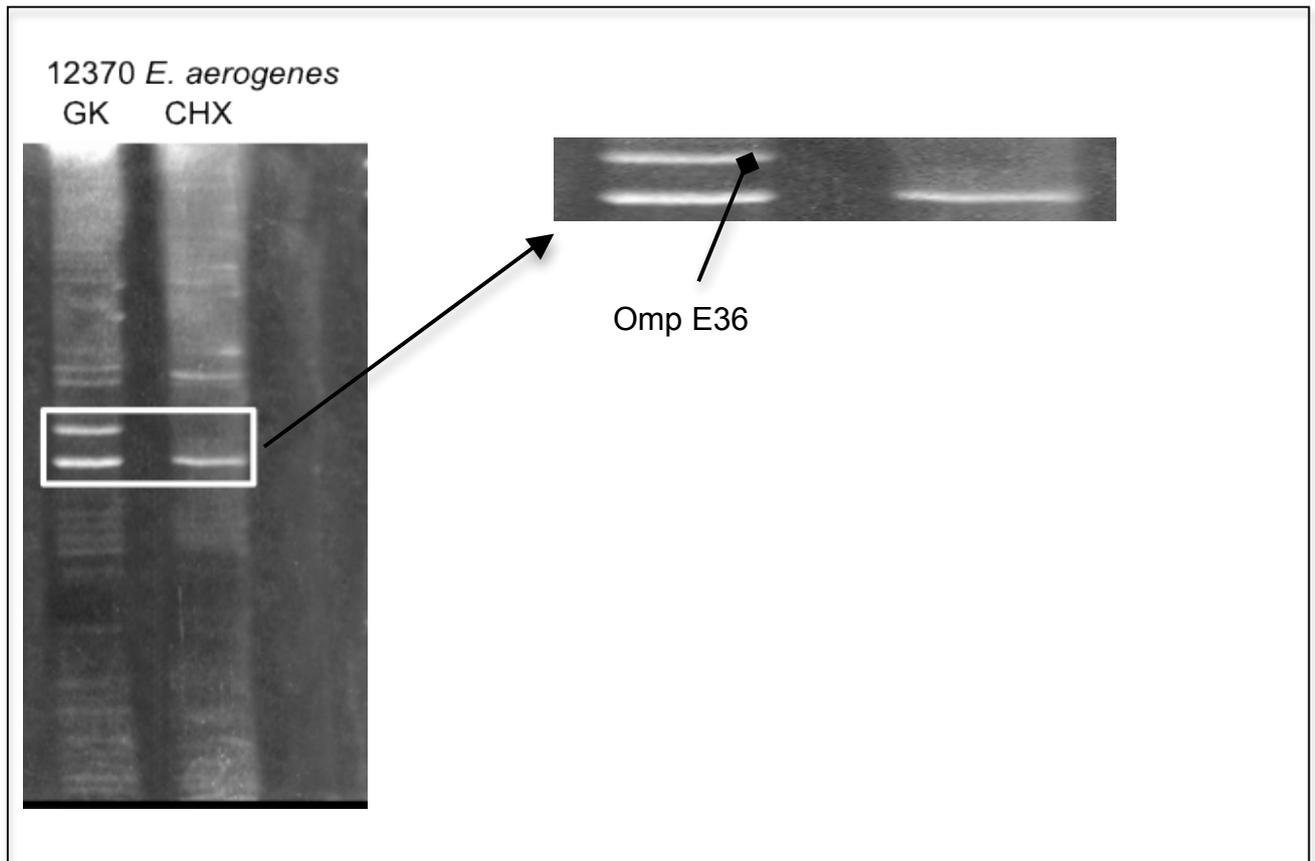


Abb. 23 Proteindifferenzierung *E. aerogenes* 12370

12290 *E. aerogenes*

Eine in der CHX-resistenten Variante im Vergleich zur Grundkultur nicht auffindbare Proteinbande mit einer Größe von 25 kDa konnte in der Biocid-sensiblen Grundkultur als Omp 36 bestimmt werden. Eine nahe beieinander liegende Doppelbande (ca. 37 kDa) der Grundkultur zeigte sich in der CHX-resistenten Variante lediglich als einfache Proteinbande. Die fehlende Bande ließ sich als Flagellin identifizieren. Zusätzlich sehen wir in der BKC-resistenten Variante eine intensiv ausgeprägte Proteinbande (20-25 kDa) welche weder in der Grundkultur noch in der CHX-resistenten Variante zu sehen ist. Diese Proteinbande konnte dem Flaggeli-domain containing protein zugeordnet werden (Abb. 24).

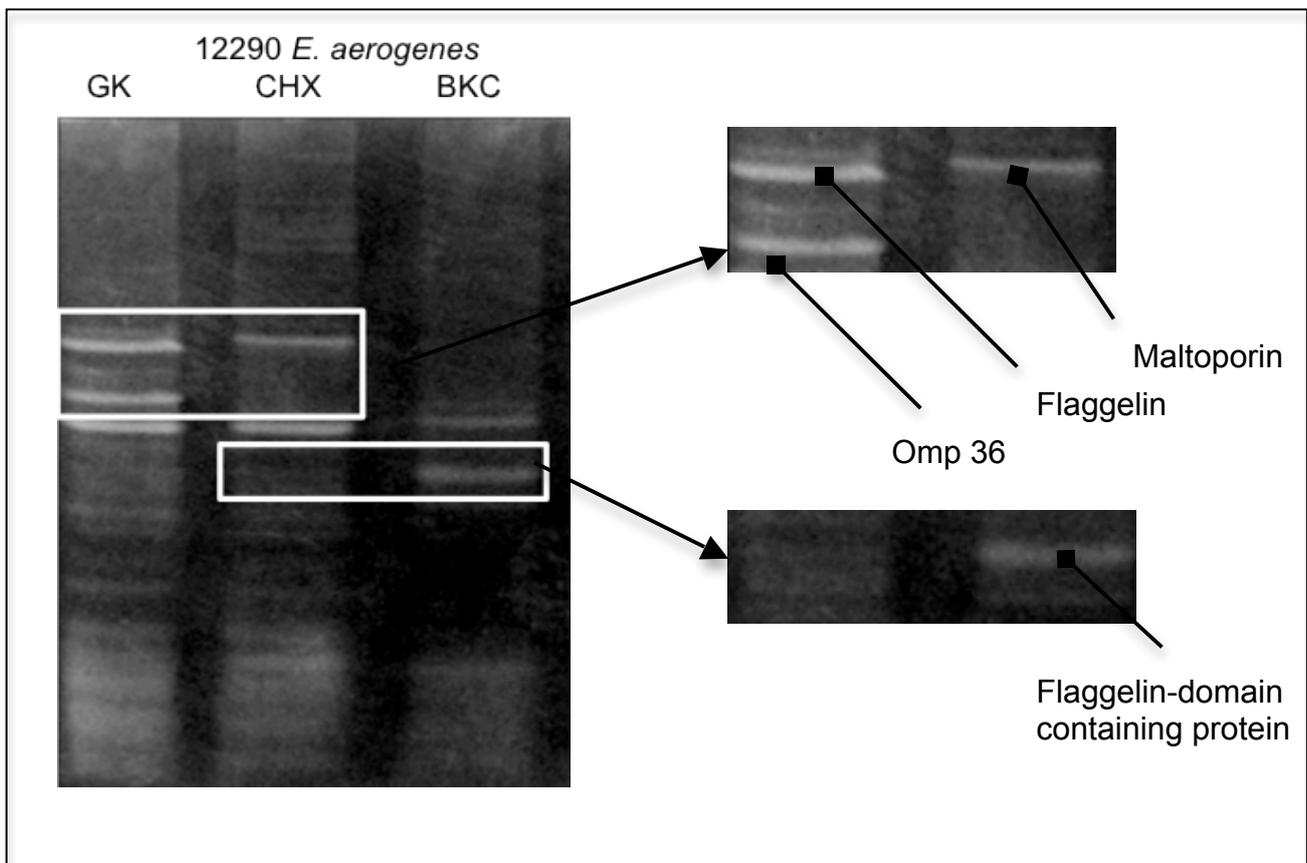


Abb. 24 Proteindifferenzierung *E. aerogenes* 12290

12495 *E. cloacae*

Die Gelelektrophorese der CHX-resistenten Variante des *E. cloacae* 12495 stellte sich im Vergleich mit der Grundkultur mit einer zusätzlichen Proteinbande um 37 kDa dar. Diese konnte dem Flaggelin-domain containing Protein, Omp A zugeordnet werden. Eine weitere Proteinbande (20-25k Da) fehlte der CHX-resistenten Variante, in der Grundkultur wurde diese durch ein Maltoporin hervorgerufen (Abb. 25).

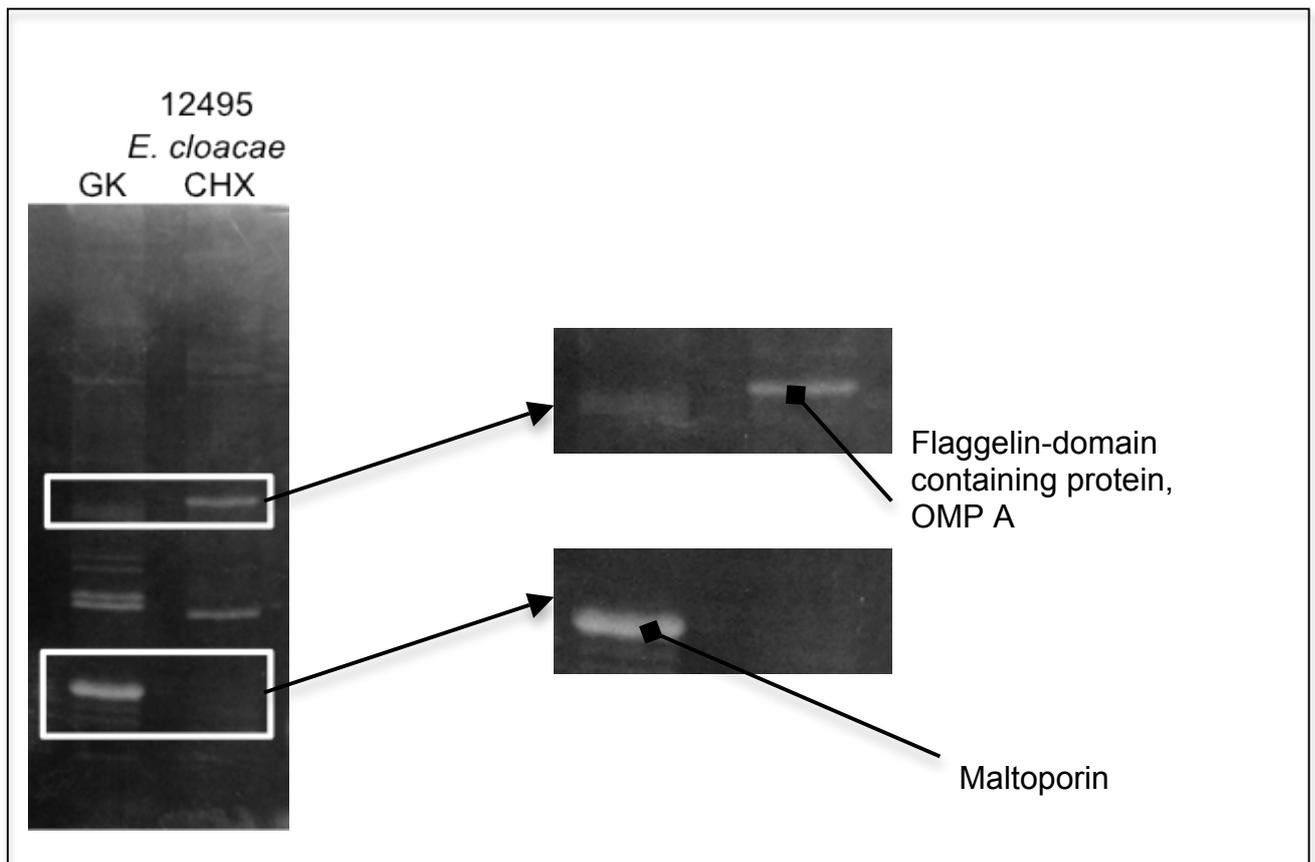


Abb. 25 Proteindifferenzierung *E. cloacae* 12495

5.11 Inhibitionsversuche

5.11.1 Resistenzinhibition durch Phenylarginin-beta-Naphthylamid

Eine initial angenommene Beteiligung der Multi-Drug-Effluxproteine der Resistance-Nodulation-Division-Klasse, Typ OmpA, wurde durch die Verwendung des dafür unspezifischen Hemmstoffes Phenylarginin-beta-Naphthylamid (PAßN) überprüft. Durch die durchgeführten Inhibitionstests konnte in Vorversuchen bei einigen der verwendeten Kulturen von *E. coli* oder *Enterobacter spp.* eine Reduktion um ein bis zwei Konzentrationsstufen der zuvor erzeugten Resistenz gegenüber den Bioziden gesehen werden. Eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ließ sich jedoch nicht dokumentieren. Dieses Resultat war sowohl für Kulturen, deren MHK-Werte für BKC signifikant angestiegen waren, als auch für die Kulturen, deren MHK-Werte für CHX signifikant angestiegen waren, gleichermaßen festzustellen. Für alle verwendeten Kulturen ließen sich auch nach wiederholter Testung und Verlängerung der Inkubationszeiten mit dem Inhibitor keine reproduzierbaren Daten erheben. Auch eine Erhöhung der Konzentration des Inhibitors im Probenansatz um den Faktor 10 bzw. 100 zeigte keine signifikanten Differenzen in den gemessenen MHK-Werten. Zusammenfassend kann man feststellen, dass es durch Zusatz von PAßN in der vorliegenden Arbeit nicht zu einer Resuszeptibilisierung kam.

5.11.2 Resistenzinhibition durch 1- (1-naphtylmethyl) -piperazin

Eine weitere Überprüfung der an den Resistenzmechanismen beteiligten Strukturen erfolgte durch den Inhibitor 1- (1-methylnaphtyl) -piperazin (NMP) [94]. Auch NMP wird die Eigenschaft zugeschrieben, die Funktion von Effluxpumpen des RND-Typs zu blockieren. Analog zu den Versuchen mit PAßN wurde NMP auf eine Inhibitorwirkung hin geprüft.

5.11.3 Inhibition der BKC-Resistenz durch NMP

BKC-resistente Isolate welche unter Hinzugabe von NMP kultiviert wurden zeigten eine deutliche Reduktion ihrer MHK für BKC. Die Inhibitorwirkung von NMP zeigte dabei bei allen Isolaten eine Dosisabhängigkeit. Durch die Hinzugabe von NMP (1280 µg/ml) konnte die zuvor dokumentierte BKC-Resistenz vollständig aufgehoben werden (Tab. 21; Abb 26).

Species	Stamm Nr.	BKC-MHK (µg/ml) ohne NMP	BKC-MHK (µg/ml) mit NMP (1280 µg/ml)
<i>E. coli</i>	12347	160	<5
<i>E. aerogenes</i>	12807II	320	40
<i>E. cloacae</i>	12317II	320	10
<i>E. aerogenes</i>	12290	320	20
<i>E. cloacae</i>	12495	160	10

Tab. 21 BKC-MHK im Vergleich mit und ohne NMP (1280µg/ml)

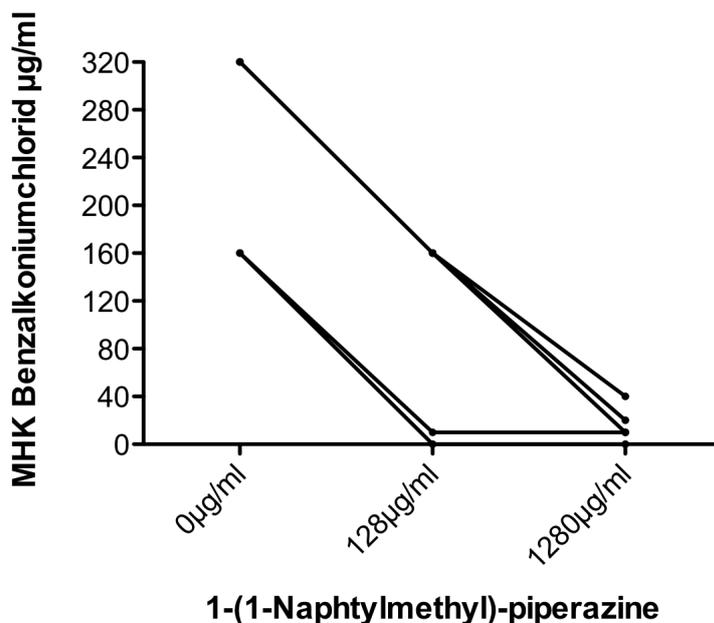


Abb. 26: BKC-MHK in Abhängigkeit der NMP-Konzentration

5.11.4 Inhibition der CHX-Resistenz durch NMP

CHX-resistente Isolate welche unter Hinzugabe von NMP kultiviert wurden zeigten eine deutliche Reduktion ihrer MHK für CHX. Die Inhibitorwirkung von NMP zeigte dabei bei allen Isolaten eine Dosisabhängigkeit. Durch die Hinzugabe von NMP (1280 µg/ml) konnte die zuvor dokumentierte BKC-Resistenz weitestgehend aufgehoben werden (Tab. 22; Abb. 27).

Species	Stamm Nr.	CHX-MHK (µg/ml) ohne NMP	CHX-MHK (µg/ml) mit NMP(1280 µg/ml)
<i>E. cloacae</i>	12455	1280	640
<i>E. aerogenes</i>	12370	1280	40
<i>E. cloacae</i>	12459	1280	640
<i>E. cloacae</i>	12360	1280	320
<i>E. cloacae</i>	12319	1280	160
<i>E. cloacae</i>	12317II	640	320
<i>E. aerogenes</i>	12290	1280	80
<i>E. cloacae</i>	12495	1280	80

Tab. 22 CHX-MHK Im Vergleich mit und ohne NMP (1280 µg/ml)

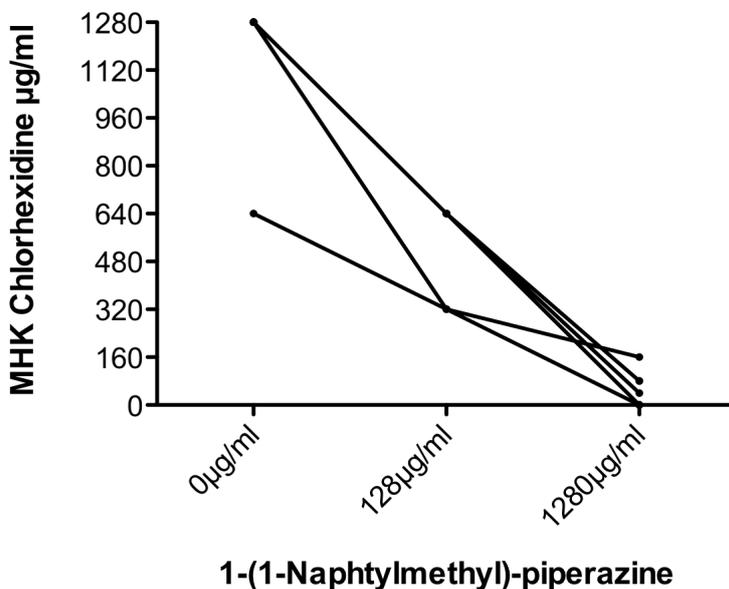


Abb. 27: CHX-MHK in Abhängigkeit der NMP-Konzentration

6 Diskussion

6.1 Anstieg der Rate resistenter Isolate im Screening

Die Ergebnisse der epidemiologischen Untersuchung der vorliegenden Arbeit, im Zusammenhang mit den Zahlen der Voruntersuchungen aus den Jahren 1994 und 2001 gesehen, lassen gut erkennen, dass die Häufigkeit resistenter Isolate einen signifikanten Zuwachs erfahren hat. Innerhalb der letzten elf Jahre hat ein progredienter Anstieg Benzalkoniumchloridresistenter gramnegativer Isolate um den Faktor 10, von 0,4 % (1994) auf 4,8 % (2005) stattgefunden. Für Chlorhexidin-gluconat fand im selben Beobachtungszeitraum eine stabile Resistenzsteigerung um etwa den Faktor 4, von 2,0 % (1994) auf 7,8 % (2005) statt (Tab. 9). Die Ausbildung von Resistenzmechanismen gegenüber potenziell schädlichen äußeren Einflüssen ist eine bekannte Form der Adaptation an eine feindliche Umwelt. Die dazu führenden Mechanismen und Auslöser, sowohl von stabilen und genetisch fixierten als auch von transienten Resistenzen, sind in unterschiedlichem Maße ergründet [95, 96].

Besondere Beachtung sollte denjenigen Erregern beigemessen werden, welche bereits in relevantem Maße klinische Infektionen verursachen. Denn hieraus resultiert nicht nur eine Relevanz für die Gestaltung der antibakteriellen Therapie, sondern auch eine relevante ökonomische Größe. Die steigenden Raten an resistenten gramnegativen Erregern erhöhen nicht nur Mortalität und Verweildauer, sondern ebenso die damit verbundenen Kosten des Krankenhausaufenthaltes [97], dies in einem Gesundheitssystem, in dem bis zu 90 % der stationären Patienten Antibiotika verordnet werden [98]. Der Auswahl des richtigen, respektive in Bezug auf den Erreger wirksamen Antibiotikums kommt dadurch eine herausragende pharmakoökonomische Bedeutung zu. Nicht umsonst entfallen bis zu 50 % des Arzneimittel-etats auf Antibiotika [99]. Eine Untersuchung konnte zeigen, dass intensivmedizinische Patienten ($n = 604$) aus dem operativen Kollektiv mit Infektionen durch resistente gramnegative Erreger eine doppelt so lange Krankenhausverweildauer hatten (29 vs. 13 Tage, $p < .0001$), deutlich mehr Intensivbehandlungstage benötigten (12 vs. 1 Tag, $p < .0001$) und folglich signifikant höhere Kosten verursachten (\$ 80,500 vs. \$ 29,604, $p < .0001$). Der Anteil, der durch die antibiotische Therapie entstandenen Kosten zwischen den beiden Gruppen, unterschied sich dabei um den Faktor 3 [100]. Multiresistente Infektionen sind teuer – und sie sind von zunehmender klinischer Re-

levanz [101, 102]. In der Vergangenheit wurde eine Vielzahl von Spezies mit Resistenzeigenschaften gegenüber Antibiotika beschrieben und diese Entwicklung rückte somit in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Die Daten dieser Arbeit liefern jedoch einen Beleg dafür, dass sich eine weitere Herausforderung auf dem Vormarsch befindet – eine Herausforderung, welche den klinischen Alltag und damit auch die Patienten schon längst erreicht hat: die zunehmende Resistenz gegenüber Bioziden. Zeitgleich konnte diese Arbeit eine relative Stabilität der Häufigkeit von CHX-resistenten Isolaten zwischen den Jahren 2001 und 2005 zeigen. Für diesen Zeitraum konnte nach dem ausgeprägten Anstieg resistenter Isolate zwischen 1994 und 2001 keine weitere Zunahme ihrer Prävalenz gefunden werden (Tab. 9; Abb. 12). Um diesen Umstand zu erklären, bedarf es der Beachtung von Faktoren, die die Entwicklung einer Resistenz beeinflussen können. Hierbei wird der (wiederholten) Exposition gegenüber einer subinhibitorischen Konzentration wiederum eine herausragende Bedeutung zugemessen [67, 103-105]. Faktoren, die eine Einflussgröße auf die Entstehung einer solchen Situation darstellen, lassen sich grob in intrinsische und extrinsische unterteilen. Eine bedeutende Überlegung, welche die Einflussgröße intrinsischer Faktoren beschreibt, ist das sog. „CT-Konzept“. Aus Konzentration („C“ concentration) und Kontaktzeit („T“ time) lässt sich dabei eine Konstante als Maß der Effektivität eines Wirkstoffes ableiten [106]. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass eine Vielfalt an (Anwender-)Fehlermöglichkeiten besteht, welche so zu einem Ungleichgewicht der beiden Größen führt. Extrinsische Faktoren subsumieren wiederum eine Vielfalt von Variablen, wie z. B. Kontaktform, Temperatur oder pH, ebenso wie Populationsspezifika der exponierten Kultur.

Ob zum Beispiel eine striktere Umsetzung von Anwendungsvorschriften mit konsekutiver Vermeidung subletaler Konzentrationen dabei eine Rolle spielt bleibt nur hoffnungsvoll zu vermuten. Eine inadäquate Vorhaltung oder Anwendung der Wirkstoffe stellt jedoch häufig die initiale Vorstufe von Resistenzen dar. In der Arbeit von Prince und Ayliffe konnten sogar aus 53 % der Wirkstoffbehältnisse Erreger kultiviert werden [107-109]. Gleichmaßen ließ sich ein Ausbruch von *Serratia marcescens* auf einer neurochirurgischen Intensivstation direkt auf kontaminierte Hexetidine-Flaschen zurückführen [110] – ein Wirkstoff, der vergleichbar zu CHX bei beatmeten Intensivpatienten zur oralen antiseptischen Behandlung verwendet wird. Die beobachtete Stabilität der Resistenz zwischen 2001 und 2005 könnte also durchaus ihre Begrün-

dung in einer günstigeren Konstellation der intrinsischen und/oder extrinsischen Faktoren haben. Die Kenntnis dieser Stabilität lässt sich allerdings auch als Argument für die Anwendung nehmen.

6.2 Verteilung der resistenten Erreger

Während der Untersuchungen über die taxonomische Verteilung der resistenten Varianten der gramnegativen Erreger zeichnete sich schon früh eine klare Auftrennung ab. Neben *Proteus spp.* erwies sich *Pseudomonas spp.* im direkten Vergleich mit *Enterobacter spp.* und *E. coli* wesentlich häufiger resistent gegenüber den angewendeten Biociden (Tab. 6 bis 8) – ein Ergebnis, das die in der Literatur bereits beschriebene bemerkenswerte Möglichkeit von *Pseudomonas spp.* untermauert, sich während der Exposition mit therapeutischen Konzentrationen von BKC und CHX einen Erhalt und sogar die Expansion der Population zu leisten [111]. In bis zu 84,2% der Fälle sind Pseudomonaden resistent gegenüber CHX [112]. Die dafür verantwortlich gemachten Mechanismen umfassen außer einer Reizantwort der Zellwand mit vermehrter Expression von Lipopolysacchariden und membranassoziierten Proteinen [113] im Fall von Benzalkoniumchlorid eine reduzierte Adsorption aufgrund der negativ geladenen Zelloberfläche und vermutlich einen energiekonsumierenden Transportmechanismus im Sinne einer Effluxpumpe [114]. Sehen wir die Phase der Adsorption als erste und zwingende Prämisse für jede weitere Wirkungsvermittlung im Gefüge des Wirkmechanismus von Bioziden, so erklärt dies die auffällige Resistenz von Pseudomonaden gegenüber CHX und BKC (Abb. 29). *Pseudomonas aeruginosa* zeigt des Weiteren eine intrinsische Resistenz gegenüber CHX, da u. a. ein hoher Gehalt an Mg^{2+} in der äußeren Membran die Bindungen zwischen den Lipopolysacchariden stabilisiert und so eine Aufnahme der Biozide respektive Penetration der Membran reduziert. In der Praxis sollte dies bedeuten, dass Desinfektionsstrategien auf der Basis von BKC- oder CHX in Bereichen mit hoher Prävalenz von *Pseudomonas spp.* kritisch zu sehen sind.

6.3 Einfluss der Nährmedien

Unabhängig von den identifizierten Spezies zeigte sich eine das Wachstum betreffende Diskrepanz zwischen den beiden im Screening verwendeten Nährmedien. Bei einer BKC-Konzentration von 300 $\mu\text{g/ml}$ konnte bei 12,3 % der Proben ($n = 1004$) auf

TSA Wachstum dokumentiert werden (Tab. 4). Gleichzeitig zeigten die identischen Proben unter den gleichen Wachstumsrahmenbedingungen jedoch in nur 3,2 % der Fälle ein Wachstum auf den ISO-Sensitest-Nährböden (Tab. 5). In den durchgeführten Untersuchungen zu CHX zeigte sich diese Tendenz in noch deutlicherer Form mit einem Wachstumsunterschied um den Faktor 80. Die auf die Iso-Sensitest-Nährböden aufgebrauchten Proben zeigten bei äquipotenten Biozidkonzentrationen im Vergleich zu der Gruppe auf TSA-Nährboden unter ansonsten identischen Rahmenbedingungen kein vergleichbares Wachstum (Abb. 10 und 11). Obwohl beide Nährböden für die Resistenztestung geeignet sind, stellen sich laut Herstellerangaben des ISO-Sensitest-Nährbodens besonders vorteilhafte Bedingungen zur Resistenztestung ein. Grundlegend lassen sich mehrere Unterschiede mit einer möglichen Beeinflussung sowohl der verwendeten Erreger als auch der angewandten Biozide zwischen den beiden verwendeten Nährböden ausmachen. An dieser Stelle sei auf die eingangs dieser Arbeit vorgestellten grundlegenden Eigenschaften von BKC und CHX hingewiesen. Für beide Biozide ist bekannt, dass in Anwesenheit von organischer Materie eine Wirkungsabschwächung zu erwarten ist. In welchem Maße diese Wirkungsminderung durch einzelne Substanzen vermittelt wird, ist jedoch noch unklar. Die Überlegung, dass eine der in den Nährböden enthaltenen organischen Verbindungen eine spezifische Interaktion mit einem der Biocide aufweist, erscheint jedoch zunächst plausibel und würde in diesem Zusammenhang dann als extrinsischer Faktor zum Tragen kommen. Weitere Untersuchungen zu dieser Fragestellung sind nötig, um hier eine klare Aussage treffen zu können.

6.4 Bakterizide Wirkung von Chlorhexidin auf *E. coli*

Bei der Analyse der Untergruppen zeigte sich, dass keiner der gescreenten *E. coli*-Isolate in der Lage war, unter den beschriebenen Bedingungen eine Resistenz gegenüber CHX zu entwickeln. Eine Konzentration ab 5 µg/ml erwies sich bei allen isolierten *E. coli*-Proben als suffizient, um Wachstum zu verhindern. Vor dem Bild dieser Beobachtung kann also davon ausgegangen werden, dass CHX schon in geringen Konzentrationen und insbesondere auch bei wiederholter Anwendung ein sicheres und verlässliches Agens zur Desinfektion von mit *E. coli* kontaminierten Flächen darstellt. Die Grundaussage dieser Beobachtung wurde in ähnlicher Form bereits durch Fitzgerald et al. und Thomas in ihren Arbeiten beschrieben [115, 116]. In diesen zeigte sich eine ausgeprägte Wirkung von CHX auf *E. coli*. Zum einem wurde sie durch

eine sehr schnelle (20 s) Aufnahme des Wirkstoffes in die Zelle erklärt, zum anderen erwies sich eine simultane Exposition gegenüber Alkohol bzw. Äthanol als ein die Wirkung des Biozids schon bei geringen CHX-Konzentrationen potenzierender Faktor. Aufgrund der Nutzung von 70-%-Äthanol im Ansatz der CHX-Stocklösungen für die Resistenzinduktionsversuche in der vorliegenden Arbeit muss dies als relevante Einflussgröße in Erwägung gezogen werden. Hierdurch ließe sich möglicherweise auch die deutlich geringere Rate im Vergleich zu anderen Untersuchungen erklären. In diesen betrug der Prozentsatz resistenter Isolate bis zu 12,8% [117]. Der ausgeprägte Effekt lässt sich nunmehr nicht sicher ausschließlich der Wirkung von CHX zuordnen. In welchem Ausmaß der jeweilige Kombinationspartner Äthanol bzw. CHX jedoch für den Wirkeffekt verantwortlich ist, verbleibt ungeklärt. Unter Anwendung einer Äthanol-CHX-Lösung jedoch ist eine effektive Wirkung durch die Ergebnisse dieser Arbeit dokumentiert.

6.5 Resistenzinduktion durch serielle Passagen

Die Möglichkeit, im Labor durch serielle Exposition gegenüber subletalen Konzentrationen von Bioziden eine Steigerung der MHK erzielen zu können, ist bekannt [118-120]. Ebenso stellt die Anwendung der MHK als Marker der Suszeptibilität eine gängige Praxis dar [121]. Es ist anzunehmen, dass die Konzentration des Biocids dabei die bedeutendste Rolle spielt [26]. Eine Konstellation, welche möglicherweise auch in der praktischen Anwendung auftritt, wurde im Versuchsabschnitt der Resistenzinduktion nachempfunden. Hierbei konnten durch serielle Passagen Isolate selektiert werden, welche Konzentrationen von BKC bzw. CHX tolerierten, die durchaus im Anwendungsbereich des jeweiligen Biocids liegen.

6.5.1 Resistenzinduktion gegenüber Chlorhexidine

Bereits nach 30 Passagen zeigten 80 % der untersuchten *Enterobacter-spp.* für CHX eine MHK von 1280 µg/ml (Tab. 10; Abb. 13). Bei Anwendungskonzentrationen von 0,1 % im klinischen Alltag kann somit davon ausgegangen werden, dass es auch in der Praxis auf diesem Wege zu einer relevanten Resistenz kommen kann. Bemerkenswerterweise zeigten die exponierten *E. coli*-Isolate ein hiervon stark abweichendes Verhalten.

In den während dieser Arbeit durchgeführten Resistenzinduktionsversuchen zeigte sich für *E. coli*-Isolate eine ausgesprochene Suszeptibilität gegenüber Chlorhexidin.

Dabei war bereits bei einer Konzentration von 5 µg/ml Chlorhexidinzusatz zu den verwendeten Nährböden kein Kolonienwachstum mehr zu dokumentieren. Selbst geringe Konzentrationen führten also zu einem zuverlässigen Biozideffekt. Ein Ergebnis, welches nun erneut die von Russel beschriebene gute Wirksamkeit von CHX in geringen Konzentrationsbereichen bestätigt [122]. Passend dazu sind ebenfalls die Ergebnisse der Arbeiten von Fitzgerald et al. und Thomas, welche eine zügige Aufnahme dieses Wirkstoffes mit einer konsekutiven Leckage von Kalium und Pentosen unter dem Biozideinfluss für einen Teil der Wirkung verantwortlich machen konnten [115, 116]. Es zeigt sich also abermals, dass die Effektivität der ersten Phase des Gefüges des Wirkungsmechanismus von immenser Bedeutung ist. Analog zu der Resistenz von *Pseudomonas spp.* mit reduzierter Adsorption und daraus resultierender ausgeprägter Resistenz lässt sich bei *E. coli* eine zügige Adsorption und passend dazu eine ausgeprägte Suszeptibilität dokumentieren. Demzufolge ist für *E. coli* davon auszugehen, dass eine Desinfektion mit Chlorhexidin eine sichere und wirksame Methode ist, um keimarme Oberflächen zu generieren.

6.5.2 Resistenzinduktion gegenüber Benzalkoniumchlorid

In den Untersuchungen zur Resistenzinduktion durch und gegenüber Benzalkoniumchlorid stellte sich bemerkenswerterweise ein vergleichbares Muster dar. Von den untersuchten *E. coli*-Isolaten zeigte lediglich eines eine signifikante Steigerung der tolerierten MHK-Stufe. Bei den neun anderen Isolaten ließ sich bei einer MHK über 20 bzw. 40 µg/ml BKC kein kulturelles Wachstum mehr dokumentieren (Tab. 11; Abb. 14). Auch in diesem Fall wäre ein möglicher Rückschluss, dass der Einsatz von Benzalkoniumchlorid in Anwendungskonzentrationen eine ausreichende Effektivität gegenüber *E. coli* beinhaltet. Da für die BKC-Stocklösung lediglich Aqua verwendet wurde, scheidet Äthanol als mögliche Einflussgröße aus. Eine genuine Wirkungsvermittlung allein durch BKC erscheint somit sehr wahrscheinlich.

Analog zu den Untersuchungen für CHX steht auch bei BKC der ausgeprägten Suszeptibilität von *E. coli* die Resistenz von *Enterobacter spp.* gegenüber. Fünf der untersuchten Isolate präsentierten nach dreißig Passagen eine bis um den Faktor 30 gesteigerte MHK. Ein Isolat zeigte Wachstum bei der sechsfachen, eines bei der doppelten MHK. Lediglich ein Isolat zeigte keine Steigerung der Anfangs-MHK von 5 µg/ml. Für ein Isolat konnte jedoch schon bei dieser Konzentration kein Wachstum mehr dargestellt werden (Tab. 12; Abb. 15). Entsprechend wäre eine zurückhaltende

Anwendung von Desinfektionsstrategien mit BKC als Grundlage in Bereichen mit hoher Prävalenz von *Enterobacter spp.* überlegenswert.

6.5.3 Zusammenschau mit den Epidemiologischen Ergebnissen

Durch die wiederholte Anwendung subletaler Konzentrationen von BKC oder CHX konnte bei *Enterobacter spp.* eine Resistenz gegenüber diesen Wirkstoffen in relevanten Konzentrationen erzeugt werden. In diesem Zusammenhang stellt sich nun die Frage, ob es sich hierbei um die Induktion einer Resistenz oder lediglich um die Selektion bereits resistenter Isolate handelt. Da die verwendeten Kulturen der klinischen Routinediagnostik entstammen, lässt sich ein Vergleich mit den Daten der epidemiologischen Untersuchung durchführen. Hierbei wird schnell ersichtlich, dass weder *Enterobacter spp.* (1,1-1,9%) noch *E. coli* (0%) im Screening einen relevanten Anteil an der Population der biozidresistenten Isolate hatten (Tab. 6 bis 8). Demgegenüber steht jedoch eine erfolgreiche MHK-Steigerung von bis zu 90 % der Isolate im Versuchsteil der Resistenzinduktion (Tab. 10 bis 12). Da auch nach einer zehnfachen Passage der resistenten Erreger in Biocidfreier Kultur sich noch immer die stark erhöhten initialen MHK-Werte nachweisen ließen erwies sich diese Resistenz als stabil (Tab. 13 bis 15). Diese Tatsache lässt zeitlich limitierte adaptionsvorgänge unwahrscheinlicher erscheinen. Bei der niedrigen Prävalenz resistenter Isolate im Screening ist eine präexistente Resistenz ebenso unwahrscheinlich. Auf der anderen Seite gilt es jedoch zu beachten, dass die kleine Anzahl der Isolate (n = 40) im Teil der Resistenzinduktionsversuche die Belastbarkeit der Aussage per se infrage stellt. Hierfür sprechen ebenfalls Daten aus Untersuchungen, in denen Isolate trotz relevanter Steigerung der MHK dennoch sensibel gegenüber höheren Anwendungskonzentrationen gewesen sind [123].

6.6 Stabilität der Resistenz

Die Bedeutung der Stabilität einer Resistenz liegt in der sich hieraus ergebenden Relevanz für den klinischen Alltag. Ist ein Erreger nach dem Erwerb von Resistenzmechanismen in der Lage, diese über einen längeren Zeitraum aufrechtzuerhalten, und zwar unabhängig davon, ob ein permanenter Reiz durch ein Biozid oder Antibiotikum besteht, ist anzunehmen, dass dies in den Alltag übersetzt bedeuten würde, dass bereits wenige unachtsam durchgeführte Desinfektionsvorgänge eine dauerhafte Wirkungslosigkeit der subsequenten Anwendungen bewirken. Entsprechend muss da-

von ausgegangen werden, dass durch eine insuffiziente Oberflächendesinfektion dauerhaft resistente Erreger erschaffen werden. Insbesondere die Unabhängigkeit von kulturellen Bedingungen definiert eine „Resistenz“.

Um die Stabilität der Resistenz der hochgeschaukelten Isolate in dieser Arbeit zu überprüfen, wurden diese über mehrere Tage ohne den Zusatz von Bioziden kultiviert und anschließend erneut die MHK bestimmt. Mit MHK-Werten die weiterhin ein Vielfaches der Ausgangs-MHK betragen, als auch über den gängigen Anwendungskonzentrationen lagen (Tab. 13 bis 15) zeigten sich die Erreger nach wie vor resistent. Es bestand also auch nach einem expositionsfreien Zeitraum von zehn Tagen weiterhin eine Resistenz bei erneuter Exposition.

Die zur Resistenz führenden Mechanismen waren in dem Beobachtungszeitraum weiterhin aktiv und sprechen somit dafür, dass nach einem Initial auslösenden Faktor/Induktor keine weitere Persistenz des Stressors notwendig ist, um die funktionelle Folge(n) zu erhalten. Theoretisch könnte also eine einmalige Induktion der Resistenz (-mechanismen) zu einer dauerhaft relevanten Resistenz führen. Weitere Untersuchungen über den Zeitraum, innerhalb welchem eine persistierende Resistenz nachweisbar ist, wären wünschenswert. Möglicherweise lässt sich dadurch ein weiterer Hinweis auf den Mechanismus erhalten.

6.7 Biozidkrezresistenz

Eine signifikante Kreuzresistenz konnte durch die reziproke Exposition der Isolate gegenüber den verwendeten Biociden nicht beobachtet werden. Vor dem Hintergrund der nur in Teilen vergleichbaren Wirkprinzipien von CHX und BKZ entspricht dieses jedoch auch den im Vorfeld gemachten Überlegungen.

6.8 Fermentation und Biozidstress

In den durchgeführten Untersuchungen zu den StoffwechsellLeistungen vor- und nach Biocidstress ließen sich keine einheitlichen Veränderungen beobachten. Mittels Enterotube®-Test zeigte sich, dass 12807II (*E. cloacae*) bereits nach sechs Passagen unter Biozidzusatz im Gegensatz zur Ausgangskultur nicht mehr in der Lage war, Lysin zu verstoffwechseln. Nach sechsfacher Passage konnte sowohl für 12807 II (*E. cloacae*) als auch 12459 (*E. cloacae*) keine Fermentierung von Laktose mehr nach-

gewiesen werden. Bei Probe 12455 (*E. cloacae*) konnte erst nach dem Wirkstoffstress eine Verstoffwechslung von Adonitol, Laktose oder Lysin dokumentiert werden.

Grundsätzlich sind bei einer bakteriellen Anpassungsreaktion Enzymexpression und Proteinexpression bzw. -induktion bekannte Mechanismen [124]. Da sich in der vorliegenden Untersuchung auf eine übersichtliche Anzahl von Reaktionen beschränkt wurde und sich hierbei keine einheitlichen Veränderungen beobachten ließen sind diesbezüglich keine weiterführenden validen Aussagen zu treffen. Zum jetzigen Zeitpunkt ist davon auszugehen, dass die beobachteten Änderungen vor allem im Bereich der Umsetzung von Zuckern als eine unspezifische Reaktion auf den (Biocid-) Stress zu werten sind. Die Überlegung, dass eine strukturelle Veränderung der Zusammensetzung der äußeren Membran, z. B. mit konsekutiv beeinträchtigten Transportvorgängen, auch eine Auswirkung auf die Stoffwechselleistung haben kann, erscheint jedoch gerechtfertigt. Hierzu sind weitere Untersuchungen notwendig.

6.9 Biozidresistenz als Kofaktor für Antibiotikaresistenz

In der Vergangenheit wurde durch Laboruntersuchungen gezeigt, dass eine Biocidresistenz grundsätzlich zu einer relevanten Antibiotikaresistenz führen kann. Dieses gilt sowohl für gramnegative als auch für grampositive Erreger [125-130]. Auch für Benzalkoniumchlorid konnte gezeigt werden, dass nach Resistenzinduktion durch subinhibitorische Konzentrationen von BKC eine *Pseudomonas spp.* (PA-29) stark erhöhte MHK-Werte für Ciprofloxacin und eine Überexpression von MexAB-OprM und MexCD-OprJ aufwies [135]. Die Vorstellung, dass Effluxproteine nur selten hochselektiv den Transport einer einzigen Substanz vermitteln, führte zu weiterführenden Untersuchungen, welche eine durch Efflux bedingte Kreuzresistenz für unterschiedliche Stoffe zeigen konnten [131-133]. Beispielhaft tritt eine Kreuzresistenz bei Erregern nach Triclosanexposition auf [130], welche möglicherweise durch die Expression der Efflux-Pumpe SmeDEF bedingt ist. In einer Untersuchung von Sanchez et al. zeigte sich bei 5 von 12 triclosanresistenten Isolaten im Vergleich zum Wildtyp zum einen eine Antibiotikaresistenz, zum anderen eine vermehrte Expression der Efflux-Pumpe SmeDEF [134].

Dennoch hat es in der Vergangenheit ebenfalls Untersuchungen gegeben, welche nicht in der Lage gewesen sind, eine direkte Verbindung zwischen Biocid- und Antibiotikaresistenz aufzuzeigen [123, 136]. In einer Untersuchung mit grampositiven Isolaten korrelierte eine über den Zeitraum von elf Jahren progrediente Biocidresistenz nicht positiv mit einer entsprechenden Antibiotikaresistenz [137]. Denkbar ist hier ein Einfluss des Gram-Verhaltens, respektive des Aufbaus der Zellwand. Entsprechend der daraus abzuleitenden Annahme, dass Resistenzen nicht exklusiv durch Effluxproteine vermittelt werden, konnte in weiteren Untersuchungen auch eine Veränderung des Targets [138] bzw. eine relative Impermeabilität der Membranstrukturen für die Ausprägung der (Kreuz-) Resistenz verantwortlich gemacht werden [119]. Des Weiteren konnte eine Resistenz auf eine veränderte Zusammensetzung der Proteine und Lipide der Membran zurückgeführt werden [139]. Hier nehmen unterschiedliche Kompositionen bzw. die Expression der Lipopolysaccharide (LPS) Einfluss. LPS-defekte Varianten von *E. coli* fielen dabei in einer Arbeit von Russel im Vergleich zum Wildtyp durch eine besonders hohe Suszeptibilität gegenüber Biociden auf [122]. Auch bei *Proteus spp.* und *Pseudomonaden* scheint eine Veränderung der LPS-Komposition kausal an der Ausprägung von Resistenzen beteiligt zu sein [140, 141]. Als weiterer Mechanismus ist die Induktion von Enzymsystemen denkbar, wie Sie für *Enterobacter spp.* und die Induktion von chromosomal encodierten β -Laktamasen durch Cephalosporine bekannt ist. In der Vergangenheit bewährte sich Cefuroxim als Indikator einer solchen Cefoxitin-induzierten Resistenz [142]. Durch die Bestimmung der MHK für FX und XM vor- und nach der Biocidresistenzinduktion könnte also möglicherweise analog auch ein Rückschluss auf eine Beteiligung von β -Laktamasen an einer Antibiotikaresistenz erhalten werden. In dieser Arbeit zeigt sich allerdings außer der bekannten Resistenz von *Enterobacter spp.* keine relevante Veränderung der Suszeptibilität von *E. coli* oder *Enterobacter spp.* im Anschluss an die Resistenzinduktion mit den verwendeten Biociden. Neben den beschriebenen Veränderungen der spezifischen Kompositionen der Membranbestandteile oder veränderten Targetsites ist auch eine selektionsbedingte genetische Drift zu resistenten Varianten als Erklärung für eine Antibiotikaresistenz denkbar, ein Phänomen, das für *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT 104 beschrieben werden konnte [143]. Eine weitere Möglichkeit der Entstehung einer Kreuzresistenz erklärt sich aus der Tatsache, dass die genetische Information für Resistenzen oftmals auf größeren Informations-elementen, wie Integrons, Transposons oder Plasmiden, vorliegt. Auf diesen bzw. mit

diesen Verbunden können auch weitere Resistenzgene vorhanden sein, so dass es im Falle einer Übertragung oder Selektion zu einer Ausprägung multipler Resistenzen kommen kann. Beispielhaft treffen wir auf eine solche Situation bei den qac-Genen gramnegativer Bakterien. Diese vermitteln eine Resistenz gegenüber quartären Ammoniumverbindungen (QAC's). Häufig liegt jedoch eine Konglomeration mit sul1-Genen vor, sodass es durch Übertragung zu einer subsequenten Sulfonamidresistenz kommt. Es können jedoch auch noch weitere Resistenzgene verbunden bzw. assoziiert sein [144-146].

In Kenntnis der Tatsache, dass eine Exposition unterhalb der bakteriziden Dosis die theoretische Möglichkeit in sich birgt, zu einer (Kreuz-)Resistenz zu führen, stellte sich die Frage, ob es in Bezug auf die in dieser Arbeit dargestellten Biocidresistenz ebenfalls zu einem Einfluss auf die Toleranz gegenüber anderen Stoffen (i. e. Antibiotika) gekommen war. Durch die Überprüfung der MHK von jeweils einem Pärchen aus sensiblem und resistentem isogenen Isolat zeigte sich sowohl für *Enterobacter spp.* als auch für *E. coli*, dass im Vergleich zum Wildtyp vier von sieben BKC-resistenten Isolaten eine gesteigerte MHK für FX und/oder XM präsentierten. Hier lässt sich also eine positive Korrelation zwischen der Biocidresistenz und der gesteigerten MHK für Antibiotika gut darstellen (Tab. 19; Abb. 16 und 17). Allerdings muss auch hier die geringe Anzahl der Isolate beachtet werden. Bezüglich der Überprüfung der MHK für CHX-resistente Isolate konnte keine vergleichbare Korrelation zwischen Biocid- und Antibiotikaresistenz dargestellt werden (Tab. 20). Dass biocidresistente Erreger im Vergleich zum Wildtyp auch eine Antibiotikaresistenz entwickeln können, wird somit durch die Beobachtungen in dieser Arbeit teilweise bestätigt. Zeitgleich lässt sich durch die durchgeführte Untersuchung ebenfalls erkennen, dass es nicht zu einer relevanten Abnahme der gut bekannten Resistenz von *Enterobacter spp.* gegenüber den Cephalosporinen gekommen ist. Welcher Mechanismus der Antibiotikaresistenzentwicklung zugrunde liegt und vor allem ob dieser kausal ist, ist noch unklar und sollte in weiteren Forschungsvorhaben untersucht werden. Aufgrund der vielfältigen Möglichkeiten ist es jedoch naheliegend anzunehmen, dass in Abhängigkeit von Bakterium und Wirkstoff unterschiedliche Mechanismen zum Tragen kommen. In beschriebenen Isolaten mit relevanten Kreuzresistenz zwischen Biociden und Antibiotika dominierten jedoch Effluxpumpen als Mediator der Resistenz [147, 148]. Die gezielte und kritische Anwendung von Biociden und insbesondere von

Benzalkoniumchlorid wird in den nächsten Jahren eine wichtige Präventionsstrategie darstellen. Insbesondere solange der kausale Zusammenhang zwischen spezifischen Antibiotika- und Biocidresistenzen nicht abschließend geklärt ist.

6.10 Inhibition durch Phenylarginin β -Naphthamid

Phenylarginin- β -Naphthamid (PA β N) ist ein Wirkstoff mit inhibierender Wirkung auf bakterielle Effluxpumpen vom RND-Typ. Ein relevanter Effekt durch diesen Wirkmechanismus konnte in der Vergangenheit wiederholt dargestellt werden, [67, 149-152]. Entsprechend der Annahme, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen Effluxpumpen und der beobachteten Resistenz besteht, wurde ein Mikrotiterplatten-Inhibitionsversuch nach der Methode von Lomovskaya durchgeführt [153]. Ein in der Vergangenheit durchgeführter Versuch hatte bereits die von Lomovskaya für *Pseudomonas aeruginosa* beschriebene erfolgreiche Reduktion der MHK auch für *Enterobacter spp.* und *E. coli* andeuten können [154]. In dem Versuch im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch auch nach wiederholter Durchführung und Kontrolle der Proben keinerlei signifikante Reduktion der MHK-Werte erreicht werden. Der zeitgleiche Zusatz von PA β N zu den mit Biozid in Kultur gebrachten Isolaten zeigte keine reproduzierbare Inhibition der Resistenz mit konsekutiver Reduktion der MHK.

Eine mögliche Erklärung wäre, dass PA β N als unspezifischer Inhibitor nicht alle für die Resistenz verantwortlichen Effluxpumpen blockiert, während eine große Anzahl von verschiedenen Effluxproteinen für die Erzeugung der Resistenz verantwortlich ist. Des Weiteren ist zwar bekannt, dass NAP an der Effluxinhibition von Antibiotika beteiligt ist, jedoch gibt es gleichermaßen Untersuchungen, in denen der Nachweis einer relevanten Reduktion der MIC durch Applikation von PA β N nicht gelang [155-157]. Als These wurde bereits der Verdacht geäußert, dass eine Effluxblockade möglicherweise durch PA β N bei bestimmten *Enterobacter spp.* nicht möglich ist [158]. Die unterschiedlichen Ergebnisse der vorliegenden und vorangegangenen Untersuchungen sind kritisch zu bewerten. Die diskrepanten Befunde lassen sich allerdings auf dem Boden der multifaktoriellen Genese von Biocidresistenzen erklären. So besteht die Möglichkeit, dass die aktuell untersuchten Kulturen über zusätzliche Mechanismen verfügen, welche auch nach Inhibitorapplikation noch einen ausreichenden Efflux des Wirkstoffes vermitteln. Da für PA β N eine direkte Inhibition der RND-Typ-Effluxpumpen bekannt ist, könnte hier auch eines der anderen Effluxsysteme eine Rolle spielen.

6.11 Inhibition durch 1- (1-methylnaphtyl) -piperazin

Erst kürzlich wurde NMP von einer Arbeitsgruppe aus Ulm mehrfach als ein wirksamer, jedoch unspezifischer Inhibitor für Transportproteine aus der Klasse der RND-Typ-Effluxpumpen beschrieben [159]. Eine Kenntnis über die genaue Art der Wirkungsvermittlung ist jedoch bis zum heutigen Tage nicht gegeben [160]. Korrespondierend zu diesen Ergebnissen aus Ulm zeigten die zeitgleich mit NMP in Kultur gebrachten Isolate in dieser Arbeit eine signifikante Reduktion der zuvor erlangten Resistenz. Dabei konnte bei einer Konzentration von nur 128 µg/ml NMP bereits eine fünfzigprozentige Reduktion der MHK bei 62,5 % der gegenüber Chlorhexidin resistenten Isolate erreicht werden (Tab. 22; Abb. 27). Bei 12,5 % der Proben zeigte sich sogar eine 75-%-Reduktion der MHK bei dieser Konzentration. In der Gruppe der benzalkoniumchloridresistenten Isolate wurde ebenfalls eine Reduktion der MHK um mindestens 50 % bei 60 % der Isolate beobachtet (Tab. 21; Abb. 26). Da eine substanz eigene biocidale Wirkung von NMP in den verwendeten Konzentrationen im Rahmen des Versuchsaufbaus weitestgehend ausgeschlossen werden konnte, lassen sich die gewonnenen Daten als Beweis für eine zuverlässige Inhibition der Biocidresistenz werten. Durch die Anwendung von NMP in BKC- oder CHX-Suspensionen kann eine signifikante Reduktion der MHK erzeugt werden.

Für *E. coli* und andere *Enterobacteriaceae spp.* ist eine relevante Inhibition der antibiotikaresistenzvermittelnden Efflux-Systeme bekannt [159, 161]. Durch die vorliegende Arbeit konnte nun ebenfalls gezeigt werden, dass für *E. coli* und *Enterobacter spp.*, die eine Resistenz gegenüber CHX oder BKC ausgebildet haben, NMP ein wirksamer Inhibitor der Biozidresistenz ist. Letztlich unverstanden ist jedoch, insbesondere in Kenntnis des Wirkmechanismus (Inhibition der RND-Typ-Effluxpumpe), welcher spezifische Mechanismus dieser Inhibition zugrunde liegt, vor allem in Anbetracht der Tatsache, dass eine Inhibition mittels eines anderen RND-Typ-Effluxinhibitors (NAßP) nicht möglich war. Diesbezüglich kann sich hier der Annahme aus der Arbeit von Gayet et al. angeschlossen werden, dass möglicherweise bestimmte Isolate einer Inhibition durch NAßP nicht zugänglich sind [158]. Alternativ erscheint die Möglichkeit, dass die Wirkung nicht durch ein RND-Typ-Effluxsystem vermittelt wird, in Anbetracht der zuverlässigen Wirkung von NMP, nicht sehr wahrscheinlich. Vor dem Bild der in der Literatur beschriebenen guten Wirksamkeit auf den RND-Typ-Efflux beider Chemikalien ist das aktuelle Ergebnis in der Interpretati-

on jedoch schwierig. Möglicherweise besteht eine unterschiedliche Selektivität der Inhibitoren innerhalb der RND-Typ-Effluxpumpen, sodass sich hierüber die ausgeprägte Differenz erklärt.

6.12 Bestimmung der Proteindifferenzen des SDS-Gels

Vor dem Bild der besonders deutlich ausgeprägten Resistenz einiger Isolate wurde eine 2%-SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Analyse der relevanten Banden durchgeführt. Ziel dabei war es, einen möglichen Angriffspunkt für die Inhibitoren zu isolieren oder aber einen Bezugspunkt zu identifizieren, welcher die Resistenz vermittelt. Eine mit dem MALDI-TOF-Verfahren durchgeführte Identifikation der Proteinfractionen verlief ohne signifikante Ergebnisse. Keines der isolierten Proteine konnte einen Mowse-Score >75 erreichen. Dementsprechend waren also die generierten Ergebnisse nicht mit einer ausreichenden Wahrscheinlichkeit einem einzelnen Protein respektive Genprodukt zuzuordnen. Unter der Annahme, dass bei den deutlichen Unterschieden in den Banden im SDS-Gel dennoch eine Aussage über deren Zugehörigkeit möglich sein müsste, erfolgte eine Tandem-Massenspektrometrie unter dem Aspekt, dass es sich bei den entsprechenden Proteinextrakten um eine komplexe Matrix handelt. Unter Anwendung dieser Methode ließen sich neben Flagellinen und Maltoporinen sogenannte Outer-Membrane-Proteine (OMP) nachweisen. Insbesondere bei den als resistent eingestuftten Isolaten konnten diese als zusätzliche oder vermehrt exprimierte Proteine gefunden werden.

6.12.1 Flagellin

Eine reduzierte Expression von Flagellin konnte bereits durch abteilungseigene Arbeiten zu diesem Thema im Vorfeld gezeigt werden. Eine spezifische und resistenzbezogene Vermittlung von Transport- oder Stoffwechsellleistungen ist für Flagellin bislang nicht bekannt. Dieses Ergebnis lässt sich somit am ehesten im Rahmen einer unspezifischen Reaktion auf äußere Stressoren erklären [67]. Auf einen kausalen durch Flagelline vermittelten Resistenzmechanismus liefert auch diese Arbeit keinen Hinweis.

6.12.2 Maltoporin

Maltoporine sind Proteinstrukturen im Bereich der äußeren Membran von Enterobacteriaceae. Die genetische Information liegt auf dem LamB-Gen. Durch ihre Struktur vermitteln sie den Transport von Maltooligosacchariden über die äußere Membran hinweg und lassen sich durch Maltose induzieren [162, 163]. Maltoporinen konnte in der Vergangenheit jedoch auch eine Assoziation mit antibiotikaresistenten Varianten von *Enterobacter spp.* nachgewiesen werden. Hierbei ließ sich eine stark vermehrte Expression bei resistenten Isolaten dokumentieren [158]. Für Biocide ist bislang lediglich die Annahme geäußert worden, dass ein Zusammenhang mit einer erhöhten Lösungsmitteltoleranz von *E. coli* und einer vermehrten LamB-Expression besteht, dieses allerdings nur als Teil eines komplexen Gefüges [164].

In der vorliegenden Arbeit bestätigte sich die Annahme einer Beteiligung von Maltoporinen an einer Biocidresistenz lediglich bei der Proben-Nr. 12290. Diese zeigte in der CHX-resistenten Variante eine deutlichere Expression von Maltoporin (Abb. 24). Dem gegenüber steht jedoch der fehlende Nachweis von Maltoporin bei der Proben-Nr. 12495 in der CHX-resistenten Variante (Abb 25). Somit lassen diese uneinheitlichen Ergebnisse nicht die Aussage einer kausalen Beteiligung von Maltoporin an der Biocidresistenz zu. Es wird sowohl für antibiotika- als auch für lösungsmittel- bzw. biozidresistente Isolate in Betracht gezogen, dass ein Teil funktioneller Resistenzen durch Alterationen der Maltoporine vermittelt werden. Ein wissenschaftlicher Beweis konnte bislang jedoch noch nicht erbracht werden.

6.12.3 OMP

Für die empfindlichen zytoplasmatischen Bestandteile des bakteriellen Organismus fungiert die umgebende Zellmembran als Schutzbarriere. Um jedoch einen Stoffaustausch mit der Umwelt zu ermöglichen, befinden sich in der Membran gramnegativer als auch grampositiver Bakterien u. a. Proteinstrukturen in Form von hydrophilen Kanälen, sogenannte Outer-Membrane-Proteine. Mit Bezug auf ihre Funktion lassen sich hierbei zwei Klassen mit unspezifischer oder spezifischer Transportfunktion unterscheiden. Sie können als eigenständiger Proteinkomplex, oder als komplexes System in Verbindung mit Membrane-Fusion-Proteinen (MFP) und transportsystemen der inneren Membran vorkommen und efflux systeme formieren [79, 165]. Diese vermitteln u. a. die Aufnahme von (Nähr-) Stoffen über die äußere Membran gram-

negativer Bakterien [166]. Für OMP's bestehen jedoch auch Hinweise in der Literatur, dass sie im Rahmen ihrer Funktion ebenfalls eine Form von Efflux mit Resistenz als funktionelles Ergebnis vermitteln [158, 167]. Aggeler et al. beschrieben in dieser Beziehung eine reduzierte Expression von OmpA im Zusammenhang mit antibiotikaresistenten Varianten von *Enterobacter spp.* [168]. Auch andere Untersuchungen zeigten bei *Enterobacter spp.* und *E. coli* einen Zusammenhang mit einer Alteration in der Porinexpression und Resistenz [169-171]. Für *E. coli* ist eine Vielzahl von Porinen identifiziert worden (u. a. OmpC, OmpF, PhoE), eine vermehrte Expression von Outer-Membrane-Proteinen bei benzalkoniumchloridresistenten Varianten ist ebenfalls bekannt [67]. Für *Pseudomonas aeruginosa* besteht gleichermaßen ein Kenntnis von unterschiedlichen Membranproteinen, die als Porine fungieren (OprF, OprP, OprB, OprD, OprC, OprE) [172]. Die im Jahre 2000 veröffentlichte Arbeit von Winder et al. konnte diesbezüglich eine Abhängigkeit der künstlich erzeugten Resistenz von *Pseudomonas aeruginosa* gegenüber Isothiazolonen von der Existenz des T-OMP zeigen [173].

In der Analyse der verwendeten Proben dieser Arbeit zeigten sich auffällige Differenzen in der Expression von Omp-(E)36, OmpA/36 und OmpX. Dabei wiesen zwei der insgesamt neun gegenüber Chlorhexidin resistenten *Enterobacter spp.* im Anschluss an die Resistenzinduktion den Verlust von Banden im Größenbereich von 25-37 kD auf (Abb. 23 und 24). In der Differenzierung konnten diese Banden bei der Ausgangskultur als Omp-(E)36 identifiziert werden. Bei den Proben 12290/12495 ließ sich erkennen, dass eine deutlich reduzierte Expression vorlag bzw. in der Analyse der chlorhexidinresistenten Varianten der Nachweis von Omp-(A/36) nicht gelang. Isolat 12317II wiederum zeigte in der CHX-resistenten Variante eine stark vermehrte Expression von OmpX (Abb. 22). OmpX ist ein Protein der äußeren Membran gramnegativer Bakterien. Neben einer Rolle in der Zellinvasion und Zelladhärenz wurde in der Literatur eine vermehrte Expression in Zusammenhang mit Umweltstress, aber auch mit Antibiotikaresistenz bei *Enterobacter spp.* beschrieben [174, 175]. Es wird angenommen, dass die konsekutiv veränderte Membranzusammensetzung die Penetration der Zellwand durch das Antibiotikum beeinträchtigt und auf diesem Wege die Resistenz vermittelt [176]. Begleitend besteht eine Korrelation zwischen der vermehrten Expression von OmpX, der folgend reduzierten Expression von Omp36 und einer β -Lactamresistenz [177]. Bei den Isolaten 12317II und 12370 ließ sich diese invers

korrelierte Assoziation der Expression von OmpX und Omp36 möglicherweise ebenfalls darstellen. Probe 12317II exprimierte OmpX in der CHX-resistenten Variante, ohne jedoch im Bereich der bei Probe 12370 als Omp36 identifiziertem Proteinbande über eine Bande zu verfügen (Abb. 22 und 23). Im Unterschied zu den anderen Arbeiten bestand jedoch gleichzeitig eine relevante Resistenz gegenüber CHX. Es lässt sich somit vermuten, dass analog zur Antibiotikaresistenz auch bei Biocid- bzw. CHX-resistenten *Enterobacter spp.* OmpX bzw. Omp36 eine Rolle in der Wirkungsvermittlung spielen – ob kausal oder reaktiv lässt sich allerdings ohne weitere Untersuchungen nicht sagen, zumal in der Arbeit von Dupont et al. die Möglichkeit in Betracht gezogen wurde, dass es sich um eine erste (unspezifische) Reaktion auf einen Stressor und somit nicht unbedingt um einen kausalen Resistenzmechanismus handeln muss [176].

Im Rahmen der Transporterfunktion der OMP erscheint eine Resistenz durch reduzierte Aufnahme über die äußere Membran aufgrund einer reduzierten Anzahl der vorhandenen Transporter jedoch naheliegend und wurde z. B. für methylochloisothiazolonresistente Pseudomonaden auch so beschrieben [178]. Möglicherweise ist dies jedoch nicht der einzige kausale Faktor, sondern lediglich für einen Teil der Resistenz verantwortlich. Diese Annahme bestätigte sich in den Untersuchungen von Nikaido et al., welche sowohl Efflux als auch OMP-alteration verantwortlich machten [179]. Vorausgesetzt, es kommt nicht zu einer Aktivitätssteigerung anderer Transportsysteme, welche funktionell die fehlenden OM-Proteine kompensieren, kann von einer geringeren Wirkstoffaufnahme und somit reduzierten Wirkungsvermittlung durch die quantitative Veränderung der Porine (i. e. Resistenz) ausgegangen werden [180]. Vor dem Bild des engen Zusammenhangs von Porinen bzw. deren reduzierter Expression und einer Antibiotikaresistenz ist in der Zusammenschau der Ergebnisse und der vergleichbaren initialen Mechanismen der Wirkungsvermittlung die Annahme gerechtfertigt, dass auch eine Biozidresistenz gegenüber CHX/BKC durch die alterierte Expression von OMP (teil-) vermittelt wird. Aus der durchgeführten Proteinbestimmung ergab sich jedoch nicht die Identifikation eines singulären Proteins, welches hochwahrscheinlich, ausschließlich oder überwiegend für die Vermittlung der Resistenz verantwortlich zeichnet. Es bestätigten sich jedoch die für Antibiotika und z. T. auch für Biozide erbrachten Hinweise, dass eine Alteration der OMP's an der Ausprägung der Biozidresistenz beteiligt ist. Zum aktuellen Zeitpunkt ist entspre-

chend weiterhin von einer multifaktoriellen Genese auszugehen, deren weitere Bestandteile und vor allem Gewichtung noch ungeklärt sind.

7 Zusammenfassung

Durch diese Arbeit konnte gezeigt werden, dass es in den vergangenen Jahren zu einer deutlichen Zunahme biocidresistenter Varianten gramnegativer Species insbesondere gegenüber Benzalkoniumchlorid gekommen ist. Durch Exposition gegenüber subletalen Konzentrationen konnte diese Resistenz bei *E. coli* und *Enterobacter spp.* unter Versuchsbedingungen innerhalb eines kurzen Zeitraumes künstlich erzeugt und deren Stabilität auch in wirkstofffreier Umgebung nachgewiesen werden. Ursächlich hierfür ist möglicherweise ein multifaktorielles Geschehen durch eine Veränderung der Membranstruktur, insbesondere der exprimierten Proteine der äußeren Membran. Diese Proteine formieren als tripartiter Komplex Efflux Systeme, welche bekannterweise bereits Antibiotikaresistenzen und auch Biocidresistenzen vermitteln. Vor dem Bild der epidemiologischen Ergebnisse ist davon auszugehen, dass bereits heute für einen Teil der Erreger auch die empfohlenen Anwendungskonzentrationen der handelsüblichen Biocide nicht ausreichend wirksam sind. Es gilt also, neue und innovative Strategien zu entwickeln. Neben bereits implementierten Maßnahmen, wie Surveillance-Systemen, zur Berücksichtigung lokaler Resistenzmuster im Fall von Antibiotikaresistenzen, sollten auch Additiva in Form von Effluxinhibitoren in das Armamentarium aufgenommen werden. Für Antibiotika ist der Zusatz von Inhibitoren, z. B. gegenüber Penicillinase, gängige Praxis. Durch diese Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine vergleichbare Strategie auch für biocidresistente gramnegative Erreger zum Erfolg führen könnte. Hierbei hat sich 1- (1-methylnaphtyl) -piperazin als potenter Wirkstoff erwiesen. Um eine sichere Anwendung im medizinischen Bereich bzw. am Menschen zu gewährleisten, sind weitere Untersuchungen notwendig.

Solange bei fortschreitender Prävalenz der Biozidresistenz zuverlässige und klinisch anwendungsbereite Inhibitoren fehlen, liegt die Kernbedeutung der Kenntnis des Problems in einer verantwortungsbewussten, sorgfältigen und den jeweiligen Resistenzspektren angepassten Desinfektionsstrategie. Im Vordergrund steht dabei die Anwendung von Biociden in einer ausreichend hohen Konzentration und Einwirkdauer. Wie auch bei zunehmender Antibiotikaresistenz mit Surveillance-Systemen den lokalen Gegebenheiten begegnet wurde, wäre eine Implementierung vergleichbarer Konzepte für die Desinfektion und Antiseptik wünschenswert.

8 Anhang

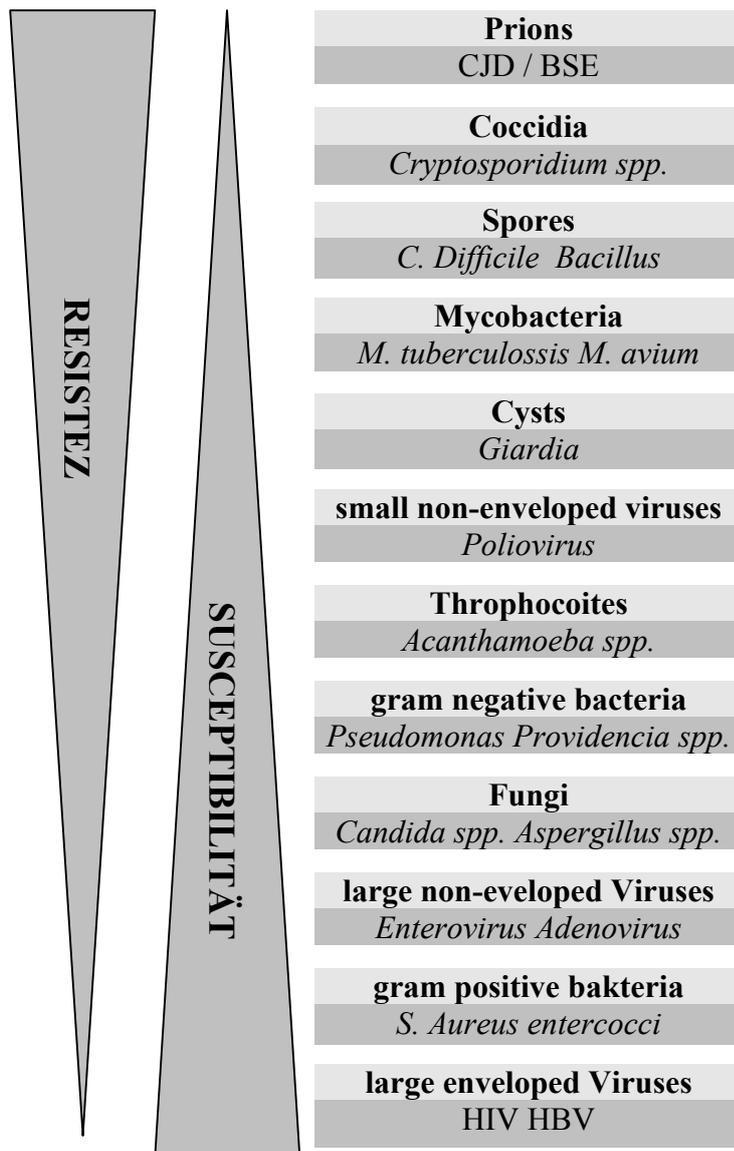


Abb. 28: Einteilung der Mikroorganismen im Bezug auf ihre Suszeptibilität gegenüber Bioziden

CJD: Creutzfeldt-Jakob-Disease, BSE: Bovine spongiforme Encephalopathy, HIV: Humanes Immundefizienz-Virus, HBV: Hepatitis-B-Virus. Resistenz hier als intrinsische Widerstandsfähigkeit

Darstellung adaptiert nach Russel et al. (1997)

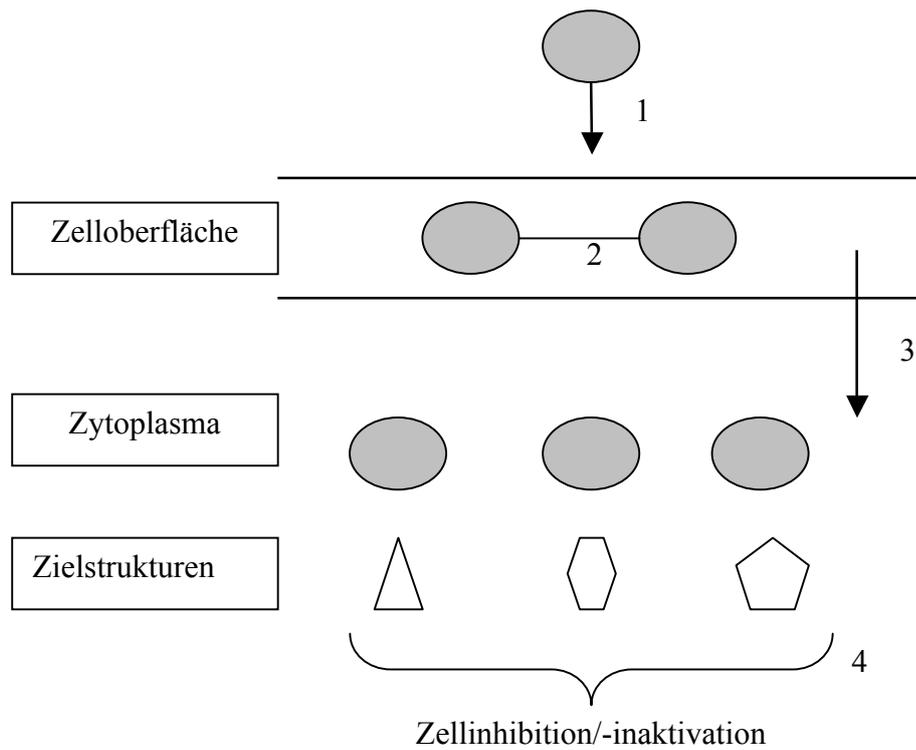


Abb. 29: Eintritt von Bioziden in Mikroorganismen, verallgemeinert:

1. Adsorption an der Zelloberfläche
2. Interaktion mit den äußeren Zellschichten
3. Aufnahme in die Zelle
4. Zielinteraktion

Darstellung übernommen von Russel, A. D., 2003

9 Literaturverzeichnis

1. Homer. Ilias. Vol. XI:597-848.
2. Hübner N-O. Experimentelle Untersuchungen zur Verbesserung der chirurgischen Händedesinfektion. Greifswald : Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität, **2004**.
3. Mochmann H, Köhler W. Meilensteine der Bakteriologie. 2 ed. Frankfurt am Main, **1997**.
4. Nutton V. The seeds of disease: an explanation of contagion and infection from the greeks to the renaissance. *Medical History*, **1983**;27:1-34.
5. Schipperges H, Linder F. 1 century antiseptis and asepsis. In memory of Lord Lister. *Chirurg* **1967**;38(4):149-53.
6. Alexander JW. The contributions of infection control to a century of surgical progress. *American Journal of Infection Control* **1985**;13(6):282-3.
7. Dunn PM. Ignac Semmelweis (1818-1865) of Budapest and the prevention of puerperal fever. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **2005** July 1, 2005;90(4):F345-8.
8. Carter K. Semmelweis and his predecessors. *Med Hist* **1981**;25(1):57-72.
9. Hanninen O, Farago M, Monos E. Semmelweis' discovery and its Finnish follow-up. *Acta Physiol Hung* **2003**;90(2):83-95.
10. Best M, Neuhauser D. Ignaz Semmelweis and the birth of infection control. *Qual Saf Health Care* **2004** June 1, 2004;13(3):233-4.
11. Lister J. On the antiseptic principle in the practice of surgery. *The Lancet* **1867**;90(2299):353-6.
12. Lister J. On The Effects Of The Antiseptic System Of Treatment Upon The Salubrity Of a Surgical Hospital. *The Lancet* **1870**;95(2418):4-6.
13. Lister J. The antiseptic system and a new method of treating compound fracture, abscess, etc. *Lancet* **1867**;1(326):257, 387, 507.
14. van den Heuvel M. Hygiene und Desinfektion in Klinik und Haushalt - eine Einführung. Neuherberg: GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, **2004**.

15. Brady MJ, Lisay CM, Yurkovetskiy AV, Sawan SP. Persistent silver disinfectant for the environmental control of pathogenic bacteria. *Am J Infect Control* **2003** Jun;31(4):208-14.
16. Zabbia V. [Use of chlorhexidine in surgery]. *Minerva Chir* **1977** Oct 31;32(20):1297-9.
17. Favero MS. Products containing biocides: perceptions and realities. *J Appl Microbiol* **2002**;92 Suppl:72S-7S.
18. Schuster A, Daschner F. Antibakterielle Produkte im Haushalt: Chance oder Risiko? *Dtsch Med Wochenschr* **2002** 14.5.2002;127:2340-4.
19. Aiello AE, Larson EL. An analysis of 6 decades of hygiene-related advertising: 1940-2000. *American Journal of Infection Control* **2001**;29(6):383-8.
20. RKI. Liste der vom Robert Koch-Institut geprüften und anerkannten Desinfektionsmittel und -verfahren1. Berlin: Robert Koch Institut, **2003**.
21. Sonntag H-G, Hingst V. *Ökologisches Stoffgebiet*. Stuttgart: Hippokrates Verlag im Thieme Verlag, **1999**.
22. McMurry LM, Oethinger M, Levy SB. Triclosan targets lipid synthesis. *Nature* **1998**;394(6693):531-2.
23. Maris P. Modes of action of disinfectants. *Rev Sci Tech* **1995**;14(1):47-55.
24. Russell AD. Mechanisms of antimicrobial action of antiseptics and disinfectants: an increasingly important area of investigation. *J Antimicrob Chemother* **2002** April 1, 2002;49(4):597-9.
25. Maillard JY. Bacterial target sites for biocide action. *J Appl Microbiol* **2002**;92 Suppl:16S-27S.
26. Russell ADM, G. Concentration: a major factor in studying biocidal action. *Journal of Hospital Infection* **2000**;44:1-3.
27. Russell AD. Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. *Journal of Hospital Infection* **1999**;43(Supplement 1):S57-S68.
28. Gilbert P, Pemberton D, DE. W. Barrier properties of the gram-negative cell envelope towards high molecular weight polyhexamethylene biguanides. *J Appl Bacteriol* **1990**;69(4):585-92.
29. Russell AD, Gould GW. Resistance of Enterobacteriaceae to preservatives and disinfectants. *Journal of Applied Bacteriology Symposium* **1988**;17:167S-95S. .

30. Renton-Harper P, Addy M, Moran J, Doherty FM, RG. N. A comparison of chlorhexidine, cetylpyridinium chloride, triclosan, and C31G mouthrinse products for plaque inhibition. *J Periodontol* **1996**;67(5):486-9. .
31. Matthijs S, Adriaens PA. Chlorhexidine varnishes: a review. *Journal of Clinical Periodontology* **2002**;29(1):1-8.
32. Loe H, Rindom Schiott C. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *Journal of Periodontal Research* **1970**;5(2):79-83.
33. Larsoni EL, Laughon BE. Comparison of Four Antiseptic Products Containing Chlorhexidine Gluconate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **1987**;31(10):1572-4.
34. Ruschulte H, Franke M, Gastmeier P, et al. Prevention of central venous catheter related infections with chlorhexidine gluconate impregnated wound dressings: a randomized controlled trial. *Ann Hematol* **2009** Mar;88(3):267-72.
35. Vokurka S, Kabatova-Maxova K, Skardova J, Bystricka E. Antimicrobial chlorhexidine/silver sulfadiazine-coated central venous catheters versus those uncoated in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Supportive care in cancer* **2009** Feb;17(2):145-51.
36. Chaiyakunapruk N, Veenstra DL, Lipsky BA, Saint S. Chlorhexidine compared with povidone-iodine solution for vascular catheter-site care: a meta-analysis. *Ann Intern Med* **2002** Jun 4;136(11):792-801.
37. Sheppard FC, Mason DJ, Bloomfield SF, Gant VA. Flow cytometric analysis of chlorhexidine action. *FEMS Microbiology Letters* **1997**;154(2):283-8.
38. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clin Microbiol Rev* **1999** January 1, 1999;12(1):147-79.
39. Kuyyakanond T, Quesnel LB. The mechanism of action of chlorhexidine. *FEMS Microbiology Letters* **1992**;100(1-3):211-5.
40. Gilbert P, Moore LE. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *Journal of Applied Microbiology* **2005**;99(4):703-15.
41. Davies A. The mode of action of chlorhexidine. *J Periodontal Res Suppl* **1973**;12:68-75.
42. Chopra I. *Microbial resistance to veterinary disinfectants and antiseptics*. Oxford: Blackwell Scientific Publications Ltd, **1987**.

43. Barrett-Bee K, Newbould L, Edwards S. The membrane destabilising action of the antibacterial agent chlorhexidine. *FEMS Microbiology Letters* **1994**;119(1-2):249-53.
44. Fitzgerald KA, Davies A, Russell AD. Uptake of ¹⁴C-chlorhexidine diacetate to *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* and its release by azolectin. *FEMS Microbiology Letters* **1989**;60(3):327-32.
45. Russell AD, Path FRC. Chlorhexidine: Antibacterial action and bacterial resistance. *Infection* **1986**;V14(5):212-5.
46. Hennessey TD. Antibacterial properties of Hibitane. *Journal of Clinical Periodontology* **1977**;4(5):36-48.
47. Kampf G, Kramer A. Epidemiologic Background of Hand Hygiene and Evaluation of the Most Important Agents for Scrubs and Rubs. *Clin Microbiol Rev* **2004** October 1, 2004;17(4):863-93.
48. Castillo JA, Clapes P, Infante MR, Comas J, Manresa A. Comparative study of the antimicrobial activity of bis(N{alpha}-caproyl-L-arginine)-1,3-propanediamine dihydrochloride and chlorhexidine dihydrochloride against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* **2006** April 1, 2006;57(4):691-8.
49. Jeker L, Zeeb M, Moccetti B, Campana A. 12. Benzalkoniumchlorid als lokales Verhütungsmittel. *Archives of Gynecology and Obstetrics* **1986**;239(3):218-22.
50. Russell AD. Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* () , 750–763 **2003** 30 September;52(Advance Access publication):750–63.
51. Grant RL, Acosta D. Prolonged Adverse Effects of Benzalkonium Chloride and Sodium Dodecyl Sulfate in a Primary Culture System of Rabbit Corneal Epithelial Cells. *Fundamental and Applied Toxicology* **1996**;33(1):71-82.
52. Schloz M. In vitro-Permeationsstudien von hydrophilen und lipophilen Arzneistoffen an okularen Geweben und Zellkulturen [Dissertation]. Berlin: Humboldt-Universität, **2003**.
53. Russell* AD. Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* () , 750–763 **2003** 30 September;52(Advance Access publication):750–63.
54. Russell AD. Bacterial spores and chemical sporicidal agents. *Clin Microbiol Rev* **1990**;3(2):9-119.
55. Timenetsky J. [Microbiological evaluation of chemical disinfectants for household use]. *Rev Saude Publica* **1990** Feb;24(1):47-50.

56. Sufya N, Allison DG, Gilbert P. Clonal variation in maximum specific growth rate and susceptibility towards antimicrobials. *J Appl Microbiol* **2003**;95(6):1261-7.
57. Hegstad K, Langsrud S, Lunestad BT, Scheie AA, Sunde M, Yazdankhah SP. Does the wide use of quaternary ammonium compounds enhance the selection and spread of antimicrobial resistance and thus threaten our health? *Microb Drug Resist* **2010** Jun;16(2):91-104.
58. Sheldon AT, Jr. Antiseptic "resistance": real or perceived threat? *Clin Infect Dis* **2005** Jun 1;40(11):1650-6.
59. Kresken K, Hafner D. Prävalenz der Antibiotikaresistenz bei klinisch wichtigen Infektionserregern in Mitteleuropa: Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie, **1999**.
60. Saubolle MA. Antimicrobial resistance: Current status and future direction. *American Journal of Rhinology* **2006**;20:667-71.
61. Meyer -E, Schwab -F, Gastmeier -P, Rueden -H, Daschner -FD. Surveillance of Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance in German Intensive Care Units (SARI): A Summary of the Data from 2001 through 2004. *Infection* **2006**:303-9.
62. Kresken M, Hafner D. Studiengruppe Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Chemotherapeutika in Mitteleuropa. Ergebnisse einer multizentrischen Studie der Arbeitsgemeinschaft Resistenz in der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e. V. aus dem Jahre 1998. *Chemotherapie J* **2000**;9:51-86.
63. Kaulfers P-M. Epidemiology and reasons for microbial resistance to biocides. *Zentralbl Hyg Umweltmed* **1995**;197(1-3):252-9.
64. Kummerle N, Feucht HH, Kaulfers PM. Plasmid-mediated formaldehyde resistance in *Escherichia coli*: characterization of resistance gene. *Antimicrob Agents Chemother* **1996** October 1, 1996;40(10):2276-9.
65. Beckwermert R. Keimzelle Krankenhaus. *Tagesspiegel*. **2008** 15.01.2008.
66. Morita Y, Murata T, Mima T, et al. Induction of mexCD-oprJ operon for a multidrug efflux pump by disinfectants in wild-type *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Antimicrob Chemother* **2003** Apr;51(4):991-4.
67. Kaulfers PM, Sherpe S. Adaptional resistance mechanisms of Enterobacteria to benzalkonium chloride and their influence on sensitivity to antibiotics. *Institut für Infektionsmedizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf*, **2004**:17.
68. Mangalappalli-Illathu AK, Korber DR. Adaptive resistance and differential protein expression of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis biofilms exposed to benzalkonium chloride. *Antimicrob Agents Chemother* **2006** Nov;50(11):3588-96.

69. Hagelueken G, Adams TM, Wiehlmann L, et al. The crystal structure of SdsA1, an alkylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa*, defines a third class of sulfatases. *PNAS* **2006** May 16, 2006;103(20):7631-6.
70. Lannigan R, Bryan LE. Decreased susceptibility of *Serratia marcescens* to chlorhexidine related to the inner membrane. *J Antimicrob Chemother* **1985** May 1, 1985;15(5):559-65.
71. Jain N, Kohli R, Cook E, Gialanella P, Chang T, Fries BC. Biofilm formation and antifungal susceptibility in *Candida* isolates from urine. *Appl Environ Microbiol* **2007** January 19, 2007:AEM.02439-06.
72. Clutterbuck AL, Woods EJ, Knottenbelt DC, Clegg PD, Cochrane CA, Percival SL. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary Microbiology* **2007**;In Press, Corrected Proof.
73. Kaulfers P-Ma, Brandt. D. Isolation of a conjugative plasmid in *Escherichia coli* determining formaldehyde resistance. *FEMS Microbiol Lett* **1987**;42:161-3.
74. Lannigan R, Bryan LE. Decreased susceptibility of *Serratia marcescens* to chlorhexidine related to the inner membrane. *J Antimicrob Chemother* **1985**;15:559-65.
75. Russel AD. Plasmids and bacterial resistance to biocides. *J Appl Microbiol* **1997**;83(2):155-65.
76. George AM. Multidrug resistance in enteric and other Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **1999** May 15;139(1):1-10.
77. Schweizer H. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet Mol Res* **2003**;2(1):48-62.
78. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* **2005** July 1, 2005;56(1):20-51.
79. Nikaido X-ZLaH. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria. *Drugs* **2004**;64(2):159-204.
80. Chen J, Kuroda T, Huda MN, Mizushima T, Tsuchiya T. An RND-type multidrug efflux pump SdeXY from *Serratia marcescens*. *J Antimicrob Chemother* **2003** Aug;52(2):176-9.
81. Fath M, Kolter R. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol Rev* **1993**;57(4):995-1017.

82. Pao SS, Paulsen IT, Saier MH, Jr. Major Facilitator Superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* **1998** March 1, 1998;62(1):1-34.
83. Holesova S, Valaskova M, Plevova E, Pazdziora E, Matejova K. Preparation of novel organovermiculites with antibacterial activity using chlorhexidine diacetate. *J Colloid Interface Sci* **2009** Oct 25.
84. Brown MH, Paulsen IT, Skurray RA. The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. *Molecular Microbiology* **1999**;31(1):394-5.
85. Paulsen I, Skurray RA, Tam R, et al. The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. *Mol Microbiol* **1996**;19(6):1167-75.
86. Saier MJ, Tam R, Reizer A, Reizer J, . Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol Microbiol* **1994**;11(5):841-7.
87. Nishino K, Yamaguchi A. Analysis of a Complete Library of Putative Drug Transporter Genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **2001** October 15, 2001;183(20):5803-12.
88. Poole K. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* **2004**;10:12-26.
89. Russell AD. Antibiotic and biocide resistance in bacteria: Introduction. *Journal of Applied Microbiology* **2002**;92(s1):1S-3S.
90. Fang C-T, Chen H-C, Chuang Y-P, Chang S-C, Wang J-T. Cloning of a Cation Efflux Pump Gene Associated with Chlorhexidine Resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **2002** June 1, 2002;46(6):2024-8.
91. Soothill JS, Bravery K, Ho A, Macqueen S, Collins J, Lock P. A fall in bloodstream infections followed a change to 2% chlorhexidine in 70% isopropanol for catheter connection antisepsis: a pediatric single center before/after study on a hemopoietic stem cell transplant ward. *Am J Infect Control* **2009** Oct;37(8):626-30.
92. Markwell MAK, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry* **1978**;87(1):206-10.
93. Markwell MAK, Haas SM, Tolbert NE, Bieber LL, John ML. [16] Protein determination in membrane and lipoprotein samples: Manual and automated procedures. *Methods in Enzymology Vol. Volume 72*: Academic Press, **1981**:296-303.
94. Kern WV, Steinke P, Schumacher A, Schuster S, von Baum H, Bohnert JA. Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on

- antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* **2006** Feb;*57*(2):339-43.
95. Tumah HN. Bacterial biocide resistance. *J Chemother* **2009** Feb;*21*(1):5-15.
96. Nikaido H. Multidrug resistance in bacteria. *Annu Rev Biochem* **2009**;78:119-46.
97. Amin A. Clinical and economic consequences of ventilator-associated pneumonia. *Clin Infect Dis* **2009** Aug 15;*49* Suppl 1:S36-43.
98. Iskedjian M TK, Bradley CA, Addis A, et al. . Quality assessment of economic evaluations published in *Pharmacoeconomics*. The first four years (1992 to 1995). *Pharmacoeconomics* **1997**(12):685-94.
99. Dietrich ES MO, Fischer H, Hoppe-Tichy T, Kullmann KH, Stodt HJ, Strehl E, Tassler H, Wittmann D und die Arbeitsgemeinschaft. . Vorschläge zur Planung, Durchführung und Publikation pharmakoökonomischer Evaluationen zu Antiinfektiva. . *Chemotherapiejournal* **2001**;10(3):110-5.
100. Evans HL, Lefrak SN, Lyman J, et al. Cost of Gram-negative resistance. *Critical care medicine* **2007** Jan;*35*(1):89-95.
101. Perry C, Hall C. Antibiotic resistance: how it arises, the current position and strategies for the future. *Nurs Times* **2009** Sep 15-21;*105*(36):20-3.
102. Livermore DM. Has the era of untreatable infections arrived? *J Antimicrob Chemother* **2009** Sep;*64* Suppl 1:i29-36.
103. Mc Cay PH, Ocampo-Sosa AA, Fleming GT. Effect of subinhibitory concentrations of benzalkonium chloride on the competitiveness of *Pseudomonas aeruginosa* grown in continuous culture. *Microbiology* **2010** Jan;*156*(Pt 1):30-8.
104. Langsrud S, Sundheim G, Holck AL. Cross-resistance to antibiotics of *Escherichia coli* adapted to benzalkonium chloride or exposed to stress-inducers. *J Appl Microbiol* **2004**;96(1):201-8.
105. Joynson JA, Forbes B, Lambert RJ. Adaptive resistance to benzalkonium chloride, amikacin and tobramycin: the effect on susceptibility to other antimicrobials. *J Appl Microbiol* **2002**;93(1):96-107.
106. Hoff JC, Akin EW. Microbial resistance to disinfectants: mechanisms and significance. *Environ Health Perspect* **1986** Nov;*69*:7-13.
107. Russell AD. Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* **2002**(31):121S-35S.

108. Prince J, Ayliffe GA. In-use testing of disinfectants in hospitals. *J Clin Pathol* **1972** Jul;25(7):586-9.
109. Sanford JP. Disinfectants that don't. *Ann Intern Med* **1970** Feb;72(2):282-3.
110. Bosi C, Davin-Regli A, Charrel R, Rocca B, Monnet D, Bollet C. *Serratia marcescens* nosocomial outbreak due to contamination of hexetidine solution. *J Hosp Infect* **1996** Jul;33(3):217-24.
111. Lambert RJ, Joynson J, Forbes B. The relationships and susceptibilities of some industrial, laboratory and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to some antibiotics and biocides. *Journal of applied microbiology* **2001** Dec;91(6):972-84.
112. Nakahara H, Kozukue H. Isolation of chlorhexidine-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from clinical lesions. *J Clin Microbiol* **1982** Jan;15(1):166-8.
113. Nde CW, Jang HJ, Toghrol F, Bentley WE. Toxicogenomic response of *Pseudomonas aeruginosa* to ortho-phenylphenol. *BMC Genomics* **2008**;9:473.
114. Nagai K, Murata T, Ohta S, Zenda H, Ohnishi M, Hayashi T. Two different mechanisms are involved in the extremely high-level benzalkonium chloride resistance of a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Microbiol Immunol* **2003**;47(10):709-15.
115. Thomas L, Maillard JY, Lambert RJW, Russell AD. Development of resistance to chlorhexidine diacetate in *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of a 'residual' concentration. *Journal of Hospital Infection* **2000**;46(4):297-303.
116. Fitzgerald K, Davies A, Russell A. Bacterial uptake of ¹⁴C-chlorhexidine diacetate and ¹⁴C-benzyl alcohol and the influence of phenoxyethanol and azolectin: studies with gram-negative bacteria. *Microbios* **1992**;70(283):77-91.
117. Nakahara H, Kozukue H. Chlorhexidine resistance in *Escherichia coli* isolated from clinical lesions. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg [A]* **1981** Dec;251(2):177-84.
118. Maillard JY. Bacterial resistance to biocides in the healthcare environment: should it be of genuine concern? *J Hosp Infect* **2007** Jun;65 Suppl 2:60-72.
119. Tattawasart U, Maillard JY, Furr JR, Russell AD. Development of resistance to chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride in *Pseudomonas stutzeri* and changes in antibiotic susceptibility. *J Hosp Infect* **1999** Jul;42(3):219-29.
120. Thomas L, Maillard JY, Lambert RJ, Russell AD. Development of resistance to chlorhexidine diacetate in *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of a "residual" concentration. *J Hosp Infect* **2000** Dec;46(4):297-303.

121. Russell AD, McDonnell G. Concentration: a major factor in studying biocidal action. *J Hosp Infect* **2000** Jan;44(1):1-3.
122. Russell AD, Furr JR. Susceptibility of porin- and lipopolysaccharide-deficient strains of *Escherichia coli* to some antiseptics and disinfectants. *J Hosp Infect* **1986** Jul;8(1):47-56.
123. Thomas L, Russell AD, Maillard JY. 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.
124. Vasseur C, Labadie J, Hebraud M. Differential protein expression by *Pseudomonas fragi* submitted to various stresses. *Electrophoresis* **1999** Aug;20(11):2204-13.
125. Kimitsu, Hamamoto H, Inoue R, et al. Increase in resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to beta-lactams caused by mutations conferring resistance to benzalkonium chloride, a disinfectant widely used in hospitals. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **1999** Dec;43(12):3042-3.
126. Braoudaki M, Hilton AC. Low level of cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Escherichia coli* K-12 and *E. coli* O55 compared to *E. coli* O157. *FEMS Microbiol Lett* **2004** Jun 15;235(2):305-9.
127. Braoudaki M, Hilton AC. Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. *J Clin Microbiol* **2004** Jan;42(1):73-8.
128. Chuanchuen R, Pathanasophon P, Khemtong S, Wannaprasat W, Padungtod P. Susceptibilities to antimicrobials and disinfectants in *Salmonella* isolates obtained from poultry and swine in Thailand. *J Vet Med Sci* **2008** Jun;70(6):595-601.
129. Russel AD, Unchalee Tattawasart, Maillard J-Y, Furr JR. Possible Link between Bacterial Resistance and Use of Antibiotics and Biocides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1998** Aug.;42(8):2151.
130. Schweizer HP. Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett* **2001** Aug 7;202(1):1-7.
131. Levy SB. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **1992** Apr;36(4):695-703.
132. Moken MC, McMurry LM, Levy SB. Selection of multiple-antibiotic-resistant (mar) mutants of *Escherichia coli* by using the disinfectant pine oil: roles of the mar and *acrAB* loci. *Antimicrob Agents Chemother* **1997** Dec;41(12):2770-2.
133. Zgurskaya HI, Nikaido H. Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Mol Microbiol* **2000** Jul;37(2):219-25.

134. Sanchez P, Moreno E, Martinez JL. The biocide triclosan selects *Stenotrophomonas maltophilia* mutants that overproduce the SmeDEF multidrug efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother* **2005** Feb;49(2):781-2.
135. Mc Cay PH, Ocampo-Sosa AA, Fleming GTA. Effect of subinhibitory concentrations of benzalkonium chloride on the competitiveness of *Pseudomonas aeruginosa* grown in continuous culture. *Microbiology* **2010** January 1, 2010;156(1):30-8.
136. Walsh SE, Maillard JY, Russell AD, Catrenich CE, Charbonneau DL, Bartolo RG. Development of bacterial resistance to several biocides and effects on antibiotic susceptibility. *J Hosp Infect* **2003** Oct;55(2):98-107.
137. Lambert RJ. 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. *Journal of applied microbiology* **2004**;97(4):699-711.
138. McMurry LM, McDermott PF, Levy SB. Genetic evidence that *InhA* of *Mycobacterium smegmatis* is a target for triclosan. *Antimicrob Agents Chemother* **1999** Mar;43(3):711-3.
139. Denyer SP, Maillard JY. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. *J Appl Microbiol* **2002**;92 Suppl:35S-45S.
140. Cox AD, Wilkinson SG. Ionizing groups in lipopolysaccharides of *Pseudomonas cepacia* in relation to antibiotic resistance. *Mol Microbiol* **1991** Mar;5(3):641-6.
141. Tattawasart U, Maillard JY, Furr JR, Russell AD. Outer membrane changes in *Pseudomonas stutzeri* resistant to chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride. *International journal of antimicrobial agents* **2000** Nov;16(3):233-8.
142. Huber TW, Thomas JS. Detection of resistance due to inducible beta-lactamase in *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*. *J Clin Microbiol* **1994** Oct;32(10):2481-6.
143. Doublet B, Lailier R, Meunier D, et al. Variant *Salmonella* genomic island 1 antibiotic resistance gene cluster in *Salmonella enterica* serovar Albany. *Emerg Infect Dis* **2003** May;9(5):585-91.
144. Sidhu MS, Heir E, Sorum H, Holck A. Genetic linkage between resistance to quaternary ammonium compounds and beta-lactam antibiotics in food-related *Staphylococcus* spp. *Microb Drug Resist* **2001** Winter;7(4):363-71.
145. Sidhu MS, Heir E, Leegaard T, Wiger K, Holck A. Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with beta-lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* **2002** Sep;46(9):2797-803.

146. Stefanska J, Mlynarczyk G, Mlynarczyk A, Starosciak B, Luczak M. [Detection of *smr* and *qacA* genes in *Staphylococcus aureus* strains using PCR]. *Med Dosw Mikrobiol* **2002**;54(3):183-9.
147. Levy SB. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. *Symposium series (Society for Applied Microbiology)* **2002**(31):65S-71S.
148. Piddock LJ. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat Rev Microbiol* **2006** Aug;4(8):629-36.
149. Payot S, Avrain L, Magras C, Praud K, Cloeckaert A, Chaslus-Dancla E. Relative contribution of target gene mutation and efflux to fluoroquinolone and erythromycin resistance, in French poultry and pig isolates of *Campylobacter coli*. *Int J Antimicrob Agents* **2004** May;23(5):468-72.
150. Hirakata Y, Kondo A, Hoshino K, et al. Efflux pump inhibitors reduce the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* **2009** Oct;34(4):343-6.
151. Chu C, Su LH, Chu CH, Baucheron S, Cloeckaert A, Chiu CH. Resistance to fluoroquinolones linked to *gyrA* and *par C* mutations and overexpression of *acr AB* efflux pump in *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis. *Microb Drug Resist* **2005** Fall;11(3):248-53.
152. Ueda O, Wexler HM, Hirai K, Shibata Y, Yoshimura F, Fujimura S. Sixteen homologs of the *mex*-type multidrug resistance efflux pump in *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother* **2005** Jul;49(7):2807-15.
153. Lomovskaya O, Warren M, Lee A, Lee V. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**;45(1):105-16.
154. Scherpe S, Kaulfers P. Adaptional resistance mechanisms of Enterobacteria to benzalkonium chloride and their influence on sensitivity to antibiotics. *Institut für Infektionsmedizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf*, **2001**:1-17.
155. Han XY, Andrade RA. *Brevundimonas diminuta* infections and its resistance to fluoroquinolones. *J Antimicrob Chemother* **2005** Jun;55(6):853-9.
156. Coban AY, Birinci A, Ekinci B, Durupinar B. [Investigation of the effects of efflux pump inhibitors on ciprofloxacin MIC values of high level fluoroquinolone resistant *Escherichia coli* clinical isolates]. *Mikrobiyol Bul* **2004** Jan-Apr;38(1-2):21-5.
157. Sanchez P, Le U, Martinez JL. The efflux pump inhibitor Phe-Arg-beta-naphthylamide does not abolish the activity of the *Stenotrophomonas maltophilia* SmeDEF multidrug efflux pump. *J Antimicrob Chemother* **2003** Apr;51(4):1042-5.

158. Gayet S, Chollet R, Molle G, Pages JM, Chevalier J. Modification of outer membrane protein profile and evidence suggesting an active drug pump in *Enterobacter aerogenes* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother* **2003** May;47(5):1555-9.
159. Schumacher A, Steinke P, Bohnert JA, Akova M, Jonas D, Kern WV. Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of Enterobacteriaceae other than *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* **2006** February 1, 2006;57(2):344-8.
160. Pannek S, Higgins PG, Steinke P, et al. Multidrug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii*: comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine- β -naphthylamide. *J Antimicrob Chemother* **2006** May 1, 2006;57(5):970-4.
161. Kern WV, Steinke P, Schumacher A, Schuster S, Baum Hv, Bohnert JA. Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* **2006** February 1, 2006;57(2):339-43.
162. Dutzler R, Wang YF, Rizkallah P, Rosenbusch JP, Schirmer T. Crystal structures of various maltooligosaccharides bound to maltoporin reveal a specific sugar translocation pathway. *Structure* **1996** Feb 15;4(2):127-34.
163. Boos W, Shuman H. Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* **1998** Mar;62(1):204-29.
164. Aono R, Tsukagoshi N, Yamamoto M. Involvement of outer membrane protein TolC, a possible member of the mar-sox regulon, in maintenance and improvement of organic solvent tolerance of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **1998** Feb;180(4):938-44.
165. Nikaido H. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **1996** Oct;178(20):5853-9.
166. Klebba PE, Newton SM. Mechanisms of solute transport through outer membrane porins: burning down the house. *Curr Opin Microbiol* **1998** Apr;1(2):238-47.
167. Pages JM, James CE, Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* **2008** Dec;6(12):893-903.
168. Aggeler R, Then R, Ghosh R. Reduced expression of outer-membrane proteins in beta-lactam-resistant mutants of *Enterobacter cloacae*. *J Gen Microbiol* **1987** Dec.;133(12):3383-92.
169. Charrel RN, Pages JM, De Micco P, Mallea M. Prevalence of outer membrane porin alteration in beta-lactam-antibiotic-resistant *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* **1996** Dec;40(12):2854-8.

170. Chevalier J, Pages JM, Mallea M. In vivo modification of porin activity conferring antibiotic resistance to *Enterobacter aerogenes*. *Biochem Biophys Res Commun* **1999** Dec 9;266(1):248-51.
171. Martinez MB, Flickinger M, Higgins L, Krick T, Nelsestuen GL. Reduced outer membrane permeability of *Escherichia coli* O157:H7: suggested role of modified outer membrane porins and theoretical function in resistance to antimicrobial agents. *Biochemistry* **2001** Oct 9;40(40):11965-74.
172. Hancock RE, Siehnel R, Martin N. Outer membrane proteins of *Pseudomonas*. *Mol Microbiol* **1990** Jul;4(7):1069-75.
173. Winder CL, Al-Adham IS, Abdel Malek SM, Buultjens TE, Horrocks AJ, Collier PJ. Outer membrane protein shifts in biocide-resistant *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Appl Microbiol* **2000** Aug;89(2):289-95.
174. de Kort G, Bolton A, Martin G, Stephen J, van de Klundert JA. Invasion of rabbit ileal tissue by *Enterobacter cloacae* varies with the concentration of OmpX in the outer membrane. *Infect Immun* **1994** Nov;62(11):4722-6.
175. Mecsas J, Welch R, Erickson JW, Gross CA. Identification and characterization of an outer membrane protein, OmpX, in *Escherichia coli* that is homologous to a family of outer membrane proteins including Ail of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **1995** Feb;177(3):799-804.
176. Dupont M, James CE, Chevalier J, Pages JM. An early response to environmental stress involves regulation of OmpX and OmpF, two enterobacterial outer membrane pore-forming proteins. *Antimicrob Agents Chemother* **2007** Sep;51(9):3190-8.
177. Dupont M, De E, Chollet R, Chevalier J, Pages JM. *Enterobacter aerogenes* OmpX, a cation-selective channel mar- and osmo-regulated. *FEBS Lett* **2004** Jul 2;569(1-3):27-30.
178. Chapman JS, Diehl MA, Fearnside KB. Preservative tolerance and resistance. *Int J Cosmet Sci* **1998** Feb;20(1):31-9.
179. Nikaido H. The role of outer membrane and efflux pumps in the resistance of gram-negative bacteria. Can we improve drug access? *Drug Resistance Updates* **1998**;1(2):93-8.
180. Li XZ, Nikaido H, Williams KE. Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag⁺ and are deficient in porins. *J Bacteriol* **1997** Oct;179(19):6127-32.

10 Danksagung

Für meine Doktorarbeit gilt es einer Vielzahl von Menschen zu danken die mich unterstützt haben. Herrn Prof. Dr. med. Aepfelbacher danke ich für die zur Verfügung gestellte Infrastruktur.

Frau Dr. S. Scherpe und P.Schillemeit danke ich für die freundliche und zuvorkommende Unterstützung während der experimentellen Phase meiner Arbeiten.

Eine gesonderte Danksagung möchte ich an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. PM Kaulfers richten. Sowohl für die Überlassung des Themas sowie die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung als auch für die beständige Unterstützung.

Ich danke Ihnen ganz herzlich für die herausragende fachliche Unterstützung und die wunderbare menschliche Art mit der Sie diese vermittelt haben.

11 Eidstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: