

# Resistenz von Mikroorganismen gegen antimikrobielle Biozide

Stellungnahme der Fachgruppe Mikrobiologie und Betriebshygiene in  
der Deutschen Gesellschaft für Wissenschaftliche und Angewandte Kosmetik e.V.  
(DGK)

Mitglieder der Fachgruppe

Karl-Heinz Diehl, Dr. Ulrich Eigener, Prof. Dr. Michael Heinzl, Thomas Kamps,  
Dr. Cornelia Koch, Sabine Koch, Jaroslava Kolar, Frank Meyer, Dr. Rainer Müller,  
Dr. Dietmar Ochs, Birgit Poetendorf, Lothar Pohl, Dr. Ulla Seidel-Wiese

Fragen der Resistenzentwicklung von Mikroorganismen gegen antimikrobielle Wirkstoffe, im folgenden als "Biozide" bezeichnet, werden vor dem Hintergrund zunehmender Antibiotika-Resistenzen von Mikroorganismen auch im Zusammenhang mit Bioziden diskutiert, wie sie in Desinfektionsmitteln, Konservierungsmitteln oder antimikrobiell wirksamen Kosmetika verwendet werden. Vor allem werden ähnliche epidemiologische Resistenzentwicklungen wie bei Antibiotika und sogar durch Biozide induzierte Kreuzresistenzen gegen Chemotherapeutika befürchtet.

Eine sachgerechte Diskussion wird dabei oftmals durch eine unpräzise Terminologie erschwert. Deshalb sind klare Begriffsdefinitionen erforderlich, die hier beschrieben werden.

## 1. Definitionen

Im Gegensatz zum Englischen ermöglicht der deutsche Sprachschatz leicht die verbale Differenzierung zwischen *Widerstandskraft* und *Resistenz*.

Die **Widerstandskraft** eines Organismus gegen einen Wirkstoff ist eine erbliche Specieseigenschaft, die bei der Mehrzahl der Vertreter einer Art vorhanden sein sollte. Die Varianzbreite, in der diese genetische Eigenschaft sich phänotypisch ausprägt, ist allerdings wirkstoff- und speciesabhängig unterschiedlich. Neben dem eher seltenen Fall, daß (fast) alle Vertreter einer Art gegen einen bestimmten Wirkstoff dieselbe Widerstandskraft aufweisen, unterscheidet man normalerweise zwei Verteilungsmuster:

- (i) Binomialverteilung
- (ii) Bimodalverteilung

Im Englischen wird diese Species-Eigenschaft als *tolerance*, *susceptibility* oder *intrinsic/innate resistance* beschrieben.

Als **Unempfindlichkeit** wird die erhöhte Widerstandskraft einzelner oder mehrerer Stämme einer Species gegen einen Wirkstoff bezeichnet. Im Gegensatz zur *Widerstandskraft* ist die *Unempfindlichkeit* also keine Species-, sondern eine Stammeigenschaft. "Erhöht" ist die Widerstandskraft dann, wenn sie außerhalb der natürlichen Varianz liegt; Faktoren einer erhöhten Widerstandskraft lassen sich also

nicht allgemein angeben. Der synonyme Sprachgebrauch von *resistent* mit *widerstandskräftig* (z.B. thermo"resistente" Sporen, Alkohol"resistenz" bakterieller Sporen, QAV(= quartäre Ammoniumverbindungen)-"Resistenz" von Pseudomonaden etc.) führt leider sehr oft zu Begriffsverwirrungen. Im Englischen werden dafür häufig die Begriffe *increased resistance* oder *acquired resistance* verwendet.

Die *Unempfindlichkeit* eines Stammes i. S. erhöhter Widerstandskraft kann unterschiedliche Ursachen haben: Eine **Adaptation** ist eine temporäre *Unempfindlichkeit*, die durch äußere, insbesondere nährstoffbedingte Einflüsse zustande kommt und auch schnell wieder verloren geht, sobald sich diese äußeren Einflüsse verändern.

Eine **Resistenz** dagegen ist von den kulturellen Bedingungen unabhängig und läßt sich i.a. auch über längere Zeit als Stammeigenschaft erhalten, da sie genetisch determiniert ist. Eine solche Resistenzentwicklung ist für Antibiotika bekannt, wo man beobachten kann, daß Keime genetisch zu Unempfindlichkeiten mutieren.

## **2. Entwicklung von Unempfindlichkeiten**

In der Praxis lassen sich i. w. vier Formen von Entwicklungen zur Unempfindlichkeit gegen Biozide unterscheiden, wobei die ersten zwei davon im strengen Sinne des Wortes gar keine sind. Sie sollen aber in diesem Zusammenhang mit angesprochen werden, weil sie vom Anwender oft als Resistenzentwicklung einer Hauskeimflora fehlinterpretiert werden

(1) Wenn Keimbekämpfungsverfahren mit eingeschränkter Wirksamkeit zur Anwendung kommen, werden logischerweise diejenigen Mikroorganismen, die dabei nicht erfaßt werden, selektiert. Das ist keine Resistenzbildung im oben definierten Sinne, sondern das natürliche Ergebnis einer (meist unbewußten) **Selektion**. Wenn also im Wasser nach UV-Bestrahlung noch vereinzelt gelb-orange pigmentierte Keime gefunden werden, war das nicht anders zu erwarten, weil diese Keime aufgrund ihrer Pigmentierung von Natur aus gegen UV-Licht widerstandsfähig sind. Auch die Kontamination von Alkoholen (selbst in hohen Konzentrationen) mit Sporen von Bacillen und Clostridien darf nicht überraschen, denn Alkohol ist bekanntlich unwirksam gegen Bakteriosporen. Da die Desinfektion nur eine Teilentkeimung ist, werden auch nach Desinfektionsmaßnahmen immer noch überlebende Keime zu finden sein.

Der Anwender muß sich daher über die Grenzen der Wirksamkeit seiner Keimbekämpfungsverfahren bewußt sein. Ggf. müssen Verfahren geändert oder verschiedene Maßnahmen kombiniert werden, wenn die Defizite der einzelnen Verfahren nicht akzeptabel erscheinen.

(2) Nur die richtige Anwendung eines wirksamen Keimbekämpfungsverfahrens gewährleistet auch seine Wirkung! Wenn überlebende Keime gefunden werden, die eigentlich innerhalb des postulierten Wirksamkeitsspektrums eines Verfahrens liegen sollten, so sind meistens nicht Unempfindlichkeiten, sondern **Anwendungsfehler** die Ursache für einen solchen Befund.

Die wichtigsten Anwendungsfehler für Biozide in Konservierungsmitteln sind:

- Dosierfehler,
- falsche pH-Werte,
- Löslichkeit/Verteilung
- Wirkstoffinaktivierung (n.b. Primärverpackung) und
- Inkompatibilitäten mit anderen Rezepturinhaltsstoffen oder Stoffverunreinigungen (n.b. Wasserhärte, Metalle, Sulfit),
- nicht ausreichende Temperaturstabilität.

Bei Desinfektionsmitteln kommen noch hinzu:

- zu geringe Einwirkungszeit,
- zu geringe Einwirkungstemperatur und vor allem
- fehlender Zutritt zum Desinfektionsgut (n.b. Sprüschatten, Totstücke).

(3) Manche Substanzen können zu einer veränderten Zusammensetzung der Zellhülle von Mikroorganismen führen, so daß ihre Empfindlichkeit gegen Wirkstoffe modifiziert wird. In nährstoffarmen, wässrigen Lösungen können viele Mikroorganismen extrazelluläre, polymere Substanzen (=EPS) ausscheiden, die ihnen eine schützende Schleimhülle verleihen und ein Anheften an festen Oberflächen ermöglichen. Solche sessilen Zellen wachsen zu einem Biofilm zusammen. Die Schleimschicht kann biozide Wirkstoffe adsorbieren und inaktivieren; auf jeden Fall behindert sie die Penetration der Wirkstoffmoleküle an die Zellwand und Zellmembran, so daß sie dort ihre letale Wirkung nur verzögert oder gar nicht mehr ausüben können.

Damit besitzen sessile Zellen aufgrund ihrer Schleimhülle gegen viele Wirkstoffe eine deutlich erhöhte Widerstandskraft im Vergleich zu planktonischen Zellen derselben Keimart. Das Potential zur Schleimbildung - und damit der Mechanismus der Unempfindlichkeit - ist bei vielen Mikroorganismen genetisch vorhanden, aber die phänotypische Ausprägung ist umweltabhängig. Es handelt sich also um eine **Adaptation** an ein bestimmtes Biotop. Wenn die unempfindlichen Keime zur Isolierung auf künstlichen Kulturmedien gezüchtet werden, verlieren sie i.d.R. schon nach wenigen Passagen ihre Schleimhülle und ihre Unempfindlichkeit läßt sich dann nicht mehr verifizieren. Wenn man solche unempfindlichen Hauskeime für spätere Konservierungsprüfungen verwenden will, ist es daher empfehlenswert, sie nicht als isolierte Stammkulturen auf künstlichen Medien zu züchten, sondern sie in einer Probe ihres ursprünglichen Biotops zu belassen.

Obwohl Biofilme seit mehr als 15 Jahren weltweit Gegenstand von intensiver, interdisziplinärer Forschung sind, sind wir von einem Verständnis oder gar einer Beherrschung noch weit entfernt. Biofilm-bedingte Biozid-Adaptationen spielen daher in der betrieblichen Praxis eine erhebliche Rolle. Weil der Mechanismus der Unempfindlichkeit verhältnismäßig unspezifisch ist, gibt es auch viele **Kreuzreaktionen** nicht nur mit Bioziden, sondern auch mit anderen antimikrobiellen Wirkstoffen (Antibiotika).

(4) Erworbene **Resistenzen** gehen auf mutative Veränderungen der genetischen Eigenschaften eines Stammes zurück und sind daher verhältnismäßig seltene Ereignisse. Permanente, subletale Konzentrationen antimikrobieller Wirkstoffe

können aber auf eine Population einen entsprechenden Selektionsdruck ausüben und damit entsprechenden Zufallsmutanten einen Wachstumsvorteil verschaffen. Wenn sich solche Resistenzen einmal etabliert haben, sind sie im Gegensatz zur Adaptation stabil und können auch weiterverbreitet werden (□ 3. Resistenzübertragung).

Ihre Resistenzmechanismen sind spezifischer als bei der Adaptation durch Schleimbildung; deshalb sind meistens nur bestimmte Wirkstoffe von einer erworbenen Resistenz betroffen. Kreuzresistenzen sind innerhalb einer Wirkstoffklasse leicht möglich, zwischen verschiedenen Wirkstoffklassen selten, kommen aber vor. Es können jedoch Koppelungen verschiedener Resistenzgene vorkommen, wie das z.B. bei den multiresistenten *Staphylococcus aureus*-Stämmen bekannt ist, wo verschiedene Antibiotika- und Schwermetall-Resistenzen auch mit QAV-Resistenzgenen gekoppelt sein können. Die Resistenzmechanismen lassen sich in folgende Typen unterteilen:

- Wirkstoffinaktivierung, z.B. durch metabolisierende Enzyme oder durch Bildung von Reaktionspartnern,
- Beeinflussung des Wirkstofftransports, entweder des Influx oder des Efflux,
- Beeinflussung des Wirkstofftargets, entweder durch Veränderung oder durch Überproduktion.

Für viele biozide Wirkstoffe sind inzwischen solche Resistenzmechanismen *in-vitro* nachgewiesen und z.T. auch aufgeklärt. Zu den prominenteren unter ihnen gehören die QAV-Resistenz in Staphylococcen und die Formaldehyd-Resistenz in Pseudomonaden und Enterobacteriaceen.

### **3. Resistenzübertragung**

Bakterien, die bedeutendsten Vertreter erworbener Resistenzen, können neben einem Chromosom als Hauptträger der wichtigsten Erbeigenschaften fakultativ auch extrachromosomale DNS in Form sogenannter Plasmide besitzen. Sowohl chromosomale als auch plasmidische DNS kann zwischen verschiedenen Zellen einer Species, aber auch zwischen verschiedenen Gattungen übertragen werden. Dabei werden natürlich auch die auf dieser DNS jeweils lokalisierten Erbeigenschaften, z.B. Resistenzeigenschaften, mit übertragen.

Bei Antibiotika-Resistenzen ist bekannt und gefürchtet, daß sie sich auf diese Weise so schnell verbreiten können, daß neu eingeführte Wirkstoffe schon nach wenigen Jahren bei vielen Stämmen wirkungslos sind. Die meisten Biozid-Resistenzen sind ebenfalls plasmid-determiniert, es gibt aber auch chromosomal gebundene Resistenzen. Während es für Antibiotika-Resistenzen in vielen Ländern Monitoringprogramme gibt, werden Biozid-Resistenzen dabei höchstens zufällig mit erfaßt, aber eine systematische Beobachtung findet nicht statt. Einzelne epidemiologische Studien, z.B. für QAV-Resistenzen, zeigen jedoch, daß sich auch diese Resistenzgene für Biozide ausbreiten, jedoch hat dieses Geschehen bisher noch keine praktische Relevanz erlangt.

#### **4. Präventivmaßnahmen**

Um einer Entwicklung von Stamm-Unempfindlichkeiten oder Resistenzen vorzubeugen, lassen einige Vorsichtsmaßnahmen empfehlen:

1. Vermeidung von Anwendungsfehlern (□ 2.(2))
2. Vermeidung subletaler Wirkstoffkonzentrationen  
In der Konservierung, indem in Belastungstests rezepturspezifisch evaluiert wird, welche Biozidkonzentrationen zur Abtötung, nicht zur Hemmung, erforderlich sind. In der Desinfektion, indem unwirksame Unterdosierungen vermieden werden.
3. Verwendung von Wirkstoffkombinationen und Stoffen mit möglichst unspezifischem Wirkungsmechanismus

Ein routinemäßiger Wechsel des Biozids ist nicht notwendig, ist aber auch nicht falsch. Wenn man sich dafür entscheidet, muß man aber darauf achten, daß auch tatsächlich der Wirkstoff gewechselt wird und nicht nur ein Präparat gegen ein anderes mit gleicher Wirkstoffbasis ausgetauscht wird.

Januar 2000