

Tierärztliche Hochschule Hannover
Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit

**Molekulare Untersuchungen zur Triclosan-Toleranz bei Isolaten und Mutanten
unterschiedlicher *Salmonella*-Serovare unter Berücksichtigung einer
möglichen Kreuzresistenzentstehung gegenüber antimikrobiellen
Chemotherapeutika**

THESE

zur Erlangung des Grades einer Doktorin
der Naturwissenschaften

**Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

vorgelegt von
Ulrike Rensch
aus Potsdam

Hannover 2014

Supervisor: Prof. Dr. Corinna Kehrenberg, PhD

Betreuungsgruppe: Prof. Dr. Corinna Kehrenberg, PhD
Prof. Dr. Pablo Steinberg
Prof. Dr. Peter Heisig

1. Gutachten: Prof. Dr. Corinna Kehrenberg, PhD, Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit, Abteilung Molekularbiologie
Prof. Dr. Pablo Steinberg, Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik, Abteilung Lebensmitteltoxikologie und Ersatz-/ Ergänzungsmethoden zum Tierversuch
Prof. Dr. Peter Heisig, Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Abteilung Pharmazeutische Biologie und Mikrobiologie

2. Gutachten: Prof. Séamus Fanning, PhD, University College Dublin, School of Public Health, Physiotherapy & Population Science, UCD-Centre for Food Safety

Datum der Disputation: 05.11.2014

Für Marcel und meine Eltern

Nicht Kunst und Wissenschaft allein, Geduld will bei dem Werke sein.

aus Faust I

Johann Wolfgang von Goethe

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder sind zur Publikation eingereicht:

RENSCH, U., G. KLEIN, S. SCHWARZ, H. KASPAR, A. DE JONG and C. KEHRENBURG

Comparative analysis of the susceptibility to triclosan and three other biocides of avian *Salmonella enterica* isolates collected 1979 through 1994 and 2004 through 2010.

J. Food Prot. 2013 Apr; 76(4):653-656, doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-420.

RENSCH, U., G. KLEIN and C. KEHRENBURG

Analysis of triclosan-selected *Salmonella enterica* mutants of eight serovars revealed increased aminoglycoside susceptibility and reduced growth rates.

PLoS One. 2013 Oct 18; 8(10):e78310, doi: 10.1371/journal.pone.0078310.

RENSCH, U., K. NISHINO, G. KLEIN and C. KEHRENBURG

Salmonella enterica serovar Typhimurium multidrug efflux pumps EmrAB and AcrEF support the major efflux system AcrAB in decreased susceptibility to triclosan.

Int. J. Antimicrob. Agents. 2014 Aug; 44(2):179-180, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.04.015.

RENSCH, U., M. GREINER, G. KLEIN and C. KEHRENBURG

Mathematical modeling to predict the fitness cost associated with triclosan tolerance in *Salmonella enterica* serovars.

Manuskript zur Publikation eingereicht, in Revision

Folgende Präsentationen wurden in Form von Vorträgen oder Postern vorgestellt:

Vorträge:

RENSCH, U., S. SCHWARZ, H. KASPAR, G. KLEIN und C. KEHREBERG:

Studies on the susceptibility of *Salmonella* isolates of avian origin to triclosan and three other biocides.

Graduate School Day, Hannover, 07.04.2011

RENSCH, U., S. SCHWARZ, H. KASPAR, G. KLEIN und C. KEHREBERG:

Studien zur Empfindlichkeit von *Salmonella*-Isolaten aviärer Herkunft gegenüber Triclosan und drei weiteren Bioziden.

52. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Garmisch-Partenkirchen, 27.-30.09.2011

RENSCH, U., S. SCHWARZ, H. KASPAR, G. KLEIN und C. KEHREBERG:

Is there a change in the susceptibility of avian *Salmonella* isolates due to the frequent use of biocides?

Kolloquien für Tiergesundheit und Lebensmittelqualität, Hannover, 02.12.2011

RENSCH, U., G. KLEIN und C. KEHREBERG:

Molekulare Charakterisierung der Triclosan-Resistenz bei *Salmonella enterica*-Mutanten unterschiedlicher Serovare.

DVG-Tagung der Fachgruppe Bakteriologie und Mykologie, Leipzig, 27.-29.06.2012

Poster:

RENSCH, U., G. KLEIN und C. KEHRENBURG:

Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen von *Salmonella*-Isolaten aviärer Herkunft sowie Mutantenstämmen mit gesteigerter Effluxaktivität gegenüber dem Biozid Triclosan.

51. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Garmisch-Partenkirchen, 28.09.-01.10.2010

RENSCH, U., S. SCHWARZ, H. KASPAR, A. DE JONG, G. KLEIN und C KEHRENBURG:

Empfindlichkeit aviärer *Salmonella*-Isolate gegenüber Triclosan und drei weiteren Bioziden.

DVG-Tagung der Fachgruppe Bakteriologie und Mykologie, Leipzig, 27.-29.06.2012

RENSCH, U., G. KLEIN und C. KEHRENBURG:

Molekulare Analyse der Triclosan-Resistenz bei generierten *Salmonella enterica*-Mutanten unterschiedlicher Serovare.

53. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Garmisch-Partenkirchen, 25.-28.09.2012

RENSCH, U., G. KLEIN und C KEHRENBURG:

Molecular analysis of decreased susceptibility to triclosan in *Salmonella* mutants selected during the determination of mutant prevention concentrations.

Graduate School Day, Hannover, 23.-24.11.2012

RENSCH, U., K. NISHINO, G. KLEIN und C. KEHRENBURG:

Involvement of multidrug efflux pumps in decreased susceptibility of *Salmonella enterica* mutants to triclosan.

Federation of European Microbiological Societies (FEMS), 5th Congress of European Microbiologists, Leipzig, 21.-25.07.2013

RENSCH, U., K. NISHINO, G. KLEIN und C. KEHRENBURG:

Untersuchungen zur Beteiligung und zum Einfluss verschiedener multidrug Effluxpumpen auf eine verringerte Triclosan-Empfindlichkeit bei *Salmonella* Typhimurium.

54. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Garmisch-Partenkirchen, 24.-27.09.2013

RENSCH, U., G. KLEIN, S. SCHWARZ, H. KASPAR, A. DE JONG und C. KEHRENBURG:

Vergleichende Analyse der Empfindlichkeit von *Salmonella enterica*-Isolaten aus den Jahren 1979-1994 und 2004-2010 gegenüber Triclosan und drei weiteren Bioziden. Symposium Antibiotikaresistenz in der Lebensmittelkette, Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin, 11.-12.11.2013

RENSCH, U., G. KLEIN und C. KEHRENBURG:

Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen der Adaptation von *Salmonella enterica*-Isolaten an Triclosan und einer möglichen Resistenzentwicklung gegenüber Antibiotika.

Symposium Antibiotikaresistenz in der Lebensmittelkette, Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin, 11.-12.11.2013

RENSCH, U., K. NISHINO, G. KLEIN und C. KEHRENBURG:

Nachweis einer Beteiligung der multidrug Effluxpumpen EmrAB-TolC und AcrEF-TolC an der Triclosan-Toleranz von *Salmonella* Typhimurium.

Symposium Antibiotikaresistenz in der Lebensmittelkette, Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin, 11.-12.11.2013

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Biozide – eine Einführung	3
2.1.1	Allgemeines	3
2.1.2	Rechtliche Einordnung und Definition	3
2.1.3	Hauptgruppen und Produktarten	4
2.1.4	Desinfektionsmittel	4
2.1.4.1	Historischer Einblick	4
2.1.4.2	Anwendungsbezogene Rechtsgrundlagen und Definition	5
2.1.4.3	Einsatz von Desinfektionsmitteln	6
2.1.4.4	Desinfektionsmittelklassen	9
2.2	Das Biozid Triclosan	10
2.2.1	Eigenschaften – Einsatz – Nachweis in der Umwelt	10
2.2.2	Wirkmechanismus	11
2.2.3	Triclosan-Toleranzmechanismen – eine Übersicht	12
2.2.3.1	Erworbene Toleranzmechanismen	13
2.2.3.1.1	Veränderungen der Angriffsstelle	13
2.2.3.1.2	Bedeutung und Aufregulierung von <i>multidrug</i> Effluxpumpen	15
2.2.3.1.3	Veränderungen der Zellwand und der Zellmorphologie	17
2.2.3.2	Intrinsische Toleranzmechanismen	17
2.2.3.2.1	Triclosan-tolerante Enoyl-ACP-Reduktasen	17
2.2.3.2.2	Effluxpumpen	18
2.2.3.2.3	Produktion Triclosan-abbauender Enzyme	18
2.2.4	Triclosan-Toleranz bei Salmonellen	19
2.2.4.1	Veränderungen in der ACP-Reduktase FabI	19

2.2.4.2	<i>Multidrug</i> Effluxpumpen: Rolle bei der Triclosan-Toleranz und mögliche Entstehung von Kreuzresistenzen.....	20
2.2.4.3	Veränderungen im Fettsäurebiosyntheseweg	22
2.3	Salmonellen als Lebensmittelinfektionserreger	23
2.3.1	Historischer Einblick.....	23
2.3.2	Taxonomie	23
2.3.3	Vorkommen und Wirtsadaptation.....	23
2.3.4	Infektionen des Menschen mit <i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i>	24
2.3.5	Prävention von Infektionen des Menschen	25
2.3.6	Prävention von Infektionen des Nutztieres.....	26
2.4	Zielsetzung der Arbeit.....	27
3	Publikationen.....	29
3.1	Publikation 1:	
	Comparative analysis of the susceptibility to triclosan and three other biocides of avian <i>Salmonella enterica</i> isolates collected 1979 through 1994 and 2004 through 2010.....	29
3.2	Publikation 2:	
	Analysis of triclosan-selected <i>Salmonella enterica</i> mutants of eight serovars revealed increased aminoglycoside susceptibility and reduced growth rates. 33	
3.3	Publikation 3:	
	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium multidrug efflux pumps EmrAB and AcrEF support the major efflux system AcrAB in decreased susceptibility to triclosan.....	37
3.4	Publikation 4:	
	Mathematical modeling to predict the fitness cost associated with triclosan tolerance in <i>Salmonella enterica</i> serovars.	39
4	Diskussion	53
4.1	Einordnung der ermittelten Empfindlichkeitsdaten.....	53

4.1.1	Empfindlichkeit gegenüber Benzalkoniumchlorid, Acriflavin und Chlorhexidin	54
4.1.2	Empfindlichkeit gegenüber Triclosan	57
4.1.3	Vergleichende Analyse von Isolaten aus verschiedenen Zeiträumen ...	60
4.1.3.1	Vergleich der MHK _{50/90} -Werte von Benzalkoniumchlorid, Acriflavin und Chlorhexidin	60
4.1.3.2	Vergleich der MHK _{50/90} -Werte von Triclosan	61
4.1.4	Zusammenhang zwischen der Triclosan-Empfindlichkeit und MHK-Werten antimikrobieller Chemotherapeutika	63
4.2	Selektion Triclosan-toleranter <i>Salmonella</i>-Mutanten	64
4.2.1	<i>Mutant prevention concentrations</i> und Mutationsfrequenz.....	64
4.2.2	Einordnung der MHK-Werte von selektierten Mutanten.....	66
4.3	Charakterisierung der Triclosan-toleranten Mutanten	67
4.3.1	<i>Multidrug</i> Effluxpumpen und Entstehung von Kreuzresistenzen.....	67
4.3.1.1	Einfluss von Efflux	67
4.3.1.2	Aufregulierungen der Effluxpumpen AcrAB- und AcrEF-TolC	68
4.3.1.3	Einfluss und Beteiligung weiterer Effluxpumpen.....	71
4.3.2	Einfluss von Mutation und Überexpression des <i>fabI</i> -Gens	74
4.3.3	Stabilität der Mutation nach Kultivierung ohne Selektionsdruck und <i>in vitro</i> Wachstumsverhalten der Mutanten.....	76
4.4	Schlussfolgerung.....	79
5	Zusammenfassung	81
6	Summary.....	83
7	Literaturverzeichnis	85
8	Danksagung.....	115

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ACP	<i>Acyl-Carrier-Protein</i>
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BedGgstV	Bedarfsgegenständeverordnung
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bzw.	beziehungsweise
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EG	Europäische Gemeinschaft
EPI	Effluxpumpeninhibitor
et al.	et alii
EU	Europäische Union
FEMS	<i>Federation of European Microbiological Societies</i>
FSB	Fettsäurebiosyntheseweg
Gly	Glycin
i.d.F.v.	in der Fassung vom
i.V.m.	in Verbindung mit
Ile	Isoleucin
KbE	koloniebildende Einheiten
Leu	Leucin
MATE	<i>multidrug and toxic compound extrusion</i>
MBK	minimale bakterizide Konzentration
Met	Methionin
MFS	<i>major facilitator superfamily</i>
mg	Milligramm
MHK	minimale Hemmkonzentration
min.	Minute
mL	Milliliter
MPC	<i>mutant prevention concentration</i>
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
n	Anzahl
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)
OD	optische Dichte
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PAβN	Phenylalanin-Arginin-β-Naphtylamid
Phe	Phenylalanin

QAV	quaternäre Ammoniumverbindung
RKI	Robert Koch-Institut
RL	Richtlinie
RND	<i>resistance nodulation cell division</i>
S.	<i>Salmonella</i>
SCCS	<i>Scientific Committee on Consumer Safety</i>
SCENIHR	<i>Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks</i>
Ser	Serin
ssp.	Subspezies
Thr	Threonin
u.	und
u. a.	unter anderem
Val	Valin
VO	Verordnung
z. B.	zum Beispiel

Tabellenverzeichnis

Tabellen in der Diskussion

Tabelle 1: Empfindlichkeitsstudien von *Salmonella*-Feldisolaten für die Biozide Benzalkoniumchlorid und Chlorhexidin

Tabelle 2: Triclosan-Empfindlichkeitsstudien von *Salmonella*-Feldisolaten und in der Literatur verfügbare MHK-Werte einzelner Isolate

1 Einleitung

Aktuellen Schätzungen zufolge werden jährlich weltweit 93,8 Millionen Fälle von Gastroenteritiden durch nichttyphoidale Salmonelleninfektionen verursacht (MAJOWICZ et al. 2010). Über 85 % davon sind auf Lebensmittelinfektionen zurückzuführen, wobei kontaminierte tierische Produkte und insbesondere Geflügelfleisch die Hauptinfektionsquellen darstellen (FRIEDRICH et al. 2010; BARROW et al. 2012; DESIN et al. 2013; HAEUSLER u. CURTIS 2013). Auch in Deutschland und der Europäischen Union (EU) stellt die Salmonellose nach der Campylobacteriose die zweithäufigste Ursache für bakterielle Lebensmittelinfektionen dar (HARTUNG u. KÄSBOHRER 2012; EFSA u. ECDC 2013; RKI 2013). Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen bilden daher wichtige Grundlagen zur Minimierung der Salmonellenprävalenz in der Primär- und Sekundärproduktion von tierischen Lebensmitteln (LANGSRUD et al. 2003; KARATZAS et al. 2007; CONDELL et al. 2012a). Zu den wichtigsten seit 1945 kommerziell eingeführten Substanzklassen von Desinfektionsmitteln gehören die Bisphenole und mit ihnen der antibakterielle Wirkstoff Triclosan (ORTEGA MORENTE et al. 2013). Während Biozide im Allgemeinen verschiedene Angriffspunkte in Bakterienzellen haben und damit eine multifaktorielle Wirkung aufweisen (FERNÁNDEZ-FUENTES et al. 2012; MAVRI u. MOŽINA 2012), ist für Triclosan in subletalen Konzentrationen ein spezifischer Angriffsort beschrieben (NIELSEN et al. 2013b), wobei auch unspezifische Angriffsorte bekannt sind. Eine Verringerung der intrazellulären Triclosan-Konzentration kann bei Salmonellen, einem bedeutenden Lebensmittelinfektionserreger, durch das *multidrug* Effluxsystem AcrAB-TolC erzielt werden, zu dessen Substratspektrum Triclosan gehört (PIDDOCK 2006b). Eine durch den vielfältigen Einsatz des Biozids induzierte Aufregulierung dieses Exporters wird mit einer Entstehung von Kreuzresistenzen gegenüber human- und veterinärmedizinisch wichtigen antimikrobiellen Chemotherapeutika assoziiert (BAILEY et al. 2009; USUI et al. 2013). Während durch nationale und EU-weite Monitoring- und *Surveillance*-Programme Daten zur Antibiotika-Resistenzlage von Salmonellen bekannt sind, fehlen für Deutschland diese Daten zur Empfindlichkeitslage gegenüber Bioziden wie Triclosan. In der vorliegenden Arbeit wurden daher Empfindlichkeitstestungen für Triclosan und drei weitere häufig eingesetzte Biozide durchgeführt.

Durch die Auswahl von aviären *Salmonella*-Isolaten aus verschiedenen Zeitspannen sollte die Frage einer möglichen Toleranzentwicklung im Laufe der Zeit geklärt werden.

Weiterhin sollten Mechanismen der Triclosan-Toleranz bei Isolaten oder Mutanten unterschiedlicher Serovare molekular charakterisiert werden. Dabei stellten Untersuchungen zur Beteiligung von anderen *multidrug* Effluxpumpen als AcrAB-TolC sowie die Klärung der Frage nach einer möglichen Kreuzresistenzentwicklung gegenüber therapeutisch eingesetzten antimikrobiellen Chemotherapeutika Schwerpunkte der Arbeit dar.

2 Literaturübersicht

2.1 Biozide – eine Einführung

2.1.1 Allgemeines

Biozide sind Bestandteile vieler Produkte, die täglich von Verbrauchern verwendet werden. Mit diesen Erzeugnissen sollen Mensch, Tier und Materialien vor Schadorganismen geschützt werden (SCENIHR 2009). Aus dieser allgemein gefassten Zweckbestimmung resultiert eine enorme Produktvielfalt, allein in Deutschland sind bis Mitte 2011 mehr als 35.000 Biozidprodukte behördlich registriert worden (UNTERRICHTUNG DURCH DIE BUNDESREGIERUNG 2011). Diese Produkt- und Anwendungsvielfalt erfordert eine sorgfältige rechtliche Regulierung (SCENIHR 2009).

2.1.2 Rechtliche Einordnung und Definition

Das Inverkehrbringen und die Verwendung von Bioziden und Biozidprodukten sind in der EU rechtlich geregelt. Im Mai 2012 ist die EU-Verordnung (VO (EU) 528/2012) „über die Bereitstellung auf dem Markt und die Verwendung von Biozidprodukten“ verabschiedet worden, die Mitte 2012 in Kraft getreten ist. Diese neue Verordnung (im Folgenden Biozidprodukte-VO genannt), die seit dem 1. September 2013 angewendet werden muss, löst die bis dahin geltende europäische Biozid-Richtlinie (RL 98/8/EG) und das Biozidgesetz als nationale Umsetzung ab.

Im Sinne dieser Biozidprodukte-VO sind Biozide bzw. Biozidprodukte jegliche Stoffe oder Stoffgemische, die dazu bestimmt sind, „auf andere Art als durch bloße physikalische oder mechanische Einwirkung Schadorganismen zu zerstören, abzuschrecken, unschädlich zu machen, ihre Wirkung zu verhindern oder sie in anderer Weise zu bekämpfen“ (VO (EU) 528/2012). Aufgrund der Vielzahl der vorhandenen Biozide erfolgt eine Zuordnung zu verschiedenen Hauptgruppen, die ihrerseits in diverse Produktarten unterteilt sind.

2.1.3 Hauptgruppen und Produktarten

Die vier Hauptgruppen der Biozide sind im Anhang V der Biozidprodukte-VO aufgelistet. Sie umfassen Desinfektionsmittel, Schutzmittel, Schädlingsbekämpfungsmittel und sonstige Biozidprodukte. Innerhalb einer Hauptgruppe spiegeln die jeweiligen Produktarten den umfangreichen Anwendungsbereich der Biozide wider. Die letzten drei Hauptgruppen beinhalten vorrangig Produktarten, die den Schutz von verschiedenen Materialien und Produkten zum Ziel haben (z. B. Holzschutzmittel). Die erste Hauptgruppe (Desinfektionsmittel) beinhaltet hingegen überwiegend Produktarten zum Schutz der menschlichen und tierischen Gesundheit. So fallen z. B. „Produkte zur Desinfektion von Trinkwasser für Menschen und Tiere“ oder auch „Produkte zur Imprägnierung von Stoffen, die mit Lebensmitteln in Berührung kommen können“ in diesen Bereich (VO (EU) 528/2012).

2.1.4 Desinfektionsmittel

2.1.4.1 Historischer Einblick

Die Geschichte der Desinfektion reicht bis zu den Ursprüngen der sesshaften Menschheit zurück. Bereits die Sumerer, Ägypter und Perser verwendeten Pflanzenextrakte und Alkohol zur Wundbehandlung, im altertümlichen Arabien wurde bereits Quecksilberchlorid als Antiseptikum eingesetzt (HUGO 1995; MAILLARD 2002). Eine systematische Anwendung von Desinfektionsmitteln setzte sich in der Epoche der industriellen Revolution durch. Besonders durch das Aufkommen der chemischen Industrie stand eine Fülle neuer Substanzen zur Verfügung, die antimikrobielle Eigenschaften aufwiesen (HUGO 1995; MAILLARD 2002).

Neben Teerdestillaten und phenolischen Agenzien, wurde 1774 Chlor entdeckt, das sich insbesondere in Form des Hypochlorits als Desinfektionsmittel im humanen Bereich durchsetzte (RUSSELL 2002a; KAMPF u. KRAMER 2004).

Der Einsatz von Phenol und Jod für antiseptische Wundverbände wurde in der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts beschrieben, in der ebenfalls Wasserstoffperoxid entdeckt wurde (HUGO 1995; RUSSELL 2002a). Das bakterizide Formaldehyd wurde 1859 synthetisiert (HUGO 1995).

Auch im 20. Jahrhundert wurden wichtige Stoffklassen eruiert oder erweitert (RUSSELL 2004a). Im Jahr 1916 wurden die quaternären Ammoniumverbindungen (QAV), die heute überwiegend zur Oberflächendesinfektion angewendet werden, eingeführt (RUSSELL 2002b; CARSON et al. 2008). Ein Hauptvertreter dieser Substanzklasse ist Benzalkoniumchlorid (CARSON et al. 2008). Es folgte die Einführung von chlorabspaltenden Verbindungen und antiseptischen Farbstoffen wie Acridin (RUSSELL 2002a). Ein Derivat des Acridins ist das antimikrobiell wirksame Acriflavin (KUMAR et al. 2012).

In der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts kamen Triclosan, Chlorhexidin, Peressigsäure und Glutaraldehyd als antimikrobielle Agenzien zum Einsatz (RUSSELL 2002a; KAMPF 2003; KAMPF u. KRAMER 2004; ORTEGA MORENTE et al. 2013).

Während Desinfektionsmittel früher überwiegend im klinischen Bereich angewendet wurden, werden diese heute aufgrund eines steigenden Bedürfnisses der Verbraucher nach Hygiene und Lebensmittelqualität in weiteren Bereichen eingesetzt (MARIN et al. 2011). Diese werden im Kapitel 2.1.4.3 näher erläutert.

2.1.4.2 Anwendungsbezogene Rechtsgrundlagen und Definition

Der vielfältige Einsatz von Desinfektionsmitteln hat eine komplexe rechtliche Einordnung zur Folge. Während die Zulassung und Vermarktung von Bioziden grundsätzlich durch die Biozidprodukte-VO geregelt ist, werden je nach Einsatzgebiet verschiedene Rechtsgebiete tangiert. Desinfektionsmittel zur direkten Anwendung an Mensch oder Tier gelten als Arzneimittel und unterliegen dem Arzneimittelgesetz. Erzeugnisse zur Desinfektion von Medizinprodukten wie chirurgischem Instrumentarium fallen unter die Regelung des Medizinproduktegesetzes. Sind Biozide Ingredienzien von kosmetischen Mitteln, erfolgt die rechtliche Regelung durch die europäische Kosmetik-VO (VO (EG) 1223/2009); als Bestandteil von Bedarfsgegenständen regelt die nationale Bedarfsgegenstände-VO (BedGgstV) die Einsatzmöglichkeiten. Den rechtlichen Rahmen für den Einsatz von Desinfektionsmitteln in der Lebensmittelherstellung und -verarbeitung gibt auf europäischer Ebene die Basisverordnung (VO (EG) 178/2002) vor, in der die Herstellung und Vermarktung von nicht sicheren Lebensmitteln untersagt wird.

Um die Begrifflichkeit des „nicht sicheren Lebensmittels“ zu konkretisieren, wurden u. a. verschiedene EU-Hygienevorschriften (z. B. VO (EG) 852/2004, 853/2004, 854/2004) erlassen. Die nationalen Umsetzungen dieser Hygienevorschriften (Tierische Lebensmittel-Hygieneverordnung, Lebensmittelhygiene-Verordnung) und das Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch stellen die Rechtsgrundlagen in Deutschland dar. Trinkwasser zählt definitionsgemäß zu den Lebensmitteln, die Desinfektion von Trinkwasser wird allerdings separat durch die Trinkwasserverordnung geregelt (Trinkwasserverordnung 2001).

Den Anwendungsgebieten entsprechend vielfältig ist die jeweilige kontextuale Definition von Desinfektionsmitteln. So definiert der Codex Alimentarius die Desinfektion für den Lebensmittelbereich als Reduktion von Mikroorganismen auf ein Maß, durch das die Lebensmittelsicherheit nicht gefährdet wird (CAC 2003). Unabhängig von der Zweckbestimmung ist allen Desinfektionsmitteln gemeinsam, dass sie mindestens eine antimikrobielle Substanz in entsprechender Konzentration enthalten, um eine bakterizide, fungizide, viruzide, sporozide oder mehrere der aufgezählten Wirkungen zu erzielen (CERF et al. 2010; SOUMET et al. 2012). Im Gegensatz zur Sterilisation, die ein physikalisches Verfahren darstellt und eine völlige Entkeimung zum Ziel hat, soll durch die Desinfektion eine Reduzierung der Keimbelastung (Faktor 10^4 bis 10^7) auf ein dem jeweiligen Zweck entsprechendes akzeptables Niveau erreicht werden (REUTER 1998; RUTALA u. WEBER 1999).

2.1.4.3 Einsatz von Desinfektionsmitteln

Desinfektionsmittel werden in der Lebensmittelproduktion, im klinischen Bereich sowie im privaten Haushalt angewendet (LEVY 2001; HOLAH 2002; MEYER u. COOKSON 2010; MARSHALL et al. 2012; LERMA et al. 2013). Den verschiedenen Einsatzgebieten gemeinsam ist die Schaffung von Hygienestandards, die zum Schutz der menschlichen und tierischen Gesundheit beitragen (MEYER 2006; SCENIHR 2009). In der Lebensmittelproduktion sollen durch den Einsatz von Desinfektionsmitteln sowohl die Kolonisierung von Tieren, als auch die Kontamination von tierischen Lebensmitteln reduziert werden, um so die Wahrscheinlichkeit einer Infektion des Verbrauchers mit pathogenen Erregern zu minimieren (LEVY 2001; DAVIDSON u. HARRISON 2002; RUSSELL 2003b; KARATZAS et al. 2007).

Dabei erstreckt sich die Anwendung von Desinfektionsmitteln über die gesamte Lebensmittelkette, von der Primärproduktion bis zum Einzelhandel (SHERIDAN et al. 2012; CAPITA u. ALONSO-CALLEJA 2013; ORTEGA MORENTE et al. 2013).

Verschiedene Entwicklungen führten in den letzten Jahren zu einem erhöhten Bedarf an effizienter Hygiene in der Lebensmittelindustrie. So wurden die Produktionschargen größer und der Anteil an verarbeiteten Lebensmitteln wuchs (LANGSRUD et al. 2003). Zeiträume und Entfernungen zwischen Primärproduktion und Endverbraucher haben stetig zugenommen. Darüber hinaus fordert der moderne Verbraucher gesunde Lebensmittel mit weniger Konservierungsstoffen bei langer Haltbarkeit (LANGSRUD et al. 2003; CONDELL et al. 2012a). Diese Umstände bedingen einen vermehrten Einsatz von Desinfektionsmitteln für die Produktion sicherer Lebensmittel (LANGSRUD et al. 2003; CONDELL et al. 2012a).

Hygienemaßnahmen in der Primärproduktion sind von besonderer Wichtigkeit, da die Primärproduktion die hauptsächliche Quelle für Lebensmittelkontaminationen mit Zoonoseerregern wie Salmonellen darstellt (WHITE et al. 2002; FOLEY et al. 2011; HARTUNG u. KÄSBOHRER 2012; EFSA u. ECDC 2013; HENRIQUES et al. 2013). Ein weiterer Grund für den Einsatz von Desinfektionsmitteln als Maßnahme zur Reduktion von Infektionserregern, ist die Notwendigkeit, den therapeutischen Antibiotikaeinsatz bei gleichbleibender Qualität und mikrobiologischer Unbedenklichkeit der tierischen Lebensmittel zu verringern (BÖHM 1998; IFH 2000; GILBERT u. MCBAIN 2003). Die Minimierung des Infektionsdrucks durch sorgfältige Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen im Umfeld lebensmittelliefernder Tiere stellt daher eine wichtige infektionsprophylaktische Maßnahme dar (DOYLE u. ERICKSON 2012). Darüber hinaus sollen die mikrobielle Übertragung zwischen Tierabteilungen reduziert und die Bildung möglicher Infektketten im Tierbestand verhindert werden, um so den Schutz des Verbrauchers zu verbessern (DOYLE u. ERICKSON 2006; VAN IMMERSEEL et al. 2009; MØRETRØ et al. 2012). Desinfektionsmittel werden daher besonders zur Dekontamination von Oberflächen in Ställen (vor und nach dem Ein- bzw. Ausstallen), Brutstätten sowie Tiertransportfahrzeugen verwendet (SCENIHR 2009; DEWAELE et al. 2011). So beschrieben CONNER u. WAKEFIELD (2006) Kreuzkontaminationen von salmonellenbelasteten Tierbeständen auf unbelastete Tiere, die durch ungenügende Reinigung und Desinfektion von Transportkäfigen verursacht wurden.

AURY et al. (2010) berichteten über eine signifikante Reduktion der Salmonellennachweise durch Desinfektion der Fußböden in Geflügelställen.

In der Sekundärproduktion werden Desinfektionsmittel vor allem zur Oberflächendesinfektion von Anlagen sowie zur Dekontamination von Gerätschaften des Schlachtprozesses eingesetzt (SCENIHR 2009; CERF et al. 2010).

Eine Anwendung am Schlachtkörper zur Minimierung der mikrobiellen Belastung ist gegenwärtig für einige Länder, z. B. die USA, beschrieben (DAVIDSON u. HARRISON 2002; SCENIHR 2009; CERF et al. 2010). Neben den oben genannten Maßnahmen stellt die sorgfältige Personalhygiene in jedem Abschnitt der Lebensmittelproduktion ein wichtiges Hygienekriterium dar (ARSENAULT et al. 2007; VAN IMMERSEEL et al. 2009). In den Bereichen Transport und Handel, den Prozessabschnitten nach der Sekundärproduktion, werden Desinfektionsmittel größtenteils zur Oberflächendesinfektion von Lebensmitteltransportbehältnissen und -fahrzeugen (SCENIHR 2009) eingesetzt.

Während die Desinfektion im klinischen sowie industriellen Bereich einen essentiellen Beitrag zum Schutz der Gesundheit leistet, ist der zunehmende Einsatz von antibakteriellen Substanzen in Produkten des häuslichen Gebrauchs umstritten (DANN u. HONTELA 2011; CIUSA et al. 2012). So werden antibakterielle Substanzen in kosmetischen Mitteln wie Zahnpasta, Deodorantien und Flüssigseife, sowie in Bedarfsgegenständen wie Haushaltsreinigern, Spielzeug und Textilien eingesetzt (FERNÁNDEZ-FUENTES et al. 2012; ARIOLI et al. 2013; SKOVGAARD et al. 2013). Der Vorteil von antimikrobiellen Inhaltsstoffen in kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen wird jedoch in Frage gestellt (LEVY 2001; RUSSELL 2004a; AIELLO et al. 2005, 2007). So konnte in Studien von LARSON et al. (2003) keine signifikante Reduktion der Bakterienanzahl bei Personen, die antibakterielle Seife benutzt hatten, im Vergleich zu denen, die herkömmliche Seife benutzt hatten, festgestellt werden.

2.1.4.4 Desinfektionsmittelklassen

Eine Einteilung der Desinfektionsmittel ist nach verschiedenen Kriterien möglich. Sie können nach Anwendungsart (z. B. Oberflächendesinfektionsmittel), Zielorganismen (z. B. Bakterien), Wirkweise (z. B. Oxidationsmittel) oder chemischen Eigenschaften (z. B. Aldehyde) eingeteilt werden. Eine gebräuchliche Systematik entsprechend der chemischen Struktur ordnet die hauptsächlich in der Lebensmittelindustrie eingesetzten Desinfektionsmittel in QAV, Biguanidine und phenolische Verbindungen ein (CONDELL et al. 2012a; LERMA et al. 2013).

Benzalkoniumchlorid, Chlorhexidin und Triclosan sind exemplarische Vertreter dieser drei Biozidstoffklassen (CONDELL et al. 2012a; ARIOLI et al. 2013; ELLI et al. 2013; MAVRI u. MOŽINA 2013).

Benzalkoniumchlorid weist ein breites antimikrobielles Spektrum auf und wird vor allem als Oberflächendesinfektionsmittel - überwiegend im industriellen sowie im klinischen und häuslichen Bereich - verwendet (CHAPMANN 2003; CARSON et al. 2008; ELLI et al. 2013).

Ein weiteres Beispiel für QAV stellt Acriflavin dar (GILBERT u. MCBAIN 2003). Dieser antimikrobiell wirksame Farbstoff wird überwiegend in Antiseptika eingesetzt und findet im human- und veterinärmedizinischen Bereich Verwendung (IFH 2000; GILBERT u. MCBAIN 2001; KAWAI u. YAMAGISHI 2009; POLAT u. KARAKUS 2013).

Chlorhexidin ist u. a. antibakterieller Bestandteil von Flächendesinfektionsmitteln und wird in der Lebensmittelproduktion sowie im klinischen Bereich angewendet (McDONNELL u. RUSSELL 1999; BLOOMFIELD 2002; CONDELL et al. 2012a; ELLI et al. 2013). Darüber hinaus wird die Substanz als antiseptischer Inhaltsstoff in Produkten der Veterinär- und Humanmedizin zur Anwendung an Mensch und Tier verwendet (THOMAS et al. 2000).

Die zunehmend relevante polychlorierte Phenoxyphenol-Verbindung Triclosan wird im folgenden Kapitel näher betrachtet (BAILEY et al. 2009; CIUSA et al. 2012).

2.2 Das Biozid Triclosan

2.2.1 Eigenschaften – Einsatz – Nachweis in der Umwelt

Die Substanz Triclosan (5-Chlor-2-(2,4-dichlorphenoxy)-phenol) wurde in den 60er Jahren eingeführt und wird bis heute aufgrund des breiten antimikrobiellen Wirkspektrums vielfältig verwendet (KAMPF u. KRAMER 2004; CLAYTON et al. 2011; YU et al. 2012; RÜDEL et al. 2013). So werden für das synthetische, nichtionische Biozid (SCHWEIZER 2001) Wirkungen sowohl gegen grampositive als auch gramnegative Bakterien beschrieben (BAILEY et al. 2009). Neben diesen antibakteriellen Eigenschaften weist die Verbindung auch eine antifungizide Wirkung auf (KAMPF u. KRAMER 2004; DANN u. HONTELA 2011; LUBARSKY et al. 2012).

Aus diesen Charakteristika resultieren vielseitige Anwendungsgebiete in der Lebensmittelindustrie (ELLI et al. 2013; SHERIDAN et al. 2013), im veterinärmedizinischen (DANN u. HONTELA 2011) und humanmedizinischen Bereich (JONES et al. 2000; MAVRI u. MOŽINA 2013). Darüber hinaus wird Triclosan in Medizinprodukten wie Nahtmaterial verwendet (KRAMER et al. 2006). Der Zusatz in kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen ist ebenso sehr verbreitet (JONES et al. 2000; LEDDER et al. 2006; COPITCH et al. 2010; CLAYTON et al. 2011; SALEH et al. 2011). Triclosan wird weltweit, vor allem aber in Nordamerika, Asien und Europa eingesetzt (CLAYTON et al. 2011; DANN u. HONTELA 2011; VON DER OHE et al. 2012; TAMURA et al. 2013). Der Verbrauch von Triclosan stieg in der EU und wurde für die Jahre 2005 und 2006 auf 350 bzw. 450 Tonnen geschätzt (SCCS 2010; VON DER OHE et al. 2012). Für Deutschland wurde ein Umsatz von ungefähr 40 Tonnen für das Jahr 2000 berechnet (WIND et al. 2004).

Triclosan wird wie viele halogenierte Verbindungen in der Umwelt nicht ausreichend abgebaut, so dass durch den gesteigerten Einsatz in den letzten 25 Jahren Triclosan und dessen Hauptmetabolit Methyltriclosan in Kläranlagen, Oberflächenwassern, Flüssen, Fischen, Sedimenten und Böden nachgewiesen werden konnte (DANN u. HONTELA 2011; LUBARSKY et al. 2012; VON DER OHE et al. 2012; MIDDLETON u. SALIERNO 2013; RÜDEL et al. 2013; TAMURA et al. 2013). Auch in Deutschland wurde Triclosan sowohl in Kläranlagen als auch in Flüssen und Fischen detektiert (VON DER OHE et al. 2012; RÜDEL et al. 2013).

Diese Umweltpersistenz führt dazu, dass in Europa, Nordamerika und Australien Triclosan in Muttermilch, Urin und Plasma beim Menschen ermittelt wurde (SCCS 2010; DANN u. HONTELA 2011; VON DER OHE et al. 2012; SKOVGAARD et al. 2013).

2.2.2 Wirkmechanismus

Im Gegensatz zu antimikrobiellen Chemotherapeutika, die einen spezifischen Vorgang in der Bakterienzelle hemmen, weisen Biozide wie Triclosan eine Vielzahl von verschiedenen Angriffspunkten (*multiple target sites*) auf (SALEH et al. 2011; MAVRI u. MOŽINA 2012; ARIOLI et al. 2013). Die einzelnen Wirkmechanismen unterscheiden sich je nach Stoffklasse (z. B. phenolische Verbindung) und Zielorganismus (DENYER u. STEWART 1998; CLOETE 2003). Die Wirkung erfolgt dabei konzentrationsabhängig und ist entweder bakteriostatisch oder bakterizid (LUBARSKY et al. 2012; MIDDLETON u. SALIERNO 2013). Membrandestabilisierende Effekte sind in höheren Konzentrationen für die meisten Biozide, so auch für Triclosan, Acriflavin, Benzalkoniumchlorid und Chlorhexidin charakteristisch (CHAPMAN 2003; COTTELL et al. 2009; KAWAI u. YAMAGISHI 2009; MIDDLETON u. SALIERNO 2013).

Der polychlorierte Phenylether Triclosan wirkt in hohen Konzentrationen (> 1 mg/mL) bakterizid (AIELLO et al. 2007; BAILEY et al. 2009; MIDDLETON u. SALIERNO 2013), wobei die Adsorption an bzw. die anschließende Penetration in die Zellmembran erste Schritte im Wirkmechanismus darstellen (KAMPF 2003). Nach verschiedenen Reaktionen mit Membranbestandteilen führt der Triclosan-induzierte Kaliumionenverlust zur Desorientierung der Membran (MCBAIN et al. 2002; RUSSELL 2004b). Der Austritt von intrazellulären niedermolekularen Bestandteilen hat den Abbau von Proteinen und Nukleinsäuren und schließlich die Lyse der Zellwand zur Folge (MCDONNELL u. RUSSELL 1999; SCHWEIZER 2001; KAMPF 2003; RUSSELL 2003b, 2004b). In subletalen Konzentrationen ist jedoch für Triclosan erstmals in den 90er Jahren eine definierte Angriffsstelle (HEATH et al. 1998, 1999; MCMURRY et al. 1998b; LEVY et al. 1999) beschrieben worden. So hemmt Triclosan spezifisch die Enoyl-Acyl-Carrier-Protein-Reduktase (ACP-Reduktase, FabI), die den letzten Schritt im Elongationszyklus des bakteriellen Fettsäurebiosyntheseweges katalysiert (MEHBOOB et al. 2010; NIELSEN et al. 2013b).

Es sind vier verschiedene prokaryotische Isoformen der ACP-Reduktase (FabI, FabK, FabL und FabV) für verschiedene Bakterienspezies beschrieben (KIM et al. 2011, 2012; HIRSCHBECK et al. 2012). Sie werden durch die Gene *fabI*, *fabK*, *fabL* und *fabV* codiert. FabI ist u. a. für *Salmonella* (S.), *Escherichia* (E.) *coli*, *Staphylococcus* oder *Campylobacter* beschrieben (LEE et al. 2011; MIN et al. 2011; CIUSA et al. 2012). Die Inhibition von FabI und die resultierende Hemmung der Fettsäurebiosynthese sind von entscheidender Bedeutung für den bakteriellen Zellwandaufbau, da Fettsäuren essentielle Bestandteile der Lipiddoppelmembran darstellen (SINGH et al. 2011). Da der prokaryotische Fettsäurebiosyntheseweg (FSB II) sich vom eukaryotischen FSB (FSB I) unterscheidet, stellen ACP-Reduktasen ein wichtiges Angriffsziel bei der Bekämpfung von Zoonose- und Infektionserregern wie Salmonellen, Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) oder Mykobakterien dar (MIN et al. 2011; SINGH et al. 2011).

Triclosan agiert bei der als irreversibel beschriebenen Hemmung als Antagonist und konkurriert kompetitiv mit dem Agonisten Enoyl-ACP um die Bindung im aktiven Zentrum von FabI (SCHWEIZER 2001; LUBARSKY et al. 2012). Dabei ist die Bildung eines ternären Triclosan-NAD⁺-FabI Komplexes beschrieben, der die Reduktion vom Enoyl-ACP zum Acyl-ACP verhindert und somit die Elongation und folglich die Fettsäurebiosynthese blockiert (HEATH et al. 1999; ROUJEINIKOVA et al. 1999; STEWART et al. 1999; ESCALADA et al. 2005).

2.2.3 Triclosan-Toleranzmechanismen – eine Übersicht

Grundsätzlich wird bei Bakterien zwischen intrinsischer (vorhandener) und extrinsischer (erworbener) Resistenz unterschieden (TUMAH 2009). Die Resistenz, die nach Ansicht der Autoren MEYER u. COOKSON (2010) ein genetisch determiniertes Phänomen darstellt, muss im Zusammenhang mit Bioziden vom phänotypischen Adaptationsprozess unterschieden werden. Biozidresistenzen müssten daher streng genommen als Biozidtoleranzen bzw. als Biozidadaptationen bezeichnet werden. Weiterhin sind - im Gegensatz zu vielen antimikrobiellen Chemotherapeutika - keine (klinischen) Breakpoints vorhanden, die eine Unterteilung der Bakterien in sensibel, intermediär oder resistent ermöglichen (McDONNELL u. RUSSELL 1999). Daher ist es angemessener, im Zusammenhang mit Bioziden von einer Reduktion der Empfindlichkeit anstelle einer Resistenz oder Resistenzzunahme zu sprechen (ABUZAID et al. 2012).

Der Begriff der Biozidresistenz wird dennoch in der wissenschaftlichen Literatur verwendet, da einige Biozide, wie Triclosan, in geringen Konzentrationen einen spezifisch definierten Angriffsort, ähnlich den antimikrobiellen Chemotherapeutika, aufweisen. Der Einsatz von solchen geringen Biozidkonzentrationen kann wiederum eine Selektion von Mutationen zur Folge haben (CIUSA et al. 2012). Da beide Begriffe, Triclosan-Resistenz und Triclosan-Toleranz, oft im gleichen Zusammenhang verwendet werden, wird in dieser Arbeit auch der Begriff Triclosan-Resistenz bei entsprechender zu Grunde liegender Literatur verwendet.

2.2.3.1 Erworbene Toleranzmechanismen

Für Triclosan sind sowohl erworbene als auch vorhandene Mechanismen beschrieben (YAZDANKHAH et al. 2006). Zu den erst genannten zählen Mutationen in der *target site*, dem Gen für die ACP-Reduktase und deren Überexpression sowie ein vermehrtes Ausschleusen der Substanz durch Aufregulierung von *multidrug* Effluxpumpen (SCHWEIZER 2001; PYCKE et al. 2010; SALEH et al. 2011). Vereinzelt wurde von Veränderungen in der Zusammensetzung der Zellmembran sowie von unterschiedlichen Morphologien bei koloniebildenden Einheiten (KbE) berichtet (SEAMAN et al. 2007; TKACHENKO et al. 2007).

2.2.3.1.1 Veränderungen der Angriffsstelle

Mutationen in dem Gen für die ACP-Reduktase *FabI*, führen zu einem Anstieg der minimalen Hemmkonzentration (MHK) für Triclosan und sind sowohl für gramnegative als auch grampositive Bakterienarten wie z. B. *E. coli*, *Acinetobacter baumannii* oder *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* beschrieben (MCMURRY et al. 1998b; SCHWEIZER 2001; CHEN et al. 2009; NIELSEN et al. 2013b; SHERIDAN et al. 2013; SKOVGAARD et al. 2013). MCMURRY et al. stellten in ihrer Studie im Jahr 1998b drei *missense* Mutationen bei *E. coli* nach Adaptation an Triclosan fest. Die *missense* Mutation am Codon 93 führt zu einem Austausch der Aminosäure Glycin gegen Valin. Der MHK-Wert für Triclosan der Gly₉₃→Val Mutante war im Vergleich zum Ausgangsstamm 95-fach höher (MCMURRY et al. 1998b). Zwei weitere *missense* Mutationen in dem Gen *fabI* führten ebenso zu einem Aminosäureaustausch (Met₁₅₉→Thr, Phe₂₀₃→Leu), die jeweiligen MHK-Werte waren jedoch nur 12- bzw. 6-fach höher im Vergleich zum MHK-Wert des Ausgangsstammes (MCMURRY et al. 1998b).

Auch HEATH und Kollegen beschrieben *missense* Mutationen am Codon 93 nach Selektion Triclosan-toleranter *E. coli*-Stämme (HEATH et al. 1998). Der Austausch von Gly₉₃→Ser sowie Gly₉₃→Val führte zur 4- bzw. 64-fachen Erhöhung des MHK-Wertes (HEATH et al. 1998).

Für *E. coli* konnte gezeigt werden, dass der Austausch von Gly₉₃→Val zu sterischen Hinderungen in der Triclosan-Bindungsstelle von FabI führt. Diese haben eine verringerte Ausbildung des ternären Triclosan-NAD⁺-FabI Komplexes zur Folge, so dass die Wirkung von Triclosan reduziert und die essentielle Elongation der Fettsäuren weniger stark beeinträchtigt wird (HEATH et al. 1999; LEVY et al. 1999; HEATH u. ROCK 2000). Dieser Mechanismus wird auch bei klinischen *Acinetobacter baumannii*-Isolaten vermutet, die eine *missense* Mutation mit resultierendem Aminosäureaustausch (Gly₉₅→Ser) und MHK-Werte von > 4 µg/mL für Triclosan aufwiesen (CHEN et al. 2009). Bei *Staphylococcus aureus* werden hauptsächlich drei Mutationen im *fabI*-Gen mit einer Triclosan-Toleranz assoziiert, die alle einen Austausch von Aminosäuren (Phe₂₀₄→Cys oder Phe₂₀₄→Ser sowie Gly₂₃→Ser und Asp₁₀₁→Thr) zur Folge haben (HEATH et al. 2000a; FAN et al. 2002; CIUSA et al. 2012). Der Phe₂₀₄→Cys-Austausch minimiert auch hier aufgrund von sterischer Hinderung in der Triclosan-Bindungsstelle von FabI die Ausbildung des Triclosan-NAD⁺-FabI Komplexes (FAN et al. 2002) und ist als wichtiger Bestandteil der Adaptationsfähigkeit von *Staphylococcus aureus* an Triclosan beschrieben (FAN et al. 2002; CIUSA et al. 2012; NIELSEN et al. 2013b).

Eine gesteigerte Expression von *fabI* ist u. a. für Triclosan-adaptierte *E. coli*-Mutanten sowie für klinische Isolate von *Acinetobacter baumannii* und *Staphylococcus aureus* publiziert (MCMURRY et al. 1998b; CHEN et al. 2009; NIELSEN et al. 2013b; SHERIDAN et al. 2013). So stellten SHERIDAN und Kollegen eine bis zu 5,5-fache Überexpression von *fabI* in einem *in vitro* Triclosan-adaptierten *E. coli* Stamm fest, der einen MHK-Wert von 8 mg/mL aufwies. Der Ausgangsstamm wies im Vergleich einen MHK-Wert von 6,25 µg/mL auf (SHERIDAN et al. 2013). Für klinische *Acinetobacter baumannii*-Isolate konnte eine bis zu 12-fache Überexpression von *fabI* bei MHK-Werten von 1 bis 2 µg/mL festgestellt werden (CHEN et al. 2009). FAN et al. beschrieben eine 3- bis 5-fache Überexpression von *fabI* bei klinischen *Staphylococcus aureus* Isolaten, die ebenfalls MHK-Werte von 1 bis 2 µg/mL aufwiesen (FAN et al. 2002).

CIUSA et al. (2012) beschrieben einen neuen Resistenzmechanismus für Triclosan, der erstmals auf einen horizontalen Gentransfer hinweist.

So wurde bei klinischen *Staphylococcus aureus*-Isolaten mit reduzierter Triclosan-Empfindlichkeit neben Mutationen im *Staphylococcus aureus fabI*-Gen noch ein zusätzliches *fabI*-Gen festgestellt. Nach weiterführenden Untersuchungen konnte dieses dem *Staphylococcus haemolyticus fabI* zugeordnet werden (CIUSA et al. 2012).

2.2.3.1.2 Bedeutung und Aufregulierung von *multidrug* Effluxpumpen

Die Aufregulierung von *multidrug* Effluxpumpen nimmt unter den Triclosan-Toleranzmechanismen eine besondere Position ein, da mit diesem Mechanismus eine mögliche Entstehung von Kreuzresistenzen gegenüber antimikrobiellen Chemotherapeutika assoziiert wird (WEBBER et al. 2008a; BAILEY et al. 2009; COPITCH et al. 2010).

Aus diesem Grund werden im Folgenden *multidrug* Effluxpumpen näher charakterisiert. Die prinzipielle Aufgabe von Effluxpumpen besteht im Transport von Stoffen aus dem Zellinneren in die extrazelluläre Umgebung (WEBBER et al. 2008b). Die zu exportierenden Stoffe können intrazelluläre Stoffwechselmetabolite, bakterielle Toxine, zytotoxisch wirkende Stoffe aus der natürlichen Umgebung des Wirtes (z. B. Gallensalze) oder antimikrobiell wirksame Stoffe sein, weshalb Effluxsysteme sowohl wichtige physiologische als auch protektive Funktionen wahrnehmen (VAN BAMBEKE et al. 2003; PIDDOCK 2006b; BAILEY et al. 2008). Die Transporter können einerseits eine sehr hohe Substratspezifität besitzen, so dass eine Substanz oder Substanzklasse aus der Zelle transportiert wird (PIDDOCK 2006b; LI u. NIKAIDO 2009). Andererseits exportieren *multidrug* Pumpen strukturell unverwandte Stoffe bzw. Stoffklassen und weisen damit ein sehr breites Substratspektrum auf (PIDDOCK 2006b; LI u. NIKAIDO 2009). Dieses Substratspektrum kann Fettsäuren, Gallensalze, Farbstoffe, Detergenzien, unterschiedliche Klassen von antimikrobiellen Chemotherapeutika oder Biozide wie Triclosan beinhalten (BORGES-WALMSLEY u. WALMSLEY 2001; BORGES-WALMSLEY et al. 2003; POOLE 2005). Aufgrund von Sequenzhomologien und Ähnlichkeiten in Struktur und Aufbau werden *multidrug* Effluxpumpen zu verschiedenen Familien zusammengefasst (SAIER u. PAULSEN 2001; BAY et al. 2008; NIKAIDO et al. 2011; ALVAREZ-ORTEGA et al. 2013).

Die unterschiedlichen Familien können zusätzlich in zwei Gruppen je nach verwendeter Energiequelle unterteilt werden (BORGES-WALMSLEY u. WALMSLEY 2001; ALVAREZ-ORTEGA et al. 2013; COSTA et al. 2013).

Zur ersten Gruppe gehört die ABC-Superfamilie (*ATP-binding cassette*), wohingegen zur zweiten Gruppe die RND- (*resistance nodulation cell division*), MFS- (*major facilitator superfamily*), MATE- (*multidrug and toxic compound extrusion*) sowie die SMR-Familie (*small multidrug resistance*) gezählt werden (SAIER u. PAULSEN 2001; PIDDOCK 2006b). Die jeweiligen Gene, die für die Effluxpumpen codieren, sind überwiegend chromosomal- aber auch plasmidlokalisiert (PIDDOCK 2006b). Die Regulation der Genexpression der Effluxkomponenten ist sehr komplex und kann sowohl über lokale als auch globale Regulatoren erfolgen (NIKAIDO 1996; NISHINO et al. 2007). Triclosan gehört zum Substratspektrum von *multidrug* Effluxpumpen vieler Bakterien wie *E. coli*, *Pseudomonas (P.) aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter baumannii* oder *Campylobacter* spp. (POOLE 2005; SANCHEZ et al. 2005; PIDDOCK 2006a; CHEN et al. 2009; SHERIDAN et al. 2013). Eine Aufregulierung dieser Transporter nach *in vitro* Triclosan-Exposition wurde u. a. für *E. coli*, *P. aeruginosa* oder *Stenotrophomonas maltophilia* beschrieben (MCMURRY et al. 1998a; CHUANCHUEN et al. 2001; SANCHEZ et al. 2005; MIMA et al. 2007; BAILEY et al. 2009). McMurry und Kollegen berichteten von einer 2-fachen Abnahme der Empfindlichkeit gegenüber Triclosan bei gleichzeitiger Überexpression der *multidrug* Effluxpumpe AcrAB in *E. coli*-Mutanten (MCMURRY et al. 1998a). Eine Deletion des AcrAB-Lokus führte zu einer 10-fachen Erhöhung der Empfindlichkeit gegenüber Triclosan (MCMURRY et al. 1998a). Des Weiteren zeigten klinische *E. coli*-Isolate, die eine Überexpression der globalen Regulatorgene *marA* oder *soxS* aufwiesen, höhere MHK-Werte gegenüber Triclosan im Vergleich zu Triclosan-empfindlicheren Isolaten (MCMURRY et al. 1998a). Die Regulatorproteine MarA und SoxS regulieren u. a. die Expression von AcrAB-TolC und führen bei einer Überexpression zur erhöhten Transkription von AcrAB-TolC (LEVY 2002). Weiterhin sind Überexpressionen der Effluxpumpen EmrE sowie AcrEF-TolC für *E. coli* beschrieben (SHERIDAN et al. 2013). Triclosan-sensitive *P. aeruginosa*-Mutanten, die eine Deletion des MexAB-OprM Effluxsystems aufweisen, zeigten eine Überexpression der MexCD-OprJ Pumpe nach Triclosan-Exposition (CHUANCHUEN et al. 2001).

Eine Überexpression der *multidrug* Effluxpumpe SmeDEF nach Exposition gegenüber Triclosan ist bei *Stenotrophomonas maltophilia*-Isolaten beschrieben worden (SANCHEZ et al. 2005).

2.2.3.1.3 Veränderungen der Zellwand und der Zellmorphologie

Bei Triclosan-toleranten *Staphylococcus aureus*-Stämmen wurden Veränderungen in der Fettsäurezusammensetzung der Lipiddoppelmembran festgestellt. Die Autoren führten diese auf eine modifizierte Genexpression von Genen, die an der Fettsäurebiosynthese beteiligt sind, zurück (TKACHENKO et al. 2007).

SEAMAN et al. (2007) berichteten von sogenannten *small colony variants*, die nach *in vitro* Triclosan-Exposition bei MRSA-Stämmen auftraten. Neben einer reduzierten Triclosan-Empfindlichkeit wiesen diese Stämme Resistenzen gegenüber Penicillin und Gentamicin auf (SEAMAN et al. 2007).

2.2.3.2 Intrinsische Toleranzmechanismen

Intrinsische Triclosan-Toleranz ist z. B. für Isolate der Bakterien *P. aeruginosa* und *P. putida*, *Alcaligenes xylosoxidans* ssp. *denitrificans*, *Bacillus (B.) subtilis*, *Streptococcus pneumoniae* oder *Enterococcus faecalis* beschrieben. (HEATH et al. 2000b; YAZDANKHAH et al. 2006; YU et al. 2010; SALEH et al. 2011; CHUANCHUEN u. SCHWEIZER 2012;). Die MHK-Werte variierten hierbei zwischen den Bakterienarten und betragen z. B. für *Streptococcus pneumoniae* 2 µg/mL, für *Enterococcus faecalis* 10 µg/mL oder für *P. aeruginosa* 1000 µg/mL (HEATH u. ROCK 2000). Dabei wurde z. B. für *P. aeruginosa* postuliert, dass dieser MHK-Wert durch die Synergien einzelner Mechanismen erzielt wird (MIMA et al. 2007; CHUANCHUEN u. SCHWEIZER 2012).

2.2.3.2.1 Triclosan-tolerante Enoyl-ACP-Reduktasen

P. aeruginosa und *B. subtilis* weisen neben einer Triclosan-empfindlichen ACP-Reduktase (FabI) noch eine Triclosan-tolerante Form (FabV bzw. FabL) auf (HEATH et al. 2000b; RUSSELL 2004b; ZHU et al. 2010). Für *Streptococcus pneumoniae* und *Enterococcus faecalis* wurde nur die Triclosan-tolerante Form des Enzyms, FabK nachgewiesen (HEATH u. ROCK 2000).

2.2.3.2.2 Effluxpumpen

Neben Triclosan-toleranten ACP-Reduktasen sind weitere Mechanismen beschrieben worden, die zu einer intrinsischen Toleranz gegenüber Triclosan führen. CHUANCHUEN und Kollegen berichteten von dem Effluxpumpensystem MexAB-OprM, das eine essentielle Rolle bei der intrinsischen Triclosan-Toleranz von *P. aeruginosa*-Feldisolaten spielt (CHUANCHUEN et al. 2003).

Daneben wurden weitere *multidrug* Effluxsysteme bei *P. aeruginosa* wie MexCD-OprJ, MexEF-OprN oder MexJK-OpmH beschrieben, die an einer Triclosan-Toleranz beteiligt sein können (MIMA et al. 2007). Darüber hinaus ist von MIMA und Kollegen (2007) erstmals eine Effluxpumpe bei einer *P. aeruginosa*-Mutante beschrieben worden, die im Gegensatz zu den oben genannten *multidrug* Effluxsystemen nur Triclosan aus der Zelle exportiert. Diese TriABC-OpmH Effluxpumpe ist eine von fünf bei *P. aeruginosa* bekannten Effluxpumpen, die Triclosan aus der Zelle transportiert, weshalb Efflux als wichtiger Mechanismus der intrinsischen Toleranz gilt (MIMA et al. 2007).

2.2.3.2.3 Produktion Triclosan-abbauender Enzyme

Die Produktion Triclosan-abbauender Enzyme wurde bei den aus Bodenproben isolierten Bakterien *P. putida* und *A. xylosoxidans* ssp. *denitrificans* beschrieben (YAZDANKHAH et al. 2006). Diese Bakterien sind in der Lage, auf festem Nährmedium, das 1 % Triclosan enthält, zu wachsen (MEADE et al. 2001).

2.2.4 Triclosan-Toleranz bei Salmonellen

Intrinsische Toleranzmechanismen sind bislang bei *S. enterica* ssp. *enterica* in der Literatur nicht beschrieben worden; als erworbene Mechanismen sind Veränderungen in der Angriffsstelle (Mutation und Aufregulierung) sowie die Überexpression von *multidrug* Effluxpumpen bekannt (TABAK et al. 2007; WEBBER et al. 2008b). Darüber hinaus sind von WEBBER et al. (2008a) Hinweise auf mögliche Veränderungen im Fettsäurebiosyntheseweg festgestellt worden.

Salmonellen zählen zu den wichtigsten Erregern lebensmittelassoziierter Krankheitsausbrüche. Aufgrund der zoonotischen Aktivität und der damit verbundenen humanpathogenen Bedeutung wird die Gattung *Salmonella* in Kapitel 2.3 näher betrachtet.

2.2.4.1 Veränderungen in der ACP-Reduktase FabI

Für Salmonellen sind *missense* Mutationen im *fabI*-Gen bei aviären Feldisolaten der Serovare *S. Indiana*, *S. Newport*, *S. Ohio*, *S. Senftenberg* und *S. Typhimurium* am Codon 115 beschrieben (COPITCH et al. 2010). Diese Basensubstitutionen führten zu einem Aminosäureaustausch von Val₁₁₅→Ile (COPITCH et al. 2010). Die unterschiedlichen Serovare wiesen MHK-Werte für Triclosan von 0,25 µg/mL auf, mit der Ausnahme von *S. Ohio*, bei dem die MHK 0,5 µg/mL betrug. COPITCH et al. (2010) schlussfolgerten aus ihren weiterführenden Untersuchungen, dass der Val₁₁₅→Ile Austausch nicht zu erhöhten MHK-Werten gegenüber Triclosan führt. Anders die von WEBBER et al. (2008b) beschriebene Punktmutation am Codon 93, die nach einer *in vitro* Triclosan-Exposition nachweisbar war. Der resultierende Aminosäureaustausch (Gly₉₃→Val) führte bei *S. Typhimurium*-Mutanten zu einer deutlich verringerten Empfindlichkeit gegenüber Triclosan (MHK-Werte von 32 bis > 128 µg/mL), trägt aber nach Meinung der Autoren nicht automatisch zu einer Triclosan-Resistenz von *S. Typhimurium* bei (WEBBER et al. 2008b). Zusätzlich wurde bei einer weiteren *S. Typhimurium*-Mutante, die einen MHK-Wert von 4 µg/mL aufwies, ein Austausch von Gly₉₃→Ser festgestellt. Im Vergleich dazu betrug der MHK-Wert des Ausgangsstammes, 0,06 µg/mL (WEBBER et al. 2008b). Dieser Gly₉₃→Ser Austausch wurde ebenfalls nach Triclosan-Exposition bei einer *S. Typhimurium*-Mutante in Studien von CONDELL et al. (2012b) nachgewiesen.

Nach Ansicht der Autoren führt diese Substitution zu einer starken Abnahme der Bindung von Triclosan an FabI, was zu einer reduzierten Wirksamkeit von Triclosan führt.

Eine Überexpression von *fabI* nach *in vitro* Triclosan-Exposition ist für das Serovar Typhimurium beschrieben worden (TABAK et al. 2007; CONDELL et al. 2012b). So berichteten CONDELL et al. (2012b) von einer 2,4- bis 4,8-fachen Aufregulierung des Gens in *S. Typhimurium*-Mutanten. WEBBER et al. (2008b) konnten in ihren Studien den direkten Einfluss einer *fabI*-Überexpression auf den MHK-Wert für Triclosan nachweisen. In Komplementationsstudien wurden bei *S. Typhimurium*-Mutanten 2- bis 4-fach höhere MHK-Werte festgestellt, nachdem eine 5-fach stärkere Expression von *fabI* durch die Plasmidlokalisierung des Gens erzielt worden war (WEBBER et al. 2008b).

2.2.4.2 *Multidrug* Effluxpumpen: Rolle bei der Triclosan-Toleranz und mögliche Entstehung von Kreuzresistenzen

Aufgrund des breiten Substratspektrums von *multidrug* Effluxpumpen besteht bei einer Triclosan-induzierten Überexpression die Möglichkeit einer gleichzeitigen Abnahme der Empfindlichkeit gegenüber wichtigen antimikrobiellen Chemotherapeutika (BAILEY et al. 2009; USUI et al. 2013). Aufregulierungen von *multidrug* Exportern nach einer *in vitro* Biozidexposition sind für *S. Typhimurium* beschrieben worden (KARATZAS et al. 2007, 2008; WHITEHEAD et al. 2011). Daher stellt die Aufregulierung von Effluxsystemen einen sehr bedeutenden Mechanismus bei der Biozid- bzw. Triclosan-Adaptation von Salmonellen dar. Bei *S. Typhimurium* sind von HORIYAMA et al. im Jahre 2010 neun verschiedene *multidrug* Effluxpumpen beschrieben worden. Diese zählen zur Familie der RND-Effluxpumpen (AcrAB-TolC, AcrAD-TolC, AcrEF-TolC, MdsABC, MdtABC-TolC), zur MF-Superfamilie (EmrAB-TolC, MdfA) zur MATE-Familie (MdtK) sowie zur ABC-Superfamilie (MacAB-TolC). Die Regulation von AcrAB-TolC, zu dessen Substratspektrum Triclosan gehört, erfolgt u. a. mit Hilfe eines lokalen Regulators (AcrR) sowie verschiedenen globalen Aktivatoren wie z. B. RamA oder MarA (OLLIVER et al. 2004; PIDDOCK 2006b; BAILEY et al. 2008, 2010; TABAK et al. 2009).

Bei *S. Typhimurium* konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von AcrAB-TolC zu einer verringerten Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen antimikrobiellen Chemotherapeutika, Desinfektionsmitteln, Detergenzien oder antiseptischen Substanzen wie Acriflavin führt (RANDALL et al. 2004a; BUCKLEY et al. 2006).

Aus Studien mit *in vitro* Triclosan-adaptierten *S. Typhimurium*-Mutanten wurde geschlossen, dass ein aktiver Efflux mittels AcrAB-TolC zu einer verringerten Empfindlichkeit gegenüber Triclosan führt (WEBBER et al. 2008b). CONDELL et al. (2012a) stellten bei *in vitro* selektierten Triclosan-toleranten *S. enterica* ssp. *enterica*-Mutanten eine Abnahme in der Empfindlichkeit gegenüber mehreren antimikrobiellen Chemotherapeutika fest und begründeten diese Empfindlichkeitsveränderung mit einer wahrscheinlichen Aufregulierung von *multidrug* Effluxsystemen, da die getesteten Substanzen zum Substratspektrum dieser Transporter gehören. KARATZAS et al. (2007) stellten bei *in vitro* Triclosan-adaptierten *S. Typhimurium*-Mutanten 2- bzw. 8-fache Erhöhungen in den MHK-Werten für antimikrobielle Chemotherapeutika (Chloramphenicol, Tetracyclin, Kanamycin bzw. Ampicillin) fest, die sie nach Expressionsanalysen auf die 3- bis 4-fache Aufregulierung von *acrB* zurückführten. Der MHK-Wert von Triclosan betrug bei den Mutanten 64 µg/mL verglichen mit dem Wild-Typ, der einen MHK-Wert von 0,06 µg/mL aufwies (KARATZAS et al. 2007).

In Studien von COPITCH et al. (2010) wurde bei aviären *S. enterica* ssp. *enterica*-Feldisolaten, die MHK-Werte von 0,25 bis 4 µg/mL aufwiesen, eine erhöhte Expression von *acrB* detektiert, so dass auch hier eine Aufregulierung der Effluxpumpe AcrAB-TolC möglich ist.

Liegt eine funktionelle Inaktivität des AcrAB-TolC Effluxsystems in *S. Typhimurium*-Mutanten vor, so wurde eine 4- bis 10-fache Zunahme der Empfindlichkeit gegenüber Triclosan festgestellt wohingegen bei einer Überexpression von einer 2- bis 4-fachen Abnahme der Triclosan-Empfindlichkeit berichtet wurde (BAILEY et al. 2009). Diese Relevanz von AcrAB-TolC im Triclosan-Toleranzmechanismus lässt die Autoren vermuten, dass eine mögliche zelluläre Antwort auf eine Triclosan-Exposition die Induktion dieses Effluxsystems ist (BAILEY et al. 2009).

Neben AcrAB-TolC ist von WHITEHEAD et al. (2011) eine weitere Effluxpumpe beschrieben worden, bei der nach Biozidexposition (Aldehyde und QAV) eine Aufregulierung nachweisbar war. Diese bis zu 10-fache Aufregulierung von AcrEF-TolC führte bei den *S. Typhimurium*-Mutanten zu einer 2- bis 4-fachen Abnahme in der Empfindlichkeit gegenüber Triclosan sowie zu einer 2- bis 16-fachen Abnahme gegenüber antimikrobiellen Chemotherapeutika (WHITEHEAD et al. 2011), so dass eine Beteiligung dieser Pumpe am Triclosan-Transport möglich erscheint.

2.2.4.3 Veränderungen im Fettsäurebiosyntheseweg

WEBBER et al. (2008a) konnten mittels Proteomanalysen eine bis zu 7-fach erhöhte Expression von verschiedenen Proteinen bei Triclosan-toleranten *S. Typhimurium*-Mutanten nachweisen. Das von den Autoren als *triclosan resistance network* bezeichnete Set von Proteinen war überwiegend durch Proteine, die an der Pyruvat- oder Fettsäurebiosynthese beteiligt sind, charakterisiert.

Dieses Set von Proteinen repräsentiert nach Meinung der Autoren einen Mechanismus, der zu einer gesteigerten Fettsäurebiosynthese über einen alternativen Stoffwechselweg führt.

Darüber hinaus waren weitere Veränderungen in den Proteinexpressionen der *S. Typhimurium*-Mutanten nachweisbar, so dass gemäß WEBBER und Kollegen ein multifaktorieller Triclosan-Resistenzmechanismus vorliegt, bei dem mehrere Mechanismen synergistisch zu einem hohen Resistenzlevel führen (WEBBER et al. 2008a).

2.3 Salmonellen als Lebensmittelinfektionserreger

2.3.1 Historischer Einblick

Der Humanmediziner und Bakteriologe August Gärtner identifizierte erstmalig 1888 Salmonellen (*S. Enteritidis*) als Verursacher von Lebensmittelvergiftungen und erbrachte durch seine Ausbruchsuntersuchungen (Tier - Lebensmittel - Verbraucher) den Beweis für die zoonotische Aktivität dieser Bakterien (ANDREWS u. BAUMLER 2005). Im Jahre 1900 führte Joseph Lignières die Benennung *Salmonella* zu Ehren des US-amerikanischen Veterinärmediziners Daniel Elmer Salmon ein. In dessen Labor isolierte der Pathologe Theobald Smith erstmals 1885 *Salmonella Choleraesuis* (SCHULTZ 2008; FÀBREGA u. VILA 2013).

2.3.2 Taxonomie

Salmonellen werden der Gattung *Salmonella* zugeordnet, die zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehört. Die Gattung wird in die Arten *S. enterica* und *S. bongori* eingeteilt, wobei für *S. enterica* eine weitere Unterteilung in die sechs Unterarten *S. enterica*, *S. salamae*, *S. diarizonae*, *S. arizonae*, *S. houtenae* und *S. indica* erfolgt (GUIBOURDENCHE et al. 2010). Innerhalb der zwei Arten sind über 2600 Serovare bekannt, wobei die Unterart *S. enterica* ssp. *enterica* mit über 1500 Vertretern den größten Anteil darstellt (GUIBOURDENCHE et al. 2010; SUEZ et al. 2013). Die resultierende, ausführliche Nomenklatur gemäß White-Kauffmann-Le Minor Schema, z. B. *S. enterica* ssp. *enterica* Serovar Enteritidis wird oft durch die verkürzte Serovarbezeichnung *S. Enteritidis* ersetzt (PUI et al. 2011; SELBITZ 2011).

2.3.3 Vorkommen und Wirtsadaptation

Natürliches Habitat der Salmonellen ist der Intestinaltrakt von Tier und Mensch. Aufgrund der hohen Tenazität sind sie jedoch auch in der Umwelt etwa im Boden oder auf Pflanzen nachweisbar (WHITE et al. 2002; WINFIELD u. GROISMAN 2003; FATICA u. SCHNEIDER 2011; CONDELL et al. 2012b). So beschreiben JACOBSEN u. BECH (2012) eine Überlebensdauer von bis zu 332 Tagen für Salmonellen im Boden. Aufgrund der Wirtsspezifität werden Salmonellen grundsätzlich in zwei Gruppen eingeteilt.

Während die Unterart *S. enterica* überwiegend bei homoiothermen Tieren nachgewiesen wird, ist das Vorkommen der fünf weiteren Unterarten sowie der Art *S. bongori* häufig auf poikilotherme Tiere, besonders Reptilien, begrenzt (BRENNER et al. 2000; FÀBREGA u. VILA 2013). Die Serovarvielfalt und die unterschiedliche Bedeutung als Krankheitserreger lassen eine Einteilung der Salmonellen nach Wirtsadaptation und Virulenz zu. Hierbei wird in vier verschiedene Gruppen unterteilt (PUI et al. 2011; SELBITZ 2011). Die erste Gruppe enthält die an den Menschen angepassten humanpathogenen Serovare z. B. *S. Typhi* und *S. Paratyphi* A, B und C (MONACK 2012). Die zweite Gruppe beinhaltet an bestimmte Tierarten adaptierte tierpathogene Erreger. So sind die Serovare *S. Gallinarum* und *S. Pullorum* an Hühner, *S. Choleraesuis* an Schweine adaptiert (DOMÍNGUEZ-BERNAL et al. 2008; FENG et al. 2013); *S. Dublin* ist an Rinder, *S. Abortusequi* ist an Pferde und *S. Abortusovis* ist an Schafe adaptiert (WIRZ-DITTUS et al. 2010; DI GENNARO et al. 2012; NIELSEN et al. 2013a). Zur dritten Gruppe werden nicht wirtsadaptierte Serovare gezählt, die eine unterschiedliche, oft nur geringe Virulenz aufweisen (AGBAJE et al. 2011; SELBITZ 2011). Bedeutung als Zoonoseerreger haben die in der vierten Gruppe zusammengefassten nicht wirtsadaptierten aber hoch virulenten Serovare. So können zum Beispiel die in diese Gruppe eingeordneten Serovare *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* bei Mensch und Tier klinische Salmonelosen auslösen (STEVENS et al. 2009; FÀBREGA u. VILA 2013).

2.3.4 Infektionen des Menschen mit *S. enterica* ssp. *enterica*

Bei Salmonellenerkrankungen des Menschen wird im Wesentlichen zwischen zwei verschiedenen Formen unterschieden. Die typhöse Form der Salmonellose wird überwiegend durch Erreger der Serovare *S. Typhi* und *S. Paratyphi* A, B, C ausgelöst. Dagegen wird die enteritische Form der Salmonellose durch sogenannte nicht typhöse oder enteritische Salmonellen verursacht (SÁNCHEZ-VARGAS et al. 2011; FEASEY et al. 2012); Beispiele hierfür sind die nicht wirtsadaptierten Serovare *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* (DE JONG et al. 2012). Charakteristisch für Infektionen mit *S. Typhi* sind eine geringe minimale Infektionsdosis von 10^2 – 10^3 KbE (geringere infektiöse Dosis bei Kindern oder immunsupprimierten Personen möglich) sowie eine lange Inkubationszeit von 7 – 14 Tagen (DE JONG et al. 2012; SUERBAUM et al. 2012). Typhus-Erkrankungen entstehen hauptsächlich in Entwicklungsländern, vor allem durch kontaminiertes Trinkwasser (MONACK 2012).

Ohne adäquate Therapie kann diese zyklische Allgemeininfektion, die in verschiedenen Stadien (primäre Bakteriämie, Generalisationsstadium, Organmanifestation) abläuft, zum Tode führen (DE JONG et al. 2012; SUERBAUM et al. 2012). Überlebende bleiben bis zu 5 % Dauerausscheider, die ein Erregerreservoir darstellen (PUI et al. 2011; SÁNCHEZ-VARGAS et al. 2011). Infektionen mit enteritischen Salmonellen sind durch eine höhere minimale Infektionsdosis von bis zu 10^6 KbE (abhängig vom jeweiligen Immunitätszustand des Patienten) sowie einer deutlich kürzeren Inkubationszeit von 12 bis 36 Stunden gekennzeichnet (SUERBAUM et al. 2012; HAEUSLER u. CURTIS 2013). Sie werden größtenteils durch den Konsum kontaminierter Lebensmittel hervorgerufen (FATICA u. SCHNEIDER 2011; HARTUNG u. KÄSBOHRER 2012). Typische Symptome sind Durchfall, Brechreiz, Erbrechen und mäßiges Fieber. Die Infektion verläuft meist selbstlimitierend mit nach 4 bis 10 Tagen abklingenden Symptomen (SUEZ et al. 2013). Schwere Verläufe (Dehydratation, hohes Fieber), die zum Tode führen können, sind bei bestimmten Personengruppen (z. B. sogenannten YOPIS – *young-old-pregnant-immunocompromised*) möglich, die meistens mit Antibiotika therapiert werden (HAEUSLER u. CURTIS 2013). Im Gegensatz zur typhösen Form sind bei dieser Salmonellose nur 0,1 bis 1 % Dauerausscheider zu verzeichnen (PUI et al. 2011; SÁNCHEZ-VARGAS et al. 2011).

2.3.5 Prävention von Infektionen des Menschen

Salmonellen sind Zoonoseerreger und kontaminierte Lebensmittel bilden den Hauptübertragungsweg für eine enteritische Salmonelleninfektion (WHITE et al. 2002; FOLEY et al. 2011; EFSA u. ECDC 2013; HENRIQUES et al. 2013). Aus diesem Grund sind präventive Maßnahmen entlang der gesamten Lebensmittelkette von der Primärproduktion bis hin zum Endverbraucher unentbehrlich. Für Letzteren sind vor allem die richtige Lagerung und Zubereitung von Lebensmitteln von Bedeutung. Hierbei stellen eine effektive Kühlung während der Lagerung (4 bis 7 °C) sowie ein ausreichendes Erhitzen bei der Zubereitung der Lebensmittel (Kerntemperatur 72 °C, 2 min.) wichtige Maßnahmen dar, um ein potenzielles bakterielles Wachstum zu minimieren bzw. zu unterbinden (AID INFODIENST u. BFR 2013). In der Gemeinschaftsgastronomie werden die Lebensmittelhygienemaßnahmen durch Wareneingangskontrollen und konsequente Personal- und Küchenhygiene ergänzt.

So helfen sorgfältige Reinigung und Desinfektion der Hände sowie der Arbeitsflächen das Risiko einer mikrobiellen Kontamination zu verringern (CAC 2003; AID INFODIENST u. BFR 2013). Den größten Umfang nehmen Präventionsmaßnahmen in der Primärproduktion ein, da diese im Allgemeinen die Eintragsquelle für eine Lebensmittelkontamination darstellt (FOLEY et al. 2011; ELLI et al. 2013). Diese Maßnahmen reichen von einer verantwortungsvollen Bestandsbetreuung durch den zuständigen Veterinär, betrieblichen Personal- und Stallhygienemaßnahmen bis hin zur Schlachtprozesshygiene. Ziel sollte die Reduktion der Salmonellenprävalenz und darüber hinaus die Schaffung bzw. die Erhaltung salmonellenfreier Tierbestände sein.

2.3.6 Prävention von Infektionen des Nutztieres

Da enteritische Salmonellosen größtenteils auf die Serovare *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* zurückzuführen sind und Geflügelbestände oft ein Erregerreservoir darstellen (GUARD-PETTER 2001; FOLEY et al. 2011; HENRIQUES et al. 2013; RKI 2013), ist zur Reduzierung des Infektionsdrucks zusätzlich eine Impfung mit *S. Typhimurium* bzw. *S. Enteritidis* Vakzinen zugelassen (§§ 3, 13 Hühner-Salmonellen-Verordnung, i.d.F.v.13.12.2011).

2.4 Zielsetzung der Arbeit

Der vielfältige Einsatz des Biozids Triclosan ist nicht unumstritten, da eine mögliche Entstehung von Kreuzresistenzen mit antimikrobiellen Chemotherapeutika befürchtet wird. Daten zur Empfindlichkeitslage von Salmonellen, die zu den wichtigsten humanpathogenen Lebensmittelerregern zählen, lagen jedoch für Deutschland nicht vor. Daher war ein erstes Ziel dieser Arbeit, den Empfindlichkeitsstatus von aviären *Salmonella*-Isolaten zu ermitteln. Untersuchungen von Isolaten aus unterschiedlichen Zeitspannen sollten Rückschlüsse auf eine mögliche Toleranzentwicklung gegenüber Triclosan sowie drei weiteren Bioziden liefern.

Anschließend sollten gegebenenfalls auftretende tolerante Feldisolate sowie durch subletale Triclosan-Konzentrationen selektierte *Salmonella*-Mutanten molekularbiologisch untersucht werden. Neben der Analyse von Veränderungen im *fabI*-Gen bildete die Untersuchung von *multidrug* Effluxpumpen einen Schwerpunkt, um Aussagen zur Entstehung von Kreuzresistenzen treffen zu können. Hierfür sollten Genexpressionsanalysen von Effluxpumpenkomponenten und globalen Regulatoren sowie Empfindlichkeitstestungen mit wichtigen antimikrobiellen Chemotherapeutika durchgeführt werden.

Des Weiteren sollte mit Hilfe von Deletions- und Komplementationsmutanten, die durch verschiedene funktionell inaktive *multidrug* Effluxpumpen charakterisiert waren, neben der bekannten Rolle von AcrAB-TolC der Einfluss anderer Effluxpumpen bei der Adaptationsfähigkeit an Triclosan untersucht werden.

Abschließend sollten mittels Wachstumskurven und Konkurrenzexperimenten von Feldisolaten und Mutanten die Fitness adaptierter Stämme beurteilt werden. Somit sollten im Rahmen der Studie wichtige Grundlagen für eine Bewertung des umstrittenen Triclosan-Einsatzes erarbeitet werden.

3 Publikationen

3.1 Publikation 1:

Comparative analysis of the susceptibility to triclosan and three other biocides of avian *Salmonella enterica* isolates collected 1979 through 1994 and 2004 through 2010.

RENSCH, U., G. KLEIN, S. SCHWARZ, H. KASPAR, A. DE JONG and C. KEHRENBURG

J. Food Prot. 2013 Apr; 76(4):653-656, doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-420.

Autorenbeteiligung:

Design der Studie:	UR, CK
Durchführung der Experimente:	UR
Auswertung der Daten:	UR
Erstellen des Manuskriptes:	UR, CK
Bereitstellung von Reagenzien/ Arbeitsplatz und wissenschaftliche Diskussion:	GK, SS, HK, AJ

Comparative analysis of the susceptibility to triclosan and three other biocides of avian *Salmonella enterica* isolates collected 1979 through 1994 and 2004 through 2010

U. Rensch ¹, G. Klein ¹, S. Schwarz ², H. Kaspar ³, A. de Jong ⁴ and C. Kehrenberg ^{1*}

¹ *Institute for Food Quality and Food Safety, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover, Germany*

² *Institute of Farm Animal Genetics, Friedrich-Loeffler-Institut, Höltystr. 10, 31535 Neustadt-Mariensee, Germany*

³ *Federal Office of Consumer Protection and Food Safety (BVL), Diedersdorfer Weg 1, 12277 Berlin, Germany*

⁴ *Bayer Animal Health GmbH, Alfred Nobel Str. 50, 40789 Monheim, Germany*

* Author for correspondence: Institute for Food Quality and Food Safety, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover, Germany Phone: +49-511-856-7554. Fax: +49-511-856-7694. Electronic mail address: corinna.kehrenberg@tiho-hannover.de

ABSTRACT

Few studies have been conducted on changes in the susceptibility of bacteria due to long-term use of biocides. A total of 375 avian *Salmonella* isolates collected in Germany from healthy or diseased animals during two time periods, 1979 through 1994 and 2004 through 2010, were included in the present study. The isolates were tested for their MICs of triclosan, acriflavine, benzalkonium chloride and chlorhexidine by broth macrodilution. MIC₅₀, MIC₉₀ and the distribution of MICs were compared. The MIC ranges were 0.0625 to 0.5 µg/ml for triclosan, 16 to 256 µg/ml for acriflavine, 8 to 128 µg/ml for benzalkonium chloride and 0.5 to 32 µg/ml for chlorhexidine. MIC₅₀s and MIC₉₀s were equal or differed by not more than one dilution step. For isolates from healthy poultry collected during two time periods, statistical analysis revealed a significant increase only in MICs for chlorhexidine. *Salmonellae* from diseased birds were more susceptible to triclosan and benzalkonium chloride but less susceptible to acriflavine and chlorhexidine. Overall, only 25 strains had the highest detected MIC of 0.5 µg/ml triclosan, but an association with multidrug resistance could not be confirmed.

3.2 Publikation 2:

Analysis of triclosan-selected *Salmonella enterica* mutants of eight serovars revealed increased aminoglycoside susceptibility and reduced growth rates.

RENSCH, U., G. KLEIN and C. KEHRENBURG

PLoS One. 2013 Oct 18; 8(10):e78310, doi: 10.1371/journal.pone.0078310.

Autorenbeteiligung:

Design der Studie:	UR, GK, CK
Durchführung der Experimente:	UR
Auswertung der Daten:	UR, CK
Erstellen des Manuskriptes:	UR, GK, CK
Bereitstellung von Reagenzien/ Arbeitsplatz und wissenschaftliche Diskussion:	GK

Analysis of triclosan-selected *Salmonella enterica* mutants of eight serovars revealed increased aminoglycoside susceptibility and reduced growth rates

U. Rensch, G. Klein, C. Kehrenberg^{*}

Institute of Food Quality and Food Safety, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover, Germany

* Author for correspondence: Institute for Food Quality and Food Safety, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Bischofsholer Damm 15, D-30173 Hannover, Germany Phone: +49-511-856-7554. Fax: +49-511-856-7694. Electronic mail address: corinna.kehrenberg@tiho-hannover.de

ABSTRACT

The biocide triclosan (TRC) is used in a wide range of household, personal care, veterinary, industrial and medical products to control microbial growth. This extended use raises concerns about a possible association between the application of triclosan and the development of antibiotic resistance. In the present study we determined triclosan mutant prevention concentrations (MPC) for *Salmonella enterica* isolates of eight serovars and investigated selected mutants for their mechanisms mediating decreased susceptibility to triclosan. MPC_{TRC} values were 8 - 64-fold higher than MIC values and ranged between 1 - 16 µg/ml. The frequencies at which mutants were selected varied between 1.3×10^{-10} - 9.9×10^{-11} . Even if MIC values of mutants decreased by 3-7 dilution steps in the presence of the efflux pump inhibitor Phe-Arg-β-naphthylamide, only minor changes were observed in the expression of genes encoding efflux components or regulators, indicating that neither the major multidrug efflux pump AcrAB-TolC nor AcrEF are up-regulated in triclosan-selected mutants. Nucleotide sequence comparisons confirmed the absence of alterations in the regulatory regions *acrRA*, *soxRS*, *marORAB*, *acrSE* and *ramRA* of selected mutants. Single bp and deduced Gly₉₃→Val amino acid exchanges were present in *fabI*, the target gene of triclosan, starting from a concentration of 1 µg/ml TRC used for MPC determinations. The *fabI* genes were up to 12.4-fold up-regulated. Complementation experiments confirmed the contribution of Gly₉₃→Val exchanges and *fabI* overexpression to decreased triclosan susceptibility. MIC values of mutants compared to parent strains were even equal or resulted in a more susceptible phenotype (1-2 dilution steps) for the aminoglycoside antibiotics kanamycin and gentamicin as well as for the biocide chlorhexidine. Growth rates of selected mutants were significantly lower and hence, might partly explain the rare occurrence of *Salmonella* field isolates exhibiting decreased susceptibility to triclosan.

3.3 Publikation 3:

***Salmonella enterica* serovar Typhimurium multidrug efflux pumps EmrAB and AcrEF support the major efflux system AcrAB in decreased susceptibility to triclosan.**

RENSCH, U., K. NISHINO, G. KLEIN and C. KEHRENBURG

Int. J. Antimicrob. Agents. 2014 Aug; 44(2):179-180, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.04.015.

Autorenbeteiligung:

Design der Studie:	UR, CK
Durchführung der Experimente:	UR
Auswertung der Daten:	UR
Erstellen des Manuskriptes:	UR, CK
Bereitstellung von Reagenzien/ Arbeitsplatz und wissenschaftliche Diskussion:	KN, GK

***Salmonella enterica* serovar Typhimurium multidrug efflux pumps EmrAB und AcrEF support the major efflux system AcrAB in decreased susceptibility to triclosan**

U. Rensch ¹, K. Nishino ², G. Klein¹, C. Kehrenberg ^{1*}

¹ *Institute of Food Quality and Food Safety, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover, Germany*

² *Laboratory of Microbiology and Infectious Diseases, Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, Japan*

* Author for correspondence: Institute for Food Quality and Food Safety, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Bischofsholer Damm 15, D-30173 Hannover, Germany Phone: +49-511-856-7554. Fax: +49-511-856-7694. Electronic mail address: corinna.kehrenberg@tiho-hannover.de

3.4 Publikation 4:

Mathematical modeling to predict the fitness cost associated with triclosan tolerance in *Salmonella enterica* serovars.

RENSCH, U., M. GREINER, G. KLEIN and C. KEHRENBURG

Manuskript zur Publikation eingereicht, in Revision

Autorenbeteiligung:

Design der Studie:	UR, CK
Durchführung der Experimente:	UR
Auswertung der Daten:	UR, MG
Erstellen des Manuskriptes:	UR, CK, MG
Bereitstellung von Reagenzien/ Arbeitsplatz und wissenschaftliche Diskussion:	GK

**Mathematical modeling to predict the fitness cost
associated with triclosan tolerance in *Salmonella enterica*
serovars**

U. Rensch ¹, M. Greiner ^{1,2}, G. Klein ¹, C. Kehrenberg ^{1*}

¹ *Institute of Food Quality and Food Safety, University of Veterinary Medicine Hannover,
Foundation, Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover, Germany*

² *Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Department of Exposure, Max-Dohrn-Str 8-10,
10589 Berlin, Germany*

* Author for correspondence: Institute for Food Quality and Food Safety,
University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Bischofsholer Damm 15, D-
30173 Hannover, Germany Phone: +49-511-856-7554. Fax: +49-511-856-7694.
Electronic mail address: corinna.kehrenberg@tiho-hannover.de

ABSTRACT

Triclosan is a broad spectrum biocide that is incorporated in a wide variety of products for food industry, medical applications and domestic use to reduce microbial loads and to improve hygiene. Despite the extended use of the biocide, bacterial tolerance to triclosan is still infrequent. Here, we support the hypothesis that the acquisition of a triclosan tolerance-mediating mutation in the target site for triclosan, the gene *fabI*, is associated with a prohibitive fitness cost in *Salmonella enterica*. Growth competition experiments with mutants exhibiting the Gly₉₃-Val mutation in *fabI* and their parent strains revealed overall decreases in the relative proportions of mutants. For all four serovars investigated, the log₁₀ difference values increased linearly over the experimental time of 96 hours. Therefore, a linear regression model was used to characterize the changes in log ratios of parents and mutants over time. The calculated regression coefficients allowed an estimation of the fitness cost of triclosan tolerance in *Salmonella* mutants in comparison to their parent strains.

INTRODUCTION

Biocides play an important role in preventing bacterial disease. They were used for many practical applications such as cleaning or disinfecting to reduce microbial loads and to improve hygiene (Sheridan, Lenahan, Duffy, Fanning, & Burgess, 2012). The broad-spectrum biocide triclosan is a chlorinated biphenyl ether (Condell et al., 2012), that has been used as active ingredient in antiseptics, preservatives and disinfectants for at least the past four decades. It is incorporated in a wide variety of products for food industry, medical applications and domestic use (Condell et al., 2012; Jones, Jampani, Newman, & Lee, 2000; Schweizer, 2001). Triclosan has a major target site of activity at subinhibitory concentrations, the bacterial enoyl acyl carrier protein reductase FabI (Heath et al., 1999; Lubarsky et al., 2012). At higher concentrations, triclosan may also impact cell membrane structure and function (Saleh, Haddadin, Baillie, & Collier, 2011). In *Salmonella enterica*, a less triclosan susceptible phenotype is reported to be the consequence of a single point mutation in *fabI* (leading to a Gly₉₃-Val amino acid exchange), although overexpression of FabI or enhanced efflux via multidrug transporters contribute to triclosan tolerance as well (Rensch, Klein, & Kehrenberg, 2013; Rensch, Nishino, Klein, & Kehrenberg, 2014; Webber, Randall, Cooles, Woodward, & Piddock, 2008). However, the de-repression of efflux systems such as AcrAB-TolC may provide cross-resistance to antibiotics and is therefore a matter of concern. While in the laboratory setting triclosan less susceptible *Salmonella enterica* mutants of different serovars can be easily selected overnight (Birošová, & Mikulášová, 2009; Rensch, Klein, & Kehrenberg, 2013) or by repeated passages in media containing increasing concentrations of triclosan (Braoudaki, & Hilton, 2004; Karatzas et al., 2007), only few studies have reported the occurrence of *Salmonella* isolates from clinical, household or community settings exhibiting elevated minimum inhibitory concentrations (MICs) to triclosan (Braoudaki, & Hilton, 2005; Copitch, Whitehead, & Webber, 2010). This rare occurrence in the environment might be explained by reduced growth rates of triclosan tolerant *Salmonella* mutants in comparison to the wild-type strains, as has been shown by generation-time determinations in liquid media (Karatzas et al., 2007; Rensch, Klein, & Kehrenberg, 2013).

In addition, it has been demonstrated that triclosan selected *Salmonella* mutants are more susceptible to the aminoglycoside antibiotics kanamycin and gentamicin and to the biocide chlorhexidine (Rensch, Klein, & Kehrenberg, 2013). Nevertheless, the assessment of the relative fitness of *S. Typhimurium* parent and mutant strains (inoculated in a 1:1 ratio) in vivo by using a day-old chick model revealed that all triclosan tolerant mutant strains were able to colonize chicks and to persist in the avian gut during an observation time of 28 days. Although the results of this study indicated the successful establishment of a stable population of triclosan tolerant *Salmonella Typhimurium* in chickens, the relative numbers of mutants were lower compared to the parent strains at the end of the experiments (Webber, Randall, Cooles, Woodward, & Piddock, 2008). As the findings in vitro and in vivo could not explain the rare occurrence of triclosan tolerant field isolates, it was aim of this study to examine the fitness of triclosan-tolerant *Salmonella* mutants in direct growth competition experiments and to predict the fitness cost by using a mathematical model.

MATERIAL AND METHODS

Four *Salmonella enterica* field isolates belonging to the serovars Enteritidis, Saintpaul, Livingstone, and Paratyphi B and their isogenic triclosan tolerant mutants were included in the study. The origins of the strains and their characteristics have been described previously (Rensch, Klein, & Kehrenberg, 2013). In brief, all mutants were selected during the determination of triclosan mutant prevention concentrations and exhibited high MIC values of triclosan (32 to ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$) compared to their parent strains (MICs of 0.125 to 0.5 $\mu\text{g/ml}$). Sequence analysis detected a base pair exchange (GGT \rightarrow GTT) in the *fabI* genes of all mutants that resulted in an amino acid exchange at codon 93 (Rensch, Klein, & Kehrenberg, 2013). The level of expression of genes encoding efflux pump components or regulators indicated that neither the efflux pump AcrAB-TolC nor AcrEF were up-regulated in the mutant strains.

Growth competition experiments were performed according to Guo, Abdelraouf, Ledesma, Nikolaou, & Tam (2012). For this, the strains were cultivated overnight in Luria Bertani (LB) broth and diluted in a 10-fold dilution series up to 10^{-3} (field isolates) or 10^{-2} (mutant strains).

Dilution steps differed to achieve the same initial inocula of the parent strain and its isogenic mutant. For the co-cultivation of strains starting at approximately 5×10^4 CFU/ml, a volume of 200 μ l of the diluted cultures were transferred in a flask containing 19.6 ml of fresh pre-warmed LB-broth. The cultures were incubated at 37°C with shaking at 130 rpm for 12 h to complete one competition cycle. At the end of every 12 h cycle, 100 μ l of the bacterial culture were diluted 1:100 with a 0.9% saline solution and 200 μ l of the dilution were transferred into a new flask containing 19.8 ml pre-warmed LB broth. The CFU/ml of both the wild-type (field isolate) and the co-cultivated mutant were determined every 24 h by culture enumeration using Mueller-Hinton (MH) agar plates and, in parallel, MH agar plates supplemented with 2 μ g/ml and 8 μ g/ml triclosan, respectively. The agar plates were incubated 24 h at 37°C. Differences between total counts of salmonellae determined on MH agar plates and on MH agar plates supplemented with triclosan were regarded as the amounts of triclosan susceptible parent strains.

The main outcome of the study are the differences between \log_{10} concentrations of the wild-type ($\log_{10}C_w$) and mutant type ($\log_{10}C_M$), referred to as the \log_{10} difference (LD), for incubation times of 0, 24, 48, 72 and 96 hours. The log difference is equivalent to the logarithm of the ratios of the respective count values ($LD = \log_{10}C_w - \log_{10}C_M = \log_{10}(C_w/C_M)$). Three independent growth competition experiments were conducted for 96 h under identical experimental conditions. The time-dependent competitive growth profiles were modeled using a simple linear model with intercept fixed as zero, fitted to the observed LD results for each serovar using time as covariate. The estimated regression parameter (denoted as K_C) can be interpreted as difference between the growth rate constant of the parent strain minus the growth rate constant of the isogenic mutant with an intercept term fixed at zero (Abdelraouf, Kabbara, Ledesma, Poole, & Tam, 2011; Guo, Abdelraouf, Ledesma, Nikolaou, & Tam, 2012). The 95% uncertainty intervals were calculated for the parameter K_C , for the predicted time-dependent mean LD (confidence intervals) as well as for the predicted observations of LD for each serovar (prediction intervals). The regression model results and graphics were obtained using the R package (R Core Team, 2013).

RESULTS AND DISCUSSION

Results from the *in vitro* growth competition experiments between the wild-type strains and their isogenic mutants revealed significant overall decreases in the relative proportions of mutant strains of all serovars. The differences in the quantities were approximately $4.4 \times 10^5 - 5.1 \times 10^7$ CFU/ml after 96 h, with the exception of *S. Paratyphi B*. For this serovar, a smaller difference of 2.7×10^3 CFU/ml between parent and mutant strain was observed. In a previous study, in which growth kinetics of triclosan tolerant *Salmonella* mutants were investigated without competition, it could be shown that the growth rates of *S. Paratyphi B* were less reduced than in the other serovars (Rensch, Klein, & Kehrenberg, 2013). Nevertheless, an investigation which includes a larger number of *S. Paratyphi B* isolates would be necessary to examine whether this is a serovar-specific property. However, the results from all serovars suggested that the triclosan tolerance-mediating mutation Gly₉₃→Val in *fabI* is associated with a substantial fitness cost. Hence, these findings support the hypothesis that the mechanism that confers triclosan tolerance limits the spread of tolerant strains in the absence of selection pressure. Similar observations have been made for antibiotic resistance-mediating mutations. Giraud, Cloeckert, Baucheron, Mouline, & Chaslus-Dancla (2003) reported that high-level fluoroquinolone resistance in *S. Typhimurium* as a consequence of mutations in *gyrA* has a prohibitive fitness cost and may limit the emergence of highly resistant clones. Similarly, Guo, Abdelraouf, Ledesma, Nikolaou, & Tam (2012) have shown that antibiotic resistant isogenic *A. baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* strains are less fit than their susceptible parent strains, resulting in a decrease in the population.

The LD values increased linearly over the experimental time of 96 h for all four serovars investigated (see Figs. 1 and 2 for *S. Saintpaul* and *S. Paratyphi B*). Therefore, the constant relative change in the log ratio of parent and mutant strains over time could be characterized using a linear regression model. The intercept of this model has been fixed at zero to reflect the experimental design of equal concentrations of the wild-type and mutant type at time zero. The estimated regression coefficients (K_c values) (and 95% confidence intervals) were 0.083 (0.08, 0.085), 0.082 (0.076, 0.089), 0.059 (0.053, 0.064) and 0.027 (0.025, 0.03) for *S. Enteritidis*, *S. Saintpaul*, *S. Livingstone* and *S. Paratyphi B*, respectively.

This parameter is an expression of the fitness cost of a mutant in comparison to the wild-type. If K_c is significantly greater zero the fitness of the mutant is compromised under the given experimental conditions. These results indicate that there is a significant fitness cost associated with triclosan tolerance for all investigated serovars. The wild-types of all four investigated field strains significantly out-grew their respective mutant types under the given experimental conditions. The narrow 95% confidence bands of the time-dependent mean LD estimates (dashed lines in Figs. 1A and 2a) reflect the strong experimental evidence based on three independent replicates of paired observations over five time points. The wider 95% prediction intervals (dotted lines in Figs. 1A and 2a) define expected ranges of hypothetical new LD observations generated under conditions consistent with the present study. For example, the results for *S. Saintpaul* suggest that after 48 h incubation the expected mean LD is 4.0 (95% confidence interval 3.6-4.3) while 95% of the observed LD values are expected to lie in the range from 2.4 to 5.5. This model characterized bacterial growth over time and allows an estimation of the fitness cost of triclosan tolerance. The fitted linear models for *S. Saintpaul* and *S. Paratyphi B* are shown in Figures 1 and 2.

CONCLUSIONS

These results indicated that acquiring a triclosan tolerance-mediating mutation in *fabI* significantly reduces the fitness of *Salmonella enterica* serovars and worsens the chances to compete with the wild-type strains. In addition, the results indicated the applicability of a mathematical model to fit the growth competition curves.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Vera Nöding and Inna Pahl for excellent technical assistance.

REFERENCES

- Abdelraouf, K., Kabbara, S., Ledesma, K. R., Poole, K., & Tam, V. H. (2011). Effect of multidrug resistance-conferring mutations on the fitness and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(6), 1311 – 1317.
- Birošová, L., & Mikulášová, M. (2009). Development of triclosan and antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Medical Microbiology*, 58, 436 – 441.
- Braoudaki, M., & Hilton, A. C. (2004). Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 73 – 78.
- Braoudaki, M., & Hilton, A. C. (2005). Mechanisms of resistance in *Salmonella enterica* adapted to erythromycin, benzalkonium chloride and triclosan. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25, 31 – 37.
- Condell, O., Sheridan, Á., Power, K. A., Bonilla-Santiago, R., Sergeant, K., Renaut, J., et al. (2012). Comparative proteomic analysis of *Salmonella* tolerance to the biocide active agent triclosan. *Journal of Proteomics*, 75(14), 4505 – 4519.
- Copitch, J. L., Whitehead, R. N., & Webber, M. A. (2010). Prevalence of decreased susceptibility to triclosan in *Salmonella enterica* isolates from animals and humans and association with multiple drug resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36, 247 – 251.
- Giraud, E., Cloeckert, A., Baucheron, S., Mouline, C., & Chaslus-Dancla, E. (2003). Fitness cost of fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Medical Microbiology*, 52(Pt 8), 697 – 703.

- Guo, B., Abdelraouf, K., Ledesma, K. R., Nikolaou, M., & Tam, V. H. (2012). Predicting bacterial fitness cost associated with drug resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(4), 928 – 932.
- Heath, R. J., Rubin, J. R., Holland, D. R., Zhang, E., Snow, M. E., & Rock, C. O. (1999). Mechanism of triclosan inhibition of bacterial fatty acid synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 11110 – 11114.
- Jones, R. D., Jampani, H. B., Newman, J. L., & Lee, A. S. (2000). Triclosan: a review of effectiveness and safety in health care settings. *American Journal of Infection Control*, 28(2), 184 – 196.
- Karatzas, K. A., Webber, M. A., Jorgensen, F., Woodward, M. J., Piddock, L. J., & Humphrey, T. J. (2007). Prolonged treatment of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with commercial disinfectants selects for multiple antibiotic resistance, increased efflux and reduced invasiveness. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(5), 947 – 955.
- Lubarsky, H. V., Gerbersdorf, S. U., Hubas, C., Behrens, S., Ricciardi, F., & Paterson, D. M. (2012). Impairment of the bacterial biofilm stability by triclosan. *PLoS One*, 7(4), e31183.
- R Core Team, (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rensch, U., Klein, G., & Kehrenberg, C. (2013). Analysis of triclosan-selected *Salmonella enterica* mutants of eight serovars revealed increased aminoglycoside susceptibility and reduced growth rates. *PLoS One*, 8(10), e78310.
- Rensch, U., Nishino, K., Klein, G., & Kehrenberg, C. (2014). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium multidrug efflux pumps EmrAB and AcrEF support the major efflux system AcrAB in decreased susceptibility to triclosan. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44(2), 179 – 180.

Saleh, S., Haddadin, R. N. S., Baillie, S., & Collier, P. J. (2011). Triclosan – an update. *Letters in Applied Microbiology*, 52, 87 – 95.

Schweizer, H. P. (2001). Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. *FEMS Microbiology Letters*, 202(1), 1 – 7.

Sheridan, À., Lenahan, M., Duffy, G., Fanning, S., & Burgess, C. (2012). The potential for biocide tolerance in *Escherichia coli* and its impact on the response to food processing stresses. *Food Control*, 26, 98 – 106.

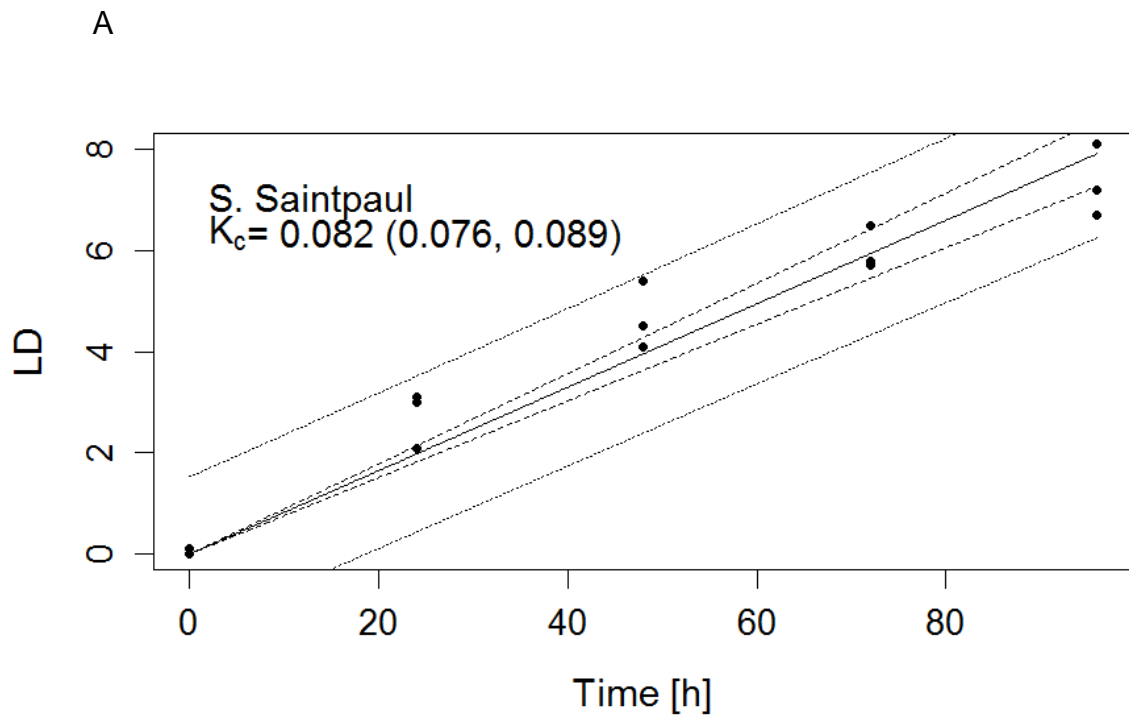
Webber, M. A., Randall, L. P., Cooles, S., Woodward, M. J., & Piddock, L. J. (2008). Triclosan resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(1), 83 – 91.

Legend to Figures:

Figure 1: Log₁₀ difference (*LD*) values for *S. Saintpaul* (log₁₀ concentration of wild-type strain minus log₁₀ concentration of isogenic mutant) plotted against the incubation time (*t*) and fitted linear model (solid line, regression coefficient K_c with 95% confidence interval as indicated) with 95% confidence intervals for expected *LD* values (dashed lines) and 95% prediction intervals (dotted lines) (A) and *in vitro* growth competition profiles of the parent strain and the respective mutant (B). The points are given as mean values \pm SD.

Figure 2: Log₁₀ difference (*LD*) values for *S. Paratyphi B* plotted against the incubation time (*t*) and fitted linear model (solid line) with 95% confidence intervals for expected *LD* values (dashed lines) and 95% prediction intervals (dotted lines) (A) and *in vitro* growth competition profiles of the parent strain and the respective mutant (B). The points are given as mean values \pm SD. See Fig. 1 and text for more details.

Figure 1



B

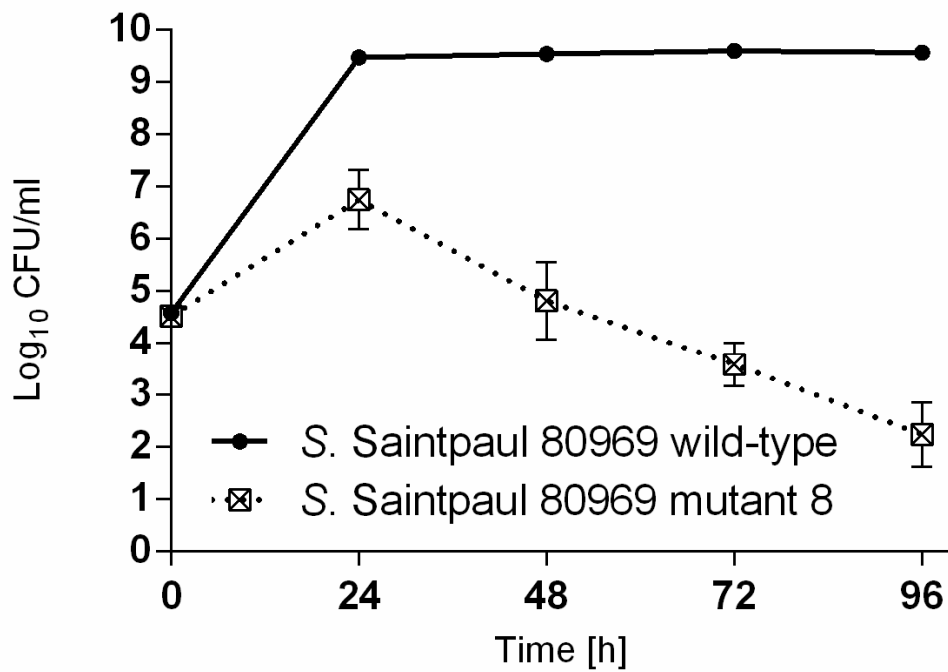
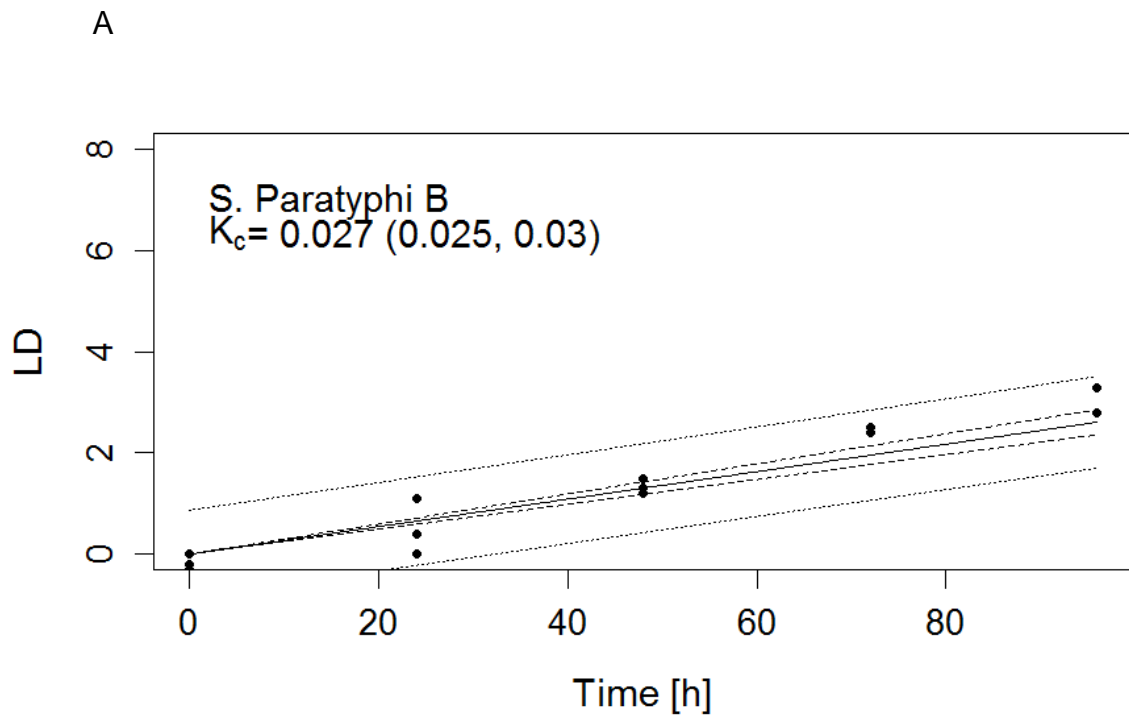
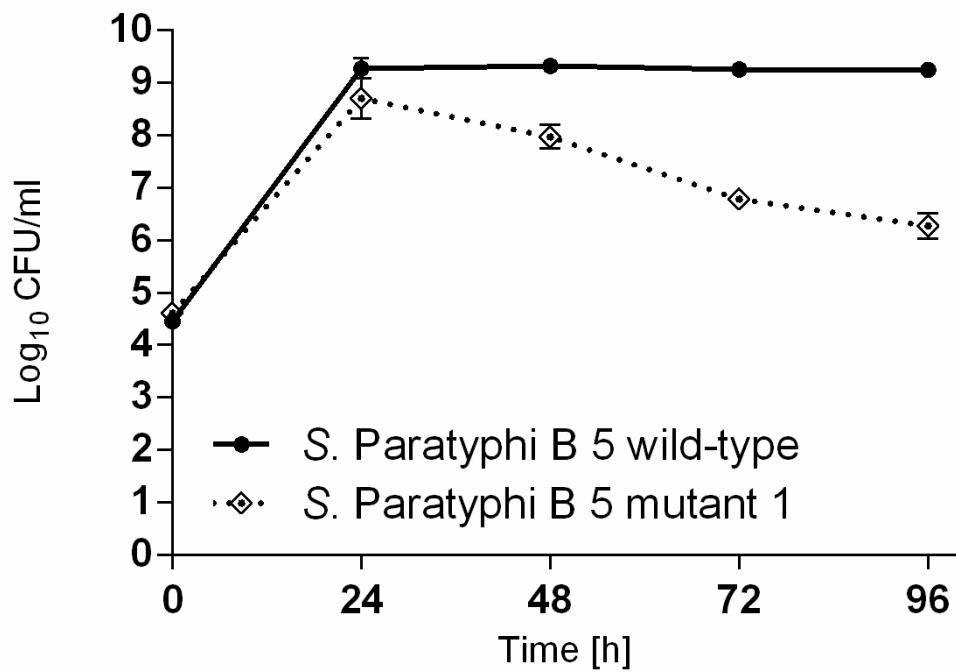


Figure 2



B



4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zur Klärung der Fragestellung beigetragen werden, ob durch die breite Anwendung des Biozids Triclosan bei *Salmonella*-Isolaten unterschiedlicher Serovare phänotypisch ein Anstieg der Unempfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen (z. B. Fluorchinolonen) zu erwarten ist und ob dies molekularbiologisch zu belegen ist. Da bislang keine Daten aus Deutschland verfügbar waren, wurde zunächst mit Hilfe von Empfindlichkeitsstudien der Empfindlichkeitsstatus von Salmonellen gegenüber Triclosan und drei weiteren häufig verwendeten Bioziden bestimmt. Im Anschluss erfolgte die molekulare Charakterisierung einzelner Isolate ausgewählter Serovare und selektierter Triclosan-toleranter Mutanten.

4.1 Einordnung der ermittelten Empfindlichkeitsdaten

Zur Bestimmung der Aktivität von antimikrobiellen Wirkstoffen gegenüber Bakterien kann sowohl die minimale bakterizide Konzentration (MBK) als auch die MHK ermittelt werden. Die MBK ist die Konzentration, bei der nach einer definierten Versuchsdurchführung 99,9 % der Bakterien abgetötet werden (ANDREWS 2001). Sie wird daher überwiegend für die klinische Wirksamkeitsprüfung der jeweiligen Substanz verwendet. Die MHK ist die geringste Konzentration eines Wirkstoffs, bei der nach definierter Testung kein sichtbares bakterielles Wachstum im Nährmedium erkennbar ist (ANDREWS 2001; BAILEY et al. 2008). Generell können neben einer Einschätzung der therapeutischen Wirksamkeit mittels Grenzwerten erhaltene MHK-Daten auch Informationen zur Verteilung der Empfindlichkeit innerhalb einer Population liefern. Da die Ermittlung des Empfindlichkeitsstatus von Salmonellen und nicht die klinische Wirksamkeitsprüfung der Biozide im Vordergrund stand, wurden 375 *Salmonella*-Feldisolate auf ihre MHK gegenüber vier verschiedenen Bioziden untersucht.

Grundsätzlich muss bei der Einordnung von MHK-Werten von Bioziden wie Triclosan berücksichtigt werden, dass sowohl offiziell anerkannte epidemiologische *cut-off*-Werte als auch (klinische) Grenzwerte fehlen. Eine Einordnung der MHK-Daten gemäß der Antibiotika in sensibel, intermediär und resistent kann deshalb nicht erfolgen. Vielmehr werden die Isolate als empfindlich bzw. tolerant gegenüber den jeweiligen Bioziden bezeichnet.

Einen ersten Vorschlag für epidemiologische *cut-off*-Werte erarbeiteten MORRISSEY und Kollegen in ihrer 2014 erschienenen Publikation (MORRISSEY et al. 2014).

Die mögliche Entwicklung einer zunehmenden Toleranz gegenüber Bioziden wurde über den Vergleich von berechneten $MHK_{50/90}$ -Werten von Isolaten aus verschiedenen Zeitspannen beurteilt (ALIABADI u. LEES 2000).

Da der Fokus der vorliegenden Arbeit auf Untersuchungen zum Biozid Triclosan lag, werden im Folgenden die drei weiteren Biozide gemeinsam und Triclosan gesondert diskutiert.

4.1.1 Empfindlichkeit gegenüber Benzalkoniumchlorid, Acriflavin und Chlorhexidin

Die mittels Bouillon-Makrodilution erhaltenen MHK-Werte der 375 aviären *Salmonella*-Feldisolate lagen in einem Bereich von 8 bis 128 µg/mL für Benzalkoniumchlorid, 16 bis 256 µg/mL für Acriflavin und 0,5 bis 32 µg/mL für Chlorhexidin.

Ähnliche, wenn auch etwas engere MHK-Bereiche für Benzalkoniumchlorid und Chlorhexidin wurden von BEIER et al. (2011) für 130 *Salmonella*-Feldisolate festgestellt. Neben einer geringeren untersuchten Isolatanzahl kann die Beschränkung auf zwei Isolationsjahre (2002 und 2004) eine Möglichkeit für die engeren MHK-Bereiche in dieser Studie darstellen. Darüber hinaus war die Isolatauswahl auf zwei texanische Putenfarmen begrenzt. Im Vergleich dazu wurden in der vorliegenden Studie 375 Isolate aus zwei längeren Zeitspannen (1979-94 und 2004-2010) und unterschiedlichen Geflügelbetrieben aus verschiedenen Regionen Deutschlands untersucht. Eine Zusammenfassung der in der Literatur verfügbaren Empfindlichkeitsstudien befindet sich in Tabelle 1. Etwas höhere MHK-Bereiche im Vergleich zur vorliegenden Arbeit sind für Salmonellen sowohl von AARESTRUP u. HASMAN (2004) als auch von CHUANHUEN et al. (2008) beschrieben worden (siehe Tabelle 1). Diese könnten durch die verschiedenen Tierarten, von denen die Stämme isoliert wurden, begründet sein. Darüber hinaus wurden dänische bzw. thailändische *Salmonella*-Feldisolate untersucht. In diesem Zusammenhang kann ein anderes Desinfektionsmanagement (in der Primärproduktion) zu unterschiedlichen Anwendungen von Bioziden führen und so eine Möglichkeit für die leicht abweichenden MHK-Werte der Biozide darstellen.

Auch die in der Studie untersuchte Anzahl an unterschiedlichen Serovaren könnte eine Begründung für breitere MHK-Bereiche sein. So untersuchten CHUANCHUEN et al. (2008) in ihrer Studie 44 unterschiedliche *Salmonella* Serovare, wohingegen für die vorliegende Arbeit zehn unterschiedliche Serovare in die Studie einbezogen wurden.

Für *Salmonella*-Feldisolate waren keine Empfindlichkeitsstudien verfügbar, bei denen die Substanz Acriflavin, ein bekanntes Substrat von *multidrug* Effluxpumpen (BAILEY et al. 2008), untersucht wurde.

Bei Betrachtung der in der eigenen Studie ermittelten MHK-Werte für Benzalkoniumchlorid, Acriflavin und Chlorhexidin der jeweiligen drei aviären *Salmonella*-Populationen (1979-1994: n=127; 2004-2010: n=104; 2006-2010: n=144) waren unimodale Verteilungen zu erkennen. Deutlich tolerantere Subpopulationen wurden nicht ermittelt (PUBLIKATION 1). MORRISSEY et al. empfehlen in ihrer 2014 veröffentlichten Studie erstmals für Salmonellen epidemiologische *cut-off*-Werte sowohl für Benzalkoniumchlorid (> 128 µg/mL) als auch für Chlorhexidin (> 32 µg/mL). Unter Berücksichtigung dieser Empfehlungen sind ebenfalls keine toleranten Subpopulationen zu verzeichnen.

Tabelle 1: Empfindlichkeitsstudien von *Salmonella*-Feldisolaten für die Biozide Benzalkoniumchlorid und Chlorhexidin

Biozid	Isolate			MHK ($\mu\text{g/mL}$)			Referenz
	Anzahl (N)	Ursprung	Isolations- jahre	Bereich	MHK ₅₀	MHK ₉₀	
BAC ¹	375	Geflügel u. Umgebung des Geflügels	1979-1994; 2004-2010	8 - 128	32	32	Makrodilution ² Eigene Arbeit
	901	Tiere aus Europa	1999-2003	16 - 128	32	64	Mikrodilution ³ MORRISSEY et al. 2014
	130	Pute	2002; 2004	16 - 32	32	32	Mikrodilution BEIER et al. 2011
	257	Geflügel, Schwein	2003-2005	4 - 256	64	256	Agardilution CHUANCHUEN et al. 2008
	156	Mastgefügel, Rind, Schwein	k. A ⁴	64 - 256	128	128	Agardilution AARESTRUP u. HASMAN 2004
CHX ⁵	375	Geflügel u. Umgebung des Geflügels	1979-1994; 2004-2010	0,5 - 32	2	8	Makrodilution Eigene Arbeit
	901	Tiere aus Europa	1999-2003	1 - 32	4	8	Mikrodilution MORRISSEY et al. 2014
	130	Pute	2002; 2004	1 - 8	4	4	Mikrodilution BEIER et al. 2011
	257	Geflügel, Schwein	2003-2005	2 - 64	8	16	Agardilution CHUANCHUEN et al. 2008
	156	Mastgefügel, Rind, Schwein	k. A.	2 - 64	16	32	Agardilution AARESTRUP u. HASMAN 2004

¹ BAC = Benzalkoniumchlorid; ² Makrodilution = Bouillon-Makrodilution; ³ Mikrodilution = Bouillon-Mikrodilution; ⁴ k. A. = keine Angaben; ⁵ CHX = Chlorhexidin

4.1.2 Empfindlichkeit gegenüber Triclosan

Für Triclosan liegen die MHK-Werte der 375 aviären *Salmonella*-Feldisolate in einem Bereich von 0,0625 bis 0,5 µg/mL, die berechneten MHK_{50/90}-Werte betragen 0,125 bzw. 0,25 µg/mL (siehe Tabelle 2). Einen ähnlichen MHK-Bereich ermittelten sowohl BEIER et al. in ihrer im Jahr 2011 durchgeführten Studie als auch RANDALL et al. in ihrer Studie aus dem Jahr 2001 (siehe Tabelle 2). Auch in der umfassenden Empfindlichkeitsstudie von COPITCH et al. (2010), in der *Salmonella*-Isolate aus einem Zeitraum von 20 Jahren untersucht wurden, wurde - mit einer Ausnahme - ein sehr ähnlicher MHK-Bereich verglichen mit dem der vorliegenden Arbeit ermittelt. Der in dieser Arbeit ermittelte MHK-Bereich scheint daher ein repräsentatives Ergebnis für die Empfindlichkeit von *Salmonella*-Populationen gegenüber Triclosan darzustellen und ließ keine Unterschiede zu Isolaten aus anderen Ländern erkennen. Ähnlich der drei anderen untersuchten Biozide ist für Triclosan eine unimodale Verteilung der MHK-Werte zu verzeichnen, die nicht auf eine Bildung Triclosan-toleranter Subpopulationen hinweist. Auch der von MORRISSEY und Kollegen (2014) erstmals für Salmonellen vorgeschlagene epidemiologische *cut-off*-Wert für Triclosan ist mit > 8 µg/mL deutlich höher als die in dieser Arbeit ermittelten MHK-Werte und deutet nicht auf die Bildung einer toleranten Subpopulation hin.

Warum bei den in Deutschland gesammelten Feldisolaten keine Triclosan-toleranten Isolate nachgewiesen wurden, bleibt dabei ungeklärt. Mögliche Ursachen können darin liegen, dass anstelle von Triclosan-haltigen Desinfektionsmitteln vermehrt andere Wirkstoffe im Geflügelbereich verwendet wurden. Aktuell sind beispielsweise keine Desinfektionsmittel mit dem Inhaltsstoff Triclosan in der von der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) herausgebrachten Liste der geprüften und empfohlenen Desinfektionsmittel für die Tierhaltung aufgeführt. Die Tatsache, dass keine Triclosan-toleranten Stämme bei den 375 untersuchten *Salmonella*-Feldisolaten nachweisbar waren, deckt sich grundlegend mit den Ergebnissen der aus der Literatur verfügbaren Studien (siehe Tabelle 2), in denen bislang nur sehr vereinzelt von *in vivo* isolierten Triclosan-toleranten *Salmonella*-Feldisolaten berichtet wurde (BRAOUDAKI u. HILTON 2005; COPITCH et al. 2010; MORRISSEY et al. 2014). Die drei in der Studie von BRAOUDAKI u. HILTON (2005) beschriebenen Triclosan-toleranten *Salmonella*-Feldisolate der Serovare Enteritidis, Typhimurium und Virchow zeigen allerdings, dass eine Triclosan-Toleranz bei Isolaten unterschiedlicher Serovare prinzipiell möglich ist.

Neben den in Tabelle 2 aufgeführten Empfindlichkeitsstudien, wurden in der Literatur keine weiteren Empfindlichkeitsstudien ermittelt, in denen eine hohe Anzahl an *Salmonella*-Feldisolaten untersucht wurde. Angaben über MHK-Werte für Triclosan sind diesbezüglich nur noch für vereinzelte *Salmonella*-Isolate beschrieben. Diese MHK-Werte liegen in einem Bereich von 0,1 bis 1,95 µg/mL (siehe Tabelle 2). Die jeweiligen untersuchten Salmonellen werden von den Autoren übereinstimmend als Triclosan-empfindlich bezeichnet. Daher wurden auch die Feldisolate der vorliegenden Arbeit als Triclosan-empfindlich eingestuft.

Tabelle 2: Triclosan-Empfindlichkeitsstudien von *Salmonella*-Feldisolaten und in der Literatur verfügbare MHK-Werte einzelner Isolate

Biozid	Anzahl (N)	Isolate		MHK ($\mu\text{g/mL}$)			Referenz
		Ursprung	Isolationsjahre	Bereich (bzw. Wert)	MHK ₅₀	MHK ₉₀	
TRC ¹	375	Geflügel u. Umgebung des Geflügels	1979-1994; 2004-2010	0,0625 - 0,5	0,125	0,25	Makrodilution ² Eigene Arbeit
	901	Tiere aus Europa	1999-2003	0,03 - 8	0,5	1	Mikrodilution ³ MORRISSEY et al. 2014
	130	Pute	2002; 2004	0,12 - 1	0,5	0,5	Mikrodilution BEIER et al. 2011
	428	Mensch, Geflügel u. a. Tierarten	1990-2000 ⁴	$\leq 0,12 - 4$	n. b. ⁵	n. b.	Agardilution COPITCH et al. 2010
	388	Mensch, Geflügel ⁶ , Umwelt- u. Futterproben	1995-2000 ⁷	0,03 - 0,5	0,13	0,25	Agardilution RANDALL et al. 2001
	3	k. A. ⁸	k. A.	0,1	n. b.	n. b.	⁹ CONDELL et al. 2012a
	1	k. A.	k. A.	1	n. b.	n. b.	⁹ CONDELL et al. 2012a
	1	k. A.	k. A.	1,95	n. b.	n. b.	⁹ CONDELL et al. 2012a
	1	k. A.	k. A.	0,2	n. b.	n. b.	k. A. CONDELL et al. 2012b
	1	k. A.	k. A.	0,12	n. b.	n. b.	Mikrodilution BAILEY et al. 2009
	1	k. A.	k. A.	0,195	n. b.	n. b.	Agardilution Birošová u. Mikulášová 2009
	1	k. A.	k. A.	0,5	n. b.	n. b.	Makrodilution TABAK et al. 2007
	3	Klinik, Lebensmittel	k. A.	8 - 16			Makrodilution BRAOUDAKI u. HILTON 2005

¹ TRC = Triclosan; ² Makrodilution = Bouillon-Makrodilution; ³ Mikrodilution = Bouillon-Mikrodilution; ⁴ 1990-2000 = für 412 Isolate lagen keine Angaben zum Isolationsjahr vor, bei 16 Isolaten wurden Isolationsjahre angegeben; ⁵ n. b. = Nicht bestimmbar; ⁶ Geflügel = und Rind, Schwein, Schaf; ⁷ 1995-2000 = für 16 Isolate lagen keine Angaben zum Isolationsjahr vor, bei 372 Isolaten wurden Isolationsjahre angegeben; ⁸ k. A. = Keine Angaben; ⁹ Methode nach Condell et al. 2012a

4.1.3 Vergleichende Analyse von Isolaten aus verschiedenen Zeiträumen

Da im Zusammenhang mit dem Einsatz von Bioziden die Möglichkeit einer Abnahme der Empfindlichkeit bzw. einer Toleranzentwicklung im Laufe der Zeit diskutiert wird, wurden $MHK_{50/90}$ -Werte von Isolaten aus verschiedenen Zeitabschnitten berechnet. Für den ersten $MHK_{50/90}$ -Vergleich wurden Isolate vom gesunden Geflügel oder der Umgebung des Geflügels aus den Jahren 1979-1994 ($n=127$) und 2004-2010 ($n=104$) verwendet. Somit lag ein zeitlicher Abstand von mindestens 10 Jahren zwischen den Isolierungen der Isolate vor. In einem zweiten Vergleich wurden Isolate vom erkrankten Geflügel ($n=144$) aus den Jahren 2006-2010 den Isolaten vom gesunden Geflügel ($n=104$) aus dem Zeitraum 2004-2010 gegenübergestellt.

4.1.3.1 Vergleich der $MHK_{50/90}$ -Werte von Benzalkoniumchlorid, Acriflavin und Chlorhexidin

Im Vergleich der älteren und aktuelleren Isolate vom gesunden Geflügel wurde keine Abnahme in der Empfindlichkeit für Acriflavin und Benzalkoniumchlorid festgestellt. Dieses Ergebnis wurde auch beim Vergleich von aktuelleren Isolaten vom gesunden Geflügel mit neueren Isolaten vom erkrankten Geflügel erhalten. Die Abweichung der $MHK_{50/90}$ -Werte betrug maximal eine Verdünnungsstufe, wobei die neueren Isolate vom gesunden und erkrankten Geflügel in der statistischen Auswertung sogar eine signifikant höhere Empfindlichkeit aufwiesen.

Eine Erhöhung der MHK -Werte war nur für Chlorhexidin feststellbar. So wiesen die aktuelleren Isolate von gesunden Tieren, die im Zeitraum 2004-2010 gesammelt wurden, eine Erhöhung des MHK_{90} -Wertes um eine Verdünnungsstufe auf. Für die neueren Isolate von erkrankten Tieren aus den Jahren 2006-2010 wurde eine Erhöhung des MHK_{50} -Wertes um eine Verdünnungsstufe ermittelt. Ähnliche Studien, in denen *Salmonella*-Isolate aus verschiedenen Isolationszeiträumen auf eine mögliche Abnahme in der Empfindlichkeit gegenüber den vorgestellten Bioziden untersucht wurden, waren in der Literatur nicht verfügbar. Somit ließ sich kein Vergleich der eigenen Daten mit Resultaten anderer Studien durchführen.

Hinweise für die Zunahme der Empfindlichkeit gegenüber Benzalkoniumchlorid und Acriflavin sowie für die Abnahme in der Empfindlichkeit gegenüber Chlorhexidin können auch Produktionsmengen bzw. Verbrauchszahlen nicht liefern, da diese Daten für Deutschland bislang nicht vorliegen.

Eine mögliche Erklärung für die Abnahme in der Empfindlichkeit gegenüber Chlorhexidin könnten Anwendungsfehler bei der Desinfektion darstellen (RUSSELL 2003a). Beispiele hierfür sind die falsche Verdünnung des Desinfektionsmittels oder eine unzureichende Einwirkdauer, die zu subinhibitorischen Konzentrationen auf Oberflächen in Ställen oder auf Schlachthofequipment führen können (RUSSELL 2003a; ABUZAID et al. 2012; MARSHALL et al. 2012). Diese subletalen Konzentrationen können zum vermehrten Überleben unempfindlicher Salmonellen nach Selektion beitragen (SOUMET et al. 2012; MAVRI u. MOŽINA 2013) und stellen daher einen möglichen Grund für die Abnahme der Empfindlichkeit gegenüber Chlorhexidin dar. Zudem ist Chlorhexidin in Deutschland in sehr vielen Produkten enthalten, so dass ein häufiger Kontakt bakterieller Erreger mit der Wirksubstanz wahrscheinlich ist.

4.1.3.2 Vergleich der $MHK_{50/90}$ -Werte von Triclosan

Für Triclosan wurde im Vergleich der $MHK_{50/90}$ -Werte der älteren (1979-1994) mit aktuelleren (2004-2010) Isolaten vom gesunden Geflügel keine Zunahme der Unempfindlichkeit nachgewiesen. Bei Betrachtung der $MHK_{50/90}$ -Werte der in späteren Jahren isolierten Salmonellen vom gesunden und erkrankten Geflügel wurde ebenso keine Abnahme in der Empfindlichkeit festgestellt. Die jüngeren Isolate waren bei beiden Vergleichen sogar signifikant empfindlicher.

Aufgrund fehlender Studien in der Literatur, die ein ähnliches Studiendesign aufweisen, kann die vorliegende vergleichende Studie nur schwer eingeordnet werden. Zwar untersuchten COPITCH et al. (2010) in ihrer Studie *Salmonella*-Isolate, die in einem Zeitraum von 20 Jahren isoliert wurden, eine Bewertung der Daten hinsichtlich einer Ab- oder Zunahme der Empfindlichkeit wurde jedoch nicht vorgenommen. Bei Einbeziehung anderer Bakterienspezies wurde eine Studie zur Empfindlichkeit bei Staphylokokken ermittelt. In dieser aktuellen Publikation von SKOVGAARD et al. (2013) wurden 98 Staphylokokken-Isolate aus verschiedenen Isolationszeiträumen auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Triclosan untersucht.

Die 34 älteren *Staphylococcus epidermidis*-Isolate stammten aus den Jahren 1965-1966 und stellten nach Auffassung der Autoren Isolate dar, die vor der Einführung von Triclosan isoliert worden waren. Die 64 aktuelleren *Staphylococcus epidermidis*-Isolate wurden aus den Jahren 2010-2011 isoliert. Sie wiesen den gleichen MHK_{50} -Wert, aber einen 8-fach höheren MHK_{90} -Wert auf. Der weitverbreitete Einsatz von Triclosan hat nach Meinung der Autoren im Laufe der Zeit zur Bildung einer Triclosan-toleranten Subpopulation von *Staphylococcus epidermidis* in Dänemark geführt (SKOVGAARD et al. 2013). Triclosan-tolerante Subpopulationen sind für die Salmonellen in der vorliegenden Arbeit nicht festgestellt worden. Dennoch zeigt die Studie von SKOVGAARD et al. (2013), dass generell die Entwicklung Triclosan-toleranter Subpopulationen möglich ist.

Ein möglicher Grund für die empfindlicheren aktuelleren Isolate der vorliegenden Arbeit könnte ein restriktiverer Umgang mit Triclosan in Deutschland in den letzten Jahren gewesen sein. So forderte das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) im Rahmen einer Stellungnahme 2006 den Einsatz von Triclosan auf den notwendigen Bereich der klinischen Humanmedizin zu beschränken, um möglichen Resistenzbildungen vorzubeugen (BFR 2006). Darüber hinaus empfahl das BfR im Jahr 2009 Triclosan nicht als Additiv für Lebensmittelkontaktmaterialien aus Kunststoff zuzulassen (BFR 2009). Dieser Empfehlung wurde Folge geleistet und der Zusatz von Triclosan zu Bedarfsgegenständen aus Kunststoff, die mit Lebensmitteln in Kontakt kommen, untersagt (BESCHLUSS DER EUROPÄISCHEN KOMMISSION VOM 19.03.2010; § 3 i.V.m. Anlage 1 BedGgstV i.d.F.v. 24.06.2013). Der Abverkauf entsprechender Produkte endete am 2. November 2011, so dass ein Rückgang der Triclosan-Produktion und des -verbrauchs vermutet werden kann. Aktuelle Zahlen bzw. Statistiken hierzu sind jedoch nicht publiziert. Verbrauchszahlen sind lediglich von WIND et al. (2004) geschätzt worden.

4.1.4 Zusammenhang zwischen der Triclosan-Empfindlichkeit und MHK-Werten antimikrobieller Chemotherapeutika

Im Verlauf der phänotypischen Bestimmung des Empfindlichkeitsstatus wurde untersucht, inwieweit eine Abnahme der Triclosan-Empfindlichkeit einen Einfluss auf die Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen ausübt. Hierfür wurden Triclosan-empfindlichere Isolate mit einem MHK-Wert von 0,125 µg/mL sowie Triclosan-unempfindlichere Isolate, die einen MHK-Wert von 0,5 µg/mL aufwiesen auf ihre MHK-Werte gegenüber antimikrobiellen Chemotherapeutika, untersucht. Bei Betrachtung der Triclosan-unempfindlicheren Feldisolate wurde kein höherer Anteil multiresistenter Stämme im Vergleich zu den Triclosan-empfindlicheren Feldisolaten festgestellt (PUBLIKATION 1). Ein anderes Ergebnis stellten COPITCH et al. (2010) fest. In dieser Studie wird von einem höheren Anteil (56 %) multiresistenter *Salmonella*-Feldisolate berichtet, die gleichzeitig eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Triclosan zeigten. In der Vergleichsgruppe, die eine höhere Triclosan-Empfindlichkeit aufwies, lag der Anteil multiresistenter Stämme nur bei 12 % (COPITCH et al. 2010). Weitere aktuelle Untersuchungen, in denen die Triclosan-Empfindlichkeit von *Salmonella*-Feldisolaten mit anderen antimikrobiellen Wirkstoffen korreliert wird, sind nicht bekannt.

Hingegen wurden Studien zu anderen Bakterienspezies veröffentlicht, die die Möglichkeit einer Kreuzresistenzentwicklung bei Triclosan-unempfindlichen Stämmen diskutieren. Zu erwähnen ist hier die Studie von RANDALL et al. (2003), in der MHK-Werte für *Campylobacter*-Isolate analysiert wurden. Die Triclosan-unempfindlicheren Isolate waren hier signifikant höher resistent gegenüber einer Anzahl von antimikrobiellen Chemotherapeutika im Vergleich zu den Triclosan-empfindlicheren Isolaten. Ein anderes Ergebnis ist von SKOVGAARD et al. (2013) für Staphylokokken publiziert worden. In dieser Studie wurde kein Zusammenhang zwischen Triclosan-unempfindlichen Stämmen und einem erhöhten Auftreten von Antibiotikaresistenzen festgestellt. Aufgrund der gegensätzlichen Ergebnisse der genannten Studien der Literatur kann generell nicht ausgeschlossen werden, dass eine Abnahme der Triclosan-Empfindlichkeit einen Einfluss auf die Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen ausübt; die Daten aus der phänotypischen Empfindlichkeitsbestimmung der vorliegenden Arbeit lassen jedoch keinen Zusammenhang feststellen.

4.2 Selektion Triclosan-toleranter *Salmonella*-Mutanten

Subinhibitorische Biozidkonzentrationen entstehen leicht im Desinfektionsprozess z. B. durch ungenügende Reinigungsmaßnahmen vor der Desinfektion, einer unsachgemäßen Verdünnung des Desinfektionsmittels oder durch eine unzureichende Einwirkdauer (HOLAH et al. 2002; RUSSELL 2003a; ABUZAID et al. 2012) und können so zur Selektion biozidtoleranter Isolate führen (SOUMET et al. 2012; MAVRI u. MOŽINA 2013). Da Triclosan-tolerante *Salmonella*-Feldisolate in der vorliegenden Arbeit nicht nachweisbar waren und die Adaptationsfähigkeit von Salmonellen an Triclosan untersucht werden sollte, wurden *in vitro* Mutanten selektiert. Für diese Selektion wurden Isolate acht unterschiedlicher Serovare verwendet. Die Selektion erfolgte während der Bestimmung der *mutant prevention concentration* (MPC) des jeweiligen Serovars. Diese MPC stellt die Konzentration einer Substanz dar, die benötigt wird, um das Auftreten von toleranten Mutanten bei $\geq 10^{10}$ Zellen/mL zu verhindern (RANDALL et al. 2004b; FERRARI et al. 2011). Bei dieser Art der Selektion kann von einer Generierung von Einschnitt-Mutanten mit einer ausreichenden Reduktion der Empfindlichkeit ausgegangen werden (DRLICA 2003).

4.2.1 *Mutant prevention concentrations* und Mutationsfrequenz

Von Isolaten aller acht Serovare ließen sich Mutanten leicht über Nacht selektieren. Die ermittelten MPCs lagen in einem Bereich von 2 bis 16 µg/mL. Vergleichswerte zur MPC von Salmonellen gegenüber Triclosan waren in der Literatur nicht verfügbar. In einigen Studien mit subinhibitorischen Triclosan-Konzentrationen wurden lediglich *in vitro* selektierte Mutanten für das Serovar Typhimurium beschrieben. Da die Generierung von MPC-Daten ein sehr materialaufwändiges Verfahren darstellt und ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf der Untersuchung der Adaptationsfähigkeit verschiedener Serovare lag, wurde jeweils ein Isolat pro Serovar genauer untersucht und in weiteren Arbeitsschritten molekular charakterisiert. Zwar konnten serovarspezifische Unterschiede in den MPC-Werten ermittelt werden, diese müssten jedoch durch Untersuchungen mit einer größeren Anzahl an Isolaten pro Serovar statistisch verifiziert werden. Gleichzeitig mit der MPC-Bestimmung wurden Mutationsfrequenzen ermittelt.

Diese wurden jeweils für die höchste Konzentrationsstufe, bei der auf Triclosan-haltigen Agarplatten noch Bakterienkolonien sichtbar waren, berechnet und lagen in einem Bereich von $9,9 \times 10^{-11}$ bis $1,3 \times 10^{-10}$. Sie sind damit geringer als die in der Literatur für Salmonellen und Triclosan beschriebenen Mutationsfrequenzen von $1,3 \times 10^{-10}$ bis $8,6 \times 10^{-7}$ (GRADEL et al. 2005; WEBBER et al. 2008b; BIROŠOVÁ u. MIKULÁŠOVÁ 2009). Dieser Unterschied könnte dadurch erklärt werden, dass die Berechnungen auf unterschiedlich einbezogenen Triclosan-Konzentrationen basierten. Während in der vorliegenden Arbeit Mutationsfrequenzen für Triclosan-Konzentrationen, die den 4- bis 32-fachen MHK-Werten der jeweiligen Ausgangstämme entsprechen, berechnet wurden, sind die in der Literatur beschriebenen Mutationsfrequenzen für deutlich geringere Konzentrationen berechnet worden. So sind z. B. in der Studie von WEBBER et al. (2008b) Mutationsfrequenzen für die 2-fache MHK von Triclosan ermittelt worden. Die für die Selektion verwendete Konzentration einer Substanz hat jedoch einen entscheidenden Einfluss auf die Mutationsfrequenz. Mit zunehmender Konzentration nimmt die Wahrscheinlichkeit für Mutationen ab, die in Summe ein Überleben ermöglichen können (MARTINEZ u. BAQUERO 2000). Aus diesem Grund sind die vorliegenden ermittelten Mutationsfrequenzen vermutlich geringer und nur bedingt mit den Werten aus der Literatur vergleichbar. Aufgrund der ermittelten niedrigen Mutationsfrequenzen kann davon ausgegangen werden, dass Triclosan die Selektion von Mutanten bei den in dieser Arbeit untersuchten Konzentrationen (1 bis 8 µg/mL) nicht zu fördern scheint. Diese Konzentrationen, die nur eine Verdünnungsstufe unterhalb der MPC liegen, sind erheblich geringer als häufig verwendete Anwendungskonzentrationen von Triclosan. So ist in Triclosan-haltigen Produkten ein Gehalt von 0,2 bis 2 % üblich (SCENIHR 2009). Dies entspricht einer Konzentration von 2000 bis 20000 µg/mL. Bei sachgemäßer Anwendung von Triclosan-haltigen Produkten kann daher davon ausgegangen werden, dass bei diesen Konzentrationsbereichen keine Toleranzentwicklung bei Salmonellen stattfindet.

Die in der Umwelt, etwa in Fischen, Flüssen, Oberflächenwasser und in Kläranlagen (bis 0,6 µg/L), Sedimenten und Klärschlamm (bis 1,2 µg/g) sowie Böden, nachgewiesenen deutlich geringeren Rückstände von Triclosan können jedoch die Adaptation und dadurch eine Toleranzentwicklung der Bakterien gegenüber Triclosan ermöglichen (WIND et al. 2004; DANN u. HONTELA 2011; LUBARSKY et al. 2012; VON DER OHE et al. 2012; MIDDLETON u. SALIERNO 2013; RÜDEL et al. 2013; TAMURA et al. 2013).

4.2.2 Einordnung der MHK-Werte von selektierten Mutanten

Die in der vorliegenden Arbeit selektierten Mutanten wiesen im Vergleich zu den Triclosan-empfindlichen Ausgangstämmen nach fünf Passagen auf Triclosan-haltigen Nährböden deutlich höhere MHK-Werte auf, die in einem Bereich von 16 bis ≥ 64 µg/mL lagen. Dies stellt eine 64- bis > 512 -fache Zunahme in der Unempfindlichkeit gegenüber Triclosan dar und zeigt erstens, dass eine Toleranzentwicklung gegenüber Triclosan generell bei unterschiedlichen Serovaren möglich ist und zweitens, dass die Adaptationsfähigkeit nach seriellen Passagen weiter zunimmt. Bei der Durchführung der MHK-Testungen ist die limitierte Löslichkeit von Triclosan in wässrigen polaren Medien zu erwähnen. Diese bedingt, dass Triclosan-Konzentrationen die 64 µg/mL überschreiten, nicht mehr ausgewertet werden können. In der Literatur sind nach *in vitro* Triclosan-Exposition ähnliche MHK-Bereiche für selektierte *Salmonella*-Mutanten beschrieben worden und es wurde von einer bis zu 1024-fachen Erhöhung der MHK-Werte der Mutanten berichtet (BRAOUDAKI u. HILTON 2005; KARATZAS et al. 2007; WEBBER et al. 2008b).

Obwohl, wie bereits erwähnt, eine Einteilung der Isolate in sensibel, intermediär und resistent aufgrund der ermittelten Biozid-MHK-Werte in Analogie zu den Antibiotika nicht erfolgen kann, beschreiben einige Autoren die von ihnen selektierten Mutanten als Triclosan-resistent, wenn diese MHK-Werte von ≥ 64 µg/mL aufweisen (COPITCH et al. 2010). WEBBER et al. (2008b) unterteilten die in Ihrer Studie selektierten *S. Typhimurium*-Mutanten zudem in drei verschiedene Resistenzphänotypen. Der *low-level* Resistenzphänotyp weist MHK-Werte von 4 bis 8 µg/mL, der *medium-level* Resistenzphänotyp MHK-Werte von 16 bis 32 µg/mL auf. Mutanten, deren MHK-Werte 32 µg/mL überschritten, wurden als *high level* Resistenzphänotyp klassifiziert. Diese phänotypische-Klassifizierung zugrunde gelegt, entsprechen die Mutanten dieser Arbeit dem *medium-* und *high-level* Resistenzphänotyp.

4.3 Charakterisierung der Triclosan-toleranten Mutanten

Eine Triclosan-Toleranz ist bei Salmonellen mit einer gleichzeitigen Entstehung einer *low-level* Kreuzresistenz gegenüber antimikrobiellen Chemotherapeutika assoziiert worden (BAILEY et al. 2009; CONDELL et al. 2012b). Um diese Assoziation überprüfen zu können, wurden sowohl die selektierten Mutanten als auch die dazugehörigen Ausgangsstämme genotypisch sowie resistenzphänotypisch charakterisiert. Dabei standen der Einfluss und die Aufregulierung von *multidrug* Effluxpumpen im Vordergrund, da diese maßgeblich an der Ausbildung von *low-level* Kreuzresistenzen gegenüber antimikrobiellen Chemotherapeutika beteiligt sind.

4.3.1 *Multidrug* Effluxpumpen und Entstehung von Kreuzresistenzen

Efflux wird bei Salmonellen als wichtiger Mechanismus in der Entstehung einer Triclosan-Toleranz diskutiert (TABAK et al. 2007; WEBBER et al. 2008b; COPITCH et al. 2010). Dabei wird vermutet, dass Triclosan möglicherweise die Aufregulierung von *multidrug* Effluxpumpen bei Salmonellen induziert (BAILEY et al. 2009). Diese Aufregulierung würde eine gleichzeitige Abnahme in der Empfindlichkeit gegenüber wichtigen antimikrobiellen Wirkstoffen bedeuten (KARATZAS et al. 2007).

4.3.1.1 Einfluss von Efflux

Um den Einfluss von Efflux zu überprüfen, wurde die Empfindlichkeit der selektierten Mutanten gegenüber Triclosan in An- und Abwesenheit eines Effluxpumpeninhibitors (EPI) überprüft. Als EPI diente Phenylalanin-Arginin- β -Naphthylamid (PA β N). Diese Substanz fungiert als kompetitiv konkurrierendes Substrat für die RND-Effluxpumpenfamilie (PAGÈS et al. 2005; MAHAMOUD et al. 2007; TEGOS et al. 2011). In Anwesenheit von PA β N zeigte sich eine Reduktion der MHK-Werte. Dieser Effekt wurde auch in der Literatur beschrieben (CONDELL et al. 2012b). Die Reduktion weist auf einen Einfluss von Efflux im Triclosan-Toleranzmechanismus hin. Da die MHK-Werte der Mutanten in Anwesenheit des EPIs immer noch höher lagen als die MHK-Werte der jeweiligen Ausgangsstämme, kann von weiteren Mechanismen, die eine Toleranz gegenüber Triclosan bedingen, ausgegangen werden. Diese werden in Kapitel 4.3.2 diskutiert.

4.3.1.2 Aufregulierungen der Effluxpumpen AcrAB- und AcrEF-TolC

Die Triclosan-exportierende RND-Effluxpumpe AcrAB-TolC weist ein breites Substratspektrum auf, das eine Vielzahl antimikrobieller Chemotherapeutika einschließt (PIDDOCK 2006b). Eine Abnahme der Empfindlichkeit gegenüber diesen Wirkstoffen kann so einen Hinweis für eine mögliche Aufregulierung dieses Transporters liefern. Daher wurden MHK-Daten sowohl von den Ausgangsstämmen als auch den jeweiligen Mutanten gegenüber Vertretern aus vier verschiedenen Wirkstoffklassen (Amphenicole, Aminocoumarin-Antibiotika, Fluorchinolone und Tetracycline) erhoben. Beim Vergleich der Empfindlichkeiten von Feldisolaten und den jeweiligen Triclosan-toleranten Mutanten konnten jedoch keine Unterschiede in den MHK-Werten für die untersuchten antimikrobiellen Chemotherapeutika festgestellt werden. Phänotypisch war bei den selektierten Triclosan-toleranten Mutanten keine Entwicklung einer *low-level* Kreuzresistenz nachweisbar. Verschiedene Autoren berichteten diesbezüglich von unterschiedlichen Ergebnissen. RANDALL et al. (2004a) und WEBBER et al. (2008b) stellten ebenso keine Unterschiede in den MHK-Werten zwischen Ausgangsstämmen und den jeweiligen nach Triclosan-Exposition selektierten Mutanten für verschiedene antimikrobielle Wirkstoffe fest. Im Gegensatz dazu wiesen KARATZAS et al. (2007) bei *in vitro* Triclosan-adaptierten *S. Typhimurium*-Mutanten eine 2- bzw. 4-fache Erhöhung in den MHK-Werten für antimikrobielle Chemotherapeutika nach. Auch CONDELL et al. (2012a) ermittelten bei *in vitro* selektierten Triclosan-toleranten Mutanten eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen. Gleichzeitig wurde in der genannten Studie jedoch auch von Mutanten berichtet, die im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangsstämmen höhere Empfindlichkeiten gegenüber antimikrobiellen Chemotherapeutika aufwiesen (CONDELL et al. 2012a).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine nach *in vitro* Triclosan-Exposition gebildete *low-level* Kreuzresistenz gegenüber antimikrobiellen Chemotherapeutika bei Salmonellen möglich ist, aber lediglich in Studien von KARATZAS et al. (2007) sowie CONDELL et al. (2012a) beschrieben wurde. Im Gegensatz dazu stellten RANDALL et al. (2004a) in ihren Untersuchungen erst nach Mehrfachexposition zunächst gegenüber Triclosan und anschließend gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen wie Ciprofloxacin diese Abnahme in der Empfindlichkeit bei Salmonellen fest, die in eigenen äquivalenten Untersuchungen nicht belegt wurde (nicht publizierte Daten).

Da bereits nach einmaliger Selektion auf Ciprofloxacin eine Abnahme in der Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Chemotherapeutika und eine Aufregulierung von AcrAB-TolC bei *Salmonella*-Mutanten beschrieben ist (KEHRENBURG et al. 2009), bleibt der Einfluss von Triclosan auf die Zunahme der MHK-Werte in der Studie von RANDALL et al. (2004a) somit schwer zu bewerten.

Aufgrund dieser unterschiedlichen Ergebnisse kann die Entstehung einer *low-level* Kreuzresistenz nach Triclosan-Exposition generell nicht ausgeschlossen werden, bei den untersuchten Salmonellen der vorliegenden Arbeit konnte jedoch phänotypisch kein Zusammenhang zwischen einer Triclosan-Toleranz und einer Kreuzresistenz gegenüber antimikrobiellen Chemotherapeutika festgestellt werden (PUBLIKATION 2). Um diese Feststellung genotypisch zu verifizieren, wurde die Genexpression von AcrAB-TolC überprüft. Hierfür wurde die Expression der Gene für die Pumpenbestandteile AcrA und TolC sowie die Expression der Gene der globalen Regulatoren MarA, RamA und SoxS analysiert.

Aufgrund einer von WHITEHEAD et al. (2011) nachgewiesenen Aufregulierung der *multidrug* Effluxpumpe AcrEF-TolC nach Biozidexposition wurde in der vorliegenden Arbeit stellvertretend für dieses Effluxsystem die Expression des Gens *acrF* untersucht. Darüber hinaus ist die Effluxkomponente TolC Bestandteil von mindestens sieben weiteren multidrug Effluxsystemen bei *S. Typhimurium* (HORIYAMA et al. 2010), so dass eine mögliche Aufregulierung auch auf eine Beteiligung weiterer Effluxsysteme hinweisen kann. Bei den Untersuchungen zeigte sich, dass die Veränderung in der Genexpression der Effluxkomponenten bei Isolaten acht verschiedener Serovare im Vergleich zum jeweiligen Ausgangsstamm sehr gering war. Die ermittelte 0,8- bis 1,9-fache Genexpression der drei untersuchten Effluxkomponentengene spricht nicht für eine Aufregulierung der jeweiligen *multidrug* Effluxsysteme. Dies erklärt die unveränderten MHK-Werte der Triclosan-toleranten Mutanten und den jeweiligen Ausgangsstämmen gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen. Studien in der Literatur berichteten diesbezüglich von unterschiedlichen Ergebnissen. BAILEY et al. (2009) ermittelten für *acrA* eine ähnlich geringe, circa 1,8-fache Veränderung in der Genexpression bei *in vitro* selektierten *S. Typhimurium*-Mutanten. Ein vergleichbares Ergebnis wurde auch von WEBBER et al. 2008a für *in vitro* selektierte *S. Typhimurium*-Mutanten nach Proteomanalyse beschrieben. Die Autoren konnten keine statistisch signifikante Aufregulierung von AcrAB-TolC bei Triclosan-toleranten Mutanten nachweisen.

Auch TABAK et al. schlussfolgerten aus ihren Untersuchungen im Jahr 2007, dass Triclosan die Transkription von *acrA* bei *in vitro* selektierten *S. Typhimurium* nicht signifikant beeinflusst.

Im Gegensatz dazu wurde von KARATZAS et al. (2007) eine 3-bis 4-fache Aufregulierung von *acrB* bei Triclosan-adaptierten *S. Typhimurium*-Mutanten ermittelt. Nach Meinung der Autoren ist diese für die bereits erwähnte 2- bzw. 4-fache Erhöhung der MHK-Werte der Triclosan-toleranten Mutanten verantwortlich. Weitere Aufregulierungen der Effluxkomponentengene *acrB* oder *acrF* wurden nach Exposition gegenüber anderen Bioziden, nicht aber nach Triclosan-Exposition nachgewiesen (RANDALL et al. 2007; WHITEHEAD et al. 2011). Die Gefahr einer Aufregulierung von AcrAB-TolC nach Triclosan-Exposition kann bei Salmonellen aufgrund dieser Studien aus der Literatur als gering eingeschätzt werden.

In Übereinstimmung dazu weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit keinen Zusammenhang zwischen Triclosan-Adaptation und verstärkter Expression von Effluxpumpengenen nach (PUBLIKATION 2). Dies wurde zusätzlich durch die Expressionsanalyse der Gene der globalen Regulatoren bestätigt. Auch hier sind für *marA*, *ramA* und *soxS* nur geringe 0,3- bis 3,4-fache Veränderungen in der Genexpression festgestellt worden, so dass auch die globalen Regulatoren keine deutliche Aufregulierung zeigten.

Genexpressionsstudien dieser globalen Regulatoren sind in der Literatur zwar nach Biozid- oder auch Antibiotika- nicht aber nach Triclosan-Exposition beschrieben worden. So stellten WHITEHEAD et al. (2011) nach Exposition gegenüber Aldehyden und QAV ähnliche Veränderungen in der Genexpression für *marA* und *soxS* bei *S. Typhimurium* fest. Eine Aufregulierung von AcrAB-TolC wurde in dieser Studie ebenfalls nicht nachgewiesen. Andere Ergebnisse wurden z. B. in der Studie von KEHRENBERG et al. aus dem Jahre 2009 erzielt, in der die Autoren von einer über 300-fachen Aufregulierung für *soxS* sowie einer knapp 95-fachen Aufregulierung für *ramA* bei Salmonellen nach Exposition gegenüber Ciprofloxacin berichteten. Diese verglichen mit den eigenen Daten deutlichen Veränderungen in der Genexpression hatten sowohl eine Aufregulierung von AcrAB-TolC als auch eine Abnahme in der Empfindlichkeit gegenüber Substanzen aus dem Substratspektrum der Pumpe wie etwa Tetracyclin, Chloramphenicol und Florfenicol zur Folge.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass nach Aufregulierung von AcrAB-TolC auch eine reduzierte Triclosan-Empfindlichkeit bei Salmonellen nachgewiesen wurde (KARATZAS et al. 2007; BAILEY 2008, 2009), da Triclosan zum Substratspektrum dieses Transporters zählt (PIDDOCK 2006b).

Eine Induktion dieses Transporters durch Triclosan-Exposition ist jedoch bislang nur vermutet worden (BAILEY et al. 2009). Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse belegen diese Vermutung nicht (PUBLIKATION 2).

Auch die in der Literatur vereinzelt beschriebene Assoziation einer Triclosan-Toleranz mit einer Kreuzresistenz-entstehung bei *in vitro* selektierten *Salmonella*-Mutanten konnte nicht bestätigt werden.

Da jedoch MHK-Testungen der Triclosan-toleranten Mutanten in Anwesenheit des EPIs PAßN auf einen Einfluss von Effluxsystemen hinwiesen, AcrAB- und AcrEF-TolC aber nicht aufreguliert waren, scheint die funktionelle Aktivität von Effluxsystemen eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung einer Triclosan-Toleranz zu sein. Darüber hinaus ist es möglich, dass neben der bekannten Effluxpumpe AcrAB-TolC weitere Effluxpumpen am Transport von Triclosan beteiligt sind.

4.3.1.3 Einfluss und Beteiligung weiterer Effluxpumpen

Um die Beteiligung weiterer Effluxsysteme untersuchen zu können, wurden Empfindlichkeits- und MPC-Studien mit Insertions- und Komplementationsmutanten von *S. Typhimurium* durchgeführt. Die Insertionsmutanten stellten dabei Mutanten dar, die aufgrund funktionell deletierter Gene für Effluxkomponenten eine Inaktivität des jeweiligen Effluxsystems aufwiesen. Die Komplementationsmutanten waren durch eine Unterbrechung im Leserahmen von *acrB* und somit durch ein funktionell inaktives AcrAB Effluxsystem charakterisiert. Zusätzlich wiesen diese Stämme Gene für jeweils eine der neun *multidrug* Effluxpumpen auf einem rekombinanten Plasmid auf.

Während die Empfindlichkeiten gegenüber Triclosan bei den Mutanten, die Insertionen in \DeltaacrD -, $\Delta mdsABC$ -, $\Delta mdtABC$ -, $\Delta mdfA$ -, $\Delta mdtK$ - und $\Delta macAB$ -Genen aufwiesen, im Vergleich zum Ausgangsstamm unverändert waren, wurde eine Verringerung in den MHK-Werten bei Stämmen mit funktionell deletierten \DeltaacrB -, $\Delta emrAB$ - und $\Delta acrEF$ -Genen erzielt.

Die zuerst genannten sechs *multidrug* Effluxsysteme AcrD, MdsABC, MdtABC, MdfA, MdtK und MacAB scheinen daher nicht am Export von Triclosan beteiligt zu sein, anders dagegen die Effluxpumpen EmrAB- und AcrEF-sowie die schon als Triclosan-exportierend beschriebene Effluxpumpe AcrAB-TolC.

Bestätigt werden konnte die Beteiligung dieser Pumpen bei Untersuchungen mit Komplementationsmutanten. Bei diesen Untersuchungen war das primär am Transport und der Adaptation an Triclosan beteiligte Effluxsystem AcrAB-TolC inaktiviert. Die Stämme wiesen daher eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Triclosan auf und auch geringere Effekte, die eine Triclosan-Empfindlichkeit beeinflussen könnten, waren somit nachweisbar. Die Komplementation von *emrAB*, *acrEF* und *acrAB* führte zu einer vierfachen Erhöhung der MHK-Werte im Vergleich zum MHK-Wert des Ausgangsstammes, der ein deletiertes *acrB*-Gen aufwies. Die weiteren Komplementationsmutanten wiesen verglichen mit dem Ausgangsstamm keine Veränderungen in der Empfindlichkeit gegenüber Triclosan auf. Neben der bekannten Effluxpumpe AcrAB- konnte durch diese Untersuchungen die Beteiligung der *multidrug* Effluxsysteme EmrAB- und AcrEF-TolC am Transport von Triclosan bestätigt werden. Bei Betrachtung der Substratspektren von AcrAB-, AcrEF- und EmrAB-TolC sind Überschneidungen bei den zu exportierenden Substanzen zu verzeichnen (POOLE 2004; CONDELL et al. 2012b). So gehören die Substanzen Nalidixinsäure, Novobiocin, Natriumdeoxycholat und Natriumdodecylsulfat zum Substratspektrum der drei erwähnten Transporter (HORIYAMA et al. 2010). Diese ähnlichen Substratspektren können daher eine mögliche Erklärung für den Triclosan-Transport von AcrEF- und EmrAB-TolC liefern.

Um zu untersuchen, ob bei einer funktionellen Inaktivität von AcrAB eine Komplementation mit AcrEF oder EmrAB die Adaptationsfähigkeit an steigende Triclosan-Konzentrationen beeinflusst, wurden mit diesen Komplementationsmutanten MPC-Studien durchgeführt. Diese MPC-Werte definieren zwar die Konzentration, die benötigt wird, um die Bildung von toleranten Mutanten zu verhindern (RANDALL et al. 2004b), können deshalb aber auch ein Maß für die Adaptationsfähigkeit der Mutanten darstellen. Eine Schlussfolgerung auf den Einfluss der komplementierten Effluxpumpen scheint somit möglich. Bei den *emrAB*- bzw. *acrEF*-Komplementationsmutanten war eine vierfache Erhöhung der MPC-Werte im Vergleich zum Ausgangsstamm (Δ *acrB*) zu verzeichnen. Diese Erhöhung der MPC-Werte ließ sich in drei unabhängigen Wiederholungen nachweisen.

WHITEHEAD et al. berichteten in diesem Zusammenhang im Jahr 2011 in ihrer Studie zu Effekten nach Biozidexposition bei *S. Typhimurium*, dass zwar AcrAB- das Haupteffluxsystem darstellt, AcrEF-TolC dieses aber durchaus funktionell unterstützen kann. Während in der erwähnten Studie von WHITEHEAD et al. (2011) Ergebnisse nach Exposition gegenüber Aldehyden und QAV beschrieben wurden, scheinen die eigenen, nach Triclosan-Exposition ermittelten Ergebnisse, eine ähnliche Schlussfolgerung zu erlauben. Bei einem funktionell inaktiven AcrAB scheint neben der Effluxpumpe AcrEF, die ebenso zur RND-Familie gezählt wird, auch die zur MF-Superfamilie gehörende Effluxpumpe EmrAB die Adaptationsfähigkeit an Triclosan zu beeinflussen und damit die Funktion von AcrAB teilweise zu kompensieren.

Für den ebenfalls zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehörenden Erreger *E. coli* wurde neben AcrAB- eine weitere Effluxpumpe, AcrEF-TolC, beschrieben, die an der Entstehung eines Triclosan-toleranten Phänotyps beteiligt ist (SHERIDAN et al. 2013). Dies ließ sich durch die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse auch für *S. Typhimurium* bestätigen.

Die Adaptationsfähigkeit an Triclosan wurde bei funktioneller Inaktivität von AcrAB sowohl durch AcrEF als auch EmrAB teilweise kompensiert. Aufgrund der essentiellen Rolle von AcrAB-TolC für ein Überleben der Salmonellen in der Umwelt und im Wirt (BUCKLEY et al. 2006; WEBBER et al. 2009) ist eine funktionelle Inaktivität dieser Effluxpumpe *in vivo* sehr unwahrscheinlich. Daher scheinen die beiden Effluxsysteme EmrAB- und AcrEF-TolC bei einer Adaptation an Triclosan eine eher unterstützende Rolle zu spielen, könnten jedoch im Falle einer Überexpression (hier gezeigt durch die Plasmidlokalisierung bei $\Delta acrB$) klar zur Triclosan-Toleranz beitragen. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass funktionell aktive Effluxsysteme eine wichtige Voraussetzung für die Adaptationsfähigkeit an Triclosan darstellen. Es konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals eine Beteiligung der Effluxpumpen EmrAB- und AcrEF-TolC an der Empfindlichkeit von *S. Typhimurium* gegenüber Triclosan nachgewiesen werden (PUBLIKATION 3).

AcrAB-TolC scheint dennoch das wichtigste Effluxsystem für den Transport von Triclosan zu sein, da Mutanten, die neben AcrAB-TolC weitere funktionell inaktive Effluxsysteme aufwiesen, keine zusätzliche Zunahme in der Empfindlichkeit gegenüber Triclosan zeigten. Obwohl weitere Effluxsysteme am Transport von Triclosan beteiligt sind, wurde keine Überexpression dieser Effluxpumpen in Triclosan-toleranten *Salmonella*-Mutanten nachgewiesen.

4.3.2 Einfluss von Mutation und Überexpression des *fabI*-Gens

Untersuchungen der Triclosan-toleranten *Salmonella*-Mutanten der vorliegenden Arbeit wiesen zwar einen Einfluss von Efflux in der Entstehung einer Triclosan-Toleranz nach, die hohen MHK-Werte für Triclosan der selektierten Mutanten konnten damit jedoch nicht erklärt werden. Weitere Mechanismen sind daher wahrscheinlich, so dass im Folgenden *fabI*, das für die Angriffsstelle von Triclosan kodierende Gen, auf Veränderungen in seiner Nukleotidsequenz und Genexpression untersucht wurde. Mit Hilfe der vergleichenden Sequenzanalyse wurde bei allen Triclosan-toleranten Mutanten der acht Serovare eine Mutation am Codon 93 detektiert, die zu einem Aminosäureaustausch von Glycin gegen Valin führte. Diese Mutation, die schon ab einer Triclosan-Konzentration von 1 µg/mL nachweisbar war, scheint einen wichtigen anfänglichen Schritt in der Entwicklung einer Toleranz gegenüber Triclosan darzustellen und wurde im Rahmen der Arbeit erstmals bei Mutanten unterschiedlicher Serovare nachgewiesen. Bislang wurde die Mutation nur bei *in vitro* selektierten *S. Typhimurium*-Mutanten detektiert, wobei ebenfalls der Austausch von Glycin gegen Serin ermittelt wurde (WEBBER et al. 2008b; CONDELL et al. 2012b). Weitere Mutationen im *fabI*-Gen sind bei *in vitro* selektierten *Salmonella*-Mutanten nicht bekannt. Anders bei *in vivo* *Salmonella*-Feldisolaten, bei denen eine *missense* Mutation am Codon 115 nachweisbar war, die zu einem Aminosäureaustausch von Valin gegen Isoleucin führte (COPITCH et al. 2010). Die Autoren dieser Studie stellten jedoch keinen Zusammenhang zwischen Val₁₁₅→Ile und erhöhten MHK-Werten der Feldisolate fest. Während für die Mutation bei Feldisolaten keine Assoziation mit einer Triclosan-Unempfindlichkeit festgestellt wurde, wird der Einfluss von Gly₉₃→Val auf die MHK-Werte für Triclosan bei *in vitro* selektierten Triclosan-toleranten Mutanten unterschiedlich diskutiert (WEBBER et al. 2008b; CONDELL et al. 2012b).

So wurden in der Studie von WEBBER et al. (2008b) neben Triclosan-toleranten *S. Typhimurium*-Mutanten mit Gly₉₃→Val Mutation auch *S. Typhimurium*-Mutanten selektiert, die hohe MHK-Werte, nicht aber die Gly₉₃→Val Mutation aufwiesen. Dagegen zeigten in der vorliegenden Arbeit alle untersuchten Mutanten der acht verschiedenen Serovare hohe MHK-Werte und die Gly₉₃→Val Mutation (ab einer Triclosan-Konzentration von 1 µg/mL). Auch CONDELL et al. (2012b) wiesen in ihrer Studie bei einer selektierten *S. Typhimurium*-Mutante sowohl hohe MHK-Werte für Triclosan als auch die Mutation (Gly₉₃→Ser) nach. Um daher den Einfluss der Mutation auf die Empfindlichkeit gegenüber Triclosan näher spezifizieren zu können, wurden Komplementationsstudien mit Triclosan-empfindlichen Empfängerstämmen durchgeführt. Hierzu wurde das Gen *fabI* mit und ohne Gly₉₃→Val Mutation in ein Vektorplasmid kloniert und in hochempfindliche *E. coli* und *Salmonella*-Empfängerstämmen transformiert. Beim Vorhandensein des *fabI*-Gens mit Gly₉₃→Val Mutation auf einem rekombinanten Plasmid war bei den nichtadaptierten, Triclosan-empfindlichen Empfängerstämmen ein sehr hoher, bis zu 32-facher Anstieg in den MHK-Werten zu verzeichnen, der sich mit in der Literatur beschriebenen Ergebnissen bei *S. Typhimurium* deckt (WEBBER et al. 2008b). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Mutation auch bei weiteren Serovaren wie *S. Livingstone* einen hohen Einfluss auf die MHK-Werte gegenüber Triclosan ausübt.

Dieser hohe Einfluss der Gly₉₃→Val Mutation im *fabI*-Gen ist auch bei *E. coli* nachgewiesen worden (siehe Kapitel 2.2.3.1.1) (MCMURRY et al. 1998b). Aufgrund von bis zu 87 % Übereinstimmung in der Sequenz der *fabI*-Gene von *E. coli* und *S. enterica* kann auch bei Salmonellen ein ähnlicher Mechanismus der sterischen Hinderung vermutet werden.

Neben dem erkennbaren Einfluss der Mutation wurde in den Komplementationsexperimenten dieser Arbeit auch ein Einfluss der Überexpression des *fabI*-Gens auf die MHK-Werte festgestellt, der in der Literatur bereits für *E. coli* beschrieben wurde (MCMURRY et al. 1998b; SLATER-RADOSTI et al. 2001). In den eigenen Untersuchungen konnte eine 16-fache Erhöhung der MHK-Werte für Triclosan allein durch die Lokalisation des *fabI*-Gens auf einem *multicopy*-Plasmid bei den empfindlichen Empfängerstämmen erzielt werden. Somit scheinen sowohl die Mutation in *fabI* als auch die Überexpression des Gens sehr wichtige Mechanismen bei der Adaptation von Salmonellen an Triclosan darzustellen (PUBLIKATION 2).

Die Untersuchung der bei MPC-Bestimmungen selektierten Triclosan-toleranten Mutanten zeigte (bis auf eine Ausnahme) eine bis zu 2-fache Aufregulierung der Genexpression von *fabI*. Eine etwas höhere Aufregulierung (bis 4,8-fach) wurde in der Literatur bei *in vitro* selektierten *S. Typhimurium*-Mutanten festgestellt (WEBBER et al. 2008a; CONDELL et al. 2012b). Die erwähnte Ausnahme in den eigenen Untersuchungen stellte die Paratyphi B-Mutante dar, bei der eine bis zu 12-fach höhere Expression des *fabI*-Gens nachweisbar war. Die Ermittlung der MHK-Werte ließ aber keinen zusätzlichen Einfluss dieser höheren Genexpression auf die Empfindlichkeit gegenüber Triclosan erkennen. Eine 10-fache Aufregulierung im Vergleich zum Ausgangsisolat wurde auch für eine *S. Typhimurium*-Mutante von TABAK et al. in ihrer 2007 erschienenen Veröffentlichung beschrieben. Unterschiede in der *fabI*-Expression bei verschiedenen Serovaren sind somit möglich, scheinen aber bei *in vitro* selektierten Mutanten eher selten vorzukommen. Dagegen konnte bei Untersuchungen der Angriffsstelle von Triclosan für alle untersuchten Mutanten die beschriebene Gly₉₃→Val Mutation in *fabI* nachgewiesen werden, die – wie in Transformationsexperimenten gezeigt – maßgeblich zur Triclosan-Toleranz beiträgt.

4.3.3 Stabilität der Mutation nach Kultivierung ohne Selektionsdruck und *in vitro* Wachstumsverhalten der Mutanten

Da die Mutation und der resultierende Gly₉₃→Val Austausch mit deutlich höheren MHK-Werten gegenüber Triclosan assoziiert werden konnten (WEBBER et al. 2008b; PUBLIKATION 2), die Mutation bei *Salmonella*-Feldisolaten *in vivo* jedoch nicht bekannt ist und auch Triclosan-tolerante Feldisolate nur vereinzelt beschrieben wurden (BRAOUDAKI u. HILTON 2005; COPITCH et al. 2010; MORRISSEY et al. 2014), kann vermutet werden, dass diese Mutation nicht stabil ist oder zu einer verminderten Fitness der Stämme führt. Nach zehnmaliger Kultivierung auf Nährmedien, die keinen Selektionsdruck aufwiesen, konnte jedoch bei allen untersuchten Mutanten der acht verschiedenen Serovare die Gly₉₃→Val-Mutation nachgewiesen werden. Darüber hinaus waren die MHK-Werte unverändert bzw. um maximal eine Verdünnungsstufe geringer. Dies weist auf eine Mutation hin, die nicht durch mehrmalige aufeinanderfolgende Kultivierungsschritte ohne Selektionsdruck verloren geht. Damit einhergehend war, wie auch in der Literatur beschrieben, der Triclosan-tolerante Phänotyp über den untersuchten Zeitraum stabil (BRAOUDAKI u. HILTON 2004, 2005; CONDELL et al. 2012a).

Daher scheint es wahrscheinlich, dass eine Verminderung der bakteriellen Fitness die Ausbreitung der Triclosan-toleranten Isolate, die eine Gly₉₃→Val Mutation aufweisen, *in vivo* verhindert (COPITCH et al. 2010). Eine Beeinträchtigung dieser bakteriellen Fitness wird *in vitro* üblicherweise mit Hilfe von Wachstumsexperimenten bestimmt. Diese können sowohl separiert für Ausgangsstamm und selektierte Mutante als auch in einem unmittelbaren Wettbewerb erfolgen (PETERSEN et al. 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurde jeweils für drei Mutanten sowie für die drei korrespondierenden Ausgangsstämme das *in vitro* Wachstumsverhalten separat in Nährmedien ohne Selektionsdruck bestimmt. Darüber hinaus wurde das Wachstumsverhalten von vier Feldisolaten und den jeweiligen daraus generierten Triclosan-toleranten Mutanten in direkter Konkurrenz ohne Selektionsdruck ermittelt. Die über die Anzahl der KbE ausgewerteten separaten Wachstumskurven der drei Triclosan-toleranten Mutanten der Serovare Enteritidis, Paratyphi B und Saintpaul waren signifikant geringer als die entsprechenden Wachstumskurven der Feldisolate (PUBLIKATION 2). Diese geringeren Werte deuteten auf eine Beeinträchtigung der bakteriellen Fitness hin. Ein ähnliches Ergebnis ist in der Studie von KARATZAS et al. (2007) beschrieben.

Die *in vitro* selektierte Triclosan-tolerante *S. Typhimurium*-Kultur wies signifikant geringere Werte der optischen Dichte (OD₆₀₀) im Vergleich zum Ausgangsstamm während der exponentiellen Wachstumsphase auf.

In einer weiteren im Jahr 2008 publizierten Studie beschrieben KARATZAS et al. ein ähnliches Ergebnis für *S. Typhimurium* und die nach *in vitro* Exposition mit Desinfektionsmitteln (u. a. mit QAV, Aldehyden, organischen Säuren) selektierten Mutanten. Auch hier wurden im Vergleich signifikant geringere Werte der OD₆₀₀ nach Ermittlung des Wachstumsverhaltens für die Mutanten festgestellt.

Im direkten Wachstumsvergleich von Feldisolaten und daraus selektierten Triclosan-toleranten Mutanten wurde in der vorliegenden Arbeit eine hohe Beeinträchtigung der bakteriellen Fitness der Mutanten ermittelt (PUBLIKATION 4).

Bei der direkten Konkurrenz sowie durch die Ergebnisse der Wachstumskurven zeigte sich, dass Triclosan-tolerante Mutanten mit einem Aminosäureaustausch im *fabI*-Gen durch ein deutlich langsames Wachstum charakterisiert sind. Darüber hinaus sind sie in direkter Konkurrenz den nicht mutierten Stämmen unterlegen.

Somit ist es wahrscheinlich, dass sie aus Populationen ohne Selektionsdruck durch Triclosan nach einiger Zeit verschwinden werden.

Weitere Studien, die das Wachstumsverhalten von *Salmonella*-Feldisolaten und Triclosan-toleranten Mutanten *in vitro* im direkten Vergleich bestimmten, waren in der Literatur nicht verfügbar.

WEBBER et al. untersuchten in ihrer Studie aus dem Jahr 2008b *in vivo* die bakterielle Fitness von *S. Typhimurium* und selektierten Triclosan-toleranten Mutanten. Alle untersuchten Mutanten waren in der Lage, den Darm von Eintagsküken zu kolonisieren und zu persistieren. Verglichen mit der vorliegenden Arbeit berichteten die Autoren von einem anderen Ergebnis. Obwohl am Ende des Experiments geringere Zellzahlen der Mutanten im Vergleich zum Ausgangsstamm nachweisbar waren, schlussfolgerten die Autoren, dass die bakterielle Fitness der Mutanten im Vergleich zum Ausgangsstamm nicht beeinträchtigt war.

In Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnten sowohl die Mutation in *fabI* als auch die MHK-Werte der selektierten Mutanten nach Kultivierungsschritten ohne Triclosan bestätigt werden. Die verminderte bakterielle Fitness der Mutanten stellt daher eine wahrscheinliche Erklärung dafür dar, dass der Nachweis Triclosan-toleranter *Salmonella*-Feldisolate äußerst selten ist (BRAOUDAKI u. HILTON 2005; COPITCH et al. 2010; PUBLIKATION 1 u. 2; MORRISSEY et al. 2014) und der Nachweis der Gly₉₃→Val Mutation bei Feldisolaten *in vivo* bislang nicht beschrieben wurde.

4.4 Schlussfolgerung

Anhand der Ergebnisse der eigenen Arbeit lässt sich feststellen, dass bei *Salmonella*-Feldisolaten weder die Bildung von Triclosan-toleranten Subpopulationen noch die Entwicklung einer Triclosan-Toleranz stattgefunden hat.

Bei den im Rahmen der Arbeit *in vitro* selektierten Triclosan-toleranten *Salmonella*-Mutanten war sowohl phäno- als auch genotypisch keine Kreuzresistenzentwicklung gegenüber antimikrobiellen Chemotherapeutika nachweisbar.

Für die Entwicklung einer Triclosan-Toleranz stellten funktionell aktive Effluxpumpen eine essentielle Grundvoraussetzung dar. Zusätzlich zu der bekannten Effluxpumpe AcrAB- konnte auch eine Beteiligung von AcrEF- und EmrAB-TolC an der Empfindlichkeit und Adaptationsfähigkeit der Isolate an Triclosan festgestellt werden.

In Ergänzung zur Rolle von Effluxsystemen trug die Gly₉₃→Val Mutation im *fabI*-Gen und dessen Überexpression maßgeblich zur Triclosan-Toleranz bei. Die signifikant verminderte bakterielle Fitness der selektierten Mutanten stellt eine mögliche Erklärung für den äußerst seltenen Nachweis dieser Stämme *in vivo* dar. Somit lieferten die Resultate dieser Arbeit neue Aspekte, die bei der Risikobewertung einer Kreuzresistenzentstehung bei Salmonellen gegenüber antimikrobiellen Chemotherapeutika nach Triclosan-Adaptation berücksichtigt werden können.

5 Zusammenfassung

Ulrike Rensch: Molekulare Untersuchungen zur Triclosan-Toleranz bei Isolaten und Mutanten unterschiedlicher *Salmonella*-Serovare unter Berücksichtigung einer möglichen Kreuzresistenzentstehung gegenüber antimikrobiellen Chemotherapeutika

Das Biozid Triclosan wird vielfältig z. B. als aktiver antimikrobieller Wirkstoff in Desinfektionsmitteln der Lebensmittelindustrie eingesetzt. Ziel der vorliegenden Studie war es, zur Klärung der Frage beizutragen, ob diese breite Anwendung bei aviären *Salmonella*-Feldisolaten zu einer Toleranzentwicklung gegenüber Triclosan geführt hat. Hierfür wurden erstmalig Daten zum Empfindlichkeitsstatus von 375 Salmonellen, die aus verschiedenen Zeiträumen in Deutschland isoliert worden waren, gegenüber Triclosan und drei weiteren Bioziden generiert. Für die untersuchten Biozide Acriflavin, Benzalkoniumchlorid und Triclosan war keine Toleranzentwicklung im Vergleich der $MHK_{50/90}$ -Werte von Isolaten aus verschiedenen Zeiträumen zu verzeichnen. Für Chlorhexidin wurde eine Erhöhung der $MHK_{50/90}$ -Werte bei den aktuelleren Isolaten ermittelt. Für das Biozid Triclosan wird neben der Entstehung einer Triclosan-Toleranz die gleichzeitige Bildung von *low-level* Kreuzresistenzen gegenüber antimikrobiellen Chemotherapeutika vermutet. Da keine Triclosan-toleranten Isolate ermittelt wurden, wurden diese *in vitro* selektiert. Diese über Nacht selektierten Triclosan-toleranten Mutanten verschiedener Serovare wiesen im Vergleich zu den Triclosan-empfindlichen Ausgangsstämmen eine deutliche Abnahme in der Empfindlichkeit gegenüber Triclosan auf. Während in Untersuchungen die Rolle von funktionell aktiven Effluxsystemen in der Entwicklung einer Triclosan-Toleranz nachgewiesen wurde, konnte die Bildung einer Kreuzresistenz gegenüber antimikrobiellen Chemotherapeutika bei den hier untersuchten Isolaten sowohl resistenzphänotypisch als auch genotypisch durch Expressionsanalysen nicht bestätigt werden. Um den Einfluss von verschiedenen Effluxsystemen auf die Empfindlichkeit und Adaptationsfähigkeit an Triclosan näher spezifizieren zu können, wurden Experimente mit Insertions- und Komplementationsmutanten durchgeführt.

Neben der bekannten Rolle von AcrAB-TolC konnte erstmals auch eine Beteiligung von EmrAB-TolC und AcrEF-TolC am Export von Triclosan festgestellt werden. Obwohl AcrAB-TolC das wichtigste Effluxsystem für den Transport und die Adaptation an Triclosan zu sein scheint, können die Effluxpumpen EmrAB-TolC und AcrEF-TolC eine funktionelle Inaktivität von AcrAB-TolC teilweise kompensieren und könnten im Falle einer Überexpression zur Triclosan-Toleranz beitragen. Während der Einfluss von Efflux in der Entwicklung einer Triclosan-Toleranz nachweisbar war, konnten die hohen MHK-Werte der selektierten Mutanten damit nicht ausschließlich erklärt werden. Die Analyse der Angriffsstelle von Triclosan, dem *fabI*-Gen, zeigte bei allen Isolaten der acht einbezogenen Serovare eine Mutation am Codon 93, die zu einem Austausch der Aminosäuren Glycin gegen Valin führte. In weiterführenden Experimenten konnte ein deutlicher Einfluss sowohl dieser Mutation als auch der Überexpression des Gens *fabI* auf die Empfindlichkeit gegenüber Triclosan festgestellt werden. Diese Veränderungen trugen maßgeblich zu den hohen MHK-Werten der Triclosan-toleranten Mutanten bei. Da der Nachweis Triclosan-toleranter Isolate selten und das Vorkommen der Mutation Gly₉₃→Val *in vivo* bislang nicht beschrieben wurde, wurden Untersuchungen der Mutanten nach Kulturpassagen ohne Selektionsdruck durchgeführt. Sowohl die Mutation in *fabI* als auch die MHK-Werte der selektierten Mutanten wurden dabei nach den Kulturpassagen bestätigt. Aufgrund dieser Bestätigungen kann eine verminderte bakterielle Fitness eine mögliche Ursache für den seltenen Nachweis Triclosan-toleranter Salmonellen und die bislang *in vivo* nicht nachgewiesene *fabI*-Mutation Gly₉₃→Val darstellen. In anschließenden Wachstumsversuchen, die separat für Mutanten (mit Mutation in *fabI*) und Feldisolate durchgeführt wurden, konnte diese Vermutung bestätigt werden. So wurde eine signifikant verminderte bakterielle Fitness der selektierten Mutanten ermittelt. In direkter Konkurrenz von Feldisolaten und Triclosan-toleranten Mutanten ließen sich die Mutanten von den nicht mutierten Stämmen anteilmäßig deutlich verdrängen. Ohne Selektionsdruck durch Triclosan scheint daher ein Rückgang dieser Mutanten in *Salmonella*-Populationen wahrscheinlich.

Im Falle einer Risikobewertung der Triclosan-Toleranz und der Kreuzresistenzentstehung gegenüber antimikrobiellen Chemotherapeutika können diese für Salmonellen dargelegten Ergebnisse wichtige neue Aspekte liefern.

6 Summary

Ulrike Rensch: Molecular investigations of triclosan tolerance in isolates and mutants of different *Salmonella* serovars considering a possible development of cross-resistance to antibiotics

The biocide triclosan is widely used as an active ingredient in many product types, e. g. disinfectants used in the food industry. One aim of the present study was to clarify whether this broad use has led to a development of triclosan tolerance in avian *Salmonella* field isolates. Therefore, the susceptibility of 375 *Salmonella* strains to triclosan and three other biocides was determined. When comparing MIC_{50/90} values of *Salmonella* isolates of different time periods no development of tolerance could be detected for the biocides acriflavine, benzalkonium chloride and triclosan. Only for chlorhexidine was an increase in MIC values obtained and the more recently collected isolates were significantly less susceptible. For the biocide triclosan, an association of triclosan tolerance and efflux mediated low-level cross-resistance to antibiotics raises concerns. As no triclosan tolerant isolates were determined they were selected during the determination of mutant prevention concentrations. The selected triclosan tolerant mutants belonging to eight different serovars exhibited high MIC values compared to their isogenic parent strains. Experiments in the presence and absence of an efflux pump inhibitor revealed the important role of functional active efflux systems in the adaptation to triclosan. The assumed cross-resistance to antimicrobial agents due to overexpressed efflux pumps could not be confirmed by real-time PCR experiments and susceptibility testing. In order to characterise the influence of efflux pumps in the adaptation process, experiments with insertion and complementation mutants were carried out. In addition to the well-known efflux pump AcrAB-TolC which has been described to extrude biocides such as triclosan, the contribution of two other efflux systems to the transport of triclosan was observed. It seems that AcrAB-TolC is still the major efflux system. Nevertheless, the efflux pumps EmrAB-TolC and AcrEF-TolC are able to partly compensate an inactivity of AcrAB-TolC and thus may have an effect on triclosan tolerance when overexpressed.

The role of functionally active efflux pumps in the development of triclosan tolerance was demonstrated but the high MIC values of triclosan remained unexplained. Therefore, the influence of the target site of triclosan, the gene *fabI*, was analysed. Sequence alignment revealed a missense mutation at codon 93 in all investigated isolates that resulted in an amino acid exchange (glycine replaces valine). This mutation and the overexpression of *fabI* were found to play an important role in decreased susceptibility to triclosan.

As the detection of triclosan tolerant *Salmonella* isolates is rare and the mutation has been described only for *in vitro* selected *Salmonella* Typhimurium, further studies investigating the occurrence of the mutation after serial passages of the mutants without selection pressure were performed. High MIC values and the mutation of *fabI* in the triclosan tolerant mutants were confirmed. Based on these results, it may be assumed that a fitness cost of the mutants is likely to occur and thus might explain the rare occurrence of triclosan tolerant *Salmonellae*. This presumption was confirmed by separate growth curve experiments of parent and mutant strains. A significant bacterial fitness cost of the mutants was revealed. Growth competition experiments between parent and mutant strains demonstrated a clear decrease in the amount of mutants. It can be assumed that without selection pressure of triclosan a reduction in the number of these mutants is likely to occur in the population of *Salmonella* isolates.

These results may provide new aspects for a risk assessment of triclosan tolerance and the development of cross-resistance to antibiotics.

7 Literaturverzeichnis

ABUZAID, A., A. HAMOUDA u. S. G. AMYES (2012):

Klebsiella pneumoniae susceptibility to biocides and its association with *cepA*, *qacΔE* and *qacE* efflux pump genes and antibiotic resistance.

J. Hosp. Infect. 81, 87-91

AGBAJE, M., R. H. BEGUM, M. A. OYEKUNLE, O. E. OJO u. O. T. ADENUBI (2011):

Evolution of *Salmonella* nomenclature: a critical note.

Folia Microbiol. 56, 497-503

AID INFODIENST u. BFR (2013):

Hygieneregeln in der Gemeinschaftsgastronomie.

<http://www.bfr.bund.de/cm/350/hygieneregeln-in-der-gemeinschaftsgastronomie-deutsch.pdf>

AIELLO, A. E., E. L. LARSON u. S. B. LEVY (2007):

Consumer antibacterial soaps: effective or just risky?

Clin. Infect. Dis. 1, Suppl 137S -147S

AIELLO, A. E., B. MARSHALL, S. B. LEVY, P. DELLA-LATTA, S. X. LIN u. E. LARSON (2005):

Antibacterial cleaning products and drug resistance.

Emerg. Infect. Dis. 11, 1565-1570

ALIABADI, F. S. u. P. LEES (2000):

Antibiotic treatment for animals: effect on bacterial population and dosage regimen optimisation.

Int. J. Antimicrob. Agents 14, 307-313

ALVAREZ-ORTEGA, C., J. OLIVARES u. J. L. MARTÍNEZ (2013):

RND multidrug efflux pumps: what are they good for?

Front. Microbiol. 4, eCollection 2013

ANDREWS, J. M. (2001):

Determination of minimum inhibitory concentrations.

J. Antimicrob. Chemother. 48, Suppl 5S-16S

ANDREWS, H. L. u. A. J. BAUMLER (2005):

Salmonella species

in: P. M. Fratamico, A. K. Bhunia u. J. L. Smith (Hrsg.):

Foodborne pathogens: microbiology and molecular biology.

Caister Academic Press, England, S. 327-339

AARESTRUP, F. M. u. H. HASMAN (2004):

Susceptibility of different bacterial species isolated from food animals to copper sulphate, zinc chloride and antimicrobial substances used for disinfection.

Vet. Microbiol. 100, 83-89

ARIOLI, S., M. ELLI, G. RICCI u. D. MORA (2013):

Assessment of the susceptibility of lactic acid bacteria to biocides.

Int. J. Food Microbiol. 163, 1-5

ARSENAULT, J., A. LETELLIER, S. QUESSY, V. NORMAND u. M. BOULIANNE (2007):

Prevalence and risk factors for *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. caecal colonization in broiler chicken and turkey flocks slaughtered in Quebec, Canada.

Prev. Vet. Med. 81, 250-264

AURY, K., M. CHEMALY, I. PETETIN, S. ROUXEL, M. PICHEROT V. MICHEL u. S. LE BOUQUIN (2010):

Prevalence and risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* contamination in French breeding and fattening turkey flocks at the end of the rearing period.

Prev. Vet. Med. 94, 84-93

BAILEY, A. M., C. CONSTANTINIDOU, A. IVENS, M. I. GARVEY, M. A. WEBBER, N. COLDHAM, J. L. HOBMAN, J. WAIN, M. J. WOODWARD u. L. J. V. PIDDOCK (2009):

Exposure of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to triclosan induces a species-specific response, including drug detoxification.

J. Antimicrob. Chemother. 64, 973-985

BAILEY, A. M., A. IVENS, R. KINGSLEY, J. L. COTTELL, J. WAIN u. L. J. V. PIDDOCK (2010):

RamA, a member of the AraC/XylS family, influences both virulence and efflux in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

J. Bacteriol. 192, 1607-1616

BAILEY, A. M., I. T. PAULSEN u. L. J. V. PIDDOCK (2008):

RamA confers multidrug resistance in *Salmonella enterica* via increased expression of *acrB*, which is inhibited by chlorpromazine.

Antimicrob. Agents Chemother. 52, 3604-3611

BARROW, P. A., M. A. JONES, A. L. SMITH u. P. WIGLEY (2012):

The long view: *Salmonella* – the last forty years.

Avian Pathol. 41, 413-420

BAY, D. C., K. L. ROMMENS u. R. J. TURNER (2008):

Small multidrug resistance proteins: a multidrug transporter family that continues to grow.

Biochim. Biophys. Acta 1778, 1814-1838

BEIER, R. C., P. N. ANDERSON, M. E. HUME, T. L. POOLE, S. E. DUKE, T. L. CRIPPEN, C. L. SHEFFIELD, D. J. CALDWELL, J. A. BYRD, R. C. ANDERSON u. D. J. NISBET (2011):

Characterization of *Salmonella enterica* isolates from turkeys in commercial processing plants for resistance to antibiotics, disinfectants, and a growth promoter.

Foodborne Pathog. Dis. 8, 593-600

BESCHLUSS DER EUROPÄISCHEN KOMMISSION (2010):

Beschluss der Kommission vom 19. März 2010 über die Nichtaufnahme von 2,4,4'-Trichloro-2'-hydroxydiphenylether in das in der Richtlinie 2002/72/EG enthaltene Unionsverzeichnis von Additiven, die bei der Herstellung von Materialien und Gegenständen aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen, verwendet werden dürfen.

Amtsblatt der Europäischen Union L 75, 23. März 2010, 25-26

BFR (2006):

Triclosan nur im ärztlichen Bereich anwenden, um Resistenzbildungen vorzubeugen.

Stellungnahme Nr. 030/2006 des BfR vom 08. Mai 2006

http://www.bfr.bund.de/cm/343/triclosan_nur_im_aerztlichen_bereich_anwenden_um_resistenzbildungen_vorzubeugen.pdf

BFR (2009):

BfR unterstützt Verwendungsverbot von Triclosan in Lebensmittelbedarfsgegenständen.

Stellungnahme Nr. 031/2009 des BfR vom 12. Juni 2009

http://www.bfr.bund.de/cm/343/bfr_unterstuetzt_verwendungsverbot_von_triclosan_in_lebensmittelbedarfsgegenstaenden.pdf

BIROŠOVÁ, L. u. M. MIKULÁŠOVÁ (2009):

Development of triclosan and antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

J. Med. Microbiol. 58, 436-441

BLOOMFIELD, S. F. (2002):

Significance of biocide usage and antimicrobial resistance in domiciliary environments.

J. Appl. Microbiol. 92, Suppl 144S-157S

BÖHM, R. (1998):

Disinfection and hygiene in the veterinary field and disinfection of animal houses and transport vehicles.

Int. Biodeterior. Biodegradation 41, 217-224

BORGES-WALMSLEY, M. I., K. S. McKEEGAN u. A. R. WALMSLEY (2003):

Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs.

Biochem. J. 376, 313-338

BORGES-WALMSLEY, M. I. u. A. R. WALMSLEY (2001):

The structure and function of drug pumps.

Trends Microbiol. 9, 71-79

BRAOUDAKI, M. u. A. C. HILTON (2004):

Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents.

J. Clin. Microbiol. 42, 73-78

BRAOUDAKI, M. u. A. C. HILTON (2005):

Mechanisms of resistance in *Salmonella enterica* adapted to erythromycin, benzalkonium chloride and triclosan.

Int. J. Antimicrob. Agents 25, 31-37

BRENNER, F. W., R. G. VILLAR, F. J. ANGULO, R. TAUXE u. B. SWAMINATHAN (2000):

Salmonella nomenclature.

J. Clin. Microbiol. 38, 2465-2467

BUCKLEY, A. M., M. A. WEBBER, S. COOLES, L. P. RANDALL, R. M. LA RAGIONE, M. J. WOODWARD u. L. J. V. PIDDOCK (2006):

The AcrAB-TolC efflux system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium plays a role in pathogenesis.

Cell. Microbiol. 8, 847-856

CAC (2003):

Codex Alimentarius Commission

Recommended international code of practice general principles of food hygiene.

CAC/RCP 1-1969, Rev. 4- 2003

<http://www.mhlw.go.jp/english/topics/importedfoods/guideline/dl/04.pdf>

CAPITA, R. u. C. ALONSO-CALLEJA (2013):

Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry.

Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 53, 11-48

CARSON, R. T., E. LARSON, S. B. LEVY, B. M. MARSHALL u. A. E. AIELLO (2008):

Use of antibacterial consumer products containing quaternary ammonium compounds and drug resistance in the community.

J. Antimicrob. Chemother. 62, 1160-1162

CERF, O., B. CARPENTIER u. P. SANDERS (2010):

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

Int. J. Food Microbiol. 136, 247-254

CHAPMANN, J. S. (2003):

Biocide resistance mechanisms.

Int. Biodeterior. Biodegradation 51, 133-138

CHEN, Y., B. PI, H. ZHOU, Y. YU u. L. LI (2009):

Triclosan resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*.

J. Med. Microbiol. 58, 1086-1091

CHUANCHUEN, R., K. BEINLICH, T. T. HOANG, A. BECHER, R. R. KARKHOFF-SCHWEIZER u. H. P. SCHWEIZER (2001):

Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects *nfxB* mutants overexpressing MexCD-OprJ.

Antimicrob. Agents Chemother. 45, 428-432

CHUANCHUEN R, R. R. KARKHOFF-SCHWEIZER u. H. P. SCHWEIZER (2003):

High-level triclosan resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is solely due to efflux.

Am. J. Infect. Control 31,124-127

CHUANCHUEN, R., P. PATHANASOPHON, S. KHEMTONG, W. WANNAPRASAT u. P. PADUNGTOD (2008):

Susceptibilities to antimicrobials and disinfectants in *Salmonella* isolates obtained from poultry and swine in Thailand.

J. Vet. Med. Sci. 70, 595-601

CHUANCHUEN, R. u. H. P. SCHWEIZER (2012):

Global transcriptional responses to triclosan exposure in *Pseudomonas aeruginosa*.

Int. J. Antimicrob. Agents 40, 114-122

CIUSA, M. L., L. FURI, D. KNIGHT, F. DECOROSI, M. FONDI, C. RAGGI, J. R. COELHO, L. ARAGONES, L. MOCE, P. VISA, A. T. FREITAS, L. BALDASSARRI, R. FANI, C. VITI, G. OREFICI, J. L. MARTINEZ, I. MORRISSEY u. M. R. OGGIONI (2012):

A novel resistance mechanism to triclosan that suggests horizontal gene transfer and demonstrates a potential selective pressure for reduced biocide susceptibility in clinical strains of *Staphylococcus aureus*.

Int. J. Antimicrob. Agents 40, 210-220

CLAYTON, E. M., M. TODD, J. B. DOWD u. A. E. AIELLO (2011):

The impact of bisphenol A and triclosan on immune parameters in the U.S. population, NHANES 2003-2006.

Environ. Health Perspect. 119, 390-396

CLOETE, T. E. (2003):

Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds.

Int. Biodeterior. Biodegradation 51, 277-282

CONDELL, O., C. IVERSEN, S. COONEY, K. A. POWER, C. WALSH, C. BURGESS u. S. FANNING (2012a):

Efficacy of biocides used in the modern food industry to control *Salmonella enterica*, and links between biocide tolerance and resistance to clinically relevant antimicrobial compounds.

Appl. Environ. Microbiol. 78, 3087-3097

CONDELL, O., Á. SHERIDAN, K. A. POWER, R. BONILLA-SANTIAGO, K. SERGEANT, J. RENAUT, C. BURGESS, S. FANNING u. J. E. NALLY (2012b):

Comparative proteomic analysis of *Salmonella* tolerance to the biocide active agent triclosan.

J. Proteomics 75, 4505-4519

CONNER, D. E. u. C. B. WAKEFIELD (2006):

Incidence of *Salmonella* in processed broilers following transportation in contaminated coops.

Proceedings of the European Poultry Conference 12, 127-132

COPITCH, J. L., R. N. WHITEHEAD u. M. A. WEBBER (2010):

Prevalence of decreased susceptibility to triclosan in *Salmonella enterica* isolates from animals and humans and association with multiple drug resistance.

Int. J. Antimicrob. Agents 36, 247-251

COSTA, S. S., M. VIVEIROS, L. AMARAL u. I. COUTO (2013):

Multidrug Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*: an update.

Open Microbiol. J. 7, 59-71

COTTELL, A., S. P. DENYER, G. W. HANLON, D. OCHS u. J.-Y. MAILLARD (2009):

Triclosan-tolerant bacteria: changes in susceptibility to antibiotics.

J. Hosp. Infect. 72, 71-76

DANN, A. B. u. A. HONTELA (2011):

Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action.

J. Appl. Toxicol. 31, 285-311

DAVIDSON, P. M. u. M. A. HARRISON (2002):

Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls.

Food Technol. Chicago 56, 69-78

DE JONG, H. K., C. M. PARRY, T. VAN DER POLL u. W. J. WIERSINGA (2012):

Host-pathogen interaction in invasive Salmonellosis.

PLoS Pathog. 8, e1002933

DENYER, S. P. u. G. S. A. B. STEWART (1998):

Mechanisms of action of disinfectants.

Int. Biodeterior. Biodegradation 41, 261-268

DESIN, T. S., W. KÖSTER u. A. A. POTTER (2013):

Salmonella vaccines in poultry: past, present and future.

Expert Rev. Vaccines 12, 87-96

DEWAELE, I., R. DUCATELLE, L. HERMAN, M. HEYNDRIKX u. K. DE REU (2011):

Sensitivity to disinfection of bacterial indicator organisms for monitoring the *Salmonella* Enteritidis status of layer farms after cleaning and disinfection.

Poult. Sci. 90, 1185-1190

DI GENNARO, E. E., N. GUIDA, P. G. FRANCO, E. V. MORAS u. A. J. MUÑOZ (2012):

Infectious abortion caused by *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Abortusequi in Argentina.

J. Equine Vet. Sci. 32, Suppl 74S

DOMÍNGUEZ-BERNAL, G., A. TIERREZ, A. BARTOLOMÉ, S. MARTÍNEZ-PULGARÍN, F. J. SALGUERO, J. ANTONIO ORDEN u. R. de la FUENTE (2008):

Salmonella enterica serovar Choleraesuis derivatives harbouring deletions in *rpoS* and *phoP* regulatory genes are attenuated in pigs, and survive and multiply in porcine intestinal macrophages and fibroblasts, respectively.

Vet. Microbiol. 130, 298-311

DOYLE, M. P. u. M. C. ERICKSON (2006):

Reducing the carriage of foodborne pathogens in livestock and poultry.

Poult. Sci. 85, 960-973

DOYLE, M. P. u. M. C. ERICKSON (2012):

Opportunities for mitigating pathogen contamination during on-farm food production.

Int. J. Food Microbiol. 152, 54-74

DRLICA, K. (2003):

The mutant selection window and antimicrobial resistance.

J. Antimicrob. Chemother. 52, 11-17

EFSA u. ECDC (2013):

Scientific report of EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011.

Published on 9 April 2013, <http://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/doc/3129.pdf>

ELLI, M., S. ARIOLI, S. GUGLIEMETTI u. D. MORA (2013):

Biocide susceptibility in bifidobacteria of human origin.

Journal of Global Antimicrobial Resistance 1, 97-101

ESCALADA, M. G., J. L. HARWOOD, J. Y. MAILLARD u. D. OCHS (2005):

Triclosan inhibition of fatty acid synthesis and its effect on growth of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.

J. Antimicrob. Chemother. 55, 879-882

FÀBREGA, A. u. J. VILA (2013):

Salmonella enterica serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation.

Clin. Microbiol. Rev. 26, 308-341

FAN, F., K. YAN, N. G. WALLIS, S. REED, T. D. MOORE, S. F. RITTENHOUSE, W. E. DEWOLF JR, J. HUANG, D. MCDEVITT, W. H. MILLER, M. A. SEEFELD, K. A. NEWLANDER, D. R. JAKAS, M. S. HEAD u. D. J. PAYNE (2002):

Defining and combating the mechanisms of triclosan resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*.

Antimicrob. Agents Chemother. 46, 3343-3347

FATICA, M. K. u. K. R. SCHNEIDER (2011):

Salmonella and produce: survival in the plant environment and implications in food safety.

Virulence 2, 573-579

FEASEY, N. A., G. DOUGAN, R. A. KINGSLEY, R. S. HEYDERMAN u. M. A. GORDON (2012):

Invasive non-typhoidal *salmonella* disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa.

Lancet 379, 2489-2499

FENG, Y., R. N. JOHNSTON, G. R. LIU u. S. L. LIU (2013):

Genomic comparison between *Salmonella* Gallinarum and Pullorum: differential pseudogene formation under common host restriction.

PLoS One 8, e59427

FERRARI, R., M. MAGNANI, R. B. SOUZA, M. C. TOGNIM u. T. C. OLIVEIRA (2011):

Mutant prevention concentration (MPC) of ciprofloxacin against *Salmonella enterica* of epidemic and poultry origin.

Curr. Microbiol. 62, 628-632

FERNÁNDEZ-FUENTES, M. A., E. A. MORENTE, H. ABRIOUEL, R. P. PULIDO u. A. GÁLVEZ (2012):

Isolation and identification of bacteria from organic foods: Sensitivity to biocides and antibiotics.

Food Control 26, 73-78

FOLEY, S. L., R. NAYAK, I. B. HANNING, T. J. JOHNSON, J. HAN u. S. C. RICKE (2011):

Population dynamics of *Salmonella enterica* serotypes in commercial egg and poultry production.

Appl. Environ. Microbiol. 77, 4273-4279

FRIEDRICH, A., C. DORN, A. SCHROETER, I. SZABO, M. JABER, G. BERENDONK, M. BROM, J. LEDWOLORZ u. R. HELMUTH (2010):

Report on *Salmonella* isolates in livestock, food and feed, received at the German national reference laboratory for *Salmonella* during 2004-2008.

Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 123, 265-277

GILBERT, P. u. A. J. MCBAIN (2001):

Biocide usage in the domestic setting and concern about antibacterial and antibiotic resistance.

J. Infect. 43, 85-91

GILBERT, P. u. A. J. MCBAIN (2003):

Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance.

Clin. Microbiol. Rev. 16, 189-208

GRADEL, K. O., L. RANDALL, A. R. SAYERS u. R. H. DAVIES (2005):

Possible associations between *Salmonella* persistence in poultry houses and resistance to commonly used disinfectants and a putative role of *mar*.

Vet. Microbiol. 107, 127-138

GUARD-PETTER, J. (2001):

The chicken, the egg and *Salmonella* enteritidis.

Environ. Microbiol. 3, 421-430

GUIBOURDENCHE, M., P. ROGGENTIN, M. MIKOLEIT, P. I. FIELDS, J. BOCKEMÜHL, P. A. D. GRIMONT u. F. X. WEILL (2010):

Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme.

Res. Microbiol. 161, 26-29

HAEUSLER, G. M. u. N. CURTIS (2013):

Non-typhoidal *Salmonella* in children: microbiology, epidemiology and treatment.

Adv. Exp. Med. Biol. 764, 13-26

HARTUNG, M. u. A. KÄSBOHRER (Hrsg.) (2012):

Erreger von Zoonosen in Deutschland im Jahr 2010.

Bundesinstitut für Risikobewertung, Pressestelle, Berlin 2012

<http://www.bfr.bund.de/cm/350/erreger-von-zoonosen-in-deutschland-im-jahr-2010.pdf>

HEATH, R. J. u. C. O. ROCK (2000):

A triclosan-resistant bacterial enzyme.

Nature 406, 145-146

HEATH, R. J., J. LI, G. E. ROLAND u. C. O. ROCK (2000a):

Inhibition of the *Staphylococcus aureus* NADPH-dependent enoyl-acyl carrier protein reductase by triclosan and hexachlorophene.

J. Biol. Chem. 275, 4654–4659

HEATH, R. J., J. R. RUBIN, D. R. HOLLAND, E. ZHANG, M. E. SNOW u. C. O. ROCK (1999):

Mechanism of triclosan inhibition of bacterial fatty acid synthesis.

J. Biol. Chem. 274, 11110-11114

HEATH, R. J., N. SU, C. K. MURPHY u. C. O. ROCK (2000b):

The enoyl-[acyl-carrier-protein] reductases FabI and FabL from *Bacillus subtilis*.

J. Biol. Chem. 275, 40128-40133

HEATH, R. J., Y. T. YU, M. A. SHAPIRO, E. OLSON u. C. O. ROCK (1998):

Broad spectrum antimicrobial biocides target the FabI component of fatty acid synthesis.

J. Biol. Chem. 273, 30316-30320

HENRIQUES, A., R. SERENO u. A. ALMEIDA (2013):

Reducing *Salmonella* horizontal transmission during egg incubation by phage therapy.

Foodborne Pathog. Dis. 10, 718-722

HIRSCHBECK, M. W., J. KUPER, H. LU, N. LIU, C. NECKLES, S. SHAH, S. WAGNER, C. A. SOTRIFFER, P. J. TONGE u. C. KISKER (2012):

Structure of the *Yersinia pestis* FabV enoyl-ACP reductase and its interaction with two 2-pyridone inhibitors.

Structure 20, 89-100

HOLAH, J. T., J. H. TAYLOR, D. J. DAWSON u. K. E. HALL (2002):

Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*.

J. Appl. Microbiol. 92, Suppl 111S-120S

HORIYAMA, T., A. YAMAGUCHI u. K. NISHINO (2010):

ToIC dependency of multidrug efflux systems in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

J. Antimicrob. Chemother. 65, 1372-1376

HUGO, W. B. (1995):

A brief history of heat, chemical and radiation preservation and disinfection.

Int. Biodeterior. Biodegradation 36, 197-217

IFH (2000):

Microbial resistance and biocides. A review by the International Scientific Forum on Home Hygiene (IFH) September 2000.

<http://www.ifh-homehygiene.org/sites/default/files/publications/antresFINAL.pdf>

JACOBSEN, C. S. u. T. B. BECH (2012):

Soil survival of *Salmonella* and transfer to freshwater and fresh produce.

Food Res. Int. 45, 557-566

JONES, R. D., H. B. JAMPANI, J. L. NEWMAN u. A. S. LEE (2000):

Triclosan: a review of effectiveness and safety in health care settings.

Am. J. Infect. Control 28, 184-196

KAMPF, G. (2003):

Triclosan

in: G. KAMPF (Hrsg.):

Hände-Hygiene im Gesundheitswesen.

Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg

KAMPF, G. u. A. KRAMER (2004):

Epidemiologic background of hand hygiene and evaluation of the most important agents for scrubs and rubs.

Clin. Microbiol. Rev. 17, 863-893

KARATZAS, K. A. G., L. P. RANDALL, M. A. WEBBER, L. J. V. PIDDOCK, T. J. HUMPHREY, M. J. WOODWARD u. N. G. COLDHAM (2008):

Phenotypic and proteomic characterization of multiply antibiotic-resistant variants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium selected following exposure to disinfectants.

Appl. Environ. Microbiol. 74, 1508-1516

KARATZAS, K. A. G., M. A. WEBBER, F. JORGENSEN, M. J. WOODWARD, L. J. V. PIDDOCK u. T. J. HUMPHREY (2007):

Prolonged treatment of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with commercial disinfectants selects for multiple antibiotic resistance, increased efflux and reduced invasiveness.

J. Antimicrob. Chemother. 60, 947-955

KAWAI, M. u. J. YAMAGISHI (2009):

Mechanisms of action of acriflavine: electron microscopic study of cell wall changes induced in *Staphylococcus aureus* by acriflavine.

Microbiol. Immunol. 53, 481-486

KEHRENBURG, C., A. CLOECKAERT, G. KLEIN u. S. SCHWARZ (2009):

Decreased fluoroquinolone susceptibility in mutants of *Salmonella* serovars other than Typhimurium: detection of novel mutations involved in modulated expression of *ramA* and *soxS*.

J. Antimicrob. Chemother. 64, 1175-1180

KIM, K. H., B. H. HA, S. J. KIM, S. K. HONG, K. Y. HWANG u. E. E. KIM (2011):

Crystal structures of Enoyl-ACP reductases I (FabI) and III (FabL) from *B. subtilis*.

J. Mol. Biol. 406, 403-415

KIM, T. O., D. W. IM, H. Y. JUNG, S. J. KWON u. Y. S. HEO (2012):

Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of enoyl-acyl carrier protein reductase (FabK) from *Streptococcus mutans* strain UA159.

Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. 68, 292-294

KRAMER, A., O. ASSADIAN, J. P. GUGGENBICHLER, C.-D. HEIDECKE, M. JÜNGER, H. LIPPERT u. F. SCHAUER (2006):

Risk/ benefit evaluation of the use of triclosan in surgical suturing materials.

GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär 1, 1-11

KUMAR, R., M. KAUR u. M. KUMARI (2012):

Acridine: a versatile heterocyclic nucleus.

Acta Pol. Pharm. 69, 3-9

LANGSRUD, S., M. S. SIDHU, E. HEIR u. A. L. HOLCK (2003):

Bacterial disinfectant resistance - a challenge for the food industry.

Int. Biodeterior. Biodegradation 51, 283-290

LARSON, E., A. AIELLO, L. V. LEE, P. DELLA-LATTA, C. GOMEZ-DUARTE u. S. LIN (2003): Short- and long-term effects of handwashing with antimicrobial or plain soap in the community.

J. Community Health 28, 139-150

LEDDER, R. G., P. GILBERT, C. WILLIS u. A. J. MCBAIN (2006):

Effects of chronic triclosan exposure upon the antimicrobial susceptibility of 40 ex-situ environmental and human isolates.

J. Appl. Microbiol. 100, 1132-1140

LEE, J. H., A. K. PARK, Y. M. CHI, J. H. MOON u. K. S. LEE (2011):

Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI) from *Pseudomonas aeruginosa*.

Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. 67, 214-216

LERMA, L. L., N. BENOMAR, A. GÁLVEZ u. H. ABRIOUEL (2013):

Prevalence of bacteria resistant to antibiotics and/or biocides on meat processing plant surfaces throughout meat chain production.

Int. J. Food Microbiol. 161, 97-106

LEVY, S. B. (2001):

Antibacterial household products: cause for concern.

Emerg. Infect. Dis. 7, Suppl 512S -515S

LEVY, S. B. (2002):

Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance.

J. Appl. Microbiol. 92, Suppl 65S-71S

LEVY, C. W., A. ROUJEINIKOVA, S. SEDELNIKOVA, P. J. BAKER, A. R. STUITJE, A. R. SLABAS, D. W. RICE u. J. B. RAFFERTY (1999):

Molecular basis of triclosan activity.

Nature 398, 383-384

LI, X. Z. u. H. NIKAIDO (2009):

Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update.

Drugs 69, 1555-1623

LUBARSKY, H. V., S. U. GERBERSDORF, C. HUBAS, S. BEHRENS, F. RICCIARDI u. D. M. PATERSON (2012):

Impairment of the bacterial biofilm stability by triclosan.

PLoS One 7, e31183

MAHAMOUD, A., J. CHEVALIER, S. ALIBERT-FRANCO, W. V. KERN u. J. M. PAGÈS (2007):

Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy.

J. Antimicrob. Chemother. 59, 1223-1229

MAILLARD, J.-Y. (2002):

Bacterial target sites for biocide action.

J. Appl. Microbiol. 92, Suppl 16S-27S

MAJOWICZ, S. E., J. MUSTO, E. SCALLAN, F. J. ANGULO, M. KIRK, S. J. O'BRIEN, T. F. JONES, A. FAZIL u. R. M. HOEKSTRA (2010):

The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis.

Clin. Infect. Dis. 50, 882-889

MARIN, C., S. BALASCH, S. VEGA u. M LAINEZ (2011):

Sources of *Salmonella* contamination during broiler production in Eastern Spain.

Prev. Vet. Med. 98, 39-45

MARSHALL, B. M., E. ROBLETO, T. DUMONT u. S. B. LEVY (2012):

The frequency of antibiotic-resistant bacteria in homes differing in their use of surface antibacterial agents.

Curr. Microbiol. 65, 407-415

MARTINEZ, J. L. u. F. BAQUERO (2000):

Mutation Frequencies and Antibiotic Resistance.

Antimicrob. Agents Chemother. 44, 1771-1777

MAVRI, A. u. S. S. MOŽINA (2012):

Involvement of efflux mechanisms in biocide resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*.

J. Med. Microbiol. 61, 800-808

MAVRI, A. u. S. S. MOŽINA (2013):

Development of antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* adapted to biocides.

Int. J. Food Microbiol. 160, 304-312

MCBAIN, A. J., A. H. RICKARD u. P. GILBERT (2002):

Possible implications of biocide accumulation in the environment on the prevalence of bacterial antibiotic resistance.

J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 29, 326-330

MCDONNELL, G. u. A. D. RUSSELL (1999):

Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance.

Clin. Microbiol. Rev. 12, 147-179

McMURRY, L. M., M. OETHINGER u. S. B. LEVY (1998a):

Overexpression of *marA*, *soxS*, or *acrAB* produces resistance to triclosan in laboratory and clinical strains of *Escherichia coli*.

FEMS Microbiol. Lett. 166, 305-309

McMURRY, L. M., M. OETHINGER u. S. B. LEVY (1998b):

Triclosan targets lipid synthesis.

Nature 394, 531-532

MEADE M. J., R. L. WADDELL u. T. M. CALLAHAN (2001):

Soil bacteria *Pseudomonas putida* and *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *denitrificans* inactivate triclosan in liquid and solid substrates.

FEMS Microbiol. Lett. 204, 45-48

MEHBOOB, S., K. TRUONG, B. D. SANTARSIERO u. M. E. JOHNSON (2010):

Structure of the *Francisella tularensis* enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI) in complex with NAD(+) and triclosan.

Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. 66, 1436-1440

MEYER, B. (2006):

Does microbial resistance to biocides create a hazard to food hygiene?

Int. J. Food Microbiol. 112, 275–279

MEYER, B. u. B. COOKSON (2010):

Does microbial resistance or adaptation to biocides create a hazard in infection prevention and control?

J. Hosp. Infect. 76, 200-205

MIDDLETON, J. H. u. J. D. SALIERNO (2013):

Antibiotic resistance in triclosan tolerant fecal coliforms isolated from surface waters near wastewater treatment plant outflows (Morris County, NJ, USA).

Ecotoxicol. Environ. Saf. 88, 79-88

MIMA, T., S. JOSHI, M. GOMEZ-ESCALADA u. H. P. SCHWEIZER (2007):

Identification and characterization of TriABC-OpmH, a triclosan efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requiring two membrane fusion proteins.

J. Bacteriol. 189, 7600-7609

MIN, J., X. ZHANG, L. WANG, X. ZOU, Q. ZHANG u. J. HE (2011):

Mutational analysis of the interaction between a potential inhibitor luteolin and enoyl-ACP reductase (FabI) from *Salmonella enterica*.

J. Mol. Catal. B-Enzym. 68, 174-180

MONACK, D. M. (2012):

Salmonella persistence and transmission strategies.

Curr. Opin. Microbiol. 15, 100-107

MØRETRØ, T., E. HEIR, L. L. NESSE, L. K. VESTBY u. S. LANGSRUD (2012):

Control of *Salmonella* in food related environments by chemical disinfection.

Food Res. Int. 45, 532-544

MORRISSEY, I., M. R. OGGIONI, D. KNIGHT, T. CURIAO, T. COQUE, A. KALKANCI, J. L. MARTINEZ u. BIOHYPO CONSORTIUM (2014):

Evaluation of epidemiological cut-off values indicates that biocide resistant subpopulations are uncommon in natural isolates of clinically-relevant microorganisms.

PLoS One 9, e86669

NIELSEN, T. D., A. B. KUDAHL, S. OSTERGAARD u. L. R. NIELSEN (2013a):

Gross margin losses due to *Salmonella* Dublin infection in Danish dairy cattle herds estimated by simulation modelling.

Prev. Vet. Med. 111, 51-62

NIELSEN, L. N., M. H. LARSEN, S. SKOVGAARD, V. KASTBJERG, H. WESTH, L. GRAM u. H. INGMER (2013b):

Staphylococcus aureus but not *Listeria monocytogenes* adapt to triclosan and adaptation correlates with increased *fabI* expression and *agr* deficiency.

BMC Microbiol. 13, 177 [Epub ahead of print]

NIKAIDO, H. (1996):

Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria.

J. Bacteriol. 178, 5853-5859

NIKAIDO, E., I. SHIROSAKA, A. YAMAGUCHI u. K. NISHINO (2011):

Regulation of the AcrAB multidrug efflux pump in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in response to indole and paraquat.

Microbiology 157, 648-655

NISHINO, K., E. NIKAIDO u. A. YAMAGUCHI (2007):

Regulation of multidrug efflux systems involved in multidrug and metal resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

J. Bacteriol. 189, 9066-9075

OLLIVER, A., M. VALLÉ, E. CHASLUS-DANCLA u. A. CLOECKAERT (2004):

Role of an *acrR* mutation in multidrug resistance of *in vitro*-selected fluoroquinolone-resistant mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

FEMS Microbiol. Lett. 238, 267-272

ORTEGA MORENTE, E., M. A. FERNÁNDEZ-FUENTES, M. J. GRANDE BURGOS, H. ABRIQUEL, R. PÉREZ PULIDO u. A. GÁLVEZ (2013):

Biocide tolerance in bacteria.

Int. J. Food Microbiol. 162, 13-25

PAGÈS, J. M., M. MASI u. J. BARBE (2005):

Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria.

Trends Mol. Med. 11, 382-389

PETERSEN, A., F. M. AARESTRUP u. J. E. OLSEN (2009):

The *in vitro* fitness cost of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* varies with the growth conditions.

FEMS Microbiol. Lett. 299, 53-59

PIDDOCK, L. J. V. (2006a):

Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria.

Clin. Microbiol. Rev. 19, 382-402

PIDDOCK, L. J. V. (2006b):

Multidrug-resistance efflux pumps – not just for resistance.

Nat. Rev. Microbiol. 4, 629-636

POLAT, Z. A. u. G. KARAKUS (2013):

Cytotoxic effect of acriflavine against clinical isolates of *Acanthamoeba* spp.

Parasitol. Res. 112, 529-533

POOLE, K. (2004):

Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria.

Clin. Microbiol. Infect. 10, 12-26

POOLE, K. (2005):

Efflux-mediated antimicrobial resistance.

J. Antimicrob. Chemother. 56, 20-51

PUI, C. F., W. C. WONG, L. C. CHAI, R. TUNUNG, P. JEYALETCHUMI, M. S. NOOR HIDAYAH, A. UBONG, M. G. FARINAZLEEN, Y. K. CHEAH, u. R. SON (2011):

Salmonella: a foodborne pathogen.

Food Res. Int. 18, 465-473

PYCKE, B. F., A. CRABBÉ, W. VERSTRAETE u. N. LEYS (2010):

Characterization of triclosan-resistant mutants reveals multiple antimicrobial resistance mechanisms in *Rhodospirillum rubrum* S1H.

Appl. Environ. Microbiol. 76, 3116-3123

RANDALL, L. P., S. W. COOLES, N. G. COLDHAM, E. G. PENUELA, A. C. MOTT, M. J. WOODWARD, L. J. V. PIDDOCK u. M. A. WEBBER (2007):

Commonly used farm disinfectants can select for mutant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with decreased susceptibility to biocides and antibiotics without compromising virulence.

J. Antimicrob. Chemother. 60, 1273-1280

RANDALL, L. P., S. W. COOLES, L. J. V. PIDDOCK u. M. J. WOODWARD (2004a):

Effect of triclosan or a phenolic farm disinfectant on the selection of antibiotic-resistant *Salmonella enterica*.

J. Antimicrob. Chemother. 54, 621-627

RANDALL, L. P., S. W. COOLES, L. J. V. PIDDOCK u. M. J. WOODWARD (2004b):

Mutant prevention concentrations of ciprofloxacin and enrofloxacin for *Salmonella enterica*.

J. Antimicrob. Chemother. 54, 688-691

RANDALL, L. P., S. W. COOLES, A. R. SAYERS u. M. J. WOODWARD (2001):

Association between cyclohexane resistance in *Salmonella* of different serovars and increased resistance to multiple antibiotics, disinfectants and dyes.

J. Med. Microbiol. 50, 919-924

RANDALL, L. P., A. M. RIDLEY, S. W. COOLES, M. SHARMA, A. R. SAYERS, L. PUMBWE, D. G. NEWELL, L. J. V. PIDDOCK u. M. J. WOODWARD (2003):

Prevalence of multiple antibiotic resistance in 443 *Campylobacter* spp. isolated from humans and animals.

J. Antimicrob. Chemother. 52, 507-510

REUTER, G. (1998):

Disinfection and hygiene in the field of food of animal origin.

Int. Biodeterior. Biodegradation 41, 209-215

RKI (2013):

Robert Koch-Institut Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2012, Berlin 2013

http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2012.pdf?__blob=publicationFile

ROUJEINIKOVA, A., C. W. LEVY, S. ROWSELL, S. SEDELNIKOVA, P. J. BAKER, C. A. MINSHULL, A. MISTRY, J. G. COLLS, R. CAMBLE, A. R. STUITJE, A. R. SLABAS, J. B. RAFFERTY, R. A. PAUPTIT, R. VINER u. D. W. RICE (1999):

Crystallographic analysis of triclosan bound to enoyl reductase.

J. Mol. Biol. 294, 527-535

RÜDEL, H., W. BÖHMER, M. MÜLLER, A. FLIEDNER, M. RICKING, D. TEUBNER u. C. SCHRÖTER-KERMANI (2013):

Retrospective study of triclosan and methyl-triclosan residues in fish and suspended particulate matter: results from the German Environmental Specimen Bank.

Chemosphere 91, 1517-1524

RUSSELL, A. D. (2002a):

Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria.

J. Appl. Microbiol. 92, Suppl 121S-135S

RUSSELL, A. D. (2002b):

Mechanisms of antimicrobial action of antiseptics and disinfectants: an increasingly important area of investigation.

J. Antimicrob. Chemother. 49, 597-599

RUSSELL, A. D. (2003a):

Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations.

Lancet Infect. Dis. 3, 794-803

RUSSELL, A. D. (2003b):

Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides.

J. Antimicrob. Chemother. 52, 750-763

RUSSELL, A. D. (2004a):

Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon.

J. Hosp. Infect. 57, 97-104

RUSSELL, A. D. (2004b):

Whither triclosan?

J. Antimicrob. Chemother. 53, 693-695

RUTALA, W. A. u. D. J. WEBER (1999):

Infection control: the role of disinfection and sterilization.

J. Hosp. Infect. 43, Suppl 43S-55S

SAIER, M. H. u. I. T. PAULSEN (2001):

Phylogeny of multidrug transporters.

Semin. Cell Dev. Biol. 12, 205-213

SALEH, S., R. N. S. HADDADIN, S. BAILLIE u. P. J. COLLIER (2011):

Triclosan - an update.

Lett. Appl. Microbiol. 52, 87-95

SANCHEZ, P., E. MORENO u. J. L. MARTINEZ (2005):

The biocide triclosan selects *Stenotrophomonas maltophilia* mutants that overproduce the SmeDEF multidrug efflux pump.

Antimicrob. Agents Chemother. 49, 781-782

SÁNCHEZ-VARGAS, F. M., M. A. ABU-EL-HAJJA u. O. G. GÓMEZ-DUARTE (2011):

Salmonella infections: an update on epidemiology, management, and prevention.

Travel Med. Infect. Dis. 9, 263-277

ScCs (2010):

Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) Opinion on triclosan (antimicrobial resistance), 20 June 2010.

http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_023.pdf

SCENIHR (2009):

Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR) Assessment of the antibiotic resistance effects of biocides, 19 January 2009.

http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihr/docs/scenihr_o_021.pdf

SCHULTZ, M. (2008):

Theobald Smith.

Emerg. Infect. Dis. 14, 1940-1942

SCHWEIZER, H. P. (2001):

Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics.

FEMS Microbiol. Lett. 202, 1-7

SEAMAN, P. F., D OCHS u. M. J. DAY (2007):

Small-colony variants: a novel mechanism for triclosan resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

J. Antimicrob. Chemother. 59, 43-50

SELBITZ, H.-J. (2011):

Gattung Salmonella

in: H.-J. SELBITZ, U. TRUYEN u. P. WALENTIN-WEIGAND (Hrsg.):

Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.

9. Aufl. Verlag Enke, Stuttgart, S. 199-214

SHERIDAN, À., M. LENAHAN, O. CONDELL, R. BONILLA-SANTIAGO, K. SERGEANT, J. RENAUT, G. DUFFY, S. FANNING, J. E. NALLY u. C. M. BURGESS (2013):

Proteomic and phenotypic analysis of triclosan tolerant verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157:H19.

J. Proteomics 80, 78-90

SHERIDAN, À., M. LENAHAN, G. DUFFY, S. FANNING u. C. BURGESS (2012):

The potential for biocide tolerance in *Escherichia coli* and its impact on the response to food processing stresses.

Food Control 26, 98-106

SINGH, N. J., D. SHIN, H. M. LEE, H. T. KIM, H. J. CHANG, J. M. CHO, K. S. KIM u. S. Ro (2011):

Structural basis of triclosan resistance.

J. Struct. Biol. 174, 173-179

SKOVGAARD, S., L. N. NIELSEN, M. H. LARSEN, R. L. SKOV, H. INGMER, u. H. WESTH (2013):

Staphylococcus epidermidis isolated in 1965 are more susceptible to triclosan than current isolates.

PLoS One 8, e62197

SLATER-RADOSTI, C., G. VAN ALLER, R. GREENWOOD, R. NICHOLAS, P. M. KELLER, W. E. DEWOLF JR, F. FAN, D. J. PAYNE u. D. D. JAWORSKI (2001):

Biochemical and genetic characterization of the action of triclosan on *Staphylococcus aureus*.

J. Antimicrob. Chemother. 48, 1-6

SOMET, C., E. FOURREAU, P. LEGRANDIS u. P. MARIS (2012):

Resistance to phenicol compounds following adaptation to quaternary ammonium compounds in *Escherichia coli*.

Vet. Microbiol. 158, 147-152

STEVENS, M. P., T. J. HUMPHREY u. D. J. MASKELL (2009):

Molecular insights into farm animal and zoonotic *Salmonella* infections.

Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 364, 2709-2723

STEWART, M. J., S. PARIKH, G. XIAO, P. J. TONGE u. C. KISKER (1999):

Structural basis and mechanism of enoyl reductase inhibition by triclosan.

J. Mol. Biol. 290, 859-865

SUERBAUM, S., J. BOCKEMÜHL u. H. KARCH (2012):

Salmonellen

in: S. SUERBAUM, H. HAHN, G. D. BURCHARD, S. H. E. KAUFMANN u. T. F. SCHULZ (Hrsg.):

Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie.

7. Aufl. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, S. 241-249

SUEZ, J., S. PORWOLLIK, A. DAGAN, A. MARZEL, Y. I. SCHORR, P. T. DESAI, V. AGMON, M. MCCLELLAND, G. RAHAV u. O. GAL-MOR (2013):

Virulence gene profiling and pathogenicity characterization of non-typhoidal *Salmonella* accounted for invasive disease in humans.

PLoS One 8, e58449

TABAK, M., K. SCHER, M. L. CHIKINDAS u. S. YARON (2009):

The synergistic activity of triclosan and ciprofloxacin on biofilms of *Salmonella* Typhimurium.
FEMS Microbiol. Lett. 301, 69-76

TABAK, M., K. SCHER, E. HARTOG, U. ROMLING, K. R. MATTHEWS, M. L. CHIKINDAS u. S. YARON (2007):

Effect of triclosan on *Salmonella* typhimurium at different growth stages and in biofilms.
FEMS Microbiol. Lett. 267, 200-206

TAMURA, I., K. I. KAGOTA, Y. YASUDA, S. YONEDA, J. MORITA, N. NAKADA, Y. KAMEDA, K. KIMURA, N. TATARAZAKO u. H. YAMAMOTO (2013):

Ecotoxicity and screening level ecotoxicological risk assessment of five antimicrobial agents: triclosan, triclocarban, resorcinol, phenoxyethanol and p-thymol.
J. Appl. Toxicol. 33, 1222-1229

TEGOS, G. P., M. HAYNES, J. J. STROUSE, M. M. KHAN, C. G. BOLOGA, T. I. OPREA u. L. A. SKLAR (2011):

Microbial efflux pump inhibition: tactics and strategies.
Curr. Pharm. Des. 17, 1291-1302

THOMAS, L., J. Y. MAILLARD, R. J. LAMBERT u. A. D. RUSSELL (2000):

Development of resistance to chlorhexidine diacetate in *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of a "residual" concentration.
J. Hosp. Infect. 46, 297-303

TKACHENKO, O., J. SHEPARD, V. M. ARIS, A. JOY, A BELLO, I. LONDONO, J. MARKU, P. SOTEROPOULOS u. M. A. PETEROY-KELLY (2007):

A triclosan-ciprofloxacin cross-resistant mutant strain of *Staphylococcus aureus* displays an alteration in the expression of several cell membrane structural and functional genes.
Res. Microbiol. 158, 651-658

TUMAH, H. N. (2009):

Bacterial biocide resistance.
J. Chemother. 21, 5-15

UNTERRICHTUNG DURCH DIE BUNDESREGIERUNG (2011):

Vierter Bericht über die Substitution risikoreicher durch risikoärmere Biozid-Wirkstoffe und Biozid-Produkte, über den aktuellen Sachstand zur Umsetzung der Biozid-Richtlinie und des Überprüfungsprogrammes der Altwirkstoffe sowie der aktuellen Entwicklungen auf EU-Ebene.

Drucksache 17/6903 vom 02.09.2011, <http://dipbt.bundestag.de/dip21/btd/17/069/1706903.pdf>

USUI, M., H. NAGAI, M. HIKI, Y. TAMURA u. T ASAI (2013):

Effect of antimicrobial exposure on AcrAB expression in *Salmonella enterica* Subspecies *enterica* Serovar Choleraesuis.

Front. Microbiol. 4, eCollection 2013

VAN BAMBEKE, F., Y. GLUPCZYNSKI, P. PLÉSIAT, J. C. PECHÈRE u. P. M. TULKENS (2003):

Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy.

J. Antimicrob. Chemother. 51, 1055-1065

VAN IMMERSEEL, F., L. DE ZUTTER, K. HOUF, F. PASMANS, F. HAESEBROUCK u. R. DUCATELLE (2009):

Strategies to control *Salmonella* in the broiler production chain.

World Poultry Sci. J. 65, 367-391

VO (EU) 528/2012:

Verordnung (EU) Nr. 528/2012 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. Mai 2012 über die Bereitstellung auf dem Markt und die Verwendung von Biozidprodukten.

Amtsblatt der Europäischen Union L 167, 27.06.2012.

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:167:0001:0123:DE:PDF>

VON DER OHE, P. C., M. SCHMITT-JANSEN, J. SLOBODNIK u. W. BRACK (2012):

Triclosan-the forgotten priority substance?

Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 19, 585-591

WEBBER, M. A., A. M. BAILEY, J. M. BLAIR, E. MORGAN, M. P. STEVENS, J. C. HINTON, A. IVENS, J. WAIN u. L. J. V. PIDDOCK (2009):

The global consequence of disruption of the AcrAB-TolC efflux pump in *Salmonella enterica* includes reduced expression of SPI-1 and other attributes required to infect the host.

J. Bacteriol. 191, 4276-4285

WEBBER, M. A., N. G. COLDHAM, M. J. WOODWARD u. L. J. V. PIDDOCK (2008a):

Proteomic analysis of triclosan resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

J. Antimicrob. Chemother. 62, 92-97

WEBBER, M. A., L. P. RANDALL, S. COOLES, M. J. WOODWARD u. L. J. V. PIDDOCK (2008b):

Triclosan resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

J. Antimicrob. Chemother. 62, 83-91

WHITE, D. G., S. ZHAO, S. SIMJEE, D. D. WAGNER u. P. F. McDERMOTT (2002):

Antimicrobial resistance of foodborne pathogens.

Microbes Infect. 4, 405-412

WHITEHEAD, R. N., T. W. OVERTON, C. L. KEMP u. M. A. WEBBER (2011):

Exposure of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to high level biocide challenge can select multidrug resistant mutants in a single step.

PLoS One 6, e22833

WIND, T., U. WERNER, M. JACOB u. A. HAUK (2004):

Environmental concentrations of boron, LAS, EDTA, NTA and Triclosan simulated with GREAT-ER in the river Itter.

Chemosphere 54, 1135-1144

WINFIELD, M. D. u. E. A. GROISMAN (2003):

Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*.

Appl. Environ. Microbiol. 69, 3687-3694

WIRZ-DITTUS, S., L. BELLOY, D. HÜSSY, A. S. WALDVOGEL u. M. G. DOHERR (2010):

Seroprevalence survey for *Salmonella* Abortusovis infection in Swiss sheep flocks.

Prev. Vet. Med. 97, 126-130

YAZDANKHAH, S. P., A. A. SCHEIE, E. A. HØIBY, B. T. LUNESTAD, E. HEIR, T. Ø. FOTLAND, K. NATERSTAD u. H. KRUSE (2006):

Triclosan and antimicrobial resistance in bacteria: an overview.

Microb. Drug Resist. 12, 83-90

YU, B. J., J. A. KIM, H. M. JU, S. K. CHOI, S. J. HWANG, S. PARK, E. KIM u. J. G. PAN (2012):

Genome-wide enrichment screening reveals multiple targets and resistance genes for triclosan in *Escherichia coli*.

J. Microbiol. 50, 785-791

YU, B. J., J. A. KIM u. J. G. PAN (2010):

Signature gene expression profile of triclosan-resistant *Escherichia coli*.

J. Antimicrob. Chemother. 65, 1171-1177

ZHU, L., J. LIN, J. MA, J. E. CRONAN u. H. WANG (2010):

Triclosan resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 is due to FabV, a triclosan-resistant enoyl-acyl carrier protein reductase.

Antimicrob. Agents Chemother. 54, 689-698

8 Danksagung

Mein allererster und ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Corinna Kehrenberg, PhD, für die Überlassung des interessanten Themas und die Einarbeitung in die spannende Thematik der Biozidtoleranzen. Besonders für ihre jederzeit engagierte Betreuung und ihren unermüdlichen Einsatz, auch bezüglich der Finanzierung meiner Arbeit, möchte ich mich sehr herzlich bedanken. Die wissenschaftlichen Diskussionen sowie die zahlreich gewährten Möglichkeiten der Weiterbildung haben dazu beigetragen, dass meine Promotionszeit eine sehr lehrreiche und schöne Zeit war.

Herrn Prof. Dr. Günter Klein danke ich für die freundliche Aufnahme im Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, durch den mir die Möglichkeit zum interdisziplinären Arbeiten an der Tierärztlichen Hochschule Hannover gegeben wurde. Darüber hinaus bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Finanzierung meiner Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Peter Heisig und Herrn Prof. Dr. Pablo Steinberg möchte ich mich für die wissenschaftlichen Diskussionen im Rahmen der Betreuung meines PhD-Studiums sowie für die Begutachtung meiner Dissertation bedanken.

Den Projekt- bzw. Kooperationspartnern Herrn Prof. Dr. Axel Cloeckert, Herrn Prof. Dr. Kunihiko Nishino, Herrn Prof. Dr. Stefan Schwarz, Herrn Dr. Anno de Jong und Frau Dr. Heike Kaspar danke ich für die zur Verfügung gestellten *Salmonella*-Stämme und die hilfreichen Diskussionen.

Beim Bundesinstitut für Risikobewertung bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung des Projektes.

Beim gesamten Team der Molekularbiologie möchte ich mich für die familiäre und herzliche Atmosphäre während meiner Arbeit bedanken. Durch die humorvolle und offene Art ist mir als Lebensmittelchemikerin der Einstieg in die neue Arbeit an der Tierärztlichen Hochschule sehr leicht gefallen. Im Besonderen möchte ich mich bei Vera Nöding und Inna Pahl für die manchmal auch sehr spontane technische Unterstützung bedanken.

Bei meinen Mitdoktoranden möchte ich mich für die schönen Gespräche und die nette Zeit im Institut bedanken. Ein besonderer Dank gilt dabei meiner Bürokollegin Diana Seinige. Liebe Diana, vielen Dank für die angenehmen Gespräche, deine stetige Erinnerung an eine regelmäßige Nahrungsaufnahme und die schöne Zeit auf den gemeinsamen Tagungen.

Bei meinen Eltern möchte ich mich für ihr immerwährendes Verständnis und für die finanzielle Unterstützung während meines Studiums in Hamburg, das die Voraussetzung für diese Promotion bildete, sehr herzlich bedanken.

Zum Schluss möchte ich dir lieber Marcel dafür danken, dass du immer so viel Verständnis und Geduld während meiner Promotionszeit aufgebracht hast. Vor allem danke ich dir für die vielen fachlichen und nichtfachlichen Gespräche und dafür, dass du mich immer unterstützt und aufgebaut hast, wenn mal das eine oder andere Experiment nicht gleich gelingen wollte. Ich danke dir, dass du an meiner Seite bist!