

Tierärztliche Hochschule Hannover

**Nanosilberbeschichtete Lebensmittelverpackungsfolie
zur Reduktion von Keimen auf Schweinefleisch und
Testung der Empfindlichkeit
von MRSA- und MSSA-Isolaten gegenüber Silber und
sieben weiteren Bioziden**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Grades einer Doktorin
- Doctor medicinae veterinariae -
(Dr. med. vet.)

vorgelegt von
Isa Adriana Kernberger-Fischer
Celle

Hannover 2018

Wissenschaftliche Betreuung: 1. PD Dr. Corinna Kehrenberg, PhD
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover Institut für
Lebensmittelqualität und -sicherheit

2. PD Dr. Carsten Krischek
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover Institut für
Lebensmittelqualität und -sicherheit

1. Gutachter: Es wird ein gemeinsames Gutachten erstellt von:
PD Dr. Corinna Kehrenberg
Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit
PD Dr. Carsten Krischek
Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Martina Hoedemaker, PhD
Klinik für Rinder

Tag der mündlichen Prüfung: 30.10.2018

Das Projekt wurde finanziell durch die Ahrberg-Stiftung unterstützt.

Meinem verstorbenen Papa

„Wer hohe Türme bauen will, muss lange am Fundament verweilen.“

Anton Bruckner (1824 – 1896)

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Einleitung | 1 |
| 2. Literaturübersicht | 3 |
| 2.1 Rechtliche Regelungen | 3 |
| 2.1.1 Lebensmittelbedingte Erkrankungen, Lebensmittelintoxikationen, und - kontaminationen | 4 |
| 2.1.1.1 Eigenschaften und Pathogenität von <i>Staphylococcus aureus</i> | 5 |
| 2.1.1.2 Resistenzentwicklung bei <i>Staphylococcus aureus</i> | 6 |
| 2.1.1.3 MLST- und <i>spa</i> -Typisierung und Nomenklatur von <i>S. aureus</i> -Isolaten | 7 |
| 2.1.1.4 Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) in der Primärproduktion und Risiken für den Menschen | 8 |
| 2.1.1.5 Häufige klonale Linien von MRSA beim Menschen | 10 |
| 2.2 Verderb und Lebensmittelkonservierung | 11 |
| 2.2.1 Physikalische Methoden zur Haltbarmachung | 12 |
| 2.2.2 Chemische Methoden zur Haltbarmachung | 14 |
| 2.2.3 Biologische Methoden zur Haltbarmachung | 14 |
| 2.2.4 Hürdenprinzip | 15 |
| 2.3 Einsatz von Bioziden und Schwermetallen im Lebensmittelbereich | 15 |
| 2.3.1 Gesetzgebung | 16 |
| 2.3.2 Einsatz und Gruppen von Bioziden | 18 |
| 2.3.2.1 Quartäre Ammoniumverbindungen | 18 |
| 2.3.2.2 Biguanidine | 19 |
| 2.3.2.3 Acridine | 19 |
| 2.3.2.4 Schwermetalle | 19 |

| | |
|---|----|
| 2.3.3 Mögliche Risiken durch einen Einsatz von Bioziden und Schwermetallen..... | 20 |
| 2.4 Verpackung von Lebensmitteln..... | 21 |
| 2.4.1 Rechtliche Regelungen für Verpackungen von Lebensmitteln/Kontaktmaterialien | 22 |
| 2.4.2 Verpackungsarten | 23 |
| 2.4.2.1 Schutzgasverpackungen (Modified Atmosphere Packaging MAP)..... | 23 |
| 2.4.2.2 Vakuumverpackungen (VP)..... | 24 |
| 2.4.2.3 Aktive Verpackungen (AP)..... | 24 |
| 2.5 Nanosilber | 25 |
| 2.6 Zielsetzung der Arbeit..... | 28 |
| 3. Publikationen..... | 29 |
| 3.1 Publikation 1..... | 31 |
| 3.2 Publikation 2..... | 33 |
| 4. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion | 35 |
| 4.1 Bestimmung der Empfindlichkeit von <i>S. aureus</i> -Isolaten gegenüber Bioziden..... | 36 |
| 4.2 Einordnung der Empfindlichkeitsdaten von MRSA- und MSSA-Isolaten | 37 |
| 4.2.1 Empfindlichkeit gegenüber Silber | 38 |
| 4.2.1.1 Empfindlichkeiten anderer Bakterienspezies gegenüber Silber..... | 40 |
| 4.2.2 Empfindlichkeit gegenüber den anderen Bioziden..... | 42 |
| 4.3 Vergleichende Analyse von Empfindlichkeiten zwischen Isolaten von Mensch und Tier | 60 |
| 4.3.1 Vergleich der Empfindlichkeiten zwischen Isolaten von Mensch und Tier gegenüber Silbernitrat | 60 |
| 4.3.2 Vergleich der Empfindlichkeiten zwischen Isolaten von Tier und Mensch gegenüber anderen Bioziden | 61 |
| 4.4 Vergleich der MHK-Werte von <i>S. aureus</i> -Isolaten unterschiedlicher klonaler Linien.. | 63 |

| | |
|--|-----|
| 4.4.1 Vergleich der MHK-Werte für Silbernitrat von Isolaten unterschiedlicher klonaler Linien | 64 |
| 4.4.2 Vergleich der MHK-Werte von Isolaten unterschiedlicher klonaler Linien gegenüber weiteren getesteten Bioziden | 64 |
| 4.5 Biozidtoleranz und Biozidtoleranz vermittelnde Gene bei Bakterien | 66 |
| 4.6 Vorkommen und Lokalisation von Biozidtoleranz vermittelnden Genen bei <i>S. aureus</i> -Isolaten der vorliegenden Studie | 69 |
| 4.6.1 Zusammenhang zwischen der Biozid-Empfindlichkeit und dem Vorhandensein spezifischer Toleranz vermittelnder Gene | 71 |
| 4.6 Biozidtoleranz und Antibiotikaresistenz | 72 |
| 4.7 Silbertoleranz bei <i>S. aureus</i> -Isolaten und anderen bakteriellen Erregern | 74 |
| 4.8 Einflüsse des Nanosilbers auf verschiedene Fleischbeschaffenheitsparameter | 76 |
| 4.8.1 Einfluss der Nanosilberfolie auf Fleischbeschaffenheits- und Myoglobin-Redoxform-Ergebnisse | 78 |
| 4.8.2 Einfluss der Nanosilberfolie auf die chemischen Parameter | 79 |
| 4.8.3 Einfluss der Nanosilberfolie auf mikrobiologische Parameter | 81 |
| 4.8.4 Beeinflussung der antimikrobiellen Eigenschaften von nanosilberbeschichteten Folien | 83 |
| 4.9 Antimikrobielle Effekte der Nanosilberfolie auf inokuliertes Schweinefleisch | 84 |
| 5. Zusammenfassung | 85 |
| 6. Summary | 88 |
| 7. Literaturverzeichnis | 91 |
| 7.1 Verordnungen, Richtlinien, Vorschriften | 153 |
| 8. Danksagungen | 157 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|---|
| % | Prozent |
| °C | Grad Celsius |
| µg | Mikrogramm |
| µg/dm ² | Mikrogramm pro Quadratdezimeter |
| µg/ml | Mikrogramm pro Milliliter |
| µl | Mikroliter |
| a*-Wert | Rot-Wert |
| ABNC | active but nonculturable |
| ACR | Acriflavin |
| ADH | Alkyldiaminoethylglycinhydrochlorid |
| AEM | Applied and Environmental Microbiology |
| AG | Aktiengesellschaft |
| Ag | Silber |
| Ag ⁺ | Silber-Ion |
| AgCl | Silberchlorid |
| AgNO ₃ | Silbernitrat |
| Ag-NP(s) | Nanosilberpartikel, Silbernanopartikel |
| Ag-Zeo | Silber-Zeolith |
| ANOVA | analysis of variance, Varianzanalyse |
| ANSORP | Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens |
| arc | Carbamat-Kinase |
| aro | Shikimat-Dehydrogenase |
| Art. | Artikel |
| ASM | American Society for Microbiology |
| ATCC | American Typ Culture Collection |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| Au | Gold |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------------|--|
| AVV | Allgemeine Verwaltungsvorschrift |
| a_w | Wasseraktivität |
| b* | Blau-Wert |
| BedGstV | Bedarfsgegenstände Verordnung |
| BEN | Benzethoniumchlorid |
| BHI | Brain Heart Infusion |
| BKC | Benzalkoniumchlorid |
| bp | Basenpaare |
| BPV | Biozidprodukt Verordnung |
| bspw. | beispielsweise |
| BURP | Based Upon Repeat Pattern |
| BVL | Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit |
| bzw. | beziehungsweise |
| C-Atom | Kohlenstoff-Atom |
| Ca | Calcium |
| CC | klonaler Komplex |
| CFU | colony forming units |
| CHX | Chlorhexidin |
| CHX-DG | Chlorhexidin-Digluconat |
| CLSI | Clinical and Laboratory Standards Institute |
| cm^3/m^2 | Kubikzentimeter pro Quadratmeter |
| CO KG | Compagnie Kommanditgesellschaft |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CoNS | Koagulase-negative Staphylokokken |
| COP | Kupfersulfat |
| CPI | Consumer Products Inventory |
| Cu ²⁺ | Kupfer-Ionen |
| d | day |
| DeoxyMb | Deoxymyoglobin |
| DLV | double locus variants |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|--|
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| e.g. | exempli gratia (zum Beispiel) |
| EARS-Net | European Antimicrobial Resistance Surveillance Network |
| EB | Ethidiumbromid |
| EC | Elektrische Leitfähigkeit |
| ECHA | European Chemicals Agency |
| ECOFF | Epidemiologischer Cut-off-Wert |
| EDX | energy-dispersive X-ray spectroscopy |
| EFSA | European Food Safety Authority |
| eG | eingetragene Genossenschaft; eingetragene Gesellschaft |
| EG | Europäische Gemeinschaft |
| EHSGs | Extended Host Spectrum Genotypes |
| et al. | et alii, et aliae oder et alia = und andere |
| EU | Europäische Union |
| EUCAST | European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing |
| EVOH | Ethylen-Vinylalkohol-Copolymer |
| -f | forward, vorwärts |
| FAO | Food and Agriculture Organization of the United Nations |
| g | Gramm |
| glp | Glycerol-Kinase |
| GmbH | Gesellschaft mit beschränkter Haftung |
| gmk | Guanylat-Kinase |
| h | hours |
| HACCP | Hazard Analysis and Critical Control Points |
| HDPE | High Density Polyethylen |
| Hg | Quecksilber |
| HHP | High Hydrostatic Pressure |
| kb | Kilobasenpaare |
| kGy | Kilogray |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|---|
| L* | Helligkeitswert |
| LA-MRSA | Livstock-assoziierte MRSA |
| LDPE | Low Density Polyethylen |
| LMFG | Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch |
| LMIV | Lebensmittelinformations Verordnung |
| Log ₁₀ | dekadischer Logarithmus |
| LSM | least square means |
| Ltd. | Limited |
| m. | musculus |
| MAP | Modified Atmosphere Packaging |
| MATE | Multidrug and Toxic Compound Extrusion |
| Mb | Myoglobin |
| MBK | Minimale bakterizide Konzentration |
| MDR | Multidrug-resistent |
| MetMb | Metmyoglobin |
| MFS | Major Facilitator Superfamily |
| mg | Milligramm |
| mg/kg | Milligramm pro Kilogramm |
| MHK | Minimale Hemmkonzentration |
| MIC(s) | Minimal inhibitory concentration |
| min | minutes |
| MLST | Multi-Locus-Sequenz-Typisierung |
| mm | Millimeter |
| mM | Millimolar |
| MRSA | Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i> |
| MRSP | Methicillin-resistente <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> |
| mS/cm | Millisiemens pro Zentimeter |
| MSSA | Methicillin-sensible <i>Staphylococcus aureus</i> |
| MSSP | Methicillin-sensible <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> |
| n. b. | nicht bestimmbar, nicht bestimmt |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|---|
| N ₂ | Stickstoff |
| NaHPO ₄ | Natriumphosphat |
| N-Atom | Stickstoff-Atom |
| ND | not detected |
| nm | Nanometer |
| NP(s) | Nanopartikel |
| NS | not significant |
| NT | not tested |
| O ₂ | Sauerstoff |
| OMP C/F | outer membrane protein, Außenmembranprotein C/F |
| OxyMb | Oxymyoglobin |
| P = | Signifikanzwert |
| P | vacuum, MAP (statistische Analyse) |
| P | Phosphat |
| p.m. | post mortem |
| PBP | Penicillinbindeprotein |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PE | Polyethylen |
| PFGE | Pulsfeldgelelektrophorese |
| pH | Aziditätswert |
| PP | Polypropylen |
| pta | Phosphat-Acetyl-Transferase |
| PVC | Polyvinylalkohol |
| QAVs | Quartäre Ammoniumverbindung(en) |
| -r | reverse, rückwärts |
| RH | relative humidity, relative Feuchtigkeit |
| RKI | Robert Koch-Institut |
| ROS | reaktive Sauerstoffspezies |
| S | non-coated, coated (statistische Analyse) |
| <i>S.</i> | <i>Staphylococcus</i> |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| <i>S. aureus</i> | <i>Staphylokokkus aureus</i> |
| SAS | statistical analysis system |
| SCCmec | staphylococcal cassette chromosome mec-Elemente |
| SCENIHR | Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks |
| SD | standard deviation |
| SEM | standard error of means |
| SIL | Silbernitrat |
| SLV | single locus variants |
| SMR | small multidrug resistance |
| spa | staphylococcal protein A |
| spp. | species pluralis |
| ST | Sequenztyp |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TBARS | thiobarbitursäurereaktive Substanzen |
| Ti | Titan |
| tpi | Triosephosphat-Isomerase |
| TVC | total viable counts |
| u. | und |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| USA | Vereinigte Staaten von Amerika |
| V | vacuum |
| VISA | Vancomycin-intermediäre <i>S. aureus</i> |
| VO | Verordnung |
| VRBGA | Violet Red Bile Glucose Agar |
| yqi | Acetyle-Coenzyme-Acetyltransferase |
| z. B. | zum Beispiel |
| ZKC | Zinkchlorid |
| Zn ²⁺ | Zink-Ionen |

Tabellenverzeichnis

Tabellen in der Literaturübersicht

Tabelle 1: Definitionen gemäß VO (EU) 528/2012

Tabelle 2: Hauptgruppen der Biozidprodukte gemäß VO (EU) 528/2012

Tabelle 3: Einsatzbereiche von Nanosilber und Beispiele für Konsumgüter

Tabelle 4: Übersicht über den Einsatz von Nanosilber in der Lebensmittelkette

Tabellen in der Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifenden Diskussion

Tabelle 5: Empfindlichkeitsstudien von *S. aureus*-Isolaten gegenüber Silber

Tabelle 6: Empfindlichkeitsstudien von *S. aureus*-Isolaten für die Biozide Acriflavin und Alkyldiaminoethylglycinhydrochlorid

Tabelle 7: Empfindlichkeitsstudien von *S. aureus*-Isolaten für das Biozid Benzethoniumchlorid

Tabelle 8: Empfindlichkeitsstudien von *S. aureus*-Isolaten für das Biozid Chlorhexidin

Tabelle 9: Empfindlichkeitsstudien von *S. aureus*-Isolaten für das Schwermetall Kupfer

Tabelle 10: Empfindlichkeitsstudien von *S. aureus* Isolaten für Benzalkoniumchlorid und Zinkchlorid

Teilergebnisse dieser Dissertation wurden an folgenden Stellen veröffentlicht:

Vorträge:

Kernberger, I. A., D. Deus, C. Krischek, Y. Pfeifer, G. Klein, F. Reich, B. Strommenger u. C. Kehrenberg (2013):

Nutzen und Risiken von Silber und Silberverbindungen in Folien mit Lebensmittelkontakt hinsichtlich der Hygiene und Beschaffenheit von verpacktem Schweine-, Rind-, Puten- und Hähnchenfleisch

Vortragsveranstaltung im Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit, Hannover

Kernberger, I. A. u. C. Kehrenberg (2014):

Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*.

Doktorandenseminar am Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit, Hannover

Poster:

Kernberger, I. A., C. Krischek, B. Strommenger, G. Klein, C. Kehrenberg (2014):

Vergleichende Empfindlichkeitstestung Methicillin-resistenter und sensibler *Staphylococcus aureus*-Isolate unterschiedlicher klonaler Linien gegenüber acht biozid wirkenden Substanzen. 55. Arbeitstagung der Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“ der DVG e. V., Garmisch-Patenkirchen vom 23.09.2014 bis 26.09.2014, Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle (Sonderausgabe), S. 164.

Kernberger-Fischer I. A., C. Krischek, B. Strommenger, G. Klein u. C. Kehrenberg (2015):

Susceptibility of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus*-isolates of various clonal lineages to eight biocides.

“One health - New Challenges”, First International Symposium of Veterinary Medicine (ISVM2015); Novi Sad, Serbia. Book of Abstracts, ISBN 978-86-82871-37-8, S.144

1. Einleitung

Fleisch, welches vom Metzger fachgerecht zerlegt, verarbeitet und im eigenen Geschäft verkauft wird, ist in den Industrieländern selten geworden. Hingegen boomt der Umsatz mit fertig portioniertem Fleisch sogenannten „ready to eat-“, „ready to cook-“ und „ready to use-“ Produkten. Diese werden dabei auch unter Schutzgasatmosphäre oder Vakuum verpackt und in transparenten Tiefziehschalen in den Kühlregalen der Supermärkte angeboten (FLEISCHATLAS 2015). Diese Art der Verpackung wird von Verbrauchern in besonderem Maße akzeptiert, da sowohl eine selbstständige Auswahl getroffen werden kann, als auch das Fleisch durch die Modifikation der Farbe zum Teil ansprechender wirkt (ZAKRYS et al. 2009). Daneben bestehen auch klare Vorteile für den Lebensmittelunternehmer durch die höhere Verbraucherakzeptanz sowie die verlängerte Haltbarkeit im Vergleich zu unverpacktem Fleisch (DEVLIEGHERE et al. 2004; ZHOU et al. 2010). Ebenso wecken Werbeversprechen und Bilder auf den Verpackungen zusätzlich das Interesse der Verbraucher (FLEISCHATLAS 2015). Abhängig von Faktoren wie Tierspezies, Zusammensetzung der Schutzgasatmosphäre, Lagerungstemperatur, Verpackungsmaterial oder sogenannten aktiven bzw. antimikrobiellen Verpackungen lässt sich die Haltbarkeit und die optisch wahrgenommene Frische verlängern (ZHOU et al. 2010).

In Deutschland werden besonders häufig Gasgemische für die Schutzgasverpackung von Frischfleisch verwendet, die aus einem hohen Sauerstoffanteil und variierenden prozentualen Anteilen an Kohlenstoffdioxid oder Stickstoff bestehen, wobei letzterer das Verpackungsvolumen konstant hält (CHURCH 1994). Während der zugesetzte Sauerstoff eine attraktive rote Farbe des Fleisches bedingt, beeinflusst Kohlenstoffdioxid das mikrobielle Wachstum (BORCH et al. 1996; CARPENTER et al. 2001). Sollen aerob ablaufende mikrobielle Wachstumsvorgänge verhindert oder minimiert werden, verspricht eine Vakuumverpackung größten Nutzen. Neben der Vakuum- und der Schutzgasverpackung bzw. MAP (Modified Atmosphere Packaging) spielen neuere Verpackungssysteme eine Rolle, um Lebensmittel sicherer und verbraucherfreundlicher zu machen.

In den letzten 10 Jahren wurden über knapp 1000 wissenschaftliche Artikel über die Effekte von Nanoprodukten bezüglich ihrer keimvermindernden Wirkung veröffentlicht (SHENG u. LIU 2017). Mittels Nanotechnologie werden Verpackungen mit antibakterieller Beschichtung

hergestellt (VANCE et al. 2015). So können antimikrobiell wirksame Nanopartikel (z. B. aus Silber), die in Lebensmittelkontaktmaterialien eingearbeitet oder auf diese aufgebracht werden, eine Reduktion der mikrobiologischen Belastung von Lebensmitteln entweder in der Verpackung oder auf Oberflächen, die mit diesen Lebensmitteln in Kontakt kommen (z. B. Schneidebretter), bedingen (CPI 2017). Der Einsatz solcher verbrauchernahen Biozidprodukte bietet die Möglichkeit, Lebensmittel hygienischer und sicherer für den Verbraucher zu machen. Jedoch birgt der Einsatz von Biozidprodukten, zu denen auch Nanopartikel wie Nanosilber zählen, auch Risiken. Da die Konzentrationen der enthaltenden Biozide oft sehr gering sind, könnte dies zu einer verstärkten Selektion resistenter Mikroben führen. Zudem gibt es bislang keine einheitlichen Kriterien wonach Bakterien als empfindlich oder resistent gegenüber Bioziden eingestuft werden können (MORRISSEY et al. 2014). Hinzu kommt die bis heute nicht ausreichend untersuchte Gesundheitsschädigung durch Nanosilber und eine nicht einheitlich geregelte Kennzeichnung nanosilberhaltiger Produkte. Bekannt ist jedoch, dass der Anteil an Silber in der Umwelt durch menschliches Handeln gestiegen ist und Nanotechnologieprodukte zur Umwelt-, Wasser- und Luftverschmutzung beitragen (KĘDZIORA et al. 2018).

Ziel der vorliegenden Studie war es, Empfindlichkeitsniveaus von Methicillin-resistenten und -sensiblen *Staphylococcus aureus*-Isolaten tierischen und menschlichen Ursprungs gegenüber Silber und sieben weiteren Bioziden zu analysieren, das Vorkommen entsprechender Resistenzgene und Toleranz vermittelnder Gene zu überprüfen sowie die sensorischen, mikrobiellen und physikalisch-chemischen Veränderungen zu untersuchen, die eine mit Nanosilber beschichtete Lebensmittelverpackungsfolie im Vergleich zu einer herkömmlichen Folie bei unter Vakuum- und Schutzgasatmosphäre gelagerten Schweineschnitzeln herbeiführt.

2. Literaturübersicht

2.1 Rechtliche Regelungen

Eine wichtige Säule zur Wahrung der menschlichen Gesundheit sind sichere Lebensmittel. Die Lebensmittelbasisverordnung VO (EU) 178/2002 formuliert verbindlich für alle EU-Mitgliedsstaaten die grundlegenden und allgemeinen Lebensmittelvorschriften und schafft die Grundlage für ein hohes Schutzniveau für die menschliche Gesundheit und die Verbraucherinteressen unter Berücksichtigung der Vielfalt des Nahrungsmittelangebots. Sie gilt für alle Produktions-, Verarbeitungs- und Vertriebsstufen, jedoch nicht für jegliche Herstellung, Verarbeitung oder Lagerung von Lebensmitteln für den häuslichen privaten Verbrauch. Lebensmittel werden laut VO (EU) 178/2002 als „Stoffe oder Erzeugnisse definiert, die dazu bestimmt sind oder von denen nach vernünftigem Ermessen erwartet werden kann, dass sie im verarbeiteten, teilweise verarbeiteten oder unverarbeiteten Zustand vom Menschen aufgenommen werden“. Um biologischen, chemischen oder physikalischen Gefahren in Lebensmitteln oder Futtermitteln, die eine Gesundheitsbeeinträchtigung verursachen können, vorzubeugen, gilt es „a) Praktiken des Betrugs oder der Täuschung, b) Verfälschung von Lebensmitteln und c) sonstige Praktiken, die den Verbraucher irreführen können“, vorzubeugen. Als „nicht sicher“ gelten Lebensmittel, von denen auszugehen ist, dass sie gesundheitsschädlich und für den Verzehr durch Menschen ungeeignet sind. Das LFGB (Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch) und die LMIV (Lebensmittelinformationsverordnung) VO (EU) 1169/2011 legen fest, dass nur sichere und ausreichend gekennzeichnete Lebensmittel in Verkehr gebracht werden. Durch die Verordnungen des Hygienepakets VO (EU) 852/2004, VO (EU) 853/2004 und VO (EU) 854/2004 werden die Lebensmittelbetriebe ebenfalls dazu angehalten, die allgemeinen Hygienevorschriften einzuhalten, die Gefahren und kritischen Kontrollpunkte im Prozessablauf zu identifizieren, zu dokumentieren und betriebseigene Hygienekontrollen nach dem HACCP- (Hazard Analysis and Critical Control Points) Konzept durchzuführen, um die Sicherheit der Lebensmittel gewährleisten zu können. Durch die EU-Kontrollverordnung 2017/625, die ab Ende 2019 vollständige Anwendung findet und die oben genannte VO (EU) 854/2004 und die VO (EG) 882/2004 über amtliche Kontrollen

aufhebt, sollen die verschiedenen Bereiche der Lebensmittelüberwachung in der EU gebündelt werden.

2.1.1 Lebensmittelbedingte Erkrankungen, Lebensmittelintoxikationen, und -kontaminationen

Lebensmittelbedingte Erkrankungen werden meist durch den Verzehr nicht sicherer Lebensmittel verursacht. Ein lebensmittelbedingter Krankheitsausbruch ist laut AVV (Allgemeine Verwaltungsvorschrift) Zoonosen Lebensmittelkette definiert als „das Auftreten einer mit demselben Lebensmittel in Zusammenhang stehenden oder wahrscheinlich in Zusammenhang stehenden Krankheit in mindestens 2 Fällen beim Menschen oder eine Situation, in der sich die festgestellten Fälle stärker häufen als erwartet“. Man kann dabei zwischen biologischen, chemischen und physikalischen Ursachen/Gefahren unterscheiden. Zu den biologischen Ursachen zählen Bakterien, Viren, Parasiten oder deren Toxine, während Unkrautbekämpfungsmittel, Schwermetalle, Reinigungs- und Desinfektionsmittel oder andere toxische Umweltstoffe chemische Ursachen und die radioaktive Belastung eine physikalische Ursache repräsentieren. Gemäß EU-Zoonosenrichtlinie 2003/99/EG bzw. AVV Zoonosen Lebensmittelkette werden lebensmittelbedingte Ausbrüche in Deutschland erfasst und an die Europäische Lebensmittelsicherheitsbehörde (EFSA) weitergeleitet. Ob Erreger in der Lage sind, eine Lebensmittelvergiftung hervorzurufen, hängt davon ab, ob der Mikroorganismus im Lebensmittel infektiös und vermehrungsfähig bleibt, von Toxizität und Invasivität, sowie von der Infektionsdosis, Abwehrlage des infizierten Menschen und der Art des Lebensmittels. Die Art des Lebensmittels ist entscheidend, da Fett- und Eiweißbestandteile sich als Schutzkolloid um die Erreger legen und diese somit vor Verdauungssäften schützen. Bei folgenden Personen werden besonders schwere Krankheitsverläufe beobachtet 1) Kinder <6 Jahren, 2) Erwachsene >60 Jahre, 3) Schwangere und Embryonen und 4) immunsupprimierte Personen (RKI 2014). Häufig verläuft eine lebensmittelassoziierte Infektion als Darminfektion (OGUNMODEDE et al. 2005). Sind Endo- oder Exotoxine ursächlich beteiligt, spricht man von einer Lebensmittelintoxikation. Die Endotoxine, die als Bestandteil der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien aus Lipopolysacchariden bestehen, sind sehr hitzeresistent, während Exotoxine, die aus Proteinen aufgebaut sind, zum Teil hitzeempfindlich sind. Allerdings gilt dieses nicht für die von *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* gebildeten Exotoxine.

2.1.1.1 Eigenschaften und Pathogenität von *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus (S.) aureus ist einer der bedeutendsten nosokomialen Erreger und kann zu schweren Krankheitsverläufen führen. Zudem zeigt *S. aureus* häufig Resistenzen gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen (CHAMBERS 1997; TENOVER u. GAYNES 2000; FEY et al. 2003). *S. aureus* ist zudem sehr resistent gegenüber Desinfektionsmitteln (RKI 2016). In der Veterinärmedizin verursacht *S. aureus* pyogene Prozesse, Otitiden, Peritonitiden, Endokarditiden, Botryomykosen, Osteomyelitiden sowie postoperative Wundinfektionen (HARTMANN et al. 1997; LOWY 1998; PETON u. LE LOIR 2014). Darüber hinaus kann es zu toxin-vermittelten Krankheitsbildern wie exfoliativen Dermatitiden kommen (ARCHER 1998; VOJTOV et al. 2002; NOVICK 2003; PETON u. LE LOIR 2014). Die von Menschen isolierten *S. aureus*-Isolate sind nach einer Studie zu 20% bis 50% in der Lage, Enterotoxine zu bilden, wohingegen diese Fähigkeit bei tierischen Isolaten sehr viel seltener ist (KRÄMER u. PRANGE 2017). Beim Menschen verursacht *S. aureus* lokale Entzündungen, schwere Wundinfektionen, Furunkel oder Karbunkel, die häufig postoperativ auftreten. Daneben kann es zu Septikämien kommen (HASSOUN et al. 2017). Chronisch verlaufende Infektionen mit *S. aureus* wie Endokarditiden, Otitiden oder Rhinosinitiden lassen sich oftmals schwer therapieren und neigen trotz anhaltender und adaptierter Antibiotikatherapien zu Rezidiven. Zudem ist *S. aureus* in der Lage, intrazellulär in phagozytierenden Zellen (neutrophilen Granulozyten) für Wochen zu persistieren (BROOK u. FINEGOLD 1979; POWERS et al. 1990; GITTELMAN et al. 1991; KAUFFMAN et al. 1993; LEW u. WALDVOGEL 2004; VOYICH et al. 2005; GARZONI et al. 2007). *S. aureus* ist bei 20% bis 30% gesunder Personen auf Schleimhäuten des Nasen-Rachen Raumes, aber auch im Stuhl, der Kopfhaut und den Haaren nachweisbar, wobei dieser Kolonisation keine pathogene Bedeutung zukommt (RKI 2014; MOBASHERIZADEH et al. 2016). Die meisten durch Staphylokokken verursachten Lebensmittelinfektionen werden durch das Enterotoxin A hervorgerufen, welches als Superantigen eine gezielte Immunantwort unterbindet (DINGES et al. 2000; MCCORMICK et al. 2001; TUFFS et al. 2018).

2.1.1.2 Resistenzentwicklung bei *Staphylococcus aureus*

S. aureus ist sehr anpassungsfähig und viele Isolate zeigen Resistenzen gegenüber mehreren Wirkstoffklassen. Die ersten Penicillinase-bildenden *S. aureus*-Isolate wurden bereits kurz nach der Einführung des Penicillins, das zunächst zu sehr guten Therapieerfolgen führte und die Letalität der Staphylokokkensepsis senkte (SKINNER u. KEEFER 1941), entdeckt (WISE et al. 1989; RAMMELKAMP u. MAXON 1942; KIRBY 1944; SPINK u. FERRIS 1945). Darauf folgend wurde die spezifische Rolle der Penicillinase (BONDI u. DIETZ 1945), die durch das *blaZ*-Gen codiert wird, entschlüsselt (KERNODLE 2002). Das *blaZ*-Gen codiert eine β -Laktamase, die den β -Laktamring von β -Laktamantibiotika hydrolysieren kann. Das Gen *blaZ* ist häufig auf einem großen Plasmid, aber auch im Chromosom lokalisiert (OLSEN et al. 2006), oft zusammen mit anderen Resistenzgenen. Aktuell sind über 90% der Isolate in der Lage, Penicillinase zu produzieren (WISE et al. 1989; AYLIFFE et al. 1998; LOWY 1998; WÜLLENWEBER u. HERRMANN 2003). Durch die Zugabe von β -Laktamase-Inhibitoren, wie Clavulansäure oder Sulbactam oder den Einsatz von Isoxazolylpenicillinen wie dem Oxacillin, lässt sich dieser Resistenzmechanismus jedoch therapeutisch umgehen. Kurz nach Einführung des Penicillinase-stabilen Methicillins im Jahr 1961 erschwerte das Vorkommen eines modifizierten, bakteriellen Penicillinbindepoteins (PBP), PBP2a oder auch PBP2' genannt, welches durch das *mecA* Gen codiert wird, die Therapiemöglichkeiten von *S. aureus*-Infektionen (JEVONS 1961; STEWART u. HOLT 1963). Die Verbreitung dieses Gens machte *S. aureus* zu einem pandemischen Problemkeim, dessen Bedeutung bei nosokomialen Infektionen besonders hoch ist (WISE et al. 1989; VAN BELKUM u. VERBRUGH 2001). Die PBPs agieren als Transpeptidasen, Endopeptidasen und Carboxypeptidasen und sind an der Zellwandsynthese von *S. aureus* beteiligt. Dadurch, dass β -Laktam-Antibiotika schlechter an das alternative, durch *mecA* codierte PBP2a binden, bleibt die Funktion des bakteriellen Enzyms auch bei einer therapeutischen Anwendung von β -Laktam-Antibiotika erhalten. Dies führte zu einer großen Verbreitung von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) (JORGENSEN 1991; CROSSLEY et al. 2009; NAVRATNA et al. 2010). Anders als das *blaZ*-Gen vermittelt *mecA* somit nicht nur Resistenz gegenüber Penicillinen, sondern auch gegenüber Cephalosporinen der 1. bis 4. Generation und Carbapenemen (RKI 2014). Die Expression beider Gene wird durch Anwesenheit von β -Laktam Antibiotika induziert (CROSSLEY et al. 2009). Das *mecA*-Gen befindet sich auf transferablen, genetischen Elementen, die in das

2. Literaturübersicht

Chromosom von Staphylokokken integriert sind (SCC*mec*-Elemente, staphylococcal cassette chromosome *mec*-Elemente). Im Jahr 2011 wurde das *mecC*-Gen als neue Methicillinresistenz vermittelnde Determinante von *S. aureus* identifiziert, welches bei *S. aureus*-Isolaten von Menschen, Haus- und Wildtieren zu einer high-level-Resistenz gegenüber Oxacillin führen kann (GARCÍA-ÁLVAREZ et al. 2011; KIM et al. 2012; PATERSON et al. 2014). So wie viele mobile genetische Elemente auch, sind diese Elemente horizontal übertragbar. Wird ein SCC*mec*-Element von einem Methicillin-sensiblen Stamm (MSSA) erworben und in das Chromosom integriert, kann eine MRSA-Linie entstehen. Derzeit sind viele Typen, Subtypen und Varianten von SCC*mec*-Elementen bekannt (ITO et al. 2009; KAYA et al. 2018). Eine aktuelle Aufstellung mit Klassifikationsschema, herausgegeben von der International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome Elements, findet sich auf der Seite http://www.sccmec.org/Pages/SCC_ClassificationEN.html. Für den diagnostischen Bereich definiert werden MRSA laut Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) über a) das (genotypisch nachgewiesene) Vorhandensein des *mecA*-Genes oder b) durch den phänotypischen Nachweis des PBP2a.

2.1.1.3 MLST- und *spa*-Typisierung und Nomenklatur von *S. aureus*-Isolaten

Die Multi-Locus-Sequenz-Typisierung (MLST) ist eine sequenzbasierte molekulare Typisierungsmethode und dient z. B. zur Analyse der klonalen Evolution von *S. aureus*. Das Grundprinzip der Methode ist eine Bestimmung von internen Gen-Sequenzen von sieben definierten Genen (housekeeping genes). Diese Gene, die für den zentralen Stoffwechsel erforderlich sind, eignen sich dafür besonders, da sie hoch konserviert sind und kaum unter Selektionsdruck stehen. Bei *S. aureus* werden Abschnitte der Gene *arc* (codiert eine Carbat-Kinase), *aro* (codiert eine Shikimat-Dehydrogenase), *glp* (codiert eine Glycerol-Kinase), *gmk* (codiert eine Guanylat-Kinase), *pta* (codiert eine Phosphat-Acetyl-Transferase), *tpi* (codiert eine Triosephosphat-Isomerase) und *yqi* (codiert eine Acetyl-Coenzym-Acetyltransferase) sequenziert (MAIDEN et al. 1998). Jeder einzelnen Variante der Nukleotidsequenz der Gene ist ein bestimmter Alleltyp zugeordnet. Diese werden durch arabische Ziffern beschrieben. Das Allelprofil der sieben Gene bestimmt so den jeweiligen Sequenztyp (ST) (RICHARDSON u. REITH 1993; MAIDEN et al. 1998). Unterscheiden sich Isolate in einem oder zwei Loci im Allelprofil, so werden diese als single locus variants (SLV) bzw. double locus variants (DLV)

bezeichnet. Isolate mit demselben ST sowie SLVs und DLVs werden unter demselben klonalen Komplex (CC) zusammengefasst (FEIL et al. 2004). Eine weitere häufige molekulare Typisierungsmethode ist die *spa*-Typisierung, die verschiedene Sequenzen der variablen Region X des *spa* (staphylococcal protein A) Gens, welches für das Protein A der Zellwand von *S. aureus* codiert, nachweist. Gegenüber der MLST wird bei der *spa*-Typisierung nur ein Locus sequenziert, was schnellere und kostengünstigere Ergebnisse liefert (O'HARA et al. 2016). Die ermittelten Sequenzen können dann per Hand oder mittels eines Algorithmus (BURP- Based Upon Repeat Pattern) mit bereits bekannten *spa*-Typen als sogenannte Cluster-Analyse verglichen werden. Die durch *spa*-Typisierung ermittelten Ergebnisse zu verwandtschaftlichen Beziehungen einzelner Isolate zueinander stimmen sehr gut mit denen mittels MLST und PFGE gewonnenen Daten überein, sodass diese drei Methoden sich international zur Typisierung von MRSA etabliert haben (STROMMENGER et al. 2006). Weltweit werden MRSA-Stämme nach diesen Methoden definiert (ROBINSON u. ENRIGHT 2003). Die Datenbank Ridom SpaServer gibt Aufschluss über alle bisher identifizierten *spa*-Typen (HARMSSEN et al. 2003).

2.1.1.4 Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) in der Primärproduktion und Risiken für den Menschen

Seit 2005 gibt es vermehrt Berichte über MRSA bei landwirtschaftlichen Nutztieren. Dies sind häufig *S. aureus* des klonalen Komplexes CC398 (ARMAND-LEFEVRE 2005; VOSS et al. 2005; DE NEELING et al. 2007; LEWIS et al. 2008). Durch die Nachweise zunächst bei Schweinen und den direkten Bezug zur Landwirtschaft wurden diese unter dem Begriff „livestock-associated MRSA“ (LA-MRSA) zusammengefasst (MEEMKEN et al. 2010; GOLDING et al. 2010). MRSA des CC398 wurden aber auch bei Mastkälbern, Puten und Pferden beobachtet (CUNY et al. 2008, 2009; NEMATI et al. 2008; MULDER et al. 2010; VAN DUIJKEREN 2010; VANDERHAEGEN et al. 2010). Darüber hinaus können CC398-MRSA aus Stallstaub, der Umgebung der Tiere sowie aus unterschiedlichen Fleischproben (nach Anreicherung) isoliert werden (VAN LOO et al. 2007; TENHAGEN et al. 2008; LOZANO et al. 2009). Bei Hunden und Katzen lassen sich ebenfalls CC398-MRSA nachweisen (WITTE et al. 2007; WALTHER et al. 2008; CUNY et al. 2010). Zudem wurden CC398-MRSA nicht nur bei Tieren nachgewiesen, sondern es ist auch bekannt, dass Menschen

2. Literaturübersicht

kolonisiert oder sogar infiziert werden können (LEWIS et al. 2008; MAMMINA et al. 2010). Aufgrund ihrer Fähigkeit, verschiedene Spezies zu kolonisieren oder zu infizieren, werden diese *S. aureus* zur Gruppe der „extended host spectrum genotypes“ (EHSGs) gezählt (WALTHER et al. 2009). In den letzten Jahren wurde ein neuer Genotyp CC9/CC398 entdeckt, der ein chromosomales Gerüst von CC398-Isolaten aufweist, jedoch auch eine kleine CC9-Region innerhalb des *spa*-Gens enthält (PRICE et al. 2012). Jüngere Studien konnten zeigen, dass dieser neue Genotyp (*spa*-Typ t899) unter anderem auch bei Menschen gefunden wird, die weder selbst in der Landwirtschaft tätig sind, noch Kontakt zu Personen hatten, die sich beruflich mit Nutztieren beschäftigen. Daher wird angenommen, dass die Transmission dieses Genotyps vorwiegend Lebensmittel- und weniger Personen-assoziiert erfolgt (LARSEN et al. 2016; FETSCH et al. 2017). Generell birgt die Kolonisierung oder Infektion von Nutztieren mit MRSA für den Menschen die Gefahr, durch direkten Kontakt oder über Lebensmittel tierischer Herkunft mit MRSA besiedelt zu werden oder sich zu infizieren, weshalb man von einem zoonotischen Potenzial von MRSA spricht. Laut aktuellen Daten des Zoonosen-Monitoring-Berichts des BVLs wurden innerhalb der Geflügelfleischkette die höchsten Nachweisraten von nutztierassoziierten MRSA gefunden. Die Daten zeigen, dass frisches Putenfleisch mit 30% bis 40% und Schlachtkörper von Mastputen mit über 60% der Proben auffallend häufig mit MRSA kontaminiert sind (BVL 2010, 2012, 2014, 2016a). Auf Schlachtkörpern von Masthähnchen und in frischem Hähnchenfleisch wurden MRSA bei 50% bzw. 25% der Proben beobachtet (BVL 2010, 2013, 2015). Bei Mastschweinen lassen sich MRSA ebenfalls häufig nachweisen. Im Einzelnen waren im Jahr 2015 26,3% der Sockentupferproben aus dem Wartebereich von Zuchtsauen positiv für MRSA, wohingegen die MRSA-Häufigkeit mit 41,3% MRSA-positiven Sockentupferproben aus dem Aufzuchtbereich von Läufern deutlich höher lag. Schlachtkörper von Mastschweinen waren zu ca. 20% und frisches Schweinefleisch zu 13% mit MRSA belastet (BVL 2016b). Mastkälber und Jungrinder sind innerhalb der gesamten Lebensmittelkette häufiger mit MRSA besiedelt als Mastrinder (BVL 2012, 2013, 2014, 2015, 2016b). Dieses zeigen die Ergebnisse von Nasantupferproben von Mastkälbern und Jungrindern am Schlachthof, die zu 35% bis 45% MRSA-positiv waren, während nur ca. 8% der Mastrinder zum Schlachtzeitpunkt nasal mit MRSA besiedelt waren. Zudem scheinen die Schlachtkörper von Mastkälbern und Jungrindern ebenfalls häufiger mit MRSA kontaminiert zu sein, was die zu 30,8% MRSA-positiven Proben, gegenüber den nur zu 5,0% MRSA-belasteten Proben bei

2. Literaturübersicht

Mastrindern widerspiegeln. Auch das frische Fleisch von Mastkälbern und Jungrindern ist mit etwa 10% - 12% positiver Proben mehr mit MRSA kontaminiert als frisches Rindfleisch, das zu 5% - 8% positiv für MRSA getestet wurde (BVL 2010, 2012, 2013, 2014, 2016b). Nach jetzigem Kenntnisstand ist der Verzehr oder die Handhabung MRSA-kontaminierter Lebensmittel nicht mit einem erhöhten Risiko verbunden, Träger des Keims oder durch ihn infiziert zu werden (EFSA 2009). Jedoch besteht ein sehr viel höheres Risiko für Menschen, die regelmäßigen Kontakt mit Tieren haben (Landwirte, Tierärzte, Menschen die an Schlachthöfen arbeiten) sich zu infizieren (BISDORFF et al. 2012; CUNY et al. 2015; REYNAGA et al. 2016, 2017). Laut Zoonose-Monitoring 2016 wiesen über 86,8% der MRSA-Isolate aus Puten- und Hähnchenfleisch aus dem Einzelhandel, sowie aus ökologischen und konventionellen Masthähnchen-Erzeugerbetrieben *spa*-Typen auf, die dem klonalen Komplex CC398 zuzuordnen sind (BVL 2017). Die Daten verdeutlichen, dass vor allem CC398-MRSA Isolate auf Fleisch zu finden sind und somit eine Risikoquelle für eine Infektion von Menschen darstellen, auch wenn das Risiko derzeit noch als gering eingeschätzt wird. Auch human-assoziierte MRSA-Isolate sind auf unterschiedlichen Fleischprodukten zu finden und stellen laut den Autoren unterschiedlicher Studien ein Risiko für eine MRSA-Infektion durch Handhabung und Verzehr dar (OGATA et al. 2012; JACKSON et al. 2013).

2.1.1.5 Häufige klonale Linien von MRSA beim Menschen

Da einige Linien von *S. aureus* sich besonders effektiv weiterverbreiten, bezeichnet man diese als sogenannte Epidemiestämme. Ursprünglich erfolgte die Benennung der deutschen Epidemiestämme nach der geografischen Region ihres ersten Auftretens. Vorherrschend bei den Hospital-assoziierten (HA-) MRSA in Deutschland sind die klonalen Linien ST22 („Barnim Epidemiestamm“) und ST225 („Rhein-Hessen Epidemiestamm“), die in ganz Deutschland in Krankenhäusern auftreten und in einigen Regionen endemisch vorkommen. Dagegen treten die klonalen Linien ST8 und ST45 („Berliner Epidemiestamm“) deutlich seltener als epidemische MRSA in Krankenhäusern auf (RKI 2018; GRUNDMANN et al. 2014). Andere klonale Linien von MRSA, die in Deutschland vermehrt in der Normalbevölkerung auftreten, sind ST30 (CC30), ST8 (CC8) und ST80 (CC80), wobei ST8 zunehmend und ST80 immer seltener auftritt. Für die Sequenztypen ST1, ST152, ST59 und

ST5 wird ein Import aus Ländern angenommen, in denen diese MLST-Typen vorwiegend vorkommen (RKI 2013, 2018; LEISTNER et al. 2015). Daneben kommt es zunehmend bei Menschen, die in der Nutztierhaltung, in Schlachthöfen oder als Tierärzte arbeiten sowie auch vermehrt in der Bevölkerung in Gegenden mit hoher Nutztierdichte zur Kolonisierung mit Isolaten des klonalen Komplexes CC398 (VAN CLEEF et al. 2011; LARSEN et al. 2015). Nasale Kolonisationsraten mit CC398-LA-MRSA werden mit 77% - 86% bei Personen mit beruflicher Exposition zu Schweinen angegeben, während Familienmitglieder dieser Personengruppe zu 4% - 5% kolonisiert sind (CUNY et al. 2015). Obwohl CC398 als dominierender LA-MRSA in Europa gilt (GARCÍA-ÁLVAREZ et al. 2012), liegt der evolutionäre Ursprung beim Menschen (PRICE et al. 2012). In Verbindung mit dem Wirtswechsel vom Menschen zum Nutztier kam es jedoch zu einem Verlust von Proteinen, die *S. aureus* vor der menschlichen Immunantwort schützen (PRICE et al. 2012). Neuere Studien konnten zeigen, dass die Subpopulation des sogenannten Hybrid LA-MRSA CC9/CC398 Genotyps sich bereits an Menschen adaptiert hat, wobei die Transmission über Geflügelfleisch erfolgen soll. Diese neuen Erkenntnisse sind jedoch unzureichend um, die allgemein akzeptierte Meinung, dass die Übertragung von MRSA über kontaminiertes Fleisch eine untergeordnete Rolle spielt, zu revidieren (LARSEN et al. 2016).

2.2 Verderb und Lebensmittelkonservierung

Verderb wird als nachteilige Veränderung von Lebensmitteln definiert, die dazu führen, dass die Lebensmittel für den menschlichen Verzehr unbrauchbar, oder für den Verkauf nicht mehr geeignet sind. Ein verdorbenes Lebensmittel ist in der Regel auch in seiner sinnfälligen Beschaffenheit (Aussehen, Konsistenz, Geruch, Geschmack) so deutlich verändert, dass es für den Verbraucher nicht mehr annehmbar ist (SINELL 2004). Daneben gibt es den Begriff der Haltbarkeit, die als Zeitspanne, die ein verderbliches Lebensmittel unter üblichen Lagerungsbedingungen in seiner Qualität akzeptabel bleibt, definiert wird (GYESZLY 1991). Lebensmittel verderben durch (mikro-)biologische, chemische und physikalische Prozesse. Von (mikro-)biologischem Verderb spricht man, wenn Mikroorganismen Inhaltsstoffe der Lebensmittel abbauen und verstoffwechseln. Dadurch reichern sich Produkte im Lebensmittel an, die - wie bei der Käseherstellung - zum Teil erwünscht sind. Zum anderen Teil entstehen

aber auch toxische Stoffe, die Krankheiten bedingen (SINELL 2004). Fleisch ist durch eine sehr hohe Wasseraktivität und große Konzentrationen an frei verfügbaren Nährstoffen recht anfällig für mikrobielles Wachstum. Dadurch entstehen Fremdgerüche, Fehlparomen, Texturänderungen und Schleimbildung (SUN u. HOLLEY 2012). Kommt es im Lebensmittel zu Abbauvorgängen, die durch zelleigene Enzyme katalysiert werden, spricht man von chemischem Verderb (HEISS u. EICHNER 2002). Beispielsweise führt die Lipidoxidation zu einer Farbänderung und zur Ranzigkeit des Fleisches. Unter physikalischem Verderb versteht man Qualitätseinbußen von Lebensmitteln durch physikalische Wechselwirkungen, wie mechanische Beeinflussungen, Hitze, Kälte oder elektromagnetische Strahlung (SINELL 2004). Für die Fleischindustrie sowie für die Verkäufer und Konsumenten stellt der Verderb von Lebensmitteln, welcher in Amerika bis zu 40% der Produktion umfassen kann, ein großes Verlustgeschäft dar (GUNDERS 2017).

2.2.1 Physikalische Methoden zur Haltbarmachung

Physikalische Konservierungsmethoden bewirken durch physikalische Kräfte (mechanische, elektromagnetische, hydrostatische, thermische), dass Mikroorganismen abgetötet und nachteilig wirkende Enzyme im Lebensmittel zerstört werden (EBERMANN u. ELMADFA 2008). Die Kühlung oder das Tiefgefrieren von Lebensmitteln ist eine der effektivsten Methoden, um den Verderb eines Lebensmittels zu beeinflussen, da sich Bakterien unter diesen Umständen nur sehr langsam bis gar nicht vermehren können. Eine gesteigerte Luftbewegung sowie die Erniedrigung der Temperatur beschleunigt die Zeit des Herunterkühlens (OCKERMAN u. BASU 2004; NYCHAS et al. 2008; ZHOU et al. 2010). Hefen und Schimmelpilze können auch an Fleischverderb beteiligt sein, spielen jedoch eher eine untergeordnete Rolle (DILLON 1998). Dagegen führt eine sehr schnelle Kühlung (ultra-rapid chilling) von Fleisch vor Eintritt des Rigor Mortis zur Kälteverkürzung, die mit einer geringeren Zartheit des Fleisches einhergeht. Durch eine Elektrostimulation, die den Abbau der Energiereserven anregt (JUAREZ et al. 2012), kann dem jedoch entgegen gewirkt werden. Der Vorteil der Tiefkühlung von Fleisch besteht darin, dass Temperaturen von unter -4°C kein bakterielles Wachstum erlauben. Dadurch treten keine bakteriell bedingten Veränderungen im Fleisch auf und chemische Veränderungen werden reduziert (LAWRIE u. LEDWARD 2006). Der Verderb wird dann durch abiotische Faktoren wie z. B. Lipasen bestimmt, die noch bei

2. Literaturübersicht

Temperaturen von -20 °C Fettsäuren spalten. Bei Verfahren, die Hitze nutzen, stellt das Pasteurisieren eine der wichtigsten Methoden der Haltbarmachung dar. Die relativ milde Erhitzung des Produktes führt zu einer Inaktivierung von Enzymen und einer Abtötung von Hitze-sensitiven Mikroorganismen bei geringen Veränderungen der Produkteigenschaften, während das Sterilisieren alle vermehrungsfähigen Mikroorganismen und Sporen im und auf dem Lebensmittel abtötet und zu deutlicheren Veränderungen der Qualität führen kann. Durch Trocknung mittels Luft und Wärme oder Zugabe von Salz und Zucker (konzentrationsabhängig) wird dem Lebensmittel Wasser entzogen und damit der a_w -Wert gesenkt. Ein mikrobiologisch stabiles Lebensmittel sollte einen a_w -Wert von 0,70 nicht überschreiten (FAO 1995; MOSSEL et al. 1995). Die Bestrahlung (Irradiation) von Lebensmitteln mittels energiereicher Strahlung (Gammastrahlung, Röntgenstrahlen, beschleunigten Elektronen) wird genutzt, um die Haltbarkeit von Lebensmitteln wie Getreide, Obst, Gemüse, Fleisch und Fisch zu verlängern oder das Keimen und Sprossen von Kartoffeln, Zwiebeln und Knoblauch zu verhindern und die Lagerfähigkeit zu optimieren. Zudem kann die Reifung von Obst verlangsamt werden und Schädlinge bzw. Keime können in Trockenobst, Nüssen, Gewürzen und Getreide abgetötet werden (BVL 2018). Die Vorteile der Bestrahlung ergeben sich aus der sehr effektiven Inaktivierung von Mikroorganismen und den sehr geringen Veränderungen der produkttypischen Eigenschaften (LAWRIE u. LEDWARD 2006). Die maximale Strahlendosis von 10 kGy entwickelt kaum thermische Energie, weshalb diese Methode als non-thermal bezeichnet wird. Daher behält Fleisch seine Frische und nährstoffspezifische Qualität (AYMERICH et al. 2008). In Deutschland dürfen nach der Lebensmittelbestrahlungsverordnung und den EU-Richtlinien 1999/2/EG und 1999/3/EG lediglich getrocknete aromatische Kräuter und Gewürze ohne entsprechende Allgemeinverfügung mit ionisierenden (Elektronen, Gamma, Röntgen) Strahlen bestrahlt und nach Kennzeichnung „mit ionisierenden Strahlen behandelt“ zum Verkauf angeboten werden. Diese Allgemeinverfügung nach §54 LFGB wird vom BVL auf Antrag erlassen, wenn nicht zwingende Gründe des Gesundheitsschutzes entgegenstehen. Weitere nicht-thermale Methoden sind die Plasmabehandlung (KLEIN 2012; HAN et al. 2016) und die Hochdruckbehandlung (High Hydrostatic Pressure HHP), wobei die sensorischen und Nährstoffe betreffenden Produkteigenschaften des Produktes erhalten bleiben und Verderbnis assoziierte Mikroorganismen und Enzyme inaktiviert werden (CHEFTEL u. CULIOLI 1997).

2.2.2 Chemische Methoden zur Haltbarmachung

Bei chemischen Verfahren führen Biozide, Konservierungsstoffe oder Substanzen, die beim Räuchern gebildet werden, zu einer Keimreduzierung im Lebensmittel. Auch die Senkung des pH-Wertes durch das Säuern ist eine chemische Methode, die das Wachstum von Mikroorganismen einschränkt. Chemische Substanzen wie Kohlendioxid oder Ozon beeinflussen die oberflächlich vorkommenden Mikroorganismen, wobei der Einsatz von hoch explosivem Ozon beispielsweise eine Gefahr für Personen darstellt, die mit diesem Stoff arbeiten müssen. Es gibt jedoch eine Reihe weiterer chemischer Substanzen, die laut der EU-Lebensmittelzusatzstoff-Verordnung VO (EU) 1333/2008 als Zusatzstoffe erlaubt sind (z. B. Sorbinsäure, Benzoesäure, p-Hydroxybenzoesäure-Ester, Ameisensäure, Propionsäure, Schwefeloxid, Natriumnitrit, Nisin, Apfelsäure, Lysozym und Natamycin). Natriumlactat wird z. B. in der fleischverarbeitenden Industrie eingesetzt, um das Aroma zu intensivieren, die Haltbarkeit zu verlängern und die mikrobiologische Sicherheit des Fleisches zu verbessern (DIEZ et al. 2009). Auf die Möglichkeit, die Haltbarkeit von Lebensmitteln mittels Verpackungsstrategien zu verlängern und den Einsatz von Biozidprodukten wird an späterer Stelle dieser Arbeit genauer eingegangen (Kapitel 2.4.2), obwohl diese auch unter die Kategorie der chemischen Konservierungsmittel fallen.

2.2.3 Biologische Methoden zur Haltbarmachung

Zu den biologischen Konservierungsmethoden („biopreservative methods“) zählt man natürlichen Substanzen wie ätherische Öle (Oregano-, Rosmarin-, Thymian-, Nelken- und Zimtöle), Chitosan, Nisin und Lysozym, sowie Bacteriocine der Milchsäurebakterien, die als heterogene Gruppe von antibakteriell wirkenden Proteinen je nach Ursprungsorganismus unterschiedliche antimikrobielle Wirkmechanismen und Fähigkeiten aufweisen (STILES u. HASTINGS 1991; DA CRUZ CABRAL et al. 2013). Rosmarinextrakt ist beispielsweise laut VO (EU) 1333/2008 mit einem erlaubten Grenzwert von 100 mg/kg in Trockenfleisch zugelassen. Aber auch die Gärungsprozesse durch Alkohol und Milchsäure, die einer Keimreduktion dienen, werden als biologische Verfahren bezeichnet (CAPLICE u. FITZGERALD 1999).

2.2.4 Hürdenprinzip

LEISTNER et al. (2000) beschreiben das Hürdenprinzip als Prinzip zur Verbesserung der mikrobiologischen Qualität, der Sicherung der sensorischen und Nährstoffe betreffenden Produkteigenschaften mittels gemeinsamer Anwendung verschiedener Konservierungsmethoden. Durch Kombination der oben beschriebenen physikalischen, chemischen und biologischen Haltbarmachungsverfahren werden verschiedene Zielstrukturen erreicht und die Intensität der einzelnen Methoden kann reduziert werden (LEISTNER u. GORRIS 1995, LEISTNER 2000). O'NEILL et al. (2018) konnten beispielsweise durch kombinierte Anwendung von HHP und einer Mixtur aus organischen Säuren die Haltbarkeit von salzarmen Würstchen hinsichtlich der mikrobiologischen Eigenschaften um 51% und Kochschinken um 97% verbessern.

2.3 Einsatz von Bioziden und Schwermetallen im Lebensmittelbereich

Biozide, zu denen laut Europäischen Chemikalienagentur (ECHA) auch Metalle wie Silber gezählt werden, begegnen uns im Alltag vor allem in Form von Insektensprays, Schimmelbekämpfungsmitteln oder Haut- und Flächendesinfektionsmitteln. Darüber hinaus gibt es antibakteriell wirkende Schneidebretter (z. B. Microstar® antibakteriell), deren Gehalt an Silberionen einen dauerhaften Schutz vor Keimen und Bakterien verspricht. In Deutschland gibt es zudem bereits zahlreiche antiseptische Produkte zur Wundversorgung wie beispielsweise Wundkompressen mit einem antibakteriellen Silberanteil (ACTISORB™ Silver 220), welche das Infektionsrisiko durch die breite antibakterielle Wirkung der Silberionen senken sollen. Ein weiteres weit verbreitet eingesetztes Biozid in Bedarfsgegenständen, dessen Einsatz in Lebensmittelkontaktmaterialien aus Kunststoff jedoch verboten wurde, ist Triclosan (5-chloro-2,4-dichlorophenoxyphenol) (BEDOUX 2012; BedGgstV 2013). Darüber hinaus gibt es durchaus Biozide, die für die Desinfektion im Lebens- und Futtermittelbereich zugelassen sind, wobei sie (bspw. Wasserstoffperoxid, Benzoesäure) jedoch nicht Produkten beigemischt werden dürfen, die direkt in Berührung mit Lebensmitteln kommen (Durchführungsverordnung (EU) 1035/2013; Durchführungsverordnung (EU) 2015/1730).

2.3.1 Gesetzgebung

In der Verordnung über Biozidprodukte (VO (EU) 528/2012), kurz BPV, wird das Inverkehrbringen und die Verwendung von Biozidprodukten, die aufgrund der Aktivität der in ihnen enthaltenen Wirkstoffe zum Schutz von Mensch, Tier, Materialien oder Erzeugnissen vor Schadorganismen wie Schädlingen oder Bakterien eingesetzt werden, geregelt. Ziel der BPV ist es für ein reibungsloses Funktionieren des Biozidprodukt-Markts in der EU zu sorgen, sowie ebenfalls ein hohes Schutzniveau für die Gesundheit von Mensch und Umwelt zu gewährleisten. Die Verordnung bestimmt, dass alle Biozidprodukte und deren einzelne Wirkstoffe -bis auf einige Ausnahmen- vor dem Inverkehrbringen genehmigt und zugelassen werden müssen. Zu diesen Ausnahmen zählen auch die Übergangsregelungen für Wirkstoffe, die bereits vor dem Jahr 2000 vermarktet wurden, deren Genehmigungsverfahren aber noch nicht abgeschlossen sind. Diese Ausnahmeregelungen betreffen bspw. auch Kupfer und Silber. Sofern eine vorläufige Produktzulassung vorliegt, dürfen auch neue Wirkstoffe, deren Bewertung noch läuft, ebenfalls in Verkehr gebracht werden. Die Bewertung der Wirkstoffe erfolgt zunächst durch eine zuständige Behörde eines Mitgliedstaats, welche die Ergebnisse dieser Bewertungen anschließend an den Ausschuss für Biozidprodukte der ECHA weiterleitet. Die ECHA nimmt Stellung zu dieser ersten Bewertung. Die Stellungnahme ist Grundlage für die Entscheidung über die Genehmigung, welche letztendlich von der Europäischen Kommission verabschiedet wird. Wirkstoffe können eine Genehmigung für maximal zehn Jahre erteilt bekommen, die Genehmigung kann aber verlängert werden. Eine aktuelle Liste (Positiv-Liste) mit genehmigten und zugelassenen Wirkstoffen ist online über die Webseite der Europäische Chemikalienagentur (ECHA 2018) abrufbar. Die delegierte VO (EG) 1062/2014 regelt die Durchführung der systematischen Prüfung aller alten Wirkstoffe. Außerdem beinhaltet sie in Anhang II die Liste über die Wirkstoffe, die ohne Zulassung verkehrsfähige Biozidprodukte sind. In dieser Liste finden sich neben Silber und Kupfer auch verschiedene Verbindungen dieser Elemente: Silbernitrat, Silberzeolith, Silber-Zink-Zeolith und Silber-Kupfer-Zeolith, sowie Kupferthiocyanat, Dikupferoxid und Kupfersulfat. Die VO (EU) 528/2012 definiert unter anderem folgende Begriffe: 1) Biozidprodukt, 2) Nanomaterial, 2.1) Partikel, 2.2) Agglomerat, 2.3) Aggregat (Tabelle 1).

Tabelle 1: Definitionen gemäß VO (EU) 528/2012

| | |
|------------------|---|
| 1) Biozidprodukt | „jeglicher Stoff oder jegliches Gemisch in der Form, in der er/es zum Verwender gelangt, und der/das aus einem oder mehreren Wirkstoffen besteht, diese enthält oder erzeugt, der/das dazu bestimmt ist, 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.“ (Art. 3, Absatz 1 a) |
| 2) Nanomaterial | „einen natürlichen oder hergestellten Wirkstoff oder nicht wirksamen Stoff, der Partikel in ungebundenem Zustand, als Aggregat oder als Agglomerat enthält und bei dem mindestens 50% der Partikel in der Anzahlgrößenverteilung ein oder mehrere Außenmaße im Bereich von 1 nm bis 100 nm haben. Fullerene, Graphenflocken und einwandige Kohlenstoff-Nanoröhren mit einem oder mehreren Außenmaßen unter 1 nm sind als Nanomaterialien zu betrachten“ |
| 2.1.) Partikel | „sehr kleines Teilchen einer Substanz mit definierten physikalischen Grenzen“ |
| 2.2.) Agglomerat | “Ansammlung schwach gebundener Partikel oder Aggregate, in der die resultierende Oberfläche ähnlich der Summe der Oberflächen der einzelnen Bestandteile ist“ |
| 2.3.) Aggregat | „Partikel aus fest gebundenen oder verschmolzenen Partikeln“ (Art. 3, Absatz 1 z). |

In der Biozidverordnung werden 22 unterschiedliche Biozidproduktarten unterschieden, welche wiederum 4 Hautgruppen zugeordnet sind. Tabelle 2 zeigt die Einteilung unterschiedlicher Biozidprodukte in die 4 Hauptgruppen: 1) Desinfektionsmittel, 2) Schutzmittel, 3) Schädlingsbekämpfungsmittel und 4) Sonstige Biozidprodukte.

Tabelle 2: Hauptgruppen der Biozidprodukte gemäß VO (EU) 528/2012

| | |
|--------------------------------|--|
| 1) Desinfektionsmittel | Produkte für die menschliche Hygiene, Oberflächendesinfektionsmittel, Desinfektionsmittel für: Veterinärbereich, Trinkwasser, Lebens- und Futtermitteldesinfektion |
| 2) Schutzmittel | Schutzmittel für Produkte während der Lagerung, Beschichtungsmittel, Holzschutzmittel, Schutzmittel für Fasern, Leder, Gummi und polymerisierte Materialien, Schutzmittel für Baumaterialien, Schutzmittel für Flüssigkeiten in Kühl- und Verfahrenssystemen, Schleimbekämpfungsmittel, Schutzmittel für Bearbeitungs- und Schneideflüssigkeiten |
| 3) Schädlingsbekämpfungsmittel | Rodentizide, Avizide, Bekämpfungsmittel gegen Mollusken und Würmer, Produkte gegen andere Wirbellose, Fischbekämpfungsmittel, Insektizide, Akarizide, andere Produkte gegen Arthropoden, Repellentien, Lockmittel, Produkte gegen sonstige Wirbeltiere |
| 4) sonstige Biozidprodukte | Antifouling-Produkte, Flüssigkeiten zur Einbalsamierung, Taxidermie (Haltbarmachung Tierkadavern) |

2.3.2 Einsatz und Gruppen von Bioziden

Es gibt eine Vielzahl biozid wirkender Stoffe, wobei im Folgenden nur die Wirkstoffe erläutert werden, die in den Untersuchungen im Rahmen der Dissertationsschrift berücksichtigt wurden.

2.3.2.1 Quartäre Ammoniumverbindungen

Quartäre Ammoniumverbindungen (QAVs) sind wirtschaftlich bedeutsame Industriechemikalien, die zur Gruppe der kationischen Tenside zählen. QAVs sind Stoffe mit einer hydrophoben Alkylkette und einer hydrophilen (wasserlöslichen) Gruppe, weshalb sie sich an die Lipidschicht lebender Organismen anreichern können. Dabei sind sie jedoch nur mikrobiozid wirksam, wenn der am N-Atom gebundene Alkylrest eine Kettenlänge von 8 - 18 C-Atomen aufweist (KULAPINA et al. 2013). Zur Gruppe der QAVs zählen unter anderem Benzethoniumchlorid (BEN), Benzalkoniumchlorid (BKC), Alkyldiaminoethylglycinhydrochlorid (ADH). Quartäre Ammoniumverbindungen sind die am häufigsten eingesetzten Desinfektionsmittel (GERBA 2015). Sie sind zudem in Reinigern, Seifen und Algenvernichtungsmitteln enthalten. Produkte, die Benzalkoniumchlorid und Dialkyldimethylammoniumchlorid enthalten, sind frei verkäuflich. Aber auch im öffentlichen

2. Literaturübersicht

und industriellen Bereich werden QAVs häufig eingesetzt, z. B. in Krankenhäusern, Lebensmittelunternehmen oder landwirtschaftlichen Betrieben. Die keimabtötende Wirkung der QAVs beruht auf der Interaktion mit der Zellwand und Zellmembran und anschließender Zellauflösung durch endogene Enzyme (MCDONELL u. RUSSELL 1999). Aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften sind sie zudem wirksam gegen lipidhaltige Viren (Influenzaviren), jedoch werden auch lipidfreie Viren (Enteroviren, Rotaviren, Hepatitis A-Viren und Noroviren) und Sporen in Abhängigkeit der Wirkstoffkombination durch sie angegriffen (GERBA 2015). Darüber hinaus interagieren QAVs mit intrazellulären Zielstrukturen und sind fähig, an die DNA der Zelle zu binden (ZINCHENKO et al. 2004). In geringen Konzentrationen wirken sie bakteriostatisch, sporostatisch, algistatisch, mykobakteriostatisch und fungistatisch. In hohen Konzentrationen sind QAVs abhängig von Wirkstoff und Organismus bakterizid, sporozid, algizid, mykobakteriozid und fungizid wirksam (GERBA 2015).

2.3.2.2 Biguanidine

Ein sehr populärer Wirkstoff aus der Klasse der Biguanidine ist Chlorhexidin. Es wird vorwiegend in Produkten für die Handwäsche, in Mitteln zur Hautdesinfektion und zur Mundhygiene eingesetzt, da es gut verträglich ist und kaum zu Irritationen führt. Chlorhexidin wirkt bakterizid, antiviral, sporostatisch und mykobakteriostatisch. Die Wirksamkeit ist jedoch pH-Wert abhängig und wird durch organisches Material eingeschränkt (MCDONELL u. RUSSELL 1999).

2.3.2.3 Acridine

Acriflavin gehört zur Gruppe der Acridine, wird jedoch teilweise auch als QAV eingeordnet (KAWAI u. YAMAGISHI 2009). Acriflavin wird vor allem zur Wundbehandlung eingesetzt. Durch Zerstörung der Zellmembran wirkt es antimikrobiell.

2.3.2.4 Schwermetalle

Schwermetalle bzw. ihre Ionen wie Silber (Ag^+), Kupfer (Cu^{2+}) und Zink (Zn^{2+}) werden aufgrund ihrer antimikrobiellen Wirkung seit langer Zeit zur Keimreduktion eingesetzt

(MCDONELL u. RUSSELL 1999; CASTELLANO et al. 2007). Silberverbindungen werden vor allem zur Wundversorgung und zur Behandlung von Augeninfektionen angewendet. Dagegen werden Kupfersulfat und Zinkoxid als Futterzusatzstoffe in supranutritiven Mengen verfüttert, um die Darmflora der Tiere zu unterstützen und zur Wachstumsverbesserung beizutragen (AARESTRUP et al. 2004, CAVACO et al. 2011). Da größere Mengen an antimikrobiell wirkenden Futterzusatzstoffen (z. B. Zink und Kupfer) jedoch die Entstehung von Antibiotikaresistenzen durch Kreuz- und Ko-Selektion fördern und das Ausbringen von Gülle mit hohen Schwermetallkonzentrationen auf landwirtschaftlichen Nutzflächen zur Anreicherung dieser Substanzen in den Böden beiträgt, werden in letzter Zeit die erlaubten Höchstmengen dieser Substanzen in der Tierfütterung reduziert. Das Gemeinschaftsregister listet alle aktuell zugelassenen Futtermittelzusatzstoffe (VO (EU) NR. 1831/2003; European Union Register of Feed Additives), während in der Durchführungsverordnung (EU) 2016/1095 folgende Höchstmengen beispielsweise für Zinkoxid angegeben werden: maximal 150 mg/kg in der Schweine/Ferkelfütterung, 200 mg/kg bei Katzen und Hunden und 180 mg/kg im Milchaustauschfuttermittel für Kälber. Darüber hinaus wurde kürzlich die Zulassung für einige Futtermittelzusatzstoffe (Zinkcarbonat, Zinklactat und Zinkchlorid) für alle Tierarten zurückgenommen (Durchführungsverordnung (EU) 2017/1145). Der genaue Wirkmechanismus der Schwermetalle wie Silber und dessen Salze ist jedoch noch ungeklärt (MCDONELL u. RUSSELL 1999; RANDALL et al. 2013). Bekannt ist jedoch, dass Silberionen innerhalb von 30 Minuten während der Exposition in das Innere der Bakterienzelle eindringen, in der Zellhülle akkumulieren und an zytoplasmatische Komponenten, Proteine und Nukleinsäuren binden (YAMANAK et al. 2005; JUNG et al. 2008). Anschließend kommt es zur Zellyse mit Zytoplasmaverlust (KĘDZIORA et al. 2018). Der Status, in den Silberionen bakterielle Zellen versetzen, wird von JUNG et al. (2008) als „active but nonculturable“ (ABNC) bezeichnet.

2.3.3 Mögliche Risiken durch einen Einsatz von Bioziden und Schwermetallen

Die Möglichkeit, dass der Einsatz von Bioziden ein Risiko für die Selektion von resistenten Bakterien darstellt, wird kontrovers diskutiert. Dabei werden zumeist zwei grundsätzliche Bedenken geäußert: 1) Es gibt Mechanismen - wie „multidrug Effluxpumpen“ - die bei Überexpression simultan Resistenz gegenüber Antibiotika und Bioziden vermitteln

2. Literaturübersicht

(Kreuzresistenz); 2) Gene, welche Biozidtoleranz vermitteln, können gemeinsam mit Antibiotika-Resistenzgenen auf mobilen genetischen Elementen (z. B. Plasmiden) lokalisiert sein. Bei einer Übertragung der Biozidtoleranz-vermittelnden Gene im Rahmen des horizontalen Gentransfers können gleichzeitig Antibiotika Resistenzgene übertragen werden (Co-Selektion) (COELHO et al. 2013). Es wird aber angenommen, dass bakterielle Toleranzen gegenüber Bioziden aufgrund der Menge an unspezifischen Zielstrukturen in der Bakterienzelle seltener auftreten (POOLE 2002). Antibiotika greifen dagegen in der Regel jeweils spezifische Zielstrukturen in oder an der Bakterienzelle an, sodass Bakterien leichter Resistenzmechanismen entwickeln und weitergeben können. AKIMITSU et al. (1999) zeigten, dass MRSA-Mutanten, die resistent gegenüber Benzalkoniumchlorid waren, ebenfalls unempfindlicher gegenüber β -Laktam-Antibiotika waren als der Elternstamm. YAMAMOTO et al. (1988) entdeckten ein Multiresistenzplasmid in einem *S. aureus*-Isolat, das Resistenzen gegenüber Kanamycin, Gentamicin, Tobramycin, Amikacin, Acriflavin, Ethidiumbromid, sowie Chlorhexidin und Benzalkoniumchlorid vermittelt. CHUANCHUEN et al. (2001) zeigten, dass die Exposition von Bakterien gegenüber Triclosan für antimikrobielle Multiresistenzen via Aufregulation von Effluxpumpen selektieren kann, wobei Triclosan als Substrat von drei verschiedenen Effluxpumpen fungiert. Dagegen belegen andere Studien, dass Antibiotika-resistente Isolate nicht zwangsläufig auch Resistenz gegenüber Bioziden entwickeln (AL-MASAUDI et al. 1991; SULLER u. RUSSELL 2000; WEBER u. RATULA 2006). Insgesamt scheint es möglich zu sein, dass ein weitverbreiteter und unkontrollierter Einsatz von Bioziden wie von Silber dazu führt, dass gleichzeitig auf bakterielle Resistenzen gegenüber Antibiotika selektiert wird (SILVER 2003).

2.4 Verpackung von Lebensmitteln

Die Verpackung bietet dem Lebensmittel Schutz vor äußeren negativen Einflüssen wie Feuchtigkeit, Licht, mechanischer Beschädigung oder bakterieller und anderer (z. B. Schmutz, Parasiten) Kontamination, verhindert, dass Lebensmittel austrocknen, Aromastoffe verlieren und sorgt dafür, dass sich vorhandene Mikroorganismen langsamer oder gar nicht vermehren (ZAKRYS et al. 2009).

2.4.1 Rechtliche Regelungen für Verpackungen von Lebensmitteln/Kontaktmaterialien

In der VO (EG) 1935/2004 werden allgemeine Anforderungen über das Inverkehrbringen von Materialien und Gegenständen, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen (Lebensmittelkontaktmaterialien) bestimmt, während die VO (EU) 10/2011 genauere Vorgaben für Lebensmittelkontaktmaterialien aus Kunststoff festlegt. Die VO (EU) 1935/2004 gilt für Materialien und Gegenstände, einschließlich aktiver und intelligenter „Lebensmittelkontaktmaterialien und -gegenstände, die als Fertigerzeugnis

- a) dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen, oder
- b) bereits mit Lebensmitteln in Berührung sind und dazu bestimmt sind oder
- c) vernünftigerweise vorhersehen lassen, dass sie bei normaler oder vorhersehbarer Verwendung mit Lebensmitteln in Berührung kommen oder ihre Bestandteile an Lebensmittel abgeben.“

Darunter fallen zum einen Verpackungsmaterialien, Verarbeitungsmaschinen, Rohrleitungen, Transportbänder, Geschirr, Besteck und vieles mehr. Die Verordnung gilt nicht für Überzugs- und Beschichtungsmaterialien, wie Materialien zum Überziehen von Käserinden, Fleisch- und Wurstwaren oder Obst, die mit dem Lebensmittel ein Ganzes bilden und mit diesem verzehrt werden können. Nach der VO (EG) 1935/2004 sind die Lebensmittelkontaktmaterialien nach guter Herstellungspraxis so herzustellen, „dass sie unter den normalen oder vorhersehbaren Verwendungsbedingungen keine Bestandteile auf Lebensmittel in Mengen abgeben, die geeignet sind, die menschliche Gesundheit zu gefährden, eine unvermeidbare Veränderung der Zusammensetzung der Lebensmittel oder eine Beeinträchtigung der organoleptischen Eigenschaften der Lebensmittel herbeizuführen“. In Art. 3 wird festgelegt, dass aktive Materialien und Gegenstände keine Veränderungen der Zusammensetzung oder der organoleptischen Eigenschaften von Lebensmitteln herbeiführen dürfen, die den Verbraucher irreführen könnten. Hierzu zählt beispielsweise das Kaschieren des Verderbs von Lebensmitteln. Die VO (EG) 10/2011 legt fest, dass grundsätzlich keine Stoffe mit Nanostruktur als Lebensmittelkontaktmaterialien zugelassen sind. Begründet wird dieses mit den anderen bzw. teils unbekanntem physikalischen und chemischen Eigenschaften der Nanopartikel. Auf nationaler Ebene werden Lebensmittelkontaktmaterialien durch die

Bedarfsgegenständeverordnung (BedGgstV) geregelt. Die Verordnung legt fest, welche Materialien für Lebensmittelbedarfsgegenstände erlaubt sind und wie hoch der Anteil der Stoffe, die aus der Verpackung in die Lebensmittel übergehen (Migration), sein darf.

2.4.2 Verpackungsarten

Die unterschiedlichen Nährstoffe im Fleisch bieten typischen Verderbnis assoziierten Mikroorganismen und Lebensmittelpathogenen ideale Wachstumsbedingungen (ZHOU et al. 2010). Aus diesem Grund ist es umso wichtiger, durch adäquate haltbarkeitsgarantierende Technologien die Sicherheit und Qualität des Fleisches zu gewährleisten (AYMERICH et al. 2008). Um diesen Ansprüchen zu genügen, werden neue Technologien im Bereich der Lebensmittelverpackungen, welche die Haltbarkeit der Produkte verlängern, entwickelt (HAN 2003; CHA u. CHINNAN 2004; OZDEMIR u. FLOROS 2004). Beim sogenannten “active packaging”, bei dem der Gasraum in der Verpackung verändert wird, wird die sensorische Qualität des Produktes (Aussehen, Geruch) verbessert, das mikrobielle Wachstum reduziert und dadurch die Haltbarkeit verlängert (DEBEAUFORT et al. 2000; QUINTAVALLA u. VICINI 2002; HAN 2003; SUPPAKUL et al. 2003). Obwohl die Farbe des Fleisches ein sehr schlechter Anhaltspunkt für die Qualität des Fleisches ist, richten sich Verbraucher bei ihrer Auswahl vorwiegend nach der Farbe des Fleisches, die nach ihren Gesichtspunkten die Bekömmlichkeit und Frische des Produktes widerspiegelt (KROPF 1980; MANCINI u. HUNT 2005; MORRISSEY et al. 2008).

2.4.2.1 Schutzgasverpackungen (Modified Atmosphere Packaging MAP)

In Deutschland wird Frischfleisch vorwiegend mit Gasgemischen versetzt, die einen hohen Sauerstoffanteil haben. Daneben werden Kohlenstoffdioxid und Stickstoff in veränderlichen prozentualen Anteilen zugesetzt. Kohlenstoffdioxid verzögert das mikrobielle Wachstum (BORCH et al. 1996; CARPENTER et al. 2001). ROSSAINT et al. (2015) untersuchten beispielsweise MAP mit hohem (70% O₂, 30% CO₂) und ohne Sauerstoffanteil (70% N₂, 30% CO₂) hinsichtlich Unterschieden der mikrobiellen, sensorischen und chemischen Fleischbeschaffenheitsparameter. Sie konnten feststellen, dass eine anaerobe Lagerung das

Wachstum von *Lactobacillus* spp. und aerobe Lagerung das Wachstum von *B. thermosphacta* begünstigt. Bezüglich der sensorischen und chemischen Parameter wurden keine Unterschiede beobachtet, sodass sich insgesamt keine positive Wirkung von MAP mit hohem O₂-Anteil hinsichtlich Haltbarkeit und Qualitätserhaltung bei Geflügel filets zeigte. Demgegenüber wiesen BLACHA et al. (2014) geringe aber messbare Vorteile von MAP mit hohem Sauerstoffanteil für Putenfilets nach.

2.4.2.2 Vakuumverpackungen (VP)

Neben den Verpackungen, die ein Gasgemisch enthalten, werden Fleisch und Fleischerzeugnisse auch unter Vakuum verpackt und verkauft. Unter Vakuum werden aerobe mikrobielle Wachstumsvorgänge reduziert, wodurch auch hier bei entsprechender Lagerung eine längere Haltbarkeit erreicht werden kann (TAYLOR et al. 1990). RAJKUMAR et al. (2007) konnten für Putenschnitzel eine Haltbarkeit von 21 Tagen in Vakuum beobachten, während die Haltbarkeit in MAP (80 % O₂ / 20 % CO₂) bei 14 Tagen lag.

2.4.2.3 Aktive Verpackungen (AP)

Aktive Verpackungen enthalten z. B. antibakteriell oder antioxidativ wirkende Bestandteile, die an das verpackte Lebensmittel abgegeben werden (SUNG et al. 2013). Als Bestandteile werden beispielsweise Silber, Wasabi und Ethanol eingesetzt (MEDIENDIENST DER FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT 2010). Andere Verpackungssysteme beinhalten CO₂-, O₂-, Ethylen- oder Feuchtigkeits-Binder oder emittieren CO₂ bzw. Ethanol (DE KRUIJF et al. 2002; HAN 2003; CHA u. CHINNAN 2004; OZDEMIR u. FLOROS 2004). Solche Bindsysteme, die bereits in Japan und den USA kommerziell vermarktet werden, können so unerwünschte Substanzen wie CO₂ und O₂, Feuchtigkeit und störende Gerüche aus dem Gasraum oder der Produktoberfläche absorbieren (LABUZA u. BREENE 1989; QUINTAVALLA u. VICINI 2002; HAN 2003).

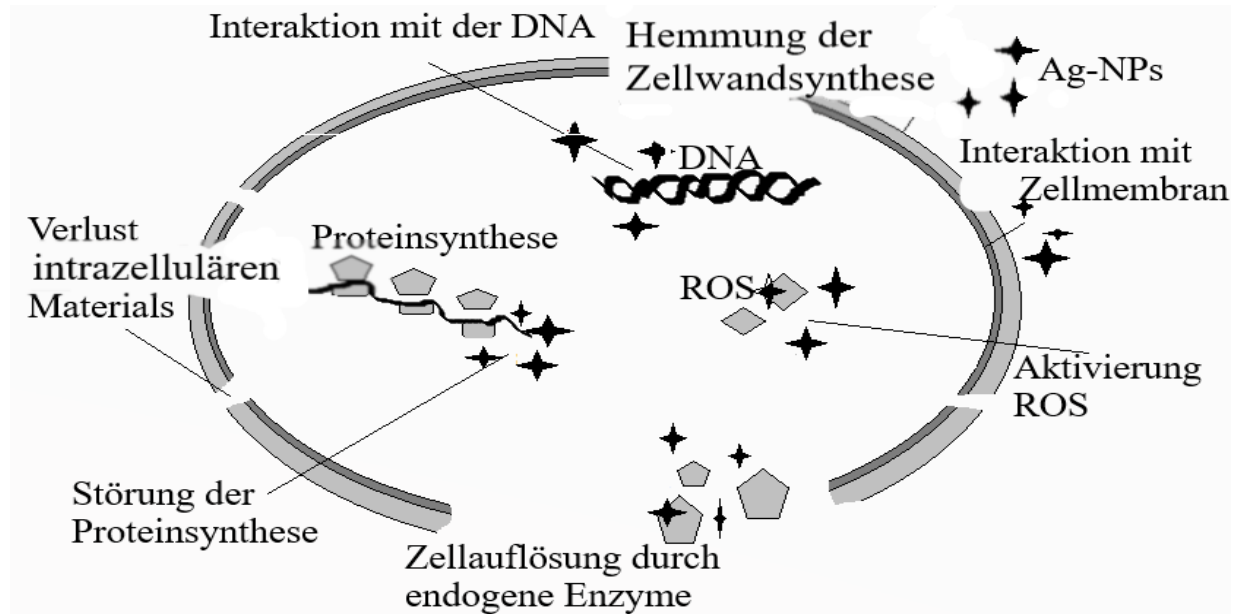
2.5 Nanosilber

Nanosilberpartikel (Ag-NPs) bestehen aus Silberteilchen einer Größe von 1-100 nm und liegen in verschiedenen Formen (sphärisch, irregulär, planar) vor, je nachdem wie sie hergestellt wurden (SHENG u. LIU 2017). Sie verfügen durch ihre kleine Größe über ein sehr hohes Oberflächen-Volumen-Verhältnis, wodurch sie sehr reaktiv sind und größere Mengen an Silberionen freisetzen, von denen angenommen wird, dass sie die biologisch wirksame Silberspezies darstellen (LOK et al. 2006; PARK et al., 2009; XIU et al. 2012). Andere metallische NPs z. B. aus Kupfer, Titan, Magnesium, Zink und Gold sind aufgrund ihres großen Oberflächen-Volumenverhältnisses ebenfalls potenziell biozid wirksam (GU et al. 2003; RETCHKIMAN-SCHABES et al. 2006). Silbernanopartikel scheinen unter allen metallischen NPs jedoch die antimikrobiell wirksamste Wirkung gegen Bakterien, Viren und eukaryotische Mikroorganismen zu haben (GONG et al. 2007). Zudem zeigen Ag-NPs eine höhere Toxizität gegenüber Mikroorganismen, als gegenüber humanen Zellen, wobei die genauen Auswirkungen von Nanosilberpartikeln auf menschliche Zellen noch nicht gänzlich geklärt werden konnten (RAI et al. 2009; GORENC 2012). XIU et al. (2012) zeigten, dass die Toxizität der Ag-NPs abhängig von der O₂-Anwesenheit ist und in Verbindung zur Freisetzung an Silberionen steht. Zudem konnten SÜTTERLIN et al. (2012) zeigen, dass die minimale bakterizide Konzentration von Silberionen für grampositive Bakterien 32-fach höher lag als für gramnegative Bakterien. Bezüglich der antibakteriellen Wirkung gegenüber Staphylokokken scheint die Zerstörung der inneren Membran durch Silberionen der wichtigste Mechanismus zu sein (RANDALL et al. 2013), wobei die antibakterielle Wirkung abhängig von Größe, Form, Konzentration und Dosis der NPs ist (MORONES et al. 2005; PAL et al. 2007; SHENG u. LIU 2017). Biologisch aktive Silberionen (Ag⁺) bilden unlösliche Komplexe mit den Sulfhydrylgruppen der zellwandassoziierten Transportproteine von Bakterien und Pilzen, wodurch der transmembrane Energiehaushalt und Elektrolyttransport der Zelle gestört wird (SAMUEL u. GUGGENBICHLER 2004). Außerdem interagieren Ag⁺ mit metabolischen Enzymen wie der NADH-Dehydrogenase und dem Transmembranprotein Cytochrom b, wodurch die Atmungskette und damit die ATP-Synthese beeinträchtigt wird (YAMANAKA et al. 2005). YANG et al. (2009) beschreiben, dass Ag⁺ durch die Bindung an die zelluläre DNA die Replikation inhibieren. Zudem führt die Penetration von Ag-NPs zur Schwächung der Membranintegrität und Schädigung der Zelle durch Nanosilber induzierte intrazelluläre

2. Literaturübersicht

Anreicherung von freien Sauerstoffradikalen (KIM et al. 2007; CHOI et al. 2008; CHATTERJEE 2015). Abbildung 2 zeigt, mit welchen Zielstrukturen Ag-NPs interagieren.

Abb. 2: Wirkungsmechanismen von Nanosilberpartikeln bei gram-positiven Bakterien



Laut RAI et al. (2012) und DURÁN et al. (2010) und einer Auflistung des „Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks“ (SCENIHR 2014) der Europäischen Union ist Nanosilber bereits in den unterschiedlichsten Produkten enthalten (Tabelle 3). Lebensmittelkontaktmaterialien und Lebensmittelzusatzstoffe, die Ag-NPs enthalten (Tabelle 4), sind in der EU jedoch bislang noch nicht generell zugelassen, sondern benötigen eine spezielle Genehmigung auf Einzelfallbasis aufgrund der Risikobewertung durch die EFSA. Diese Produkte aufzuspüren ist schwierig, da die Produkte unter verschiedensten Markennamen vertrieben werden und nur einige wenige Regularien [VO (EU) 1223/2009 über kosmetische Mittel, VO (EU) 1169/2011, VO (EU) 10/2011] die Angabe von Nanosilber als Bestandteil des Produktes fordern.

Tabelle 3: Einsatzbereiche von Nanosilber und Beispiele für Konsumgüter

| | |
|----------------------------|---|
| Gesundheit | Wundabdeckung, Textilien, Antiseptika, Krankenhausbetten und Einrichtungsgegenstände |
| Konsumprodukte im Haushalt | Babyfläschchen, Vorratsboxen, Salatschüsseln, Schneidebretter, Staubsauger, Geschirrspüler, Kühlschränke, Waschmaschinen, Toilettensitze, Badezimmerzubehör, Küchenzubehör, Bürsten, Glätteisen, Kämmen, Duschhauben, Zahnpasta, Deodorants, Zahnbürsten, Rasierapparate, Epilierer, Tierhaarwaschmittel, Tierkörbchen, Handläufe (Busse), Tastaturen, Handtrockner, Yogamatten, Laminierfolie, Klarsichtfolie, Bürozubehör |
| Bekleidung | Babykleidung, Unterwäsche, Socken, Schuhe, Badetücher, Kissen, Matratzenschoner, Handtücher |
| Lebensmittel | Verpackung, Nanobiotische Geflügelproduktion * |
| Konstruktion | Wandfarbe, Puderbeschichtung (Türkäufe), Klimaanlage, Bodenbeläge, Oberflächen, Krankenhaustüren |
| Desinfektionsmittel | Landwirtschaftliche, industrielle Desinfektionsmittel, Pool- und Aquakulturdessinfektionsmittel |

* in EU nicht zugelassen. Die Produkte können aber auf Einzelfallbasis eine Genehmigung erhalten.

Quelle: modifiziert nach (SCENIHR 2014)

Die Produkte sind in der EU nicht zugelassen (können aber auf Einzelfallbasis eine Genehmigung erhalten)!

Tabelle 4: Übersicht über den Einsatz von Nanosilber in der Lebensmittelkette

| Einsatzgebiet | Anwendung | Nanotechnologie | Funktion |
|-------------------------|--|--|--|
| Lebensmittelherstellung | Utensilien zur Lebensmittelzubereitung | eingearbeitete Nanosilberpartikel | antibakterielle Beschichtung in der Lebensmittelverarbeitung |
| Konservierung | Kühlschränke, Vorratsboxen | eingearbeitete Nanosilberpartikel | antibakterielle Beschichtung von Vorratsbehältnissen |
| | Lebensmittelprodukte | Nanosilbersprays | antibakterielle Wirkung |
| | Verpackungsmaterialien | eingearbeitete aktive Nanosilberpartikel | Sauerstofffänger, Prävention von bakteriellem Wachstum |
| Lebensmittelkonsum | Zusatzstoffe | kolloidale Metallnanopartikel | gewünschte Aufnahme steigern |

Quelle: modifiziert nach (SCENIHR 2014)

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zum einen a) die Empfindlichkeit von MRSA- und MSSA-Isolaten menschlicher und tierischer Herkunft gegenüber Silbernitrat und sieben weiterer Bioziden und b) der Nutzen einer Nanosilberfolie bezüglich Keimreduktion auf Schweinefleisch ermittelt werden.

Durch diese Arbeiten sollten Rückschlüsse auf die Empfindlichkeitslage von *S. aureus*, einem wichtigen, über Fleisch übertragbaren pathogenen Erreger gegenüber Bioziden möglich werden. Darüber hinaus wurden Zusammenhänge zwischen dem Vorhandensein von Biozidtoleranz vermittelnden Genen und einem Empfindlichkeitsverlust bei *S. aureus*-Isolaten gegenüber Bioziden ermittelt. Zudem war es Ziel zu analysieren, ob Unterschiede im Empfindlichkeitsstatus von *S. aureus*-Isolaten unterschiedlicher klonaler Linien oder in Abhängigkeit von der Herkunft der Isolate oder dem Infektionsstatus bestehen. Nach den In-vitro-Untersuchungen sollte in dieser Arbeit der Nutzen einer antimikrobiell beschichteten Lebensmittelkontaktfolie untersucht werden. Wichtige Parameter waren dabei die Auswirkungen der Nanosilberpartikel auf die Fleischbeschaffenheit, das Erscheinungsbild und die mikrobielle Kontamination des Schweinefleisches. Zudem wurde auch der Einfluss der Nanosilberfolie auf eine Kontamination von Schweinefleisch mit MRSA getestet.

3. Publikationen

3. Publikationen

Dieser Dissertation liegen zwei Publikationen zugrunde.

Publikation 1: Isa Adriana Kernberger-Fischer, Carsten Krischek, Birgit Strommenger, Ulrike Fiegen, Martin Beyerbach, Lothar Kreienbrock, Günter Klein, Corinna Kehrenberg

Susceptibility of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* isolates of various clonal lineages from Germany to eight biocides

Applied and Environmental Microbiology 84(13), e00799-18, published online May 4, 2018

<https://doi.org/10.1128/AEM.00799-18>

Die erste Publikation beschäftigt sich mit der Empfindlichkeitstestung von MRSA und MSSA Isolaten tierischer und menschlicher Herkunft gegenüber acht verschiedenen Bioziden, sowie der Prüfung auf Vorhandensein spezifischer Toleranz vermittelnder Resistenzgene.

Idee und Konzeption: C. Kehrenberg, C. Krischek, I Kernberger-Fischer

Experimentelle Umsetzung: I. Kernberger-Fischer, C. Kehrenberg, U. Fiegen

Auswertung der Ergebnisse: I. Kernberger-Fischer, C. Kehrenberg, M. Beyerbach, L. Kreienbrock

Verfassen des Manuskriptes: I. Kernberger-Fischer, C. Kehrenberg, C. Krischek

3. Publikationen

Publikation 2: Isa Kernberger-Fischer, Corinna Kehrenberg, Guenter Klein, Dirk Schaudien, Carsten Krischek

Influence of modified atmosphere and vacuum packaging with and without nanosilver-coated films on different quality parameters of pork

Journal of Food Science and Technology 54(10), 3251-3259, published online August 8, 2017

<https://doi.org/10.1007/s13197-017-2768-4>

Die zweite Publikation beschäftigt sich mit dem Einfluss, den Nanosilber beschichtete Verpackungsfolie auf verschiedene Fleischqualitätsparameter von natürlich kontaminierten und mit MRSA beimpften Schweineschnitzeln nimmt.

Idee und Konzeption: C. Krischek, C. Kehrenberg, I. Kernberger-Fischer

Experimentelle Umsetzung: I. Kernberger-Fischer, C. Krischek, D. Schaudien,

Auswertung der Ergebnisse: I. Kernberger-Fischer, C. Krischek, D. Schaudien,

Verfassen des Manuskriptes: I. Kernberger-Fischer, C. Krischek, C. Kehrenberg, D. Schaudien

3.1 Publikation 1

Susceptibility of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus*-isolates of various clonal lineages from Germany to eight biocides

ISA ADRIANA KERNBERGER-FISCHER,^a CARSTEN KRISCHEK,^a BIRGIT STROMMENDER,^b ULRIKE FIEGEN,^a MARTIN BEYERBACH,^c LOTHAR KREIENBROCK,^c GÜNTER KLEIN,^{a†} CORINNA KEHRENBERG^a

^a*Institute for Food Quality and Food Safety, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Hannover, Germany*

^b*National Reference Center for Staphylococci and Enterococci (Robert Koch Institute), Wernigerode, Germany*

^c*Department of Biometry, Epidemiology and Information Processing, WHO Collaborating Centre for Research and Training in Veterinary Public Health, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Hannover, Germany*

†deceased

Corresponding author: Corinna Kehrenberg,

E-mail address: Corinna.kehrenberg@tiho-hannover.de

Tel.: +49 5119537554; fax: +49 511 953 827554

DOI: 10.1128/AEM.00799-1

ABSTRACT Few studies have been conducted on the susceptibility of bacteria to biocides. A total of 182 methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* isolates collected from healthy or diseased humans and animals in Germany were included in the present study. Sixty-three isolates of animal origin and 119 human isolates were tested for their MICs to eight biocides or heavy metals by the broth microdilution method. The MIC₅₀ and MIC₉₀ values of human and animal isolates were equal or differed by not more than 1 dilution step, and statistical analysis revealed that differences between MICs of human and animal isolates were not significant. However, when taking into account the multilocus sequence type (MLST), a strong tendency ($P = 0.054$) to higher MICs of silver nitrate was detected for clonal complex 398 (CC398) isolates from humans compared to those from animals. Furthermore, a comparison of MIC values from isolates belonging to different clonal lineages revealed that important human lineages such as CC22 and CC5 exhibited significantly ($P < 0.05$) higher MICs for the biocides chlorhexidine, benzethonium chloride, and acriflavine than the main animal lineage sequence type 398 (ST398). Isolates with elevated MIC values were tested for the presence of biocide and heavy metal tolerance-mediating genes by PCR assays, and the following genes were detected: *mepA* (n [no. of isolates containing the gene] = 44), *ImrS* (n = 36), *norA* (n = 35), *sepA* (n = 22), *mco* (n = 5), *czrC* (n = 3), *smr* (n = 2), *copA* (n = 1), *qacA* and/or *-B* (n = 1), *qacG* (n = 2), and *qacJ* (n = 1). However, only for some compounds was a correlation between the presence of a biocide tolerance gene and the level of MIC values detected.

IMPORTANCE Biocides play an essential role in controlling the growth of microorganisms and the dissemination of nosocomial pathogens. In this study, we determined the susceptibility of methicillin-resistant and -susceptible *S. aureus* isolates from humans and animals to various biocides and heavy metal ions and analyzed differences in susceptibilities between important clonal lineages. In addition, the presence of biocide or heavy metal tolerance-mediating genes was investigated. We demonstrated that important human lineages such as CC22 and CC5 had significantly higher MIC values for chlorhexidine, benzethonium chloride, and acriflavine than the main farm animal lineage, ST398. In addition, it was shown that for some combinations of biocides and tolerance genes, significantly higher MICs were detected for carriers. These findings provide new insights into *S. aureus* biocide and heavy metal tolerance.

KEYWORDS MIC values, susceptibility testing, *Staphylococcus aureus*, biocides, heavy metals, tolerance

3.2 Publikation 2

Influence of modified atmosphere and vacuum packaging with and without nanosilver-coated films on different quality parameters of pork

ISA KERNBERGER-FISCHER*, CORINNA KEHRENBURG*, GUENTER KLEIN*¹,
DIRK SCHAUDIEN[#], CARSTEN KRISCHEK*²

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

[#]Fraunhofer-Institute for Toxicology and Experimental Medicine ITEM, Nikolai-Fuchs-Strasse 1, D-30625 Hannover, Germany

¹deceased

²Corresponding author:

E-mail address: Carsten.Krischek@tiho-hannover.de;

Tel.: +49 5118567617; fax: +49 511856827617.

DOI: 10.1007/s13197-017-2768-4

ABSTRACT Pork is often marketed in packages with high oxygen atmosphere (MAP) or vacuum to improve shelf life and appearance. As silver ions have antibacterial effects, food contact films coated with silver might improve the shelf life of meat. In the present study, pork was wrapped in commercially available films, coated with nanosilver particles, and stored in the two packaging variants MAP and vacuum for 12 days. During storage, samples were analyzed on days 1 (before packaging), 4, 8 and 12 for microbiological contamination, meat quality (e.g., pH, color), and for the percentages of the myoglobin (Mb) redox forms. In addition, the effects of the film were examined after inoculation of the meat with high quantities of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) cells before vacuum storage for 8 days. MAP storage resulted in higher lightness (L*) values, lower liquid loss and higher Mb oxidation compared to vacuum. Microbiological spoilage was partly affected by the packaging variants with reducing effects of the MAP. The nanosilvercoating only affects the Mb redox form percentages of the pork cutlets and on day 4 the L* values, whereas microbiological parameters were not influenced. As the nanosilver coating had no influence on the total viable bacteria counts as well as *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae* and MRSA counts, an advantage of the nanosilver coating on the shelf life could be excluded.

KEYWORDS Pig meat, Nanosilver film, Meat quality, Total viable counts, Chemical spoilage

4. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

Aus den Arbeiten dieser Dissertation sind zwei Publikationen zu folgenden Themen entstanden:

- a) Empfindlichkeitstestung von MRSA/MSSA-Isolaten gegenüber Bioziden einschließlich Silbernitrat
- b) Effektivität einer nanosilberbeschichteten Lebensmittelkontaktfolie bezüglich der mikrobiellen, physikalischen und chemischen Eigenschaften von beimpften (MRSA) und nicht beimpften Schweineschnitzeln.

Die **erste Publikation** befasste sich mit der Bestimmung von minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) von MRSA- und MSSA-Isolaten, die von Tieren, Menschen sowie in Umgebungsproben isoliert wurden, gegenüber den acht unterschiedlichen Bioziden Alkyldiaminoethylglycinhydrochlorid (ADH), Benzethoniumchlorid (BEN), Benzalkoniumchlorid (BKC), Acriflavin (ACR), Chlorhexidin (CHX), Kupfersulfat (COP) Silbernitrat (SIL) und Zinkchlorid (ZKC). Zusätzlich wurden Isolate, die einen erhöhten MHK-Wert gegenüber einem Biozid aufwiesen und - zu Vergleichszwecken - einige Isolate ohne erhöhte MHK-Werte (Vergleichsgruppe), mittels PCR und Southern Blotting auf das Vorhandensein und die Lokalisation ausgewählter Toleranz vermittelnder Gene (*lmrS*, *mepA*, *norA*, *sepA*, *qacA/B*, *qacG*, *qacH*, *qacJ*, *smr*, *copA*, *mco* und *czrC*) untersucht.

In der **zweiten Publikation** wurden Schweineschnitzel in vier verschiedene Verpackungsvarianten verpackt:

- 1) MAP (Modified Atmosphere Packaging) + unbeschichtete Lebensmittelkontaktfolie (bezeichnet als: MAP 1),
- 2) Vakuum + unbeschichtete Lebensmittelkontaktfolie (bezeichnet als: V 1),
- 3) MAP + Nanosilber beschichtete Lebensmittelkontaktfolie (bezeichnet als: MAP 2),
- 4) Vakuum + Nanosilber beschichtete Lebensmittelkontaktfolie (bezeichnet als: V 2).

In einem weiteren Versuch wurden Schweineschnitzel mit einem MRSA-Isolat inokuliert, mit einer unbeschichteten oder mit Nanosilber beschichteten Lebensmittelkontaktfolie bedeckt und während einer Lagerdauer von 8 Tagen unter Vakuum an mehreren Tagen (4 und 8) hinsichtlich der Veränderung der MRSA-Keimzahlen untersucht.

4.1 Bestimmung der Empfindlichkeit von *S. aureus*-Isolaten gegenüber Bioziden

Da für *S. aureus* keine oder nur sehr wenige Daten zu Empfindlichkeiten gegenüber Silber und anderen häufig eingesetzten Bioziden vorliegen, wurde im Rahmen der vorliegenden Studie der Empfindlichkeitsstatus Methicillin-sensibler und Methicillin-resistenter *S. aureus*-Isolate unter Verwendung eines Stammkollektivs, das Isolate von Menschen und unterschiedlichen Tierarten aus Deutschland beinhaltet, gegenüber Silbernitrat und weiteren Bioziden untersucht. Da sich die Anwendung von Bioziden im humanmedizinischen Bereich vom Hygienemanagement in der Tierhaltung und den dort eingesetzten Biozidprodukten unterscheidet, ist auch mit variierenden Empfindlichkeiten bei Isolaten von Menschen und Tieren zu rechnen, weshalb die ermittelten humanen Empfindlichkeitswerte mit denen von Isolaten tierischer Herkunft verglichen wurden. Vertiefende Analysen verglichen die Werte unterschiedlicher klonaler Linien von *S. aureus* gegenüber Silber und den anderen Bioziden miteinander. Anschließend erfolgte eine molekulargenetische Untersuchung einzelner Isolate, die eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber einem oder mehreren Bioziden aufwiesen. Dabei wurden die Isolate auf die Präsenz von Genen untersucht, die eine Biozidtoleranz vermitteln können. Ein Vergleich des Vorkommens von Toleranzgenen bei Isolaten mit einer reduzierten Empfindlichkeit [höhere Minimale Hemmkonzentrationswerte (MHK-Werte) im Vergleich zu den anderen Isolaten; MHK-Wert am rechten Rand der Verteilung] und Isolaten, die eine hohe Empfindlichkeit (niedriger MHK-Wert; MHK-Wert am linken Rand der Verteilung) gegenüber dem Biozid aufwiesen, wurde durchgeführt. Da sich zeigte, dass die MHK-Werte von MRSA- und MSSA-Isolaten humaner und tierischer Herkunft gegenüber Silber bzw. Silbernitrat sehr gering waren ($\text{MHK}_{90} = 4\mu\text{g/ml}$), konnte auf eine hohe Empfindlichkeit des Erregers geschlossen werden. Daher konnte Silber als vielversprechende Substanz ausgemacht werden, die bei einer Beschichtung von Lebensmittelkontaktmaterialien eine gute Wirksamkeit erwarten lassen würde. In einer anschließenden Studie wurde der Nutzen einer Nanosilber beschichteten Lebensmittelkontaktfolie bezüglich der allgemeinen Keimreduktion und der Haltbarkeitsverlängerung von Schweinefleisch in MAP- und Vakuumverpackungen untersucht. Aufgrund des zuvor festgestellten günstigen Empfindlichkeitsstatus war auch ein Inokulationsversuch mit einem MRSA-Isolat, mit welchem das verpackte Schweinefleisch kontaminiert wurde, Bestandteil dieser Studie.

4.2 Einordnung der Empfindlichkeitsdaten von MRSA- und MSSA-Isolaten

Die *In-vitro*-Empfindlichkeit von Bakterien gegenüber antimikrobiell wirkenden Stoffen wird üblicherweise als MHK-Wert angegeben. Die MHK ist dabei die geringste Konzentration eines Wirkstoffes, bei der nach einer definierten Testung kein sichtbares Bakterienwachstum im Nährmedium mehr auftritt (ANDREWS 2001). Dagegen gibt die minimale bakterizide Konzentration (MBK) die Konzentration eines Wirkstoffes an, die in der Lage ist 99,9% der Bakterien unter definierten Versuchsbedingungen abzutöten (ANDREWS 2001). Zur Ermittlung der antimikrobiellen Wirksamkeit von Substanzen wird die Angabe der MBK bevorzugt, während Informationen über den Empfindlichkeitsstatus innerhalb einer Population von Bakterien vorwiegend mittels MHK-Werten angegeben werden. Folglich wurden die 182 MRSA und MSSA-Isolate von gesunden oder erkrankten Menschen (n=119) und Tieren (n=63) in dieser Arbeit auf ihre MHK-Werte gegenüber Silbernitrat und sieben weiteren Bioziden untersucht. Beachtenswert ist, dass die Bewertung der Ergebnisse der Empfindlichkeitstestungen nicht anhand von offiziell anerkannten epidemiologischen *cut-off*-Werten (ECOFFs) erfolgen konnte, da diese (bis auf ganz wenige zum Teil variierende Empfehlungen) bis zum jetzigen Zeitpunkt für Biozide fehlen. Mittels der epidemiologischen *cut-off*-Werte lassen sich Bakterienisolate z. B. bei Untersuchungen zur Antibiotikaempfindlichkeit in zwei Gruppen einteilen: 1) dem Wildtyp = vermutlich ohne erworbene Resistenzmechanismen und 2) einem Nicht-Wildtyp = vermutlich mit erworbenen Resistenzmechanismen bezüglich der entsprechenden antimikrobiellen Substanz (EUCAST 2018). Anders als bei Empfindlichkeiten von Bakterien gegenüber Antibiotika lassen sich Bakterienisolate aufgrund ihrer MHK-Werte gegenüber Bioziden auch nicht in die Kategorien sensibel, intermediär und resistent einteilen, da klinische Grenzwerte hier keine Anwendung finden können. Bei Betrachtung der MHK-Verteilungskurven (z. B. unimodale oder bimodale Verteilungskurve) könnten jedoch vermutliche Wildtyp-Isolate von Nicht-Wildtyp-Isolaten unterschieden werden. Zudem ist es möglich die Empfindlichkeit eines Isolates im Vergleich zu den anderen Isolaten zu erfassen (z. B. Isolate mit MHK-Werten am rechten Ende der Verteilungskurve können als toleranter bezeichnet werden und Isolate am linken Ende der Verteilungskurve als empfindlicher).

Da Silber im Fokus dieser Arbeit stand, wird dieses Schwermetall in den folgenden Abschnitten getrennt von den anderen Bioziden beschrieben und diskutiert.

4.2.1 Empfindlichkeit gegenüber Silber

Die mittels Mikrodilution ermittelten MHK-Werte des Stammkollektivs für Silbernitrat lagen zwischen 2 und 16 µg/ml. Die Verteilungskurve zeigte einen unimodalen Verlauf, sodass kein Hinweis auf Bildung einer toleranten Subpopulation erkennbar war. Die MHK_{50/90}-Werte der humanen Isolate betragen jeweils 4 µg/ml, während für die Isolate tierischen Ursprungs MHK_{50/90}-Werte von 2 bzw. 4 µg/ml ermittelt wurden. Tabelle 5 fasst die Ergebnisse unterschiedlicher in der Literatur verfügbaren Empfindlichkeitsstudien von *S. aureus*-Isolaten gegenüber Silber und Silberverbindungen zusammen. Die Tabellen 5 bis 10 erheben dabei keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Wie aus Tabelle 5 ersichtlich ist, ermittelten YUAN et al. (2017) und LKHAGVAJAV et al. (2011) Empfindlichkeitsdaten, die denen der vorliegenden Studie sehr nahe kommen. Mittels Mikrodilution wurde in der Studie von YUAN et al. (2017) für ein aus Ziegenmilch isoliertes multidrug-resistentes (MDR) *S. aureus*-Isolat ein MHK-Wert von 2 µg/ml bestimmt, während LKHAGVAJAV et al. (2011) für einen *S. aureus*-Teststamm einen MHK-Wert von 4 µg/ml ermittelten. SARKAR et al. (2007) ermittelten mittels Agardilution MHK-Werte für drei unterschiedliche *S. aureus*-Isolate. Dabei wurden ebenfalls Werte im Bereich von 2 bzw. 4 µg/ml erfasst. Weitere Studien zeigten etwas höhere MHK-Werte gegenüber Silber. CAVACO et al. (2010) untersuchten die Empfindlichkeit eines *S. aureus*-Teststammes bzw. eines Empfängerstammes und dessen Klone mit und ohne Zink- und Cadmiumtoleranz vermittelndem *czrC*-Gen, wobei bei allen drei Isolaten MHK-Werte von 21 µg/ml festgestellt wurden. EGGER et al. (2009) verwendeten einen Oxacillin-sensiblen Teststamm zur Empfindlichkeitstestung gegenüber Silber-Zeolith, Silbernitrat und Nanosilber, für die sich MHK-Werte von 16,6 bzw. 15,6 bzw. 250 µg/ml bei Verwendung der Makrodilutionsmethode zeigten. Wie bei den zuvor beschriebenen Studien wurden die Ergebnisse nur für ein einzelnes Isolates bestimmt, sodass man bei der Einordnung dieser Werte keine generellen Aussagen treffen kann. In zwei weiteren Studien wurden noch höhere MHK-Werte für Nanosilberpartikel (Ag-NPs) angegeben. SHARIFI-RAD et al. (2014) ermittelten per Mikrodilution für einen MRSA-Teststamm einen MHK-Wert von 5600 µg/ml gegenüber Nanosilber. ABDEL RAHIM u. ALI MOHAMED (2015) untersuchten mittels Mikrodilution 30 MRSA-Isolate, die aus Blut, Urin und Eiter gewonnen wurden und gaben für diese Isolate einen mittleren MHK-Wert von 100 µg/ml gegenüber Ag-NPs an. Die stark variierenden MHK-Werte dieser Studien lassen sich zum einen durch die kleine Anzahl an getesteten Isolaten

4. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

erklären, die nicht ausreicht um Rückschlüsse auf Empfindlichkeitsniveaus von *S. aureus* gegenüber Silber und Nanosilber in einer größeren Population ziehen zu können. Zum anderen wurden unterschiedliche Methoden zur Empfindlichkeitstestung und unterschiedliche Silberverbindungen (Silbernitrat, Silber-Zeolith und Nanosilber) verwendet, welches die Vergleichbarkeit der Werte stark einschränkt. Obwohl die antimikrobielle Wirkung von Silber oder Nanosilber noch nicht gänzlich verstanden ist (FENG et al. 2000; BUTKUS et al. 2003), ist bekannt, dass der inhibitorische Effekt auf das bakterielle Wachstum von den freigesetzten Silberionen abhängt (MORONES et al. 2005; LOK et al. 2007). Daher kann man vermuten, dass die Herkunft der Silberionen, sprich die Silberverbindung (z. B. AgNO₃), bei einem Vergleich der Empfindlichkeitswerte zu vernachlässigen wäre, jedoch werden je nach Ausgangsstoff (Nanosilber, Silbernitrat; Silber-Zeolith) unterschiedliche Mengen an Ionen freigesetzt. Beispielsweise werden erst durch Interaktion mit einer flüssig-wässrigen Phase Silberionen aus Silber beinhaltender Polymer-Matrices (z. B. PE) gelöst und freigesetzt (KUMAR u. MÜNSTEDT 2005). Auf diese Weise tragen geringere oder höhere Freisetzungsraten von Ag⁺-Ionen ebenfalls zu unterschiedlichen Empfindlichkeitsergebnissen bei. Beachtenswert ist, dass Nanosilber im Vergleich zu Silbernitrat in einigen Studien eher in sehr hohen Konzentrationen das Wachstum unterschiedlicher *S. aureus*-Isolate hemmen konnte (EGGER et al. 2009; SHARIFI-RAD et al. 2014; ABDEL RAHIM u. ALI MOHAMED 2015), obwohl Nanosilber aufgrund des größeren Oberflächen-Volumen-Verhältnisses im Allgemeinen als stärker antimikrobiell wirksam gilt als größere Silberpartikel. Demgegenüber zeigte sich Silbernitrat in der vorliegenden Studie und in der Studie von EGGER et al. (2009) schon in geringeren Konzentrationen als antibakteriell wirksam. Weiterhin lässt sich auch kein Zusammenhang zwischen der Höhe der MHK-Werte und der Herkunft der Isolate aus unterschiedlichen Regionen ausmachen (Tabelle 5), da in den Studien größtenteils Referenzstämme zur Testung herangezogen wurden. Besonders interessant wären dabei MHK_{50/90}-Werte von Isolaten aus Ländern, in denen nachweislich ein verstärkter Einsatz von silberhaltigen medizinischen, lebensmittel-assoziierten oder verbrauchernahen Produkten stattfindet. Dies wird beispielsweise aus China oder Japan berichtet (RAI et al. 2009; BUMBUDSANPHAROKHE u. KO 2015; SYAFIYUDDIN et al. 2017). Aufgrund des Mangels an anerkannten epidemiologischen *cut-off*-Werten für Silber können die verwendeten Isolate

4. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

nicht in Wildtyp und Nicht-Wildtyp unterschieden werden. Es wurde lediglich ein visuell ermittelter *cut-off*-Wert $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ für die untersuchte Stammkollektion bestimmt.

4.2.1.1 Empfindlichkeiten anderer Bakterienspezies gegenüber Silber

Da nur sehr wenige MHK-Werte für *S. aureus* in der Literatur verfügbar sind, wurden auch die Empfindlichkeitswerte weiterer Bakterienspezies als Vergleich zu den hier ermittelten Werten herangezogen. Die Studien von MORONES et al. (2005) und SARKAR et al. (2007) ermittelten MHK-Werte im Bereich von 2 - 75 $\mu\text{g/ml}$ für *E. coli* gegenüber Silber. Diese MHK-Werte liegen auf ähnlich niedrigem Niveau wie die MHK-Werte der drei getesteten *S. aureus*-Stämme (SARKAR et al. 2007) und in vorliegender Studie ermittelter Daten. Auch DEUS et al. (2017) ermittelten mittels Mikrodilutionsplatten für Silbernitrat einen MHK-Bereich von 2 bis 4 $\mu\text{g/ml}$ und $\text{MHK}_{50/90}$ -Werte von 2/4 $\mu\text{g/ml}$ jeweils für *E. coli*-Isolate von Menschen und Geflügel, die den in der vorliegenden Studie ermittelten Empfindlichkeitsdaten sehr ähnlich sind. Staphylokokken sind aufgrund ihrer Zellwandstruktur weniger empfindlich gegenüber Ag^+ -Ionen als gramnegative Bakterien wie *E. coli*. Diese Beobachtung wird durch die negativ geladenen Bestandteile Teichonsäure und Lipoteichonsäure der Zellwand, die aus Peptidoglycanen besteht, erklärt. Die positiv geladenen Silberionen werden von den negativ geladenen Zellwandbestandteilen gebunden, wodurch sie von ihren „normalen“ Bindungsstellen ferngehalten werden und ihr Eindringen in grampositive Zellen gehemmt wird (VOLESKY 2001; WANG u. CHEN 2009). Obwohl *S. aureus* gemäß dieses Sachverhalts als resistenter gegenüber Silber einzuordnen wäre als gramnegative Bakterien, konnten in der vorliegenden Arbeit und anderen Studien ähnlich niedrige MHK-Werte bei beiden Spezies ermittelt werden (SARKAR et al. 2007; LKHAGVAJAV et al. 2011; YUAN et al. 2017).

Tabelle 5: Empfindlichkeitsstudien von *S. aureus*-Isolaten gegenüber Silber

| Biozid | Charakteristika der Isolate | | | | MHK-Werte ($\mu\text{g/ml}$) | | Testmethode | Referenz |
|--------------------------------|-----------------------------|------------|----------|---|--------------------------------|----------------------|----------------------------|---------------------------------|
| | Land | Anzahl (n) | Herkunft | Ursprung der Isolate oder Bezeichnung der verwendeten Stämme | Bereich oder Wert | MHK _{50/90} | | |
| AgNO ₃ ¹ | Deutschland | 63 | Tier | Geflügelhaltung, Umgebung Tierarztpraxis, Wildschwein, Milchkuh, Haustier | 2-8 | 4/4 | Mikrodilution ⁷ | Eigene Arbeit |
| AgNO ₃ | Deutschland | 119 | Mensch | infizierte oder kolonisierte Menschen | 2-16 | 2/4 | Mikrodilution | Eigene Arbeit |
| AgNO ₃ | Schweiz | 1 | n. b. | <i>S. aureus</i> ATCC 29213 | 15,6 | n. b. ⁹ | Makrodilution ⁸ | EGGER et al. 2009 |
| AgNO ₃ | Dänemark | 3 | n. b. | <i>S. aureus</i> RN4220 ⁴ RN4220 + pAT18 ⁵ RN4220 + pAT18 mit <i>czrC</i> | 21 21 21 | n. b. | Agardilution | CAVACO et al. 2010 |
| Ag-Zeo ² | Schweiz | 1 | n. b. | <i>S. aureus</i> ATCC 29213 | 15,6 | n. b. | Makrodilution | EGGER et al. 2009 |
| Ag-Nps ³ | Schweiz | 1 | n. b. | <i>S. aureus</i> ATCC 29213 | 250 | n. b. | Makrodilution | EGGER et al. 2009 |
| Ag-Nps | Türkei | 1 | n. b. | <i>S. aureus</i> ATCC 6538-P | 4 | n. b. | Mikrodilution | LKHAGVAJAV et al. 2011 |
| Ag-Nps | Iran | 1 | n. b. | MRSA ATCC 14458 | 5600 | n. b. | Mikrodilution | SHARIFI-RAD et al. 2014 |
| Ag-Nps | Saudi Arabien | 30 | Mensch | MRSA aus Krankenhaus (isoliert aus Blut, Urin, Eiter) | 100 | 100/100 | Mikrodilution | ABDEL RAHIM u. ALI MOHAMED 2015 |
| Ag-Nps | China | 1 | Tier | MDR- <i>S. aureus</i> ⁶ aus Ziegenmilch | 2 | n. b. | Mikrodilution | YUAN et al. 2017 |
| Ag-Nps | Indien | 3 | Mensch | <i>S. aureus</i> ATCC 29737 <i>S. aureus</i> ML 276 <i>S. aureus</i> ML 422 | 4 4 2 | n. b. | Agardilution | SARKAR et al. 2007 |

¹AgNO₃ = Silbernitrat; ²Ag-Zeo = Silber-Zeolith; ³Ag-Nps = Silber-Nanopartikel; ⁴RN4220 = Empfängerstamm, der fähig ist DNA aus *E. coli* zu empfangen; ⁵pAT18 = Vektorplasmid bzw. Klonierungsvektor für Transformation ⁶MDR-*S. aureus* = multidrug-resistenter *S. aureus*; ⁷Mikrodilution = Bouillon-Mikrodilution, ⁸Makrodilution = Bouillon-Makrodilution; ⁹n. b. = nicht bestimmt, nicht bestimmbar

4.2.2 Empfindlichkeit gegenüber den anderen Bioziden

Die mittels Mikrodilution erhaltenen MHK-Werte für die 182 Isolate lagen in einem Bereich von ≤ 2 bis 32 $\mu\text{g/ml}$ für Acriflavin (ACR), von $\leq 0,0625$ bis 0,25 $\mu\text{g/ml}$ für Alkyldiaminoethylglycinhydrochlorid (ADH), von ≤ 1 bis 4 $\mu\text{g/ml}$ für Benzethoniumchlorid (BEN), von ≤ 2 bis 64 $\mu\text{g/ml}$ für Benzalkoniumchlorid (BKC), von 0,125 bis 4 $\mu\text{g/ml}$ für Chlorhexidin (CHX), von 512 bis 8192 $\mu\text{g/ml}$ für Kupfersulfat (COP) und von 32 bis 8192 $\mu\text{g/ml}$ für Zinkchlorid (ZKC). Für die meisten Biozide und Schwermetalle konnte ein unimodales Verteilungsmuster der MHK-Werte beobachtet werden. Für Benzalkoniumchlorid und Zinkchlorid zeigte sich jedoch eine bimodale Verteilungskurve, was Anhaltspunkte für das Vorhandensein einer toleranten bzw. weniger empfindlichen Subpopulation an Bakterien liefert.

Für Acriflavin wurden in einer großangelegten Studie von NOGUCHI et al. (2005) mit 894 MRSA-Isolaten aus Asien, die im Rahmen des „Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens“ (ANSORP) gesammelt wurden, etwas höhere $\text{MHK}_{50/90}$ -Werte von 512/1024 $\mu\text{g/ml}$ und ein breiterer MHK-Bereich von $< 0,5$ bis 1024 $\mu\text{g/ml}$ ermittelt (Tabelle 6). Das ANSORP ist ein Programm, das die Resistenzentwicklung verschiedener Pathogene überwacht und entspricht in seiner Funktion dem europäischen EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network), in dem nur Isolate aus Krankenhäusern untersucht werden. Dagegen wurden in der vorliegenden Arbeit, die auch Isolate von nicht erkrankten Personen und Tieren untersuchte, $\text{MHK}_{50/90}$ -Werte von 8/16 $\mu\text{g/ml}$ für humane und 8/8 $\mu\text{g/ml}$ für tierische Isolate nachgewiesen, wobei die MHK-Ergebnisse von ≤ 2 bis 32 $\mu\text{g/ml}$ reichten. Ein möglicher Grund für die geringere Empfindlichkeit der Isolate aus der Studie von NOGUCHI et al. (2005) könnte die hospital-assoziierte Herkunft der Isolate und damit der vorausgegangene Kontakt der Isolate zu Acriflavin sein. In einer anderen Studie der Autoren (NOGUCHI et al. 1999) wurden die Isolate anhand ihrer MHK-Werte in vier Gruppen eingeteilt: 1) Isolate mit MHK-Werten von > 400 $\mu\text{g/ml}$ und mit dem Resistenzgen *qacA*; 2) Isolate mit unterschiedlich hohen MHK-Werten von 25 bis 400 $\mu\text{g/ml}$ mit dem Resistenzgen *smr*; 3) Isolate mit MHK von 100 bis > 400 $\mu\text{g/ml}$ ohne die Resistenzgene *qacA* und *smr*; 4) Isolate mit MHK-Werten von 12,5 bis 100 $\mu\text{g/ml}$ ohne die Resistenzgene *qacA* und *smr* (Tabelle 6). Dabei fiel auf, dass Isolate der

4. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

Gruppen 2) und 4) geringfügig höhere und Isolate der Gruppe 1) und 3) sehr viel höhere MHK-Resultate lieferten als die Isolate der vorliegenden Studie.

Für die 894 *S. aureus*-Isolate aus der großangelegten Studie von NOGUCHI et al. (2005), die aus Krankenhäusern unterschiedlicher Regionen Asiens stammten, wurden ebenfalls Empfindlichkeiten gegenüber Alkyldiaminoethylglycinhydrochlorid ermittelt (Tabelle 6). Diese lagen acht bis zehn Verdünnungsstufen höher als die in unserer Studie ermittelten Ergebnisse. Ursächlich für die beträchtlichen Unterschiede in den Empfindlichkeiten zwischen den Daten aus der Literatur und denen aus der vorliegenden Studie könnte - wie im Falle von Acriflavin - die ausschließliche nosokomiale Herkunft der asiatischen Isolate sein.

Tabelle 6: Empfindlichkeitsstudien von *S. aureus*-Isolaten für die Biozide Acriflavin und Alkyldiaminoethylglycinhydrochlorid

| Biozid | Land | Anzahl (N) | Herkunft | Ursprung der Isolate oder Bezeichnung der verwendeten Stämme | Empfindlichkeiten als MHK ($\mu\text{g/ml}$) | | | Testmethode | Referenz |
|------------------|-------------|------------|----------|---|--|----------------------|--|----------------------------|------------------------|
| | | | | | Bereich oder Wert | MHK _{50/90} | | | |
| ACR ¹ | Deutschland | 63 | Tier | Geflügelhaltung, Umgebung Tierarztpraxis, Wildschwein, Milchkuh, Haustier | 4-16 | 8/8 | | Mikrodilution ³ | Eigene Arbeit |
| ACR | Deutschland | 119 | Mensch | infizierte oder kolonisierte Menschen | ≤2-32 | 8/16 | | Mikrodilution | Eigene Arbeit |
| ACR | Asien | 894 | Mensch | MRSA (ANSORP ⁴ Daten) | <0,5-1024 | 512/1024 | | Agardoppel- diffusion | NOGUCHI et al. 2005 |
| ACR | Japan | | Mensch | MRSA von Menschen aus Krankenhäusern | | | | Agardilution | NOGUCHI et al. 1999 |
| | | 10 | | 1) hohe MHK für EB ⁵ , ACR, CHX ⁶ + <i>qacA</i> ⁷ | >400 | >400/>400 | | | |
| | | 20 | | 2) variable MHK für EB, ACR+ <i>smr</i> ⁷ | 25-400 | 100/400 | | | |
| | | 19 | | 3) hohe MHK ($\geq 100 \mu\text{g/ml}$) für ACR ohne <i>smr</i> , <i>qacA</i> | 100->400 | 400/>400 | | | |
| | | 22 | | 4) niedrige MHK für ACR ohne <i>smr</i> , <i>qacA</i> | 12,5-100 | 25/50 | | | |
| ADH ² | Deutschland | 63 | Tier | Geflügelhaltung, Umgebung Tierarztpraxis, Wildschwein, Milchkuh, Haustier | ≤0,06-0,25 | ≤0,06/≤0,06 | | Mikrodilution | Eigene Arbeit |
| ADH | Deutschland | 119 | Mensch | gesunde oder kolonisierte Menschen | ≤0,06-0,25 | ≤0,06/≤0,06 | | Mikrodilution | Eigene Arbeit |
| ADH | Asien | 894 | Mensch | MRSA (ANSORP Daten) | 16-64 | 32/64 | | Agardoppel- diffusion | NOGUCHI et al. 2005 |

¹ACR = Acriflavin; ²ADH = Alkyldiaminoethylglycinhydrochlorid; ³Mikrodilution = Bouillon-Mikrodilution; ⁴ANSORP = Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens; ⁵EB = Ethidiumbromid; ⁶CHX = Chlorhexidin; ⁷*smr*, *qacA*/B = Toleranz vermittelnde Gene bei *S. aureus* gegenüber unterschiedlichen Bioziden

4. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

Bezüglich des Empfindlichkeitsstatus von *S. aureus* gegenüber Benzethoniumchlorid, Chlorhexidin und Chlorhexidindigluconat sind in der Literatur zum Teil etwas engere MHK-Bereiche angegeben, verglichen mit den Daten der vorliegenden Studie. Für Benzethoniumchlorid liegen die in der Literatur (Tabelle 7) zu findenden $MHK_{50/90}$ -Werte meist höher und die MHK-Bereiche umfassen zum Teil eine größere Konzentrationsspanne als die Daten der vorliegenden Studie (MHK-Bereich von ≤ 1 bis $4 \mu\text{g/ml}$ und $MHK_{50/90}$: $\leq 1/2 \mu\text{g/ml}$ für humane und $\leq 1/4 \mu\text{g/ml}$ für tierische Isolate). Während LAMBERT et al. (2004) ähnliche MHK-Bereiche von $0,25$ bis $8 \mu\text{g/ml}$ und $MHK_{50/90}$ -Werte von $0,5/2 \mu\text{g/ml}$ angeben, liegen die Daten von NOGUCHI et al. (1999) mit MHK-Werten von $1,56$ bis $12,5 \mu\text{g/ml}$ und $MHK_{50/90}$ -Werten für die bereits beschriebenen Gruppen 1) $12,5/12,5 \mu\text{g/ml}$, 2) $6,25/6,25 \mu\text{g/ml}$, 3) $3,13/3,13 \mu\text{g/ml}$ und 4) $1,56/3,13 \mu\text{g/ml}$ deutlich höher. Ebenfalls höhere MHK-Werte von $0,5$ bis $64 \mu\text{g/ml}$ und höhere $MHK_{50/90}$ -Werte von $4/16 \mu\text{g/ml}$ für MRSA, $1/2 \mu\text{g/ml}$ für MSSA und $4/16 \mu\text{g/ml}$ für Koagulase-negative Staphylokokken fanden TAHERI et al. (2016) mittels Mikrodilution für humane Isolate aus einem iranischen Krankenhaus. Außerdem ermittelten NOGUCHI et al. (2005) für die 894 asiatischen MRSA-Isolate MHK-Bereiche von $0,5$ bis $32 \mu\text{g/ml}$ und $MHK_{50/90}$ -Werte von $8/20 \mu\text{g/ml}$, die auch auf einem höheren Niveau lagen als die des untersuchten Stammkollektivs.

Tabelle 7: Empfindlichkeitsstudien von *S. aureus*-Isolaten für das Biozid Benzethoniumchlorid

| Charakteristika der Isolate | | | | | | Empfindlichkeiten als MHK (µg/ml) | | |
|-----------------------------|-------------|------------|----------|--|-------------------|-----------------------------------|----------------------------|---------------------|
| Biozid | Land | Anzahl (N) | Herkunft | Ursprung der Isolate oder Bezeichnung der verwendeten Stämme | Bereich oder Wert | MHK _{50/90} | Testmethode | Referenz |
| BEN ¹ | Deutschland | 63 | Tier | Geflügelhaltung, Umgebung Tierarztpraxis, Wildschwein, Milchkuh, Haustier | ≤1-4 | ≤1/4 | Mikrodilution ² | Eigene Arbeit |
| BEN | Deutschland | 119 | Mensch | infizierte oder kolonisierte Menschen | ≤1-4 | ≤1/2 | Mikrodilution | Eigene Arbeit |
| BEN | USA (Iowa) | 116 | Mensch | <i>S. aureus</i> von medizinischem Personal und chirurgisch versorgten Patienten | 0,25-8 | 0,5/2 | Makrodilution ³ | LAMBERT 2004 |
| BEN | Japan | | Mensch | MRSA von Menschen aus Krankenhäusern | | | | |
| | | 10 | | 1) hohe MHK für EB ⁴ ,ACR,CHX ⁵ + <i>qacA</i> ⁷ | 3,13-12,5 | 12,5/12,5 | | |
| | | 20 | | 2) variable MHK für EB, ACR+ <i>smr</i> ⁷ | 3,13-6,25 | 6,24/6,25 | | |
| | | 19 | | 3) hohe MHK (≥100 µg/ml) für ACR ohne <i>smr</i> , <i>qacA</i> | 3,13-6,25 | 3,13/3,13 | | |
| | | 22 | | 4) niedrige MHK für ACR ohne <i>smr</i> , <i>qacA</i> | 1,56-3,13 | 1,56/3,13 | | |
| BEN | Iran | 60 | Mensch | MRSA | 0,5-64 | 4/16 | Mikrodilution | TAHERI et al. 2016 |
| | | 55 | | MSSA | 0,5-16 | 1/2 | | |
| | | 51 | | CoNS ⁸ | 0,5-16 | 4/16 | | |
| | | | | von Patienten eines einzigen Krankenhauses | | | | |
| BEN | Asien | 894 | Mensch | MRSA (ANSORP Daten ⁶) | <0,5-32 | 8/20 | Agardoppel-diffusion | NOGUCHI et al. 2005 |

¹BEN = Benzethoniumchlorid; ²Mikrodilution = Bouillon-Mikrodilution; ³Makrodilution = Bouillon; ⁴EB = Ethidiumbromid; ⁵CHX = Chlorhexidin; ⁶ANSORP = Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens; ⁷*smr*, *qacA/B* = Toleranz vermittelnde Gene bei *S. aureus* gegenüber unterschiedlichen Bioziden; ⁸CoNS = Koagulase-negative Staphylokokken

4. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

Für Chlorhexidin werden in der Literatur MHK-Bereiche und $MHK_{50/90}$ -Werte auf einem ähnlichen bzw. identischen Niveau wie die ermittelten Daten dieser Arbeit beschrieben. Während in der vorliegenden Studie MHK-Bereiche von 0,125 bis 4 $\mu\text{g/ml}$ und $MHK_{50/90}$ -Werte von 0,5/1 $\mu\text{g/ml}$ erfasst wurden, konnten VALI et al. (2017) für 121 humane MRSA-Isolate MHK-Werte von 0,2 bis 2 $\mu\text{g/ml}$ und $MHK_{50/90}$ -Werte von 1/2 $\mu\text{g/ml}$ und für 56 MSSA-Isolate MHK-Resultate von 0,5 bis 60 $\mu\text{g/ml}$ und $MHK_{50/90}$ -Werte von 1/2 $\mu\text{g/ml}$ mittels Plattendifusionstest ermitteln. Auch TAHERI et al. (2016) untersuchten MRSA-, MSSA- und zusätzlich Koagulase-negative Staphylokokken-Isolate gegenüber Chlorhexidindigluconat und ermittelten mittels Mikrodilution ähnliche Empfindlichkeiten wie bei den Isolaten dieser Arbeit (Tabelle 8). HAYDEN et al. (2016) untersuchten ebenfalls humane MRSA-Isolate mittels Mikrodilution, wobei die Empfindlichkeiten der Isolate getrennt nach Behandlungsart des Patienten auf einer Intensivstation ermittelt wurden. 1) Für Isolate von Patienten, die nach dem Aufnahmescreening nur isoliert wurden und keine Behandlung mit Chlorhexidindigluconat bekamen, wurden MHK-Bereiche von 0,5 bis 4 $\mu\text{g/ml}$ als Ausgangswerte vor Interventionsmaßnahmen und MHK-Werte von 1 bis 8 $\mu\text{g/ml}$ nach der Isolation erfasst, wobei identische $MHK_{50/90}$ -Werte von 2/4 $\mu\text{g/ml}$ für Isolate aus Aufnahmescreening und Interventionsphase beobachtet wurden. 2) Für Isolate von Patienten, die nach dem Aufnahmescreening mittels gezielter Dekolonisationsmaßnahmen behandelt wurden, ergaben sich jeweils identische MHK-Bereiche von 1 bis 4 $\mu\text{g/ml}$ und $MHK_{50/90}$ -Werte von 2/4 $\mu\text{g/ml}$ für Ausgangswerte und Werte nach Intervention. 3) Für Isolate von Patienten, die nach dem Aufnahmescreening mittels universeller Dekolonisationsmaßnahmen behandelt wurden, ergaben sich ebenfalls identische MHK-Resultate von 0,5 bis 4 $\mu\text{g/ml}$ und $MHK_{50/90}$ -Werte von 2/4 $\mu\text{g/ml}$ für Ausgangswerte und Werte nach Intervention. Diese Studie zeigt anhand eines Stammkollektivs von insgesamt 3173 Isolaten, dass die Empfindlichkeiten der Isolate auf ähnlichen Niveaus liegen wie in der vorliegenden Studie und dass sich kaum Unterschiede in den Empfindlichkeiten gegenüber Chlorhexidindigluconat durch unterschiedliche Interventionsmaßnahmen entwickeln. In den Studien von NOGUCHI et al. (1999) und MORRISSEY et al. (2014) wurden ebenfalls ähnliche MHK-Ergebnisse für humane Isolate ermittelt. NOGUCHI et al. (2005) konnten anhand von 894 humanen Isolaten aus unterschiedlichen Regionen Asiens einen etwas breiteren MHK-Bereich von 0,5 bis 16 $\mu\text{g/ml}$ und etwas höhere $MHK_{50/90}$ -Werte von 4/8 $\mu\text{g/ml}$, als in der vorausgegangenen Studien von

4. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

1999 und in der vorliegenden Studie nachgewiesen, ermitteln. Hinsichtlich der Empfindlichkeit tierischer Isolate geben AARESTRUP u. HASMAN (2004) einen MHK-Bereich für Chlorhexidin von 0,5 bis 2 µg/ml für 43 *S. aureus*-Isolate vom Rind an, während CLARK et al. (2015) MHK-Ergebnisse für MSSA-, Methicillin-sensible und Methicillin-resistente *S. pseudintermedius*-Isolate (MSSP und MRSP) von Hunden von 0,5 bis 4 µg/ml angeben, wobei die MRSA-Isolate von Hunden höhere MHK-Werte von 4 bis 8 µg/ml aufwiesen. Abschließend bleibt anzumerken, dass die Isolate aus den anderen Studien sich hinsichtlich der Herkunft der Isolate von der hier verwendeten Stammsammlung unterschieden. Während hier ausschließlich MRSA- und MSSA-Isolate verwendet wurden, bezogen andere Studien auch Koagulase-negative Staphylokokken-, MSSP- und MRSP-Isolate ein. Zudem verwendeten andere Studien überwiegend Isolate, die von infizierten Personen aus Krankenhäusern stammten (NOGUCHI et al. 1999, 2005; LAMBERT et al. 2004, HAYDEN et al. 2016 u. TAHERI et al. 2016), während in der vorliegenden Studie und in Studien von MORRISSEY et al. (2014) und VALI et al. (2017) die Isolate sowohl von infizierten als auch von kolonisierten Personen stammten. Ob die Herkunft der Isolate von gesunden oder erkrankten Personen tatsächlich Einfluss auf die Empfindlichkeitswerte nimmt, bleibt zu klären. Darüber hinaus lässt sich vermuten, dass der Einsatz von Chlorhexidin-, Benzethoniumchlorid- und Acriflavin-beihaltenden Oberflächen- oder Hautdesinfektionsmitteln, die bekanntermaßen in Kliniken eingesetzt werden, zu Unterschieden der bakteriellen Empfindlichkeit führen kann.

Tabelle 8: Empfindlichkeitsstudien von *S. aureus*-Isolaten für das Biozid Chlorhexidin

| Biozid | Charakteristika der Isolate | | | | Empfindlichkeiten als MHK ($\mu\text{g/ml}$) | | | Referenz |
|---------------------|-----------------------------|------------|----------|---|--|----------------------|----------------------------|--------------------|
| | Land | Anzahl (N) | Herkunft | Ursprung der Isolate oder Bezeichnung der verwendeten Stämme | Bereich oder Wert | MHK _{50/90} | Testmethode | |
| CHX ¹ | Deutschland | 63 | Tier | Geflügelhaltung, Umgebung Tierarztpraxis, Wildschwein, Milchkuh, Haustier | 0,125-2 | 0,5/1 | Mikrodilution ³ | Eigene Arbeit |
| CHX | Deutschland | 119 | Mensch | infizierte oder kolonisierte Menschen | 0,125-4 | 0,5/1 | Mikrodilution | Eigene Arbeit |
| CHX | Kuwait | 121 56 | Mensch | MRSA und MSSA infizierter und kolonisierter Menschen | 0,5-2 0,5-60 | 1/2 1/2 | Platten- diffusionstest | VALI et al. 2017 |
| CHX | Japan | 10 | Mensch | MRSA von Menschen aus Krankenhäusern | 3,13-12,5 | 3,13/3,13 | Agardilution | NOGUCHI et al.1999 |
| | | 20 | | 1) hohe MHK für EB ⁴ , ACR, CHX+ <i>qac</i> ⁵ 2) variable MHK für EB, ACR+ <i>smr</i> ⁴ | 1,56-3,13 | 3,13/3,13 | | |
| | | 19 | | 3) hohe MHK ($\geq 100 \mu\text{g/ml}$) für ACR ohne <i>smr</i> , <i>qacA</i> | 1,56-3,13 | 3,13/3,13 | | |
| | | 22 | | 4) niedrige MHK für ACR ohne <i>smr</i> , <i>qacA</i> | 1,56-3,13 | 1,56/1,56 | | |
| CHX | Großbritannien | 50 | Tier | MRSA | 4-8 | 4/4 | Agardilution | CLARK et al. 2015 |
| | Deutschland | 50 | | MSSA | 0,5-4 | 2/2 | | |
| | | 49 | | MRSP (<i>S. pseudintermedius</i>) | 0,5-4 | 1/2 | | |
| | | 50 | | MSSP (<i>S. pseudintermedius</i>) von Hunden | 0,5-4 | 1/1 | | |
| CHX-DG ² | Iran | 60 | Mensch | MRSA | 0,5-8 | 1/2 | Mikrodilution | TAHERI et al. 2016 |
| | | 55 | | MSSA | 0,25-4 | 0,5/1 | | |
| | | 51 | | CoNS ⁶ von Patienten eines einzigen Krankenhauses | 0,25-2 | 0,5/1 | | |

| Biozid | Isolat Charakteristika | | | | Empfindlichkeiten als MHK (µg/ml) | | | Referenz |
|--------|------------------------|------------|----------|--|-----------------------------------|----------------------|----------------------------|--------------------------|
| | Land | Anzahl (N) | Herkunft | Ursprung der Isolate oder Bezeichnung der verwendeten Stämme | Bereich oder Wert | MHK _{50/90} | Testmethode | |
| CHX-DG | USA | 3173 | Mensch | MRSA von Patienten auf Intensivstationen verschiedener Krankenhäuser (n=43) MHK-Werte zu Beginn und nach 3 unterschiedlichen Behandlungsarten 1), 2) oder 3) 1) MRSA-Screening und Isolation Ausgangswerte Interventionswerte 2) MRSA gezielte Dekolonisation Ausgangswerte Interventionswerte 3) MRSA universelle Dekolonisation Ausgangswerte Interventionswerte | 0,5-4 1-8 | 2/4 2/4 | Mikrodilution | HAYDEN et al. 2016 |
| CHX-DG | Asien | 894 | Mensch | MRSA (ANSORP ⁷ Daten) | <0,5-16 | 4/8 | Agardoppel-diffusion | NOGUCHI et al. 2005 |
| CHX | USA (Iowa) | 116 | Mensch | <i>S. aureus</i> von medizinischem Personal und chirurgisch versorgten Patienten | 0,39-6,25 | 0,39/3,1 | Makrodilution ⁸ | LAMBERT 2004 |
| CHX | Dänemark | 43 | Tier | <i>S. aureus</i> Rind | 0,5-2 | 1/2 | Agardilution | AARESTRUP u. HASMAN 2004 |
| CHX | weltweit | 1635 | Mensch | <i>S. aureus</i> (HA und CA) | 0,5-16 | 2/4 | Mikrodilution | MORRISSEY et al. 2014 |

¹CHX = Chlorhexidin, ²CHX-DG = Chlorhexidindigluconat; ³Mikrodilution = Bouillon-Mikrodilution; ⁴EB = Ethidiumbromid; ⁵smr, qacA/B = Toleranz vermittelnde Gene bei *S. aureus* gegenüber unterschiedlichen Bioziden; ⁶CoNS = Koagulase-negative Staphylokokken; ⁷ANSORP = Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens; ⁸Makrodilution = Bouillon-Makrodilution

4. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

Bezüglich der Empfindlichkeit gegenüber Kupfer bzw. Kupfersulfat geben AARESTRUP u. HASMAN (2004) für 43 *S. aureus*-Isolate, die von Milchkühen mit Mastitis stammten, einen engen Empfindlichkeitsbereich von 319 bis 1915 µg/ml an, wobei die MHK_{50/90}-Werte mit 319/1915 µg/ml niedriger liegen als in der vorliegenden Studie, in der MHK-Bereiche von 512 bis 8192 µg/ml und MHK_{50/90}-Werte von 1024/2048 für tierische Isolate und MHK-Bereiche von 512 bis 4096 µg/ml und ein MHK₉₀-Wert von 1024 für humane Isolate ermittelt wurden. In den beiden Studien von CAVACO et al. (2010, 2011) lagen die ermittelten Empfindlichkeitsbereiche ebenfalls in etwas engeren Bereichen von 638 bis >4469 µg/ml. Bekanntermaßen werden Schwermetalle wie Zink und Kupfer in der Nutztierfütterung vorwiegend bei Rind, Schwein und Geflügel als supranutritive Futterzusatzstoffe eingesetzt, da sie eine positive Wirkung auf die Darmflora und die Wachstumsraten der Tiere haben sollen (AARESTRUP u. HASMAN 2004). Es gibt jedoch national unterschiedliche maximal zugelassene Futterzusatzstoffkonzentrationen für Zink und Kupfer, da eine übermäßige Fütterung von Schwermetallen toxisch wirken kann und zudem zu sehr hohen Schwermetallkonzentrationen in der Gülle führt (GRASS et al. 2001; ZETHNER et al. 2007; PIEPER u. HILLER 2013). Beispielsweise geben AARESTRUP u. HASMAN (2004) für Dänemark Konzentrationen im Futtermittel für Ferkel von 175 mg Kupfersulfat/kg und 35 mg Kupfersulfat/kg für Mastschweine an, während das Futter für Masthähnchen in Dänemark zum Zeitpunkt der Veröffentlichung der Arbeit von AARESTRUP u. HASMAN (2004) typischerweise nur 20 mg Kupfersulfat/kg und Rinderfutter sogar nur 2 mg Kupfersulfat/kg enthielt. In der EU wurden im März 2018 die erlaubten Höchstgehalte an Zink und Kupfer durch Änderungen im EU-Gemeinschaftsregister über Futterzusatzstoffe Annex I entsprechend der VO (EU) 1831/2003 im Tierfutter drastisch gesenkt. Gemäß der Durchführungsverordnung (EU) 2018/1039 sind folgende Gehalte an zweiwertigem Kupfer als Spurenelement in Futtermitteln erlaubt: Für Rinder vor Beginn des Wiederkäualters 15 mg/kg, danach 30 mg/kg, für Saug- und Absetzferkel bis vier Wochen nach dem Absetzen 15 mg/kg, ab der fünften Woche nach Absetzen bis acht Wochen nach Absetzen 100 mg/kg und für alle anderen Tierarten 25 mg/kg. Gemäß der Durchführungsverordnung (EU) 2016/2261 werden für Kupfer (I) Oxid als Bestandteil von Spurenelementen etwas höhere Gehalte für Rinder von 35 mg/kg und für Schweine bis 12 Wochen 170 mg/kg im Futter erlaubt. Zudem werden teilweise auch antibakterielle mit Kupfer beschichtete Tränken und Rohrleitungen in Geflügelstallungen

4. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

eingebaut, die ebenfalls dazu führen könnten, dass sich kupfertolerante Bakterienpopulationen bilden (PIEPER u. HILLER 2013). In der vorliegenden Arbeit wurden neben Isolaten aus Geflügelhaltungen auch Isolate von Haustieren, Wildschweinen und Umgebungsproben untersucht. Bei den sechs Isolaten vom Wildschwein wurden MHK-Werte von 512 bis 1024 $\mu\text{g/ml}$ nachgewiesen. Demgegenüber wurde für Isolate, die aus Geflügelbetrieben stammten, ein MHK-Bereich von 512 bis 8192 $\mu\text{g/ml}$ bestimmt. Unter den sechs tierischen Isolaten des vorliegenden Stammkollektivs mit erhöhten MHK-Werten gegenüber Kupfersulfat stammte nur ein einziges nicht aus Geflügelbeständen, sondern wurde aus einer Wunde vom Kleintier isoliert. Zudem zeigte sich, dass die sechs Isolate vom Wildschwein einheitlich als empfindlich gegenüber Kupfer einzuordnen sind, während unter den Geflügelisolaten sieben von 26 Isolaten einen MHK-Wert von 2048 $\mu\text{g/ml}$ überschritten. Dies lässt vermuten, dass die Kupfer-Exposition der Isolate z. B. während der Fütterung des Geflügels eine Rolle bei der Toleranzentwicklung der Bakterien spielt.

Bezüglich zwei der hier beschriebenen Biozide sind bereits erste Vorschläge für epidemiologische *cut-off*-Werte (MORRISSEY et al. 2014) bzw. vorläufige Schwellenkonzentrationen, die resistente von sensiblen Bakterienpopulation trennen (AARESTRUP u. HASMANN 2004), veröffentlicht worden. MORRISSEY et al. (2014) erarbeiteten anhand eines Kollektivs von $n = 1635$ *S. aureus*-Isolaten einen vorläufigen ECOFF-Wert für Chlorhexidin von 8 $\mu\text{g/ml}$. Diesbezüglich bleibt anzumerken, dass dieser Wert allein anhand humaner Isolate ermittelt wurde. Demgegenüber konnten FURI et al. (2013) in einer großangelegten Studie mit 1602 klinischen *S. aureus*-Isolaten keine Hinweise für einen ECOFF-Wert für Chlorhexidin ermitteln. Für Kupfersulfat gaben AARESTRUP u. HASMANN (2004) einen MHK-Wert von >12 mM (ca. 1915 $\mu\text{g/ml}$) als möglichen ECOFF an. Legt man diese Empfehlungen zur Bewertung der Empfindlichkeitsergebnisse aus dieser Arbeit zugrunde, so konnten für Kupfersulfat und Chlorhexidin keine toleranten Subpopulationen in dem getesteten Stammkollektiv nachgewiesen werden. Darüber hinaus weist die unimodale Verteilung der MHK-Werte für die meisten der untersuchten Biozide ebenfalls darauf hin, dass keine toleranten Subpopulationen entstanden sind. Allerdings konnten für das vorliegende Stammkollektiv durch visuelle Begutachtung der MHK-Verteilungskurven folgende ECOFFs bestimmt werden: für Acriflavin ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$, für Alkyldiaminoethylglycinhydrochlorid $\geq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$, für Benzethoniumchlorid ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$, für Chlorhexidin ≥ 6 $\mu\text{g/ml}$ und für Kupfersulfat

4. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

≥4096. Der hier für Chlorhexidin ermittelte ECOFF-Wert liegt etwas niedriger als der von MORRISSEY et al. (2014) vorgeschlagene Wert von 8 µg/ml. Demgegenüber liegt der ECOFF-Wert für Kupfersulfat für das vorliegende Stammkollektiv weit über dem von AARESTRUP u. HASMAN (2004) ermittelten ECOFF-Werte von 1915 µg/ml.

Tabelle 9: Empfindlichkeitsstudien von *S. aureus*-Isolaten für das Schwermetall Kupfer

| Biozid | Land | Anzahl (N) | Herkunft | Ursprung der Isolate oder Bezeichnung der verwendeten Stämme | Bereich oder Wert | Empfindlichkeiten als MHK (µg/ml) | | Testmethode | Referenz |
|------------------|-------------|------------|----------|--|--------------------|-----------------------------------|----------------------|----------------------------|--------------------------|
| | | | | | | MHK _{50/90} | MHK _{90/50} | | |
| COP ¹ | Deutschland | 63 | Tier | Geflügelhaltung, Umgebung Tierarzt-praxis, Wildschwein, Milchkuh, Haustier | 512-8192 | 1024/2048 | | Mikrodilution ² | Eigene Arbeit |
| COP | Deutschland | 119 | Mensch | infizierte oder kolonisierte Menschen | 512-4096 | 1024/1024 | | Mikrodilution | Eigene Arbeit |
| COP | Dänemark | 3 | n. b. | <i>S. aureus</i> RN4220 ³ RN4220 + pAT18 ⁴ | 1277 | n. b. ⁸ | | Agardilution | CAVACO et al. 2010 |
| COP | Europa | 88 | Tier | RN4220 + pAT18 mit <i>czrC</i> ⁶ <i>czrC</i> negative MSSA ⁵ CC n. b. ⁸ <i>czrC</i> negative MRSA ⁵ CC398 | 1277 1277->4469 | 2554/>4469 | | Agardilution | CAVACO et al. 2011 |
| | | 115 | | CC398 | 1277-3831 | 1277/3192 | | | |
| | | 19 | | CC1 | 1277-3831 | 1277/3192 | | | |
| | | 1 | | CC5 | 1277 | n. b. | | | |
| | | 1 | | CC9 | 1915 | n. b. | | | |
| | | 4 | | CC97 | 1277-3831 | 1277/3193 | | | |
| | | 3 | | n. b. | 1277-1915 | 1277/1915 | | | |
| | | 321 | | <i>czrC</i> positive MRSA CC398 | 638-4469 | 1277/3831 | | | |
| | | 2 | | CC1 | 1277-2554 | 1277/2554 | | | |
| | | 10 | | CC97 | 2554-3192 | 2554/2554 | | | |
| COP | Niederlande | 60 | Tier | <i>czrC</i> negative MSSA ⁷ n. b. <i>czrC</i> negative MRSA ⁷ CC398 | 1277-2554 | 1277/1277 | | Agardilution | CAVACO et al. 2011 |
| | | 54 | | <i>czrC</i> positive MRSA CC398 | 1277-2554 | 1915/1915 | | | |
| | | 38 | | <i>czrC</i> positive MRSA CC398 | 1277-3192 | 1277/3192 | | | |
| COP | Dänemark | 43 | Tier | <i>S. aureus</i> Rind | 319-1915 | 319/1915 | | Agardilution | AARESTRUP u. HASMAN 2004 |

¹COP = Kupfersulfat, ²Mikrodilution = Bouillon-Mikrodilution; ³RN4220 = Empfängerstamm, der fähig ist DNA aus *E. coli* zu empfangen; ⁴pAT18 = Vektorplasmid bzw. Klonierungsvektor für Transformation; ⁵MRSA und MSSA aus Staub europ. Schweinehaltungen, ⁶*czrC* = Cadmium Zink Resistenzgen, das aus *E. coli* Transformanten extrahiert wurde; ⁷MRSA und MSSA von nasalen Abstrichen von Kälbern; ⁸n. b. = nicht bestimmt oder bestimmbar

4. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

Demgegenüber wurde für Zinkchlorid und Benzalkoniumchlorid eine bimodale Verteilungskurve nachgewiesen, sodass hier das Vorhandensein von Nicht-Wildtyp Bakterien zu vermuten ist. Für Benzalkoniumchlorid wurden ein MHK-Bereich von ≤ 2 bis 64 $\mu\text{g/ml}$ und $\text{MHK}_{50/90}$ -Werte von $\leq 2/4$ $\mu\text{g/ml}$ für tierische und von $\leq 2/\leq 2$ $\mu\text{g/ml}$ für humane Isolate ermittelt. TAHERI et al. (2016) konnten für humane MRSA-Isolate einen MHK-Bereich von 1,64 bis 64 $\mu\text{g/ml}$ und für MSSA- und Koagulase-negative Staphylokokken MHK-Werte von 0,5 bis 64 $\mu\text{g/ml}$ beobachten. Die $\text{MHK}_{50/90}$ -Werte lagen für MRSA-Isolate bei 8/64 $\mu\text{g/ml}$ und für Koagulase-negative Staphylokokken bei 4/32 $\mu\text{g/ml}$ und damit deutlich höher als die in der vorliegenden Studie ermittelten Werte. Dagegen wurden für die MSSA-Isolate $\text{MHK}_{50/90}$ -Werte von 1/4 $\mu\text{g/ml}$ nachgewiesen, die den hier ermittelten Daten sehr nahe kommen. Ebenfalls höhere $\text{MHK}_{50/90}$ -Werte von 16/16 $\mu\text{g/ml}$ und ein MHK-Bereich von 1 bis 16 $\mu\text{g/ml}$ wurden in einer asiatischen Studie für humane MRSA-Isolate von NOGUCHI et al. (2005) beschrieben. LAMBERT et al. (2004) und MORRISSEY et al. (2014) konnten ebenfalls für humane *S. aureus*- und MRSA-Isolate ähnliche MHK-Bereiche von 0,5 bis 32 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 0,5 bis 64 $\mu\text{g/ml}$ feststellen. Hinsichtlich der $\text{MHK}_{50/90}$ -Werte von 1/2 $\mu\text{g/ml}$ für die *S. aureus*-Isolate aus der Studie von LAMBERT et al. (2004) und von 2/4 $\mu\text{g/ml}$ (MORRISSEY et al. 2014) können ebenfalls ähnliche Empfindlichkeiten, wie sie für die Isolate des hier untersuchten Stammkollektivs gefunden wurden, festgestellt werden. Bezüglich der Studien, die tierische Isolate getestet haben, wurden engere MHK-Bereiche für *S. aureus*-Isolate von Milchkühen aus Dänemark von 1 bis 8 $\mu\text{g/ml}$ in der Studie von AARESTRUP u. HASMAN (2004) und für MRSA-Isolate aus US-amerikanischen Schweinehaltungen von 2 bis 5 $\mu\text{g/ml}$ in der Studie von SLIFIERZ et al. (2015) beobachtet. In den Studien aus dem Iran, aus Asien, der Studie von MORRISSEY et al. (2014) und der vorliegenden Arbeit wurden breitere MHK-Bereiche, aber nur bei der asiatischen und iranischen Studie auch höhere $\text{MHK}_{50/90}$ -Werte nachgewiesen (NOGUCHI et al. 2005; TAHERI et al. 2016). Ursächlich für die breitere Streuung der Werte bei humanen Isolaten können zum einen das heterogenere Stammkollektiv (wie in der vorliegenden Studie) und zum anderen Unterschiede in der Exposition gegenüber Benzalkoniumchlorid sein. In wie weit die Region und der evtl. vermehrte bzw. nicht sachgemäße Einsatz von Desinfektionsmitteln in einigen Ländern eine Rolle bezüglich der Empfindlichkeitswerte spielt, sollte und kann anhand dieser Arbeit nicht geklärt werden. Darüber hinaus wird in der Arbeit von MORRISSEY et al. (2014) für Benzalkoniumchlorid ein

4. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

cut-off-Wert von 16 µg/ml vorgeschlagen. Anhand visueller Begutachtung der Verteilungskurve für die Empfindlichkeiten der hier getesteten Isolate wurde ein ECOFF-Wert von ≥ 8 µg/ml ermittelt. Somit liegt dieser etwas niedriger als der von MORRISSEY et al. (2014) vorgeschlagene ECOFF-Wert. Dennoch lässt sich eine tolerantere Subpopulation bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Isolaten erahnen. Allerdings wurde diese Subpopulation nur durch eine kleine Anzahl an Stämmen repräsentiert. Daher wäre es interessant noch eine größere Anzahl an *S. aureus*-Isolaten auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Benzalkoniumchlorid zu untersuchen, um das Vorkommen weiterer Isolate mit reduzierter Empfindlichkeit zu bestimmen.

Für Zinkchlorid wurden in der vorliegenden Arbeit MHK-Werte zwischen 32 und 8192 µg/ml ermittelt, wobei die $MHK_{50/90}$ -Werte einheitlich bei 128 µg/ml lagen. In keiner der vergleichbaren Studien wurde ein so weiter MHK-Bereich, der mehr als neun Verdünnungsstufen umfasste, ermittelt (AARESTRUP u. HASMAN 2004; CAVACO et al. 2010, 2011; SLIFIERZ et al. 2015). Allerdings lagen die detektierten MHK-Bereiche dieser Studien in einem höheren Konzentrationsbereich als die $MHK_{50/90}$ -Werte der vorliegenden Arbeit. In der Studie von AARESTRUP u. HASMAN (2004) wurden für 26 *S. aureus*-Isolate von Milchkühen mit Mastitis $MHK_{50/90}$ -Werte von 136/273 µg/ml ermittelt, während in den Studien von CAVACO et al (2010, 2011) höhere $MHK_{50/90}$ -Werte bis hin zu Werten von 1090/2180 µg/ml nachgewiesen wurden, wobei die MHK_{90} -Werte von 2180 µg/ml nur bei MRSA-Isolaten vorkamen. Wie Kupfer wird auch Zink in der Tierfütterung vor allem prophylaktisch und therapeutisch zur Behandlung von Durchfallerkrankungen bei Schweinen (Absatzferkeln) eingesetzt. In der Literatur sind abhängig von Studie, Tierart und Land unterschiedliche Angaben bezüglich der Konzentrationen von Zink im Tierfutter verfügbar. SLIFIERZ et al. (2015) geben Werte von >500 bis <3000 mg Zinkoxid/kg in den Futtermitteln von Schweinen in den USA an. Die aktuell zulässigen Höchstgehalte betragen laut Eintrag im Gemeinschaftsregister der Futtermittelzusatzstoffe (Annex I) für wasserfreies Zinkchlorid als ernährungsphysiologischer Zusatzstoff im Futter für Hunde und Katzen 200 mg/kg, für Milchaustauscher für Kälber 180 mg/kg, für Ferkel, Sauen, Kaninchen, Fische (exkl. Salmoniden) 150 mg/kg und für alle anderen Tierarten 120 mg/kg (EUROPEAN UNION REGISTER OF FEED ADDITIVES 2018). Außerdem wurden im Juni 2018 einige Zinkverbindungen wie Zinkcarbonat, Zinkchlorid Monohydrat und Zinklactat Trihydrat für alle

4. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

Tiere gemäß Anhang 1 der Durchführungsverordnung (EU) 2017/1145 von Mark genommen. Ob die zum Teil stark variierenden MHK-Werte zwischen den Studien sich anhand der je nach Tierart und Nation unterschiedlichen zulässigen Höchstmengen von Zinkverbindungen im Tierfutter erklären lassen, bleibt zu klären.

Anhand der MHK-Verteilung für Zinkchlorid lassen sich gegebenenfalls tolerantere Subpopulationen von *S. aureus* ausmachen. AARESTRUP u. HASMAN (2004) haben in ihrer Arbeit für Zinkchlorid einen Schwellenwert von >2 mM (ca. 273 $\mu\text{g/ml}$) vorgeschlagen, um resistente von sensiblen Isolaten zu unterscheiden. Anhand visueller Inspektion der Verteilungskurve wurde für das vorliegende Stammkollektiv ein ECOFF-Wert von ≥ 512 $\mu\text{g/ml}$ für Zinkchlorid ermittelt, der mit dem von AARESTRUP u. HASMAN (2014) vorgeschlagenen Wert hinsichtlich des hier ermittelten bimodalen Verteilungsmusters gut übereinstimmt. Die hier als resistenter bzw. toleranter identifizierte Subpopulation (MHK ≥ 512 $\mu\text{g/ml}$ für Zinkchlorid) wird allerdings nur durch fünf Isolate repräsentiert, wobei die Isolate mit den höchsten MHK-Werten von >8192 $\mu\text{g/ml}$ alle aus Geflügelhaltungen und die Isolate mit MHK-Werten von 512 $\mu\text{g/ml}$ von humanen Patienten stammten. Des Weiteren fällt auf, dass von den fünf Isolaten mit sehr hohen MHK-Werten für Zinkchlorid (≥ 512 $\mu\text{g/ml}$) vier Isolate dem klonalen Komplex 398 angehören, während ein Isolat CC45 zugeordnet ist. Diese Ergebnisse untermauern den Verdacht, dass supranutritive Zinkkonzentrationen im Futter, zinkhaltige Antiseptika oder antibakteriell wirkende zinkhaltige Beschichtungen von Tränken und anderen Materialien in den Stallungen oder Klinken zur Entstehung von Toleranzen führen könnten (ZETHNER et al. 2007; PIEPER u. HILLER 2013; VILLAPÚN et al. 2016).

Tabelle 10: Empfindlichkeitsstudien von *S. aureus* Isolaten für Benzalkoniumchlorid und Zinkchlorid

| Biozid | Charakteristika der Isolate | | | | Empfindlichkeiten als MHK (µg/ml) | | Testmethode | Referenz |
|------------------|-----------------------------|------------|----------|--|-----------------------------------|----------------------|----------------------------|--------------------------|
| | Land | Anzahl (N) | Herkunft | Ursprung der Isolate oder Bezeichnung der verwendeten Stämme | Bereich oder Wert | MHK _{50/90} | | |
| BKC ¹ | Deutschland | 63 | Tier | Geflügelhaltung, Umgebung Tierarztpraxis, Wildschwein, Milchkuh, Haustier | ≤2-16 | ≤2/4 | Mikrodilution ² | Eigene Arbeit |
| BKC | Deutschland | 119 | Mensch | infizierte oder kolonisierte Menschen | ≤2-64 | ≤2/≤2 | Mikrodilution | Eigene Arbeit |
| BKC | Iran | 60 | Mensch | MRSA | 1.64-64 | 8/64 | Mikrodilution | TAHERI et al. 2016 |
| | | 55 | | MSSA | 0,5-64 | 1/4 | | |
| | | 51 | | CoNS ⁴ | 0,5-64 | 4/32 | | |
| | | | | von Patienten eines einzigen Krankenhauses | | | | |
| BKC | Dänemark | 43 | Tier | <i>S. aureus</i> Rind | 1-8 | 2/4 | Agardilution | AARESTROP u. HASMAN 2004 |
| BKC | Asien | 894 | Mensch | MRSA (ANSORP Daten ⁵) | 1-16 | 16/16 | Agardoppel-diffusion | NOGUCHI et al. 2005 |
| BKC | USA (Iowa) | 116 | Mensch | <i>S. aureus</i> von medizinischem Personal und chirurgisch versorgten Patienten | 0,5-32 | 1/2 | Makrodilution ³ | LAMBERT 2004 |
| BKC | USA (Ontario) | | Tier | MRSA Schweine + nachgewiesene(s) Gen(e) | | | Agardilution | SLIFIERZ et al. 2015 |
| | | 6 | | + <i>qacG</i> ¹⁶ | 2-4,5 | 3,5/4 | | |
| | | 3 | | + <i>qacH</i> ¹⁶ | 2 | 2/2 | | |
| | | 1 | | + <i>smr</i> ¹⁶ | 3 | n. b. | | |
| | | 6 | | + <i>qacG</i> , <i>qacH</i> | 2-5 | 4/5 | | |
| | | 10 | | + <i>qacG</i> , <i>smr</i> | 2-5 | 2/4 | | |
| | | 13 | | + <i>qacG</i> , <i>qacH</i> , <i>smr</i> | 2-5 | 3,4/4 | | |
| | | 1 | | + <i>qacG</i> , <i>qacH</i> , <i>smr</i> , <i>qacA/B</i> | 4 | n. b. | | |
| BKC | weltweit | 1635 | Mensch | <i>S. aureus</i> (HA und CA) | 0,5-64 | 2/4 | Mikrodilution | MORRISSEY et al. 2014 |

| Isolat Charakteristika | | | | | | Empfindlichkeiten als MHK (µg/ml) | |
|------------------------|---------------|------------|----------|---|-------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| Biozid | Land | Anzahl (N) | Herkunft | Ursprung der Isolate oder Bezeichnung der verwendeten Stämme | Bereich oder Wert | MHK _{50/90} | Referenz |
| ZKC ⁶ | Deutschland | 63 | Tier | Geflügelhaltung, Umgebung Tierarztpraxis, Wildschwein, Milchkuh, Haustier infizierte oder kolonisierte Menschen | 32-8192 | 128/128 | Eigene Arbeit |
| ZKC | Deutschland | 119 | Mensch | | 32-512 | 128/128 | Eigene Arbeit |
| ZKC | Dänemark | 3 | n. b. | <i>S. aureus</i> RN4220 ⁷ RN4220::pAT18 ⁸ | 273 273 | n. b. ¹² n. b. | CAVACO et al. 2010 |
| ZKC | Europa | 88 | Tier | RN4220::pAT18 mit <i>czrC</i> ¹⁰ | 1090 | n. b. | CAVACO et al. 2011 |
| | | 115 | | <i>czrC</i> negative MSSA ⁹ CC n. b. | 136-273 | 273/273 | |
| | | 19 | | <i>czrC</i> negative MRSA ⁹ CC398 | 136-1635 | 273/273 | |
| | | 1 u.1 | | CC1 | 136-2180 | 545/2180 | |
| | | 4 | | CC5 u. CC9 | 273 u. 273 | n. b. | |
| | | 3 | | CC97 | 273-1635 | 273/1635 | |
| | | 3 | | n. b. ⁸ | 136-273 | 273/273 | |
| | | 321 | | <i>czrC</i> positive MRSA CC398 | 273-2180 | 1090/2180 | |
| | | 2 | | CC1 | 1090- | 1090/2180 | |
| | | 10 | | CC97 | 2180 | 1090/1635 | |
| ZKC | Dänemark | 26 | Tier | <i>S. aureus</i> Rind | 273-1635 | 136/273 | AARESTRUP u. HASMAN 2004 |
| ZKC | USA (Ontario) | 25 | Tier | MRSA von Schweinen <i>czrC</i> positiv | 818-2180 | 1090/2180 | SLIFIERZ et al. 2015 |
| ZKC | Niederlande | 60 | Tier | <i>czrC</i> negativ | 273-545 | 545/545 | CAVACO et al. 2011 |
| | | 54 | | <i>czrC</i> negative MSSA ¹¹ CC n. b. | 136-545 | 273/273 | |
| | | 38 | | <i>czrC</i> negative MRSA ¹¹ CC398 | 136-545 | 273/273 | |
| | | | | <i>czrC</i> positive MRSA CC398 | 1090-1635 | 1090/1635 | |

¹BKC = Benzalkoniumchlorid; ²Mikrodilution = Bouillon-Mikrodilution; ³Makodilution = Bouillon-Makrodilution; ⁴CoNS = Koagulase-negative Staphylokokken; ⁵ANSORP = Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens; ⁶ZKC = Zinkchlorid; ⁷RN4220 = Empfängerstamm, der fähig ist DNA aus *E. coli* zu empfangen; ⁸pAT18 = Vektorplasmid bzw. Klonierungsvektor für Transformation; ⁹MRSA und MSSA aus Staub europ. Schweinehaltungen, ¹⁰*czrC* = Cadmium Zink Resistenzgen, das aus *E. coli* Transformanten extrahiert wurde; ¹¹MRSA und MSSA von nasalen Abstrichen von Kälbern; ¹²n. b. = nicht bestimmt oder bestimmbar

4.3 Vergleichende Analyse von Empfindlichkeiten zwischen Isolaten von Mensch und Tier

Im Zusammenhang mit dem Einsatz unterschiedlicher Biozidprodukte zur medizinischen Anwendung in Konsumprodukten oder Oberflächendesinfektion - wie bei Chlorhexidin oder Benzalkoniumchlorid - ist die Feststellung interessant, ob es zu einer vermehrten Toleranz bei humanen *S. aureus*-Isolaten gekommen ist. Im Gegenzug ist es vorstellbar, dass andere Biozide wie Zink und Kupfer, die in der Nutztierhaltung bzw. Fütterung Anwendung finden, ein Risiko für eine Toleranzentwicklung bei tierischen *S. aureus*-Isolaten darstellen. Innerhalb der vorliegenden Studie sollten Unterschiede zwischen den Empfindlichkeiten zwischen *S. aureus*-Isolaten von Mensch und Tier untersucht werden.

4.3.1 Vergleich der Empfindlichkeiten zwischen Isolaten von Mensch und Tier gegenüber Silbernitrat

Der Vergleich der MHK-Werte von menschlichen und tierischen Isolaten für Silbernitrat zeigte, dass kein signifikanter Unterschied zwischen menschlichen und tierischen *S. aureus*-Isolaten bezüglich der Empfindlichkeit gegenüber Silber nachgewiesen werden konnte. Jedoch konnte die statistische Auswertung innerhalb der Isolate des CC398 zeigen, dass humane Isolate tendenziell höhere ($P = 0,054$) MHK-Werte für Silbernitrat aufwiesen als die animalen Stämme des CC398. Dies zeigt, dass ein Einfluss der klonalen Linie von *S. aureus* auf die Ergebnisse berücksichtigt werden sollte. Im Folgenden beziehen sich die Daten zum Mensch-Tier-Vergleich bei den anderen Bioziden auf alle Isolate des Stammkollektivs unabhängig von der klonalen Linie, es sei denn es wird explizit darauf hingewiesen, dass nur CC398-Isolate analysiert wurden. Ein Vergleich der Ergebnisse von Isolaten unterschiedlicher klonaler Linien wird an späterer Stelle vorgenommen. Ein Grund für die verminderte Empfindlichkeit gegenüber Silbernitrat humaner MRSA- und MSSA-Stämme des CC398, die vorwiegend aus Krankenhäusern stammten, kann der selektive Druck, der durch den langjährigen und umfangreichen Einsatz von Silber als Antiseptikum in der Humanmedizin ausgeübt wird, sein. Zum anderen könnten die seit einiger Zeit auf dem Markt zu findenden verbrauchernahen Produkte wie Deodorants, Sportbekleidung, Schneidebretter, Waschmaschinen oder Kühlschränke, die Nanosilber enthalten, eine Ursache für den Empfindlichkeitsverlust von humanen Isolaten gegenüber Silber darstellen (SCENIHR 2014). Demgegenüber stammten die

animalen CC398-Isolate vor allem aus der Geflügelhaltung, in der Silber keine Anwendung finden sollte. Die Vergleiche mit Daten aus der Literatur lassen auf Hinweise für Empfindlichkeitsverluste humaner *S. aureus*-Isolate schließen (Tabelle 1). Da in diesen Studien nur selten Stammkollektive mit einer größeren Anzahl an Isolaten untersucht wurden, müssen diese Ergebnisse jedoch sehr vorsichtig bewertet werden.

4.3.2 Vergleich der Empfindlichkeiten zwischen Isolaten von Tier und Mensch gegenüber anderen Bioziden

Hinsichtlich der Empfindlichkeit gegenüber Acriflavin lassen sich in der vorliegenden Studie keine signifikanten Differenzen zwischen den Isolaten der Tiere und Menschen nachweisen. In den Studien von NOGUCHI et al. (1999, 2005) wurden jedoch für eine repräsentative Anzahl an Isolaten aus Asien und Japan sehr viel höhere MHK-Werte gegenüber ACR bei ausschließlich menschlichen Isolaten nachgewiesen. Diese stammen jedoch zumeist aus Krankenhäusern. Acriflavin wird als Bestandteil von Desinfektionsmitteln und äußerlich zur lokalen antiseptischen Wundbehandlung eingesetzt. Obwohl einige Studien neben der antiinflammatorischen und antimikrobiellen Wirkung auch eine antimalariale und antikanzerogene Wirkung von Acridinderivaten annehmen, sollten diese Anwendungen nicht als Grund für erhöhte MHK-Werte humaner *S. aureus* Isolate angenommen werden, da die Anwendung von acridinhaltigen lokalen Antiseptika die häufigste zu sein scheint (AUPARAKKITANON et al. 2003; PETRIKAITE et al. 2007; KUMAR et al. 2009; SONDHI et al. 2010; TOMAR et al. 2010). Für Alkyldiaminoethylglycinhydrochlorid konnten keine signifikanten Unterschiede in der Empfindlichkeit der Isolate bezüglich der Herkunft (Tier/Mensch) nachgewiesen werden. Die MHK-Bereiche und MHK_{50/90}-Werte waren für alle getesteten Isolate von Menschen und Tieren unabhängig von klonaler Linie identisch. Hinsichtlich Benzalkoniumchlorid zeigt sich bei getrennter Betrachtung von menschlichen und tierischen Isolaten, dass nur für Isolate vom Menschen eine bimodale Verteilungskurve vorliegt. Vereinzelt zeigen humane Isolate höhere MHK-Werte, dennoch liegt der MHK₉₀-Wert für die tierischen Isolate um eine Verdünnungsstufe höher. Die statistische Auswertung ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den humanen und animalen Isolaten. Dies gilt auch bezüglich des Vergleichs zwischen MHK-Werten von humanen und tierischen Isolaten innerhalb des CC398. In der Literatur wird jedoch von humanen Isolaten berichtet, welche

4. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

MHK-Werte $>16\mu\text{g/ml}$ für Benzalkoniumchlorid aufweisen, während tierische Isolate einheitlich etwas niedrige Empfindlichkeitsniveaus hatten (AARESTRUP u. HASMAN 2004; NOGUCHI et al. 2005; SLIFIERZ et al. 2015). Benzalkoniumchlorid ist ein weit verbreiteter Bestandteil von Desinfektionsmitteln, die uneingeschränkt frei verkäuflich sind. Daher könnten Anwendungsfehler solcher verbrauchernahen Benzalkoniumchlorid enthaltender Produkte zur Toleranzentstehung beitragen, ohne dass ein nosokomialer Hintergrund vorliegen muss. Anwendungsfehler bei der Desinfektion kommen vor allem im häuslichen Gebrauch vor, weshalb BEUMER et al. (1999) sogar Richtlinien für die häusliche Hygiene fordern. Grundlage für die Forderung waren Studien, die eine Zunahme von kritischen Pathogenen (bspw. *S. aureus*) in der häuslichen Umgebung und deren zoonotisches Potenzial beleuchteten (MASTERTON et al. 1995; ALLEN et al. 1997; HEROLD et al. 1998). Für Benzethoniumchlorid konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen Isolaten von Tier und Mensch festgestellt werden. Der MHK_{90} -Wert der humanen Isolate lag nur eine Verdünnungsstufe niedriger als der der tierischen Isolate. Auch innerhalb der CC398-Isolate konnte kein signifikanter Unterschied erfasst werden. Auch Chlorhexidin ist ein sehr häufig eingesetztes Biozid, weshalb der Selektionsdruck, insbesondere bei falscher Anwendung, hier als recht hoch angenommen werden kann. Innerhalb des getesteten Stammkollektivs konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Empfindlichkeiten von tierischen und menschlichen Stämmen gegenüber Chlorhexidin beobachtet werden. Auch innerhalb der CC398-Isolate wurden keine signifikanten Differenzen zwischen humanen und tierischen Isolaten errechnet. Die in der Literatur beschriebenen MHK-Ergebnisse bei *S. aureus* bezüglich Chlorhexidin liegen in sehr ähnlichen Bereichen, wobei auch hier kaum Unterschiede hinsichtlich der Empfindlichkeiten menschlicher und tierischer Isolate zu erkennen sind. Beispielsweise gibt es einige MRSA von Tier und Mensch die MHK-Werte von $8\mu\text{g/ml}$ aufweisen (CLARK et al. 2015; TAHERI et al. 2016), jedoch werden Werte von $16\mu\text{g/ml}$ nur von humanen MRSA erreicht (NOGUCHI et al. 2005; MORRISSEY et al. 2014).

Wie bereits beschrieben wird Kupfer bzw. Kupfersulfat in supranutritiven Konzentrationen als Futterzusatzstoff eingesetzt. Daher waren höhere MHK-Werte bei tierischen Isolaten zu erwarten, allerdings konnte kein signifikanter Unterschied zu den humanen Isolaten berechnet werden. Der statistische Vergleich humaner und tierischer Isolate des CC398 konnte ebenfalls keine Signifikanz zeigen. Bekanntermaßen wird neben Kupfer auch Zink in umfangreichem

Maße an Nutztiere verfüttert (NICHOLSON et al. 1999; ZHANG et al. 2012; DEBSKI 2016). Die vorliegende Studie konnte für die MHK-Verteilungen für Zinkchlorid eine bimodale Verteilungskurve aufzeigen. Im rechten Gipfel der Verteilung waren die MHK-Werte von drei CC398-Isolaten vom Geflügel zu finden. Dennoch lagen die $MHK_{50/90}$ -Werte von humanen und tierischen Isolaten für Zinkchlorid einheitlich bei 128 $\mu\text{g/ml}$. Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass MHK-Werte von $\geq 1951 \mu\text{g/ml}$ für Isolate aus Nutztierhaltungen häufig nachgewiesen werden können. Dagegen zeigt eine Studie von CAVACO et al. (2011), dass ein Teststamm menschlicher Herkunft ohne die spezifische Resistenzdeterminate *czrC* einen geringen MHK-Wert von 273 $\mu\text{g/ml}$ aufweist. Die statistische Analyse der Empfindlichkeitswerte von CC398-Isolaten zwischen menschlicher und tierischer Herkunft ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

Abschließend kann festgehalten werden, dass kein signifikanter Unterschied in den Empfindlichkeiten zwischen Isolaten vom Tier und vom Menschen bestätigt werden konnte. Lediglich für Silbernitrat ergab die statistische Analyse der CC398-Isolate deutlichere Unterschiede zwischen Isolaten von Mensch und Tier, wobei humane Isolate statistisch auffällig ($P = 0,054$) höhere MHK-Werte aufwiesen als animale Isolate. Obwohl das Signifikanzniveau von $P = 0,05$ knapp verfehlt wurde, untermauern diese Daten die Hinweise bezüglich einer herabgesetzten Empfindlichkeit humaner *S. aureus*-Isolate des CC398 gegenüber Silbernitrat im Vergleich zu den tierischen CC398-Isolaten.

4.4 Vergleich der MHK-Werte von *S. aureus*-Isolaten unterschiedlicher klonaler Linien

In einem weiteren Schritt sollte geklärt werden, ob *S. aureus*-Isolate unterschiedlicher klonaler Linien Differenzen in der Höhe der MHK-Werte für die getesteten Biozide aufzeigen. Dabei gibt es bekanntermaßen klonale Linien, die als typisch Mensch- oder typisch Tier-assoziiert, wie bspw. CC398, gelten. Innerhalb des Stammkollektivs waren insgesamt 28 unterschiedliche Sequenztypen (ST) vertreten, von denen einige STs nur durch ein Isolat repräsentiert wurden. Daher wurden nur Isolate der vier klonalen Linien CC5, CC22, CC9 und CC398, welche eine repräsentative Anzahl an Isolaten umfasste, in die statistische Auswertung einbezogen. Isolate des CC5 und CC22 gelten als typisch human-assoziierte Linien, während Isolate der CC398 und CC9 zu den typisch Tier-assoziierten Linien zählen. Dennoch können natürlich auch CC398-Isolate vom Menschen isoliert werden (RKI 2015).

4.4.1 Vergleich der MHK-Werte für Silbernitrat von Isolaten unterschiedlicher klonaler Linien

Für Silbernitrat konnten mittels statistischer Analyse Unterschiede in der Empfindlichkeit zwischen Isolaten der klonalen Linien CC5 und CC22 nachgewiesen werden, wobei die CC22-Isolate signifikant niedrigere MHK-Werte als die CC5-Isolate aufwiesen. Betrachtet man die Herkunft der einbezogenen CC5- und der CC22-Isolate, zeigt sich, dass innerhalb der 22 CC5-Isolate vom Menschen sieben Isolate von infizierten und drei von kolonisierten Personen stammten, wobei 12 Isolate einen unbekanntem Status aufwiesen. Unter den 19 CC22-Isolaten waren neun Isolate von infizierten, vier von kolonisierten Personen und bei sechs Isolaten blieb der Status ungeklärt. Folglich ist es unwahrscheinlich, dass der Infektionsstatus einen erheblichen Einfluss auf die ermittelten MHK-Werte hat. Dieses wurde später durch statistische Analysen bestätigt, bei denen der Faktor „Infektionsstatus“ bei der Herkunft der Isolate berücksichtigt wurde. Da sowohl CC5- als auch CC22-Isolate häufig in Krankenhäusern nachgewiesen werden (GRUNDMANN et al. 2014; RKI 2015), kann dies nicht als Ursache für die Empfindlichkeitsunterschiede gegenüber Silber angenommen werden.

4.4.2 Vergleich der MHK-Werte von Isolaten unterschiedlicher klonaler Linien gegenüber weiteren getesteten Bioziden

Für Acriflavin zeigte sich, dass Isolate des CC5 und CC22, die in Deutschland zu den typischen human-assoziierten HA-MRSA zählen (RKI 2015), signifikant höhere MHK-Werte als die CC398-Isolate aufwiesen. Ursächlich für die verminderte Empfindlichkeit dieser Isolate könnte, wie bereits diskutiert, ein häufiger Einsatz von acridinhaltigen lokalen Antiseptika, zu denen unter anderem auch Acriflavin zählt, im Krankenhausbereich sein (LEELAVATHI et al. 2011). Für Alkyldiaminoethylglycinhydrochlorid konnten keine Unterschiede in den *S. aureus* MHK-Werten zwischen den untersuchten klonalen Linien ermittelt werden. Hinsichtlich der Empfindlichkeiten gegenüber Benzalkoniumchlorid zeigt sich, dass die klonalen Linien CC22, CC5 und CC398 signifikant niedrigere MHK-Werte als die Isolate des CC9 aufweisen und damit deutlich sensibler auf Benzalkoniumchlorid reagieren. Innerhalb dieser Studie stammten alle ST9-Isolate (bis auf ein humanes ST9-Isolat) aus Geflügelbetrieben. Ob in den Geflügelbetrieben, aus denen die Isolate stammten, Benzalkoniumchlorid im Rahmen des

4. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

Desinfektionsmanagements als Wirkstoff eingesetzt wird, ist nicht bekannt. Grundsätzlich sind jedoch einige Desinfektionsmittel, die Benzalkoniumchlorid enthalten, auf dem Markt erhältlich. Die Hersteller von Aldovet[®] Super und Aldekol[®]-Des-03 geben als Anwendungsbereich unter anderem Geflügelstallungen, Batteriehaltungen, Schweinezucht- und Mastbetriebe, Kälber- und Rinderbetriebe sowie Stalleinrichtungen und Tiertransportfahrzeuge an. BJORLAND et al. (2001, 2003) berichten ebenfalls, dass auf Quartäre Ammonium Verbindungen basierende Desinfektionsmittel in unterschiedlichen Bereichen der Veterinärmedizin und zur Behandlung von Infektionen bei Tieren Anwendung finden. Zudem wird Benzalkoniumchlorid in Norwegen typischerweise als Bestandteil von Dippmitteln zur Mastitis-Prophylaxe in Milchkuhherden eingesetzt. Für Benzethoniumchlorid zeigt sich, dass die Isolate der klonalen Komplexe CC22, CC5 und CC9 signifikant höhere MHK-Werte aufweisen als die CC398-Isolate. Allerdings ergab sich auch zwischen Isolaten des CC9 und CC5 ein signifikanter Unterschied mit höheren MHK-Werten der CC9-Isolate. Wodurch die verminderte Sensibilität von Isolaten des CC9 gegenüber Benzethoniumchlorid hervorgerufen wird, lässt sich an dieser Stelle nicht klären. Allerdings könnte das vermehrte Vorhandensein und die Expression spezifischer toleranz-vermittelnder Gene bei CC9-Isolaten zu diesem Effekt führen. In der Literatur sind jedoch keine Studien veröffentlicht, die für *S. aureus* dieser klonalen Linie eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber QAVs nachgewiesen haben. Bezüglich der Empfindlichkeiten gegenüber Chlorhexidin zeigte sich, dass CC22-Isolate signifikant höhere MHK-Werte haben als CC398- und CC9-Isolate. Auch wiesen CC5-*S. aureus* ebenfalls signifikant höhere MHK-Werte auf als CC9- und CC398-Isolate. Diese Ergebnisse zeigen, dass für die typischen humanen HA-MRSA eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber Chlorhexidin vorliegt, was durch einen umfangreichen Einsatz von Chlorhexidin als Bestandteil von Desinfektionsmitteln und Antiseptika in Krankenhäusern erklärt werden könnte (NAGENDRAN et al. 2009; BENJAMIN et al. 2012). Es konnten für beide Schwermetalle - Kupfersulfat und Zinkchlorid - keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Empfindlichkeiten zwischen den untersuchten klonalen Linien ermittelt werden. Im Vergleich zu den getesteten Bioziden können Unterschiede in der Antibiotika-Empfindlichkeit bei *S. aureus*-Isolaten unterschiedlicher klonaler Linien vorkommen. So hat eine Studie aus China gezeigt, dass Isolate der klonalen Linien ST5, ST239 und ST59 auch unterschiedliche Antibiotikaresistenzprofile aufweisen. Die ST5-Isolate verfügten

4. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

beispielsweise über Resistenzen gegenüber Clindamycin, Erythromycin und Ciprofloxacin, während ST239-Isolate (t037) Resistenzen gegenüber Clindamycin, Erythromycin, Ciprofloxacin, Gentamycin, Tetracyclin und Trimethoprim/Sulfamethoxazol aufwiesen. Dabei wurden für ST239-Isolate (t030) erhöhte Resistenzen gegenüber Rifampicin und eine Sensibilität gegenüber Trimethoprim/Sulfamethoxazol detektiert, die auch von CHEN et al. (2010) und CHENG et al. (2013) beobachtet wurden. Im Gegensatz dazu wurde für ST59-Isolate, die zu den typischen CA-MRSA von Kindern in China zählen, nur gegenüber Clindamycin und Erythromycin eine Resistenzausbildung festgestellt (GENG et al. 2010; WANG et al. 2012; KONG et al. 2017). Demgegenüber konnten BENDARIF et al. (2016) keine Korrelation zwischen Antibiotika-Empfindlichkeiten und klonalen Linien von *S. aureus*-Isolaten aus Libyen feststellen. Allerdings wurde beobachtet, dass CC8- und CC339-Isolate die breitesten Antibiotikaresistenzprofile aufwiesen. Da diese Daten einen gezielteren Einsatz von Antibiotikaklassen in verschiedenen Bereichen (Veterinärmedizin, Tierhaltung oder Humanmedizin) ermöglichen können, ist es ebenso wichtig, vergleichbare Daten zu Biozidtoleranzen bei unterschiedlichen klonalen Linien zu erheben (KONG et al. 2017). Die vorliegende Studie liefert dazu erste Ansätze, die durch Testung weiterer Isolate noch belegt werden könnten.

4.5 Biozidtoleranz und Biozidtoleranz vermittelnde Gene bei Bakterien

Biozidprodukte werden seit langer Zeit in unterschiedlichen Bereichen (Medizin, Tierhaltung, Haushalt) zur Keimreduzierung angewendet und schließen ein breites Spektrum an Substanzen ein, die auf verschiedene Weise ihre antibakterielle Wirkung entfalten (ALAM et al. 2003; AIELLO u. LARSON 2003; BJORLAND et al. 2005). Besorgniserregend sind die zunehmenden Biozidtoleranzen, die durch Langzeitanwendung von Bioziden in subinhibitorischen Konzentrationen entstehen können (MCCAY et al. 2010). Während Antibiotika bzw. Antibiotikaklassen eine bestimmte Zielstruktur der Bakterienzelle angreifen, wirken Biozide an mehreren Zielstrukturen gleichzeitig, sodass eine Reaktion der Zelle hinsichtlich einer Zielstruktur nicht gleich zu einer Resistenz des Bakteriums führt, da noch andere nicht modifizierte Ziele für die Angriffe durch Biozide zur Verfügung stehen. Beispielsweise greifen Chlorhexidin und Benzalkoniumchlorid als positiv geladene Substanzen die negativ geladenen Zelloberflächenstrukturen an, zerstören diese und vermitteln so ihre

4. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

Aufnahme in die Zelle (GILBERT u. MOORE 2005). Darüber hinaus interagieren Biozide mit enzymatischen Systemen wie beispielsweise Chlorhexidin, das an die Adenosin-Triphosphatase bindet und in hohen Konzentrationen die Funktion inhibiert (KUYAKANOND u. QUESNEL 1992). Viele Biozide wie Acridinderivate interagieren mit Nukleinsäuren (z. B. DNA) bzw. zerstören Ribosomen (SILVER 1967, NAKAMURA u. TAMAOKI 1968). Ein weiterer Mechanismus für kationische Verbindungen wie Chlorhexidin ist die Koagulation des Zytoplasmas (FITZGERALD et al. 1989). Während diese Beispiele die variablen Zielstrukturen der Biozide erläutern, gibt es ebenso unterschiedliche Resistenzmechanismen. Als erworbene Toleranz- bzw. Resistenzmechanismen gegenüber Bioziden werden Mutationen in der DNA oder der Erwerb genetischen Materials durch Plasmide, Transposons oder selbst-replizierender extrachromosomaler DNA bezeichnet (PAULSEN et al. 1993). Die Blockierung der Aufnahme und die Detoxifizierung sind die zwei wesentlichen Resistenzmechanismen von Bakterien gegenüber Schwermetallen und Bioziden (RENSING u. GRASS 2003; SOLIOZ u. STOYANOV 2003). Bei *S. aureus* ist die Biozidtoleranz vorwiegend das Ergebnis einer veränderten Zellhülle, gesteigerter Effluxpumpen-Aktivität bzw. des Erwerbs von plasmid-assoziierten Genen (ORTEGA-MORENTE et al. 2013). Da diese Effluxpumpen bzw. Transporter mitunter wenig spezifisch sind, können sie die Bakterienzelle gegenüber einer Vielzahl von Bioziden schützen (GILBERT u. MCBAIN 2003).

Gemäß den Angaben in der Literatur und der Datenbank BacMet (2018) können an der Toleranzausbildung grampositiver Bakterien gegenüber Bioziden wie QAVs, Acriflavin und Chlorhexidin die Gene *lmrS*, *norA* und *qacA/B*, die für Multidrugtransporter der „major facilitator superfamily (MFS)“ codieren, die Gene *qacG*, *qacH*, *qacJ* und *smr* aus der „small multidrug resistance (SMR)“ Familie, das Gen *sepA* der „resistance nodulation cell division“ Familie und *mepA* als Vertreter aus „multidrug and toxic compound extrusion (MATE)“ Familie beteiligt sein (PAULSEN et al. 1995, 1996; HEIR et al. 1998, 1999; MITCHELL et al. 1998; NARUI et al. 2002; BJORLAND et al. 2003; HUET et al. 2008; FLOYD et al. 2010; PAL et al. 2014).

Das Gen *lmrS* ist chromosomal gelegen und codiert eine Effluxpumpe, die neben QAVs und Linezolid, welche zur Behandlung von MRSA- und VISA (Vancomycin-intermediäre *S. aureus*)-Infektionen eingesetzt werden, auch Natriumdodecylsulfat, Ethidiumbromid,

4. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

Lincomycin, Fusidinsäure transportiert (FLOYD et al. 2010). Die Effluxpumpe MepA wird durch das chromosomal lokalisierte Gen *mepA* codiert und vermittelt eine low-level Resistenz gegenüber QAVs (Cetrimide, Benzalkoniumchlorid, Tetraphenylphosphonium, Dequalinium), Chlorhexidin, Ethidiumbromid, Acriflavin, Rhodamine 6G, Pentadiamin, Trimethylamindiphenylhexatrien, Kristallviolett, Pyronin Y und Antibiotika (unter anderem Tigecyclin, Ciprofloxacin, Norfloxacin) (MCALEESE et al. 2005; KAATZ et al. 2005; HUET et al. 2008; COSTA et al. 2013). Das im Bakterienchromosom vorkommende Gen *norA* codiert für einen Efflux-Transporter, der eine Reihe von unterschiedlichen Wirkstoffen ausschleust, wie QAVs (Cetrimide, Benzalkoniumchlorid, Tetraphenylphosphonium, Dequalinium), Acriflavin, Chlorhexidin, Kristallviolett, Ethidiumbromid, Pentamidin, Pyronin Y, Rhodamin 6G und Fluorchinolone (YOSHIDA et al. 1990; HUET et al. 2008; DENG et al. 2012). Die Effluxpumpe SepA wird durch das chromosomale Gen *sepA* codiert und vermittelt eine low-level Resistenz gegenüber Benzalkoniumchlorid, Chlorhexidindigluconat, Ethidiumbromid und Acriflavin (NARUI et al. 2002). Die Gene *qacA* und *qacB* (hier als *qacA/B* bezeichnet, da beide Gene mittels PCR detektiert werden) codieren für eine Effluxpumpe, welche in der Zellmembran lokalisiert ist und die eingedrungene Substanz wieder aus der Bakterienzelle hinaus befördert und so die Konzentration der Substanz in der Zelle reduziert (PAL et al. 2014; ZOU et al. 2014). Die Gene *qacA/B* codieren für Proteine/Pumpen, die den Export von QAVs (Benzalkoniumchlorid, Cetylpyridiniumchlorid, Cetrimide), Biguanidinen (Chlorhexidin, Alexidin), Ethidiumbromid, Acriflavin, Kristallviolett, Pyronin Y, Quinaldinrot, sowie einer Reihe von Substanzen, die den Xanthenen, Diamidinen und Guanylhydrazonen zugeordnet werden, bedingen. Zudem belegen Studien, dass *qacA* zu einer erhöhten Toleranz gegenüber Chlorhexidin führen kann, während *qacB* nur geringfügig bis gar nicht zu einer Toleranzsteigerung gegenüber zweiwertigen Kationen wie Chlorhexidin beiträgt (LITTLEJOHN et al. 1992). Die häufig plasmid-lokalisierten Gene *qacG* und *qacH* codieren für Multidrug-Exporter, die Benzalkoniumchlorid, Ethidiumbromid und Proflavin (nur *qacH*) aus der Zelle transportieren (HEIR et al. 1999). Das Multidrug-Efflux-Protein QacJ, das durch das plasmid-assoziierte Gen *qacJ* codiert wird, schleust Benzalkoniumchlorid aus der Zelle (BJORLAND et al. 2003). Dagegen vermittelt das Gen *smr*, das in der Literatur auch als *qacC* oder *qacD* bezeichnet wird, Resistenz gegenüber QAVs (Cetrimide, Benzalkoniumchlorid,

4. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

Tetraphenylphosphonium, Cetylpyridiniumchlorid, Dequalinium), Ethidiumbromid, Pyronin Y, Rhodamin 6G und Kristallviolett (PAULSEN et al. 1993, 1995).

Darüber hinaus gibt es einige Gene, die Toleranzen gegenüber Schwermetallen vermitteln. Das „ATPase copper transport gene“ *copA*, welches Toleranz vorwiegend gegenüber Kupfer, aber laut Literatur auch vermutlich gegenüber Blei und Eisen vermittelt, zählt dazu (SITTHISAK et al. 2007). RENSING et al. (2000) beobachteten jedoch, dass *copA* keine weiteren Resistenzen gegenüber anderen Metallen vermittelt, obwohl die Expression des Gens beispielsweise durch die Anwesenheit von Silber - nicht jedoch durch Zink oder Cadmium - induziert wird. Ein weiteres Kupferresistenzgen „multicopper oxidase gene“ *mco*, welches Toleranz gegenüber Kupfer und Kobalt vermittelt, wurde bislang im Gegensatz zu *copA* auf Plasmiden oder auf Plasmiden, die in das Chromosom integriert wurden, lokalisiert (HOLDEN et al. 2004; SITTHISAK et al. 2005; BAKER et al. 2011; FESSLER et al. 2017). Toleranz gegenüber Zink und Cadmium wird dagegen durch das „cadmium zinc resistance gene“ *czrC* vermittelt, das vorwiegend chromosomal lokalisiert ist, aber auch schon auf Plasmiden detektiert wurde (SITTHISAK et al. 2005, 2007; CAVACO et al. 2010; GÓMEZ-SANZ et al. 2013; SLIFIERZ et al. 2015).

4.6 Vorkommen und Lokalisation von Biozidtoleranz vermittelnden Genen bei *S. aureus*-Isolaten der vorliegenden Studie

Mittels PCR-Analyse (polymerase chain reaction) wurden zunächst Isolate, die auffallend hohe MHK-Werte für QAVs, Acriflavin und Chlorhexidin aufwiesen und damit am rechten Ende der Verteilungskurve lagen, auf das Vorhandensein der spezifischen Toleranz vermittelnden Gene *lmrS*, *mepA*, *norA*, *sepA*, *qacA/B*, *qacG*, *qacH*, *qacJ* und *smr* untersucht (Publikation 1, Tabelle S1). Das Gen *mepA* wurde bei allen diesen Isolaten nachgewiesen. Für Acriflavin wurden 27 Isolate getestet, die einen MHK-Wert ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ aufwiesen, von denen 21 positiv für *norA*, 21 positiv für *lmrS*, 19 positiv für *sepA* und nur zwei Isolate positiv für *smr* waren. Von den 12 Isolaten mit MHK-Werten ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ für Benzalkoniumchlorid ließ sich bei 11 Isolaten das Gen *lmrS*, bei neun Isolaten das Gen *norA*, bei drei Isolaten *sepA*, bei zwei Isolaten *qacG* und bei einem Isolat *smr* nachweisen. Unter den 16 Isolaten mit MHK-Werten ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ für Benzethoniumchlorid wurde die Präsenz der Gene ähnlich häufig beobachtet: alle Isolate

4. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

wurden positiv auf *lmrS*, 11 auf *norA*, vier auf *sepA*, eins auf *qacA/B*, zwei auf *qacG*, eins auf *qacJ* und zwei auf *smr* getestet. Hinsichtlich Chlorhexidin ergibt sich ebenfalls eine ähnliche Verteilung bezüglich der Toleranzgen-Häufigkeiten. Es wurden neun Isolate mit MHK-Werten ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ untersucht, wobei *lmrS* bei acht, *norA* bei fünf, und *sepA* bei drei Isolaten nachgewiesen werden konnte (Publikation 1, Tabelle 2 und S1). LIU et al. (2015) konnten in ihrer Studie mit Mupirocin-resistenten MRSA folgende Häufigkeiten der Plasmid-assoziierten Gene *qacA/B* (83%) und *smr* (77,4%) beobachten. Die Präsenz für *norA* lag bei 49%, wobei 90,6% der Isolate als resistent gegenüber Chlorhexidin eingestuft wurden (LIU et al. 2015). Demgegenüber beobachteten VALI et al. (2008) bei klinischen MRSA in Großbritannien, dass 36,7% der Isolate positiv für *norA* waren. CONCEIÇÃO et al. (2016) konnten anhand ihres Stammkollektivs von 82 MRSA- und 219 MSSA-Isolaten aus drei afrikanischen Ländern sehr hohe Vorkommen für *sepA* (95,3%), *mepA* (89,4%) und *norA* (86,4%), etwas geringere Präsenzen für *lmrS* (60,8%) und *qacA/B* (40,5%) und eine sehr geringe Präsenz für *smr* (3,7%) feststellen. Diese Häufigkeiten kommen denen in der vorliegenden Studie ermittelten Häufigkeiten sehr nahe. Allerdings wurde das Gen *sepA* in der vorliegenden Studie etwas seltener nachgewiesen. Zudem wurden auch die Isolate mit MHK-Werten am rechten Ende der Verteilungskurve gegenüber den Schwermetallen Kupfersulfat und Zinkchlorid auf das Vorhandensein der Schwermetallresistenz vermittelnden Gene *copA*, *czrC* und *mco* untersucht. Unter den sieben Isolaten mit MHK-Werten ≥ 4096 $\mu\text{g/ml}$ gegenüber Kupfersulfat wiesen fünf Isolate *mco* auf und ein Isolat wurde positiv auf *copA* getestet. Alle drei Isolate mit MHK-Werten von > 8192 $\mu\text{g/ml}$ gegenüber Zinkchlorid wurden positiv auf *czrC* getestet. Anschließend wurde mittels Southern Blotting die Lokalisation der Gene bestimmt. Als plasmid-lokalisierte Gene wurden *smr*, *mco*, *copA*, *qacG* und *qacJ* nachgewiesen. In der Literatur wird beschrieben, dass die Gene *qacA/B* in *S. aureus*-Isolaten vorwiegend plasmid-assoziiert vorkommen, in der vorliegenden Studie wurden *qacA/B* jedoch nur als chromosomale Gene nachgewiesen (LEELAPORN et al. 1994; ORTEGA MORENTE et al. 2013). Alle anderen Biozidtoleranz vermittelnden Gene waren im Chromosom lokalisiert. Auch das Schwermetalltoleranz vermittelnde Gen *czrC* wurde als chromosomal lokalisiert nachgewiesen. Dies entspricht den Ergebnissen von CAVACO et al. (2010), die das Gen *czrC* zu 74% (n = 23) in tierischen und zu 48% (n = 24) in humanen CC398-MRSA-Isolaten auf dem SCC*mec*-Element lokalisierten. Allerdings kann das Gen *czrC* ebenfalls auf Plasmiden lokalisiert

4. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

werden, wie die Studie von GÓMEZ-SANZ et al. (2013) für MRSA-Isolate von Menschen und Schweinen zeigte. Ein Grund für dieses gemeinsame Vorkommen von Zinktoleranz- und Methicillinresistenz-Determinanten kann der Einsatz von Zinkchlorid enthaltenen Futtermitteln bei zeitgleich erfolgender antibiotischer Behandlung der Tiere sein (CAVACO et al. 2010; ORTEGA MORENTE et al. 2013). Dagegen wurde in der vorliegenden Arbeit bei einem Isolat, das per PCR positiv für das Vorkommen des Gens *mco* getestet wurde, zusätzlich das Kupferresistenzgen *copA* auf einem Plasmid lokalisiert. Diese zweite zusätzliche Kupferresistenzkomponente führte jedoch nicht zu einem weiteren phänotypischen Empfindlichkeitsverlust. Die Kupfertoleranzgene *mco* waren größtenteils auf Plasmiden lokalisiert, während ein Isolat ein chromosomal gelegenes *mco*-Gen aufwies. Hinsichtlich der Weitergabe und Verbreitung von Toleranz- und Resistenzgenen ist die Lokalisation der Gene entscheidend. Bakterien wie *S. aureus* geben ihre DNA nicht nur vertikal an die Tochtergeneration, sondern können DNA auch horizontal per Gentransfer (beispielsweise über Plasmide) an andere Bakterien weitergeben. Im Fall von plasmid-assoziierten Genen ermöglicht der horizontale Gentransfer eine einfache und schnellere Weitergabe auch mehrerer Resistenz- bzw. Toleranzgene, denn diese können auch gemeinsam auf mobilen genetischen Elementen vorkommen. Ein Transfer kann sogar an virulentere Staphylokokken oder auch andere Bakterienspezies erfolgen (BJORLAND et al. 2001, 2005; CORREA et al. 2008; ORTEGA-MORENTE et al. 2013).

4.6.1 Zusammenhang zwischen der Biozid-Empfindlichkeit und dem Vorhandensein spezifischer Toleranz vermittelnder Gene

Anschließend wurde überprüft, ob ein statistischer Zusammenhang zwischen der Präsenz spezifischer Toleranz vermittelnder Gene und einer erhöhten Toleranz der Bakterien gegenüber Bioziden besteht. Hierfür wurden die biozid-unempfindlicheren Isolate und einige ausgewählte biozid-empfindlichere Isolate (n = 15) in die Analysen einbezogen (Publikation 1, Tabelle S 1). Dabei ist aber zu bedenken, dass bei einem reinen Nachweis von DNA-Sequenzen, wie er hier per PCR erfolgte, die Expression dieser detektierten Gene nicht zwangsläufig auch stattfindet (LIU et al. 2015). Bezüglich der Alkyldiaminoethylglycinhydrochlorid-Empfindlichkeit ließ sich kein Zusammenhang zum Vorhandensein einzelner Gene beobachten. Die MHK-Werte für Acriflavin waren dagegen signifikant höher bei Isolaten, die das Gen *norA* aufwiesen.

4. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

Außerdem zeigte sich, dass Isolate mit dem Gen *lmrS* signifikant höhere MHK-Werte für Benzethoniumchlorid aufwiesen als Isolate ohne das Gen (Publikation 1, Tabelle S2). HE et al. (2014) untersuchten in ihrer Studie bei *S. aureus*-Isolaten den Zusammenhang zwischen einer Benzalkoniumchloridtoleranz und der Präsenz von Toleranzvermittelnden Genen. Die Isolate stammten von Oberflächen, welche regelmäßig mit antibakteriellen Tüchern oder Sprays, die Benzalkoniumchlorid in einer Konzentration von 0,02 bis 0,12% enthielten, desinfiziert wurden. Sie konnten in ihrer Studie nachweisen, dass die Gene *smr*, *qacG* (und *qacH*) an der Resistenz- bzw. Toleranzentstehung dieser Isolate beteiligt waren.

Hinsichtlich der Chlorhexidinempfindlichkeit fiel auf, dass kein Isolat mit erhöhten MHK-Werten für Chlorhexidin in der vorliegenden Arbeit über die Gene *qacA/B*, *qacG*, *qacH*, *qacJ* und *smr* verfügte. Offensichtlich wurde die geringere Empfindlichkeit gegenüber Chlorhexidin bei diesen Isolaten nicht durch die Präsenz dieser Gene vermittelt. Diese Beobachtung wird durch die Ergebnisse von SKOVGAARD et al. (2013) gestützt. Auch in dieser Studie konnte kein Zusammenhang zwischen der *qac*-Gen-Präsenz bei *Staphylococcus epidermidis* und einer Abnahme der Chlorhexidinempfindlichkeit gefunden werden. Hinsichtlich der Gene, die Schwermetalltoleranz vermitteln (*copA*, *mco* und *czcC*) und erhöhten MHK-Werten für Kupfersulfat, Zinkchlorid und Silbernitrat wurden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen Isolaten mit und ohne Gen festgestellt. Jedoch bleibt festzuhalten, dass von den sieben Isolaten mit MHK-Werten ≥ 4096 $\mu\text{g/ml}$ für Kupfersulfat nur 2 Isolate weder *mco* noch *copA* aufwiesen, während die anderen 5 Isolate jeweils mindestens über eine der beiden Resistenzgene verfügten. In einer Studie von GÓMEZ-SANZ et al. (2013) konnte jedoch eine klare Abnahme der Empfindlichkeit von MRSA-Isolaten von Schweinen (um das 2-fache der MHK-Werte von Isolaten ohne Gene) durch die Anwesenheit der Gene *copA* und *mco* festgestellt werden.

4.6 Biozidtoleranz und Antibiotikaresistenz

Zahlreiche Studien zeigen, dass häufig ein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Biozidtoleranz- bzw. Schwermetalltoleranz vermittelnden Genen und dem Vorkommen von Antibiotikaresistenz-Genen bei Bakterien gibt (GÓMEZ-SANZ et al. 2013; CONCEIÇÃO et al. 2016). In Fällen, in denen die vermittelnden Gene für Antibiotikaresistenz und Biozidtoleranz beispielsweise gemeinsam auf einem Plasmid liegen, können diese gekoppelt

4. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

weitergegeben werden. Das Ko-Selektionspotenzial von Genen für Antibiotika- und Metallresistenz ist seit langem bekannt (NOVICK u. ROTH 1968; FOSTER 1983), wobei zunächst der Zusammenhang von Quecksilbertoleranz und Antibiotikaresistenz untersucht wurde (SUMMERS et al 1993). Laut PAL et al. (2015) besteht für Quecksilber- und QAVs-Toleranzgene das weitaus größte Potenzial im Rahmen einer Ko-Selektion mit Antibiotikaresistenz-Genen weitergegeben zu werden. Dies liegt daran, dass Quecksilbertoleranzgene (bspw. *merA*, *merB*, *merD* und *merT*) und das QAV-Resistenz-Gen *qacEΔ1* die einzigen Metall- und Biozidresistenz-Gene sind, die häufig gemeinsam mit Antibiotikaresistenz-Genen auf Plasmiden vorkommen. Somit sind beide durch horizontalen Gentransfer leicht übertragbar. Daneben wurde aber bereits auch das Biozid- bzw. Metalltoleranzgen *cadD*, das Toleranz gegenüber Cadmium und Zink vermittelt, gemeinsam mit Makrolidresistenz vermittelnden Genen wie *mrs(A)* und *mph(C)* und dem Aminoglycosidresistenz vermittelnden Gen *aph(3')-IIa* auf Plasmiden nachgewiesen (MATSUOKA et al. 2003; OJO et al. 2006; WOEGERBAUER et al. 2014; PAL et al. 2015). Allerdings kommen Toleranzgene für andere Biozide und Metalle einschließlich Silber und Kupfer seltener gemeinsam mit Antibiotikaresistenz-Genen auf Plasmiden vor (PAL et al. 2015). Daher kann man hier von einem geringeren Potential für Ko-Selektionsprozesse ausgehen.

Es wurde weiterhin festgestellt, dass Bakterien, die Metall- und Biozidresistenz-Gene tragen, auch häufiger Antibiotikaresistenz-Gene aufweisen. Metall- und Biozidresistenz-Gene wurden laut PAL et al. (2015) in 86% der Bakteriengenome gefunden und sie kamen zu 17% gemeinsam mit Antibiotikaresistenz-Genen vor. Auf Plasmiden dagegen kam es bei weniger als 0,7% der Bakterien aus der Umwelt und etwas häufiger (5% bzw. 7%) bei Bakterien von Haustieren und Menschen zu einem gemeinsamen Vorkommen von Antibiotikaresistenz-Genen und Metall- und Biozidresistenz-Genen. Außerdem sind Plasmide, die Metall- und Biozidresistenz-Gene und Antibiotikaresistenz-Gene tragen, häufiger konjugativ und somit selbstübertragbar. PAL et al. (2015) konnten zudem feststellen, dass Kupfer, Silber, Arsen, Antimon, Kobalt, Nickel, Cadmium, Eisen, Zink, Quecksilber und QAVs als potentielle Ko-Selektoren für Bakterien wirken, die resistent gegenüber Sulfonamiden, β -Laktamen, Amphenicolen, Tetracyclinen und Aminoglykosiden sind.

4. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

Die Untersuchungen der vorliegenden Studie haben gezeigt, dass die Biozidtoleranz vermittelnden Gene *smr*, *qacG* und *qacJ* und die Metall- bzw. Kupfertoleranz vermittelnden Gene *mco*, *copA* und auf Plasmiden von *S. aureus* vorkommen, wobei das Gen *mco* in einem Isolat chromosomal gelegen lokalisiert wurde. Demgegenüber konnten die anderen Biozidtoleranz vermittelnden Gene *lmrS*, *sepA*, *mepA*, *qacA/B* und *norA* und das Zinktoleranz vermittelnde Gen *czrC* im Chromosom nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, ob die Plasmide, welche die Gene *smr*, *qacG*, *qacJ*, *mco* und *copA* tragen, auch über Antibiotikaresistenz-Gene verfügen. Weiterführende Untersuchungen der Isolate könnten Hinweise auf weitere Verknüpfungen zwischen Biozidtoleranz und Antibiotikaresistenz bei *S. aureus* offenlegen.

4.7 Silbertoleranz bei *S. aureus*-Isolaten und anderen bakteriellen Erregern

Die Empfindlichkeitstestung für Silbernitrat in der vorliegenden Arbeit ergab ein unimodales Verteilungsmuster mit nur geringen Unterschieden in den ermittelten MHK_{50/90}-Werten bei humanen und animalen Isolaten. Somit waren in der untersuchten Sammlung von *S. aureus*-Isolaten vermutlich keine Nicht-Wildtyp Isolate vorhanden. Dennoch kann es durch eine kontinuierliche Freisetzung von Silberionen über einen längeren Zeitraum zu einer Selektion weniger empfindlicher Bakterien kommen. Während für eine Vielzahl an gramnegativen Bakterien wie *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter cloacae*, Pseudomonaden, *Acinetobacter baumannii*, *E. coli* und *Klebsiella pneumoniae* Plasmid oder chromosomal lokalisierte Silberresistenzgene, die zu einer Toleranzsteigerung gegenüber Silber führen, beschrieben wurden (MCHUGH et al. 1975; ANNEAR et al. 1976; HENDRY u. STEWART 1979; BRIDGES et al. 1979; KAUR et al. 1985; KAUR u. VADEHRA 1986; DESHPANDE u. CHOPADE 1994; SILVER 2003), scheinen Silbertoleranzgene bei grampositiven Bakterien seltener vorzukommen. Im Zuge dessen gibt es nur eine Veröffentlichung, die das Silberresistenzgen *silE* in zwei MRSA und einem Methicillin-resistenten Koagulase-negativen *S. aureus* nachweisen konnte, wobei das Vorhandensein dieser Determinante nicht zu einer Toleranzsteigerung gegenüber Silber führte. Dennoch erscheint es möglich, dass Bakterien sich an steigende Silberkonzentrationen adaptieren können.

Im Jahr 1998 wurden erstmals die genetischen Hintergründe einer Silbertoleranz bei Bakterien beschrieben (MCHUGH et al. 1975; GUPTA u. SILVER 1998, SILVER 1998; GUPTA et al.

4. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

1999; SILVER et al. 1999). Die Mechanismen lassen sich in endogene und exogene (horizontal erworbene) Mechanismen einteilen. Endogene Mechanismen sind beispielsweise mit einem Verlust von speziellen *outer membrane* Proteinen (Außenmembranproteinen OMP C/F) und der Aufregulation von Effluxmechanismen (Cus-System) assoziiert, die als Effekt von zwei Punktmutationen nach einer längeren Silberionen-Exposition (AgNO_3) von Bakterien (bspw. *E. coli*) auftreten können (RANDALL et al. 2015). RANDALL et al. (2015) zeigten, dass sich nach einer 6-tägigen subinhibitorischen Silberexposition resistente Bakterien (*E. coli*) entwickelten. Diese *cusCFBA*-Gene codieren für ein System des aktiven extrazellulären Exports von einwertigem Silber und Kupfer. Die Protein-Komponenten dieser Effluxpumpe sind CusA, CusB und CusC, sowie ein periplasmatisches Chaperon CusF (SU et al. 2011a, b). Die Transkription der Gene wird durch die extrazelluläre Konzentration von Schwermetallionen und dem Vorhandensein des *cusRS* Operons gesteuert (CHACÓN et al. 2014). 1975 wurde in einem *S. Typhimurium* Isolat ein Plasmid pMG101 entdeckt, welches Resistenzgene (exogene Resistenz) für Schwermetalle (Hg, Ag), Tellurit und Antibiotika (Chloramphenicol, Streptomycin, Tetracyclin und Ampillicin) aufwies (SILVER et al. 1999; RANDALL et al. 2015). Die spezifische Region für die Silbertoleranz besteht aus neun Genen *silRS*, *silE*, *silCFBAGP*, die für Sil-Proteine codieren (RANDALL et al. 2015). Während die Funktion von SilG noch unbekannt ist, konnten die anderen Proteine anhand ihrer Homologie (>80 %) zu den CusCFBA-Komponenten bereits charakterisiert werden (SILVER 2003; FINLEY et al. 2015).

Schlussendlich zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie die Daten aus der Literatur, dass bei *S. aureus* bezüglich einer Toleranzentwicklung gegenüber Silber derzeit noch wenig Grund zur Besorgnis besteht. Alle getesteten MRSA und MSSA-Isolate zeigten einheitlich niedrige MHK-Werte für das Schwermetall ($\text{MHK}_{90} = 4\mu\text{g/ml}$). Aus diesem Grund sollten Nanosilberpartikel auf einer Lebensmittelkontaktfolie in einem Anwendungsversuch hinsichtlich ihrer antibakteriellen Wirkung und der Effekte auf die Fleischbeschaffenheit überprüft werden.

4.8 Einflüsse des Nanosilbers auf verschiedene Fleischbeschaffenheitsparameter

Verpackungen, bei denen ein Wirkstoff über einen längeren Zeitraum an das Lebensmittel oder in den Gasraum abgegeben wird, bezeichnet man als „Controlled Release-“, „Time Release-“ oder „Slow Release-Verpackungen“ (LACOSTE et al. 2005; MALHOTRA et al. 2015). Neben der Anwendung von organischen Substanzen wie Nisin, werden zunehmend anorganische Stoffe verwendet, die sehr viel stabiler gegenüber höheren Temperaturen sind (METAK u. AJAAL 2013; METAK 2015). Zu den anorganischen Stoffen zählen beispielsweise metallische Nanopartikel (Cu, Zn, Au, Ti und Ag), deren Einsatzgebiete immer weiter zunehmen (TOKER et al. 2013; CARBONE et al. 2015). Im Lebensmittelbereich sind vor allem Verpackungssysteme - wie Vorratsboxen - mit Nanosilber ausgestattet. Unabhängig von den speziellen Beschichtungen bestehen Verpackungen für Lebensmittel zumeist aus nicht biologisch abbaubaren, polymeren Kunststoffen wie Polyethylen (PE), Polypropylen (PP), Polyvinylchlorid (PVC) oder Ethylenvinylalkohol (EVOH). Die Kunststoffe PE, PVC und EVOH sind gleichzeitig auch die häufigsten Trägermaterialien für Nanopartikel wie Nanosilber (CARBONE et al. 2016). PE und PP sind die am häufigsten verwendeten Kunststoffe, wobei man bei PE zwischen dem high density PE (HDPE) und dem low-density PE (LDPE) unterscheidet (CARBONE et al. 2016). Letzteres stellt das flexiblere, transparentere und feuchtigkeitsresistentere Material dar. Aus diesem Grund wird auch nur das LDPE als Verpackungsüberfolie eingesetzt (MAHDI et al. 2012). PVC ist ein starres, aber biegsames und transparentes Material, welches vorwiegend für Vorratsboxen und Container zur Lebensmittelaufbewahrung eingesetzt wird (MAHDI et al. 2012; BRAGA et al. 2018). Gemäß der VO (EU) 10/2011 muss allerdings bei der Verwendung von PVC als Lebensmittelkontaktmaterial sichergestellt werden, dass Vinylchlorid (bspw. als Bestandteil von PVC-Folien) nicht in nachweisbaren Mengen in das Lebensmittel migrieren darf. EVOH ist ein Copolymer aus Ethylen sowie Vinylalkohol und ist als dünne Folie gegenüber Öl, Fett und Sauerstoff unempfindlich, jedoch sehr sensitiv gegenüber Feuchtigkeit. Wie Studien zeigen konnten, sinken mit steigender Temperatur und höherer relativer Feuchtigkeit die Barriereigenschaften gegenüber Sauerstoff (ZHANG et al. 1999; MURAMATSU et al. 2003; LOPEZ-RUBIO et al. 2005). Grund dafür ist die Feuchtigkeitsabsorption durch einzelne Hydroxylgruppen der EVOH-Folie, die Wassermoleküle über Wasserstoffbrückenbindungen

4. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

binden, sodass es folglich zur Schwellung der EVOH-Folie kommt (APICELLA u. HOPFENBERG 1982; IWAMOTO et al. 2006). Zudem muss wie im Fall von PVC-Folien gemäß der VO (EU) 10/2011 sichergestellt werden, dass Vinylchlorid als Bestandteil des Copolymers EVOH nicht in nachweisbaren Mengen in das Lebensmittel migriert. Aus diesen Gründen eignen sich die EVOH-Folien nicht für Verpackungen mit direkten Kontakt zu flüssigen oder sehr feuchten Lebensmitteln. Deswegen werden diese Folien regelmäßig, auch wegen der guten Barriereigenschaften für Gase wie Sauerstoff und Kohlendioxid, in mehrschichtigen Folien als Zwischenfolie ohne direkten Kontakt zu Produkten eingesetzt (MARTÍNEZ-ABAD et al. 2012). In dieser Studie wurde eine mehrschichtige Folie aus PE, EVOH und PP verwendet (Suedpack GmbH & CO KG, Ochsenhausen, Germany), wobei PP als Bestandteil der äußersten Schicht zum Stoßwiderstand sowie der Hitzebeständigkeit der Folie beiträgt. Die mittlere Schicht aus EVOH bedingt die sehr guten Barriereigenschaften der Folie gegenüber Gasen (z. B. O₂, CO₂, N₂, Wasserdampf, Aromastoffe). Die innerste PE-Schicht, die Kontakt zum Fleisch hat, ist sehr widerstandsfähig gegenüber Chemikalien und Fetten und hinsichtlich der Freisetzung möglicher Migrationsstoffe sehr unbedenklich. Da Nanosilber bakterizid gegenüber Hefen, Bakterien, Viren und Pilzen ist, gibt es verschiedene Untersuchungen, die die antimikrobielle Wirksamkeit von Nanosilber bezüglich Fleisch, Reis, Gemüse, Obst, Säften oder Lebensmittelsimulanzien in kommerziell vermarkteten Verpackungsmaterialien analysierten auf die in Kapitel 4.8.3 eingegangen wird (RAI et al. 2009, 2012; CHERNOUSOVA u. EPPLE 2013; REALINI u. MARCOS 2014). Zur Beurteilung der Fleischbeschaffenheit werden neben den Farbwerten, wie Rotwert (a*) und Helligkeitswert (L*), oft auch der Tropfsaftverlust, der pH-Wert, die elektrische Leitfähigkeit (EC) und die anteilmäßige Verteilung der Myoglobin-Redoxformen bestimmt. Weitere Parameter, die sich während der Lagerung verändern, sind die mikrobiologische Belastung des Lebensmittels, sowie die Konzentrationen chemischer Verderbnisindikatoren, wie biogener Amine und TBARS. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Studie diese Parameter an den Tagen 4, 8 und 12 während der 12-tägigen Lagerung von Schweinefleisch untersucht.

4.8.1 Einfluss der Nanosilberfolie auf Fleischbeschafftheits- und Myoglobin-Redoxform-Ergebnisse

Der Einfluss der Nanosilberfolie auf die Farb-Werte mit signifikant ($P \leq 0,05$) niedrigeren L^* -Werten der Schweineschnitzel am Tag 4 nach Kontakt mit der Nanosilberfolie (Tabelle 3, Publikation 1), welcher in der vorliegenden Arbeit festgestellt wurde, sollte nicht überbewertet werden. Grund dafür ist, dass sich während der weiteren Lagerung keine weiteren signifikanten Unterschiede der L^* - und auch der a^* - und b^* -Werte zwischen den beiden Folientypen mehr zeigten. Andere Studien konnten ebenfalls keine Auswirkungen von Nanosilberfolien auf die Farb-Werte von Hähnchen-, Rind oder Putenfleisch feststellen (FERNÁNDEZ et al. 2010a; AZLIN-HASIM et al. 2015, 2016; DEUS et al. 2017a). Da die Farb-Ergebnisse gering waren und andere Studien variierende Farbveränderungen zeigten, kann der Effekt der Nanosilberfolie auf Schweinefleisch als sehr gering angenommen werden. Um jedoch die Beeinflussung der Farbwerte besser nachvollziehen zu können, wurden ebenfalls die Myoglobin-Redoxformen, die maßgeblich die Farbe des Fleisches beeinflussen, in ihren veränderlichen Anteilen bestimmt (MANCINI u. HUNT 2005). Dabei werden die drei Myoglobin (Mb)-Redoxformen Oxy-myoglobin (OxyMb), welches eine frischhellrote Farbe hervorruft, Deoxy-myoglobin (DeoxyMb), welches ein tiefes bis dunkelrot erzeugt und Met-myoglobin (MetMb), welches zu einer Braunfärbung des Fleisches führt, analysiert (ORKUSZ et al. 2013). Die Anteile der Mb-Redoxformen wurden dabei durch die Nanosilberfolie stärker beeinflusst als die Farbmessung vermuten ließ (Publikation 2, Tabelle 4). Es zeigte sich, dass die OxyMb-Anteile von Schweinefleisch, welches mit der Nanosilberfolie in Kontakt kam, an den Lagerungstagen 4 und 12 signifikant ($P \leq 0,05$) höher waren als bei der Vergleichsgruppe, während die MetMb- und DeoxyMb-Anteile an diesen Tagen nach Nanosilberkontakt niedriger waren. An Tag 8 konnte ein komplett gegenteiliger Effekt auf die Anteile der Mb-Redoxformen bestimmt werden. Es lassen sich zwar Veränderungen der Farbe und der Myoglobin-Redoxformen durch Ag-NP hervorrufen, jedoch ist der Effekt aufgrund der nicht schlüssigen Ergebnisse schwer zu diskutieren. Grundsätzlich zeigte sich, dass Nanosilber nicht nur die Oxidation der Myoglobin-Moleküle, sondern auch deren Oxygenierung zu beeinflussen scheint. Bezüglich der Effekte, die Nanosilber auf die Myoglobin-Redoxformen ausübt, sind in der Literatur keine vergleichbaren Studien verfügbar, die die Beobachtungen der vorliegenden Studie untermauern. Jedoch haben MAHATO et al. (2011) nachweisen können, dass Ag-NPs an

4. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

Tryptophan-, Amid-, Häm- und aromatische Amin-Reste des Hämoglobinmoleküls binden können, wodurch das Hämoglobinmolekül seine Konformation ändert und sich entfaltet. Aufgrund der Strukturähnlichkeit zwischen Hämoglobin- und Myoglobinmolekülen lässt sich vermuten, dass Ag-NPs ebenfalls zu Veränderungen in der Tertiärstruktur der Myoglobinmoleküle führen, weshalb anzunehmen ist, dass Nanosilber indirekt auch die Bildung der Myoglobin-Redoxformen beeinflusst. Berücksichtigt man andere Parameter, wie Tropfsaftverlust, pH-Wert und elektrische Leitfähigkeit, so hat die Nanosilberfolie diese Parameter nicht signifikant beeinflusst. Dies war allerdings auch unter Berücksichtigung der fehlenden mikrobiologischen Effekte zu erwarten. In einer Studie von AN et al. (2008), die die physikalischen, chemischen und mikrobiologischen Effekte von Nanosilber für Spargel untersuchten, wurden hingegen während der 25-tägigen Lagerung positive Effekte der Nanopartikel, wie ein geringerer Gewichtsverlust, eine grünere Farbe und eine zartere Textur der Spargelstangen im Vergleich zu den Kontrollproben nachgewiesen. Hinsichtlich der Beeinflussung des pH-Werts, Tropfsaftverlustes und der elektrischen Leitfähigkeit gibt es in der Literatur keine vergleichbaren Studien, die diese Parameter für Fleisch in Verbindung mit Nanosilberpartikeln untersucht haben. Jedoch scheinen Nanopartikel einen generellen Effekt auf die elektrische Leitfähigkeit und das visuelle Erscheinungsbild durch Lichtstreuung und -absorption zu nehmen (DORIA et al. 2012).

4.8.2 Einfluss der Nanosilberfolie auf die chemischen Parameter

Zur Beurteilung der Frische werden oft zusätzlich die Konzentrationen biogener Amine und thiobarbitursäurereaktiver Substanzen (TBARS) als wichtiges Kriterium neben der mikrobiellen Kontamination bestimmt. Gewebs- oder mikrobielle Enzyme tragen durch die Decarboxylierung von freien Aminosäuren dazu bei, dass biogene Amine entstehen (NTZIMANI et al. 2008). Einige biogene Amine wie Histamin und Tyramin sind nicht nur Indikatoren für vorangeschrittenen Verderb, sondern führen bei empfindlichen Personen auch zu Krankheitserscheinungen wie Kopfschmerzen und Übelkeit (VINCI et al. 2002; FRAQUEZA et al. 2012). Während der 12-tägigen Lagerung konnten keine Effekte der Ag-NP auf die Konzentrationen der biogenen Amine Tyramin, Putrescin, Cadaverin, Histamin und Spermidin nachgewiesen werden. Dagegen konnten DEUS et al. (2017a) in einem identischen Versuchsaufbau für Putenbrüste, die in Nanosilberfolie verpackt wurden, signifikant höhere

4. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

Konzentrationen an Tag 4 der Lagerung für Cadaverin und Tag 12 für Tyramin im Vergleich zu Putenbrüsten der Kontrollverpackungen ohne Silber feststellen. DEUS et al. (2017a) wiesen ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den Konzentrationen weiterer biogener Amine für vakuumverpacktes Fleisch nach. In diesen Fällen wurden höhere Werte für Putrescin und Cadaverin an Tag 4 für Fleisch der Verpackungsvariante mit Nanosilber und für Tyramin, Histamin und Spermidin höhere Werte an Tag 8 für Fleisch aus Verpackungen ohne Nanosilberfolie ermittelt. Bezüglich der MAP Verpackungen konnten DEUS et al. (2017a) ebenfalls signifikante Unterschiede an einzelnen Probeentnahmetagen ermitteln, wobei allerdings eindeutige Effekte der Folie auf eine Erhöhung oder Verminderung der Konzentration einzelner biogener Amine nicht beobachtet werden konnte. Da es in der Literatur bislang an Studien mangelt, die die Effekte von Nanosilber auf die Bildung von biogenen Aminen untersucht haben, bleibt ungeklärt, ob und in welchem Rahmen Nanosilberpartikel die Bildung von biogenen Aminen hemmen oder begünstigen. Bei der TBARS-Analyse wird Malondialdehyd als Abbauprodukt des oxidativen Fettsäureabbaus nachgewiesen. Da eine verstärkte Lipidoxidation zu sensorischen Veränderungen des Fleisches führen kann und das Fleisch z. B. ranzig schmecken lässt, ist die TBARS-Analyse angezeigt, um Rückschlüsse auf die oxidativen Veränderungen innerhalb des Fleisches ziehen zu können (CORTEZ-VEGA et al. 2012). Studien konnten zeigen, dass hohe Sauerstoffkonzentrationen zu stärkerer Lipidoxidation führen (MARTINEZ et al. 2006; BLACHA et al. 2014). In der vorliegenden Studie konnte allerdings nur eine signifikante ($P \leq 0,05$) Erhöhung der Malondialdehyd-Konzentration an Tag 8 bei Fleisch mit Nanosilberkontakt festgestellt werden, so dass der Effekt von Nanosilber nicht überbewertet werden sollte. Da die an einem Tag beprobten Schweineschnitzel aus dem gleichen Teilstück geschnitten wurden, ist auch nachvollziehbar, dass der Fettgehalt und die damit assoziierte Lipidoxidation vergleichbar zwischen den Verpackungsvarianten mit und ohne Nanosilber waren. In der mit dieser Studie vergleichbaren Arbeit von DEUS et al. (2017a), die allerdings anstatt Schweinefleisch Putenbrüste untersuchte, wurden an Tag 4 der Lagerung signifikant höhere TBARS-Konzentrationen bei in Nanosilberverpackungen gelagertem Fleisch nachgewiesen als bei den in Kontrollfolie verpackten Proben, wohingegen an Tag 8 der gegenteilige Effekt beobachtet wurde. In der Literatur gibt es bislang nur wenige Studien, die die Effekte von Nanosilberpartikeln hinsichtlich der Lipidoxidation im Fleisch untersucht haben. In den Studien von AZLIN-

HASIM et al. (2016, 2018) wird jedoch für Hähnchenbrustfilets eine verminderte Lipidoxidation bzw. verbesserte oxidative Stabilität durch Verwendung Nanosilber beinhaltender PVC- und LDPE-Folien beschrieben.

4.8.3 Einfluss der Nanosilberfolie auf mikrobiologische Parameter

Die Nanosilberfolie konnte in der vorliegenden Studie an keinem Lagertag die Gesamtkeimzahlen sowie die Zahlen an Pseudomonaden und *Enterobacteriaceae* während der 12-tägigen Lagerung reduzieren. Anhand von elektronenmikroskopischen Bildern konnte jedoch eine geringere Konzentration und veränderte Anordnung der Ag-NPs auf der beschichteten Folie nach der Lagerung festgestellt werden. Auch andere Studien konnten keinen antimikrobiellen Effekt von Nanosilbermaterialien auf Hähnchen- und Rindfleisch nachweisen, jedoch konnte ein keimreduzierender Effekt bestimmt werden, wenn der während der Lagerung abtropfende Fleischsaft untersucht wurde (FERNÁNDEZ et al. 2009, 2010a). Auch LLORET et al. (2012) stellten in ihren Untersuchungen Reduktionen der bakteriellen Belastung von Rind- und Geflügelfleischexsudaten sowie Kiwi- und Melonensäften durch nanosilberbeladene Absorptionsmaterialien fest. Dagegen konnten AZLIN-HASIM et al. (2016) eine antimikrobielle Wirkung einer Nanosilberfolie gegenüber *Pseudomonas* spp. und der aeroben Gesamtkeimzahl auf Hähnchenbrustfilets nachweisen. MAHDI et al. (2012) zeigten, dass PVC Folien mit Ag-NPs das bakterielle Wachstum auf gehacktem Rindfleisch nach 7-tägiger Lagerung bei 4°C verhindern, wobei das Wachstum von *E. coli* stärker inhibiert wurde als das von *S. aureus*. MORSY et al. (2014) konnten ebenfalls für essbare, biologisch abbaubare Pullulan-Folien, in die Ag-NPs und ätherische Öle (Oreganoextrakt) eingebettet wurden, die antimikrobielle Wirkung für frisches und zuvor verarbeitetes rotes Fleisch und Geflügelfleisch belegen. MARCHIORE et al. (2017) zeigten, dass Milchsäurebakterien auf Hähnchenwürsten während einer Lagerung über 30 Tage durch das Eintauchen der Würste in eine Nanosilberlösung signifikant reduziert werden konnten. Möglicherweise ist eine höhere Lagerungsdauer wichtig, um die antibakteriellen Effekte der Nanosilberpartikel sichtbar zu machen. So fanden LEE et al. (2011) ebenfalls keine Reduktion der *Pseudomonas putida*-Keimzahlen für Rind-, Schweine- und Putenfleisch nach 3-tägiger Lagerung in Silberzeolith-Verpackungsfolie. Auch GALLOCCHIO et al. (2016) zeigten, dass kommerziell

4. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

nanosilberbeschichtete Plastiktüten nach 7-tägiger Lagerung zu keiner signifikanten Verminderung der Gesamtkeimzahl und der Konzentration an *Pseudomonas* spp. auf Hähnchenfleisch und Fleischbällchen führten. Hingegen gelang es in der Studie von DEUS et al. (2017a) nicht, in einem 12-tägigen Lagerungsversuch eine signifikante mikrobielle Reduktion auf Putenbrustfilets nach Lagerung in Kontakt mit einer kommerziellen Nanosilberfolie zu erzielen. MARTÍNEZ-ABAD et al. (2012) untersuchten die antibakterielle Wirkung einer Folie, in die Silberionen eingebettet wurden, auf Lebensmittel mit variierenden Proteingehalten, da diese die Silberionen in unterschiedlichem Maße in ihrer Wirkung inhibieren würden. Als Lebensmittel mit geringem Proteingehalt wurden Gemüse, Fruchtstücke und Fruchtsäfte getestet, während Käse und Fleisch als Lebensmittel mit hohem Proteingehalt untersucht wurden. Die Ergebnisse zeigten, dass Ag-NPs bei Lebensmitteln mit geringem Proteingehalt weniger gehemmt wurden, wobei ein deutlicher antibakterieller Effekt erst bei Folien mit 10 %-igen Ag-NPs erreicht wurde. Es gelang in dieser Studie jedoch nicht, antimikrobielle Effekte bei Lebensmitteln mit geringem Proteingehalt mit Konzentrationen von 0,1 % Silbergehalt in den EVOH-Folien zu erzielen. Dagegen konnten LI et al. (2017) während einer 35-tägigen Lagerdauer geringere Keimgehalte bei Reis, der in nanosilberbeschichteten Folien eingepackt war, im Vergleich zu in Kontrollfolien verpacktem Reis beobachten. Da der Reis, zum einen sehr viel trockener ist als frisches Fleisch und zum anderen über einen längeren Zeitraum gelagert wurde, ist davon auszugehen, dass die längere Kontaktzeit zu den Nanosilberpartikeln sowie der Feuchtigkeitsgehalt der Produkte ebenfalls die antibakterielle Wirksamkeit von Nanosilberfolien beeinflusst (LI et al. 2017). EMAMIFAR et al. (2010) konnten ebenfalls zeigen, dass LDPE-Matrices, die Nanosilber beinhalten, gute antimikrobielle Eigenschaften in Verbindung mit Hitze erzielen, sodass die Pasteurisierungstemperatur für Orangensaft um 10°C gesenkt werden konnte. FERNÁNDEZ et al. (2010b) untersuchten die antimikrobiellen Effekte von Nanosilberpartikeln in Absorptionsmaterialien auf Melonenstücke. Sie konnten zeigen, dass Ag-NPs aus den Absorptionsmaterialien freigesetzt wurden sobald diese mit Melonensaft durchtränkt waren. Da die antimikrobielle Wirkung der Ag-NPs kaum durch Bindung bspw. an Proteine eingeschränkt wurde, konnten die Nanosilberpartikel enthaltenden Absorptionsmaterialien das Wachstum der Verderbnisflora auf Melonenstücken teilweise reduzieren.

4.8.4 Beeinflussung der antimikrobiellen Eigenschaften von nanosilberbeschichteten Folien

Während die antibakterielle Wirksamkeit der Silberionen zum einen durch Bildung unlöslicher Präzipitate (AgCl) oder durch Interaktion mit Proteinen (Albumin) vermindert wird, ist zum anderen die Freisetzung der Metallionen aus den Materialien ein wichtiger Faktor hinsichtlich deren antibakterieller Wirkung (ESPITIA et al. 2012; SHI et al. 2014; KĘDZIORA et al. 2018). Deswegen wurden in den letzten Jahren zahlreiche Studien veröffentlicht, die die Migration von Nanosilber aus unterschiedlichen Kunststoffen (PE, PP, HDPE, LDPE, PVC) mit unterschiedlichen Lebensmitteln und spezifischen Simulanzien untersucht haben (ECHEGOYEN u. NESRIN 2013; ARTIAGA et al. 2015; HANNON et al. 2016; MACKEVICA et al. 2016; STÖRMER et al. 2017). Einige der Studien untersuchten auch das Migrationspotential von Ag-NPs aus PE-Kunststoffen bei geringen Temperaturen von ca. 4 bis 8 °C, die vergleichbar mit der Lagerungstemperatur dieser Studie sind. Zusammenfassend sind allerdings in diesen Studien bei diesen geringen Temperaturen, auch bei Produkten oder Simulanzien mit erhöhter Azidität, nur sehr geringe Silberkonzentrationen von 0,01 bis 3,0 µg/dm² nachgewiesen worden. Die Ergebnisse dieser und weiterer Studien, bei denen die Migration bei höheren Temperaturen getestet wurde, sind allerdings auch aufgrund unterschiedlicher Versuchsanordnungen und Nachweismethoden sehr heterogen. Bezüglich dieser Heterogenität verweisen STÖRMER et al. (2017) darauf, dass bei einigen im Labor oder kommerziell hergestellten Nanopartikel-beschichteten Kunststoffen die Partikel unter einer dünnen Schicht eines Polymers liegen, wodurch kein direkter Kontakt zum Lebensmittel oder Simulanz möglich ist. Werden die Kunststofffolien während der Analyse der Migrationswerte jedoch in kleinere Stücke zerschnitten, so können an diesen Schnittkanten die Nanopartikel in direkten Kontakt zum Lebensmittel oder Simulanz treten und folglich Ionen auch besser migrieren. Das Problem ist, dass dieser sogenannte „cutting edges effect“ bei den Migrationsversuchen oftmals nicht beachtet wird, obwohl dieser höhere Konzentrationen der Migrationssubstanzen bedingen kann (STÖRMER et al. 2017). Zudem bemängeln STÖRMER et al. (2017), dass bei allen Studien als quantitative Nachweismethode ein Verfahren eingesetzt wurde, das nicht zwischen Ag-NPs und Silberionen unterscheiden kann. Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass heterogene Migrationsraten nachgewiesen wurden, allerdings übereinstimmend höhere Migrationsraten bei Lebensmitteln oder Simulanzien mit niedrigerem

pH-Wert beobachtet wurden. Die Freisetzung der Ionen ist aber auch von der Molekülmasse, den Verpackungsmaterialien, der Zusammensetzung des Lebensmittels und der Lagerung bzw. Zubereitungsart (bspw. Ofen oder Mikrowelle) abhängig (CARBONE et al. 2005; STÖRMER et al. 2017). Nach STÖRMER et al. (2017) wird das Migrationsverhalten von Nanoteilchen in einem Polymer von dessen molekularem Volumen bestimmt. Nanopartikel mit einer Größe von 1-2 nm haben eine reelle Chance sich zwischen den größeren Plastikpolymeren zu bewegen, jedoch werden Nanopartikel dieser Größe praktisch nicht in Lebensmittelverpackungen eingesetzt.

Dass in der vorliegenden Studie die Nanosilberfolie keine antibakterielle Wirkung zeigte, könnte mit der zu geringen Konzentration an Ag-NPs auf der Folie, deren Form und Größe, sowie der geringen Migration bei der niedrigen Lagertemperatur und der zu kurzen Lagerdauer zusammenhängen. Außerdem könnten die Ag-NPs durch den Tropfsaft, der während der Lagerung vom Schweinefleisch abtropft, von der Fleischoberfläche gespült oder durch Bindungen an Proteine und Fette inhibiert worden sein (CARBONE et al. 2005; FERNÁNDEZ et al. 2010b, c, MARTÍNEZ-ABAD et al. 2012; LI et al. 2017; STÖRMER et al. 2017).

4.9 Antimikrobielle Effekte der Nanosilberfolie auf inokuliertes Schweinefleisch

Nachdem keine keimreduzierende Wirkung der Nanosilberfolie auf natürlich kontaminiertem Schweinefleisch beobachtet werden konnte, wurden in einer zweiten Studie inokulierte Fleischstücke in einem ähnlichen Versuch über eine Lagerdauer von 8 Tagen zu unterschiedlichen Zeitpunkten beprobt. Als Keim zur Inokulation wurde ein Methicillin-resistenter *S. aureus* vom Sequenztyp ST398 ausgewählt. *S. aureus* dieser klonalen Line sind häufig bei Schweinen zu finden. Allerdings konnte auch in diesem Versuch kein messbarer antibakterieller Effekt durch Verwendung der Nanosilberfolie erzielt werden. Gründe dafür können ebenfalls durch den angenommenen Verlust der Nanosilberteilchen in den Tropfsaft, die zu geringe Konzentration an Partikeln auf der Folie, die inhibierende Wirkung der Nährstoffe im Fleisch und die zu kurze Lagerungsdauer sein.

5. Zusammenfassung

Isa Adriana Kernberger-Fischer

Nanosilberbeschichtete Lebensmittelverpackungsfolie zur Reduktion von Keimen auf Schweinefleisch und Testung der Empfindlichkeit von MRSA- und MSSA-Isolaten gegenüber Silber und sieben weiteren Bioziden

Wie Studien belegen, lassen sich auch MRSA auf Schweinefleisch nachweisen. Es besteht also die Möglichkeit, dass vor allem rohes Fleisch als Vektor für eine Transmission von MRSA zwischen Tier und Mensch fungiert. Während Silber schon seit langem in der Medizin Anwendung findet, wird der Einsatz von Nanosilber in Lebensmittelkontaktmaterialien zur Keimreduktion auf Lebensmitteln und zur Haltbarkeitsverlängerung kontrovers diskutiert.

Ziel der vorliegenden Studie war es, zunächst die Empfindlichkeit von humanen und tierischen MRSA- und MSSA-Isolaten gegenüber Silbernitrat und sieben weiteren Bioziden zu überprüfen. Anschließend sollten die Effekte einer mit Nanosilber beschichteten Folie auf verschiedene mikrobiologische und physikochemische Fleischparameter von verpacktem Schweinefleisch in einem Lagerungsversuch untersucht werden. In zusätzlichen Versuchen wurde die gezielte Wirkung der mit Nanosilber beschichteten Folie auf mit MRSA inokuliertes Schweinefleisch in einem weiteren Lagerversuch eruiert.

Die Empfindlichkeitstestung von MRSA und MSSA-Isolaten humaner und tierischer Herkunft wurde mittels Bouillon-Mikrodilution durchgeführt. Hierbei wurden die Minimalen Hemmkonzentrationswerte (MHK-Werte) für Alkyldiaminoethylglycinhydrochlorid, Benzethoniumchlorid, Benzalkoniumchlorid, Chlorhexidin, Acriflavin, Kupfersulfat, Silbernitrat und Zinkchlorid bestimmt. Zudem wurden Isolate mit erhöhten MHK-Werten auf das Vorhandensein Toleranz vermittelnder Gene (*lmrS*, *mepA*, *norA*, *sepA*, *qacA/B*, *qacG*, *qacH*, *qacJ*, *smr*, *copA*, *mco* und *czrC*) untersucht. Die statistische Analyse zeigte, dass es keine signifikanten Unterschiede der MHK-Werte zwischen Isolaten tierischer und humaner Herkunft, sowie zwischen Isolaten von kolonisierten und erkrankten Wirten gab. Gegenüber Silbernitrat zeigte sich für die getesteten MSSA- und MRSA-Isolate ein relativ enges,

unimodales Verteilungsmuster der MHK-Werte. Isolate mit verminderter Empfindlichkeit wurden nicht beobachtet. Innerhalb der CC398-Isolate wurden für humane Isolate aber tendenziell höhere MHK-Werte gegenüber Silbernitrat im Vergleich zu den animalen Isolaten ermittelt. Darüber hinaus wiesen CC5-Isolate signifikant höhere MHK-Werte gegenüber Silbernitrat auf als CC22-Isolate. Für die zusätzlich untersuchten Biozide Acriflavin, Alkyldiaminoethylglycinhydrochlorid, Benzethoniumchlorid, Chlorhexidin und Kupfersulfat wurden ebenfalls unimodale, aber deutlich breitere Verteilungsmuster sichtbar. Eine bimodale Verteilung der MHK-Werte für Benzalkoniumchlorid und Zinkchlorid lieferte Hinweise auf eine tolerantere Subpopulation der MRSA/MSSA. Nur für Acriflavin, Benzethoniumchlorid, Benzalkoniumchlorid und Chlorhexidin wurden signifikante Unterschiede der MHK-Werte unterschiedlicher klonaler Linien beobachtet. Bei Isolaten mit erhöhten MHK-Werten für Quartäre Ammoniumverbindungen, Acriflavin und Chlorhexidin wurden vorwiegend die Gene *lmrS*, *sepA* und *norA* detektiert, während die Gene *qacA/B*, *qacG*, *qacJ* und *smr* nur vereinzelt nachzuweisen waren. Für Isolate mit erhöhten MHK-Werten für Kupfersulfat und Zinkchlorid wurden die Gene *mco*, *copA* und *czrC* nachgewiesen. Die statistische Analyse, die als Vergleichsgruppe eine Auswahl an Isolaten mit niedrigen MHK-Werten einschloss, konnte jedoch keinen Zusammenhang zwischen Genpräsenz und verminderter Empfindlichkeit von Isolaten offenlegen.

Anschließend wurden in Verpackungsversuchen Schweineschnitzel in vier unterschiedlichen Verpackungsvarianten über eine Dauer von 12 Tagen gelagert. Bei den vier unterschiedlichen Verpackungsvarianten handelte es sich um: Schutzgasatmosphäre (80% O₂ + 20% CO₂) mit Kontrollfolie (MAP 1), Vakuum mit Kontrollfolie (V 1), Schutzgasatmosphäre mit Nanosilberfolie (MAP 2) und Vakuum mit Nanosilberfolie (V 2). In einem sich anschließenden Versuch wurden Schweineschnitzel mit MRSA inokuliert und mit direktem Kontakt zur Nanosilberfolie bzw. zur Kontrollfolie über 8 Tage gelagert. Hinsichtlich des Folientyps zeigten sich während der Lagerung nur vereinzelt signifikante Effekte der Nanosilberfolie. Zum einen wurden für das Fleisch an Tag 4 in den Verpackungen V 1 und MAP 1 signifikant höhere L*-Werte als für Schnitzel in V 2- und MAP 2-Verpackungen ermittelt. Deutlichere Ergebnisse wurden für die Anteile der Myoglobinredoxformen nachgewiesen. Für die Verpackungsvarianten mit Nanosilber wurden an den Tagen 4 und 12 signifikant höhere und an Tag 8 signifikant niedrigere OxyMb-Anteile nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurden für

die Verpackungsvarianten V 2 und MAP 2 an den Tagen 4 und 12 signifikant niedrigere MetMb- und DeoxyMb-Anteile ermittelt, während an Tag 8 der gegenteilige Effekt beobachtet wurde. Demgegenüber wurden für MAP oder Vakuumverpackungen signifikante Effekte auf die Keimzahlen, die L*- und a*-Werte sowie die OxyMb- und MetMb-Anteile beobachtet. Während die Gesamtkeimzahl an Tag 12 in MAP 1 und 2 signifikant höher lag als in V 1 und 2, wurden für *Pseudomonas* spp. (Tag 8) und für *Enterobacteriaceae* (Tag 8, 12) in den Vakuumverpackungen höhere Keimzahlen ermittelt. Zudem wurden während der gesamten Lagerdauer höhere L*-Werte in MAP 1 und 2 beobachtet. Des Weiteren wurden in V 1 und 2 (Tag 8, 12) signifikant höhere OxyMb-Anteile und signifikant niedrigere MetMb-Anteile ermittelt. Innerhalb der Inokulationsversuche konnten keine keimreduzierenden Effekte der Nanosilberfolie auf die MRSA-Keimzahlen im Vergleich zur Kontrollfolie beobachtet werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zum einen, dass die Empfindlichkeitslage der untersuchten Isolate gegenüber Silbernitrat als sehr gut einzustufen ist und innerhalb des untersuchten Stammkollektivs keine Toleranzentstehung gegenüber Silber zu beobachten ist. Allerdings zeigte sich auch, dass der Einsatz einer Nanosilberfolie nicht zu den erwarteten antimikrobiellen Effekten bei Verpackung von Schweinefleisch führte. Diesbezüglich sollten die Effekte der Folie anhand eines weniger proteinreichen Produktes überprüft werden, sowie die Konzentration an Nanosilber auf der Folie an das Produkt und die vermuteten Verluste durch den Tropfsaft oder durch Bindung an andere Lebensmittel- oder Folienbestandteile angepasst werden.

6. Summary

Isa Adriana Kernberger-Fischer

Nanosilver-coated food packaging film for reducing germs on pork and susceptibility testing of MRSA and MSSA isolates to silver and seven other biocides

Studies have shown that MRSA can also be detected on pork. It is therefore possible that raw meat in particular acts as a vector for the transmission of MRSA between animals and humans. While silver has long been used in medicine, the use of nanosilver in food contact materials for germ reduction on food and for prolonging shelf life is controversially discussed.

The aim of the present study was first to test the susceptibility of human and animal MRSA and MSSA isolates to silver nitrate and seven other biocides. Subsequently, the effects of a nanosilver coated film on various microbiological and physicochemical meat parameters of packaged pork should be investigated in a storage experiment. In additional experiments, the targeted effect of the nanosilver-coated foil on MRSA-inoculated pork was investigated in a further storage experiment.

The susceptibility testing of MRSA and MSSA isolates of human and animal origin was performed by broth microdilution. The minimum inhibitory concentration (MIC) values were determined for alkyldiaminoethyl glycine hydrochloride, benzethonium chloride, benzalkonium chloride, chlorhexidine, acriflavine, copper sulphate, silver nitrate and zinc chloride. In addition, isolates with increased MIC results were examined for the presence of tolerance-mediating genes (*lmrS*, *mepA*, *norA*, *sepA*, *qacA/B*, *qacG*, *qacH*, *qacJ*, *smr*, *copA*, *mco* and *czcC*). The statistical analysis revealed that there were no significant differences in the MIC values between isolates of animal and human origin or between isolates of colonised and diseased hosts. The tested MSSA and MRSA isolates showed a relatively narrow, unimodal distribution pattern of MIC values for silver nitrate. Isolates with reduced susceptibilities were not observed. However, within the CC398 isolates, higher MIC results for silver nitrate were observed for human isolates than for animal isolates. In addition, CC5 isolates showed

6. Summary

significantly higher MIC values for silver nitrate than CC22 isolates. For the additionally investigated biocides; acriflavine, alkyldiaminoethyl glycine hydrochloride, benzethonium chloride, chlorhexidine and copper sulphate, not only were unimodal patterns visible, but also significantly wider distribution patterns. A bimodal distribution of the MIC values for benzalkonium chloride and zinc chloride indicated a more tolerant subpopulation of MRSA/MSSA. For acriflavine, benzethonium chloride, benzalkonium chloride and chlorhexidine, significant differences in the MIC values of different clonal lineages were observed, whereas these differences were not detectable for alkyldiaminoethyl glycine hydrochloride, copper sulphate and zinc chloride. Isolates with elevated MIC results for quaternary ammonium compounds, acriflavine and chlorhexidine mainly harboured the genes *lmrS*, *sepA* and *norA*, whereas the genes *qacA/B*, *qacG*, *qacJ* and *smr* could only be sporadically detected. For isolates with increased MIC values for copper sulphate and zinc chloride, the genes *mco*, *copA* and *czrC* were detected. However, the statistical analysis, which included a selection of isolates with low MIC values as a comparison group, could not reveal any correlation between gene presence and reduced susceptibility of isolates.

Subsequently, in packaging trials, pork cutlets was stored in four different packaging variants for a period of 12 days. The four different packaging variants were as follows: 1) modified atmosphere packaging (80% O₂ + 20% CO₂) with control foil (MAP 1), vacuum with control foil (V 1), modified atmosphere packaging with nanosilver foil (MAP 2) and vacuum with nanosilver foil (V 2). In a subsequent experiment, pork cutlets were inoculated with MRSA and stored in direct contact with the nanosilver and the control foil for eight days. With regard to the film type, only a few significant effects of the nanosilver foil were observed during storage. For a start, significantly higher L* values were determined for the meat on day 4 in the V 1 and MAP 1 packaging than for cutlets in the V 2 and MAP 2 packaging. Clearer results were found for the proportions of myoglobin redox forms. For the packaging variants with nanosilver, significantly higher OxyMb proportions were found on days 4 and 12 and significantly lower ones on day 8. In contrast, significantly lower levels of MetMb and DeoxyMb were found for the V 2 and MAP 2 packaging variants on days 4 and 12, while the opposite effect was observed on day 8. In contrast, significant effects on microbial counts, L* and a* values, OxyMb and MetMb content were observed for MAP or vacuum packaging. While the total viable counts on day 12 were significantly higher in MAP 1 and 2 than in V 1 and 2, higher microbial counts

6. Summary

were observed for *Pseudomonas* spp. (day 8) and *Enterobacteriaceae* (day 8, 12) in the vacuum packages. In addition, higher L* values were observed in MAP 1 and 2 throughout the storage period. Furthermore, significantly higher OxyMb proportions and significantly lower MetMb proportions were observed in V 1 and 2 (day 8, 12). Within the inoculation experiments, no antibacterial effects of the nanosilver foil on the MRSA microbial counts compared to the control foil could be observed.

The results of this study show, on the one hand, that the susceptibility of the investigated isolates to silver nitrate can be classified as very good and, on the other hand, that within the investigated strain collection, no emerging tolerance to silver can be observed. However, it was also found that using a nanosilver film did not lead to the expected antimicrobial effects in the pork packaging. In this respect, the effects of the film should be assessed using a less protein-rich product, and the concentration of nanosilver on the film should be adjusted to the product and the presumed drip losses or binding to other food or foil components.

7. Literaturverzeichnis

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(1-2), 83-89

AARESTRUP, F. M., A. M. SEYFARTH u. Ø, ANGEN (2004):

Antimicrobial susceptibility of Haemophilus parasuis and Histophilus somni from pigs and cattle in Denmark.

Vet. Microbiol. 101, 143-146

ABDEL RAHIM, K. A. u. A. M. ALI MOHAMED (2015):

Bactericidal and antibiotic synergistic effect of nanosilver against methicillin-resistant Staphylococcus aureus.

Jundishapur J. Microbiol. 8(11), e25867

AIELLO, A. E. u. E. LARSON (2003):

Antibacterial cleaning and hygiene products as an emerging risk factor for antibiotic resistance in the community.

Lancet Infect. Dis. 3, 501-506

AKIMITSU, N, H. HAMAMOTO, R. INOUE, M. SHOJI, A. AKAMINE, K. TAKEMORI, N. HAMASAKI u. K. SEKIMIZU (1999):

Increase in resistance of methicillin-resistant Staphylococcus aureus to beta-lactams caused by mutations conferring resistance to benzalkonium chloride, a disinfectant widely used in hospitals.

Antimicrob. Agents Chemother. 43(12), 3042-3043

7. Literaturverzeichnis

AL-MASAUDI, S. B., M. B. DAY u. A. D. RUSSELL (1991):

Antimicrobial resistance and gene transfer in *Staphylococcus aureus*.

J. Appl. Bacteriol. 70, 279-290

ALAM, M. M., M. ISHINO u. N. KOBAYASHI (2003):

Analysis of genomic diversity and evolution of the low-level antiseptic resistance gene *smr* in *Staphylococcus aureus*.

Microb. Drug Resist. 9 (Suppl. 1), 1-7

ALLEN, K. D., J. J. ANSON, L. A. PARSONS u. N. G. FROST (1997):

Staff carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (EMRSA 15) and the home environment: a case report.

J. Hosp. Infect. 35, 307-311

AN, J., M. ZHANG, S. WANG u. J. TANG (2008):

Physical, chemical and microbiological changes in stored green asparagus spears as affected by coating of silver nanoparticles-PVP.

LWT - Food Sci. Technol. 41(6), 1100-1107

ANDREWS, J. M. (2001):

Determination of minimum inhibitory concentrations.

J. Antimicrob. Chemother. 48(1), 5-16

ANNEAR, D. I., B. J. MEE u. M. BAILEY (1976):

Instability and linkage of silver resistance, lactose fermentation, and colony structure in *Enterobacter cloacae* from burn wounds. .

J. Clin. Pathol. 29(5), 441-443

7. Literaturverzeichnis

APICELLA, A. u. H. B. HOPFENBERG (1982):

Water-swelling behavior of an ethylene-vinyl alcohol co-polymer in presence of sorbed sodium chloride.

J. Appl. Polym. Sci. 27, 1139-1148

ARMAND-LEFEVRE, L., R. RUIMY u. A. ANDREMONT (2005):

Clonal comparison of Staphylococcus aureus isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs.

Emerg. Infect. Dis. 11(5), 711-714

ARTIAGA, G., K. RAMOS, L. RAMOS, C. CÁMARA u. M. GÓMEZ-GÓMEZ (2015):

Migration and characterisation of nanosilver from food containers by AF4-ICP-MS.

Food Chemistry 166, 76-85

AUPARAKKITANON, S., W. NOONPAKDEE, R. K. RALPH, W. A. DENNY u. P. WILAIRAT (2003):

Antimalarial 9-anilinoacridine compounds directed at hematin.

Antimicrob. Agents Chemother. 47(12), 3708-3712

AYLIFFE, G. A. J., A. BUCKLES, M. W. CASEWELL, B. D. COOKSON, R. A. COX G. J. DUCKWORTH, G. L. FRENCH, A. GRIFFITHS-JONE, R. HEATHCOCK, H. HUMPHREYS, C. T. KEANE R. R. MARPLES, D. C. SHANSON, R. SLACK u. E. TEBBS (1998):

Revised guidelines for the control of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection in hospitals.

J. Hosp. Infect. 39(4), 253-290

AYMERICH, T., P. A. PICOUET u. J. M. MONFORT (2008):

Decontamination technologies for meat products.

Meat Sci. 78(1-2), 114-129

AZLIN-HASIM, S., M. C. CRUZ-ROMERO, M. A MORRIS, E. CUMMINS u. J. P KERRY (2018):

Spray coating application for the development of nanocoated antimicrobial low-density polyethylene films to increase the shelf life of chicken breast fillets

Food Sci. Technol. Int. <https://doi.org/10.1177/1082013218789224>

AZLIN-HASIM, S., M. C. CRUZ-ROMERO, M. A. MORRIS, S. C. PADMANABHAN, E. CUMMINS u. J. P. KERRY (2016):

The potential application of antimicrobial silver polyvinyl chloride nanocomposite films to extend the shelf-life of chicken breast fillets.

Food Bioprocess. Technol. 9, 1661-1673

BAKER, J., M. SENGUPTA, R. K. JAYASWAL u. J. A. MORRISSEY (2011):

The Staphylococcus aureus CsoR regulates both chromosomal and plasmid-encoded copper resistance mechanisms.

Environ. Microbiol. 13, 2495-2507

BEDOUX, G., B. ROIG, O. THOMAS, V. DUPONT u. B. LE BOT (2012):

Occurrence and toxicity of antimicrobial triclosan and by-products in the environment.

Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 19(4), 1044-1065

BENDARIF, E., A. KHALIL, A. RAYES, E. BENNOUR, A. DHAWI, J. J. LOWE, S. GIBBS u. R. V. GOERING(2016):

Goering Characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated at Tripoli Medical Center, Libya, between 2008 and 2014.

J. Med. Microbiol. 65(12), 1472-1475

BENJAMIN, B., F. CHRIS, G. SALVADOR, G. MELISSA u. N. SUSAN (2012):

Visual and confocal Microscopic interpretation of patch tests to benzethonium chloride and benzalkonium chloride.

Skin Res. Technol. 18, 272-277

7. Literaturverzeichnis

BEUMER, R., S. F. BLOOMFIELD, M. EXNER, G. FARA u. E. A. SCOTT (1999):

The need for a home hygiene policy and guidelines on home hygiene.

Ann. Ig. 11(1), 11-26

BISDORFF, B., J. SCHOLHOLTER, K. CLAUSSEN, M. PULZ, D. NOWAK u. K. RADON (2012):

MRSA-ST398 in livestock farmers and neighbouring residents in a rural area in Germany.

Epidemiol. Infect. 140(10), 1800-1808

BLACHA, I., C. KRISCHEK u. G. KLEIN (2014):

Influence of modified atmosphere packaging on meat quality parameters of turkey breast muscles.

J. Food Prot. 77(1), 127-132

BRIDGES, K., A. KIDSON, E. J. LOWBURY u. M. D. WILKINS (1979):

Gentamicin- and silver-resistant pseudomonas in a burns unit.

BMJ 17(6161), 446-449

BROOK, I. u. S. M. FINEGOLD (1979):

Bacteriology of chronic otitis media.

J. Am. Med. Assoc. 241, 487-488.

BJORLAND, J., T. STEINUM, B. KVITILE, S. WAAGE, M. SUNDE u. E. HEIR (2005):

Widespread Distribution of Disinfectant Resistance Genes among Staphylococci of Bovine and Caprine Origin in Norway.

J. Clin. Microbiol. 43(9), 4363-4368

BJORLAND, J., T. STEINUM, M. SUNDE, S. WAAGE u. E. HEIR (2003):

Novel plasmid-borne gene qacJ mediates resistance to quaternary ammonium compounds in equine Staphylococcus aureus, Staphylococcus simulans, and Staphylococcus intermedius.

Antimicrob. Agents Chemother. 47(10), 3046-3052

7. Literaturverzeichnis

BJORLAND, J., M. SUNDE u. S. WAAGE (2001):

Plasmid-Borne smr Gene Causes Resistance to Quaternary Ammonium Compounds in Bovine Staphylococcus aureus.

J. Clin. Microbiol. 39(11), 3999-4004

BONDI, J. A. u. C. C. DIETZ (1945):

Penicillin resistant staphylococci.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 60, 55-58

BORCH, E., M. L. KANT-MUERMANS u. Y. BLIXT (1996):

Bacterial spoilage of meat and cured meat products.

Int. J. Food Microbiol. 33(1), 103-120

BRAGA, L. R., E. T. RANGEL, A. Z. SUAREZ u. F. MACHADO (2018):

Simple synthesis of active films based on PVC incorporated with silver nanoparticles: Evaluation of the thermal, structural and antimicrobial properties.

J. Food Pack. Shelf Life 15, 122-129

BUMBUDSANPHAROKE, N. u. S. KO (2015):

Nano-Food Packaging: An Overview of Market, Migration Research, and Safety Regulations.

J. Food Sci. 80(5) R910-923

BUTKUS, M. A., L. EDLING u. M. P. LABARE (2003):

The efficacy of silver as a bactericidal agent: advantages, limitations and considerations for future use.

J. Water Supply Res. Technol. AQUA 52, 407-416

BVL - BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND
LEBENSMITTELSICHERHEIT (2010):

Berichte zur Lebensmittelsicherheit 2009 - Zoonosen-Monitoring.

[Internet URL: <http://www.bvl.bund.de/ZoonosenMonitoring>] (zuletzt besucht: 11.09.2018)

BVL - BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND
LEBENSMITTELSICHERHEIT (2012):

Berichte zur Lebensmittelsicherheit 2010 - Zoonosen-Monitoring.

[Internet URL: <http://www.bvl.bund.de/ZoonosenMonitoring>] (zuletzt besucht: 11.09.2018)

BVL- BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND
LEBENSMITTELSICHERHEIT (2013):

Berichte zur Lebensmittelsicherheit 2011 - Zoonosen-Monitoring.

[Internet URL: <http://www.bvl.bund.de/ZoonosenMonitoring>] (zuletzt besucht: 11.09.2018)

BVL - BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND
LEBENSMITTELSICHERHEIT (2014):

Berichte zur Lebensmittelsicherheit - Zoonosen-Monitoring 2012.

[Internet URL: <http://www.bvl.bund.de/ZoonosenMonitoring>] (zuletzt besucht: 11.09.2018)

BVL - BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND
LEBENSMITTELSICHERHEIT (2015):

Berichte zur Lebensmittelsicherheit - Zoonosen-Monitoring 2013.

[Internet URL: <http://www.bvl.bund.de/ZoonosenMonitoring>] (zuletzt besucht: 11.09.2018)

BVL - BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND
LEBENSMITTELSICHERHEIT (2016a):

Berichte zur Lebensmittelsicherheit - Zoonosen-Monitoring 2014.

[Internet URL: <http://www.bvl.bund.de/ZoonosenMonitoring>] (zuletzt besucht: 11.09.2018)

BVL - BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND
LEBENSMITTELSICHERHEIT (2016b):

Berichte zur Lebensmittelsicherheit - Zoonosen-Monitoring 2015.

[Internet URL: <http://www.bvl.bund.de/ZoonosenMonitoring>] (zuletzt besucht: 11.09.2018)

7. Literaturverzeichnis

BVL - BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND
LEBENSMITTELSICHERHEIT (2017):

Berichte zur Lebensmittelsicherheit - Zoonosen-Monitoring 2016.

[Internet URL: <http://www.bvl.bund.de/ZoonosenMonitoring>] (zuletzt besucht: 11.09.2018)

BVL - BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND
LEBENSMITTELSICHERHEIT (2018):

Bestrahlung von Lebensmitteln.

[Internet URL:

https://www.bvl.bund.de/DE/01_Lebensmittel/03_Verbraucher/10_LMBestrahlen/lm_LM_Bestrahlen_node.html] (zuletzt besucht: 11.09.2018)

CARBONE, M., D. T. DONI, G. SABBATELLA u. R. ANTIOCHIA (2016):

Silver nanoparticles in polymeric matrices for fresh food packaging.

J. King Saud. Univ. Sci. 28(4), 273-279

CARBONE, M., G. SABBATELLA, S. ANTONAROLI, H. REMITA, V. ORLANDO, S.
BIAGIONI u. A. NUCARA (2015):

Exogenous control over intracellular acidification: enhancement via proton caged compounds coupled to gold nanoparticles.

Biochim. Biophys. Acta 1850, 2304-2307

CARPENTER, C. E., D. P. CORNFORTH u. D. WHITTIER (2001):

Consumer preferences for beef color and packaging did not affect eating satisfaction.

Meat Sci. 57(4), 359-363

CAPLICE, E. u. G. F. FITZGERALD (1999):

Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation.

Int. J. Food Microbiol. 50(1-2), 131-149

CASTELLANO, J. J., S. M. SHAFII, F. KO, G. DONATE, T. E. WRIGHT, R. J. MANNARI, W. G. PAYNE, D. J. SMITH u. M. C. ROBSON (2007):

Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs.

Int. Wound. J. 4, 114-122

CAVACO, L. M., H. HASMAN u. F. M. AARESTRUP (2011):

Zinc resistance of *Staphylococcus aureus* of animal origin is strongly associated with methicillin resistance.

Vet. Microbiol. 150 (3-4), 344-348

CAVACO, L. M., H. HASMAN, M. STEGGER, P. S. ANDERSEN, R. SKOV, A. C. FLUIT, T. ITO u. F. M. AARESTRUP (2010):

Cloning and occurrence of *czrC*, a gene conferring cadmium and zinc resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 isolates.

Antimicrob. Agents Chemother. 54, 3605-3608

CHA, D. S. u. M. S. CHINNAN (2004):

Biopolymer-based antimicrobial packaging: a review.

Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 44, 223-237

CHACÓN, K. N., T. D. MEALMAN, M. M. MCEVOY u. N. J. BLACKBURN (2014):

Tracking metal ions through a Cu/Ag efflux pump assigns the functional roles of the periplasmic proteins.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 111, 15373-15378

CHAMBERS, H. F. (1997)

Parenteral antibiotics for the treatment of bacteremia and other serious staphylococcal infections.

in: CROSSLEY, K. B. u. ARCHER, G. L. (Hrsg): *The staphylococci in human disease*

1. Auflage, Verlag Churchill Livingstone, New York, N.Y, S. 583-601

7. Literaturverzeichnis

CHATTERJEE, T, B. K. CHATTERJEE, D. MAJUMDAR u. P.CHAKRABARTI (2015):
Antibacterial effect of silver nanoparticles and the modeling of bacterial growth kinetics using a modified Gompertz model.

Biochim. Biophys. Acta. 1850(2), 299-306

CHEFTEL, J. C. u. J. CULIOLI (1997):

Effects of high pressure on meat: A review.

Meat Sci. 46(3), 211-236

CHEN, H., Y. LIU, X. JIANG, M. CHEN u. H. WANG (2010):

Rapid change of methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones in a Chinese tertiary care hospital over a 15-year period.

Antimicrob. Agents Chemother. 54, 1842-1847

CHENG, H., W. YUAN, F. ZENG, Q. HU, W. SHANG, D. TANG D., W. XUE, J. FU, J. LIU, N. LIU, J. ZHU, J. YANG, Z. HU, J. YUAN, X. ZHANG, S. LI, Z. CHEN, X. HU u. X. RAO (2013):

Molecular and phenotypic evidence for the spread of three major methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones associated with two characteristic antimicrobial resistance profiles in China.

J. Antimicrob. Chemother. 68, 2453-2457

CHERNOUSOVA, S. u. M. EPPLE (2013):

Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal.

Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 52, 1636-1653

CHOI, O., K. K DENG, N. J. KIM, L. JR. ROSS, R. Y. SURAMPALLI u. Z. HU (2008):

The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth.

Water Res. 42(12), 3066-3074

7. Literaturverzeichnis

CHUANCHUEN, R., K. BEINLICH, T. T. HOANG, A. BECHER, R. A. 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(2), 428-432

CHURCH, N. (1994):

Developments in modified-atmosphere packaging and related technologies.

Trends. Food Sci. Technol. 5(11), 345-352

CLARK, S. M., A. LOEFFLER u. R. BOND (2015):

Susceptibility in vitro of canine methicillin-resistant and -susceptible staphylococcal isolates to fusidic acid, chlorhexidine and miconazole: opportunities for topical therapy of canine superficial pyoderma.

J. Antimicrob. Chemother. 70(7), 2048-2052

COELHO, J. R., J. A. CARRIÇO, D. KNIGHT, J.-L. MARTÍNEZ, I. MORRISSEY, M. R. OGGIONI u. A. T. FREITAS (2013):

The Use of Machine Learning Methodologies to Analyse Antibiotic and Biocide Susceptibility in *Staphylococcus aureus*.

PLoS ONE, 8(2), e55582

CONCEIÇÃO, T., C. COELHO, H. DE LENCASTRE u. M. AIRES-DE-SOUSA (2016):

High Prevalence of Biocide Resistance Determinants in *Staphylococcus aureus* Isolates from Three African Countries.

Antimicrob. Agents Chemother. 60(1), 678-681

7. Literaturverzeichnis

CORREA, J. E., A. DE PAULIS, S. PREDARI, D. O. SORDELLI u. P. E. JERIC (2008):
First report of qacG, qacH and qacJ genes in Staphylococcus haemolyticus human clinical isolates.

J. Antimicrob. Chemother. 62, 956-960.

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

CPI - COSUMER PRODUCTS INVENTORY (2017):

The Project on Emerging Nanotechnologies.

[Internet: URL: <http://www.nanotechproject.org/cpi/products/>] (zuletzt besucht: 11.09.2018)

CROSSLEY, K. B., K. K. JEFFERSON, G. L. ARCHER u. V. G. FOWLER (2009):

Staphylococci in Human Disease

2. Auflage, Verlag Wiley-Blackwell, Oxford, UK

CUNY, C., A. W. FRIEDRICH, S. KOZYTSKA, F. LAYER, U. NÜBEL, K. OHLSEN, B. STROMMENDER, B. WALTHER, L. WIELER u. W. WITTE (2010):

Emergence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in different animal species.

Int. J. Med. Microbiol. 300(2-3), 109-117

CUNY, C., A. W. FRIEDRICH u. W. WITTE (2012):

Absence of livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus clonal complex CC398 as a nasal colonizer of pigs raised in an alternative system.

Appl. Environ. Microbiol. 78, 1296-1297

7. Literaturverzeichnis

CUNY, C., R. NATHAUS, F. LAYER, B. STROMMENGER, D. ALTMANN u. W. WITTE (2009):

Nasal Colonization of Humans with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CC398 with and without Exposure to Pigs.

PLoS ONE 4(8), e6800

CUNY, C., B. STROMMENGER, W. WITTE u. C. STANEK (2008):

Clusters of infections in horses with MRSA ST1, ST254, and ST398 in a veterinary hospital.

Microb. Drug Resist. 14(4), 307-310

CUNY, C., L. H. WIELER u. W. WITTE (2015):

Livestock-Associated MRSA: The Impact on Humans.

Antibiotics (Basel) 4(4), 521-543

DA CRUZ CABRAL, L., V. FERNÁNDEZ PINTO u. A. PATRIARCA (2013):

Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods.

Int. J. Food Microbiol. 166(1), 1-14

DE KRUIJF, N., M. VAN BEEST, R. RIJK, T. SIPILAINEN-MALM, P. P. LOSADA u. B. DE MEULENAER (2002):

Active and intelligent packaging: applications and regulatory aspects.

Food Addit. Contam. 19, 144-162

DE NEELING, A. J., M. J. VAN DEN BROEK, E. C. SPALBURG, M. G. VAN SANTEN-VERHEUVEL, W. D. DAM-DEISZ, H. C. BOSUIZEN, A. W. VAN DE GIESSEN, E. VAN DUIJKEREN u. X. W. HUIJSDENS (2007):

High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs.

Vet. Microbiol. 122(3-4), 366-372

7. Literaturverzeichnis

DEBEAUFORT, F., J. A. QUEZADA-GALLO, B. DELPOTE u. A. VOILLEY (2000):
Lipid hydrophobicity and physical state effects on the properties of bilayer edible films.
J. Membr. Sci. 180, 47-55

DEBSKI, B. (2016):
Supplementation of pigs diet with zinc and copper as alternative to conventional antimicrobials.
Pol. J. Vet. Sci. 19(4), 917-924

DENG, X., F. SUN, Q. JI, H. LIANG, D. MISSIAKAS, L. LAN u. C. HE (2012):
Expression of Multidrug Resistance Efflux Pump Gene norA Is Iron Responsive in
Staphylococcus aureus.
J. Bacteriol. 194(7), 1753-1762

DESHPANDE, L. M. u. B. A. CHOPADE (1994):
Plasmid mediated silver resistance in Acinetobacter baumannii.
Biometals. 7(1), 49-56

DEUS, D., C. KEHRENBURG, D. SCHAUDIEN, G. KLEIN u. C. KRISCHEK (2017a):
Effect of a nano-silver coating on the quality of fresh turkey meat during storage after modified
atmosphere or vacuum packaging.
Poult. Sci. 96, 449-457

DEUS, D., C. KRISCHEK, Y. PFEIFER, A. R. SHARIFI, U. FIEGEN, F. REICH, G. KLEIN
u. C. KEHRENBURG (2017b):
Comparative analysis of the susceptibility to biocides and heavy metals of extended-spectrum
 β -lactamase-producing Escherichia coli isolates of human and avian origin, Germany
Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 88(1), 88-92

DEVLIEGHERE, F., L. VERMEIREN u. J. DEBEVERE (2004):
New preservation technologies: Possibilities and limitations.
Int. Dairy J. 14(4), 273-285

DIEZ, A. M., E. M. SANTOS, I. JAIME u. J. ROVIRA (2009):

Effectiveness of combined preservation methods to extend the shelf life of Morcilla de Burgos.
Meat Sci. 81(1),171-177

DILLON, V. M. (1998):

Yeast and molds associated with meat and meat products.

in: DAVIES, A. u. R. BROAD (Hrsg): The Microbiology of Meat and Poultry

1. Auflage, Verlag Blackie Academic and Professional, Glasgow, S. 85-117

DINGES, M. M., P. M. ORWIN u. P. SCHLIEVERT (2000):

Exotoxins of Staphylococcus aureus.

Clin. Microbiol. Rev. 13, 16-34

DORIA, G., J. CONDE, B. VEIGAS, L. GIESTAS, C. ALMEIDA, M. ASSUNCAO, J. ROSA
u. P. V. BAPTISTA (2012):

Noble metal nanoparticles for biosensing applications.

Sensors. 12, 1657-168

DURÁN, N., P. D. MARCATO, R. D. CONTI, O. L. ALVES, F. T. M. COSTA u. M.
BROCCHI (2010):

Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible
mechanisms of action.

J. Braz. Chem. Soc. 21, 949-959

EBERMANN, R. u. I. ELMADFA (2008):

Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung

2. Auflage, Verlag Springer, Wien, Österreich

7. Literaturverzeichnis

EARS-NET - EUROPEAN ANTIMICROBIAL RESISTANCE SURVEILLANCE NETWORK u. ECDC - EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (2017):

Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2016: Annual Report of the European Antimicrobial resistance Surveillance Network (EARSNet).

ECDC, Stockholm

ECHA – European Chemicals Agency (2018):

List of notification Prepared as of 31 July 2018.

ECHA, Helsinki [Internet: URL: <https://echa.europa.eu>] (zuletzt besucht: 11.09.2018)

ECHEGOYEN, Y. u. C. NERIN (2013):

Nanoparticle release from nano-silver antimicrobial food containers.

Food Chem. Toxicol., 62C, 16-22

EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2009):

Assessment of the Public Health significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods.

EFSA Journal 993:1-73

[Internet: URL: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/993>] (zuletzt besucht: 11.09.2018)

EGGER, S, R. P. LEHMANN, M. J. HEIGHT, M. J. LOESSNER u. M. SCHUPPLER (2009):

Antimicrobial Properties of a Novel Silver-Silica Nanocomposite Material.

Appl. Environ. Microbiol. 75(9), 2973-2976

EMAMIFAR, A., M. KADIVAR, M. SHAHEDI u. S. SOLEIMANIAN-ZAD (2011):

Effect of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on inactivation of *Lactobacillus plantarum* in orange juice.

Food Control 22, 408-413

7. Literaturverzeichnis

ESPITIA, P. J. P., N. F. F. SOARES, J. S. R. COIMBRA, N. J. DE ANDRADE, R. SOUZA CRUZ u. E. A. ALVES MEDEIROS (2015):

Zinc Oxide Nanoparticles: Synthesis, Antimicrobial Activity and Food Packaging Applications.

Food Bioprocess. Technol. 5(5), 1447-1464

EUCAST - EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (2018):

Data from the EUCAST MIC distribution website.

[Internet URL: <http://www.eucast.org>] (zuletzt besucht: 11.09.2018)

EUROPEAN UNION REGISTER OF FEED ADDITIVES (2018):

pursuant to Regulation (EC) No 1831/2003 Annex I: List of additives (08.0 6.2018), Edition 4/2018 (263), Directorate-General For Health And Food Safety, Directorate E - Food and feed safety, innovation Unit E5 – Animal nutrition, veterinary medicines

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (1995):

FAO Agricultural Services Bulletin No.119 - Fruit and vegetable processing.

FAO of the U.N., Rom, Italien

FEIL, E. J, B. C. LI, D. M. AANENSEN, W. P. HANAGE u. B. G. SPRATT (2004):

eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data.

J. Bacteriol. 186(5), 1518-1530

FENG, Q. L., J. WU, G. Q. CHEN, F. Z. CUI, T. N. KIM u. J. O. KIM (2000):

A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus.

J. Biomed. Mater. Res. 52(4), 662-668

7. Literaturverzeichnis

FERNÁNDEZ, A., P. PICOUET u. E. LLORET (2010 a):

Reduction of the spoilage-related microflora in absorbent pads by silver nanotechnology during modified atmosphere packaging of beef meat.

J. Food Prot. 73, 2263-2269

FERNÁNDEZ, A., P. PICOUET u. E. LLORET (2010 b):

Cellulose-silver nanoparticle hybrid materials to control spoilage-related microflora in absorbent pads located in trays of fresh-cut melon.

Int. J. Food Microbiol. 142(1–2), 222-228

FERNÁNDEZ, A., E. SORIANO, P. HERNÁNDEZ-MUÑOZ u. R. GAVARA (2010 c):

Migration of Antimicrobial Silver from Composites of Polylactide with Silver Zeolites.

J. Food Sci. 75(3), E186-E193

FERNÁNDEZ, A., E. SORIANO, G. LÓPEZ-CARBALLO, P. PICOUET, E. LLORET, R. GAVARA, P. HERNÁNDEZ-MUÑOZ (2009):

Preservation of aseptic conditions in absorbent pads by using silver nanotechnology.

Food Res. Int. 42, 1105-1112

FESSLER, A. T., Q. ZHAO, S. SCHOENFELDER, K. KADLEC, G. BRENNER MICHAEL, Y. WANG, W. ZIEBUHR, J. SHEN u. S. SCHWARZ (2017):

Complete sequence of a plasmid from a bovine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring a novel *ica*-like gene cluster in addition to antimicrobial and heavy metal resistance genes.

Vet. Microbiol. 200, 95-100

FETSCH, A., B. KRAUSHAAR, A. KÄSBOHRER u. J. A. HAMMERL (2017):

Turkey Meat as Source of CC9/CC398 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Humans?

Clin. Infect. Dis. 64(1), 102-103

7. Literaturverzeichnis

FEY, P. D., B. SAÏD-SALIM, M. E. RUPP, S. H. HINRICHS, D. J. BOXRUD, C. C. DAVIS, B. N. KREISWIRTH u. P. M. SCHLIEVERT (2003):

Comparative Molecular Analysis of Community- or Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.

Antimicrob. Agents Chemother. 47(1), 196-203

FINLEY, P. J., R. NORTON, C. AUSTIN, A. MITCHELL, S. ZANK u. P. DURHAM (2015):
Unprecedented Silver Resistance in Clinically Isolated Enterobacteriaceae: Major Implications for Burn and Wound Management.

Antimicrob. Agents Chemother. 59(8), 4734-4741

FITZGERALD, K. A., A. DAVIES u. A. D. RUSSELL (1989):

Uptake of ¹⁴C-chlorhexidine diacetate to *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* and its release by azolectin.

FEMS Microbiol. Lett. 51, 327-332

FLEISCHATLAS 2014 (2015):

Rosarot im Kühlregal.

6. Auflage, Heinrich-Böll Stiftung, Berlin; Bund für Umwelt- und Naturschutz Deutschland, Berlin, S. 16, 17

FLOYD, J. L., K. P. SMITH, S. H. KUMAR, J. T. FLOYD u. M. F. VARELA (2010):

LmrS is a multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily from *Staphylococcus aureus*.

Antimicrob. Agents Chemother. 54(12), 5406-5412

FOSTER, T. J. (1983):

Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria.

Microbiol. Rev. 47, 361-409

FRAQUEZA, M. J., C. M. ALFAIA u. A. S. BARRETO (2012):

Biogenic amine formation in turkey meat under modified atmosphere packaging with extended shelf life: Index of freshness.

Poult. Sci. 91, 1465-1472

FURI, L., M. L. CIUSA, D. KNIGHT, V. DI LORENZO, N. TOCCI, D. CIRASOLA, L. ARAGONES, J. R. COELHO, A. T. FREITAS, E. MARCHI, L. MOCE, P. VISA, J. B. NORTHWOOD, C. VITI, E. BORGHI u. G. OREFICI, BIOHYPO CONSORTIUM, I. MORRISSEY u. M. R. OGGIONI (2013):

Evaluation of reduced susceptibility to quaternary ammonium compounds and bisbiguanides in clinical isolates and laboratory-generated mutants of *Staphylococcus aureus*.

Antimicrob. Agents Chemother. 57, 3488-3497

GALLOCCCHIO, F., V. CIBIN, G. BIANCOTTO, A. ROCCATO, O. MUZZOLON, L. CARMEN, B. SIMONE, L. MANODORI, A. FABRIZI, I. PATUZZI u. A. RICCI (2016):

Testing nano-silver food packaging to evaluate silver migration and food spoilage bacteria on chicken meat.

Food Addit. Contam. Part. A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk. Assess. 33(6), 1063-1071

GARCÍA-ÁLVAREZ, L., M. T. G. HOLDEN, H. LINDSAY, C. WEBB, D. F. J. BROWN, M. D. CURRAN, E. WALPOLE, K. BROOKS, D. J. PICKARD, C. TEALE, J. PARKHILL, S. D. BENTLEY, G. F. EDWARDS, E. K. GIRVAN, A. M. KEARNS, B. PICHON, R. L. R. HILL, A. R. LARSEN, R. L. SKOV, S. J. PEACOCK, D. J. MASKELL u. M. A. HOLMES (2011):

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study.

Lancet Infect. Dis. 11, 595-603

GARCÍA-ÁLVAREZ, L.; S. DAWSON, B. COOKSON, P. HAWKEY (2012):

Working across the veterinary and human health sectors.

J. Antimicrob. Chemother. 67, i37-i49

GARZONI, C., P. FRANCOIS, A. HUYGHE, S. COUZINET, C. TAPPAREL, Y. CHARBONNIER, A. RENZONI S. LUCCHINI, D. P. LEW, P. VAUDAUX, W. L. KELLEY u. J. SCHRENZEL (2007):

A global view of Staphylococcus aureus whole genome expression upon internalization in human epithelial cells.

BMC Genomics 8, 171

GENG, W., Y. YANG, D. WU, W. ZHANG, C. WANG, Y. SHANG, Y. ZHENG, L. DENG, Z. FU, X. LI, S. YU u. X. SHEN (2010):

Community-acquired, methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from children with community-onset pneumonia in China.

Pediatr. Pulmonol. 45(4), 387-394

GERBA, C. P. (2015):

Quarternary ammonium biocides: efficacy in application.

Appl. Environ. Microb. 81, 464-469

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

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

Clin. Microbiol. 16(2), 189-208

GILBERT, P. u. L. E. MOORE (2005):

Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet.

J. Appl. Microbiol. 99(4), 703-715

7. Literaturverzeichnis

GITTELMAN, P. D, J. B. JACOBS, A. S. LEBOWITZ u. P. M. TIERNO (1991):

Staphylococcus aureus nasal carriage in patients with rhinosinusitis.

Laryngoscope 101, 733-737

GOLDING, G. R., L. BRYDEN, P. N. LEVETT, R. R. MCDONALD, A. WONG, J. WYLIE, M. R. GRAHAM, S. TYLER, G. VAN DOMSELAAR, A. E. SIMOR, D. GRAVEL u. M. R. MULVEY (2010):

Livestock-associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Sequence Type 398 in Humans, Canada.

Emerg. Infect. Dis. 16(4), 587-594

GÓMEZ-SANZ, E., K. KADLEC, A. T. FESSLER, M. ZARAZAGA, C. TORRES u. S. SCHWARZ (2013):

Novel erm(T)-carrying multiresistance plasmids from porcine and human isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 that also harbor cadmium and copper resistance determinants.

Antimicrob. Agents Chemother. 57(7), 3275-3282

GONG, P., H. LI, X. HE, K. WANG, J. HU, S. ZHANG u. X. YANG (2007):

Preparation and antibacterial activity of Fe₃O₄@Ag nanoparticles.

Nanotechnology 18(28), 604-611

GORENC, J. K. (2012):

Die Interaktionen von Silber-Nanopartikeln mit humanen mesenchymalen Stammzellen.

Bochum, Univ. Fachber. Humanmed., Diss.

GRASS, G., B. FAN, B. P. ROSEN; S. FRANKE, D. H. NIES u. C. RENSING (2001):

ZitB (YbgR), a member of the cation diffusion facilitator family, is an additional zinc transporter in Escherichia coli.

J. Bacteriol. 183(15), 4664-4667

GRUNDMANN, H., L. M. SCHOOLS, D. M. AANENSEN, G. N. PLUISTER, A. TAMI, M. CHLEBOWICZ, C. GLASNER, A. J. SABAT, K. WEIST, O. HEUER, A. W. FRIEDRICH, ESCMID STUDY GROUP ON MOLECULAR EPIDEMIOLOGICAL MARKERS u. EUROPEAN STAPHYLOCOCCAL REFERENCE LABORATORY WORKING GROUP (2014):

The dynamic changes of dominant clones of *Staphylococcus aureus* causing bloodstream infections in the European region: results of a second structured survey.

Euro. Surveill. 19(49)

GU, H., P. L. HO, E. TONG, L. WANG u. B. XU (2003):

Presenting vancomycin on nanoparticles to enhance antimicrobial activities.

Nano Lett. 3(9), 1261-1263

GUNDERS, D. (2017):

Wasted: how America is losing up to 40 percent of its food from farm to fork to landfill. Second edition of NRDC'S original 2012 report.

Natural Resources Defense Council 2017, New York

GUPTA, A. u. S. SILVER (1998):

Silver as a biocide: will resistance become a problem?

Nat. Biotechnol. 16(10), 888

GYESZLY, S. W. (1991):

Total Systems Approach to Predict Shelf Life of Packaged Foods.

in: HENYON, D. K. (Hrsg.): Food Packaging Technology.

ASTM STP 1113, S. 46-50

HAN, J. H. (2003):

Antimicrobial food packaging.

in: AHVENAINEN, R (Hrsg.): Novel Food Packaging Techniques.

Verlag Woodhead Publishing, Sawston, Cambridge, Großbritannien, S. 50-70

HAN, L., D. ZIUZINA, C. HESLIN, D. BOEHM, A. PATANGE, D. M. SANGO, V. P. VALDRAMIDIS, P. J. CULLEN u. P. BOURKE (2016):

Controlling Microbial Safety Challenges of Meat Using High Voltage Atmospheric Cold Plasma.

Front. Microbiol. 7, 977

HANNON, C. J., J. P. KERRY, M. CRUZ-ROMERO, S. AZLIN-HASIM, M. MORRIS u. E CUMMINS (2016):

Assessment of the migration potential of nanosilver from nanoparticle-coated low-density polyethylene food packaging into food simulants.

Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess. 33(1), 167-178

HARMSSEN, D., H. CLAUS, W. WITTE, J. ROTHGÄNGER, H. CLAUS, D. TURNWALD u. U. VOGEL (2003):

Typing of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in a University Hospital Setting by Using Novel Software for spa Repeat Determination and Database Management.

J. Clin. Microbiol. 41(12), 5442-5448

HARTMANN, F. A., S. S. TROSTLE u. A. A. KLOHNEN (1997):

Isolation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from a postoperative wound infection in a horse.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 211(5), 590-592

HASSOUN, A., P. K. LINDEN u. B. FRIEDMAN (2017):

Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations—a review of recent developments in MRSA management and treatment.

Crit. Care 21(1), 211

HAYDEN, M. K., K. LOLANS, K. HAFFENREFFER, T. R. AVERY, K. KLEINMAN, H. LI, R. E. KAGANOV, J. LANKIEWICZ, J. MOODY, E. SEPTIMUS, R. A. WEINSTEIN, J. HICKOK, J. JERNIGAN, J. B. PERLIN, R. PLATT u. S. S. HUANG (2016):

Chlorhexidine and Mupirocin Susceptibility of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates in the REDUCE-MRSA Trial.

J. Clin. Microbiol. 54(11), 2735-2742

HE, G.-X., M. LANDRY, H. CHEN, C. THORPE, D. WALSH, M. F. VARELAAND u. H. PAN (2014):

Detection of benzalkonium chloride resistance in community environmental isolates of staphylococci

J. Medical. Microbiol. 63, 735-741

HEIR, E., G. SUNDHEIM u. A. L. HOLCK (1998):

The *Staphylococcus qacH* gene product: a new member of the SMR family encoding multidrug resistance.

FEMS Microbiol. Lett. 163(1), 49-56

HEIR, E., G. SUNDHEIM u. A. L. HOLCK (1999):

The *qacG* gene on plasmid pST94 confers resistance to quaternary ammonium compounds in staphylococci isolated from the food industry.

J. Appl. Microbiol. 86(3), 378-838

HEISS, R. u. K. EICHNER (2002):

Haltbarmachen von Lebensmitteln - Chemische, physikalische und mikrobiologische Grundlagen der Qualitätserhaltung

4. Auflage, Verlag Springer, Berlin

HENDRY, A. T. u. I. O. STEWART (1979):

Silver-resistant Enterobacteriaceae from hospital patients.

Can. J. Microbiol. 25(8), 915-21

HEROLD, B.C., L. C. IMMERGLUCK, M. C. MARANAN, D. S. LAUDERDALE, R. E. GASKIN, S. BOYLE-VAVRA, D. C. LEITCH u. R. S. DAUM (1998):

Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk.

J. Am. Med. Assoc. 279, 593-598

HOLDEN M. T., E. J. FEIL, J. A. LINDSAY, S. J. PEACOCK, N. P. DAY, M. C. ENRIGHT, T. J. FOSTER, C. E. MOORE, L. HURST, R. ATKIN, A. BARRON, N. BASON, S. D. BENTLEY, C. CHILLINGWORTH, T. CHILLINGWORTH, C. CHURCHER, L. CLARK, C. CORTON, A. CRONIN, J. DOGGETT, L. DOWD, T. FELTWELL, Z. HANCE, B. HARRIS, H. HAUSER, S. HOLROYD, K. JAGELS, K. D. JAMES, N. LENNARD, A. LINE, R. MAYES, S. MOULE, K. MUNGALL, D. ORMOND, M. A. QUAIL, E. RABBINOWITSCH, K. RUTHERFORD, M. SANDERS, S. SHARP, M. SIMMONDS, K. STEVENS, S. WHITEHEAD, B. G. BARRELL, B. G. SPRATT u. J. PARKHILL (2004):

Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101, 9786-9791

HUET, A. A., J. L. RAYGADA, K. MENDIRATTA, S. M. SEO u. G. W. KAATZ (2008):

Multidrug efflux pump overexpression in *Staphylococcus aureus* after single and multiple in vitro exposures to biocides and dyes.

Microbiology. 154(10), 3144-3153

ITO, T., K. HIRAMATSU, D. C. OLIVEIRA, H. DE LENCASTRE, K. ZHANG, H. WESTH, F. O'BRIEN, P. M. GIFFARD, D. COLEMAN, F. C. TENOVER, S. BOYLE-VAVRA, R. L. SKOV, M. C. ENRIGHT, B. KREISWIRTH, S. K. KWAN, H. GRUNDMANN, F. LAURENT, J. E. SOLLID, A. M. KEARNS, R. GOERING, J. F. JOHN, R. DAUM u. B. SODERQUIST (2009):

Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements.

Antimicrob. Agents Chemother. 53, 4961-4967

IWAMOTO, R., T. MATSUDA, S. AMIYA u. T. YAMAMOTO (2006):

Interactions of water with OH groups in poly(ethylene-co-vinyl alcohol).

J. Polym. Sci. 44, 2425-2437

JACKSON, C. R., J. A. DAVIS u. J. B. BARRETT (2013):

Prevalence and Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Retail Meat and Humans in Georgia.

J. Clin. Microbiol. 51, 1199-1207

JEVONS, M. P. (1961):

“Celbenin”-resistant staphylococci.

BMJ 1, 124-125

JORGENSEN, J. H. (1991):

Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and methods for laboratory detection.

Infect. Control Hosp. Epidemiol. 12(1), 149

JUAREZ, M., N. ALDAI, O. LOPEZ-COMPOS, M. DUNGAN, B. UTARRO u. J. AALHUS (2012):

Beef texture and juiciness.

in: HUI, Y. H. (Hrsg): Handbook of Meat and Meat Processing.

2. Auflage, Verlag CRC, Boca Raton, Florida, S. 177-195

JUNG, W. K., H. C. KOO, K. W. KIM, S. SHIN, S. H. KIM u. Y. H. PARK (2008):

Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Appl. Environ. Microbiol. 74, 2171-2178

7. Literaturverzeichnis

KAATZ, G. W., F. MCALEESE u. S. M. SEO (2005):

Multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* due to overexpression of a novel multidrug and toxin extrusion (MATE) transport protein.

Antimicrob. Agents Chemother. 49(5), 1857-1864

KAUFFMAN, C. A., M. S. TERPENNING, X. HE, L. T. ZARINS, M. A. RAMSEY K. A. JORGENSEN, W. S. SOTTILE u. S. F. BRADLEY (1993):

Attempts to eradicate methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a long-term-care facility with the use of mupirocin ointment.

Am. J. Med. 94, 371-378

KAUR, P., M. SAXENA u. D. V. VADEHRA (1985):

Plasmid mediated resistance to silver ions in *Escherichia coli*.

Indian J. Med. Res. 82, 122-126

KAUR, P. u. D. V. VADEHRA (1986):

Mechanism of resistance to silver ions in *Klebsiella pneumoniae*.

Antimicrob. Agents Chemother. 29(1), 165-167

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(9), 481-486

KAYA, H., H. HASMAN, J. LARSEN, M. STEGGER, T. B. JOHANNESSEN, R. L. ALLESØE, C. K. LEMVIGH, F. M. AARESTRUP, O. LUND u. A. R. LARSEN (2018):

SCCmecFinder, a Web-Based Tool for Typing of Staphylococcal Cassette Chromosome mec in *Staphylococcus aureus* Using Whole-Genome Sequence Data.

mSphere 3(1), e00612-17

KĘDZIORA, A., M. SPERUDA, E. KRZYŻEWSKA, J. RYBKA, A. ŁUKOWIAK u. G. BUGLA-PŁOSKOŃSKA (2018):

Similarities and Differences between Silver Ions and Silver in Nanoforms as Antibacterial Agents.

Int. Mol. Sci. 19(2), 444

KERNODLE, D. S. (2000):

Mechanisms of Resistance to β -Lactam Antibiotics.

in: FISCHETTI, V., R. NOVICK, J. FERRETTI, D. PORTNOY u. J. ROOD (Hrsg.): Gram-Positive Pathogens.

2. Auflage, Verlag ASM Press, Washington, DC, USA S. 769-781

KIM, J. S., E. KUK, K. N. YU, J. H. KIM, S. J. PARK, H. J. LEE, S. H. KIM, Y. K. PARK, Y. H. PARK, C. Y. HWANG, Y. K. KIM, Y. S. LEE, D. H. JEONG u. M. H. CHO (2007):

Antimicrobial effects of silver nanoparticles.

Nanomedicine 3(1), 95-101

KIM, C., C. MILHEIRIÇO, S. GARDETE, M. A. HOLMES, M. T. G. HOLDEN, H. DE LENCASTRE u. A. TOMASZ (2012):

Properties of a novel PBP2A protein homolog from Staphylococcus aureus strain LGA251 and its contribution to the β -lactam-resistant phenotype.

J. Biol. Chem. 287, 36854-36863

KIRBY, W. M. M. (1944):

Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci.

Science 99, 452-453

7. Literaturverzeichnis

KLEIN, G. (2012):

Verbesserung der Lebensmittelhygiene durch Dekontamination? Standortbestimmung und Perspektiven. Dekontamination von Lebensmitteln: Einordnung klassischer und innovativer Verfahren.

12. BfR-Forum Verbraucherschutz vom 04.06.2012 - 05.06.2012 in Berlin Marienfelde

KONG, H., F. YU, W. ZHANG, X. LI u. H. WANG (2017):

Molecular Epidemiology and Antibiotic Resistance Profiles of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains in a Tertiary Hospital in China.

Front. Microbiol. 8, 838

KRÄMER, J. u. A. PRANGE (2017):

Lebensmittelmikrobiologie.

7. Auflage, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

KROPF, D. (1980):

Effect of retail display conditions on meat color,

Proceedings of the Reciprocal Meat Conference 33, 15-3

KULAPINA, E. G., E. S. POGORELOVA, N. M. MAKAROVA u. L. A. BAZHANOVA (2013):

Physicochemical Properties of Tetraalkylammonium Tetraphenylborates and Tetraalkylammonium Dodecylsulfates.

Russ. J. Inorg. Chem. 58(1), 112-116

KUMAR, R u. H. MÜNSTEDT (2005):

Silver ion release from antimicrobial polyamide/silver composites.

Biomaterials 26(14), 2081-2088

7. Literaturverzeichnis

KUMAR, A., K. SRIVASTAVA, S. R. KUMAR, S. K. PURI u. P. M. S. CHAUHAN (2009):
Synthesis of 9-anilinoacridine triazines as new class of hybrid antimalarial agents.

Bioorg. Med. Chem. Lett. 19, 6996-6999

KUYAKANOND, T. u. L. B. QUESNEL (1992):

The mechanism of action of chlorhexidine.

FEMS Microbiol. Lett. 100(1-3), 211-215

LABUZA, T. P. u. W. M. BREENE (1989):

Applications of active packaging for improvement of shelf-life and nutritional quality of fresh and extended shelf-life foods.

J. Food Process. Preservation 13, 1-69

LACOSTE, A., K. M. SCHAICH, D. ZUMBRUNNEN u. K. L. YAM (2005):

Advancing controlled release packaging through smart blending.

Packag. Technol. Sci. 18, 77-87

LAMBERT, R. (2004):

Comparative analysis of antibiotic and antimicrobial biocide susceptibility data in clinical isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* between 1989 and 2000.

J. Appl. Microbiol. 97(4), 699-711

LARSEN, J., A. PETERSEN, M. SØRUM, M. STEGGER, L. VAN ALPHEN, P. VALENTINER-BRANTH, L. K. KNUDSEN, L. S. LARSEN, B. FEINGOLD, L. B. PRICE, P. S. ANDERSEN, A. R. LARSEN u. R. L. SKOV (2015):

Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 is an increasing cause of disease in people with no livestock contact in Denmark, 1999 to 2011.

Euro Surveill. 20(37), 10.2807/1560-7917

LARSEN, J., M. STEGGER, P. S. ANDERSEN, A. PETERSEN, A. R. LARSEN, H. WESTH, Y. AGERSØ, A. FETSCH, B. KRAUSHAAR, A. KÄSBOHRER, A. T. FEBLER, S. SCHWARZ, C. CUNY, W. WITTE, P. BUTAYE, O. DENIS, M. HAENNI, J.-Y. MADEC, E. JOUY, F. LAURENT, A. BATTISTI, A. FRANCO, P. ALBA, C. MAMMINA, A. PANTOSTI, M. MONACO, J. A. WAGENAAR, E. DE BOER, E. VAN DUIJKEREN, M. HECK, L. DOMÍNGUEZ, C. TORRES, M. ZARAZAGA, L. B. PRICE u. R. L. SKOV (2016): Evidence for Human Adaptation and Foodborne Transmission of Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.

Clin. Infect. Dis., 63(10), 1349-1352

LAWRIE, R. A. u. D. A. LEDWARD (2006)

Lawrie's Meat Science.

7.Auflage, Verlage Woodhead Publishing Limited und CRC Press LLC, Cambridge Großbritannien, Boca Raton, bzw. Florida

LEE, J., Y. H. LEE, K. JONES, E. SHAREK u. M. A. PASCALL (2011):

Antimicrobial packaging of raw beef, pork and turkey using silver-zeolite incorporated into the material.

Int. J. Food Sci. Tech. 46, 2382-2386

LEELAPORN, A., I. T. PAULSEN, J. M TENNENT, T. G. LITTLEJOHN u. R. A. SKURRAY (1994):

Multidrug resistance to antiseptics and disinfectants in coagulase-negative staphylococci.

J. Med. Microbiol. 40, 214-220

LEELAVATHI, M., Y. Y. LE, H. TOHID u. A. H. HASLIZA (2011):

Contact dermatitis presenting as non-healing wound: case report.

Asia Pac. Fam. Med. 10(1), 6

LEISTNER, L. (2000):

Basic aspects of food preservation by hurdle technology.

Int. J. Food Microbiol. 55(1-3), 181-186

LEISTNER, L. u. L. G. M. GORRIS (1995):

Food preservation by hurdle technology.

Trends Food Sci. Technol. 6(2), 41-46

LEISTNER, R., L. A. DENKEL, P. GASTMEIER, G. WERNER, F. LAYER, Y. PFEIFER (2015):

Prevalence of MRSA and Gram-negative bacteria with ESBLs and carbapenemases in patients from Northern Africa at a German hospital

J. Antimicrob. Chemother. 70(11), 3161-3164

LEW, D. P u. F. A. WALDVOGEL (2004):

Osteomyelitis.

Lancet. 364, 369-379

LEWIS, H. C., K. MØLBAK, C. REESE, F. M. AARESTRUP, M. SELCHAU, M. SØRUM u. R. L. SKOV (2008):

Pigs as source of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 infections in humans, Denmark.

Emerg. Infect. Dis. 14(9), 1383-1389

LI, L., C. ZHAO, Y. ZHANG, J. YAO, W. YANG, Q. HU, C. WANG u. C. CAO (2017):

Effect of stable antimicrobial nano-silver packaging on inhibiting mildew and in storage of rice.

Food Chem. 215, 477-482

LITTLEJOHN, T. G., I. T. PAULSEN, M. T. GILLESPIE, J. M. TENNENT, M. MIDGLEY, I. G. JONES, A. S. PUREWAL u. R. A. SKURRAY (1992):

Substrate specificity and energetics of antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*.

FEMS Microbiol. Lett. 95, 259-266

LIU, Q., H. ZHAO, L. HAN, W. SHU, Q. WU u. Y. NI (2015):

Frequency of biocide-resistant genes and susceptibility to chlorhexidine in high-level mupirocin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MuH MRSA).

Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 82, 278-283

LKHAGVAJAV, N., I. YASA, E. ÇELIK, M. KOIZHAIGANOVA u. Ö. SARI (2011):

Antimicrobial activity of colloidal silver nanoparticles prepared by sol-gel method.

Dig. J. Nanomater. Biostr. 6, 149-154

LLORET, E., P. PICOUET u. A. FERNÁNDEZ (2012):

Matrix effects on the antimicrobial capacity of silver based nanocomposite absorbing materials.

LWT - Food Sci. Technol. 49(2), 333-338

LOK, C. N., C. M. HO, R. CHEN, Q. Y. HE, W. Y. YU, H. SUN, P. K. TAM, J. F. CHIU u. C. M. CHE (2006):

Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles.

J. Proteome. Res. 5(4), 916-924

LOK, C. N., C. M. HO, R. CHEN, Q. Y. HE, W. Y. YU, H. SUN, P. K. TAM, J. F. CHIU u. C. M. CHE (2007):

Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities.

J. Biol. Inorg. Chem. 12(4), 527-534

7. Literaturverzeichnis

LOPEZ-RUBIO, A., P. HERNADEZ-MUNOZ, E. GIMENEZ, T. YAMAMOTO, R. GAVARA u. J. M. LAGARON (2005):

Gas barrier and morphological alterations induced by retorting in ethylene vinyl alcohol based food packaging structures.

J. Appl. Polym. Sci. 96, 2192-2202

LOWY, F. D. (1998):

Staphylococcus aureus infections.

N. Engl. J. Med. 339(8), 520-532

LOZANO, C., M. LÓPEZ, E. GÓMEZ-SANZ, F. RUIZ-LARREA, C. TORRES u. M. ZARAZAGA (2009):

Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 in food samples of animal origin in Spain.

J. Antimicrob. Chemother. 64(6), 1325-1326

MACKEVICA, A., M. E. OLSSON u. S. F. HANSEN (2016):

Silver nanoparticle release from commercially available plastic food containers into food simulants.

J. Nanopart. Res. 18(5)

MAHATO, M., P. PAL, B. TAH, M. GHOSH u. G. B. TALAPATRA (2011):

Study of silver nanoparticle-hemoglobin interaction and composite formation.

Colloids Surf. B Biointerfaces. 88(1):141-149

MAHDI, S., R. VADOOD u. R. NOURDAHR (2012):

Study on the antimicrobial effect of nano-silver tray packaging of minced beef at refrigerator temperature.

Glob. Vet. 9, 284-289

7. Literaturverzeichnis

MAIDEN M. C. J., J. A. BYGRAVES, E. FEIL, G. MORELLI, J. E. RUSSELL, R. URWIN, Q. ZHANG, J. ZHOU, K. ZURTH, D. A. CAUGANT, I. M. FEATHERS, M. ACHTMAN u. B. G. SPRATT (1998):

Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic Microorganisms.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 95, 3140-3145

MALHOTRA, B., A. KESHWANI u. H. KHARKWAL (2015):

Antimicrobial food packaging: potential and pitfalls.

Front. Microbiol. 6, 611

MAMMINA, C., C. CALÀ, M. R. A. PLANO, C. BONURA, A. VELLA, R. MONASTERO u. D. M. PALMA (2010):

Ventilator-associated Pneumonia and MRSA ST398, Italy.

Emerg. Infect. Dis. 16(4), 730-731

MANCINI, R. A. u. M. C. HUNT (2005):

Current research in meat color.

Meat Sci. 71, 100-121

MARCHIORE, N. G., I. J. MANSO, K. C. KAUFMANN, G. F. LEMES, A. P. DE OLIVEIRA PIZOLLI, A. A. DROVAL, L. BRACHT, O. H. GONÇALVES u. F. V. LEIMANN (2017):

Migration evaluation of silver nanoparticles from antimicrobial edible coating to sausages.

LWT - Food Sci. Tech. 76, 203-208

MARTÍNEZ-ABAD, A., J. M. LAGARON u. M. J. OCIO (2012):

Development and characterization of silver-based antimicrobial ethylene-vinyl alcohol copolymer (EVOH) films for food-packaging applications.

J. Agric. Food Chem. 60(21), 5350-5359

7. Literaturverzeichnis

MASTERTON R. G., J. E. COIA, A. W. NOTMAN, L. KEMPTON-SMITH u. B. D. COOKSON (1995):

Refractory methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage associated with contamination of the home environment.

J. Hosp. Infect. 29(4), 318-319

MATSUOKA, M., M. INOUE, Y. ENDO u. Y. NAKAJIMA (2003):

Characteristic expression of three genes, *msr(A)*, *mph(C)* and *erm(Y)*, that confer resistance to macrolide antibiotics on *Staphylococcus aureus*.

FEMS Microbiol. Lett. 220(2), 287-293

MCALEESE, F., P. PETERSEN, A. RUZIN, P. M. DUNMAN, E. MURPHY, S. J. PROJAN u. P. A. BRADFORD (2005):

A novel MATE family efflux pump contributes to the reduced susceptibility of laboratory-derived *Staphylococcus aureus* mutants to tigecycline.

Antimicrob. Agents Chemother. 49(5), 1865-1871

MCCAY, P. H., A. A. OCAMPO-SOSA u. G. T. A. FLEMING (2010):

Effect of subinhibitory concentrations of benzalkonium chloride on the competitiveness of *Pseudomonas aeruginosa* grown in continuous culture.

Microbiology 156, 30-38

MCCORMICK, J. M., J. M. YARWOOD u. P. M. SCHLIEVERT (2001):

Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update.

Annu. Rev. Microbiol. 55, 77-104

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

Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance.

Clin. Microbiol. Rev. 12, 147-179

7. Literaturverzeichnis

MCHUGH, S. L., R. C. MOELLERING, C. C. HOPKINS u. M. N. SWARTZ (1975):
Salmonella typhimurium resistant to silver nitrate, chloramphenicol, and ampicillin. A new threat in burn units?
Lancet. 305(7901), 235-240

MEDIENDIENST DER FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT (2010):
Thema 2, Aktive Verpackung hält Fleisch länger frisch.
Fraunhofer-Gesellschaft ISSN 0948 – 8375, München

MEEMKEN, D., T. BLAHA, R. TEGELER, B. A. TENHAGEN, B. GUERRA, J. A. HAMMERL, S. HERTWIG, A. KÄSBOHRER, B. APPEL u. A. FETSCH (2010):
Livestock Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (LaMRSA) Isolated from Lesions of Pigs at Necropsy in Northwest Germany Between 2004 and 2007.
Zoonoses Public Health 57(7-8), 143-148

METAK, A. M. u. T. T. AJAAL (2013):
Investigation on polymer based nano-silver as food packaging materials.
Int. J. Biol. Food Vet. Agric. 7(12), 772-778
METAK, A. M., N. FARHAD u. S. N. CONNOLLY (2015):
Migration of engineered nanoparticles from packaging into food products.
LWT - Food Sci. Technol. 64(2), 781-787

MITCHELL, B. A., M. H. BROWN u. R. A. SKURRAY (1998):
QacA multidrug efflux pump from Staphylococcus aureus: comparative analysis of resistance to diamidines, biguanidines, and guanylhydrazones.
Antimicrob. Agents Chemother. 42(2), 475-477

MOBASHERIZADEH, S., H. SHOJAEI, S. A. HAVAEI, K. MOSTAFAVIZADEH, F. DAVOODABADI, F. KHORVASH, A. M. KUSHKI, A. DAEI-NASER u. F. GHANBARI (2016):

Nasal carriage screening of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in healthy children of a developing country.

Adv. Biomed. Res. 5, 144

MORONES, J. R, J. L. ELECHIGUERRA, A. CAMACHO, K. HOLT, J. B. KOURI, J. T. RAMÍREZ u. M. J. YACAMAN (2005):

The bactericidal effect of silver nanoparticles.

Nanotechnology 16(10), 2346-2353

MORRISSEY, E. R., R. H. JACOB u. J. M. PLUSKE (2008):

Perception of red brown colour by consumers.

Proc. 54th Inter. Cong, of Meat Sci. and Tech., Cape Town, South Africa

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

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

PLoS One 9, e86669

MORSY, M. K., H. H. KHALAF, A. M. SHAROBA, H. H. EL-TANAHI u. C. N. CUTTER (2014):

Incorporation of essential oils and nanoparticles in pullulan films to control foodborne pathogens on meat and poultry products

J. Food Sci. 79, M675-M682

7. Literaturverzeichnis

MOSSEL, D. A. A., J. E. L. CORRY, C. B. STRUIJK u. R. M. BAIRD (1995):

Essentials of the Microbiology of foods: a textbook for advanced studies.

Verlag Wiley, England

MULDERS, M. N., A. P. HAENEN, P. L. GEENEN, P. C. VESSEUR, E. S. POLDERVAART, T. BOSCH, X. W. HUIJSDENS, P. D. HENGEVELD, W. D. DAM-DEISZ, E. A. GRAAT, D. MEVIUS, A. VOSS u. A. W. VAN DE GIESSEN (2010):

Prevalence of livestock-associated MRSA in broiler flocks and risk factors for slaughterhouse personnel in The Netherlands.

Epidemiol. Infect. 138(5), 743-755

MURAMATSU, M., M. OKURA, K. KUBOYAMA, T. OUGIZAWA, T. YAMAMOTO, Y. NISHIHARA, Y. SAITO, K. ITO, K. HIRATA u. Y. KOBAYASHI (2003):

Oxygen permeability and free volume hole size in ethylene vinyl alcohol copolymer film: temperature and humidity dependence.

Radiat. Phys. Chem. 68, 561-564

NAGENDRAN, V., J. WICKING, A. EKBOTE, T. ONYEKWE u. L. H. GARVEY (2009):

IgE-mediated chlorhexidine allergy: a new occupational hazard?

Occup. Med. (Lond.) 59, 270-272

NAKAMURA, K. u. T. TAMAOKI (1968):

Reversible dissociation of Escherichia coli ribosomes by hydrogen peroxide.

Biochim. Biophys. Acta. 161(2), 368-376

NARUI, K., N. NOGUCHI, K. WAKASUGI u. M. SASATSU (2002):

Cloning and characterization of a novel chromosomal drug efflux gene in Staphylococcus aureus.

Biol. Pharm. Bull. 25(12), 1533-1536

7. Literaturverzeichnis

NAVRATNA, V. S. NADIG, V. SOOD, K. PRASAD, G. ARAKERE u. B. GOPAL (2010):
Molecular Basis for the Role of Staphylococcus aureus Penicillin Binding Protein 4 in
Antimicrobial Resistance.

J. Bacteriol. 192(1), 134-144

NEMATI, M., K. HERMANS, U. LIPINSKA, O. DENIS, A. DEPLANO, M. STRUELENS,
L. A. DEVRIESE, F. PASMANS u. F. HAESEBROUCK (2008):

Antimicrobial resistance of old and recent Staphylococcus aureus isolates from poultry: first
detection of livestock-associated methicillin-resistant strain ST398.

Antimicrob. Agents Chemother. 52(10), 3817-3819

NICHOLSON, F. A., B. J. CHAMBERS, J. R. WILLIAMS u. R. J. UNWIN (1999):

Heavy metal contents of livestock feeds and animal manures in England and Wales.

Bioresour. Technol. 70, 23-31

NTZIMANI, A. G., E. K. PALEOLOGOS, I. N. SAVVAIDIS u. M. G. KONTOMINAS
(2008):

Formation of biogenic amines and relation to microbial flora and sensory changes in smoked
turkey breast fillets stored under various packaging conditions at 4 °C.

Food Microbiol. 25, 509-517

NOGUCHI, N., M. HASE, M. KITTA, M. SASATSU K. DEGUCHI u. M. KONO (1999):

Antiseptic susceptibility and distribution of antiseptic-resistance genes in methicillin-resistant
Staphylococcus aureus.

FEMS Microbiology Letters 172(2), 247-253

NOGUCHI, N., J. SUWA, K. NARUI, M. SASATSU, T. ITO, K. HIRAMATSU u. J. H. SONG
(2005):

Susceptibilities to antiseptic agents and distribution of antiseptic-resistance genes qacA/B and
smr of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated in Asia during 1998 and 1999.

J Med Microbiol. 54(6), 557-565

7. Literaturverzeichnis

NOVICK, R. P. (2003):

Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence.

Mol. Microbiol. 48, 1429-1449

NOVICK, R. P. u. C. ROTH (1968):

Plasmid-linked resistance to inorganic salts in *Staphylococcus aureus*.

J. Bacteriol. 95, 1335-1342

NYCHAS, G. J. E., P. N. SKANDAMIS, C. C. TASSOU u. K. P. KOUTSOUMANIS (2008):

Meat spoilage during distribution.

Meat Sci., 78, 77-89

OCKERMAN, H. W. u. L. BASU (2004):

Carcass chilling and boning.

in: Jensen, W. K. (Hrsg.): Encyclopedia of meat sciences

Verlag Elsevier Academic Press, Oxford S. 144-149

OGATA, K., H. NARIMATSU, M. SUZUKI W. HIGUCHI, T. YAMAMOTO u. H. TANIGUCHI (2012):

Commercially Distributed Meat as a Potential Vehicle for Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.

Appl. Environ. Microbiol. 78(8), 2797-2802

OGUNMODEDE F., J. L. JONES, J. SCHEFTEL, E. KIRKLAND, J. SCHULKIN u. R. LYNFIELD (2005):

Listeriosis prevention knowledge among pregnant women in the USA.

Infect. Dis. Obstet. Gynecol. 13(1), 11-15

O'HARA, F. P., J. A. SUAYA, G. T. RAY, R. BAXTER, M. L. BROWN, R. M. MERA., N. M. CLOSE., E. THOMAS u. H. AMRINE-MADSEN (2016):

Spa Typing and Multilocus Sequence Typing Show Comparable Performance in a Macroepidemiologic Study of *Staphylococcus aureus* in the United States.

Microb. Drug Resist. 22(1), 88-96

OJO, K. K., M. J. STRIPLIN, C. C. ULEP, N. S. CLOSE, J. ZITTLE, H. LUIS, M. BERNARDO, J. LEITAO u. M. C. ROBERTS (2006):

Staphylococcus Efflux *msr(A)* Gene Characterized in *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Corynebacterium*, and *Pseudomonas* Isolates.

Antimicrob. Agents Chemother. 50(3), 1089-1091

OLSEN, J. E., H. CHRISTENSEN u. F. M. AARESTRUP (2006):

Diversity and evolution of *bla_Z* from *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci.

J. Antimicrob. Chemother. 57, 450-460

O'NEILL, C. M., M. C. CRUZ-ROMERO, G. DUFFY u. J. P. KERRY (2018):

Shelf life extension of vacuum-packed salt reduced frankfurters and cooked ham through the combined application of high pressure processing and organic acids.

J. Food Pack. Shelf Life 17, 120-128

ORKUSZ, A., J. WOLOSZYN, G. HARAF u. A. OKRUSZEK (2013):

Effect of protective atmosphere on color of goose meat.

Poult. Sci. 92, 2188-2194

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

Biocide tolerance in bacteria.

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

7. Literaturverzeichnis

OZDEMIR, M. u. J. D. FLOROS (2004):

Active food packaging technologies.

Crit. Rev. Food. Sci. 44, 185–193

PAL, C., J. BENGTSSON-PALME, E. KRISTIANSSON u. D. G. J. LARSSON (2015):

Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential.

BMC Genomics 16, 964

PAL, C., J. BENGTSSON-PALME, C. RENSING, E. KRISTIANSSON u. D. G. J. LARSSON (2014):

BacMet: antibacterial biocide and metal resistance genes database.

Nucleic Acids Res. 42, D737-D743

PAL, S., Y. K. TAK u. J. M. SONG (2007):

Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium Escherichia coli.

Appl. Environ. Microbiol. 73, 1712–1720

PARK, H. J., J. Y. KIM, J. KIM, J. H. LEE, J. S. HAHN, M. B. GU u. J. YOON (2009):

Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity.

Water Res. 43(4):1027-1032

PATERSON, G. K., E. M. HARRISON u. M. A. HOLMES (2014):

The emergence of mecC methicillin-resistant Staphylococcus aureus.

Trends Microbiol. 22, 42-47

PAULSEN, I. T., M. H. BROWN, S. J. DUNSTAN u. R. A. SKURRAY (1995):

Molecular characterization of the staphylococcal multidrug resistance export protein QacC.

J. Bacteriol. 177(10), 2827-2833

7. Literaturverzeichnis

PAULSEN I.T., M. H. BROWN, T. G. LITTLEJOHN, B. A. MITCHELL u. R. A. SKURRAY (1996):

Multidrug resistance proteins QacA and QacB from *Staphylococcus aureus*: membrane topology and identification of residues involved in substrate specificity.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 93(8), 3630-3635

PAULSEN, I. T., T. G. LITTLEJOHN, P. RÅDSTRÖM, L. SUNDSTRÖM, O. SKÖLD, G. SWEDBERG u. R. A. SKURRAY (1993):

The 3'-conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants.

Antimicrob. Agents Chemother. 37, 761-768

PETON, V. u. Y. LE LOIR (2014):

Staphylococcus aureus in veterinary medicine.

Infect. Genet. Evol. 21, 602-614

PETRIKAITE, V., E. TARASEVICIUS u. A. PAILONIS (2007):

New ethacridine derivatives as the potential anti-fungal and antibacterial preparation

Medicina (Kaunas), 43(8), 657-663

PIEPER, H. u. P. HILLER (2013):

Tränkewasserhygiene - wichtig oder entbehrlich? Saures Wasser im Hähnchenstall: altes Verfahren mit neuem Wasserprodukt.

Landwirtschaftskammer Niedersachsen, Oldenburg [Internet: URL: <https://www.lwk-niedersachsen.de/index.cfm/portal/tier/nav/755/article/22191.html>] (zuletzt besucht: 11.09.2018)

POOLE, K. (2002):

Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance.

J. Appl. Microbiol. 92, 55S-64S

7. Literaturverzeichnis

POWERS, K. A., M. S. TERPENNING, R. A. VOICE u. C. A. KAUFFMAN (1990):

Prosthetic joint infections in the elderly.

J. Med. 88, 9N-13N

PRICE, L. B., M. STEGGER, H. HASMAN, M. AZIZ, J. LARSEN, P. S. ANDERSEN, T. PEARSON, A. E. WATERS, J. T. FOSTER, J. SCHUPP, J. GILLECE, E. DRIEBE, C. M. LIU, B. SPRINGER, I. ZDOVC, A. BATTISTI, A. FRANCO, J. ŽMUDZKI, S. SCHWARZ, P. BUTAYE, E. JOUY, C. POMBA, M. CONCEPCIÓN PORRERO, R. RUIMY, TARA C. SMITH, D. A. ROBINSON, J. SCOTT WEESE, C. S. ARRIOLA, F. YU, F. LAURENT, P. KEIM, R. SKOV u. F. M. AARESTRUP (2012):

Staphylococcus aureus CC398: host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock.

mBio 3(1), e00305-11

QUINTAVALLA, S. u. L. VICINI (2002):

Antimicrobial food packaging in meat industry.

Meat. Sci. 62, 373-380

RAI, M. K., S. D. DESHMUKH, A. P. INGLE u. A. K. GADE (2012):

Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria.

J. Appl. Microbiol. 112(5), 841-852

RAI, M., A. YADAV u. A. GADE (2009):

Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials.

Biotechnol. Adv. 27(1), 76-83

RAMMELKAMP, C. H. u. T. MAXON (1942):

Resistance of Staphylococcus aureus to the Action of Penicillin.

Proc. Soc. Exp. Biol Med. 51, 386-189

7. Literaturverzeichnis

- RANDALL, C. P., A. GUPTA, N. JACKSON, D. BUSSE u. A. J. O'NEILL (2015):
Silver resistance in Gram-negative bacteria: a dissection of endogenous and exogenous mechanisms.
Antimicrob. Chemother. 70(4), 1037-1046
- RANDALL, C. P., L. B. OYAMA, J. M. BOSTOCK, I. CHOPRA u. A. J. O'NEILL (2013):
The silver cation (Ag^+): antistaphylococcal activity, mode of action and resistance studies.
J. Antimicrob. Chemother. 68, 131-138
- RAJKUMAR, R., K. DUSHYANTHAN, R. ASHA RAJINI u. S. SURESHKUMAR (2007):
Effect of modified atmosphere packaging on microbial and physical qualities of turkey meat.
Am. J. Food Technol. 2(3), 183-189
- REALINI, C. E. u. B. MARCOS (2014):
Active and intelligent packaging systems for a modern society.
Meat Sci. 98, 404-419
- RENSING, C., F. BIN, R. SHARMA, B. MITRA U. B. P. ROSEN (2000):
CopA: an Escherichia coli Cu(I)-translocating P-type ATPase.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 97, 652-656
- RENSING, C. u. G. GRASS (2003):
Escherichia coli mechanisms of copper homeostasis in a changing environment.
FEMS Microbiol. Rev. 27, 197-213
- RETKHIMAN-SCHABES, P. S., G. CANIZAL, R. BECERRA-HERRERA, C. ZORRILLA,
H. B. LIU u. J. A. ASCENCIO (2006):
Biosynthesis and characterization of Ti/Ni bimetallic nanoparticles
Opt. Mater. 29, 95-99

7. Literaturverzeichnis

REYNAGA, E., M. NAVARRO, A. VILAMALA, P. ROURE, M. QUINTANA, M. GARCIA-NUNEZ, R. FIGUERAS, C. TORRES, G. LUCCHETTI u. M. SABRIA (2016): Prevalence of colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in pigs and pig farm workers in an area of Catalonia, Spain.

BMC Infect. Dis 16, 716

REYNAGA, E., C. TORRES, M. GARCIA-NUNEZ, M. NAVARRO, A. VILAMALA, E. PUIGORIOL, G. E. LUCCHETTI u. M. SABRIA (2017):

Clinical impact and prevalence of MRSA CC398 and differences between MRSA-TetR and MRSA-TetS in an area of Spain with a high density of pig farming: a prospective cohort study. Clin. Microbiol. Infect. 23(9), 678.e1-678.e4

RICHARDSON J. F. u. S. REITH (1993):

Characterization of a strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (EMRSA-15) by conventional and molecular methods.

J. Hosp. Infect. 25, 45-52

RKI- ROBERT KOCH-INSTITUT, Berlin (2013):

Epidemiologisches Bulletin, Nr. 21 aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und public health; Eigenschaften, Häufigkeit und Verbreitung von MRSA in Deutschland – Update 2011/2012.

Robert Koch-Institut, Berlin

RKI - ROBERT KOCH-INSTITUT, Berlin (2014):

Lebensmittelbedingte Ausbrüche

Robert Koch-Institut, Berlin [Internet: URL:

http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Ausbrueche/LM/lebensmittelbedingte_Ausbrueche_nod_e.html] (zuletzt besucht: 11.09.2018)

7. Literaturverzeichnis

RKI- ROBERT KOCH-INSTITUT, Berlin (2015):

Epidemiologisches Bulletin, Nr. 31 aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und public health; MRSA Eigenschaften, Häufigkeit und Verbreitung von MRSA in Deutschland – Update 2013/2014.

Robert Koch-Institut, Berlin

RKI - ROBERT KOCH-INSTITUT, Berlin (2016):

RKI - Ratgeber für Ärzte - Staphylokokken-Erkrankungen, insbesondere Infektionen durch MRSA.

Robert Koch-Institut, Berlin

RKI - ROBERT KOCH-INSTITUT, Berlin (2017):

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2016.

Robert Koch-Institut, Berlin

RKI- ROBERT KOCH-INSTITUT, Berlin (2018):

Epidemiologisches Bulletin, Nr. 5 aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und public health; Eigenschaften, Häufigkeit und Verbreitung von MRSA in Deutschland Update 2015/2016

Robert Koch-Institut, Berlin

ROBINSON, D. A. u. M. C. ENRIGHT (2003):

Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Antimicrob. Agents and Chemother. 47(12), 3926-3934

ROSSAINT, S., S. KLAUSMANN u. J. KREYENSCHMIDT (2015):

Effect of high-oxygen and oxygen-free modified atmosphere packaging on the spoilage process of poultry breast fillets.

Poultry Sci. 94, 96-103

RUSSELL, A. D. (1997):

Plasmids and bacterial resistance to biocides.

J. Appl. Microbiol. 82, 155-165

SAMUEL, U. u. J. P. GUGGENBICHLER (2004):

Prevention of catheter-related infections: the potential of a new nano-silver impregnated catheter.

Int. J. Antimicrob. Agents. 23, 75-78

SARKAR, S., A. D. JANA, S. K. SAMANTA u. G. MOSTAFA (2007):

Facile synthesis of silver nano particles with highly efficient anti-microbial property.

Polyhedron 26(15), 4419-4426

SCENIHR - SCIENTIFIC COMMITTEE ON EMERGING AND NEWLY IDENTIFIED HEALTH RISKS (2014): Nanosilver: safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance.

[Internet: URL:

https://ec.europa.eu/search/?query_source=PUBLICHEALTH&QueryText=Nanosilver

(zuletzt besucht: 11.09.2018)

SHARIFI-RAD, J., S. M. HOSEINI ALFATEMI, M. SHARIFI RAD u. M. IRITI (2014):

Antimicrobial Synergic Effect of Allicin and Silver Nanoparticles on Skin Infection Caused by Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus spp.

J. Ann. Med. Health. Sci. Res. 4(6), 863-868

SHENG, Z. u. Y. LIU (2017):

Potential impacts of silver nanoparticles on bacteria in the aquatic environment.

J. Environ. Manag. 191, 290-296

7. Literaturverzeichnis

SHI, L. E., Z. H. LI, W. ZHENG, Y. F. ZHAO, Y. F. JIN u. Z. X. TANG (2014):
Synthesis, antibacterial activity, antibacterial mechanism and food applications of ZnO nanoparticles: a review.

Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess. 31(2), 173-186

SILVER, S. (1967):

Acridine sensitivity of bacteria T-2: A virus gene affecting cell permeability.

J. Mol. Biol. 29, 191

SILVER, S. (1998):

Genes for all metals--a bacterial view of the periodic table. The 1996 Thom Award Lecture.

J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 20(1), 1-12

SILVER, S. (2003):

Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds.

FEMS Microbiol. Rev. 27(2-3), 341-353

SINELL, H. J. (2004):

Einführung in die Lebensmittelhygiene.

4. Auflage, Verlag Parey, Stuttgart

SITTHISAK, S., K. HOWIESON, C. AMEZOLA u. R. K. JAYASWAL (2005):

Characterization of a Multicopper Oxidase Gene from Staphylococcus aureus S.

Appl. Environ. Microbiol. 71(9), 5650-5653

SITTHISAK, S., L. KNUTSSON, J. W. WEBB u. R. K. JAYASWAL (2007):

Molecular characterization of the copper transport system in Staphylococcus aureus.

Microbiology 153, 4274-4283.

7. Literaturverzeichnis

SKINNER, D. u. C. S. KEEFER (1941):

Significance of Bacteremia Caused by *Staphylococcus aureus*.

Arch. Intern. Med. 68(5), 851-875

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

Recently introduced *qacA/B* genes in *Staphylococcus epidermidis* do not increase chlorhexidine MHK/MBK.

J. Antimicrob. Chemother. 68, 2226-2233

SLIFIERZ, M. J, R. M. FRIENDSHIP u. J. S. WEESE (2015):

Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Commercial Swine Herds Is Associated with Disinfectant and Zinc Usage.

Appl. Environ. Microbiol. 81(8), 2690-2695

SOLIOZ, M. u. J. V. STOYANOV (2003):

Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*.

FEMS Microbiol. Rev. 27, 183-195

SONDHI, S. M., J. SINGH, R. RANI, P. P. GUPTA, S. K. AGARWAL u. A. K. SEXENA (2010):

Synthesis, anti-inflammatory and anticancer activity evaluation of some novel acridine derivatives.

Eur. J. Med. Chem. 45(2), 555-563

SPINK, W .W. u. V. FERRIS (1945):

Quantitative Action of Penicillin Inhibitor From Penicillin-Resistant Strains of *Staphylococci*.

Science 102(2644), 221-223

7. Literaturverzeichnis

STEWART, G. T. and R. J. HOLT (1963):

Evolution of natural resistance to the newer Penicillins.

BMJ 1(5326), 308-311

STILES, M. E. u. J. W. HASTINGS (1991):

Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation.

Trends Food Sci. Tech. 2, 247-251

STÖRMER, A. J. BOTT, D. KEMMER u. R. FRANZ (2017):

Critical review of the migration potential of nanoparticles in food contact plastics Trends in Food Sci. Technol. 63, 39-50

STROMMINGER, B., C. KETTLITT, D. HARMSSEN, A. FRIEDRICH u. W. WITTE (2006):

Assignment of Staphylococcus isolates to groups by spa typing, SmaI macrorestriction analysis, and multilocus sequence typing.

J. Clin. Microbiol. 44(7), 2533-2540

SU, C. C., F. LONG u. E. W. YU (2011a)

The Cus efflux system removes toxic ions via a methionine shuttle.

Protein Sci. 20(1), 6-18

SU, C. C., F. LONG, M. T. ZIMMERMANN, K. R. RAJASHANKAR, R. L. JERNIGAN u. E.

W. YU (2011b):

Crystal structure of the CusBA heavy-metal efflux complex of Escherichia coli.

Nature 470(7335), 558-562

SULLER, M. T. u. A. D. RUSSELL (2000):

Triclosan and antibiotic resistance in Staphylococcus aureus.

J. Antimicrob. Chemother. 46(1), 11-18

7. Literaturverzeichnis

SÜTTERLIN, S., E. TANO, A. BERGSTEN, A.-B. TALLBERG u. A. MELHUS (2012):
Effects of silver-based wound dressings on the bacterial flora in chronic leg ulcers and its susceptibility in vitro to silver.

Acta. Derm. Venereol. 92, 34-39

SUMMERS, A. O., J. WIREMAN, M. J. VIMY, F. L. LORSCHIEDER, B. MARSHALL, S. B. LEVY, S. BENNETT u. L. BILLARD (1993):

Mercury released from dental “silver” fillings provokes an increase in mercury-resistant and antibiotic-resistant bacteria in oral and intestinal floras of primates.

Antimicrob. Agents Chemother. 37, 825-834

SUN, X. D. u. R. A. HOLLEY (2012):

Antimicrobial and Antioxidative Strategies to Reduce Pathogens and Extend the Shelf Life of Fresh Red Meats.

Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 11(2), 340-354

SUNG, S. Y., L. T. SIN, T. T. TEE, S. T. BEE., A. R. RAHMAT, W. A. W. A. RAHMAN, A. C. TAN u. M. VIKHRAMAN (2013):

Antimicrobial agents for food packaging applications.

Trends Food Sci. Technol. 33, 110-123

SUPPAKUL, P., J. MILTZ, K. SONNEVELD u. S. W. BIGGER (2003):

Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications.

J. Food. Sci. 68, 408-420

SYAFIYUDDIN, A., SALMIATI, M. R. SALIM, A. B. H. KUEH, T. HADIBARATA u. H. NUR (2017):

A Review of Silver Nanoparticles: Research Trends, Global Consumption, Synthesis, Properties, and Future Challenges.

J. Chin. Chem. Soc. 64, 732-775

TAHERI, N., A. ARDEBILI, A. AMOUZANDEH-NOBAVEH u. E. GHAZNAVI-RAD (2016)

Frequency of Antiseptic Resistance among Staphylococcus aureus and Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from a University Hospital in Central Iran.

Oman Med. J. 31(6), 426-432

TAYLOR, A. A., N. F. DOWN u. B. G. SHAW (1990):

A comparison of modified atmosphere and vacuum skin packing for the storage of red meats.

J. Food. Sci. Technol. 25(1), 98-109

TENHAGEN, B. A., A. FETSCH, J. BRÄUNIG u. A. KÄSBOHRER (2008):

Methicillin-resistente Staphylococcus aureus (MRSA) von Nutztieren.

Dt. Tierärzteblatt 9, 1177-1181

TENOVER, F. C. u. R. P. GAYNES (2000):

The epidemiology of Staphylococcus infection.

in: FISCHETTI, V. A., R. P. NOVICK, J. J. FERRETTI, D. A. PORTNOY u. J. I. ROOD (Hrsg.): Gram-positive pathogens

1. Auflage, Verlag ASM Press, Washington, D.C., S. 414-421

TOKER, R. D., N. KAYAMAN-APOHAN u. M. V. KAHRAMAN (2013):

UV-curable nano-silver containing polyurethane based organic-inorganic hybrid coatings

Prog. Org. Coat. 76(9), 1243-1250

TOMAR, V., G. BHATTACHARJEE, KAMALUDDIN, S. RAJKUMAR, K. SRIVASTAVA u. S. K. PURI (2010):

Synthesis of new chalcone derivatives containing acridinyl moiety with potential antimalarial activity.

Eur. J. Med. Chem. 45, 745-751

TUFFS, S. W., S. M. M. HAERYFAR u. J. K. MCCORMICK (2018):

Manipulation of Innate and Adaptive Immunity by Staphylococcal Superantigens.

Pathogens 7(2), 53

VALI, L., A. A. DASHTI, F. MATHEW u. E. E. UDO (2017):

Characterization of Heterogeneous MRSA and MSSA with Reduced Susceptibility to Chlorhexidine in Kuwaiti Hospitals.

Front. Microbiol. 8, 1359

VALI, L., S. E. DAVIES, L. L. LAI, J. DAVE u. S. G. AMYES (2008):

Frequency of biocide resistance genes, antibiotic resistance and the effect of chlorhexidine exposure on clinical methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates.

J. Antimicrob. Chemother. 61, 524-532

VAN BELKUM, A. u. H. VERBRUGH (2001):

40 years of methicillin resistant Staphylococcus aureus.

BMJ 323(7314), 644-645

VAN CLEEF, B. A., D. L. MONNET, A. VOSS, K. KRZIWANEK, F. ALLERBERGER, M. STRUELENS, H. ZEMLICKOVA, R. L. SKOV, J. VUOPIO-VARKILA, C. CUNY, A. W. FRIEDRICH, I. SPILIOPOULOU, J. PÁSZTI, H. HARDARDOTTIR, A. ROSSNEY, A. PAN, A. PANTOSTI, M. BORG, H. GRUNDMANN, M. MUELLER-PREMRU, B. OLSSON-LILJEQUIST, A. WIDMER, S. HARBARTH, A. SCHWEIGER, S. UNAL u. J. A. KLUYTMANS (2011):

Livestock-associated Staphylococcus aureus in humans, Europe.

Emerg. Infect. Dis. 17, 502-505

VAN DUIJKEREN, E., M. MOLEMAN, M. M. SLOET VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, J. MULTEM, A. TROELSTRA, A. C. FLUIT, W. J. VAN WAMEL, D. J. HOUWERS, A. J. DE NEELING u. J. A. WAGENAAR (2010):

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse personnel: an investigation of several outbreaks.

Vet. Microbiol. 141(1-2), 96-102

VAN LOO, I. H. M., B. M. W. DIEDEREN, P. H. M. SAVELKOUL, J. H. C. WOUDEBERG, R. ROOSEDAAL, A. VAN BELKUM, N. LEMMENS-DEN TOOM, C. VERHULST, P. H. J. VAN KEULEN u. J.A. J. W. KLUYTMANS (2007):

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat products, the Netherlands.

Emerg. Infect. Dis. 13(11), 1753-1755

VANCE, M. E., T. KUIKEN, E. P. VEJERANO, S. P. MCGINNIS, M. F. HOHELLA JR., D. REJESKI u. M. S. HULL (2015):

Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory.

Beilstein J. Nanotechnol. 6, 1769-1780

VANDERHAEGHEN, W., K. HERMANS, F. HAESEBROUCK u. P. BUTAYE (2010):

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food production animals.

Epidemiol. Infect. 38(5), 606-625

VILLAPÚN, V. M., L. G. DOVER, A. CROSS u. S. GONZÁLEZ (2016):

Antibacterial Metallic Touch Surfaces.

Materials (Basel) 9(9), 736

VINCI, G. u. M. L. ANTONELLE (2002):

Biogenic amines: quality index of freshness in red and white meat.

Food Control. 13, 519-524

VOJTOV, N., H. ROSS u. R. P. NOVICK (2002):

Global repression of exotoxin synthesis by staphylococcal superantigens.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 99, 10102-10107

VOLESKY, B. (2001):

Detoxification of metal-bearing effluents: bio-sorption for the next century.

Hydrometallurgy 59, 203-216

VOSS, A., F. LOEFFEN, J. BAKKER, C. KLAASSEN u. M. WULF (2005):

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Pig Farming.

Emerg. Infect. Dis. 11(12), 1965-1966

VOYICH, J. M., K. R. BRAUGHTON, D. E. STURDEVANT, A. R. WHITNEY, B. SAÏD-SALIM, S. F. PORCELLA, R. D. LONG, D. W. DORWARD, D. J. GARDNER, B. N. KREISWIRTH, J. M. MUSSER u. F. R. DELEO (2005):

Insights into mechanisms used by *Staphylococcus aureus* to avoid destruction by human neutrophils.

J. Immunol. 175(6), 3907-3919

WALTHER, B., L. H. WIELER, A. W. FRIEDRICH, A. M. HANSEN, B. KOHN, L. BRUNNBERG u. A. LÜBKE-BECKER (2008):

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from small and exotic animals at a university hospital during routine microbiological examinations.

Vet. Microbiol. 127(1-2), 171-178

WALTHER, B., S. MONECKE, C. RUSCHER, A. W. FRIEDRICH, R. EHRLICH, P. SLICKERS, A. SOBA, C. G. WLEKLINSKI, L. H. WIELER u. A. LÜBKE-BECKER (2009):

Comparative molecular analysis substantiates zoonotic potential of equine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

J. Clin. Microbiol. 47(3), 704-710

7. Literaturverzeichnis

WANG, J. u. C. CHEN (2009):

Biosorbents for heavy metals removal and their future.

Biotechnol. Adv. 27, 195-226

WANG, L., Y. LIU, Y. YANG, G. HUANG, C. WANG, L. DENG, Y. ZHENG, Z. FU, C. LI, Y. SHANG, C. ZHAO, M. SUN, X. LI, S. YU, K. YAO u. X. SHEN (2012):

Multidrug-resistant clones of community-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Chinese children and the resistance genes to clindamycin and mupirocin. *J. Med. Microbiol.* 61, 1240-1247

WEBER, D. J. u. W. A. RATULA (2006):

Use of germicides in the home and the healthcare setting: is there a relationship between germicide use and antibiotic resistance?

Infect. Control Hosp. Epidemiol. 27(10), 1107-1119

WISE, R. I, E. A. OSSMAN u. D. R. LITTLEFIELD (1989):

Personal reflections on nosocomial staphylococcal infections and the development of hospital surveillance.

Rev. Infect. Dis. 11(6), 1005-1019

WITTE, W., B. STROMMENDER, C. STANEK u. C. CUNY (2007):

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe.

Emerg. Infect. Dis. 3(2), 255-258

WÖGERBAUER, M., J. ZEINZINGER, B. SPRINGER, P. HUFNAGL, A. INDRA, I. KORSCHINECK, J. HOFRICHTER, I. KOPACKA, R. FUCHS, J. STEINWIDER, K. FUCHS, K. M. NIELSEN u. F. ALLERBERGER (2014):

Prevalence of the aminoglycoside phosphotransferase genes *aph(3')-IIIa* and *aph(3')-IIa* in *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* and *Staphylococcus aureus* isolates in Austria.

J. Med. Microbiol. 63, 210-217

WÜLLENWEBER, J. u. M. HERRMANN (2003):

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-diagnosis and therapy.

Hno 51(6), 451-455

XIU, Z. M., Q. B. ZHANG, H. L. PUPPALA, V. L. COLVIN u. P. J. ALVAREZ (2012):

Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles.

Nano Lett. 12(8), 4271-4275

YAMAMOTO, T., Y. TAMURA u. T. YOKOTA (1988).

Antiseptic and antibiotic resistance plasmid in *Staphylococcus aureus* that possesses ability to confer chlorhexidine and acrinol resistance.

Antimicrob. Agents Chemother. 32(6), 932-935

YAMANAKA, M., K.HARA u. J. KUDO (2005):

Bactericidal Actions of a Silver Ion Solution on *Escherichia coli*, Studied by Energy-Filtering Transmission Electron Microscopy and Proteomic Analysis.

Appl. Environ. Microbiol. 71, 7589-7593

YANG W., C. SHEN, Q. JI, H. AN, J. WANG, Q. LIU u. Z. ZHANG (2009):

Food storage material silver nanoparticles interfere with DNA replication fidelity and bind with DNA.

Nanotechnology 20(8), 085102

YOSHIDA, H., M. BOGAKI, S. NAKAMURA, K. UBUKATA u. M. KONNO (1990):

Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* *norA* gene, which confers resistance to quinolones.

J. Bacteriol. 172(12), 6942-6949

7. Literaturverzeichnis

YUAN, Y.-G., Q. L. PENG u. S. GURUNATHAN (2017):

Effects of Silver Nanoparticles on Multiple Drug-Resistant Strains of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa from Mastitis-Infected Goats: An Alternative Approach for Antimicrobial Therapy.

Int. J. Mol. Sci. 18(3), 569

ZAKRYS, P. I., M. G. O'SULLIVAN, P. ALLEN u. J. P. KERRY (2009):

Consumer acceptability and physiochemical characteristics of modified atmosphere packed beef steaks.

Meat Sci. 81(4), 720-725

ZHANG, Z., I. J. BRITT u. M. A. TUNG (1999):

Water absorption in EVOH films and its influence on glass transition temperature.

J. Polym. Sci. 37, 691-699

ZHANG, F., Y. LI, M. YANG u. W. LI (2012):

Content of heavy metals in animal feeds and manures from farms of different scales in northeast China.

J. Environ. Res. Public Health 9, 2658-2668

ZETHNER, G., R. SATTELBERGER u. A. HANUS-ILLNAR (2007):

Kupfer und Zink im Wirtschaftsdünger von Schweine- und Geflügelmastbetrieben.

Report, REP-0073 Umweltbundesamt GmbH, Wien, Österreich

ZHOU, G. H., X. L. XU u. Y. LIU (2010):

Preservation technologies for fresh meat –A review.

Meat. Sci. 86(1), 119-128

ZINCHENKO, A. A., V. G. SERGEYEV, K. YAMABE, S. MURATA u. K. YOSHIKAWA (2004):

DNA compaction by divalent cations: structural specificity revealed by the potentiality of designed quarternary diammonium salts.

Chembiochem. 5, 360-386

ZOU, L., J. MENG, P. F. MCDERMOTT, F. WANG, Q. YANG, G. CAO, M. HOFFMANN, u. S. ZHAO (2014):

Presence of disinfectant resistance genes in Escherichia coli isolated from retail meats in the USA.

J. Antimicrob. Chemother. 69, 2644-264

7.1 Verordnungen, Richtlinien, Vorschriften

VERORDNUNG (EG) NR. 178/2002 des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 28. Januar 2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit

VERORDNUNG (EG) NR. 852/2004 des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 29. April 2004 über Lebensmittelhygiene

VERORDNUNG (EG) NR. 853/2004 des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs

VERORDNUNG (EG) NR. 854/2004 des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 29. April 2004 mit besonderen Verfahrensvorschriften für die amtliche Überwachung von zum menschlichen Verzehr bestimmten Erzeugnissen tierischen Ursprungs

VERORDNUNG (EG) NR. 882/2004 des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 29. April 2004 über amtliche Kontrollen zur Überprüfung der Einhaltung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts sowie der Bestimmungen über Tiergesundheit und Tierschutz

VERORDNUNG (EG) NR. 1831/2003 des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung

VERORDNUNG (EG) NR. 1935/2004 des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 27. Oktober 2004 über Materialien und Gegenstände, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen und zur Aufhebung der Richtlinien 80/590/EWG und 89/109/EWG

VERORDNUNG (EG) NR. 1333/2008 des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 16. Dezember 2008 über Lebensmittelzusatzstoffe

7. Literaturverzeichnis

VERORDNUNG (EG) NR. 1223/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 30. November 2009 über kosmetische Mittel

VERORDNUNG (EG) NR. 10/2011 des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 14. Januar 2011 über Materialien und Gegenstände aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen

VERORDNUNG (EU) NR. 1169/2011 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 25. Oktober 2011 betreffend die Information der Verbraucher über Lebensmittel und zur Änderung der Verordnungen.....

VERORDNUNG (EG) NR. 528/2012 des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 22. Mai 2012 über die Bereitstellung auf dem Markt und die Verwendung von Biozidprodukten

DELEGIERTE VERORDNUNG (EG) NR. 1062/2014 der Kommission vom 4. August 2014 über das Arbeitsprogramm zur Systematischen Prüfung aller in Biozidprodukten enthaltenen alten Wirkstoffe gemäß der Verordnung (EG) Nr. 528/2012 des Europäischen Parlaments und Rates

VERORDNUNG (EU) NR. 2017/625 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 15. März 2017 über amtliche Kontrollen und andere amtliche Tätigkeiten zur Gewährleistung der Anwendung des Lebens- und Futtermittelrechts und der Vorschriften über Tiergesundheit und Tierschutz, Pflanzengesundheit und Pflanzenschutzmittel, Änderung der.....

DURCHFÜHRUNGSVERORDNUNG (EU) NR. 1035/2013 der Kommission vom 24. Oktober 2013 zur Genehmigung von Benzoesäure als alten Wirkstoff zur Verwendung in Biozidprodukten der Produktarten 3 und 4

DURCHFÜHRUNGSVERORDNUNG (EU) NR. 2015/1730 der Kommission vom 28. September 2015 zur Genehmigung von Wasserstoffperoxid als alter Wirkstoff zur Verwendung in Biozidprodukten der Produktarten 1, 2, 3, 4, 5 und 6

7. Literaturverzeichnis

DURCHFÜHRUNGSVERORDNUNG (EU) NR. 2016/1095 der Kommission vom 6. Juli 2016 zur Zulassung von Zinkacetat, Dihydrat; Zinkchlorid, wasserfrei; Zinkoxid; Zinksulfat, Heptahydrat; Zinksulfat, Monohydrat; Aminosäuren-Zinkchelate, Hydrate; Proteinhydrolysate-Zinkchelate; Glycin-Zinkchelate-Hydrate (fest) und Glycin-Zinkchelate-Hydrate (flüssig) als Zusatzstoffe in Futtermitteln für alle Tierarten und zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 1334/2003, (EG) Nr. 479/2006 und (EU) Nr. 335/2010 sowie der Durchführungsverordnungen (EU) Nr. 991/2012 und (EU) Nr. 636/2013

DURCHFÜHRUNGSVERORDNUNG (EU) NR. 2017/1145 der Kommission vom 8. Juni 2017 über die Marktrücknahme bestimmter gemäß den Richtlinien 70/524/EWG und 82/471/EWG des Rates zugelassener Futtermittelzusatzstoffe und zur Aufhebung der veralteten Bestimmungen über die Zulassung dieser Futtermittelzusatzstoffe

BEDARFSGEGENSTÄNDEVERORDNUNG, BedGgstV

Ausfertigungsdatum: 10.04.1992 Vollzitat:

"Bedarfsgegenständeverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 23. Dezember 1997 (BGBl. 1998 I S. 5), die zuletzt durch Art. 2 Absatz 1 des Gesetzes vom 15. Februar 2016 (BGBl. I S. 198) geändert worden ist"

LEBENSMITTELBESTRAHLUNGSVERORDNUNG, LMBestV

Ausfertigungsdatum: 14.12.2000 Vollzitat:

"Lebensmittelbestrahlungsverordnung vom 14. Dezember 2000 (BGBl. I S. 1730), die zuletzt durch Artikel 5 der Verordnung vom 5. Juli 2017 (BGBl. I S. 2272) geändert worden ist"

Stand: Zuletzt geändert durch Art. 5 V v. 5.7.2017 I 2272

RICHTLINIE 1999/2/EG Des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. Februar 1999 zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über mit ionisierenden Strahlen behandelte Lebensmittel und Lebensmittelbestandteile

RICHTLINIE 1999/3/EG Des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. Februar 1999 über die Festlegung einer Gemeinschaftsliste von mit ionisierenden Strahlen behandelten Lebensmitteln und Lebensmittelbestandteilen

RICHTLINIE 2003/99/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 17. November 2003 zur Überwachung von Zoonosen und Zoonoseerregern und zur Änderung der Entscheidung 90/424/EWG des Rates sowie zur Aufhebung der Richtlinie 92/117/EWG des Rates

AVV ZOONOSEN LEBENSMITTELKETTE - Allgemeine Verwaltungsvorschrift über die Erfassung, Auswertung und Veröffentlichung von Daten über das Auftreten von Zoonosen und Zoonoseerregern entlang der Lebensmittelkette in der Fassung der Bekanntmachung vom 10. Februar 2012 (BAnz. S. 623), geändert durch Artikel 2 der Verwaltungsvorschrift vom 20. Oktober 2014 (BAnz AT 07.11.2014 B2)

LEBENSMITTEL-, BEDARFSGEGENSTÄNDE- UND FUTTERMITTELGESETZBUCH (LEBENSMITTEL- UND FUTTERMITTELGESETZBUCH – LFGB)
Bundesgesetzdatenblatt, Verlag Bundesanzeiger Verlag

EUROPEAN UNION REGISTER OF FEED ADDITIVES (2018):

Annex I: Gemeinschaftsregister gemäß VO (EU) NR. 1831/2003

Edition 4/2018 (264) DIRECTORATE-GENERAL FOR HEALTH AND FOOD SAFETY
Directorate E - Food and feed safety, innovation Unit E5 – Animal nutrition, veterinary medicines

8. Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Corinna Kehrenberg, PhD und Herrn PD Dr. Carsten Krischek für Auswahl und Bereitstellung des überaus interessanten und hoch aktuellen Themas, die Möglichkeit diese Arbeit im Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit anfertigen zu können und für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung während meiner Zeit als Doktorandin. Im Besonderen möchte ich mich bei meinen beiden Betreuern für die unermüdliche und geduldige Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft und Fachkompetenz, die Hilfestellungen bei der statistischen Auswertung, (die anspornenden und aufmunternden Worte bedanken.

Darüber hinaus gilt mein Dank Frau Dr. Birgit Strommenger, PhD vom Robert Koch-Institut, (FG Nosokomiale Infektionserreger und Antibiotikaresistenzen) für die Bereitstellung einiger *S. aureus*-Isolate und die Möglichkeit diese vor Ort am Robert Koch-Institut auf ihre Empfindlichkeiten testen zu können, das zur Verfügung stellen ausgewählter Isolate zur Testung am Institut für Lebensmittelqualität und-sicherheit sowie für die freundliche und hilfsbereite Kommunikation während meiner gesamten Doktorandenzeit.

Des Weiteren bedanke ich mich recht herzlich bei Herrn Beyerbach, der mich noch während seiner kürzlich beendeten Zeit am Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung überaus hilfsbereit und freundlich mit der statistischen Auswertung der Daten zur Empfindlichkeitstestung unterstützt hat.

Außerdem gilt es sich bei der Fritz Ahrberg Stiftung für die Bereitstellung der finanziellen Mittel zu bedanken, die es erst ermöglichten dieses Projekt zu bearbeiten.

Ein besonderes Dankeschön geht an meine Bürokollegin Daniela, mit der die Teamarbeit am RKI und LMQS nicht nur außerordentlich viel Spaß gemacht hat, sondern ebenfalls sehr gut funktioniert hat, sodass ich mich gerne an die Zeit erinnern werde.

Da ich meine oft sehr aufwendigen und lange dauernden Probenentnahmen nur mit der Unterstützung der vielen ausdauernden Helfer durchführen konnte, möchte ich mich ebenfalls bei allen bedanken, die bereit waren so viel Zeit für die Hilfe bei meinen Versuchen und

8. Danksagungen

Analysen zu opfern. Ich möchte im Einzelnen besonders Bettina EngelAbé, Manuela von Ahlen, Vera Meyer, Iris Oltrogge und Inna Pahl für die fachlich beratende, aber auch tatkräftig unterstützende Hilfe bedanken. Daneben danke ich den allerbesten Doktorandenkollegen Heike, André, Sylvia, Greta, Paula, Ines und Sandra mit denen ich nicht nur in der Mittagspause, sondern auch in Garmisch-Patenkirchen und während der Versuchsphasen sehr viel gelacht habe und die mich unwahrscheinlich unterstützt haben.

Das größte Dankeschön richtet sich jedoch an meinen geliebten Ehemann Peer und meine beiden Söhne Adrian und Julian, die mich jeden Tag aufs Neue wieder aufgemuntert haben und die geduldig auf mich gewartet haben, wenn es in der Schlussphase der Doktorarbeit mal wieder zu lange am PC gedauert hat. Zudem danke ich meinem verstorbenen Papa, der die Anfangszeit meiner Doktorarbeit noch erleben durfte, doch nun nach schwerer Krankheit das Ende leider nicht mehr miterleben kann. Ich widme dir daher diese Arbeit und ich hoffe sie gefällt dir, Papa. Ich vermisse dich so unglaublich.

