

<https://commons.wikimedia.org>

Inaktivierung von Biofilm-assoziierten Salmonellen: Wie wirksam ist die Desinfektion?

Prof. Dr. Mardjan Arvand

Fachgebiet angewandte Krankenhaus- und Infektionshygiene

ÖGD Fortbildung, 20.04.2023



Agenda

- Salmonellen
- Biofilme
- Methoden zur Wirksamkeitsprüfung von Desinfektionsmitteln
- Wirksamkeit von Desinfektionsmittel auf Salmonellen in Biofilm
- Zusammenfassung und Ausblick



Salmonellen als Infektionserreger – ein Überblick

- **Enteritische Salmonellen => Infektiöse Gastroenteritis**
 - Reservoir Tiere (Hühner, Schweine, Reptilien, etc.)
 - Übertragung i.d.R. durch kontaminierte Lebensmittel
 - **Häufige Ursache von Lebensmittel-assoziierten Infektionen und Ausbrüche** in Industrieländern

- **Typhöse Salmonellen => Typhus abdominalis**
 - Reservoir Mensch
 - Übertragung i.d.R. von Mensch-zu-Mensch oder indirekt z.B. über Trinkwasser
 - In Deutschland nur importierte Infektionen

Weltweit jährlich
93,8 Mill. Fälle;
155 Tsd. Todesfälle

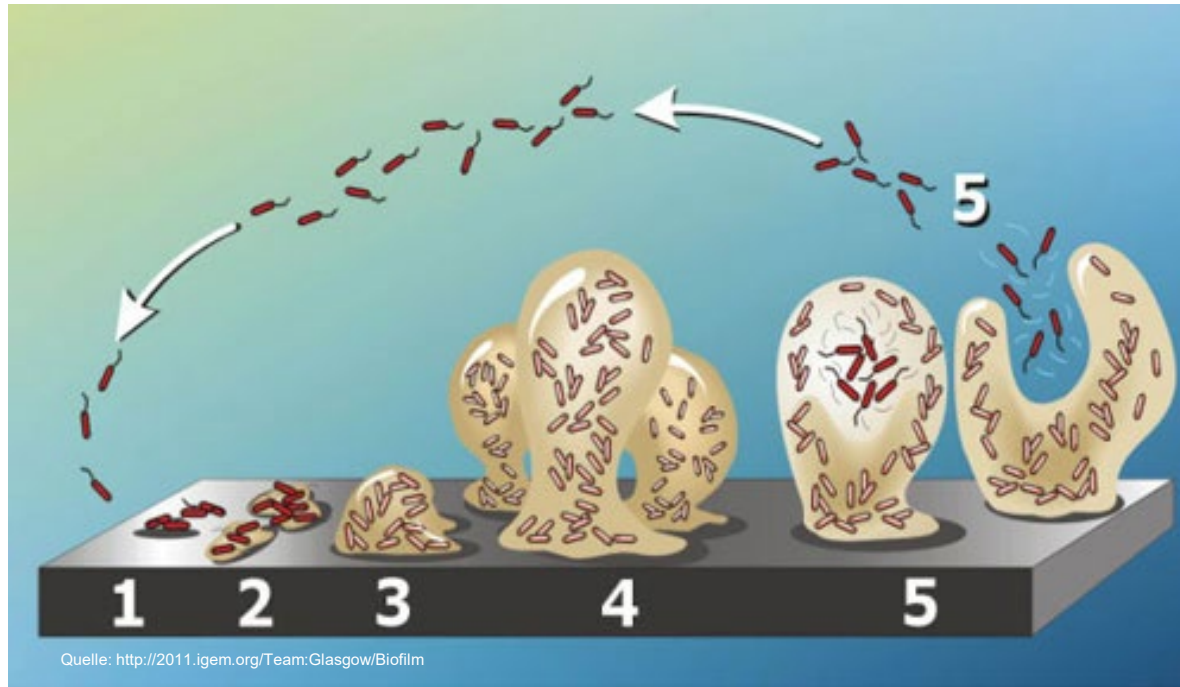
Weltweit jährlich
11-21 Mill. Fälle;
161 Tsd. Todesfälle



Was sind Biofilme?

- Mikrobielle Biofilme sind Aggregate aus Zellen und einer selbst-produzierten extrazellulären Matrix
- Vorkommen in freier Natur in Gewässern und Böden, in med. Kontext (z.B. chronische Wundinfektionen, Implantate & Katheter), in der Industrie (z.B. Kühltürme)
- Heterogene Zellpopulation (u.a. Persister), Optimaler Ort für Austausch von Resistenz- und Virulenzgenen
- Biofilm-Bildung erhöht die Toleranz gegenüber widrigen Umweltbedingungen wie Immunabwehrzellen, Austrocknung, Antibiotika, Desinfektionsmittel
- Salmonellen-Biofilme wurden bisher beschrieben in Zusammenhang mit Persistenz in fleischverarbeitenden Betrieben/Farmen, bei Lebensmittel-assoziierten Ausbrüchen

Biofilmkreislauf



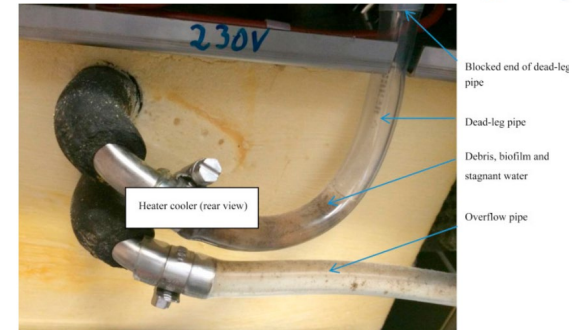


Biofilme im Krankenhaus und in der Umwelt

- Heater cooler units (atypische Mykobakterien)
- Wasserleitung, Dentaleinheit (Pseudomonas, Legionellen, etc.)
- Tierstall (Salmonellen, Listerien, etc.)



©Tim Scrivener



J. Walker et al. J Hosp Infect 2017



Maßnahmen zu Prävention und Kontrolle von Infektionen

- Sauberes Wasser
- Hygiene in Produktionsstätten
- Lebensmittel- und Küchenhygiene
- Händehygiene
- ...
- Reinigung
- **Desinfektion**
 - Kommerzielle Produkte
 - Unterschiedliche Wirkstoffe
 - verschiedene Wirkbereiche



Desinfektion in der Veterinärmedizin
Ausschuss der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V.



Ausschuss Desinfektion DVG-Desinfektionsmittellisten Infos für Anwender Infos für Hersteller und Gutachter English Informa

DVG-Desinfektionsmittellisten



Bekanntmachungen – Amtliche Mitteilungen

Bundesgesundheitsbl 2017 · 60:1274–1297
<https://doi.org/10.1007/s00103-017-2634-6>
 © Springer-Verlag GmbH Deutschland 2017

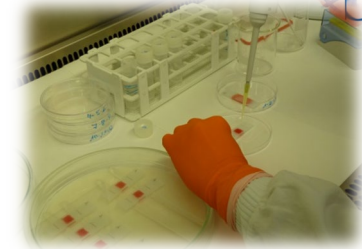
Bekanntmachung des Robert Koch-Institutes

**Liste der vom Robert Koch-Institut
geprüften und anerkannten
Desinfektionsmittel und
-verfahren**

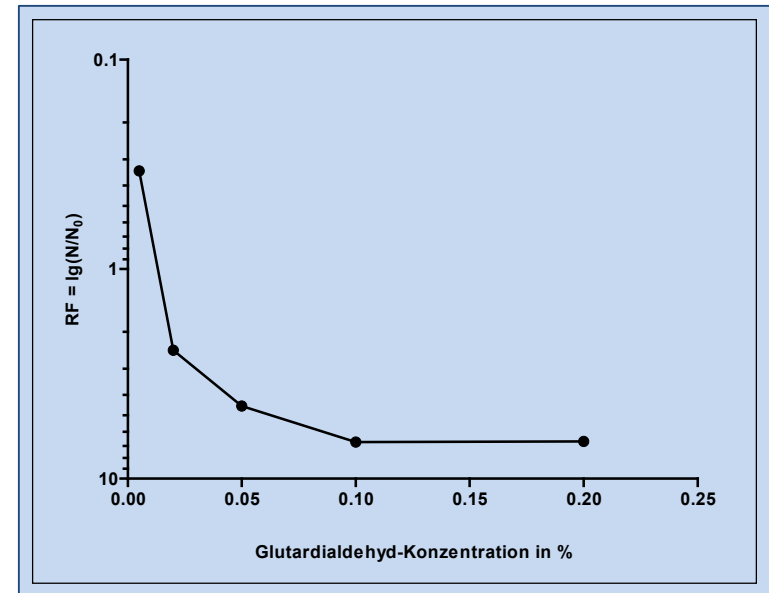
Stand: 31. Oktober 2017 (17. Ausgabe)



Wie wird Wirksamkeit von Desinfektionsmittel ermittelt?



- Prüfung mittels mikrobiologischer Laboruntersuchung
- Prüfung unter definierten Bedingungen
 - Testorganismen, Temperatur, Belastung, Zeit, etc.
 - 3 unabhängige Prüfungen
 - Neutralisationstest mit Toxizitätsprüfung
 - Es werden viele Konzentrationen geprüft
 - **Reduktionsfaktor → 4 - 5 Log-Stufen = erfolgreiche Desinfektion**





Wie wird Wirksamkeit von Desinfektionsmittel ermittelt?

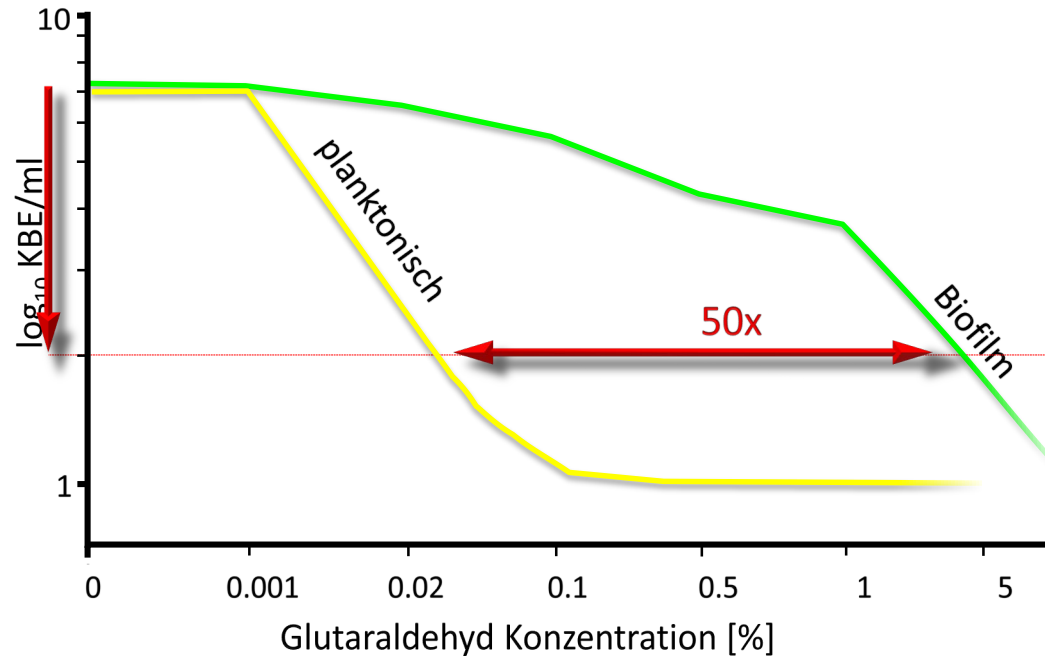
- Standardisierten Verfahren gemäß DIN EU Normen erhältlich für verschieden Bereiche
- Grundsätzlich zwei Stufen
 - Stufe 1: Suspensionsverfahren
 - Stufe 2: praxisnaher Test
- Alle Stufen werden mit planktonischen Bakterien/Mikroorganismen durchgeführt

	Veterinärbereich	Bereich Lebensmittel, Industrie, Haushalt & öffentl. Einrichtungen	Humanmedizinischer Bereich
Phase 2, Stufe 1	Quant. Suspensionsversuch EN 1656:2019 ($\geq 5 \log_{10}$)	Quant. Suspensionsversuch EN 1276:2019 ($\geq 5 \log_{10}$)	Quant. Suspensionsversuch EN 13727:2012+A2:2015 ($\geq 5 \log_{10}$)
Phase 2, Stufe 2	Quant. Oberflächenversuch auf nicht porösen Oberflächen EN 14349:2012 ($\geq 4 \log_{10}$) Quant. Oberflächenversuch auf porösen Oberflächen EN 16437:2014+A1:2019 ($\geq 4 \log_{10}$)	Quant. Oberflächenversuch auf nicht porösen Oberflächen EN 13697:2015+A1:2019 ($\geq 4 \log_{10}$)	Quant. Keimträgerversuch EN 14561:2006 ($\geq 5 \log_{10}$) Quant. Oberflächenversuch auf nicht porösen Oberflächen EN 16615:2015 (mit mechan. Einwirkung, $\geq 5 \log_{10}$) Quant. Oberflächenversuch auf nicht-porösen Oberflächen EN 17387:2021 (ohne mechan. Einwirkung, $\geq 5 \log_{10}$)



Biofilm-assoziierte Bakterien verhalten sich anders als planktonische Zellen

- Bsp. *Pseudomonas aeruginosa*



Quelle: Konrat, RKI



Biofilm-assoziierte Bakterien verhalten sich anders als planktonische Zellen

Brunke et al.
Antimicrobial Resistance & Infection Control (2022) 11:81
<https://doi.org/10.1186/s13756-022-01112-z>

Antimicrobial Resistance
and Infection Control

BRIEF REPORT

Open Access



Tolerance of biofilm of a carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* involved in a duodenoscopy-associated outbreak to the disinfectant used in reprocessing

Melanie S. Brunke^{1*}, Katharina Konrat^{1†}, Christoph Schaudinn², Brar Piening³, Yvonne Pfeifer⁴, Laura Becker^{4,5}, Ingeborg Schwabke¹ and Mardjan Arvand^{1,6}

Abstract

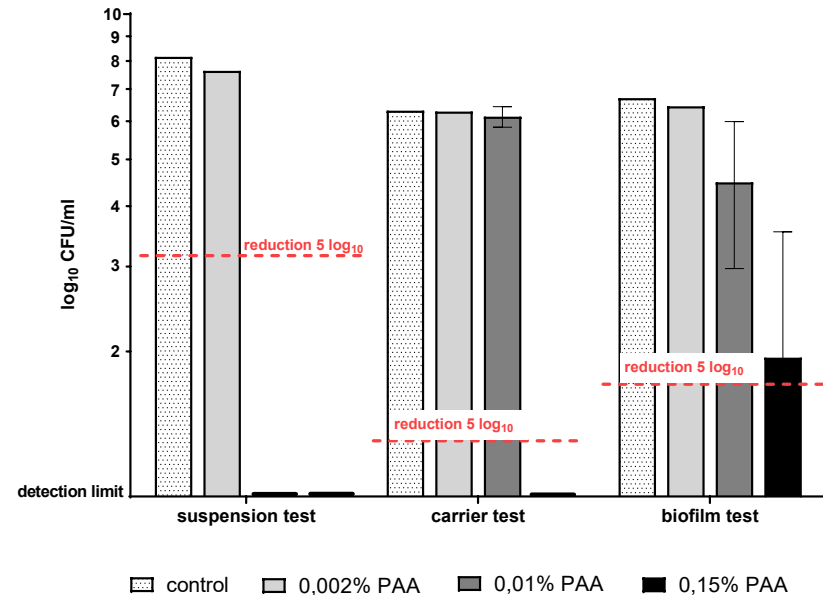
Background: One possible transmission route for nosocomial pathogens is contaminated medical devices. Formation of biofilms can exacerbate the problem. We report on a carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* that had caused an outbreak linked to contaminated duodenoscopes. To determine whether increased tolerance to disinfectants may have contributed to the outbreak, we investigated the susceptibility of the outbreak strain to disinfectants commonly used for duodenoscope reprocessing. Disinfection efficacy was tested on planktonic bacteria and on biofilm.

Methods: Disinfectant efficacy testing was performed for planktonic bacteria according to EN standards 13727 and 14561 and for biofilm using the Bead Assay for Biofilms. Disinfection was defined as $\geq 5 \log_{10}$ reduction in recoverable colony forming units (CFU).

Brunke, Konrat et al.

Antimicrob Resist Infect Control 2022

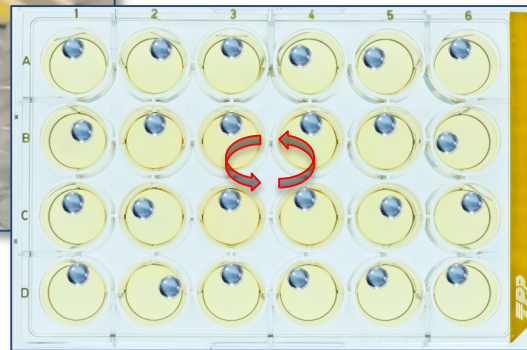
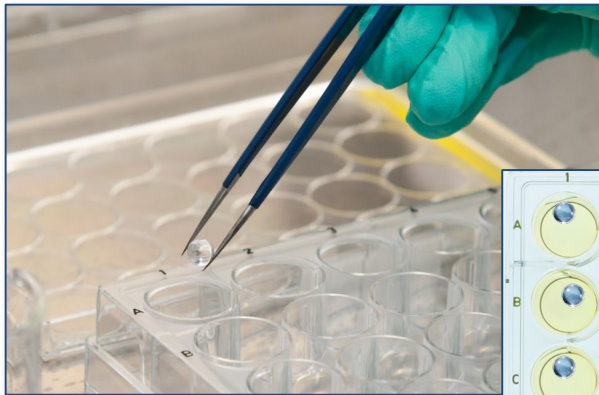
K. pneumoniae - outbreak strain





The Bead Assay for Biofilms – Biofilm Kultivierung auf Glass Beads

The Bead Assay for Biofilms: A Quick, Easy and Robust Method for Testing Disinfectants. (Konrat et al. 2016, *PLoS ONE*)



RESEARCH ARTICLE

The Bead Assay for Biofilms: A Quick, Easy and Robust Method for Testing Disinfectants

Katharina Konrat^{1,2}, Ingeborg Schwebke¹, Michael Lause², Christin Dittmann², Katja Levin¹, Ricarda Andrich¹, Mardjan Arvand¹, Christoph Schaudin^{1*}

¹ Division for applied Infection Control and Hospital Hygiene, Robert Koch Institute, Berlin, Germany, ² Advanced Light and Electron Microscopy, Robert Koch Institute, Berlin, Germany

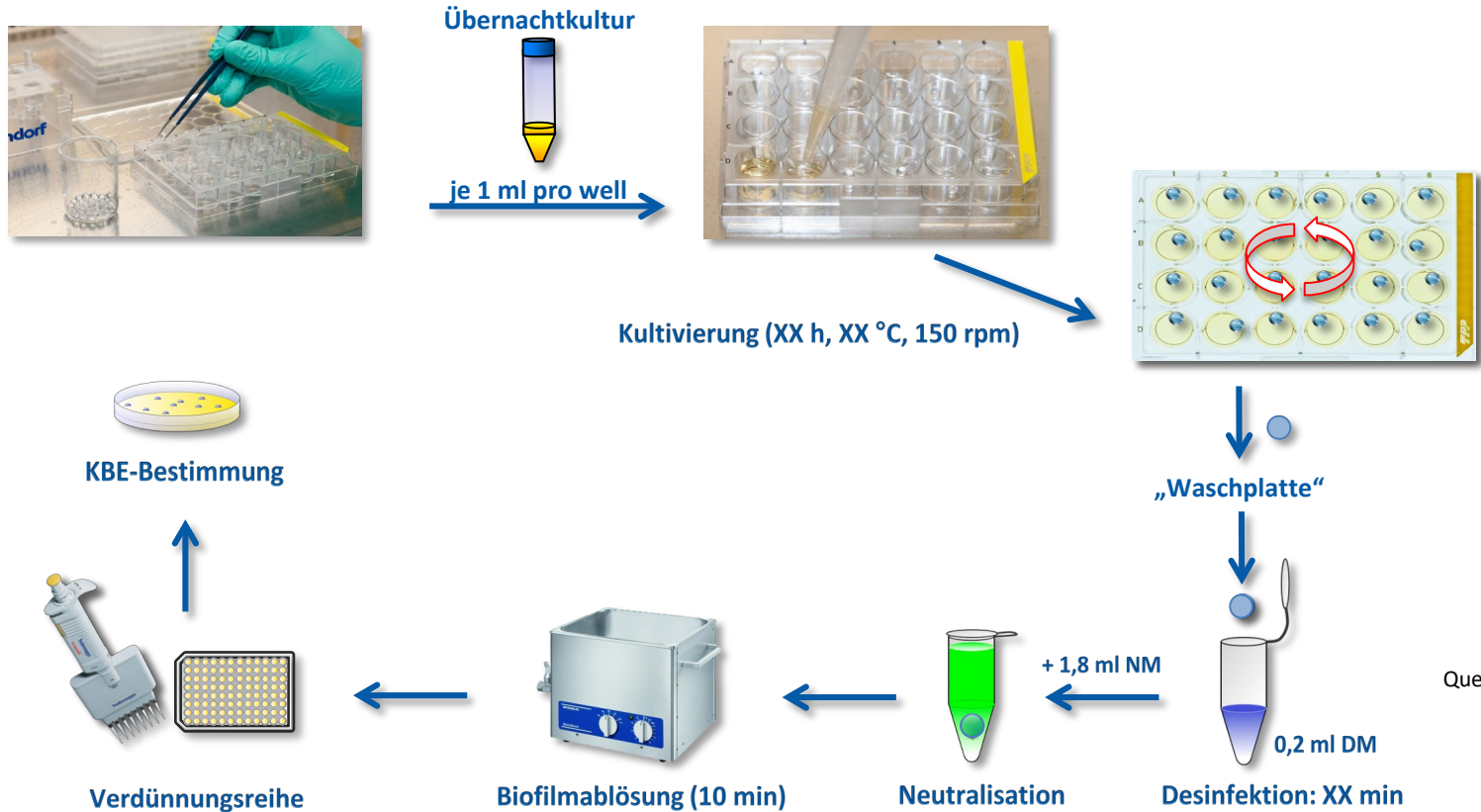
* schaudin@rki.de

Abstract

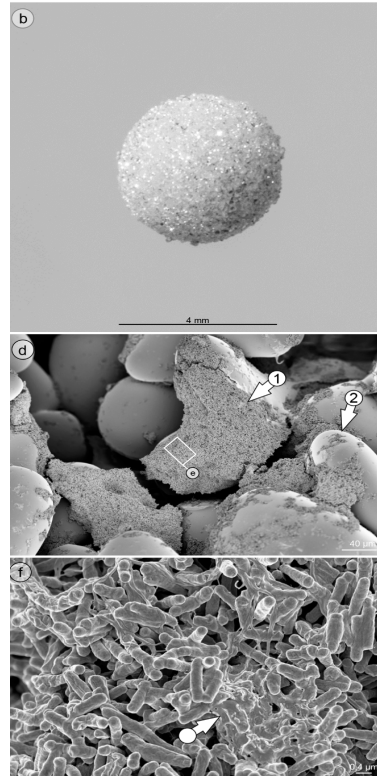
Bacteria live primarily in microbial communities (biofilms), where they exhibit considerably higher biocide tolerance than their planktonic counterparts. Current standardized efficacy testing protocols of disinfectants, however, employ predominantly planktonic bacteria. In order to test the efficacy of biocides on biofilms in a standardized manner, a new assay was developed and optimized for easy handling, quickness, low running costs, and above all—repeatability. In this assay, 5 mm glass- or polytetrafluoroethylene beads in 24 well microplate plates served as substrate for *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. After optimizing result-relevant steps, the actual performance of the assay was explored by treating *P. aeruginosa* biofilms with glutaraldehyde, isopropanol, or peracetic acid in predefined concentrations. The aspired 5 log₁₀ reduction in CFU counts was achieved by glutaraldehyde at 5% (30 min), and by peracetic acid at 0.2% (10 min). In contrast, 80% isopropanol (30 min) failed to meet the reduction goal. However, the main accomplishment of this study was to unveil the potential of the assay itself: most noteworthy here, a reliable repeatability of the results. The new bead assay for biofilms is a robust, quick and cost-effective method for assessing the efficacy of biocides against biofilms.



The Bead Assay for Biofilms – Versuchsschema



The Bead Assay for Biofilms – Desinfektion von Salmonellen



Glass bead mit Mycobakterien Biofilm
(C. Schaudinn, RKI, ZBS4)



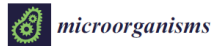
BIOPIGEE - Biosecurity practices for pig farming across Europe

- One Health European Joint Programme
- 16 Partner nationaler Public-Health-, Veterinär- und Lebensmittelinstitute aus 13 Ländern. Deutsche Beteiligung: BfR (Koordinator) & RKI
- RKI-Beteiligung am Teilprojekt zur Wirksamkeitsprüfung von Desinfektionsmitteln auf Biofilm-assoziierte Salmonellen – zusammen mit Animal and Plant Health Agency, UK & Norwegian Veterinary Institute
- Vergleich dreier Biofilm-Kultivierungsmethoden und deren Eignung zur Desinfektionsmitteltestung





Desinfektionsmitteltestung gegen Biofilme: *S. Typhimurium* - Glutaraldehyd



Article

Evaluation of Biofilm Cultivation Models for Efficacy Testing of Disinfectants against *Salmonella* Typhimurium Biofilms

Anja M. Richter^{1,*}, Katharina Konrat^{1,†}, Ane M. Osland², Emma Brook³, Claire Ostler³, Lene K. Vestby², Rebecca J. Gosling^{3,†}, Live L. Nesse⁴ and Mardjan Arvand^{1,5,*}

¹ Hospital Hygiene, Infection Prevention and Control, Department Infectious Diseases, Robert Koch Institute, 13353 Berlin, Germany

² Department of Analysis and Diagnostics, Norwegian Veterinary Institute, 1433 Ås, Norway

³ Department of Bacteriology, Animal and Plant Health Agency, Addlestone, Surrey KT15 3NB, UK

⁴ Department of Animal Health, Welfare and Food Safety, Norwegian Veterinary Institute, 1433 Ås, Norway

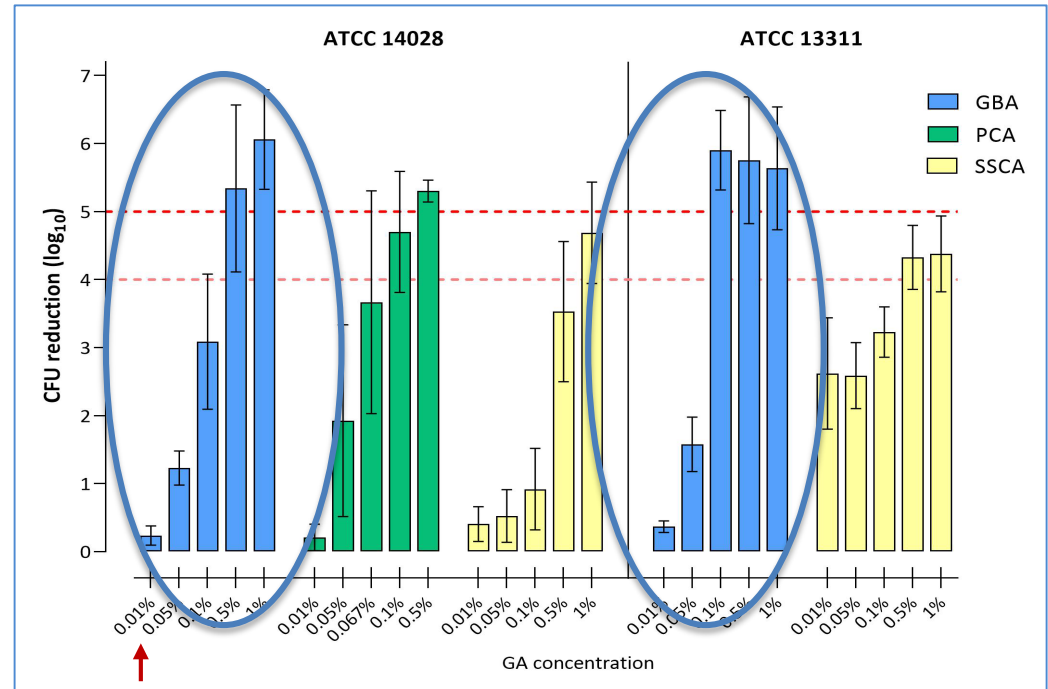
⁵ Department of Infectious Diseases, Medical Microbiology and Hygiene, University of Heidelberg, 69120 Heidelberg, Germany

* Correspondence: richteranj@rki.de (A.M.R.); arvandm@rki.de (M.A.)

† These authors contributed equally to this article.

‡ Current address: Health and Safety Executive, The Science and Research Centre, Harpur Hill, Buxton, Derbyshire SK17 9JN, UK.

Richter, Konrat et al.
Microorganisms 2023

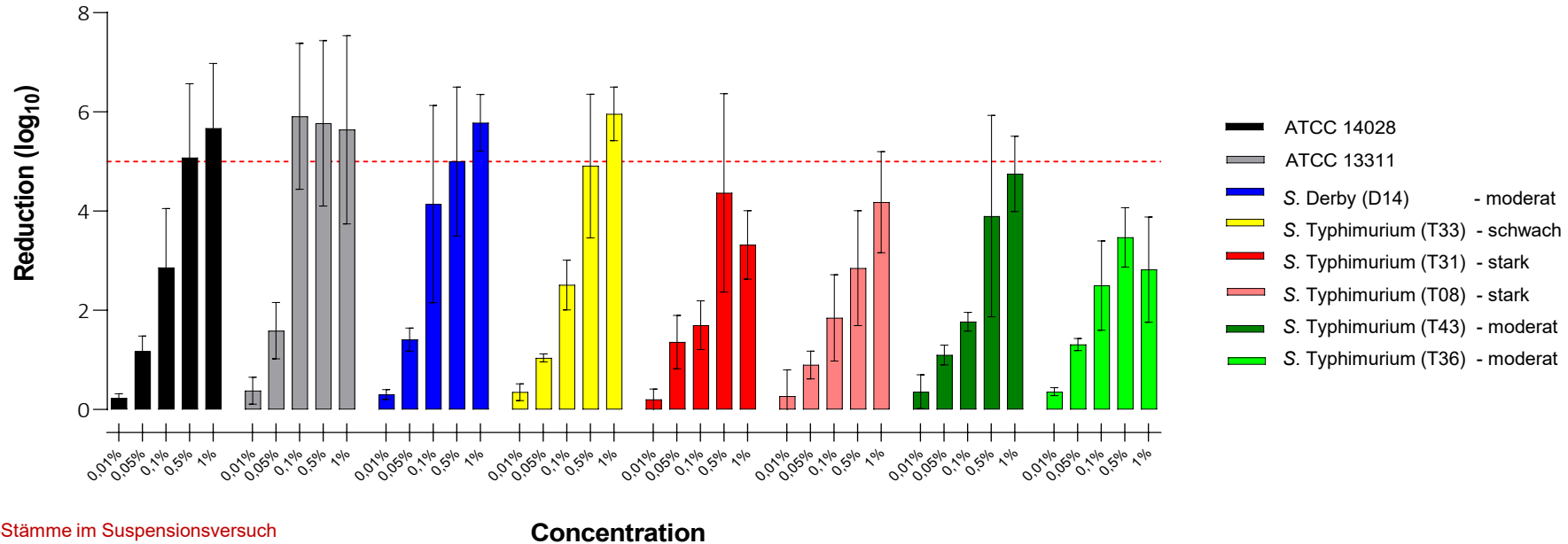


ATCC-Stämme im Suspensionsversuch
Reduktion $\geq 5 \log_{10}$ \rightarrow 0,03% GA



Desinfektionsmitteltestung gegen Biofilme: *S. Typhimurium* & *S. Derby*

Vergleich von Labor- und Wildtypstämmen - Glutaraldehyd (30 min, 20°C)





Desinfektionsmittel-Wirksamkeit auf *Salmonella* in Biofilm

- Aktuelle Untersuchungen eines *S. Typhimurium* Ausbruchstamms in Zusammenhang mit Schokolade
 - RASFF Alert 2022.1799
 - 369 Fälle (Stand Mai 2022), davon 22 in Deutschland (81 FR, 64 BE)
 - Patientenalter überwiegend < 10 Jahre
 - Hospitalisierungsrate 41%
- Vorläufige Ergebnisse



Zusammenfassung

- Biofilm-assoziierte Salmonellen sind wesentlich toleranter gegenüber Desinfektionsmittel als planktonische Formen
- Die aktuell vorhandenen Vorgaben zur Desinfektion bilden Biofilm-Desinfektion nicht ab
- Für die Desinfektion von präformierten Biofilmen sind deutlich höhere Konzentrationen bzw. Einwirkzeiten erforderlich



Schlussfolgerung und Ausblick

- Bei Ausbrüchen, wiederkehrenden Übertragungen, persistierenden Kontaminationen an Biofilme denken!
- Eine dauerhafte Elimination von Biofilmen ist i.d.R. durch chemische Desinfektion „allein“ nicht möglich
- Für die nachhaltige Reduktion von Biofilmen ist eine Kombination verschiedener Verfahren (u.a. Reinigung, mechanische Entfernung, Ultraschall, Temperatur, Trocknung) und Desinfektion erforderlich
- Standardisierte Methoden für Desinfektionsmitteltestung von Biofilmen sind erforderlich



Vielen Dank

- Katharina Konrat, Anja Richter
- Labor-Team FG14: Dora Csertö, Sevilay Dalci, Antje Finke
- FG13: Sandra Simon, Angelika Fruth
- ZBS4: Christoph Schaudinn
- Animal and Plant Health Agency, UK
- Norwegian Veterinary Institute, Norway
- One Health European Joint Programme



- Kontakt: ArvandM@rki.de