

Antimikrobielles Wirkprofil der beiden neuen polymerischen Guanidine Akacid und Akacid plus

C. Kratzer, A. Buxbaum, S. Tobudic, W. Graninger, A. Georgopoulos*

Univ.-Klinik für Innere Medizin I, Klin. Abt. für Infektionen und Chemotherapie, Medizinische Universität Wien

* Korrespondierender Autor: Univ.-Prof. DDr. A. Georgopoulos

Schlüsselwörter:

Biozid, Akacid, Akacid plus, MHK, Bakterizidie, Resistenzinduktion, Toxizität

Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde die *In vitro*-Wirksamkeit der beiden neuartigen polymerischen Guanidine, Akacid und sein Nachfolger Akacid plus, im Vergleich zu Chlorhexidindigluconat gegenüber 369 klinischen Isolaten von Patienten mit dokumentierten Infektionen in österreichischen Spitälern, deren akute Toxizität und die Fähigkeit der Resistenzinduktion von Akacid evaluiert. Die untersuchten Bakterien- und Pilzstämmen waren: *Staphylococcus aureus* (98), *Staphylococcus epidermidis* (9), *Enterococcus faecalis* (32), *Klebsiella* spp. (45), *Enterobacter* spp. (20), *Escherichia coli* (65), *Salmonella* spp. (6), *Shigella* spp. (2), *Yersinia enterocolitica* (1), *Acinetobacter* spp. (4), *Proteus* spp. (7), *Pseudomonas aeruginosa* (59), *Stenotrophomonas maltophilia* (4), *Candida* spp. (10) und *Aspergillus* spp. (7). Die Empfindlichkeit der Testsubstanzen wurde auch gegenüber Sporen von *Bacillus subtilis* und *Bacillus anthracis* untersucht. Für die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) wurde die Mikrodilutionsmethode nach CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) verwendet. Zusätzlich wurde die bakterizide Wirksamkeit von Akacid plus nach einer Expositionszeit von 5 Minuten im Quantitativen Sus-

pensionstest Europäischer Standard EN 1040 gegenüber den Qualitätskontrollstämmen von *S. aureus*, *Enterococcus hirae*, *E. coli* und *P. aeruginosa* untersucht. *In vitro*-Resistenzselektion gegenüber Akacid wurde an 24 verschiedenen Bakterienstämmen durchgeführt. Alle drei Testsubstanzen zeigten höchste antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber *Staphylococcus* und *Bacillus* spp. Höhere MHK-Werte wurden gegenüber Enterokokken, Gram-negativen Bakterien und Pilzen gefunden. MHK₅₀ und MHK₉₀ von Chlorhexidin zeigten einen 4-8-fachen Anstieg für die Methicillinresistenten *S. aureus* im Vergleich zu den Methicillinempfindlichen Stämmen, wohingegen kein Unterschied in den MHK-Werten für Akacid und Akacid plus gegenüber Antibiotikaempfindlichen und multi-resistenten Stämmen gefunden wurde. Bakterizide Wirkung von Akacid plus wurde gegenüber allen getesteten Bakterienspezies bei einer Konzentration $\geq 0,1\%$ beobachtet. Im *In vitro*-Resistenzselektionstest konnte kein Anstieg der MHK-Werte für Akacid in den getesteten Isolaten nach 30 Passagen nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigten Akacid und Akacid plus niedrige akute orale und dermale Toxizität. Aufgrund ihrer breiten antimikrobiellen Eigenschaften und ihres niedrigen Toxizitätsprofils könnten die polymerischen Guanidine Akacid und Akacid plus zukünftig wertvolle Substanzen für die Prophylaxe und Therapie von bakteriellen Infektionen und Pilzinfektionen darstellen.

Key-words:

Biocide, Akacid, Akacid plus, MIC, bactericidal activity, induction of resistance, toxicity

Summary

This paper evaluates the *in vitro* activity of the novel polymeric guanidines, Akacid and its successor Akacid plus, compared to the bisbiguanide chlorhexidine digluconate against a total of 369 clinical isolates from patients with documented infections in hospitals located in Austria, their acute toxicity and the potential for induction of resistance of Akacid. The tested bacterial and fungal strains were: *Staphylococcus aureus* (98), *Staphylococcus epidermidis* (9), *Enterococcus faecalis* (32), *Klebsiella* spp. (45), *Enterobacter* spp. (20), *Escherichia coli* (65), *Salmonella* spp. (6), *Shigella* spp. (2), *Yersinia enterocolitica* (1), *Acinetobacter* spp. (4), *Proteus* spp. (7), *Pseudomonas aeruginosa* (59), *Stenotrophomonas maltophilia* (4), *Candida* spp. (10) and *Aspergillus* spp. (7). The susceptibility of the active substances was also investigated against spores of *Bacillus subtilis* and *Bacillus anthracis*. Determination of minimal inhibitory concentrations (MICs) was performed using the microdilution method according to the CLSI criteria (Clinical and Laboratory Standards Institute). Additionally, the bactericidal activity of Akacid plus was investigated after exposure for 5 minutes against quality control strains of *S. aureus*, *Ent-*

erococcus hirae, *E. coli* and *P. aeruginosa* using the quantitative suspension test European Standard EN 1040. *In vitro* selection of resistance to Akacid was carried out on 24 different bacterial strains. All three active substances were most effective against *Staphylococcus* spp. and *Bacillus* spp. Higher MIC values were detected against *E. faecalis*, gram-negative bacteria and fungi. MIC₅₀ and MIC₉₀

of chlorhexidine showed a 4- to 8-fold increase for methicillin-resistant *S. aureus* in comparison to methicillin-sensitive strains, while MIC values for Akacid and Akacid plus were similar for both antibiotic-sensitive and multi-resistant strains. Bactericidal action of Akacid plus was observed against all tested bacterial species at concentrations of $\geq 0.1\%$. In the *in vitro* selection of resistance test no increase in

MIC values of Akacid in any isolate after 30 passages was detected. Also, Akacid and Akacid plus showed low acute oral and dermal toxicity. Due to their broad antimicrobial properties and low toxicity profile, the polymeric guanidines Akacid and Akacid plus could represent valuable substances for the prophylaxis and treatment of bacterial and fungal infections in the future.

Einleitung

Die polymerischen Guanidine Akacid und sein Nachfolger Akacid plus sind neue Mitglieder der kationischen Familie antimikrobiell wirksamer Substanzen. Sie wurden von der österreichischen Firma POC mit Hauptsitz in Wien entwickelt und sind in der Europäischen Union registriert.

Die Gruppe der kationischen Antiseptika umfasst chemisch sehr unterschiedliche Substanzen, die aber als gemeinsames Charakteristikum stark basische Gruppen, gebunden an ein ziemlich massives lipophiles Molekül, besitzen. Die wichtigsten Vertreter sind unter den Quarternären Ammoniumverbindungen Benzalkoniumchlorid und Cetrimid, unter den Bisbiguaniden Chlorhexidin und Alexidin und unter den polymerischen Biguaniden Polyhexamethylen-Biguanid (PHMB). Die kationisch antimikrobiell wirksamen Substanzen werden seit einem Jahrhundert zur Antisepsis und Desinfektion innerhalb und außerhalb von klinischen Einrichtungen eingesetzt [1-4]. Crawford et al. berechneten jährliche Nettogewinne von durchschnittlich 275 Millionen bis 1,97 Billionen US Dollar durch die Verwendung von Chlorhexidindigluconat im Verbandsmaterial zur Prävention von Katheter-assoziierten Infektionen [5]. Aufgrund ihrer eige-

nen positiv geladenen Moleküle haben die kationisch antimikrobiell wirksamen Substanzen eine hohe Bindungsaffinität an die negativ geladenen Zellwände und Membranen von Bakterien. Durch Störung dieser Angriffspunkte kommt es zunächst zur Herabsetzung der Membranfluidität und zu einer Störung der osmoregulatorischen und physiologischen Zellfunktionen. In weiterer Folge entstehen hydrophile Poren in der Phospholipidmembran, und die Proteinfunktion wird gestört. Das Endergebnis ist eine Lyse der Zielzelle [6]. Dieser Membran-schädigende Wirkmechanismus konnte auch für die polymerischen Guanidine gegenüber *Escherichia coli* demonstriert werden [7].

Akacid, Poly-[2-(2-ethoxy)-ethoxyethyl-guanidinium-chloride], und sein Nachfolger Akacid plus, eine 3:1-Mischung aus Poly-(hexamethylen-guanidinium-chloride) und Poly-[2-(2-ethoxy)-ethoxyethyl-guanidinium-chloride], zeigen hohe Wasserlöslichkeit. Die beiden Substanzen wurden speziell entwickelt, um die antimikrobielle Wirksamkeit dieser Klasse zu verbessern und mit signifikant geringerer Toxizität zu kombinieren.

Ziel dieser Studie war es, die *In vitro*-Aktivität von Akacid und Akacid plus im Vergleich zu dem weit verbreiteten

Chlorhexidin gegenüber 369 verschiedenen klinischen Isolaten von Patienten mit dokumentierten Infektionen in österreichischen Spitälern, deren Toxizität und die Fähigkeit der Resistenzinduktion von Akacid zu evaluieren. Zusätzlich wurde die bakterizide Wirksamkeit von Akacid plus nach einer Expositionszeit von fünf Minuten im Quantitativen Suspensionstest gegenüber den Qualitätskontrollstämmen von *S. aureus*, *Enterococcus hirae*, *E. coli* und *P. aeruginosa* untersucht.

Material und Methoden

Stocklösungen von Akacid und Akacid plus (POC, Austria) als 25%ige wässrige Lösungen und Chlorhexidindigluconat (Sigma, Germany) als 20%ige Lösung wurden in destilliertem Wasser, Müller-Hinton-Bouillon bzw. RPMI 1640-Medium zu den gewünschten Konzentrationen verdünnt. Es wurden 369 klinische Isolate von Patienten mit dokumentierten Infektionen in österreichischen Spitälern getestet. Die Verteilung der Spezies und die Anzahl der Stämme war wie folgt: Methicillin-empfindliche *S. aureus* (MSSA) (36 Stämme), Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) (62 Stämme), Methicillin-resistente *S. epidermidis* (MRSE) (9 Stämme); Vancomycin-empfindliche

Enterococcus faecalis (27 Stämme); Vancomycin-resistente *E. faecalis* (VRE) (5 Stämme); *Klebsiella* spp. (45 Stämme); *Escherichia coli* (65 Stämme), *Salmonella* spp. (6 Stämme), *Shigella* spp. (2 Stämme); *Yersinia enterocolitica* (1 Stamm); *Acinetobacter* spp. (4 Stämme); *Proteus* spp. (7 Stämme); *Pseudomonas aeruginosa* (59 Stämme); *Stenotrophomonas maltophilia* (4 Stämme); *Candida* spp. (10 Stämme); *Aspergillus* spp. (7 Stämme). Zusätzlich wurden auch *Bacillus subtilis* (Sporensuspension für den Hemmstofftest, Merck) und *Bacillus anthracis* CH10 (Anthrax Sporen Merck reg.no. G112/WET/ACT 36/47) getestet.

Für die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) gegenüber Bakterien, Spross- und Schimmelpilzen wurden die Mikrodilutionsmethoden nach CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, früher NCCLS) verwendet [8, 9, 10]. Die Testmedien waren Kationen-angereicherte Müller-Hinton-Bouillon für Bakterien und 3-(N-Morpholino)Propansulfonsäure-gepuffertes 2-fach konzentriertes RPMI 1640-Medium mit Glutamin und 2% Glukose für Pilze. Es wurde ein Testinokulum von 5×10^5 Kolonie-bildenden Einheiten (KBE)/ml für Bakterien, ein Inokulum von $0,5 - 2,5 \times 10^3$ Blastosporen/ml für Sprosspilze und ein Inokulum von $1 - 5 \times 10^4$ Konidien/ml für Schimmelpilze verwendet. Mikrodilutionsplatten wurden bei 35°C für 24 Stunden (für Bakterien) bzw. für 48 Stunden (für Pilze) inkubiert. Die niedrigste Biozidkonzentration, bei der kein mikrobielles Wachstum sichtbar war, wurde als MHK definiert.

Killing-Kurven von Akacid für *S. aureus* ATCC 29213 und *E. coli* ATCC 35218 (Inokulum 10^6 KBE/ml)

wurden erstellt. Konzentrationen von 0,5x, 1x, 2x und 4x MHK wurden im Vergleich einer Biozid-freien Kontrolle getestet und die Lebendkeimzahl wurde zum Zeitpunkt 0, nach 5 min, 30 min, 2 h, 6 h und 24 h ermittelt. Drei unabhängige Experimente wurden pro Stamm durchgeführt.

Die bakterizide Wirksamkeit von 0,01, 0,1, 0,25 und 0,5% Akacid plus wurde im Quantitativen Suspensions-test Europäischer Standard EN 1040 [11] gegenüber *S. aureus* ATCC 6538, *E. hirae* ATCC 10541, *E. coli* ATCC 10536 und *P. aeruginosa* ATCC 15442 bestimmt. Zu 1 ml destilliertem Wasser und 1 ml Keimsuspension ($1,5 - 5 \times 10^8$ KBE/ml) wurden 8 ml Testsubstanz hinzugefügt. Nach einer Einwirkzeit von 5 Minuten bei 20°C wurde 1 ml Testlösung zu 8 ml Neutralisierungslösung (Natriumtryptonlösung ergänzt mit 3% Saponin, 3% Polysorbat 80, 0,1% Histidin und 0,1% Cystein) und 1 ml destilliertem Wasser übertragen. Nach weiteren 5 Minuten wurde 1 ml der neutralisierten Mischung in leere Petrischalen pipettiert und von 15 ml geschmolzenen Tryptone-Soja-Agar (TSA), ergänzt mit Neutralizern, wie beschrieben bei Kampf et al. [12], bedeckt. Die TSA-Platten wurden für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Eine Reduktion der Lebendkeimzahl $> 10^5$ KBE/ml wurde als bakterizide Wirksamkeit bezeichnet.

In vitro-Resistenzselektion von Akacid wurde für 24 Stämme durchgeführt: MSSA (1 Stamm), MRSA (2 Stämme), MRSE (4 Stämme), VRE (5 Stämme), *Klebsiella* spp. (2 Stämme), *E. coli* (3 empfindliche und 2 ESBL-positive Stämme), *P. aeruginosa* (2 empfindliche und 2 ESBL-positive Stämme) und *Acinetobacter* (2 Stämme). Die *In vitro*-Resistenzselektionsmethode nach Markopoulos et al.

[13] wurde für die Experimente verwendet. 30 Passagen von jedem Testisolat wurden 2-mal durchgeführt. Falls unterschiedliche Ergebnisse gefunden wurden, wurde nur der höhere MHK-Wert als Resultat akzeptiert.

Die Toxizitätsstudien wurden an der Toxikologie der ARC Seibersdorf research GmbH (Seibersdorf, Österreich) durchgeführt. Die akute Toxizität nach einer einzigen peroralen Verabreichung an Ratten wurde nach der EU-Methode B.1 tris Akute orale Toxizitätsstudie an Ratten – Acute toxic class method [14] ermittelt. Die Experimente wurden mit einer Dosierung von 200 mg/kg Körpergewicht an 3 Tieren eines Geschlechts gestartet. Aufgrund der Beobachtungen dieser Untersuchungen wurde die 2. Dosis auf 2000 mg Wirkstoff/kg Körpergewicht angehoben. Alle Tiere wurden 2 Wochen lang beobachtet.

Die akuten toxischen Effekte von Akacid und Akacid plus nach einer einmaligen dermalen Applikation wurden anhand der EU-Methode B.3 Akute dermale Toxizität [15] untersucht. Akacid und Akacid plus in einer Dosierung von 2000 mg/kg Körpergewicht wurden 1x für eine Dauer von 24 Stunden auf ein 5×6 cm großes Areal in der dorsalen Thorakalregion von 5 männlichen und 5 weiblichen Ratten verabreicht. Die Tiere wurden abermals für 14 Tage beobachtet.

Um eine mögliche Irritation oder Korrosion von Akacid und Akacid plus nach einer einmaligen Applikation auf die intakte Haut von Kaninchen nachzuweisen, wurde die EU-Methode B.4 Akute Toxizität: Dermale Irritation/Korrosion [16] durchgeführt. 1,5 g der unverdünnten Testsubstanz (25% wässrige Lösung) wurden für 4 Stunden mit der intakten Haut von

3 weiblichen Neuseeland-White-Kaninchen in Kontakt gebracht. Die Haut der Tiere wurde nach 1, 24, 48 und 72 Stunden auf Erythem/Schorf und Ödem sowie auf andere lokale Veränderungen untersucht.

Ergebnisse

Die Resultate der MHK-Testung von Akacid, Akacid plus und Chlorhexidin gegenüber klinisch relevanten Bakterien- und Pilzstämmen sind in den

Tabellen 1-3 dargestellt. Akacid und Akacid plus zeigten hohe antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber Staphylokokken (Tabelle 1) mit MHK-Werten von 0,5 - 8 und 0,06 - 0,5 mg/l, unabhängig von der Empfindlichkeit der Stämme gegenüber Methicillin. MHK₅₀ und MHK₉₀ von Chlorhexidin wiesen einen 4 - 8-fachen Anstieg für MRSA im Vergleich zu Methicillinempfindlichen Stämmen auf. Alle drei kationisch antimikrobiell wirksamen Substanzen erreichten höhere MHK-

Werte gegenüber *E. faecalis* (2 - 64 mg/l), kein Unterschied wurde jedoch für Vancomycin-empfindliche Enterokokken und VRE gefunden. Niedrige MHK-Werte waren ebenso ausreichend, um das Auskeimen der Sporen von *B. subtilis* und *B. anthracis* zu hemmen. Akacid, Akacid plus und Chlorhexidin zeigten geringere Empfindlichkeit für Gram-negative Bakterien und Pilze. MHK-Werte gegenüber Enterobakterien (Tabelle 2) einschließlich *Salmonella* spp., *Shi-*

Tabelle 1: *In vitro*-Aktivität von kationisch antimikrobiell wirksamen Substanzen gegenüber Gram-positiven Bakterien (139 Stämme) und Sporen von *Bacillus* spp. (2 Stämme)

Pathogen (n)	Biozid	MHK (mg/l)		
		Bereich	MHK ₅₀	MHK ₉₀
MSSA (36)	Akacid	2 - 8	4	8
	Akacid plus	0,06 - 0,5	0,125	0,25
	Chlorhexidin	0,06 - 1	0,25	0,5
MRSA (62)	Akacid	2 - 8	4	8
	Akacid plus	0,06 - 0,5	0,125	0,25
	Chlorhexidin	0,5-2	2	2
MRSE (9)	Akacid	0,5 - 2	-	-
	Akacid plus	0,06 - 0,25	-	-
	Chlorhexidin	0,5 - 2	-	-
<i>E. faecalis</i> (27)	Akacid	32 - 64	64	64
	Akacid plus	2 - 16	8	16
	Chlorhexidin	2 - 16	8	8
VRE (5)	Akacid	32 - 64	-	-
	Akacid plus	4 - 16	-	-
	Chlorhexidin	4 - 16	-	-
<i>Bacillus</i> spp. (2)	Akacid	0,5	-	-
	Akacid plus	0,125	-	-
	Chlorhexidin	1	-	-

Tabelle 2: *In vitro*-Aktivität von kationisch antimikrobiell wirksamen Substanzen gegenüber *Enterobacteriaceae* (146 Stämme)

Pathogen (n)	Biozid	MHK (mg/l)		
		Bereich	MHK ₅₀	MHK ₉₀
<i>E. coli</i> (65)	Akacid	8 - 32	16	32
	Akacid plus	1 - 8	2	4
	Chlorhexidin	2 - 8	2	8
<i>Klebsiella</i> spp. (45) ^a	Akacid	8 - 16	16	16
	Akacid plus	1 - 8	2	8
	Chlorhexidin	4 - 32	8	16
<i>Enterobacter</i> spp. (20) ^b	Akacid	16 - 32	16	32
	Akacid plus	1 - 8	2	8
	Chlorhexidin	8 - 32	8	32
<i>Salmonella</i> spp. (6) ^c	Akacid	8 - 16	-	-
	Akacid plus	1 - 2	-	-
	Chlorhexidin	2 - 4	-	-
<i>Shigella</i> spp. (2) ^d	Akacid	16 - 32	-	-
	Akacid plus	2 - 4	-	-
	Chlorhexidin	1 - 2	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> (1)	Akacid	32	-	-
	Akacid plus	2	-	-
	Chlorhexidin	32	-	-
<i>Proteus</i> spp. (7) ^e	Akacid	8 - 128	-	-
	Akacid plus	4 - 32	-	-
	Chlorhexidin	8 - 64	-	-
^a <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i>		^c <i>S. enteritidis</i> , <i>S. typhimurium</i>		^e <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i>
^b <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i>		^d <i>S. sonnei</i> , <i>S. flexneri</i>		

gella spp. und *Y. enterocolitica* lagen im Bereich von 8 - 32 mg/l für Akacid, 1 - 8 mg/l für Akacid plus und 2 - 32 mg/l für Chlorhexidin. Die Testsubstanzen zeigten ähnliche Emp-

findlichkeit gegenüber *Acinetobacter* spp., während höhere MHK-Werte gegenüber *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* und *Proteus* spp. gefunden wurden. Akacid plus erzielte die

höchste antifungale Wirksamkeit gegenüber Pilzstämmen von *Candida* und *Aspergillus* spp., gefolgt von Chlorhexidin und Akacid (Tabelle 3). Alle Testsubstanzen erreichten die

Tabelle 3: *In vitro*-Aktivität von kationisch antimikrobiell wirksamen Substanzen gegenüber Non-Fermentern (67 Stämme) und Pilzen (17 Stämme)

Pathogen (n)	Biozid	MHK (mg/l)		
		Bereich	MHK ₅₀	MHK ₉₀
<i>P. aeruginosa</i> (59)	Akacid	32 - 128	64	64
	Akacid plus	4 - 32	8	32
	Chlorhexidin	8 - 32	16	32
<i>Acinetobacter</i> spp. (4) ^a	Akacid	8 - 32	-	-
	Akacid plus	1 - 8	-	-
	Chlorhexidin	2 - 32	-	-
<i>S. maltophilia</i> (4)	Akacid	128 - 256	-	-
	Akacid plus	8 - 32	-	-
	Chlorhexidin	16 - 32	-	-
<i>Candida</i> spp. (10) ^b	Akacid	0,25 - 64	-	-
	Akacid plus	0,125 - 4	-	-
	Chlorhexidin	1 - 16	-	-
<i>Aspergillus</i> spp. (7) ^c	Akacid	16 - >256	-	-
	Akacid plus	1 - 16	-	-
	Chlorhexidin	8 - 64	-	-

^a *A. baumannii*, *A. iwoffii*
^b *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*
^c *A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*

niedrigsten MHK-Werte gegenüber *Candida tropicalis*, gefolgt von *Aspergillus niger*.

Killing-Kurven für *S. aureus* ATCC 29213 und *E. coli* ATCC 35218 sind in Abbildung 1 dargestellt (unteres Detektionslimit 5×10^1 KBE/ml). Akacid in einer Konzentration $\geq 2 \times$ MHK und $1 \times$ MHK eradizierte *S. aureus* und *E. coli* innerhalb von 2 bzw. 6 Stunden.

Wie in Tabelle 4 gezeigt wird, erreichte 0,1% Akacid plus im Quantitativen

Suspensionstest bakterizide Wirksamkeit (Reduktionsfaktor $>10^5$ KBE/ml) gegenüber Qualitätskontrollstämmen von *S. aureus*, *E. hirae*, *E. coli* und *P. aeruginosa* nach fünf Minuten Expositionszeit.

Der *In vitro*-Resistenzselektionstest von Akacid wurde nicht nur für empfindliche ATCC-Stämme, sondern auch für multi-resistente klinische Gram-positive und Gram-negative Stämme durchgeführt. Es wurde kein Anstieg der MHK-Werte in den getes-

teten Isolaten nach 30 Passagen gefunden (Tabelle 5).

Die mediane lethale Dosis (LD₅₀) von Akacid und Akacid plus im Anschluss an eine einmalige perorale oder dermale Applikation in Ratten war >2000 mg Wirksubstanz/kg Körpergewicht (siehe Tabelle 6). Nach einer einzigen Verabreichung der beiden polymerischen Guanidine auf die intakte Haut von Kaninchen wurden keine allgemeinen sowie lokalen toxischen Effekte an den exponierten Hautstellen beobachtet.

Abbildung 1: Killing-Kurve für Akacid gegenüber *S. aureus* ATCC 29213 (MHK, 4 mg/l) und *E. coli* ATCC 35218 (MHK, 16 mg/l). Die durchschnittliche Lebendkeimzahl (KBE/ml) von *S. aureus* (A) und *E. coli* (B) wurde in Gegenwart von Akacid bei 0,5x, 1x, 2x und 4x MHK nach 5 min, 30 min, 2 h, 6 h und 24 h im Vergleich zu einer Biozid-freien Wachstumskontrolle evaluiert. Dargestellte Werte repräsentieren das arithmetische Mittel \pm 1 Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten.

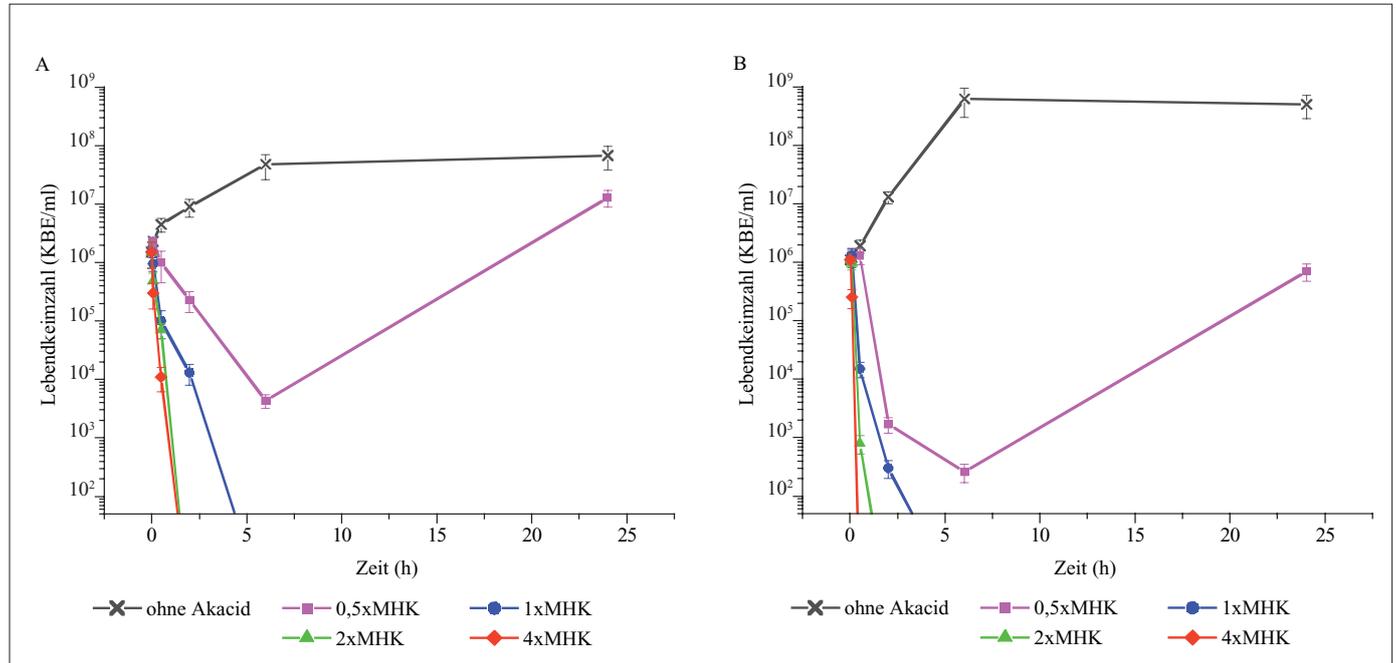


Tabelle 4: Ergebnisse des Quantitativen Suspensionstests EN 1040 von Akacid plus gegenüber *S. aureus*, *E. hirae*, *E. coli* und *P. aeruginosa* nach 5 Minuten Expositionszeit

Pathogen	Inokulum N		Konzentration von Akacid plus in %			
			0,5	0,25	0,1	0,01
<i>S. aureus</i>	$4,1 \times 10^8$	R	$>2,7 \times 10^5$	$>2,7 \times 10^5$	$>2,7 \times 10^5$	$<1,4 \times 10^4$
<i>E. hirae</i>	$3,5 \times 10^8$	R	$>2,3 \times 10^5$	$>2,3 \times 10^5$	$>2,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$
<i>E. coli</i>	$2,5 \times 10^8$	R	$>1,7 \times 10^5$	$>1,7 \times 10^5$	$>1,7 \times 10^5$	$3,5 \times 10^4$
<i>P. aeruginosa</i>	$2,1 \times 10^8$	R	$>1,4 \times 10^5$	$>1,4 \times 10^5$	$>1,4 \times 10^5$	$>1,4 \times 10^5$

N: Lebendkeimzahl in der Inokulumsuspension (KBE/ml)

R: Reduktion der Lebendkeimzahl (KBE/ml)

Diskussion

In Spitals- und Gesundheitseinrichtungen stellen Antiseptika und Desinfektionsmittel ein wesentliches Werkzeug zur Infektionskontrolle und eine bedeutende Hilfe in der Prävention

von nosokomialen Infektionen dar [17]. Aufgrund ihres raschen Wirkungseintritts können Desinfektionsmittel die Ausbreitung von pathogenen Keimen verhindern [18].

Die vorliegende Studie demonstriert das breite antimikrobielle Wirkprofil der neuartigen Biozide Akacid und Akacid plus im Vergleich zu Chlorhexidindigluconat. Die kationisch antimikrobiell wirksamen Substanzen

Tabelle 5: *In vitro*-Resistenzselektion von unterschiedlichen Bakterienstämmen gegenüber Akacid (MHK-Werte sind in mg/l angegeben)

Pathogen (n)	0. Passage	10. Passage	20. Passage	30. Passage
MSSA (1)	2	4	2	2
MRSA (2)	2	2	1 - 2	2
MRSE (2)	0,5	0,5	0,5	0,5
MRSE (2)	2	1 - 2	2	2
VRE (3)	32	32	16 - 32	32
VRE (2)	64	64	64	64
<i>K. pneumoniae</i> (1)	8	16	8	8
<i>K. oxytoca</i> (1)	16	16	16	16
<i>E. coli</i> (1)	8	8	4	8
<i>E. coli</i> (1)	16	16	16	16
<i>E. coli</i> , ESBL-positiv (2)	16	16	16	16
<i>P. aeruginosa</i> , ESBL-positiv (2)	64	64	64	64
<i>P. aeruginosa</i> (1)	32	64	32	32
<i>P. aeruginosa</i> (1)	64	64	64	64
<i>Acinetobacter</i> spp. (2)	8	8	8 - 16	8

zeigten höhere Empfindlichkeit gegenüber Staphylokokken und *Bacillus* spp. als gegenüber *E. faecalis*, Gram-negativen Bakterien und Pilzen. Im Allgemeinen sind Enterokokken weniger empfindlich gegenüber Bioziden als die Staphylokokken, obwohl Unterschiede in den inhibitorischen und bakteriziden Konzentrationen unter den einzelnen Enterokokkenspezies gefunden werden [19]. Frühere Studien von Cookson et al. [20], Irizarry et al. [21] und Suller et al. [22] enthüllten, dass MRSA-Stämme eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Chlorhexidin, Triclosan und quaternären Ammoniumverbin-

dungen aufweisen. Kürzlich entdeckten Schmidt et al. [23] die herabgesetzte Empfindlichkeit von Triclosan speziell gegenüber MRSE. In unserer Studie wurde ein 4-8-facher Anstieg der MHK_{50} und MHK_{90} von Chlorhexidin für MRSA im Vergleich zu Methicillin-empfindlichen Stämmen gefunden, während die MHK-Werte für Akacid und Akacid plus unverändert blieben. Im Gegensatz dazu, erreichten alle drei Testsubstanzen äquivalente MHK-Werte für Vancomycin-empfindliche *E. faecalis* und VRE. Zusätzlich wurde die antifungale Aktivität gegenüber 17 Pilzstämmen untersucht. Akacid plus erreich-

te eindeutig die niedrigsten MHK-Werte gegenüber den getesteten Spross- und Schimmelpilz-Spezies. Alle Testsubstanzen zeigten höchste Wirksamkeit gegenüber *C. tropicalis* gefolgt von *A. niger*. Im Quantitativen Suspensionstest ohne organische Belastung erzielte 0,1% Akacid plus innerhalb von fünf Minuten bakterizide Wirksamkeit gegenüber allen getesteten Bakterienspezies.

Der zunehmende Einsatz von Bioziden hat zur Besorgnis über eine mögliche Resistenzentwicklung auch bei Bioziden geführt. Zahlreiche Studien haben bereits über einen Zusammen-

Tabelle 6: Ergebnisse der akuten oralen und dermalen Toxizitätsstudie von Akacid und Akacid plus an Ratten

Wirkstoff	Applikationsform	Dosis (mg/kg)	Geschlecht	Anzahl der Tiere		LD ₅₀ ^a (mg/kg)
				exponiert	verstorben	
Akacid	oral	200	m	3	0	>2000
			w	3	0	
		2000	m	3	0	
			w	3	1	
	dermal	2000	m	5	0	
			w	5	0	
Akacid plus	oral	200	m	3	0	>2000
			w	3	1	
		2000	m	3	1	
			w	3	1	
	dermal	2000	m	5	0	
			w	5	0	

^a Mediane lethale Dosis

hang zwischen Biozid- und Antibiotikaresistenz berichtet. Block et al. [24] konnten eine Assoziation zwischen der Intensität des Chlorhexidinverbrauchs und einer herabgesetzten Empfindlichkeit gegenüber Mikroorganismen im Spital herstellen. Ebenso haben Lambert et al. [25] eine Korrelation zwischen der Resistenz zu Antibiotika und zu den Bioziden Benzalkoniumchlorid und Chlorhexidin in klinischen Stämmen von *P. aeruginosa* gefunden. Im Gegensatz dazu konnten wir keine bakterielle Resistenz zu Akacid induzieren. Der Kontakt subinhibitorischer Konzentrationen von Akacid resultierte auch nach 30 Passagen in keiner reduzierten Empfindlichkeit gegenüber *Staphylococcus* spp., *E. faecalis*, *Klebsiella* spp., *E. coli*, *P. aeruginosa* und *Acinetobacter* spp.

Bis jetzt gilt es als akzeptierte Tatsache, dass hohe antimikrobielle Aktivität von Bioziden auch mit hoher

Toxizität einhergeht. Die toxikologischen Studien von Akacid und Akacid plus an Ratten und Kaninchen haben eine niedrige akute orale und dermale Toxizität gezeigt (LD₅₀ >2000 mg/kg Körpergewicht).

Aufgrund ihrer breiten antimikrobiellen Eigenschaften und ihres niedrigen Toxizitätsprofils könnten die polymerischen Guanidine Akacid und Akacid plus zukünftig wertvolle Substanzen für die Prophylaxe und Therapie von bakteriellen Infektionen und Pilzinfektionen darstellen.

Literatur:

- Holah J.T., Taylor J.H., Dawson D.J., Hall K.E.: "Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*." Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol. 31 (2002) 111-120.
- Kusnetsov J.M., Tulkki A.I., Ahonen H.E., Martikainen P.J.: "Efficacy of three prevention strategies against legionella in cooling water systems." J. Appl. Microbiol. 82 (1997) 763-768.

- Hibbard J.S.: "Administration of 2% chlorhexidine gluconate in 70% isopropyl alcohol is effective in 30 seconds." Infect. Control Hosp. Epidemiol. 23 (2002) 233-234.

- Gerli S., Rossetti D., Di Renzo G.C.: "A new approach for the treatment of bacterial vaginosis: use of polyhexamethylene biguanide. A prospective, randomized study." Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 7 (2003) 127-130.

- Crawford A.G., Fuhr J.P., Bhaskar R.: "Cost-benefit analysis of chlorhexidine gluconate dressing in the prevention of catheter-related bloodstream infections." Infect. Control Hosp. Epidemiol. 25 (2004) 668-674.

- Gilbert P., Moore L.E.: "Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet." J. Appl. Microbiol. 99 (2005) 703-715.

- Kerschner H.: „Wirkmechanismus von Akacid Forte gegenüber *E. coli*.“ Dissertation, Medizinische Universität Wien (2004).

- National Committee for Clinical Laboratory Standards: "Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically – 6th Edition: Approved Standard M7-A6." NCCLS, Wayne, Pa, USA (2003).

- National Committee for Clinical Laboratory Standards: "Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility

Testing of Yeasts: Approved Standard Second Edition: NCCLS document M27-A2." NCCLS, Wayne, Pa, USA (2002).

10. National Committee for Clinical Laboratory Standards: "Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Conidium-forming Filamentous Fungi. Proposed Standard M38-A." NCCLS, Wayne, Pa, USA (2002).

11. European Committee for Standardization: "European Standard EN 1040: Chemical disinfectants and antiseptics – Basic bactericidal activity – Test method and requirements (phase 1)." CEN, Brussels (1997).

12. Kampf G., Höfer M., Henning R.: "Neutralization of chlorhexidine for *in vitro* testing of disinfectants." Zent. Bl. Hyg. Umweltmed. 200 (1998) 457-464.

13. Markopoulos E., Graninger W., Georgopoulos A.: "*In vitro* selection of resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis* compared with *Staphylococcus epidermidis*." J. Antimicrob. Chemother. 41 (1998) 43-47.

14. European Commission: "EU Method B.1 tris Acute Oral Toxicity - Acute toxic class method." Dir. 2004/73/EC; O.J. L 152 (2004).

15. European Commission: "EU Method B.3 Acute Dermal Toxicity." Dir. 92/69/EEC; O.J. L383 A (1992).

16. European Commission: "EU Method B.4 Acute Toxicity: dermal irritation/corrosion." Dir. 2004/73/EC; O.J. L 152 (2004).

17. Dettenkofer M., Block C.: "Hospital disinfection: efficacy and safety issues." Curr. Opin. Infect. Dis. 18 (2005) 320-325.

18. Cozard A., Jones R.D.: "Disinfection and the prevention of infectious disease." Am. J. Infect. Control 31 (2003) 243-254.

19. McDonnell G., Russell A.D.: "Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance." Clin. Microbiol. Reviews 12 (1999) 147-179.

20. Cookson B.D., Bolton M.C., Platt J.H.: "Chlorhexidine resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* or just an elevated MIC? An *in vitro* and *in vivo* assessment." Antimicrob. Agents Chemother. 35 (1991) 1997-2002.

21. Irizarry L., Merlin T., Rupp J., Griffith J.: "Reduced susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to cetylpyridinium chloride and chlorhexidine." Chemother. 42 (1996) 248-52.

22. Suller M.T., Russell A.D.: "Antibiotic and biocide resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus*." J. Hosp. Infect. 43 (1999) 281-91.

23. Schmid M.B., Kaplan N.: "Reduced triclosan susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*." Antimicrob. Agents Chemother. 48 (2004) 1397-1399.

24. Block C., Furman M.: "Association between intensity of chlorhexidine use and micro-organisms of reduced susceptibility in a hospital environment." J. Hosp. Infect. 51 (2002) 201-206.

25. Lambert R.J., Joyson J., Forbes B.: "The relationships and susceptibilities of some industrial, laboratory and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to some antibiotics and biocides." J. Appl. Microbiol. 91 (2001) 972-984.

Korrespondierender Autor:

Univ.-Prof. DDr. Apostolos Georgopoulos
Univ.-Klinik für Innere Medizin I, Klin. Abt.
für Infektionen und Chemotherapie
A-1090 Wien, Währinger Gürtel 18-20

E-Mail:

apostolos.georgopoulos@meduniwien.ac.at