

---

# Inhalt

22. Jahrgang  
Heft 1/2/2006

---

A. Georgopoulos

## **Vorwort**

C. Kratzer, A. Buxbaum, S. Tobudic, W. Graninger, A. Georgopoulos\*  
Univ.-Klinik für Innere Medizin I, Klin. Abt. für Infektionen und Chemotherapie, MUW  
\* Korrespondierender Autor: Univ.-Prof. DDr. A. Georgopoulos

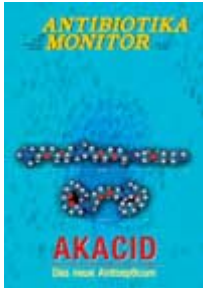
## **Antimikrobielles Wirkprofil der beiden neuen polymerischen Guanidine Akacid und Akacid plus**

Univ.-Klinik für Innere Medizin I, Klin. Abt. für Infektionen und Chemotherapie, MUW  
**Sprosspilze und filamentöse Pilze**

S. Tobudic, C. Kratzer, W. Graninger, A. Georgopoulos\*  
Univ.-Klinik für Innere Medizin I, Klin. Abt. für Infektionen und Chemotherapie, MUW  
\* Korrespondierender Autor: Univ.-Prof. DDr. A. Georgopoulos

## ***In vitro*-Wirksamkeit von Akacid plus gegenüber Spross- und filamentösen Pilzen im Vergleich zu konventionellen Antimykotika und Chlorhexidin**

[zurück zur Übersicht](#)



*Wir leben in der so genannten „Antibiotika-Ära“. Trotz großer Auswahl an Substanzklassen und guter Verträglichkeit ist die Mortalität bei bestimmten Indikationen immer noch sehr hoch. Der vermehrte Einsatz von Antibiotika und ihre oftmals nicht ordnungsgemäße Anwendung führen zu Selektion von vorhandenen Mikroorganismen und zu multiplen Resistenzen.*

*Die Entwicklung und Einführung neuer Substanzen oder gar Substanzklassen ist – wie aus der Literatur hervorgeht – in den letzten 10 Jahren stark rückläufig. Es werden kaum neue Antibiotika entwickelt. Jedoch gelangt eine große Anzahl von Generika zur Anwendung, die zwar möglicherweise nicht immer die erforderlichen Qualitätskriterien erfüllen, aber kostengünstig angeboten werden.*

*Konzepte über Hygienemaßnahmen werden laufend entwickelt und überarbeitet. Es scheint vor allem in großen Spitälern das Managementproblem gegenüber multiresistenten Erregern nicht gelöst zu sein. Es ist daher angebracht, sich hinsichtlich der Prävention von Infektionskrankheiten Gedanken zu machen. Die vorhandenen Antiseptika weisen zwar gute Wirksamkeit auf, führen aber oft zu Unverträglichkeitsreaktionen mit Haut- und Schleimhautirritationen. Um dieses Problem zu lösen, wäre eine Weiterentwicklung von Antiseptika und Desinfektionsmittel von enormer Wichtigkeit.*

*Die Entwicklung von Produkten auf der Grundlage von polymerischen Guanidinen wie z.B. Akacid und Akacid plus, die eine breite Wirksamkeit gegenüber Bakterien, Pilzen und Viren aufweisen und in den nachstehenden Arbeiten vorgestellt werden, dient als Beispiel dafür, dass auch in diesem Feld Produkte entwickelt werden können, die ohne Wirksamkeitsverlust für Menschen und auch Tiere gut verträglich sind.*

*Aufgrund des guten Wirkprofils und vor allem durch die gute Verträglichkeit bietet sich für Akacid in der Zukunft möglicherweise eine breite Anwendung in der Landwirtschaft, Veterinärmedizin, Industrie und Humanmedizin. Eine besondere Bedeutung könnte Akacid als Baustein in der Prävention von Infektionskrankheiten bekommen.*

*Univ.-Prof. DDr. Apostolos Georgopoulos  
Univ.-Klinik für Innere Medizin I,  
Klin. Abt. für Infektionen und Chemotherapie,  
Medizinische Universität Wien*

[zurück zum Inhalt](#)

---

# 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](#)
- [Zusammenfassung](#)
- [Key-words](#)
- [Summary](#)
- [Einleitung](#)
- [Material und Methoden](#)
- [Ergebnisse](#)
- [Diskussion](#)
- [Literatur](#)

---

## 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 Suspensionstest 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. MHK<sub>50</sub> und MHK<sub>90</sub> von Chlorhexidin zeigten einen 4-8-fachen Anstieg für die Methicillin-resistenten *S. aureus* im Vergleich zu den Methicillin-empfindlichen Stämmen, wohingegen kein Unterschied in den MHK-Werten für Akacid und Akacid plus gegenüber Antibiotikaempfindlichen und multiresistenten 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 bisbiguanidechlorhexidine 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*, *Enterococcus 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. MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> 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 eigenen 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 Endresultat 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 geringer 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-fachkonzentriertes RPMI 1640-Medium mit Glutamin und 2% Glukose für Pilze. Es wurde ein Testinokulum von  $5 \times 10^5$  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  $10^5$  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 Suspensionstest 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 – Acutetoxic 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 x 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

MHK-Werte gegenüber *E. faecalis* (2-64 mg/l), kein Unterschied wurde jedoch für Vancomycinempfindliche 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., *Shigella* 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 Empfindlichkeit 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 niedrigsten MHK-Werte gegenüber *Candida tropicalis*, gefolgt von *Aspergillus niger*.

**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	MHK50	MHK90
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	<b>2-8</b>	<b>4</b>	<b>8</b>
	Akacid plus	<b>0,06-0,5</b>	<b>0,125</b>	<b>0,25</b>
	Chlorhexidin	<b>0,5-2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
MRSE (9)	Akacid	<b>0,5-2</b>	-	-
	Akacid plus	<b>0,06-0,25</b>	-	-
	Chlorhexidin	<b>0,5-2</b>	-	-
<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	MHK50	MHK90
<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>		

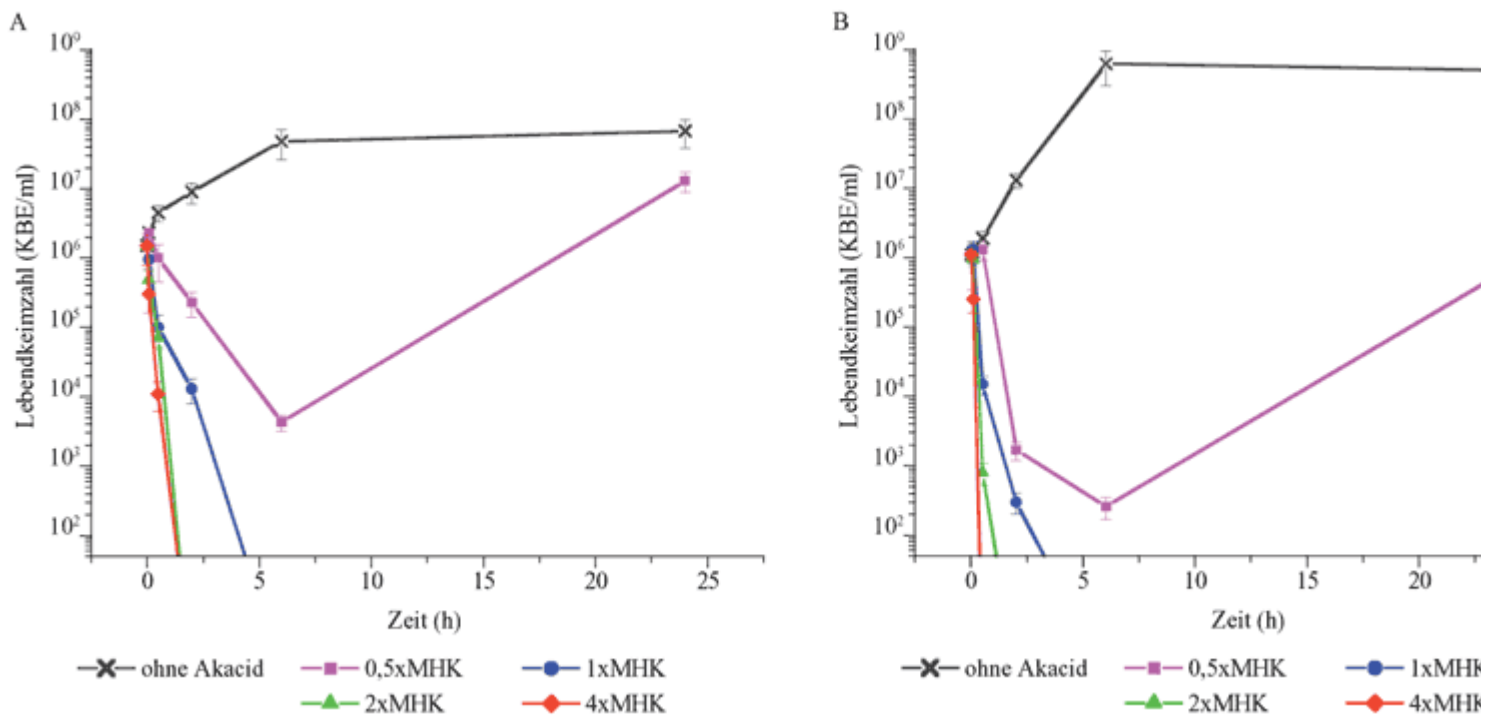
**Tabelle 3:** *In vitro*-Aktivität von kationisch antimikrobiell wirksamen Substanzen gegenüber Non-Fermentern (67 Stämme) und Pilzen (17 Stämme)

Pathogen (n)	Biozid	MHK (mg/l)		
		Bereich	MHK50	MHK90
<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	<b>0,125-4</b>	-	-

	Chlorhexidin	1-16	-	-
c	Akacid	16->256	-	-
	Akacid plus	<b>1-16</b>	-	-
	Chlorhexidin	8-64	-	-
a <i>A. baumannii</i> , <i>A. iwoffii</i> b <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. tropicalis</i> c <i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i>				

Killing-Kurven für *S. aureus* ATCC29213 und *E. coli* ATCC 35218 sind in [Abbildung 1](#) dargestellt (unteres Detektionslimit  $5 \times 10^1$  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.

**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.



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 getesteten 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.

**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>	4,1x10 <sup>8</sup>	R	>2,7x10 <sup>5</sup>	>2,7x10 <sup>5</sup>	>2,7x10 <sup>5</sup>	<1,4x10 <sup>4</sup>
<i>E. hirae</i>	3,5x10 <sup>8</sup>	R	>2,3 x 10 <sup>5</sup>	>2,3x10 <sup>5</sup>	>2,3x10 <sup>5</sup>	2,3x10 <sup>5</sup>
<i>E. coli</i>	2,5x10 <sup>8</sup>	R	>1,7x10 <sup>5</sup>	>1,7x10 <sup>5</sup>	>1,7x10 <sup>5</sup>	3,5x10 <sup>4</sup>
<i>P. aeruginosa</i>	2,1x10 <sup>8</sup>	R	>1,4x10 <sup>5</sup>	>1,4x10 <sup>5</sup>	>1,4x10 <sup>5</sup>	>1,4x10 <sup>5</sup>

N: Lebendkeimzahl in der Inokulumsuspension (KBE/ml)  
R: Reduktion der Lebendkeimzahl (KBE/ml)igatus

**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

**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	
				exponiert	verstorben
Akacid	oral	200	m	3	0
			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
			m	3	1
	dermal	2000	m	5	0

a Mediane lethale Dosis

## 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 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 Ammoniumverbindungen 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<sub>50</sub> und MHK<sub>90</sub> 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 erreichte 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 Zusammenhang 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 (LD<sub>50</sub> > 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:

1. 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.

2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Gilbert P., Moore L.E.: "Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet." J. Appl. Microbiol. 99 (2005) 703-715.
7. Kerschner H.: „Wirkmechanismus von Akacid Forte gegenüber *E. coli*.“ Dissertation, Medizinische Universität Wien (2004).
8. 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).
9. 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* and *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 microorganisms 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](mailto:apostolos.georgopoulos@meduniwien.ac.at)

[zurück zum Inhalt](#)

# Sprosspilze und filamentöse Pilze

## 1. *Candida* spp.

Seite  
ausdruck

KOH-Präparat *C. albicans*

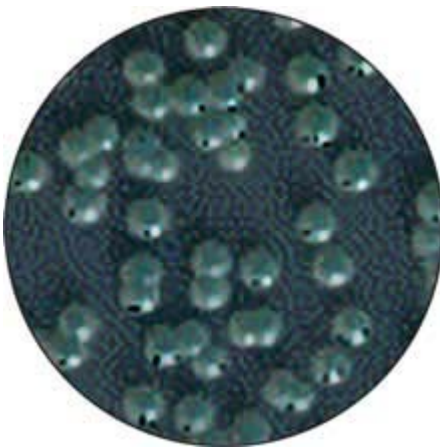


Gram-Präparat *C. albicans*



### *Candida* spp. auf Chromagar

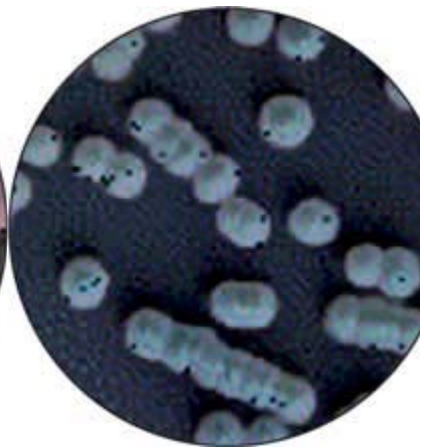
*C. albicans*



*C. krusei*

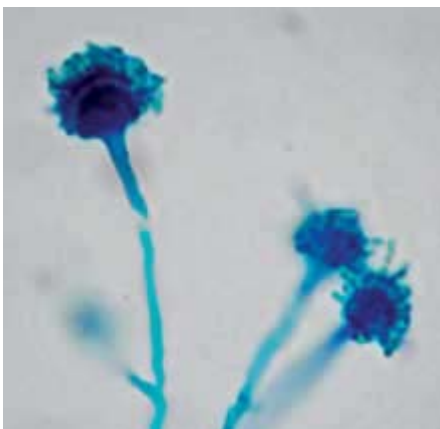


*C. tropicalis*



## 2. Schimmelpilze

*A. fumigatus*



Kultur *A. fumigatus*



Kultur *A. niger*

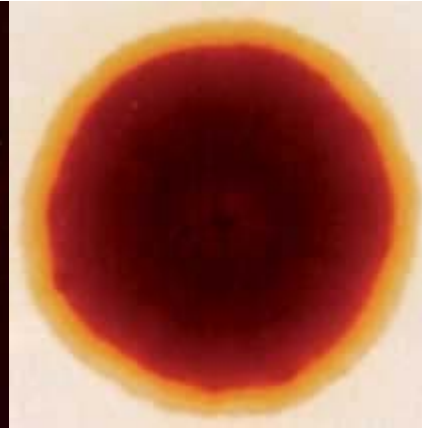
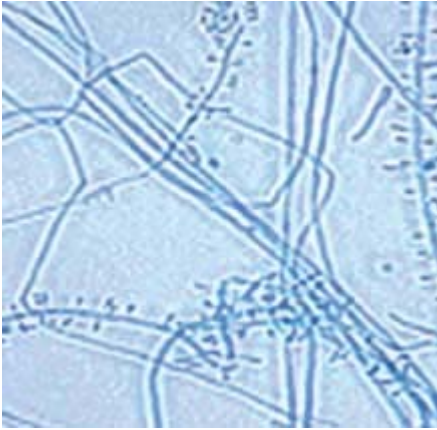


## 3. Dermatophyten

*T. rubrum*

Kulturoberseite

Kulturunterseite



[zurück zum Inhalt](#)

---

# In vitro-Wirksamkeit von Akacid plus gegenüber Spross- und filamentösen Pilzen im Vergleich zu konventionellen Antimykotika und Chlorhexidin

---

S. Tobudic, C. Kratzer, 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](#)
  - [Zusammenfassung](#)
  - [Key-words](#)
  - [Summary](#)
  - [Einleitung](#)
  - [Material und Methode](#)
  - [Ergebnisse](#)
  - [Diskussion](#)
  - [Literatur](#)
- 

## Schlüsselwörter

Pilze, *Candida*, Dermatophyten, Schimmelpilze, MHK, Killing-Kurve, Akacid plus

## Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die *In vitro*-Wirksamkeit des neuartigen polymerischen Guanidins Akacid plus mit konventionellen Antimykotika und Chlorhexidin gegenüber 132 verschiedenen klinischen Pilzisolaten zu vergleichen. Die untersuchten Pilzstämmen waren: *C. albicans* (n=46), *C. glabrata* (n=13), *C. parapsilosis* (n=11), *C. krusei* (n=8), *C. tropicalis* (n=5), *C. guilliermondi* (n=3), *C. pelliculosa* (n=1), *C. pseudotropicalis* (n=1), *C. lusitaniae* (n=1), *C. lipolytica* (n=1), *Trichophyton rubrum* (n=17), *Trichophyton mentagrophytes* (n=5), *Microsporum canis* (n=4), *Trichophyton violaceum* (n=1), *Trichophyton soudanense* (n=1), *Aspergillus fumigatus* (n=5), *Aspergillus flavus* (n=1), *Aspergillus terreus* (n=1), *Acremonium speci* (n=1), *Dermatiaceae* (n=1), *Pencillium purpureescens* (n=2), *Scopulariopsis brevicularis* (n=2) und *Emericella nidulans* (n=1). Für die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) wurde die Mikrodilutionsmethode in RPMI1640 nach CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) verwendet. Zusätzlich wurden Killing-Kurven von Akacid plus gegenüber *C. krusei* ATCC 6258, *C. tropicalis* ATCC 750 und *C. albicans* 4D (Fluconazol-resistentes klinisches Isolat) getestet. Gegenüber allen Stämmen von *Candida* spp. erreichte Akacid plus MHK-Werte im Bereich von 0,03-8 mg/l. MHK<sub>50</sub> und MHK<sub>90</sub> gegenüber *C. albicans* und Non-*albicans* Spezies waren äquivalent und betragen 1 bzw. 4 mg/l. Vergleichbare MHK-Werte wurden für Nystatin, Clotrimazol und Caspofungin gefunden, während Fluconazol und Chlorhexidin mit 32 mg/l eine deutlich höhere MHK<sub>90</sub> erzielten. Akacid plus, Chlorhexidin und Fluconazol erreichten ähnliche MHK-Werte (4-64 mg/l) gegenüber Dermatophyten. Der MHK-Bereich von Akacid plus, Amphotericin B und Voriconazol gegenüber den getesteten Schimmelpilzen betrug 0,25-32 mg/l. Die Ergebnisse der zeitabhängigen Abtötung von *Candida* spp. durch Akacid plus haben eine fungizide Wirksamkeit der untersuchten Substanz bei 1x MHK nach einer Exposition für 5-6 Stunden demonstriert. Aufgrund der vergleichbaren *In vitro*-Wirksamkeit zu konventionellen Antimykotika und Chlorhexidin und der raschen Aktivität gegenüber *Candida* spp. könnte das neue Biozid Akacid plus zukünftig eine wichtige Rolle in der Prophylaxe und Therapie von Pilzinfektionen spielen.

## Key-words

Fungi, *Candida*, Dermatophytes, Moulds, MIC, time-killing-curve, Akacid plus

## Summary

The purpose of this study was to evaluate the *in vitro* activity of Akacid plus, a novel polymeric guanidine, compared to conventional antifungal drugs and chlorhexidine against 132 different fungal isolates. The included clinical strains were: *C. albicans* (n=46), *C. glabrata* (n=13), *C. parapsilosis* (n=11), *C. krusei* (n=8), *C. tropicalis* (n=5), *C. guilliermondi* (n=3), *C. pelliculosa* (n=1), *C. pseudotropicalis* (n=1), *C. lusitaniae* (n=1), *C. lipolytica* (n=1), *Trichophyton rubrum* (n=17), *Trichophyton mentagrophytes* (n=5), *Microsporum canis* (n=4), *Trichophyton violaceum* (n=1), *Trichophyton soudanense* (n=1), *Aspergillus fumigatus* (n=5), *Aspergillus flavus* (n=1), *Aspergillus terreus* (n=1), *Acremonium specii* (n=1), *Dermatiaceae* (n=1), *Penicillium purpurescens* (n=2), *Scopulariopsis brevicularis* (n=2) and *Emericella nidulans* (n=1). *In vitro* susceptibility was evaluated by determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) in RPMI 1640 according to CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) guidelines. Additionally, time killing-curves of Akacid plus were carried out on *C. krusei* ATCC 6258, *C. tropicalis* ATCC 750 and fluconazol-resistant *C. albicans* 4D. MICs of Akacid plus against all strains of *Candida* spp. were in the range of 0,03-8 mg/l. MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> were equivalent against *C. albicans* and non-*albicans* species and reached values of 1 and 4 mg/l. MIC values of Akacid plus were comparable to that of nystatin, clotrimazole and caspofungin, whereas MIC<sub>90</sub> (32 mg/l) of fluconazole and chlorhexidine was significantly higher than for Akacid plus. Akacid plus, chlorhexidine and fluconazole achieved corresponding MIC values (4-64mg/l) against dermatophytes. The MIC range of Akacid plus, amphotericin B and voriconazole against tested moulds was 0.25-32 mg/l. Time-killing curves of Akacid plus against *Candida* spp. demonstrating fungicidal activity were at 1x MIC after exposure for 5-6 hours. Due to its fast fungicidal activity against *Candida* spp. and comparable *in vitro* effectiveness to conventional antifungal drugs and chlorhexidine, the new biocide Akacid plus might play an important role in the prophylaxis and treatment of fungal infections in the future.

---

## Einleitung

Pilze stellen nach *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* und Koagulase-negativen Staphylokokken die fünfthäufigsten pathogenen Krankheitserreger insbesondere bei klinisch kranken Patienten dar [1]. Der Sprosspilz *Candida* spp. ist der häufigste Erreger unter den Pilzen und verursacht ein breites Spektrum an Infektionen, oberflächliche bzw. muko-kutane Candidosen bis hin zu invasiven Candidosen, die verschiedene Organe betreffen können. Obwohl *C. albicans* die am häufigsten isolierte Spezies darstellt, kommen auch Non-*albicans* Spezies immer mehr als Erreger in Frage [2, 3, 4]. Muko-kutane Candidosen werden in erster Linie mit lokalen oder oralen Azolen (Clotrimazol, Fluconazol, Itraconazol) behandelt [4]. Zur Therapie der invasiven Candidosen werden Fluconazol, Voriconazol, Caspofungin oder Amphotericin B eingesetzt [5].

2-5% aller invasiven Pilzinfektionen werden durch *Aspergillus*-Spezies, zumeist *A. fumigatus*, seltener durch *A. flavus*, *A. niger* oder *A. terreus*, verursacht [6]. Die wichtigsten durch Aspergillen verursachten Infektionen sind die invasive pulmonale Aspergillose, die allergische bronchopulmonale Aspergillose, das Aspergillom, die Mykotoxikose und die Aspergillus-Tracheobronchitis. Die häufigste Form, die invasive pulmonale Aspergillose, wird typischerweise bei sehr schwer immunsupprimierten Patienten beobachtet. Zur

Behandlung können Voriconazol, liposomales oder konventionelles Amphotericin B, Itraconazol oder Caspofungin eingesetzt werden [7].

Dermatophyten sind eine spezielle Gruppe von filamentösen Pilzen, die durch Invasion der Keratinozyten bei Menschen und Tieren eine oberflächliche Infektion verursachen können. Zur Therapie von Dermatophyteninfektionen werden unter anderem Terbinafin, Clotrimazol, Itraconazol und Fluconazol eingesetzt [8].

Abgesehen von den konventionellen Antimykotika zeigen auch einige andere Substanzklassen, wie z.B. die kationisch antimikrobiell wirksamen Substanzen, eine gute Wirksamkeit gegenüber Pilzen. Diese Substanzen können sowohl in der Prävention (als Antiseptikum) als auch in der Therapie (in lokaler Applikationsform) von Pilzinfektionen eingesetzt werden [9, 10].

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die *In vitro*-Wirksamkeit des polymerischen Guanidins Akacid plus, einem neuartigen Mitglied der kationisch antimikrobiell wirksamen Substanzen, mit dem Bisbiguanid Chlorhexidin, und mit konventionellen Antimykotika gegenüber verschiedenen Spezies von Spross- und filamentösen Pilzen zu vergleichen. Zusätzlich wurden die zeitabhängige fungizide Wirksamkeit von Akacid plus gegenüber verschiedenen *Candida*-Spezies mittels Killing-Kurve und die Resistenzrate von Fluconazol gegenüber *Candida* spp. evaluiert.

## Material und Methode

Insgesamt wurden 90 klinische Isolate von *Candida* spp., 28 klinische Isolate von Dermatophyten und 14 Schimmelpilzisolatete getestet. Von 2004 bis 2005 wurden Sprosspilz- und Dermatophytenisolatete von Patienten mit Hautinfektionen an der Dermatologie im AKH Wien gesammelt und unserer Abteilung zur Verfügung gestellt.

Die getesteten Hautisolatete waren: *C. albicans* (46 Stämme), *C. glabrata* (13 Stämme), *C. parapsilosis* (11 Stämme), *C. krusei* (8 Stämme), *C. tropicalis* (5 Stämme), *C. guilliermond* (3 Stämme), *C. pelliculosa* (1 Stamm), *C. pseudotropicalis* (1 Stamm), *C. lusitaniae* (1 Stamm), *C. lipolytica* (1 Stamm), *Trichophyton rubrum* (17 Stämme), *Trichophyton mentagrophytes* (5 Stämme), *Microsporum canis* (4 Stämme), *Trichophyton violaceum* (1 Stamm) und *Trichophyton soudanense* (1 Stamm). Die Isolate von Schimmelpilzen wurden aus verschiedenen klinischen Materialien isoliert und gehörten zu folgenden Spezies: *Aspergillus fumigatus* (5 Stämme), *Aspergillus flavus* (1 Stamm), *Aspergillus terreus* (1 Stamm), *Acremonium specii* (1 Stamm), *Dermatiaceae* (1 Stamm), *Penicillium purpureescens* (2 Stämme), *Scopulariopsis brevicularis* (2 Stämme), *Emericella nidulans* (1 Stamm).

Die Stocklösungen von Akacid plus (POC, Austria) und von Chlorhexidindigluconat (Sigma, Germany), als 25- und 20%ige wässrige Lösungen, wurden mit destilliertem Wasser und RPMI 1640 zu den gewünschten Konzentrationen verdünnt. Amphotericin B, Fluconazol, Clotrimazol, Nystatin, Caspofungin und Voriconazol wurden als Referenzsubstanzen ausgewählt und wurden nach den jeweiligen Vorschriften des Herstellers in Dimethylsulfoxid bzw. in destilliertem Wasser gelöst.

Für die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) wurde die Mikrodilutionsmethode in 2-fach konzentriertem RPMI 1640-Medium mit Glutamin und mit 2% Glukose nach CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute, früher NCCLS) M27-A2 [11] für *Candida* spp. und M38-A für Schimmelpilze [12] verwendet. Für Dermatophyten wurde eine modifizierte Methode des Standards M38-A durchgeführt [8]. Die

Inokulumgröße war  $0,5 \times 10^3$ - $2,5 \times 10^3$  Kolonie-bildende Einheiten (KBE)/ml für *Candida* und  $0,5 \times 10^4$ - $5 \times 10^4$  Konidien/ml für Fadenpilze. Die Endkonzentration aller getesteten Substanzen reichte von 0,007 bis 256 mg/l. Antimykotikum- und Inokulum-freie Kontrollen wurden inkludiert. Die Mikrotiterplatten wurden bei 35°C für 48 Stunden für *Candida* spp. und Schimmelpilze und bei 28°C für 7 Tage für Dermatophyten inkubiert. Die MHK der Azole wurde definiert als die niedrigste Konzentration, die eine auffallende Reduktion der Trübung im Vergleich zur Wachstumskontrolle erzielte (50% Wachstumshemmung). Für alle anderen Testsubstanzen wurde die MHK als die niedrigste Konzentration definiert, die in einer totalen Wachstumshemmung resultierte (100% Wachstumshemmung). Bei jedem Testansatz wurden zur Qualitätskontrolle *C. krusei* ATCC 6258 und *C. tropicalis* ATCC750 mitgeführt.

Killing-Kurven von Akacid plus wurden gegenüber *C. krusei* ATCC 6258, *C. tropicalis* ATCC 750 und *C. albicans* 4D, ein Fluconazol-resistentes klinisches Isolat, in RPMI 1640 nach der Methode von Karlowky et al. erstellt [13]. Die Sprosspilze wurden auf Sabouraud-Dextrose-Agar-Platten subkultiviert. Von der Platte wurden 2-3 Kolonien in 20 ml RPMI 1640-Medium inokuliert. Die Pilzsuspension wurde unter Schütteln bei 37°C für 16 Stunden inkubiert. Zu 1 ml Pilzsuspension ( $10^7$  KBE/ml) wurden entweder 9 ml Biozid-freies RPMI 1640-Medium (Wachstumskontrolle) oder 9 ml Akacid plus in RPMI in den Endkonzentrationen von 0,5x, 1x, 2x, 4x, 8x MHK hinzugefügt und bei 37°C für 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 24 und 48 Stunden inkubiert. Danach wurden jeweils 20 µl Suspension entnommen und in 10er Schritten in Sabouraud-Glucose-Bouillon verdünnt und auf Sabouraud-Dextrose-Agar-Platten getropft. Die Platten wurden bei 37°C für 48 Stunden inkubiert und die Anzahl der lebensfähigen Pilzkolonien wurde bestimmt. Drei unabhängige Testungen wurden für jeden Stamm durchgeführt und Killing-Kurven wurden mit der Darstellung von Mittelwerten  $\log_{10}$  KBE/ml in Abhängigkeit von der Zeit konstruiert.

## Ergebnisse

Die Ergebnisse der MHK-Bestimmung sind in den [Tabellen 1-3](#) und in den [Abbildungen 1-4](#) dargestellt. Gegenüber allen getesteten Stämmen von *Candida* spp. erreichte Akacid plus MHK-Werte im Bereich von 0,03 und 8 mg/l. Vergleichbare MHK-Werte wurden für Nystatin, Clotrimazol und Caspofungin gefunden, während Fluconazol und Chlorhexidin mit 32 mg/l eine deutlich höhere MHK<sub>90</sub> erzielten ([Tabelle 1](#), [Abbildung 1-4](#)). Die MHK<sub>50</sub>- und MHK<sub>90</sub>-Werte von Akacid plus gegenüber *C. albicans*- und Non-*albicans*-Spezies waren äquivalent und betragen 1 bzw. 4 mg/l. 15,3% der *C. albicans*-Stämme und 4,5% aller Non-*albicans*-Stämme waren resistent gegenüber Fluconazol (MHK >64 mg/l). 43,1% der Non-*albicans*-Stämme zeigten ebenso nur eine dosisabhängige Empfindlichkeit gegenüber Fluconazol (MHK 16-32 mg/l). Akacid plus, Chlorhexidin und Fluconazol erreichten ähnliche *In vitro*-Wirksamkeit (MHK 4-64 mg/l) gegenüber Dermatophyten. Clotrimazol zeigte die höchste Empfindlichkeit gegenüber Dermatophyten mit MHK-Werten von 0,06-0,5 mg/l ([Tabelle 2](#), [Abbildung 5](#)). Der MHK-Bereich von Akacid plus, Amphotericin B und Voriconazol gegenüber den getesteten Schimmelpilzen betrug 0,25-32 mg/l, höhere MHK-Werte 16->256 mg/l wurden für Caspofungin bestimmt. Die MHK<sub>90</sub> von Akacid plus gegenüber *Aspergillus* spp. war 16 mg/l und die von Amphotericin B und Voriconazol 8 mg/l ([Tabelle 3](#), [Abbildung 6](#)).

Killing-Kurven für *C. krusei* ATCC6258, *C. tropicalis* ATCC 750 und *C. albicans* 4D wurden erstellt. Die Ergebnisse der zeitabhängigen Abtötung des Fluconazol-resistenten Stamms *C. albicans* 4D durch Akacid plus sind in [Abbildung 7](#) dargestellt. Akacid plus in einer Konzentration  $\geq 1x$  MHK führte zu einer Abtötung von *Candida* spp. nach einer Exposition

von 5-6 Stunden bei 37°C.

**Tabelle 1:** *In vitro*-Aktivität von Akacid plus, Chlorhexidin und konventionellen Antimykotika gegenüber *Candida* spp. insgesamt ( $\Sigma$ ) bzw. getrennt für *C. albicans* und Non-*albicans*-Spezies (n).

Pathogen ( $\Sigma$ /n)	Wirksubstanz	MHK (mg/l)		
		MHK-Bereich	MHK50	MHK90
Candida spp. ( $\Sigma$ =90)	Akacid plus	0,03-8	1	4
	Nystatin	1-4	2	4
	Clotrimazol	0,03-8	0,125	1
	Fluconazol	0,125-256	2	32
	Caspofungin	0,06-4	0,5	2
	Chlorhexidin	8-64	16	32
<i>C. albicans</i> (n=46)	Akacid plus	0,5-8	1	4
	Nystatin	1-4	2	2
	Clotrimazol	0,03-8	0,125	0,5
	Fluconazol	0,25-256	1	64
	Caspofungin	0,06-2	0,125	0,25
	Chlorhexidin	8-32	16	32
Non- <i>albicans</i> -Spezies (n=44)	Akacid plus	0,03-4	1	4
	Nystatin	1-4	4	4
	Clotrimazol	0,03-1	0,125	1
	Fluconazol	0,125-256	4	32
	Caspofungin	0,5-4	2	4
	Chlorhexidin	4-64	16	64

**Tabelle 2:** *In vitro*-Aktivität von Akacid plus, Chlorhexidin, Fluconazol und Clotrimazol gegenüber Dermatophyten insgesamt ( $\Sigma$ ) bzw. getrennt für *T. rubrum* und Non-*rubrum*-Spezies (n).

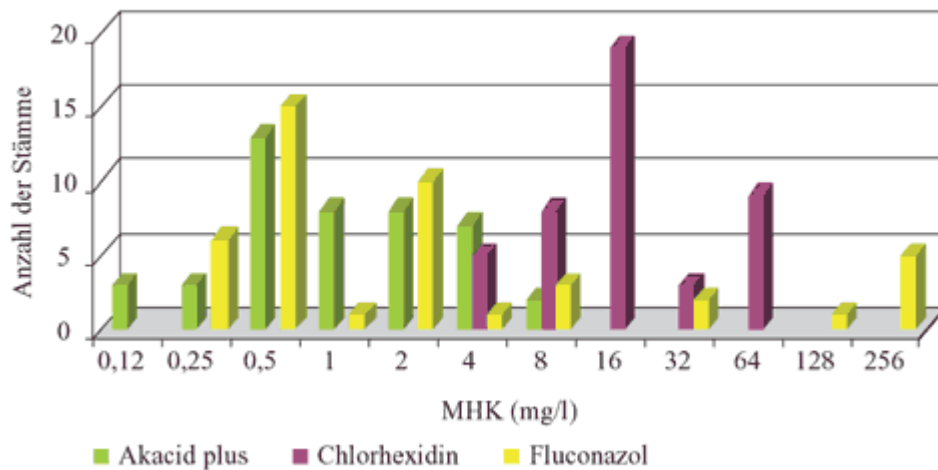
Pathogen ( $\Sigma$ /n)	Wirksubstanz	MHK (mg/l)		
		MHK-Bereich	MHK50	MHK90
Dermatophyten ( $\Sigma$ =28)	Akacid plus	16-32	16	32
	Chlorhexidin	16-32	32	32
	Fluconazol	4-64	16	64
	Clotrimazol	0,06-0,5	0,125	0,5
<i>T. rubrum</i> (n=17)	Akacid plus	8-32	16	32
	Chlorhexidin	16-32	32	32
	Fluconazol	4-64	4	32
	Clotrimazol	0,125-0,5	0,5	0,5
Non- <i>rubrum</i> (n=11)	Akacid plus	16-32	16	32
	Chlorhexidin	16-32	16	32

	Fluconazol	16-64	16	64
	Clotrimazol	0,06-0,125	0,06	0,125

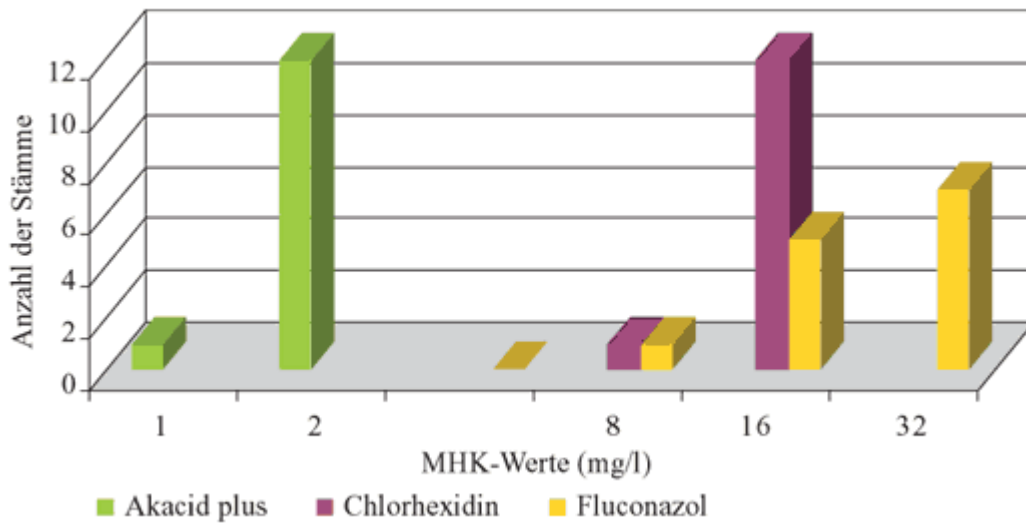
**Tabelle 3:** *In vitro*-Aktivität von Akacid plus, Amphotericin B, Voriconazol und Caspofungin gegenüber Schimmelpilzen insgesamt ( $\Sigma$ ) bzw. getrennt für *Aspergillus* und Non-*Aspergillus*-Spezies (n)

Pathogen ( $\Sigma$ /n)	Wirksubstanz	MHK (mg/l)		
		MHK-Bereich	MHK <sub>50</sub>	MHK <sub>90</sub>
Schimmelpilze ( $\Sigma=14$ )	Akacid plus	0,25-16	4	16
	Amphotericin B	1-16	4	8
	Voriconazol	0,25-32	1	8
	Caspofungin	16->256	128	256
<i>Aspergillus</i> spp. (n=7)	Akacid plus	2-16	8	16
	Amphotericin B	1-8	4	8
	Voriconazol	0,5-8	8	8
	Caspofungin	16->256	128	256
Andere Schimmelpilze (n=7)	Akacid plus	0,25-16	1	8
	Amphotericin B	1-16	4	8
	Voriconazol	0,25-32	0,5	1
	Caspofungin	16->256	128	256

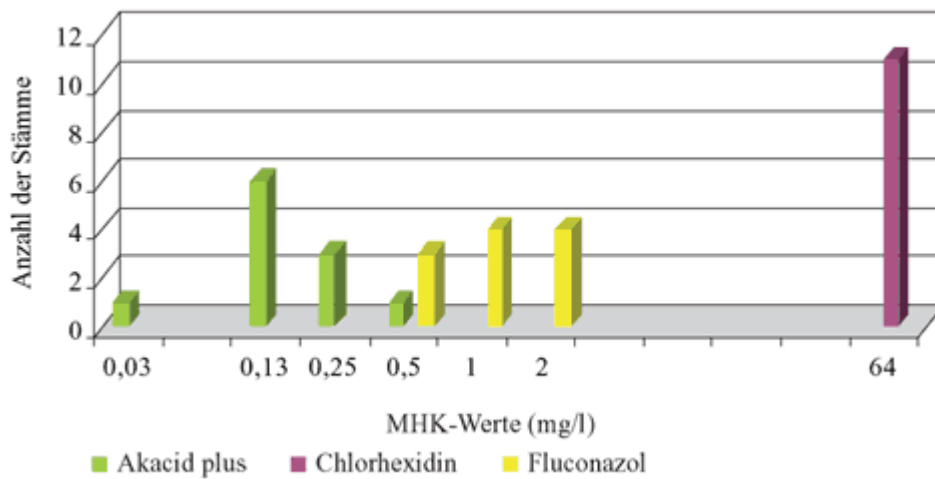
**Abbildung 1:** Verteilung der MHK-Werte von Akacid plus, Chlorhexidin und Fluconazol gegenüber *C. albicans* (n=46)



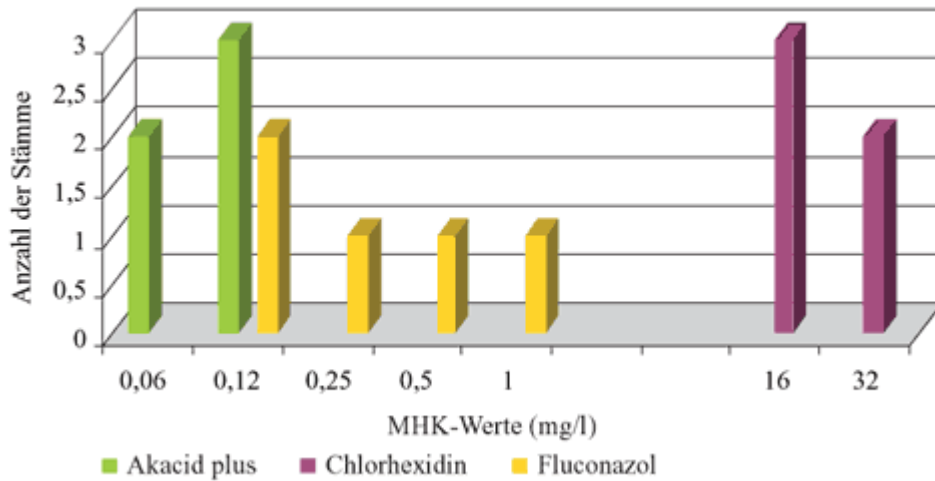
**Abbildung 2:** Verteilung der MHK-Werte von Akacid plus, Chlorhexidin und Fluconazol gegenüber *C. glabrata* (n=13)



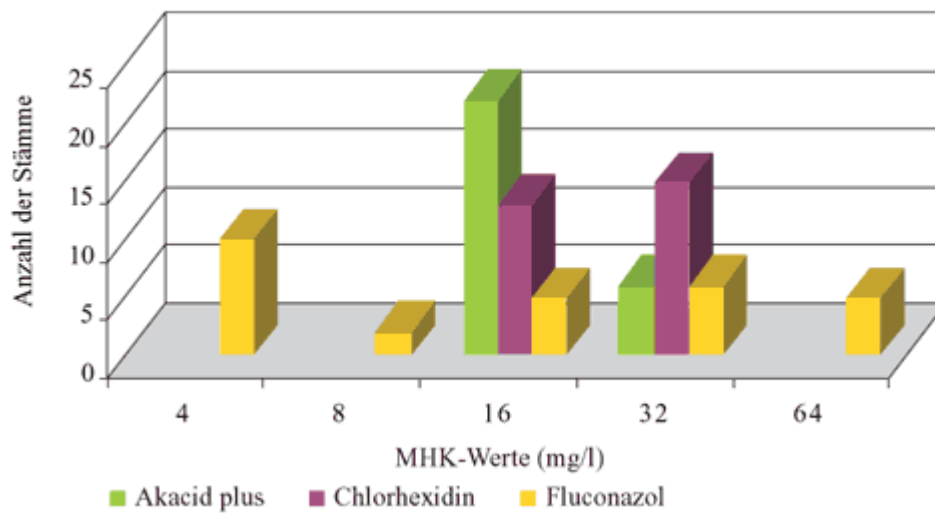
**Abbildung 3:** Verteilung der MHK-Werte von Akacid plus, Chlorhexidin und Fluconazol gegenüber *C. parapsilosis* (n=11)



**Abbildung 4:** Verteilung der MHK-Werte von Akacid plus, Chlorhexidin und Fluconazol gegenüber *C. tropicalis* (n=5)



**Abbildung 5:** Verteilung der MHK-Werte von Akacid plus, Chlorhexidin und Fluconazol gegenüber Dermatophyten (n=28)



**Abbildung 6:** Verteilung der MHK-Werte von Akacid plus, Chlorhexidin und Fluconazol gegenüber Schimmelpilzen (n=14)

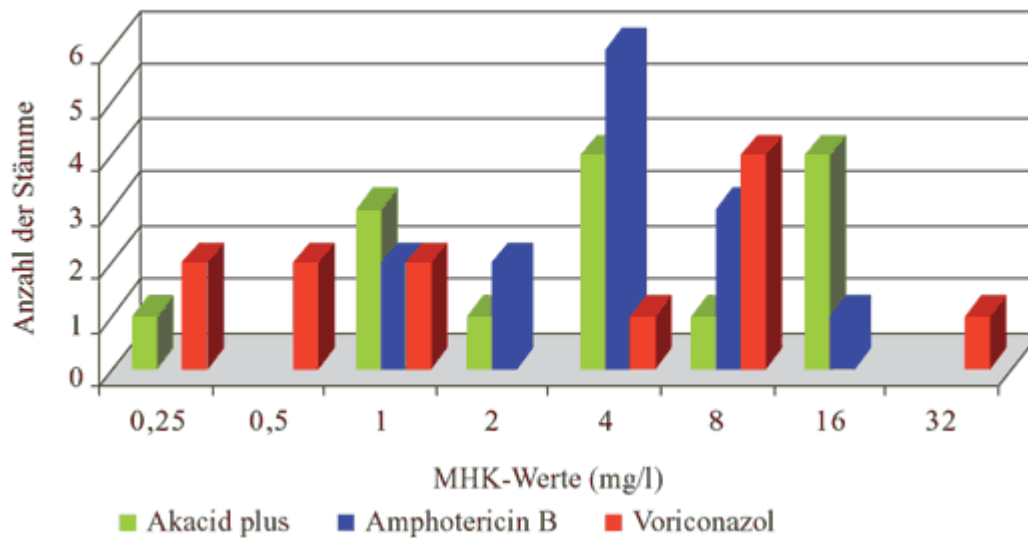
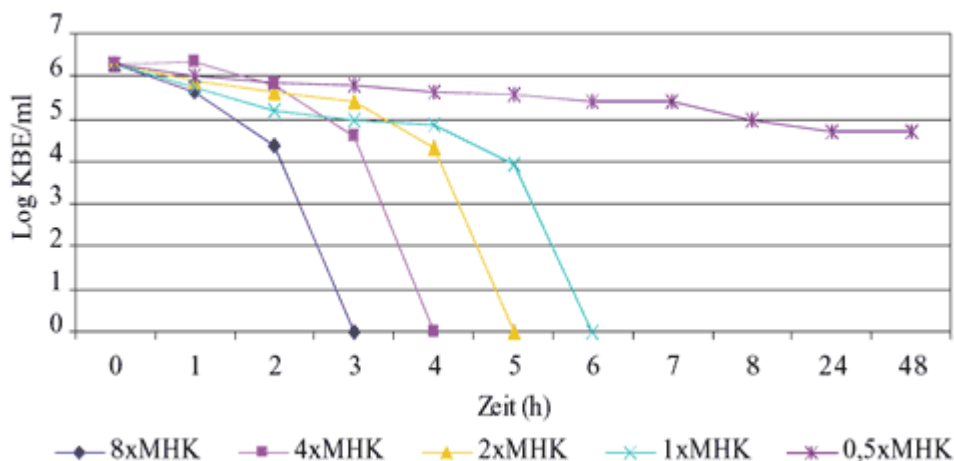


Abbildung 7: Killing-Kurve von Akacid plus gegenüber *C. albicans* 4D



## Diskussion

Der weltweite Gebrauch von Fluconazol hatte eine Resistenzentwicklung gegenüber *C. krusei* und *C. glabrata* zur Folge [14]. Obwohl *C. albicans* gegenüber den konventionellen Antimykotika meistens empfindlich ist, wurde auch bei dieser Spezies eine Resistenzentwicklung gegenüber Azolen bei HIV-Patienten mit oropharyngealen Candidosen und bei klinisch schwer kranken Patienten mit invasiven Candidosen sowie bei Gesunden beschrieben [15, 16]. Außerdem wurde bereits eine Resistenzentwicklung bei *C. tropicalis* gegenüber Fluconazol [17] sowie eine deutlich verminderte Empfindlichkeit von Amphotericin B gegenüber *C. glabrata*, *C. krusei* und *C. lusitanae* berichtet [4]. Gleichzeitig steigt die Anzahl von Pilzinfektionen stetig an, sodass eine Entwicklung neuer antifungaler Substanzen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen erforderlich wird. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Vergleich von Akacid plus zu konventionellen Antimykotika und Chlorhexidin gezogen. Akacid plus zeigte sowohl ähnliche *In vitro*-Wirksamkeit gegenüber *Candida* spp. als auch gegenüber den Fadenpilzen (Dermatophyten und Schimmelpilzen).

10% der getesteten *Candida* spp. waren resistent und 21,1% waren dosisabhängig empfindlich gegenüber Fluconazol. Hohe MHK-Werte von Caspofungin wurden gegenüber Schimmelpilzen gefunden, jedoch haben *In vivo*-Ergebnisse gegenüber *Aspergillus* spp. in der Vergangenheit gezeigt, dass zur Evaluierung der *In vitro*-Ergebnisse besser die minimale effektive Konzentration (MEK) statt der MHK bestimmt werden sollte. Die MEK wird als die niedrigste Konzentration definiert, die einen morphologischen Effekt an den Zellmembranen von Pilzen produziert [18]. Für die anderen konventionellen Antimykotika konnte eine Übereinstimmung zwischen den *In vitro*-Ergebnissen und der *In vivo*-Wirksamkeit bestätigt werden [4, 7]. Frühere *In vitro*-Studien an Akacid plus haben die fungizide Wirksamkeit der neuen Substanz im quantitativen Suspensionstest mit und ohne organische Belastung gegenüber den Qualitätskontrollstämmen von *C. albicans* ATCC 10231 und *A. niger* ATCC 16404 demonstriert [19]. In dieser Studie konnte eine Abtötung von *Candida* spp. bei 1x MHK nach einer Exposition von nur 5-6 Stunden gezeigt werden. Aufgrund der vergleichbaren *In vitro*-Wirksamkeit zu konventionellen Antimykotika und Chlorhexidin und der raschen Aktivität gegenüber *Candida* spp. könnte das neue Biozid Akacid plus zukünftig eine wichtige Rolle in der Prophylaxe und Therapie von Pilzinfektionen spielen.

## Literatur:

1. Vincent J.L., Bihari D.J., Suter P.M., et al.: "The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European prevalence of infection in intensive care (EPIC) study. EPIC international advisory committee." JAMA 274 (1995) 639-644.
2. Pfaller M.A., Jones R.N., Edmond M.B., Wenzel R.P.: "National surveillance of nosocomial blood stream infection due to species of *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE programme." Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 30 (1998) 121-129.
3. Goswami D., Goswami R., Banerjee U., Dadhwal V., Miglani S., Latiff A., Kochupillai N.: "Pattern of *Candida* species isolated from patients with diabetes mellitus and vulvovaginal candidiasis and their response to single dose oral fluconazole." J. Infect. 52(2006) 111-117.
4. Pappas P.G., Rex J.H., Sobel D., et al.: "Guidelines for treatment of candidiasis." J. Infect. Dis. 38 (2004) 161-189.
5. Sims C.R., Ostrosky-Zeichner L., Rex J.H.: "Invasive candidiasis in immuno-compromized hospitalized patients." Arch. Med. Res. 36 (2005) 660-671.
6. Kontoliannis D.B., Bodey G.B.: "Invasive aspergillosis in 2002: an update." Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 21 (2002) 161-172.
7. Stevens D.A., Kan V.L., Judson M.A., et al.: "Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*." Clin. Infect. Dis. 30 (2000) 696-709.
8. Fernandez-Torres B., Carrillo A.J., Martin E., et al.: "*In vitro* activities of 10 antifungal drugs against 508 dermatophyte strains." Antimicrob. Agents Chemother. 45(2001) 2524-2528.
9. Imbert C., Lassy E., Daniault G., Jacquemin J.L., Rodier M.H.: "Treatment of plastic and extracellular matrix components with chlorhexidine or benzalkonium chloride: effect on *Candida albicans* adherence capacity *in vitro*." J. Antimicrob. Chemother. 51 (2003) 281-287.
10. Molteni B., D'Antuono A., Bandini P., et al.: "Efficacy and tolerability of a new chlorhexidine-based vaginal gel in vaginal infections." Curr. Med. Res. Opin. 20 (2004) 849-853.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard M27-A2. NCCLS, Wayne, PA (2002).
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved Standard M38-A. NCCLS, Wayne, PA (2002).
13. Karlowsky J.N., Harding G.A.J., Zelenitsky S.A., et al.: "*In vitro* kill curves of a new semisynthetic

echinocandin, LY-303366, against fluconazole-sensitive and -resistant *Candida* species.”  
Antimicrob. Agents Chemother. 41 (1997) 2576-2578.

14. Rex J.H., Rinaldi M.G., Pfaller M.A.: “Resistance of *Candida* Species to fluconazole.” Antimicrob. Agents Chemother. 39(1995) 1-8.

15. Marr K.A., White T.C., Burik J.A.H., Bowden R.A.: “Development of fluconazole resistance in *Candida albicans* causing disseminated infection in a patient undergoing marrow transplantation.” Clin. Infect. Dis. 25 (1997) 908-910.

16. Xu J.G., Ramos A.R., Vilgalys R., Mitchell T.G.: “Clonal and spontaneous origins of fluconazole resistance in *Candida albicans*.” J. Clin. Microbiol. 38 (2000) 1214-1220.

17. Barchiesi F., Calabrese D., Sanglard D., et al.: “Experimental induction of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* ATCC750.” Antimicrob. Agents Chemother. 44(2000) 1578-1584.

18. Kurtz M.B., Heath I.B., Marrinan J., Dreikorn S., Onishi J., Douglas C.: “Morphological effects of lipopeptides against *Aspergillus fumigatus* correlate with activities against (1,3)-Beta D-glucan synthesis.” Antimicrob. Agents Chemother. 38 (1994) 1480-1489.

19. Kratzer C., Tobudic S., Graninger W., Buxbaum A., Georgopoulos A.: “*In vitro* antimicrobial activity of the novel polymeric guanidine Akacid plus.” J. Hosp. Infect. (2006), in press.

**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](mailto:apostolos.georgopoulos@meduniwien.ac.at)

[zurück zum Inhalt](#)