Aus dem Institut für Hygiene und Umweltmedizin
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. habil. Axel Kramer)
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Untersuchungen zur Neutralisierung der antiseptischen Wirkstoffe Chlorhexidindigluconat, Octenidindihydrochlorid und Polyhexamethylenbiguanidinhydrochlorid als Voraussetzung für die Bestimmung der antiseptischen Wirksamkeit in vitro

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2012

vorgelegt von: Joseph Khalil
geboren am: 05.02.1982
in: Harajel (Libanon)

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reiner Biffar

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Axel Kramer

2. Gutachter: Prof. Dr. P. Heeg

3. Gutachter:

Tag der Disputation: 28. Mai. 2013

Ort, Raum: Martin Luther Str.6, Institut für Medizinische Mikrobiologie

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AKZ	Ausgangskoloniezahl
Aqua	Deionisiertes, pyrogenfreies Wasser
ATCC	American Type Culture Collection
CASO-Agar	Casein-Sojamehl-Pepton-Agar (=TSA oder CSA)
CEN	Comité Européen de Normalisation
CFU	Colony-Forming Unit
Ch.	Chargen-Bezeichnung
CHX	Chlorhexidindigluconat
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Mikrobiologie und Hygiene
DIN	Deutsches Institut für Normung
DM	Desinfektionsmittel
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
EG	Europäische Gemeinschaft
EN	Europäische Norm
EU	Europäische Union
FBS	Fötales Bovines Serum
LCT	Long Chain Tryglycerides
MCT	Medium Chain Tryglycerides
MEM	Minimum Essential Medium
n.b.	nicht bestimmt
NCTC	National Collection of Type Cultures
OCT	Octenidindihydrochlorid
PHMB	Polyhexamethylenbiguanidhydrochlorid
PVP-Iod	Polyvinylpyrrolidon-Iod
QAV	Quartäre Ammoniumverbindungen
RF	Reduktionsfaktor
RKI	Robert Koch-Institut
Tab.	Tabelle
VAH	Verbund für angewandte Hygiene
VE-Wasser	Vollentsalztes (entmineralisiertes) Wasser

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung und Problemstellung 6

1.1 Problemstellung 6

1.2 Kurzcharakteristik der zur Prüfung vorgesehenen Antiseptika und des Neutralisators 8

1.2.1 Chlorhexidindigluconat 8

1.2.2 Octenidindihydrochlorid 8

1.2.3 Polyhexamethylenbiguanidinhydrochlorid 8

1.2.4 Lipofundin MCT 20 % 9

1.3 Wirkungsprüfung von Desinfektionsmitteln und Antiseptika 10

1.3.1 Normen zur Wirksamkeitsprüfung von Desinfektionsmitteln und Antiseptika auf europäischer und nationaler Ebene 10

1.3.2 Testprinzip von Suspensionstests 11

1.3.3 Bedeutung der Ausschaltung der mikrobiostatischen Nachwirkung durch sogenannte Neutralisationstests 11

2. Eigene Untersuchungen 22

2.1 Methode 22

2.1.1 Medien 22

2.1.2 Versuchsdurchführung 24

2.1.3 Durchführung des Neutralisationstests 26

2.2 Ergebnisse 30

2.2.1 Auswertung der Versuche für *Escherichia coli* 30

2.2.2 Auswertung der Versuche für Staphylococcus *aureus* 33

2.2.3 Auswertung der Versuche für *Enterococcus hirae* 36

2.2.4 Auswertung der Versuche für *Pseudomonas aeruginosa* 39

2.2.5 Auswertung der Versuche für *Candida albicans* 42

2.2.6 Maximale zu neutralisierende Wirkstoffkonzentration [%] 45

2.3 Diskussion 46

2.3.1 Methode 46

2.3.2 Ergebnisse 47

3. Schlussfolgerungen und weiterführende Gedanken 49

4. Zusammenfassung 50

5. Summary 51

6. Literaturverzeichnis 52

7. Anhang XIII

A1 Abbildungsverzeichnis XIV

A2 Tabellenverzeichnis XV

Eidesstattliche Erklärung XVI

Lebenslauf XVII

Danksagung XVIII

1. Einleitung und Problemstellung

1.1 Problemstellung

Aufgrund des wissenschaftlichen Fortschritts im Bereich der Desinfektion und Antiseptik konnte ein wesentlicher Beitrag zur Infektionsprävention insbesondere in Bezug auf Health Care assoziierte Infektionen geleistet werden. Der Weg dieses Erfolgs begann mit der Entdeckung der Mikroorganismen durch Louis Pasteur (zit.: Wagner 1972) und Robert Koch (zit.: Wagner 1972) und der kurz danach erfolgten Einführung desinfizierender Maßnahmen. Die ersten Meilensteine waren die von Ignaz Semmelweis (1847, zit.: Rotter u. Skopec 2003) eingeführte Händedesinfektion mit Chlorkalklösung und das von Joseph Lister (1865, zit.: Rotter u. Skopec 2003) eingeführte Besprühen des Operationsfelds und der Operationsgeräte mit Karbolsäurelösung. Robert Koch begründete sowohl den Einsatz von Desinfektionsmitteln (DM) als auch die experimentellen Grundlagen für deren Testung [Kramer u. Exner 2011]. Seitdem steht die Effektivitätserhöhung antimikrobieller Maßnahmen im Fokus von Hygienikern, Mikrobiologen, Virologen und ebenso von Entwicklungsarbeiten in Bezug auf neue Formulierungen bzw. Wirkstoffe.

Auf dem Weg der Optimierung antimikrobiell wirksamer Rezepturen sind die Wissenschaftler immer wieder auf unterschiedliche Faktoren gestoßen, die die Untersuchungsergebnisse beeinträchtigten und Zweifel an der Wirksamkeit der DM aufkommen ließen [Bodenschatz 2006, Steuer u. Schubert 2007]. Während Einwirkungszeit, -konzentration, Feuchtigkeit und Temperatur zu den physikalischen Faktoren gehören, zählt die mögliche Wirkungsbeeinträchtigung der DM z.B. durch Reinigungsmittel, Eiweiße (Blut, Serum, Casein, Eiter und andere Proteine), Lipopolysaccharide und Mucin zu den chemischen Einflussfaktoren. Dieses Phänomen wurde erstmals bei Fällungsreaktionen auffällig. Man bezeichnete das als "die Desinfektion schädigende Wirkung". Die Untersuchungen von Emil von Behring (1894, zit.: Wagner 1972) zeigten, dass die bakteriozide Wirksamkeit des DM in Anwesenheit von Eiweißen herabgesetzt war. Als Konsequenz wurde vorgeschlagen, die DM-Testung mit und ohne Belastung durchzuführen. Die ersten derartigen Tests wurden mit dem Zusatz von Serum als Belastung durchgeführt.

Ein weiterer die Wirksamkeit beeinflussender Faktor ist die Übertragung von Spuren des Desinfektionswirkstoffs bei der Testung in die Subkultur. Sofern nicht wie bei Alkoholen allein die durch die Subkultur erreichte wässrige Verdünnung zur Wirkungsaufhebung ausreicht, wird dadurch eine höhere Wirksamkeit vorgetäuscht, weil die Wirkung nach Beendigung der Einwirkungszeit nicht abgebrochen worden ist.

Deshalb muss die mikrobiostatische Wirkung in die Subkultur übertragener Wirkstoffreste durch geeignete Zusätze aufgehoben werden [Geppert 1889]. Diese Substanzen bzw. Substanzgemische, die die Desinfektionswirkstoffe neutralisieren, werden als Neutralisationsmittel (auch Enthemmer/Inaktivatoren) bezeichnet [Wallhäußer 1995]. Bei der experimentellen Ermittlung der geeigneten Neutralisation ist nicht nur die sichere Neutralisation nachzuweisen, sondern ist zugleich eine Schädigung der Testorganismen durch die Neutralisation auszuschließen, weil andernfalls auch ein fehlerhaftes Ergebnis resultieren könnte [MacKinnon 1974]. Wie bereits oben erwähnt wurde, können zahlreiche Faktoren die Wirksamkeit der DM modifizieren. Um einen signifikanten Einfluss dieser Faktoren auf die Wirksamkeit auszuschließen, wird empfohlen, die DM-Neutralisation unter Zusatzbelastung (organische Belastung) zu prüfen. Eiweiß ist hierfür geeignet, weil es Mikroorganismen vor dem Angriff des DM schützt oder mit dem Wirkstoff reagieren kann, was in beiden Fällen mit einer Herabsetzung der Wirksamkeit verbunden ist. Wirkstoffe mit einem sog. hohen Eiweißfehler sind z.B. Aldehyde, quaternäre Ammoniumverbindungen, Halogene, Schwermetalle und Oxidanzien, während Alkohole einen geringen Eiweißfehler aufweisen [Assadian u. Kramer 2008]. Deswegen ist zur korrekten Bewertung der Desinfektionsleistung die Prüfung von DM mit Eiweißbelastung und mit geeigneter Neutralisation State of the Art.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte die Neutralisierung für die derzeit am häufigsten zur Antiseptik eingesetzten Wirkstoffe Chlorhexidindigluconat; Octenidin-dihydrochlorid und Polyhexamethylenbiguanidinhydrochlorid durch eine Lipidemulsion (Lipofundin MCT 20 %) untersucht werden. Ausgangspunkt hierfür waren Voruntersuchungen am Institut für Hygiene und Umweltmedizin, in denen auffällig wurde, dass diese Wirkstoffe an die Monolayer des Ei-Lecithins im emulgierten Öltröpfchen von Lipofundin binden und dadurch inaktiviert werden. Unbekannt ist jedoch die maximale Bindungskapazität von Lipofundin für diese ausgewählten antiseptischen Wirkstoffe.

1.2 Kurzcharakteristik der zur Prüfung vorgesehenen Antiseptika und des Neutralisators

1.2.1 Chlorhexidindigluconat

Chlorhexidindigluconat (CHX) gehört zu den Diguanidinen und somit zu den kationisch oberflächenaktiven Verbindungen. Mikrobiozid wirkt CHX am effektivsten gegen grampositive, weniger ausgeprägt gegen gramnegative Bakterien, Mykobakterien, Pilze und Herpes-simpex-Viren. Seine Wirksamkeit wird durch Neutralisierung der Zelloberflächen-Ladung durch Anlagerung des Wirkstoffs an die negativ geladene Zytoplasmamembran erreicht. CHX ist bei Zimmertemperatur unwirksam gegen Bakteriensporen und gegen unbehüllte Viren [Sonntag 2001, Kramer et al. 2008]. Während CHX mit kationischen und nicht-ionogenen Tensiden kombinierbar ist, setzen anionische Tenside antimikrobielle Wirkung herab. Chlorhexidin weist einen hohen Eiweißfehler auf [Rudolf u. Kampf 2003, Kramer et al. 2008]. Trotz möglicher Nebenwirkungen (z. B. allergische Reaktionen bis zum anaphylaktischen Schock) ist CHX nach wie vor eines der am häufigsten angewendeten Antiseptika besonders in der Zahnmedizin und gilt als Goldstandard zur Plaquehemmung in der Mundhöhle.

1.2.2 Octenidindihydrochlorid

Octenidindihydrochlorid (OCT) ist der Hauptvertreter der Bispyridine und gehört zu den oberflächenaktiven kationischen Wirkstoffen. OCT ist hoch effektiv gegen grampositive und gramnegative Bakterien sowie gegen Pilze, aber auch wirksam gegen hydrophile unbehüllte Viren, dagegen unwirksam gegen Bakteriensporen und Protozoen. Es ist fünf- bis zehnfach wirksamer als Chlorhexidin und wirkt innerhalb von 30 s. Die Wirksamkeit wird durch die Anwesenheit von Albumin, Blut (bis 10 %) und Mucin, außer bei *Candida albicans,* nicht herabgesetzt [Kramer u. Müller 2007, Kramer et al. 2008]. OCT erreicht die Zerstörung der Zellfunktion, besonders der Mitochondrien, durch Angriff der Enzyme in der Zellmembran [Kramer et al. 2008].

Der Hauptanwendungsbereich von OCT liegt in der Schleimhautantiseptik sowie der antiseptischen Behandlung von traumatischen, akuten, chronischen und chirurgischen Wunden. Für die Schleimhäute (mit Ausnahme des Auges) gilt OCT derzeit als Mittel der Wahl [Kramer et al. 2008, Bültemann et al. 2008].

1.2.3 Polyhexamethylenbiguanidinhydrochlorid

Polyhexamethylenbiguanidhydrochlorid (PHMB, internationaler Freiname Polihexanid) ist eine kationenaktive Verbindung, die zu den polymeren Biguaniden gehört. PHMB ist mikrobiozid gegen ein breites Spektrum von grampositiven und gramnegativen

Bakterien wirksam, dagegen unwirksam gegen Viren und Bakteriensporen. PHMB reagiert bevorzugt mit den in den Bakterienmembranen vorkommenden sauren Phospholipiden mit der Folge der Permeabilitätsstörung, dagegen weniger ausgeprägt mit den neutralen Phospholipiden der humanen Zellwand, womit die gute Verträglichkeit erklärt werden kann [Majic-Todt 2003, Kramer et al. 2008, Dissemond 2009]. PHMB ist durch einen geringen Blut- und Eiweißfehler gekennzeichnet.

PHMB und Chlorhexidin sind in ihrer Wirksamkeit vergleichbar [Koburger et al. 2010], allerdings ist PHMB durch eine größere therapeutische Breite gekennzeichnet [Kramer et al. 2008]. Auf Grund seiner Wundheilungsförderung auch bei aseptischen Wunden gilt PHMB als Wirkstoff der Wahl zur Behandlung kritisch kolonisierter oder infizierter chronischer Wunden [Hübner u. Kramer 2010].

1.2.4 Lipofundin MCT 20 %

Lipofundin MCT 20 % ist eine parenterale Lipidemulsion, die intravenös verabreicht wird. Es handelt sich um eine Öl-in-Wasser-Emulsion (O/W-Emulsion). Mittelkettige Triglyceride (MCT) und Sojabohnenöl bilden die dispergierte innere Phase und Wasser bildet die äußere Phase (polar), die mit Glycerol isotonisiert wird. Parenterale Ernährungslösungen stellen stark verdünnte Fettemulsionen dar, die mit Emulgatoren stabilisiert werden. Bei Lipofundin sind das Ei-Lecithine (Phosphatidylcholine). Lecithine besitzen eine negativ geladene Phosphat-Gruppe (Anion) und ein positiv geladenes Stickstoff-Atom (Kation). Sie sind insgesamt neutral geladen [Frese 2008]. Die Öltröpfchengröße variiert zwischen 200 – 500 nm. Ein Öltröpfchen besteht aus einem Triglycerid-Kern, der von einer Phospholipidschicht umgegeben wird (ein- oder mehrschichtiger Film). Außerdem enthält Lipofundin 4,8 - 5,8 % Linolsäure, 0,5 - 1,1 % α-Linolensäure, 0,02 % α-Tocopherol und 0,03 % Natriumoleat [Braun Melsungen 2007].

1.3 Wirkungsprüfung von Desinfektionsmitteln und Antiseptika

Die Auswahl an chemischen DM und Antiseptika ist groß. Ein universelles Mittel, das gegen alle Krankheitserreger wirksam ist, gibt es nicht. Die Wirksamkeit eines Mittels gilt als nachgewiesen, wenn die in Prüfmethoden verlangten Anforderungen erfüllt werden. Um die Prüfung zu standardisieren, sind in der EU Normen für die Wirkungsprüfung von DM erarbeitet worden [Gebel et al. 2008].

1.3.1 Normen zur Wirksamkeitsprüfung von Desinfektionsmitteln und Antiseptika auf europäischer und nationaler Ebene

Die europäischen Normen (EN) werden vom europäischen Komitee 216 für „Chemische DM und Antiseptika“ (CEN TC 216) für Mittel zur Anwendung in der Humanmedizin, Veterinärmedizin und in Lebensmittelbereichen herausgegeben. Die europäischen Prüfnormen für chemische DM und Antiseptika bestehen aus drei Phasen. Die Wirksamkeitstestung ist bis zur sog. Phase 2, Stufe 2 durch EN geregelt [Kramer 2000] und beginnt mit dem sog. Basistest [EN 1040]. Hierbei handelt es sich um einen Suspensionstest ohne Belastung, um zu prüfen ob die bakteriozide und fungizide Wirkung generell ausreichend ist. Phase 2 enthält Suspensionstests mit erhöhten Anforderungen. In Phase 2, Stufe 1 wird im quantitativen Suspensionstest [EN 13272] innerhalb der deklarierten Einwirkungszeit ohne Belastung eine Reduktion der Testorganismen > 5 lg (bezeichnet als RF > 5), bei Belastung > 3 lg gefordert [Pitten et al. 2003]. In Phase 2, Stufe 2 wird die Wirksamkeit unter praxisnah simulierten Bedingungen auf Prüfkörpern ohne und mit Belastung mit einer Referenz verglichen [EN 14561, EN 14562, Ebert 2011]. In Phase 3 sind Feldversuche unter Praxisbedingungen vorgesehen. Bei Bestehen der Anforderungen gemäß Phase 1 und 2 der EN-Prüfnormen werden die geprüften Präparate als DM bzw. Antiseptika zertifiziert.

Neben den EN gibt es auf nationaler Ebene 3 DM-Prüfinstitutionen, die sich jeweils nach anwendungsorientierten Zwecken in ihren Prüfmethoden unterscheiden, wobei die Richtlinien der deutschen Prüfmethoden die europäischen Normen einschließen. Die drei deutschen DM-Institutionen sind:

- das Robert Koch-Institut (RKI) [RKI 2003, RKI 2007, Gebel et al. 2008],
- der Verbund für Angewandte Hygiene e.V. (VAH) [DGHM 2001, Gebel et al. 2008, VAH 2010] und
- die Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG) [Gebel et al. 2008].

Bei Erfüllung der Prüfvorschriften werden die Präparate in die entsprechenden Listen (RKI-Liste, VAH-Liste und DVG-Liste) aufgenommen.

1.3.2 Testprinzip von Suspensionstests

Im Suspensionstest wird die zu prüfende Erregersuspension mit dem DM gemischt. Ist die Einwirkungszeit abgelaufen, wird das DM neutralisiert (inaktiviert) oder durch Sterilfiltration und mehrfaches Nachspülen entfernt. Anschließend wird die Anzahl koloniebildender Einheiten (KbE) im DM-Erreger-Gemisch bestimmt und auf diese Weise die Reduktion berechnet. Es handelt sich also um eine quantitative Prüfung [Gebel et al. 2008].

Im Unterschied dazu spielt der qualitative Vortest sowohl bei der Bestimmung der Desinfektionswirksamkeit in verschiedenen Konzentrationen als auch bei der Effizienzermittlung des Neutralisationsmittels eine Rolle [Schneemann u. Wurm 1995]. Dabei gelten nach wie vor die von MacKinnon im Jahr 1974 [zit.: MacKinnon 1974] eingeführten Kriterien für die Optimierung des Neutralisators, d. h. bei der Kombination mit dem DM soll keine hemmende Wirkung aufgrund entweder eigener oder infolge neu entstandener Produkte auftreten.

Zusammengefasst werden mit der Testung drei Hauptziele verfolgt [Cremieux u. Fleurette 1991]:

- Evaluierung der Wirksamkeit wasserlöslicher DM (aktuell sind in Phase 2, Stufe 1 keine Methoden zum Testen nichtwasserlöslicher Zubereitungen mit antimikrobieller Wirkung bekannt),
- Ausschaltung der mikrobiostatischen Nachwirkung des DM auf überlebende Testmikroorganismen; Voraussetzung für diesen essentiellen Schritt ist ein geeigneter Inaktivator oder eine ausreichende Verdünnung,
- Untersuchung der Wirksamkeit einfacher oder komplexer Stoffgemische unter Berücksichtigung realer Praxiseinflüsse.

1.3.3 Bedeutung der Ausschaltung der mikrobiostatischen Nachwirkung durch sogenannte Neutralisationstests

Bei der DM-Prüfung können in die Subkultur übertragene Desinfektionswirkstoffe nach Ablauf der Prüfzeit noch hemmend wirken, was als mikrobiostatische Nachwirkung des DM bezeichnet wird, und somit zur Verfälschung der Testergebnisse führen. Um diesen Fehler zu vermeiden, stehen abhängig von den Wirkstoffeigenschaften Verdünnungs-, Wasch- und Neutralisationsverfahren zur Auswahl (Tab. 1). Die Verdünnung ist nur ausreichend, wenn der Wirkstoff ab einer bestimmten Verdünnung keine Nachwirkung mehr entfalten kann. Beim Waschen handelt es sich um ein

mechanisches Verfahren, um die Mikroorganismen vom DM zu trennen. Diese Trennung kann durch die Membranfiltration oder Zentrifugation erreicht werden [Cremieux u. Fleurette 1991]. Die Neutralisation erfolgt durch die Zugabe verschiedener Stoffe oder Stoffgemische, die die Wirkstoffe neutralisieren (enthemmen/inaktivieren) [Wagner 1972]. Sie kann als komplexes Phänomen betrachtet werden. Während es sich z. T. um eine rein chemische Neutralisierung handelt (z. B. Thiosulfate und Thiol-Verbindungen für Halogen-haltige Substanzen), findet in anderen Fällen keine direkte chemische Inaktivierung statt, sondern der Wirkstoff verliert durch Bindung an den Neutralisator seine Wirksamkeit. Bis heute ist die Ermittlung des geeigneten Neutralisators eine anspruchsvolle Aufgabenstellung [Cremieux u. Fleurette 1991]. In Tabelle 1 sind die unterschiedlichen Möglichkeiten zur Neutralisierung zusammengefasst.

Tab. 1: Prinzip unterschiedlicher Neutralisationsverfahren [Cremieux u. Fleurette 1991]

Verfahren	Waschen oder Filtrieren		Verdünnung	Neutralisation
Prinzip	Mechanische Trennung des DM von den Mikroorganismen.		Das zu prüfende Gemisch (DM-Mikroorganismen-Suspension) wird mit Verdünnungsflüssigkeit verdünnt.	Durch den Zusatz bestimmter Stoffe oder Stoffgemische wird die antimikrobielle Wirkung des DM neutralisiert.
	Membranfiltration: Das zu prüfende Gemisch wird durch eine Membran filtriert und danach mehrfach gewaschen.	Zentrifugation: Das zu prüfende Gemisch wird durch Zentrifugalkraft getrennt.		
Ziel	Aufhebung der Desinfektionsnachwirkung auf den überlebenden Mikroorganismen		Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration, bei der das DM gerade noch mikrobiostatisch wirkt	Ausschaltung der Desinfektionsnachwirkung auf überlebende Mikroorganismen
Vorteile	Kein möglicher Einfluss des Neutralisators auf das Testergebnis		Kein möglicher Einfluss des Neutralisators auf das Testergebnis	einfache Durchführung
Nachteile	Zwischen der Membran und dem DM können Wechselwirkungen stattfinden, hoher exp. Aufwand	Gefahr der Zellschädigung	Manche Desinfektionswirkstoffe können, trotz starker Verdünnung noch mikrobiostatisch wirken	Problematik der Auswahl eines geeigneten Inaktivators ohne antimikrobielle Wirkung
Fazit	Anwendung nur bei nicht erreichbarer Neutralisierung.	Alternativ zur Membranfiltration.	Nur selten anwendbar.	Bei wirksamer Neutralisierung Verfahren der Wahl.

Als Fazit ist nach heutigem Stand des Wissens bei der Prüfung von DM die Ausschaltung einer antimikrobiellen Nachwirkung unerlässlich, was experimentell nachgewiesen sein muss [Kampf 2008]. Dabei soll die Neutralisierung die Wirkung des DM aufheben, nicht jedoch die Testorganismen schädigen. Daher wird empfohlen, keine Inaktivatoren mit antimikrobieller Eigenwirkung zu verwenden, obwohl das nicht systematisch geprüft wurde. Kenntnisse über die chemischen Eigenschaften eines DM lassen Rückschlüsse auf die Eignung bestimmter Stoffe bzw. Stoffgemische zur Neutralisierung zu. So eignen sich z. B. anionische Verbindungen als Neutralisatoren für kationisch oberflächenaktive Antiseptika [Ikeda et al. 1984]. Viele Neutralisatoren enthalten Phospholipide wie Lecithin oder nichtionische Tenside wie Polysorbate und/oder Polyoxyethylen-Fettalkohol. Dabei wird angenommen, dass ihre nicht polaren Gruppen von den Antiseptika und DM aufgrund ihrer lipophilen Struktur absorbiert werden. Bei komplex zusammengesetzten antiseptischen Mitteln werden die Inaktivierungsmittel häufig kombiniert. In Untersuchungen von Reybrouck (zit.: Reybrouck 1978) zeigten Inaktivator-Kombinationen gute Wirksamkeit gegen die meisten kombinierten DM. In diesem Fall wurde sogar von einem universellen Inaktivierungsmittel gesprochen.

In den Tabellen 2 - 8 wird eine Übersicht über häufig eingesetzte Neutralisatoren gegeben. Es wird deutlich, dass für gleiche Wirkstoffe bzw. Wirkstoffgruppen eine unterschiedliche Neutralisierung empfohlen wird. Sofern die Effektivität jeweils im Vortest nachgewiesen wurde, spricht nichts gegen den Einsatz unterschiedlicher Neutralisatoren. Wird jedoch in Veröffentlichungen nur auf die Wirksamkeit im Vortest hingewiesen, ohne dass dafür Daten mitgeteilt werden, ist das kritisch zu bewerten.

Tab. 2: Zur DM-Prüfung empfohlene Neutralisierungsmittel für Alkohole.

Wirkstoff bzw. Wirkstoffgruppe	**Empfohlene Neutralisierung**	**Literatur**
Alkohole	Verdünnung bis zur subhemmenden Stufe	[Russel 1981], [Russel 1991]
	3% Tween 80 + 3% Saponin + 0,1% Cystein + 0,1% Histidin	[Hübner 2004]
	Frisches Eigelb; Lecithin; Tween 80; Glycin; Ethylenoxidkondensat; Phospholipidemulsion; Cystein; Natriumthioglycolat	[EN 1040]
	Lecithin; Tween 80; Saponin	[EN 13272]
Alkohole: Benzylalkohol, Dichlorbenzyl-alkohol, Phenylethyl-alkohol, Isopropanol	Tween 80; 0,3% Lecithin; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 0,1% Cystein; 3% Tween 80 + 3% Saponin + 0,1% Cystein + 0,1% Histidin; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 0,1% Histidin + 0,1% Natriumthiosulfat	[Wallhäußer 1995]
	Tween 80; Verdünnung bis zur subhemmenden Stufe	[ASTM E1054]
Alkohole: Ethanol	4% Tween 80 + 0,5% Lecithin	[Kampf et al. 2005]

Tab. 3: Zur DM-Prüfung empfohlene Neutralisierungsmittel für Aldehyde.

Wirkstoff bzw. Wirkstoffgruppe	Empfohlene Neutralisierung	Literatur
Aldehyde	Nährstoffreiches Medium	[MacKinnon 1974]
	Verdünnung bis zur subhemmenden Stufe; Glycin; Natriumsulfit	[Russell 1981], [Russel 1991]
	Frisches Eigelb; Lecithin; Tween 80; Glycin; Ethylenoxidkondensat; Phospholipidemulsion; Cystein; Natriumthioglycolat	[EN 1040]
	0,1-1% Histidin; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 3% Saponin + 0,1% Histidin; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 0,1% Cystein; 3% Tween 80 + 3% Saponin + 0,1% Cystein + 0,1% Histidin; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 0,1% Histidin + 0,5% Natriumthiosulfat	[Rockhoff 2008]
	L-Histidin; Glycin	[EN 13272]
Aldehyde: Bronopol	0,1% Cystein; Thioglycolat; 0,3% Lecithin; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 0,1% Cystein; 3% Tween 80 + 3% Saponin + 0,1% Cystein + 0,1% Histidin; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 0,1% Histidin + 0,1% Natriumthiosulfat	[Wallhäußer 1995]
	Serum; Cystein; Thiosulfat; Thioglycolat; Metabisulfit	[ASTM E1054]
Aldehyde: Formaldehyd	Natriumsulfit; Histidin; Ammoniak	[ASTM E1054]
	0,5% Histidin; 0,05% Dimedone; 0,3% Lecithin; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 0,1% Cystein; 3% Tween 80 + 3% Saponin + 0,1% Cystein + 0,1% Histidin; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 0,1% Histidin + 0,1% Natriumthiosulfat	[Wallhäußer 1995]
Aldehyde: Glutaraldehyd	Verdünnung bis zur subhemmenden Stufe; Glycin; Natriumbisulfit; Natriumsulfit; Cystein; Cystin	[ASTM E1054]
	Natriumbisulfit; 0,3% Lecithin; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 0,1% Cystein; 3% Tween 80 + 3% Saponin + 0,1% Cystein + 0,1% Histidin; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 0,1% Histidin + 0,1% Natriumthiosulfat	[Wallhäußer 1995]

Tab. 4: Zur DM-Prüfung empfohlene Neutralisierungsmittel für Biguanide

Wirkstoff bzw. Wirkstoffgruppe	Empfohlene Neutralisierung	Literatur
Biguanide: CHX	0,3% Lecithin; 1% Tween 80; 2% Lubrol W; LPHT (0,3% Lecithin + 3% Tween 80 + 0,1% Histidin + 0,5% Natriumthiosulfat); LPWT (0,5 % Lecithin +1% Tween 80 + 1% Lubrol W + 1% Natriumthiosulfat); LPT (2% Lecithin+ 2% Tween 80 + 0,5% Natriumthiosulfat); PS (3% Tween 80 + 3% Saponin)	[Reybrouck 1978]
	Lecithin + Lubrol W; Lecithin + Tween 80	[Russel 1991]
	3% Tween 80 + 0,3% Lecithin	[Wallhäußer 1995]
	Letheen-Agar; Lecithin + Lubrol W	[Russel 1991]
	4% Tween 80 + 0,5% Lecithin	[Kampf et al. 2005]
	Frisches Eigelb; Lecithin; Tween 80; Glycin; Ethylenoxidkondensat; Phospholipidemulsion; Cystein; Natriumthioglycolat	[EN 1040]
	Lecithin + Tween 80	[ASTM E1054]
	Lecithin; Tween 80; Saponin	[EN 13272]
Biguanide: PHMB	Lecithin + Lubrol W; Lecithin + Tween 80	[Russel 1981]
	Letheen-Agar; Lecithin + Lubrol W	[Russel 1991]
	3% Tween 80 + 3% Saponin + 0,1% Cystein + 0,1% Histidin; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 0,1% Histidin + 0,5% Natriumthiosulfat	[Müller 2003]
	Frisches Eigelb; Lecithin; Tween 80; Glycin; Ethylenoxidkondensat; Phospholipidemulsion; Cystein; Natriumthioglycolat	[EN 1040]
	Lecithin + Tween 80	[ASTM E1054]
	Lecithin; Tween 80; Saponin	[EN 13272]
Diguanide	Nichtionische Oberflächenverbindungen mit Lecithin	[MacKinnon 1974]

Tab. 5: Zur DM-Prüfung empfohlene Neutralisierungsmittel für Phenol und Phenolderivate

Wirkstoff bzw. Wirkstoffgruppe	Empfohlene Neutralisierung	Literatur
Phenole	Nichtionische Oberflächenverbindungen; Tween 80	[MacKinnon 1974]
	0,3% Lecithin; 1% Tween 80; 0,1% Natriumsulfit; LPHT (0,3% Lecithin + 3% Tween 80 + 0,1% Histidin + 0,5% Natriumthiosulfat); LPWT (0,5% Lecithin +1% Tween 80 + 1% Lubrol W + 1% Natriumthiosulfat); LPT (2% Lecithin+ 2% Tween 80 + 0,5% Natriumthiosulfat); PS (3% Tween 80 + 3% Saponin)	[Reybrouck 1978]
	Verdünnung bis zur subhemmenden Stufe; Tween 80	[Russel 1991]
	Frisches Eigelb; Lecithin; Tween 80; Glycin; Ethylenoxidkondensat; Phospholipidemulsion; Cystein; Natriumthioglycolat	[EN 1040]
	3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 3% Saponin + 0,1% Histidin; 1% Tween 80; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 0,1% Cystein; 3% Tween 80 + 3% Saponin + 0,1% Cystein + 0,1% Histidin; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 0,1% Histidin + 0,5% Natriumthiosulfat	[Rockhoff 2008]
	Lecithin; Tween 80; Ethylenoxidkondensat von Fettalkohol	[EN 13272]
Phenole: o-Phenylphenol	1% Tween 80; 0,3% Lecithin; LPHT (0,3% Lecithin + 3% Tween 80 + 0,1% Histidin + 0,5% Natriumthiosulfat); LPWT (0,5% Lecithin +1% Tween 80 + 1% Lubrol W + % Natriumthiosulfat); LPT (2% Lecithin+ 2% Tween 80 + 0,5% Natriumthiosulfat); PS (3% Tween 80 + 3% Saponin)	[Reybrouck 1978]
Phenolderivate	1% Tween 80; 0,3% Lecithin; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 0,1% Cystein; 3% Tween 80 + 3% Saponin + 0,1% Cystein + 0,1% Histidin; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 0,1% Histidin + 0,1% Natriumthiosulfat	[Wallhäußer 1995]
Phenole: Phenylphenol, Chloroxylenol, Kresole	Nichtionische Oberflächenverbindungen; Tween 80; Verdünnung bis zur subhemmenden Stufe	[ASTM E1054]

Tab. 6: Zur DM-Prüfung empfohlene Neutralisierungsmittel für oberflächenaktive Substanzen

Wirkstoff bzw. Wirkstoffgruppe	Empfohlene Neutralisierung	Literatur
QAV	Nichtionische Oberflächenverbindungen mit Lecithin	[MacKinnon 1974]
	Lecithin + Lubrol W; Lecithin + Tween 80	[Russel 1981]
	Letheen-Agar; Lecithin + Lubrol W	[Russel 1991]
	0,3% Lecithin; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 0,1% Cystein; 3% Tween 80 + 3% Saponin + 0,1% Cystein + 0,1% Histidin; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 0,1% Histidin + 0,1% Natriumthiosulfat	[Wallhäußer 1995]
	Frisches Eigelb; Lecithin; Tween 80; Glycin; Ethylenoxidkondensat; Phospholipidemulsion; Cystein; Natriumthioglycolat	[EN 1040]
	3% Tween 80 + 0,3% Lecithin; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 3% Saponin + 0,1% Histidin; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 0,1% Cystein; 3% Tween 80 + 3% Saponin + 0,1% Cystein + 0,1% Histidin; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 0,1% Histidin + 0,5% Natriumthiosulfat	[Rockhoff 2008]
	Lecithin; Tween 80; Saponin; Natriumdodecylsulfat; Ethylenoxidkondensat von Fettalkohole	[EN 13272]
QAV: Cetrimonium-bromide, Benzalkonium-chloride, Benzethonium-chloride, Cetylpyridinium-chloride	0,3% Lecithin; 1% Tween 80; 0,1% Natriumsulfit; 2% Lubrol W; LPHT (0,3% Lecithin + 3% Tween 80 + 0,1% Histidin + 0,5% Natriumthiosulfat); LPWT (0,5% Lecithin +1% Tween 80 + 1% Lubrol W + 1% Natriumthiosulfat); LPT (2% Lecithin+ 2% Tween 80 + 0,5% Natriumthiosulfat); PS (3% Tween 80 + 3% Saponin)	[Reybrouck 1978]
QAV	Lecithin + Tween 80; Suramin; 0,5% Tween 80; organische Substanzen; Cyclodextrin; Thiosulfate; Thiole; Hydrogensulfite; Ammoniumsulfit	[ASTM E1054]
OCT	3% Tween 80 + 3% Saponin + 0,1% Cystein + 0,1% Histidin; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 0,1% Histidin + 0,5% Natriumthiosulfat	[Müller 2003]
	Frisches Eigelb; Lecithin; Tween 80; Glycin; Ethylenoxidkondensat; Phospholipidemulsion; Cystein; Natriumthioglycolat	[EN 1040]
	Lecithin; Tween 80; Saponin	[EN 13272]

Tab. 7: Zur DM-Prüfung empfohlene Neutralisierungsmittel für Halogene

Wirkstoff bzw. Wirkstoffgruppe	Empfohlene Neutralisierung	Literatur
Iod, Chlor, Brom	Nährmedium mit Natriumthiosulfat	[MacKinnon 1974]
Iodophore	Nichtionische Oberflächenverbindungen; Tween 80;	[MacKinnon 1974]
	0,1% Cystein; 0,3% Lecithin; 1% Tween 80; 0,5% Natriumthiosulfat; 0,1% Natriumsulfit; 0,5% Nariumthioglycolat; LPHT (0,3% Lecithin + 3% Tween 80 + 0,1% Histidin + 0,5% Natriumthiosulfat); LPWT (0,5% Lecithin +1% Tween 80 + 1% Lubrol W + 1% Natriumthiosulfat); LPT (2% Lecithin+ 2% Tween 80 + 0,5% Natriumthiosulfat); PS (3% Tween 80 + 3% Saponin)	[Reybrouck 1978]
Iodophore: PVP-I	3% Tween 80 + 3% Saponin + 0,1% Cystein + 0,1% Histidin; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 0,1% Histidin + 0,5% Natriumthiosulfat	[Müller 2003]
Iod, Iodophore	Natriumthiosulfat; 0,3% Lecithin; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 0,1% Cystein; 3% Tween 80 + 3% Saponin + 0,1% Cystein + 0,1% Histidin; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 0,1% Histidin + 0,1% Natriumthiosulfat	[Wallhäußer 1995]
Iodo-, Chlorophore	3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 3% Saponin + 0,1% Histidin; 0,1-0,5% Cystein; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 0,1% Cystein; 3% Tween 80 + 3% Saponin + 0,1% Cystein + 0,1% Histidin; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 0,1% Histidin + 0,5% Natriumthiosulfat	[Rockhoff 2008]
	Natriumthiosulfat	[EN 13272]
Iod, Hypochlorit	Nährmedium; Tween 80; Natriumthiosulfat	[Russel 1981]
Iod, Hypochlorit, Brom	Verdünnung bis zur subhemmenden Stufe; Thiosulfate; Tween 80	[ASTM E1054]
Iod-, Chlor-, Brom-verbindungen	Frisches Eigelb; Lecithin; Tween 80; Glycin; Ethylenoxidkondensat; Phospholipidemulsion; Cystein; Natriumthioglycolat	[EN 1040]
Chloramin-T	0,5% Nariumthioglycolat; 0,5% Natriumthiosulfat; LPHT (0,3% Lecithin + 3% Tween 80 + 0,1% Histidin + 0,5% Natriumthiosulfat); LPWT (0,5% Lecithin +1% Tween 80 + 1% Lubrol W + 1% Natriumthiosulfat); LPT (2% Lecithin+ 2% Tween 80 + 0,5% Natriumthiosulfat); PS (3% Tween 80 + 3% Saponin)	[Reybrouck 1978]

Tab. 8: Zur DM-Prüfung empfohlene Neutralisierungsmittel für andere Wirkstoffe

Wirkstoff bzw. Wirkstoffgruppe	Empfohlene Neutralisierung	Literatur
Peroxide	Katalase; Natriumthiosulfat	[Russel 1981], [EN 13272], [ASTM E1054]
	0,5% Natriumthiosullfat; 0,1-0,5% Cystein; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 3% Saponin + 0,1% Histidin; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 0,1% Cystein; 3% Tween 80 + 3% Saponin + 0,1% Cystein + 0,1% Histidin; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 0,1% Histidin + 0,5% Natriumthiosulfat	[Rockhoff 2008]
Schwermetalle: Quecksilber(II)-chlorid	0,1% Cystein; 0,5% Natriumthiosulfat; 0,1% Natriumsulfit; 0,5% Nariumthioglycolat; 0,3% Lecithin + 3% Tween 80 + 0,1% Histidin + 0,5% Natriumthiosulfat; 0,5% Lecithin +1% Tween 80 + 1% Lubrol W + 1% Natriumthiosulfat; 2% Lecithin+ 2% Tween 80 + 0,5% Natriumthiosulfat; 3% Tween 80 + 3% Saponin	[Reybrouck 1978]
Schwermetalle: Quecksilber	Nariumthioglycolat; Cystein	[MacKinnon 1974], [Russel 1981]
	Thiole	[Russel 1991]
Schwermetalle: Quecksilber, Silber	Thiosulfate; Hydrogensulfit; Thiole; Thioglycolsäure; Ammoniumsulfit	[ASTM E1054]
Organo-quecksilber-verbindungen	0,1% Cystein; 0,5% Thioglycolat; 0,3% Lecithin; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 0,1% Cystein; 3% Tween 80 + 3% Saponin + 0,1% Cystein + 0,1% Histidin; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 0,1% Histidin + 0,1% Natriumthiosulfat	[Wallhäußer 1995]
	0,1% Cystein; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 3% Saponin + 0,1% Histidin; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 0,1% Cystein; 3% Tween 80 + 3% Saponin + 0,1% Cystein + 0,1% Histidin; 3% Tween 80 + 0,3% Lecithin + 0,1% Histidin + 0,5% Natriumthiosulfat	[Rockhoff 2008]

2. Eigene Untersuchungen

2.1 Methode

2.1.1 Medien

Ausgangs-Prüflösungen

Es wurden folgende in Antiseptika und auch in DM verwendete Wirkstoffe untersucht:

- Octenidindihydrochlorid in wässriger Lösung (Ch. 1170700, Schülke&Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland)
- Chlorhexidindigluconat in wässriger Lösung (C9394, Ch. BCBC 4041, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland)
- Cosmocil PG mit 20 % Polyhexamethylenbisguanidinhydrochlorid (Ch. 0000695544, B. Braun Medical AG, Sempach, Schweiz)

Neutralisator

Lipofundin@ MCT 20 % (Ch. 8171A181, B. Braun Melsungen AG, Deutschland)

1000 ml Lipofundin@ MCT 20 % enthält:

- Sojabohnenöl (langkettige Triglyceride, LCT) 100 g
- mittelkettige Triglyceride (MCT) 100 g
- Eilecithin (Phospholipide aus Ei) 12 g
- Glycerol 25 g
- α-Tocopherol 0,2 g
- Natriumoleat 0,3 g

Testorganismen

Gemäß DIN EN 13727 wurden folgende Prüforganismen eingesetzt:

- *Escherichia coli K 12* NCTC 10538
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Enterococcus hirae* ATCC 10541
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442
- *Candida albicans* ATCC 10231

CASO-Agar

Als Nährmedium wurde Casein-Sojamehl-Pepton-Agar (CASO-Agar, auch bekannt als Tryptic Soy Agar (TSA) oder Soybean Digest Agar (CSA)) (Ch. 1.05458, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) mit folgender Zusammensetzung (g/l) angewendet.

- Pepton aus Casein (Trypton), tryptisch verdaut 15,0 g
- Pepton aus Sojamehl 5,0 g
- Natriumchlorid 5,0 g
- Agar 15,0 g

Wasser

Für alle Versuche wurde deionisiertes, pyrogenfreies Wasser (als Aqua abgekürzt) und entmineralisiertes Wasser (weiter als VE-Wasser abgekürzt) verwendet.

Trypton/NaCl

Als Verdünnungsmedium für die Versuche wurde Trypton/NaCl-Lösung (Trypton - Ch. 1.07213, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland und NaCl - Ch. 1.06404, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) angewendet.

Es besteht aus (g/l):

- Pepton aus Casein (Trypton), tryptisch verdaut 1,0 g
- Natriumchlorid 8,5 g

MEM mit 10 % FBS

Für die Versuche wurden homogenisierte Bakterien- und Candida-Suspensionen in Essential Medium Eagle (MEM) (PAA Laboratories GmbH, Cölbe E15-825, Deutschland) und 10 % Fötales Bovines Serum (FBS) (Ch. 10270-106, Gibco Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) als Belastungssubstanz eingesetzt. Dieses Medium ist Antibiotika frei.

Geräte und Verbrauchsmaterialen

Es wurden folgende Geräte und Verbrauchsmaterialen verwendet:

- Petri-Schalen mit Nocken: Durchmesser 90 mm, Länge 16 mm, steril (Ch. 82.1473.001, Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, Deutschland),
- Brutschrank, alle Bebrütungen erfolgten bei 37 ± 1 ^{o}C ,
- 1 Autotube -Ständer mit 1 ml Röhrchen (autoklaviert) laut Bestückungsplan,
- Biosphere Filtertips blau 1000 µl, steril (Ch. 70.762.211, Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, Deutschland),

- Biosphere Filtertips gelb 100 µl, steril (Ch. 70.762.212, Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, Deutschland),
- Pipetten, 2 - 20 µl, 10 - 100 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1000 µl und 1000 - 5000 µl Modell Research (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland),
- 2 * 100 ml Maßkolben, steril,
- 16 * 13 ml Polystyrol-Röhrchen (PS-Röhrchen 13 ml = 95 * 16,8 mm) mit sterilem montiertem Eindrückstopfen, steril (Ch. 55.468.001, Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, Deutschland),
- CASO-Agarplatten,
- Photometer.

2.1.2 Versuchsdurchführung

Die Versuchsdurchführung wird für einen quantitativen Suspensionstest in mehrere Schritte unterteilt.

Vorbereitung

Für den quantitativen Suspensionstest werden Suspensionen der Prüfmikroorganismen hergestellt. Hierfür wurden die notwendigen Hilfsmittel, Lösungen und CASO-Agarplatten bereitgestellt. Für jeden Testorganismus wurden jeweils Subkulturen angezüchtet.

Herstellung der 1. Subkultur

Aus Stammkulturen der oben genannten Prüforganismen wurden Subkulturen gemäß EN 12353 hergestellt. Als Nährmedium zur Anzüchtung wurde Blut-Agar verwendet.
Es wurde jeweils eine sterile Glasperle aus dem Kryo-Röhrchen mit der Stammkultur unter aseptischen Bedingungen entnommen und auf einer Blut-Agarplatte ausgerollt. Anschließend wurde die Platte bei 37 °C für maximal 24 h (meistens über Nacht) bebrütet. Die resultierende 1. Subkultur ist bei 4 °C gelagert für vier Wochen verwendbar.

Herstellung der 2. Subkultur

Einen Tag vor Versuchsbeginn erfolgte die Herstellung der 2. Subkultur, indem jeweils eine CASO-Agarplatte mit einer Öse der 1. Subkultur beimpft und ausgestrichen wurde (Abb. 1). Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurde am Versuchstag die resultierende Bakterienkultur mit 3 ml Trypton/NaCl-Lösung unter Zuhilfenahme eines Drigalski-Spatels aufgeschwemmt und abgelöst. Die 3 ml Bakteriensuspension wurden mit Trypton/NaCl auf insgesamt 10 ml aufgefüllt.

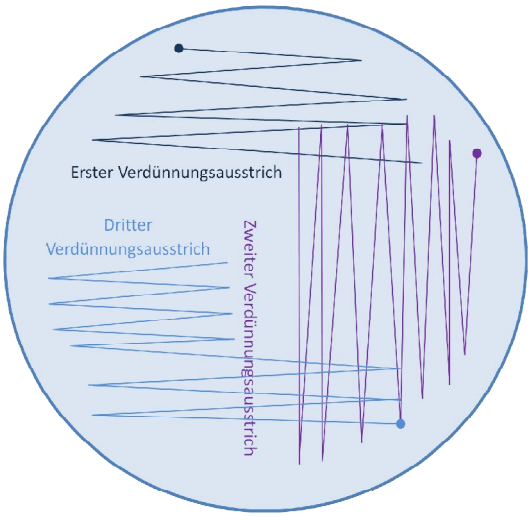


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Verdünnungsausstrichs mittels 3-Ösen-Technik.

Einstellen der Arbeits-Prüfmikroorganismen-Dichte auf 10^4 KbE/ml

Für die Bakterien:

Die Ausgangs-Mikroorganismen-Dispersion (= abgeschwemmte und mit Trypton/NaCl verdünnte 2. Subkultur) wurde zunächst 1:10 mit MEM verdünnt. Anschließend wurden zwei weitere 1:1-Unterverdünnungen in MEM hergestellt.

Die optische Dichte wurde sowohl von den 1:10 Verdünnungen als auch von den beiden daraus hergestellten seriellen 1:1-Unterverdünnungen bei 620 nm im Spektralphotometer gemessen. Die Verdünnung, bei der ein Wert im Bereich von 0,15 - 0,46 resultiert, entspricht einer Mikroorganismen-Ausgangsdichte von 10^8 KbE/ml.

Für C. albicans:

Aus der Ausgangs-Mikroorganismen-Dispersion (= abgeschwemmte und mit Trypton/NaCl verdünnte 2. Subkultur) wurden anschließend zwei weitere 1:1-Unterverdünnungen in MEM hergestellt. Die höchste Verdünnungsstufe wurde in einer Neubauer-Zählkammer als 1:1-Verdünnung mit 0,5 % Trypanblau-Lösung ausgezählt. Die Zellzahl soll zwischen 30 und 300 liegen, ansonsten sind weitere Verdünnungen zu untersuchen. Die Ausgangsdispersion ist so auf 50 - 200 gezählte Zellen einzustellen, dass eine Ausgangsdichte von 1 - $4x10^6$ KbE/ml resultiert.

Aus vorliegenden definierten Mikroorganismen-Ausgangsdichten wurden jeweils weitere Verdünnungen hergestellt, um die geeignete Verdünnung für den Neutralisationstest zu erhalten.

Herstellen von Trypton/NaCl

1 g Trypton und 8,5 g NaCl wurden in einer sterilen 1 l Glaslaborflasche vorgelegt und mit VE-Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Die Dispersion wurde im Wasserdampftopf für 45 min bei 100 °C desinfiziert, wobei der Gefäßdeckel zuvor nicht festgeschraubt wird. Die noch heiße Lösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, wobei der Gefäßdeckel zuvor leicht zugeschraubt wurde. Die resultierende Lösung wurde bei 4 °C aufbewahrt und kann bis zu 4 Wochen verwendet werden. Der pH-Wert des Verdünnungsmediums soll bei 7,2 ± 0,2 bleiben.

9 ml Verdünnungsmedium wurden in sterilen 13 ml Polystyrenröhrchen mit Eindrückstopfen vorgelegt. Die Röhrchen sowie CASO-Platten wurden für die Ausgangs-KbE-Bestimmung entsprechend beschriftet.

Kontroll-Messungen

Während des Neutralisationstests wurden jeweils zwei Kontroll-Messungen mit Aqua durchgeführt:

- **K1** als Kontrollmessung zur Wirkung des Neutralisators auf Prüforganismen in Abwesenheit der Prüfsubstanz; 1 ml-Röhrchen wurden mit 0,8 ml Lipofundin MCT 20 % + 0,1 ml Aqua befüllt,
- **K2** als Kontrollmessung ohne Inaktivator und ohne Prüfsubstanz: 1 ml-Röhrchen wurde mit 0,9 ml Trypton/NaCl befüllt.

Ansetzen der Lösungen

Für die Versuche wurden aus den CHX-, OCT- und PHMB-Stammlösungen die Zielkonzentrationen (für die verschiedenen Testorganismen), sogenannte Prüflösungen, vorbereitet.

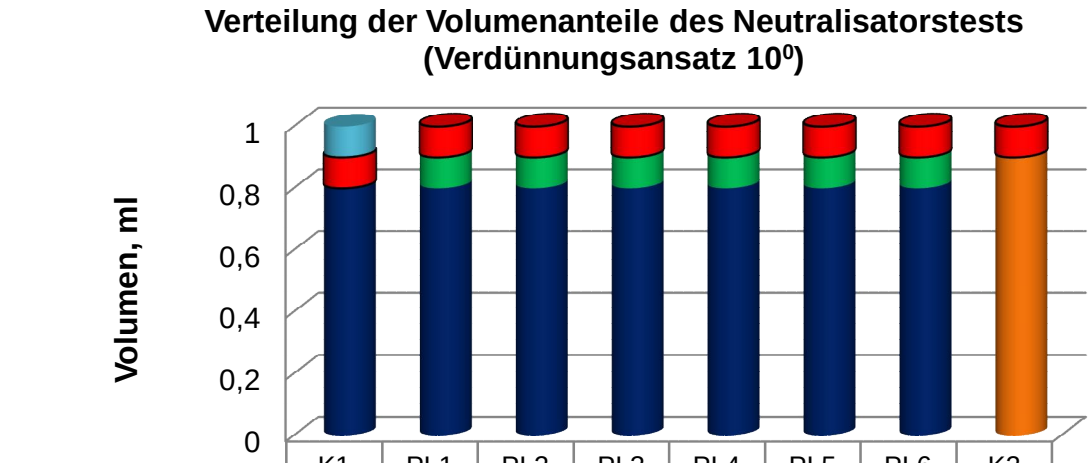
2.1.3 Durchführung des Neutralisationstests

Für alle fünf Testorganismen wurde das gleiche Durchführungsschema angewendet.

Als erstes wurden 0,8 ml Lipofundin MCT 20 % in sterilen 1 ml Röhrchen vorgelegt. Dazu wurden 0,1 ml Prüflösung bzw. 0,1 ml Aqua für die Kontrolle K1 hinzugefügt und durch Hin- und Herpipettieren gründlich gemischt.

Nach 5 min Kontaktzeit wurden 0,1 ml Prüfmikroorganismen mit 10^4 KbE/ml hinzugefügt und gut gemischt (Verdünnungsansatz 10^0). In der Abbildung 2 sind die Volumenanteile des Neutralisatortests für den Verdünnungsansatz 10^0 dargestellt.

Wiederum nach 5 min Kontaktzeit wurden eine weitere 1:10-Verdünnung in Lipofundin MCT 20 % bzw. Trypton/NaCl hergestellt, indem 0,1 ml aus dem Verdünnungsansatz 10^0 entnommen und in die Röhrchen mit 0,9 ml Lipofundin MCT 20 % oder Trypton/NaCl der nächsten Verdünnung 10^{-1} überführt und gut gemischt wurden. Anschließend wurde nach gleichem Schema der Verdünnungsansatz 10^{-2} hergestellt.



	K1	PL1	PL2	PL3	PL4	PL5	PL6	K2
Aquadest	0,1							
Bakteriensuspension	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Prüflösung		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	
Trypton/NaCL								0,9
Lipofundin	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	

Abb. 2: Balkendiagramm mit Volumenanteilen des Neutralisatortests für den Verdünnungsansatz 10^0.

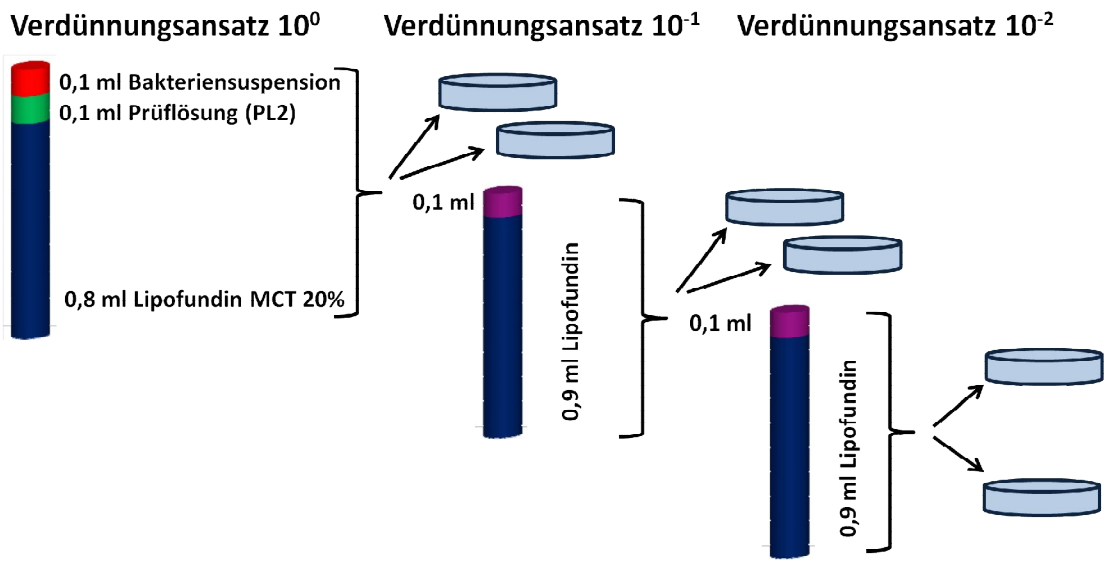


Abb. 3: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung für die Herstellung des Verdünnungsansatz 10^0-10^{-2} für den Neutralisatortest am Beispiel der Prüflösung PL2

Es wurden jeweils 2 CASO-Agarplatten mit je 0,1 ml aus den Verdünnungen 10^0, 10^{-1} und 10^{-2} ausplattiert (Abb. 3).

Zur Bestimmung der Ausgangs-KbE wurden von der jeweiligen Ausgangssuspension Verdünnungen von 10^{-1} bis 10^{-7} im Verdünnungsmedium für Bakterien und von 10^{-1} bis 10^{-5} im Verdünnungsmedium für *C. albicans* hergestellt. Danach wurden jeweils 0,1 ml der Verdünnungen 10^{-5}, 10^{-6} und 10^{-7} für Bakterien bzw. 10^{-3}, 10^{-4} und 10^{-5} für *C. albicans* als Doppel-Bestimmung auf CASO-Agarplatten ausgespatelt.

Die Platten werden bei 37 °C für 48 h bebrütet und anschließend mittels Koloniezählgerät ausgewertet (KbE). Für die Auswertung wurden die Verdünnungsstufen mit einer KbE-Zahl im Bereich zwischen 15 und 300 pro Platte ausgewählt.

Für eine erfolgreiche Neutralisierung soll gemäß DIN EN 137270 die Zahl überlebender Testorganismen nicht die Hälfte der Ausgangskoloniezahl (AKZ) unterschreiten:

$$\text{Gezählte KbE} \geq \frac{\text{AKZ}}{2}$$

Weil damit nur eine unvollständige Neutralisierung definiert ist, bietet sich als alternative Bewertungsmöglichkeit an, dass sich die Anzahl gezählter KbE nicht signifikant zwischen Neutralisation und K2 unterscheiden darf. Das wurde durch

Wiederholungsversuche abgeklärt. Die statistische Auswertung erfolgte unter Anwendung des U-Tests nach Mann und Whitney mit Hilfe der Statistik- und Graphik Software GraphPad Prism 5.0. Die Signifikanz ist in den Abbildungen eingetragen, wobei n die Anzahl der ausgewerteten Platten (Mittelwert aus je 2 Platten/Versuch) angibt. Es wurden ausschließlich die 10^0-Verdünnungen statistisch ausgewertet.

2.2 Ergebnisse

2.2.1 Auswertung der Versuche für *Escherichia coli*

In Tabelle 9 sind die Ergebnisse der Versuche für den Testorganismus *E. coli* mit CHX, OCT, PHMB und dem Inaktivator Lipofundin MCT 20 % eingetragen und in Abb. 4 - 6 graphisch dargestellt.

Der geforderte Signifikanz-Unterschied wird bei den Konzentrationen c_{CHX} = 2 mg/ml, c_{OCT} = 3 mg/ml, c_{PHMB} = 0,3 mg/ml erreicht. Die KbE-Zahl bei den Kontrollen ist annähernd identisch mit der AKZ.

Tab. 9: Gezählte KbE für *E. coli* mit den drei Wirkstoffen mit/ohne Lipofundin im Neutralisatortest

Parameter	Prüfkonz. [mg/ml]	Verd.-Stufe	Test 1 Platte1 [KbE]	Test 1 Platte1 [KbE]	Test 2 Platte1 [KbE]	Test 2 Platte2 [KbE]	Test 3 Platte1 [KbE]	Test 3 Platte2 [KbE]	Test 4 Platte1 [KbE]	Test 4 Platte2 [KbE]	Test 5 Platte1 [KbE]	Test 5 Platte2 [KbE]	KbE-Mw	Stab	Mw	Stab
AKZ	0	1,00E-05	153	148	118	112	154	157	156	154	148	151	145	16		
K1	0	1,00E+00	134	142	125	121	119	115	134	138	141	139	131	10	131	9
K2	0	1,00E+00	141	138	127	128	136	141	125	118	128	129	131	8		
CHX	2	1,00E+00	n.b.*	n.b.	119	114	126	132	139	127	132	126	127	8		
CHX	3	1,00E+00	n.b.	n.b.	108	113	122	116	89	77	117	122	108	16		
CHX	4	1,00E+00	128	125	119	111	113	118	67	61	100	98	104	23		
CHX	5	1,00E+00	121	123	71	68	71	79	35	28	49	52	70	32		
CHX	6	1,00E+00	112	114	65	68	55	59	24	26	41	45	61	31		
CHX	7	1,00E+00	n.b.	n.b.	32	35	16	20	9	11	32	36	24	11		
K1	0	1,00E+00	128	134	119	110	134	138	128	144	139	131	131	10	131	10
K2	0	1,00E+00	131	131	131	123	139	129	117	123	147	151	132	11		
OCT	2,5	1,00E+00	135	134	125	129	141	148	119	124	134	135	132	9		
OCT	3	1,00E+00	133	133	113	118	128	124	90	88	131	130	119	17		
OCT	3,5	1,00E+00	129	121	102	109	102	108	79	80	92	99	102	16		
OCT	4	1,00E+00	114	115	72	69	90	93	48	45	54	56	76	26		
OCT	4,5	1,00E+00	101	103	66	68	82	77	32	33	42	45	65	26		
OCT	5	1,00E+00	n.b.*	n.b.	17	14	42	39	15	17	17	14	22	12		
K1	0	1,00E+00	128	124	122	124	135	146	136	140	126	123	130	8	126	11
K2	0	1,00E+00	139	132	111	103	136	131	125	122	133	129	126	11		
PHMB	0,3	1,00E+00	135	133	117	113	125	121	125	121	123	125	124	7		
PHMB	0,4	1,00E+00	125	127	108	114	114	109	65	69	109	114	105	21		
PHMB	0,5	1,00E+00	124	119	104	98	102	99	66	60	88	90	95	20		
PHMB	0,6	1,00E+00	110	110	101	94	92	97	46	52	82	86	87	22		
PHMB	0,7	1,00E+00	94	88	89	94	77	85	18	20	81	80	73	29		
PHMB	0,8	1,00E+00	n.b.	n.b.	69	74	64	65	14	16	32	29	45	25		

* n.b. = nicht bestimmt

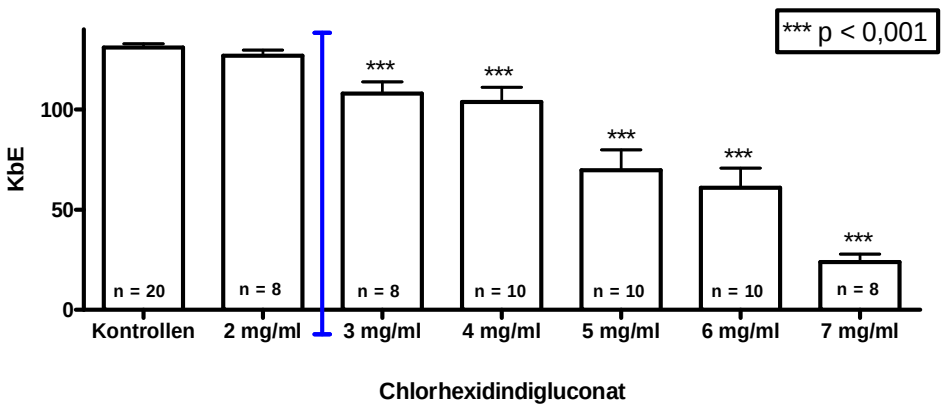


Abb. 4: Balkendiagramm der Ergebnisse des Neutralisatortests für CHX mit *E. coli*.

Bei diesem Testorganismus weist CHX eine desinfizierende Wirkung auf, wobei die mit (***)-gekennzeichneten Balken einen signifikanten Unterschied (p<0,001) zu den Kontrollen zeigen. Bei ansteigenden Konzentrationen von 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml und 7 mg/ml (rechts der blau markierten Signifikanzgrenze in Abb. 4) ist eine weitere Reduktion der Prüforganismen trotz Anwesenheit des Neutralisators zu beobachten, d.h. die Neutralisierung ist unvollständig. Bei der Konzentration 2 mg/ml (links vom blauen Strich) erfolgt eine Inaktivierung. Dies wird durch die Anzahl der weiterwachsenden Prüfkeime erklärt, die annähernd dem Wert der Kontrollen entspricht.

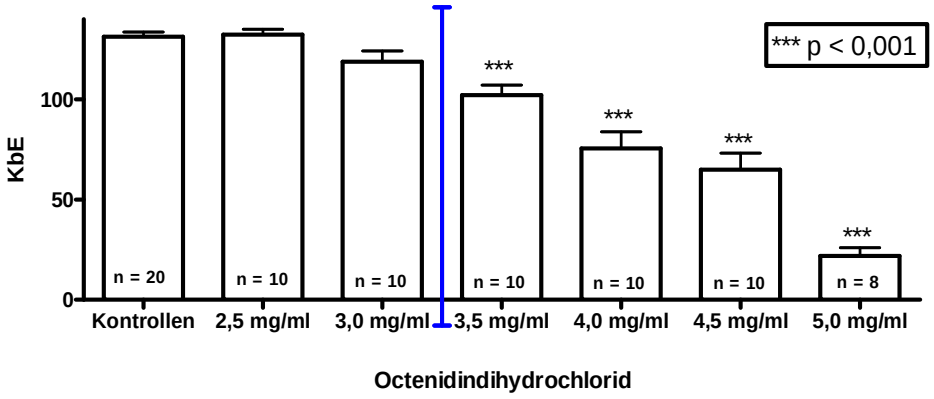


Abb. 5: Balkendiagramm der Ergebnisse des Neutralisatortests für OCT mit *E. coli*

Für *E. coli* weist OCT eine desinfizierende Wirkung auf, wobei die mit (***)-gekennzeichneten Balken einen signifikanten Unterschied (p<0,001) zu den Kontrollen zeigen. Bei ansteigenden Konzentrationen 3,5 mg/ml, 4 mg/ml, 4,5 mg/ml und 5 mg/ml (rechts vom blauen Strich in der Abb. 5) ist eine weitere Reduktion der Prüfkeime trotz der Anwesenheit des Inaktivators zu beobachten. Eine Inaktivierung hat nicht stattgefunden. Bei den Konzentrationen 2,5 mg/ml und 3 mg/ml (links vom blauen

Strich) erfolgt eine Inaktivierung. Dies wird durch die Anzahl der weiterwachsenden Prüfkeime erklärt, die annähernd dem Wert der Kontrollen entspricht.

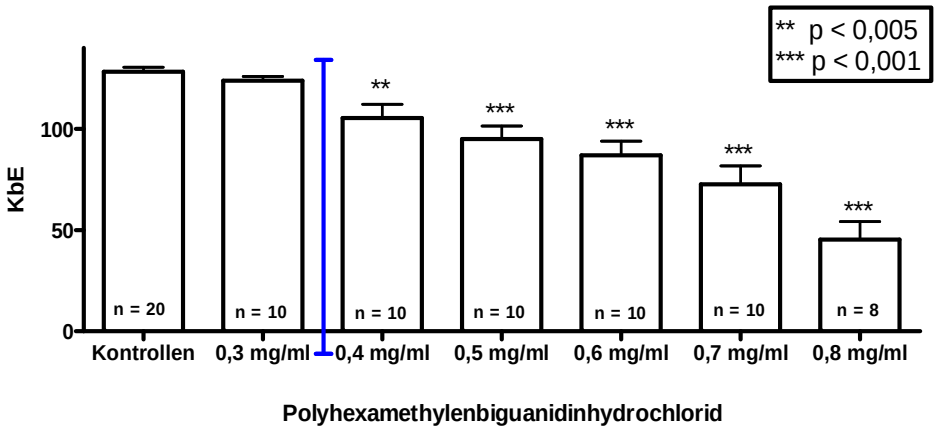


Abb. 6: Balkendiagramm der Ergebnisse des Neutralisatortests für PHMB mit *E. coli*

Für *E. coli* weist PHMB eine desinfizierende Wirkung auf, wobei die mit (**)-gekennzeichneten Balken einen signifikanten Unterschied (p<0,005) und mit (***)-gekennzeichneten Balken einen signifikanten Unterschied (p<0,001) zu den Kontrollen zeigen. Bei ansteigenden Konzentrationen 0,4 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,7 mg/ml und 0,8 mg/ml (rechts vom blauen Strich in der Abb. 6) ist eine weitere Reduktion der Prüfkeime trotz der Anwesenheit des Inaktivators zu beobachten. Eine Inaktivierung hat nicht stattgefunden. Bei der Konzentration 0,3 mg/ml (links vom blauen Strich) erfolgt eine Inaktivierung. Dies wird durch die Anzahl der weiterwachsenden Prüfkeime erklärt, die annähernd dem Wert der Kontrollen entspricht.

2.2.2 Auswertung der Versuche für Staphylococcus *aureus*

In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der Versuche für den Testorganismus *S. aureus* mit CHX, OCT, PHMB und dem Inaktivator Lipofundin MCT 20 % eingetragen und in Abb. 7 - 9 graphisch dargestellt.

Tab. 10: Gezählte KbE für *S. aureus* mit den drei Wirkstoffen mit/ohne Lipofundin im Neutralisatortest

Para-meter	Prüf-konz. [mg/ml]	Verd.-Stufe	Test 1 Platte1 [KbE]	Test 1 Platte2 [KbE]	Test 2 Platte1 [KbE]	Test 2 Platte2 [KbE]	Test 3 Platte1 [KbE]	Test 3 Platte2 [KbE]	Test 4 Platte1 [KbE]	Test 4 Platte2 [KbE]	Test 5 Platte1 [KbE]	Test 5 Platte2 [KbE]	KbE-Mw	Stab	Mw	Stab
AKZ	0	1,00E-05	145	166	136	167	198	218	145	148	187	194	170	28		
K1	0	1,00E+00	169	144	145	146	163	161	163	163	148	159	156	9	158	9
K2	0	1,00E+00	165	145	169	178	151	159	154	166	159	162	161	9		
CHX	4	1,00E+00	146	143	152	145	158	149	169	174	147	154	154	10		
CHX	5	1,00E+00	135	137	135	146	158	151	171	162	137	133	147	13		
CHX	6	1,00E+00	129	136	149	133	150	142	134	149	127	124	137	10		
CHX	7	1,00E+00	124	127	143	126	148	149	112	121	125	124	130	12		
CHX	8	1,00E+00	83	98	120	108	110	129	88	93	110	116	106	15		
CHX	9	1,00E+00	47	43	68	65	65	70	76	67	79	89	67	14		
K1	0	1,00E+00	161	163	149	152	178	188	144	162	183	162	164	15	163	14
K2	0	1,00E+00	157	150	181	171	152	141	152	159	179	181	162	15		
OCT	0,05	1,00E+00	156	146	161	181	176	195	204	196	161	158	173	20		
OCT	0,1	1,00E+00	148	152	162	165	183	192	167	179	144	157	165	16		
OCT	0,15	1,00E+00	138	135	169	173	154	160	99	117	119	117	138	25		
OCT	0,2	1,00E+00	129	123	161	176	69	74	78	90	68	57	103	42		
OCT	0,25	1,00E+00	125	118	165	159	39	43	61	63	47	42	86	50		
OCT	0,3	1,00E+00	105	94	85	94	24	25	16	20	12	14	49	40		
K1	0	1,00E+00	174	188	163	164	211	223	134	144	160	154	172	28	166	20
K2	0	1,00E+00	171	163	173	178	194	189	133	139	163	157	166	20		
PHMB	0,5	1,00E+00	143	135	147	158	186	196	142	146	142	137	153	21		
PHMB	0,6	1,00E+00	141	136	152	163	183	181	143	141	139	136	152	18		
PHMB	0,7	1,00E+00	136	124	146	143	203	186	138	132	131	136	148	26		
PHMB	0,8	1,00E+00	108	116	132	134	121	128	137	131	137	131	128	10		
PHMB	0,9	1,00E+00	102	103	135	141	104	112	128	126	132	128	121	15		
PHMB	1	1,00E+00	93	98	107	119	103	96	121	123	120	126	111	13		

Der geforderte Signifikanz-Unterschied wird bei den Konzentrationen c_{CHX} = 4 mg/ml, c_{OCT} = 0,1 mg/ml, c_{PHMB} = 0,6 mg/ml erreicht. Die Keimzahl bei den Kontrollen ist annähernd identisch mit der AKZ.

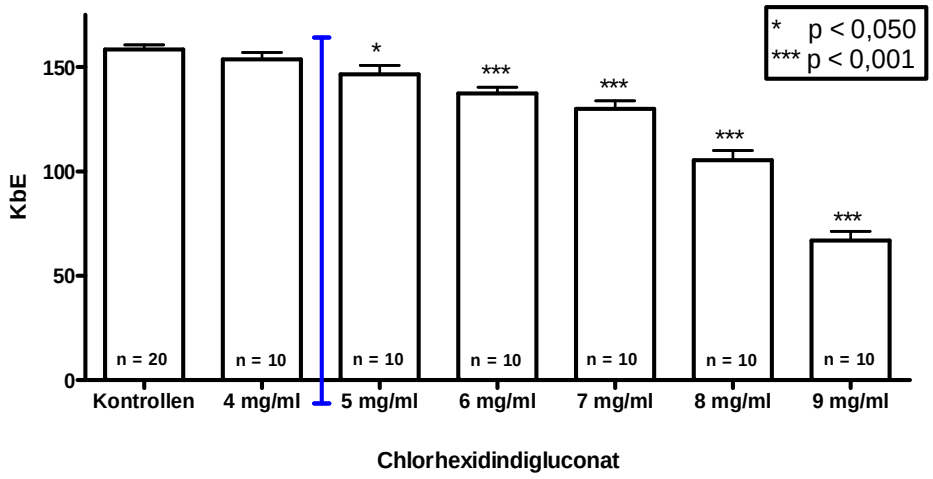


Abb. 7: Balkendiagramm der Ergebnisse des Neutralisatortests für CHX mit *S. aureus*

Bei diesem Testorganismus weist CHX eine desinfizierende Wirkung auf, wobei die mit (*)-gekennzeichneten Balken einen signifikanten Unterschied (p<0,05) und mit (***)-gekennzeichneten Balken einen signifikanten Unterschied (p<0,001) zu den Kontrollen zeigen. Bei ansteigenden Konzentrationen 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml und 9 mg/ml (rechts vom blauen Strich in der Abb. 7) ist eine weitere Reduktion der Prüfkeime trotz der Anwesenheit des Inaktivators zu beobachten. Eine Inaktivierung hat nicht stattgefunden. Bei der Konzentration 4 mg/ml (links vom blauen Strich) erfolgt eine Inaktivierung. Dies wird durch die Anzahl der weiterwachsenden Prüfkeime erklärt, die annähernd dem Wert der Kontrollen entspricht.

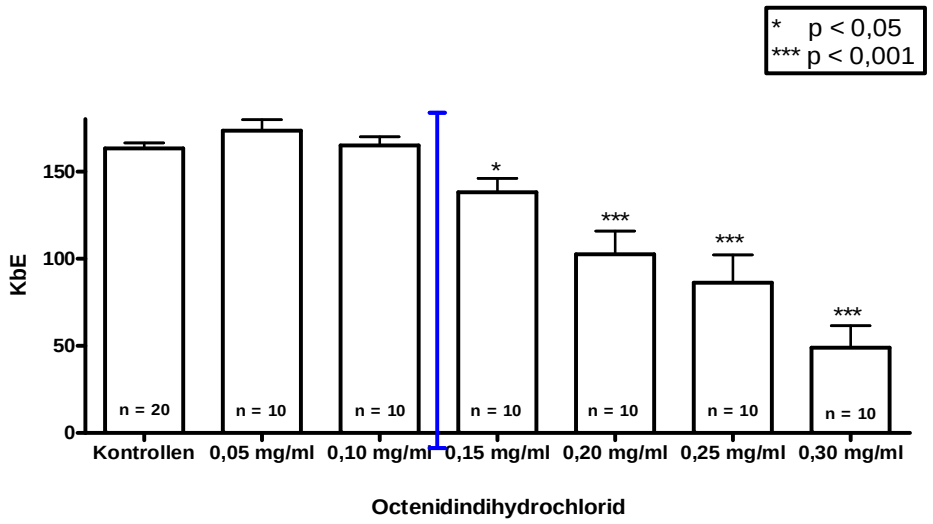


Abb. 8: Balkendiagramm der Ergebnisse des Neutralisatortests für OCT mit *S. aureus*

Für *S. aureus* weist OCT eine desinfizierende Wirkung auf, wobei die mit (*)-gekennzeichneten Balken einen signifikanten Unterschied (p<0,05) und mit (***)-

gekennzeichneten Balken einen signifikanten Unterschied (p<0,001) zu den Kontrollen zeigen. Bei ansteigenden Konzentrationen 0,15 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,25 mg/ml und 0,3 mg/ml (rechts vom blauen Strich in der Abb. 8) ist eine weitere Reduktion der Prüfkeime trotz der Anwesenheit des Inaktivators zu beobachten. Eine Inaktivierung hat nicht stattgefunden. Bei den Konzentrationen 0,05 mg/ml und 0,1 mg/ml (links vom blauen Strich) erfolgt eine Inaktivierung. Dies wird durch die Anzahl der weiterwachsenden Prüfkeime erklärt, die annähernd dem Wert der Kontrollen entspricht.

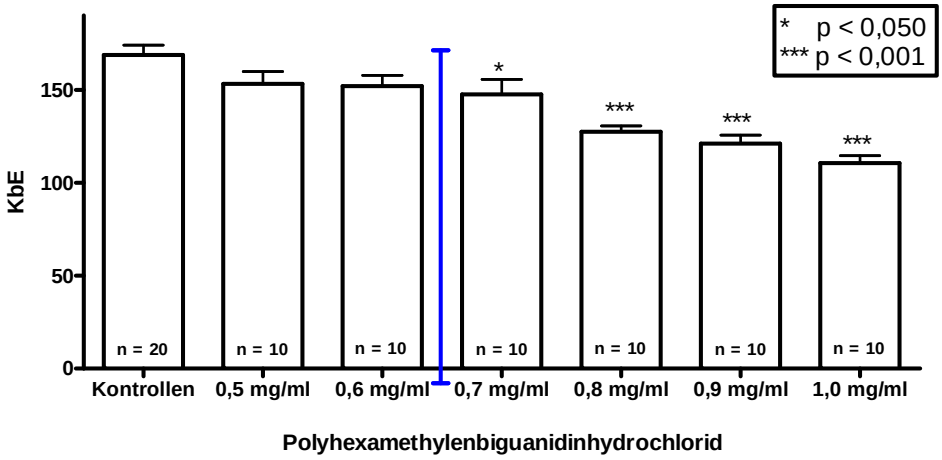


Abb. 9: Balkendiagramm der Ergebnisse des Neutralisatortests für PHMB mit *S. aureus*

Für *S. aureus* weist PHMB eine desinfizierende Wirkung auf, wobei die mit (*)-gekennzeichneten Balken einen signifikanten Unterschied (p<0,05) und mit (***)-gekennzeichneten Balken einen signifikanten Unterschied (p<0,001) zu den Kontrollen zeigen. Bei ansteigenden Konzentrationen 0,7 mg/ml, 0,8 mg/ml, 0,9 mg/ml und 1,0 mg/ml (rechts vom blauen Strich in der Abb. 9) ist eine weitere Reduktion der Prüfkeime trotz der Anwesenheit des Inaktivators zu beobachten. Eine Inaktivierung hat nicht stattgefunden. Bei den Konzentrationen 0,5 mg/ml und 0,6 mg/ml (links vom blauen Strich) erfolgt eine Inaktivierung. Dies wird durch die Anzahl der weiterwachsenden Prüfkeime erklärt, die annähernd dem Wert der Kontrollen entspricht.

2.2.3 Auswertung der Versuche für *Enterococcus hirae*

In Tabelle 11 sind die Ergebnisse der Versuche für den Testorganismus *E. hirae* mit CHX, OCT, PHMB und dem Inaktivator Lipofundin MCT 20 % eingetragen und in Abb. 10 - 12 graphisch dargestellt.

Tab. 11: Gezählte KbE für *E. hirae* mit den drei Wirkstoffen mit/ohne Lipofundin im Neutralisatortest

Para-meter	Prüf-konz. [mg/ml]	Verd.-Stufe	Test 1 Platte1 [KbE]	Test 1 Platte2 [KbE]	Test 2 Platte1 [KbE]	Test 2 Platte2 [KbE]	Test 3 Platte1 [KbE]	Test 3 Platte2 [KbE]	Test 4 Platte1 [KbE]	Test 4 Platte2 [KbE]	Test 5 Platte1 [KbE]	Test 5 Platte2 [KbE]	KbE-Mw	Stab	Mw	Stab
AKZ	0	1,00E-05	118	115	106	105	134	149	166	161	125	117	130	22		
K1	0	1,00E+00	103	102	119	106	125	144	142	135	112	116	120	16	120	16
K2	0	1,00E+00	111	106	129	121	145	117	138	136	92	105	120	17		
CHX	8	1,00E+00	n.b.*	n.b.	99	103	147	139	144	137	127	122	127	18		
CHX	9	1,00E+00	n.b.	n.b.	114	106	119	129	142	134	120	111	122	12		
CHX	10	1,00E+00	n.b.	n.b.	109	102	102	101	128	122	115	117	112	10		
CHX	11	1,00E+00	n.b.	n.b.	98	100	97	87	121	118	103	112	105	12		
CHX	12	1,00E+00	n.b.	n.b.	88	93	73	79	103	107	101	105	94	13		
CHX	13	1,00E+00	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	50	57	73	80	76	75	69	12		
K1	0	1,00E+00	96	97	124	129	108	104	133	134	112	107	114	14	117	19
K2	0	1,00E+00	89	94	125	137	106	113	154	154	111	114	120	23		
OCT	3	1,00E+00	92	99	112	118	104	109	134	128	118	121	114	13		
OCT	3,5	1,00E+00	90	96	94	99	97	95	119	123	110	113	104	12		
OCT	4	1,00E+00	82	89	76	79	86	90	112	117	98	101	93	14		
OCT	4,5	1,00E+00	80	82	64	70	52	49	95	98	86	83	76	17		
OCT	5	1,00E+00	38	39	31	33	46	44	58	61	79	77	51	17		
OCT	5,5	1,00E+00	15	18	17	18	24	28	36	38	71	67	33	20		
K1	0	1,00E+00	104	112	135	132	113	110	112	110	118	112	116	10	122	6
K2	0	1,00E+00	118	117	118	123	114	126	125	120	126	136	122	6		
PHMB	1	1,00E+00	109	117	120	127	115	116	133	129	132	143	124	10		
PHMB	1,2	1,00E+00	85	93	88	93	105	102	120	111	121	123	104	14		
PHMB	1,4	1,00E+00	89	94	94	88	91	100	112	105	123	119	102	13		
PHMB	1,6	1,00E+00	72	65	83	78	81	84	101	95	99	96	85	12		
PHMB	1,8	1,00E+00	54	57	53	54	74	79	91	87	92	87	73	17		
PHMB	2	1,00E+00	34	31	37	40	68	65	80	74	67	72	57	19		

* n.b. = nicht bestimmt

Der geforderte Signifikanz-Unterschied wird bei den Konzentrationen c_{CHX} = 10 mg/ml, c_{OCT} = 3,5 mg/ml, c_{PHMB} = 1 mg/ml erreicht. Die Keimzahl bei den Kontrollen ist annähernd identisch mit der AKZ.

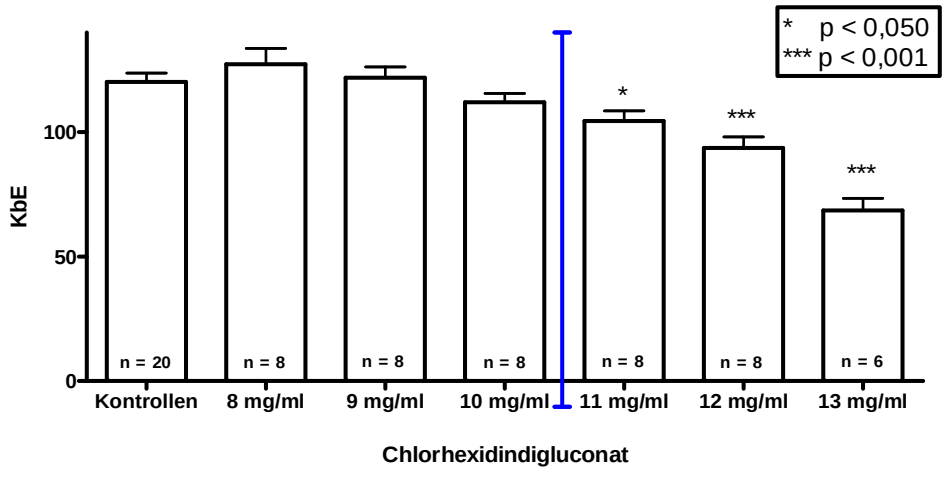


Abb. 10: Balkendiagramm der Ergebnisse des Neutralisatortests für CHX mit *E. hirae*

Bei diesem Testorganismus weist CHX eine desinfizierende Wirkung auf, wobei die mit (*)-gekennzeichneten Balken einen signifikanten Unterschied (p<0,05) und mit (***)-gekennzeichneten Balken einen signifikanten Unterschied (p<0,001) zu den Kontrollen zeigen. Bei ansteigenden Konzentrationen 11 mg/ml, 12 mg/ml und 13 mg/ml (rechts vom blauen Strich in der Abb. 10) ist eine weitere Reduktion der Prüfkeime trotz der Anwesenheit des Inaktivators zu beobachten. Eine Inaktivierung hat nicht stattgefunden. Bei den Konzentrationen 8 mg/ml, 9 mg/ml und 10 mg/ml (links vom blauen Strich) erfolgt eine Inaktivierung. Dies wird durch die Anzahl der weiterwachsenden Prüfkeime erklärt, die annähernd dem Wert der Kontrollen entspricht.

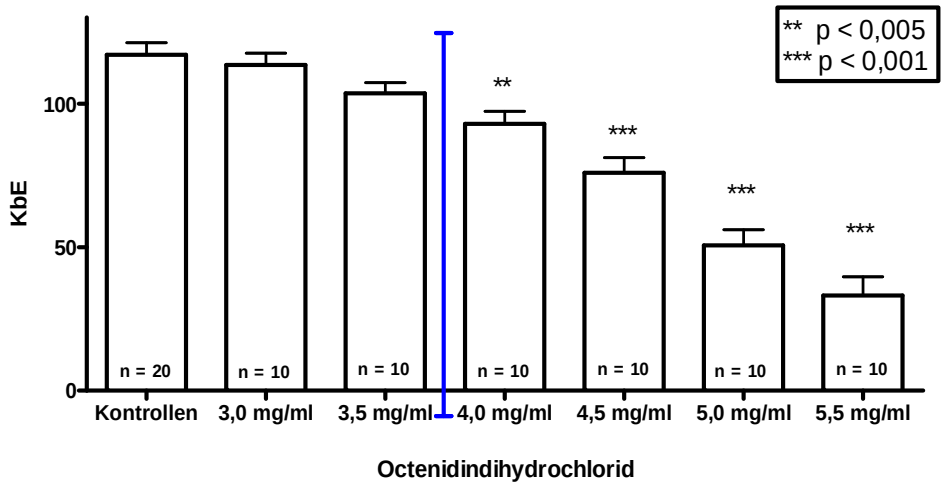


Abb. 11: Balkendiagramm der Ergebnisse des Neutralisatortests für OCT mit *E. hirae*

Für *E. hirae* weist OCT eine desinfizierende Wirkung auf, wobei die mit (**)-gekennzeichneten Balken einen signifikanten Unterschied (p<0,005) und mit (***)-

gekennzeichneten Balken einen signifikanten Unterschied (p<0,001) zu den Kontrollen zeigen. Bei ansteigenden Konzentrationen 4 mg/ml, 4,5 mg/ml, 5 mg/ml und 5,5 mg/ml (rechts vom blauen Strich in der Abb. 11) ist eine weitere Reduktion der Prüfkeime trotz der Anwesenheit des Inaktivators zu beobachten. Eine Inaktivierung hat nicht stattgefunden. Bei den Konzentrationen 3 mg/ml und 3,5 mg/ml (links vom blauen Strich) erfolgt eine Inaktivierung. Dies wird durch die Anzahl der weiterwachsenden Prüfkeime erklärt, die annähernd dem Wert der Kontrollen entspricht.

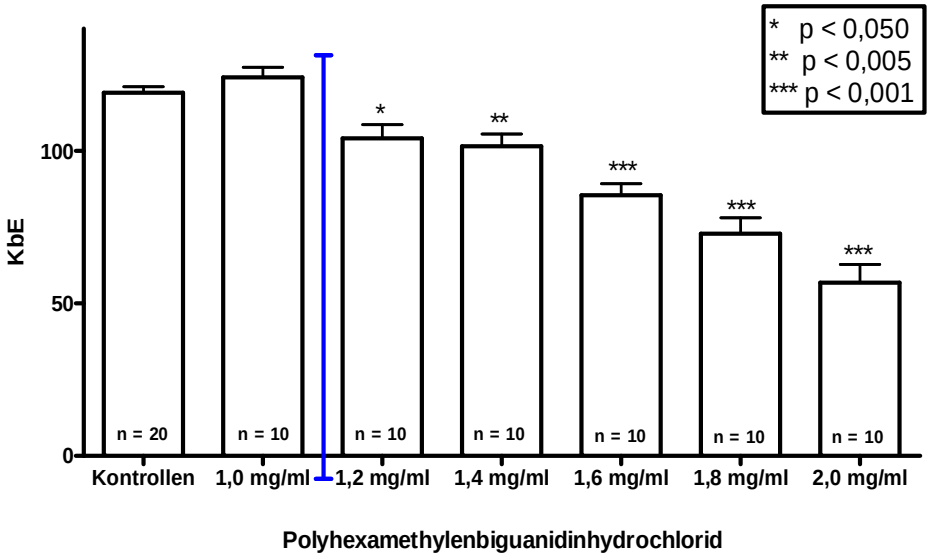


Abb. 12: Balkendiagramm der Ergebnisse des Neutralisatortests für PHMB mit *E. hirae*

Für *E. hirae* weist PHMB eine desinfizierende Wirkung auf, wobei die mit (*)-gekennzeichneten Balken einen signifikanten Unterschied (p<0,05), die mit (**)-gekennzeichneten Balken einen signifikanten Unterschied (p<0,005) und mit (***)-gekennzeichneten Balken einen signifikanten Unterschied (p<0,001) zu den Kontrollen zeigen. Bei ansteigenden Konzentrationen 1,2 mg/ml, 1,4 mg/ml, 1,6 mg/ml, 1,8 mg/ml und 2,0 mg/ml (rechts vom blauen Strich in der Abb. 12) ist eine weitere Reduktion der Prüfkeime trotz der Anwesenheit des Inaktivators zu beobachten. Eine Inaktivierung hat nicht stattgefunden. Bei der Konzentration 1 mg/ml (links vom blauen Strich) erfolgt eine Inaktivierung. Dies wird durch die Anzahl der weiterwachsenden Prüfkeime erklärt, die annähernd dem Wert der Kontrollen entspricht.

2.2.4 Auswertung der Versuche für *Pseudomonas aeruginosa*

Tab. 12: Gezählte KbE für *P. aeruginosa* mit den drei Wirkstoffen mit/ohne Lipofundin im Neutralisatortest

Para-meter	Prüf-konz. [mg/ml]	Verd.-Stufe	Test 1 Platte1 [KbE]	Test 1 Platte2 [KbE]	Test 2 Platte1 [KbE]	Test 2 Platte2 [KbE]	Test 3 Platte1 [KbE]	Test 3 Platte2 [KbE]	Test 4 Platte1 [KbE]	Test 4 Platte2 [KbE]	Test 5 Platte1 [KbE]	Test 5 Platte2 [KbE]	KbE-Mw	Stab	Mw	Stab
AKZ	0	1,00E-05	280	262	276	301	295	275	208	212	220	219	255	36		
K1	0	1,00E+00	219	219	199	220	204	205	239	249	249	249	225	20	230	18
K2	0	1,00E+00	241	261	222	232	216	220	225	235	245	252	235	15		
CHX	6	1,00E+00	n.b.*	n.b.	221	212	238	235	239	249	286	289	246	28		
CHX	7	1,00E+00	251	272	212	229	218	232	231	240	266	271	242	22		
CHX	8	1,00E+00	237	236	205	206	205	198	223	237	253	261	226	22		
CHX	9	1,00E+00	224	222	198	209	194	197	221	226	218	222	213	12		
CHX	10	1,00E+00	n.b.	n.b.	156	146	136	144	149	158	155	162	151	9		
CHX	11	1,00E+00	n.b.	n.b.	83	88	98	92	119	116	112	109	102	14		
K1	0	1,00E+00	203	220	214	228	283	274	303	286	252	257	252	34	249	29
K2	0	1,00E+00	219	218	218	228	286	267	267	249	253	251	246	24		
OCT	3	1,00E+00	242	239	255	242	254	274	310	301	247	257	262	25		
OCT	4	1,00E+00	233	251	248	251	242	268	297	299	260	266	262	22		
OCT	5	1,00E+00	254	248	254	247	255	262	260	247	251	256	253	5		
OCT	6	1,00E+00	234	227	243	255	203	187	120	125	232	231	206	48		
OCT	7	1,00E+00	195	195	136	148	140	132	112	107	187	179	153	33		
OCT	8	1,00E+00	133	118	24	21	46	54	56	60	68	66	65	36		
K1	0	1,00E+00	213	210	213	210	232	228	238	256	248	249	230	18	219	9
K2	0	1,00E+00	219	205	214	214	208	221	223	223	225	234	219	9		
PHMB	1	1,00E+00	n.b.	n.b.	226	214	236	248	229	225	238	237	232	10		
PHMB	1,1	1,00E+00	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	157	159	209	214	223	219	197	30		
PHMB	1,2	1,00E+00	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	105	119	198	190	192	204	168	44		
PHMB	1,3	1,00E+00	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	63	68	163	174	153	169	132	52		
PHMB	1,4	1,00E+00	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	52	56	85	101	132	123	92	33		
PHMB	1,5	1,00E+00	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	41	36	26	29	44	57	39	11		

* n.b. = nicht bestimmt

In der Tabelle 12 sind die Ergebnisse der Versuche für den Testorganismus *P. aeruginosa* mit CHX, OCT, PHMB und dem Inaktivator Lipofundin MCT 20 % eingetragen und in Abb. 13 - 15 graphisch dargestellt.

Der geforderte Signifikanz-Unterschied wird bei den Konzentrationen c_{CHX} = 8 mg/ml, c_{OCT} = 5 mg/ml, c_{PHMB} = 1,1 mg/ml erreicht. Die Keimzahl bei den Kontrollen ist annähernd identisch mit der AKZ.

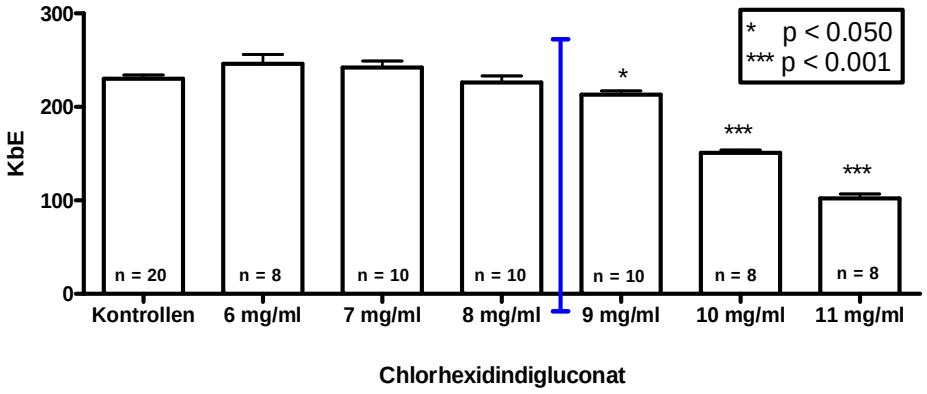


Abb. 13: Balkendiagramm der Ergebnisse des Neutralisatortests für CHX mit *P. aeruginosa*.

Bei diesem Testorganismus weist CHX eine desinfizierende Wirkung auf, wobei die mit (*)-gekennzeichneten Balken einen signifikanten Unterschied (p<0,05) und mit (***)-gekennzeichneten Balken einen signifikanten Unterschied (p<0,001) zu den Kontrollen zeigen. Bei ansteigenden Konzentrationen 9 mg/ml, 10 mg/ml und 11 mg/ml (rechts vom blauen Strich in der Abb. 13) ist eine weitere Reduktion der Prüfkeime trotz der Anwesenheit des Inaktivators zu beobachten. Eine Inaktivierung hat nicht stattgefunden. Bei den Konzentrationen 6 mg/ml, 7 mg/ml und 8 mg/ml (links vom blauen Strich) erfolgt eine Inaktivierung. Dies wird durch die Anzahl der weiterwachsenden Prüfkeime erklärt, die annähernd dem Wert der Kontrollen entspricht.

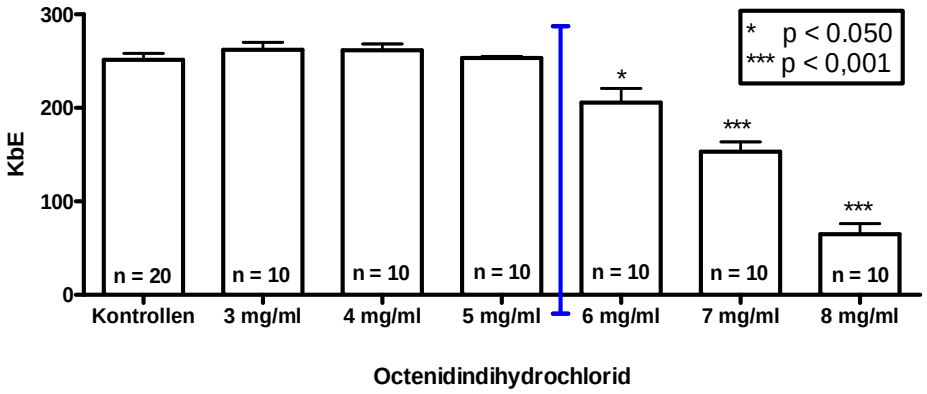


Abb. 14: Balkendiagramm der Ergebnisse des Neutralisatortests für OCT mit *P. aeruginosa*.

Für *P. aeruginosa* weist OCT eine desinfizierende Wirkung auf, wobei die mit (*)-gekennzeichneten Balken einen signifikanten Unterschied (p<0,05) und mit (***)-gekennzeichneten Balken einen signifikanten Unterschied (p<0,001) zu den Kontrollen

zeigen. Bei ansteigenden Konzentrationen 6 mg/ml, 7 mg/ml und 8 mg/ml (rechts vom blauen Strich in der Abb. 14) ist eine weitere Reduktion der Prüfkeime trotz der Anwesenheit des Inaktivators zu beobachten. Eine Inaktivierung hat nicht stattgefunden. Bei den Konzentrationen 3 mg/ml, 4 mg/ml und 5 mg/ml (links vom blauen Strich) erfolgt eine Inaktivierung. Dies wird durch die Anzahl der weiterwachsenden Prüfkeime erklärt, die annähernd dem Wert der Kontrollen entspricht.

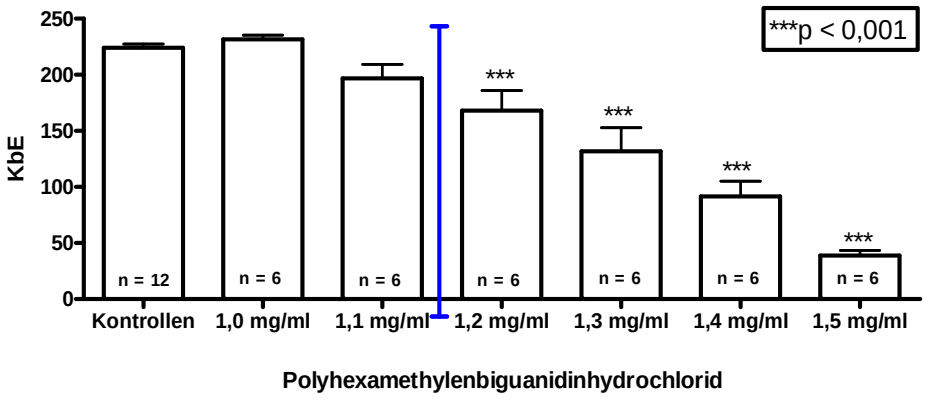


Abb. 15: Balkendiagramm der Ergebnisse des Neutralisatortests für PHMB *P. aeruginosa*.

Für *P. aeruginosa* weist PHMB eine desinfizierende Wirkung auf, wobei die mit (***)-gekennzeichneten Balken einen signifikanten Unterschied (p<0,001) zu den Kontrollen zeigen. Bei ansteigenden Konzentrationen 1,2 mg/ml, 1,3 mg/ml, 1,4 mg/ml und 1,5 mg/ml (rechts vom blauen Strich in der Abb. 15) ist eine weitere Reduktion der Prüfkeime trotz der Anwesenheit des Inaktivators zu beobachten. Eine Inaktivierung hat nicht stattgefunden. Bei den Konzentrationen 1 mg/ml und 1,1 mg/ml (links vom blauen Strich) erfolgt eine Inaktivierung. Dies wird durch die Anzahl der weiterwachsenden Prüfkeime erklärt, die annähernd dem Wert der Kontrollen entspricht.

2.2.5 Auswertung der Versuche für *Candida albicans*

Tab. 13: Gezählte KbE für *C. albicans* mit den drei Wirkstoffen mit/ohne Lipofundin im Neutralisatortest

Para-meter	Prüf-konz. [mg/ml]	Verd.-Stufe	Test 1 Platte1 [KbE]	Test 1 Platte2 [KbE]	Test 2 Platte1 [KbE]	Test 2 Platte2 [KbE]	Test 3 Platte1 [KbE]	Test 3 Platte2 [KbE]	Test 4 Platte1 [KbE]	Test 4 Platte2 [KbE]	Test 5 Platte1 [KbE]	Test 5 Platte2 [KbE]	KbE-Mw	Stab	Mw	Stab
AKZ	0	1,00E-05	139	137	165	175	159	148	126	131	124	126	143	18		
K1	0	1,00E+00	132	138	132	138	147	154	116	114	124	126	132	13	133	13
K2	0	1,00E+00	126	120	148	139	152	146	116	110	132	141	133	14		
CHX	7	1,00E+00	123	125	168	153	147	146	123	120	127	123	136	17		
CHX	8	1,00E+00	125	129	156	155	143	144	124	118	130	129	135	13		
CHX	9	1,00E+00	120	121	137	138	138	142	127	121	127	131	130	8		
CHX	10	1,00E+00	122	119	117	125	134	132	109	114	118	115	121	8		
CHX	11	1,00E+00	110	105	82	87	64	72	68	69	102	104	86	18		
CHX	12	1,00E+00	64	60	23	26	42	44	40	36	42	48	43	13		
K1	0	1,00E+00	118	127	134	134	139	148	102	110	125	118	126	14	126	15
K2	0	1,00E+00	125	119	127	118	151	157	101	106	126	130	126	17		
OCT	0,8	1,00E+00	115	118	143	140	142	147	114	111	123	121	127	14		
OCT	0,9	1,00E+00	119	122	149	152	141	141	108	114	120	124	129	15		
OCT	1,0	1,00E+00	115	116	144	136	141	146	107	105	122	119	125	15		
OCT	1,1	1,00E+00	117	117	137	133	143	142	97	94	125	121	123	17		
OCT	1,2	1,00E+00	98	94	127	123	118	117	88	92	120	122	110	15		
OCT	1,3	1,00E+00	74	81	110	104	107	103	62	66	99	109	92	19		
K1	0	1,00E+00	131	135	132	139	153	149	116	118	113	117	130	14	130	16
K2	0	1,00E+00	123	125	136	134	154	159	120	127	110	113	130	16		
PHMB	1,4	1,00E+00	124	125	147	143	128	129	114	120	145	147	132	12		
PHMB	1,5	1,00E+00	111	116	145	144	127	124	105	107	140	143	126	16		
PHMB	1,6	1,00E+00	108	113	146	146	128	126	89	85	117	116	117	21		
PHMB	1,7	1,00E+00	114	114	130	134	115	114	79	84	106	100	109	18		
PHMB	1,8	1,00E+00	102	95	109	116	107	101	46	42	86	92	90	26		
PHMB	1,9	1,00E+00	81	80	59	64	67	66	32	35	76	71	63	17		

In der Tabelle 13 sind die Ergebnisse der Versuche für den Testorganismus *C. albicans* mit CHX, OCT, PHMB und dem Inaktivator Lipofundin MCT 20 % eingetragen und in Abb. 16 - 18 graphisch dargestellt.

Der geforderte Signifikanz-Unterschied wird bei den Konzentrationen c_{CHX} = 9 mg/ml, c_{OCT} = 1,1 mg/ml, c_{PHMB} = 1,6 mg/ml erreicht. Die Keimzahl bei den Kontrollen ist annähernd identisch mit der AKZ.

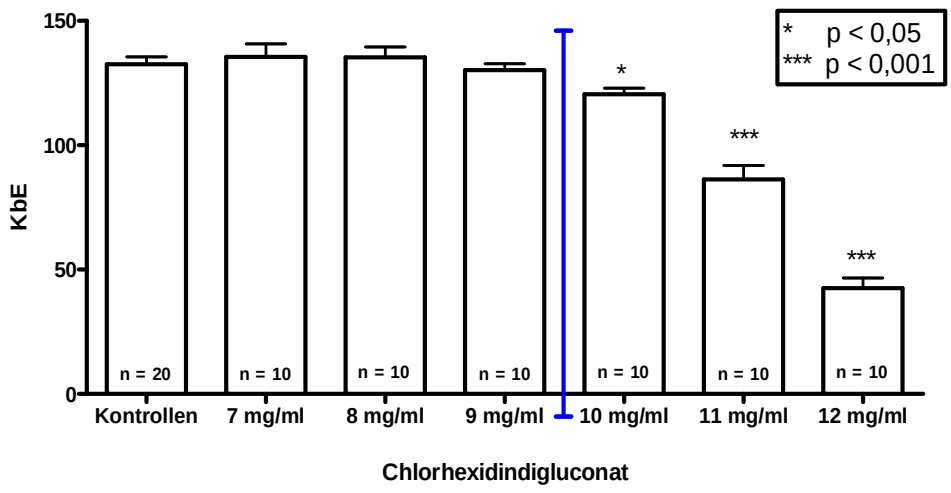


Abb. 16: Balkendiagramm der Ergebnisse des Neutralisatortests für CHX *C. albicans*

Bei diesem Testorganismus weist CHX eine desinfizierende Wirkung auf, wobei die mit (*)-gekennzeichneten Balken einen signifikanten Unterschied (p<0,05) und mit (***)-gekennzeichneten Balken einen signifikanten Unterschied (p<0,001) zu den Kontrollen zeigen. Bei ansteigenden Konzentrationen 10 mg/ml, 11 mg/ml und 12 mg/ml (rechts vom blauen Strich in der Abb. 16) ist eine weitere Reduktion der Prüfkeime trotz der Anwesenheit des Inaktivators zu beobachten. Eine Inaktivierung hat nicht stattgefunden. Bei den Konzentrationen 7 mg/ml, 8 mg/ml und 9 mg/ml (links vom blauen Strich) erfolgt eine Inaktivierung. Dies wird durch die Anzahl der weiterwachsenden Prüfkeime erklärt, die annähernd dem Wert der Kontrollen entspricht.

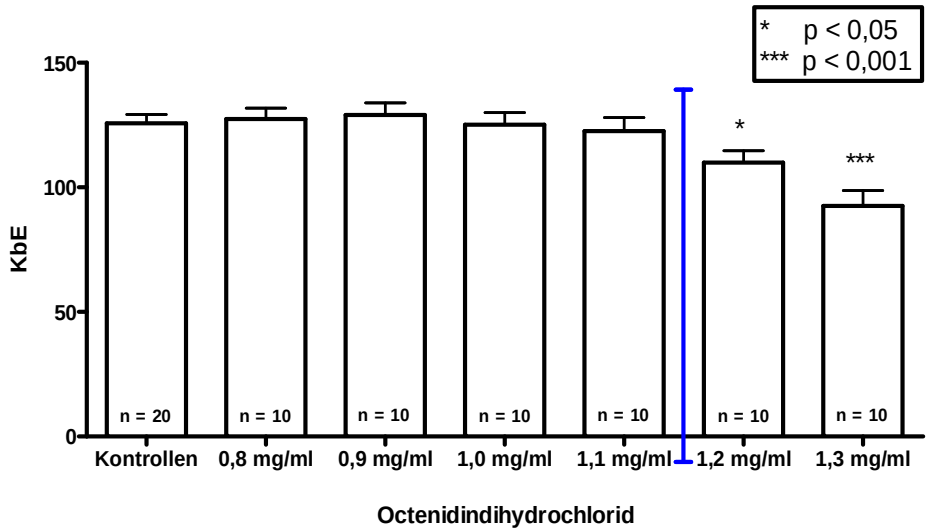


Abb. 17: Balkendiagramm der Ergebnisse des Neutralisatortests für OCT *C. albicans*

Für *C. albicans* weist OCT eine desinfizierende Wirkung auf, wobei die mit (*)-gekennzeichneten Balken einen signifikanten Unterschied (p<0,05) und mit (***)-gekennzeichneten Balken einen signifikanten Unterschied (p<0,001) zu den Kontrollen zeigen. Bei den Konzentrationen 1,2 mg/ml und 1,3 mg/ml (rechts vom blauen Strich in der Abb. 17) ist eine weitere Reduktion der Prüfkeime trotz der Anwesenheit des Inaktivators zu beobachten. Eine Inaktivierung hat nicht stattgefunden. Bei den Konzentrationen 0,8 mg/ml, 0,9 mg/ml, 1,0 mg/ml und 1,1 mg/ml (links vom blauen Strich) erfolgt eine Inaktivierung. Dies wird durch die Anzahl der weiterwachsenden Prüfkeime erklärt, die annähernd dem Wert der Kontrollen entspricht.

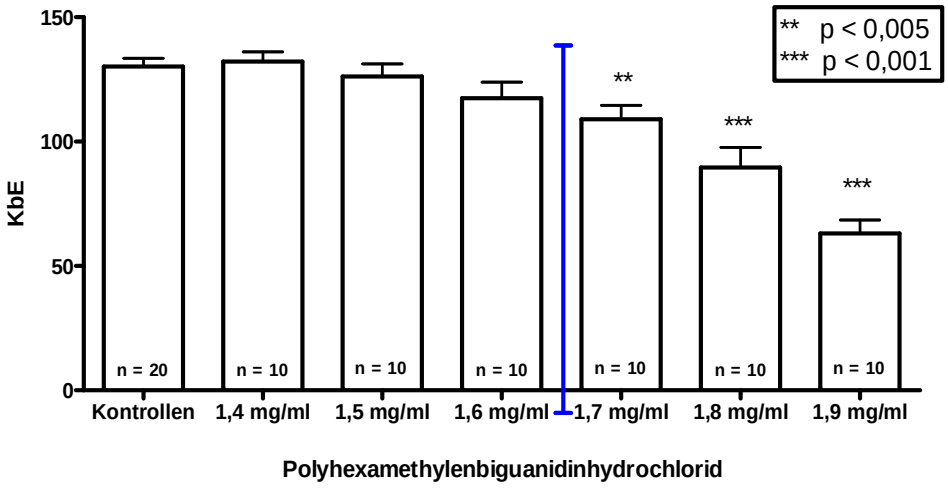


Abb. 18: Balkendiagramm der Ergebnisse des Neutralisatortests für PHMB *C. albicans*

Für *C. albicans* weist PHMB eine desinfizierende Wirkung auf, wobei die mit (**)-gekennzeichneten Balken einen signifikanten Unterschied (p<0,005) und mit (***)-gekennzeichneten Balken einen signifikanten Unterschied (p<0,001) zu den Kontrollen zeigen. Bei den Konzentrationen 1,7 mg/ml, 1,8 mg/ml und 1,9 mg/ml (rechts vom blauen Strich in der Abb. 18) ist eine weitere Reduktion der Prüfkeime trotz der Anwesenheit des Inaktivators zu beobachten. Eine Inaktivierung hat nicht stattgefunden. Bei den Konzentrationen 1,4 mg/ml, 1,5 mg/ml und 1,6 mg/ml (links vom blauen Strich) erfolgt eine Inaktivierung. Dies wird durch die Anzahl der weiterwachsenden Prüfkeime erklärt, die annähernd dem Wert der Kontrollen entspricht.

2.2.6 Maximale zu neutralisierende Wirkstoffkonzentration [%]

Die Ergebnisse des durchgeführten Neutralisatortests zeigen je nach Testorganismus unterschiedliche Neutralisierungsgrenzen. In Tabelle 14 sind die entsprechenden maximalen Wirkstoffkonzentrationen für die zu prüfenden DM zusammengefasst.

Tab. 14: Vergleich der Neutralisierungsgrenzen gemäß DIN EN 13727 und gemäß Signifikanzvergleich zur Kontrolle K2

Wirkstoff	***Escherichia coli***	***Staphylococcus aureus***	***Enterococcus hirae***	***Pseudomonas aeruginosa***	***Candida albicans***
CHX					
DIN EN	0,4 %	0,8 %	1,3 %	1,0 %	1,1 %
zu K2	0,2 %	0,4 %	1,0 %	0,8 %	0,9 %
OCT					
DIN EN	0,4 %	0,025 %	0,45 %	0,7 %	0,13 %
zu K2	0,3 %	0,01 %	0,35 %	0,5 %	0,11 %
PHMB					
DIN EN	0,07 %	0,1 %	0,18 %	0,13 %	0,18 %
zu K2	0,03 %	0,06 %	0,1 %	0,11 %	0,16 %

2.3 Diskussion

In dieser Arbeit wurden die antimikrobiellen Wirkstoffe OCT, CHX und PHMB geprüft, die oberflächenaktive Verbindungen mit positiver Nettoladung präsentieren. Diese Verbindungen sind im Markt bekannt und ihre Anwendung besonders in Antiseptika weit verbreitet. Ihre abtötende Wirkung wird durch Interaktion mit der Zellwand von Mikroorganismen mit Unterbrechung der Stoffwechselprozesse erreicht. Die Oberfläche des Peptidoglykansacculus ist bei den grampositiven und der Phospholipidschicht bei gramnegativen Bakterien negativ geladen. Die negative Ladung der Zelloberfläche erfüllt ein Kernkriterium für den Angriff antimikrobieller kationischer Verbindungen. Ihr Ziel erreichen sie jedoch durch unterschiedliche Wirkmechanismen (s. Abschnitt 1.1).

2.3.1 Methode

Zur Bestimmung der mikrobioziden Wirkung ist der quantitative Suspensionstest geeignet (s. Abschnitt 1.3.1). Gemäß DIN EN 13727 beinhaltet diese Prüfung einen Neutralisationstest zur Ermittlung des geeigneten Neutralisators bei zusätzlicher Eiweißbelastung zum Ausschluss hemmender Einflüsse auf die Wirksamkeit in der Anwendungspraxis. Die Tatsache, dass sich die Wirkmechanismen von einem Mittel zum anderen unterscheiden, macht die Wahl des Neutralisators bei der Prüfung vom DM schwierig. Die bisher vorliegende Literatur weist auf die Eignung von Eigelb und Ei-Lecithin (Phosphatidylcholin) als Neutralisator für oberflächenaktive mikrobiozide Wirkstoffe hin. So werden Lecithine nach den ASTM Standard-Normen E1054-08 zur Neutralisierung von Chlorhexidin und Polihexanid empfohlen [ASTM E 1054]. Diese Phospholipide (Lecithin), die wichtige Zellmembran-Bestandteile vieler Organismen sind, kommen als emulgierte Öltröpfchen mit neutraler Ladung in der Fettemulsion Lipofundin vor. Da Phospholipide als Hauptbestandteil in der physiologischen Zusammensetzung der Zellmembran vorhanden sind, ergibt sich bei der Anwendung dieser keine Zellschädigung.

Voruntersuchungen mit dieser parenteralen Lipidemulsion zeigten einen Neutralisierungseffekt. Diese Wirkung wird durch die Bindung der Wirkstoffe an die Monolayer der Ei-Lecithin emulgierten Öltröpfchen von Lipofundin erreicht. Während eine Inaktivierung von OCT in vielen Untersuchungen häufig problemlos erreicht wurde [Tirali et al. 2009], weisen Literaturbefunde zu CHX auf unzuverlässige und falsch positive Ergebnisse hin, die ohne Sicherstellung der ausreichenden Neutralisierung auftreten können. Daher muss die Ausschaltung der Nachwirkung der CHX experimentell eindeutig bestätigt werden [Kampf 2008, Kramer et al. 2008]. Entscheidend für die neutralisierende Wirkung ist hauptsächlich die Ladung der

Phospholipide. Hier stellt PHMB eine besondere Herausforderung dar, da seine Inaktivierung gemäß den Ergebnissen von Ikeda [Ikeda et al.1984] nur durch anionische aber nicht durch neutral geladene Phospholipide erreicht werden kann. Im Gegensatz dazu zeigten die Untersuchungen von Müller [Müller et al. 2011] eine eindeutige Wirkungsreduzierung von PHMB durch die neutral geladene O/W-Emulsion, trotz der deutlichen bevorzugten Bindung der PHMB-Wirkstoffe an die Phospholipid-Layer.

Deshalb wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation die Neutralisierung von Chlorhexidindigluconat, Octenidindihydrochlorid und Polyhexamethylenbiguanidin-hydrochlorid durch die Lipidemulsion Lipofundin MCT 20 % unter Verwendung der empfohlenen Testorganismen *E. coli, P. aeruginosa, S. aureus, E. hirae* und *C. albicans* genauer untersucht und die sich gemäß DIN EN 17232 ergebenden Neutralisierungsgrenzen mit den Ergebnissen eines Signifikanzvergleichs zwischen der Wirkstoff- und Neutralisatorfreien Kontrolle und dem Prüfsubstanz-Neutralisator-Gemisch verglichen.

2.3.2 Ergebnisse

Lipofundin hat selbst keine antimikrobielle Wirkung und ist damit grundsätzlich als Neutralisator einsetzbar. Zum besseren Vergleich der maximalen Neutralisierungsgrenzen sind die Konzentrationen für jede Prüfsubstanz in absteigender Wirkstärke angeordnet. Die KbE der Kontrollmessungen K1 (mit Lipofundin) und K2 (ohne Lipofundin) sind auch entsprechend eingetragen.

Die auf Grund der Statistik von der jeweiligen Kontrolle nicht signifikant abweichenden Neutralisierungsgrenzen sind für die zu prüfenden Wirkstoffkonzentrationen in Tabelle 14 zusammengefasst und den Grenzen gemäß DIN EN 13727 gegenübergestellt. Es wird deutlich, dass Lipofundin für die geprüften Wirkstoffe seine Neutralisierung je nach Testorganismus bei unterschiedlichen Konzentrationen erreicht. Am höchsten ist der neutralisierbare Konzentrationsbereich bei CHX (2,0 mg/ml - 10,0 mg/ml), gefolgt von OCT (0,1 mg/ml - 5,0 mg/ml) und PHMB (0,3 mg/ml - 1,6 mg/ml). Dabei verhalten sich auch die Prüforganismen sehr unterschiedlich, was möglicherweise u.a. durch deren unterschiedliche Phospholipid-Zusammensetzung bedingt wird. Die Zusammensetzung der Zytoplasmamembran der unterschiedlichen Mikroorganismen kann man der Monographie Microbial Lipids Vol. 1 [O'Leary u. Wilkinson 1988] entnehmen. Die gramnegativen Bakterien *E. coli* und *P. aeruginosa* besitzen kein Phosphatidylcholin (PC). Haupt-Glycerophospholipid in beiden Spezies ist Phosphatidylethanolamin (PE). *E. coli* enthält durchschnittlich 82 -

91 % PE, 3 - 6 % Phosphatidylglycerol (PG) und 6 - 12 % Diphosphatidylglycerol (DPG, Cardiolipin). Die prozentuale Phospholipid-Zusammensetzung von *P. aeruginosa* beträgt 71 % PE, 12 % PG und 8 % DPG.

Die grampositiven Bakterien *S. aureus* und *E. hirae* besitzen kein PC und auch kein PE. Die Glycerophospholipid-Zusammensetzung von *S. aureus* beträgt 57 % PG, 5 % DPG und 38 % LysoPG. *E. durans* (analoge Spezies zu *E. hirae*) besteht aus 20 % PG, 17 % DPG, 56 % LysoPG und 7 % Phosphoglycolipide.

C. albicans dagegen enthält das Glycerophospholipid PC. Die prozentuale Zusammensetzung beträgt durchschnittlich 10 % Phosphatidylserin (PS), 10 % Phosphatidylinositol (PI), 50 % PC und 30 % PE. Die Phospholipid-Zusammensetzung der Hefen ähnelt denen der Säugerzellen [Van Meer et al. 2008]. Der Neutralisationseffekt von PC im Lipofundin kann durch die unterschiedliche Affinität der antiseptischen Wirkstoffe zu den neutralen und anionischen Glycerophospholipiden in den Membranen der Mikroorganismen beeinflusst werden.

3. Schlussfolgerungen und weiterführende Gedanken

Geringe Zytotoxizität einerseits und hohe antimikrobielle Wirksamkeit andererseits stellen zwei wichtige Säulen für die Anwendung von Antiseptika dar. Aus den Untersuchungen kann abgeleitet werden, dass Lipofundin ein wirksamer Neutralisator für OCT und CHX ist, während PHMB nur in geringerem Ausmaß neutralisierbar ist. Für die Anwendungspraxis kann daraus abgeleitet werden, dass die Wirkung von PHMB durch Phosphatidlycholin weniger beeinflusst wird als von OCT und CHX. Für die Klinik könnte daher PHMB in Kombination mit Lipofundin speziell für sensitive Biotope wie Harnblase und Peritoneum zur antiseptischen Behandlung vorteilhaft sein, weil trotz Anwesenheit von Lipofundin noch eine antiseptische Wirksamkeit gegeben ist. Durch Lipofundin wird jedoch die Zytotoxizität von PHMB noch weiter reduziert [Müller et al. 2011]. Für die Testung mikrobiozider Wirkstoffe ist die gute Verfügbarkeit von Lipofundin als Neutralisator als Vorteil anzusehen.

4. Zusammenfassung

Bei der Prüfung mikrobiozider Wirkstoffe im quantitativen Suspensionsversuch muss die sog. Nachwirkung von in die Subkultur verschleppten Wirkstoffspuren ausgeschaltet werden, weil andernfalls eine zu hohe Wirksamkeit vorgetäuscht wird.

Deshalb wurde die Neutralisierung der oberflächenaktiven kationischen Antiseptika Chlorhexidindigluconat, Octenidindihydrochlorid und Polyhexamethylenbiguanidin-hydrochlorid durch Lipofundin MCT 20 % bei Einsatz von *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa, E. hirae* und *C. albicans* gemäß DIN EN 13727 untersucht.

Zu 8 Volumenanteilen Inaktivator (Lipofundin) wurden zunächst 1 Volumenanteil Wirkstofflösung hinzugefügt. Nach 5 min Kontakt bei Raumtemperatur wurde dann die Mischung mit 1 Volumenanteil Prüfmikroorganismen mit einer Dichte von 10^4 KbE/ml versetzt, gründlich gemischt und anschließend die vorhandenen KbE quantifiziert. Um die Neutralisierungskapazität von Lipofundin genauer zu bestimmen, wurde abweichend von der Empfehlung der Norm, wonach die KbE-Anzahl nach Neutralisierung unter der Hälfte der KbE-Anzahl in der Kontrolle betragen muss, als Maßstab ein fehlender signifikanter Unterschied zwischen beiden Ansätzen zugrunde gelegt.

Die Ergebnisse zeigen, dass CHX, OCT und PHMB durch die Bindung an die Phospholipidschicht des Lipofundins konzentrationsabhängig neutralisiert wurden, was zu einem Weiterwachstum von *E. coli*, *S. aureus, E. hirae, P. aeruginosa* und *C. albicans* geführt hat. Damit erwies sich Lipofundin als effektiver Neutralisator. Im Vergleich zu CHX und OCT war der Konzentrationsbereich für die Neutralisierung bei PHMB allerdings kleiner. Daraus lässt sich umgekehrt ableiten, dass PHMB in Gegenwart von Phosphatidylcholin weniger an mikrobiozider Wirkung einbüßt als OCT und CHX, was für die antiseptische Anwendung vorteilhaft sein könnte.

5. Summary

While examining microbiocidal agents in a quantitative suspension test, the so-called “after-effect” of contamination by traces of agents introduced into the subculture has to be eliminated; otherwise, the test will indicate an effectiveness higher than it really is.

Therefore, the neutralizing effects of Lipofundin MCT 20 % on the cationic surfactant antiseptics chlorhexidine digluconate (CHX), octenidine dihydrochloride (OCT), and poly hexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB) were examined with *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa, E. hirae,* and *C. albicans* in accordance with DIN EN 13727.

First, 1 volume fraction of active agent solution was added to 8 volume fractions of the inactivator (Lipofundin). After 5 min of contact at room temperature, the solution was mixed with 1 volume fraction of diagnostic microorganisms with a concentration of 10^4 CFU/ml; then, the existing CFU were quantified.
In order to determine the neutralizing capacity of Lipofundin more precisely, and deviating from the recommendation of DIN EN 13727 that the number of CFU after neutralization should be less than half of the number of CFU in the control probe, a missing significant difference between both approaches has been chosen as standard.

The results show that CHX, OCT, and PHMB were neutralized irrespective of their concentration by bonding to the phospholipid layer of the Lipofundin, which led to a continued growth of *E. coli*, *S. aureus*, *E. hirae, P. aeruginosa,* and *C. albicans*. Thus, Lipofundin proved to be an effective neutralizing agent. The concentration range for neutralizing PHMB was smaller than that for CHX and OCT. This indicates that in the presence of phosphatidylcholine, PHMB loses less of its microbiocidal effectiveness than OCT and CHX, which could be of advantage for antiseptic application.

6. Literaturverzeichnis

Assadian O, Kramer A (2008) Desinfektion unbelebter Materialien. In: Kramer A, Assadian O (Hrsg) Wallhäußers Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Antiseptik und Konservierung. Thieme Stuttgart: 161-184

ASTM E 1054 (2006) Standard Test Methods for Evaluation of Inactivators of Antimicrobial Agents.

Bodenschatz W (2006) Verfahren des Deisnfektion und Sterilisation. In: Bodenschatz W (Hrsg) Kompaktwissen Desinfektion. 3. Aufl, Behr Hamburg: 104-105

Braun Melsungen Deutschland (2007) http://www.pharmazie.com/graphic/A/82/1-19782.pdf

Bültemann A, Gerber V, Protz K 2008) Octenisept® Wundkompendium. Octenisept® in der antiseptischen Wundbehandlung. Schülke & Mayr GmbH

Cremieux A, Fleurette J. Methods of Testing Disinfectants (1991) In: Block SS (eds) Disinfection, Sterilization and Preservation. Lea & Febiger Philadelphia London: 1009-1027

DGHM (2001) Desinfektionsmittel-Kommission der DGHM: Prüfung und Bewertung chemischer Desinfektionsverfahren. mhp Wiesbaden

Dissemond J, Gerber V, Kramer A,Riepe G, Strohal R, Vasel-Biergans A, Eberlein T (2009) Praxisorientierte Expertenempfehlung zur Behandlung kritisch kolonisierter und lokal infizierter Wunden mit Polihexanid. GMS Krankenhaushyg Interdiszip 4(2): Doc17

Ebert M, Assadian O, Hübner NO et al. (2011) Antimicrobial efficacy of the silver wound dressing Biatain Ag in a disc carrier test simulating wound secretion. Skin Pharmacol Physiol 24(6): 337-41

EN 1040 (1997) Chemical disinfectants and antiseptics - Basic bactericidal activity. Test method and requirements (phase 1)

EN 1275 (2006) Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of basic fungicidal or basic yeasticidal activity of chemical disinfectants and antiseptics. Test method and requirements (phase 1). 2006

EN 13727 (2010) Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity in the medical area. Test method and requirements (phase 2, step 1)

EN 14561 (2006) Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative carrier test for the evaluation of bactericidal activity for instruments used in the medical area. Test method and requirements (phase 2, step 2)

EN 14562 (2006) Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative carrier test for the evaluation of fungicidal or yeasticidal activity for instruments used in the medical area. Test method and requirements (phase 2, step 2)

Frese C (2008) Stabilisierung von (R)-(+)-Limonen in einer Phospholipid Nanoemulsion mittels Hochdruckhomogenisation. Diss Landwirt Fak Univ Bonn

Gebel J, Kirsch-Altena A, Exner M, Schwebke I (2008) Prüfung der Wirksamkeit chemischer Desinfektionsmittel. In: Kramer A, Assadian O (Hrsg) Wallhäußers Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Antiseptik und Konservierung. Thieme Stuttgart: 601-609

Geppert J (1989) Zur Lehre von den Antiseptics. Eine Experimentaluntersuchung. Berl Klin Wochenschr 36(26): 689-794; 819-821

Hübner N-O (2004) Experimenentelle Untersuchungen zur Verbesserung der chirurgischen Händedesinfektion. Diss Med Fak Univ Greifwald

Hübner N-O, Kramer A (2010) Review on the efficacy, safety and clinical applications of polihexanide, a modern wound antiseptic. Skin Pharmacol Physiol 23(Suppl): 17-27

Ikeda T, Ledwith A, Bamford C, Hann EA (1984) Interaction of a polymeric biguanide biocide with phospholipids membranes. Biochim Biophys Acta 769: 57-66

Kampf G (2008) What is left to justify the use of chlorhexidine in hand hygiene? J Hosp Infect 70(51): 27-34

Kampf G, Shaffer M, Hunte C (2005) Insufficient neutralisation in testing a chlorhexidine-containing ethanol-based hand rub can result in a false positive efficacy assessment. BMC Infec Dis 5: 48-52

Koburger T, Hübner N-O, Braun M et al. (2010) Standardized comparison of antiseptic efficacy of triclosan, PVP-iodine, octenidine dihydrochloride, polyhexanide and chlorhexidine digluconate. J Antimicrob Chemother 65(8): 1712-1719

Kramer A (2000) Hand Disinfection and Antiseptic of Skin, Mucous Membranes, and Wounds. In: Gabard B, Elsner P, Surber C, Treffel P (eds) Dermatopharmacology of Topical Preparations. Springer Berlin: 121-134

Kramer A, Reichwagen S, Widulle H, Heldt P (2008) Guanidine und Biguanide. In: Kramer A, Assadian O (Hrsg) Wallhäußers Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Antiseptik und Konservierung. Thieme Stuttgart: 793-798

Kramer A, Reichwagen S, Widulle H, Heldt P (2008) N-Heterocyclen. In: Kramer A, Assadian O (Hrsg) Wallhäußers Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Antiseptik und Konservierung. Thieme Stuttgart: 799-804

Kramer A, Reichwagen S, Widulle H, Heldt P (2008) Guanidine und Biguanide. In: Kramer A, Assadian O (Hrsg) Wallhäußers Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Antiseptik und Konservierung. Thieme Stuttgart: 789-793

Kramer A, Müller G (2007) Mikrobiozide Wirksamkeit, weitere biologische Wirkungen, Verträglichkeit und Abbaubarkeit von Octenidindihdrochlorid. GMS Krankenhaushyg Interdiszip 2(2): Doc49

Kramer A, Exner M (2011) Historische Entwicklung der Strategien zur Verhütung und Bekämpfung nosokomialer Infektionen. In: Kramer A, Assadian O, Exner M, Hübner NO, Simon A (Hrsg) Krankenhaus- und Praxishygiene. Elsevier Urban Fischer München: 2-7

MacKinnon IH (1974) The use of inactivators in the evaluation of disinfectants. J Hyg 73: 44-49

Majic-Todt A (2003) Prüfung von Lavasept® auf antiseptische Effektivität und Plaque-hemmung. Diss Med Fak Univ Greifswald

Müller G, Kramer A, Schmidt J, Harden D, Koburger T (2011) Reduced cytotoxicity of polyhexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB) by egg phosphatidylcholine while maintaining antimicrobial efficacy. Chem Biol Interact 190: 171-178

Müller G, Kramer A (2003) In vitro action of combinations of selected antimicrobial agents and adult bovine articular cartilage (sesamoid bone). Chem Biol Interact 145: 331-336

Müller G, Kramer A (2008) Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. J Antimicrob Chemother 61(6): 1281-1287

Pitten FA, Werner HP, Kramer A (2003) A standardized test to assess the impact of different organic challenges on the antimicrobial activity of antiseptics. J Hosp Infect 55: 108-115

O'Leary WM, Wilkinson SG (1988) Gram-positive bacteria. In: Ratledge C, Wilkinson SG (eds) Microbial Lipids, Vol 1. Academic Press London: 117–201

Reybrouck G (1978) Bactericidal Activity of 40 potential Disinfectant Inactivators. Zentralbl Bakteriol B 167(5-6): 528-534

RKI (2003) Vorwort zur Liste der vom Robert Koch-Institut geprüften und anerkannten Deinfektionsmittel und -verfahren. Bundes-gesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz 1: 72-95

RKI (2007): Liste der vom Robert Koch-Institut geprüften und anerkannten DM und -verfahren. Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz 10: 1335-1356

Rockhoff V (2008) Vergleichende Untersuchungen von Agarplatten-Oberflächen-Verfahren und Most-Probable-Number-Methode zur Desinfektionsmittelprüfung gemäß den CEN-Normen EN 1656 und EN 1657, Diss Vet Fak Univ Leipzig

Rotter M, Skopec M (2003) Entwicklung der Hände-Hygiene. In: Kampf G (Hrsg) Hände-Hygiene im Gesundheitswesen. Springer Berlin: 1-9

Rudolf M, Kampf G (2003) Wirkstoffe. In: Kampf G (2003) Hände-Hygiene im Gesundheitswesen. Springer Berlin: 80-85

Russel AD (1981) Neutralization Procedures in Evaluation of Bactericidal Activity. In: Collins CH et al. (eds) Disinfectants, their use and evaluation of effectiveness. Academic Press London: 45-59

Russel AD (1991) Principles of antimicrobial Activity. In: Block SS (eds) Disinfection, Sterilization and Preservation. Lea & Febiger Philadelphia: 29-31

Schneemann H, Wurm G (1995) Festlegung der Anwendungsparameter von Desinfektionsmitteln. In: Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis Band 1, 5.Aufl, Springer Berlin: 893-894

Sonntag HG (2001) Desinfektion In: Forth W (Hrsg) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 8. Aufl, Urban & Fischer München: 942-943

Steuer W, Schubert F (2007) Leitfaden der Desinfektion, Sterilisation und Entwesung. Behr Hamburg: 106-109

Tirali RE, Turan Y, Akan N, Karahan ZC (2009) In vitro antimicrobial activity of several concentrations of NaOCl and Octenisept in elimination of endodontic pathogens. OOOOE 180(5): e117-120

Van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. Nat Rev Mol Cell Biol 9(2): 112-124

VAH (2010) Desinfektionsmittel-Liste des Verbunds für Angewandte Hygiene. http://www.vah-online.de

Wagner D (1972) Geschichte der experimentellen Keintötung. In.: Horn H, Prirova M, Weuffen, W (Hrsg) Handbuch der Desinfektion und Sterilisation Bd. 1, Grundlagen der Desinfektion. Volk u. Gesundheit Berlin: 23-25

Wallhäußer KH (1995) Praxis der Sterilisation, Desinfektion - Konservierung, 5. Aufl Thieme Stuttgart 43: 391-394.

7. Anhang

A1 Abbildungsverzeichnis

A2 Tabellenverzeichnis

A1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung eines Verdünnungsausstrichs mittels 3-Ösen-Technik. ..25
Abb. 2: Balkendiagramm mit Volumenanteilen des Neutralisatortests für den Verdünnungsansatz 10^0. 27
Abb. 3: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung für die Herstellung des Verdünnungsansatz 10^0-10^{-2} für den Neutralisatortest am Beispiel der Prüflösung PL2 28
Abb. 4: Balkendiagramm der Ergebnisse des Neutralisatortests für CHX mit *E. coli*.....31
Abb. 6: Balkendiagramm der Ergebnisse des Neutralisatortests für OCT mit *E. coli*.....31
Abb. 7: Balkendiagramm der Ergebnisse des Neutralisatortests für PHMB mit *E. coli* 32
Abb. 8: Balkendiagramm der Ergebnisse des Neutralisatortests für CHX mit *S. aureus* 34
Abb. 9: Balkendiagramm der Ergebnisse des Neutralisatortests für OCT mit *S. aureus* 34
Abb. 10: Balkendiagramm der Ergebnisse des Neutralisatortests für PHMB mit *S. aureus*...35
Abb. 11: Balkendiagramm der Ergebnisse des Neutralisatortests für CHX mit *E. hirae* 37
Abb. 12: Balkendiagramm der Ergebnisse des Neutralisatortests für OCT mit *E. hirae* 37
Abb. 13: Balkendiagramm der Ergebnisse des Neutralisatortests für PHMB mit *E. hirae* 38
Abb. 14: Balkendiagramm der Ergebnisse des Neutralisatortests für CHX mit *P. aeruginosa*. 40
Abb. 15: Balkendiagramm der Ergebnisse des Neutralisatortests für OCT mit *P. aeruginosa*. 40
Abb. 16: Balkendiagramm der Ergebnisse des Neutralisatortests für PHMB *P. aeruginosa*..41
Abb. 17: Balkendiagramm der Ergebnisse des Neutralisatortests für CHX *C. albicans*.....43
Abb. 18: Balkendiagramm der Ergebnisse des Neutralisatortests für OCT *C. albicans*.....43
Abb. 19: Balkendiagramm der Ergebnisse des Neutralisatortests für PHMB *C. albicans*.....44

A2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Prinzip unterschiedlicher Neutralisationsverfahren [Cremieux u. Fleurette 1991].....13
Tab. 2: Zur DM-Prüfung empfohlene Neutralisierungsmittel für Alkohole.....15
Tab. 3: Zur DM-Prüfung empfohlene Neutralisierungsmittel für Aldehyde.....16
Tab. 4: Zur DM-Prüfung empfohlene Neutralisierungsmittel für Biguanide.....17
Tab. 5: Zur DM-Prüfung empfohlene Neutralisierungsmittel für Phenol und Phenolderivate.18
Tab. 6: Zur DM-Prüfung empfohlene Neutralisierungsmittel für oberflächenaktive Substanzen 19
Tab. 7: Zur DM-Prüfung empfohlene Neutralisierungsmittel für Halogene 20
Tab. 8: Zur DM-Prüfung empfohlene Neutralisierungsmittel für andere Wirkstoffe.....21
Tab. 9: Gezählte KbE für *E. coli* mit den drei Wirkstoffen mit/ohne Lipofundin im Neutralisatortest 30
Tab. 10: Gezählte KbE für *S. aureus* mit den drei Wirkstoffen mit/ohne Lipofundin im Neutralisatortest 33
Tab. 11: Gezählte KbE für *E. hirae* mit den drei Wirkstoffen mit/ohne Lipofundin im Neutralisatortest 36
Tab. 12: Gezählte KbE für *P. aeruginosa* mit den drei Wirkstoffen mit/ohne Lipofundin im Neutralisatortest 39
Tab. 13: Gezählte KbE für *C. albicans* mit den drei Wirkstoffen mit/ohne Lipofundin im Neutralisatortest 42
Tab. 14: Vergleich der Neutralisierungsgrenzen gemäß DIN EN 13727 und gemäß Signifikanzvergleich zur Kontrolle K2.....45

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Joseph Khalil, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades vorliegt.

Greifswald, den

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Khalil
Vorname:	Joseph
Geburtsdatum:	05.02.82
Geburtsort	Harajel (Libanon)

Bildungsweg

1989-1997	Grund-, Mittelschule, Notre Dame Sahel Alma
1997-2000	Gymnasium, Collège des Apotres Jounieh
2003-2004	Staatliches Studienkolleg an der Universität Greifswald
2004-2011	Medizinstudium an der Universität Greifswald
01.04.2012	Approbation als Arzt

Berufsausbildung

Ab 01.04.2012	Assistenzarzt für Allgemein-, Viszeral-, Gefäss- und Thoraxchirurgie am Dietrich-Bonhoeffer-Klinikum

Sprachen

Arabisch	fließend
Französisch	fließend
Englisch	fließend
Deutsch	fließend

Danksagung

Mein besonderer herzlicher Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. med. Axel Kramer für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit am Institut für Hygiene und Umweltmedizin der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald anzufertigen. Besonderes bedanke ich mich für seine hervorragende Betreuung und die stets sehr guten Ratschlägen.

Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei meinem Ansprechpartner Herrn Dr. rer. nat. Gerald Müller für die hilfreiche wissenschaftliche Begleitung und großartige Unterstützung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt außerdem dem ganzen Laborteam, insbesondere Frau Margret Schultz, für ihre freundliche Unterstützung bei den praktischen Untersuchungsdurchführungen.

Ein herzlicher Dank richtet sich auch an Frau Brigitte Sümnicht für Ihre Kompetenz und Hilfe bei allen organisatorischen Fragen.

Meinen Eltern, die trotz Entfernung auf vielfältige Weise zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben, namentlich meinem Vater Sami Khalil, meiner Mutter Yvonne Khalil und meinem Bruder Antoine Khalil, gilt mein bester Dank.

Schließlich gilt Dir Altyn ein spezieller Dank.