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

In vitro - Untersuchungen zur Wirksamkeit und Zytotoxizität von Polihexanid in herkömmlicher galenischer Grundlage und assoziiert an Lecithin

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizinwissenschaften
(Dr. rer. med.)

der Universitätsmedizin der
Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Greifswald

2014

vorgelegt von:

Torsten Koburger-Janssen
(geb. Koburger)

geb. am 16.07.1974

in Eisenach

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

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

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Matthias Trautmann; Stuttgart

3. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Werner Weitschies, Greifswald

Tag der Disputation: 22.09.2014

Ort, Raum: Friedrich-Löffler-Institut für Medizinische Mikrobiologie, Seminarraum

Die vorliegende kumulative Promotionsschrift wertet die folgenden 5 Originalarbeiten aus:

Koburger T, Müller G, Eisenbeiß W, Assadian O, Kramer A. Microbicidal activity of polihexanide. GMS Krankenhaushyg Interdiszip 2007; 2(2):Doc44 (20071228)

Müller G, **Koburger T**, Jethon FUW, Kramer A. Comparison of the bactericidal efficacy and *in vitro* cytotoxicity of Lavasept® and Prontosan®. GMS Krankenhhyg Interdiszip. 2007; 2(2):Doc42 (20071228)

Koburger T, Hübner NO, Braun M, Siebert J, Kramer A. Standardized comparison of the antiseptic efficacy of triclosan, PVP-iodine, octenidine dihydrochloride, polyhexanide and chlorhexidine digluconate. J Antimicrob Chemother. 2010; 65(8):1712-9

Müller G, Kramer A, Schmitt J, Harden D, **Koburger T**. Reduced cytotoxicity of polyhexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB) by egg phosphatidylcholine while maintaining antimicrobial efficacy. Chem Biol Interact. 2011;190(2-3):171-8

Müller G, **Koburger T**, Kramer A. Interaction of polyhexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB) with phosphatidylcholine containing o/w emulsions and consequences for microbial efficacy and cytotoxicity. Chem Biol Interact. 2013;201(1-3):58-64

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Problemstellung 3

1.1 Problemstellung 3

1.2 Charakterisierung des antimikrobiellen Wirkstoffs Polihexanid in Hinblick auf die antiseptische Anwendung 7

1.2.1 Stoffeigenschaften 7

1.2.2 Antimikrobielle Wirksamkeit 9

Wirkungsspektrum 9

Wirkungsbeeinflussung 10

Resistenzentwicklung 10

Relation von Wirksamkeit und Verträglichkeit 10

1.2.3 Wirkungsmechanismus 11

1.2.4 Lokale und systemische Verträglichkeit 13

Lokale Verträglichkeit 14

Wundverträglichkeit 14

Sensibilisierung 14

Zytotoxizität 15

Akute Toxizität 15

Chronische Toxizität 16

Mutagenität und Karzinogenität 16

Reproduktionstoxizität 16

Resorption 17

1.2.5 Antiseptische Einsatzbereiche 18

Händedesinfektion und Hautantiseptik 18

Schleimhautantiseptik 19

Augenantiseptik 19

Wundantiseptik 20

1.2.6 Zusammenfassende Bewertung 23

2 Material und Methoden 24

2.1 Verwendete Prüforganismen 24

2.2 Prüfsubstanzen 24

2.3 Mikrodilutionsmethode 25

2.4 Quantitativer Suspensionsversuch 25

2.5 *In vitro* Zytotoxizitätstestung 26

2.6 Kombinierte *in vitro* Zytotoxizitäts- und Mikrobizidie-Testung 26

3 Ergebnisse und Diskussion 27

3.1 Wirksamkeit von Polihexanid im Vergleich zu anderen wundantiseptischen Wirkstoffen 27

3.2 Antimikrobielle Wirksamkeit von Polihexanid unter verschiedenen organischen Belastungen 28

3.3 Mikrobizidie und *in vitro*- Zytotoxizität von Polihexanid in Abhängigkeit von der Galenik 29

3.4 Untersuchungen zur Reduktion der *in vitro* – Zytotoxizität von Polihexanid unter Beibehaltung der antimikrobiellen Wirksamkeit 30

3.5 Untersuchungen zur Bindung und Abgabe von Polihexanid durch EPC-haltige o/w-Emulsionen 31

4 Zusammenfassung 33

5 Literaturverzeichnis 36

Eidesstattliche Erklärung 60

Danksagung 61

Anhang 62

1. Auflistung von Veröffentlichungen und Vorträgen 62

2. Der kumulativen Promotion zugrunde liegende Publikationen 67

1 Einleitung und Problemstellung

1.1 Problemstellung

Polihexanid ist ein mikrobizider Wirkstoff, der sich für die antiseptische Anwendung am Menschen durch sein breites Wirkspektrum bei gleichzeitig geringer Zytotoxizität, guter Haut-, Schleimhaut- und Wundverträglichkeit sowie bisher nicht bekannter systemischer Risiken bei antiseptischer Anwendung auf der Köperoberfläche auszeichnet (*Kramer 1995, Kramer u. Roth 2008, Hübner u. Kramer 2010*). Bei der Risikoklassifizierung anhand des Biokompatibilitätsquotienten wird nur noch von dem antiseptischen Wirkstoff Octenidin in gleicher Weise wie für Polihexanid ein Wert > 1 erreicht, d.h. die für eine antiseptische Wirksamkeit benötigte Konzentration liegt unter der zytotoxischen Konzentration, wodurch sich die hohe therapeutische Breite ergibt. Die Ursache hierfür ist in dem Wirkungsmechanismus von Polihexanid zu sehen (Details s. Abschn. 1.2.3), das vorwiegend mit negativ geladenen Phospholipiden interagiert, dem Hauptbestandteil der Membranen Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien. Weitere Bindungstargets sind die Lipopolysaccharide in der Outer Membrane Gram-negativer und Teichonsäuren in der Zellmembran Gram-positiver Bakterien sowie generell Peptidoglycan-Bestandteile der Zellwand und Membranproteine. Im Unterschied dazu ist die Bindung an die neutralen Lipopolysacharide der Zellwand humaner Zellen weniger ausgeprägt, womit die vergleichsweise selektive antiseptische Wirkung erklärt wird (*Broxton et al. 1984, Ikeda et al. 1983, 1984, 1985, Yasuda et al. 2003, Gilbert u. Moore 2005, Gabriel et al. 2007*). Der Wirkungsmechanismus von Polihexanid macht eine Resistenzentwicklung der Zielorganismen unwahrscheinlich, da die negative Oberflächenladung für die Gesamtheit der Lebensprozesse von Bakterien, aber auch von Hefen und Pilzen essentiell ist. Damit ist Polihexanid im Unterschied zu Chlorhexidin, das eine plasmidische Resistenz mit Kreuzresistenz gegenüber Antibiotika zu induzieren vermag (*Russell et al. 1998*), auch für den Einsatz gegen die zunehmende Zahl Antibiotika-resistenter Erreger geeignet.

Polihexanid unterscheidet sich von den anderen bekannten antiseptischen Wirkstoffen durch seine wundheilungsfördernden Eigenschaften für die Anwendungskonzentrationen sowohl *in vitro* (*Wiegand et al. 2007a, Roth et al. 2010*) als auch an aseptischen Wunden bei Ratte, Meerschweinchen und Schwein (*Bolton et al. 1985, Kallenberger et al. 1991, Kramer et al. 2004a*).

In der sich aus diesen Sachverhalten ableitbaren Gesamtbewertung wird Polihexanid in Leitlinien und Konsensusempfehlungen als Wirkstoff der Wahl für die Behandlung kritisch kolonisierter oder lokal infizierter akuter und chronischer Wunden bewertet (*Kramer et al. 2004a; Dissemond et al. 2009, Dissemond et al. 2011*). Allerdings wird Polihexanid wie Octenidin, Chlorhexidin und PVP-Iod nicht bei Anwendung zur Peritonealspülung toleriert (*Berg 2000, Frieling et al. 2007, Lauenstein 2007*). Hier überwiegen die zytotoxische Schädigung bzw. systemische Nebenwirkungen die antiseptische Wirkung. Ebenso ist die Verträglichkeit für hyalinen Knorpel erst ab Konzentrationen $\leq$ 0,005% gegeben (*Müller u. Kramer 2006*). Die Anwendung im Mittel- und Innenohr sowie an Strukturen des ZNS ist im Analogieschluss zu Chlorhexidin als Kontraindikation ausgewiesen (*Kramer 2008, DAC/NRF 2008, Röhner et al. 2011, 2012, Kramer et al. 2013*), obwohl hierzu keine Untersuchungen durchgeführt wurden und Studien zur Teratogenität und Reproduktionstoxizität keinen Hinweis auf neurotoxische Risiken ergaben (*Hübner u. Kramer 2010*). Da durch Mundhöhlenantiseptik bei Patienten mit Stammzelltransplantation in der Phase der aggressiven Krebs-Chemotherapie mit Chlorhexidin die Mukositis entgegen der antiseptischen Zielstellung verstärkt wurde (*Pitten et al. 2003*), kann auch Polihexanid für diese Indikation nicht ungeprüft eingesetzt werden.

Mit der Zielsetzung der weiteren Abklärung der Eigenschaften von Polihexanid und damit verbunden der Abschätzung der bevorzugten Anwendungsmöglichkeiten dieses Wirkstoffs wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- In der Arbeit "**Koburger T**, Hübner NO, Braun M, Siebert J, Kramer A. Standardized comparison of the antiseptic efficacy of triclosan, PVP-iodine, octenidine dihydrochloride, polyhexanide and chlorhexidine digluconate. J Antimicrob Chemother. 2010; 65(8):1712-9" wurden die Dosis- und Einwirkzeit-abhängige bakteriozide und levurozide Wirksamkeiten sowie Minimale Hemmkonzentrationen (MHK) und Minimale Bakterizide Konzentrationen (MBK) der wesentlichen zur Wundantiseptik eingesetzten Wirkstoffe unter identischen Prüfbedingungen mit der Zielstellung verglichen, Empfehlungen für die Praxisanwendung abzuleiten.

- In der Arbeit "**Koburger T**, Müller G, Eisenbeiß W, Assadian O, Kramer A. Microbicidal activity of polihexanide. GMS Krankenhaushyg Interdiszip 2007; 2(2):Doc44 (20071228)" wurde vor dem Hintergrund der zunehmenden Bedeutung von Polihexanid in der Antiseptik auf Basis des Europäischen Normentwurfs prEN 12054 erstmalig unter standardisierten Bedingungen *in vitro* die antimikrobielle Wirksamkeit der Polihexanid-haltigen Präparate Lavasept®, Serasept® und Prontosan® in Gegenwart verschiedener für die Wundantiseptik relevanter organischer Belastungen beurteilt. Im Gegensatz zu den im medizinischen Bereich traditionell zumindest für Antibiotika oft herangezogenen MHK-Werten wurde der Umfang der tatsächlichen Abtötung repräsentativer Prüforganismen innerhalb vergleichsweise kurzer Einwirkzeiten von 1 min bis 60 min bestimmt.
- In der Arbeit "Müller G, **Koburger T**, Jethon FUW, Kramer A. Comparison of the bactericidal efficacy and *in vitro* cytotoxicity of Lavasept® and Prontosan®. GMS Krankenhhyg Interdiszip. 2007; 2(2):Doc42 (20071228)" wurde auf Basis der prEN 13727 bzw. der EN ISO 10993-5 der mögliche Koergismus von Polihexanid mit Macrogol 4000, einem penetrationsfördernden Polyethylenglycol, und Undecylenamidopropylbetain, einem wundreinigungsverstärkenden, amphotheren Tensid bzgl. der bakterioziden Wirksamkeit und der *in vitro* Zytotoxizität untersucht.

Im Vergleich von Prontosan® und Lavasept® hinsichtlich Wirksamkeit und Zytotoxizität ergaben sich erste Hinweise darauf, dass die Mikrobiozidie und insbesondere die Verträglichkeit von Polihexanid durch Zusätze in den Rezepturen verändert werden können. So verstärkte der Zusatz von Undecylenamidopropylbetain im Prontosan® im Vergleich zum Macrogol-haltigen Lavasept die Wirksamkeit gleicher Polihexanidkonzentrationen (0,089 %) gegenüber *Pseudomonas aeruginosa*, für *Staphylococcus aureus* wurde jedoch kein Unterschied festgestellt. Gleichzeitig wurde bis zu einer PHMB-Konzentration von 0,04 % für das Betain-haltige Produkt eine deutlich geringere Zytotoxizität gegenüber der verwendeten Mäusefibroblasten-Zelllinie

L929 gezeigt. Im Gegensatz zum ungeladenen Macrogol ist Undecylenamidopropylbetain ein amphoteres Tensid, das einerseits wahrscheinlich eine eigene antimikrobielle Wirksamkeit aufweist, das andererseits aber mit dem Polihexanid um Bindungsstellen bevorzugt an der eukarytischen Zytoplasmamembran konkurrieren kann. Es scheint also eine Frage des Gesamtgleichgewichts aus Mengenverhältnissen von Wirkstoff und Zusatzstoffen einerseits und Bindungsaffinitäten zu den verschiedenen eukaryotischen oder mikrobiellen zytoplasmatischen Zielstrukturen andererseits zu sein, das darüber entscheidet, wie stark das mikrobiozide und zytoxische Potential des Polihexanid jeweils zur Ausprägung kommt.

Führt man diesen Gedanken mit Blick auf den Wirkmechanismus des Polihexanids, also die bevorzugte Bindung an negativ geladene Zellwand- und Membranstrukturen, und allein auf den Wirkstoff bezogen fort, ergibt sich die Frage, ob man die unterschiedlichen Eigenschaften eukaryotischer und prokaryotischer Zellwände nutzen kann, um die Bindungsgleichgewichte des Polihexanids an diese Strukturen durch die galenische Grundlage in Richtung der gewünschten antimikrobiellen Wirksamkeit zu verschieben, um die in der Antiseptik immer gegebene Koexistenz von Mikroorganismen und menschlichen Zellen letztlich zielgerichteter und mit verminderten Nebenwirkungen für den Patienten beeinflussen zu können. Das sollte daher in den nachfolgenden beiden Studien untersucht werden:

- In der Arbeit "Müller G, Kramer A, Schmitt J, Harden D, **Koburger T**. Reduced cytotoxicity of polyhexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB) by egg phosphatidylcholine while maintaining antimicrobial efficacy. Chem Biol Interact. 2011;190(2-3):171-8" wurde die Hypothese untersucht, ob in Phosphatidylcholin-haltigen Liposomen bzw. Öl/Wasser Emulsionen die Wirksamkeit von Polihexanid noch ausreichend gewährleistet ist, aber zugleich die Zytotoxizität deutlich herabgesetzt wird. Dieser Gesichtspunkt wurde in der Arbeit "Müller G, **Koburger T**, Kramer A. Interaction of polyhexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB) with phosphatidylcholine containing o/w emulsions and consequences for microbial efficacy and cytotoxicity. Chem Biol Interact. 2013;201(1-3):58-64" vertieft analysiert.

Auf Basis dieser Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirksamkeit und Zytotoxizität sollen auf der Grundlage der Erkenntnisse zu den biochemischen und biophysikalischen Grundlagen des Wirkmechanismus des Polihexanids an der bakteriellen Zellumembran und unter Berücksichtigung der Unterschiede zwischen mikrobiellen und humanen Zellmembranen neue Darreichungsformen abgeleitet werden, die die oben aufgeführten Einsatzeinschränkungen von Polihexanid möglicherweise weiter reduzieren können.

1.2 Charakterisierung des antimikrobiellen Wirkstoffs Polihexanid in Hinblick auf die antiseptische Anwendung

1.2.1 Stoffeigenschaften

Polihexanid (Synonyma PHMB, Polyhexamethylenbiguanidhydrochlorid, Cosmocil CQ, Lonzabac BG, Vantocil IB) ist chemisch das üblicherweise als Hydrochlorid verfügbare homopolymere Poly(imino[imido-carbonyl]imino[imido-carbonyl]-iminohexamethylen (CAS-Nummer 32289-58-0; Abb. 1). Das Molekulargewicht beträgt für das Monomer 185,3 g/mol, für das Polymer etwa 2.300 – 3.600 (*Kramer u. Roth 2008*). Polihexanid (ATC Code D08AC05) wird als Markenprodukt, das in seiner chemischen Spezifikation den in der DAC Monographie für Polihexanid definierten Parametern entspricht, unter dem Markennamen Cosmocil PG™ von Arch Chemicals Inc. (USA) vertrieben, die seit 2011 zur Lonza Group AG (Schweiz) gehören. Unter den Namen Vantocil IB™, Cosmocil CQ™ (beides Arch Chem) sowie Lonzabac BG™ (Pareva/FR) ist die Substanz in nur unvollständiger Entsprechung zur DAC Monographie erhältlich.

Sowohl Polihexanid als auch Chlorhexidin wurden erstmalig in den 1950er Jahren durch ICI Ltd. (UK) im Rahmen eines Screeningprogramms für Antimalaria-Wirkstoffe synthetisiert (*Davies et al. 1954, Rose u. Swain 1956*), woraufhin Chlorhexidin bald erfolgreich für die Haut- und Schleimhautantiseptik vermarktet, Polihexanid jedoch bis in die 1990er Jahre vorrangig im nichtmedizinischen (Consumer-) Bereich eingesetzt wurde (*Kaehn 2010*). Anwendungen und Vorschläge zum Einsatz von Polihexanid im medizinischen Bereich reichen jedoch bis in die 1970er und 1980er Jahre zurück (*Good 1979, Roth u. Brill 2010*) und resultierten 1991 in der Zulassung von Lavasept® als Polihexanid-haltiges Medizinprodukt in der Schweiz (*Roth u. Brill 2010*). Aber

erst ab 1994 wurde Polihexanid durch den Schweizer Chirurgen Willenegger der breiten medizinischen Öffentlichkeit für die lokale Wundantiseptik vorgestellt (*Willenegger 1994a, 1994b, 1994c, Willenegger et al. 1995*). Die grundlegenden Arbeiten von Werner und Skripitz bestätigen die Wirksamkeit von Polihexanid *in vitro* (*Werner 1992, Skripitz u. Werner 1994*).

Strukturell ähnelt Polihexanid weitgehend dem Biguanid Chlorhexidin (Abb. 1), das jedoch nur als Monomer vorliegt und an beiden Enden 4-Chlorophenyl-Gruppen trägt, die *in vivo* metabolisch mit den entsprechenden toxikologischen Folgen (4-Chloranilin) abgespalten werden können (*Hildebrandt 2011*) oder schon während der Synthese oder Lagerung als Verunreinigung entstehen können (*Ciarlone et al. 1976, Kohlbecker 1989*).

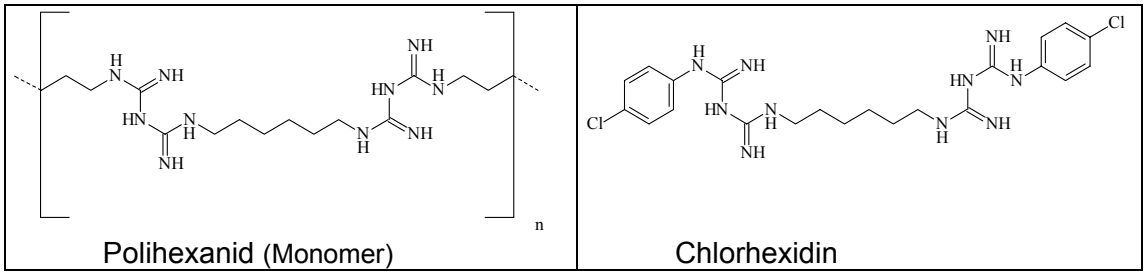


Abb. 1 Gegenüberstellung der chemischen Struktur von Polihexanid und Chlorhexidin

Polihexanid trägt synthesebedingt terminal Amino- oder Cyanoguanidin-Gruppen; zumindest im Cosmocil® CQ wurden aber auch Guanidin- und Cyanoamino-Gruppen detektiert. Im physiologischen pH-Bereich liegen die Biguanid-Gruppen des Polymers monoprotoniert vor, wodurch Polihexanid als ein Polykation agiert (*O'Malley et al. 2006b, Kaehn 2010*).

0,003 - 0,3%ig wird durch Polihexanid die Bildung von Superoxid- und Peroxynitritradikalen *in vitro* gehemmt. Da die Überproduktion von Nitrogen- und Sauerstoffspecies in chronischen Wunden zur Verlängerung der inflammatorischen Phase und zu schwerer Gewebsschädigung führt, könnte diese Hemmung eine der Ursachen für die wundheilungsfördernde Wirkung von Polihexanid sein (*Wiegand et al. 2008c*). Eine weitere für die Wundheilung relevante Wirkung ist die Hemmung der durch Elastase von *P. aeruginosa* verursachten Degradation von Proteinen der Wundflüssigkeit und des Hautgewebes. Parallel wurden endogene Metalloproteinasen nicht beeinflusst (*Schmidtchen et al. 2003, Werthen et al. 2004*).

Als Handelsprodukt ist Polihexanid zumeist eine leicht opaleszierende, farblose oder leicht gelblich gefärbte Lösung mit 20% Wirkstoffgehalt. Der Wirkstoff ist chemisch stabil, besitzt kationische Eigenschaften, ist leicht löslich in kaltem und heißem Wasser, löslich in aliphatischen Alkoholen, Glycolen, Glycolethern, jedoch unlöslich in üblichen organischen und aromatischen Lösungsmitteln.
Mit nichtionischen Detergenzien, Säuren (Phosphorsäure, Salpetersäure) und anderen kationischen oberflächenaktiven Substanzen wie quaternären Ammonium-Verbindungen (QAV) geht Polihexanid wegen seiner eigenen positiven Nettoladung keine wirksamkeitsvermindernden Wechselwirkungen ein. Unverträglich ist PHMB mit anionischen Detergenzien, Seifen oder Alkylsulfonaten. Mischung mit starken Alkalien wie Natronlauge, Na-Metasilikat, Trinatriumphosphat oder komplexen Phosphaten, z.B. Hexamethaphosphat, führt zu Ausfällungen (*Kramer u. Roth 2008*). 0,1 % EDTA reduziert die Wirksamkeit gegen Akanthamöben (*Khunkitti et al. 1996*). Am Modell der *Acanthamoeba polyphaga* - Keratitis wurde ein synergistischer Effekt in Kombination mit Hexamidindiisethionat nachgewiesen (*Vasseneix et al. 2006*).

1.2.2 Antimikrobielle Wirksamkeit

Wirkungsspektrum: Auf Grund des Wirkungsmechanismus hat Polihexanid ein breites Wirkungsspektrum, das Gram-positive und Gram-negative Bakterien einschließlich multiresistenter Erreger (*Lee et al. 2004*), Mykobakterien, Legionellen, Plaque- und Biofilm-bildende Bakterien, Sporenbildner in der vegetativen Form, sich intrazellulär vermehrende Erreger wie Akanthamöben, Chlamydien, Mykoplasmen und Neisserien sowie Pilze einschließlich *Candida spp.* und *Aspergillus spp*. umfasst (*Hay et al. 1994, Husain et al. 1994, Tiradoangel et al. 1995, Jethon u. Kramer 1997, Kusnetsov et al. 1997, Messick et al. 1999, Rosin et al. 2001, Narasimhan et al. 2002, Hughes 2003 Pietsch u. Kraft 2006, Harbs u. Siebert 2007, Koburger et al. 2007, Lee et al. 2007, Müller et al. 2007, Hübner u. Kramer 2010*). In Nährlösung kultivierte *Legionella pneumophila* Zellen wurden durch Polihexanid nach 6 h um 5 log und nach 24 h komplett reduziert, während bei intrazellulärer Kultivierung in Acanthamoeba polyphaga nach 6 h nur 1 log und nach 24 h 4 log abgetötet wurden. Auch von *A. polyphaga* wurde die Mehrzahl der Zellen abgetötet. Damit ist Polihexanid auch ein potentielles Biozid zur Wasserbehandlung (*Barker et al. 1992*).

Polihexanid entfaltet eine teilweise Wirkung gegen Biofilme von *Escherichia coli* und *S. aureus* im Mikrotiterplattenmodell (*Gilbert et al. 2001*), erreichte bis 4 log Reduktion in einem Swimming Pool Biofilm-Modell (*Goeres et al. 2004*) und ist auch gegen *P. aeruginosa* Biofilme auf Silikon und Polystyren wirksam (*Seipp et al. 2005, Hübner et al. 2010b*).
In vitro ist Polihexanid wirksam gegen HIV-1 (Krebs *et al.* 2005) und HSV (0,01, 0,02 und 0,05 %ig), aber im Infektionsmodell mit HSV am Kaninchenauge war der Wirkstoff unwirksam (*Valluri et al. 1997*).

Wirkungsbeeinflussung: Polihexanid ist ohne und mit Belastung wirksamer als Chlorhexidin, bei hoher Blutbelastung auch wirksamer als Iodophore, allerdings mit deutlich langsamerem Wirkungseintritt als bei Iodophoren (erregerabhängig 5-20 min im quantitativen Suspensionstest; *Werner u. Kramer [1995])*, (*Kramer u. Roth 2008*). Ebenso ist die Wirksamkeit in Gegenwart von Wundflüssigkeit bzw. analog zusammengesetzter Zellkulturflüssigkeit gewährleistet (*Schmidtchen et al. 2003, Werthen et al. 2004, Müller u. Kramer 2008*). 0,5 % und 1 % Muzin reduzieren die Wirkung deutlich (*Ansorg et al. 2002*). Durch Chondroitinsulfat wird die Wirksamkeit von Polihexanid komplett aufgehoben (*Müller u. Kramer 2000*). Die Wirkung von 0,035 % Polihexanid gegen *S. typhimurium* wird nach 24 h Exposition mit Hühnerkot komplett aufgehoben, während die Mischung von Eigelb mit Eiweiß ohne Einfluss war (*Bailey et al. 2001*).

Resistenzentwicklung: Nach Exposition mit subletalen Dosen von Polihexanid kam es zur klonalen Expansion von *Pseudomonas* mit Abnahme Gram-positiver Kokkenbakterien, verbunden mit einer Empfindlichkeitsabnahme, es wurden aber keine resistenten Klone generiert (*Moore et al. 2008*).

Relation von Wirksamkeit und Verträglichkeit: Mit dem Biokompatibilitätsindex (BI) können Antiseptika bzgl. ihrer therapeutischen Breite verglichen werden. Zur Berechnung werden unter gleichen Versuchsbedingungen Mikrobiozidie und Zytotoxizität ermittelt und der BI aus IC_{50} und Konzentration für den Reduktionsfaktor log 3 innerhalb 30 min gebildet. Ist der Index < 1, ist die Zytotoxizität größer als die Wirksamkeit gegenüber Mikroorganismen. Im Vergleich der zur Wundantiseptik verwendeten Wirkstoffe Polihexanid, Octenidin (bei entsprechend reduzierter

Anwendungskonzentration), PVP-I Salbe, Chlorhexidindigluconat, Triclosan, Ag-Protein (bezogen auf Ag), Silbersulfadiazin und AgNO3 erreichten nur Polihexanid und Octenidin einen BI > 1 (*Müller u. Kramer 2006, 2008*)

In Übereinstimmung zu diesen Ergebnissen konnte nachgewiesen werden, dass in der Zellkultur bei gleichzeitiger Infektion mit *S. aureus* die Infektion beherrscht wurde und dadurch anschließend die Keratinozyten weiter proliferieren konnten (*Wiegand et al. 2008a; 2008c, 2009*).

1.2.3 Wirkungsmechanismus

Studien von Ikeda *et al.* (*1983, 1984a, 1984b, 1985*) zur Fluidität von Phospholipidbilayern unter Nutzung von Liposomen aus typischerweise in zytoplasmatischen Membranen vorkommenden Phosphoglyceriden zeigten, dass Polihexanid bevorzugt mit Phosphatidylglycerol interagiert – also mit einem bei pH 7 durch die Kombination aus deprotonierter Phosphatgruppe und neutralem, jedoch stark polarem Glycerol insgesamt negativ geladenem Phosphoglycerid. Die negativ geladene Phosphatgruppe konnte auch in Versuchen mit entsprechenden Lipid-Surrogaten bzw. polymeren Metaphosphaten als wesentlicher Interaktionspartner des Polihexanids identifiziert werden, zumal der Abstand der anionischen Kopfgruppen von Phospholipiden zumindest in artifiziellen Lipid-Monolayern der Länge des Hexamethylen-Spacers zwischen den Biguanid-Gruppen des Polihexanids entspricht (*Kramer u. Roth 2008, Kaehn 2010*). Die Fluidität von Liposomen aus Phosphatidylcholin und/oder Phosphatidylethanolamin, also Phosphoglyceriden mit neutraler Nettoladung, wurde durch die Zugabe von Polihexanid jedoch nicht wesentlich beeinflusst (*Ikeda et al. 1983, 1985a)*. Ebenfalls nur für Phosphatidylglycerol-haltige Membranen wurde eine Polihexanid-bedingte Separation in Phosphatidylglycerol-Domänen und Domänen mit neutralen Phosphoglyceriden beobachtet (*Ikeda et al. 1984*). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Polihexanid-Moleküle mit terminaler Aminogruppe die Esterbindung negativ geladener Substrate hydrolysieren können (*Ikeda et al. 1985b*). Auch damit kann durch Polihexanid eine Destabilisierung und Desintegration entsprechender zytoplasmatische Membranen hervorgerufen werden (*Kaehn 2010*).

Im Vordergrund des Wirkmechanismus' dürfte jedoch die Umstrukturierung und Destabilisierung zytoplasmatischer Membranen stehen. Phosphatidylglycerol ist

ein Hauptbestandteil der Membranen Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien, z.B. 25 % in *Escherichia coli* bzw. 37 % in *S. aureus* (*Ikeda et al. 2009*). Weitere Bindungstargets für Polihexanid stellen Lipopolysaccharide in der Outer Membrane Gram-negativer oder Teichonsäuren in der Zellwand Gram-positiver Bakterien dar, dazu generell Peptidoglycan-Bestandteile der Zellwand und Membranproteine (*Yasuda et al. 2003, Allen et al. 2006, Kaehn 2010*).

Die Oberfläche von Bakterien ist generell negativ geladen und üblicherweise durch divalente Kationen (Ca^{2+}, Mg^{2+}) stabilisiert. Der antimikrobielle Effekt des Polihexanids insbesondere gegenüber Gram-negativen Bakterien beruht damit auf der Verdrängung stabilisierender Calciumionen (Ca^{2+}) von den anionischen Kopfgruppen der äußeren Membran-Phospholipide durch die kationischen Biguanid-Gruppen des PHMB (*Broxton et al. 1984a*). Die hydrophoben Hexamethylen-Gruppen des Polymers sind nicht flexibel genug, um dabei in den hydrophoben Teil des Zellmembran-Bilayers integriert zu werden, so dass es einerseits zu einer Auflagerung auf die Zelloberfläche kommen muss, andererseits aber dennoch hydrophobe Wechselwirkungen z.B. von Membranproteinen beeinflusst werden können. Während beim ähnlich agierenden, monomeren Chlorhexidin jedoch nur benachbarte Paare von Phospholipiden in räumlicher Nähe zueinander fixiert werden können, führt die polymere Struktur des Polihexanids zu einer umfassenden Aggregation von sauren Membran-Phospholipiden in lokal begrenzten Membranbereichen, so dass sich gemäß dem Fluid Mosaic Model der Struktur der Zellmembran (*Singer u. Nicolson 1972*) deren biologischen Eigenschaften (Ionenpumpen, Rezeptor- und Enzymaktivitäten) verändern. Letztlich erhöht sich die unkontrollierte Permeabilität der Zellmembran für niedrigmolekulare Bestandteile des Zytoplasmas, wie beispielsweise Kalium-Ionen (K^+), was den gesamten Zellmetabolismus bis hin zur Mikrobiozidie durch Koagulation des Zellinhalts unterbrechen kann (*Davies u. Field 1968, Mitchinson et al. 1983, Broxton et al. 1983, 1984b, Ikeda et al. 1984a, 1984b, 1985a, Khunkitti et al. 1997,1998, 1999, Yasuda et al. 2003, Turner et al. 2004*). *In vitro* konnten nach Bindung von Polihexanid die Präzipitation von DNA und tRNA sowie die Alteration bakterieller Gene nachgewiesen werden (*Allen et al. 2004, 2006*). Hinzu kommt die Blockierung des mikrobiellen Attachments, möglicherweise als

Folge der Interaktion von Polihexanid mit der Zellmembran (*Broxton et al. 1984a, 1984b, 1984c, Gilbert et al. 1990a, Jones 1995*), nachgewiesen durch Hemmung dentaler Plaques und durch remanente Wirkung bei Anwendung zur präoperativen Augenantiseptik (*Rosin et al. 2002, Hansmann et al. 2004*). Ferner ist Polihexanid in der Lage, Fibrinplaques *in vitro* zu eliminieren (*Körber et al. 2008*). Das wird durch klinische Daten bestätigt (*Daeschlein et al. 2007*) und ist klinisch relevant, weil Fibrinbeläge die Wundheilung behindern.

In vitro - Befunde sprechen dafür, dass durch Polihexanid NO freigesetzt und der Kaliumkanal aktiviert wird (*Frieling et al. 2006, 2007*).

Eine Besonderheit des Polihexanids stellt der für die wenigsten antimikrobiellen Wirkstoffe beschriebene anhaltende, also über den Zeitraum der antiseptischen Behandlung hinausgehende postantiseptische (remanente) Effekt dar (*Skripitz u. Werner 1994, Dissemond et al. 2009*). Als Ursache kann die durch die Polymerstruktur bedingte Potenzierung der relativ schwachen, auf Van-der-Waals-Kräften bzw. Wasserstoff-Brückenbindung beruhende Wechselwirkung des Polihexanids mit den Phospholipid-Köpfen der Zellmembran angesehen werden, wodurch der Wirkstoff wahrscheinlich längerfristig am Applikations- bzw. Bindungsort verbleiben kann.

Die Interaktion von Polihexanid mit menschlichen und tierischen Zellen ist sehr limitiert, was zu einem günstigen Risiko/Nutzen-Verhältnis in der antiseptischen Anwendung führt (*Kramer 1995*). Für mit Bakterien kontaminierte Kulturen humaner Keratinozyten wurde die bakteriozide Wirkung des Polihexanids bei gleichzeitiger Nichtbeeinträchtigung der Proliferation der humanen Zellen gezeigt *(Wiegand 2009*).

1.2.4 Lokale und systemische Verträglichkeit

Aus toxikologischer Sicht ergeben sich für Polihexanid keine Anwendungseinschränkungen bei Einsatz in alkoholischen Formulierungen zur Händedesinfektion und Hautantiseptik oder für nichtalkoholische Formulierungen zur Schleimhaut- und Wundantiseptik. Als Kontraindikationen gelten Allergien auf den Wirkstoff bzw. auf Inhaltsstoffe der angewandten Zubereitungsform. Anwendung auf hyalinem Knorpel > 0,005 %, Einsatz zur Peritonealspülung, im Bereich des ZNS, im Mittel- und Innenohr, im Innenauge und bei Retentionsgefahr. In der Schwangerschaft sollte die Anwendung sorgfältig abgewogen werden (*Kramer u. Roth 2008*).

Lokale Verträglichkeit: Für Polihexanid liegt die Konzentrationsschwelle für die primäre Hautreizung (Ratte) >> 5 %, für die primäre Augenreizung (Kaninchen) > 25 % (*Kramer 1994*). Für 0,02 % Polihexanid in Kombination mit Polyethylenglycol wurde innerhalb 5 min im Chorioallantoismembrantest am Hühnerei (HET-CAM) keine Reizung, bei 0,04 % leichte Hyperämie und vereinzelt Hämorrhagien beobachtet (*Kramer u. Behrens Baumann, 1997*). Kalteis *et al.* (*2003*) konnten im HET-CAM sogar für 0,2 % Lavasept keine Reizwirkung nachweisen, während sich 0.5 % Chlorhexidindigluconat als hoch reizend erwies. 0,02 % Polihexanid ist verträglich gegenüber dem Nasoziliarepithel *in vitro* (*Rudolph et al. 2000*), (*Kramer u. Roth 2008*).
Im zur Wundantiseptik üblichen Konzentrationsbereich (0,04 bzw. 0,02 %) verursachte Polihexanid in Kombination mit Polyethylenglycol bei der Ratte eine chronische erosive granulierende Synovialitis mit lokaler Fremdkörperreaktion, Riesenzellen und dystrophischer Kalzifizierung des Knorpels (*Ganzer et al.* 2001). 0,005%ig wird Polihexanid jedoch bei noch vorhandener antiseptischer Effektivität *in vitro* vom Knorpel des Sesambeins/Rind toleriert (*Müller u. Kramer 2005*), (*Kramer u. Roth 2008*). Bei Hunden erwies sich die lokale Applikation der Kombination von EDTA (1,21 g/l) und Polihexanid (0,22 g/l) für 21 d weder als oto- noch als vestibulartoxisch (*Mills et al. 2005*).

Wundverträglichkeit: Polihexanid ist PVP-Iod signifikant an Gewebeverträglichkeit überlegen (*Kramer et al. 1998*) und ist bisher der einzige antiseptische Wirkstoff, für den eine Wundheilungsförderung auch ohne gleichzeitige Infektion nachgewiesen wurde (*Kallenberger et al. 1991; Kramer et al. 2004a; Wiegand et al. 2007a; Wiegand et al. 2008a; Roth et al. 2010)*.

Sensibilisierung: Tierexperimentell ist Polihexanid nicht sensibilisierend und photosensibilisierend, (*Kramer u. Roth 2008*). Im Gegensatz zu Chlorhexidin ist Polihexanid als Kontaktallergen bisher unauffällig (*Kanerva et al. 2000, Schnuch et al. 2000, 2007*). Zwei Fälle einer möglicherweise durch Polihexanid induzierten Anaphylaxie konnten im Prick-Test nicht bestätigt werden *(Olivieri et al. 1998)*. Nach mehr als 20 Anwendungsjahren finden sich keine Hinweise auf ein anaphylaktisches bzw. allergenes Risiko (*Ferrarini et al. 2006*), (*Kramer u. Roth 2008*). Bei Patienten mit chronischen Wunden betrug die Rate der Kontaktsensibilisierung durch PVP-Iod 20 %, durch Polihexanid 0 % (*Freise et al. 2008*).

Zytotoxizität: Neben Taurolidin ist Polihexanid der antiseptische Wirkstoff mit der geringsten Zytotoxizität *in vitro* (*Müller u. Kramer 2008, Kramer u. Behrens Baumann 1997*). Im Explantationstest wurden Wachstum und Flächenausdehnung im Vergleich zu den übrigen geprüften Antiseptika am wenigsten gehemmt (*Kramer et al. 1998*). Die *in vitro* - Zytotoxizität wird durch Betainzusatz in Abhängigkeit von der Konzentrations-Zeit-Relation noch weiter abgeschwächt, obwohl die Wirksamkeit gegen *P. aeruginosa* höher war und gegen *S. aureus* nicht beeinflusst wurde (*Müller et al. 2007*). In einem Infektionsmodell konnte indirekt nachgewiesen werden, dass Polihexanid nicht die Kollagenfasern und das Elastin des Bindegewebes schädigt (*Werthen et al. 2004*).

Nach Inkubation immortalisierter humaner fetaler Osteoblasten und Endothelzellen mit Gentamicin bzw. Polihexanid für 6 h wurden durch Polihexanid im Unterschied zu Gentamycin die Vitalität und Zellzahl jedoch stark reduziert (*Ince et al. 2007*).

Akute Toxizität: Polihexanid ist auf Grund der oralen LD_{50}/Ratte von 1.049 – 2.747 mg/kg (*EPA, 2005*) bzw. 5 g/kg (*Hodge u. Sterner, 1943*) als “praktisch nicht toxisch” einzuordnen. Bei deutlich überhöhter Anwendungskonzentration von Lavasept-Konzentrat ist die Auslösung eines Fieberschubs mit generalisiertem Exanthem beschrieben (*Kramer 1994*). Im Zuge der neuen europäischen Chemikaliengesetzgebung wurde vom Committee of Risk Assessment (RAC) der Europäische Chemikalienagentur (ECHA) 2011 jedoch eine weitergehende Empfehlung zur zukünftigen CLP Bewertung (Classification, Labeling and Packaging of Substances and Mixtures) der Toxizität von PHMB ausgesprochen. Während die ausgewerteten Studien keine Hinweise für akute Toxizität bei dermaler Exposition ergaben, wurde eine moderate Toxizität bei oraler Aufnahme (LD_{50}/Ratte ab ca. 500 mg/kg) und eine deutliche inhalative Toxizität (0,030 mg/l, entspricht Acute Tox 1)) angeben. Abgesehen von Zweifeln an der Validität der Studienergebnisse, die z.T. nur auf Extrapolation beruhen, wird insbesondere bei der inhalativen Toxizität jedoch auch auf sehr gegensätzliche Studienergebnisse (0,36 mg/l, entspricht Acute Tox 4) verwiesen (*ECHA/RAC/ CLH-O-0000001973-68-01/F; ECHA/RAC/CLH-O-0000001973-68-01/A1*). In der 5. Anpassung an den Technischen Fortschritt (5. ATP) vom Oktober 2013 wird die Einstufung daher bis zur endgültigen

Klärung auf Acute Tox 4 festgesetzt (*Verordnung [EU] Nr. 944/2013 der Kommission*).

Chronische Toxizität: Der NOEL (No Observed Effect Level) liegt im 2-Jahres-Fütterungstest bei 20 mg/kg *(Kramer u. Wallhäußer 1993).* Die chronische orale Aufnahme von 100 mg/kgKM/d über 2 Jahre wurde ohne Nebenwirkungen toleriert.

Mutagenität und Karzinogenität: Es besteht kein Anhalt für eine diesbezügliche Gefährdung (EPA, 2003; PHMB P20 D. Material Safety Data sheet of PHMB P20 D. July, 2007. *www.pareva.fr/download/doc_download-2.html*). RAC / ECHA empfehlen jedoch die CLP-Klassifizierung als Karzinogen der Klasse 2, da sich in einer Studie geringfügige Hinweise auf ein karzinogenes Potential ergeben. Produkte, die > 1% PHMB enthalten, müssten danach als Karzinogen Klasse 2 (R40) gelabelt werden. Die Datenbasis ist mit nur einer entsprechenden ausgewerteten älteren Studie jedoch limitiert und entspricht auch nicht allen aktuellen Anforderungen zum Studiendesign. Dazu treten negative Effekte auch nur bei hoher Dosierung auf (ca. 4000 ppm / 0,4 %), die wahrscheinlich auch die maximale tolerierbare Dosis (MTD) überschreitet. In Kenntnis auch dieser Daten sehen daher beispielsweise die amerikanische EPA und die Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority (APVMA) im Kontext sämtlicher verfügbaren toxikologischen Informationen für die erwartbaren Expositionen im beruflichen oder öffentlichen Umfeld kein relevantes karzinogenes Potential für Polihexanid (*http://www.apvma.gov.au/products/review/docs/polihexanide_carc_report.pdf*).

Reproduktionstoxizität: Bei oraler Applikation der Kombination von 0,04 % Polihexanid mit Polyethylenglycol beim Kaninchen wurden in der Dosierung 32 mg/kgKM/d embryotoxische Effekte nachgewiesen. Teratogene Effekte traten nicht auf (NOEL für embryotoxische Effekte 8 mg/kgKM/d). Bei der Ratte wurden bei oraler Gabe von 100 mg/kgKM/d embryotoxische Effekte ausgelöst; bei intraperitonealer Applikation waren ab 10 mg/kgKM/d teratogene Effekte feststellbar. Vergleichbare Effekte wurden bei der Maus (40 mg/kg M/d, oral) nicht nachgewiesen (*Fresenius AG, 1991*), (*Kramer u. Roth 2008*). In den Studien zur subakuten Toxizität ergaben sich keine Anhaltspunkte zur Wirkung auf Gonaden und Hoden. Bei Prüfung der chronischen oralen Toxizität an

Hunden war bei einigen Tieren die Testesmasse reduziert, verbunden mit testikulärer tubulärer Degeneration, aber nur in hoher toxischer Dosis. 2004 ergab die Bewertung der Daten zur pränatalen und Reproduktionstoxizität von Polihexanid für die Spezies Maus, Ratte und Kaninchen durch die US Environmental Protection Agency (EPA) keinen Anhalt für derartige Risiken. Die Relevanz der o. g. teratogenen Wirkung bei der Ratte, auf die in der Patienteninformation von Lavasept aufmerksam gemacht wird, konnte nicht überprüft werden, weil diese Studie nicht publiziert ist und der EPA nicht vorlag. In der EPA Bewertung wurde anhand der präklinischen Daten folgendes Fazit gezogen: Bis etwa 250 mg/kg/d oral bei Ratte und Maus bzw. bis 40 mg/kg/d beim Kaninchen besteht weder quantitativ noch qualitativ ein Anhalt für pränatale Suszeptibilität, ebenso nicht in Reproduktionsstudien über mehrere Generationen (geprüft bis 250 mg/kg/d oral Ratte). Bei der Ratte wurde eine erhöhte Inzidenz zusätzlich angelegter Rippen im Fetus festgestellt, beim Kaninchen eine mögliche Toxizität in Form reduzierter Wurfzahl und von Skelettanomalien, aber keine erhöhte Suszeptibilität. Die Entwicklungstoxizität war in Dosen im Bereich der Toxizität für den mütterlichen Organismus gegeben, was dafür spricht, dass der Entwicklungstoxizität toxische Wirkungen auf den mütterlichen Organismus zugrunde liegen. Ebenso ergab sich kein Anhalt für Neurotoxizität beim Feten. Auch die Fertilität wurde bei der Ratte nicht beeinflusst (*EPA 2003, 2004, 2005*).

Beim Menschen gibt es keine Hinweise auf reproduktions- oder entwicklungstoxische Einflüsse von Polihexanid. Dabei ist zu berücksichtigen, dass es bei lokaler Anwendung zu keiner messbaren systemischen Exposition kommt. Auf Grund der Molekülgröße ist auch keine diaplazentare Passage oder Aufnahme durch die Muttermilch zu erwarten. Daher ist die Verallgemeinerung zulässig, dass sich aus den präklinischen Daten bei Anwendung von Polihexanid zur Händedesinfektion sowie zur Haut-, Schleimhaut- oder Wundantiseptik keine Bedenken in Hinblick auf teratogene Gefährdung, embryo-fetale Toxizität, Auswirkungen auf Spermatogenese oder irgendeine schädliche Wirkung auf das gestillte Baby ableiten lassen.

Resorption: Polihexanid wird bei intakter Haut und bei Wundanwendung nicht resorbiert (Erfassungsgrenze > 10 ppm; *Willenegger 1994*).

1.2.5 Antiseptische Einsatzbereiche

Polihexanid findet Einsatz in Händedesinfektionsmitteln sowie Haut-, Schleimhaut-, Augen- und Wundantiseptika.

Im medizinischen Bereich sind Polihexanid basierte Präparate abhängig vom Produkt und länderspezifisch als Arzneimittel, als Medizinprodukt oder als Kosmetikum registriert bzw. zugelassen. In Deutschland und Österreich ist Polihexanid zur Fertigung einer Gebrauchslösung für die Wundantiseptik als Lavasept-Konzentrat (Kombination von Polihexanid mit Macrogolum) erhältlich. Der Hersteller garantiert die Einhaltung der DAB-Spezifikationen (Molekularmasseverteilung, Abwesenheit giftiger Vor- oder Zwischenprodukte aus der Synthese, Einhaltung der Grenzwerte für den Schwermetallgehalt). Im Neuen Rezeptur-Formularium (NRF) des DAC (*Deutscher Arzneimittel Codex*) sind folgende Monographien enthalten: Polihexanid-Lösung 0,02 % / 0,04 % (NRF 11.128), Hydrophiles Polihexanid-Gel 0,04 % / 0,1 % (NRF 11.131), Polihexanid-Augentropfen 0,02 % (NRF 15.25), Polihexanid-Augenbad 0,04 % (NRF 15.26), Polihexanid-Stammlösung 0,1 %. Seit 2007 steht mit Serasept in Deutschland ein zugelassenes Arzneimittel mit 0,02 % bzw. 0,04 % Polihexanid in einer sterilen, gebrauchsfertigen Darreichung zur Verfügung. In Deutschland, Österreich und der Schweiz sind sterile, gebrauchsfertige Wundspüllösungen (z.B. Lavasorb, Lavanid) auf Basis von 0,02 bzw. 0,04 % Polihexanid mit Macrogolum (Polyethylenglycol 4000) zur Reinigung, Erregerausschwemmung und Feuchthalten von Wunden als Medizinprodukt registriert. Ebenso ist die Wundspüllösung Prontosan mit den Komponenten Undecylenamidpropyl-Betain als oberflächenaktive Substanz und mit 0,1 % Polihexanid als antiseptischem Wirkstoff erhältlich. In der Schweiz ist Polihexanid als Konzentrat und Gebrauchslösung als Arzneimittel registriert (*Kramer u. Roth 2008*). In den USA und in Deutschland wurde 2008 die antiseptische Wundauflage Suprasorb X + PHMB zur feuchten Wundversorgung als Medizinprodukt eingeführt. Die Auflage setzt Polihexanid in der wundheilungsfördernden Konzentration frei (*Roth et. al. 2010)*. Trockene, Polihexanid haltige Wundauflagen gibt es beispielsweise unter den Handels-namen Telfa® A.M.D. oder Kerlix® A.M.D.

Händedesinfektion und Hautantiseptik: Polihexanid wird in Kombination mit Alkoholen als remanenter Wirkstoff in Händedesinfektionsmitteln und Hautantiseptika eingesetzt. In Kombination mit Detergentien wird Polihexanid

zur Ganzkörpersanierung von MRSA-Trägern einschließlich Haarwäsche und zur Anwendung im äußeren Gehörgang eingesetzt (*Mills 2005; Kramer und Miksits, 2008*). Ein klinischer Fallbericht bestätigt die erfolgreiche Behandlung einer tiefen *Trichophyton mentagrophytes* - Mykose bei einem Diabetiker durch systemische Gabe von Terbinafin in Kombination mit lokaler Anwendung von Ciclopirox und Polihexanid (*Hohaus et al. 2003*).

Schleimhautantiseptik: Der Wirkstoff wird zur Sanierung von MRSA-Trägern im Vestibulum nasi und zur Spülung des Mund-Rachen-Raums verwendet. In der Mundhöhle erreicht Polihexanid nur zum Teil die plaquehemmende Wirksamkeit von Chlorhexidin (*Rosin et al. 2001, Rosin et al. 2002, Welk et al. 2005*). Brecx *et al.* (*2008*) konnten *in vivo* in einer doppelblinden randomisierten kontrollierten Studie die Wirksamkeit einer Polihexanid-basierten Mundspüllösung (Prontolind®) gegen die *de novo* - Biofilmbildung bestätigen. Dabei unterschied sich die Wirksamkeit nicht von der Positivkontrolle 0,2 % Chlorhexidin Mundspüllösung. Wegen der Langzeittoxizität von Chlorhexidin ist Polihexanid daher eine aussichtsreiche Alternative (*Kramer u. Roth 2008*).
Zur Behandlung der bakteriellen Vaginose war die einmalige Applikation eines Polihexanidgels der 7-tägigen Anwendung von Clindamycincream gleichwertig (*Gerli et al. 2003*, *Minozzi et al. 2008*). In einer prospektiven, doppelt blinden, randomisierten und Plazebo kontrollierten Studie war Polihexanid auch gegen genitale Warzen wirksam (*Marelli et al. 2005*).

Augenantiseptik: 0,02 % Polihexanid ist wirksam gegen die Akanthamoeben-Keratitis sowohl als Einzelwirkstoff (*Elder et al. 1994, Lindquist 1998, Lim et al. 2008*) als auch in Kombination mit Propamidin (*Duguid et al. 1997, Donoso et al. 2002*), das in jüngerer Zeit auch durch Hexamidin ersetzt wird (*Cazzaniga et al. 2002, Walochnik et al. 2003*). Polihexanid gilt als Mittel der 1. Wahl für diese Indikation (*Larkin et al. 1992, Gray et al. 1994, 1996, Azuara-Blanco et al. 1997, Panda et al. 2003, Walochnik et al. 2003*). Allerdings wurde über therapieresistente Formen berichtet, insbesondere bei zu spätem Behandlungsbeginn und bei tiefer Stromainfektion (*Murdoch et al. 1998*), wobei kein Zusammenhang zwischen der *in vitro* Empfindlichkeit und dem Behandlungserfolg bestand (*Perez-Santonja et al. 2003, Seal, 2003*).

Polihexanid erwies sich 0,02 %ig auch bei *Nocardia asteroides* - Keratitis als wirksam (*Lin et al. 1997*). Bei der experimentellen *Aspergillus*-Keratitis am Kaninchen war Polihexanid mäßig wirksam, während PVP-Iod unwirksam war (*Panda et al. 2003*). Polihexanid ist 0,02 % auch wirksam im Modell der *Fusarium* - Keratomykose des Kaninchens (*Fiscella et al. 1997*).
Zur präoperativen Antiseptik vor Kataraktoperationen erwies sich Polihexanid bezüglich Erregerelimination und Remanenz wirksamer als PVP-Iod (*Hansmann et al. 2004, 2005*). Als Alternative für PVP-Iod kommt Polihexanid 0,02-0,04 % zur Anwendung am Auge in Betracht, weil es bezüglich Zytotoxizität, Reizwirkung und remanenter Wirkung 2,5% PVP-Iod überlegen ist *(Kramer u. Behrens-Baumann 1997)*, allerdings ist der im Vergleich zu PVP-Iod langsamere Wirkungseintritt (geeignetes Applikationsregime) zu beachten, (*Kramer u. Roth 2008*).

Wundantiseptik: Für die Indikation zur Antiseptik müssen Stadium, Schwere, Lokalisation und Grad der Kontamination/Infektion der Wunde bewertet werden. Des Weiteren ist die Frage nach den Folgen einer möglichen Infektion entscheidend, nicht zuletzt auch im Zusammenhang mit insbesondere multiresistenten Erregern. Umso infektionsgefährdeter die Wunde ist, umso wichtiger ist die Antiseptik als entscheidender Teil der Therapie (*Dissemond et al. 2011*). Kritisch kolonisierte und infizierte Wunde müssen unabhängig von zusätzlich eingesetzten Behandlungsmethoden zunächst antiseptisch saniert werden. Bei Zeichen der Entzündungsfortleitung (Phlegmone, Lymphangitis, -adenitis) ist zusätzlich eine systemische antimikrobielle Chemotherapie durchzuführen (*Kramer et al. 2008*).
Obwohl für Polihexanid, wie für alle Wundantiseptika, nur eingeschränkte Daten aus randomisierten, kontrollierten Doppelblindstudien vorliegen, hat sich der Wirkstoff im Ergebnis der Gesamtbeurteilung der *in vitro*-Befunde, der Testung in *ex vivo* - Modellen und am Versuchstier sowie der bisherigen Therapie-ergebnisse in der Humanmedizin als Therapiestandard in der chronischen Wundbehandlung etabliert und gilt als Mittel der ersten Wahl bei schlecht heilenden chronischen bzw. sehr empfindlichen Wunden mit folgenden Konzentrationsempfehlungen: 0,04%ig zur Reinigung verschmutzter traumatischer Wunden, 0,02%ig zur wiederholten therapeutischen Anwendung auf infizierten Wunden einschließlich Spül-Saug-Drainage und längerfristigen

feuchten Wundabdeckung (*Mulder et al. 2007*, *Kramer u. Roth 2008*). Auf dieser Grundlage wird Polihexanid in einer unabhängigen Konsensusempfehlung als Wirkstoff der Wahl für schlecht heilende und chronische Wunden bewertet (*Kramer et al. 2004a*). Unter Mitarbeit von Vertretern der Austrian Wound Association, der Deutschen Gesellschaft für Wundheilung und Wundbehandlung sowie der Initiative Chronische Wunde wurde 2009 eine weitere Expertenempfehlung zur Behandlung kritisch kolonisierter oder lokal infizierter akuter und chronischer Wunden mit Polihexanid gegeben, um einen Schritt in Richtung Therapiestandard zu unternehmen (*Dissemond et al. 2009*). Ebenso wird Polihexanid in verschiedenen Leitlinien der AWMF als antiseptischer Wirkstoff empfohlen: AWMF-Leitlinien-Register Nr. 029/019 2004, Nr.013/048 2004, Nr.013/038 2004, Nr.037/009 1999/2004, Nr.036/005 1999, Nr.013/014 2000 (*AWMF*). In zwei Buchbeiträgen wird folgendes Fazit gezogen: Für schlecht heilende chronische und für sehr empfindliche Wunden (z. B. Verbrennungs-wunden) gilt Polihexanid aufgrund der Gewebeverträglichkeit und der klinisch imponierenden Wundheilungsförderung (*Gilliver 2009*) nach derzeitigem Kenntnisstand als Mittel der 1. Wahl. Geeignet sind Polihexanid basierte Wundantiseptika ebenso zur antiseptischen Primärversorgung traumatischer stark verschmutzter Wunden (*Kramer et al. 2004b, Assadian u. Kramer 2006)*.

In einem Mikrotiter-Assay reagierte Polihexanid mit häufig eingesetzten Antibiotika synergistisch (*Hübner et al. 2007*), was bei Chlorhexidin nicht der Fall war (*Hübner u. Kramer 2008*). Das ist insofern von praktischem Interesse, da sich systemisch angewandte Antibiotika in der Wundflüssigkeit anreichern und mit einem parallel lokal applizierten Antiseptikum interagieren können.

Gute klinische Erfahrungen liegen für folgende Indikationen vor: traumatische verschmutzte Wunden (*Roth et al. 2007*), infizierte Wunden und Weichteilphlegmone (Spül-Saug-Drainage), Osteomyelitis (Freilegung, prä-, intra- und postoperative Spülung), venöse Beinulcera (*Andriessen u. Eberlein 2008, Roth u. Kramer 2009*), superinfiziertes Ulcus cruris und Verbrennungen II. Grades (feuchte Abdeckung) (*Bruck et al. 2000, Daeschlein et al. 2007*), intraoperative Spülung unmittelbar vor Hüftendoprothesen-Implantation bei Verzicht auf perioperative Chemoprophylaxe (*Roth et al. 1985*).

Darüber hinaus bestätigen klinische Fallberichte die Eignung von Polihexanid zur Wundantiseptik in unterschiedlichen Settings. Bei vereiterter perikardialer und kardialer Fistel wurde zusätzlich zur Antibiotikatherapie erfolgreich eine Lavage der Fistel mit Lavanid durchgeführt (*Wiedmann et al. 2005*). Bei MRSA infiziertem Ulcera cruris war die Eradikation innerhalb von 2 – 8 d erreichbar (*Dissemond et al. 2004, Rietkotter et al. 2007*). Die 2-Stadien-Revision bei infizierter Hüftendoprothese war mit Polihexanid ohne lokale Applikation lokaler Antibiotikaträger mit gleichem Ergebnis erreichbar wie bei Einsatz der Antibiotikaträger (*Disch et al. 2007*). Ebenfalls wurde über die günstige Wirkung bei Revisionseingriffen infizierter Hüftendoprothesen berichtet (*Wagner 1995*).

Polihexanid bindet stark an Baumwolle und Viskose (*Payne u. Kudner 1996, Kawabata u. Taylor 2004, Blackburn et al. 2006, Kawabata u. Taylor 2006, 2007*), weshalb es erfolgreich in Wundauflagen nicht nur zur antibakteriellen (*Cazzaniga et al. 2002, Salas Campos et al. 2006, Lee et al. 2007,Schmitz et al. 2007*), sondern auch zur antifungiellen Behandlung (*Wiegand et al., 2008c*) eingesetzt wird. Die mikrobielle Barrierefunktion von Wundauflagen ist auch in Gegenwart von Protein gewährleistet, wobei die Wundepithelisierung nicht gehemmt wurde *(Reitsma u. Rodeheaver 2003*), (*Kramer u. Roth 2008*). Seit Einführung und klinischer Erprobung der sog. HydroBalance-Wundauflagen mit Polihexanid als antiseptischem Wirkstoffzusatz wird übereinstimmend die gute Verträglichkeit und antiseptische Effektivität bestätigt (*Bruckner et al. 2008, Jørgensen u. Nygaard 2008; Mosti u. Mattaliano 2008, Mosti et al. 2008, Fracchia u. Schmitz 2008*). Mit derartigen Wundauflagen konnte nach max. 2 Wochen auch eine MRSA-Kolonisation komplett eradiziert werden (*Eberlein et al. 2008*).

Für den Einsatz von Polihexanid zur Wundantiseptik lässt sich folgendes Fazit ableiten: Für chronische und sehr empfindliche Wunden (Verbrennungswunden) gilt Polihexanid aufgrund der Wirksamkeit und Wundheilungsförderung derzeit als Mittel der 1. Wahl. Geeignet sind Polihexanid-basierte Wundantiseptika jedoch gleichermaßen zur antiseptischen Primärversorgung traumatischer stark verschmutzter Wunden (*Kramer et al. 2013*).

1.2.6 Zusammenfassende Bewertung

Polihexanid ist ein mikrobizider Wirkstoff, der sich für die antiseptische Anwendung am Menschen durch ein breites Wirkspektrum bei gleichzeitig herausragend guter Verträglichkeit, Toxikologie und einem geringen, anderen antiseptischen Wirkstoffen weit überlegenen Risikoprofil (*Kramer 1995*) auszeichnet. Der Wirkmechanismus macht eine Resistenzentwicklung der Zielorganismen unwahrscheinlich, da die negative Oberflächenladung für die Gesamtheit der Lebensprozesse von Bakterien, aber auch von Hefen und Pilzen essentiell ist. Damit ist Polihexanid auch besonders für den Einsatz gegen die zunehmende Zahl an Antibiotika-resistenter Erreger geeignet und nützlich. Polihexanid wird in Leitlinien und Konsensusempfehlungen umfassend als Wirkstoff der Wahl für die Behandlung kritisch kolonisierter oder lokal infizierter akuter und chronischer Wunden bewertet (*Kramer et al. 2004a; Dissemond et al. 2009, Dissemond et al. 2011*). Für den Wirkstoff spricht der günstige Biokompatibilitätsindex, die hohe, z.T. virozide Wirksamkeit bei guter Verträglichkeit, die starke Remanenz, die nicht messbare Resorption im analytischen Nachweisbereich und die *in vitro* und *in vivo* nachgewiesene Wundheilungsförderung. Kontraindikationen sind der negativer Einfluss auf die Mikrozirkulation und die (ggf. dosisabhängige) Unverträglichkeit für das Peritoneum und hyalines Knorpelgewebe sowie der Einsatz im gesamten zentralen Nervensystem, im Mittel- und Innenohr und während der zumindest ersten 4 Monate der Schwangerschaft (*Kramer 2008; DAC/NRF 2008, Röhner et al. 2011, Röhner et al. 2012*).

An dieser Stelle setzt die vorliegende Dissertation auf Basis eigener, im obigen z.T. bereits zitierter Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirksamkeit mit der Zielstellung an, durch konsequente Anwendung der Erkenntnisse zu den biochemischen und biophysikalischen Grundlagen des Wirkmechanismus des Polihexanids an der bakteriellen Zellumhüllung sowie unter Berücksichtigung der Unterschiede zwischen mikrobiellen und humanen Zellmembranen neue Darreichungsformen zu entwickeln, die die oben aufgeführten Einsatzeinschränken des Polihexanids weiter reduzieren können.

2 Material und Methoden

In diesem Abschnitt werden die im Rahmen dieser Studie eingesetzten Untersuchungsmethoden zusammengefasst. Eine detaillierte Beschreibung ist den beigefügten Publikationen zu entnehmen.

2.1 Verwendete Prüforganismen

In den Mikrodilutionsversuchen wurden in Anlehnung an die DIN 58940-8 (2002) und ihre Beiblätter die folgenden Prüforganismen eingesetzt: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Candida albicans* ATCC 10231, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Haemophilus influenzae*, ein Methicilin-resistenter *S. aureus* (Norddeutscher Epidemiestamm) und ein Vancomycin-resistenter *Enterococcus* – letztere beides klinische Isolate des Institutes für Hygiene und Umweltmedizin der Universitätsmedizin Greifswald. In den Mikrobizidie-Prüfungen wurden die Stämme *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 15442 und *C. albicans* ATCC 10231 verwendet. Für die *in vitro* Zytotoxizitätstestungen wurde die in der ISO 10993-5 (*2009*) empfohlene Mäusefibroblasten-Zelllinie L929 (ATCC CCL 1) verwendet.

2.2 Prüfsubstanzen

Für die reinen Mikrobizidie-Testungen wurden die kommerziell verfügbaren Produkte Lavasept® (B.Braun, Melsungen, Deutschland; 20 % Polihexanid, Macrogol 4000), Serasept® (Serag-Wiessner, Naila, Deutschland; 0,04 % Polihexanid, Macrogol 4000) und Prontosan® (B.Braun, Melsungen, Deutschland; 0,1 % Polihexanid, 0,1 % Undecylenamidopropyl-Betain) bzw. die Wirkstoffe Polihexanid (Fagron, Hamburg, Deutschland, 20 % Polihexanid), Octenidin (Schülke & Mayr, Norderstedt, Deutschland), Triclosan, PVP-Iod und Chlorhexidindigluconat (Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland) verwendet.

Liposomen und o/w-Emulsionen mit einem Ei-Phosphatidylcholin (EPC) Gehalt von 6 % oder 1,2 % wurden aus Lipoid E80 (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Deutschland) bzw. Lipofundin® MCT 20 % bzw. Lipofundin® MCT 10 % (B.Braun Melsungen, Deutschland) durch Hochdruck-Homogenisation hergestellt. Zur Beladung mit PHMB wurde Cosmocil PG (Arch Chemicals Inc. Norwalk, CT, US) verwendet (PHMB-Gehalt = 20 % w/v). Die mittlere

Partikelgröße der hergestellten Präparationen wurde mittels Photonen-Korrelations-Spectroskopie (PCS) ermittelt. Zur Bestimmung des freien und des EPC-assoziierten PHMB wurden die Wasser- und die Lipid-Phase durch Zentrifugation über Ultrafree MC Filter (Millipore) mit Durapore PVDF Membran (o/w-Emulsionen) bzw. Nanosep 300K Omega Zentrifugaleinsätzen (Pall Corporation) getrennt (Liposomen). Die PHMB-Konzentration in der wässrigen Phase wurde colorimetrisch/spektral-photometrisch analysiert.

2.3 Mikrodilutionsmethode

Die Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration und der Minimalen bakteriziden Konzentration erfolgte auf Basis der DIN 58940-8 (*2002*) und der DIN 58940-7 (*2009*) unter Beachtung der entsprechenden Beiblätter. 100 µl der gemäß Normvorgaben kultivierten Mikroorganismen (10^5 KbE / ml) wurden mit 100 µl geometrisch verdünnter Wirkstofflösungen in 96-Well Mikrotiterplatten für 24 h und 48 h kultiviert; die MHK ist die Wirkstoff-verdünnung, bei der nach der Inkubation keine Trübung des Prüfansatzes durch Vermehrung der Prüforganismen erkennbar ist. Nach 24 h wurde durch Ausplattieren eines Aliquotes von Verdünnungen im Grenzbereich der Wirksamkeit (Trübung) auf Blutagar die MBK bestimmt.

2.4 Quantitativer Suspensionsversuch

Die Testungen der antimikrobiellen Wirksamkeit erfolgten auf Basis der europäischen Normen prEN 12054 (*1995*), prEN 13727 (*1999*), EN 1040 (*2005*) und EN 1275 (*2005*). Grundprinzip dieser Testungen ist die Durchmischung einer Testorganismensuspension (für Bakterien in der Größenordnung 10^8 - 10^9 und für Hefen / Pilze 10^7 – 10^8 Koloniebildende Einheiten [KbE] / ml) mit einer Wirkstoff- oder Produktprüflösung in einem Gesamtvolumen von 10 ml, wobei die Interaktion des Wirkstoffs mit dem Prüforganismus nach der zu prüfenden Einwirkzeit durch Verdünnung eines Aliquots des Prüfgemisches in einem für den Wirkstoff validierten Neutralisationsmittel genormt vollständig abgestoppt wird. Aus dem resultierenden Prüfneutralisationsgemisch und ggf. dessen dekadischen Verdünnungen wird 1 ml in Doppelbestimmung auf einem geeigneten Närmedium ausplattiert und inkubiert. Aus der Anzahl der KbE kann die Zahl der überlebenden Prüforganismen im Prüfgemisch zum Ende der Einwirkzeit berechnet werden. Durch Bezug auf die eingesetzte Koloniezahl

lässt sich damit der durch den Wirkstoff verursachte Reduktionsfaktor bestimmen; dieser wird logarithmiert angeben. In leichter Abwandlung dieses prinzipiellen Verfahrens beschreibt die prEN 13727 den Zusatz einer organischen Belastung zur Testorganismensuspension, durch die die Wirksamkeit des Prüfproduktes auch unter simulierten typischen Umgebungsbedingungen am angedachten realen Einsatzort beurteilt werden kann. Typische, über die Vorgaben der prEN 13727 hinausgehende Belastungen zur Prüfung von Wund- und Schleimhautantiseptika wurden durch Pitten *et al.* (*2003*) definiert und finden daher in die hier genutzten Methoden Eingang.

2.5 *In vitro* Zytotoxizitätstestung

Die Testungen erfolgten zur Simulation von Wundflüssigkeit (*Campbell et al. 2003*) in Anwesenheit von 10 % fötalem bovinen Serum (BSA) mit L929-Zellen bei mind. 80 % Konfluenz. Die Zellvitalität wurde mittels MTT- oder NR-Methode bestimmt. Der MTT Test basiert auf der Umwandlung des gelb gefärbten Tetrazoliumsalzes MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl-tetrazolium-bromid] in blaues, unlösliches Formazanderivat durch die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase. Die NR-Methode ist in der ISO 10993-5 (*2009*) standardisiert – der Neutralrot (NR) Lebendfarbstoff wird in die Lysosomen vitaler Zellen inkorporiert und kann von dort extrahiert werden. In beiden Fällen können die Farbstoffe eluiert und spektralphotometrisch quantifiziert werden - die Absorbtion ist ein direktes Maß der Vitalität der Zellen.

2.6 Kombinierte *in vitro* Zytotoxizitäts- und Mikrobizidie-Testung

Den wie in der einfachen *in vitro* - Zytotoxizitätstestung kultivierten L929 – Zellen wurden unmittelbar vor Zugabe des Prüfproduktes eine *S. aureus* bzw. *P. aeruginosa* – Suspension mit ca. 10^6 KbE / ml zugesetzt. Nach 30 min oder 60 min Einwirkzeit wurde ein Aliquot dieser Prüfsuspension entnommen, die mikrobizide Wirksamkeit mit einem validierten Verfahren neutralisiert, die Anzahl überlebender Prüfbakterien durch das Ausplattieren serieller Verdünnungen dieser Prüfneutralisationslösung bestimmt und der Reduktionsfaktor in Bezug auf die mitgeführte Mediumkontrolle berechnet. Parallel wurde das verbleibende Zellkulturmedium von den L929-Zellen entfernt und die Zytotoxizität mittels NR-Methode bestimmt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Wirksamkeit von Polihexanid im Vergleich zu anderen wundantiseptischen Wirkstoffen

Die Ergebnisse sind ausführlich in der nachfolgenden Publikation dargestellt:

- **Koburger T**, Hübner NO, Braun M, Siebert J, Kramer A: Standardized comparison of the antiseptic efficacy of triclosan, PVP-iodine, octenidine dihydrochloride, polyhexanide and chlorhexidine digluconate. J Antimicrob Chemother. 2010 Aug; 65(8):1712-9

Die Arbeit vergleicht, ebenfalls erstmalig standardisiert und parallel, die Dosis- und Einwirkzeit-abhängige bakterizide und levurozide Wirksamkeit, aber auch der MHKs und MBKs der wesentlichen wundantiseptischen Wirkstoffe PVP-Iod, Polihexanid, Octenidin, Chlorhexidin und Triclosan unter identischen Prüfbedingungen mit der Zielstellung, zumindest auf dieser Basis Empfehlungen für die Auswahl von antimikrobiellen Wirkstoffen für die verschiedene Anforderungen der Wundantiseptik geben zu können. In Bezug auf die zum Erreichen derselben antimikrobiellen Wirksamkeit (MHK, MBK, Bakterizidie und Levurozidie) nötige Wirkstoffkonzentration in Einwirkzeiten von 1 min bis 24 h in diesen Untersuchungen ohne organische Belastung konnte folgendes Ranking (zunehmende Wirkstoff-konzentration) aufgestellt werden: Polihexanid = Octenidin > Chlorhexidin > PVP-Iod > Triclosan. Für Einwirkzeiten < 5 min verschiebt sich das Ranking jedoch wie folgt: Octenidin = PVP-Iod >> Polihexanid ≥ Chlorhexidin > Triclosan. Jedoch wurden in diesen Untersuchungen bekannte Wirksamkeitslücken des Triclosan (*P. aeruginosa*) und des PVP-Iod (*S. pneumoniae*) bestätigt. Die Befunde zur Wirkkinetik dieser antiseptischen Wirkstoffe allein können eine Einsatzempfehlung für die Praxis noch nicht hinreichend begründen. Bislang unveröffentliche Daten zeigen, dass sich die Situation in Gegenwart einer organischen Belastung von 10 % Albumin prinzipiell genauso darstellt, lediglich die zum Erreichen der geforderten Reduktionsfaktoren nötigen Wirkstoffkonzentrationen erhöhen sich proportional. Für Polihexanid werden im Folgenden weitere Untersuchungen zur Wirksamkeit unter verschiedenen praxisrelevanten organischen Belastungen präsentiert.

3.2 Antimikrobielle Wirksamkeit von Polihexanid unter verschiedenen organischen Belastungen

Die Ergebnisse sind ausführlich in der nachfolgenden Publikation dargestellt:

- **Koburger T**, Müller G, Eisenbeiß W, Assadian O, Kramer A: Mikrobiozide Wirksamkeit / Microbicidal activity of polihexanide. GMS Krankenhaushyg Interdiszip 2007; 2(2):Doc44 (20071228)

Die Arbeit beurteilt vor dem Hintergrund der zunehmenden Bedeutung von Polihexanid in der Antiseptik auf Basis des Europäischen Normentwurfes prEN 12054 erstmalig unter standardisierten Bedingungen *in vitro* die antimikrobielle Wirksamkeit der Polihexanid-haltigen Präparate Lavasept®, Serasept® und Prontosan® in Gegenwart verschiedener für die Wundantiseptik relevanter organischer Belastungen. Im Gegensatz zu den im medizinischen Bereich traditionell zumindest für Antibiotika oft herangezogenen MHK-Werten wurde hier der Umfang der tatsächlichen Abtötung repräsentativer Prüforganismen innerhalb von vergleichsweise kurzen Einwirkzeiten von 1 min bis 60 min bestimmt.

Die *in vitro* Wirksamkeit von Polihexanid wurde damit in einem typischerweise auf europäischer Ebene zur Effektivitätsbeurteilung bei der Marktzulassung von antimikrobiellen Bioziden, Desinfektionsmitteln, Antiseptika oder ggf. Arzneimitteln als Bewertungsgrundlage geforderten Prüfverfahren mit dem Ergebnis gezeigt, dass der Wirkstoff die Anforderungen an ein Antiseptikum (*Pitten et al. 2003*) auch in Gegenwart verschiedener standardmäßiger oder darüber hinausgehender, und auch wundtypischer organischer Belastungen innerhalb von Einwirkzeiten zwischen 1 min bis max. 30 min erfüllt oder übertrifft. Spätestens nach 10 min Einwirkzeit wurden diese Wirksamkeiten bei einer Polihexanid-Konzentrationen erreicht, die in der Praxis beispielsweise für das Lavasept® oder das Serasept® bei sehr guter Verträglichkeit zur Behandlung auch chronischer Wunden empfohlen wird (0,02 %). Der Hefepilz *Candida albicans* stellte sich in den hier vorgelegten Untersuchungen zur bakteriziden und levuroziden Wirksamkeit dabei als am resistentesten gegenüber dem Wirkstoff heraus, was mit den Ergebnissen zur Wirksamkeit ohne Belastung, aber auch mit dem Wissen über die Angriffspunkte des Polihexanids an der Zytoplasmamembran korreliert – Phospholipide mit

negativer Nettoladung, beispielsweise Phosphatidylglycerol. Dieser Typ Phospholipid ist im Vergleich zu Bakterien bei Pilzen zugunsten neutraler Phospolipide wie Phosphatidylcholin und/oder Phosphatidyl-ethanolamin weniger stark repräsentiert, insofern überrascht es nicht, dass höhere Wirkstoffkonzentrationen zum Erreichen vergleichbarer Reduktionsfaktoren nötig sind.

3.3 Mikrobizidie und *in vitro*- Zytotoxizität von Polihexanid in Abhängigkeit von der Galenik

Die Ergebnisse sind ausführlich in der nachfolgenden Publikation dargestellt:

- Müller G, **Koburger T**, Jethon FUW, Kramer A: Vergleich der bakterioziden Wirksamkeit und In-vitro-Zytotoxizität von Lavasept® und Prontosan® / Comparison of the bactericidal efficacy and in vitro cytotoxicity of Lavasept® and Prontosan®. GMS Krankenhhyg Interdiszip. 2007; 2(2):Doc42 (20071228)

Die Arbeit untersucht auf Basis der prEN 13727 bzw. der EN ISO 10993-5 den Einfluss (im Sinne eines möglichen Koergismus) der unterschiedlichen Rezeptur-Zusätze in beiden Präparaten – Macrogol 4000 (ein penetrationsförderndes Polyethylenglycol) im Lavasept® und Undecylenamidopropylbetain (ein wundreinigungsverstärkendes, amphotheres Tensid) im Prontosan® - sowohl auf die bakterizide Wirksamkeit als auch auf die *in vitro* Zytotoxizität bei gleicher Polihexanid-Konzentration.

Es zeigte sich, dass die Mikrobizidie und insbesondere die Verträglichkeit von Polihexanid durch die Zusätze in den Produktrezepturen moduliert werden können. Beispielsweise beschleunigt der Zusatz von Undecylenamidopropylbetain im Prontosan® im Vergleich zum Macrogol-haltigen Lavasept® die Wirksamkeit gleicher Polihexanidkonzentrationen (0,089 %) gegenüber dem Gram-negativen Bakterium *P. aeruginosa*. Bei geringeren Konzentrationen und Einwirkzeiten > 15 min schien sich der Effekt jedoch sogar leicht umzukehren. Für den Gram-positiven Prüforganismus *S. aureus* wurde kein Unterschied festgestellt. Gleichzeitig wurde bis zu einer PHMB-Konzentration von 0,04 % für das Betain-haltige Produkt eine deutlich geringere Zytotoxizität gegenüber der verwendeten Mäusefibroblasten-Zelllinie L929 gezeigt, die IC_{50} war für das Betain-haltige Produkt für alle

Konzentration/Einwirkzeit-Relationen höher als für das Macrogol-haltige Lavasept®.

Im Gegensatz zum ungeladenen Macrogol ist Undecylenamidopropylbetain ein amphoteres Tensid, das einerseits wahrscheinlich eine eigene antimikrobielle Wirksamkeit aufweist, das andererseits aber auch mit dem PHMB um Bindungsstellen bevorzugt an der eukarytischen Zytoplasmamembran konkurrieren kann. Es scheint also eine Frage des Gesamtgleichgewichts aus Mengenverhältnissen von Wirkstoff und Zusatzstoffen einerseits und Bindungsaffinitäten zu den verschiedenen eukaryotischen oder mikrobiellen zytoplasmatischen Zielstrukturen andererseits zu sein, das darüber entscheidet, wie stark das mikrobizide und zytoxische Potential des Polihexanid jeweils zur Ausprägung kommt.

3.4 Untersuchungen zur Reduktion der *in vitro* – Zytotoxizität von Polihexanid unter Beibehaltung der antimikrobiellen Wirksamkeit

Die Ergebnisse sind ausführlich in der nachfolgenden Publikation dargestellt:

- Müller G, Kramer A, Schmitt J, Harden D, **Koburger T**: Reduced cytotoxicity of polyhexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB) by egg phosphatidylcholine while maintaining antimicrobial efficacy. Chem Biol Interact. 2011 Apr 25;190(2-3):171-8

Auf Basis der bekannten biochemischen und biopysikalischen Grundlagen der antimikrobiellen Wirksamkeit von Polihexanid konnte gezeigt werden, dass die Verminderung der Zytotoxizität des Polihexanids bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung der bakteriziden Wirksamkeit möglich ist, indem Polihexanid in Phosphatidylcholin-haltigen Liposomen bzw. oil/water (o/w) - Emulsionen dargereicht wird. Experimentell wurde das Polihexanid dazu mit primär Phosphatidylcholin-haltigen Liposomen (egg phosphatidylcholin – EPC) bzw. mit 0,4 % bzw. 0,6 % EPC – haltigen o/w - Emulsionen neutraler Triglyceride (Lipofundin®) kombiniert. In erst separaten und dann auch kombinierten Assays zur Bakterizidie und *in vitro* - Zytotoxizität wurde nachgewiesen, dass diese, eukaryotische Zytoplasmamembranen simulierende Präparationen in der Lage sind, PHMB zu binden, es aber wieder, zumindest im Bereich der für die Wundantiseptik verwendeten Polihexanid-Konzentrationen, bevorzugt an die mikrobiellen Zielorganismen unter Beibehaltung der antibakteriellen

Wirksamkeit abzugeben. Innerhalb der gewählten Einwirkzeiten war für die liposomalen Präparationen mit 0,05 %, 0,1 % und 0,2 % PHMB dabei kein zytotoxischer Effekt gegenüber eukaryotischen Zellen nachzuweisen, für die o/w-Emulsionen ergab sich in Abhängigkeit von der EPC-Konzentration ein zytotoxischer Effekt ab einem PHMB-Anteil von 0,1 % bzw. 0,2 %. Freies PHMB war im Testsystem bereits bei 0,05 % zytotoxisch. Korrespondierend dazu wurde für die liposomalen Präparationen jedoch auch eine schlechtere bakterizide Wirksamkeit festgestellt. Als optimale Präparation hinsichtlich Bakterizidie, Zytotoxizität aber auch Herstellbarkeit erwiesen sich insgesamt die o/w – Emulsion Varianten 0,05 % PHMB / 0,4 % EPC und 0,05 % PHMB / 0,6 % EPC. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Bakterien und eukaryotischen Zellen unter simulierten Wundbedingungen war bereits die Kombination 0,05 % PHMB / 0,4 % EPC vollständig bakterizid und dabei ohne zytotoxischen Effekt wirksam.

Diese Ergebnisse lassen sich dahingehend interpretieren, dass zumindest innerhalb der gewählten Einwirkzeiten keine Migration bzw. Diffusion des PHMB aus den Liposomen und o/w-Emulsionen in die in Bezug auf ihre Membrankomposition gleichartigen eukaryotischen Zellen stattfindet, das Affinitätsgleichgewicht des PHMB also erfolgreich in Richtung der bakteriellen Zellwandstrukturen verschoben werden konnte.

3.5 Untersuchungen zur Bindung und Abgabe von Polihexanid durch EPC-haltige o/w-Emulsionen

Die Ergebnisse sind ausführlich in der nachfolgenden Publikation dargestellt:

- Müller G, Koburger T, Kramer A: Interaction of polyhexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB) with phosphatidylcholine containing o/w emulsions and consequences for microbial efficacy and cytotoxicity. Chem Biol Interact. 2013 Jan 25;201(1-3):58-64

Das unter 3.4 beschriebene Darreichungssystem wurde hinsichtlich der Stärke der Bindung des Polihexanids in Phosphatidylcholin-haltigen o/w-Emulsionen und die Kapazität der selektiven Abgabe des Polihexanids an bakterielle Zielorganismen weitergehend beurteilt.

Dabei konnte gezeigt werden, dass unter Simulation von Wundbedingungen (MEM-Zellkulturmedium mit 10 % FBS) beispielsweise bei Einsatz der o/w-

Emulsion 0,05 % PHMB/0,6 % EPC etwa 0,003 % PHMB bioverfügbar, also antimikrobiell wirksam, vorliegt. In den entsprechenden Mikrobizidie-Testungen konnte weiterhin gezeigt werden, dass im Gegensatz zu einer wässrigen 0,003 %igen PHMB-Lösung die korrespondierende o/w-Emulsion 0,05 % PHMB/0,6 % EPC als PHMB-Depot fungiert, das auch nach 8 Passagen durch eine Bakteriensuspension noch die gleiche, ausreichend wundantiseptische Wirksamkeit aufweist wie in der ersten Passage. Für die wässrige Präparation war bereits nach 3 Passagen ein sich kontinuierlich fortsetzender Abfall der Bakterizidie zu verzeichnen.

Die Kombination von 0,05 % PHMB mit Lipofundin® zu einer o/w-Emulsion führt zumindest *in vitro* somit bei vollständiger Vermeidung der für eukaryotische Zellen ansonsten gegebenen Zytotoxizität nicht nur zu einer Verschiebung des Wirkgleichgewichts in Richtung bakterieller Targets, sondern es ergibt sich darüber hinaus die Möglichkeit, diese Präparation als Wirkstoffdepot für größere als üblicherweise eingesetzte PHMB-Mengen zu nutzen, die dann beispielsweise im Falle einer anhaltenden, erneuten oder wiederaufflammenden bakteriellen Infektion gezielt und zusätzlich zum ohnehin gegebenen remanenten Effekt des PHMB in nicht oder kaum zytotoxischer Konzentration als antiseptischer Wirkstoff abgegeben werden können.

4 Zusammenfassung

Durch die vorgestellten *in vitro* - Studien konnte gezeigt werden, dass Polihexanid in seiner antimikrobiellen Wirksamkeit im Vergleich zu anderen bekannten Wirkstoffen sowie in Anwesenheit anwendungsnah simulierter organischer Belastungen ein für die Wundantisepsis geeigneter Wirkstoff ist. Im Kontext mit den bekannten Daten zur Verträglichkeit zumindest im Bereich der medizinischen Anwendungskonzentrationen (0,02 % und 0,04 % Polihexanid) und zum Einfluss auf die Wundheilung stützen die hier erhobenen Daten die bestehende Konsensusempfehlung zur Wundantiseptik (*Kramer et al. 2004a*), nach der Polihexanid zwar auch zur akuten Wundantiseptik, insbesondere aber zur Behandlung chronischer Wunden als geeignet angesehen wird.

Auf Basis der biochemischen und biopysikalischen Grundlagen der antimikrobiellen Wirksamkeit von Polihexanid wurde die Möglichkeit der weiteren Verminderung der Zytotoxizität des Polihexanids bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung der bakteriziden Wirksamkeit durch die Bindung an Phosphatidylcholin-haltige o/w-Emulsionen gezeigt; im Testsystem bei gleichzeitiger Anwesenheit von Bakterien und eukaryotischen Zellen unter simulierten Wundbedingungen war bereits die Kombination 0,05 % PHMB / 0,4 % EPC vollständig bakterizid und dabei ohne zytotoxischen Effekt wirksam. Diese Darreichungsform fungiert weiterhin als PHMB-Depot, das auch nach wiederholter Passage durch eine Bakteriensuspension noch die gleiche ausreichend wundantiseptische Wirksamkeit aufweist wie in der ersten Passage.

Erste *in vitro*- und *in vivo*- Erfahrungen mit den hier beschriebenen PHMB-haltigen o/w-Emulsionen wurden bereits durch andere Arbeitsgruppen publiziert, allerdings bislang nur für intakte Haut. Demnach führt diese Darreichungsform zu einer größeren Eindringtiefe des Wirkstoffs in die Haarfollikel, die in Bezug auf die Hautfläche das mit Abstand größte Reservoir für die mikrobielle Hautflora und nicht zuletzt auch für eine Repopulation oberflächlich desinfizierter Haut darstellen. Die *in viv*o – Daten deuten darauf hin, dass mit partikel-gebundenem PHMB eine bessere und nachhaltigere Antisepsis erreicht werden kann (*Lange-Asschenfeldt et al. 2011; Lademan et al. Ulmer et al. 2012; Ulmer et al. 2013*) als mit freiem PHMB.

Zusätzlich zum Beitrag an der bestehenden Konsensusempfehlung des

Polihexanids zur Behandlung chronischer Wunden wird damit als wesentliches Ergebnis der vorliegenden Arbeit die Erschließung von bisher für wässrige PHMB-Lösungen nicht möglicher medizinischer Einsatzgebiete wie in sensiblen Geweben oder Anwendung bei Neugeborenen, am Auge, in Gegenwart von Knorpel, am Peritoneum und in anderen Körperhöhlen (Blase, Harnröhre, vereiterte Gelenkhöhlen), zur Mukositis-Prophylaxe, bei der Krebs-chemotherapie, bei Verbrennungen 3. Grades, aber auch in der antimikrobiellen Behandlung von Zellkulturen vorstellbar. Bis zu einer derartigen therapeutischen Nutzung sind jedoch noch weitere Studien notwendig. Als Vorstufe klinischer Studien bietet sich der HET-CAM (Hen's Egg Test Chorionallontoic Membran) zur Untersuchung der Wundverträglichkeit und Beeinflussung der Durchblutung an (*Spielmann et al. 1993; Liebsch u. Spielmann 2002*), alternativ aber auch komplexere *in vitro* Testsysteme, beispielsweise unter Nutzung von 3D-Zellkultur-Modelle oraler Mucosa oder humaner Epidermis (*OECD 2013a, 2013b*), oder auch von intaktem Gelenkknorpel. Als günstig dürfte sich erweisen, dass es sich sowohl beim Polihexanid, als auch bei dem hier verwendeten Lipofundin® um bereits etablierte und gut verstandene Medizinprodukte handelt (*Hardy u. Puzovic 2009*).

Im Kontext der weltweit zunehmenden Antibiotikaresistenzen und Verbreitungswege nosokomialer Erreger bei entsprechend geringer werdenden chemotherapeutischen Interventionsmöglichkeiten (*Valverde et al. 2004; Fonseca et al. 2010; Kumarasamy et al. 2010; Wadl et al. 2010; Castanheira et al. 2011; Livermore 2012; Magiorakos et al. 2012, Schaumburg et al- 2012; Iwamoto et al. 2013; Pfaller et al. 2013*) nach der bislang nur gut 60-jährigen medizinischen Verfügbarkeit von Antibiotika gewinnt die Möglichkeit des Einsatzes von Antiseptika mit breitem Wirkungsspektrum und guter Verträglichkeit immer mehr an Bedeutung, und dabei auch umso mehr die Erweiterung bestehender Einsatz-Indikationen. Neben der auf den ersten Blick vordringlich erscheinenden Identifikation neuer Wirkstoffe kann nicht zuletzt auf Basis der hier vorgelegten Ergebnisse die auf das gewünschte Wirkumfeld zugeschnittene Modifikation der Darreichungsform bekannter antiseptischer Wirkstoffe als möglicher Weg zur verbesserten antimikrobiellen Therapie herausgestellt werden. Diesem Gedanken folgen beispielsweise bereits

Versuche, die die besonderen Eigenschaften von Nanopartikeln oder Peptid-basierten Nanostrukturen für die Bekämpfung von Infektionen und Kolonisationen zu nutzen (*Di Turi et al. 2012, Eid u. Azzazy, 2013; Kairyte et al. 2013; Lademann et al. 2013; Pelgrift u. Friedman, 2013; Roy et al. 2013*), wobei deren Einsatz wegen der zum Teil hohen ökologischen Fremdartigkeit für biologische Systeme kritisch evaluiert werden muss (*Worthington et al. 2013*). Im Gegensatz dazu ähnelt die Wirkung des Polihexanids auf die zwangsläufig und physiologisch kaum modifizierbar negativ geladenen bakteriellen Zellwandstrukturen dem Wirkmechanismen natürlich vorkommender antibakterieller Peptide wie dem β-Defensin, die einen wesentlichen Bestandteil des evolutionär sehr alten, angeborenen Immunsystems der Vertebraten darstellen – mikrobielle Zellumhüllungen sind anfällig gegenüber polykationischen Verbindungen mit hydrophoben Domänen (*Sugiarto u. Yu 2007; Zhu 2007, Krishnakumari u. Nagaraj 2008; Morgera et al. 2008; Taylor et al. 2008, Zhu u. Gao, 2013*). Auch das stellt einen Vorteil des Polihexanids gegenüber anderen Antiseptika dar.

5 Literaturverzeichnis

Abad-Villar EM, Etter SF, Thiel MA, Hauser PC: Determination of chlorhexidine digluconate and polyhexamethylene biguanide in eye drops by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. 2006; Analytica Chimica Acta 561:133-137.

Allen MJ, Morby AP, White GF: Cooperativity in the binding of the cationic biocide polyhexamethylene biguanide to nucleic acids. 2004; Biochemical and Biophysical Research Communications 318:397-404.

Allen MJ, White GF, Morby AP: The response of *Escherichia coli* to exposure to the biocide polyhexamethylene biguanide. 2006; Microbiology-Sgm 152:989-1000.

Andriessen AE, Eberlein T: Assessment of a wound cleansing solution in the treatment of problem wounds. 2008; Wounds-a Compendium of Clinical Research and Practice 20:171-175.

Ansorg R, Rath PM, Fabry W: Inhibition of the anti-staphylococcal activity of the antiseptic polihexanide by mucin. 2003; Arzneimittelforschung 53:368-371.

Ansorg RA, Azem T, Fabry WH, Rath PM: Influence of mucin on the activity of the antiseptic lavasept against staphylococcus aureus. 2002; Chemotherapy 48:129-133.

Assadian O, Kramer A: Wundinfektionen, Lokalbehandlung sekundär heilender Wunden, in Lippert H (ed): Wundatlas, pp 55-91 Stuttgart: Thieme; 2006

AWMF: Aktuelle Leitlinien: http://www.awmf.org/leitlinien/aktuelle-leitlinien.html

Azuara-Blanco A, Sadiq AS, Hussain M, Lloyd JH, Dua HS: Successful medical treatment of acanthamoeba keratitis. 1997; International Ophthalmology 21:223-227.

Bailey JS, Cox NA, Berrang ME: Bactericidal treatment of hatching eggs iii: Effect of organic contaminants on efficacy of egg sanitizers. 2001; Journal of Applied Poultry Research 10:117-120.

Barker J, Brown MRW, Collier PJ, Farrell I, Gilbert P: Relationship between legionella-pneumophila and acanthamoeba-polyphaga - physiological status and susceptibility to chemical inactivation. 1992; Applied and Environmental Microbiology 58:2420-2425.

Baumgartner E, Fernande R, Turyn D: Change of apparent acidity constant of indicators in polyelectrolyte solutions. 1974; Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions I 70:1518-1526.

Beaudouin E, Kanny G, Morisset M, Renaudin JM, Mertes M, Laxenaire MC, Mouton C, Jacson F, Moneret-Vautrin DA: Immediate hypersensitivity to chlorhexidine: Literature review. 2004; Eur Ann Allergy Clin Immunol 36:123-126.

Behrens-Baumann W, Kramer A: Therapeutic indications for local anti-infectives. Anti-infectives against amebic keratitis. 2002; Dev Ophthalmol (Switzerland) 33:297-303.

Berg A: Einfluss der peritonealen spülung mit dem antiinfektivum polihexanid/lavasept auf die experimentell induzierte peritonitis beim meerschweinchen: Diss Med Fak Univ Greifswald 2000Greifwald 2000).

Bergqvist-Karlsson A: Delayed and immediate-type hypersensitivity to chlorhexidine. 1988; Contact Dermatitis 18:84-88.

Blackburn RS, Harvey A, Kettle LL, Payne JD, Russell SJ: Sorption of poly(hexamethylenebiguanide) on cellulose: Mechanism of binding and molecular recognition. 2006; Langmuir 22:5636-5644.

Bratt H, Hathway DE: Characterisation of the urinary polymer-related material from rats given poly[biguanide-1,5-diylhexamethylene hydrochloride]. Macromol Chem Phys 1976;177:2591-2605

Brecx M, Decker E, Freitag H, Maier G, vOhle C: The effect of polihexanide on dental biofilm formation in vivo: Pan European Federation of the International Association for Dental ResearchLondon 2008).

Broxton P, Woodcock PM, Gilbert P: A study of the anti-bacterial activity of some polyhexamethylene biguanides towards *Escherichia coli* ATCC 8739. 1983; Journal of Applied Bacteriology 54:345-353.

Broxton P, Woodcock PM, Gilbert P: Binding of some polyhexamethylene biguanides to the cell-envelope of *Escherichia coli* ATCC 8739. 1984a; Microbios 41:15-22.

Broxton P, Woodcock PM, Gilbert P: Injury and recovery of Escherichia coli ATCC 8739 from treatment with some polyhexamethylene biguanides. 1984b; Microbios 40:187-193.

Broxton P, Woodcock PM, Heatley F, Gilbert P: Interaction of some polyhexamethylene biguanides and membrane phospholipids in Escherichia coli. 1984c; Journal of Applied Bacteriology 57:115-124.

Bruck JC, Koch S, Kramer A: Klinische und histologische Untersuchungen zur Wirksamkeit von Lavasept auf granulierenden bzw. epithelisierenden Wunden. 2000; Hyg Med suppl. 1:46.

Bruckner M, Schwarz C, Otto F, Heillinger J, Wild T: Evaluation of cellulose and polyhexamethylene biguanide (suprasorb®x+phmb) in therapy of infected wounds. 2008; EWMA Journal Supp 8:54.

Campbell KE, Keast D, Woodbury G, Houghton P: Wear time of two hydrocolloid dressings using a novel *in vivo* model. 2003; Wounds 15;40-48.

Castanheira M, Mendes RE, Woosley LN, Jones RN: Trends in carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* from Europe and the Americas: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2007-09). J Antimicrob Chemother. 2011 Jun;66(6):1409-11.

Cazzaniga A, Serralta V, Davis S, Orr R, Eaglstein W, Mertz PM: The effect of an antimicrobial gauze dressing impregnated with 0.2-percent polyhexamethylene biguanide as a barrier to prevent Pseudomonas aeruginosa wound invasion. 2002; Wounds-a Compendium of Clinical Research and Practice 14:169-176.

Christiansen R, Palmork KH: Distribution and Elimination of [^{14}C] in saithe (*Pollachius virens* L.) after application of single dose of [^{14}C] polyhexamethylene hydrochloridebiguanide. Bull Environ Contam Toxicol 1996;36:121-128.

Ciarlone A, Gangarosa L, Fong B: Detection of p-chloraniline in chlorhexidine solutions using thin-layer chromatography. J Dent Res 1976; 55: (5) 918.

Codling CE, Maillard JY, Russell AD: Performance of contact lens disinfecting solutions against pseudomonas aeruginosa in the presence of organic load. 2003; Eye Contact Lens 29:100-102.

Cox NA, Bailey JS, Berrang ME: Bactericidal treatment of hatching eggs i. Chemical immersion treatments and salmonella. 1998; Journal of Applied Poultry Research 7:347-350.

Cox NA, Berrang ME, Buhr RJ, Bailey JS: Bactericidal treatment of hatching eggs ii. Use of chemical disinfectants with vacuum to reduce salmonella. 1999; Journal of Applied Poultry Research 8:321-326.

Daeschlein G, Assadian O, Bruck JC, Meinl C, Kramer A, Koch S: Feasibility and clinical applicability of polihexanide for treatment of second-degree burn wounds. 2007; Skin Pharmacology and Physiology 20:292-296.

Davies A, Bentley M, Field BS: Comparison of the action of vantocil, cetrimide and chlorhexidine in *Escherichia coli* and its spheroblasts and the protoplasts of gram-positive bacteria. J Appl Bacteriol 1968;31:448-461.

Davies GE, Francis J, Martin AR, Rose FL, Swain G: 1:6-Di-4'-chlorophenyldiguanidhexane ('hibitane'); laboratory investigation of a new antibacterial agent of a high potency. Br J Pharmacol Chemother 1954;9:192-196.

Davis S, Mertz PM, Cazzaniga A, Serralta V, Orr R, Eaglstein W: The use of new antimicrobial gauze dressings: Effects on the rate of epithelialization of partial-thickness wounds. 2002; Wounds-a Compendium of Clinical Research and Practice 14:252-256.

Debbasch C, Chaumeil C, Quesnot S, Batellier L, Scat Y: A study on the activity of antiseptics and antibiotic on two isolates of acanthamoeba from corneal ulcerations. 1998; Journal Francais D Ophtalmologie 21:577-582.

Deutscher Arzneimittel-Codex/Neus Rezeptur-Formularium NRF. Eschborn, Govi, 2008.

DIN 58940-7 (2009): Medizinische Mikrobiologie - Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika - Teil 7: Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) mit der Mikrobouillondilutionsmethode;. Berlin, Beuth Verlag.

DIN 58940-8 (2002): Medizinische Mikrobiologie - Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika - Teil 8: Mikrodilution; Allgemeine methodenspezifische Anforderungen. Berlin, Beuth Verlag.

DIN EN 1040 (2005): Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika - Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der bakteriziden Wirkung (Basistest) chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika - Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 1). Berlin, Beuth Verlag.

DIN EN 1275 (2005): Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika - Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der fungiziden oder levuroziden Wirkung (Basistest) chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika - Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 1). Berlin, Beuth Verlag.

Di Turi G, Riggio C, Vittorio O, Marconcini S, Briguglio F, Funel N, Campani D, Barone A, Raffa V, Covani U: Sub-micrometric liposomes as drug delivery systems in the treatment of periodontitis. Int J Immunopathol Pharmacol. 2012 Jul-Sep;25(3): 657-70.

Disch AC, Matziolis G, Perka C: Two-stage operative strategy without local antibiotic treatment for infected hip arthroplasty: Clinical and radiological outcome. 2007; Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery 127:691-697.

Dissemond J, Assadian O, Gerber V, Kingsley A, Kramer A, Leaper DJ, Mosti G, Piatkowski de Grzymala A, Riepe G, Risse A, Romanelli M, Strohal R, Traber J, Vasel-Biergans A, Wild T, Eberlein T: Classification of wounds at risk and their antimicrobial treatment with polihexanide: a practice-oriented expert recommendation. Skin Pharmacol Physiol 2011;24(5):245-55.

Dissemond J, Geisheimer M, Goos M: Eradikation eines orsa bei einem patienten mit ulcus cruris durch lavasept-gel. 2004; ZfW 1:29-32.

Dissemond J, Gerber V, Kramer A, Riepe G, Strohal R, Vasel-Biergans A, Eberlein T: Practice-oriented expert recommendation for the treatment of critical colonised and local infected wounds using polihexanide. GMS Krankenhaushyg Interdiszip 2009;4(2):Doc17.

Dissemond J, Gerber V, Kramer A, Riepe G, Strohal R, Vasel-Biergans A, Eberlein T: Praxisorientierte Expertenempfehlung zur Behandlung kritisch kolonisierter und lokal infizierter Wunden mit Polihexanid. 2009; Z Wundbeh 14:20-26.

Donoso R, Mura JJ, Lopez M: Acanthamoeba keratitis treated with propamidine and polyhexamethyl biguanide. 2002; Revista Medica De Chile 130:396-401.

Duguid IGM, Dart JKG, Morlet N, Allan BDS, Matheson M, Ficker L, Tuft S: Outcome of acanthamoeba keratitis treated with polyhexamethyl biguanide and propamidine. 1997; Ophthalmology 104:1587-1592.

Eberlein T, Riepe G, Fendler H, Wild T, Schmitz M, Abel M: Successful sanitation of MRSA-contaminated chronic skin wounds by using a PHMB-containing hydrobalanced biocellulose based wound dressing. 2008; EWMA J Suppl 8:253.

Eifler-Bollen R, Fluhr JW: Antimicrobially effective compounded medications. Clinical value and critical comments. 2005; Hautarzt 56:752-758.

Elder MJ, Kilvington S, Dart JKG: A clinicopathological study of in-vitro sensitivity testing and acanthamoeba-keratitis. 1994; Investigative Ophthalmology & Visual Science 35:1059-1064.

Elsztein C, de Menezes JAS, de Morais MA: Polyhexamethyl biguanide can eliminate contaminant yeasts from fuel-ethanol fermentation process. 2008; Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 35:967-973.

EPA: Reregistration Eligibility Decision (RED) for PHMB, September 30, 2004. Environmental Protection Agency document EPA-HQ-OPP-2004-0305-004; 98 pages, approved September 2005.

EPA: Poly(hexamethylenebiguanide) hydrochloride (PHMB) - Case 3122, PC Code: 111801. Toxicology disciplinary chapter for the Reregistration Eligibility Decision document. Environmental Protection Agency document EPA-HQ-OPP-2004-0305-0008, 28 pages, August 2004.

EPA: Environmental Protection Agency document EPA-HQ-OPP-2004-0305-001 published in the Federal Register, Volume 69 (No. 175), 54784-54786, September 2004.

EPA: Evaluation of the carcinogenic potential of PHMB. Environmental Protection Agency cancer assessment document EPA-HQ-OPP-2004-0305-007, PC Code 111801; TXR No. 0052040; 45 pages, July 2003.

EPA: PHMB Summary. Environmental Protection Agency document EPA-HQ-OPP-2004-0305-0002, 4 pages, August 2004.

EPA: Poly(hexamethylenebiguanide) hydrochloride (PHMB) Preliminary risk assessment for the Reregistration Eligibility Decision (OPPTS 248.4000). Environmental Protection Agency document EPA-HQ-OPP-2004-0305-0004, 49 pages, August 2004.

Ferrarini A, Baggi M, Fluckiger R, Bianchetti MG: Intraoperative anaphylaxis to a chlorhexdine polymer in childhood. 2006; Paediatr Anaesth 16:705.

Fiscella RG, Moshifar M, Messick CR, Pendland SL, Chandler JW, Viana M: Polyhexamethylene biguanide in the treatment of experimental fusarium keratomycosis. 1997; Cornea 16:447-449.

Fonseca, E.L., S. Freitas Fdos, and A.C. Vicente: The colistin-only-sensitive Brazilian *Pseudomonas aeruginosa* clone SP (sequence type 277) is spread worldwide. Antimicrob Agents Chemother, 2010. 54(6): p. 2743

Fracchia E, Schmitz M: Clinical experience in the treatment of lower leg ulcers with a hydrobalanced biocellulose based wound dressing in Italy. 2008; EWMA Journal Supp 8:262.

Freise J, Kohaus S, Korber A, Hillen U, Kroger K, Grabbe S, Dissemond J: Contact sensitization in patients with chronic wounds: Results of a prospective investigation. 2008; Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology 22:1203-1207.

Frieling H, Grundling M, Lauer KS, Wendt M, Hachenberg T, Lehmann C, Pavlovic D: Intraperitoneal instillation of polihexanide produces hypotension and vasodilation: *In vivo* and *in vitro* study in rats. Int J Colorectal Dis 2006;21:373-380

Frieling H, Lauer KS, Grundling M, Usichenko T, Meissner K, Kanellopoulou T, Lehmann C, Wendt M, Pavlovic D: Peritoneal instillation of taurolidine or polihexanide modulates intestinal microcirculation in experimental endotoxemia. Int J Colorectal Dis 2007;22:807-817.

Ganzer D, Völker L, Follak N, Wolf E, Granzow H: Reaktion des hyalinen Gelenkknorpels und der Synovialis auf eine intraartikuläre Instillation von verschiedenen Antiinfektiva. 2001; Arthroskopie 14:31-34.

Gerli S, Rossetti D, Di Renzo GC: A new approach for the treatment of bacterial vaginosis: Use of polyhexamethylene biguanide. A prospective, randomized study. 2003; Eur Rev Med Pharmacol Sci 7:127-130.

Gilbert P, Das JR, Jones MV, Allison DG: Assessment of resistance towards biocides following the attachment of micro-organisms to, and growth on, surfaces. 2001; Journal of Applied Microbiology 91:248-254.

Gilbert P, Moore LE: Cationic antiseptics: Diversity of action under a common epithet. 2005; Journal of Applied Microbiology 99:703-715.

Gilbert P, Pemberton D, Wilkinson DE: Barrier properties of the gram-negative cell-envelope towards high-molecular-weight polyhexamethylene biguanides. 1990a; Journal of Applied Bacteriology 69:585-592.

Gilbert P, Pemberton D, Wilkinson DE: Synergism within polyhexamethylene biguanide biocide formulations. 1990b; Journal of Applied Bacteriology 69:593-598.

Gilliver S: PHMB: a well tolerated antiseptic with no reported toxic effects. J. Wound Care/ACTIVA Healthcare 2009;(suppl 2):14

Goeres DM, Palys T, Sandel BB, Geiger J: Evaluation of disinfectant efficacy against biofilm and suspended bacteria in a laboratory swimming pool model. 2004; Water Research 38:3103-3109.

Good H: Charakterisierung der Desinfektionsmittel. Aktuelle Probleme der Chirurgie und Orthopädie. Bern, Huber. 1979, pp 87-96.

Gray TB, Gross KA, Cursons RTM, Shewan JF: Acanthamoeba-keratitis - a sobering case and a promising new treatment. 1994; Australian and New Zealand Journal of Ophthalmology 22:73-76.

Gray TB, Kilvington S, Dart JKG: Amoebicidal, efficacy of hexamidine, compared with phmb chlorhexidine, propamidine and paromomycin. 1996; Investigative Ophthalmology & Visual Science 37:4050-4050.

Hansmann F, Kramer A, Ohgke H, Strobel H, Muller M, Geerling G: Lavasept as an alternative to PVP-iodine as a preoperative antiseptic in ophthalmic surgery. Randomized, controlled, prospective double-blind trial. 2005; Ophthalmologe 102:1043-1046, 1048-1050.

Hansmann F, Kramer A, Ohgke H, Strobel H, Müller M, Geerling G: Polyhexamethylbiguanid zur präoperativen Antisepsis bei Kataraktoperation. 2004; Ophthalmologe 101:377-383.

Harbs N, Siebert J: *In vitro* efficacy of octenidine and polihexanide against biofilms composed of *Pseudomonas aeruginosa*. 2007; GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär 2(2).

Hardy G, Puzovic M: Formulation, stability and administration of parentaral nutrition with new lipid emulsions. 2003; Nutr. Clin. Pract. 24;616-625

Hattori T, Nakata Y, Kato R: Determination of biguanide groups in polyhexamethylene biguanide hydrochloride by titrimetric methods. 2003; Analytical Sciences 19:1525-1528.

Hay J, Kirkness CM, Seal DV, Wright P: Drug-resistance and Acanthamoeba-keratitis - the quest for alternative antiprotozoal chemotherapy. 1994; Eye 8:555-563.

Hildebrandt U: Ermittlung der Resorption von Chlorhexidin, p-Chlornitrobenzen und p-Chloranilin über Schleimhäute und Gastrointestinaltrakt bei klinisch üblicher prä- und postoperativer Mundspülung in der Oralchirurgie. Diss Med Fak Univ. Greifswald, 2011

Hiti K, Walochnik J, Haller-Schober EM, Faschinger C, Aspock H: Viability of acanthamoeba after exposure to a multipurpose disinfecting contact lens solution and two hydrogen peroxide systems. 2002; British Journal of Ophthalmology 86:144-146.

Hodge H, Sterner J: Tabulation of toxicity classes. 1943; Amer Ind Hyg Ass Quart 10:93.

Hohaus K, Vennewald I, Wollina U: Deep mycosis caused by *Trichophyton mentagrophytes* in a diabetic patient. 2003; Mycoses 46:355-357.

Hübner N, Assadian O, Sciermoch K, Kramer A: Interaktion von antiseptika und antibiotika – grundlagen und erste ergebnisse *in vitro*. 2007; GMS Krankenhaushyg Interdiszip 2.

Hübner N, Kramer A: Antimikrobielle Wirkung und Verträglichkeit von Polihexanid, in BBraun S (ed) (BBraun Symposium 2008, Baden 2008).

Hübner NO, Kramer A: Review on the efficacy, safety and clinical applications of polihexanide, a modern wound antiseptic. Skin Pharmacol Physiol. 23 (2010a);23 Suppl:17-27.

Hübner NO, Matthes R, Koban I, Rändler C, Müller G, Bender C, Kindel E, Kocher T, Kramer A. Efficacy of Chlorhexidine, Polihexanide and Tissue-Tolerable Plasma against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Grown on Polystyrene and Silicone Materials. Skin Pharmacol. Physiol. 23 (2010b) Suppl:28-34.

Husain SE, Matoba AY, Husain N: Antimicrobial effect of polyhexamethylene biguanide (PHMB against *Mycobacterium chelonae* and *M. abscessus*. 1994; Investigative Ophthalmology & Visual Science 35:1677-1677.

Ikeda T, Ledwith A, Bamford CH, Hann RA: Interaction of a polymeric biguanide biocide with phospholipid-membranes. 1984; Biochimica Et Biophysica Acta 769:57-66.

Ikeda T, Tazuke S, Bamford CH, Ledwith A: Spectroscopic studies on the interaction of polymeric in-chain biguanide biocide with phospholipid-membranes as probed by 8-anilinonaphthalene-1-sulfonate. 1985a; Bulletin of the Chemical Society of Japan 58:705-709.

Ikeda T, Tazuke S, Bamford CH: Interaction of membrane active biguanides with negatively charged species. A model oftheir interactionwith target sites in microbial membranes. J Chem Res 1985b;58:705-709

Ikeda T, Tazuke S, Watanabe M: Interaction of biologically-active molecules with phospholipid-membranes.1. Fluorescence depolarization studies on the effect of polymeric biocide bearing biguanide groups in the main chain. 1983; Biochimica Et Biophysica Acta 735:380-386.

Ince A, Schutze N, Hendrich C, Jakob F, Eulert J, Lohr JF: Effect of polyhexanide and gentamicin on human osteoblasts and endothelial cells. 2007; Swiss Medical Weekly 137:139-145.

ISO 10993-5 (2009): Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 5: Prüfungen auf in vitro Zytotoxizität. Berlin, Beuth Verlag 2002

Iwamoto M, Mu Y, Lynfield R, Bulens SN, Nadle J, Aragon D, Petit S, Ray SM, Harrison LH, Dumyati G, Townes JM, Schaffner W, Gorwitz RJ, Lessa FC: Trends in Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. Pediatrics 2013 Sep 23. [Epub ahead of print]

Jeong HJ, Lee SJ, Kim JH, Xuan YH, Lee KH, Park SK, Choi SH, Chung DI, Kong HH, Ock MS, Yu HS: Acanthamoeba: Keratopathogenicity of isolates from domestic tap water in korea. 2007; Experimental parasitology ISSN (PRINT VERSION): 0014 4894 117:357-367.

Jethon F, Kramer A: Verwendung von PHMB zur Behandlung von durch sich intrazellulär vermehrende Erreger verursachten infektionen, EP 0788797 A1. 06.02.1997.

Jones DS: Preliminary investigations concerning the anti-adherence properties of polyhexamethylenebiguanide (vantocil ib(tm)). 1995; International Journal of Pharmaceutics 117:123-126.

Jones L, Macdougall N, Sorbara LG: Asymptomatic corneal staining associated with the use of balafilcon silicone-hydrogel contact lenses disinfected with a polyaminopropyl biguanide-preserved care regimen. 2002; Optometry and Vision Science 79:753-761.

Jørgensen S, Nygaard R: New hydrobalanced wound concept or the primary sector - first results of a real life study in a danish community. 2008; EWMA J Suppl 8:240.

Kaehn K: Polihexanide: A safe and highly effective biocide. Skin Pharmacol Physiol 2010;23(suppl 1):7-16

Kairyte K, Kadys A, Luksiene Z: Antibacterial and antifungal activity of photoactivated ZnO nanoparticles in suspension. J Photochem Photobiol B. 2013 Jul 29;128C:78-84.

Kallenberger A, Kallenberger C, Willenegger H: Experimentelle Untersuchungen zur Gewebeverträglichkeit von Antiseptika. 1991; Hyg Med:16:383--395.

Kalteis T, Luring C, Schaumburger J, Perlick L, Bathis H, Grifka J: Gewebetoxizitat lokaler Antiseptika. 2003; Zeitschrift fur Orthopadie und ihre Grenzgebiete ISSN (PRINT VERSION): 0044 3220 141:233-238.

Kanerva L, Elsner P, Wahlberg J, Maibach H: Handbook of occupational dermatology. (Springer, New York: 2000).

Kawabata A, Taylor JA: Effect of reactive dyes upon the uptake and antibacterial action of poly(hexamethylene biguanide) on cotton. Part 1: Effect of bis(monochlorotriazinyl) dyes. 2004; Coloration Technology 120:213-219.

Kawabata A, Taylor JA: The effect of reactive dyes upon the uptake and anti bacterial action of poly(hexamethylene biguanide) on cotton. Part 2: Uptake of poly(hexamethylene biguanide) on cotton dyed with beta-sulphatoethylsulphonyl reactive dyes. 2006; Dyes and Pigments 68:197-204.

Kawabata A, Taylor JA: The effect of reactive dyes upon the uptake and antibacterial efficacy of poly(hexamethylene biguanide) on cotton. Part 3: Reduction in the antibacterial efficacy of poly(hexamethylene biguanide) on cotton, dyed with bis(monochlorotriazinyl) reactive dyes. 2007; Carbohydrate Polymers 67:375-389.

Khunkitti W, Hann AC, Lloyd D, Furr JR, Russell AD: Biguanide-induced changes in *Acanthamoeba castellanii*: An electron microscopic study. 1998; Journal of Applied Microbiology 84:53-62.

Khunkitti W, Hann AC, Lloyd D, Furr JR, Russell AD: X-ray microanalysis of chlorine and phosphorus content in biguanide-treated *Acanthamoeba castellanii*. 1999; Journal of Applied Microbiology 86:453-459.

Khunkitti W, Lloyd D, Furr JR, Russell AD: Aspects of the mechanisms of action of biguanides on trophozoites and cysts of acanthamoeba castellanii. 1997; Journal of Applied Microbiology 82:107-114.

Khunkitti W, Lloyd D, Furr JR, Russell AD: The lethal effects of biguanides on cysts and trophozoites of acanthamoeba castellanii. 1996; Journal of Applied Bacteriology 81:73-77.

Koburger T, Müller G, Eisenbeiß W, Assadian O, Kramer A: Microbicidal activity of polihexanide. 2007; GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär 2(2).

Kohlbecker G: Toxische Verunreinigungen in Chlorhexidin-digluconat. Dtsch Zahnärztl Z 1989;44(4):273-6.

Körber A, Seipp H, Hofmann S: Efficacy of different wound dressings on artificial plaques of fibrin. 2008; EWMA J (Suppl) 8:261.

Kramer A, Adrian V, Rudolph P, Wurster S, Lippert H: Explantationstest mit Haut und Peritoneum der neonatalen Ratte als Voraussetzung zur Verträglichkeit lokaler Antiinfektiva für Wunden und Körperhölen. 1998; Chirurg 69:840-845.

Kramer A, Assadian O (eds): Wallhäußers Praxis der Sterilisation, Desinfektion und Konservierung, Qualitätssicherung der Hygiene in Industrie, Pharmazie und Medizin. (Thieme, Stuttgart, New York 2008)

Kramer A, Behrens Baumann W: Prophylactic use of topical anti-infectives in ophthalmology. 1997; Ophthalmologica; Journal international d'ophtalmologie; International journal of ophthalmology; Zeitschrift fur Augenheilkunde ISSN (PRINT VERSION): 0030 3755 211 Suppl 1:68-76.

Kramer A, Daeschlein G, Kammerlander G, Andriessen A, Aspöck C, Bergemann R, Eberlein T, Gerngross H, Görtz G, Heeg P, Jünger M, Koch S, König B, Laun R, Peter RU, Roth B, Ruef C, Sellmer W, Wewalka G, Eisenbeiß W: Konsensusempfehlung zur Auswahl von Wirkstoffen für die Wundantiseptik. 2004; ZfW 2004:110-120.

Kramer A, Guggenbichler P, Heldt P, Junger M, Ladwig A, Thierbach H, Weber U, Daeschlein G: Hygienic relevance and risk assessment of antimicrobial-impregnated textiles. 2006a; Curr Probl Dermatol 33:78-109.

Kramer A, Hinz P, Maier S, Hübner N, Assadian O: Indikationen und Besonderheiten der Wundantiseptik und Wirkstoffauswahl bei chronischen Wunden. 2008. Medizin & Praxis: Spezial "Chronische Wunden":27-32

Kramer A, Kremer J, Assadian O, Schneider I, Dahne H, Schwemmer J, Muller G, Siegmund W, Jakel C: The classification of antiseptic products to be administered to wounds - another borderline case between medicinal products and medical devices? 2006b; International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics 44:677-692.

Kramer A, Miksits K: Prävention von Bakterien- und Virusinfektionen; in Hanh H, Kaufmann SHE, Schulz TF, Suerbaum S (eds): Medizinische Mikrobiologie Und Infektiologie. Heidelberg, Springer Medizin Verlag, 6. Auflage 2008, pp 163-164

Kramer A, Roth B, Müller G, Rudolph P, Klocker N: Influence of the antiseptic agents polyhexanide and octenidine on fl cells and on healing of experimental superficial aseptic wounds in piglets. A double-blind, randomised, stratified, controlled, parallel-group study. 2004b; Skin Pharmacol Physiol 17:141-146.

Kramer A, Roth B: Polihexanid; in Kramer A, Assadian O (eds): Wallhäußers Praxis der Sterilisation, Desinfektion und Konservierung, Qualitätssicherung der Hygiene in Industrie, Pharmazie und Medizin. Stuttgart, Thieme, 2008, pp789-793).

Kramer A, Rudolph P, Werner H: Antimicrobial efficacy of contact lens care products and critical comment on iso/fdis 14729. 2002; Dev Ophthalmol 2002 33:343-361.

Kramer A, Wallhäußer K: Wirkungsspektrum und Anwendungseigenschaften häufig aus prophylaktischer Indikation angewandter Antiseptika. In Kramer A, Weuffen W, Gröschel D, Heeg P, Hingst V, Lippert H, al. e (eds): Klinische Antiseptik, pp 23-82 Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 1993

Kramer A: Polihexanid. In: v. Bruchhausen F, Dannhardt G, Ebel S, Frahm AW, Hackenthal E, Holzgrabe U (eds): Hagners Handbuch der pharmazeutischen Praxis, Stoffe P—Z. Springer; 1994.

Kramer A: Stellenwert der Infektionsprophylaxe und –therapie mit lokalen Antiinfektiva; in Kramer A, Wendt M, Werner HP (eds): Möglichkeiten und Perspektiven der klinischen Antiseptik. Wiesbaden, mhp, 1995, pp 15 -25

Krautheim AB, Jermann TH, Bircher AJ: Chlorhexidine anaphylaxis: Case report and review of the literature. 2004; Contact Dermatitis 50:113-116.

Krebs FC, Miller SR, Ferguson ML, Labib M, Rando RF, Wigdahl B: Polybiguanides, particularly polyethylene hexamethylene biguanide, have activity against human immunodeficiency virus type 1. 2005; Biomedicine and pharmacotherapy; Biomedecine and pharmacotherapie ISSN (PRINT VERSION): 0753 3322 59:438-445.

Krishnakumari V, Nagaraj R: Interaction of antibacterial peptides spanning the carboxy-terminal region of human beta-defensins 1-3 with phospholipids at the air-water interface and inner membrane of *E. coli*.Peptides. 2008 Jan;29(1):7-14.

Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, Chaudhary U, Doumith M, Giske CG, Irfan S, Krishnan P, Kumar AV, Maharjan S, Mushtaq S, Noorie T, Paterson DL, Pearson A, Perry C, Pike R, Rao B, Ray U, Sarma JB, Sharma M, Sheridan E, Thirunarayan MA, Turton J, Upadhyay S, Warner M, Welfare W, Livermore DM, Woodford N: Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. Lancet Infect Dis. 2010 Sep;10(9):597-602

Kusnetsov JM, Tulkki AI, Ahonen HE, Martikainen PJ: Efficacy of three prevention strategies against legionella in cooling water systems. 1997; Journal of Applied Microbiology 82:763-768.

Lademann J, Richter H, Meinke MC, Lange-Asschenfeldt B, Antoniou C, Mak WC, Renneberg R, Sterry W, Patzelt A: Drug delivery with topically applied nanoparticles: science fiction or reality. Skin Pharmacol Physiol. 2013;26(4-6): Epub 2013 Jul 29.

Lange-Asschenfeldt B, Marenbach D, Lang C, Patzelt A, Ulrich M, Maltusch A, Terhorst D, Stockfleth E, Sterry W, Lademann J: Distribution of bacteria in the epidermal layers and hair follicles of the human skin. Skin Pharmacol Physiol. 2011;24(6):305-11

Langer S, Sedigh Salakdeh M, Goertz O, Steinau HU, Steinstraesser L, Homann HH: The impact of topical antiseptics on skin microcirculation. 2004; European journal of medical research ISSN (PRINT VERSION): 0949 2321 9:449-454.

Larkin DFP, Kilvington S, Dart JKG: Treatment of acanthamoeba keratitis with polyhexamethylene biguanide. 1992; Ophthalmology 99:185-191.

Lauenstein P: Untersuchung zur Peritonealverträglichkeit von Polihexanid im Meerschweinchenmodell: Diss Med Fak Univ Greifswald 2007).

Lee JE, Hahn TW, Oum BS, Choi HY, Yu HS, Lee JS: Acanthamoeba keratitis related to orthokeratology. 2007; International ophthalmology ISSN (PRINT VERSION): 0165 5701 27:45-49.

Lee WR, Tobias KM, Bemis DA, Rohrbach BW: *In vitro* efficacy of a polyhexamethylene biguanide-impregnated gauze dressing against bacteria found in veterinary patients. 2004; Veterinary Surgery 33:404-411.

Liebsch M, Spielmann H: Currently available *in vitro* methods used in the regulatory toxicology. 2002; Toxicol Lett. Feb 28;127(1-3):127-34.

Lim N, Goh D, Bunce C, Xing W, Fraenkel G, Poole TRG, Ficker L: Comparison of polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine as monotherapy agents in the treatment of acanthamoeba keratitis. 2008; American Journal of Ophthalmology 145:130-135.

Lin JC, Ward TP, Belyea DA, McEvoy P, Kramer KK: Treatment of nocardia asteroides keratitis with polyhexamethylene biguanide. 1997; Ophthalmology ISSN (PRINT VERSION): 0161 6420 104:1306-1311.

Lindquist TD: Treatment of acanthamoeba keratitis. 1998; Cornea 17:11-16.

Livermore DM: Fourteen years in resistance. Int J Antimicrob Agents. 2012 Apr;39(4):283-94.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL: Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012 Mar;18(3):268-81.

Marelli G, Papaleo E, Origoni M, Caputo L, Ferrari A: Polyhexamethylene biguanide for treatment of external genital warts: A prospective, double-blind, randomized study. 2005; Eur Rev Med Pharmacol Sci 9:369-372.

Masadome T, Yamagishi Y, Takano M, Hattori T: Potentiometric titration of polyhexamethylene biguanide hydrochloride with potassium poly(vinyl sulfate) solution using a cationic surfactant-selective electrode. 2008; Analytical Sciences 24:415-418.

Messick CR, Pendland SL, Moshirfar M, Fiscella RG, Losnedahl KJ, Schriever CA, Schreckenberger PC: *In-vitro* activity of polyhexamethylene biguanide (PHMB) against fungal isolates associated with infective keratitis. 1999; Journal of Antimicrobial Chemotherapy 44:297-298.

Mills PC, Ahlstrom L, Wilson WJ: Ototoxicity and tolerance assessment of a TrisEDTA and polyhexamethylene biguanide ear flush formulation in dogs. 2005; Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 28:391-397.

Minozzi M, Gerli S, Di Renzo GC, Papaleo E, Ferrari A: The efficacy and safety of a single dose of polyhexamethylene biguanide gynaecologic solution versus a seven-dose regimen of vaginal clindamycin cream in patients with bacterial vaginosis. 2008; European Review for Medical and Pharmacological Sciences 12:59-65.

Mitchell MA, Adamson TW, Singleton CB, Roundtree MK, Bauer RW, Acierno MJ: Evaluation of a combination of sodium hypochlorite and polyhexamethylene biguanide as an egg wash for red-eared slider turtles (trachemys scripta elegans) to suppress or eliminate salmonella organisms on egg surfaces and in hatchlings. 2007; American journal of veterinary research ISSN (PRINT VERSION): 0002 9645 68:158-164.

Mitchinson C, Pain RH, Vinson JR, Walker T: The relative effectiveness of guanidinium and some biguanide salts as denaturants. Assessment against penicillinase. 1983; Biochimica et biophysica acta ISSN (PRINT VERSION): 0006 3002 743:31-36.

Moore LE, Ledder RG, Gilbert P, McBain AJ: *In vitro* study of the effect of cationic biocides on bacterial population dynamics and susceptibility. 2008; Applied and Environmental Microbiology 74:4825-4834.

Morgera F, Antcheva N, Pacor S, Quaroni L, Berti F, Vaccari L, Tossi A: Structuring and interactions of human beta-defensins 2 and 3 with model membranes. J Pept Sci. 2008 Apr;14(4):518-23.

Mosti G, Mattaliano V, Schmitz M, Abel M: First italian experience with a polihexanide-containing hydrobalanced wound dressing in hospitalized patients with critically-colonized or infected chronic wounds. 2008; EWMA J Supp 8:168.

Mosti G, Mattaliano V: Sucessful therapy of critically-colonised or locally infected wounds with a new hydrobalanced cellulose-based wound dressing with polihexanide on out-patients. 2008; EWMA J Suppl 8:169.

Mueller G, Kramer A: Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. 2008; Journal of Antimicrobial Chemotherapy 61:1281-1287.

Mulder GD, Cavorsi JP, Lee DK: Polyhexamethylene biguanide: An addendum to current topical antimicrobials. 2007; Wounds - A Compendium of Clinical Research and Practice 19:173-182.

Müller G, Koburger T, Jethon F, Kramer A: Comparison of the bactericidal efficacy and *in vitro* cytotoxicity of lavasept and prontosan. 2007; GMS Krankenhaushyg Interdiszip 2:Doc42.

Müller G, Kramer A: Comparative study of *in vitro* cytotoxicity of povidone-iodine in solution, in ointment or in a liposomal formulation (repithel) and selected antiseptics. 2006; Dermatology 212 Suppl 1:91-93.

Müller G, Kramer A: Effect of selected wound antiseptics on adult articular cartilage (bovine sesamoid bone) in the presence of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. 2005; J Orthop Res 23:127-133.

Müller G, Kramer A: *In vitro* action of a combination of selected antimicrobial agents and chondroitin sulfate. 2000; Chem Biol Interact 124:77-85.

Murdoch D, Gray TB, Cursons R, Parr D: Acanthamoeba keratitis in New Zealand, including two cases with *in vivo* resistance to polyhexamethylene biguanide. 1998; Australian and New Zealand Journal of Ophthalmology 26:231-236.

Eid KA, Azzazy HM: Sustained broad-spectrum antibacterial effects of nanoliposomes loaded with silver nanoparticles. Nanomedicine (Lond). 2013 Sep 11. [Epub ahead of print]

Narasimhan S, Madhavan HN, K LT: Development and application of an *in vitro* susceptibility test for acanthamoeba species isolated from keratitis to polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine. 2002; Cornea 21:203-205.

Noble JA, Ahearn DG, Avery SV, Crow SA: Phagocytosis affects biguanide sensitivity of *Acanthamoeba spp*. 2002; Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46:2069-2076.

OECD Test No. 431 (2013a): In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test. 2004; OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing.

OECD Test No. 439 (2013b): In Vitro Skin Irritation - Reconstructed Human Epidermis Test Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing.

Okano M, Nomura M, Hata S, Okada N, Sato K, Kitano Y, Tashiro M, Yoshimoto Y, Hama R, Aoki T: Anaphylactic symptoms due to chlorhexidine gluconate. 1989; Archives of Dermatology 125:50-52.

Olivieri J, Eigenmann PA, Hauser C: Severe anaphylaxis to a new disinfectant: Polyhexanide, a chlorhexidine polymer. 1998; Schweizerische Medizinische Wochenschrift 128:1508-1511.

O'Malley LP, Collins AN, White GF: Biodegradability of end-groups of the biocide polyhexamethylene biguanide assessed using model compounds. 2006a; Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 33:677-684.

O'Malley LP, Hassan KZ, Brittan H, Johnson N, Collins AN: Characterization of the biocide polyhexamethylene biguanide by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. 2006b; Journal of Applied Polymer Science 102:4928-4936.

O'Malley LP, Shaw CH, Collins AN: Microbial degradation of the biocide polyhexamethylene biguanide: Isolation and characterization of enrichment consortia and determination of degradation by measurement of stable isotope incorporation into DNA. 2007; Journal of Applied Microbiology 103:1158-1169.

Orr R, LP THG, MA M, Eggleston T: Determination of the irritating and sensitizing propensities of kerlix a.M.D. Antimicrobial gauze dressing on scarified human skin. 2001.

Panda A, Ahuja R, Biswas NR, Satpathy G, Khokhar S: Role of 0.02% polyhexamethylene biguanide and 1% povidone iodine in experimental aspergillus keratitis. 2003; Cornea 22:138-141.

Paugh JR, Marsden HJ, Edrington TB, Deland PN, Simmons PA, Vehige JG: A pre-application drop containing carboxymethylcellulose can reduce multipurpose solution-induced corneal staining. 2007; Optometry and Vision Science 84:65-71.

Payne JD, Kudner DW: A durable antiodor finish for cotton textiles. 1996; Textile Chemist and Colorist 28:28-30.

Pelgrift RY, Friedman AJ: Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. Adv Drug Deliv Rev. 2013 Jul 24. [Epub ahead of print]

Perez-Santonja JJ, Kilvington S, Hughes R, Tufail A, Matheson M, Dart JKG: Persistently culture positive acanthamoeba keratitis - in vivo resistance and *in vitro* sensitivity. 2003; Ophthalmology 110:1593-1600.

Pfaller MA, Messer SA, Woosley LN, Jones RN, Castanheira M: Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of geographic and temporal trends of antifungal resistance. J Clin Microbiol. 2013 Aug;51(8):2571-81.

Pietsch M, Kraft B: Antimikrobielle Wirksamkeit ausgewählter Substanzen für die Wasserdesinfektion in Dentaleinheiten mit Biofilm. 2006; aseptica 12:3.

Pitten F-A, Kramer A: Antimicrobial efficacy of antiseptic mouthrinse solutions. 1999; Eur J Pharmacol 55:95-100.

Pitten FA, Werner HP, Kramer A: A standardized test to assess the impact of different organic challenges on the antimicrobial activity of antiseptics. J Hosp Infect. 2003;55(2):108-15.

prEN 12054 (1995): Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika - Produkte für die hygienische und chirurgische Händedesinfektion und Händewaschung - Bakterizide Wirkung; Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1). Berlin, Beuth Verlag.

prEN 13727 (1999): Chemische Desinfektionsmittel - Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der bakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel für Instrumente im humanmedizinischen Bereich - Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1). Berlin, Beuth Verlag.

Reitsma AM, Rodeheaver GT: Effectiveness of a new antimicrobial gauze dressing as a bacterial barrier, (Report prepared for Tyco Healthcare, 2003).

Rietkotter J, Korber A, Grabbe S, Dissemond J: Eradication of methicillin-resistant staphylococcus aureus in a chronic wound by a new polyhexanide hydrogel. 2007; Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology 21:1416-1417.

Röhner E, Hoff P, Pfitzner T, Seeger JB, Buttgereit F, Perka C, Matziolis G: Limited use of antiseptics in septic surgery. J Invest Surg. 2012 Oct;25(5):311-6

Röhner E, Hoff P, Winkler T, von Roth P, Seeger JB, Perka C, Matziolis G: Polyhexanide and hydrogen peroxide inhibit proteoglycan synthesis of human chondrocytes. J Histotechnol. 2011 Mar;34(1):35-39

Rose FL, Swain G: Bisdiguanides having antibacterial activity. J Chem Soc 1956;850:4422-4425

Rosin M, Welk A, Bernhardt O, Ruhnau M, Pitten FA, Kocher T, Kramer A: Effect of a polyhexamethylene biguanide mouthrinse on bacterial counts and plaque. 2001; Journal of Clinical Periodontology 28:1121-1126.

Rosin M, Welk A, Kocher T, Majic-Todt A, Kramer A, Pitten FA: The effect of a polyhexamethylene biguanide mouthrinse compared to an essential oil rinse and a chlorhexidine rinse on bacterial counts and 4-day plaque regrowth. 2002; Journal of Clinical Periodontology 29:392-399.

Ross MSF: Determination of metformin in biological fluids by derivatization followed by high-performance liquid chromatography. 1977; J Chromatogr 133:408-411.

Roth B, Assadian O, Wurmitzer F, Kramer A: Surgical site infections after promary antiseptic cleansing of dirty-contaminated wounds by polihexanide, pvp iodine resp. Hydrogen peroxide. 2007; GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär.

Roth B, Brill FHH: Polihexanide for wound treatment – how it began. Skin Pharmacol Physiol 2010;23(suppl 1):4-6

Roth B, Kramer A. Antiseptische Begleittherapie des Ulcus cruris mit Polihexanid. GMS Krankenhaushyg Interdiszip 2009; 4(2):Doc16 (20091216).

Roth B, Müller J, Willenegger H. Intraoperative wound irrigation with a new local antiseptic. Helv Chir Acta. 1985 Apr;52(1):61-5.

Roth C., Beule A.G., Kramer A., Hosemann W., Kohlmann T., Scharf C. Response Analysis of Stimulating Efficacy of Polihexanide in an *in vitro* Wound Model with Respiratory Ciliary Epithelial Cells. Skin Pharmacol Physiol 2010;23(suppl 1):35–40

Rowhani T, Lagalante AF: A colorimetric assay for the determination of polyhexamethylene biguanide in pool and spa water using nickel-nioxime. 2007; Talanta 71:964-970.

Roy A, Franco OL, Mandal SM: Biomedical Exploitation of Self Assembled Peptide Based Nanostructures. Curr Protein Pept Sci. 2013 Aug 2. [Epub ahead of print]

Rudolph P, Reimer K, Mlynski G, Reese M, Kramer A: Modell zur Ermittlung der Nasenverträglichkeit lokaler Antiinfektiva mittels *in vitro* - Bestimmung der Ziliaraktivität. 2000; Hyg Med 25:500-503.

Russell AD, Tattawasart U, Maillard JY, urr JR: Possible Link between Bacterial Resistance and Use of Antibiotics and Biocides. Antimicrob Agents Chemother. 1998 August; 42(8): 2151.

Salas Campos L, Gomez Ferrero O, Estudillo Perez V, Fernandez Mansilla M: Prevenir la infeccion nosocomial. Apositos impregnados con polihexametileno biguanida. 2006; Revista de enfermeria Barcelona, Spain ISSN (PRINT VERSION): 0210 5020 29:43-48.

Santodomingo-Rubido J: The comparative clinical performance of a new polyhexamethylene biguanide- vs a polyquad-based contact lens care regime with two silicone hydrogel contact lenses. 2007; Ophthalmic and Physiological Optics 27:168-173.

Schaumburg F, Köck R, Mellmann A, Richter L, Hasenberg F, Kriegeskorte A, Friedrich AW, Gatermann S, Peters G, von Eiff C, Becker K: Population dynamics among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Germany during a 6-year period: J Clin Microbiol. 2012 Oct;50(10):3186-92

Schmidtchen A, Davoudi M, Andersson E: Potent antibacterial effects of polyhexamethylenebbiguanide on common chronic ulcer-derived bacteria: Abstracts 13th Conf Europ Wound Manag Assoc Pisa, 2003, 702003).

Schmit Neuerburg KP, Bettag C, Schlickewei W, Fabry W, Hanke J, Renzing Kohler K, Hirche H, Kock HJ: Wirksamkeit eines neuartigen antisepticum in der behandlung kontaminierter weichteilwunden. 2001; Chirurg Zeitschrift fur alle Gebiete der operativen Medizen, ISSN (PRINT VERSION): 0009 4722 72:61-71.

Schmitz M, Mosti G, Mattaliano V, Eberlein T: Ein neuer antimikrobieller Wundverband mit Polihexanid, Suprasorb® X + PHMB -- Erste klinische Resultate. 2007; GMS Krankenhaushyg Interdiszipl 2:Doc.14.

Schnuch A, Geier J, Brasch J, Fuchs T, Pirker C, Schulze-Dirks A, Basketter DA: Polyhexamethylenebiguanide: A relevant contact allergen? 2000; Contact Dermatitis 42:302-303.

Schnuch A, Geier J, Uter W, Basketter DA, Jowsey IR: The biocide polyhexamethylene biguanide remains an uncommon contact allergen - recent multicentre surveillance data. 2007; Contact Dermatitis 56:235-239.

Seal D: Treatment of acanthamoeba keratitis. 2003; Expert Rev Anti Infect Ther 1:205-208.

Seipp H, Hofmann S, Hack A, Skowronsky A, Hauri A: Wirksamkeit verschiedener Wundspüllösungen gegenüber Biofilmen. 2005; J Wound Healing 10:160-164.

Senchyna M, Jones L, Louie D, May C, Forbes L, Glasier MA: Quantitative and conformational characterization of lysozyme deposited on balafilcon and etafilcon contact lens materials. 2004; Current Eye Research 28:25-36.

Singer SJ, Nicolson GL: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science 1972;175:720-731.

Skripitz R, Werner HP: Bactericidal long-term effect of selective antiseptics. Hyg Med 1994;19:199-204.

Spielmann H, Kalweit S, Liebsch M, Wirnsberger T, Gerner I, Bertram-Neis E, Krauser K, Kreiling R, Miltenburger HG, Pape W, Steiling W: Validation study of alternatives to the Draize eye irritation test in Germany: Cytotoxicity testing and HET-CAM test with 136 industrial chemicals. 1993; Toxicol In Vitro. Jul;7(4):505-10.

Sugiarto H, Yu PL: Mechanisms of action of ostrich beta-defensins against *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett. 2007 May;270(2):195-200

Taylor K, Clarke DJ, McCullough B, Chin W, Seo E, Yang D, Oppenheim J, Uhrin D, Govan JR, Campopiano DJ, MacMillan D, Barran P, Dorin JR: Analysis and separation of residues important for the chemoattractant and antimicrobial activities of beta-defensin 3. J Biol Chem. 2008 Mar 14;283(11):6631-9.

Tiradoangel J, Gabriel MM, Wilson LA, Ahearn DG: Effects of polyhexamethylbiguanide and chlorhexidine gluconate (chx) on 4 species of free-living acanthamoeba in-vitro. 1995; Investigative Ophthalmology & Visual Science 36:S327-S327.

Turner NA, Russell AD, Furr JR, Lloyd D: Resistance, biguanide sorption and biguanide-induced pentose leakage during encystment of acanthamoeba castellanii. 2004; Journal of Applied Microbiology 96:1287-1295.

Ulmer M, Patzelt A, Vergou T, Lademann J, Richter H, Kramer A, Müller G, Sterry W, Lange-Asschenfeldt B: *In vitro* investigation of the follicular penetration of porcine ear skin using a nanoparticle-emulsion containing polihexanide. Laser Phys. Lett. 9, No. 5, 381-386 (2012).

Ulmer M, Patzelt A, Vergou T, Richter H, Müller G, Kramer A, Sterry W, Czaika V, Lademann J: *In vivo* investigation of the efficiency of a nanoparticle-emulsion containing polihexanide on the human skin. Eur J Pharm Biopharm. 2013 Jun;84(2):325-9

Uygur F, Oezyurt M, Evinc R, Hosbul T, Celikoz B, Haznedaroglu T: Comparison of octenidine dihydrochloride (Octenisept®), polihexanide (Prontosan®) and povidon iodine (Betadine®) for topical antibacterial effects in *Pseudomonas aeruginosa*-contaminated, full-skin thickness burn wounds in rats. 2008; Central European Journal of Medicine 3:417-421.

Valluri S, Fleming TP, Laycock KA, Tarle IS, Goldberg MA, GarciaFerrer FJ, Essary LR, Pepose JS: *In vitro* and *in vivo* effects of polyhexamethylene biguanide against herpes simplex virus infection. 1997; Cornea 16:556-559.

Valverde A, Coque TM, Sánchez-Moreno MP, Rollán A, Baquero F, Cantón R: Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* during nonoutbreak situations in Spain. J Clin Microbiol. 2004 Oct;42(10):4769-75

Vasseneix C, Gargala G, Francois A, Hellot MF, Duclos C, Muraine M, Benichou J, Ballet JJ, Brasseur G, Favennec L: A keratitis rat model for evaluation of anti-acanthamoeba polyphaga agents. 2006; Cornea 25:597-602.

Vehige JG, Simmons PA, Anger C, Graham R, Tran L, Brady N: Cytoprotective properties of carboxymethyl cellulose (cmc) when used prior to wearing contact lenses treated with cationic disinfecting agents. 2003; Eye and contact lens ISSN (PRINT VERSION): 1542 2321 29:177-180.

Wadl M, Heckenbach K, Noll I, Ziesing S, Pfister W, Beer J, Schubert S, Eckmanns T: Increasing occurrence of multidrug-resistance in *Acinetobacter baumannii* isolates from four German University Hospitals, 2002-2006. Infection. 2010 Feb;38(1):47-51

Wagner M: Local antisepsis in revision surgery of infected total hip prostheses. 1995; Orthopade 24:319-325.

Wallhäußer KH: Praxis der Sterilisation, Desinfektion und Konservierung. (Thieme, Stuttgart 1995).

Walochnik J, Duchene M, Eibl H, Aspock H: Treatment of acanthamoeba keratitis: Standard, problems, and new approaches. 2003; Wiener Klinische Wochenschrift 115:10-17.

Welk A, Splieth CH, Schmidt-Martens G, Schwahn C, Kocher T, Kramer A, Rosin M: The effect of a polyhexamethylene biguanide mouthrinse compared with a triclosan rinse and a chlorhexidine rinse on bacterial counts and 4-day plaque re-growth. 2005; Journal of Clinical Periodontology 32:499-505.

Werner HP, Kramer A: Mikrobiologische Anforderungen an lokale Antiinfektiva unter spezieller Berücksichtigung der antiinfektiven Wundbehandlung: Möglichkeiten und Perspektiven der klinischen Antiseptik, pp 26--30 Wiesbaden: mhp ; 1995

Werner HP: Microbicidal effectiveness of selected antiseptics in surgery. Hyg Med 1992; 17:51-59

Werthen M, Davoudi M, Sonesson A, Nitsche DP, Morgelin M, Blom K, Schmidtchen A: Pseudomonas aeruginosa-induced infection and degradation of human wound fluid and skin proteins ex vivo are eradicated by a synthetic cationic polymer. 2004; Journal of Antimicrobial Chemotherapy 54:772-779.

Wiedmann A, Hagendorff A, Bohm R, Schulz T, Mossner J, Caca K: Malignant oesophago-pleuro-pericardial fistula in a patient with oesophageal carcinoma. 2005; Zeitschrift Fur Kardiologie 94:411-414.

Wiegand C, Abel M, Kramer A, Müller G, Ruth P, Hipler U: Stimulation of proliferation and biocompatibility of polihexanide. 2007a; GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär.

Wiegand C, Abel M, Kramer A, Ruth P, Hipler U: Viability and proliferation of fibroblasts, keratinocytes and hacat-cells influenced by polihexanide. 2008a; Experimental Dermatology 17:283-283.

Wiegand C, Abel M, Ruth P, Hipler UC: Polihexanide inhibits the formation of ros/rns *in vitro*: 18th Conference of the European Wound Management AssociationLissabon, Portugal 2008b).

Wiegand C, Abel M, Ruth P, Hipler UC: A biocellulose wound dressing with polihexanide exhibits antifungal activity. 2008c; Mycoses 51:432-432.

Wiegand C, Abel M, Ruth P, Hipler U: Hacat keratinocytes in co-culture with staphylococcus aureus can be protected from bacterial damage by polihexanide. 2009; Wound Repair Regen 17:730-738.

Wiegand C, Abel M, Ruth P, Hipler UC: Analysis of the adaptation capacity of *Staphylococcus aureus* to commonly used antiseptics by microplate laser nephelometry. Skin Pharmacol Physiol. 2012;25(6):288-97

Wiegand C, Elsner P, Norgauer J, Abel M, Kramer A, Hipler U: Fibroblasts, keratinocytes and hacat-cells proliferation influenced by polihexanide. 2007b; Experimental Dermatology 16:272-272.

Willenegger H, Roth B, Ochsner P: The return of local antiseptics in surgery. Injury 1995;26:28-33

Willenegger H: Klinische Erfahrungen mit einem neuen Antiinfektivum. Hyg Med 1994a;19:227-233

Willenegger H: Local Antiseptics in surgery – revival and advance. Eur J Trauma 1994c;20:94-100

Willenegger H: Lokale Antiseptika in der Chirugie - Wiedergeburt und Weiterentwicklung. 1994b; Unfallchirugie 20:94-110.

Worthington KL, Adamcakova-Dodd A, Wongrakpanich A, Mudunkotuwa IA, Mapuskar KA, Joshi VB, Allan Guymon C, Spitz DR, Grassian VH, Thorne PS, Salem AK: Chitosan coating of copper nanoparticles reduces *in vitro* toxicity and increases inflammation in the lung. Nanotechnology. 2013 Oct 4;24(39):395101.

Yasuda K, Ohmizo C, Katsu T: Potassium and tetraphenylphosphonium ion-selective electrodes for monitoring changes in the permeability of bacterial outer and cytoplasmatic membranes. J Microbiol Methods 2003;54:111-115.

Yeates T: PHMB for use in household and institutional cleaning products. 2002; Chimica Oggi-Chemistry Today 20:14-15.

Yiping C, Xiaojing D, Shan Z, Pengyan L: Rapid determination of polyhexamethylenebiguanide in compound chemical disinfectants by reversed-phase high performance liquid chromatography. 2005; Chemical Journal of Internet 8:7.

Zhu S, Gao B: Evolutionary origin of β-defensins. Dev Comp Immunol. 2013 Jan-Feb;39(1-2):79-84

Zhu S: Evidence for myxobacterial origin of eukaryotic defensins. Immunogenetics. 2007 Dec;59(12):949-54.

Zöllner HK, A.; Youssef, P.; Youssef, U.; Adrian, V.: Orientierende Untersuchungen zur Abbaubarkeit von ausgewählten mikrobiziden Wirkstoffen. 1995; Hyg Med 20:401-407.

Eidesstattliche Erklärung

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

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt woden.

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

Greifswald, im Januar 2014 Torsten Koburger-Janssen

Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Datum der Einreichung:
Medizinische Fakultät

Danksagung

Beim Werden meiner Dissertation habe ich von vielen Seiten Unterstützung erfahren, ohne die diese Arbeit nicht hätte entstehen können.

Bedanken möchte ich mich in erster Linie bei Prof. Dr. med. Axel Kramer vom Institut für Hygiene und Umweltmedizin der Universitätsmedizin Greifswald für die Überlassung des Themas und die außergewöhnliche fachliche, fördernde und freundschaftliche Betreuung und Unterstützung. Großer Dank gebührt gleichermaßen Dr. rer. nat Gerald Müller vom Institut für Hygiene und Umweltmedizin der Universitätsmedizin Greifswald, ohne dessen Fürsorge und wissenschaftlichen Input diese Arbeit in der vorliegenden Form nicht möglich gewesen wäre. Danken möchte ich auch Prof. Dr. rer. nat. Michael Hecker vom Institut für Mikrobiologie (Abt. Mikrobielle Physiologie / Molekulare Biologie) der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald für sein kluges, begeisterndes und begeistertes Vermitteln und Fördern der Fähigkeiten zum klaren und eigenständigen wissenschaftlichen Denken und Arbeiten und zum Erkennen der wesentlichen Zusammenhänge. Dem gesamten Team der Hygiene Nord GmbH, Greifswald, bin ich außerordentlich dankbar für die hochgradig engagierte, professionelle und zuverlässige technische Unterstützung bei der Vorbereitung oder Durchführung vieler der hier ausgewerteten Versuche.

Im besonderen Maße möchte ich mich bei meinen Eltern Sabine und Hans-Peter Koburger dafür bedanken, dass sie mich frühzeitig und anhaltend auf dem schulischen, akademischen und beruflichen Weg zu dieser Dissertation geführt, begleitet und unterstützt haben, selbst als es für sie inhaltlich und organisatorisch nicht mehr vollständig nachvollziehbar zu werden began. Meine Frau Jersey hat mich in ihrer sanften und nicht nachlassenden Aufmerksamkeit insbesondere in der Endphase der Erstellung der Arbeit immer wieder motiviert, mir die nötigen Freiräume im Alltag geschaffen und dabei auf viel familiäres und persönliches Miteinander verzichten müssen, für diese großherzige Unterstützung bin ich sehr dankbar und hoffe, sie bald vergelten zu können.

Und sämtlichen Freunden, Wegbegleitern und Kollegen gebührt meine Dankbarkeit für die gemeinsam verbrachten Zeiten, die zusammen bewältigten Herausforderungen und die gemachten Erfahrungen, die alle dafür gesorgt haben, dass ich das Ziel nicht aus den Augen verloren habe und die Freude an der Arbeit nie versiegt ist.

Anhang

1. Auflistung von Veröffentlichungen und Vorträgen

Publikationen (Nach Erscheinungsdatum und mit Hervorhebung der zum Thema Polihexanid gehörigen):

Müller G, Koburger T, Kramer A: Interaction of **polyhexamethylene biguanide hydrochloride** (PHMB) with phosphatidylcholine containing o/w emulsions and consequences for microbial efficacy and cytotoxicity. Chem Biol Interact. 2013 Jan 25;201(1-3):58-64.

Kramer A, Koburger T, Taube LD, Menzel M, Meyer G, Assadian O: Evaluation of the PotoClean® decontamination technology for reprocessing of water supply lines in dental units during routine work. GMS Krankenhhyg Interdiszip. 2012;7(1):Doc10.

Koburger T, Below H, Dornquast T, Kramer A: Decontamination of room air and adjoining wall surfaces by nebulizing hydrogen peroxide. GMS Krankenhhyg Interdiszip. 2011;6(1):Doc09.

Assadian O, Wehse K, Hübner NO, Koburger T, Bagel S, Jethon F, Kramer A: Minimum inhibitory (MIC) and minimum microbicidal concentration (MMC) of **polihexanide** and triclosan against antibiotic sensitive and resistant Staphylococcus aureus and *Escherichia coli* strains. GMS Krankenhhyg Interdiszip. 2011;6(1):Doc06.

Ebert M, Assadian O, Hübner NO, Koburger T, Kramer A: Antimicrobial efficacy of the silver wound dressing Biatain Ag in a disc carrier test simulating wound secretion. International Society of Chemotherapy Working Group Antiseptics; Working Section for Clinical Antiseptic of the German Society for Hospital Hygiene. Skin Pharmacol Physiol. 2011;24(6):337-41.

Hübner NO, Kellner NB, Partecke LI, Koburger T, Heidecke CD, Kohlmann T, Kramer A: Determination of antiseptic efficacy of rubs on the forearm and consequences for surgical hand disinfection. J Hosp Infect. 2011 May;78(1):11-5.

Müller G, Kramer A, Schmitt J, Harden D, Koburger T: Reduced cytotoxicity of **polyhexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB)** by egg phosphatidylcholine while maintaining antimicrobial efficacy. Chem Biol Interact. 2011 Apr 25;190(2-3):171-8.

Koburger T, Pitts D, Kramer A.: Results of a field study on the influence of HygienicWood mattress toppers on the number of mites in bed dust and the state of health of people with house dust mite allergies. GMS Krankenhhyg Interdiszip. 2010 Sep 21;5(2) 5(2):Doc04 (20100921).

Koburger T, Hübner NO, Braun M, Siebert J, Kramer A.: Standardized comparison of the antiseptic efficacy of triclosan, PVP-iodine, octenidine dihydrochloride, **polyhexanide** and chlorhexidine digluconate. J Antimicrob Chemother. 2010 Aug; 65(8):1712-9.

Siegfried Müller, Rolf-Jürgen Zahn, Torsten Koburger, Klaus-Dieter Weltmann: Smell reduction and disinfection of textile materials by dielectric barrier discharges. NS. 2010 Sep; Vol.2, No.9, 1044-1048.

Goroncy-Bermes P, Koburger T, Meyer B.: Impact of the amount of hand rub applied in hygienic hand disinfection on the reduction of microbial counts on hands. J Hosp Infect. 2010 Mar;74(3):212-8.

N.O. Huebner, O. Assadian, I. Harfenstein, R. Moesges, T. Koburger, U. Weber and A. Kramer: Microbiological Efficacy of Throat Antiseptics Used as A Spray or A Solution in Healthy Volunteers. Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry, 2008, 7, 281-284.

Igelbrink D, Koburger T, Simon A, Kramer A: Mikrobiozide Wirksamkeit von Medihoney™ / *Microbiocidal efficacy of Medihoney™*. GMS Krankenhaushyg Interdiszip 2007; 2(2):Doc50 (20071228).

Koburger T, Müller G, Eisenbeiß W, Assadian O, Kramer A: Mikrobiozide Wirksamkeit von **Polihexanid** / *Microbicidal activity of **polihexanide***. GMS Krankenhaushyg Interdiszip 2007; 2(2):Doc44 (20071228).

Müller G, Koburger T, Jethon FUW, Kramer A: Vergleich der bakterioziden Wirksamkeit und In-vitro-Zytotoxizität von **Lavasept®** und **Prontosan®** / *Comparison of the bactericidal efficacy and in vitro cytotoxicity of **Lavasept®** and **Prontosan®***. GMS Krankenhhyg Interdiszip. 2007; 2(2):Doc42 (20071228).

Koburger T, Weibezahn J, Bernhardt J, Homuth G, Hecker M.: Genome-wide mRNA profiling in glucose starved Bacillus subtilis cells. Mol Genet Genomics. 2005 Aug;274(1):1-12.

Steffen Tobisch, Torsten Koburger, Britta Jürgen, Steffi Leja, Michael Hecker, Thomas Schweder: Quantification of Bacterial mRNA by One-Step RT-PCR Using the LightCycler System. Roche Applied Sience, BIOCHEMICA NO. 3 2003; 5 -8.

Petersohn A, Bernhardt J, Gerth U, Höper D, Koburger T, Völker U, Hecker M.: Identification of sigma(B)-dependent genes in Bacillus subtilis using a promoter consensus-directed search and oligonucleotide hybridization. J Bacteriol. 1999 Sep;181(18):5718-24.

Vorträge auf wissenschaftlichen Fachtagungen (Nach Tagungsdatum und mit Hervorhebung der zum Thema Polihexanid gehörigen):

Koburger T, Kramer A: Testing of the GLOSAIR^{TM} 400 area decontamination system under laboratory and hospital conditions. International Conference on Prevention & Infection Control -ICPIC 2013, ASP Satellite Syposium; 25. Juni 2013, Genf

Müller G, Koburger T, Kramer A: Reduced cytotoxicity of **polyhexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB)** by egg phosphatidylcholine while maintaining antimicrobial efficacy. The Infected Wound 2011 – International Symposium of the Working Section for Clinical Antisepsis of the German Society of Hospital Hygiene (DGKH), 03. Juni 2011, Berlin

T. Koburger, N.-O. Hübner, A. Kramer: **Microbicidal activity in the quantitative suspension test** without and with Bioburden. The Infected Wound 2011 – International Symposium of the Working Section for Clinical Antisepsis of the German Society of Hospital Hygiene (DGKH), 03. Juni 2011, Berlin

T. Koburger, Claudia Rändler: Sauerstoffabspalter bei Einsatz hinsichtlich *Clostridium difficile*. 6. Paderborner Hygiene-Symposium - eine Gemeinschaftsveranstaltung des Berufsverbandes der Hygieneinspektoren /innen des Landes Nordrhein-Westphalen e.V. und dem Gesundheitsamt des Kreises Paderborn, 09. November 2010, Paderborn

T. Koburger, A. Kramer: Implantate als Risikofaktor bei der Entstehung postoperativer Wundinfektionen. Fachtagung Krankenhaus Agatharied "Neue Konzepte zur Prävention Und Reparation der Bauchwandhernie", 21. Mai 2010, Tegernsee

T. Koburger: Methoden, Kosten und Relevanz der Desinfektionsmittelprüfung in Abhängigkeit vom Anwendungszweck - Diskussion der brennendsten Probleme. 10th International congress of the German Society of Hospital Hygiene (DGKH), 21. April 2010, Berlin

T. Koburger, G. Müller: New antimicrobial formulation of **polihexanide** to minimize the cytotoxicity markedly. 10th international congress of the German Society of Hospital Hygiene (DGKH), 20. April 2010, Berlin

T. Koburger, N.-O. Hübner, M. Braun, J. Siebert, A. Kramer: Direct comparison of microbiostatic and microbiocidal efficacy of triclosan, PVP-iodine, octenidine dihydrochloride, **polihexanide** and chlorhexidine digluconate. 10th international congress of the German Society of Hospital Hygiene (DGKH), 19. April 2010, Berlin

N.-O. Hübner, T. Koburger, A. Kramer , J. Siebert: Antimikrobielle Wirkung von **Octenidin im Vergleich zu herkömmlichen Wirkstoffen**. Die infizierte Problemwunde - 3. Symposion der Deutschen Gesellschaft für Krankenhaushygiene (DGKH), 26. Juni 2009, Berlin

T. Koburger, G. Müller und A. Kramer: **Mikrobiozide Wirksamkeit von Polihexanid.** Die infizierte Problemwunde - 3. Symposion der Deutschen Gesellschaft für Krankenhaushygiene (DGKH), 29. Juni 2007, Berlin

2. Der kumulativen Promotion zugrunde liegende Publikationen

1 Mikrobiozide Wirksamkeit von Polihexanid

2 Vergleich der bakteriziden Wirksamkeit un In-vitro-Zytotoxizität von Lavasept® und Prontosan®

3 StandardisierterVergleich der antiseptischen Wirksamkeit von Triclosan, PVP-Iod, Octenidindihydrochlorid, Polhexanid und Chlorhexidinedigluconat

4 Reduzierte Zytotoxizität von Polyhexamethylenbiguanidhydrochlorid (PHMB) durch Ei-Phosphatidylcholin unter Beibehaltung der Antimikrobiellen Wirksamkeit

5 Interaktion von Polyhexamethylenbiguanidhydrochlorid (PHMB) mit Phosphatidylcholin-haltigen o/w-Emulsionen und Konsequenzen für die Mikrobizidie und Zytotoxizität

Mikrobiozide Wirksamkeit von Polihexanid

Microbicidal activity of polihexanide

Abstract

When tested in the quantitative suspension test according to the prEN 12054, polihexanide meets the requirements defined by this standard for an antiseptic. At a product concentration of 0.02%, the test organisms are reduced by ≥5 lg, or ≥3 lg under dirty conditions, respectively, within a contact time of 5 min. This agrees well with the accepted recommendation of 0.02% polihexanide for the application on chronic wounds. In the presence of sesamoid bone/cartilage a polihexanide concentration of 0.005% is sufficient effective. As this concentration does not appear to have any adverse effects it might be promising to analyze its suitability for the antiseptic irrigation of joints in the animal model.
The combination of 0.1% polihexanide with undecylenamidopropyl betaine (Prontosan®) possesses the antiseptic properties specified above, too. However, with regard to the higher concentration of polihexanide, at least a repeated application of this formulation cannot be recommended for cleansing and irrigating wounds or burns.

Keywords: polihexanide, Lavasept®, Serasept®, microbicidal efficacy

Zusammenfassung

Bei Testung im quantitativen Suspensionstest gemäß EN 12054 erfüllt der Wirkstoff Polihexanid 0,02% bei ≤5 min Einwirkungszeit die Anforderungen an ein Antiseptikum ohne Belastung mit einer Erregerreduktion ≥5 lg bzw. mit organischer Belastung ≥3 lg. Damit findet die Empfehlung dieser reduzierten Anwendungskonzentration für chronischen Wunden ihre Bestätigung. In Gegenwart von Knorpel ist eine Verdünnung von 0,005% ausreichend wirksam. Da diese Konzentration in vitro noch knorpelverträglich ist, erscheint es aussichtsreich, ihre Effektivität und Verträglichkeit zur Gelenkspülung am Tiermodell zu untersuchen.
Die Kombination von 0,1% Polihexanid mit Undecylenamidopropylbetain (Prontosan®) erfüllt ebenfalls die Wirkungsanforderungen an ein Antiseptikum ohne und mit Belastung, wobei auf Grund der höheren Anwendungskonzentration von Polihexanid zumindest für Verbrennungswunden kein wiederholter Einsatz zur reinigenden Wundspülung empfohlen werden kann.

Schlüsselwörter: Polihexanid, Lavasept®, Serasept®, mikrobiozide Wirksamkeit

Torsten Koburger[1]
Gerald Müller[2]
Werner Eisenbeiß[3]
Ojan Assadian[4]
Axel Kramer[2]

1 Hygiene Nord GmbH, Greifswald, Deutschland

2 Institut für Hygiene und Umweltmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald, Deutschland

3 Klinik für Plastische Chirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck, Deutschland

4 Klinisches Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie, Medizinische Universität, Wien, Österreich

Einleitung

Polihexanid (chemische Bezeichnungen N-Amidino-2-(2,6-dichlorphenyl)acetamid, Polyhexamethylenbiguanidhydrochlorid oder Poly(imino[imido-carbonyl]imino[imido-carbonyl] iminohexa-methylen)hydrochlorid)) (Abbildung 1) enthält im Unterschied zu Chlorhexidin (Abbildung 2) keine endständigen Chlorbenzensubstituenten.

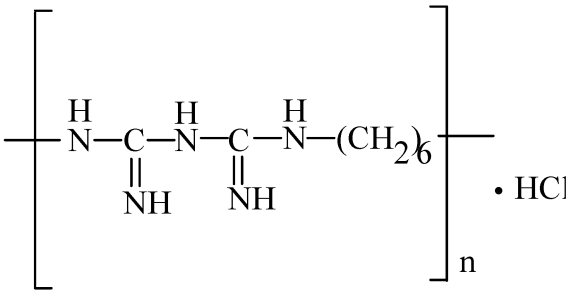


Abbildung 1: Strukturformel von Polihexanid

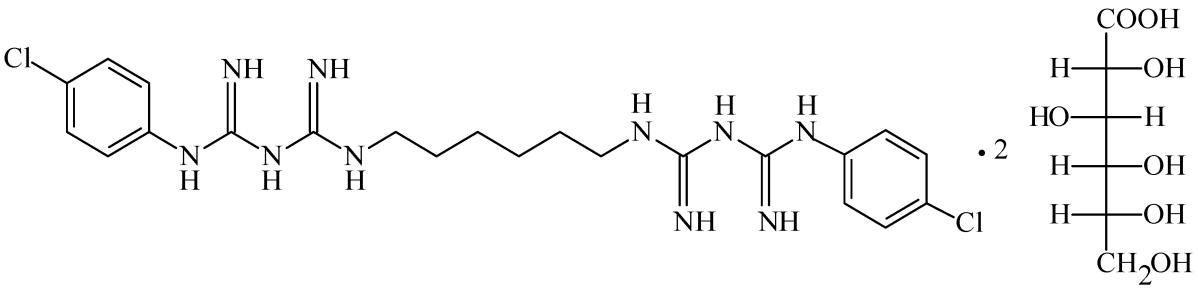


Abbildung 2: Strukturformel von Chlorhexidin

Es ist davon auszugehen, dass die im Vergleich zu Polihexanid mit Abstand ungünstigere Toxikologie (hohe Zytotoxizität, anaphylaktische und allergische Reaktionen, Neurotoxizität, Mutagenität) von Chlorhexidin auf diesem Strukturunterschied beruht.

Trotzdem ergibt sich aus bisherigen Untersuchungen, dass Polihexanid ohne und mit Belastung wirksamer als Chlorhexidin, bei hoher Blutbelastung auch wirksamer als Iodophore ist, allerdings mit deutlich langsamerem Wirkungseintritt als bei Iodophoren (erregerabhängig 5-20 min im quantitativen Suspensionstest [1]). Die Wirkung richtet sich auch gegen intrazellulär sich vermehrende Erreger wie Chlamydien und Neisserien [2]. Dieser Unterschied ist im Wirkungsmechanismus von Polihexanid begründet. Die mikrobiozide Wirkung beruht in erster Linie auf der selektiven Permeabilitätsbeeinflussung der bakteriellen Zellmembran auf Grund der starken Wirkung gegenüber sauren Phospholipiden bakterieller Zellmembranen bei nur geringer Beeinflussung neutraler Phospholipide humaner Zellmembranen [3], [4], [5]. Das führt zur Hemmung metabolischer Prozesse, die letztlich eine Koagulation des Zellinhalts nach sich ziehen [6], [7]. Hinzu kommt die Blockierung des mikrobiellen Attachments, nachgewiesen durch Hemmung dentaler Plaques [8] und durch remanente Wirkung bei Anwendung zur präoperativen Augenantiseptik [9].

Im Ergebnis einer Medline-Analyse zur Zitationshäufigkeit von PVP-Iod und Octenidin im Vergleich zu Polihexanid ergab sich für den Zeitraum der letzten vier Jahre eine deutliche Zunahme zugunsten des letztgenannten Wirkstoffs (Tabelle 1), was dessen zunehmende Bedeutung für die Praxis der Antiseptik widerspiegelt.

Tabelle 1: Zitationshäufigkeit von Polihexanid im Vergleich zu PVP-Iod und Octenidin

Wirkstoff	Zitationshäufigkeit (%)	
	bis 2002	nach 2002
PVP-Iod	85	15
Octenidine	71	29
Polihexanid	62	38

Daher sollten weitere Daten zur mikrobioziden Wirksamkeit von Polihexanid vor allem bei geringeren Konzentrationen generiert werden, um daraus möglicherweise Schlussfolgerungen für die Praxis der Antiseptik ableiten zu können.

Methoden

Die Testung wurde im quantitativen Suspensionstest gemäß EN 12054 [10] durchgeführt. Das Testprinzip besteht darin, dass 1 ml einer Suspension des Testorganismus (für Bakterien 10^8-10^9 Koloniebildende Einheiten (KbE)/ml, für C. albicans 10^7-10^8 KbE/ml) mit 9 ml der Prüflösung gemischt werden. Am Ende der Einwirkungszeit werden 1 ml aus dem Prüfsubstanz-Testorganismus-Gemisch in 9 ml Enthemmerlösung (3% Tween 80, 3% Saponin, 0,1% Histidin und 0,1% Cystein) überführt. Nach 5 min Neutralisation werden daraus und aus den dekadischen Verdünnungen dieses Prüfneutralisationsgemisches jeweils 1 ml als Doppelbestimmung auf CSL-Agar ausgespatelt und für 48 h bei 36°C kultiviert. Die Wirksamkeit wird in Form des Reduktionsfaktors (RF) ausgedrückt. Er wird berechnet aus der Differenz des lg der Anzahl KbE des Vor- und Nachwerts.

Die Verdünnungen der Prüfsubstanzen wurden jeweils mit sterilem destilliertem Wasser hergestellt.

Ergebnisse und Diskussion

Der Wirkstoff Polihexanid erfüllt gemäß [11] die Anforderungen an ein Antiseptikum ohne und mit organischer Belastung mit einem RF>5 (Tabelle 2).

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass Polihexanid bei 5 min Einwirkungszeit auch in der Verdünnung von 0,02%, wie sie zur Anwendung auf chronischen Wunden empfohlen wird, die Wirkungsanforderungen mit hohem Sicherheitsabstand an ein Antiseptikum erfüllt. In Gegenwart von Knorpel ist für die geprüften Testorganismen sogar eine Verdünnung von 0,005% ausreichend. Da diese Konzentration in vitro gerade noch knorpelverträglich ist [12], erscheint es aussichtsreich, ihre Effektivität und Verträglichkeit zur Gelenkspülung am Tiermodell zu untersuchen.

Die Kombination von 0,1% Polihexanid mit Undecylenamidopropylbetain (Prontosan®) erfüllt ebenfalls die Wirkungsanforderungen an ein Antiseptikum ohne und mit Belastung (Tabelle 3).

Allerdings ist die Wirkstoffkonzentration 2,5 bis 5fach höher als im Lavasept® bzw. Serasept®, was mit einer höheren Zytotoxizität verbunden ist. Bei klinischer Anwendung wurde nach durchschnittlich 8tägiger Anwendung

Tabelle 2: Mikrobiozide Wirksamkeit von Lavasept bzw. Serasept im quantitativen Suspensionstest

Test-organismus	Einwirkungs-zeit (min)	Konzentration (%) bezogen auf Polihexanid/RF				
		Belastung				
		Keine[2]	0,2% BSA*[1]	0,3% BSA + 0,3% Blut[2]	4,5% BSA + 4,5% Blut[2]	Sesambein des Rinds[1]
S. aureus	0,5 5 10 60	0,02/>5 0,02/>6 0,02/>7 0,005/>8	0,005/3,8	0,02/>4 0,02/>6	0,02/3,6 0,02/4,1	0,0025/>4
E. coli	0,5 10 60	0,02/>6 0,005/>8	0,005/>8	0,02/>6	0,02/~2 0,02/>6	0,00125/>3
E. faecium	5 60	0,02/4-5 0,02/>6	0,02/4-5 0,02/>6	ng**	ng**	ng**
P. aeruginosa	5 60	0,02/>6 0,02/>6	0,02/>6	0,02/>6	0,02/>6	ng**
C. albicans	0,5 10	0,02/>5 0,02/>6	ng**	0,02/>5	0,02/~4	ng**

[1] Lavasept [2] Serasept
* bovines Serumalbumin ** nicht getestet

Tabelle 3: Mikrobiozide Wirksamkeit der Kombination von 0,1% Polihexanid mit Undecylenamidopropylbetain (Prontosan®) im quantitativen Suspensionstest

Testorganismus	Einwirkungszeit (min)	Konzentration (%) bezogen auf Polihexanid/RF	
		Belastung	
		keine	0,3% BSA* + 0,3% Blut
S. aureus	1 1 5 10	0,05/>6 0,05/>6 0,05/>6	0,05/>3,2 0,1/>6 0,05/4,5 0,05/6,0
E. coli	1 5	0,05/5,9 0,05/>6	0,05/4,9 0,05/>6
E. hirae	1 5	0,05/3,6 0,05/>6	0,05/3,4 0,05/>6
P. aeruginosa	1 5	0,05/>6 0,05/>6	0,05/>6 0,05/>6
C. albicans	1 5	0,05/>5 0,05/>5	0,05/3,7 0,05/>5

* bovines Serumalbumin

die Bildung gelber Membranen auf den Wunden auffällig, die als zytotoxische Reaktion aufzufassen sein dürfte.
Es zeigte sich im Einsatz von Prontosan bei Brandverletzungen, die länger als eine Woche mit einem Feuchtverband konservativ behandelt wurden, dass diese Membranen fest adhärent trocken auf den Wundoberflächen entstanden und eine weitere Reepithelialisierung nicht mehr stattfand. Das führte zur spätprimären operativen Behandlung mit tangentialer Exzision von trockenem Schorf inklusive oberster epithelialer Hautschichten und Spalthautdeckung von Arealen, die eigentlich spontan heilen sollten.
Der gleiche Prozess wurde auch unter längerer Prontosananwendung bei anderen Wundflächen beobachtet und führte dazu, dass Prontosan nicht mehr verwendet und wieder die konventionelle Lavasept-Konzentration bei Brandverletzungen eingesetzt wurde (Eisenbeiß pers Mitt.). Zumindest für Verbrennungswunden ist auf Grund dieser Beobachtungen der Einsatz von Prontosan nur zur einmaligen Wundreinigung zu empfehlen. Anschließend sollte die antiseptische Behandlung mit Lavasept® oder mit Serasept® fortgesetzt werden.

Literatur

1. Werner HP, Kramer A. Mikrobiologische Anforderungen an lokale Antiinfektiva unter spezieller Berücksichtigung der antiinfektiven Wundbehandlung. In: Kramer A, Wendt M, Werner HP, Hrsg. Möglichkeiten und Perspektiven der klinischen Antiseptik. Wiesbaden: mhp; 1995. S. 26-30.

2. Jethon F, Kramer A. Verwendung von PHMB zur Behandlung von durch sich intrazellulär vermehrende Erreger verursachten Infektionen. EP 0788797 A1. 06.02. 1997.

3. Ikeda T, Ledwith A, Bamford CH, Harm RA. Interaction of a polymeric biguanide biocide with phospholipid membranes. Biochim Biophys Acta. 1984;769:57-66.

4. Ikeda T, Tazuki S, Watanabe M. Interaction of biologically active molecules with phospholipid membranes. 1. Fluorescence depolarization studies on the effect of polymeric biocide bearing biguanide groups in the main chain. Biochim Biophys Acta. 1983;735:380-6.

5. Ikeda T, Tazuke S, Bamford C, Ledwith A. Spectroscopic studies on the interaction of polymeric in-chain biguanide biocide with phospholipids membranes as probed by 8-anilinonaphthalene-1-sulfonate. Bull Chem Soc Jpn. 1985;58:705-9.

6. Davies A, Field BS. Action of biguanides, phenols and detergents on Escherichia coli and its spheroplasts. J Appl Bact. 1968;32:233-43.

7. Mitchinson C, Pain RH, Vinson JR, Walker T. The relative effectiveness of guanidinium and some biguanide salts as denaturants. Biochim Biophys Acta. 1983;743:31-6.

8. Rosin M, Welk A, Kocher T, Majic-Todt A, Kramer A, Pitten FA. The effect of a polyhexamethylene biguanide mouthrinse compared to an essential oil rinse and a chlorhexidine rinse on bacterial counts and 4-day plaque regrowth. J Clin Periodontol. 2002;98:392-9.

9. Hansmann F, Kramer A, Ohgke H, Strobel H, Geerling G. Polyhexamethylbiguanid (PHMB) zur präoperativen Antisepsis bei Cataract Operation. Ophthalmologe. 2004;101:377-83.

10. EN 12054. Chemical disinfectants and antiseptis - Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of products for hygienic and surgical handrub and handwash used in human medicine - Test method and requirements (phase 2/step 1). Brüssel: European Committee for Standardization; 1997.

11. Pitten FA, Werner HP, Kramer A. A standardized test to assess the impact of different organic challenges on the antimicrobial activity of antiseptics. J Hosp Infect. 2003;55(2):108-15.

12. Müller G, Kramer A. Effect of selected wound antiseptics on adult articular cartilage (bovine sesamoid bone) in the presence of Escherichia coli and Staphylococcus aureus. J Orthop Res. 2005;23:127-33

Korrespondenzadresse:
Prof. Dr. med. Axel Kramer
Institut für Hygiene und Umweltmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Walther-Rathenau-Str. 49 a, 17489 Greifswald, Deutschland, Tel.: +49-(0)3834-515542, Telefax: +49-(0)3834-515541
kramer@uni-greifswald.de

Bitte zitieren als
Koburger T, Müller G, Eisenbeiß W, Assadian O, Kramer A. Mikrobiozide Wirksamkeit von Polihexanid. GMS Krankenhaushyg Interdiszip. 2007;2(2):Doc44.

Artikel online frei zugänglich unter
http://www.egms.de/en/journals/dgkh/2007-2/dgkh000077.shtml

Copyright
©2007 Koburger et al. Dieser Artikel ist ein Open Access-Artikel und steht unter den Creative Commons Lizenzbedingungen (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.de). Er darf vervielfältigt, verbreitet und öffentlich zugänglich gemacht werden, vorausgesetzt dass Autor und Quelle genannt werden.

Vergleich der bakterioziden Wirksamkeit und In-vitro-Zytotoxizität von Lavasept® und Prontosan®

Comparison of the bactericidal efficacy and in vitro cytotoxicity of Lavasept® and Prontosan®

Gerald Müller[1]
Torsten Koburger[2]
Frank U. W. Jethon[3]
Axel Kramer[4]

1 Institut für Hygiene und Umweltmedizin, Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald, Deutschland

2 Hygiene Nord GmbH, Greifswald, Deutschland

3 Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland

4 Institut für Hygiene und Umweltmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald, Deutschland

Abstract

Lavasept® and Prontosan® were compared using identical concentrations of the active agent polihexanide contained in both preparations regarding their bactericidal effectiveness in the quantitative suspension test and their cytotoxicity on mice fibroblasts, to obtain a statement regarding the coergism of polihexanide with the additives Macrogolum resp. undecylenamidopropyl betaine that are different in both preparations.
In higher polihexanide concentrations the addition of undecylenamidopropyl betaine leads to a better bactericidal effectiveness of the preparation Prontosan®, against P. aeruginosa, but at the same time to a decrease of the in vitro cytotoxicity of up to 50% depending on the concentration-time relationship. Comparing the IC_{50} there is a difference of approximately 28%.
With lower concentration and longer exposure time this effect is reduced and with exposure times >1 min there is partly even the tendency towards a better effectiveness of the combination preparation consisting of polihexanide and Macrogolum. As a cause for this phenomenon, an interaction among the constituents polihexanide with undecylenamidopropyl betaine resp. Macrogolum can be discussed. The effectiveness of both preparations towards S. aureus is not different from each other. Because Lavasept® is used in a maximum application concentration of 0.04% polihexanide, and for chronic wounds the reduced application concentration of 0.02% is recommended, but the application concentration of polihexanide in Prontosan® is 0.1%, regarding the use solutions the combination of polihexanide and Macrogolum is to be appraised as being less cytotoxic and therefore more compatible with wounds than undiluted Prontosan®. For experimental support of this assumption further investigations are necessary.

Keywords: polihexanide, Macrogolum, undecylenamidopropyl betaine, coergism, cytotoxicity

Zusammenfassung

Lavasept® und Prontosan® wurden auf der Basis vergleichbarer Konzentrationen des in beiden Zubereitungen enthaltenen Wirkstoffs Polihexanid bezüglich bakteriozider Wirksamkeit im quantitativen Suspensionstest und der Zytotoxizität an Mäusefibroblasten verglichen, um eine Aussage zum Koergismus von Polihexanid mit dem sich in beiden Zubereitungen unterscheidenden Zusatzes Macrogolum bzw. Undecylenamidopropylbetain zu erhalten.
Der Zusatz von Undecylenamidopropylbetain im Präparat Prontosan® führt bei hoher Polihexanidkonzentration gegenüber P. aeruginosa zu einer Wirkungsverstärkung bei gleichzeitiger Abschwächung der In-vitro-Zytotoxizität in Abhängigkeit von der Konzentrations-Zeit-Relation um bis zu 50%. Beim Vergleich der IC_{50} ergibt sich ein Abstand von etwa 28%.

Bei niedrigerer Konzentration und längerer Einwirkzeit reduziert sich dieser Effekt, und es zeichnet sich bei Einwirkungszeiten >1 min z.T. sogar die Tendenz einer besseren Wirksamkeit des Kombinationspräparats aus Polihexanid und Macrogolum ab. Als Ursache für dieses Phänomen kann eine Wechselwirkung der Inhaltsstoffe Polihexanid mit Undecylenamidopropylbetain bzw. Macrogolum diskutiert werden. Gegenüber S. aureus unterscheiden sich die Wirksamkeiten beider Präparate nicht voneinander.
Da Lavasept® maximal in der Anwendungskonzentration von 0,04% Polihexanid verwendet und für chronische Wunden die reduzierte Anwendungskonzentration von 0,02% empfohlen wird, die Anwendungskonzentration von Polihexanid im Prontosan® jedoch 0,1% beträgt, ist bezüglich der Anwendungslösungen die Kombination von Polihexanid und Macrogolum gegenüber unverdünntem Protosan® als weniger zytotoxisch und damit besser wundverträglich einzuschätzen. Zur experimentellen Manifestierung dieser Vermutung sind weitere Untersuchungen angezeigt.

Schlüsselwörter: Polihexanid, Macrogolum, Undecylenamidopropyl-Betain, Koergismus, Zytotoxizität

Einleitung

Der antiseptische Wirkstoff Polihexanid ist als remanenter Wirkstoff in Händedesinfektionsmitteln und Hautantiseptika für den Einsatz zur Ganzkörpersanierung von MRSA-Trägern einschließlich Haarwäsche und Anwendung im äußeren Gehörgang enthalten. In Schleimhaut- und Wundantiseptika wird er als Hauptwirkstoff eingesetzt.
Der Wirkstoff Polihexanid steht in verschiedenen Zubereitungen zur Auswahl. Die seit längstem verfügbare ist Lavasept®, die Kombination von Polihexanid mit Macrogolum. In der Schweiz ist Polihexanid (Lavasept®) als Konzentrat und als Gebrauchslösung als Arzneimittel registriert. Der Hersteller garantiert für das Konzentrat die Einhaltung der Spezifikationen hinsichtlich Molekularmassenverteilung, Abwesenheit giftiger Vor- oder Zwischenprodukte aus der Synthese sowie Einhaltung der Grenzwerte für den Schwermetallgehalt nach DAB. In Deutschland und Österreich ist Lavasept® nicht als Arzneimittel registriert, so dass von Apotheken die Gebrauchslösung zur Wundantiseptik sowie andere Zubereitungen aus Lavasept®-Konzentrat durch Verdünnung mit Ringer-Lösung hergestellt werden.
Im Neuen Rezeptur-Formularium des DAC sind folgende Monographien enthalten: Polihexanid-Lösung 0,02%/0,04% NRF 11.128, Hydrophiles Polihexanid-Gel 0,04%/0,1% NRF 11.131, Polihexanid-Augentropfen 0,02%, NRF 15.25, Polihexanid-Augenbad 0,04%, NRF 15.26 und Polihexanid-Stammlösung 0,1%. Diese neuen Rezepturen unterstreichen die wachsende Bedeutung dieser gut wirksamen verträglichen Substanz [1].
In Deutschland, Österreich und der Schweiz sind sterile, gebrauchsfertige Wundspüllösungen wie Lavasorb® und Lavanid® mit 0,02% bzw. 0,04% Polihexanid mit Macrogolum zur Reinigung, Erregerausschwemmung und Feuchthaltung von Wunden als Medizinprodukt erhältlich.
Ebenso ist die Wundspüllösung Prontosan® mit den Komponenten Undecylenamidopropyl-Betain als oberflächenaktive Substanz und Polihexanid als antiseptischem Wirkstoff erhältlich.
Schließlich steht seit 2007 mit Serasept® das erste in Deutschland zugelassene Arzneimittel mit 0,02% bzw. 0,04% Polihexanid in steriler, gebrauchsfertiger Darreichung zur Verfügung.
Da der Koergimus von Macrogolum bzw. Undecylenamidopropylbetain mit Polihexanid bisher nicht untersucht worden ist, sollte damit anhand der Merkmale bakterizide Wirksamkeit und Zytotoxizität gegenüber Mäusefibroblasten im direkten Vergleich begonnen werden.

Methode

Quantitativer Suspensionstest

Der quantitative Suspensionstest wurde gemäß prEN13727 [2] durchgeführt, wobei die Testung auf die Leitmikroorganismen S. aureus und P. aeruginosa bei Belastung mit 10% Schafblut beschränkt wurde. Für jede Einwirkungszeit und Prüfkonzentration wurde eine Wiederholung geprüft. Die Wirksamkeit wird als sog. Reduktionsfaktor angegeben, der sich aus der Differenz des lg der Koloniezahl vor Substanzeinwirkung und des lg der Koloniezahl nach Substanzeinwirkung ergibt.

Zytotoxizitätstestung

Testprinzip

Als Testzellen wurden permanente Mäusefibroblasten L929 (ATCC CCL1) verwendet. Die Testung erfolgte in Kulturmedium bei Anwesenheit von 10% fötalem bovinen Serum (BSA) nach Kontaktzeiten der Prüflösungen mit den Zellen über 1, 5, 15 und 60 min durch sofortige

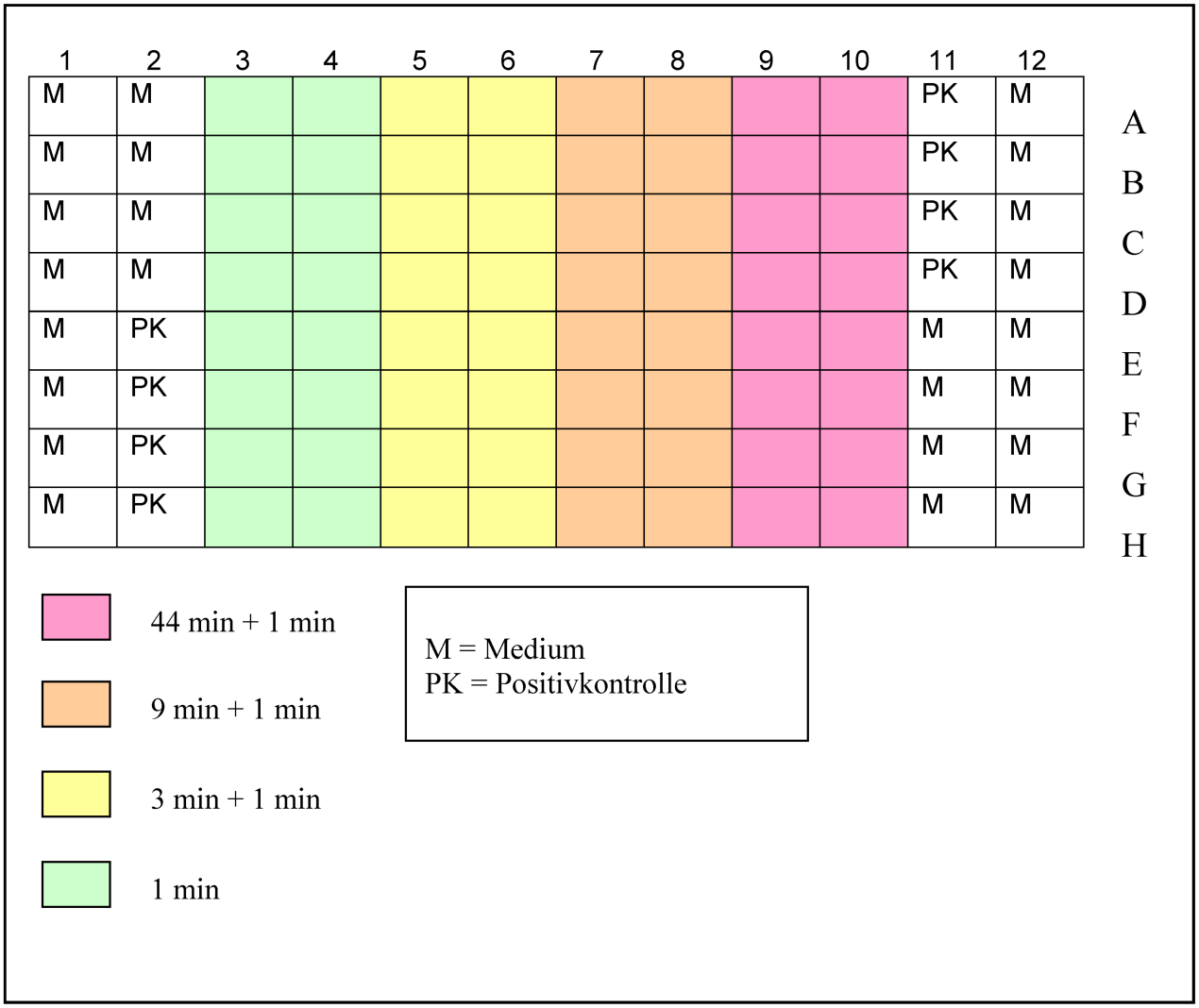


Abbildung 1: Schematische Darstellung der 96 well-Zellkulturplatte mit den dazugehörigen Positionen für die unterschiedlichen Einwirkzeiten einer Prüfkonzentration

Charakterisierung der Vitalität der Prüfzellen mittels MTT-Nachweisreaktion [3]. Alle Untersuchungen wurden als 12-fache Bestimmung durchgeführt.

Ablaufschema

Einen Tag vor der Testung wurden die L929-Zellen in einer Dichte von $1x10^6$ Zellen/ml in 96 well-Zellkulturplatten (MTP) ausgesät und über Nacht im Begasungsbrutschrank anwachsen gelassen. Es resultierte 80%-90% Konfluenz. Die Versuchsdurchführung erfolgte gemäß Abbildung 1.
Eine MTP mit >80% konfluentem Zellrasen wird dem Brutschrank entnommen. Nur von den rosa gekennzeichneten Reihen wird zunächst das überstehende Kulturmedium vorsichtig abgesaugt und 100 µl der Prüflösung (PL) zugefügt. Absaugen und Zugabe der PL müssen innerhalb von 1 min erfolgen. Die MTP wird für 44 min weiter inkubiert. Anschließend wird von den hellbraun gekennzeichneten Reihen das Medium abgesaugt und 100 µl der PL zugefügt. Die MTP wird für 9 min weiter inkubiert. Absaugen und Zugabe der Prüflösung müssen innerhalb von 1 min erfolgen. Anschließend wird von den gelb gekennzeichneten Reihen das Medium abgesaugt und 100 µl der PL zugefügt. Die MTP wird für 3 min weiter inkubiert. Absaugen und Zugabe der Prüflösung müssen wiederum innerhalb von 1 min erfolgen. Zuletzt wird von den hellgrün gekennzeichneten Reihen das Medium abgesaugt und 100 µl der PL zugefügt. Absaugen und Zugabe der Prüflösung müssen erneut innerhalb von 1 min erfolgen. Nach einer weiteren Minute Einwirkzeit werden sämtliche Überstände in den Kavitäten der MTP auf sterilem Zellstoff ausgeschüttet und durch vorsichtiges Ausklopfen entfernt.
Die Zellen werden sofort mit 2x200 µl Kulturmedium für jeweils 2 min gewaschen. Anschließend erfolgt die Zugabe von MTT-Medium. Nach einer Inkubationszeit von 3 h bei 37 °C im Begasungsbrutschrank wird das überstehende Medium gründlich entfernt. Das in den Zellen abgelagerte Formazan wird über 1 h auf dem Schütteltisch unter Lichtausschluss mit HCl-angesäuertem 2-Propanol eluiert.

MTT-Methode

Die Bestimmung der Vitalität der Zellen beruht darauf, dass lebende Zellen mit Hilfe der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenase das gelb gefärbte Tetrazoliumsalz MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid] in ein blaues, unlösliches Formazanderivat umwandeln und intrazellulär ablagern. Anschließend wird das gespeicherte Formazanderivat mit angesäuertem 2-Propanol eluiert. Die Färbung des Überstands wird spektralphotometrisch im EIA-Reader Benchmark (BioRad) ausgewertet (Messwellenlänge 540 nm, Referenzwellenlänge 655 nm). Die Absorption ist ein direktes Maß der Vitalität der Zellen. Definitionsgemäß wird die mittlere Absorption des Medium-Kontrollansatzes 100% Vitalität gleichgesetzt und die Vitalität der Zellen in den Testansätzen relativ zu dieser bestimmt.

Bestimmung der IC_{50}

Die IC_{50} ist die Wirkstoff-Konzentration, bei der noch 50% der Zellen vital bleiben. Die IC_{50} stellt eine geeignete Konzentrationsgröße zur vergleichenden Abschätzung der In-vitro-Zytotoxizität verschiedener Präparate dar. Zu ihrer Ermittlung werden mindestens 4 Werte benötigt, wobei im Idealfall 2 Werte den Bereich ≥50% Vitalität und 2 Werte den Bereich ≤50% Vitalität der L929-Zellen einschließen sollten.

Prüfsubstanzen

Geprüft wurden Lavasept® Konzentrat (Ch.-B. PC552, 03/2006, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, seit Juli 2007 B. Braun Medical AG, Sempach) und Prontosan® Wundspüllösung (Ch. 2001-7, WS 35310701, 2004-07; Prontomed GmbH Medizinprodukte, Hiddenheim). 1 ml Lavasept®-Konzentrat enthält 200 mg Polihexanid (PHMB) mit einem Durchschnittsmolekulargewicht von 2800 und 10 mg Macrogolum 4000. Als Anwendungskonzentration wird zu Beginn der Wundbehandlung 0,2%iges Konzentrat, d.h. 0,04% PHMB, empfohlen [4]. 100 ml Lösung Prontosan® Wundspüllösung enthalten 0,1 g Undecylenamidopropyl-Betain und 0,1 g PHMB. Die Anwendungskonzentration beträgt 0,1% PHMB.
Es wurden jeweils in Bezug auf die Wirkstoffkonzentration im Produkt äquivalente Verdünnungen beider Wundspüllösungen getestet (Tabelle 1).

Ergebnisse

Bakteriozide Wirksamkeit

Während sich gegenüber S. aureus keine Wirkungsunterschiede verifizieren lassen, ist Prontosan® bei kurzer Einwirkungszeit nach 1 min aber auch noch nach 5 min Exposition gegenüber P. aeruginosa deutlich wirksamer als Lavasept®. In der Prüfkonzentration von 0,089% Polihexanid erreicht Lavasept® erst ab 15 min Einwirkungszeit die gleiche Wirksamkeit wie Prontosan®. Bei niedrigeren Polihexanid Konzentrationen, 0,02 und 0,01%, und längerer Einwirkzeit, ab 15 min, zeichnet sich eine geringfügig bessere Wirksamkeit des Kombinationspräparats aus Polihexanid und Macrogolum ab, die allerdings nicht signifikant ist.
Bezogen auf diese Prüfkonzentration erfüllt Prontosan® die Wirkungsanforderungen an ein Antiseptikum mit ≥3lg Reduktion gegenüber P. aeruginosa nach 1 min Einwirkungszeit, Lavasept® erst nach 5 min Einwirkungszeit (Tabelle 2).

Zytotoxizität

Die Ergebnisse der In-vitro-Zytotoxizitäts-Testung für das Prüfpräparat Prontosan® für die Konzentrationen von 100, 200, 400 und 500 µg/ml PHMB sind in Abbildung 2 dargestellt, die für Lavasept® in Abbildung 3.
Bei der höchsten Prüfkonzentration von PHMB von 500 µg/l und der kürzesten Einwirkungszeit von 1 min ist der Unterschied der Zytotoxizität zwischen beiden Wundspüllösungen am deutlichsten ausgeprägt. Bei dieser Konzentrations-Zeit-Relation ist die Zytoxizität von Lavasept® etwa doppelt so hoch wie die von Prontosan®. Mit abnehmender Prüfkonzentration und zunehmender Einwirkungszeit schwächt sich dieser Unterschied zunehmend ab.
In Abbildung 4, Abbildung 5, Abbildung 6 und Abbildung 7 sind die Prüfergebnisse im direkten Vergleich für die unterschiedlichen Prüfkonzentrationen zusammengefasst. Hier ergibt sich eine vergleichbare Abstufung in der Zytotoxizität zwischen Lavasept® und Prontosan®. Bei der PHMB-Konzentration von 500 µg/l ist die Zytotoxizität von Lavasept® sowohl bei 1 min als auch bei 5 min etwa doppelt so hoch wie die von Prontosan®. Bei 400 µg/l ergibt sich die analoge Situation bei 5 min und 15 min Einwirkungszeit, bei 200 µg/l bei 15 min und 60 min Einwirkungszeit. Bei 100 µg/l ist der Unterschied bei allen Einwirkungszeiten dagegen nur noch marginal.
Zur vergleichenden Abschätzung der In-vitro-Zytotoxizität wurde die IC_{50} kalkuliert. Dabei ist zu berücksichtigen, dass eine Bestimmung der IC_{50} für die untersuchten Wirkstoffe mit den vorliegenden Ergebnissen streng genommen nur bei der Einwirkzeit von 5 min möglich ist, d.h. alle anderen Werte sind als Näherungswerte zu betrachten (Abbildung 8).
Die IC_{50}-Werte der beiden PHMB-enthaltenden Prüfpräparate betragen nach einer Einwirkzeit von 5 min für Lavasept 255 µg/ml und für Prontosan 353 µg/ml (Abbildung 8).

Tabelle 1: Produkt- und Wirkstoffkonzentration [%] mit zugehöriger Einwirkzeit (prEN 13727)

Produkt	Konzentration (%) im Kulturmedium		Einwirkzeit (min)			
	Präparat	PHMB				
Prontosan	50	0,05	1	5	15	60
	40	0,04	1	5	15	60
	20	0,02	1	5	15	60
	10	0,01	1	5	15	60
Lavasept-Konzentrat	0,25	0,05	1	5	15	60
	0,20	0,04	1	5	15	60
	0,10	0,02	1	5	15	60
	0,05	0,01	1	5	15	60

Tabelle 2: Reduktionsfaktoren (RF) für S. aureus und P. aeruginosa

Einwirkungszeit (min)	Polihexanid-konzentration (%)	RF			
		S. aureus		P. aeruginosa	
		Lavasept®	Prontosan®	Lavasept®	Prontosan®
1	0,089	>5	>5	<1,7	>5
	0,04	2,5	2,6	<1,7	<1,5
	0,02	1,9	1,8	<1,7	<1,5
	0,01	<1,6	<1,6	<1,7	<1,5
5	0,089	>5	>5	4,2	>5
	0,04	>5	>5	3	3,5
	0,02	3,4	3,7	<1,7	<1,5
	0,01	2,2	2,7	<1,7	<1,5
15	0,089	>5	>5	>5	>5
	0,04	>5	>5	4,3	4,7
	0,02	>5	>5	2,6	<1,5
	0,01	4,5	4,8	<1,7	<1,5
30	0,089	>5	>5	>5	>5
	0,04	>5	>5	>5	>5
	0,02	>5	>5	4,4	4,1
	0,01	5	4,9	2,7	<1,5
60	0,089	>5	>5	>5	>5
	0,04	>5	>5	>5	>5
	0,02	>5	>5	4,9	4
	0,01	>5	4,8	3,3	3,1

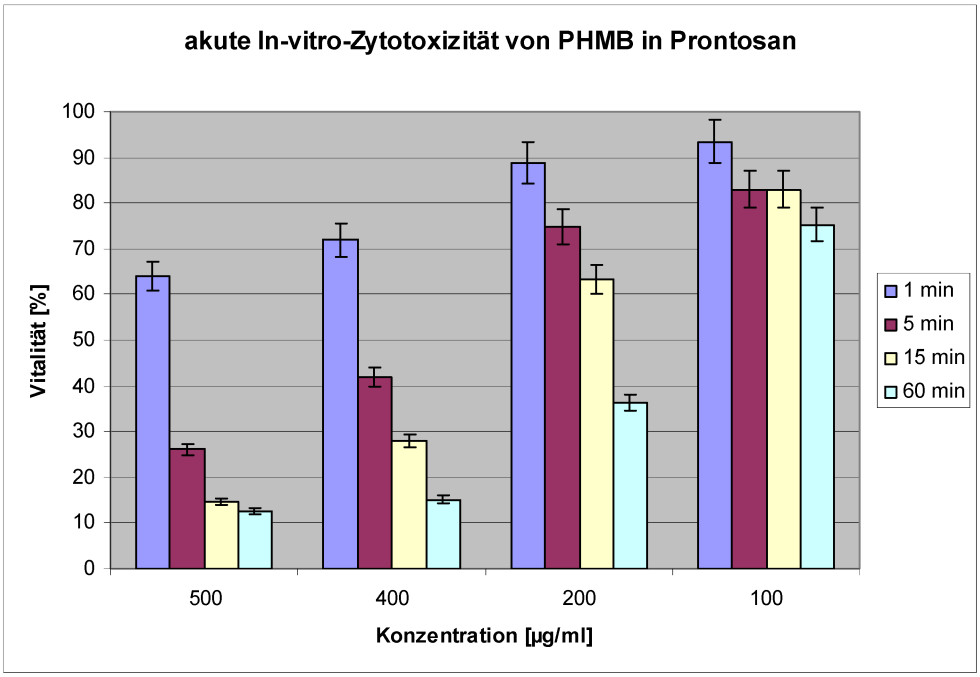


Abbildung 2: Vitalität der L929-Zellen [%] nach Kontakt mit 100-500 µg/ml PHMB (Prontosan®) über 1, 5, 15 und 60 min bei Anwesenheit von 10% FBS

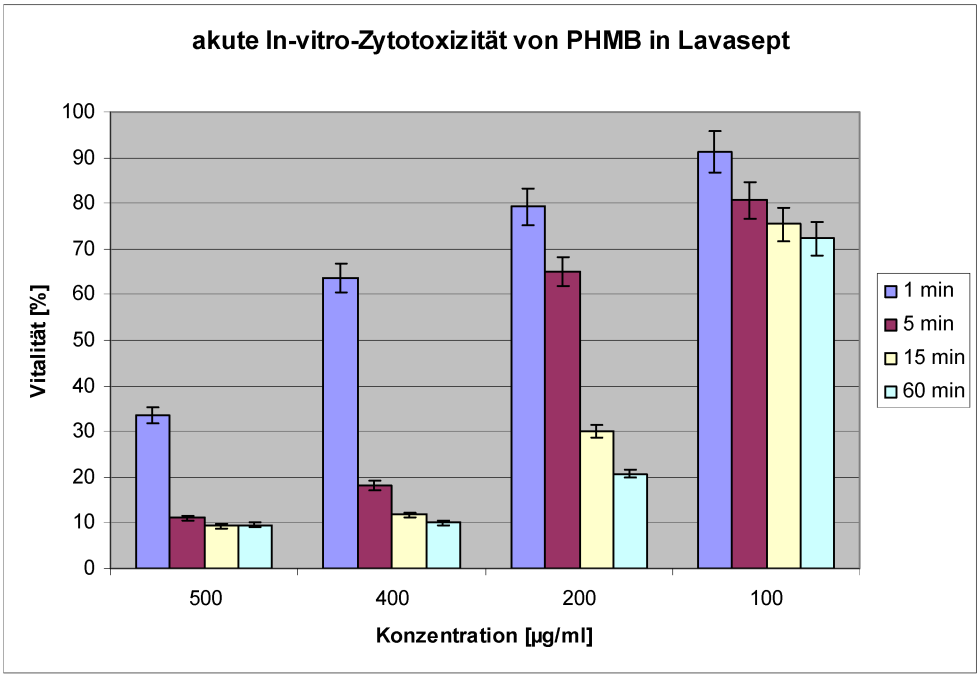


Abbildung 3: Vitalität der L929-Zellen [%] nach Kontakt mit 100-500 µg/ml PHMB (Lavasept®) über 1, 5, 15 und 60 min bei Anwesenheit von 10% FBS

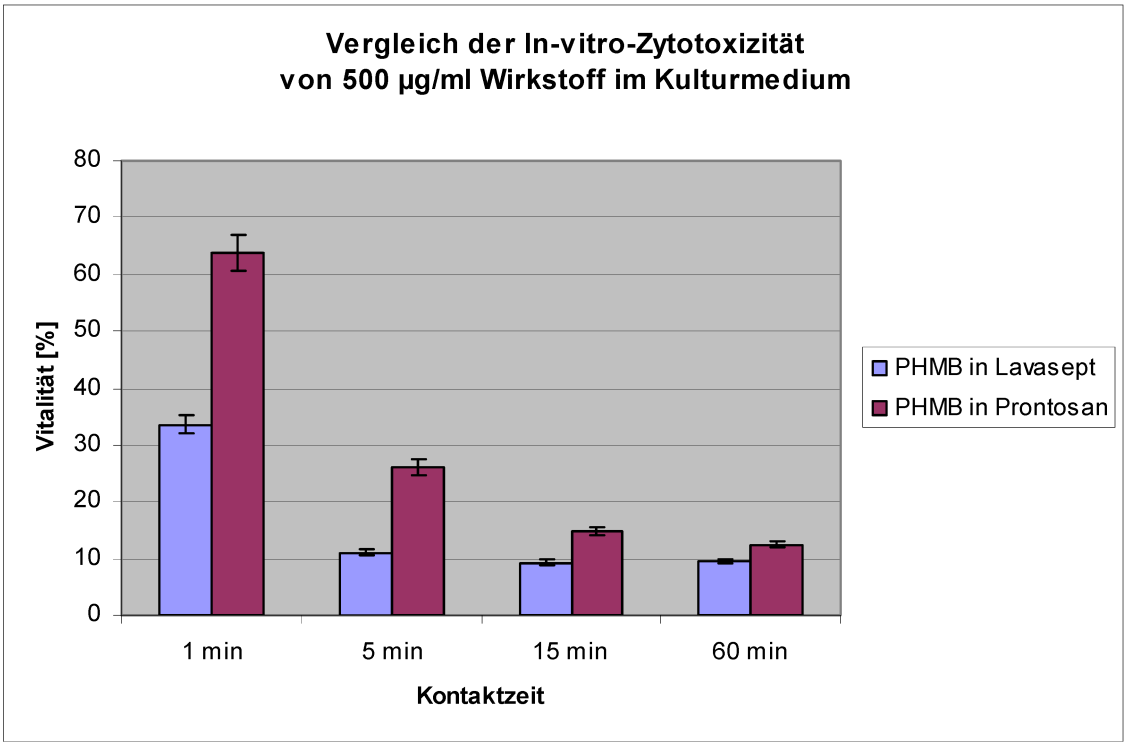


Abbildung 4: Vergleich der Vitalität der L929-Zellen [%] im In-vitro-Zytotoxizitätstest nach Kontakt mit 500 µg/ml Wirkstoff in den Prüfpräparaten Lavasept® und Prontosan®

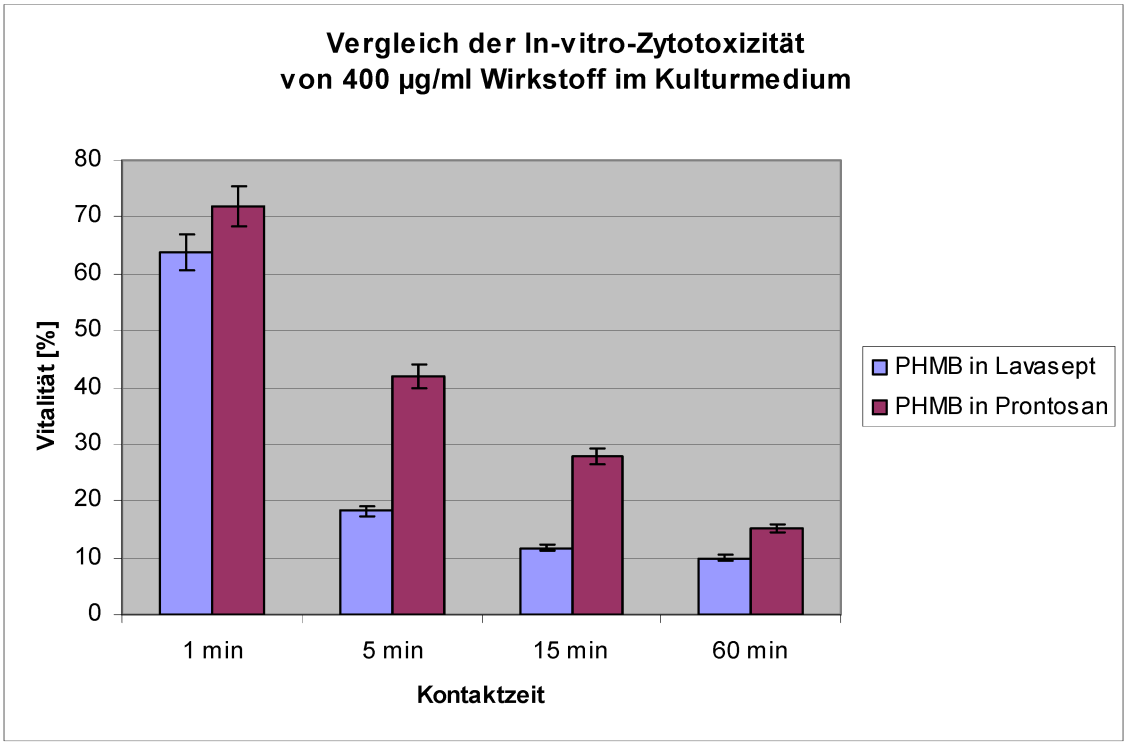


Abbildung 5: Vergleich der Vitalität der L929-Zellen [%] im In-vitro-Zytotoxizitätstest nach Kontakt mit 400 µg/ml Wirkstoff in den Prüfpräparaten Lavasept® und Prontosan®

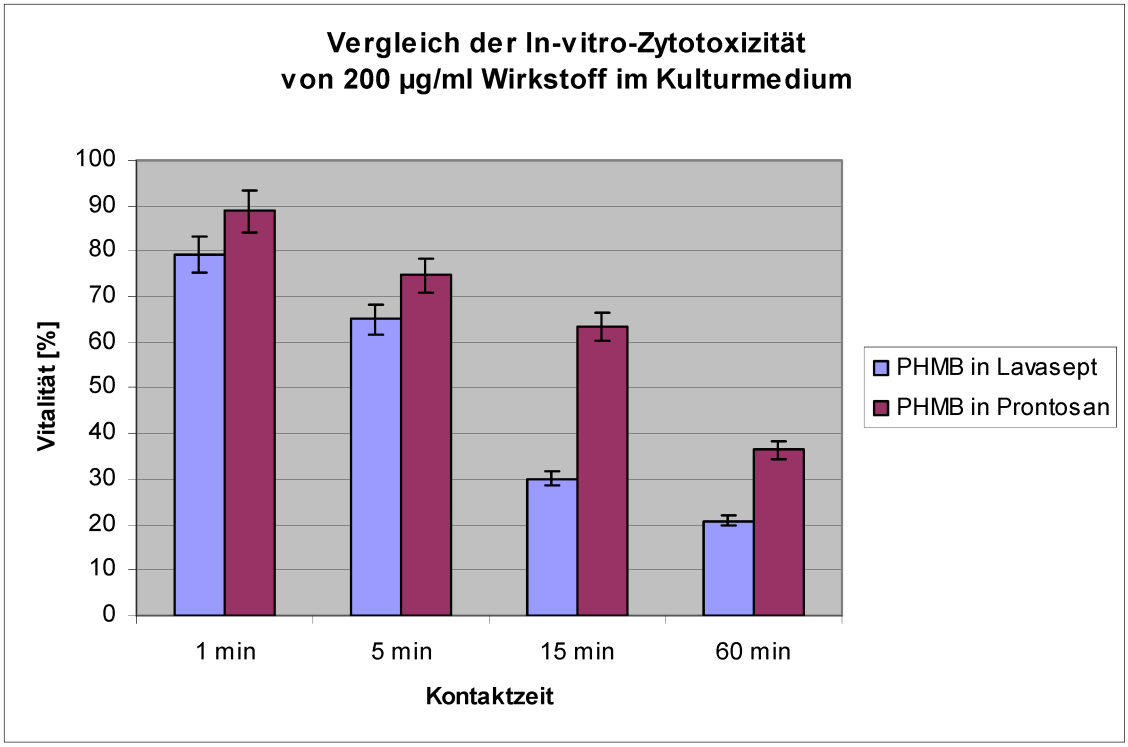


Abbildung 6: Vergleich der Vitalität der L929-Zellen [%] im In-vitro-Zytotoxizitätstest nach Kontakt mit 200 µg/ml Wirkstoff in den Prüfpräparaten Lavasept® und Prontosan®

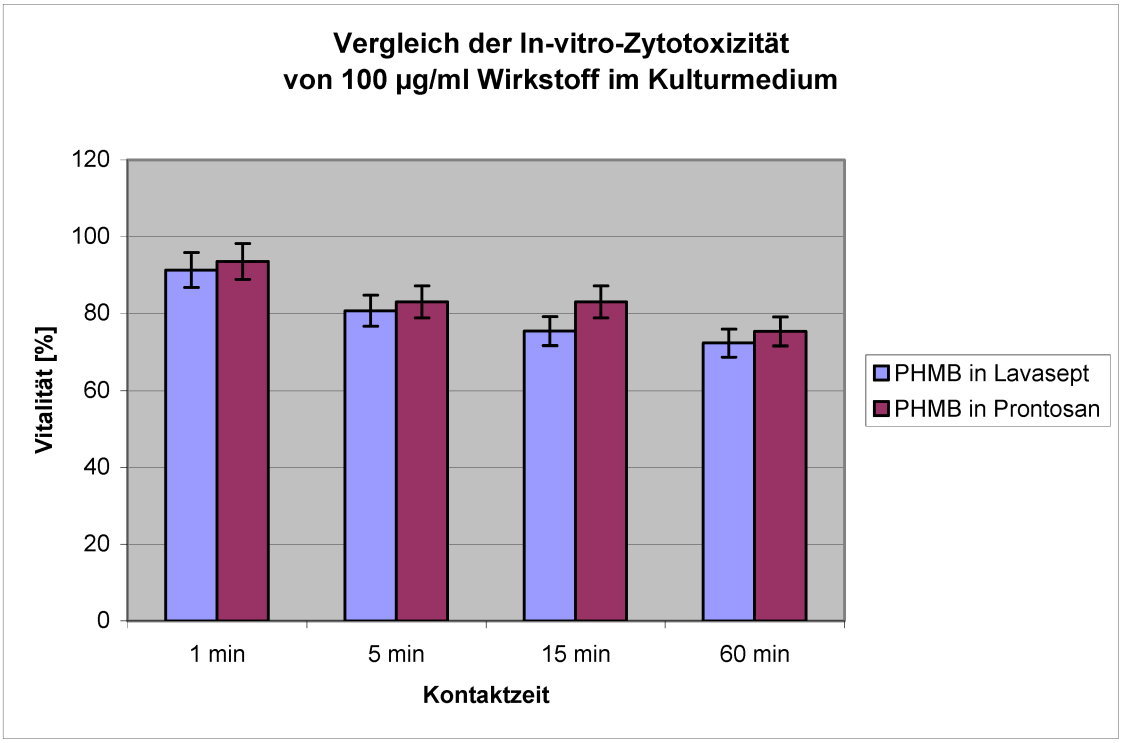


Abbildung 7: Vergleich der Vitalität der L929-Zellen [%] im In-vitro-Zytotoxizitätstest nach Kontakt mit 100 µg/ml Wirkstoff in den Prüfpräparaten Lavasept® und Prontosan®

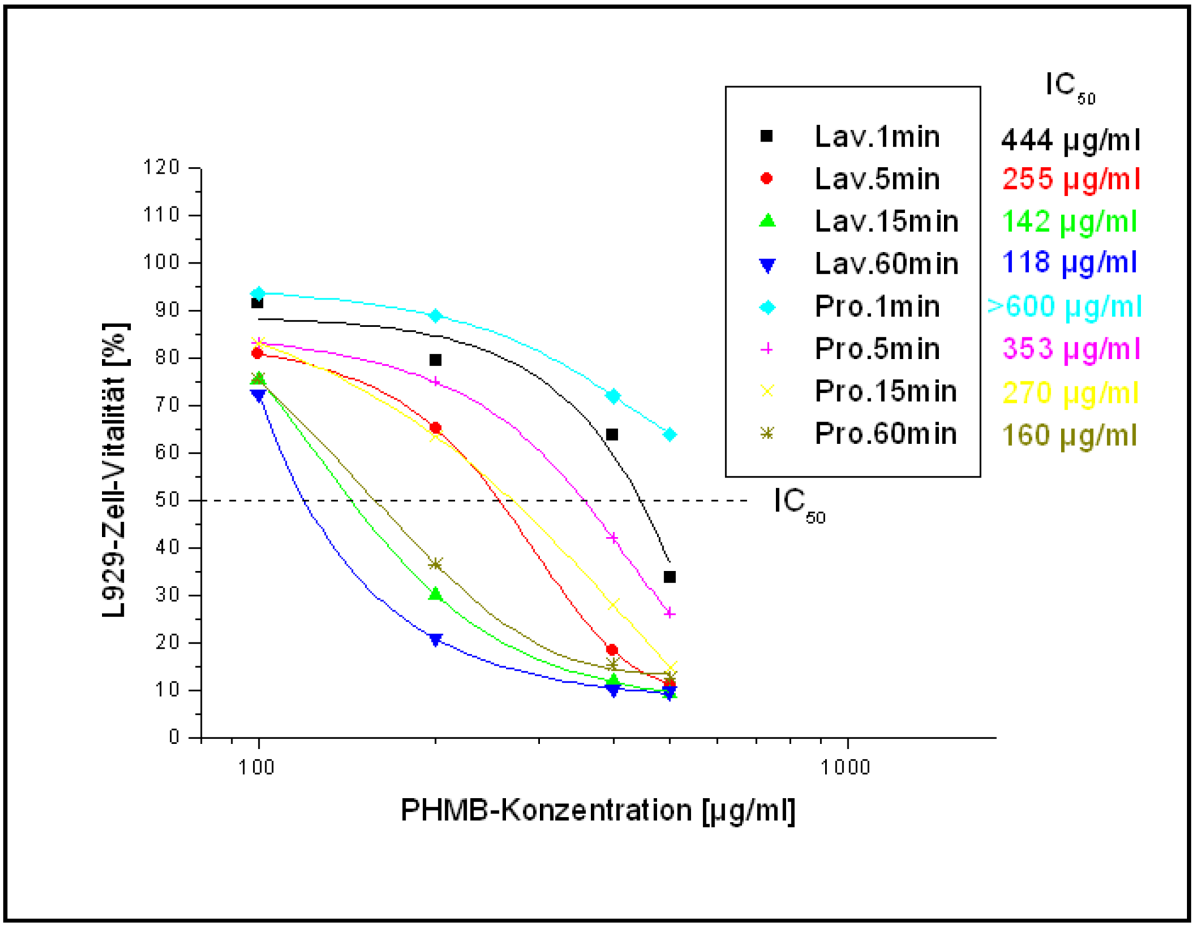


Abbildung 8: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der untersuchten Präparate Prontosan® (Pro) und Lavasept® (Lav) nach Einwirkzeiten von 1-60 min

Diskussion

Die Untersuchungen zeigen, dass bei vergleichsweise hohen Anwendungskonzentrationen von Polihexanid durch den Zusatz von Undecylenamidopropylbetain die Wirksamkeit im Vergleich zur Kombination mit Macrogolum gegenüber P. aeruginosa verstärkt wird, obwohl gleichzeitig die In-vitro-Zytotoxizität gegenüber Mäusefibroblasten geringer ist als für die Kombination von Polihexanid mit Macrogolum. Die In-vitro-Zytotoxizität wird durch den Betainzusatz in Abhängigkeit von der Konzentrations-Zeit-Relation um bis zu 50% abgeschwächt. Beim Vergleich der IC_{50} ergibt sich ein Abstand von etwa 28%. Bei niedrigeren Polihexanid Konzentrationen, 0,02 und 0,01%, und längerer Einwirkzeit, ab 15 min, zeichnet sich eine geringfügig bessere Wirksamkeit des Kombinationspräparates aus Polihexanid und Macrogolum ab. Bei starker Verdünnung, z. B. durch Wundsekret, könnte die Formulierung aus Polihexanid und Macrogolum ggf. über eine etwas größere Wirksamkeitsreserven verfügen. Zudem nähert sich die In-vitro-Zytotoxizität beider Formulierungen gegenüber Mäusefibroblasten mit abnehmender Polihexanid Konzentration an.

Als Ursache für die beobachteten Phänomene kommt eine Wechselwirkung der Inhaltsstoffe Polihexanid mit Macrogolum bzw. Undecylenamidopropylbetain infrage. Bei Undecylenamidopropylbetain handelt es sich um ein Derivat der Undecylensäure. Diese verändert Eiweißstrukturen in der Hornschicht der Haut und schädigt die Zellmembranen von Mikroorganismen. Von Undecylensäure ist bekannt, dass sie antifungielle Eigenschaften hat. Einer der durch Untersuchungen an Candida albicans nachgewiesenen Mechanismen hierfür ist, dass die Morphogenese der Hefe durch Hemmung der Umwandlung in die hyphale Form unterbunden wird. Als ein möglicher Mechanismus werden die Wechselwirkung mit der Biosynthese von Fettsäuren und eine Störung der Lipidsynthese diskutiert. Darüber hinaus verändern mittelkettige, ungesättigte Fettsäuren wie Undecylensäure den pH-Wert des Zytoplasmas durch den Transport von Protonen in die Zelle [5], [6]. Undecylenamidopropyl-betain ist ein amphoteres Tensid, d.h. es ist sowohl positiv als auch negativ geladen. Gemäß dem Produktblatt des Herstellers [2] kann Undecylenamidopropylbetain problemlos mit anionischen, nichtionischen und anderen amphoteren Tensiden kombiniert werden. Mit kationischen Substanzen kann es jedoch zu Wechselwirkungen kommen. So reduzieren quartäre Ammoniumverbindungen die antifungiellen Eigenschaften des Undecylenamido-propylbetain über Wechselwirkungen der Moleküle. Bei Polihexanid handelt es sich um eine kationische Substanz. Der Wirkstoff bindet an Phospholipidmembranen in der Bakterien-

zellwand, löst Permeabilitätsänderungen und Ladungsverschiebungen in der Zellmembran aus, hemmt membranständige Stoffwechselprozesse und bewirkt letztlich die Koagulation von Zellinhaltsstoffen. Damit werden die Bakterienzellen abgetötet [7], [8], [9], [10]. Die Substanzen Undecylenamidopropylbetain und Polihexanid binden und wirken somit beide an den gleichen Strukturen von Zellen, an den Zellmembranen. Werden beide Substanzen kombiniert eingesetzt, konkurrieren sie um die Bindungsstellen in der Zellmembran. Hierdurch würde sich die in unseren Versuchen festgestellte geringere Zytotoxizität einer Formulierung, die beide Substanzen enthält, erklären lassen. Der Zugang des Polihexanid zu einer in diesem Fall Eukaryontenzelle würde abgeschwächt werden. Die entgegen dieser Hypothese festgestellte Verbesserung der mikrobioziden Wirksamkeit im Kurzzeitbereich von 1–5 min Exposition könnte durch die tensidische Eigenschaft des Undecylenamidopropylbetains, das einen besseren Zugriff des Polihexanid auf den Erreger P. auruginosa, der zur Schleimbildung neigt, erzeugt werden. Die tensidische Eigenschaft würde nach dieser Hypothese in diesem Fall die Konkurrenz um die Bindungsstellen in der Zellmembran der Prokaryontenzelle überkompensieren. Bei S. aureus ist eine Wirkungsverstärkung durch Undecylenamidopropylbetain nicht erkennbar, was mit der unterschiedlichen Zellwandstruktur grampositiver und gramnegativer Bakterien zusammenhängen könnte. Ein Anhaltspunkt für die Hypothese von der Konkurrenz um Bindungstellen in Zellmembranen zeigt sich in der festgestellten Umkehr der beobachteten Effekte mit zunehmender Einwirkzeit und abnehmender Konzentration. Möglicherweise wird, wenn der Tensidvorteil des Undecylenamidopropylbetains aus der Formulierung „herausverdünnt“ wird, die Wechselwirkung an der geringfügig reduzierten Wirksamkeit der Kombination von Polihexanid mit Undecylenamidopropylbetain im Vergleich zur Kombination von Polihexanid mit Macrgolum sichtbar. Damit kann eine Kombination von Polihexanid mit Undecylenamidopropylbetain unter Zugrundelegung gleicher Wirkstoffkonzentrationen von Polihexanid als das gegenüber einer Kombination mit Macrogolum verträglichere Wundantiseptikum eingeschätzt werden, wobei der Unterschied mit höherer Wirkstoffkonzentration deutlicher wird.

Da Prontosan® zur Wundreinigung unverdünnt mit einer Polihexanidkonzentration von 0,1%, Lavasept® dagegen mit einer Polihexanidkonzentration von 0,04% bzw. bei längerer Anwendung von 0,02% eingesetzt wird, werden die Wirkungsanforderungen an ein Wundantiseptikum für die beiden Testorganismen S. aureus und P. aeruginosa durch Prontosan® bereits nach 1 min Einwirkungszeit erreicht, für Lavasept® dagegen erst nach 5 min.

Da Lavasept® maximal in der Anwendungskonzentration von 0,04% Polihexanid verwendet wird und für chronische Wunden die reduzierte Anwendungskonzentration von 0,02% empfohlen wird [4], die Anwendungskonzentration von Polihexanid im Prontosan® jedoch 0,1% beträgt, ist bezüglich der Anwendungslösungen Lavasept® gegenüber Prontosan® als weniger zytotoxisch und damit besser wundverträglich einzuschätzen. Zur experimentellen Abklärung dieser Vermutung sind weitere Untersuchungen angezeigt. Inwieweit dieser wahrscheinliche/vermutete Unterschied bei nur einmaliger Anwendung von Prontosan® zur Wundreinigung zum Tragen kommt, kann mit dieser Studie nicht beantwortet werden.

Prinzipiell scheint jedoch eine Optimierung von Polihexanid haltigen Wundpüllösungen durch besser aufeinander abgestimmte Konzentrationsverhältnisse von Polihexanid und Undecylenamidopropylbetain denkbar zu sein.

Literatur

1. Pharmazeutisches Laboratorium des "Neues Rezeptur-Formularium". Standardisierte Rezepturen (NRF/SR). Rezepturhinweise Polihexanid. Eschborn: Govi; 29.11.2006.
2. prEN13727. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika - Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der bakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel für Instrumente im humanmedizinischen Bereich; Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1). 2000.
3. Müller G, Kramer A. Comparative study of in vitro cytotoxicity of povidone-Iodine in solution, in ointment or in a liposomal formulation (Repithel) and selected antiseptics. Dermatology. 2006;212(suppl. 1):91-3.
4. Kramer A, Roth B. Polihexanid. In: Kramer A, Assadian O, Hrsg. Wallhäußers Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Antiseptik und Konservierung. Qualitätssicherung der Hygiene in medizinischen und industriellen Bereichen. Stuttgart: Thieme; im Druck.
5. REWOTERIC® AM B U 185. Goldschmidt GmbH.
6. McLain N, Ascanio R, Baker C, et al. Undecylenic acid inhibits morphogenesis of Candida albicans. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44:2873-5.
7. Steven S, Hofemyer JHS. Effects of ethanol, octanoic and decanoic acids on fermentation and the passive influx of protons through the plasma membrane of Saccharomyces cerevisiae. Appl Microbiol Biotechnol. 1993;38:356-63.
8. Ikeda T, Ledwith A, Bamford C, Hann RA. Interaction of a polymeric biguanide biocide with phospholipid membranes. Biochim Biophys Acta. 1984;769:57-66.
9. Ikeda T, Tazuke S, Bamford C, Ledwith A. Spectroscopic studies on the interaction of polymeric in-chain biguanide biocide with phospholipids membranes as probed by 8-anilinonaphthalene-1-sulfonate. Bull Chem Soc Jpn. 1985;58:705-9.
10. Davies A, Field BS. Action of biguanides, phenols and detergents on Escherichia coli and its spheroplasts. J Appl Bact. 1968;32:233-43.
11. DIN EN ISO 10993-5. Biologische Beurteilung von Medizinprodukten. Teil 5. Prüfungen auf Zytotoxizität: in vitro-Methoden. 1999.
12. Mitchinson C, Pain RH, Vinson JR, Walker T. The relative effectiveness of guanidinium and some biguanide salts as denaturants. Biochim Biophys Acta. 1983;743:31-6.

Korrespondenzadresse:
Prof. Dr. med. Axel Kramer
Institut für Hygiene und Umweltmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Walther-Rathenau-Str. 49 a, 17489 Greifswald, Deutschland, Tel.: +49-(0)3834-515542, Telefax: +49-(0)3834-515541
kramer@uni-greifswald.de

Bitte zitieren als
Müller G, Koburger T, Jethon FUW, Kramer A. Vergleich der bakterioziden Wirksamkeit und In-vitro-Zytotoxizität von Lavasept® und Prontosan®. GMS Krankenhaushyg Interdiszip. 2007;2(2):Doc42.

Artikel online frei zugänglich unter
http://www.egms.de/en/journals/dgkh/2007-2/dgkh000075.shtml

Copyright
©2007 Müller et al. Dieser Artikel ist ein Open Access-Artikel und steht unter den Creative Commons Lizenzbedingungen (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.de). Er darf vervielfältigt, verbreitet und öffentlich zugänglich gemacht werden, vorausgesetzt dass Autor und Quelle genannt werden.

J Antimicrob Chemother 2010; **65**: 1712–1719
doi:10.1093/jac/dkq212 Advance Access publication 15 June 2010

Journal of Antimicrobial Chemotherapy

Standardized comparison of antiseptic efficacy of triclosan, PVP–iodine, octenidine dihydrochloride, polyhexanide and chlorhexidine digluconate

T. Koburger[1], N.-O. Hübner[2]*, M. Braun[3], J. Siebert[3] and A. Kramer[2]

[1]*Hygiene-North GmbH, Walther-Rathenau-Str. 49a, 17489 Greifswald, Germany;* [2]*Institute of Hygiene and Environmental Medicine, University of Greifswald, Walther-Rathenau-Str. 49a, 17489 Greifswald, Germany;* [3]*Schülke & Mayr GmbH, RobertKoch Str. 2, 22851 Norderstedt, Germany*

*Corresponding author. Tel: +49-3834-515546; Fax: +49-3834-515541; E-mail: nhuebner@uni-greifswald.de

Received 1 February 2010; returned 11 March 2010; revised 10 May 2010; accepted 11 May 2010

Background: This study presents a comparative investigation of the antimicrobial efficacy of the antiseptics PVP–iodine, triclosan, chlorhexidine, octenidine and polyhexanide used for pre-surgical antisepsis and antiseptic treatment of skin, wounds and mucous membranes based on internationally accepted standards.

Methods: MICs and MBCs were determined in accordance with DIN 58940-7 and 58940-8 using *Staphylococcus aureus* (including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), *Enterococcus faecalis* (including vancomycin-resistant *Enterococcus*), *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens*, *Haemophilus influenzae* and *Candida albicans*. The microbicidal efficacy was determined in accordance with DIN EN 1040 and 1275 using *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans*.

Results: For chlorhexidine, octenidine and polyhexanide, MIC_{48} and MBC_{24} ranged from 16 to 32 mg/L. Maximum values for triclosan ranged from 256 to 512 mg/L, with an efficacy gap against *P. aeruginosa*, while the maximum values of PVP–iodine were 1024 mg/L, with a gap against *S. pneumoniae*. Comparing the minimal effective concentrations, octenidine was most effective. After 1 min, only octenidine and PVP–iodine fulfil the requirements for antiseptics.

Conclusions: Tests under standardized and harmonized conditions help to choose the most efficacious agent. When a prolonged contact time is feasible, ranking of agents would be polyhexanide = octenidine > chlorhexidine > triclosan > PVP–iodine. This is consistent with the recommendations for antisepsis of acute wounds. Polyhexanide seems to be preferable for chronic wounds due to its higher tolerability. If an immediate effect is required, ranking would be octenidine = PVP–iodine ≫ polyhexanide > chlorhexidine > triclosan.

Keywords: wounds, antisepsis, disinfection, skin, mucous membranes, EN 1040, EN 1275, DIN 58940, MIC, MBC, microbistatic, microbicidal

Introduction

Antiseptic agents such as triclosan [5-chlorine-2-(2,4-dichlorphenoxy)-phenol], PVP–iodine [poly(vinylpyrrolidone)–iodine complex], octenidine dihydrochloride (octenidine), polyhexanide (polyhexamethylene biguanide) and chlorhexidine digluconate (chlorhexidine) are widely used for the prevention and therapy of bacterial infections, especially for antisepsis of mucous membranes and wounds.[1–10] Numerous studies have been published concerning the antimicrobial properties of these agents.[11–24] However, there are no systematic investigations comparing these antiseptics against each other using standardized and harmonized test procedures. Furthermore, many of these studies have been performed using commercial products, such as disinfectants and hand scrubs, which contain the active ingredients in different concentrations, making it difficult to compare the antiseptic properties of the active substance itself and to decide which is the antiseptic of choice for specific indications.

In order to provide reliable and reproducible information on the MIC/minimal microbicidal concentration (MBC) (microdilution test; DIN 58940) as well as the microbicidal efficacy (quantitative suspension tests; EN 1040, EN 1275) of triclosan, PVP–iodine, octenidine, polyhexanide and chlorhexidine, a comparative study under standardized conditions based on the DIN EN standards[25–28] was performed.

© *The Author 2010. Published by Oxford University Press on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oxfordjournals.org*

Materials and methods

Test preparations and neutralization

Octenidine (Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Germany), polyhexanide (Fagron GmbH & Co. KG, Hamburg, Germany), PVP–iodine and chlorhexidine digluconate (Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Germany) were diluted in water of standardized hardness (WSH; according to DIN EN 1040[25]) to the final test concentrations. Triclosan (Fluka/Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Buchs, Switzerland) was only poorly soluble in water, so a stock solution of 50% triclosan in 80% dimethylsulphoxide (DMSO) was prepared and diluted in several steps to yield a final concentration of 1% triclosan in 40% DMSO/WSH. All further dilutions were prepared with 40% DMSO/WSH. The suitability as solvent of 40% DMSO/WSH regarding inefficacy was demonstrated using the quantitative suspension test as well as in the microdilution test. After a contact time of 24 h, no microbicidal or microbistatic effect was observed against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* or *Candida albicans*.

As neutralizing agents, the following solutions were used in accordance with DIN EN 1040 and 1275:[25,26] 3.0% polysorbate 80 + 3.0% saponin + 0.1% L-histidine + 0.1% cysteine for neutralizing octenidine, chlorhexidine and polyhexanide; 3.0% polysorbate 80 + 0.3% lecithin + 0.3% L-histidine + 0.5% sodium thiosulphate for neutralizing PVP–iodine; and 8.0% polysorbate 80 + 2.0% SDS + 0.8% lecithin + 1.0% sodium thiosulphate + 6.0% saponin (double-concentrated) for neutralizing triclosan.

To determine the MICs and the MBCs as the first step of the investigation, all substances were prepared in concentrations in the range 1024–0.00390625 mg/L. The concentration ranges used in the quantitative suspension tests are summarized in Table 1.

Test organisms and nutrient solutions

In the microdilution method, the test organisms *S. aureus* (ATCC 6538), *P. aeruginosa* (ATCC 15442), *C. albicans* (ATCC 10231), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619), *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Clostridium perfringens* (ATCC 13124), *Haemophilus influenzae* (ATCC 49247), a methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA; North German epidemic strain, clinical isolate, Institute for Hygiene and Environmental Medicine, University Greifswald) and a vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE; clinical isolate, Institute for Hygiene and Environmental Medicine, University Greifswald) were used. Except for *H. influenzae* and *C. perfringens*, bacteria were cultivated on blood agar and Mueller–Hinton broth (MHB). *H. influenzae* was grown in MHB, supplemented with 2% lysed horse blood, 5 mg/L NAD and 5 mg/mL yeast extract. *C. perfringens* was cultivated in heart–brain–glucose bouillon or the respective solid medium. *C. albicans* was cultivated on Sabouraud agar and in 'high-resolution' (HR) medium.

In the quantitative suspension tests, the test organisms *S. aureus* (ATCC 6538), *P. aeruginosa* (ATCC 15442) and *C. albicans* (ATCC 10231) were used. The bacteria were cultivated on casein peptone soybean agar (CSA). *C. albicans* was cultivated on malt extract agar (MEA).

Microdilution test

To determine MICs and MBCs, DIN 58940-7[27] and 58940-8[28] and the corresponding supplementary sheets were strictly followed. Briefly, the test organisms were cultivated on agar at 36°C for 18 h; thereafter, one colony was transferred into 1 mL of Mueller–Hinton bouillon and diluted to reach 10^5 cfu/mL. Tests were performed using 96-well microtitre plates. Each well was filled with 100 μL of defined antiseptic dilution and 100 μL of test organism suspension.

After 24 h, the turbidity was evaluated as the indicator for bacterial growth. For determination of the MBC, samples in the range around the threshold for turbidity after 24 h were transferred onto blood agar as described in the standard[28] and evaluated for growth after 24 h.

Table 1. Concentration ranges of the test preparations used in the quantitative suspension tests according to DIN EN 1040 and 1275[25,26]

Antiseptic agent	PVP–iodine	Chlorhexidine	Octenidine	Polyhexanide	Triclosan
Concentration range (mg/L)	500–31.25	4000–5	250–1	5000–1	50000–10

Table 2. Results of MIC and MBC determination according to DIN 58940-7 and 58940-8[27,28]

	MIC and MBC (mg/L)														
	octenidine			PVP–iodine			polyhexanide			chlorhexidine			triclosan		
Test organism	MIC_{24}	MIC_{48}	MBC_{24}	MIC_{24}	MIC_{48}	MBC_{24}	MIC_{24}	MIC_{48}	MBC_{24}	MIC_{24}	MIC_{48}	MBC_{24}	MIC_{24}	MIC_{48}	MBC_{24}
S. aureus	2	2	2	512	8	8	0.5	1	1	8	8	8	0.125	0.125	1
E. faecalis	4	4	1	≥1024	1024	1024	2	16	16	16	16	16	16	16	16
S. pneumoniae	8	32	32	>1024	>1024	>1024	1	2	2	4	4	4	8	8	8
E. coli	2	2	8	1024	1024	1024	0.5	1	1	8	16	16	2	4	4
P. aeruginosa	2	8	8	1024	1024	1024	2	2	2	32	32	32	>512	>512	>512
C. perfringens	1	1	1	1024	1024	1024	2	2	2	32	32	32	256	256	512
H. influenzae	1	1	1	512	512	512	2	2	1	8	8	8	32	0.125	0.125
C. albicans	1	1	1	256	256	1024	1	1	4	4	ND	8	8	32	128
MRSA	1	1	2	256	256	1024	0.5	0.5	1	2	2	2	64	64	64
VRE	4	4	4	1024	1024	1024	4	8	32	16	32	32	128	128	128
Maximum value	8	32	32	>1024	>1024	>1024	4	16	32	32	32	32	>512	>512	>512

ND, not determined.

Quantitative suspension test

Bactericidal and fungicidal efficacy was determined without organic load, strictly following DIN EN 1040[25] and DIN EN 1275.[26] Briefly, 1 mL of the test organism suspension and 1 mL of WSH were mixed and incubated for 2 min. Afterwards, 8 mL of the respective test substance was added. The resulting solutions were incubated for 1, 5, 10, 60, 360 or 1440 min. At the end of the contact time, 1 mL of the test solution was transferred to 8 mL of the respective neutralizing solution and 1 mL of WSH and neutralized for 5 min. Thereafter, 1 mL of the neutralized test solution was spread onto two nutrient agar plates. After incubation for 24 h (bacteria) or 48 h (yeast), the colonies were counted and the number of recoverable colonies (N_a) in the test solution was calculated. The reduction factor (RF) was determined as the difference between the log number of cells in the test solution at the beginning of the contact time (N_0) and the log of N_a.

In addition to DIN EN, water controls using 8 mL of WSH instead of test preparation were performed simultaneously in the first test run to

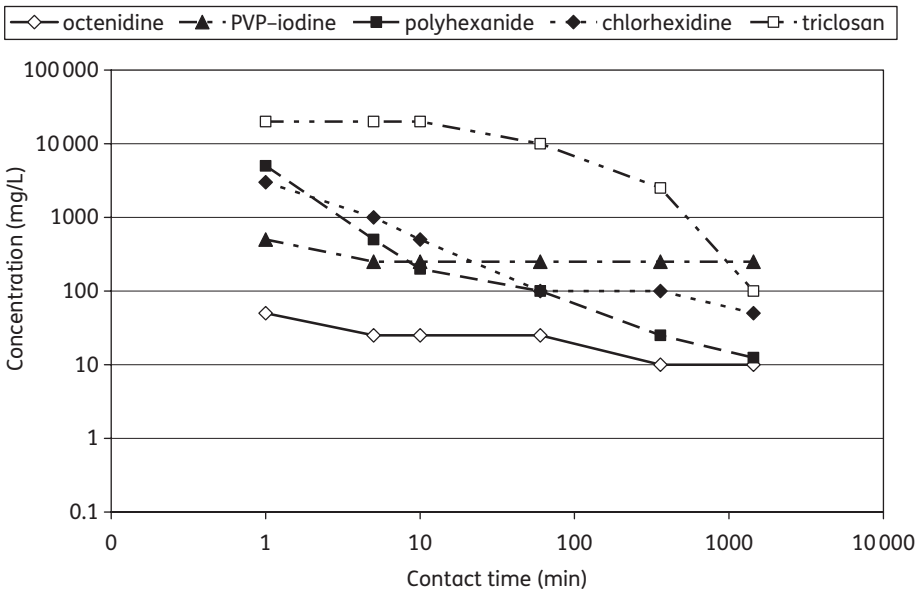


Figure 1. Concentration–time curves for the concentrations of the antiseptic agents to achieve the minimum required reduction of the most resistant test organism at each contact time. Data points represent the concentrations achieving a log reduction of ≥4.8 or ≥3.8 for the test bacteria (*P. aeruginosa* and *S. aureus*) and *C. albicans*, respectively, in at least three experiments.

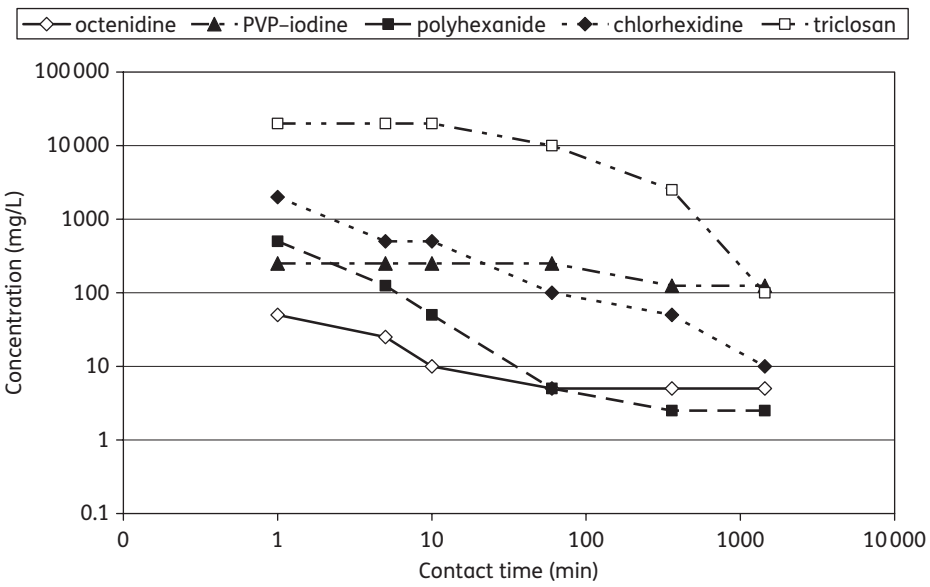


Figure 2. Concentration–time curves for the antiseptic agents to achieve an RF of ≥4.8 with *P. aeruginosa*. Data points represent the concentrations achieving a log reduction of ≥4.8 for *P. aeruginosa* in at least three experiments.

exclude any bactericidal effects of WSH. In the water controls, no essential difference was observed compared with the N_0 values.

Results

MICs and MBCs

The maximum value of the antiseptic agent describes the concentration required for inhibition or killing of the individually most resistant test organism. For chlorhexidine, octenidine and polyhexanide, comparable concentrations of 16–32 mg/L were determined for the MIC_{48} and MBC_{24}. The MIC_{24} of chlorhexidine (32 mg/L) was at the same level, while those of octenidine (8 mg/L) and polyhexanide (4 mg/L) were lower. For triclosan, the maximum values ranged from 256 to 512 mg/L with a distinct efficacy gap against *P. aeruginosa*, while the maximum values of PVP–iodine were 1024 mg/L with an efficacy gap against *S. pneumoniae* (Table 2).

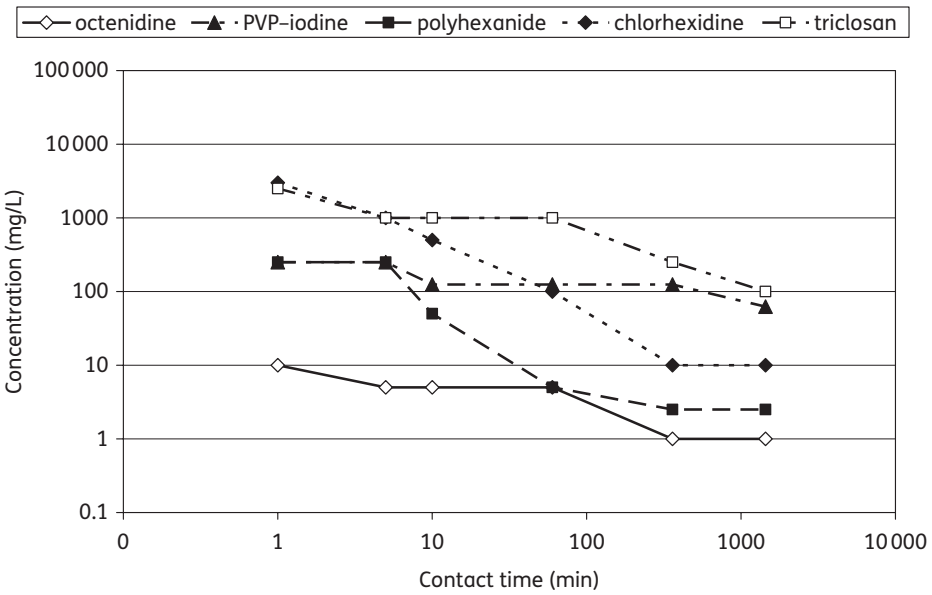


Figure 3. Concentration–time curves for the antiseptic agents to achieve an RF of ≥4.8 with *S. aureus*. Data points represent the concentrations achieving a log reduction of ≥4.8 for *S. aureus* in at least three experiments.

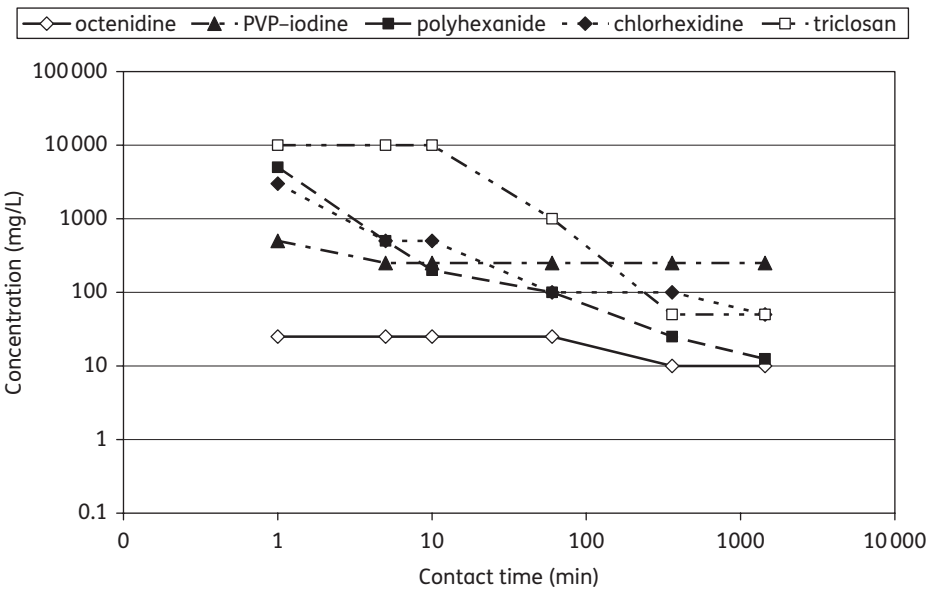


Figure 4. Concentration–time curves for the antiseptic agents to achieve an RF of ≥3.8 with *C. albicans*. Data points represent the concentrations achieving a log reduction of ≥3.8 for *C. albicans* in at least three experiments.

Table 3. Results according to DIN EN 1040[25] and 1275:[26] concentrations that resulted in an average log reduction of ≥3.8 (*C. albicans*) or ≥4.8 (*S. aureus* and *P. aeruginosa*) with the individual contact times; the highest concentration necessary is underlined for the respective test organism and then summarized in bold for each contact time

		Concentration (mg/L) to achieve a log reduction of ≥3.8 or ≥4.8 (mean reduction in ≥3 experiments/SD)				
Test organism	Contact time	octenidine	PVP–iodine	polyhexanide	chlorhexidine	triclosan
C. albicans	1 min	25 (4.03 log/SD=0.48)	500 (4.16 log/SD=0.20)	5000 (4.07 log/SD=0.22)	5000 (3.82 log/SD=0.25)	10000 (4.03 log/SD=0.45)
P. aeruginosa		50 (4.96 log/SD=0.42)	250 (5.17 log/SD=0.24)	500 (5.29 log/SD=0.12)	5000 (4.94 log/SD=0.37)	20000 (5.20 log/SD=0.16)
S. aureus		10 (5.38 log/SD=0.12)	250 (5.06 log/SD=0.23)	250 (5.27 log/SD=0.07)	2000 (5.30 log/SD=0.15)	2500 (5.19 log/SD=0.10)
Max. required concentration in mg/L for this contact time		**50**	**500**	**5000**	**5000**	**20000**
C. albicans	5 min	25 (3.89 log/SD=0.25)	250 (4.21 log/SD=0.21)	500 (4.13 log/SD=0.21)	500 (4.07 log/SD=0.29)	10000 (4.42 log/SD=0.09)
P. aeruginosa		25 (5.23 log/SD=0.11)	250 (5.18 log/SD=0.05)	125 (5.32 log/SD=0.12)	500 (5.09 log/SD=0.20)	20000 (5.20 log/SD=0.16)
S. aureus		5 (5.15 log/SD=0.35)	250 (5.37 log/SD=0.07)	250 (5.23 log/SD=0.06)	1000 (5.11 log/SD=0.19)	1000 (5.24 log/SD=0.04)
Max. required concentration in mg/L for this contact time		**25**	**250**	**500**	**1000**	**20000**
C. albicans	10 min	25 (4.30 log/SD=0.25)	250 (4.26 log/SD=0.12)	200 (4.16 log/SD=0.13)	500 (4.29 log/SD=0.14)	10000 (4.42 log/SD=0.09)
P. aeruginosa		10 (5.21 log/SD=0.21)	250 (5.18 log/SD=0.05)	50 (5.34 log/SD=0.03)	500 (5.29 log/SD=0.16)	20000 (5.28 log/SD=0.13)
S. aureus		5 (5.32 log/SD=0.08)	125 (5.07 log/SD=0.29)	50 (5.27 log/SD=0.07)	500 (5.06 log/SD=0.23)	1000 (5.22 log/SD=0.11)
Max. required concentration in mg/L for this contact time		**25**	**250**	**200**	**500**	**20000**
C. albicans	60 min	25 (4.30 log/SD=0.25)	250 (4.39 log/SD=0.09)	100 (4.20 log/SD=0.02)	100 (4.10 log/SD=0.09)	1000 (4.16 log/SD=0.61)
P. aeruginosa		5 (5.82 log/SD=0.25)	250 (5.18 log/SD=0.05)	5 (5.28 log/SD=0.12)	100 (5.29 log/SD=0.16)	10000 (5.16 log/SD=0.02)
S. aureus		5 (5.82 log/SD=0.25)	125 (5.13 log/SD=0.13)	5 (5.23 log/SD=0.06)	100 (4.87 log/SD=0.07)	1000 (5.07 log/SD=0.45)
Max. required concentration in mg/L for this contact time		**25**	**250**	**100**	**100**	**10000**
C. albicans	360 min	10 (4.82 log/SD=0.25)	250 (4.31 log/SD=0.19)	25 (4.03 log/SD=0.40)	100 (4.16 log/SD=0.13)	50 (4.19 log/SD=0.13)
P. aeruginosa		5 (5.23 log/SD=0.11)	125 (5.23 log/SD=0.13)	2.5 (5.14 log/SD=0.24)	50 (5.19 log/SD=0.02)	2500 (5.11 log/SD=0.30)
S. aureus		1 (5.832 log/SD=0.08)	125 (5.23 log/SD=0.10)	2.5 (5.14 log/SD=0.11)	10 (5.17 log/SD=0.12)	250 (5.03 log/SD=0.25)
Max. required concentration in mg/L for this contact time		**10**	**250**	**25**	**100**	**2500**
C. albicans	1440 min	10 (4.32 log/SD=0.03)	250 (4.08 log/SD=0.15)	12.5 (4.26 log/SD=0.08)	50 (4.25 log/SD=0.17)	50 (4.36 log/SD=0.39)
P. aeruginosa		5 (5.23 log/SD=0.11)	125 (4.79 log/SD=0.16)	2.5 (5.27 log/SD=0.22)	10 (5.03 log/SD=0.55)	100 (5.11 log/SD=0.06)
S. aureus		1 (5.32 log/SD=0.11)	62.5 (4.96 log/SD=0.52)	2.5 (5.08 log/SD=0.15)	10 (5.13 log/SD=0.23)	100 (4.94 log/SD=0.31)
Max. required concentration in mg/L for this contact time		**10**	**250**	**12.5**	**50**	**100**

Bactericidal and fungicidal efficacy

In DIN EN, the concentration of an antiseptic agent is considered adequately bactericidal or fungicidal if a reduction in the quantitative suspension test of at least 5 (bactericidal) or 4 (fungicidal) log steps is achieved.[25,26] In this study, bactericidal or fungicidal efficacy was accepted for a tested concentration if three independent tests resulted in a mean reduction of ≥4.8 or ≥3.8 log steps, respectively. In addition to those fixed lower limits, the upper limits are set to 5.55 log or 4.55 log for EN 1040 or EN 1275, respectively—according to those EN standards, greater numbers are not to be stated explicitly. The variation of the data used for claiming sufficient efficacy for a given biocide concentration is therefore confined to a range of 4.8–5.55 log (EN 1040) or 3.8–4.55 log (EN 1275), for all data points and given concentrations.

Comparing the minimal concentrations for the reduction of the individually most resistant test organism, octenidine was the most effective substance at all contact times (Figure 1). Compared with polyhexanide, chlorhexidine and triclosan, the minimal concentrations for PVP–iodine and octenidine were almost constant over the entire time range of 1–1440 min (PVP–iodine, 500–250 mg/L; and octenidine, 50–10 mg/L) (Figures 1–4). For PVP–iodine, the minimal concentrations were ∼10 times higher than those of octenidine (Table 3). The microbicidal efficacy of polyhexanide, chlorhexidine and triclosan showed a clear time dependency, with an up to 400-fold difference in the effective concentration between the shortest and the longest contact time (Table 3). Furthermore, at a contact time of 1 min, the effective concentrations of polyhexanide (5000 mg/L) and chlorhexidine (2000 mg/L) were ∼40–100 times higher than those of octenidine. With a contact time of 10 min, both agents achieved the efficacy of PVP–iodine (Figure 1). Polyhexanide even achieved the efficacy of octenidine at contact times >60 min. Triclosan was the agent with the highest minimal concentration for achieving adequate antimicrobial efficacy, with a distinct efficacy gap against *P. aeruginosa* as already seen in the MIC and MBC tests (Figure 2 and Table 2). The effective concentrations ranged from 20000 mg/L at 1–10 min contact time and >2500 mg/L at 360 min, to 100 mg/L at a contact time of 1440 min (24 h) (Table 3). However, for *S. aureus* and *C. albicans*, the efficacy of triclosan followed a time dependency more comparable to that of polyhexanide and chlorhexidine, but at higher concentrations (Figures 3 and 4).

Comparison of MIC/MBC values and RFs for bactericidal and fungicidal efficacy

For octenidine, polyhexanide and chlorhexidine, slightly higher concentrations were determined in the quantitative suspension tests compared with the microdilution test, whereas for PVP–iodine and triclosan the MIC and MBC values were slightly higher (Table 4).

Discussion

The antimicrobial properties of the antiseptic agents triclosan, PVP–iodine, chlorhexidine, polyhexanide and octenidine, their MICs and MBCs in the microdilution method, as well as bactericidal and fungicidal effects in the quantitative suspension test, were compared in a systematic approach based on European standards that are internationally accepted.

With regard to MIC and MBC, octenidine and polyhexanide were shown to be the most effective agents with equally low maximum values for all timepoints, followed by chlorhexidine, which only failed to reach their efficacy for the MIC after 24 h. The maximum values for triclosan were ∼10 times higher. Against *P. aeruginosa* an efficacy gap was observed, as no effective concentration could be determined. For PVP–iodine, the maximum values were up to 250 times higher than for polyhexanide and octenidine. An efficacy gap was observed against *S. pneumoniae*.

For *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans*, MIC/MBC data may be compared with the results from the quantitative suspension test after a contact time of 24 h. Triclosan and PVP–iodine seemed to be 4–5 times less active in the microdilution test. This may be explained by differences in the methodology, as the microdilution test was performed in a nutrient solution, which already represents a high organic challenge. For PVP–iodine, a distinct decrease in its antimicrobial activity in the presence of organic matter (e.g. blood or sputum) is well known,[1,3] and Haraszthy *et al.*[29] reported an increase in the MIC of triclosan when defibrinated blood or horse serum was added. In contrast, no such difference was observed for octenidine or chlorhexidine. Only polyhexanide was found to be more effective in the microdilution test than in the quantitative suspension test. This may be explained by a more effective neutralization of this substance in the quantitative suspension test. For

Table 4. Comparison of concentrations required for MIC, MBC and RFs ≥4.8 log or ≥3.8 log in the quantitative suspension test after 24 h of exposure

	Effective concentrations for MIC, MBC and RF (mg/L)														
	octenidine			PVP–iodine			polyhexanide			chlorhexidine			triclosan		
Test organism	MIC	MBC	RF	MIC	MBC	RF	MIC	MBC	RF	MIC	MBC	RF	MIC	MBC	RF
S. aureus	2	2	1	512	8	62.5	0.5	1	2.5	8	8	10	0.125	1	100
P. aeruginosa	2	8	5	1024	1024	125	2	2	2.5	32	32	10	>512	>512	100
C. albicans	1	1	10	256	1024	250	1	4	12.5	4	8	50	8	128	50
Maximum value	2	8	10	1024	1024	250	2	4	12.5	32	32	50	>512	>512	100

the microdilution test, the use of a neutralizing agent is not specified, as it was established for testing antibiotics for which neutralization need not be performed.

Nevertheless, even under these circumstances, the MIC and MBC values of triclosan and PVP–iodine correlated well with the results of the quantitative tests, insofar as all were higher than those of the more effective antiseptic agents octenidine, polyhexanide and chlorhexidine.

As antiseptics are often used for the antisepsis of skin and mucous membranes before invasive procedures, their short-term efficacy is of great importance. In the quantitative suspension test at a contact time of 1 min, both octenidine and PVP–iodine fulfil the requirements defined for antiseptics at a concentration that is already quite similar to the concentrations required at the longer contact times; however, the effective concentration of PVP–iodine was ∼10 times higher than that of octenidine at that contact time. In contrast, the antimicrobial activity of polyhexanide and chlorhexidine noticeably increased over time. While their effective concentrations after 1 min were ∼40–100 times higher than that of octenidine, they achieved the level of PVP–iodine after a contact time of 10 min. After 6 h, polyhexanide even reached the efficacy level of octenidine. Concentration-wise, triclosan was demonstrated to be the least effective agent, especially against *P. aeruginosa*. Only at a contact time of 24 h were concentrations that corresponded to those of PVP–iodine sufficient for the intended reduction of the three test organisms.

Nevertheless, the present tests were performed without defined interfering substances, e.g. protein load, and therefore do not completely represent clinical conditions. As could already be seen for PVP–iodine and triclosan, protein load may have a noticeable influence on the results of such investigations. Currently, further investigations under 'dirty conditions' are being conducted to provide additional insight into the influence of protein load on the antimicrobial efficacy of antiseptic agents.

Conclusions

This investigation of antiseptic efficacy under standardized and harmonized conditions allows the user to choose the most efficacious agent. For indications such as wound antisepsis and treatment of mucosal infections, where a prolonged contact time for antiseptic treatment is feasible, the following ranking for the investigated antiseptic agents regarding their effective microbistatic and microbicidal concentration was set: polyhexanide = octenidine > chlorhexidine > triclosan > PVP–iodine. With regard to the tissue compatibility of octenidine and polyhexanide, this ranking is consistent with the recommendations for antisepsis of acute wounds,[5] whereas for chronic wounds polyhexanide seems to be preferable because of its higher tolerability.[30,31] In contrast, for indications requiring a quick onset of antimicrobial activity, for instance, before invasive procedures, the agents of choice are PVP–iodine and octenidine followed by polyhexanide, chlorhexidine and triclosan. The influence of interfering substances on the biocides' efficacy is currently under standardized investigation as well. However, it has also to be noted that the decision for or against a particular antiseptic product cannot be based solely on concentration-based data only—additional factors, such as residual activity, cytotoxicity and systemic risks, need to be taken into account equally. But as those factors will be concentration dependent as well, the data presented herein will further the more judicious use of antiseptics with regard to concentration–contact time relationship, side effects or the speed of onset of antimicrobial activity at a given concentration.

Funding

This research was conducted with the financial support of Schülke & Mayr GmbH (Norderstedt, Germany).

Transparency declarations

M. B. and J. S. are employees of Schülke & Mayr GmbH (Norderstedt, Germany). The antiseptic compound octenidine is used in some of the company's products. M. B. and J. S. do not own stocks or options in Schülke & Mayr GmbH. Other authors: none to declare.

References

1 Durani P, Leaper D. Povidone-iodine: use in hand disinfection, skin preparation and antiseptic irrigation. *Int Wound J* 2008; **5**: 376–87.

2 Daeschlein G, Assadian O, Koch S *et al*. Feasibility and clinical applicability of polihexanide for treatment of second-degree burn wounds. *Skin Pharmacol Physiol* 2007; **20**: 292–6.

3 Jackson MM. Topical antiseptics in healthcare. *Clin Lab Sci* 2005; **18**: 160–9.

4 Kramer A, Kampf G. Epidemiologic background of hand hygiene and evaluation of the most important agents for scrubs and rubs. *Clin Microbiol Rev* 2004; **17**: 863–93.

5 Mulder GD, Cavorsi JP, Lee DK. Polyhexamethylene biguanide (PHMB): an addendum to current topical antimicrobials. *Wounds* 2007; **19**: 173–82.

6 Dogan AA, Cetin ES, Adiloglu AK *et al*. Microbiological evaluation of octenidine dihydrochloride mouth rinse after 5 days' use in orthodontic patients. *Angle Orthod* 2009; **79**: 766–72.

7 Puig Silla M, Montiel Company JM, Almerich Silla JM. Use of chlorhexidine varnishes in preventing and treating periodontal disease: a review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008; **13**: E257–60.

8 Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J* 2009; **42**: 288–302.

9 Sopata M, Ciupinska M, Tomaszewska E *et al*. Effect of Octenisept antiseptic on bioburden of neoplastic ulcers in patients with advanced cancer. *J Wound Care* 2008; **17**: 24–7.

10 Novakov Mikic A, Budakov D. Comparison of local metronidazole and a local antiseptic in the treatment of bacterial vaginosis. *Arch Gynecol Obstet* 2009; doi:10.1007/s00404-009-1241-7.

11 Müller G, Kramer A. Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. *J Antimicrob Chemother* 2008; **61**: 1281–7.

12 Koburger T, Müller G, Kramer A *et al*. Microbicidal activity of polyhexanide. *GMS Krankenhaushyg Interdiszipl* 2007; **2**: Doc44 (20071228).

13 Al-Doori Z, Morrison D, Gemmell CG *et al*. Susceptibility of MRSA to octenidine dihydrochloride. *Clin Microbiol Infect* 2006; **12** Suppl 4: P893.

14 Pitten FA, Werner HP, Kramer A. A standardized test to assess the impact of different organic challenges on the antimicrobial activity of antiseptics. *J Hosp Infect* 2003; **55**: 108–15.

wnloaded

15 Ekizoglu MT, Özalp M, Gür D *et al*. An investigation of the bactericidal effect of certain antiseptics and disinfectants on some hospital isolates of Gram-negative bacteria. *ICHE* 2003; **24**: 224–6.

16 Kampf G, Höfer M, Wendt C. Efficacy of hand disinfectants against vancomycin-resistant enterococci *in vitro*. *J Hosp Infect* 1999; **42**: 143–50.

17 Sakuragi T, Yanagisawa K, Dan K. Bactericidal activity of skin disinfectants on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Anesth Analg* 1995; **81**: 555–8.

18 Sedlock DM, Bailey DM. Microbicidal activity of octenidine dihydrochloride, a new alkanediylbis[pyridine] germicidal agent. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; **28**: 786–90.

19 Haley CE, Marling-Cason M, Mackowiak PA *et al*. Bactericidal activity of antiseptics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1985; **21**: 991–2.

20 Slee AM, O'Connor JR. *In vitro* antiplaque activity of octenidine dihydrochloride (WIN 41464-2) against preformed plaques of selected oral plaque-forming microorganisms. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; **23**: 379–84.

21 Marchetti MG, Kampf G, Salvatorelli G *et al*. Evaluation of the bactericidal effect of five products for surgical hand disinfection according to prEN 12054 and prRN 12791. *J Hosp Infect* 2003; **54**: 63–7.

22 Messager S, Goddard PA, Maillard JY *et al*. Determination of the antibacterial efficacy of several antiseptics tested on skin by an '*ex-vivo*' test. *J Med Microbiol* 2001; **50**: 284–92.

23 Smith K, Hunter IS. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *J Med Microbiol* 2008; **57**: 966–73.

24 Sickbert-Bennett EE, Weber DJ, Gergen-Teague MF *et al*. Comparative efficacy of hand hygiene agents in the reduction of bacteria and viruses. *Am J Infect Control* 2005; **33**: 67–77.

25 Deutsches Institut für Normung. *DIN EN 1040: Chemical Disinfectants and Antiseptics—Quantitative Suspension Test for the Evaluation of Basic Bactericidal Activity of Chemical Disinfectants and Antiseptics—Test Method and Requirements (Phase 1)*. Berlin, Germany: Beuth, 2005.

26 Deutsches Institut für Normung. *DIN EN 1275: 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)*. Berlin, Germany: Beuth, 2005.

27 Deutsches Institut für Normung. *DIN 58940-7 (standard draft): Medical Microbiology—Susceptibility Testing of Microbial Pathogens to Antimicrobial Agents—Part 7: Determination of the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) by Means of the Microbouillon Dilution Method*. Berlin, Germany: Beuth, 2008.

28 Deutsches Institut für Normung. *DIN 58940-8: Medicinal Microbiology—Sensitivity Testing of Pathogens to Antimicrobial Agents—Part 8: Microdilution; General Method-specific Requirements*. Berlin, Germany: Beuth, 2002.

29 Haraszthy VI, Reynolds HS, Sreenivasan PK *et al*. Media- and method-dependent variations in minimal inhibitory concentrations of antiplaque agents on oral bacteria. *Lett Appl Microbiol* 2006; **43**: 256–61.

30 Kramer A, Roth B, Müller G *et al*. Influence of the antiseptic agents polyhexanide and octenidine on FL cells and on healing of experimental superficial aseptic wounds in piglets: a double-blind, randomised, stratified controlled, parallel-group study. *Skin Pharmacol Physiol* 2004; **17**: 141–6.

31 Wiegand C, Abel M, Kramer A *et al*. Stimulation of proliferation and biocompatibility of polihexanide. *GMS Krankenhaushyg Interdiszip* 2007; **2**: Doc43 (20071228).

Chemico-Biological Interactions 190 (2011) 171–178

Contents lists available at ScienceDirect

Chemico-Biological Interactions

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chembioint

Reduced cytotoxicity of polyhexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB) by egg phosphatidylcholine while maintaining antimicrobial efficacy

Gerald Müller[a], Axel Kramer[a,*], Jürgen Schmitt[b], Daniela Harden[b], Torsten Koburger[c]

[a] Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Ernst-Moritz-Arndt-University Greifswald, W.-Rathenau-Str. 49a, 17487 Greifswald, Germany
[b] B. Braun Melsungen Ltd., Hospital Care Division, Am Schwerzelshof, 34212 Melsungen, Germany
[c] Hygiene Nord GmbH, Biotechnikum, W.-Rathenau-Str. 49a, 17489 Greifswald, Germany

ARTICLE INFO

Article history:
Received 17 November 2010
Received in revised form 16 February 2011
Accepted 21 February 2011
Available online 26 February 2011

Keywords:
Polyhexamethylene biguanide
PHMB
Egg phosphatidylcholine
Liposomes
Antimicrobial efficacy
Cytotoxicity
In vitro

ABSTRACT

Liposomes or oil-in-water emulsions containing egg yolk phosphatidylcholine (EPC) were combined with aqueous polyhexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB). The bactericidal activity of these preparations against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* as well as their cytotoxicity on cultured murine fibroblasts (L929 cells) was then assayed for either 30 min or 60 min in the presence of cell culture medium containing 10% fetal bovine serum as surrogate for wound fluid. We used two assay designs: in the first bactericidal activity and cytotoxicity were determined in separate experiments; in the second both were determined in one experiment. Combining PHMB and EPC containing o/w emulsions or liposomes protects mammalian cells without neutralizing the antiseptic effect. From all tested combinations the o/w emulsions containing 0.05% PHMB proved to be superior in this respect to the aqueous preparation.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Polyhexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB, polihexanide) is a highly water soluble polymeric cationic antimicrobial agent which is commercially available as a 20% (w/v) aqueous solution (Vantocil™, Cosmocil™, Lavasept®). In the past, PHMB has been widely used as antimicrobial agent, i.e. in cosmetics, as sanitizer, or in contact-lens multipurpose solutions because of its low systemic toxicity. The agent accentuates from other known antiseptics due to its significant promotion of wound healing [1]. PHMB may become the agent of choice for the treatment of chronic wounds [2]. In addition to other antiseptics polihexanide is highly cytotoxic in the peritoneal cavity [3]. Therefore we proved the possibility to decrease its cytotoxicity while maintaining the antiseptic efficacy combining egg phosphatidylcholine (EPC) and PHMB.

PHMB interacts via the cationic biguanide groups with the anionic head groups in the outer layer of the cell membranes displacing membrane stabilizing Ca^{2+} [4]. The hydrophobic hexamethylene bridging domains of the polymer are relatively inflexible, so that they cannot be integrated into the hydrophobic bilayer of the cell membrane. Thus, interaction of PHMB with the cell membrane results in a bridging of the anionic head groups of adjacent acidic phospholipids [5–7]. This bridging is not restricted to pairs of adjacent acidic phospholipids but leads to a rearrangement of phospholipids into individual acidic phospholipid domains. This rearrangement results in an alteration of the biological properties of the membrane [5–9]. These alterations include repulsion of adjacent anionic phospholipids, disruption of the packaging of the phospholipid hydrophobic tails and an increase in the permeability of the membrane to low molecular weight cytoplasmic components including K^+ [10]. The ability of PHMB to create single phospholipid domains within heterogeneous phospholipid-bilayers is not restricted to microbial cell membranes. A similar increased distortion of membrane integrity is also produced in mammalian cells. The commonest glycerophospholipids in bacterial cell membranes are phosphatidylethanolamine (frequently predominant in Gram-negative species), phosphatidylglycerol and diphosphatidylglycerol (cardiolipin). The latter two are acidic phospholipids which are rarely found in mammalian cell membranes. In contrast, phosphatidylcholine (lecithin), universally present as the dominant phospholipid in membranes from animals, plants and fungi, is a very rare component of bacteria and indeed is absent altogether from Gram-positive species [11–13]. Even though it has been reported that PHMB does not react with neutral phospholipids, such as phosphatidylcholine [7], it nevertheless has considerable cytotoxicity toward mammalian cells [14–16] which contain phosphatidylcholine as the predominant glycerophospholipid.

* Corresponding author. Tel.: +49 3834 515542; fax: +49 3834 515541.
E-mail address: kramer@uni-greifswald.de (A. Kramer).

0009-2797/$ – see front matter © 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.cbi.2011.02.024

We therefore investigated the possibility of decreasing the cytotoxic potency of PHMB on mammalian cells while maintaining its antimicrobial efficacy by using liposomes or oil-in-water (o/w) emulsions containing almost entirely of egg yolk phosphatidylcholine forming membranous structures.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Lipoid E80 (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Germany) consisting of phospholipids from egg yolk was used for the preparation of both the liposomes and the o/w emulsion. Lipoid E80 is composed in general of 75–84% (w/w) 3-sn-phosphatidylcholine, 7–9% (w/w) phosphatidylethanolamine, <6% (w/w) non-polar lipids, <3% (w/w) lysophosphatidylcholine, <3% (w/w) sphingomyelin, <2% (w/w) water, traces of cholesterol and D,L-a-tocopherol. 6% (w/v) lipoid E80 liposomes were prepared by high pressure homogenization by passing the dispersion in water through a Gaulin Micron Lab 40 high pressure homogenizer (APV Gaulin, Lübeck, Germany) at 70 MPa for 10 cycles. The resulting liposomes were sterile filtered using first a 0.45 μm pore size filter followed by a 0.2 μm filter. The final liposome preparation was stored under a nitrogen atmosphere.

Lipofundin® MCT 20% and Lipofundin® MCT 10% (B. Braun, Melsungen, Germany), as o/w emulsions contain 200 g/L respectively 100 g/L of 1:1 (w/w) mixture of long chain triglycerides (LCT; soybean oil) and medium chain triglycerides (MCT), glycerol (2.5%), sodium oleate (0.03%) and D,L-a-tocopherol and are stabilized with egg lecithin. These emulsions are manufactured using high pressure homogenization (30–60 MPa, 45–80 °C). The shelf life of Lipofundin® MCT 20% and Lipofundin® MCT 10% is restricted to 2 years at room temperature, which was demonstrated by continuously performed stability investigations according to a specification released by health authorities. The o/w emulsions were obtained from the local hospital dispensary.

2.2. Passive loading of liposomes and o/w emulsions with PHMB

Cosmocil PG (Arch Chemicals Inc., Norwalk, CT, US) containing 20% (w/v) polyhexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB) in water was diluted with water to final concentrations of 0.1, 0.2, and 0.4% (w/v) PHMB. Equal volumes of EPC-containing dispersions (liposomes and o/w emulsions) and 0.1, 0.2, or 0.4% (w/v) PHMB were combined and thoroughly mixed at room temperature (20 ± 2 °C). The resulting mixtures were defined as ready-to-use preparations of PHMB and were used within 24 h after preparation.

2.3. Particle size determination of liposomes and o/w emulsion containing PHMB

The mean particle size of the preparations determined by photon correlation spectroscopy (PCS) was analyzed in a Malvern Zetasizer (Malvern Instruments, UK). PCS is a dynamic light scattering technique for determining the mean particle size of the bulk population (*z*-average) and polydispersity index (PI) as a dimensionless value for the width of particle size distribution. The PCS only can detect particles below approximately 3 μm [17]. All samples were diluted using purified water to yield a suitable scattering intensity and were analyzed at 25 °C.

2.4. Determination of free and EPC-associated PHMB

Aqueous and EPC-enriched lipid phases of the preparations were separated by gentle centrifugation at 380 × *g* (2000 rpm) at 18 °C in a Biofuge fresco (Haraeus) using different centrifugal filter devices. Emulsions were centrifuged for 90 min in Ultrafree-MC filter devices (Millipore) with a microporous low-binding Durapore PVDF membrane of 0.1 μm pore size. Liposomes were centrifuged for 3 h in Nanosep 300K Omega centrifugal devices (Pall) with a filter membrane of a molecular weight cutoff of 300 kDa.

Concentrations of PHMB in the aqueous phase were assessed colorimetrically in 24-well cell culture plates at 545 nm in a PowerWave XS spectral photometer (BioTek) after reaction of a 2 mL sample with 0.1 mL 10% (w/v) sodium acetate, 0.25 mL 0.025% (w/v) Eosin Y, and 0.15 mL purified water for 15 min at room temperature in the dark [18]. A calibration curve was derived for 1–15 mg/L PHMB in water and used for calculations. 0.1 mL of aqueous filtrate of o/w emulsions or liposomes was diluted with 4.9 mL purified water to get sample solutions. 1 mL or 2 mL of the sample solution containing between 0 and 15 mg/L PHMB was used in the test.

2.5. L929 cell line, culture medium, and cytotoxicity assay

L929 cells (ATCC CCL 1), derived from an immortalized mouse fibroblast cell line, are a recommended cell line for cytotoxicity testing of medical devices in accordance with ISO 10993-5 [19]. Mouse fibroblasts (ACC 2) were purchased from the German collection of microorganisms and cell lines (DSMZ, Braunschweig, Germany). Stock cultures of L929 cells were routinely propagated in Eagle minimal essential medium (MEM) containing 10% FBS. In the cytotoxicity assay cells were grown in medium containing 10% fetal bovine serum (FBS), which is similar to the composition of artificial wound fluid [20].

MEM with Earle's salts and L-glutamine (PAA Laboratories, Cölbe, Germany) was supplemented with 10% FBS (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). Double concentrated culture medium (2×MEM) was prepared from powder MEM medium (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) for 1 L. The ingredients of the powder medium and 2.2 g $NaHCO_3$ were dissolved in 400 mL water. After aseptic filtration using a 0.2 μm filter 100 mL FBS was added. The cell culture media were used without antibiotics to avoid possible interactions. The neutral red (NR) assay has been standardized for L929 cells [19]. Procedures for the NR assay have been described in detail elsewhere [21–23]. Briefly, L929 cells were seeded into 96-well cell culture plates, 0.1 mL/well, at a density of 1×10^6 cells/mL to reach about >90% confluence after 24 h. 24 h after seeding, 0.1 mL fresh medium and mixtures of the same parts per volume of 2×MEM and ready-to-use preparations of PHMB (see Section 2.2) were added. Six replicates per test sample were used. After 30 min or 60 min of incubation in a humidified atmosphere of 5% CO_2/95% air at 37 °C, the medium was removed and the wells were washed twice for 1–2 min with 0.15 mL of fresh medium. 0.2 mL of a fresh sterile solution of 50 mg/L NR (3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride) dye in medium, pre-equilibrated for 3 h at 37 °C was then added for 3 h at 37 °C. The NR vital dye is incorporated into the lysosomes of viable cells. After incubation, the medium was completely removed and cells were washed carefully twice with of 0.25 mL of warm PBS for 2 min. Incorporated NR dye was extracted by adding 0.2 mL of 1% (v/v) acetic acid/50% (v/v) ethanol. The plates were agitated on an orbital shaker for at least 1 h in order to ensure quantitative extraction and solubilisation of NR. The optical densities of the wells were measured using an automated plate reader (Bio-Rad, Benchmark) with a 540 nm test wavelength and a 655 nm reference wavelength. The results are expressed as percentage of the control (unexposed cells). The cytotoxicity tests were repeated three times.

2.6. Microorganisms, inactivation combinations, and quantitative suspension tests

The investigation was carried out with *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 11229). For *P. aeruginosa* biguanides were inactivated as recommended [24–26] using TSHC [3% (w/v) Tween 80 (63161, Sigma–Aldrich, Seelze, Germany), 3% (w/v) saponin (A2542, AppliChem, Darmstadt, Germany), 0.1% (w/v) L-histidine (1.04351, Merck, Darmstadt, Germany) and 0.1% (w/v) L-cysteine (1.02838, Merck, Darmstadt, Germany). For *S. aureus* TSLS was used [4% (w/v) Tween 80 (63161, Sigma–Aldrich, Seelze, Germany), 3% (w/v) saponin (A2542, AppliChem, Darmstadt, Germany), 0.4% (w/v) lecithin from soybean 30% (A2182, AppliChem, Darmstadt, Germany) and 1% (w/v) sodium dodecylsulfate (A1502, AppliChem, Darmstadt, Germany)]. TSHC inactivated PHMB without any inhibitory effect on growth of *P. aeruginosa* and TSLS inactivated PHMB without affecting *S. aureus* (data not shown). The quantitative suspension test was carried out in accordance with the guidelines for testing disinfectants and antiseptics of the European Committee for Standardization [24,25]. The bacterial broth culture contained 10^8 cfu/mL in cell culture medium. A 1 mL aliquot of this inoculum was mixed with 9 mL cell culture medium with or without the test sample. The test sample was prepared immediately before use by combining equal volumes of 2×MEM and ready-to-use preparations of PHMB. Incubation was for either 30 or 60 min at room temperature. The antimicrobial agent was eliminated by transfer of 1 mL of the incubated test combination into 9 mL TSHC (*P. aeruginosa*) or TSLS (*S. aureus*). After 5 min of inactivation, serial dilutions were prepared in inactivator and 0.1 mL of each dilution was plated in triplicate on Trypticase soy agar. The cfu of the test microorganisms were counted after 48 h of incubation at 37 °C. The initial inoculum reduction (IIR, $\log_{10}$ cfu/mL) for each contact time was calculated according to the formula:

$$\mathrm{IIR} = \log_{10} n_c - \log_{10} n_d$$

where n_c is the number of viable cells (cfu) in the inoculum in the presence of cell culture medium and n_d is the number of viable cells (cfu) in the inoculum after contact with the test combination. All experiments were repeated three times.

In a modification of this quantitative suspension test a 9 mL aliquot of the inoculum of 10^7 cfu/mL in cell culture medium, was mixed with 1 mL of the ready-to-use preparation of PHMB (see Section 2.2) and the IIR determined as described above for each contact time.

2.7. Combined assay of cytotoxicity and microbicidal activity

24-well cell culture plates were seeded with a suspension of L929 cells (1×10^5 cells/mL). 24 h after seeding 1 mL fresh medium was added and the cells were cultured for a further 24 h. The experimental design consisted of 2 replicate 24-well plates one of which was incubated with 0.9 mL medium/well while the second was incubated with 0.9 mL medium containing 10^6 cfu/mL test microorganisms/well. Immediately after inoculation 0.1 mL of test samples and controls were added during agitating on an orbital shaker to achieve a rapid and uniform distribution of components. Two or three replicates per sample were used.

After either 30 min or 60 min of incubation without shaking, 0.1 mL of the incubation mix was transferred into 0.9 mL of the inactivator solution TSHC or TSLS (see above). After 5 min inactivation, serial dilutions were prepared in inactivator and 0.1 mL of each dilution was plated in triplicate on Trypticase soy agar. The IIR for each contact time was determined.

All remaining medium was removed from the cells and the extent of cytotoxicity determined using the NR dye procedure described above. All experiments were repeated three times.

3. Results

3.1. Physical stability of liposomes and o/w emulsions containing PHMB

Test samples of liposomes and o/w emulsions with and without PHMB were stored over a time period of 48 h at 5 ± 2 °C for the particle size determination (PCS) after 0 h, 24 h, and 48 h (Table 1). There were virtually no changes in the mean particle size of all investigated liposomal formulations with and without PHMB. The differences in polydispersity index (PI) are in the range of tolerance.

The o/w emulsion 0.05% PHMB/0.4% EPC demonstrated only a slightly increase in the mean particle size but not for 0.05%/0.6% EPC. The changes of the PI were negligible for all formulation with and without PHMB (Table 1).

3.2. Free and EPC-associated PHMB

No PHMB is detected in the aqueous part of the liposomal formulation containing 0.05% PHMB. Deduced from the concentrations of PHMB in the aqueous phase of the preparation 0.1% PHMB/3% EPC and of 0.2% PHMB/3% EPC, approximately 750 mg/L PHMB is associated with EPC of the liposomal particles (Table 2).

The assessed binding capacity of EPC for PHMB in o/w emulsions amounts to approximately 330 mg/L for the formulation containing 0.4% EPC, and 500 mg/L PHMB is associated with the lipid phase of 0.05% PHMB/0.6% EPC, which was demonstrated by the absence of PHMB in the aqueous part of 0.05% PHMB/0.6% EPC (Table 2).

3.3. Microbicidal efficacy of PHMB with and without EPC in the standard test

The microbicidal effect of 0.05% PHMB in the form of liposomes containing a final concentration of 3% EPC resulted in a less than 1 $\log_{10}$ reduction of either *P. aeruginosa* or *S. aureus* after 30 min incubation (Table 3). Over the same time period the aqueous 0.05% PHMB preparation resulted in a greater than 4 $\log_{10}$ reduction of both bacterial species. After 60 min of incubation with 0.05% PHMB/3% EPC the maximum IIR of *S. aureus* was 1.2 and that of *P. aeruginosa* was 0.8. Final concentrations of >0.1% PHMB for liposomes containing 3% EPC resulted in >3 $\log_{10}$ reduction of both organisms which is recommended for antiseptics [26]. The antimicrobial effect against *P. aeruginosa* of all tested liposomal preparations was lower than that for the equivalent aqueous PHMB.

The concentration at which *P. aeruginosa* and *S. aureus* was reduced by at least 3 $\log_{10}$, the minimum efficacy in the presence of organic matter [26], was 225 mg/L PHMB for both the aqueous solution and the two o/w emulsions but 450 mg/L PHMB for the liposomal preparation.

The microbicidal effect of 0.05% PHMB in o/w emulsions is slightly decreased in the order of 0.4% EPC > 0.6% EPC. The liposomes (3% EPC) and o/w emulsions (0.4 or 0.6% EPC) without PHMB did not influence bacterial growth over the course of a 60 min incubation (Table 3).

3.4. Cytotoxicity of PHMB with and without EPC

The test combination in MEM of 0.025% PHMB resulted in <10% viable cells after 30 min contact (Table 4). In contrast, there was no cytotoxic effect detected using 250–1000 mg/L PHMB in the presence of liposomal EPC. Concentrations of >250 mg/L PHMB in o/w emulsions produced a cytotoxic effect as demonstrated in Table 4.

Table 1
Mean particle size (*z*-average [nm]) and polydispersity index (PI) of liposomal PHMB and PHMB in w/o emulsions in comparison with liposomes and o/w emulsion without PHMB immediately after preparing (0 h) and after storage of 24 h and 48 h at 5 °C in the dark.

Test combination	*z*-Average [nm]	PI	*z*-Average [nm]	PI	*z*-Average [nm]	PI
	0 h		24 h		48 h	
Liposomal						
0.10% PHMB/3% EPC	84.6 ± 1.5	0.277 ± 0.02	83.7 ± 1.6	0.310 ± 0.04	87.2 ± 1.5	0.315 ± 0.20
0.20% PHMB/3% EPC	85.2 ± 1.4	0.277 ± 0.03	81.8 ± 2.0	0.195 ± 0.03	88.8 ± 1.7	0.303 ± 0.03
3% EPC	86.6 ± 0.9	0.256 ± 0.03	81.9 ± 0.8	0.241 ± 0.02	85.2 ± 1.3	0.247 ± 0.03
o/w-emulsion						
0.05% PHMB/0.4% EPC	210.7 ± 5.3	0.099 ± 0.08	203.1 ± 3.4	0.107 ± 0.04	232.4 ± 4.8	0.163 ± 0.06
0.4% EPC	234.3 ± 4.2	0.053 ± 0.03	234.6 ± 5.5	0.103 ± 0.05	239.3 ± 6.9	0.176 ± 0.05
0.05% PHMB/0.6% EPC	292.6 ± 7.6	0.121 ± 0.08	292.0 ± 7.1	0.157 ± 0.14	297.0 ± 8.5	0.153 ± 0.05
0.6% EPC	295.1 ± 8.2	0.081 ± 0.08	297.2 ± 16.6	0.200 ± 0.13	315.5 ± 9.1	0.123 ± 0.06

Table 2
PHMB (mg/L) in the aqueous phase of liposomes and o/w emulsions after filtration using centrifugal devices estimated by the Eosin Y method compared with the PHMB concentration in the aqueous solution with and without applying centrifugal filter devices ($n = 6$).

Test sample	Centrifugal device	PHMB concentration (mean ± S.D.)	
		Eosin Y test (mg/L)	Final calculated (mg/L)
Aqueous			
0.05% PHMB	No	10.16 ± 0.20	508 ± 12
0.10% PHMB	No	10.56 ± 0.27[a]	528 ± 7
Aqueous			
0.05% PHMB	Nanosep 300K	9.97 ± 0.23	499 ± 12
0.10% PHMB	Nanosep 300K	10.24 ± 0.13[a]	512 ± 7
Liposomal			
0.05% PHMB/3% EPC	Nanosep 300K	n.d.	0
0.10% PHMB/3% EPC	Nanosep 300K	4.85 ± 0.10	243 ± 5
0.20% PHMB/3% EPC	Nanosep 300K	14.74 ± 0.07	738 ± 1
3% EPC	Nanosep 300K	n.d.	0
Aqueous			
0.05% PHMB	Ultrafree-MC	10.04 ± 0.08	502 ± 4
0.10% PHMB	Ultrafree-MC	10.32 ± 0.16[a]	516 ± 8
o/w-emulsion			
0.05% PHMB/0.4% EPC	Ultrafree-MC	3.37 ± 0.13	169 ± 7
0.10% PHMB/0.4% EPC	Ultrafree-MC	13.35 ± 0.45	668 ± 23
0.4% EPC	Ultrafree-MC	n.d.	0
0.05% PHMB/0.6% EPC	Ultrafree-MC	n.d.	0
0.10% PHMB/0.6% EPC	Ultrafree-MC	9.99 ± 0.12	500 ± 6
0.6% EPC	Ultrafree-MC	n.d.	0

n.d., not detectable (<0.5 mg/L PHMB).
[a] 1 mL sample was diluted with 1 mL water before performing the Eosin Y test.

Table 3
Initial inoculum reduction (IIR; $\log_{10}$ cfu/mL) of *P. aeruginosa* and *S. aureus* at 30 and 60 min at room temperature using aqueous PHMB, liposomal PHMB, and PHMB in o/w emulsion and the final concentration of PHMB in cell culture medium containing 10% FBS in the quantitative suspension test (EN 1040).

Test combination	Final PHMB test concentration [mg/L]	Initial inoculum ($\log_{10}$ cfu/mL)		IIR 30 min		IIR 60 min	
		P. aeruginosa	*S. aureus*	*P. aeruginosa*	*S. aureus*	*P. aeruginosa*	*S. aureus*
Aqueous							
0.05% PHMB	225	7.4 ± 0.2	7.2 ± 0.1	4.3 ± 0.3	>5.2[a]	>5,4[a]	>5.2[a]
0.10% PHMB	450			>5.4[a]	>5.2[a]	>5.4[a]	>5.2[a]
0.20% PHMB	900			>5.4[a]	>5.2[a]	>5.4[a]	>5.2[a]
Sterile water	0			0.01	0.02	0.01	−0.01[b]
Liposomal							
0.05% PHMB/3% EPC	225	7.5 ± 0.2	7.1 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.2	1.2 ± 0.4
0.10% PHMB/3% EPC	450			3.1 ± 0.1	4.0 ± 0.2	4.1 ± 0.3	>5.1[a]
0.20% PHMB/3% EPC	900			3.9 ± 0.1	>5.1[a]	4.9 ± 0.4	>5.1[a]
3% EPC	0			−0.01[b]	−0.05[b]	0.05	−0.03[b]
o/w-emulsion							
0.05% PHMB/0.4% EPC	225	7.4 ± 0.2	7.2 ± 0.1	3.9 ± 0.1	>5.2[a]	4.1 ± 0.1	>5.2[a]
0.10% PHMB/0.4% EPC	450			>5.4[a]	>5.2[a]	>5.4[a]	>5.2[a]
0.20% PHMB/0.4% EPC	900			>5.4[a]	>5.2[a]	>5.4[a]	>5.2[a]
0.4% EPC	0			−0.06[b]	−0.04[b]	−0.12[b]	−0.04[b]
0.05% PHMB/0.6% EPC	225	7.6 ± 0.2	7.3 ± 0.2	3.3 ± 0.2	>5.3[a]	3.9 ± 0.3	>5.3[a]
0.10% PHMB/0.6% EPC	450			>5.6[a]	>5.3[a]	>5.6[a]	>5.3[a]
0.20% PHMB/0.6% EPC	900			>5.6[a]	>5.3[a]	>5.6[a]	>5.3[a]
0.6% EPC	0			−0.07[b]	−0.05[b]	−0.09[b]	−0.06[b]

[a] Values indicated with > representing the detection limit of the test without detectable cfu (calculation of standard error not possible).
[b] Negative values indicate regrowth of the initial inoculum.

Table 4
Viability (%) of mouse fibroblasts (L929) after 30 and 60 min contact at 37 °C using aqueous PHMB, liposomal PHMB, and PHMB in o/w emulsion in cell culture medium with 10% FBS and the final concentration of PHMB in the NR assay.

Test combination	Final PHMB test concentration (mg/L)	L929 cell viability [%]	
		30 min	60 min
Aqueous			
0.05% PHMB	250	6.5 ± 4.3	6.8 ± 0.8
0.10% PHMB	500	6.0 ± 2.7	6.6 ± 4.5
0.20% PHMB	1000	6.5 ± 3.2	7.6 ± 6.2
sterile water	0	97.5 ± 1.1	95.8 ± 1.1
Liposomal			
0.05% PHMB/3% EPC	250	98.7 ± 0.5	96.5 ± 1.3
0.10% PHMB/3% EPC	500	97.0 ± 1.1	95.6 ± 2.1
0.20% PHMB/3% EPC	1000	95.0 ± 1.0	92.5 ± 0.8
3% EPC	0	99.0 ± 0.8	96.1 ± 1.2
o/w-emulsion			
0.05% PHMB/0.4% EPC	250	94.3 ± 3.2	88.1 ± 2.2
0.10% PHMB/0.4% EPC	500	13.5 ± 9.3	7.1 ± 6.3
0.20% PHMB/0.4% EPC	1000	5.8 ± 2.4	6.3 ± 1.0
0.4% EPC	0	96.8 ± 0.9	97.0 ± 1.2
0.05% PHMB/0.6% EPC	250	94.4 ± 1.1	93.8 ± 1.4
0.10% PHMB/0.6% EPC	500	74.2 ± 5.2	57.2 ± 3.4
0.20% PHMB/0.6% EPC	1000	5.2 ± 3.1	6.0 ± 5.0
0.6% EPC	0	99.2 ± 0.8	97.5 ± 1.5

Table 5
Initial inoculum reduction (IIR; $\log_{10}$ cfu/mL) of *P. aeruginosa* and *S. aureus* in cell culture medium containing 10% FBS (MEM) at 30 and 60 min at room temperature using aqueous PHMB, liposomal PHMB, and PHMB in o/w emulsions and the final concentration of PHMB in the modified quantitative suspension test.

Test combination	Final PHMB test concentration (mg/L)	Initial inoculum in MEM ($\log_{10}$ cfu/mL)		IIR 30 min		IIR 60 min	
		P. aeruginosa	*S. aureus*	*P. aeruginosa*	*S. aureus*	*P. aeruginosa*	*S. aureus*
Aqueous							
0.05% PHMB	50	7.5 ± 0.2	7.6 ± 0.3	1.1 ± 0.7	>5.6[a]	2.9 ± 1.2	>5.6[a]
Liposomal							
0.10% PHMB/3% EPC	100			2.1 ± 0.7	4.0 ± 1.0	3.2 ± 0.5	4.4 ± 0.8
o/w-emulsion							
0.05% PHMB/0.4% EPC	50			3.3 ± 0.5	>5.6[a]	3.7 ± 0.2	>5.6[a]
0.05% PHMB/0.6% EPC	50			3.2 ± 0.4	>5.6[a]	3.8 ± 0.3	>5.6[a]

[a] Values indicated with >representing the detection limit of the test without detectable cfu (calculation of standard error not possible).

The maximal reduction of cytotoxicity is reached at a final concentration of 0.05% PHMB for o/w emulsions containing 0.4 or 0.6% EPC. 3% EPC in the liposomes can neutralize the cytotoxic effect of 0.2% PHMB against L929 cells. The 3% EPC/0.2% PHMB combination is the most effective of these liposomal antimicrobial preparations which is tolerated by mouse fibroblasts. Neither the liposomes (3% EPC) nor the o/w emulsions (0.4 or 0.6% EPC) without PHMB resulted in a reduction of cell viability over the course of a 60 min of incubation (Table 4).

3.5. Microbicidal efficacy of PHMB with and without EPC in the modified test

The test combinations producing >3 $\log_{10}$ IIR (Table 3) were selected for re-testing with ready-to-use preparations of PHMB in the modified quantitative suspension test. The standard test was modified to simulate a bacterial exudate existing in abundance and to ensure comparably bacterial cfu in the standard and modified test in the final mixture. The resulting final PHMB concentration in the incubation mixture of the modified quantitative suspension test represents only 1/10 of that in the standard test. The results of the IIR after either 30 or 60 min incubation are shown in Table 5. After 30 min incubation the o/w emulsions containing 0.05% PHMB were more effective against *P. aeruginosa* than 0.05% PHMB in water. A maximum of 1 $\log_{10}$ IIR was found for aqueous PHMB but 3 $\log_{10}$ for the same PHMB concentration in the o/w emulsions. The liposomal preparation was also more effective than aqueous PHMB, and yielded a 2 $\log_{10}$ reduction of *P. aeruginosa*. The microbicidal effect of liposomes against *P. aeruginosa* was lower than that of the emulsion even when the liposomes contained twice as much PHMB as was present in the o/w emulsion. All of these preparations demonstrated >3 $\log_{10}$ IIR for *S. aureus*.

3.6. Microbicidal and cytotoxic effect in the combined assay

To simulate a worst case contamination of an infected wound, the combined assay was carried out with an initial inoculum of 10^6 cfu in accordance to the modified assay. After either 30 or 60 min of incubation the o/w emulsions containing 0.05% PHMB were more effective against *P. aeruginosa* than 0.05% PHMB in water (Table 6). However, the minimum efficacy of 3 $\log_{10}$ reduction in the presence of organic matter was evident for all 3 tested preparations already after 30 min. In accordance with the results of the separate cytotoxicity assays, the viability of the mouse fibroblasts was only reduced using aqueous 0.05% PHMB but not for the two o/w emulsions containing the same concentration of PHMB. The results of the cytotoxicity tests were similar after either 30 or 60 min incubation. No viable microorganisms were detected in culture supernatants from experimental sets using o/w emulsions after 60 min incubation, but *P. aeruginosa* was recovered after 60 min treatment with aqueous PHMB (Table 6).

The IIR of *S. aureus* was >4 $\log_{10}$ already after 30 min of incubation (Table 7). Test microorganisms alone did not influence the viability of cells after 60 min of contact (Tables 6 and 7).

Table 6
Initial inoculum reduction (IIR; $\log_{10}$ cfu/mL) of *P. aeruginosa* in cell culture medium containing 10% FBS (MEM) and the resulting L929 cell viability (%) at 30 and 60 min at room temperature using 0.05% PHMB in water and in o/w emulsions in a final concentration of 50 mg/L PHMB in the combination test.

Test combination	Initial inoculum in MEM ($\log_{10}$ cfu/mL)	30 min			60 min		
		IIR	L929 cell viability (%)		IIR	L929 cell viability (%)	
			With *P. aeruginosa*	Without *P. aeruginosa*		With *P. aeruginosa*	Without *P. aeruginosa*
0.05% PHMB	6.1 ± 0.1	3.7 ± 0.4	20.5 ± 5.0	22.4 ± 13.3	3.7 ± 0.3	26.1 ± 6.7	26.7 ± 11.5
0.05% PHMB/0.4% EPC		3.9 ± 0.1	96.2 ± 6.8	95.0 ± 8.8	>4.1[a]	95.8 ± 6.2	92.6 ± 5.8
0.05% PHMB/0.6% EPC		>4.1[a]	99.1 ± 5.7	95.2 ± 3.8	>4.1[a]	98.9 ± 4.2	92.3 ± 3.2
Sterile water		0.2 ± 0.1	98.8 ± 5.2	102.7 ± 3.4	0.2 ± 0.1	97.8 ± 4.4	105.4 ± 4.3
0.4% EPC		0	101.4 ± 3.1	104.3 ± 3.6	−0.1[b]	100.2 ± 4.7	106.4 ± 3.0
0.6% EPC		0	101.8 ± 3.3	103.4 ± 3.4	−0.1[b]	102.2 ± 2.7	102.9 ± 3.2

[a] Values indicated with >representing the detection limit of the test without detectable cfu (calculation of standard error not possible).
[b] Negative values indicate regrowth of the initial inoculum.

Table 7
Initial inoculum reduction (IIR; $\log_{10}$ cfu/mL) of *S. aureus* in cell culture medium containing 10% FBS (MEM) and the resulting L929 cell viability (%) at 30 and 60 min at room temperature using 0.05% PHMB in water and in o/w emulsions in a final concentration of 50 mg/L PHMB in the combination test.

Test combination	Initial inoculum in MEM ($\log_{10}$ cfu/mL)	30 min			60 min		
		IIR	L929 cell viability (%)		IIR	L929 cell viability (%)	
			With *S. aureus*	Without *S. aureus*		With *S. aureus*	Without *S. aureus*
0.05% PHMB	6.0 ± 0.1	>4.0[a]	19.9 ± 2.5	21.3 ± 9.2	>4.0[a]	24.1 ± 3.9	25.7 ± 5.9
0.05% PHMB/0.4% EPC		>4.0[a]	96.9 ± 5.1	93.8 ± 3.8	>4.0[a]	96.0 ± 3.5	94.4 ± 3.0
0.05% PHMB/0.6% EPC		>4.0[a]	99.1 ± 3.8	94.2 ± 2.8	>4.0[a]	99.5 ± 2.4	91.6 ± 2.1
Sterile water		0.1	101.8 ± 0.3	103.3 ± 2.0	0.08	100.6 ± 5.3	103.8 ± 1.5
0.4% EPC		0.07	101.5 ± 4.2	104.5 ± 3.3	−0.01[b]	103.6 ± 2.8	106.0 ± 2.3
0.6% EPC		0.05	100.6 ± 3.8	103.6 ± 1.7	−0.02[b]	103.1 ± 3.0	105.2 ± 2.6

[a] Values indicated with >representing the detection limit of the test without detectable cfu (calculation of standard error not possible).
[b] Negative values indicate regrowth of the initial inoculum.

4. Discussion

EPC is the most abundant glycerophospholipid of fibroblasts and other mammalian cell plasma membranes [27,28]. Because of this, the liposomes used consisting of phospholipid bilayers [29] and, to a lesser extent, the o/w emulsions consisting of a phospholipid monolayer [30] simulate simple mammalian cells or ghost cells without anionic phospholipids. Studies of Ikeda et al. [6–9] demonstrated that only anionic but not neutral phospholipids can bind the polymeric biguanide. In the present study, the presence of EPC reduces the cytotoxicity of PHMB against murine fibroblasts markedly. Both the binding of PHMB at the EPC layer in the preparations or the direct interaction of the spherical EPC preparations with the mammalian cell membrane could be the reason for this protective effect on cells. Centrifugal filtration experiments demonstrated that PHMB is in association with EPC of the lipid particles (Table 2). The binding capacity of EPC for PHMB depends on the concentration of EPC in the formulation. However, there is a weaker association between PHMB and EPC in o/w emulsions than in liposomes, because after dialysis against water PHMB diffuses across a 50 kDa MWCO membrane in the case of o/w emulsion of 0.05% PHMB/0.6% EPC but not for liposomes also containing 0.05% PHMB. Therefore we concluded that PHMB interacts more preferably with an EPC bilayer than a monolayer. The interaction of PHMB with EPC is in contrast to the results of Ikeda et al. [7] but makes sense in the light of the recommendations for the use of egg yolk and lecithin as neutralizers of antiseptic agents in the quantitative suspensions test [24–26].

The evaluation of cytotoxicity was conducted with cell cultures of 3000 cells/mm^2 which more realistically reflects in vivo cell densities than that of 300 cells/mm^2 in the recommendations of ISO 10993-5. Densities of 4000–7000 cells/mm^2 were found for epidermal basal keratinocytes in the human skin [31] and 4700–5800 cells/mm^2 for corneal basal epithelial cells [32]. Cytotoxicity against mouse fibroblasts is evident only in preparations containing PHMB at concentrations of at least 250 mg/L. Therefore, the determination of a cytotoxic effect of the PHMB preparations on murine fibroblasts may implicitly demonstrate the presence of free available PHMB. Additionally, the absence of cytotoxicity supports the notion that an interaction of PHMB with EPC containing ghost cells may prevent the cytotoxicity against mammalian cells.

The modified quantitative suspension test in which an antiseptic agent acts on bacteria suspended in an artificial wound fluid reflects more realistically the situation in vivo (Table 3). Ready-to-use PHMB preparations which resulted in >3 $\log_{10}$ IIR of test microorganisms in the normal quantitative suspension test were used to compare the bactericidal effect of PHMB at final concentrations of between 50 and 100 mg/L in the test. The IIR of *S. aureus* is comparable between all tested ready-to-use PHMB preparations, but not for IIR of *P. aeruginosa*. The difference in the efficacy against Gram-negative and Gram-positive bacteria may be explained by the barrier properties of the Gram-negative cell envelope toward the high molecular weight biguanide [18]. Surprisingly, the bactericidal effect of aqueous 0.05% PHMB was lower than that of the same PHMB concentration in the o/w emulsions. It may be that the active agent PHMB is more uniformly distributed in aqueous solution than in the o/w emulsions. PHMB may be more concentrated superficially around the ghost cells resulting in a higher local concentration, resulting in facilitated transfer of PHMB to the cell membrane of the Gram-negative bacteria. The o/w emulsions containing PHMB were more active than the liposomal preparation which may be the result of the difference in EPC content and addi-

tionally, PHMB may be more tightly bound by the EPC bilayer than by the monolayer.

To verify the results of the separate examination of cytotoxicity and bactericidal efficacy, aqueous 0.05% PHMB and the equivalent o/w emulsions were selected for the combined assay. L929 cell cultures with approximately 2000 cells/mm^2 were inoculated with 10^6 cfu/mL test microorganisms which simulate a worst case contamination of an infected wound [33–35]. The bactericidal effect against *P. aeruginosa* of aqueous 0.05% PHMB was lower than that of the same PHMB concentration in the o/w emulsions as evidenced by the presence of bacteria even after 60 min of incubation. This effect was not observed with *S. aureus*. The o/w emulsions containing 0.05% PHMB are superior to the aqueous preparation, because though bacteria were killed the mammalian cells were not. The binding of PHMB to EPC containing ghost cells protects the mammalian cells without negating the antiseptic effect against bacteria. These properties could be of benefit especially for antiseptic treatment of sensitive tissues, and cells, i.e. neonates, eye, articular cartilage, peritoneum, and cell cultures.

The main task of an antiseptic agent is to destroy or inhibit the growth of microorganisms in or on living tissue [36]. Unwanted cytotoxic side effects against mammalian cells are usually accepted, because the injured tissues can regenerate within a few days. However, antisepsis of some highly sensitive body compartments needs the pre-selection of a suitable biocompatible antiseptic agent [37]. The combination of 0.05% PHMB and o/w emulsions may be useful for rinsing contaminated and infected body cavities such as bladder, urethra, joint cavities, and peritoneum. The o/w emulsion in the form of Lipofundin® is used for parenteral nutrition [38], showing that it is well tolerated by the human body.

The combined assessment of cellular cytotoxicity and bactericidal activity in one assay provides a means of testing whether a preparation of a defined antiseptic agent is effective against bacteria without harming host cells.

The presented results are reproducible also after using 0.05% PHMB/0.6% EPC and 0.1% PHMB/3% EPC which have been stored for more than 8 months at room temperature in the dark for both separate and combined assessment of cytotoxicity and antimicrobial efficacy. Because of this, the liposomes and the o/w emulsions containing PHMB may be used longer than 48 h after preparation. Within 48 h after producing the ready-to-use dispersions the stability of the resulting particles was demonstrated (Table 1). However, for long term stability the larger oil droplets in the suspensions should be further investigated for example by light microscopy and by determination of the $pFAT_5$ value by light obscuration [39].

Additional experiments are required to assess the effect of different organic challenges, such as mucin or blood, which may alter the antimicrobial effect of the biocompatible PHMB-o/w emulsion which we have tested.

In conclusion, combining aqueous PHMB solutions and EPC containing o/w emulsions or liposomes protects mammalian cells without neutralizing the antiseptic effect. New indications may be opened for PHMB, especially in clinical practice where aqueous PHMB solutions were not tolerated by the tissue, i.e. peritoneal lavage, mouth antisepsis for prophylaxis of mucositis during chemotherapy of cancer, treatment of burns of 3rd degree, rinsing of joint cavity in the case of empyema.

Whether the combination of PHMB and EPC may be used therapeutically in the non-cytotoxic treatment of wound infections and septic conditions created by an increased bacterial growth or release warrants further study.

Conflict of interest statement

None declared.

Acknowledgements

Experimental work was supported by B. Braun Medical Ltd., Centre of Excellence Infection Control, Sempach, Switzerland.

We thank Prof. Dr. R. Jack, Institute of Immunology, University of Greifswald, for critical reading and correcting of the manuscript.

References

[1] C. Roth, A.G. Beule, A. Kramer, W. Hosemann, T. Kohlmann, C. Scharf, Response analysis of stimulating efficacy of polihexanide in an in vitro wound model with respiratory ciliary epithelial cells, Skin Pharmacol. Physiol. 23 (Suppl. 1) (2010) 35–40.
[2] N.-O. Hübner, A. Kramer, Review on the efficacy, safety and clinical applications of polihexanide (PHMB), a modern wound antiseptic, Skin Pharmacol. Physiol. 23 (Suppl. 1) (2010) 17–27.
[3] A. Berg, O. Assadian, P. Rudolph, R.G. Mundkowski, J. Janda, A. Kramer, Intolerability to Lavasept® peritoneal lavage in experimentally induced peritonitis in the guinea pig, Hyg. Med. 33 (2008) 189–193.
[4] P. Broxton, P.M. Woodcock, P. Gilbert, Binding of polyhexamethylene biguanides to the cell envelope of *Escherichia coli* ATCC 8739, Microbios 41 (1984) 15–22.
[5] P. Broxton, P.M. Woodcock, M. Heatley, P. Gilbert, Interaction of some polyhexamethylene biguanides and membrane phospholipids in *Escherichia coli*, J. Appl. Bacteriol. 57 (1984) 115–125.
[6] T. Ikeda, S. Tazuke, M. Watanabe, Interaction of biologically active molecules with phospholipids membranes, Biochim. Biophys. Acta 735 (1984) 380–386.
[7] T. Ikeda, A. Ledwith, C.H. Bamford, R.A. Hann, Interaction of a polymeric biguanide biocide with phospholipids membranes, Biochim. Biophys. Acta 769 (1984) 57–66.
[8] T. Ikeda, S. Tazuke, C.H. Bamford, Interaction of membrane active biguanides with negatively charged species. A model for their interaction with target sites in microbial membranes, J. Chem. Res. 6 (1985) 180–181.
[9] T. Ikeda, S. Tazuke, C.H. Bamford, A. Ledwith, Spectroscopic studies on the interaction of polymeric in-chain biguanide biocides with phospholipids membranes, Bull. Chem. Soc. Jpn. 58 (1985) 705–709.
[10] P. Broxton, P.M. Woodcock, P. Gilbert, A study of the antibacterial activity of some polyhexamethylene biguanides towards *Escherichia coli* ATCC 8739, J. Appl. Bacteriol. 54 (1983) 345–353.
[11] W.C. McMurray, W.L. Magee, Phospholipid metabolism, Ann. Rev. Biochem. 41 (1972) 129–160.
[12] H.J. Rogers, H.R. Perkins, J.B. Ward (Eds.), Microbial Cell Walls and Membranes, Chapman and Hall, London, 1980.
[13] C. Ratledge, S.G. Wilkinson (Eds.), Microbial Lipids, vol. 1, Acad. Press, London, 1988.
[14] A. Kallenberger, C. Kallenberger, H. Willenegger, Experimental investigations on tissue compatibility of antiseptics, Hyg. Med. 10 (1991) 3–15.
[15] G. Müller, A. Kramer, Effect of selected wound antiseptics on adult articular cartilage (bovine sesamoid bone) in the presence of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, J. Orthop. Res. 23 (2005) 127–133.
[16] G. Müller, A. Kramer, Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity, J. Antimicrob. Chemother. 61 (2008) 1281–1287.
[17] N. Ostrowsky, Liposome size measurements by photon correlation spectroscopy, Chem. Phys. Lipids 64 (1993) 45–56.
[18] P. Gilbert, C. Pemperton, D.E. Wilkinson, Barrier properties of Gram-negative cell envelope towards high molecular weight polyhexamethylene biguanides, J. Appl. Bacteriol. 69 (1990) 585–592.
[19] ISO 10993-5, Biological evaluation of medical devices – Part 5, Tests for in vitro cytotoxicity, 2009.
[20] K.E. Campbell, D. Keast, G. Woodbury, P. Houghton, Wear time in two hydrocolloid dressings using a noval in-vivo model, Wounds 15 (2003) 40–48.
[21] E. Borenfreund, J. Puerner, A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90), J. Tissue Cult. Methods 9 (1984) 7–9.
[22] E. Borenfreund, J. Puerner, Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption, Toxicol. Lett. 24 (1985) 119–124.
[23] A.P. Wilson, Cytotoxicity and viability assays, in: J.R.W. Masters (Ed.), Animal Cell Culture, University Press, Oxford, 2000, pp. 175–219.
[24] DIN EN 13727, 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), German version prEN 13727, 2009.
[25] DIN EN 1040, Chemical disinfectants and antiseptics – quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics – test method and requirements (phase 1), German version EN 1040, 2005.
[26] F.-A. Pitten, H.-P. Werner, A. Kramer, A standardized test to assess the impact of different organic challenges on the antimicrobial activity of antiseptics, J. Hosp. Infect. 55 (2003) 108–115.
[27] R. Pankov, T. Markovska, P. Antonov, L. Ivanova, A. Momchilova, The plasma membrane lipid composition affects fusion between cells and model membranes, Chem. Biol. Interact. 164 (2006) 167–173.

[28] G. Van Meer, D.R. Voelker, G.W. Feigenson, Membrane lipids: where there are and how they behave, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9 (2008) 112–124.
[29] V.P. Torchilin, V. Weissig (Eds.), Liposomes. A Practical Approach, 2nd ed., University Press, Oxford, 2003.
[30] G.I. Schoefl, The ultrastructure of chylomicra and of the particles in an artificial fat emulsion, Proc. R. Soc. London Ser. B: Biol. Sci. 169 (1968) 147–152.
[31] E. Frenk, A. Marazzi, Neurofibromatosis of von Recklinghausen: a quantitative study of the epidermal keratinocyte and melanocyte populations, J. Invest. Dermatol. 83 (1984) 23–25.
[32] D.A. Harrison, C. Joos, R. Ambrosio, Morphology of corneal basal epithelial cells by in vivo slit-scanning confocal microscopy, Cornea 22 (2003) 246–248.
[33] M.C. Robson, Wound infection: a failure of wound healing caused by an imbalance of bacteria, Surg. Clin. North Am. 77 (1997) 637–650.
[34] A.B. Wysocki, Evaluating and managing open skin wounds: colonization versus infection, AACN Clin. Issues 13 (2002) 382–397.
[35] R. Edwards, K.G. Harding, Bacteria and wound healing, Curr. Opin. Infect. Dis. 17 (2004) 91–96.
[36] G. McDonell, A.D. Russell, Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance, Clin. Microbiol. Rev. 12 (1999) 147–179.
[37] A. Kramer, O. Assadian, G. Müller, S. Reichwagen, H. Widulle, P Heldt, W. Nürnberg, Octenidine, chlorhexidine, iodine and iodophores, With introductory chapter antisepsis. Reprint from A. Kramer, O. Assadian (Eds.), Wallhäußers Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Antiseptik und Konservierung, Thieme, Stuttgart, 2008).
[38] G. Hardy, M. Puzovic, Formulation, stability, and administration of parenteral nutrition with new lipid emulsions, Nutr. Clin. Pract. 24 (2009) 616–625.
[39] D.F. Driscoll, P.-R. Ling, B.R. Bistrian, Physical stability of 20% lipid injectable emulsions via simulated syringe infusion: effects of glass vs plastic product packaging, J. Parenter. Enteral Nutr. 31 (2007) 148–153.

Chemico-Biological Interactions 201 (2013) 58–64

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Chemico-Biological Interactions

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chembioint

Interaction of polyhexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB) with phosphatidylcholine containing o/w emulsion and consequences for microbicidal efficacy and cytotoxicity

Gerald Müller [a], Torsten Koburger [b], Axel Kramer [a,*]

[a] Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Ernst-Moritz-Arndt-University Greifswald, W.-Rathenau-Str. 49a, 17487 Greifswald, Germany
[b] Hygiene Nord GmbH, Biotechnikum, W.-Rathenau-Str. 49a, 17489 Greifswald, Germany

ARTICLE INFO

Article history:
Received 8 October 2012
Received in revised form 5 December 2012
Accepted 2 January 2013
Available online 9 January 2013

Keywords:
Polyhexamethylene biguanide
PHMB
Egg phosphatidylcholine
O/w emulsion
Antimicrobial efficacy
Cytotoxicity

ABSTRACT

Oil-in-water (o/w) emulsions containing egg yolk phosphatidylcholine (EPC) were combined with aqueous polyhexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB). The PHMB concentration in the aqueous phase was estimated by filtration centrifugation experiments. In parallel, PHMB concentration was assessed utilizing cytotoxicity assays (neutral red) on cultured murine fibroblasts (L929 cells) and tests of bactericidal efficacy on either *Pseudomonas aeruginosa* or *Staphylococcus aureus.* Biological tests were performed in cell culture medium. Filtration centrifugation experiments demonstrated much higher aqueous PHMB concentrations than did the assays for biologically effective PHMB. Therefore, biological test systems should preferably be used to verify effective PHMB concentrations. Tests of microbicidal efficacy in which the same 0.05% PHMB o/w emulsion was re-used 8 times revealed a drug delivery system activated by the presence of test bacteria.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Polyhexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB, polihexanide) is a water-soluble polymeric cationic antibacterial agent (commercially available as Vantocil™, Cosmocil™, and Lavasept®) that has been widely used in industry and medicine. Applications include impregnation of fabrics to inhibit microbial growth [1–3], water treatment [4], contact-lens multipurpose solutions [5,6], mouthwash solution [7,8], treatment of hatching eggs to prevent *Salmonella* infection [9,10], consumer applications (swimming pool sanitizer, preservation of cosmetics), and applications in industrial processes [11]. As an antiseptic in medicine, it has been demonstrated that polihexanide is effective against fungi [12] and *Acanthamoeba* [13–15] in infective keratitis. PHMB is widely used in wound care dressings [16]. The agent differs from other known antiseptics in that it significantly promotes wound healing [17,18]. PHMB may thus become the agent of choice for the treatment of chronic wounds [19]. However, like other antiseptics, polihexanide is highly cytotoxic in the peritoneal cavity [20]. The proposed basis for the antimicrobial and cytotoxic effect is that PHMB interacts with acidic cell membrane lipids to cause phase separation and phospholipid domain formation [21].

Phosphatidylcholine is the most abundant glycerophospholipid of mammalian cell plasma membranes [22,23]. Even though it has been reported that PHMB does not react with neutral phospholipids [24], it was combined with egg phosphatidylcholine to investigate a possible protective effect on mammalian cells. The combination of an oil-in-water (o/w) emulsion containing egg yolk phosphatidylcholine (EPC) with PHMB reduces the cytotoxicity on mammalian cells without neutralizing the microbicidal efficacy against bacteria [25]. In that preliminary study [25], only selected preparations were used to determine PHMB in the aqueous phase after gentle filtration using centrifuge filter units. The present study, however, provides more details on both the interaction and the binding forces of PHMB with the EPC layer of the emulsified particles. The interaction of PHMB with the particles of the EPC-containing o/w emulsion may be described as the attachment of a compound (ligand) to a macromolecular receptor [26]. This non-covalent, reversible association of PHMB (low-molecular ligand) with macromolecular receptors (possibly phosphate groups of the EPC monolayer) can be used to derive an optimal combination of the two components suitable for use as an effective and biocompatible antiseptic preparation. The results were evaluated by assessing biologically effective PHMB using cytotoxicity assays and tests for microbicidal efficacy. Additionally, one 0.05% PHMB o/w emulsion was re-used eight times to test the antimicrobial activity based on release of the active agent from a depot in the presence of test microorganisms (a drug delivery system).

* Corresponding author. Tel.: +49 3834 515542; fax: +49 3834 515541.
E-mail address: kramer@uni-greifswald.de (A. Kramer).

0009-2797/$ - see front matter © 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2013.01.001

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Lipoid E80 (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Germany) consisting of phospholipids from egg yolk was used for the preparation of the o/w emulsion.

The o/w emulsion Lipofundin® MCT 20% (B. Braun, Melsungen, Germany) containing 1.2% (w/v) EPC was manufactured by B. Braun using high pressure homogenization (30–60 MPa, 45–80 °C). The o/w emulsion was obtained from the local hospital dispensary.

Cosmocil PG (Arch Chemicals Inc., USA) containing 20% (w/v) PHMB in water was used as the antiseptic agent in this study.

2.2. Passive loading of the o/w emulsion with PHMB

Twenty percent (20%) (w/v) PHMB was diluted with sterile water (B. Braun, Germany) to final concentrations of 0.01–0.4% (w/v) PHMB. Equal volumes of the EPC-containing dispersion and 0.01–0.4% (w/v) PHMB were added to this (20 ± 2 °C) and used within 14 days after preparation.

2.3. Determination of free and EPC-associated PHMB

Aqueous and EPC-enriched lipid phases of the preparations were separated by gentle centrifugation at 380*g* (2000 rpm) at 18 °C in a Biofuge Fresco (Heraeus, Germany) using Nanosep 300 K Omega centrifugal filter units (Pall Corporation, USA) with a filter membrane of a molecular weight cutoff of 300 kDa. The centrifugal experiments with the test mixtures were repeated six times.

Concentrations of PHMB in the aqueous phase were assessed spectrophotometrically in QS 10.00 mm quartz glass cuvettes (Hellma, Germany) at 235 nm in an Ultrospec 4000 UV/VIS spectral photometer using a calibration curve of 0–20 mg/L PHMB. If necessary, aqueous filtrates were diluted with water after centrifugation to obtain sample concentrations within the calibration curve.

2.4. L929 cell line, culture medium, and cytotoxicity assays for determination of free PHMB

L929 cells (ATCC CCL1) derived from an immortalized mouse fibroblast cell line are recommended for cytotoxicity testing of medical devices in accordance with ISO 10993-5 [27]. The mouse fibroblasts (ACC 2) were purchased from the German collection of microorganisms and cell lines (DSMZ, Germany). Stock cultures of L929 cells were routinely propagated in Eagle minimum essential medium containing 10% fetal bovine serum. This culture medium with Earle's salts and L-glutamine (PAA Laboratories, Germany) was supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen, Germany) but without antibiotics to prevent additional antimicrobial activity. Double-concentrated culture medium was prepared from the powder MEM medium (Invitrogen, Germany) required for 1 L. The ingredients of the powder medium and 2.2 g $NaHCO_3$ were dissolved in 400 mL sterile water. After aseptic filtration using a 0.2-μm filter, 100 mL fetal bovine serum was added.

The neutral red assay, which was standardized for L929 cells [27], was used to assess cytotoxicity. Procedures for characterizing the resulting viability of mouse fibroblasts in the neutral red assay have been described in detail elsewhere [28–30]. Briefly, L929 cells were seeded into 96-well cell culture plates, 0.1 mL per well, at a density of 1×10^5 cells/mL. Twenty-four hours after seeding, the medium was changed and cells were cultured further for 24 h. Forty-eight hours after seeding, 0.1 mL of fresh medium (negative control) and 0.1 mL of a mixture of the same parts per volume of double-concentrated medium and PHMB-containing preparations were added. Three replicates per test sample were used. PHMB concentrations of 0–30 mg/L were selected to produce a concentration-viability curve used to assess the free PHMB concentration of the EPC-containing preparations. After 1 h of incubation in a humidified atmosphere of 5% CO_2/95% air at 37 °C, the medium was removed and the wells were washed twice for 1 min with 0.15 mL of fresh medium. 0.2 mL of a fresh sterile solution of 50 mg/L neutral red (2-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride) dye in culture medium, pre-equilibrated for 3 h at 37 °C, was then added; incubation then continued for three more hours at 37 °C. The neutral red vital dye is incorporated into the lysosomes of viable cells. After incubation, the medium was completely removed and cells were washed carefully twice with 0.25 mL of warm phosphate buffered saline (PBS) for 2 min. Incorporated neutral red dye was extracted by adding 0.2 mL of 1% (v/v) acetic acid/50% (v/v) ethanol. The plates were agitated on an orbital shaker for at least 1 h in order to ensure quantitative extraction and solubilization of neutral red. The optical densities of the wells were measured using an automated plate reader (PowerWave XS, BioTek, USA) with a 540-nm test wavelength and a 625-nm reference wavelength. The results are expressed as percentage of the viability of unexposed cells in culture medium (negative control). The separately performed neutral red assays were validated by using sodium dodecylsulfate in concentrations of 50, 100, 150, and 200 mg/L in culture medium as positive controls as recommended in ISO 10993-5 [27]. The cytotoxicity tests were repeated six times.

2.5. Microorganisms, inactivation combinations, and testing of microbicidal action

Quantitative suspension tests were applied to assess the microbicidal effect of PHMB. The trial was carried out with the test microorganisms *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442). For *P. aeruginosa,* PHMB was inactivated as recommended [31–34] by TSHC [3% (w/v) Tween 80 (63161, Sigma–Aldrich, Germany), 3% (w/v) saponin (A2542, AppliChem, Germany), 0.1% (w/v) L-histidine (1.04351, Merck, Germany), and 0.1% (w/v) L-cysteine (1.02838, Merck, Germany)]. For *S. aureus,* TSLS was used [4% (w/v) Tween 80, 3% (w/v) saponin, 0.4% (w/v) soy lecithin (A2182, AppliChem, Germany), and 1% sodium dodecylsulfate (A1502, AppliChem, Germany)]. In control experiments, TSHC inactivated PHMB without any inhibitory effect on the growth of *P. aeruginosa*, and TSLS inactivated PHMB without affecting *S. aureus* (data not shown), as recommended [35]. The microbicidal action was determined in accordance with the guidelines for testing disinfectants and antiseptics of the European Committee of Standardization [31,32].

The bacterial growth culture contained 10^8 cfu/mL in culture medium. A 0.1-ml aliquot of this inoculum was mixed with 0.9 mL of culture medium with or without (negative control) the test sample. The test sample was prepared immediately before use by combining equal parts per volume of the double-concentrated culture medium and the PHMB preparation. Aqueous PHMB concentrations of 0–30 mg/L were used to calibrate the quantitative suspension test. Incubation was performed for 1 h at room temperature. The antimicrobial agent was eliminated by transferring 0.1 mL of the incubated test combination into 0.9 mL of the inactivators TSHC (*P. aeruginosa*) or TSLS (*S. aureus*). After 5 min of inactivation, serial dilutions were prepared in inactivator, and 0.1 mL of each dilution was plated in triplicate on Trypticase Soy Agar. The cfu of the test microorganisms were counted after 48 h of incubation at 37 °C. The $\log_{10}$ reduction ($\log_{10}$ cfu/mL) was calculated according to the formula:

$$\log_{10}\text{ reduction} = \log_{10} n_c - \log_{10} n_d$$

where n_c is the number of viable cells (cfu) in the inoculum in the presence of culture medium and n_d is the number of viable cells (cfu) in the inoculum after 1 h of contact with the test combination. All experiments were repeated three times.

For demonstrating the action of a drug-delivery system, microbicidal bioavailability of PHMB was evaluated by step-wise quantitative suspension tests starting with 2.0 mL of test microorganisms in culture medium (10^8 cfu/mL) and 18.0 mL of PHMB preparation (aqueous or in o/w emulsion) in culture medium. The test sample was prepared immediately before use by combining equal parts per volume of double-concentrated culture medium and PHMB preparation. Incubation at each step lasted 15 min at room temperature. The antimicrobial agent was eliminated by transferring 1.0 mL of the incubated test combination into 9.0 mL of the inactivators TSHC (*P. aeruginosa*) or TSLS (*S. aureus*). Immediately thereafter, the test microorganisms were removed from the test combination by aseptic filtration using a 0.45-μm filter. This procedure was repeated eight times, re-using the same starting preparation and thereafter performing an incubation setup consisting of 1 part by volume test microorganisms and 9 parts by volume PHMB preparation. All experiments were repeated three times.

2.6. Statistical analysis

Dissociation constants and maximal binding capacities were derived from saturation binding curves and Scatchard Plots using GraphPad Prism software version 5.0.

Data are expressed as mean ± standard deviation (SD). Comparisons between two different groups were performed using the Mann–Whitney *U*-test.

3. Results

3.1. PHMB-ligand – EPC-receptor binding affinity

As shown in Table 1, each EPC-containing preparation examined demonstrated PHMB in the aqueous phase after centrifugation. For o/w emulsions containing 0.005–0.1% PHMB, ⩾50% of the added PHMB was associated with the EPC emulsion layer. The PHMB concentration of the aqueous solutions was not influenced by the centrifugal filter unit.

Under the assumption of a relative molecular mass of 2400 Da for PHMB [36], the added micromolar concentration of PHMB yielded a correlation curve with the PHMB bound on EPC. The corresponding saturation binding curve and the Scatchard Plot of the o/w emulsion are presented in Fig. 1. The maximal binding capacity of the EPC layer was 51.6 nmol PHMB/mg EPC for the o/w emulsion (Fig. 1) which is equal to 724 mg PHMB/L o/w emulsion.

The non-covalent, reversible association of the ligand PHMB with the macromolecular receptor (EPC-layer) forming a ligand-receptor complex (EPC-PHMB) is described in Eq. (1) [26]. The association constant K_a equals the reciprocal value of the experimentally determined dissociation constant K_d according to Eq. (2) [26], which can be used for the calculation of the standard Gibb's free energy of binding (ΔG^o) using Eq. (3) [26].

$$[\text{PHMB}] + [\text{EPC-layer}] \underset{K_b}{\overset{K_a}{\leftrightarrow}} [\text{PHMB-EPC}] \quad (1)$$

$$K_a = K_d^{-1} = \frac{[\text{PHMB-EPC}]}{[\text{PHMB}][\text{EPC-layer}]} \quad (2)$$

$$\Delta G^{\circ} = -RT \ln K_a \quad (3)$$

Table 1
PHMB (mg/L) in the aqueous phase of the o/w emulsion after filtration using Nanosep 300 K centrifugal filter units estimated UV spectrophotometrically at 235 nm and the calculated EPC-associated PHMB compared with aqueous PHMB solution with (+) and without (−) applying centrifugation (n = 6).

Test sample	PHMB concentration (mean ± SD)	
	Aqueous (mg/L)	EPC-associated (mg/L)
Aqueous (−)		
0.01% PHMB	106 ± 4	0
0.02% PHMB	212 ± 4	0
0.03% PHMB	316 ± 5	0
0.04% PHMB	423 ± 4	0
0.05% PHMB	527 ± 6	0
0.10% PHMB	1021 ± 5	0
0.15% PHMB	1550 ± 11	0
0.20% PHMB	2053 ± 5	0
Aqueous (+)		
0.01% PHMB	103 ± 5	0
0.02% PHMB	211 ± 4	0
0.03% PHMB	316 ± 5	0
0.04% PHMB	422 ± 5	0
0.05% PHMB	525 ± 8	0
0.10% PHMB	1022 ± 8	0
0.15% PHMB	1551 ± 7	0
0.20% PHMB	2055 ± 6	0
o/w emulsion (+)		
0.005% PHMB/0.6% EPC	1 ± 1	49 ± 1
0.010% PHMB/0.6% EPC	8 ± 1	92 ± 1
0.015% PHMB/0.6% EPC	24 ± 1	126 ± 1
0.020% PHMB/0.6% EPC	43 ± 2	157 ± 2
0.025% PHMB/0.6% EPC	63 ± 2	187 ± 2
0.030% PHMB/0.6% EPC	80 ± 3	220 ± 3
0.035% PHMB/0.6% EPC	104 ± 3	246 ± 3
0.040% PHMB/0.6% EPC	136 ± 3	264 ± 3
0.045% PHMB/0.6% EPC	161 ± 3	289 ± 3
0.050% PHMB/0.6% EPC	188 ± 6	312 ± 6
0.100% PHMB/0.6% EPC	529 ± 5	471 ± 5
0.150% PHMB/0.6% EPC	1002 ± 19	489 ± 19
0.200% PHMB/0.6% EPC	1485 ± 11	515 ± 11
0.6% EPC	0	0

where T (temperature) = 278 K and R (gas constant) = 8.31446 21 J/mol K, K_a (association constant) = 3434 L/mol, a standard Gibb's free energy of 20 kJ/mol for binding PHMB to particles of the o/w emulsion results from Eq. (3).

3.2. Cytotoxicity assays

Experimental data points on dose-response curves of aqueous PHMB were fitted according to a sigmoid regression. The resulting calibration curve was applied to determine the effective PHMB concentration of EPC-containing preparations; these values are shown in Table 2. The PHMB concentrations detected in the neutral red assay (Table 2) were significantly different from that of the experiments using centrifugal devices (Table 1). Aqueous filtrates after centrifugation contained at least five times as much PHMB as was revealed in cytotoxicity testing, i.e., 0.05% PHMB in o/w emulsion demonstrated a cytotoxic effect, which correspond to 23.6 ± 4.0 mg/L PHMB in the aqueous phase of the o/w emulsion (Table 2).

3.3. Tests of microbicidal action

Aqueous 0.001–0.003% PHMB solutions were selected to result in an evaluable 1–5 $\log_{10}$ reduction of both test microorganisms after 1 h of incubation. The resulting $\log_{10}$ reduction of the aqueous solutions and PHMB concentrations in o/w emulsions producing the same microbicidal effect in the quantitative suspension tests

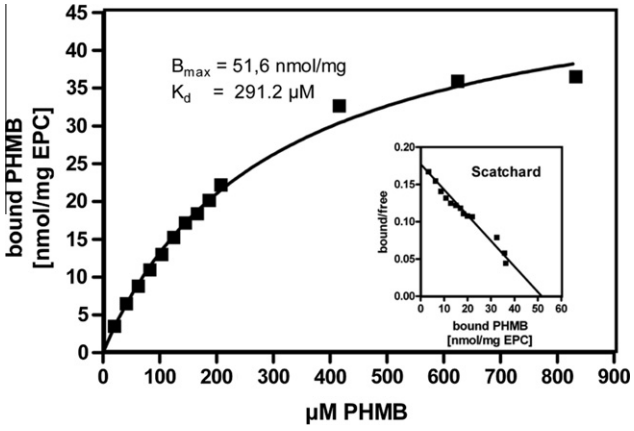


Fig. 1. Saturation binding curve of PHMB to the EPC monolayer of the o/w emulsion Lipofundin MCT 20%, the derived dissociation constant K_d and the corresponding Scatchard Plot for the assessment of the maximal binding capacity B_{max}.

are shown in Table 3. In accordance with cytotoxicity testing, bacterial reduction values were obtained for 0.05% PHMB in o/w emulsion which correspond to 30 mg/L PHMB in the starting solution; this is significantly different from the result after filtration using centrifugal devices, demonstrating 188 ± 6 mg/L PHMB in the aqueous phase (Table 1).

Bioavailability of PHMB was verified in testing microbicidal action by re-using both the same aqueous and EPC-associated PHMB preparation up to eight times, showing that not only PHMB in the aqueous phase of the o/w emulsion is effective against microorganisms, but also the PHMB on the o/w emulsion particles themselves. The 0.05% PHMB o/w emulsion demonstrated 30 mg/L of effective PHMB concentration in tests of microbicidal action; a similar concentration of 23.6 ± 4.0 mg/L PHMB was found in cytotoxicity assays. Therefore, the 0.05% PHMB o/w emulsion and 0.003% aqueous PHMB possessed comparable effective PHMB concentrations. The results of $\log_{10}$ reduction after eight stages of re-testing the microbicidal effect of the same starting preparation are shown in Fig. 2 for *P. aeruginosa* and Fig. 3 for *S. aureus*. The resulting bacterial reduction values were comparable up to 3–4 re-uses of these two PHMB preparations. Thereafter, the microbicidal effect of the aqueous PHMB decreased. In contrast, during all eight stages of re-testing, the microbicidal effect of 0.05% PHMB in o/w emulsion resulted in a relatively constant $\log_{10}$ reduction.

4. Discussion

Centrifugation filtration experiments demonstrated that the association of PHMB with the EPC layer of particles in the o/w emulsion results from hydrogen bonds, which are specialized dipole–dipole interactions. The binding energy of a moderate H-bond in water is in the range of 17–63 kJ mol^{-1} [37]. Both the saturation binding curve in Fig. 1 and the results in Table 1 demonstrate that non-associated PHMB is present at each investigated PHMB concentration in the o/w emulsion. In our preliminary paper [25], the eosin *Y* test [38] was used for quantitative determination of PHMB, which revealed an absence of aqueous PHMB in the 0.05% PHMB o/w emulsion after filtration in centrifugal filter units. The eosin *Y* assay underestimates PHMB at low concentrations (results not shown). The PHMB concentration of 0.1% PHMB in o/w emulsion is around 500 mg/L which correlates with the results of the UV method used in the present study and the eosin-dye assay used in the previous study.

The results of centrifugation filtration experiments were verified in cell cultures by estimating the viability of mouse fibroblasts. The evaluation of cytotoxicity was conducted with cell cultures of 300 cells/mm^2 to increase the sensitivity of the detection system. A concentration–viability curve using L929 cells and aqueous PHMB was applied as a calibration curve to assess the biologically effective PHMB in 0.01–0.05% PHMB o/w emulsions (Table 2), which demonstrated much lower PHMB concentrations than did the filtration centrifugation experiments. After 1 h of incubation, more than 60% of the L929 cells were viable. Only concentrations of <15 mg/L aqueous PHMB resulted in a similar viability in this test system. This low biological efficacy of PHMB may result from a weak interaction of PHMB with the phospholipids of the cell membrane in the presence of the EPC in the o/w emulsion. Additionally, the possibility that PHMB is more associated with the EPC layer of the emulsion than expected from the results of the centrifugal filtration experiments cannot be excluded. However, it was confirmed that PHMB interacts with neutral phospholipids. The association of PHMB with the EPC layer of the particles in the o/w emulsion is not in keeping with the results found by Ikeda et al. [24], but it makes sense in the light of the recommendations for the use of egg yolk and lecithin as neutralizers of PHMB in the quantitative suspension test [31–34].

To verify the results of cytotoxicity, quantitative suspension tests were applied to assess the biologically effective PHMB concentration of o/w emulsions. Bactericidal efficacy against *P. aeruginosa* and *S. aureus* was calibrated using final concentrations of 5–15 mg/L PHMB in cell culture medium. The subsequent $\log_{10}$ reduction of 0.03–0.05% PHMB o/w emulsions was in the range of that of the aqueous PHMB used for calibration (Table 3).

In both cytotoxicity and antibacterial efficacy testing, o/w emulsions containing 0.02–0.05% PHMB demonstrated similar biologically effective PHMB concentrations of 10–30 mg/L. In contrast, filtration centrifugations experiments demonstrated 50–200 mg/L of aqueous PHMB in the o/w emulsion (Table 1). The filtration process using centrifugal devices causes a permanent alteration of the

Table 2
Resulting viability of L929 cells after 1-h contact with selected PHMB o/w emulsions prepared in cell culture medium at 37 °C (n = 18) and the free-PHMB concentration deduced from a calibration curve.

Test combination	L929 cell viability (%)	PHMB concentration (mean ± SD)	
		Neutral red assay (mg/L)	Final calculated (mg/L)[a]
0.01% PHMB/0.6% EPC	96.3 ± 3.9	0[b]	0[b]
0.02% PHMB/0.6% EPC	81.3 ± 3.7	4.7 ± 1.1	9.4 ± 2.2
0.03% PHMB/0.6% EPC	72.7 ± 3.2	7.5 ± 1.2	15.0 ± 2.4
0.04% PHMB/0.6% EPC	69.1 ± 3.1	9.0 ± 1.3	18.0 ± 2.6
0.05% PHMB/0.6% EPC	64.2 ± 3.0	11.8 ± 2.0	23.6 ± 4.0
0.6% EPC	97.9 ± 4.0	0[b]	0[b]

[a] The data from the neutral red assay were duplicated, because the test mixtures were previously combined with the same volume of double concentrated culture medium for the test.
[b] Viability of L929 cells of control and test combination were not significantly different.

Table 3
Log_{10} bacterial reduction (log10 cfu/mL) of *P. aeruginosa* and *S. aureus* at 1 h at room temperature using aqueous PHMB and PHMB in o/w emulsion and the final concentration of PHMB in cell culture medium containing 10% fetal bovine serum in the quantitative suspension test (EN 1040).

Test combination	Final PHMB test concentration (mg/L)	Initial inoculum (log10 cfu/mL)		log_{10} reduction after 1 h	
		P. aeruginosa	*S. aureus*	*P. aeruginosa*	*S. aureus*
Aqueous					
0.001% PHMB		7.2 ± 0.1	7.3 ± 0.1	3.9 ± 0.3	1.8 ± 0.1
0.002% PHMB				4.5 ± 0.2	2.8 ± 0.1
0.003% PHMB				5.0 ± 0.2	4.0 ± 0.2
Water	0			0.02	0.01
o/w emulsion					
0.03% PHMB/0.6% EPC	150	7.2 ± 0.2	7.3 ± 0.2	3.8 ± 0.1	1.3 ± 0.1
0.04% PHMB/0.6% EPC	200			4.3 ± 0.4	2.5 ± 0.3
0.05% PHMB/0.6% EPC	250			5.0 ± 0.3	3.5 ± 0.1
0.6% EPC	0			–0.05[a]	–0.07[a]

[a] Negative values indicate regrowth of the initial inoculum.

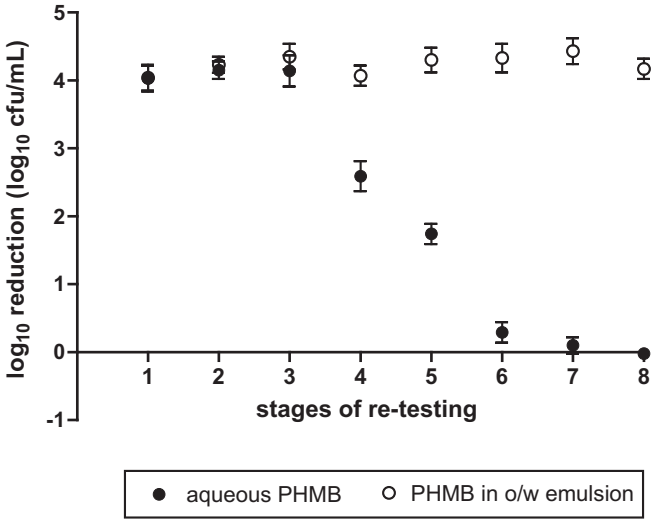


Fig. 2. Resulting log_{10} bacterial reduction of *Pseudomonas aeruginosa* after re-using the same 0.003% aqueous PHMB or 0.05% PHMB in o/w emulsion eight times in quantitative suspension tests, with 15 min incubation each time. The eight-stage tests were conducted at least three times in parallel.

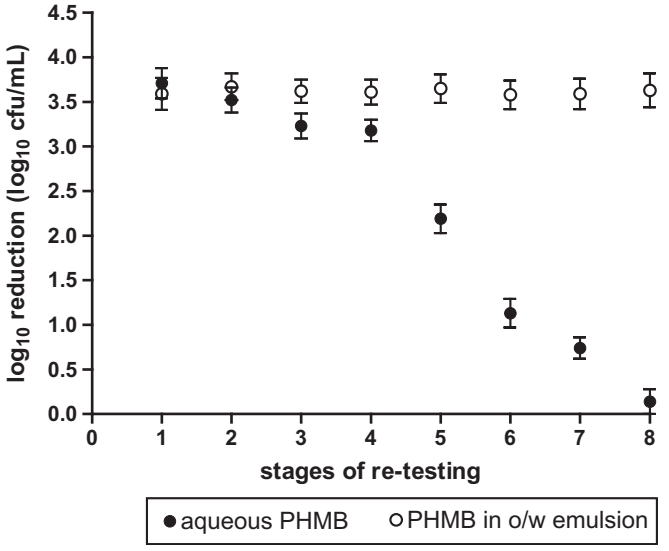


Fig. 3. Resulting log_{10} bacterial reduction of *Staphylococcus aureus* after re-using the same 0.003% aqueous PHMB or 0.05% PHMB in o/w emulsion eight times in quantitative suspension tests, with 15 min incubation each time. The eight-stage tests were conducted at least three times in parallel.

equilibrium between the aqueous phase and emulsified particles. Constant removal of the aqueous phase can induce the release of particle-associated PHMB, which has been demonstrated as higher PHMB concentrations after filtration centrifugation experiments. Additionally, dialysis against water releases the total associated PHMB from the o/w emulsion (results not shown), demonstrating the increased sensitivity of the equilibrium of PHMB between the aqueous phase and emulsified particles in the presence of excess water. The influence of solvation and desolvation is of utmost importance in the stability of hydrogen bonds [26].

Assessment of biologically effective PHMB of o/w emulsions was conducted in cell culture medium containing 10% fetal bovine serum to simulate artificial wound fluid [39]. The presence of protein in cell culture medium may stabilize the interaction of PHMB with EPC of the o/w emulsion, causing a lower PHMB concentration in the aqueous phase as demonstrated in biological tests. This benefits practical use where aqueous solutions are not tolerated by the tissue, e.g., for peritoneal lavage, mouth antisepsis for mucositis prophylaxis during chemotherapy, treatment of third degree burns, rinsing of joint cavities in cases of empyema. The new indications in clinical practice are supported by the results of testing the microbicidal effect by re-using both aqueous PHMB and PHMB o/w emulsion containing similar aqueous PHMB concentrations (Figs. 2 and 3). After 3–4 re-uses the same starting preparation, PHMB was consumed by test microorganisms only in the aqueous preparation. The aqueous PHMB concentration of the o/w emulsion was constantly replenished over eight stages of testing, demonstrating action as a drug-delivery system. Possibly, the concentration of biologically effective PHMB is influenced by the presence of bacteria. The equilibrium of between PHMB and EPC of the o/w emulsion is altered by anionically charged bacteria, which results in subsequent replenishment of PHMB.

If the gradual release of PHMB into infected wounds and contaminated tissues is a clinical priority, the delivery system demonstrated in this study would be the method of choice for wound dressings and irrigation of body cavities, as stipulated and discussed in the consensus document for PHMB by UK wound experts [40].

In conclusion, the present study expands the knowledge about the attachment of PHMB to the EPC layer of o/w emulsion presented in our preliminary paper [25] and reports the assessment of biologically effective PHMB. Biological test systems should be preferred for characterizing biologically effective substances. The drug-delivery system discovered and described here, based on bactericidal tests in which the PHMB o/w emulsion was repeatedly reused, supports the usefulness of this preparation for new clinical

indications, especially on sensitive tissues. Although silver, iodine, and honey will continue to play a key role in clinical practice, as concluded by UK wound experts in their consensus document [40], it should be borne in mind that the treatment of wounds with low concentrations of biologically effective PHMB proved to be superior in preventing infections in comparison to PVP-iodine or silver [41–43]. Two cochrane analyses [44,45] demonstrated that silver treatment did not significantly decrease the rate of wound infections, which could be the result of the high cytotoxicity and low microbicidal efficacy of silver in the presence of serum proteins [46]. The application of low concentrations of microbicidally effective PHMB as an o/w emulsion as presented here represents a new method of bacterial control. This will benefit patients and clinicians by offering an alternative and additional tool to manage the bacterial burden in different clinical situations characterized by critical bacterial colonization. Indeed, the application of the 0.05% PHMB o/w emulsion described above for peritoneal lavage increases the survival of mice with experimentally induced peritonitis [47].

Nevertheless, whether the PHMB o/w emulsion may be used therapeutically in non-cytotoxic treatment of wound infection and septic conditions created by increased bacterial growth or release warrants further study. Such research should focus on irritation tests in HET-CAM [48,49], three-dimensional models of human oral epithelia [50,51], reconstructed human epidermis [52,53], and intact articular cartilage [54,55].

Acknowledgements

The authors thank Juliane Jeschke and Margret Schulz for competent technical assistance. This work was supported in part by the Federal Ministry of Education and Research in Germany (grant 01EC1001B).

References

[1] J.D. Payne, D.W. Kudner, A durable antiodor finish for cotton textiles, Text. Chem. Color 28 (1996) 28–30.
[2] M. Wallace, Testing the efficacy of polyhexamethylene biguanide as an antimicrobial treatment of cotton fabric, AATCC Rev. 1 (2001) 18–20.
[3] J.H. Chen-Yu, D.M. Eberhardt, D.H. Kincade, Antibacterial and laundering properties of AMS and PHMB as finishing agent on fabric for health care workers uniform, Cloth. Text. Res. J. 25 (2007) 258–272.
[4] J.M. Kusnetsov, A.I. Tulkki, H.E. Ahonen, P.J. Martikainen, Efficacy of three prevention strategies against *Legionella* in cooling water systems, J. Appl. Microbiol. 82 (1997) 763–768.
[5] K. Hiti, J. Walochnik, E.M. Halle-Schober, C. Faschinger, H. Aspock, Viability of *Acathamoeba* after exposure to a multipurpose desinfecting contact lens solution and two hydrogen peroxide systems, Br. J. Ophthalmol. 86 (2002) 144–146.
[6] C. Hildebrandt, D. Wagner, T. Kohlmann, A. Kramer, *In-vitro* analysis of the microbicidal activity of 6 contact lens care solutions, BMC Infect. Dis. 12 (2012) 241.
[7] M. Rosin, A. Welk, O. Berhardt, M. Ruhnau, F.-A. Pitten, T. Kocher, A. Kramer, Effect of a polyhexamethylene biguanide mouthrinse on bacterial counts and plaque, J. Clin. Periodontol. 28 (2001) 1121–1126.
[8] M. Rosin, A. Welk, T. Kocher, A. Majic-Todt, A. Kramer, F.-A. Pitten, The effect of a polyhexamethylene biguanide mouthrinse compared to an essential oil rinse and a chlorhexidine rinse on bacterial counts a 4-day plaque regrowth, J. Clin. Periodontol. 29 (2002) 392–399.
[9] N.A. Cox, J.S. Bailey, M.E. Berrang, Bactericidal treatment of hatching eggs. I. Chemical immersion treatments and *Salmonella*, J. Appl. Poult. Res. 7 (1998) 347–350.
[10] N.A. Cox, M.E. Berrang, R.J. Buhr, J.S. Bailey, Bactericidal treatment of hatching eggs. II. Use of chemical disinfection with vacuum to reduce *Salmonella*., J. Appl. Poul. Res. 8 (1999) 321–326.
[11] K. Kaehn, Polihexanide: a safe and highly effective biocide, Skin Pharmacol. Physiol. 23 (Suppl. 1) (2010) 7–16.
[12] C.R. Messick, S.L. Pendland, M. Moshirfar, R.G. Fiscella, K.J. Losnedahl, C.A. Schriever, P.C. Schreckenberger, *In-vitro* activity of polyhexamethylene biguanide (PHMB) against fungal isolates associated with infective keratitis, J. Antimicrob. Chemother. 44 (1999) 197–198.
[13] T.B. Gray, K.A. Gross, R.T.M. Cursons, J.F. Shewan, *Acanthamoeba*-keratitis – a sobering case and a promising new treatment, Aust. N. Z. J. Ophthalmol. 22 (1994) 73–76.
[14] R. Donoso, J.J. Mura, M. Lopez, *Acanthamoeba* keratitis treated with propamidine and polyhexamethyl biguanide (PHMB), Rev. Med. Chil. 130 (2002) 396–401.
[15] S. Narasimhan, H.N. Madhavan, L.K. Therese, Development and application of an in vitro susceptibility test for *Acanthamoeba* species isolated from keratitis to polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine, Cornea 21 (2002) 203–205.
[16] G.D. Mulder, J.P. Cavorsi, D.K. Lee, Polyhexamethylene biguanide (PHMB): an addendum to current topical antimicrobials, Wounds 19 (2007) 173–182.
[17] C. Roth, A.G. Beule, A. Kramer, W. Hosemann, T. Kohlmann, C. Scharf, Response analysis of stimulating efficacy of polihexanide in an in vitro wound model with respiratory ciliary epithelial cells, Skin Pharmacol. Physiol. 23 (Suppl. 1) (2010) 35–40.
[18] A. Kramer, B. Roth, G. Müller, P. Rudolph, N. Klöcker, Influence of the antiseptic agents polyhexanide and octenidine on FL cells and on healing of experimental superficial aseptic wounds in piglets. A double-blind, randomized, stratified, controlled, parallel-group study, Skin Pharmacol. Physiol. 17 (2004) 141–146.
[19] N.-O. Hübner, A. Kramer, Review on the efficacy, safety and clinical applications of polihexanide (PHMB), a modern wound antiseptic, Skin Pharmacol. Physiol. 23 (Suppl. 1) (2010) 17–27.
[20] A. Berg, O. Assadian, P. Rudolph, R.G. Mundkowski, J. Janda, A. Kramer, Intolerability to Lavasept® peritoneal lavage in experimentally induced peritonitis in the guinea pig, Hyg. Med. 33 (2008) 189–193.
[21] P. Gilbert, L.E. Moore, Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet, J. Appl. Microbiol. 99 (2005) 703–715.
[22] R. Pankov, T. Markovska, P. Antonov, I. Ivanova, A. Momchilova, The plasma membrane lipid composition affects fusion between cells and model membranes, Chem. Biol. Interact. 164 (2006) 167–173.
[23] G. Van Meer, D.R. Voelker, G.W. Feigenson, Membrane lipids: where there are and how they behave, Natl. Rev. Mol. Cell Biol. 9 (2008) 112–124.
[24] T. Ikeda, A. Ledwith, C.H. Bamford, R.A. Hann, Interaction of a polymeric biguanide biocide with phospholipid membranes, Biochim. Biophys. Acta 769 (1984) 57–66.
[25] G. Müller, A. Kramer, J. Schmidt, D. Harden, T. Koburger, Reduced cytotoxicity of polyhexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB) by egg phosphatidylcholine while maintaining antimicrobial efficacy, Chem. Biol. Interact. 190 (2011) 171–178.
[26] H. Gohlke, G. Klebe, Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors, Angew. Chem. Int. Ed. 41 (2002) 2644–2676.
[27] ISO 10993–5, Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5, Tests for *In Vitro* Cytotoxicity, 2009.
[28] E. Borenfreund, J. Puerner, A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90), J. Tissue Cult. Methods 9 (1984) 7–9.
[29] E. Borenfreund, J. Puerner, Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption, Toxicol. Lett. 24 (1985) 119–124.
[30] A.P. Wilson, Cytotoxicity and viability assays, in: J.R.W. Masters (Ed.), Animal Cell Culture, University Press, Oxford, 2000, pp. 175–219.
[31] DIN EN 13727, 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), German version prEN 13727, 2009.
[32] DIN EN 1040, Chemical disinfectants and antiseptics – quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics – test method and requirements (phase 1), German version EN 1040, 2005.
[33] F.-A. Pitten, H.-P. Werner, A. Kramer, A standardized test to assess the impact of different organic challanges on the antimicrobial activity of antiseptics, J. Hosp. Infect. 55 (2003) 108–115.
[34] ASTM E1054–08, Standard test methods for evaluation of inactivators of antimicrobial agents, 2008.
[35] S.V.W. Sutton, D.W. Proud, S. Rachui, D.K. Brannan, Validation of microbial recovery from disinfectants, PDA J. Pharmaceut. Sci. Technol. 56 (2002) 255–266.
[36] G.F. de Paula, G.I. Netto, L.H.C. Mattoso, Physical and chemical characterization of poly(hexamethylene biguanide) hydrochloride, Polymers 3 (2011) 928–941.
[37] D.G. Watson, Bond type and bond strength, in: D.G. Watson (Ed.), Pharmaceutical Chemistry, Elsevier Churchill Livingstone, 2011, pp. 1–15.
[38] P. Gilbert, C. Pemperton, D.E. Wilkinson, Barrier properties of Gram-negative cell envelope towards high molecular weight polyhexamethylene biguanides, J. Appl. Bacteriol. 69 (1990) 585–592.
[39] K.E. Campbell, D. Keast, G. Woodbury, P. Houghton, Wear time in two hydrocolloid dressings using a noval *in-vivo* model, Wounds 15 (2003) 40–48.
[40] Consensus document: PHMB and Its Potential Contribution to Wound Management, Wounds UK, Aberdeen, 2010.
[41] T. Eberlein, G. Haemmerle, M. Signer, U. Gruber-Moesenbacher, J. Traber, M. Mittlboeck, M. Abel, R. Strohal, Comparison of PHMB-containing dressing and silver dressings in patients with critically colonized or locally infected wound, J. Wound Care 21 (2012) 12–20.
[42] C. Wiegand, T. Heinze, U.C. Hipler, Comparative *in vitro* study on cytotoxicity, antimicrobial activity, and binding capacity for pathophysiological factors in chronic wounds of alginate and silver-containing alginate, Wound Rep. Regen. 17 (2009) 511–521.
[43] B. Roth, O. Assadian, F. Wurmitzer, A. Kramer, Surgical site infections after primary antiseptic cleansing of dirty-contaminated wound by polihexanide,

PVP iodine resp. hydrogen peroxide, GMS Krankenhaushyg. Interdiszipl. 2 (2007). Doc58.
[44] H. Vermeulen, J.M. van Hettem, M.N. Storm-Versloot, D.T. Ubbink, Topical silver for treating infected wounds, Cochrane Database Syst. Rev. 1 (2007). CD005486.
[45] M.N. Storm-Versloot, C.G. Vos, D.T. Ubbink, H. Vermeulen, Topical silver for preventing wound infection, Cochrane Database Syst. Rev. 3 (2010). CD006478.
[46] G. Müller, A. Kramer, Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity, J. Antimicrob. Chemother. 61 (2008) 1281–1287.
[47] S. Dietrich, C. Sandbrink, A. Kramer, W. Kessler, T. Traeger, P. Menges, A. Busemann, I. Patecke, C.-D. Heidecke, S. Maier, An innovative antiseptic emulsion for peritoneal lavage increases survival of experimental peritonitis in mice, Langenbecks Arch. Surg. 396 (2011) 927.
[48] NIH publication no. 06-4515 (2006), Current status of *in vitro* test methods for identifying ocular corrosives and severe irritants: hen's egg test-chorioallantoic membrane test method. http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/ocutox_docs/ocubrd/hetcam/hetcambrd.pdf.
[49] C. Lüring, T. Kalteis, K. Wild, L. Perlick, J. Grifka, Gewebetoxizität lokaler Anästhetika im HET-CAM-Test, Schmerz 17 (2003) 185–190.
[50] M. Klausner, S. Ayehunie, B.A. Breyfogle, P.W. Wutz, L. Bacca, J. Kubilus, Organotypic human oral tissue models for toxicological studies, Toxicol. In Vitro 21 (2007) 938–949.
[51] L. Selvaratnam, A.T. Cruchley, H. Navsaria, P.W. Hertz, E.P. Haga-Pavli, I.M. Leigh, C.A. Squier, D.M. Williams, Permeability barrier properties of oral keratinocyte cultures: a model of intact human oral mucosa, Oral Dis. 7 (2001) 252–258.
[52] H. Kandarova, M. Liebsch, E. Genschow, I. Gerner, D. Traue, B. Slawik, H. Spielmann, Optimization of the EpiDerm protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests, ALTEX 21 (2004) 107–114.
[53] H. Kandarova, P. Hayden, M. Klausner, J. Kubilus, J. Sheasgreen, An Vitro Skin Irritation Test (SIT) using EpiDerm Reconstructed Human Epidermis (RHE) Model, 2006, JoVE. http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=1366, doi:10.3791/1366.
[54] G.H.V. Korver, R.J. Van de Stadt, G.P.J. Van Kampen, E. Kiljan, J.K. Van der Horst, Bovine sesamoid bones: a culture system for anatomically intact articular cartilage, *In Vitro* Cell Dev. Biol. 25 (1989) 1099–1106.
[55] G. Müller, A. Kramer, Effect of selected wound antiseptics on adult articular cartilage (bovine sesamoid bone) in the presence of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, J. Orthop. Res. 23 (2005) 127–133.