

**Mikrobiologische
Grundlagenuntersuchungen und *In-vivo*-
Wirksamkeitsstudien zur Optimierung der
Hautantiseptik**

Kumulative Dissertation

**zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
der Universität Hamburg
Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften**

vorgelegt von

Mirja Reichel

aus Hamburg

Hamburg 2010

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von April 2006 bis Mai 2010 bei der Firma BODE Chemie GmbH in Hamburg unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Günter Kampf und wurde durch Herrn Professor Dr. Peter Heisig am Institut für Pharmazie der Universität Hamburg begleitet.

1. Gutachter: Prof. Dr. P. Heisig
(Universität Hamburg, Abteilung für Pharmazeutische Biologie und Mikrobiologie)
2. Gutachter: Prof. Dr. G. Kampf
(BODE Chemie GmbH, Forschung & Entwicklung / Scientific Affairs)

Tag der Disputation: 14.07.2010

Markus
und meiner Familie
in Liebe gewidmet

**Kann es wohl einen größeren Widerspruch geben als eine
Spitalkrankheit? Ein Übel, welches man da erst bekommt, wo man
sein eigenes loszuwerden gedenkt?**

J.P. Frank

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Klinische Bedeutung und Prävention nosokomialer Infektionen	1
1.2	Die endogene Hautflora als potentielle Infektionsquelle.....	3
1.2.1	Unterschiede in der mikrobiellen Besiedelung der Haut und deren Bedeutung für die Hautantiseptik	5
1.2.2	Methoden zur Quantifizierung der Mikroorganismen auf der Haut	7
1.3	Hautantiseptik in der klinischen Praxis	8
1.3.1	Alkohole als Hautantiseptika	9
1.3.2	Reduktion der Rekolonisation der Haut durch Chlorhexidindigluconat	11
1.3.3	Weitere in der Hautantiseptik eingesetzte, nicht-flüchtige Wirkstoffe	15
1.3.3.1	Benzalkoniumchlorid.....	15
1.3.3.2	Mecetronium Etilsulfat	16
1.3.3.3	Octenidindihydrochlorid	17
1.3.3.4	Polihexanid	18
1.3.3.5	Polyvinylpyrrolidon-Iod	19
1.3.4	Richtlinien zur Prüfung der Wirksamkeit antiseptischer Verfahren.....	20
1.4	Einflussfaktoren für die Dichte der aeroben Hautflora.....	24
1.5	Neutralisierungsvalidierung für <i>In-vivo</i> -Wirksamkeitsstudien.....	25
1.6	Wirksamkeitsprüfung antiseptischer Lösungen auf klinisch relevanten Hautarealen	26
1.6.1	Identifizierung einer Alkohollösung mit einer optimalen Sofortwirkung zur Reduktion der Hautflora	27
1.6.2	Vergleich des optimierten Verfahrens mit dem Standardreferenzalkohol der DGHM	29
1.6.3	Hemmung der Rekolonisation der Hautflora.....	29
1.7	Die natürliche Immunabwehr der Haut und mögliche Wechselwirkungen mit Antiseptika.....	30
1.7.1	Wirkungsweise des humanen β -Defensins-3	31
1.7.2	Sensitivität von <i>Staphylococcus</i> spp. gegenüber humanem β -Defensin-3 nach Exposition gegenüber sub-lethalen Chlorhexidinkonzentrationen.....	32
1.8	Zielsetzung.....	33

2	Material & Methoden	35
2.1	Material.....	35
2.1.1	Bakterienstämme	35
2.1.2	Antiseptische Lösungen.....	35
2.1.3	Nährlösungen.....	36
2.1.4	Nährböden	36
2.1.5	Neutralisierungssubstanzen.....	37
2.1.6	Abstrichtupfer.....	37
2.1.7	Chemikalien für die Gram-Färbung / Mikroskopie.....	37
2.1.8	Stammhaltung.....	37
2.1.9	Weitere verwendete Materialien.....	37
2.2	Methoden.....	38
2.2.1	Metaanalyse zur Generierung einer quantitativen Kartierung der aeroben Hautflora	39
2.2.2	<i>In vivo</i> -Bestimmung der Dichte der Hautmikroflora.....	41
2.2.2.1	Probandenkollektiv	41
2.2.2.2	Durchführung der Versuche zur Bestimmung der Dichte der Hautmikroflora	42
2.2.2.3	Statistische Auswertung	43
2.2.2.4	Weitere verwendete Methoden.....	43
3	Ergebnisse	47
4	Diskussion.....	53
5	Schlussfolgerungen.....	73
6	Ausblick.....	75
	Zusammenfassung	79
	Summary	81
	Literaturverzeichnis	83
	Anhang.....	101
	Abbildungsverzeichnis.....	101
	Tabellenverzeichnis	101
	Abkürzungsverzeichnis.....	102
	Gefahrstoffverzeichnis.....	104
	Danksagung.....	106
	Lebenslauf.....	108
	Veröffentlichungen / Vorträge	109
	Angaben zu dem individuellen Beitrag zu jeder Publikation	111
	Versicherung an Eides statt.....	113
	Originalarbeiten	115

1 Einleitung

1.1 Klinische Bedeutung und Prävention nosokomialer Infektionen

Die klinische und epidemiologische Bedeutung der in Einrichtungen des Gesundheitswesens erworbenen, sogenannten nosokomialen Infektionen (NI), ist seit langem bekannt. Die Relevanz im klinischen Alltag nimmt immer weiter zu, da neue invasive diagnostische und therapeutische Verfahren zum Einsatz kommen und sich die Konstitution der Patienten verändert. Die Patienten werden immer älter und sind zum Teil bereits bei der Aufnahme in Gesundheitseinrichtungen multimorbide.

Die Infektionsraten unterscheiden sich, je nach Art der medizinischen Versorgung und der Art des Eingriffes, deutlich (64). So sind z. B. unter intensivmedizinischer Betreuung die Infektionsraten wesentlich höher als in der Gynäkologie (67, 201). Besonders wichtig ist, dass es sich insgesamt bei ca. 1/3 der NI um vermeidbare Infektionen handelt (65, 78), allerdings variiert die Rate der vermeidbaren NI beispielsweise je nach medizinischer Fachabteilung. Es konnte gezeigt werden dass mindestens 1/4 der NI auf Intensivstationen vermieden werden können (200).

Das primäre Ziel der weltweit ins Leben gerufenen Programme zur Vermeidung nosokomialer Infektionen ist der Schutz jedes Patienten, da sowohl die Morbiditätsrate als auch die Mortalitätsrate mit der Zahl nosokomialer Infektionen ansteigt. Daneben stehen allerdings auch immer mehr gesundheitsökonomische Aspekte im Fokus, da beispielsweise aus einem signifikant verlängerten Krankenhausaufenthalt oder Aufenthalt auf einer Intensivstation und der notwendigen Medikation sowie einer notwendigen Diagnostik erhebliche Kosten resultieren.

Die vier häufigsten Arten der NI sind katheterassoziierte Harnwegsinfektionen, postoperative Wundinfektionen; beatmungsassoziierte Pneumonien und

gefäßkatheterassoziierte Infektionen des Blutkreislaufs (113). Daraus resultiert die wichtige Bedeutung der Hautantiseptik, da hierbei zwei Arten von NI im Fokus stehen: postoperative Wundinfektionen und gefäßkatheterassoziierte Infektionen des Blutkreislaufs. Somit ist die effektive Hautantiseptik eine wichtige Präventionsmaßnahme für die Risikominimierung dieser beiden Infektionsarten.

Die „Centers for Disease Control and Prevention“ (CDC) geben an, dass rund 1,7 Millionen NI bei 99.000 Patienten jedes Jahr zum Tode führen. Davon sind 22 % durch postoperative Wundinfektionen und 14 % durch gefäßkatheterassoziierte Infektionen verursacht (45). Infektionen der Blutbahn waren für 30.665 Todesfälle verantwortlich und stellten damit die zweithäufigste Todesursache innerhalb der sogenannten „healthcare-associated infections“ (HCAI) dar (113). Untersuchungen aus England zeigten für den Zeitraum von 2008 bis 2009, dass rund 15 % der HCAI durch postoperative Wundinfektionen verursacht wurden (84) und dass daraus verlängerte Krankenhausaufenthalte resultieren, die zu einer Verdoppelung der Krankenhauskosten führten (177). Die epidemiologische Studie von Tacconelli *et al.* zeigte für vier Länder in Europa (Frankreich, Italien, Großbritannien und Deutschland), dass gefäßkatheterassoziierte Infektionen ebenfalls zu längeren Verweilzeiten in Krankenhäusern führten und dass daraus erhebliche Kosten resultierten (248).

Für die Prävention gefäßkatheterassoziierter Infektionen und postoperativer Wundinfektionen spielt, neben der konsequenten Umsetzung der Händehygiene die Hautantiseptik eine entscheidende Rolle, da bei diesen Infektionen die normale Hautflora des Patienten selbst eine Infektionsquelle darstellen kann. Allerdings kommen die Autoren einer Cochrane-Auswertung zu dem Schluss, dass aufgrund der geringen Zahl sowie der Qualität der publizierten Studien zu klinischen Endpunkten, wie z. B. die Reduktion postoperativer Wundinfektionen, bislang keine evidenzbasierte Aussage möglich ist, ob durch die Hautantiseptik eine Verminderung der Infektionsrate erzielt werden kann (48, 134, 135). Die Publikation zu dieser Auswertung stammt aus dem Jahr 2004; im letzten Jahr wurden dann erstmalig

Studien zur Hautantiseptik mit Chlorhexidin publiziert, in denen der Nutzen für die Patienten nachgewiesen wurde.

1.2 Die endogene Hautflora als potentielle Infektionsquelle

Die Haut dient unter anderem als natürliche Barriere, die den Körper schützend umgibt und für eine Regulation wichtiger physiologischer Parameter wie der Körpertemperatur verantwortlich ist. Für die Schutzfunktion der Haut spielt neben vielen weiteren Faktoren auch das natürliche Gleichgewicht der residenten Mikroorganismenflora eine wichtige Rolle. Dieses mikroökologische Gleichgewicht schützt den Körper vor der Besiedelung der Haut durch pathogene Mikroorganismen (38, 148, 264). Die auf der Haut natürlicherweise vorkommenden Mikroorganismen (residente Mikroflora) oder die vorübergehend auf der Haut befindlichen Mikroorganismen (transiente Mikroflora) stellen allerdings selbst unter bestimmten Umständen eine bedeutende Quelle für sogenannte endogene Infektionen dar.

Die meisten Bakterien leben auf der Haut innerhalb einer Schichttiefe von weniger als 0,3 mm (12) und sind vor allem im Stratum corneum, den Haarfollikeln sowie den Talgdrüsenöffnungen angesiedelt (siehe Abbildung 1) (136, 157, 193, 218). Es kommen in diesen Bereichen sowohl aerob als auch anaerob lebende Bakterien vor. Sowohl die qualitative als auch die quantitative Zusammensetzung der Mikroorganismen auf der Haut verändert sich ständig.

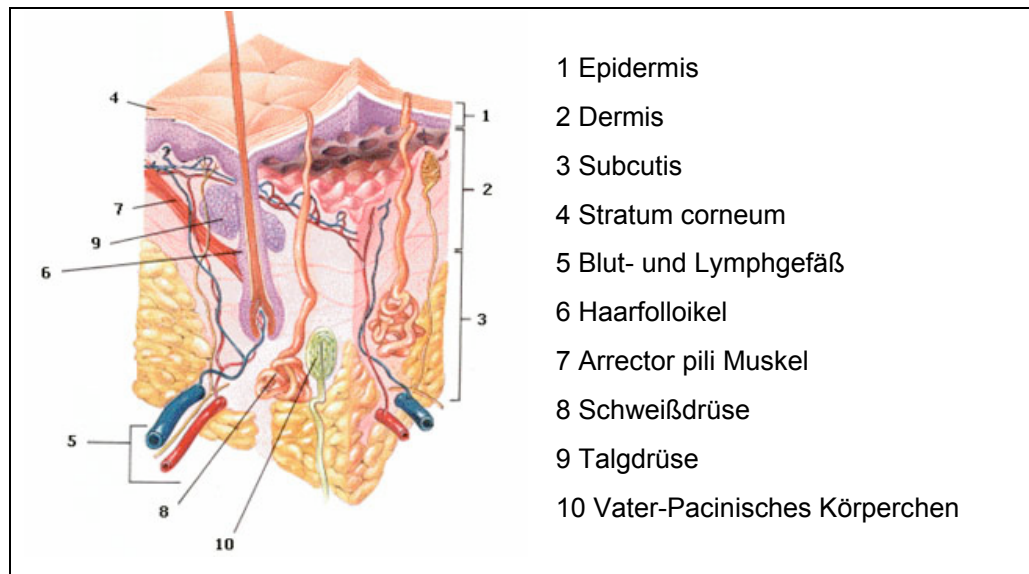


Abbildung 1: Querschnitt der menschlichen Haut (254)

Die Flora der gesunden Haut wird in zwei Gruppen eingeteilt; es werden die transienten und die residenten Mikroorganismen unterschieden (s. o.) (181, 197). Als residente Flora (Standortflora) bezeichnet man alle Mikroorganismen, die ständig über einen längeren Zeitraum auf der Haut vorkommen und sich dort vermehren. Diese Bakterien liegen nicht als Einzelzellen vor, sondern sind in der Regel in Form von Mikrokolonien angesiedelt. Zu den wichtigsten residenten Mikroorganismen gehören *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus* spec., *Corynebacterium* spec., *Propionibacterium* spec. und einige Pilzarten (34, 118). Der Einfluss äußerer Faktoren, wie z. B. Waschen oder Schwitzen auf die Zusammensetzung der residenten Mikroflora ist sehr gering (89).

Transiente Mikroorganismen („Anflugkeime“) kommen nicht dauerhaft auf der Haut vor, sondern gelangen über die Luft oder durch Kontakt auf die Hautoberfläche. Sie können in der Regel nicht dauerhaft auf der Haut überleben (118) und sind durch antiseptische bzw. hygienische Maßnahmen stark beeinflussbar. Zu dieser Gruppe gehören häufig aerobe Spezies. Ein wichtiger Vertreter ist *Staphylococcus aureus* der insbesondere für nosokomiale Infektionen wie z. B. Sepsis und Wundinfektionen eine hohe Bedeutung hat, da die Verbreitung und somit auch die Infektionsgefahr durch multiresistente Varianten wie methicillinresistente *S. aureus* (MRSA) stetig zunimmt (5, 172).

Die Grenze dieser Einteilung verläuft allerdings fließend und eine eindeutige Zuordnung zu einer der beiden Gruppen ist nicht immer möglich, zumal unter bestimmten Umständen oder bei bestimmten Personen transiente Mikroorganismen auch zu residenten Mikroorganismen werden können und es auch Mikroorganismen gibt, die nur zeitweilig zur residenten Flora gehören.

Sowohl transiente als auch residente Mikroorganismen können z. B. bei Verletzungen der Haut als Pathogene fungieren. In einer prospektiven Studie zur Häufigkeit von Infektionen nach 188 Cholecystectomien konnte nachgewiesen werden, dass eine hohe Korrelation zwischen der Ausgangskeimzahl der Haut und der Keimzahl in der entstandenen Wunde bestand. Damit einhergehend erfolgte der Nachweis, dass bei hohen Ausgangskeimzahlen auch eine erhöhte Infektionsgefahr besteht (261). Eine weitere Studie belegte, dass die meisten Infektionen nach Operationen durch endogene Bakterien, wie z. B. *S. epidermidis* verursacht werden (99). Für die gefäßkatheterassoziierten Infektionen und postoperativen Wundinfektionen sind in der Regel vor allem aerobe Mikroorganismen verantwortlich. Die bei diesen Infektionen am häufigsten gefundenen Bakterien sind koagulasenegative Staphylokokken, *Staphylococcus aureus* und gramnegative Bakterien (141, 169).

Da keine vollständige Eradikation der Mikroorganismen auf der Haut durch antiseptische Maßnahmen möglich ist, findet innerhalb von Stunden eine Rekolonisation der Hautflora statt. Es ist davon auszugehen, dass tiefer siedelnde Mikroorganismen ein Reservoir bilden, aus dem sich die residente Hautflora regenerieren kann (28, 85).

1.2.1 Unterschiede in der mikrobiellen Besiedelung der Haut und deren Bedeutung für die Hautantiseptik

Sowohl für die Qualität als auch die Quantität der Mikroorganismen auf der Haut konnten deutliche intra- und interindividuelle Unterschiede gezeigt werden (58, 63, 73, 74, 128, 235, 262, 263). Bei jedem Individuum ändert sich die Zusammensetzung der Hautflora ständig und es existieren starke intraindividuelle Unterschiede bezüglich der vorkommenden Spezies, aber auch der Zahl der Mikroorganismen auf

der Haut. Dabei spielen extrinsische und intrinsische Faktoren eine wichtige Rolle, wie beispielsweise der pH-Wert der Haut, das Alter und der Wasser- und Lipidgehalt (23, 24, 107, 196, 231). Je nach vorliegenden physiologischen Bedingungen sind z. B. in talgdrüsenarmen Regionen vermehrt *Staphylococcus* spp. und *Corynebakterien* zu finden; talgdrüsenreiche Gebiete hingegen sind vermehrt besiedelt durch *Propionibakterien* (17, 23, 132, 154). In talgdrüsenreichen Arealen sind in der Regel höhere Keimzahlen zu finden als in den talgdrüsenarmen Gebieten. Daneben sind ebenfalls zwischen feuchten und trockenen Hautarealen deutliche Unterschiede feststellbar. Die feuchten Hautareale wie beispielsweise die Achselhöhle sind stärker besiedelt als trockene Areale. Diese Erkenntnisse beeinflussten die Wahl der Testareale für die Methoden zur *In-vivo*-Wirksamkeitsuntersuchung der Hautantiseptika (siehe Kapitel 1.6).

Die Identität einer Vielzahl der auf der Haut vorkommenden Mikroorganismen ist nach wie vor noch nicht geklärt. Allerdings wurden inzwischen Projekte initiiert, z. B. das „Human Microbiome Project“, deren Ziel die Identifizierung der Mikroorganismen auf und in dem menschlichen Körper ist. Für die Hautantiseptik spielt diese Fragestellung allerdings nur eine untergeordnete Rolle, da die Präparate in der Regel ein sehr breites Wirkspektrum besitzen und somit die Quantität der Mikroorganismen im Vordergrund steht.

Um für die Prüfung der Wirksamkeit eines Antiseptikums möglichst reale Bedingungen zu schaffen, ist die Durchführung von *In-vivo*-Studien unerlässlich; die Zielgröße für derartige Studien stellt die Dichte der Mikroflora auf der Haut dar. Ein entscheidender Vorteil dieser Studien ist, dass sie die Berücksichtigung der intra- und interindividuellen Unterschiede ermöglichen, da diese einen entscheidenden Einfluss auf die antiseptische Wirksamkeit haben können. Darüber hinaus werden gleichzeitig physiologische Faktoren einbezogen, die ebenfalls die Wirksamkeit eines Antiseptikums beeinflussen können (siehe Abschnitt Originalarbeiten; Publikation „Alcohols for skin antiseptics at clinically relevant skin sites“).

1.2.2 Methoden zur Quantifizierung der Mikroorganismen auf der Haut

Zur Bestimmung der Mikroorganismen auf der Haut ist eine quantitative Überführung von der Haut in ein Nährmedium zur Kultivierung notwendig. Dazu wurden bereits verschiedene Methoden zur Quantifizierung der Hautflora etabliert. Keine der zur Verfügung stehenden Methoden ermöglicht allerdings eine Erfassung der gesamten Hautflora. Darüber hinaus hängt das Ergebnis einer Untersuchung sehr stark von der gewählten Methode ab. Studien, die auf verschiedenen Methoden zur Quantifizierung basieren, sind demnach nicht in jedem Fall miteinander vergleichbar.

Im Allgemeinen unterscheidet man folgende Methoden:

- Biopsiemethoden
- Abdruckmethoden
- Abrissmethoden
- Abstrichmethoden
- Spülmethoden

Die Biopsiemethoden, mit denen vermutlich am besten die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Mikroorganismen auf der Haut bestimmt werden kann, besitzen den Nachteil, dass sie nicht routinemäßig einsetzbar sind. Bei gesunden Probanden bergen diese Methoden ein nicht unerhebliches Risiko, z. B. Infektionen oder Narbenbildung zu verursachen. Weniger risikoreiche und schmerzhaftere Verfahren werden daher bevorzugt. Die Ergebnisse von Biopsien an Leichenhaut (220) zur Quantifizierung der Hautflora sind aufgrund der veränderten physiologischen Bedingungen nicht ohne Weiteres auf die Haut lebender Menschen übertragbar.

Abdruckmethoden liefern in der Regel die geringste Wiederfindungsrate an Mikroorganismen (167) und geben lediglich ein Bild der Besiedelung der oberen Hautschicht wieder. Diese Methoden bieten allerdings im Gegensatz zu Biopsiemethoden den Vorteil, dass sie einfach und routinemäßig einsetzbar sind und

die Zahl der Mikrokolonien bestimmt werden kann, da nicht davon auszugehen ist, dass durch den Abdruck eine Zerteilung der Kolonien erfolgt.

Mit Hilfe von Abrissmethoden lässt sich die Mikroflora unterschiedlicher Hautschichten darstellen. Somit bieten diese Methoden den Vorteil parallel zur Quantifizierung und Bestimmung der Mikroorganismen ihre Lokalisation feststellen zu können. Diese Methoden sind ebenfalls einfach und routinemäßig einsetzbar. Ein Nachteil gegenüber den Abdruckmethoden ist, dass die Mikroorganismen von dem Abrissmaterial für die Auswertung in ein Nährmedium quantitativ überführt werden müssen.

Die Ergebnisse der semiquantitative Tupferabstrichmethode decken sich sowohl in der Gesamtkeimzahl als auch in der prozentualen Verteilung der Bakterienspezies mit den Befunden der Spülmethode nach Williamson und Kligman (34, 35, 56, 222, 263). Beide Methoden besitzen jedoch im Gegensatz zu Abdruckverfahren den Nachteil, dass Mikrokolonien möglicherweise zerteilt werden und diese somit bei der Auswertung zu höheren Zahlen an koloniebildenden Einheiten (KBE) führen können. Da die Tupferabstrichmethode allerdings gut reproduzierbare Ergebnisse liefert (37, 222), einfach durchzuführen ist und ebenfalls in den Standardmethoden der DGHM vorgeschlagen wird, wurde diese Methode in allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien verwendet (siehe auch Abschnitt Originalarbeiten; „Alcohols for skin antisepsis at clinically relevant skin sites“; „Vergleich der Wirksamkeit von 89,5 % 1-Propanol bei kurzen Anwendungszeiten mit dem Referenzverfahren der DGHM-Methode“).

1.3 Hautantiseptik in der klinischen Praxis

Die Hautantiseptik bezeichnet generell alle desinfizierenden Maßnahmen auf belebten Körperoberflächen (75, 260). Das Ziel der prophylaktischen Hautantiseptik, die im Rahmen dieser Arbeit betrachtet wird, ist die Eliminierung der transienten und größtmögliche Reduktion der residenten Hautflora vor invasiven Eingriffen, um eine Prävention der Abszessbildung, der postoperativen Wundinfektionen sowie der

Septikämien zu erzielen. Zu diesem Zweck werden verschiedene biozide Wirkstoffe verwendet. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Wirkstoffe werden in den folgenden Unterkapiteln charakterisiert.

1.3.1 Alkohole als Hautantiseptika

In Europa werden für die Hautantiseptik am häufigsten die drei Alkohole Ethanol, *iso*-Propanol und *n*-Propanol und deren Gemische verwendet. Ihre chemischen Strukturformeln sind in Abbildung 2 dargestellt.

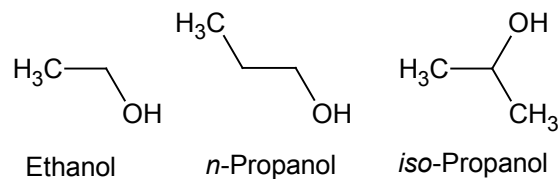


Abbildung 2: Chemische Strukturformeln der Alkohole

Alle drei Alkohole besitzen ein breites Wirkungsspektrum und sind in der Regel gut hautverträglich. Sie wirken bakterizid, fungizid, tuberkulozid und begrenzt viruzid (wirksam gegenüber behüllten Viren). Ethanol ist vor allem in hohen Konzentrationen $\geq 95\%$ auch in kurzen Einwirkzeiten von bis zu 2 Minuten gegen unbehüllte Viren wirksam. Die Propanole hingegen zeigen nur gegen wenige unbehüllte Viren wie z. B. dem Rotavirus eine Wirksamkeit. Generell sind Alkohole unwirksam gegenüber bakteriellen Sporen. Die wichtigsten Vorteile der Alkohole sind neben dem sehr schnellen Wirkungseintritt, die gute Verträglichkeit (fehlende Allergisierung) und die fehlende Resistenzbildung aufgrund des unspezifischen Wirkungsmechanismus.

Der Hauptmechanismus für die antibakterielle Wirkung der Alkohole ist die Denaturierung sowie die Koagulation der Plasmaproteine und damit einhergehend die Hemmung wichtiger Enzymfunktionen in der Bakterienzelle (98, 247). Des Weiteren wird als Wirkmechanismus die Zerstörung der Zytoplasmamembran diskutiert (96, 174). Alkohole besitzen einen nur einen geringen Eiweißfehler, d.h. organische Belastungen haben nur einen geringen Einfluss auf die Wirksamkeit.

Allgemein lässt sich feststellen, dass die antibakterielle Wirkung monovalenter Alkohole mit zunehmendem Siedepunkt sowie mit zunehmender Lipophilie steigt. Je nach Konstitution der chemischen Struktur der Alkohole ist eine Abnahme der Wirkung in folgender Reihenfolge zu erwarten (118):

primärer *n*-Alkohol > primärer *iso*-Alkohol > sekundärer Alkohol > tertiärer Alkohol.

Es fehlten jedoch bislang systematische Untersuchungen für die Hautantiseptik *in vivo*, in denen Ethanol, *iso*-Propanol und *n*-Propanol in bestimmten Konzentrationen auf unterschiedlichen Hautarealen miteinander verglichen werden. Die umfangreichsten Untersuchungen wurden von Christiansen *et al.* durchgeführt (34). Allerdings wurde die Wirksamkeit unterschiedlich konzentrierter Alkohole miteinander verglichen, so dass keine gezielte Aussage getroffen werden kann, welche Art des Alkohols bei vergleichbaren Konzentrationen überlegen ist. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist deshalb der systematische Vergleich der Wirksamkeit der Alkohole *in vivo* (siehe 1.8).

Neuere Studien belegen, dass eine Exposition gegenüber sehr geringen Alkoholkonzentrationen von 0,5-6% bei bestimmten Bakterienstämmen durch Regulationsmechanismen auf transkriptioneller Ebene dazu führen kann, dass unter anderem bei *Staphylococcus epidermidis* die Biofilmbildung angeregt wird. In der Literatur ist beschrieben, dass es bei *Staphylococcus epidermidis* in Gegenwart von Ethanol zu einer gesteigerten Expression des *ica*A₁BC-Operons kommt (115, 155). *Staphylococcus* spp. sind hauptverantwortlich für die gefäßkatheterassoziierten Infektionen und die Pathogenität von *S. epidermidis* wird durch die Fähigkeit der Biofilmbildung mitbestimmt. Die in der klinischen Praxis verwendeten Alkoholkonzentrationen liegen zwar deutlich höher als die hier angegebenen Konzentrationen, und es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung eines *S. epidermidis*-Biofilms mit 60 % *n*-Propanol dazu führte, dass keine lebenden Bakterienzellen mehr nachgewiesen werden konnten; die optische Dichte des Biofilms wurde durch den Alkohol jedoch nicht reduziert (180). Es ist jedoch nicht

auszuschließen, dass Bakterien auch gegenüber geringen Alkoholkonzentrationen auf der Haut exponiert sein können. Diese Erkenntnis könnte eine wichtige Rolle spielen, wenn die Hautbarriere permanent durchbrochen wird und durch medizinische Geräte wie z. B. Katheterschläuche eine Eintrittsmöglichkeit für Mikroorganismen in den Körper gegeben ist. Aus diesem Grund könnte die Supplementierung der alkoholischen Lösungen für die Katheterpflege aus mehreren Gründen für die Prävention von Infektionen hilfreich sein. Es wird eine schnelle Sofortwirkung durch den Alkohol erzielt, die Rekolonisation der Haut wird durch Zusatz von Chlorhexidin über einen Zeitraum von mehreren Tagen gehemmt (siehe Abschnitt Originalarbeiten; „Alcohols for skin antisepsis at clinically relevant skin sites“), darüber hinaus führt Chlorhexidin in einer Konzentration oberhalb der minimalen Hemmkonzentration (MHK) zu einer Abnahme einer möglichen Biofilmbildung (93, 115).

1.3.2 Reduktion der Rekolonisation der Haut durch Chlorhexidindigluconat

Chlorhexidindigluconat (CHG) (siehe Abbildung 3) ist ein nicht-flüchtiger Langzeitwirkstoff, der in der Hautantiseptik, aber auch in anderen Bereichen wie beispielsweise der Zahnheilkunde, eingesetzt wird. Der biozide Stoff Chlorhexidin ist aufgrund der basischen Eigenschaften als Salz stabil. Da unterschiedliche Salze des Chlorrhexidins in der Praxis zur Anwendung kommen; wird in dieser Arbeit auch von Chlorhexidin im Allgemeinen gesprochen.

Chlorhexidin gehört zur Gruppe der Biguanide, bindet stark an die Hautoberfläche und ist dadurch als Langzeitwirkstoff einsetzbar (remanenter Effekt). Allergien gegenüber Chlorhexidin sind vereinzelt in der Literatur beschrieben; in seltenen Fällen kommt es nach dem Einsatz von Chlorhexidin zu anaphylaktischen Reaktionen (13, 210).

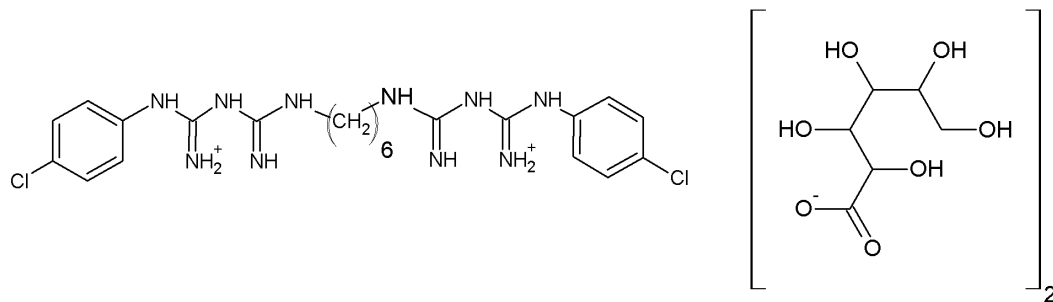


Abbildung 3: Strukturformel von Chlorhexidindigluconat

Chlorhexidin ist in Lösung relativ stabil, wenn es dunkel und möglichst kühl gelagert wird. Allerdings ist in der Literatur beschrieben, dass bei der Lagerung von Chlorhexidinlösungen bereits bei Raumtemperatur (20-25 °C) Zersetzungsprodukte nachgewiesen werden können (116, 192). Die Chlorhexidin-Hydrolyse folgt dabei einem linearen Trend und wird durch höhere Temperaturen sowie durch einen sauren pH-Wert (pH-Wert < 5) beschleunigt. Versuche zur Zersetzung des Wirkstoffes bei höheren Temperaturen, die z. B. bei dem Vorgang des Autoklavierens auftreten (100 °C), zeigten bereits einen 50 %igen CHG-Abbau innerhalb von 2 Tagen. Ebenfalls hat eine direkte Sonnenlichteinstrahlung Auswirkungen auf die Zersetzung des Wirkstoffes, es entstehen dabei praktisch identische Abbauprodukte im Vergleich zur thermischen Zersetzung. Die Hydrolyse des CHG, führt neben anderen Abbauprodukten zu *p*-Chloranilin (siehe Abbildung 4) (116, 192). Diese Substanz wird auch bei der Synthese von Chlorhexidinsalzen verwendet, und der zulässige Gehalt in arzneilich verwendeten Chlorhexidinlösungen ist aufgrund der toxischen Wirkungen limitiert (39). Dieses Abbauprodukt färbt chlorhexidinhaltige Lösungen rötlich und trägt wesentlich zur Toxizität von Chlorhexidin bei.

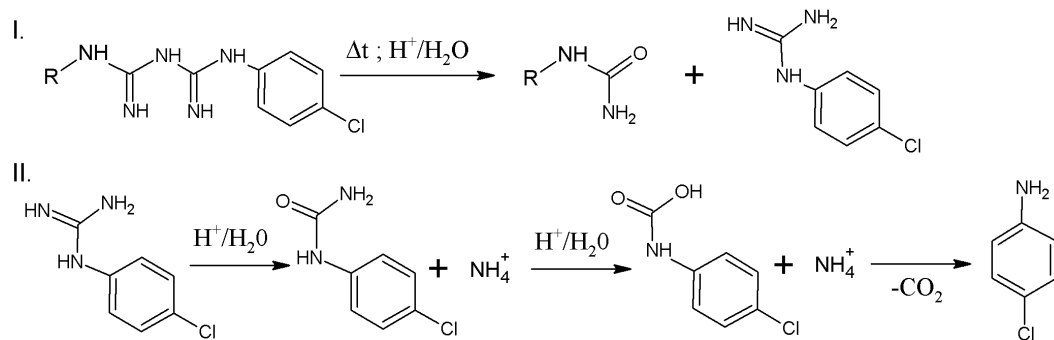


Abbildung 4: Hydrolyse von Chlorhexidindigluconat; neben weiteren Zersetzungsprodukten (nicht gezeigt) entsteht *p*-Chlorphenylharnstoff, das dann weiter zu *p*-Chloranilin zerfällt. Dies führt zu einer Verfärbung der Chlorhexidinlösung (192).

Je nach Mikroorganismus ist CHG konzentrationsabhängig bakteriostatisch beziehungsweise bakterizid wirksam. Gegenüber behüllten Viren und Hefepilzen ist dieser Wirkstoff ebenfalls wirksam; eine sporizide Wirksamkeit fehlt jedoch genau wie bei den Alkoholen (70, 102, 202, 203).

Die antimikrobielle Wirkung basiert auf einer Anlagerung an die Zelle und nachfolgender Interaktion mit der negativ geladenen Zellmembran. Die Zellmembran wird durch CHG geschädigt; dies führt zu einem Austritt zellulärer Bestandteile (153). Zudem werden membrangebundene und frei in der Zelle vorliegende Enzyme wie die Adenosyl-Triphosphatase inhibiert, das elektrochemische Gleichgewicht der Zelle wird gestört und es werden verschiedene Bestandteile des Zytoplasmas wie beispielsweise Adenosintriphosphat und Nukleinsäuren komplexiert. Bei gram-negativen Bakterien wird sowohl die äußere Membran als auch die Zytoplasmamembran durch CHG geschädigt; dabei werden so genannte „Blister“ gebildet (59, 185, 221). Chlorhexidin besitzt, wie beispielsweise PVP-Iod, einen Eiweißfehler (204).

Natürliche und erworben bakterielle Resistenzen gegenüber Chlorhexidin sowie eine Abnahme der Empfindlichkeit nach Exposition gegenüber sub-lethalen Konzentrationen („Adaption“) sind bei bestimmten Spezies in der Literatur beschrieben (158, 203, 249-251). Die Einstufung der Empfindlichkeit bzw. Resistenz ist allerdings bei bioziden Wirkstoffe, im Gegensatz zu den Antibiotika, aufgrund der fehlenden, international anerkannten, Definition von Grenzwerten („Breakpoints“)

bislang schwer. In der Literatur wird von Stämmen mit einer deutlich erhöhten minimalen Hemmkonzentration berichtet, diese werden teilweise von den Autoren selbst als „resistent“ eingestuft (68, 95, 112, 127, 149).

Für verschiedene MRSA-Stämme und gramnegative Bakterien konnte eine Abnahme der Empfindlichkeit bzw. von den Autoren beschriebene Resistenzen gegenüber Chlorhexidin nachgewiesen werden. Da die Resistenzgene teilweise auf Plasmiden zu finden sind (68, 112, 127), ist eine Übertragung auf andere Bakterien möglich. Bei verschiedenen Bakterienspezies wurde ein Zusammenhang zwischen Antibiotika- und Chlorhexidinresistenzen festgestellt; Kreuzresistenzen konnten ebenfalls nachgewiesen werden (149). Verschiedene Mechanismen werden in Bezug auf die Resistenzbildung gegenüber chlorhexidinhaltigen Präparaten diskutiert. Ein wichtiger Mechanismus der Resistenzbildung gegenüber Chlorhexidin ist die Induktion von multiple drug resistance (MDR) Effluxsystemen (z. B. MexCD-OprJ; CepA; MepA; QacA/B) (178, 179). Ein weiterer Mechanismus, der in Bezug auf Chlorhexidin-Resistenzen in der Literatur beschrieben ist, sind Veränderungen der Membranproteine und Lipopolysaccharide (68, 95). Außerdem wird die Ladung der Zellen durch Veränderungen der Lipoteichonsäure und Zellwandteichonsäurestrukturen diskutiert (26).

In der klinischen Praxis spielt Chlorhexidin vor allem für die Pflege von Gefäßkathetern eine große Rolle. Zum einen konnte gezeigt werden, dass die Katheterkolonisation nach der Verwendung von chlorhexidinhaltigen Antiseptika signifikant geringer ist als nach der Verwendung von Povidon-Iod haltigen Lösungen (110). Zum anderen konnten Maki *et al.* zeigen, dass durch die Verwendung einer chlorhexidinhaltigen Lösung auf der Haut an der Punktionsstelle die Rate an gefäßkatheterassozierten Infektionen gesenkt werden konnte (140). Darüber hinaus zeigte eine Metaanalyse die signifikante Überlegenheit der Reduktion der gefäßkatheterassozierten Infektionen der Blutbahn bei der Verwendung von Chlorhexidin anstelle des ebenfalls routinemäßig eingesetzten Povidon-Iods (33). Die CDC empfehlen aufgrund der wissenschaftlichen Datenlage die Verwendung einer 2 %igen Chlorhexidinlösung für die Katheterpflege aufgrund des hohen

Evidenzgrades durch vorliegende experimentelle, klinische und epidemiologische Studien. Im Januar 2010 ist darüber hinaus eine Studie von Darouiche *et al.* erschienen, die eine signifikante Überlegenheit einer alkoholischen Chlorhexidinlösung gegenüber einer Povidon-Iod-Lösung in Bezug auf den wichtigsten klinischen Endpunkt, die postoperative Wundinfektionen, innerhalb von 30 Tagen nach einer Operation belegt (40). Die Gesamtrate der postoperativen Wundinfektionen war in der Gruppe mit der alkoholischen Chlorhexidinlösung für die Hautantiseptik signifikant geringer als in der Povidon-Iod-Gruppe. Chlorhexidin war ebenfalls überlegen in der Prävention der oberflächlichen Infektionen und der tiefen Infektionen (141); kein Unterschied bestand jedoch bei den Infektionen mit Organbeteiligung (40). Darüber hinaus erschienen zwei weitere Studien, die ebenfalls eine Überlegenheit der Verwendung von Chlorhexidin in der präoperativen Hautantiseptik für die Patienten belegen (49, 173). Bislang wurde in einer Vielzahl der Studien die Wirksamkeit wässriger Chlorhexidinlösungen untersucht. Allerdings haben wässrige Lösungen den Nachteil dass, im Vergleich zu alkoholischen Lösungen, die antimikrobielle Wirkung erst mit Verzögerung eintritt.

Studien zum Vergleich der Wirksamkeit verschiedener Chlorhexidinkonzentrationen über mehrere Tage *in vivo* fehlten bislang in der Literatur für alkoholische Lösungen. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit die Hemmung der Rekolonisation der Hautflora nach Applikation einer optimierten Alkohollösung mit unterschiedlichen Chlorhexidinkonzentrationen über einen Zeitraum von 72 Stunden im Probandenversuch bestimmt (siehe Abschnitt Originalarbeiten; „Alcohols for skin antisepsis at clinically relevant skin sites“).

1.3.3 Weitere in der Hautantiseptik eingesetzte, nicht-flüchtige Wirkstoffe

1.3.3.1 Benzalkoniumchlorid

Benzalkoniumchlorid (BAC) gehört zur Gruppe der quaternären Ammoniumverbindungen und zählt somit zu den oberflächenaktiven Substanzen. Dieser Wirkstoff adsorbiert stark an Oberflächen, wie z. B. der Hautoberfläche. BAC wird sowohl als antimikrobieller Wirkstoff als auch als Konservierungsmittel unter anderem für Arzneimittel und Kosmetika eingesetzt.

Das Wirkungsspektrum dieses Stoffes umfasst Bakterien, Hefepilze und Dermatophyten. Dabei ist eine Konzentration von 0,1 % wirksam (bakteriostatische Wirkung ab 0,05 %) (223). Gegenüber Schimmelpilzen ist diese Substanz nicht ausreichend wirksam; ebenso zeigt BAC keine Wirksamkeit gegenüber bakteriellen Sporen (101).

Wie andere quarternäre Ammoniumverbindungen zählt auch BAC zu den membranaktiven Substanzen. Als Wirkmechanismus wird eine Schädigung der äußeren Zellmembran sowie der inneren Zytoplasmamembran angegeben, was zu einem Austritt zellulärer Bestandteile und zu einer Lyse der Zellen führt (101).

Eine Resistenzbildung gegenüber BAC ist prinzipiell möglich (226). Sowohl Adaption als auch Resistenzen und Kreuzresistenzen mit Chlorhexidin und verschiedenen Antibiotika wurden für BAC nachgewiesen (25, 224, 225), eine mögliche Erklärung für die Resistenzbildung könnte der breite Einsatz z. B. in einer Vielzahl von Kosmetika sein. Ein Resistenzmechanismus, der für diese Substanz von besonderer Bedeutung ist, ist das Ausschleusen des Wirkstoffes aus der Zelle durch QacA (29, 150, 156).

BAC besitzt bei einer Konzentration von 0,1 % bereits ein hautirritatives Potenzial und kann die Nasenschleimhaut schädigen (Einsatz als Konservierungsmittel in Nasentropfen) (10, 72). Außerdem konnte im tierexperimentellen Modell eine verzögerte Wundheilung nach der Anwendung von BAC belegt werden (101). Eine weitere Problematik hinsichtlich der Verträglichkeit besteht in der Sensibilisierungspotenz des Wirkstoffes (Sensibilisierungsrate in Vaseline 0,75 % und in Wasser 7,2 %) (213).

1.3.3.2 Mecetronium Etilsulfat

Der Wirkstoff Mecetronium Etilsulfat (MES) gehört, wie auch BAC, zur Substanzgruppe der quarternären Ammoniumverbindungen.

MES ist in einer Konzentration von 0,2 % gegen Bakterien und Hefepilze wirksam. Die Wirkungsweise unterscheidet sich dabei nicht von BAC (101).

Resistenzen gegenüber MES sind bislang nicht beschrieben, allerdings ist aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu BAC nicht auszuschließen, dass für diesen Wirkstoff gleiche bzw. ähnliche Resistenzmechanismen existieren.

MES ist gut hautverträglich und zeigt darüber hinaus durch die Herabsetzung der Hautrauigkeit hautprotektive Eigenschaften (183). Die Hautverträglichkeit einer 0,2 %igen alkoholischen MES-Lösung wurde im Epikutantest in einer Studie untersucht. Dabei zeigte sich für diese Lösung nur ein minimal irritatives Potenzial, das vergleichbar mit Wasser war. Es wurde in dieser Studie nicht untersucht, ob der Alkoholgehalt oder das MES für diese Reaktion verantwortlich war (227).

1.3.3.3 Octenidindihydrochlorid

Octenidindihydrochlorid ist ein kationischer Wirkstoff aus der Gruppe der Pyridinderivate. Dieser Wirkstoff zeichnet sich durch eine Bispyridinstruktur aus und findet neben der Anwendung als Hautantiseptikum auch Anwendung in der Schleimhautantiseptik sowie der Wundantiseptik. Es wird unter anderem in Kombination mit Alkoholen sowie Phenoxyethanol eingesetzt.

Octenidindihydrochlorid wirkt bakterizid, fungizid und begrenzt viruzid; eine Beeinträchtigung der Wirksamkeit durch Eiweiß oder Blut ist nicht nachgewiesen (kein Eiweißfehler). Eine sporizide Wirksamkeit besitzt Octenidindihydrochlorid nicht (216, 217).

Octenidindihydrochlorid entfaltet seine Wirksamkeit, wie auch andere kationische Wirkstoffe, durch eine Interaktion mit der Zellwand und Schädigung der Zytoplasmamembran der Bakterien. Die negative Ladung der Zellwand ist eine entscheidende Voraussetzung für die Wirksamkeit dieser Substanz. Des Weiteren wird als Wirkmechanismus postuliert, dass die Schädigung der Bakterienzellen zu einer erhöhten Phagozytose durch neutrophile Granulozyten führt (241).

Resistenzen gegenüber diesem Wirkstoff sind bislang noch nicht beschrieben. Untersuchungen an MRSA-Stämmen zeigten, dass es zwar zu einer Adaption kommen kann; eine stabile Resistenz konnte jedoch nicht gezeigt werden (1).

Der Hersteller eines Wundantiseptikums mit diesem Wirkstoff gibt an, dass *in vivo* für Octenidindihydrochlorid keine irritativen Eigenschaften auf der Haut, der Vaginalschleimhaut oder den Augen gefunden wurden. Darüber hinaus zeigte diese Substanz kein Sensibilisierungspotenzial (216).

1.3.3.4 Polihexanid

Bei Polihexanid handelt es sich um ein polymeres Biguanid, das üblicherweise als Rohstoff in Form einer 20 %igen Lösung angeboten wird. Es wird sowohl in Arzneimitteln als auch in Medizinprodukten und Kosmetika eingesetzt. In den letzten Jahren hat dieser Wirkstoff immer weiter an Bedeutung gewonnen und gilt heute neben Octenidindihydrochlorid als Mittel der Wahl für die Wundantiseptik.

Polihexanid ist in einer Konzentration von 0,2 % umfassend wirksam gegenüber Bakterien, des Weiteren konnte eine Wirksamkeit gegenüber Pilzen gezeigt werden (101, 119). *In vitro* wurde für Polihexanid eine Wirksamkeit gegenüber HIV nachgewiesen (122). Im Vergleich zu Iodophoren ist bei dieser Substanz allerdings mit einem langsameren Wirkungseintritt zu rechnen.

Der Wirkungsmechanismus dieses Wirkstoffes beruht auf einer Interaktion mit den Phospholipidstrukturen der Zellmembran und Erhöhung der Membranpermeabilität, so dass es durch einen Austritt von Kalium-Ionen zum Zelltod kommt (30, 31, 69). Ein Vorteil dieser Substanz gegenüber dem strukturähnlichen Chlorhexidin ist die fehlende *p*-Chloranilinbildung, da Polihexanid keinen Chlorbenzolsubstituenten enthält.

Bislang gibt es für Polihexanid keinen Hinweis auf eine mögliche Resistenzbildung.

Polihexanid ist sehr gut hautverträglich. Ein allergenes Potenzial konnte im tierexperimentellen Modell nicht nachgewiesen werden; in der Literatur gibt es jedoch vereinzelt Berichte zu anaphylaktischen Reaktionen nach Kontakt zu diesem Wirkstoff (105). Im Vergleich zu anderen Antiseptika, die zu einer Verzögerung der Wundheilung führen können, zeigte sich für Polihexanid, dass bei einer Anwendung

auf Wunden die Wundheilung sogar verbessert wurde (121). Daher ist der Wirkstoff Mittel der 1. Wahl bei schlecht heilenden, chronischen Wunden.

1.3.3.5 Polyvinylpyrrolidon-Iod

Im Polyvinylpyrrolidon-Iod (Synonyme: Povidon-Iod; PVP-Iod), das zur Gruppe der Iodophore gehört, ist Iod an das Makromolekül Polyvinylpyrrolidon gebunden. In wässriger Lösung kommt es zu einer Gleichgewichtseinstellung zwischen freiem und gebundenem Iod. Das gebundene Iod dient als Reservoir für die Freisetzung des aktiven, freien Iods. Neben der Hautantiseptik findet der Wirkstoff auch häufig Anwendung bei der Schleimhautantiseptik.

Bei einer freien Iod-Konzentration von 1-1,3 % ist PVP-Iod bakterizid wirksam. Eine schnelle Wirkung zeigt sich auch gegenüber Hefepilzen und Dermatophyten; der Wirkungseintritt gegenüber Schimmelpilzen setzt langsamer ein. Eine Vielzahl von Viren wird durch diesen Wirkstoff ebenfalls erfasst. Bei einer hohen Eiweiß- oder Blutbelastung können sich die notwendigen Einwirkzeiten verlängern (101).

Freies Iod reagiert mit Aminosäuren sowie ungesättigten Fettsäuren und führt in der Bakterienzelle zu einer Schädigung der Proteine und der räumlicher Strukturen der Zelle. Außerdem induziert Iod an der Zellwand die Porenbildung und führt somit zu einem Austritt zellulärer Bestandteile (119, 191).

Eine Resistenzbildung gegenüber diesem Wirkstoff ist aufgrund des Wirkungsmechanismus unwahrscheinlich (92, 125), dennoch gibt es Angaben in der Literatur, dass in seltenen Fällen plasmidische Resistenzen *in vitro* gefunden wurden (120).

Insgesamt handelt es sich bei PVP-Iod um eine gut verträgliche Substanz, so ist für die in den in der Antiseptik eingesetzten Anwendungskonzentrationen eine gute Haut- und Schleimhautverträglichkeit belegt. Bei hohen Konzentrationen (> 2 %) wurden im tierexperimentellen Modell Wundheilungsstörungen beobachtet. Im Gegensatz zu Octenidindihydrochlorid ist PVP-Iod knorpelverträglich. Bei der Anwendung von Iod-haltigen Arzneimitteln sind Schilddrüsenerkrankung immer zu

berücksichtigen (101). Die Substanz besitzt nur ein sehr geringes Allergisierungspotenzial, wobei in Einzelfällen anaphylaktische Reaktionen beschrieben sind (171).

1.3.4 Richtlinien zur Prüfung der Wirksamkeit antiseptischer Verfahren

Eine europäische Norm zur Prüfung von Hautantiseptika existiert, im Gegensatz zur Prüfung von Händedesinfektionsmitteln, bislang noch nicht. Für Deutschland entwickelte die DGHM „Standardmethoden der DGHM zur Prüfung chemischer Desinfektionsverfahren“, um unterschiedliche antimikrobielle Präparate bezüglich ihrer Wirksamkeit miteinander vergleichen zu können. Es werden sowohl *In-vitro*- als auch *In-vivo*-Prüfmethoden berücksichtigt. Für die *In-vivo*-Prüfung der Hautantiseptika wird ein praxisnaher Versuch mit Probanden vorgeschlagen (66). Einen ähnlichen Ansatz wählen die Food and Drug Administration (FDA) und die American Society for Testing and Materials (ASTM) in den USA. Diese drei experimentellen Methoden unterscheiden sich jedoch im Detail maßgeblich.

Der Wirksamkeitsnachweis beruht bei der Testmethode der DGHM sowie den amerikanischen Methoden auf der Reduktion der Hautfloradichte, die durch einen Vergleich der Hautfloradichte auf einem Areal vor der antiseptischen Maßnahme mit der Dichte nach der antiseptischen Maßnahme errechnet wird (7, 57, 190). Allerdings ist im Gegensatz zur deutschen Methode, bei der die Präparate mit dem Referenzalkohol (70% (V/V) *iso*-Propanol) verglichen werden, in der Methode der ASTM keine vergleichende Untersuchung vorgeschrieben; die FDA verlangt einen Vergleich mit einem bereits zugelassenen Hautantiseptikum.

Für die Wirksamkeitsprüfung für Antiseptika gegen die residente Hautflora unterteilt die DGHM die zu testenden Hautbereiche in einen talgdrüsenarmen Bereich (Oberarm) und ein talgdrüsenreiches Areal (Stirn). Diese Einteilung ist zurückzuführen auf die Ergebnisse der Untersuchungen von Christiansen *et al.* (36).

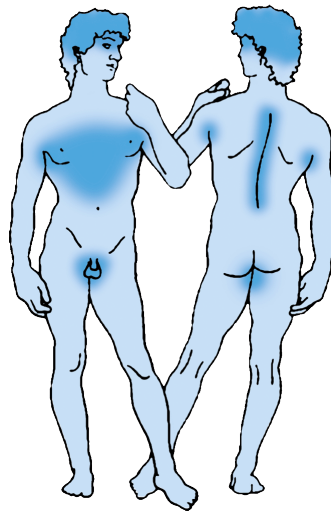


Abbildung 5: Darstellung der talgdrüsenarmen (hellblauen) und talgdrüsenreichen (dunkelblauen) Hautareale gemäß der Einteilung durch die DGHM (66)

In den USA hat die FDA eine andere Einteilung zur Prüfung der Wirksamkeit verschiedener Hautantiseptika gewählt. Die Prüfung wird anstatt auf talgdrüsenarmen bzw. -reichen Arealen (siehe Abbildung 5) auf feuchten und trockenen Bereichen durchgeführt. Diese Einteilung basiert auf Untersuchungen zur Floradichte auf okkludierter Haut (2, 9, 186). Hierbei wurde festgestellt, dass eine Okklusion der Haut über mehrere Tage eine qualitative und quantitative Veränderung der Hautflora, vermutlich bedingt durch eine Veränderung des pH-Wertes der Haut, zur Folge hatte. Die Bakteriendichte in feuchten, intertriginösen Bereichen, wie z. B. der Achselhöhle, der Leiste und der Gesäßfalte ist höher als die in trockenen exponierten Hautbereichen (19, 164).

Die FDA orientiert sich in den Anforderungen an die Testung von Hautantiseptika an den Standardmethoden der ASTM. In der „Standard Test Method for Evaluation of Preoperative, Precatheterization, or Preinjection Skin Preparations“ (ASTM E 1173-01) wird eine möglichst praxisnahe Testung gefordert. So wird dort beispielsweise bezüglich der zu testenden Hautareale empfohlen, feuchte und trockene Hautareale auszuwählen, die in einem Operationsgebiet liegen oder in denen Katheterisierungen vorgenommen werden, die also von klinischer Relevanz sind. Als bevorzugte Hautareale für die präoperative Antiseptik werden die Leistenregion und der untere Bauchbereich genannt; für die Antiseptik vor Katheterisierung werden neben der

Leistenregion die Armbeuge und die Subclavia-Region genannt. Im Gegensatz zu der deutschen Methode wird in den amerikanischen Methoden eine Mindestausgangskkeimzahl auf den Hautarealen gefordert. Damit erfolgt zwar der Nachweis der Wirksamkeit eines Antiseptikums bei einer bestimmten mikrobiologischen Belastung, allerdings spiegelt dies nicht das Bild aus der klinischen Praxis wieder, da eine Präselektion der Probanden erforderlich ist (57).

Die Einwirkzeiten für Hautantiseptika richten sich nach der physiologischen Beschaffenheit des zu behandelnden Hautareals. So gilt in Deutschland auch hier die Unterscheidung zwischen talgdrüsenreichen und talgdrüsenarmen Arealen. Eine Einwirkzeit von mindestens 10 Minuten war für alle Hautantiseptika bis Ende 2008 auf talgdrüsenreicher Haut vorgeschrieben, wobei die Haut durch ständige Neubenetzung mit dem Antiseptikum über die gesamte Einwirkzeit feucht zu halten ist. In der VAH-Liste sind erst seit Beginn des Jahres 2009 Hautantiseptika mit wesentlich kürzeren Einwirkzeiten mit aufgenommen worden (43), da in einer Studie z. B. gezeigt werden konnte, dass eine 85 %ige ethanolische Lösung (m/m) eine dem Referenzverfahren gleichwertige Reduktion in 2,5 Minuten erreichen kann (103) (siehe Abschnitt Originalarbeiten; „Vergleich der Wirksamkeit von 89,5 % 1-Propanol bei kurzen Anwendungszeiten mit dem Referenzverfahren der DGHM-Methode für die Hautantiseptik“). Für die meisten handelsüblichen Antiseptika wird basierend auf der Zulassung als Arzneimittel immer noch eine Einwirkzeit von mindestens 10 Minuten im Lumbalbereich verlangt. Bereits 1994 wurde in der Literatur beschrieben, dass die bisher von der DGHM vorgeschlagenen Einwirkzeiten an talgdrüsenreicher Haut eventuell zu verkürzen sind (117).

Auf talgdrüsenarmer Haut gilt eine Mindesteinwirkzeit von 15 Sekunden vor Injektionen und Punktionen und 1 Minute vor Punktionen von Gelenken, Körperhöhlen und Hohlorganen sowie vor Operationen. Neben der Sofortwirkung wird in der DGHM-Methode auch noch die Wirksamkeit nach 1 Minute (talgdrüsenarme Haut) und nach 30 Minuten talgdrüsenreiche Haut) bestimmt. Es ist jedoch fraglich, ob sich nach der Applikation bei rein alkoholischen Lösungen nach 30 Minuten eine deutliche Veränderung in der Dichte der Mikroflora zeigt, da

Christiansen *et al.* nach der Applikation verschiedener Antiseptika innerhalb von 24 h kaum Veränderungen der Reduktionsfaktoren feststellen konnten (37).

Die FDA und die ASTM legen keine definierten Einwirkzeiten bei der Wirksamkeitsprüfung fest, allerdings ist auf trockenen Hautarealen eine Probenahme nach 30 Sekunden Produktanwendung vorgeschrieben; somit ist die Einwirkzeit hier auf 30 s begrenzt. In beiden Methoden heißt es, dass die Behandlung gemäß der Produktauslobung bzw. gemäß den Vorgaben erfolgen soll. Für beide Testareale sind dann noch weitere Probennahmezeitpunkte vorgeschrieben, um einen weiteren Effekt bzw. die Rekolonisation der Hautflora zu messen (7, 57). Hierbei ist zu beachten, dass die Begriffe Einwirkzeit und Probennahmezeit in der Literatur zum Teil synonym verwendet werden; die Begriffe sollten allerdings klar voneinander abgegrenzt werden, um Missverständnisse zu vermeiden.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Bestimmung der optimalen Alkohollösung nur der Sofortwert bestimmt; damit sind Einwirkzeit und Probennahmezeit gleichzusetzen. Für die Langzeitwirkung des Chlorhexidins hingegen, war die Einwirkzeit auf maximal 3 Minuten begrenzt und die Probenahme erfolgte dann erst nach 72 h (siehe Abschnitt Originalarbeiten; Publikation „Alcohols for skin antiseptics at clinically relevant skin sites“).

Neben den unterschiedlichen Richtwerten für die Einwirkzeiten besteht die Herausforderung, dass in der alltäglichen Krankenhaushygiene häufig die auf den Präparaten angegebene minimale Einwirkzeit nicht eingehalten wird. Vor allem kann eine 10-minütige Einwirkzeit z. B. in Notfallsituationen nicht einhaltbar sein. Neben den Vorteilen im klinischen Alltag führen kürzere, wissenschaftlich begründete Einwirkzeiten zu einer erhöhten Akzeptanz beim Anwender und reduzieren die Kosten (siehe Abschnitt Originalarbeiten; „Vergleich der Wirksamkeit von 89,5 % 1-Propanol bei kurzen Anwendungszeiten mit dem Referenzverfahren der DGHM-Methode“).

Alle drei Methoden zur Prüfung von Antiseptika berücksichtigen die Notwendigkeit einer *In-vitro*-Neutralisierung der antimikrobiellen Wirkstoffe. Als Grundlage für Wirksamkeitsstudien, insbesondere mit nicht-flüchtigen Wirkstoffen, sollte eine Validierung der Neutralisierung durchgeführt werden, um die Wirksamkeit der Neutralisierung sowie die fehlende Toxizität der Neutralisierungssubstanzen unter praxisnahen Bedingungen zu testen (siehe auch 1.5). In der Standardmethode der DGHM wird bislang eine Validierung der Neutralisierung empfohlen, aber nicht zwingend gefordert. Dort steht lediglich, dass für jedes Produkt das geeignete Neutralisierungsmittel ausgewählt werden sollte (66).

1.4 Einflussfaktoren für die Dichte der aeroben Hautflora

Studien, deren Ergebnisse auf der Quantifizierung der Hautflora basieren, werden in der Regel auf unterschiedlichen Testarealen durchgeführt. Für die Wirksamkeitstestung für Hautantiseptika werden je nach verwendeter Methode die Präparate jeweils auf ganz unterschiedlichen Hautarealen getestet (7, 57, 66). Dies ist von entscheidender Bedeutung, da die Wahl des Hautareals maßgeblich das Studienergebnis beeinflussen kann (siehe Abschnitt Originalarbeiten; Publikation „Alcohols for skin antiseptics at clinically relevant skin sites“).

In der Literatur existieren zwar bereits Studien zur Qualität und Quantität der Hautflora, allerdings besteht eine Einschränkung darin, dass die Studienergebnisse häufig durch die Verwendung unterschiedlicher Methoden zur Hautkeimgewinnung nicht vergleichbar sind (80). Außerdem ist eine Vielzahl der Studien schon mehrere Jahrzehnte alt; inzwischen hat sich z. B. die Bekleidung vermutlich auch das Hygieneverhalten der Menschen geändert. Die Ergebnisse der älteren Studien werden häufig nicht nachvollziehbar dargestellt und die verwendeten Methoden werden häufig nicht nachvollziehbar beschrieben. Es fehlen neuere Studien in der Literatur, in denen eine reproduzierbare Methodenbeschreibung publiziert ist und eine klare sowie eindeutige Ergebnisdarstellung vorliegt.

Eine Kartierung der Hautfloradichte ist hilfreich, um beispielsweise für antimikrobielle Studien geeignete Testareale auswählen zu können. Für einen

Vergleich der Quantität der Mikroflora auf unterschiedlichen Hautarealen, wurde vor Beginn der *In-vivo*-Untersuchungen in einem ersten Schritt eine Metaanalyse zur Quantifizierung der aeroben Hautflora durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Metaanalyse bildeten die Basis für die Identifizierung vier klinisch relevanter Hautareale mit unterschiedlicher physiologischer Beschaffenheit der Haut sowie unterschiedlicher Dichte der Mikroflora. Nach Auswertung der Metaanalyse erwiesen sich die Stirn, das Abdomen, der Nacken und der Lumbalbereich als geeignete Testareale für die anschließenden *In-vivo*-Studien.

1.5 Neutralisierungsvalidierung für *In-vivo*-Wirksamkeitsstudien

Für Wirksamkeitsuntersuchungen für Antiseptika und Desinfektionsmittel ist es erforderlich, die Zahl der noch lebenden Mikroorganismen nach einer definierten Kontaktzeit mit den antimikrobiellen Wirkstoffen zu bestimmen. Es kann in der Regel aufgrund methodischer Voraussetzungen nicht ausgeschlossen werden, dass Wirkstoffspuren verschleppt werden, die dann zu einer weiteren Reduktion der lebensfähigen Mikroorganismen bei der Verarbeitung *in vitro* führen. Da die Zielgröße in Wirksamkeitsuntersuchungen die Reduktion der Mikroorganismen auf der Haut innerhalb einer vorgegebenen Einwirkzeit ist, ist eine weitere Reduktion im Probenröhrchen nicht gewünscht. Eine fehlende Inaktivierung von Wirkstoffen *in vitro* führt zu einem systematischen Fehler, da die gemessene Gesamtreduktion größer ist als die Reduktion auf der Haut nach definierter Einwirkzeit. Der Vorgang der Inaktivierung von Wirkstoffresten wird in der Fachliteratur auch als Neutralisierung bezeichnet. Die Neutralisierung ist vor allem bei Testung nicht-flüchtiger Wirkstoffe unerlässlich, um falsch-positive Wirksamkeitsergebnisse zu vermeiden.

So konnte für Wirksamkeitsstudien mit Chlorhexidin gezeigt werden, dass die Wiederfindungsrate für Mikroorganismen in Studien ohne Neutralisierung deutlich niedriger lag im Vergleich zu Studien mit einer Neutralisierung des Wirkstoffes nach der vorgegebenen Einwirkzeit (104, 258). Obwohl das Phänomen seit langem

bekannt ist, werden nach wie vor Studien publiziert, in denen keine validierte Neutralisierung nach Abschluss der Anwendung eines Antiseptikums erfolgte und somit nicht sichergestellt ist, dass die Daten zur Wirksamkeit valide sind.

Bei der Neutralisierungsvalidierung müssen verschiedene Aspekte berücksichtigt werden, die für die Eignung eines Neutralisierungsmittels entscheidend sind. Neben der Prüfung der Wirksamkeit der Inaktivierung der Wirkstoffreste ist es entscheidend, dass die Neutralisierungssubstanzen selbst nicht toxisch auf die Mikroorganismen wirken, dass die Testbedingungen in der Validierung keinen Einfluss auf das Ergebnis haben und dass nachgewiesen wird, dass die antiseptische Lösung eine antimikrobielle Wirksamkeit besitzt.

Um ein valides Ergebnis zu generieren, sollten die Bedingungen für den Test der Neutralisierungssubstanzen nach Möglichkeit genauso gewählt werden wie später in der Wirksamkeitsuntersuchung. Wie in der Publikation zur Neutralisierungsvalidierung (siehe Abschnitt Originalarbeiten; Publikation „Pitfalls in efficacy testing – how important is the validation of neutralization of chlorhexidine digluconate?“) gezeigt, können dabei z. B. die Art der gewählten Mikroorganismen, die Verwendung von Trägermaterialien oder die Lagerbedingungen vor der Ausplattierung einen entscheidenden Einfluss haben.

Für die Neutralisierungsvalidierung existiert sowohl eine ASTM-Methode; darüber hinaus ist die Neutralisierungsvalidierung in einer europäischen Norm u. a. beschrieben (6, 52). Neben der Effektivität der Neutralisierungssubstanzen wird in beiden Methoden untersucht, ob die Substanzen selbst gegenüber den Mikroorganismen toxisch wirken.

1.6 Wirksamkeitsprüfung antiseptischer Lösungen auf klinisch relevanten Hautarealen

In Deutschland sind diverse alkoholische Handelspräparate zur Hautantiseptik als Arzneimittel auf dem Markt. Bei den Produkten handelt es sich entweder um

monoalkoholische Präparate oder Präparate mit einem Alkoholgemisch, deren Wirksamkeit in der Regel nach den Standardmethoden der DGHM im Rahmen des Zulassungsverfahrens belegt werden musste. Allerdings sind die Präparate, wie im Abschnitt 1.3.4 beschrieben, somit in ihrer Wirksamkeit nur gegen 70 %igen *iso*-Propanol verglichen worden.

Ob es sich bei dem Referenzalkohol allerdings um den bestwirksamen Alkohol handelt, ist fraglich, denn es gibt Hinweise in der Literatur, dass mit *n*-Propanol eine bessere Reduktion der residenten Hautflora erzielt werden kann, bzw. niedrigere Konzentrationen oder Einwirkzeiten für diese Art des Alkohols ausreichend sind (118). Belastbare Daten im Vergleich zu den anderen Alkoholen aus *In-vivo*-Studien liegen dazu bislang allerdings nicht vor. Um die Effektivität von 70 %igem *iso*-Propanol gegenüber der Effektivität der anderen beiden standardmäßig verwendeten Alkohole einschätzen zu können, und damit auch die Wirksamkeit alkoholischer Hautantiseptika besser einschätzen zu können, sind systematische Untersuchungen notwendig.

1.6.1 Identifizierung einer Alkohollösung mit einer optimalen Sofortwirkung zur Reduktion der Hautflora

Die Wirksamkeit der Hautantiseptika wird durch drei Variablen (Art des Alkohols, Konzentration der alkoholischen Lösung und Einwirkzeit) beeinflusst. Es existieren zwar eine Reihe publizierter Daten zur Wirksamkeit alkoholischer Lösungen auf die residente Hautflora, doch fehlten bislang systematische Untersuchungen, welchen Einfluss auf die Wirksamkeit jede dieser Variablen ausübt, da es sich in den publizierten Studien um isolierte Betrachtungen handelte.

(1) Art des Alkohols:

Es gibt es Hinweise in der Literatur, dass gegenüber der residenten Flora der Hände (chirurgische Händedesinfektion) *n*-Propanol eine bessere Wirksamkeit zeigt als *iso*-Propanol oder Ethanol (102, 243).

(2) Konzentration der alkoholischen Lösung:

Generell zeigen alkoholische Lösungen mit höheren Alkoholkonzentrationen bis zu 95 % eine bessere Wirksamkeit im Vergleich zu Lösungen mit einem niedrigen Alkoholgehalt. Allerdings ist aus Studien im Bereich der Händehygiene bekannt, dass je nach Art des verwendeten Alkohols auch niedrigere Konzentrationen eine vergleichbare Wirksamkeit erzielen kann (102). So konnten Suchomel *et al.* zeigen, dass 60 %iger *n*-Propanol gegenüber der residenten Händeflora eine Wirksamkeit zeigte, die der Wirksamkeit des 70 %igen *iso*-Propanols überlegen war (243).

(3) Einwirkzeit

Die Einwirkzeit ist ebenfalls für die Wirksamkeit eines Antiseptikums entscheidend. So zeigen mehrere Studien, dass bei einer verlängerten Einwirkzeit eine bessere Wirksamkeit zu erzielen ist. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass in der klinischen Praxis die Einwirkzeit nicht beliebig verlängert werden kann und somit ein Konsens zwischen vertretbarer Einwirkzeit und Effektivität des Antiseptikums gefunden werden muss.

Die Frage, welche der Variablen eine entscheidende Rolle spielt und welche einen nachrangigen Effekt ausübt, wurde bislang in der Fachliteratur für Hautantiseptika nicht beantwortet. Die wohl bislang umfangreichsten Untersuchungen wurden von Christiansen durchgeführt (37); allerdings wurden auch hier die drei Alkohole jeweils nur in unterschiedlichen Konzentrationen in ihrer Wirksamkeit miteinander verglichen. Zur Klärung der Frage ist die Ermittlung einer Rangfolge der Einflussgrößen für die Hautantiseptik notwendig (siehe Abschnitt Originalarbeiten; Publikation „Alcohols for skin antisepsis at clinically relevant skin sites“). Diese Rangfolge zeigt die Gewichtung der einzelnen Parameter für die Reduktion der residenten Hautflora an; also ob eine bessere Wirksamkeit z. B. durch die Verwendung einer bestimmten Art des Alkohols eher zu erzielen ist als durch eine bestimmte Alkoholkonzentration.

1.6.2 Vergleich des optimierten Verfahrens mit dem Standardreferenzalkohol der DGHM

Um die Wirksamkeit einer optimierten alkoholischen Lösung mit der Wirksamkeit des DGHM-Referenzverfahrens vergleichen zu können sind Versuche im direkten Überkreuz-Design erforderlich.

Es ist davon auszugehen, dass mit einer optimierten alkoholischen Lösung, eine dem Referenzverfahren der DGHM nicht unterlegene Wirksamkeit bereits bei Einwirkzeiten deutlich unter 10 Minuten erreicht werden kann (103).

Weitere interessante Fragestellungen sind neben der Prüfung auf Nicht-Unterlegenheit, die Prüfung auf Überlegenheit gegenüber dem Referenzverfahren bei kürzeren Einwirkzeiten und die Ermittlung der Grenze für die Einwirkzeit, für die Nicht-Unterlegenheit noch nachgewiesen werden kann.

1.6.3 Hemmung der Rekolonisation der Hautflora

Wird bei einem Patienten während einer medizinischen Behandlung ein Gefäßkatheter verwendet, ist die Hautbarriere über einen längeren Zeitraum durchbrochen und es besteht eine direkte Verbindung über medizinische Hilfsmittel ins Gefäßsystem des Körpers. Zur Vermeidung von Infektionen an der Kathetereintrittsstelle oder durch eine Kolonisierung des Katheters, die eine Bakteriämie bzw. Sepsis zur Folge haben kann, ist eine Reduktion der mikrobiellen Flora erforderlich. Neben einer schnellen Sofortwirkung, die im Rahmen der Katheterisierung entscheidend ist, ist eine Hemmung der Rekolonisation der Hautflora wichtig.

In der klinischen Praxis ist es inzwischen Standard, bei Gefäßkathetern transparente Verbände zu verwenden, damit auch ohne einen täglichen Verbandwechsel erste Anzeichen einer lokalen Infektion erkannt werden können. Dies ermöglicht ein langes Intervall zwischen zwei Verbandwechseln, das in der klinischen Praxis in der Regel zwischen 3-7 Tagen liegt. Da das Hautareal um die Kathetereintrittsstelle in der

Regel nur bei einem Verbandwechsel antiseptisch behandelt wird, ist eine Hemmung der Rekolonisation über einen Zeitraum von mehreren Tagen erforderlich.

Auch zur Vermeidung postoperativer Wundinfektionen kann es vorteilhaft sein, vor und nach dem operativen Eingriff ein Hautantiseptikum zu verwenden, das sowohl eine hervorragende Sofortwirkung als auch eine gute Langzeitwirkung ausübt. Eine Kombination aus optimalem Alkohol mit der bestwirksamen CHG-Konzentration bietet die Möglichkeit, bei kurzen Einwirkzeiten eine größtmögliche Reduktion der Hautflora und eine Suppression der Rekolonisation über einen längeren Zeitraum zu erzielen und erfüllt somit die Kriterien für die Prävention gefäßkatheterassoziierter Infektionen und postoperativer Wundinfektionen (33, 40, 140).

Da Chlorhexidin vor allem in den USA für die Hautantiseptik verwendet wird und *n*-Propanol aufgrund der fehlenden Monographie von der FDA für die Hautantiseptik kein als grundsätzlich sicherer und wirksamer Wirkstoff anerkannt ist, gibt es in der Literatur hauptsächlich Studien zur Wirksamkeit von Chlorhexidin in *iso*-Propanol. Allerdings fehlen auch hier systematische Untersuchungen zum Vergleich der Wirksamkeit unterschiedlicher Chlorhexidinkonzentrationen. Im Gegensatz zu den USA ist *n*-Propanol in Europa ein anerkannter, monographierter Wirkstoff und kann deshalb für die Anwendung auf der Haut eingesetzt werden (39).

Für ein monoalkoholisches Hautantiseptikum, bestehend aus *n*-Propanol in Kombination mit unterschiedlichen Chlorhexidinkonzentrationen lagen bislang keine Wirksamkeitsdaten aus der Literatur vor. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte nach der Identifizierung der Alkohollösung mit der besten Sofortwirkung eine Optimierung der Langzeitwirkung durch Zusatz von Chlorhexidindigluconat.

1.7 Die natürliche Immunabwehr der Haut und mögliche Wechselwirkungen mit Antiseptika

Zur Erhaltung des mikroökologischen Gleichgewichts auf der Haut ist eine Vielzahl von Abwehrmechanismen erforderlich. Eine besondere Rolle spielen hierbei die auf

der Haut vorkommenden induzierbar beziehungsweise konstitutiv exprimierten kationischen antimikrobiellen Peptide (CAMP), die als endogene Antibiotika fungieren und in der Lage sind, Mikroorganismen effektiv abzutöten. Durch den Kontakt zwischen körpereigenen Zellen mit bakteriellen Signalmolekülen, wie z. B. Lipopolysacchariden, werden über verschiedene Signalkaskaden die Abwehrmechanismen stimuliert. Dabei spielen unter anderem membranständige Toll-like Rezeptoren eine wichtige Rolle, deren Stimulation zur Expression von CAMP in Granulozyten, Makrophagen und Epithelzellen führt (60). Somit vernetzen CAMP die unspezifische mit der spezifischen Abwehr des Körpers.

Wichtige Vertreter aus der Gruppe der CAMPs sind die antimikrobiell wirksamen, kationischen humanen beta-Defensine, die in verschiedenen Organen wie dem Darm, den Atemwegen und der Haut gebildet werden. Neben ihrer direkten antimikrobiellen Wirkung, fungieren sie als Signalmoleküle, um Kaskaden der adaptiven Immunantwort in Gang zu setzen. Ein beta-Defensin mit besonders breitem Wirkungsspektrum ist das durch Keratinozyten exprimierte humane beta-Defensin-3 (hBD-3) (238), dessen induzierbare Expression sowohl bei entzündlichen Hauterkrankungen als auch nach Kontakt mit Bakterien und bei sterilen Hautverletzungen nachgewiesen werden konnte (44, 79, 212). Im Gegensatz zu hBD-1 und -2 zeigt es eine gute Wirksamkeiten sowohl gegenüber grampositiven als auch gegenüber gramnegativen Bakterien. Das Wirkspektrum umfasst neben *Staphylococcus aureus* (inklusive MRSA) (79, 111), einem Hauptverursacher nosokomialer Infektionen (141, 168), auch andere multiresistente Bakterien wie beispielsweise vancomycinresistente Enterokokken (VRE) (79, 138).

1.7.1 Wirkungsweise des humanen β -Defensins-3

Der antimikrobielle Wirkungsmechanismus des hBD-3 auf Bakterienzellen ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird eine membranschädigende Wirkung und Porenbildung diskutiert; wobei in einer neueren Arbeit als Wirkungsmechanismus auch diskutiert wird, dass hBD-3 den Ablauf der an / in der Mikroorganismenmembran stattfindenden Prozesse (v. a. der Zellwandbiosynthese) stört (208, 209). Neben einer direkten antimikrobiellen Wirkung, dient hBD-3 als

Signalmolekül und besitzt eine chemotaktische Wirkung. So erfolgt aufgrund der Expression von hBD-3 z. B. eine Rekrutierung von dendritischen Zellen und T-Zellen (44, 62).

1.7.2 Sensitivität von *Staphylococcus* spp. gegenüber humanem β -Defensin-3 nach Exposition gegenüber sub-lethalen Chlorhexidinkonzentrationen

Eine synergistische Wirkung von Chlorhexidin und hBD-3 gegenüber oralen Bakterien wurde durch Maisetta *et al.* nachgewiesen (139). Für biozide Wirkstoffe wie Chlorhexidin ist bekannt, dass eine Exposition gegenüber sub-lethalen Konzentration zu einer Abschwächung der Empfindlichkeit bei Bakterien führen kann und es damit einhergehend auch zu einer veränderten Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika und bioziden Wirkstoffen kommen kann (21, 27, 151, 205, 244, 250, 252, 259). Aufgrund der kationischen Struktur und der vergleichbaren Wirkungsweise der beiden Substanzen ist es durchaus vorstellbar, dass eine Exposition gegenüber sub-lethalen Chlorhexidinkonzentrationen ebenfalls zu einer Veränderung der Empfindlichkeit der Zellen gegenüber hBD-3 führen kann. Diese Theorie wird durch die Hypothese gestützt, dass für beide kationischen Wirkstoffe vergleichbare Resistenzmechanismen existieren wie beispielsweise eine Veränderung der Ladung auf der Zelloberfläche oder die Expression von Effluxpumpen (siehe Abschnitt Originalarbeiten; Publikation „Skin bacteria after chlorhexidine exposure – Is there a difference in response to human β -Defensin-3).

Untersuchungen zu einer möglichen Veränderung der bakteriellen Empfindlichkeit gegenüber hBD-3 nach Chlorhexidinexposition fehlen bislang in der Literatur. Für Chlorhexidin konnte eine überlegene Wirksamkeit in der Katheterpflege nachgewiesen werden (siehe 1.3.2), und es wurde gezeigt, dass dieser Wirkstoff über mehrere Tage auf der Haut verbleiben kann (z. B. unter einem Verband, da der Wirkstoff an diesen Stellen nicht abgewaschen wird). Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass die hBD-3-Konzentration auf der Haut nach der Durchtrennung der Hautbarriere ansteigt (239). Somit ist die Fragestellung von klinischer Relevanz, da davon auszugehen ist, dass bei einer Verwendung von Chlorhexidin während der

Katheterisierung, beide Substanzen parallel an der Punktionsstelle auf der Haut vorkommen.

1.8 Zielsetzung

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit stellt die Optimierung der Hautantiseptik dar. Als Grundlage für *In-vivo*-Wirksamkeitsstudien verschiedener antiseptischer Lösungen soll zunächst eine Metaanalyse zur Quantifizierung und Kartierung der aeroben Hautflora des menschlichen Körpers durchgeführt werden, anhand derer die Auswahl geeigneter, klinisch relevanter Hautareale erfolgt.

Die Quantifizierung der aeroben Hautflora ist das primäre Ziel der ersten *In-vivo*-Studie. Darüber hinaus stellen sowohl die Identifizierung von Einflussgrößen für die Quantität der aeroben Hautflora als auch die Etablierung eines optimierten Verfahrens zur Hautantiseptik weitere wichtige Ziele dieser Arbeit dar. Das optimierte Verfahren soll aus einer Kombination der bestwirksamen Alkohollösung und der optimalen Einwirkzeit bestehen. Zusätzlich sollte eine Rangfolge der wichtigsten Einflussgrößen für die Hautantiseptik identifiziert werden.

Das optimierte Verfahren ist in einer Nicht-Unterlegenheitsuntersuchung (non-inferiority test) *in vivo* gegen das von der DGHM vorgegebene Referenzverfahren zu testen. Dabei ist das Ziel, bei einem Nachweis der Nicht-Unterlegenheit des neu etablierten Verfahrens mit einer signifikant kürzeren Einwirkzeit eine gleichwertige Reduktion der Hautflora zu erreichen und damit eine zeitsparende Alternative für die klinische Praxis bei vergleichbarem Schutz des Patienten vor Infektionen zu ermöglichen. Des Weiteren ist anhand dieser Untersuchungen festzustellen, welche Einwirkzeit die Grenze für den Nachweis der Nicht-Unterlegenheit darstellt, um so für die bestwirksame Alkohollösung eine evidenzbasierte Mindesteinwirkzeit zu definieren.

Als Basis für eine *In-vivo*-Langzeituntersuchung sollte die Neutralisierung des ausgewählten nicht-flüchtigen Wirkstoffs Chlorhexidindigluconat *in vitro* erfolgen,

da diese essentieller Bestandteil von Wirksamkeitsuntersuchungen von Antiseptika/Desinfektionsmitteln mit Langzeiteffekt ist, um falsch-positive Ergebnisse zu verhindern. Primäres Ziel ist dabei die Identifizierung geeigneter Neutralisierungssubstanzen. Des Weiteren sind jedoch zusätzlich relevante Faktoren bezüglich der Neutralisierungsvalidierung zu bestimmen, die für die Generierung valider Wirksamkeitsdaten essentiell sind. Diese Faktoren sind z. B. die Standzeit der Lösung, die Verwendung von Trägermaterialien und die Wahl der Mikroorganismen. Der Effekt von CHG auf die Rekolonisation der Haut unter einer sterilen Abdeckung über 72 h zur Optimierung des bestwirksamen antiseptischen Verfahrens ist auf zwei Hautarealen *in vivo* zu untersuchen, da z. B. bei der Katheterpflege sowohl eine schnelle Sofortwirkung des Antiseptikums als auch eine Verminderung der Rekolonisation der Haut über mehrere Tage von entscheidender Bedeutung ist.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit besteht darin, einen möglichen Einfluss einer Exposition verschiedener klinischer *Staphylococcus* spp.-Isolate gegenüber sublethalen CHG-Konzentrationen über drei Tage, auf die Sensitivität gegenüber humanem β -Defensin-3 bei zu analysieren.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Corynebacterium jeikeium* ATCC 43734
- *Micrococcus luteus* ATCC 4698
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
- *Staphylococcus capitis* subsp. *capitis* ATCC 27841
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990
- *Staphylococcus, warneri* ATCC 27836
- *Staphylococcus warneri* ATCC 155

2.1.2 Antiseptische Lösungen

Alle alkoholischen Lösungen wurden bei der Firma BODE Chemie GmbH hergestellt. Die Wirkstoffe wurden gemäß der internen Spezifikation analysiert und freigegeben.

- CHG (Evonik Degussa GmbH, Hanau, Deutschland)
- *n*-Propanol (BASF, Ludwigshafen, Deutschland)
- Ethanol (Euro Alkohol GmbH, Lüdinghausen, Deutschland & sowie Brüggemann Alcohol Heilbronn GmbH, Heilbronn, Deutschland)
- *iso*-Propanol (Sasol Solvents Germany GmbH, Hamburg, Deutschland)

Der Gehalt der alkoholischen Lösung wurde mittels gaschromatographischer Analyse mit einem internen Standard untersucht:

- Gaschromatograph: PerkinElmer Clarus-Serie oder Autosystem XL (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA) mit einem FID-Detektor
- Kapillarsäule: 30 m x 0,25 mm, belegt mit 1,0 µm 14 % Cyanopropylphenyl - 86 % Dimethylpolisiloxane
- Ofentemperatur: 90 °C; mit 30 °C/min auf 180 °C; 1,0 min isotherm
- Injektor 250 °C
- Detektor 260 °C
- Trägergas: Helium, 100 kPa
- Split 100 ml/min
- Dosiervolumen 1,0 µl

Der Gehalt an CHG wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie bestimmt. Dazu wurde die Absorption des Chlorhexidindigluconat in wässriger Lösung am Absorptionsmaximum bei 254 nm gemessen (UV/Vis Photometer, PE Lambda 2, PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA). Als Referenzsubstanz wurde Chlorhexidindiacetat eingesetzt.

2.1.3 Nährlösungen

- Casobouillon (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)
- Müller-Hinton-Bouillon (DIFCO, Augsburg, Germany), supplementiert mit 3 % NaCl

2.1.4 Nährböden

- CASO-Agar (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)
- CASO-Agar mit Enthemmungsmittel; 0,1 % L-Histidin, 0,3 % Lecithin und 3 % Polysorbat 80 (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)
- Kanamycin-Aesculin-Azid Agar/Trockensubstanz (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)
- Mannitol-Salzagar (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)

2.1.5 Neutralisierungssubstanzen

Neutralisierungsgemisch A:

- 3 % Polysorbate 80 (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)
- 0,3 % Lecithin (SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg, Deutschland)
- 0,1 % L-Histidin (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)
- 0,5 % Natriumthiosulfat (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)
- 3 % Saponin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- 1 % Natriumlauryl ethersulfat (Cognis GmbH, Mohnheim am Rhein, Deutschland)

Neutralisierungsgemisch B:

- 3 % Polysorbate 80 (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)
- 0,3 % Lecithin (SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg, Deutschland)
- 0,1 % L-Histidin (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)
- 0,1 % L-Cystein (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)

2.1.6 Abstrichtupfer

- CultureSwab ohne Medium (Becton Dickinson; Darmstadt, Deutschland)

2.1.7 Chemikalien für die Gram-Färbung / Mikroskopie

Grams Kristallviolettlösung (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)

Lugolsche Lösung (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)

Grams Safraninlösung (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)

Immersionsöl (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)

2.1.8 Stammhaltung

- CRYOBANK-System (MAST Diagnostica Laboratoriumspräparate GmbH, Reinfeld, Deutschland)

2.1.9 Weitere verwendete Materialien

- Humanes β -Defensin 3 (RELIATech, Braunschweig, Deutschland)

- Staphylect™ plus test (Oxoid Deutschland GmbH; Wesel, Deutschland)
- API ID 32 Staph-test (bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen, Deutschland)
- QIAGEN Tissue Purification Kit® (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland)
- Taq DNA polymerase (NE Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland)
- Macherey-Nagel NucleoSpin Extract II Kit® (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland)
- EB-Puffer® (QIAGEN, Hilden, Deutschland)
- Quick Start Kit (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland)
- SLS® (Beckman-Coulter, Krefeld, Deutschland)
- Oxacillin (InfectoStaph, Infectopharm; Heppenheim, Deutschland)

2.2 Methoden

Die *In-vivo*-Studien wurden von der Freiburger Ethikkommission genehmigt (Freiburger Ethik-Kommission GmbH International, Freiburg, Deutschland; Studiennummer: 07/2064). Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Probandenversuche wurden in Anlehnung an die Standardmethode der DGHM zur Prüfung von Hautantiseptika im praxisnahen Versuch mit Probanden durchgeführt (66).

In dieser Arbeit wurde nur die aerobe Hautflora und deren Reduktion *in vivo* bestimmt, da die anaerobe Hautflora für die postoperativen Wundinfektionen und die gefäßkatheterassoziierten Infektionen nur eine untergeordnete Rolle spielt. Die aerobe Hautflora ist für die Hautantiseptik und damit auch für die Prävention dieser Infektionen von wesentlich höherer klinischer Bedeutung.

2.2.1 Metaanalyse zur Generierung einer quantitativen Kartierung der aeroben Hautflora

Für die Metaanalyse zur Generierung einer quantitativen Kartierung der aeroben Hautflora wurde elektronisch und manuell nach Publikationen und experimentelle *In vivo*-Studien zur Dichte der Hautflora gesucht.

Die Literatursuche war beschränkt auf deutsch- und englischsprachige Publikationen und wurde zwischen April und August 2006 durchgeführt. Für die elektronische Suche wurde über Pubmed in der Datenbank MEDLINE gesucht (in der Suche wurde der Zeitraum von 1950-2006 eingeschlossen) (161). Zusätzlich wurde eine elektronische Suche aller Publikationen, die bis August 2006 im Campus Katalog Hamburg (Staats- und Universitätsbibliothek Hamburg Carl von Ossietzky; Universität Hamburg; <https://kataloge.uni-hamburg.de>), im Web-Portal des Gemeinsamen Bibliotheksverbundes der Länder Bremen, Hamburg, Mecklenburg-Vorpommern, Niedersachsen, Sachsen-Anhalt, Schleswig-Holstein, Thüringen und der Stiftung Preußischer Kulturbesitz (<http://www.gbv.de/vgm>) und auf dem Online-Publikationsserver OPUS (Universität Hamburg; <http://www.sub.uni-hamburg.de/opus>) verfügbar waren, durchgeführt. Für die elektronische Suche wurde folgende Stichwörter in Englisch (für die deutschsprachige Literatur in Deutsch) verwendet: *skin bacteria*, *cutaneous microflora*; *skin flora*; *skin microbiology*, *skin disinfection*, *skin antisepsis*.

Zusätzlich zu der elektronischen Suche wurde das Publikationsarchiv der Firma BODE Chemie GmbH (Hamburg) nach allen Studien zur Hautfloradichte per Hand durchsucht (Zeitschrift: Hygiene & Medizin (1976-2006) sowie Einzelausgaben anderer Zeitschriften aus dem Fachbereich Mikrobiologie und Hygiene).

Anhand der Zusammenfassung der Artikel wurde entschieden, ob ein Artikel in die detaillierte Bewertung mit eingeschlossen wurde.

In Abbildung 6 ist der Auswahlprozess der Studien dargestellt. Es wurden 83 Studien für einen möglichen Einschluss in die Metaanalyse ausgewählt (3, 4, 9, 11, 14, 16-

18, 20, 22, 32, 34-36, 41, 42, 46, 47, 53-55, 71, 76, 77, 80-83, 86, 87, 90, 91, 99, 106-109, 114, 123, 124, 126, 129-131, 133, 143-147, 152, 159, 162-167, 175, 176, 181, 182, 184, 193-195, 211, 214, 215, 218-220, 222, 229, 230, 232-234, 236, 240, 242, 255, 263).

Nach Sammlung aller verfügbaren Daten wurden Studien eingeschlossen, die die folgenden Kriterien erfüllten:

- Verwendung einer Tupfer- oder “cup scrub”-Methode für die Gewinnung der Hautflora
- Angabe bezüglich der KBE pro definiertem Hautareal
- Angabe zur bestimmten Hautflora (z. B. aerob/anaerob)

Insgesamt wurden 11 Studien in die Metaanalyse eingeschlossen (4, 34, 36, 90, 123, 167, 182, 234, 236, 242, 263). Die Auswertung wurde anhand der KBE/cm² durchgeführt, bei Angabe mehrerer Werte in einer Studie wurde der Mittelwert für jedes Hautareal bestimmt.

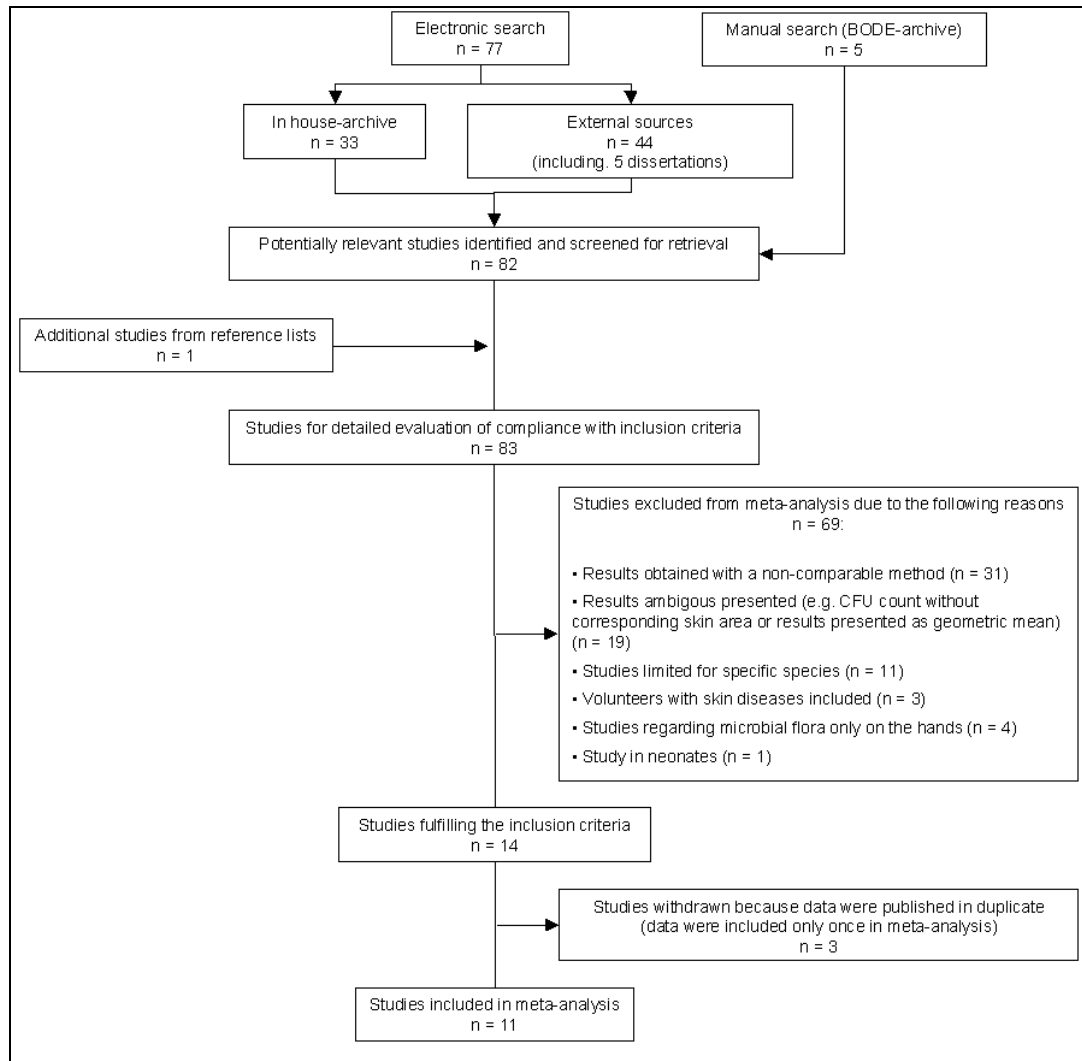


Abbildung 6: Prozess der Studienauswahl für die Metaanalyse

2.2.2 *In vivo*-Bestimmung der Dichte der Hautmikroflora

2.2.2.1 Probandenkollektiv

Insgesamt nehmen 180 freiwillige Probanden an der Studie teil; davon waren 95 weiblich und 85 männlich. Jede Person durfte mehrmals teilnehmen; die maximale Anzahl der Teilnahmen war auf 9 begrenzt. Ein Zeitintervall von mindestens 7 Tagen lag zwischen den Tests an einem Probanden.

Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie waren:

- Alter unter 18 Jahren,
- vorliegende Hauterkrankungen auf den zu testenden Hautarealen,
- antibiotische Therapie oder antiseptische Behandlung 7 Tage vor dem Versuch.

2.2.2.2 Durchführung der Versuche zur Bestimmung der Dichte der Hautmikroflora

Die Dichte der Hautmikroflora wurde auf der Stirn, dem Bauch, dem Nacken und im Lumbalbereich bestimmt. Dabei war neben der Quantifizierung das Ziel, Einflussgrößen auf die Dichte der Mikroflora zu identifizieren.

Auf jedem dieser vier Hautareale wurden vier 5 cm² große Testfelder markiert (auf der Stirn nebeneinander; auf allen anderen Hautarealen in rechteckiger Anordnung; siehe Abbildung 7). Es erfolgte eine randomisierte Zuordnung der Felder zur Entnahme des Vorwertes, um einen systematischen Fehler durch eine festgelegte Lokalisation der Testfelder auszuschließen (188). Bei den Untersuchungen auf der Stirn wurden die Haare gegebenenfalls mit Klammern aus dem Gesicht ferngehalten.

Vor jeder Probennahme wurden die Testfelder mit einer sterilisierten Metallschablone und Stempelfarbe markiert, um die Beprobungsflächen zu begrenzen. Das jeweilige 5 cm² große Testfeld wurde mit einem zuvor in Bouillon angefeuchteten sterilen Tupfer mit 30 Tupferabstrichen unter möglichst gleichmäßigem Anpressdruck innerhalb von etwa 10–12 Sekunden abgerieben. Anschließend wurde die Tupferspitze in ein steriles Probengefäß mit 5 ml CSL supplementiert mit 3 % Polysorbat 80, 0,3 % Lecithin, 0,1 % L-Histidin, und 0,1 % L-Cystein (66) gebrochen und für 30 Sekunden gevortext. Bis zur Ausplattierung erfolgte eine Lagerung der Proben bei 2 bis 8 °C für maximal 3 Stunden (108, 189). Unmittelbar vor dem Anlegen einer Verdünnungsreihe wurde jede Probe erneut für 5 Sekunden gevortext. Jeweils 0,5 ml der Probe sowie Aliquote entsprechender Verdünnungen wurden jeweils in einer Doppelbestimmung auf Casein-Pepton-Sojapepton-Agar (CASO-Agar, Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland) ausplattiert. Nach der Inkubation der Agarplatten (aerob; 48 Stunden bei 37 ± 2 °C) erfolgte die Quantifizierung der KBE auf jeder Platte. Es wurden alle Platten mit einer Dichte von 15 bis 300 KBE in die Bewertung mit eingeschlossen.

Die bestimmten KBE/cm² wurden logarithmiert und die Mittelwerte der log₁₀ KBE/cm² berechnet. Lagen die Werte von zwei aufeinanderfolgenden

Verdünnungsschritten innerhalb der Grenzen für die KBE / Agar-Platte, wurde der gewichtete Mittelwert bestimmt.

2.2.2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS13.0 oder 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden mittels einer Varianzanalyse bestimmt. Bei einem signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) wurde für einen Vergleich ein zweiseitiger, ungepaarter t-Test durchgeführt.

2.2.2.4 Weitere verwendete Methoden

Die weiteren verwendeten Methoden sind im Detail in den jeweiligen Publikationen beschrieben (siehe Abschnitt Originalarbeiten).

Die Auswahl der zu testenden, klinisch relevanten Hautareale erfolgte auf Basis der Metaanalyse zur Dichte der aeroben Hautflora. Die Stirn, das Abdomen, der Nacken und der Lumbalbereich erwiesen sich als geeignete Testareale für die anschließenden *In-vivo*-Studien. Zur besseren Übersicht wird in Abbildung 7 die Verteilung der Testfelder für die experimentellen *In-vivo*-Studien mit alkoholisch-wässrigen Lösungen beispielhaft graphisch dargestellt:

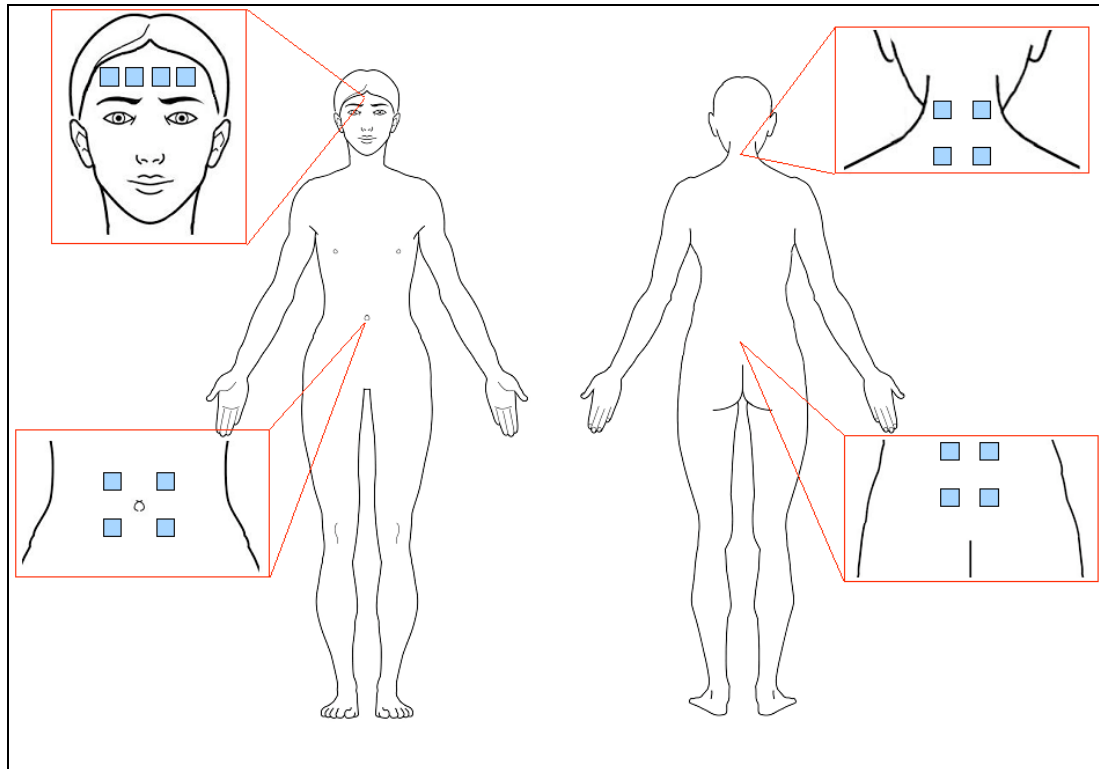


Abbildung 7: Verteilung der Testfelder in den experimentellen *In-vivo*-Studien mit alkoholisch-wässrigen Lösungen (ohne CHG) beispielhaft für einen Probanden dargestellt (siehe auch Abschnitt Originalarbeiten; „Alcohols for skin antiseptics at clinically relevant skin sites“; „Vergleich der Wirksamkeit von 89,5 % 1-Propanol bei kurzen Anwendungszeiten mit dem Referenzverfahren der DGHM-Methode“).

Als Basis für die *In-vivo*-Wirksamkeitsstudien wurde für die höchste gewählte CHG-Konzentration (2 %; siehe Abschnitt Originalarbeiten; Publikation „Alcohols for skin antiseptics at clinically relevant skin sites“) ein geeignetes Neutralisierungsgemisch identifiziert. Da die ASTM-Methode zur Neutralisierungsvalidierung wesentlich praxisorientierter ist als die Methode in der europäischen Norm, wurde in dieser Arbeit diese Methode gewählt. Die Durchführung der Neutralisierungsvalidierung erfolgte *in vitro* mit 5 verschiedenen Bakterienspezies, die häufig auf der humanen Haut vorkommen (siehe Abschnitt Originalarbeiten; Publikation „Pitfalls in efficacy testing – how important is the validation of neutralization of chlorhexidine digluconate?“). Dabei waren neben der Wahl des richtigen Gemisches der Neutralisierungssubstanzen verschiedene Parameter zu identifizieren, die das Ergebnis einer Wirksamkeitsuntersuchung signifikant beeinflussen können. Das validierte Verfahren war die Basis für die Prüfung der Hemmung der Rekolonisation der Hautflora durch CHG *in vivo* (s. u.).

Die Reduktion der aeroben Hautflora auf den gewählten Hautarealen (s. o.) durch wässrige Lösungen der in der Antiseptik bereits verwendeten Alkohole (Ethanol, *iso*-Propanol und *n*-Propanol) wurde in einer doppelt-verblindeten *In-vivo*-Studie mit 180 Probanden untersucht. Die Einteilung in insgesamt 9 Versuchsblöcke mit jeweils 20 Probanden ermöglichte die Untersuchung der Sofortwirkung dreier unterschiedlicher Alkoholkonzentrationen sowie dreier unterschiedlicher Einwirkzeiten. Jeder der 20 Versuche in einem Versuchsblock beinhaltete die Anwendung der drei unterschiedlichen Alkohole parallel an einem Probanden.

Zum Vergleich der Wirksamkeit der wirksamsten Alkohollösung aus dieser Studie mit dem in Deutschland zurzeit geltenden Standardverfahren der DGHM für die Hautantiseptik, erfolgte eine Nicht-Unterlegenheitsuntersuchung. In zwei Teilschritten wurde die Wirksamkeit bei 4 und 3 sowie 2 und 1 Minuten Einwirkzeit mit dem 10-minütigen Standardverfahren auf Nicht-Unterlegenheit geprüft. Als Maßstab für die Auswertung wurde festgelegt, dass das neu etablierte Verfahren in Bezug auf die Reduktion der Hautflora dem Referenzverfahren nicht unterlegen sein durfte, um eine vergleichbare Wirksamkeit bei wesentlich verkürzter Einwirkzeit nachzuweisen (siehe Abschnitt Originalarbeiten; „Vergleich der Wirksamkeit von 89,5 % 1-Propanol bei kurzen Anwendungszeiten mit dem Referenzverfahren der DGHM-Methode“).

Darüber hinaus wurde in einer Doppelblindstudie die Wirksamkeit der bestwirksamen Alkohollösung, supplementiert mit 2 %CHG, auf die Hemmung der Rekolonisation der aeroben Hautflora auf dem Nacken und den Oberarmen über einen Zeitraum von 72 h bestimmt (siehe Abschnitt Originalarbeiten; Publikation „Alcohols for skin antiseptics at clinically relevant skin sites“). Diese beiden Hautareale wurden gewählt, da sie in enger Nachbarschaft zu Arealen liegen, die bei der Katheterisierung eine wichtige Rolle spielen und da eine sterile Abdeckung über den gewählten Zeitraum problemlos möglich war.

Um eine mögliche Verbindung zwischen der Verwendung des CHG in der Hautantiseptik und dem auf der Haut natürlicherweise vorkommenden

antimikrobiellen Peptid hBD-3 zu untersuchen, wurden *In-vitro*-Studien mit verschiedenen klinischen Isolaten und ATCC-Stämmen von *Staphylococcus* spp. durchgeführt. Ziel dieser Studien war es, die Reduktion zwischen CHG-exponierten und nicht exponierten Zellen der gleichen Stämme über einen definierten Zeitraum zu vergleichen (siehe Abschnitt Originalarbeiten; Publikation „Skin bacteria after chlorhexidine exposure – Is there a difference in response to human β -Defensin-3?“).

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Metaanalyse zur Generierung einer quantitativen Kartierung der aeroben Hautflora und der *In vivo*-Untersuchung der Hautfloradichte werden in diesem Abschnitt mit aufgeführt. Weitere Ergebnisse dieser Arbeit sind in den vier Publikationen im Abschnitt Originalarbeiten enthalten; die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeiten werden im Folgenden ergänzend in einem Überblick zusammengefasst dargestellt.

Die Ergebnisse der Metaanalyse zeigten, dass deutliche Unterschiede in der Quantität der aeroben Hautflora zwischen einzelnen Körperarealen bestehen (siehe Abbildung 8).

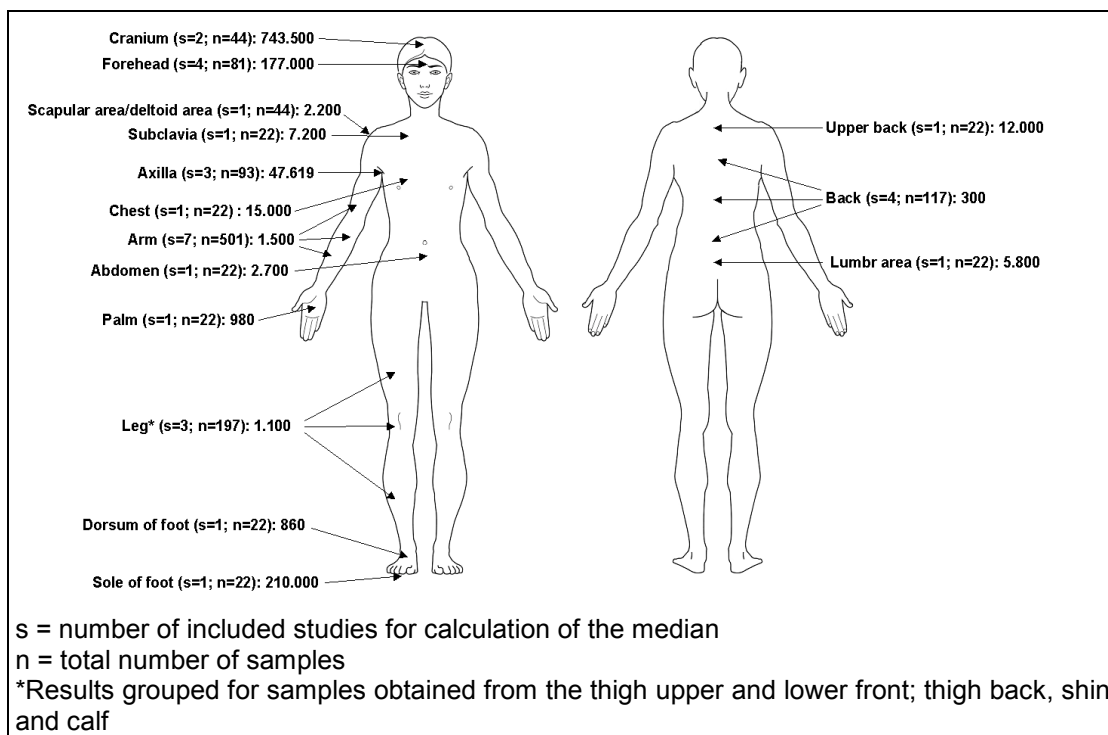


Abbildung 8: Ergebnisse der Metaanalyse für die Quantifizierung der aerobe Hautmikroflora, dargestellt als Median der Mittelwerte der KBE/cm² (nicht geschlechtsspezifisch)

Im Rahmen der *In-vivo*-Studie zur Hautantiseptik (siehe Originalarbeiten; Publikation „Alcohols for skin antiseptics at clinically relevant skin sites“) erfolgte parallel zu den Wirksamkeitsuntersuchungen die Quantifizierung der aeroben Hautflora. Dabei zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den

Hautarealen Stirn, Abdomen, Nacken und Lumbalbereich (ANOVA; $p < 0,001$). Die höchste Mikrofloradichte wurde auf der Stirn gefunden ($\log_{10}$ -Mittelwert = $3,69 \pm 1,00$ KBE/cm²). Obwohl unterschiedliche physiologische Bedingungen auf der Haut vorliegen, konnte zwischen der Höhe der Vorwerte auf dem Nacken und dem Abdomen kein signifikanter Unterschied ($3,00 \pm 0,90$ KBE/cm²; $2,98 \pm 0,74$ KBE/cm²; $p = 0,998$) nachgewiesen werden. Das Hautareal, mit der niedrigsten Dichte der Hautflora war der, bislang in Deutschland als für die Antiseptik kritisch angesehene, Lumbalbereich mit einem mittleren $\log_{10}$ Vorwert von $2,35 \pm 0,70$.

Bei einer Gruppierung der medialen bzw. lateralen Testfelder auf der Stirn sowie der beiden kranial gelegenen und der kaudal gelegenen Testfelder auf dem Nacken, konnten signifikante Unterschiede zwischen den Lokalisationen innerhalb des entsprechenden Areals nachgewiesen werden. Die Hautflora war auf der Stirn medial signifikant höher als lateral und auf dem Nacken kranial höher als kaudal (siehe Tabelle 1). Auf anderen Arealen oder bei anderen Gruppierungen der Testfelder wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden. Des Weiteren zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen rechter und linker Körperhälfte.

Hautareal	Mittelwert $\log_{10}$ KBE/cm ² ($\pm$ Standardabw.)			p-Wert*
	Alle Testfelder	Testfelder (lateral)	Testfelder (medial)	
Stirn	$3,69 \pm 1,00$	$3,47 \pm 1,01$	$3,92 \pm 0,96$	0,002
		Testfelder (kranial)	Testfelder (kaudal)	
Nacken	$3,00 \pm 0,90$	$3,16 \pm 0,87$	$2,79 \pm 0,90$	0,006
Bauch	$2,98 \pm 0,74$	$2,88 \pm 0,70$	$3,07 \pm 0,76$	0,088
Lumbalbereich	$2,35 \pm 0,70$	$2,26 \pm 0,66$	$2,45 \pm 0,74$	0,072

Tabelle 1: Vergleich der mittleren $\log_{10}$ KBE/cm² auf unterschiedlichen Testfeldern für jedes Hautareal (n = 180); * t-Test

Bei Männern konnte auf allen Hautarealen eine höhere Mikrofloradichte im Vergleich zu der Dichte auf der Haut der weiblichen Probanden nachgewiesen werden ($p < 0,001$; t-Test) (siehe Tabelle 2).

Hautareal	Mittelwert $\log_{10}$ KBE/cm ² ($\pm$ Standardabw.)		p-Wert*
	Männliche Probanden n = 85	Weibliche Probanden n = 95	
Stirn	3,85 $\pm$ 0,91	3,53 $\pm$ 1,07	0,033
Nacken	3,33 $\pm$ 0,95	2,70 $\pm$ 0,74	< 0,001
Bauch	3,45 $\pm$ 0,57	2,57 $\pm$ 0,62	< 0,001
Lumbalbereich	2,48 $\pm$ 0,67	2,23 $\pm$ 0,72	0,017

Tabelle 2: Vergleich der mittleren $\log_{10}$ KBE/cm² zwischen männlichen und weiblichen Probanden für jedes Hautareal (n = 180); * t-Test

Im Vorfeld zu den *In-vivo*-Studien wurde im Rahmen der Neutralisierungsvalidierung für 2 % CHG in *n*-Propanol (89,5 %; V/V) ein geeignetes, gegenüber den zu testenden Mikroorganismen nicht toxisches, Gemisch verschiedener Neutralisierungssubstanzen identifiziert. Dieses Neutralisierungsgemisch war auch nach einer dreistündigen Kühlung mit einem Tupfer als Trägermaterial im Test effektiv. *Micrococcus luteus* zeigte sich als besonders empfindliches Bakterium, bei dem zwar eine Abnahme der lebenden Zellen nach 3 h Lagerung gemessen werden konnte, die allerdings nicht signifikant war. In einem zusätzlich durchgeführten Test ohne Tupfer als Trägermaterial („worst-case“-Szenario im Suspensionsversuch) war keine valide Neutralisierung nachzuweisen. Dieser Test hatte jedoch für die Validität der Ergebnisse der *In-vivo*-Studie keine unmittelbare, praktische Relevanz, da die eingesetzten Mengen des Antiseptikums wesentlich höher lagen als in der späteren Studie (ausführliche Ergebnisdarstellung siehe Abschnitt Originalarbeiten; Publikation „Pitfalls in efficacy testing – how important is the validation of neutralization of chlorhexidine digluconate?“). Es ist jedoch davon auszugehen, dass wenn die Neutralisierung unter diesen Bedingungen valide ist, auch unter den Versuchsbedingungen keine Beeinflussung des Ergebnisses durch CHG-Rückstände zu erwarten ist.

In der Studie zur Identifizierung der am besten wirksamen Alkohollösung (siehe Publikation „Alcohols for skin antiseptics at clinically relevant skin sites“) mit insgesamt 180 Probanden reduzierte 89,5 %iger *n*-Propanol die residente, aerobe Hautflora am effektivsten. Die in dieser Studie erstmals erstellte Rangfolge der Einflussgrößen für die Hautantiseptik zeigte, dass insgesamt die Art des Alkohols

den größten Einfluss auf die Wirksamkeit hatte (*n*-Propanol > *iso*-Propanol > Ethanol), gefolgt von der Konzentration der Lösung (89,5% > 70% > 60). Den geringsten Einfluss hatte bei dieser Untersuchung die Einwirkzeit. In einer post-hoc-Analyse zeigte sich, dass *n*-Propanol auf der Stirn, dem Abdomen und dem Nacken unabhängig von der Konzentration und der Einwirkzeit signifikant wirksamer war als *iso*-Propanol und Ethanol ($p \leq 0,001$). Die höchste Konzentration (89,5 %) erwies sich unabhängig von der Art des Alkohols und der Einwirkzeit als effektivste Konzentration. Die Wirksamkeit nahm insgesamt mit einer längeren Einwirkzeit zu, wenn die Ergebnisse unabhängig von der Art des Alkohols und der Konzentration betrachtet wurden.

Ein interessanter Aspekt bei der Auswertung war, dass sich trotz gleich hoher Ausgangskeimzahlen zwischen Abdomen ($2,98 \pm 0,74$) und Nacken ($3,00 \pm 0,90$) (siehe Seite 47) in der Wirksamkeitsprüfung der alkoholischen Lösungen signifikante Unterschiede zwischen beiden Arealen zeigen ließen (Beispiel: 89,5 % Ethanol, 2 Minuten EWZ; $1,40 \pm 0,74$ vs. $2,50 \pm 0,78$; $p < 0,001$). Des Weiteren zeigte sich eine fast vollständige Reduktion der Hautflora in dem ohnehin sehr niedrig besiedelten Lumbalbereich mit allen drei Alkoholen insbesondere bei einer Konzentration von 89,5 %. Hier ist davon auszugehen, dass ein durch dieses antiseptische Verfahren nicht weiter zu reduzierendes Minimum der aeroben Mikroflora erzielt werden konnte (ausführliche Ergebnisdarstellung siehe Abschnitt Originalarbeiten; Publikation „Alcohols for skin antisepsis at clinically relevant skin sites“).

In einer weiteren *In-vivo*-Studie auf den Oberarmen und dem Nacken zeigte sich, dass die Rekolonisation der aeroben Hautflora unter einer sterilen Abdeckung über einen Zeitraum von 72 h durch Zusatz verschiedener CHG-Konzentrationen (0,5; 1 und 2 %) zu einer 89,5 %igen *n*-Propanollösung gehemmt werden konnte. Im Vergleich zu einer un-supplementierten *n*-Propanollösung erwiesen sich auf den Oberarmen im paarweisen Vergleich alle drei CHG-Konzentrationen als signifikant wirksamer als *n*-Propanol alleine; auf dem Nacken konnte dies nur für die Konzentrationen 0,5 und 2 % gezeigt werden, obwohl mit der 1 %igen Lösung insgesamt nach 72 h im Mittel die höchste Reduktion erzielt wurde (ausführliche

Ergebnisdarstellung siehe Abschnitt Originalarbeiten; Publikation „Alcohols for skin antisepsis at clinically relevant skin sites“).

In einer *In-vivo*-Studie zur Prüfung auf Nicht-Unterlegenheit bzw. Überlegenheit der 89,5 %igen *n*-Propanollösung gegenüber dem in Deutschland verwendeten Referenzverfahren für die Hautantiseptik (70 % *iso*-Propanol; 10-minütige Einwirkzeit) konnten für normalverteilte Datensätze die folgenden Hauptergebnisse erzielt werden: Bei einer Einwirkzeit von mindestens 3 Minuten konnte auf allen Hautarealen Nicht-Unterlegenheit nachgewiesen werden. Für kürzere Zeiten von 2 bzw. 1 Minute war der Nachweis nur auf der Stirn, dem Abdomen und dem Lumbalbereich zu erbringen. Darüber hinaus konnte für die *n*-Propanollösung sogar Überlegenheit gegenüber dem Referenzverfahren auf der Stirn, dem Abdomen und dem Nacken gezeigt werden. Im Lumbalbereich zeigte sich keine Überlegenheit der *n*-Propanollösung; allerdings waren hier beide Lösungen besonders effektiv und führten ab einer Einwirkzeit von 3 Minuten zu einer fast vollständigen Eliminierung der lebenden Zellen im Probenmaterial (siehe Abschnitt Originalarbeiten; „Vergleich der Wirksamkeit von 89,5 % 1-Propanol bei kurzen Anwendungszeiten mit dem Referenzverfahren der DGHM-Methode“).

Die mikrobiologische Charakterisierung und Sequenzanalyse eines intragenetischen *gyrA*-Fragments ergab, dass es sich bei den klinischen Isolaten um *S. capitis* bzw. *S. warneri* handelte. Bei zwei Isolaten (19/2 und 16/1) konnte bei der dreitägigen Exposition gegenüber sub-lethalen CHG-Konzentrationen ein Anstieg der minimalen Hemmkonzentration um den Faktor 2 gezeigt werden. Bei dem dritten Isolat (19/1) sowie *S. epidermidis* ATCC 12228 zeigte sich nach drei Tagen keine Veränderung der Empfindlichkeit gegenüber CHG. Für *S. aureus* ATCC 6538 wurde nach einer anfänglich nur schwachen Trübung der Bouillon bei Zusatz von 1 µg/ml CHG bei der zweiten Passage nur ein Wachstum bei 0,5 µg/ml visuell detektiert. Bei den Ergebnissen der Empfindlichkeitsprüfung gegenüber hBD-3 nach dreitägiger CHG-Exposition zeigte sich kein einheitlicher Trend. Auf Basis der Daten gibt es im Moment keine eindeutigen Hinweise, dass sich durch eine Exposition gegenüber sub-lethalen CHG-Konzentrationen die Empfindlichkeit gegenüber hBD-3 ändert. In über

der Hälfte der Versuche (13 von 20 Versuchen) war kein signifikanter Unterschied zwischen CHG-exponierten und nicht-exponierten Bakterien nachzuweisen. In vier Versuchen zeigte sich eine Abnahme der Empfindlichkeit gegenüber hBD-3 bei Bakterien, die zuvor gegenüber CHG exponiert waren (in einem Fall lag die Differenz allerdings nur bei weniger als 0,1 log₁₀-Stufen). Für beide Einwirkzeiten wurde dies jedoch nur bei *S. capitis* 19/2 gezeigt. In drei Versuchen waren die CHG-exponierten Bakterien empfindlicher gegenüber hBD-3, wobei die Differenz in einem Fall geringer war als 0,4 log₁₀-Stufen.

4 Diskussion

Als das zentrale Ergebnis dieser Arbeit ist die Rangfolge der Einflussgrößen für die Hautantiseptik festzuhalten. Bislang existierte keine publizierte Studie, in der untersucht wurde, welche der drei Variablen in der Hautantiseptik (Art des Alkohols, Konzentration oder Einwirkzeit) den größtmöglichen Einfluss auf die Reduktion der aeroben, residenten Hautflora hat. Für die Wirksamkeit eines Hautantiseptikums und somit auch für die Etablierung eines optimierten Hautantiseptikverfahrens ist die Wahl der Art des Alkohols von besonderer Bedeutung. Für eine optimale Wirksamkeit ist der Einsatz von *n*-Propanol zu präferieren, da die anderen beiden Alkohole in höheren Konzentrationen bzw. mit längeren Einwirkzeiten eingesetzt werden müssen, um eine vergleichbare Wirksamkeit zu erzielen. Es konnte bereits in früheren Studien im Bereich der Händehygiene gezeigt werden, dass *n*-Propanol gegenüber der residenten Händeflora wirksamer ist als *iso*-Propanol. Untersuchungen zeigten, dass wesentlich höhere Konzentrationen für *iso*-Propanol im Vergleich zu *n*-Propanol notwendig waren, um eine vergleichbare Wirksamkeit zu erzielen (90 % *iso*-Propanol vs. 60 % *n*-Propanol) (199). Dieses wurde durch Untersuchungen von Suchomel et al. bestätigt, in denen die Wirksamkeit von 60 % *n*-Propanol mit der Wirksamkeit von 70 % *iso*-Propanol verglichen wurde (243).

Den zweitgrößten Einfluss auf die Wirksamkeit hat die Konzentration der alkoholischen Lösung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche Konzentrationen miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass unabhängig von der Art des Alkohols und der Einwirkzeit, eine Konzentration von 89,5 % (V/V) wirksamer war als 70 % und 60 %. Eine Limitierung der Studie war, dass nicht untersucht wurde, ob eine Konzentrationserhöhung über 89,5 % hinaus zu einer weiteren Wirksamkeitssteigerung führt.

Die Wirksamkeit wurde bei einem Vergleich von 4, 3 und 2 Minuten am wenigsten durch die Einwirkzeit der alkoholischen Lösungen auf der Haut beeinflusst. Allerdings konnte belegt werden, dass auch die schwächer wirksamen Alkohole *iso*-

Propanol und Ethanol bei einer zunehmenden Konzentration bzw. mit einer längeren Einwirkzeit eine zunehmend bessere Wirksamkeit zeigten.

Das Optimum für die Hautantiseptik stellt eine 89,5 %ige *n*-propanolische Lösung bei einer Einwirkzeit von 3 Minuten im Vergleich zwischen allen in dieser Arbeit untersuchten Lösungen dar. Hieraus wird deutlich, dass eine 10-minütige Einwirkzeit, wie sie bis Ende 2008 noch aufgrund der Arzneimittelzulassungen für alle Hautantiseptika in Deutschland vorgeschrieben war, bei der richtigen Wahl des Wirkstoffes und einer geeigneten Konzentration wissenschaftlich nicht begründet ist und somit nicht notwendigerweise gewählt werden sollte.

Sieht man sich im Hinblick auf die optimierte Alkohollösung und die Einwirkzeiten einmal die Zusammensetzungen und die Anwendungshinweise der in Deutschland zugelassenen Hautantiseptika genauer an, stellt man fest, dass bislang kein zugelassenes Präparat diesem Optimum entspricht und dieses somit auf dem Markt auch noch nicht zur Verfügung steht. Es gibt zwar wenige Präparate, die bereits mit kürzeren Einwirkzeiten gelistet und zugelassen sind, aber es fehlt auf dem deutschen Markt ein Monopräparat für die präoperative Hautantiseptik mit dem wirksamsten Alkohol *n*-Propanol (8). Hieraus wird ein deutliches Potenzial für Verbesserungen ersichtlich. Das einzige *n*-propanolische Monopräparat hat nur eine Konzentration von 70 % (m/m) und ist nur für die Händedesinfektion und nicht für die präoperative Hautantiseptik zugelassen.

Bei den meisten zugelassenen Präparaten handelt es sich um Kombinationspräparate mit Kombinationen aus unterschiedlichen Alkoholen mit oder ohne Langzeitwirkstoff. In dieser Arbeit wurden nur monoalkoholische Lösungen untersucht, da zunächst die Frage zu klären war, mit welchem der Alkohole die bestmögliche Reduktion der residenten aeroben Hautflora erzielt werden kann.

Die zugelassenen Monopräparate für die präoperative Hautantiseptik liegen in der Alkoholkonzentration zwischen 62,8 % (m/m) und 85 % (m/m). Die in dieser Arbeit untersuchte 89,5 %ige Konzentration (V/V) wurde gewählt, da diese

Volumenkonzentration zu der höchsten Konzentration eines in Deutschland zugelassenen monoalkoholischen Ethanolpräparates äquivalent ist [85 % (m/m) Ethanol entspricht 89,5 % (V/V)]. Bei der Wahl einer geeigneten Konzentration eines Antiseptikums ist neben der Wirksamkeit auch immer die Verträglichkeit zu berücksichtigen. So ist für *n*-Propanol beschrieben, dass es bei höheren Konzentrationen (137) vermehrt zu Hautirritationen kommen kann, so dass hier eine Konzentration gewählt werden sollte, die auf der einen Seite in kurzen Einwirkzeiten eine sehr gute Wirksamkeit zeigt und auf der anderen Seite gut hautverträglich ist. Bei der Wahl der geeigneten Konzentration ist zu berücksichtigen, dass die Exposition gegenüber *n*-Propanol in einem Hautantiseptikum wesentlich geringer ist, als die Exposition gegenüber dieser Substanz in einem Händedesinfektionsmittel, da die Hautantiseptik in der Regel einmalig bzw. nur über einen sehr begrenzten Zeitraum angewendet wird und es bei der Händedesinfektion durchaus zu 50 Anwendungen pro Tag in der klinischen Praxis kommt. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien wurden keine unerwünschten Effekte bei der Anwendung der gewählten Konzentration beobachtet, was angesichts der Probandenzahlen nahelegt, dass selbst die hohe Konzentration von 89,5 % für die Anwendung in der Hautantiseptik gut hautverträglich ist.

Bei den Einwirkzeiten sind bereits wenige Präparate mit Einwirkzeiten von weniger als 10 Minuten für die Antiseptik auf talgdrüsenreicher Haut in die VAH-Liste mit aufgenommen. Eine Aufnahme in die VAH-Liste mit kürzeren Einwirkzeiten bedeutet jedoch nicht automatisch, dass das Arzneimittel dann auch für die Anwendung bei kürzeren Einwirkzeiten in Deutschland zugelassen ist, da es sich bei der VAH-Liste lediglich um eine Zertifizierung der Desinfektionsmittel-Kommission handelt, die von der Arzneimittelzulassung unabhängig ist. Zum Stand Februar 2010 war die kürzeste Einwirkzeit für ein Hautantiseptikum auf talgdrüsenreicher Haut in der VAH-Liste 1 Minute; die meisten Präparate sind allerdings noch mit einer 10-minütigen Einwirkzeit für die talgdrüsenreiche Haut gelistet (43). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Mindesteinwirkzeit von 3 Minuten erforderlich ist, um auch auf besonders kritischen Arealen wie dem Nacken eine ausreichende Wirksamkeit zu gewährleisten. Ein weiteres klinisch relevantes Ergebnis dieser

Arbeit war, dass sich auf der Stirn auch bei einer Minute keine Nicht-Unterlegenheit gegenüber dem Referenzverfahren zeigen ließ, sich andere Hautareale, wie beispielsweise der Nacken aber diesbezüglich als wesentlich kritischer erwiesen. Das bedeutet, dass ein Präparat, für das auf der Stirn eine gleichwertige Wirksamkeit zu dem Referenzverfahren gezeigt wurde, nicht unbedingt auf allen anderen talgdrüsenreichen Hautarealen ebenfalls eine gleichwertige Wirksamkeit zeigt. Somit ist fraglich, ob eine einminütige Wirksamkeit hier ausreichend ist.

Generell besteht entweder die Möglichkeit durch ein optimiertes Präparat insgesamt eine bessere Wirksamkeit oder eine vergleichbare Wirksamkeit bei kürzeren Einwirkzeiten zu erzielen. Ziel ist eine optimale Kombination zu erreichen, so dass bei einer ausreichend guten Wirksamkeit eine Einwirkzeit, die so kurz wie möglich aber so lang wie nötig ist, vorgegeben werden kann.

In einem Verfahren zur Ermittlung eines wirksamen Antiseptikums auf Alkoholbasis sollte zunächst die Art des Alkohols festgelegt werden. Die Studien im Rahmen dieser Arbeit haben gezeigt, dass *n*-Propanol der wirksamste Monoalkohol für die Reduktion der residenten Hautflora ist. Im zweiten Schritt ist die Festlegung einer geeigneten Konzentration sinnvoll. Im letzten Schritt ist dann eine geeignete Einwirkzeit zu definieren, da dieses der Faktor mit dem geringsten Einfluss auf die Wirksamkeit gegenüber der residenten, aeroben Hautflora ist.

Neben einer schnellen Sofortwirkung spielt in der Hautantiseptik in einigen medizinischen Bereichen, z.B. bei der Katheterpflege zentraler Venenkatheter, der Langzeiteffekt eines Hautantiseptikums für die Patienten eine wichtige Rolle. So zeigten Chaiyakunapruk *et al.* und Darouiche *et al.*, dass sowohl für die Rate an gefäßkatheterassozierten Infektionen als auch für die Rate postoperativer Wundinfektionen der Zusatz von Chlorhexidin zu einer alkoholischen Lösung einen Nutzen für den Patienten bringt (33, 40). In Deutschland ist allerdings erst ein einziges handelsübliches Präparat mit Chlorhexidin in *iso*-Propanol als Hautantiseptikum zugelassen (8). Dieses Präparat enthält nur 0,5% CHG; eine Konzentration, die deutlich unterhalb der von der CDC empfohlenen Konzentration

von 2 % liegt (169). Zudem zeigte die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Studie, dass eine monoalkoholische *n*-Propanollösung über einen Zeitraum von 72 h keine ausreichende Wirksamkeit ($< 0,5$ log-Stufen) zeigt. Somit besteht auch für diese Indikationen in Deutschland Verbesserungspotential, zumal entsprechende, alkoholbasierte CHG-Präparate in anderen Ländern bereits eingesetzt werden. Bislang fehlten allerdings Studien, in denen systematisch unterschiedliche CHG-Konzentrationen in alkoholischen Lösungen in Bezug auf die Hemmung der Rekolonisation der Hautflora miteinander verglichen werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Studie zum Vergleich unterschiedlicher CHG-Konzentrationen auf zwei unterschiedlichen Hautarealen zeigten eine vergleichbare Wirksamkeit von 0,5, 1 und 2 % CHG in einer 89,5 %igen *n*-Propanollösung nach 72 h steriler Abdeckung. Zum einen ist denkbar, dass durch die hervorragende Wirksamkeit die Mikrofloradichte bereits nach der Einwirkzeit so weit reduziert wurde, dass auch eine geringe Konzentration an CHG über diesen Zeitraum ausreicht, um die Rekolonisation zu reduzieren. Zum anderen gibt es insgesamt bislang nur wenige Studien, in denen die Wirksamkeit von Chlorhexidin in alkoholischen Lösungen über einen Zeitraum von mehreren Tagen untersucht wurde. Auch wenn in der Studie in dieser Arbeit nach 72 h kein Unterschied zwischen der Wirksamkeit einer 0,5 % und einer 2 %igen alkoholischen Lösung nachgewiesen werden konnte, spricht auf Basis der Daten aus der Literatur mehr dafür, eine 2 %ige Lösung für die Katheterpflege und die präoperative Hautantiseptik einzusetzen (siehe nachfolgende Diskussion).

Es zeigte sich in dieser Studie, dass mit der nicht-supplementierten *n*-Propanollösung kaum eine Hemmung der Rekolonisation der Hautflora zu erzielen war, da die Mikrofloradichte nach 72 h nur um 0,41 bzw. 0,28 log-Stufen niedriger lag als der Ausgangswert. Dieses Ergebnis bestätigt das Ergebnis von Hibbard *et al.* aus dem Jahr 2002, mit dem gezeigt werden konnte, dass *iso*-Propanol alleine und 2 % CHG in Wasser die Rekolonisation der Hautflora über einen Zeitraum von 24 h auf dem Abdomen signifikant schlechter hemmten als eine Kombination aus *iso*-Propanol und CHG (88). Bei dem Vergleich zwischen 2 % CHG in 70 % *iso*-Propanol und *iso*-

Propanol ohne CHG zeigte sich, dass in Bezug auf die Reduktion der Katheterkolonisation bzw. -kontamination die CHG-haltige Lösung signifikant besser wirksam war (228).

In einer Studie zur Prävention der Katheterkolonisation war eine 0,5 %ige alkoholische CHG Lösung genauso wirksam, wie eine 2 %ige wässrige CHG-Lösung. Es wurde sogar eine geringere Anzahl an kolonisierten Kathetern in der Gruppe mit der alkoholischen Lösung gefunden, auch wenn der Unterschied nicht signifikant war (256).

Das spricht insgesamt für eine synergistische Wirkung des Alkohols mit dem CHG. Auf der einen Seite führt der Alkohol zu einer sofortigen Reduktion der Mikroorganismen und auf der anderen Seite übt das CHG einen Langzeiteffekt auf die Rekolonisation der Hautflora aus. Eine mögliche Theorie ist, dass durch den Alkohol Mikroorganismen vorgeschädigt werden, diese sich dann aufgrund der lang anhaltenden Exposition gegenüber CHG nicht wieder erholen und zeitverzögert absterben. Für Chlorhexidin konnte zudem von Fursted *et al.* ein postantibiotischer Effekt nachgewiesen werden. Damit ist davon auszugehen, dass es für einen Zeitraum von mindestens einigen Stunden zu einer Verzögerung der Rekolonisation der Hautflora kommt, auch wenn kein Chlorhexidin mehr auf der Haut vorhanden ist (61). Dies könnte eine mögliche Erklärung für die guten Resultate bezüglich der Infektionsraten bei der Verwendung in der Katheterpflege bzw. der präoperativen Hautantiseptik sein.

Es ist allerdings ebenfalls denkbar, dass die Art des Alkohols bzw. dessen Konzentration ebenfalls einen Einfluss auf die benötigte CHG-Konzentration ausübt. Das Chlorhexidin verbleibt nach der Verdunstung des Alkohols auf der Haut und bewirkt eine Verzögerung der Rekolonisation der Hautflora. Entscheidend für die Rekolonisationsgeschwindigkeit ist vermutlich neben weiteren Faktoren auch die Ausgangskeimzahl auf der Haut. Wird durch die Verwendung eines besonders wirksamen Alkohols die Hautflora nun besonders stark reduziert, wird dadurch die Quantität der rekolonisierenden Mikroorganismen ebenfalls beeinflusst. So besteht

entweder die Möglichkeit, dass bei Verwendung eines besonders gut wirksamen Alkohols bereits geringere CHG-Konzentrationen ausreichen, um die Rekolonisation zu verzögern oder es sind nach 72 h weniger Mikroorganismen im Vergleich zu anderen Lösungen nachweisbar.

Bei der Verwendung eines anderen Alkohols als *n*-Propanol oder einer anderen Konzentration besteht somit die Möglichkeit, dass bei einer 0,5 %igen CHG-Lösung nach 72 h bereits keine ausreichende Wirksamkeit mehr nachzuweisen ist. Allerdings konnte auch für Ethanol, der in der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studie zur Identifizierung des bestwirksamen Alkohols in Bezug auf die Sofortwirkung am schlechtesten abgeschnitten hatte, durch eine Supplementierung mit 0,5 % Chlorhexidin gezeigt werden, dass durch Anwendung dieser Lösung die Zahl der Hautproben mit Bakterienbesiedelung signifikant geringer war als nach der Behandlung mit 10 % Povidon-Iod (PVP-I) (211).

PVP-I zählt zu den antiseptischen Wirkstoffen, die neben CHG routinemäßig in der Hautantiseptik z. B. für die Katheterpflege eingesetzt werden. Es wurden in einer Vielzahl von Studien vergleichende Untersuchungen für die Wirksamkeit von CHG und PVP-I durchgeführt. Dabei wurde gezeigt, dass CHG nicht nur besser geeignet war, die Rate an kontaminierten Blutkulturen zu verringern (142), sondern auch die Rate an kolonisierten Kathetern. Vallés *et al.* zeigten, dass sowohl 2 % CHG in Wasser als auch 0,5 % CHG in *iso*-Propanol einer 10 %igen wässrigen PVP-I-Lösung signifikant überlegen waren (256); Kinirons *et al.* konnten ebenfalls belegen, dass in einer Studie zur Katheterisierung bei Kindern die Rate an kolonisierten Kathetern in der CHG-Gruppe niedriger war als in der Gruppe, deren Haut zuvor mit 10 % PVP-I antiseptisch behandelt wurde (110). Auch für die Antiseptik in dem in Deutschland bislang als kritisch angesehenen Lumbalbereich zeigte sich eine signifikant bessere Wirksamkeit für 0,5 % CHG in *iso*-Propanol, verglichen mit 10 % PVP-I in Bezug auf die Kontamination der verwendeten Nadeln mit endogenen Mikroorganismen (160).

Neben der Kontamination und der Kolonisation der eingesetzten Katheter ist allerdings der wichtigste klinische Endpunkt die Vermeidung gefäßkatheterassoziierter Infektionen. Auch hier zeigten verschiedene Studien den Vorteil des Einsatzes von Chlorhexidin in der Katheterpflege. Die Zahl katheterassoziierter Bakteriämien und die Länge der Hospitalisierung waren geringer in der Gruppe, bei der 2 % CHG in 70 % *iso*-Propanol als Antiseptikum für die Haut und die Desinfektion des Katheter-Anschlusses eingesetzt wurde im Vergleich zu einer Gruppe, die eine wässrige 10 %ige PVP-I-Lösung erhielt (170). Für die Desinfektion der Katheteranschlussstelle zeigten Soothill *et al.*, dass nach einer Umstellung von der Desinfektion mit 70 % *iso*-Propanol auf 2 % Chlorhexidin in *iso*-Propanol die Zahl der Infektionen signifikant, auf eine Gesamtzahl von 1/4 der zuvor gemessenen Infektionsrate, gesenkt werden konnte (237). Selbst für eine Chlorhexidin-Konzentration von 0,05 % konnte Nicht-Unterlegenheit gegenüber 10 % PVP-I in Bezug auf die katheterassozierten Infektionen nachgewiesen werden (94). Die wohl wichtigste Studie zum Vergleich verschiedener Antiseptika für die Prävention katheterassozierte Infektionen führten Chaiyakunapruk *et al.* durch. Deren Metaanalyse bestätigte den signifikanten Vorteil für die Verwendung von Chlorhexidin gegenüber PVP-I (33).

Ein weiterer wichtiger klinischer Endpunkt für die Hautantiseptik ist die Vermeidung postoperativer Wundinfektionen durch die Verwendung eines geeigneten Antiseptikums. Auch hier zeigte sich in unterschiedlichen Studien die Überlegenheit des Chlorhexidins. Bereits 1982 wurde gezeigt, dass die Gesamtfektionsrate nach der präoperativen Hautantiseptik mit 0,5 % Chlorhexidin in Alkohol im Vergleich zu PVP-I (10 % in Alkohol) signifikant niedriger war, obwohl für einige spezielle Operationsgebiete die Zahl der Infektionen in der Chlorhexidingruppe höher lag (nicht signifikant) und die Autoren zusammenfassend feststellten, dass eine Untersuchung eines größeren Patientenkollektivs notwendig sei, um signifikante Unterschiede zwischen den Präparaten aufzeigen zu können (15). Im Jahr 2009 sind zwei weitere wichtige Studien erschienen, in denen sich Chlorhexidin für die Prävention postoperativer Wundinfektionen als vorteilhaft erwies. So zeigten Paocharoen *et al.*, dass nach einer Behandlung („scrub and paint“) mit Chlorhexidin

die Rate an postoperativen Wundinfektionen geringer war als nach der Applikation von PVP-I (173). Für die Infektionsprävention nach Schulteroperationen wurde darüber hinaus die überlegene Wirksamkeit von 2 % Chlorhexidin in Alkohol im Vergleich zu zwei Iod-haltigen Präparaten gezeigt (207). Swenson *et al.* zeigten, dass zwei Iod-haltige Präparate in Bezug auf die Prävention postoperativer Wundinfektionen besser waren als ein Chlorhexidin-haltiges Präparat (246). Darouiche *et al.* publizierten hingegen Anfang 2010 Ergebnisse, die einen signifikanten Vorteil von Chlorhexidin gegenüber einer 10 %igen PVP-Iod-Lösung für die Prävention postoperativer Wundinfektionen belegen (40). Der Unterschied zwischen den Untersuchungen bestand darin, dass in der Studie von Darouiche *et al.* beide Präparate parallel getestet wurden, nachdem die Patienten in dieser Studie zufällig zu einer Behandlungsgruppe zugeordnet wurden. In der Studie von Swenson *et al.* wurde die unterschiedlichen Behandlungen jeweils über einen Zeitraum von 6 Monaten nacheinander eingesetzt und die Infektionsraten in diesen Zeiträumen miteinander verglichen. Auf Basis der Daten aus der Literatur gibt es mehr Hinweise dafür, dass Chlorhexidin-haltige Präparate einen Vorteil gegenüber PVP-Iod-haltigen Präparaten in Bezug auf die Prävention postoperativer Wundinfektionen bringen.

Eine Limitierung der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studie mit CHG war, dass für die Hemmung der Rekolonisation der Hautflora nur eine Aussage nach 72 h getroffen werden kann. Die Intervalle für die Katheterpflege in der klinischen Praxis können aber durchaus bis zu 7 Tage betragen. Es stellt sich somit die Frage, ob auch nach einer längeren sterilen Abdeckung von 4-8 Tagen alle drei CHG-Konzentrationen in der Wirksamkeit gleichwertig sind und inwieweit die optimale Alkohollösung in Kombination mit CHG in der Lage ist auch über einen noch längeren Zeitraum die Rekolonisation der Hautflora zu hemmen.

Außerdem wurden die Studien auf Untersuchungen zur aeroben Hautflora begrenzt, da diese für die Infektionen der Patienten von entscheidender Bedeutung ist (141, 169). Ob sich die Rangfolge der Einflussgrößen, sowie die optimale Alkoholkonzentration ebenso wie die vergleichbare Wirksamkeit der

unterschiedlichen CHG-Konzentrationen auch für die anaerobe Mikroflora der Haut zeigen lässt, muss gegebenenfalls geklärt werden.

Nachdem bereits durch Maisetta *et al.* nachgewiesen werden konnte, dass Chlorhexidin und hBD-3 gegenüber oralen Bakterien eine synergistische Wirksamkeit zeigen, wurde im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche überprüft, ob verschiedene *Staphylococcus* spp. eine veränderte Empfindlichkeit gegenüber hBD-3 nach Exposition gegenüber sub-lethalen CHG-Konzentrationen aufweisen. Bei einer Verletzung der Hautbarriere werden verschiedene Botenstoffe freigesetzt und es kommt zu einer Aktivierung des Immunsystems. Daran ist auch hBD-3 beteiligt, das u. a. aufgrund seiner breiten antimikrobiellen Wirkung selbst zur Infektionsverhütung beiträgt. Somit ist durchaus denkbar, dass Chlorhexidin und hBD-3 z. B. bei Patienten mit einem zentralen Gefäßkatheter gleichzeitig auf der Haut vorkommen.

Auf Basis der generierten Daten gibt es keine eindeutigen Hinweise, dass eine Exposition gegenüber sub-lethalen CHG-Konzentrationen zu einer veränderten hBD-3-Empfindlichkeit führt. Somit ist nicht davon auszugehen, dass es auf der Haut zu einer Beeinflussung der hBD-3 vermittelten Immunabwehr durch die Verwendung von CHG in der Hautantiseptik kommt. Die in einem Fall gemessene Abnahme der Empfindlichkeit gegenüber hBD-3 war mit 0,1 log₁₀-Stufen sehr niedrig, zumal in einer vergleichbaren Methode im Europäischen Arzneibuch angegeben wird, dass aufgrund der Genauigkeit der Methode eine Abweichung um den Faktor 2 akzeptiert wird (39). Die Genauigkeit der Methode liegt damit mit 0,3 log-Stufen über der in dem Versuch gemessenen Differenz. Die biologische Relevanz dieses statistisch signifikanten Unterschiedes ist fraglich. Aufgrund des gewählten Studiendesigns kann nur eine Aussage für bestimmte Spezies und Konzentrationen getroffen werden. Ob die Staphylokokken bei einer längeren Exposition gegenüber CHG adaptieren bzw. noch stärker adaptieren und ob es dadurch zu einer veränderten Empfindlichkeit gegenüber hBD-3 kommt, sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Untersuchungen zur Klärung der Frage, ob die Ergebnisse auch auf andere antimikrobielle Peptide übertragbar sind, fehlen bislang in der Literatur. Zudem ist noch nicht geklärt, ob andere nicht-flüchtige Wirkstoffe, wie z. B. Octenidindihydrochlorid oder Benzalkoniumchlorid zu einer veränderten hBD-3-Empfindlichkeit führen können.

Es ist zu berücksichtigen, dass die in der klinischen Praxis eingesetzten CHG-Konzentrationen deutlich über den in dieser Studie gewählten sub-lethalen Konzentrationen liegen. Auch in der *In-vivo*-Studie mit dem optimierten Verfahren lag die niedrigste gewählte CHG-Konzentration mit 0,5 % deutlich oberhalb der MHK für die untersuchten Spezies (0,5-2 µg/ml).

Ein bislang noch sehr wenig erforschtes Gebiet sind Kreuzresistenzen zwischen antiseptischen bzw. bioziden Wirkstoffen und den „klassischen“ Antibiotika sowie den natürlichen Peptidantibiotika, die beispielsweise auf der Haut vorkommen. Auch wenn die Einsatzkonzentrationen der bioziden Wirkstoffe in der Regel deutlich über der MHK liegen, so gibt es doch verschiedene Studien, in denen bereits ein Zusammenhang zwischen Antibiotikaresistenzen und Resistenzen gegenüber bioziden Wirkstoffen nachgewiesen werden konnte (253, 265). Es bleibt zu klären, inwieweit es zu Kreuzresistenzen kommen kann, unter welchen Bedingungen die Resistenzbildung begünstigt wird und bei welchen antiseptischen Wirkstoffen diese beobachtet werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit war nach der Identifizierung einer optimalen alkoholischen Lösung die Frage zu klären, wie die Wirksamkeit dieser Lösung im Vergleich zu dem derzeit in Deutschland vorgegebenen Referenzverfahren der DGHM gegenüber der aeroben residenten Hautflora zu beurteilen ist. Die Ergebnisse auf allen vier Hautarealen belegen, dass die gewählte 89,5 %ige *n*-Propanollösung bereits bei wesentlich kürzeren Einwirkzeiten eine Wirksamkeit zeigt, die mit der Wirksamkeit einer 70% igen *iso*-Propanollösung bei einer Einwirkzeit von 10 Minuten vergleichbar ist.

Es zeigten sich dabei Unterschiede in der Wirksamkeit auf den einzelnen Hautarealen. Nachdem auf der Stirn die $\log_{10}$ -Reduktionen bei beiden Verfahren sehr niedrig lagen, wurde hier sogar für eine einminütige Einwirkzeit Nicht-Unterlegenheit nachgewiesen. Das kritischste Hautareal war der Nacken. Dort war eine Mindesteinwirkzeit von 3 Minuten erforderlich, um Nicht-Unterlegenheit nachweisen zu können. Bei dieser Einwirkzeit konnte dann allerdings nicht nur Nicht-Unterlegenheit, sondern sogar Überlegenheit gegenüber dem Referenzverfahren gezeigt werden. Da in dieser Studie nur Einwirkzeiten im Abstand von einer Minute untersucht wurden, ist zu vermuten, dass es in dem Zeitintervall zwischen zwei und drei Minuten Einwirkzeit einen Bereich gibt, in dem das optimierte Verfahren mit dem Referenzverfahren gleichwertig ist. Um dieses zu belegen sind allerdings weitere Untersuchungen bei anderen Einwirkzeiten erforderlich.

Bei allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen konnte nicht bestätigt werden, dass es sich bei dem Lumbalbereich um einen Bereich handelt, der für die Hautantiseptik besonders kritisch ist. Bislang galt dieses Areal in Deutschland als kritischer Bereich, da er zu den talgdrüsenreichen Gebieten gezählt wurde und somit eine 10-minütige Einwirkzeit bis Ende 2008 für alle Hautantiseptika vorgeschrieben war. Im Gegenteil dazu stehen die Versuchsergebnisse an insgesamt 220 Probanden, aus denen hervorgeht, dass auch alkoholische Lösungen, die auf anderen Arealen eine schwächere Wirksamkeit zeigen, auf diesem Areal in der Lage sind, die residente Hautflora so weit zu eliminieren, dass nur noch vereinzelte Kolonien nachweisbar waren. Da es unmöglich ist, die Hautflora vollständig zu eliminieren und damit „Sterilität“ der Haut zu erzeugen, ist es wahrscheinlich, dass bereits bei kurzen Einwirkzeiten ein nicht weiter zu reduzierendes Minimum („irreducible minimum“) der Hautflora erzielt wird. Somit konnte aufgrund der fast vollständigen Reduktion der aeroben Hautflora durch beide alkoholischen Lösungen keine Überlegenheit für die *n*-propanolische Lösung nachgewiesen werden.

In der von der DGHM vorgegebenen Methode zur Wirksamkeitstestung der Hautantiseptika im praxisnahen Versuch mit Probanden wird 70 %iger *iso*-Propanol

als Referenzalkohol verwendet. In dieser Arbeit stellte sich jedoch heraus, dass es sich bei diesem Alkohol weder um die wirksamste Art des Alkohols noch um die wirksamste Konzentration handelt. Da die DGHM-Methode die Basis für den Wirksamkeitsnachweis im Rahmen der Zulassung der Hautantiseptika als Arzneimittel darstellt, ist diese Alkohollösung der Standard für die Wirksamkeit, den alle Präparate erfüllen müssen. Es stellt sich jedoch die Frage, ob dieser Standard ausreichend ist. Vorstellbar ist z. B. analog zu der Referenzmethode der chirurgischen Händedesinfektion nach EN 12791 60 % *n*-Propanol bei der Etablierung einer europäischen Methode zum Nachweis der Wirksamkeit für Hautantiseptika als Referenzalkohol zu definieren. Damit würde der wichtigste Einflussfaktor für die Wirksamkeit, die Art des Alkohols, auch in der Referenzmethode Berücksichtigung finden.

Eine Etablierung einer europäischen Methode für Wirksamkeitsprüfungen für Hautantiseptika ist sinnvoll, um die Wirksamkeitsanforderungen zu vereinheitlichen und durch den Standard eine Mindestwirksamkeit zu gewährleisten. Neben der Art des gewählten Referenzalkohols sollten allerdings noch weitere methodische Voraussetzungen bei der Etablierung einer neuen Methode berücksichtigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass verschiedene methodische Details wie z. B. die Wahl des Probandenkollektivs und die Auswahl der Testareale einen entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis von Wirksamkeitsstudien ausüben können. Im Folgenden werden verschiedene methodische Details diskutiert, die zukünftig in einer Methode zur Wirksamkeitsprüfung berücksichtigt werden sollten.

Soll in eine Wirksamkeitsstudie die Untersuchung nicht-flüchtiger Wirkstoffe, wie z. B. CHG, mit eingeschlossen werden, ist ein besonderes Augenmerk darauf zu legen, dass keine falsch-positiven Ergebnisse durch eine nachträgliche Wirkung *in vitro* durch verschleppte Wirkstoffreste generiert werden. Für die flüchtigen alkoholischen Wirkstoffe ist diese Problematik kaum relevant, da durch den Verdünnungseffekt bei der Probennahme und -aufbereitung sofort Konzentrationsbereiche erreicht werden, bei denen keine Auswirkung auf das

Ergebnis einer Studie zu erwarten ist. Insbesondere bei nicht-flüchtigen Wirkstoffen stellt eine Verschleppung von Wirkstoffresten allerdings ein Problem dar (100, 104, 198), da auch bei sehr geringen Konzentrationen die Ergebnisse signifikant beeinflusst werden. Somit ist es dann nicht mehr möglich, die *In-vivo*-Wirksamkeit nach einer bestimmten Einwirkzeit zu bestimmen, da auch nach der Probennahme noch eine weitere Reduktion der Zahl der Mikroorganismen zu erwarten ist.

Um diese *In-vitro*-Reduktion zu unterbinden, müssen Substanzen der Probennahmeflüssigkeit zugesetzt werden, die in der Lage sind, Reste des nicht-flüchtigen Wirkstoffs vollständig zu neutralisieren. An diese Substanzen wird allerdings neben der Eignung zur Neutralisierung des Wirkstoffes auch noch die Anforderung gestellt, dass sie selbst keine toxische Wirkung auf die Mikroorganismen haben dürfen. Bevor ein Antiseptikum mit einem nicht-flüchtigen Wirkstoff *in vivo* getestet wird, muss eine Neutralisierungsvalidierung erfolgen, da ansonsten die Ergebnisse aus der Wirksamkeitsuntersuchung nicht valide sind (198). Eine international anerkannte Methode zur Validierung der Neutralisierung ist die Methode der ASTM (ASTM E1054) (6). Wie wichtig eine Neutralisierung ist, zeigt unter anderem auch eine Studie, bei der nach der antiseptischen Behandlung Proben von der Haut mit Kontaktagarplatten ohne Neutralisierungssubstanzen genommen wurden. Dabei wurde nach der Behandlung mit CHG keine einzige positive Kultur gefunden und nach der Behandlung mit PVP-I waren nur wenige Proben positiv. Wurde allerdings nach der Behandlung mit PVP-I Natriumthiosulfatlösung aufgetragen, für die bekannt ist, dass sie PVP-I neutralisiert, zeigten deutlich mehr Kulturen Wachstum (206).

Für eine 2%ige alkoholische CHG-Lösung konnte in dieser Arbeit ein geeignetes Neutralisierungsgemisch identifiziert werden. Für dieses Gemisch wurde die Neutralisierung gemäß der ASTM-Methode validiert, so dass im späteren Wirksamkeitsversuch keine Beeinflussung des Ergebnisses durch verschlepptes CHG zu erwarten war. Bei der Evaluierung eines Neutralisierungsgemisches in dieser Arbeit unter Verwendung dieser Methode zeigte sich, dass bereits während der Validierung der Neutralisierung einige Faktoren berücksichtigt werden müssen, die

sonst im späteren Wirksamkeitstest zu einer signifikanten Beeinflussung des Wirksamkeitsergebnisses führen können. Die Bedingungen in der Validierungsphase sollten so nah wie möglich an das spätere Versuchsdesign angelehnt sein. So spielt zum einen die Lagerungsdauer der Proben bis zur weiteren Verarbeitung eine Rolle. In der Validierung ist die längste Probenlagerung zu untersuchen, die später im Wirksamkeitsversuch auftreten kann. Zum anderen ist aber auch zu berücksichtigen, ob zum Beispiel bei der Beprobung ein Trägermaterial verwendet wird. Dieses sollte ebenfalls in der Neutralisierungsvalidierung verwendet werden, um die Bedingungen so praxisnah wie möglich zu wählen.

In der DGHM-Methode wird zwar vorgegeben, dass geeignete Neutralisierungssubstanzen zu wählen sind, doch wird bislang noch nicht gefordert, dass die Neutralisierung validiert sein muss. Dies ist aber entscheidend dafür, auch valide Wirksamkeitsergebnisse im praxisnahen Versuch zu generieren. In der amerikanischen Methode der FDA zur Prüfung der Wirksamkeit der Hautantiseptika wird die Neutralisierungsvalidierung gefordert. Auch für eine zukünftige europäische Norm zur Hautantiseptik sollte die Neutralisierungsvalidierung analog zu der Validierung der Neutralisierungssubstanzen im Bereich der chirurgischen Händedesinfektion EN 12791 berücksichtigt werden (51).

Bevor ein praxisnaher Versuch mit Probanden durchgeführt werden kann, ist ein geeignetes Probandenkollektiv auszuwählen. Ergebnisse aus Studien zur Dichte der Hautflora bzw. zur Wirksamkeit antiseptischer Lösungen sind kritisch zu betrachten, wenn das Geschlechterverhältnis des Probandenkollektivs nicht ausgewogen ist und die Testfelder nicht randomisiert wurden.

Bereits in der durchgeführten Metaanalyse zur Mikrofloradichte der Haut zeigten sich in einigen Studien Unterschiede in der Quantität der Hautflora zwischen den Geschlechtern (165), in den meisten Studien war die Dichte bei Männern höher als bei Frauen (128, 144, 164). Eine geschlechtsspezifische Auswertung der Studien für die Metaanalyse war aufgrund der geringen Studienzahl bzw. der mangelnden Datenlage nicht möglich. In zwei Studien von Noble *et al.* wurden Angaben zu

verschiedenen Hautarealen geschlechtsbezogen ausgewertet (164, 167). In dieser Studie war die Dichte der Hautmikroflora auf allen Hautarealen bei Männern höher als bei Frauen.

Auch in den in dieser Arbeit durchgeführten *In vivo*-Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass Männer eine signifikant höhere Hautfloradichte aufweisen als Frauen. Es ist demnach bei der Wahl der Probanden auf ein ausgewogenes Geschlechterverhältnis in Wirksamkeitsstudien zu achten. Diese Anforderung sollte einen Einzug in nationale Standardmethoden, wie z. B. die DGHM-Methode, finden und darüber hinaus auch in einer zukünftigen europäischen Norm berücksichtigt werden.

Fierer *et al.* konnten darüber hinaus zeigen, dass sich auch die Zusammensetzung der Hautflora je nach Geschlecht unterschied. Bei Frauen wurde dabei eine größere Vielfalt gefunden als bei Männern (58). Diese Ergebnisse von Grice *et al.* zeigen, dass auf geringer besiedelten Hautarealen, wie z. B. den Unterarmen eine größere Vielfalt vorliegt als auf dicht besiedelten Arealen (73), was den Zusammenhang mit der Geschlechtsspezifität erklären könnte. Ein möglicher Grund für die unterschiedliche Vielfalt je nach Hautfloradichte könnte die Interaktion bzw. Der „Konkurrenzkampf“ zwischen unterschiedlichen Mikroorganismen sein. Beispielsweise vermag *Staphylococcus epidermidis* die Kolonisation der Haut mit anderen Mikroorganismen durch die Sekretion von Peptiden, die toxisch gegenüber anderen Mikroorganismen wirken, zu hemmen (38). Auch wenn in dieser Arbeit keine Differenzierung der Mikroflora erfolgte, so ist auf Basis dieser Daten davon auszugehen, dass die Unterschiede in der Zusammensetzung z. B. in Wirksamkeitsstudien für Antiseptika eine Rolle spielen können (189).

Neben Einflussfaktoren, wie beispielsweise das Alter, der pH-Wert der Haut und der Wassergehalt (23, 107, 196, 231), spielt die physiologische Beschaffenheit des Hautareals für die Dichte der Hautmikroflora auch eine wichtige Rolle. Auch bezüglich der physiologischen Beschaffenheit der Haut spielt das Geschlecht eine Rolle (97).

Auf der Stirn, einem talgdrüsenreichen Areal mit einem hohen Lipidgehalt, wurde die höchste Dichte der aeroben Hautflora gemessen. Im Vergleich dazu waren der Bauch und der Nacken weniger dicht besiedelt. Obwohl die physiologischen Bedingungen auf diesen beiden Arealen sehr unterschiedlich sind, zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der aeroben Hautfloradichte. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass unterschiedliche Spezies auf diesen Arealen zu finden sind. Auch ohne eine Differenzierung einzelner Spezies ließen sich während der Versuchsdurchführung deutliche Unterschiede bezüglich der Morphologie und dem Habitus der Mikroorganismen feststellen. Ein Zusammenhang zwischen Qualität der Mikroorganismen und der Beschaffenheit des Hautareals wird auch durch Ergebnisse aus der Literatur bestätigt (23, 132, 154).

Es gibt bislang keine eindeutigen Hinweise, dass hinsichtlich der ethnischen Zugehörigkeit Unterschiede in der Quantität und der Qualität der Hautmikroflora existieren. Allerdings gibt nur wenige Studien zu dieser Thematik und die Datenlage hinsichtlich dieser Fragestellung ist widersprüchlich. So fanden Sultana *et al.* bei Probanden mit unterschiedlicher ethnischer Zugehörigkeit keine Unterschiede in der Zahl der Mikroorganismen auf den Händen (245). Warrier *et al.* fanden ebenfalls keine Unterschiede in der aeroben Hautfloradichte zwischen unterschiedlichen ethnischen Gruppen, obwohl hinsichtlich der Zusammensetzung der Hautflora eine höhere Zahl an *P. acnes* in der Gruppe der Personen afrikanischen Ursprungs gefunden wurde. Der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant (257). Reborá *et al.* fanden im Gegensatz dazu eine höhere Zahl an aeroben Mikroorganismen bei Personen afrikanischen Ursprungs (187). Es sind weitere Untersuchungen notwendig, um zu klären, ob diese Ergebnisse tatsächlich existieren bzw. ob sie eine klinische Relevanz aufweisen und damit bei der Etablierung einer neuen Methode Berücksichtigung finden sollten.

Im Studiendesign sollte zusätzlich auch die Auswahl geeigneter Testareale erfolgen. Wie in der Metaanalyse gezeigt werden konnte, bestehen deutliche Unterschiede in der Dichte der Hautflora zwischen einzelnen Hautarealen. Es ist entscheidend, dass für den Wirksamkeitsnachweis entsprechend klinisch relevante Areale gewählt

werden, da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass nicht nur die Zahl der Mikroorganismen selbst einen Einfluss auf die Wirksamkeit ausübt, sondern dass auch die physiologischen Bedingungen auf den Arealen eine Rolle spielen (s. o.). Ist eine entsprechende Auswahl nicht möglich, sollten Areale gewählt werden, die sowohl in der Zahl der Mikroorganismen als auch von den physiologischen Bedingungen (trocken/feucht; talgdrüsenarm/-reich) vergleichbar sind. Im ungünstigsten Fall sollten feuchte (z. B. die Leistenregion) sowie talgdrüsenreiche Areale (z. B. die Stirn) gewählt werden, da hier die Mikrofloradichte am höchsten ist.

Wird als zu prüfendes Hautareal der Rücken gewählt, ist genau festzulegen, in welchem Bereich der Rücken zu beproben ist, da die Ergebnisse dieser Arbeit deutliche Unterschiede zwischen dem oberen und dem unteren Rückenbereich zeigen. Im oberen Rückenbereich war die Dichte der Mikroflora signifikant höher als im Lumbalbereich. Auch Sakuragi *et al.* fanden Unterschiede in der Dichte der Hautflora je nach Lokalisation auf dem Rücken (206).

Die Daten aus dieser Arbeit zeigen, dass auch innerhalb bestimmter Areale, wie der Stirn und dem Nacken, signifikante Unterschiede in der Dichte der Hautflora zu finden sind. Aus diesem Grund ist, neben der Wahl der geeigneten Testareale, eine Randomisierung der Testfelder besonders wichtig, um eine Beeinflussung des Ergebnisses zu vermeiden. Wird der Vorwert beispielsweise immer von einem bestimmten Testfeld entnommen, auf dem generell eine höhere Ausgangszahl an Mikroorganismen zu erwarten ist (z. B. einem medial gelegenen Feld auf der Stirn) und der Nachwert von einem Areal, auf dem eine signifikant geringere Dichte der Mikroorganismen erwartet wird, ergibt sich alleine schon durch der Wahl der Testfelder eine „Pseudo-Wirksamkeit“ für das Antiseptikum. Das bedeutet, dass dies auch dann gelten würde, wenn das Antiseptikum gar keine antimikrobielle Wirkung aufweist. Dieser Aspekt findet bislang in der DGHM-Methode keine Berücksichtigung, da keine Randomisierung der Testfelder verbindlich vorgeschrieben ist. Dies sollte zukünftig berücksichtigt werden, um diesen systematischen Fehler zu vermeiden.

In der ASTM Methode für die Wirksamkeitsprüfung für Antiseptika, die vor Operationen, vor der Gefäßkatheterisierung oder vor Injektionen angewendet werden, wird zwar die Notwendigkeit der Randomisierung der Testfelder berücksichtigt, allerdings wird gerade auf dem kritischsten Areal, der Leistengegend, eine Ausnahme gemacht (7). Auf diesem Areal wird als Standard vorgegeben, die Testfelder generell nicht zu randomisieren. Der Vorwert ist hier immer von einem Testareal an einer bestimmten Stelle der Leistenregion abzunehmen, um ein „worst case“-Szenario zu simulieren. Eine Randomisierung wird jedoch von der ASTM als Ausnahme ebenfalls zugelassen. Allerdings wird in diesem Fall darauf verwiesen, dass bei einer Randomisierung eine größere Probandenzahl notwendig sein könnte, um Unterschiede zwischen den einzelnen Verfahren nachzuweisen (größere Streuung der Werte). Aus statistischer Sicht wäre diese Variante allerdings eindeutig zu bevorzugen, um einen Fehler durch die Selektion der Testfelder zu vermeiden. Auf allen anderen Arealen, die in dieser Methode untersucht werden, wird eine Randomisierung der Testfelder vorgeschrieben.

Eine gleichmäßige Zuordnung zwischen rechter und linker Körperhälfte ist nicht zwingend erforderlich, da keine signifikanten Unterschiede zwischen den Körperhälften nachgewiesen werden konnten.

In der FDA-Methode sowie in der ASTM-Methode zur Prüfung der Hautantiseptika wird vorgeschrieben, dass auf jedem Hautareal eine bestimmte Mindestkeimzahl nachgewiesen werden muss. Der Vorteil ist, dass Wirksamkeitsunterschiede deutlicher nachweisbar sind bzw. dass der Nachweis einer besonders hohen Wirksamkeit möglich ist, da eine nicht so starke Limitierung durch eine niedrige mittlere Ausgangskeimzahl erfolgt. Die Präparate werden somit unter einem gewissen „worst-case“-Szenario getestet und es ist davon auszugehen, dass auch bei Personen mit einer niedrigeren Mikrofloradichte das Präparat wirkt. Der Nachteil daran ist, dass diese gezielte Auswahl nicht mehr einer zufälligen Stichprobe entspricht und sich deshalb mathematisch nicht klären lässt, inwieweit die Ergebnisse auf die Gesamtbevölkerung übertragbar sind.

In der DGHM-Methode für den praxisnahen Versuch mit Probanden zur Testung von Hautantiseptika wird anstelle eines Tests auf Nicht-Unterlegenheit der Vorzeichen-Rangtest für Paardifferenzen nach Wilcoxon verwendet. Durch diesen Test ist es jedoch nur möglich, Überlegenheit eines Verfahrens im Vergleich zu einem Referenzverfahren nachzuweisen. Da aber die Nicht-Unterlegenheit der Wirksamkeit zu dem Referenzverfahren untersucht werden soll, sollte eine Prüfung auf Nicht-Unterlegenheit durchgeführt werden. Bei der Etablierung einer europäischen Norm wäre es demnach sinnvoll, analog zu den europäischen Normen zur Händehygiene (50, 51), für die statistische Auswertung die Nicht-Unterlegenheitsprüfung zu wählen. In dieser Arbeit wurde die Nicht-Unterlegenheitsgrenze auf $\delta=0,7$ festgelegt. Dieser Wert liegt damit zwischen dem Wert für die hygienische Händedesinfektion ($\delta=0,6$) und der aller Voraussicht nach in die Norm für die chirurgische Händedesinfektion einfließende Wert von $\delta=0,75$. Die Festlegung des Wertes im Rahmen dieser Arbeit erfolgte auf Basis verschiedener Studienergebnisse zur Wirksamkeitsprüfung von Hautantiseptika aus unterschiedlichen Studienzentren (Daten nicht gezeigt). Bei der Entwicklung einer Norm für den Wirksamkeitsnachweis für Hautantiseptika sollten noch weitere Studienergebnisse bei der Festlegung der Nicht-Unterlegenheitsgrenze berücksichtigt werden, um diesen Wert durch weitere Daten statistisch zu untermauern.

5 Schlussfolgerungen

Die Validierung der Neutralisierung nicht-flüchtiger Langzeitwirkstoffe in Antiseptika und Desinfektionsmitteln ist essentiell, um nach einer definierten Einwirkzeit die tatsächliche Wirksamkeit bestimmen zu können. Daten aus Studien ohne eine entsprechende Neutralisierungsvalidierung sind mit Vorsicht zu interpretieren, da eine weitere Schädigung der Mikroorganismen nach der Einwirkzeit und Probennahme (*in vitro*) zu falsch-positiven Testergebnissen führen kann. Das Design der Neutralisierungsversuche sollte dabei so eng wie möglich an das Design der *In-vivo*-Wirksamkeitsversuche angelehnt sein, insbesondere unter der Berücksichtigung der Wirkstoffmenge, der Standzeit der Proben vor der weiteren Verarbeitung und Bebrütung sowie die Wahl geeigneter und sensitiver Mikroorganismen.

Bei Studien zur Hautantiseptik und darüber hinaus auch bei anderen Studien zur Quantifizierung der Dichte der Hautflora sollten die Testareale auf der Haut für einzelne Testverfahren randomisiert zugeordnet werden. Für die Wahl des Probandenkollektivs ist in derartigen Studien ein ausgewogenes Geschlechterverhältnis wichtig, um valide Ergebnisse zu generieren, da gezeigt werden konnte, dass die Hautfloradichte bei Männern und Frauen unterschiedlich ist.

Die Untersuchung an 180 Probanden zeigte, dass eine 89,5 %ige *n*-Propanollösung eine bessere antiseptische Wirksamkeit auf der Stirn, dem Abdomen und dem Rücken zeigte als *iso*-Propanol und Ethanol. Die wichtigste Einflussgröße für die Hautantiseptik war die Art des Alkohols; die Einwirkzeit spielte nur eine untergeordnete Rolle. In einer weiteren Studie konnte nachgewiesen werden, dass durch Zusatz von 0,5, 1 und 2 % CHG zu der 89,5 %ige *n*-Propanollösung die Rekolonisation der Hautflora für mindestens 72 Stunden vermindert wird.

In einem Vergleich von 89,5 %igem *n*-Propanol mit dem 10-minütigen Referenzverfahren der DGHM (70 % *iso*-Propanol) zeigte sich, dass mit dieser alkoholischen Lösung bereits bei 3 Minuten Einwirkzeit eine gleichwertige

Reduktion der aeroben, residenten Hautflora auf der Stirn, dem Abdomen, dem Nacken und im Lumbalbereich erzielt wird. Somit ist davon auszugehen, dass das jetzige Referenzverfahren nicht das Optimum der Hautantiseptik darstellt. Bei der möglicherweise in Zukunft geplanten Etablierung einer europäischen Norm für die Wirksamkeitsbestimmung von Hautantiseptika ist somit eine alternative Referenzmethode in Erwägung zu ziehen.

Auf Basis der durchgeführten Versuche existieren keine eindeutigen Hinweise, dass bei verschiedenen *Staphylococcus* spp. eine dreitägige Exposition gegenüber sublethalen Konzentrationen des nicht-flüchtigen Wirkstoffs CHG zu einer veränderten Empfindlichkeit gegenüber dem auf der Haut vorkommenden antimikrobiellen Peptid hBD-3 führt. Allerdings zeigten Stämme, deren Empfindlichkeit gegenüber CHG in der Expositionszeit abnahm, auch eine geringere Sensitivität gegenüber hBD-3. Auf Basis der vorliegenden Daten ist deshalb nicht davon auszugehen, dass der Einsatz von CHG für die Hautantiseptik die natürliche Abwehr der Haut durch hBD-3 gegenüber Mikroorganismen schwächt.

6 Ausblick

Die Basis für Wirksamkeitsuntersuchungen zur Hautantiseptik bildet neben der Quantifizierung der Hautflora die *In-vivo*-Untersuchung auf zwei physiologisch unterschiedlichen Hautarealen in Deutschland und in den USA. Die bisher für die Hautantiseptik in Deutschland zugrunde gelegte Einteilung in talgdrüsenarme und talgdrüsenreiche Hautareale bringt jedoch in der klinischen Praxis den Nachteil mit sich, dass häufig nicht klar ist, wo genau die talgdrüsenreiche Haut beginnt und wo somit eine wesentlich längere Einwirkzeit einzuhalten ist (siehe Abbildung 5). In den USA wird im Gegensatz zur deutschen Methode die Anwendung auf feuchten und trockenen Arealen unterschieden. Dies geht vermutlich zurück auf die Tatsache, dass in der Literatur für feuchte Hautareale eine höhere Bakteriendichte angegeben wird als für die trockenen Areale. Zukünftig sollte in Deutschland eine Einteilung des Körpers für die Hautantiseptik zugrunde gelegt werden, die es in der klinischen Praxis ermöglicht, schnell und sicher die richtige Einwirkzeit für Hautantiseptika zu ermitteln. Dabei sollten die Unterschiede in der Besiedelung des menschlichen Körpers mit Mikroorganismen nicht außer Acht gelassen werden.

Seit Ende 2008 gibt es bereits erste Hautantiseptika auf dem deutschen Markt, die für die antiseptische Behandlung auf talgdrüsenreicher Haut für Einwirkzeiten unterhalb von 10 Minuten zugelassen sind. Generell sind für die Hautantiseptik bislang nur sehr wenige Daten in der Fachliteratur zu verkürzten Einwirkzeiten für Hautantiseptika zu finden. Es bedarf demnach weiterer Forschung, inwieweit die Einwirkzeiten auf ein wissenschaftlich begründetes Maß verkürzt werden können, ohne den Schutz des Patienten zu gefährden.

Des Weiteren zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass es sich bei dem DGHM-Referenzverfahren nicht um das Optimum der Hautantiseptik handelt. Analog zu den Normen zur Testung von Händedesinfektionsmitteln sollte es ebenfalls eine europäische Norm für die Wirksamkeitstests von Hautantiseptika etabliert werden, um die Testung sowie die Anforderungen an die Wirksamkeit europaweit zu vereinheitlichen. Im Rahmen der Etablierung einer entsprechenden Norm sollte

berücksichtigt werden, dass es sich bei dem derzeitigen deutschen Referenzverfahren weder um den wirksamsten Alkohol noch um die wirksamste Konzentration handelt. Es ist zu prüfen, ob es eventuell sinnvoll wäre, den optimalen Alkohol, *n*-Propanol, ggf. analog zur EN 12791 für die chirurgische Händedesinfektion in einer Konzentration von 60 % als Referenzverfahren mit aufzunehmen.

Bislang sind überwiegend Präparate ohne nicht-flüchtige Remanenzwirkstoffe oder Präparate mit Wirkstoffen wie z. B. Benzalkoniumchlorid, Octenidindihydrochlorid oder Povidon-Iod für die Hautantiseptik auf dem deutschen Markt, für die wesentlich weniger öffentlich zugängliche Daten vorliegen als für Chlorhexidin. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Studie zur Untersuchung, ob durch Zusatz von CHG zu einer alkoholischen *n*-Propanollösung die Rekolonisation der Hautflora über mehrere Tage gehemmt werden kann, gibt erste Hinweise auf das Potenzial dieses Wirkstoffes. Bei der Pflege von zentralen Venenkathetern werden in der Regel die Verbände nicht täglich gewechselt. Ein Wechsel wird jedoch spätestens nach 7 Tagen empfohlen. Demnach bleibt anhand weiterer *In-vivo*-Untersuchungen zu klären, ob Chlorhexidin auch geeignet ist, über einen Zeitraum von mehr als 72 Stunden die Rekolonisation der Hautflora unter einer sterilen Abdeckung zu hemmen und welche Konzentrationen in alkoholischen Lösungen die beste Wirksamkeit bei guter Verträglichkeit erbringen. Vor allem sind weitere Untersuchungen für die Kombination aus Chlorhexidin und alkoholischen Lösungen notwendig, da bislang eine Vielzahl der publizierten Studien mit wässrigen Chlorhexidin-Lösungen durchgeführt wurden. Diese Lösungen haben den Nachteil, dass die Wirkung von Chlorhexidin erst verzögert eintritt, beim Legen eines Katheters aber eine sehr gute antiseptische Sofortwirkung benötigt wird, um eine Kontamination des Katheters beim Durchdringen der Haut zu vermeiden. Außerdem besteht bei wässrigen Chlorhexidinlösungen in Abhängigkeit von der Konzentration des Wirkstoffs ein Risiko der Verkeimung.

Nach der Etablierung entsprechender optimaler Chlorhexidinkonzentrationen in alkoholischen Lösungen sollte durch weitere Studien geklärt werden, ob durch den Einsatz entsprechender Lösungen im Vergleich zu Standardpräparaten beispielsweise

die Rate an kolonisierten Kathetern beziehungsweise gefäßkatheterassoziierter Infektionen oder postoperativen Wundinfektionen sinkt. Die bislang wohl ausführlichste Analyse zu der Fragestellung, ob sich der Nutzen für Hautantiseptika anhand von klinischen Endpunkten belegen lässt, wurde in einer Cochrane-Auswertung publiziert. In dieser Untersuchung wurden mehrere Studien übergreifend ausgewertet. Auf Basis der geringen Anzahl der Studien, deren Qualität und deren Aussagekraft konnten die Autoren den Nutzen der Hautantiseptik nicht nachweisen (48). Auf diesem Gebiet sind weitere Studien notwendig, auch wenn aus ethischen Gründen eine Negativkontrolle nicht vertretbar ist und generell nur ein Vergleich zwischen unterschiedlichen Präparaten, deren generelle antimikrobielle Wirksamkeit nachgewiesen ist, statthaft ist. Im letzten Jahr wurden erstmalig Studien mit einem nachgewiesenen Nutzen für die Patienten bei der Verwendung von Chlorhexidin, anstelle des sonst verwendeten Standards Povidon-Iod, publiziert (40, 49, 173).

Durch weitere Studien ist zu klären, welche Chlorhexidin-Konzentration die optimale Wirksamkeit für die Prävention gefäßkatheterassoziierter Infektionen sowie postoperativer Wundinfektionen bei guter Hautverträglichkeit bietet. Es fehlen bislang Studien mit diesen Endpunkten, in denen 2 %ige alkoholische Chlorhexidinlösungen mit Lösungen anderer CHG-Konzentrationen verglichen werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung, ob eine Exposition gegenüber CHG zu einer veränderten Sensitivität von Bakterien gegenüber hBD-3 führt, sind dadurch limitiert, dass nur *Staphylococcus* spp. untersucht wurden und die Chlorhexidinexposition auf drei Tage begrenzt war. Zudem kommen auf der Haut noch weitere antimikrobielle Peptide vor, für die derartige Untersuchungen noch nicht publiziert sind. Des Weiteren sollte für nicht-flüchtige, biozide Wirkstoffe untersucht werden, inwieweit es zu Resistenzentwicklungen kommen kann, welche Bedingungen die Resistenzentwicklungen begünstigen, welche Spezies dafür besonders anfällig sind und ob Kreuzresistenzen zu Antibiotika zu erwarten sind.

Zusammenfassung

Die Hautflora ist intra- und interindividuell unterschiedlich; dabei spielen verschiedene Faktoren für die Hautfloradichte eine entscheidende Rolle, die auch zum Beispiel im Studiendesign für Wirksamkeitsuntersuchungen für Antiseptika berücksichtigt werden sollten. Es konnte gezeigt werden, dass die Wirksamkeit von Antiseptika maßgeblich mit dem getesteten Hautareal und dessen physiologischer Beschaffenheit zusammenhängt. Die Art des Alkohols ist die wichtigste Einflussgröße für die Wirksamkeit der Hautantiseptika und *n*-Propanol in einer Konzentration von 89.5% erwies sich als die bestwirksame Alkohollösung. Die Stirn zeigte sich als geeignetes Areal für die Prüfung der Hautantiseptika. Mit dem optimierten Verfahren konnte nachgewiesen werden, dass eine zu dem in Deutschland derzeit gültigen Referenzverfahren gleichwertige Reduktion bereits bei signifikant kürzeren Einwirkzeiten zu erreichen ist.

Studien zur Hautantiseptik mit nicht-flüchtigen Langzeitwirkstoffen, wie z.B. Chlorhexidin liefern falsch-positive Ergebnisse, wenn nicht sichergestellt ist, dass der Wirkstoff *in vitro* nach der Einwirkzeit neutralisiert wird. Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zur Neutralisierungsvalidierung belegen, dass verschiedene Faktoren wie beispielsweise die Wahl der Mikroorganismen, die Standzeit der Lösung und die Verwendung von Trägermaterialien analog zu den Bedingungen im Wirksamkeitstest im Studiendesign zu berücksichtigen sind, damit valide Ergebnisse erzielt werden.

In den vorliegenden *In-vivo*-Untersuchungen mit einer chlorhexidinhaltigen Alkohollösung zeigte sich, dass Konzentrationen von 0,5-2 % in Kombination mit dem optimierten Hautantiseptikverfahren zu einer signifikanten Hemmung der Rekolonisation der Hautflora für mind. 72 h führten. Dies ist vor allem bei einer permanenten Durchtrennung der Hautbarriere (zum Beispiel bei Katheterisierung) von großer Relevanz, um den Patienten vor endogenen Infektionen zu schützen.

Auf Basis der Versuchsergebnisse dieser Arbeit ist nicht davon auszugehen, dass die Anwendung von Chlorhexidindiacetat zu einer veränderten Sensitivität von Hautbakterien (*Staphylococcus* spp.) gegenüber hBD-3 führt und somit die Effektivität der haut eigenen Immunabwehr schwächt.

Summary

The skin flora is intra- and interindividually different. Multiple factors with an influence on the skin flora density should be considered in studies, e.g., in antiseptic efficacy studies. It was shown that the efficacy of skin antiseptics is significantly influenced by the skin site and the physiological conditions at different skin sites. The type of alcohol was the most important influencing factor for the antiseptic efficacy. 89.5 % *n*-propanol was most effective and the forehead proved to be a suitable test site for efficacy studies. The optimized antiseptic procedure showed an equal efficacy compared to the German reference test method within significantly shorter application times.

Efficacy studies for skin antiseptics with non-volatile, long-lasting active agents like chlorhexidine give false-positive efficacy results, if *in vitro* neutralization is not validated. The neutralization validation showed that different factors, e. g. the chosen microorganisms, the storage time and the application of carriers, have to be included in the study design to obtain valid efficacy data. The test design of the neutralization validation should simulate the conditions of the efficacy test and should therefore follow the efficacy test design as closely as possible.

The results of our *in vivo* study with a chlorhexidine-containing antiseptic showed that CHG-concentrations of 0.5-2 % combined with the optimized antiseptic procedure significantly suppressed recolonisation of the skin flora for at least 72 h. This is important if the skin barrier is permanently disrupted (e.g., during catheterization) to protect the patient from endogenous infections.

No consistent evidence was found that exposure to CHG changes the response of skin bacteria (*Staphylococcus* spp.) to hBD-3 and therefore the use of CHG for skin antisepsis is, unlikely to change the natural defence of hBD-3.

Literaturverzeichnis

1. **Al-Doori, Z., P. Goroncy-Bermes, C. G. Gemmell, and D. Morrison.** 2007. Low-level exposure of MRSA to octenidine dihydrochloride does not select for resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **59**:1280-1282.
2. **Aly, R., and H. I. Maibach.** 1981. Factors Controlling Skin Bacterial Flora, p. 29-44. *In* H. I. Maibach and R. Aly (ed.), *Skin Microbiology*. Springer-Verlag, New-York.
3. **Aly, R., H. I. Maibach, and E. Bloom.** 1978. Quantification of anaerobic diptheroids on the skin. *Acta Dermatologica et Venereologica* **58**:501-504.
4. **Aly, R., H. I. Maibach, H. R. Shinefield, and W. G. Strauss.** 1972. Survival of pathogenic microorganisms on human skin. *Journal of Investigative Dermatology* **58**:205-10.
5. **Anderson, D. J., and K. S. Kaye.** 2009. Staphylococcal surgical site infections. *Infect Dis Clin North Am* **23**:53-72.
6. **Anonymous.** 2002. ASTM E 1054 - 02. Standard test method for evaluation of inactivators of antimicrobial agents.
7. **Anonymous.** 2009. ASTM E 1173 - 01 Standard test method for evaluation of preoperative, precatheterization, or preinjection skin preparations.
8. **Anonymous.** 2010. Rote Liste, vol. 2010. Rote Liste® Service GmbH Frankfurt/Main
9. **Arnold, L.** 1942. Relationship Between Certain Physico-Chemical Changes in the Cornified Layer and the Endogenous Bacterial Flora of the Skin. *The Journal of Investigative Dermatology* **5**:207-223.
10. **Bandemir, B., and M. Pambor.** 1986. Toxische (irritative) Nebenwirkungen von Antiseptika an der Haut, p. 37-66. *In* A. Kramer, G. Berencsi, and W. Weuffen (ed.), *Band 1 Grundlagen der Antiseptik Teil 5 Toxische und allergische Nebenwirkungen von Antiseptika*.
11. **Baumgart, J.** 1990. Untersuchungen zur Keimverschleppung bei intravenösen Punktionen nach 10 Sekunden Hautdesinfektion mittels eines alkoholischen Präparates, Lübeck.
12. **Baxby, D., and R. C. Woodroffe.** 1965. The location of bacteria in skin. *Journal of Applied Bacteriology* **28**:316-21.
13. **Beaudouin, E., G. Kanny, M. Morisset, J. M. Renaudin, M. Mertes, M. C. Laxenaire, C. Mouton, F. Jacson, and D. A. Moneret-Vautrin.** 2004. Immediate hypersensitivity to chlorhexidine: literature review. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* **36**:123-6.
14. **Bernau, A., and P. Heeg.** 1985. Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Hautdesinfektion. *Orthop. Praxis* **5**:351-358.
15. **Berry, A. R., B. Watt, M. J. Goldacre, J. W. Thomson, and T. J. McNair.** 1982. A comparison of the use of povidone-iodine and chlorhexidine in the prophylaxis of postoperative wound infection. *J Hosp Infect* **3**:55-63.
16. **Bibel, D. J., and J. R. LeBrun.** 1975. Changes in cutaneous flora after wet occlusion. *Canadian Journal of Microbiology* **21**:496-500.
17. **Bibel, D. J., and D. J. Lovell.** 1976. Skin flora maps: a tool in the study of cutaneous ecology. *The Journal of Investigative Dermatology* **67**:265-269.

18. **Bibel, D. J., D. J. Lovell, and R. J. Smiljanic.** 1976. Effects of occlusion upon population dynamics of skin bacteria. *British Journal of Dermatology* **95**:607-612.
19. **Blank, I. H.** 1952. Factors which influence the water content of the stratum corneum. *J Invest Dermatol* **18**:433-440.
20. **Blank, I. H., and M. H. Coolidge.** 1950. Degerming the cutaneous surface. *Journal of Investigative Dermatology* **15**:249-256.
21. **Block, C., and M. Furman.** 2002. Association between intensity of chlorhexidine use and micro-organisms of reduced susceptibility in a hospital environment. *J Hosp Infect* **51**:201-6.
22. **Bloom, E., R. Aly, and H. I. Maibach.** 1979. Quantification of skin bacteria: lethality of the wash solution to remove bacteria. *Acta Dermatologica et Venereologica* **59**:460-463.
23. **Bojar, R. A., and K. T. Holland.** 2002. The human cutaneous microflora and factors controlling colonisation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **18**:889-903.
24. **Bojar, R. A., C. J. Tue, and K. T. Holland.** 2004. The effect of lipids on the adherence of axillary aerobic coryneform bacteria. *Lett Appl Microbiol* **38**:470-5.
25. **Bore, E., M. Hebraud, I. Chafsey, C. Chambon, C. Skjaeret, B. Moen, T. Moretro, O. Langsrud, K. Rudi, and S. Langsrud.** 2007. Adapted tolerance to benzalkonium chloride in *Escherichia coli* K-12 studied by transcriptome and proteome analyses. *Microbiology* **153**:935-46.
26. **Boyd, D. A., D. G. Cvitkovitch, A. S. Bleiweis, M. Y. Kiriukhin, D. V. Debabov, F. C. Neuhaus, and I. R. Hamilton.** 2000. Defects in D-alanyl-lipoteichoic acid synthesis in *Streptococcus mutans* results in acid sensitivity. *J Bacteriol* **182**:6055-65.
27. **Braoudaki, M., and A. C. Hilton.** 2004. Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. *J Clin Microbiol* **42**:73-8.
28. **Brown, E., R. P. Wenzel, and J. O. Hendley.** 1989. Exploration of the microbial anatomy of normal human skin by using plasmid profiles of coagulase-negative staphylococci: search for the reservoir of resident skin flora. *J Infect Dis* **160**:644-50.
29. **Brown, M. H., and R. A. Skurray.** 2001. Staphylococcal multidrug efflux protein QacA. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**:163-70.
30. **Broxton, P., P. M. Woodcock, and P. Gilbert.** 1984. Injury and recovery of *Escherichia coli* ATCC 8739 from treatment with some polyhexamethylene biguanides. *Microbios* **40**:187-93.
31. **Broxton, P., P. M. Woodcock, F. Heatley, and P. Gilbert.** 1984. Interaction of some polyhexamethylene biguanides and membrane phospholipids in *Escherichia coli*. *J Appl Bacteriol* **57**:115-24.
32. **Cagianut, L.** 1948. Untersuchungen über die Hautdesinfektion vor medikamentösen Injektionen. Universität Bern, Bern.
33. **Chaiyakunapruk, N., D. L. Veenstra, B. A. Lipsky, and S. Saint.** 2002. Chlorhexidine compared with povidone-iodine solution for vascular catheter-site care: a meta-analysis. *Annals of Internal Medicine* **136**:792-801.

34. **Christiansen, B.** 1987. Vorschlag einer Testmethodik zur Prüfung und Bewertung von Präparaten zur Hautdesinfektion. MD thesis, medical faculty. Christian-Albrechts-Universität, Kiel.
35. **Christiansen, B., and K.-O. Gundermann.** 1986. Vergleichende Untersuchungen zur Desinfektionswirkung von 70% Isopropanol auf die aerobe und anaerobe Hautflora an Oberarm und Stirn. *Hygiene + Medizin* **11**:328-330.
36. **Christiansen, B., C. Höller, and K.-O. Gundermann.** 1984. Vorschlag einer neuen quantitativen Methode zur Prüfung der Eignung von Präparaten zur prä- und postoperativen Hautdesinfektion. *Hygiene + Medizin* **9**:471-473.
37. **Christiansen, B., C. Höller, and K. O. Gundermann.** 1985. Anforderungen an Präparate zur Desinfektion bei Injektionen und Operationen. *Hygiene + Medizin* **10**:57-58.
38. **Cogen, A. L., V. Nizet, and R. L. Gallo.** 2008. Skin microbiota: a source of disease or defence? *Br J Dermatol* **158**:442-55.
39. **Council of Europe, 67075 Strasbourg Cedex, and France.** 2007. European Pharmacopoeia 6.0. Directorate for the Quality of Medicines & Health Care of the Council of Europe (EDQM).
40. **Darouiche, R. O., M. J. Wall, Jr., K. M. Itani, M. F. Otterson, A. L. Webb, M. M. Carrick, H. J. Miller, S. S. Awad, C. T. Crosby, M. C. Mosier, A. Alsharif, and D. H. Berger.** 2010. Chlorhexidine-Alcohol versus Povidone-Iodine for Surgical-Site Antisepsis. *N Engl J Med* **362**:18-26.
41. **Davies, J., J. R. Babb, G. A. Ayliffe, and M. D. Wilkins.** 1978. Disinfection of the skin of the abdomen. *Br J Surg* **65**:855-8.
42. **Davis, C. P.** 1996. Medical microbiology. In S. Baron (ed.), *Normal flora*, 4th ed. The University of Texas Medical Branch at Galveston Galveston.
43. **Desinfektionsmittelkommission im VAH (ed.).** 2009. Online-Desinfektionsmittelliste des VAH. mhp-Verlag, Wiesbaden.
44. **Dhople, V., A. Krukemeyer, and A. Ramamoorthy.** 2006. The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions. *Biochim Biophys Acta* **1758**:1499-512.
45. **Division of Healthcare Quality Promotion (DHQP) National Center for Preparedness, Detection, and and Control of Infectious Diseases** June 15, 2009, posting date. [Online.]
46. **Duncan, W. C., M. E. McBride, and J. M. Knox.** 1969. Bacterial flora. The role of environmental factors. *J Invest Dermatol* **52**:479-84.
47. **Dzubow, L. M., A. C. Halpern, J. J. Leyden, D. Grossman, and K. J. McGinley.** 1988. Comparison of preoperative skin preparations for the face. *J Am Acad Dermatol* **19**:737-41.
48. **Edwards, P. S., A. Lipp, and A. Holmes.** 2004. Preoperative skin antiseptics for preventing surgical wound infections after clean surgery. *Cochrane Database Syst Rev*:CD003949.
49. **Eiselt, D.** 2009. Presurgical skin preparation with a novel 2% chlorhexidine gluconate cloth reduces rates of surgical site infection in orthopaedic surgical patients. *Orthop Nurs* **28**:141-5.
50. **EN 1500:1997.** 1997. Chemical disinfectants and antiseptics. Hygienic hand disinfection. Test method and requirement (phase 2, step 2). CEN - Comité Européen de Normalisation, Brussels.

51. **EN 12791:2005.** 2005. Chemical disinfectants and antiseptics. Surgical hand disinfection. Test method and requirement (phase 2, step 2). CEN - Comité Européen de Normalisation, Brussels.
52. **EN 13727:2007.** 2007. 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). CEN - Comité Européen de Normalisation, Brussels.
53. **Evans, C. A.** 1975. Persistent individual differences in the bacterial flora of the skin of the forehead: numbers of proprionibacteria. *The Journal of Investigative Dermatology* **64**:42-46.
54. **Evans, C. A., and K. L. Mattern.** 1980. The bacterial flora of the antecubital fossa: the efficacy of alcohol disinfection of this site, the palm and the forehead. *Journal of Investigative Dermatology* **75**:140-143.
55. **Evans, C. A., W. M. Smith, E. A. Johnston, and E. R. Giblett.** 1950. Bacterial flora of the normal human skin. *The Journal of Investigative Dermatology* **15**:305-324.
56. **Evans, C. A., and R. J. Stevens.** 1976. Differential quantitation of surface and subsurface bacteria of normal skin by the combined use of the cotton swab and the scrub methods. *J Clin Microbiol* **3**:576-81.
57. **FDA.** 1994. Food and Drug Administration. 21 CFR Parts 333 and 369. Tentative Final Monograph for health-care Antiseptic Drug Products; Proposed Rule. *Federal Register* **59**:31402-31452.
58. **Fierer, N., M. Hamady, C. L. Lauber, and R. Knight.** 2008. The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:17994-9.
59. **Franklin, T. J., and G. A. Snow (ed.).** 2005. *Biochemistry and Molecular Biology of Antimicrobial drug action.* Springer Science + Business Media Inc., New York.
60. **Funderburg, N., M. M. Lederman, Z. Feng, M. G. Drage, J. Jadowsky, C. V. Harding, A. Weinberg, and S. F. Sieg.** 2007. Human α -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:18631-5.
61. **Fuursted, K., A. Hjort, and L. Knudsen.** 1997. Evaluation of bactericidal activity and lag of regrowth (postantibiotic effect) of five antiseptics on nine bacterial pathogens. *J Antimicrob Chemother* **40**:221-6.
62. **Gallo, R. L., M. Murakami, T. Ohtake, and M. Zaiou.** 2002. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J Allergy Clin Immunol* **110**:823-31.
63. **Gao, Z., C. Tseng, Z. Pei, and M. J. Blaser.** 2007. Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **104**:2927-2932.
64. **Gastmeier, P., C. Brandt, D. Sohr, R. Babikir, D. Mlageni, F. Daschner, and H. Ruden.** 2004. [Surgical site infections in hospitals and outpatient settings. Results of the German nosocomial infection surveillance system (KISS)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* **47**:339-44.

-
65. **Gastmeier, P., F. Brunkhorst, M. Schrappe, W. Kern, and C. Geffers.** Wie viele nosokomiale Infektionen sind vermeidbar? *Dtsch Med Wochenschr* **135**:91-3.
66. **Gebel, J., H.-P. Werner, A. Kirsch-Altena, and K. Bansemir.** 2002. Standardmethoden der DGHM zur Prüfung chemischer Desinfektionsverfahren. mhp-Verlag, Wiesbaden.
67. **Geffers, C., P. Gastmeier, and H. Rüden.** 2002. Gesundheitsberichterstattung des Bundes Nosokomiale Infektionen, vol. 8. Robert Koch-Institut in Zusammenarbeit mit dem statistischen Bundesamt; Berlin: Verlag Robert Koch-Institut.
68. **Gilbert, P., and A. J. McBain.** 2003. Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev* **16**:189-208.
69. **Gilbert, P., D. Pemberton, and D. E. Wilkinson.** 1990. Barrier properties of the gram-negative cell envelope towards high molecular weight polyhexamethylene biguanides. *J Appl Bacteriol* **69**:585-92.
70. **Gorman, S. P., D. S. Jones, and A. M. Loftus.** 1987. The sporicidal activity and inactivation of chlorhexidine gluconate in aqueous and alcoholic solution. *J Appl Bacteriol* **63**:183-8.
71. **Grabe, N., C. J. Jakobsen, and M. D. Damm.** 1985. Skin disinfection before intravenous cannulation. Intraluminal contamination after disinfection with 70% isopropyl alcohol. *Acta Anaesthesiol Scand* **29**:764-6.
72. **Graf, P., H. Hallen, and J. E. Juto.** 1995. Benzalkonium chloride in a decongestant nasal spray aggravates rhinitis medicamentosa in healthy volunteers. *Clin Exp Allergy* **25**:395-400.
73. **Grice, E. A., H. H. Kong, S. Conlan, C. B. Deming, J. Davis, A. C. Young, G. G. Bouffard, R. W. Blakesley, P. R. Murray, E. D. Green, M. L. Turner, and J. A. Segre.** 2009. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science* **324**:1190-2.
74. **Grice, E. A., H. H. Kong, G. Renaud, A. C. Young, G. G. Bouffard, R. W. Blakesley, T. G. Wolfsberg, M. L. Turner, and J. A. Segre.** 2008. A diversity profile of the human skin microbiota. *Genome Res* **18**:1043-50.
75. **Groschel, D. H., A. Kramer, A. P. Krasilnikow, E. H. Spaulding, and W. Weuffen.** 1989. [Antisepsis and disinfection: the necessity of a conceptual demarcation]. *Zentralbl Hyg Umweltmed* **188**:526-32.
76. **Gundermann, K.-O., B. Christiansen, and C. Höller.** 1985. New methods for determining pre-operative and postoperative skin disinfection. *Journal of Hospital Infection* **6**:51-57.
77. **Hambraeus, A., J. Hoborn, and W. Whyte.** 1990. Skin sampling-validation of a pad method and comparison with commonly used methods. *J Hosp Infect* **16**:19-27.
78. **Harbarth, S., H. Sax, and P. Gastmeier.** 2003. The preventable proportion of nosocomial infections: an overview of published reports. *J Hosp Infect* **54**:258-66; quiz 321.
79. **Harder, J., J. Bartels, E. Christophers, and J. M. Schroder.** 2001. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* **276**:5707-13. Epub 2000 Nov 20.

-
80. **Hartmann, A. A.** 1982. A comparative investigation of methods for sampling skin flora. *Arch Dermatol Res* **274**:381-5.
 81. **Hartmann, A. A.** 1984. Ein neues Verfahren zur Prüfung der antimikrobiellen Wirksamkeit und Sicherheit präoperativ beim Patienten anzuwendender Hautdesinfektionsmittel. *Hygiene + Medizin* **9**:465-467.
 82. **Hartmann, A. A.** 1983. Untersuchungen zu Unterschieden der Keimzahlen der Residentflora benachbarter Hautareale. *Ärztliche Kosmetologie* **13**:142-154.
 83. **Hartmann, A. A., C. Pietzsch, P. Elsner, T. Lange, H. Hackel, P. Fischer, and T. Bertelt.** 1986. Antibacterial efficacy of Fabry's tinctura on the resident flora of the skin at the forehead. Study of bacterial population dynamics in stratum corneum and infundibulum after single and repeated applications. *Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene, I. Abt. Orig. B* **182**:499-514.
 84. **Healthcare Associated Infection and Antimicrobial Resistance Programme** 2009, posting date. Healthcare-Associated Infections in England: 2008-2009 Report. [Online.]
 85. **Hendley, J. O., and K. M. Ashe.** 1991. Effect of topical antimicrobial treatment on aerobic bacteria in the stratum corneum of human skin. *Antimicrob Agents Chemother* **35**:627-31.
 86. **Hendley, J. O., and K. M. Ashe.** 2003. Eradication of resident bacteria of normal human skin by antimicrobial ointment. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:1988-90.
 87. **Henning, D. R., T. B. Griffin, and H. I. Maibach.** 1972. Studies on changes in skin surface bacteria in induced miliaria and associated hypohydrosis. *Acta Dermato-Venereologica* **52**:371-375.
 88. **Hibbard, J. S., G. K. Mulberry, and A. R. Brady.** 2002. A clinical study comparing the skin antiseptics and safety of Chloraprep, 70% isopropyl alcohol, and 2% aqueous chlorhexidine. *J Infus Nurs* **25**:244-9.
 89. **Hof, H., and R. Dörries (ed.).** 2005. MLP - Duale Reihe, Medizinische Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
 90. **Höffler, U., M. Gloor, G. Peters, H. L. Ko, A. Brautigan, A. Thurn, and G. Pulverer.** 1980. Qualitative and quantitative investigations on the resident bacterial skin flora in healthy persons and in the non-affected skin of patients with seborrheic Eczema. *Arch Dermatol Res* **268**:297-312.
 91. **Holt, R. J.** 1966. Pad culture studies on skin surfaces. *J Appl Bacteriol* **29**:625-30.
 92. **Houang, E. T., O. J. Gilmore, C. Reid, and E. J. Shaw.** 1976. Absence of bacterial resistance to povidone iodine. *J Clin Pathol* **29**:752-5.
 93. **Houari, A., and P. Di Martino.** 2007. Effect of chlorhexidine and benzalkonium chloride on bacterial biofilm formation. *Lett Appl Microbiol* **45**:652-6.
 94. **Ishizuka, M., H. Nagata, K. Takagi, and K. Kubota.** 2009. Comparison of 0.05% chlorhexidine and 10% povidone-iodine as cutaneous disinfectant for prevention of central venous catheter-related bloodstream infection: a comparative study. *Eur Surg Res* **43**:286-90.

-
95. **Ismaeel, N., T. El-Moug, J. R. Furr, and A. D. Russell.** 1986. Resistance of *Providencia stuartii* to chlorhexidine: a consideration of the role of the inner membrane. *Journal of Applied Bacteriology* **60**:361-367.
 96. **Isquith, A. Y., and W. R. Chesbro.** 1963. Pools confluxes and transport of amino acids in *Streptococcus faecium*. *Biochim. Biophys. Acta* **74**:642-658.
 97. **Jacobi, U., J. Gautier, W. Sterry, and J. Lademann.** 2005. Gender-related differences in the physiology of the stratum corneum. *Dermatology* **211**:312-7.
 98. **Kamm, O.** 1921. The relation between structure and physiologic action of the alcohols. *Journal of the American Pharmaceutical Association* **10**:87-92.
 99. **Kamme, C., V. Soltesz, and G. Sundbarg.** 1984. Aerobic and anaerobic bacteria in neurosurgical infections. Per-operative culture with flexible contact agar film. *Journal of Hospital Infection* **5**:147-154.
 100. **Kampf, G.** 2009. Effect of chlorhexidine probably overestimated due to lack of neutralization after sampling. *Infect Control Hosp Epidemiol* **30**:811-812.
 101. **Kampf, G.** 2003. *Hände-Hygiene im Gesundheitswesen*. Springer, Berlin.
 102. **Kampf, G., and A. Kramer.** 2004. Epidemiologic background of hand hygiene and evaluation of the most important agents for scrubs and rubs. *Clinical Microbiology Reviews* **17**:863-893.
 103. **Kampf, G., F.-A. Pitten, P. Heeg, and B. Christiansen.** 2007. Efficacy of two ethanol-based skin antiseptics on the forehead at shorter application times. *BMC Infectious Diseases* **7**:85.
 104. **Kampf, G., M. Shaffer, and C. Hunte.** 2005. Insufficient neutralization in testing a chlorhexidin-containing ethanol-based hand rub can result in a false positive efficacy assessment. *BMC Infectious Diseases* **5**:48.
 105. **Kautz, O., H. Schumann, F. Degerbeck, L. Venemalm, and T. Jakob.** Severe anaphylaxis to the antiseptic polyhexanide. *Allergy*.
 106. **Kearney, J. N., D. Harnby, G. Gowland, and K. T. Holland.** 1984. The follicular distribution and abundance of resident bacteria on human skin. *Journal of General Microbiology* **130**:797-801.
 107. **Kearney, J. N., E. Ingham, W. J. Cunliffe, and K. T. Holland.** 1984. Correlation between human skin bacteria and skin lipids. *British Journal of Dermatology* **110**:593-599.
 108. **Keswick, B. H., and D. Frank.** 1987. Modified scrub technique for sampling infant skin microflora. *J Clin Microbiol* **25**:2400-1.
 109. **Keyworth, N., M. R. Millar, and K. T. Holland.** 1990. Swab-wash method for quantitation of cutaneous microflora. *J Clin Microbiol* **28**:941-3.
 110. **Kinirons, B., O. Mimos, L. Lafendi, T. Naas, J. Meunier, and P. Nordmann.** 2001. Chlorhexidine versus povidone iodine in preventing colonization of continuous epidural catheters in children: a randomized, controlled trial. *Anesthesiology* **94**:239-44.
 111. **Kisich, K. O., M. D. Howell, M. Boguniewicz, H. R. Heizer, N. U. Watson, and D. Y. Leung.** 2007. The constitutive capacity of human keratinocytes to kill *Staphylococcus aureus* is dependent on beta-defensin 3. *J Invest Dermatol* **127**:2368-80.
 112. **Klemperer, R. M. M., N. T. A. J. Ismail, and M. R. W. Brown.** 1980. Effect of R-plasmid RP1 and nutrient depletion on the resistance of

- Escherichia coli* to cetremide, chlorhexidine and phenol. Journal of Applied Bacteriology **48**:349-357.
113. **Klebens, R. M., J. R. Edwards, C. L. Richards, Jr., T. C. Horan, R. P. Gaynes, D. A. Pollock, and D. M. Cardo.** 2007. Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. Public Health Rep **122**:160-6.
 114. **Kloos, W. E., and M. S. Musselwhite.** 1975. Distribution and persistence of Staphylococcus and Micrococcus species and other aerobic bacteria on human skin. Appl Microbiol **30**:381-5.
 115. **Knobloch, J. K., M. A. Horstkotte, H. Rohde, P. M. Kaulfers, and D. Mack.** 2002. Alcoholic ingredients in skin disinfectants increase biofilm expression of Staphylococcus epidermidis. J Antimicrob Chemother **49**:683-7.
 116. **Kohlbecker, G.** 1989. Toxic impurities in chlorhexidine digluconate. Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift **44**:273-276.
 117. **Kramer, A.** 1994. Aktuelle Gesichtspunkte der Antiseptik in der Dermatologie und Venerologie. Hautarzt **45**:207-221.
 118. **Kramer, A. (ed.).** 1987. Handbuch der Antiseptik. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart / New York.
 119. **Kramer, A., and O. Assadian (ed.).** 2008. Wallhäußers Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Antiseptik und Konservierung, vol. 6. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart.
 120. **Kramer, A., W. Kedzia, G. Lebek, L. Grün, W. Weuffen, and A. Pocza (ed.).** 1984. In-vitro und in-vivo Befunde zur Resistenzsteigerung bei Bakterien gegen Antiseptika und Desinfektionsmittel. Gustav Fischer Verlag Stuttgart.
 121. **Kramer, A., B. Roth, G. Muller, P. Rudolph, and N. Klocker.** 2004. 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 **17**:141-6.
 122. **Krebs, F. C., S. R. Miller, M. L. Ferguson, M. Labib, R. F. Rando, and B. Wigdahl.** 2005. Polybiguanides, particularly polyethylene hexamethylene biguanide, have activity against human immunodeficiency virus type 1. Biomedicine & Pharmacotherapy **59**:438-445.
 123. **Kuhrt, D.** 1993. Vergleichbarkeit der Wirksamkeit der Hautdesinfektion bei Gesunden und Krankenhauspatienten. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Kiel.
 124. **Kuipers, J. S.** 1974. Skin disinfection with ethanol, without and with additives. Arch Chir Neerl **26**:15-25.
 125. **Lanker Klossner, B., H. R. Widmer, and F. Frey.** 1997. Nondevelopment of resistance by bacteria during hospital use of povidone-iodine. Dermatology **195 Suppl 2**:10-3.
 126. **Larson, E. L., M. S. Strom, and C. A. Evans.** 1980. Analysis of three variables in sampling solutions used to assay bacteria of hands: type of solution, use of antiseptic neutralizers, and solution temperature. Journal of Clinical Microbiology **12**:355-360.

-
127. **Lebek, G.** 1983. Genetische Grundlagen der Resistenzentwicklung von Mikroorganismen gegenüber Antiseptika bzw. Desinfektionsmitteln, p. 171-187. In W. Weuffen, A. Kramer, D. Gröschel, G. Berencsi, and E. Bulka (ed.), Band 1 Grundlagen der Antiseptik Teil 2 Allgemeine Prinzipien.
 128. **Leeming, J. P., F. H. Notman, and K. T. Holland.** 1989. The distribution and ecology of *Malassezia furfur* and cutaneous bacteria on human skin. *J Appl Bacteriol* **67**:47-52.
 129. **Leyden, J. J., K. J. McGinley, A. N. Foglia, J. E. Wahrman, C. N. Gropper, and B. R. Vowels.** 1996. A new method for in vivo evaluation of antimicrobial agents by translocation of complex dense populations of cutaneous bacteria. *Skin Pharmacol* **9**:60-8.
 130. **Leyden, J. J., K. J. McGinley, O. H. Mills, and A. M. Kligman.** 1975. Age-related changes in the resident bacterial flora of the human face. *The Journal of Investigative Dermatology* **65**:379-381.
 131. **Leyden, J. J., K. J. McGinley, O. H. Mills, and A. M. Kligman.** 1975. Propionibacterium levels in patients with and without acne vulgaris. *J Invest Dermatol* **65**:382-4.
 132. **Leyden, J. J., K. J. McGinley, K. M. Nordstrom, and G. F. Webster.** 1987. Skin microflora. *J Invest Dermatol* **88**:65s-72s.
 133. **Lilly, H. A., E. J. L. Lowbury, and M. D. Wilkins.** 1979. Limits to progressive reduction of resident skin bacteria by disinfection. *Journal of Clinical Pathology* **32**:382-385.
 134. **Lipp, A.** 2005. An evaluation of preoperative skin antiseptics. *British Journal of Perioperative Nursing* **15**:12-14.
 135. **Lipp, A.** 2006. Pre-operative antiseptics: the evidence. *J Hosp Infect* **62**:241-3.
 136. **Lovell, D. L.** 1945. Skin bacteria. Their location with reference to skin sterilization. *Surgery, Gynecology & Obstetrics* **80**:174-177.
 137. **Lubbe, J., C. Ruffieux, G. van Melle, and D. Perrenoud.** 2001. Irritancy of the skin disinfectant n-propanol. *Contact Dermatitis* **45**:226-31.
 138. **Maisetta, G., G. Batoni, S. Esin, W. Florio, D. Bottai, F. Favilli, and M. Campa.** 2006. In vitro bactericidal activity of human beta-defensin 3 against multidrug-resistant nosocomial strains. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:806-9.
 139. **Maisetta, G., G. Batoni, S. Esin, F. Luperini, M. Pardini, D. Bottai, W. Florio, M. R. Giuca, M. Gabriele, and M. Campa.** 2003. Activity of human beta-defensin 3 alone or combined with other antimicrobial agents against oral bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:3349-51.
 140. **Maki, D. G., M. Ringer, and C. J. Alvarado.** 1991. Prospective randomised trial of povidone-iodine, alcohol and chlorhexidine for prevention of infection associated with central venous and arterial catheters. *The Lancet* **338**:339-343.
 141. **Mangram, A. J., T. C. Horan, M. L. Pearson, L. C. Silver, and W. R. Jarvis.** 1999. Guideline for prevention of surgical site infection, 1999. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. *Infect Control Hosp Epidemiol* **20**:250-78; quiz 279-80.
 142. **Marlowe, L., R. D. Mistry, S. Coffin, K. H. Leckerman, K. L. McGowan, D. Dai, L. M. Bell, and T. Zaoutis.** Blood culture contamination rates after

- skin antiseptics with chlorhexidine gluconate versus povidone-iodine in a pediatric emergency department. *Infect Control Hosp Epidemiol* **31**:171-6.
143. **Marples, R. R.** 1969. Diphtheroids of normal human skin. *British Journal of Dermatology* **81**:47-54.
144. **Marples, R. R.** 1982. Sex, constancy, and skin bacteria. *Archives of Dermatological Research* **272**:317-320.
145. **Marples, R. R., J. J. Leyden, R. N. Stewart, O. H. Mills, and A. M. Kligman.** 1974. The skin microflora in acne vulgaris. *The Journal of Investigative Dermatology* **62**:37-41.
146. **Marples, R. R., and K. J. McGinley.** 1974. *Corynebacterium acnes* and other anaerobic diphtheroids from human skin. *J Med Microbiol* **7**:349-57.
147. **Marples, R. R., and P. Williamson.** 1969. Effects of systemic demethylchlortetracycline on human cutaneous microflora. *Appl Microbiol* **18**:228-34.
148. **Marsh, P. D., and S. Selwyn.** 1977. Studies on antagonism between human skin bacteria. *Journal of Medical Microbiology* **10**:161-169.
149. **Maseda, H., Y. Hashida, R. Konaka, A. Shirai, and H. Kourai.** 2009. Mutational upregulation of a resistance-nodulation-cell division-type multidrug efflux pump, SdeAB, upon exposure to a biocide, cetylpyridinium chloride, and antibiotic resistance in *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:5230-5.
150. **Mayer, S., M. Boos, A. Beyer, A. C. Fluit, and F. J. Schmitz.** 2001. Distribution of the antiseptic resistance genes *qacA*, *qacB* and *qacC* in 497 methicillin-resistant and -susceptible European isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* **47**:896-7.
151. **McBain, A. J., R. G. Bartolo, C. E. Catrenich, D. Charbonneau, R. G. Ledder, and P. Gilbert.** 2003. Effects of a chlorhexidine gluconate-containing mouthwash on the vitality and antimicrobial susceptibility of in vitro oral bacterial ecosystems. *Appl Environ Microbiol* **69**:4770-6.
152. **McBride, M. E., L. F. Montes, and J. M. Knox.** 1968. The persistence and penetration of antiseptic activity. *Surgery, Gynecology & Obstetrics* **127**:270-274.
153. **McDonnell, G. (ed.).** 2007. Antisepsis, Disinfection and Sterilization: types, action and resistance. ASM Press, Washington.
154. **McGinley, K. J., G. F. Webster, and J. J. Leyden.** 1978. Regional variations of cutaneous propionibacteria. *Appl Environ Microbiol* **35**:62-6.
155. **Milisavljevic, V., L. P. Tran, C. Batmalle, and H. J. Bootsma.** 2008. Benzyl alcohol and ethanol can enhance the pathogenic potential of clinical *Staphylococcus epidermidis* strains. *Am J Infect Control* **36**:552-8.
156. **Mitchell, B. A., M. H. Brown, and R. A. Skurray.** 1998. QacA multidrug efflux pump from *Staphylococcus aureus*: comparative analysis of resistance to diamidines, biguanidines, and guanyldiazones. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:475-7.
157. **Montes, L. F., and W. H. Wilborn.** 1970. Anatomical location of normal skin flora. *Archives of Dermatology* **101**:145-159.
158. **Moore, L. E., R. G. Ledder, P. Gilbert, and A. J. McBain.** 2008. In vitro study of the effect of cationic biocides on bacterial population dynamics and susceptibility. *Appl Environ Microbiol* **74**:4825-34.

-
159. **Myers, G. E., W. C. Mackenzie, and K. A. Ward.** 1956. The effect of a new antiseptic 1, 6-di-4'-chlorophenyldiguanidohexane on skin flora. *Can J Microbiol* **2**:87-93.
 160. **Nahm, F. S., W. Ahn, C. J. Lee, and B. M. Ham.** 2004. Chlorhexidine Versus Povidone Iodine in Bacterial Contamination Rate of Needles Used for Spinal Anesthesia. *Korean J Anesthesiol* **47**:S1-S4.
 161. **National Center for Biotechnology Information.** 2009. PubMed. U.S. National Library of Medicine and the National Institute of Health.
 162. **Nielsen, M. L., D. Raahave, J. G. Stage, and T. Justesen.** 1975. Anaerobic and aerobic skin bacteria before and after skin-disinfection with chlorhexidine: an experimental study in volunteers. *Journal of Clinical Pathology* **28**:793-797.
 163. **Nobel, W. C.** 1980. Carriage of Micro-organisms on Skin, p. 7-10. *In* B. Newsom and A. D. S. Caldwell (ed.), *Problems in the Control of Hospital Infection*. Academic Press Inc., London.
 164. **Noble, W. C.** 1975. Dispersal of skin microorganisms. *British Journal of Dermatology* **93**:477-485.
 165. **Noble, W. C.** 1968. Observations on the surface flora of the skin and on the skin pH. *Br J Dermatol* **80**:279-81.
 166. **Noble, W. C.** 1998. Skin bacteriology and the role of *Staphylococcus aureus* in infection. *Br J Dermatol* **139**:9-12.
 167. **Noble, W. C., J. D. Habbema, R. van Furth, I. Smith, and C. de Raay.** 1976. Quantitative studies on the dispersal of skin bacteria into the air. *Journal of Medical Microbiology* **9**:53-61.
 168. **O'Grady, N. P., M. Alexander, E. P. Dellinger, J. L. Gerberding, S. O. Heard, D. G. Maki, H. Masur, R. D. McCormick, L. A. Mermel, M. L. Pearson, I. I. Raad, A. Randolph, and R. A. Weinstein.** 2002. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. *Infection Control and Hospital Epidemiology* **23**:759-769.
 169. **O'Grady, N. P. e. a.** 2002. CDC Guidelines for the Prevention of Intravascular Catheter-Related Infections. *Journal of infection Control and Hospital Epidemiology* **23**:259-269.
 170. **Onder, A. M., J. Chandar, A. Billings, R. Diaz, D. Francoeur, C. Abitbol, and G. Zilleruelo.** 2009. Chlorhexidine-based antiseptic solutions effectively reduce catheter-related bacteremia. *Pediatr Nephrol* **24**:1741-7.
 171. **Palobart, C., J. Cros, I. Orsel, and N. Nathan.** 2009. [Anaphylactic shock to iodinated povidone]. *Ann Fr Anesth Reanim* **28**:168-70.
 172. **Panlilio, A. L., D. H. Culver, R. P. Gaynes, S. Banerjee, T. S. Henderson, J. S. Tolson, and W. J. Martone.** 1992. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. hospitals, 1975-1991. *Infect Control Hosp Epidemiol* **13**:582-6.
 173. **Paocharoen, V., C. Mingmalairak, and A. Apisarnthanarak.** 2009. Comparison of surgical wound infection after preoperative skin preparation with 4% chlorhexidine [correction of chlohexidine] and povidone iodine: a prospective randomized trial. *J Med Assoc Thai* **92**:898-902.
 174. **Pethica, B.** 1958. Bacterial lysis: lysis by physical and chemical methods. *Journal of General Microbiology* **15**:166-168.

-
175. **Phillips, L. G., J. P. Heggors, M. C. Robson, J. A. Boertman, T. Meltzer, and D. J. Smith.** 1989. The effect of endogenous skin bacteria on burn wound infection. *Annals of Plastic Surgery* **23**:35-38.
 176. **Pillsbury, D. M., G. Rebell, S. Kaneda, and M. de Saint Phalle.** 1952. The Bacterial Flora of the Skin1. *The Journal of Investigative Dermatology* **18**:173-186.
 177. **Plowman, R., N. Graves, M. A. Griffin, J. A. Roberts, A. V. Swan, B. Cookson, and L. Taylor.** 2001. The rate and cost of hospital-acquired infections occurring in patients admitted to selected specialties of a district general hospital in England and the national burden imposed. *J Hosp Infect* **47**:198-209.
 178. **Poole, K.** 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* **56**:20-51.
 179. **Poole, K.** 2002. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology* **92**:55S-64S.
 180. **Presterl, E., M. Suchomel, M. Eder, S. Reichmann, A. Lassnigg, W. Graninger, and M. Rotter.** 2007. Effects of alcohols, povidone-iodine and hydrogen peroxide on biofilms of *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother* **60**:417-20.
 181. **Price, P. B.** 1938. The bacteriology of normal skin: a new quantitative test applied to a study of the bacterial flora and the disinfectant action of mechanical cleansing. *The Journal of Infectious Diseases* **63**:301-318.
 182. **Prince, H. N., and J. A. Rodgers.** 1974. Studies on the aerobic axillary microflora employing a standardized swabbing technique. *Cosmet. Perfume* **89**:25-30.
 183. **Proske, O., G. Sauermann, H. Pietsch, and B. Rohde.** 1995. Die Hautverträglichkeit von Mectroniumetilsulfat in einem Desinfektionsmittel - eine klinische Studie. *Hygiene + Medizin* **20**:535-542.
 184. **Puhvel, S. M., R. M. Reisner, and D. A. Amirian.** 1975. Quantification of bacteria in isolated pilosebaceous follicles in normal skin. *The Journal of Investigative Dermatology* **65**:525-531.
 185. **Ranganathan, N. S.** 1996. Chlorhexidine, p. 235-264. *In* J. M. Ascenzi (ed.), *Handbook of Disinfectants and Antiseptics*. Marcel Dekker, Inc., New York.
 186. **Rebell, G., D. M. Pillsbury, M. De Saint Phalle, and D. Ginsburg.** 1950. Factors affecting the rapid disappearance of bacteria placed on the normal skin. *J Invest Dermatol* **14**:247-64.
 187. **Rebora, A., and M. Guarrera.** 1988. Racial differences in experimental skin infection with *Candida albicans*. *Acta Derm Venereol* **68**:165-8.
 188. **Reichel, M., P. Heisig, and G. Kampf.** 2008. Bakteriendichte auf klinisch relevanten Hautarealen (Abstract). *Hygiene + Medizin* **33**:50.
 189. **Reichel, M., P. Heisig, and G. Kampf.** 2008. Pitfalls in efficacy testing-how important is the validation of neutralization of chlorhexidine digluconate? *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* **7**:20.
 190. **Reichel, M., P. Heisig, T. Kohlmann, and G. Kampf.** 2009. Alcohols for skin antisepsis at clinically relevant skin sites. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:4778-82.
 191. **Reimer, K., H. Schreier, G. Erdos, B. König, W. König, and W. Fleischer.** 1997/98. Molekulare Effekte eines mikrobiziden Wirkstoffes auf

- relevante Mikroorganismen: Elektronenmikroskopische und biochemische Untersuchungen zu Polyvidon-Iod. *zentralbl Hyg Umweltmed*:423-434.
192. **Revelle, L. K., W. H. Doub, R. T. Wilson, M. H. Harris, and A. M. Rutter.** 1993. Identification and isolation of chlorhexidine digluconate impurities. *Pharm Res* **10**:1777-84.
193. **Röckl, H., and E. Müller.** 1959. Beitrag zur Lokalisation der Mikroben der Haut. *Archiv für klinische und experimentelle Dermatologie* **209**:13-29.
194. **Romero-Steiner, S., T. Witek, and E. Balish.** 1990. Adherence of skin bacteria to human epithelial cells. *Journal of Clinical Microbiology* **28**:27-31.
195. **Rößler, E.** 1996. Untersuchungen zur Hautdesinfektion von injektionshygienisch relevanten Körperstellen mittels einer modifizierten Hautkeimgewinnungsmethode. Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen-Nürnberg.
196. **Roth, R. R., and W. D. James.** 1988. Microbial ecology of the skin. *Annu Rev Microbiol* **42**:441-64.
197. **Roth, R. R., and W. D. James.** 1989. Microbiology of the skin: resident flora, ecology, infection. *Journal of the American Academy of Dermatology* **20**:367-390.
198. **Rotter, M. L.** 1981. Povidone-iodine and chlorhexidine gluconate containing detergents for disinfection of hands. *Journal of Hospital Infection* **2**:273-276.
199. **Rotter, M. L., R. A. Simpson, and W. Koller.** 1998. Surgical hand disinfection with alcohols at various concentrations: parallel experiments using the new proposed European standards methods. *Infection Control and Hospital Epidemiology* **19**:778-781.
200. **Rüden, H., F. Daschner, and P. Gastmeier.** 1999. Nosokomiale Infektionen in Deutschland - Erfassung und Prävention (NIDEP-Studie)-Teil2: Studie zur Einführung eines Qualitätsmanagementprogramms. Verlagsgesellschaft Baden-Baden.
201. **Rüden, H., F. Daschner, and M. Schumacher.** 1995. Nosokomiale Infektionen in Deutschland: Erfassung und Prävention (NIDEP-Studie). Teil 1: Prävalenz nosokomialer Infektionen; Qualitätssicherung in der Krankenhaushygiene, vol. 56. Nomos-Verlagsgesellschaft, Baden-Baden.
202. **Russell, A. D.** 1990. Bacterial spores and chemical sporicidal agents. *Clinical Microbiology Reviews* **3**:99-119.
203. **Russell, A. D.** 1986. Chlorhexidine: Antibacterial action and bacterial resistance. *Infection* **14**:212-215.
204. **Russell, A. D., and M. J. Day.** 1993. Antibacterial activity of chlorhexidine. *Journal of Hospital Infection* **25**:229-238.
205. **Russell, A. D., U. Tattawasart, J. Y. Maillard, and J. R. Furr.** 1998. Possible link between bacterial resistance and use of antibiotics and biocides. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:2151.
206. **Sakuragi, T., K. Higa, K. Dan, and M. Okubo.** 1986/1987. Skin floras on the human back and disinfection with alcoholic chlorhexidine, povidone iodine, and ethyl alcohol. *Pain Clinic* **1**:183-188.
207. **Saltzman, M. D., G. W. Nuber, S. M. Gryzlo, G. S. Marecek, and J. L. Koh.** 2009. Efficacy of surgical preparation solutions in shoulder surgery. *J Bone Joint Surg Am* **91**:1949-53.

-
208. **Saß, V.** 2008. Die molekulare Wirkung des humanen β -Defensins hBD3 auf *Staphylococcus aureus* Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
209. **Sass, V., U. Pag, A. Tossi, G. Bierbaum, and H. G. Sahl.** 2008. Mode of action of human beta-defensin 3 against *Staphylococcus aureus* and transcriptional analysis of responses to defensin challenge. *Int J Med Microbiol* **298**:619-33.
210. **Sato, K., Y. Kusaka, N. Suganuma, S. Nagasawa, and Y. Deguchi.** 2004. Occupational allergy in medical doctors. *J Occup Health* **46**:165-70.
211. **Sato, S., T. Sakuragi, and K. Dan.** 1996. Human skin flora as a potential source of epidural abscess. *Anesthesiology* **85**:1276-1282.
212. **Schitteck, B., M. Paulmann, I. Senyurek, and H. Steffen.** 2008. The role of antimicrobial peptides in human skin and in skin infectious diseases. *Infect Disord Drug Targets* **8**:135-43.
213. **Schnuch, A.** 1997. Benzalkoniumchlorid, p. 179-180, *Dermatosen*, vol. 45. Informationsverbund dermatologischer Kliniken (IVDK), Universitäts-Hautklinik Göttingen.
214. **Schrader, G., and J. Herber.** 1991. Keimnachweis aus tieferen Schichten der menschlichen Haut nach Desinfektionsmitteleinwirkung. *Hygiene + Medizin* **16**:164-166.
215. **Schrader, G., J. Herber, and H. H.** 1990. Keimnachweis aus tieferen Regionen der menschlichen Haut nach Desinfektion. *Hygiene + Medizin* **15**:428-433.
216. **Schülke & Mayr GmbH.** 2006. Octenidine dihydrochloride - A new topical antimicrobial for local treatment of skin, mucous membranes and wounds, Norderstedt (Germany).
217. **Sedlock, D. M., and D. M. Bailey.** 1985. Microbicidal activity of octenidine hydrochloride, a new alkanediylbis[pyridine] germicidal agent. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **28**:786-790.
218. **Selwyn, S., and H. Ellis.** 1972. Skin bacteria and skin disinfection reconsidered. *Br Med J* **1**:136-40.
219. **Semrádová, S., R. Sedivy, W. Ulrich, and M. Rotter.** 1994. Systematische Untersuchungen zur Prüfung von Hautdesinfektionsmitteln, Wien.
220. **Semrádová, S., W. Ulrich, M. Kundi, and M. Rotter.** 1995. Systematische Untersuchungen zur Prüfung von Hautdesinfektionsmitteln: Wirkung von n-Propanol und wässriger PVP-J-Lösung an der Leichenhaut, Wien.
221. **Shalamanov, D. S.** 2005. Chlorhexidine gluconate-induced morphological changes in gram negative microorganisms. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **19**.
222. **Shaw, C. M., J. A. Smith, M. E. McBride, and W. C. Duncan.** 1970. An evaluation of techniques for sampling skin flora. *J Invest Dermatol* **54**:160-3.
223. **Shimizu, M., K. Okuzumi, A. Yoneyama, T. Kunisada, M. Araake, H. Ogawa, and S. Kimura.** 2002. In vitro antiseptic susceptibility of clinical isolates from nosocomial infections. *Dermatology* **204**:21-27.
224. **Sidhu, M. S., E. Heir, H. Sorum, and A. Holck.** 2001. Genetic linkage between resistance to quaternary ammonium compounds and beta-lactam antibiotics in food-related *Staphylococcus* spp. *Microb Drug Resist* **7**:363-71.

-
225. **Sidhu, M. S., S. Langsrud, and A. Holck.** 2001. Disinfectant and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from the food industry. *Microb Drug Resist* **7**:73-83.
226. **Sidhu, M. S., H. Sorum, and A. Holck.** 2002. Resistance to quaternary ammonium compounds in food-related bacteria. *Microb Drug Resist* **8**:393-9.
227. **Slotosch, C. M., G. Kampf, and H. Löffler.** 2007. Effects of disinfectants and detergents on skin irritation. *Contact Dermatitis* **57**:235-241.
228. **Small, H., D. Adams, A. L. Casey, C. T. Crosby, P. A. Lambert, and T. Elliott.** 2008. Efficacy of adding 2% (w/v) chlorhexidine gluconate to 70% (v/v) isopropyl alcohol for skin disinfection prior to peripheral venous cannulation. *Infect Control Hosp Epidemiol* **29**:963-5.
229. **Smith, R. F.** 1969. Characterization of human cutaneous lipophilic diphtheroids. *Journal of General Microbiology* **55**:433-443.
230. **Smith, R. F.** 1970. Comparative enumeration of lipophilic and nonlipophilic cutaneous diphtheroids and cocci. *Applied Microbiology* **19**:254-258.
231. **Somerville, D. A.** 1969. The effect of age on the normal bacterial flora of the skin. *Br J Dermatol* **81**:Suppl:14+.
232. **Somerville, D. A.** 1969. The normal flora of the skin in different age groups. *Br J Dermatol* **81**:248-58.
233. **Somerville, D. A., and M. Lancaster-Smith.** 1973. The aerobic cutaneous microflora of diabetic subjects. *Br J Dermatol* **89**:395-400.
234. **Somerville, D. A., and C. T. Murphy.** 1973. Quantitation of *Corynebacterium acnes* on healthy human skin. *J Invest Dermatol* **60**:231-3.
235. **Somerville, D. A., and C. T. Murphy.** 1973. Quantitation of *Corynebacterium acnes* on healthy human skin. *Journal of Investigative Dermatology* **60**:231-233.
236. **Somerville, D. A., and W. C. Noble.** 1973. Microcolony size of microbes on human skin. *J Med Microbiol* **6**:323-8.
237. **Soothill, J. S., K. Bravery, A. Ho, S. Macqueen, J. Collins, and P. Lock.** 2009. A fall in bloodstream infections followed a change to 2% chlorhexidine in 70% isopropanol for catheter connection antisepsis: a pediatric single center before/after study on a hemopoietic stem cell transplant ward. *Am J Infect Control* **37**:626-30.
238. **Sorensen, O. E., J. B. Cowland, K. Theilgaard-Monch, L. Liu, T. Ganz, and N. Borregaard.** 2003. Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *J Immunol* **170**:5583-9.
239. **Sorensen, O. E., D. R. Thapa, K. M. Roupe, E. V. Valore, U. Sjöbring, A. A. Roberts, A. Schmidtchen, and T. Ganz.** 2006. Injury-induced innate immune response in human skin mediated by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J Clin Invest* **116**:1878-85.
240. **Staal, E. M., and A. C. Noorddij.** 1978. A new method for the quantitative determination of micro-organisms on human skin. *Journal of the Society for Cosmetic Chemists* **29**:607-615.
241. **Steinhauer, K., and P. Goroncy-Bermes.** 2007. Einfluss von Octenidin auf die Phagocytose von "*Staphylococcus aureus*" durch neutrophile Granulocyten *GMS Krankenhaushyg Interdiszip* **2**:47.

-
242. **Stringer, M. F., and R. R. Marples.** 1976. Ultrasonic methods for sampling human skin micro-organisms. *Br J Dermatol* **94**:551-5.
243. **Suchomel, M., W. Koller, M. Kundi, and M. L. Rotter.** 2009. Surgical hand rub: Influence of duration of application on the immediate and 3-hours effects of n-propanol and isopropanol. *Am J Infect Control* **37**:289-93.
244. **Suller, M. T. E., and A. D. Russell.** 1999. Antibiotic and biocide resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococcus. *Journal of Hospital Infection* **43**:281-291.
245. **Sultana, B., J. Cimiotti, A. E. Aiello, D. Sloan, and E. Larson.** 2003. Effects of age and race on skin condition and bacterial counts on hands of neonatal ICU nurses. *Heart Lung* **32**:283-9.
246. **Swenson, J. M., P. P. Williams, G. Killgore, C. M. O'Hara, and F. C. Tenover.** 2001. Performance of eight methods, including two new rapid methods, for detection of oxacillin resistance in a challenge set of *Staphylococcus aureus* organisms. *Journal of Clinical Microbiology* **39**:3785-3788.
247. **Sykes, G.** 1939. The influence of germicides on the dehydrogenases of *Bact. coli*. The succinic acid dehydrogenase of *Bact. coli*. *J Hyg* **39**:463-469.
248. **Tacconelli, E., G. Smith, K. Hieke, A. Lafuma, and P. Bastide.** 2009. Epidemiology, medical outcomes and costs of catheter-related bloodstream infections in intensive care units of four European countries: literature- and registry-based estimates. *J Hosp Infect* **72**:97-103.
249. **Tattawasart, U., A. C. Hann, J.-Y. Maillard, J. R. Furr, and A. D. Russell.** 2000. Cytological changes in chlorhexidine-resistant isolates of *Pseudomonas stutzeri*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **45**:145-152.
250. **Tattawasart, U., J.-Y. Maillard, J. R. Furr, and A. D. Russell.** 1999. Development of resistance to chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride in *Pseudomonas stutzeri* and changes in antibiotic susceptibility. *Journal of Hospital Infection* **42**:219-229.
251. **Tattawasart, U., J.-Y. Maillard, J. R. Furr, and A. D. Russell.** 2000. Outer membrane changes in *Pseudomonas stutzeri* resistant to chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride. *International Journal of Antimicrobial Agents* **16**:233-238.
252. **Thomas, L., J. Y. Maillard, R. J. Lambert, and A. D. Russell.** 2000. Development of resistance to chlorhexidine diacetate in *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of a "residual" concentration. *Journal of Hospital Infection* **46**:297-303.
253. **Truong-Bolduc, Q. C., P. M. Dunman, J. Strahilevitz, S. J. Projan, and D. C. Hooper.** 2005. MgrA is a multiple regulator of two new efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **187**:2395-405.
254. **U.S. National Institute of Health,** posting date. *Anatomy of the Skin* [Online.]
255. **Ulrich, J. A.** 1964. Technics of skin sampling for microbial contaminants. *Health Lab Sci.* **1**:133-136.
256. **Valles, J., I. Fernandez, D. Alcaraz, E. Chacon, A. Cazorla, M. Canals, D. Mariscal, D. Fontanals, and A. Moron.** 2008. Prospective randomized trial of 3 antiseptic solutions for prevention of catheter colonization in an

- intensive care unit for adult patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* **29**:847-53.
257. **Warrier, A. G., A. M. Kligman, R. A. Harper, J. Bowman, and R. R. Wickett.** 1996. A comparison of black and white skin using noninvasive methods. *J Soc Cosmet Chem*:229-240.
258. **Werner, H.-P., and C. Engelhardt.** 1978. Problematik der Inaktivierung am Beispiel des in vitro-Tests. *Hygiene + Medizin* **3**:326-330.
259. **Westergren, G., and C.-G. Emilson.** 1980. In vitro development of chlorhexidine resistance in *Streptococcus sanguis* and its transmissibility by genetic transformation. *Scandinavian Journal of Dental Research* **88**:236-243.
260. **Weuffen, W.** 1981. Die Antiseptik - Begriff, Zielstellung und Anwendungsgebiete, p. 14-69. *In* W. Weuffen, D. Gröschel, and A. Kramer (ed.), Band 1 Grundlagen der Antiseptik Teil 1 Begriffsbestimmung der Antiseptik.
261. **Whyte, W., A. Hambræus, G. Laurell, and J. Hoborn.** 1991. The relative importance of routes and sources of wound contamination during general surgery. I. Non-airborne. *Journal of Hospital Infection* **18**:93-107.
262. **Williamson, B. A.** 1965. Quantitative Estimation of Cutaneous Bacteria, p. 3-12. *In* H. I. Maibach and G. Hildick-Smith (ed.), *Skin Bacteria and Their Role in Infection*. McGraw-Hill Book Company, New York.
263. **Williamson, P., and A. M. Kligman.** 1965. A new method for the quantitative investigation of cutaneous bacteria. *The Journal of Investigative Dermatology* **45**:498-501.
264. **Wright, P., and C. S. Terry.** 1981. Antagonism within populations of micro-organisms from normal human skin. *J Med Microbiol* **14**:271-8.
265. **Yamamoto, T., Y. Tamura, and T. Yokota.** 1988. Antiseptic and antibiotic resistance plasmid in *Staphylococcus aureus* that possesses ability to confer chlorhexidine and acrinol resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **32**:932-935.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Querschnitt der menschlichen Haut (254).....	4
Abbildung 2: Chemische Strukturformeln der Alkohole.....	9
Abbildung 3: Strukturformel von Chlorhexidindigluconat	12
Abbildung 4: Hydrolyse von Chlorhexidindigluconat; neben weiteren Zersetzungsprodukten (nicht gezeigt) entsteht <i>p</i> -Chlorphenylharnstoff, das dann weiter zu <i>p</i> -Chloranilin zerfällt. Dies führt zu einer Verfärbung der Chlorhexidinlösung (192).....	13
Abbildung 5: Darstellung der talgdrüsenarmen (hellblauen) und talgdrüsenreichen (dunkelblauen) Hautareale gemäß der Einteilung durch die DGHM (66).....	21
Abbildung 6: Prozess der Studienauswahl für die Metaanalyse.....	41
Abbildung 7: Verteilung der Testfelder in den experimentellen <i>In-vivo</i> -Studien mit alkoholisch-wässrigen Lösungen (ohne CHG) beispielhaft für einen Probanden dargestellt (siehe auch Abschnitt Originalarbeiten; „Alcohols for skin antisepsis at clinically relevant skin sites“; „Vergleich der Wirksamkeit von 89,5 % 1-Propanol bei kurzen Anwendungszeiten mit dem Referenzverfahren der DGHM-Methode“).	44
Abbildung 8: Ergebnisse der Metaanalyse für die Quantifizierung der aerobe Hautmikroflora, dargestellt als Median der Mittelwerte der KBE/cm ² (nicht geschlechtsspezifisch).....	47

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich der mittleren log ₁₀ KBE/cm ² auf unterschiedlichen Testfeldern für jedes Hautareal (n = 180); * t-Test.....	48
Tabelle 2: Vergleich der mittleren log ₁₀ KBE/cm ² zwischen männlichen und weiblichen Probanden für jedes Hautareal (n = 180); * t-Test.....	49

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Analysis of Variance
ASTM	American Society for Testing and Materials
ATCC	American Type Culture Collection
BAC	Benzalkoniumchlorid
°C	Grad Celsius
CAMP	kationische antimikrobielle Peptide
CASO-Agar	Casein-Peptide Sojamehl-Peptide Agar
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CFU	Colony forming units
CVC(s)	Central venous catheter(s)
CH	Chlorhexidin
CHG	Chlorhexidindigluconat
CSL	Casein-Peptide Sojamehl-Peptide Lösung
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EN	Europäische Norm
et al.	et alii
FDA	Food and Drug Administration
h	Stunde(n)
hBD-3	Human beta-Defensin-3 (humanes beta-Defensin-3)
HCAI	Healthcare-associated infection(s)
hNP-1-3	Human neutral peptide-1-3
KBE	Koloniebildende Einheiten
MDR	Multidrug resistant
MES	Mecetronium Etilsulfat
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MIC	Minimal inhibitory concentration
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar

m/m (w/w)	Masse pro Masse (weight by weight)
MRSA	methicillinresistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
m/v	Masse pro Volumen
n.d.	Not determined (nicht bestimmt)
n.s.	Nicht signifikant
NI	Nosokomiale Infektionen
PB	Phosphate buffer
PCR	Polymerase chain reaction
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis
PVP-I	Povidon-Iod
RF	Reduktionsfaktor ($\log_{10}$)
RM	Referenzmethode der DGHM für die Hautantiseptik
rpm	Revolutions per minute
QRDR	Quinolone-resistance determing region
TSB	Tryptic soy broth
VRE	vancomycinresistente Enterokokken
v/v (vol/vol)	Volumen pro Volumen

Gefahrstoffverzeichnis

Wichtige in der Arbeit verwendete Gefahrstoffe (R- und S-Sätze).

Gefahrstoff	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
Bacillol® AF		R 10-41-67	S 2-23-26-51
Chlorhexidindigluconat 20%		R 41-50	S 26-37/39-61
Ethanol (2-Butanon) Ph. Eur.		R 11	S 7-16
Ethersulfat		R 38-41	S 24/25-26-28-37/39
Ethidiumbromidlösung		R 23-68	S 36/37
Grams Kristallviolettlösung	---	R 10-52/53	S 61
Grams Safraninlösung	---	R 10	---
Immersionsöl		R 22	S 25
Kanamycin-Aesculin-Azid Agar/ Trockensubstanz		R 22-52/53	S 61
Kohrsolin®		R 20/22-37/38-41-42/43	S 23-24-26-37/39-45
Kohrsolin® extra		R 10-20/22-34-37-42/43-50	S 16-23-26-36/37/39-45
L-Cystein		R 22	---
NucleoSpin® Ectract II Reagenz Pufferlösung NT		R 20/21/22	S 13

Propan-1-ol	 Leichtentzündlich Reizend	R 11-41-67	S 7-16-24-26-39
Propan-2-ol	 Leichtentzündlich Reizend	R 11-36-67	S 7-16-24/25-26
Proteinase K	 Gesundheitsschädlich	R 36/37/38-42/43	S 23-24-26-36/37
QIAGEN Buffer AL	 Gesundheitsschädlich	R 22-36/38	S 13-26-36-46
QIAGEN Buffer AW1	 Gesundheitsschädlich	R 22-36/38	S 13-26-36-46
Quick Start Kit	 Gesundheitsschädlich	R 20/21/22-68	S 16
Saponin	 Reizend	R 36/37	S 26-37/39
SLS	 Gesundheitsschädlich Leichtentzündlich	R 11- 21/22-36/37/38	S 26 - 36/37
Staphytect® Plus (Oxoid)	 Gesundheitsschädlich	R 22	---
Sterillium®	 Reizend	R 10-36-67	S 26-46
Sterillium® classic pure	 Reizend	R 10-67-R36	S 26-46
Sterillium® rub	 Leichtentzündlich	R 11	S 16
Sterillium® Virugard	 Leichtentzündlich	R 11-52/53	S 9-16

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Günter Kampf möchte ich mich für die Bereitstellung dieses spannenden Themas und die hervorragende Betreuung während der Doktorandenzeit bedanken. Ohne die Unterstützung, die Motivation und die sehr konstruktiven Diskussionsrunden wäre ich nie so weit gekommen. Vielen Dank für die vertrauensvolle Zusammenarbeit, das immer offene Ohr, die vielen wertvollen Ratschläge, die mir so sehr weitergeholfen haben und die vielen humorvollen Stunden.

Herrn Prof. Dr. Peter Heisig danke ich ganz herzlich für die Begutachtung, die universitäre Begleitung dieser externen Doktorarbeit, die sehr gute Hilfestellung bei Fragen und die Möglichkeit, einen Teil der Versuche in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können.

Bei der Firma BODE Chemie Hamburg bedanke ich mich dafür, dass ich diese Arbeit dort anfertigen und an Kongressen teilnehmen konnte. Vielen Dank für die stets unkomplizierten, praktischen Lösungen für die spezifischen Fragestellungen, die sich in der Doktorandenzeit ergaben. Meinen herzlichen Dank richte ich selbstverständlich auch an alle Kolleginnen und Kollegen, die diese Arbeit durch ihre hervorragende, kollegiale Zusammenarbeit unterstützt haben. Insbesondere allen Kolleginnen aus der Mikrobiologie gilt mein Dank für die zahlreichen schönen Stunden, durch die der Spaß an der Laborarbeit immer erhalten blieb und natürlich auch für die hilfreichen Anregungen bei der praktischen Arbeit. Vielen Dank, dass ich so herzlich in das Team aufgenommen wurde und sich immer ein Plätzchen für mich gefunden hat. Ebenfalls bedanke ich mich bei den Kollegen aus dem Entwicklungslabor für die Bereitstellung und Verblindung der Muster für die Studien und den Kollegen aus der Qualitätskontrolle für die Untersuchung der Muster. Meiner Büronachbarin, Dr. Herta Gerdes, danke ich für das ebenfalls immer offene Ohr, die Ermutigung zum Durchhalten, die vielen lustigen Stunden, die mich immer motiviert haben und natürlich für die Nervennahrung, die mir immer gut geholfen hat.

Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Peter Heisig danke ich ganz besonders für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe als „externe Doktorandin“. Bei Antje Schnasse und Tatjana Claussen bedanke ich mich für die praktische Unterstützung bei der Charakterisierung und DNA-Sequenzierung der Bakterienisolate. Dr. Anke Heisig gilt mein Dank für die Hilfe bei der Manuskripterstellung für die Versuche mit hBD-3. Frau Sabine Badziong danke ich herzlich für die Hilfe und Unterstützung bei organisatorischen Fragen während der gesamten Doktorandenzeit.

Allen Probanden, die sich für die Studien zur Verfügung gestellt haben möchte ich ebenfalls auf diesem Wege danken. Mein Dank gilt zudem Herrn Wiedemann, Frau Much und Frau Otto aus dem Department Chemie, die mir die Räumlichkeiten für die Studie zur Verfügung gestellt haben und die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Herrn Prof. Dr. Kohlmann (Universität Greifswald) und Herrn Prof. Dr. Berger (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) danke ich für die statistische Beratung und Hilfestellung. Bei Frau Dr. Christiansen (Universitätsklinikum Schleswig-Holstein/Campus Kiel) bedanke ich mich dafür, dass ich die für die Studien grundlegende Methode zur Gewinnung der Hautflora in Ihrem Labor erlernen durfte.

Ein sehr großer Dank gilt meiner Familie. Vor allem meinen Eltern und meinem Bruder, ohne deren emotionale Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. An meine Eltern richte ich außerdem meinen herzlichen Dank für die Unterstützung in der gesamten Studien- und Doktorandenzeit.

Mein tiefer Dank gilt meinem Mann Markus. Seine Liebe und Geduld, sowie die wunderbare gemeinsame Zeit waren sowohl Ausgleich als auch Motivation und gaben mir für diese Arbeit das Gefühl, dies alles schaffen zu können. Vielen Dank für die stetige Ermutigung weiterzumachen, ganz besonders während der anstrengenden Phasen dieser Arbeit. Natürlich bedanke ich mich auch für die Bewahrung vor der Verzweiflung bei dem Umgang mit unterschiedlichen Computerprogrammen.

Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen befindet sich der Lebenslauf nur in der gedruckten Version der Dissertation.

Veröffentlichungen / Vorträge

Veröffentlichungen:

- Europäische Patentanmeldung EP 2 008 516 A1; Patentblatt 2009/01; Anmeldetag: 27.06.2008
- Kampf G, Reichel M, Feil Y, Eggerstedt S, Kaulfers PM: Influence of rub-in technique on required application time and hand coverage in hygienic hand disinfection. BMC Infect Dis 2008, 8:149.
- Reichel M, Heisig P, Kampf G: Pitfalls in efficacy testing-how important is the validation of neutralization of chlorhexidine digluconate? Ann Clin Microbiol Antimicrob 2008, 7:20.
- Reichel M, Heisig P, Kohlmann T, Kampf G: Alcohols for skin antisepsis at clinically relevant skin sites. Antimicrob Agents Chemother 2009, 53(11):4778-4782.
- Kampf G, Reichel M, Feil Y, Eggerstedt S, Kaulfers PM: Einfluss der Einreibetechnik auf die benötigte Einreibezeit und die Benetzung der Hand bei der hygienischen Händedesinfektion. Hyg Med 2009, 34(1/2):24-31.
- Reichel M, Heisig A, Heisig P, Kampf G: Skin bacteria after chlorhexidine exposure – Is there a difference in response to human β -Defensin-3? Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010 Jun; 29(6):623-32. Epub 2010 Mar 27
- Reichel M, Heisig P, Kampf G: Vergleich der Wirksamkeit von 89,5 % 1-Propanol bei kurzen Anwendungszeiten mit dem Referenzverfahren der DGHM-Methode für die Hautantiseptik. Hyg Med 2010, 35(3):64-69.
- Kampf G, Reichel M. Gehäufte Hautirritationen durch ein viruzides Händedesinfektionsmittel mit hohem Phosphorsäuregehalt. ASU – Arbeitsmedizin Sozialmedizin Umwelt (Manuskript angenommen am 24.03.2010)

Eingereichte Manuskripte:

Reichel M, Heisig P, Kampf G: Identification of variables for aerobic bacterial density at clinically relevant skin sites (eingereicht am 16.12.2009 bei BMC Microbiology; zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Arbeit in Begutachtung)

Poster:

Pitfalls in efficacy testing - how important is the validation of neutralization? Poster presentation at the SHEA 18th Annual Scientific Meeting (Orlando, Florida, USA, 2008).

Vortrag:

Bakteriendichte auf klinisch relevanten Hautarealen. 9. Internationaler Kongress der Deutschen Gesellschaft für Krankenhaushygiene (DGKH); 20.-23. April 2008 Berlin, Deutschland (Abstract: Hyg Med 2008, 33(Suppl. 1):50).

Angaben zu dem individuellen Beitrag zu jeder Publikation

➤ **Pitfalls in efficacy testing – how important is the validation of neutralization of chlorhexidine digluconate?**

Mirja Reichel, Peter Heisig und Günter Kampf

Mirja Reichel konzipierte das Studiendesign, führte alle experimentellen Untersuchungen inklusive der statistischen Auswertung der Daten durch, erstellte das Manuskript und reichte es zur Veröffentlichung ein. Prof. Dr. Günter Kampf wirkte bei der Konzipierung des Studiendesigns sowie der Auswertung mit, unterstützte die Erstellung des Manuskripts und gab es zur Veröffentlichung frei. Prof. Dr. Peter Heisig prüfte das Manuskript und gab es ebenfalls zur Veröffentlichung frei.

➤ **Alcohols for Skin Antisepsis at Clinically Relevant Skin Sites**

Mirja Reichel, Peter Heisig, Thomas Kohlmann und Günter Kampf

Mirja Reichel konzipierte das Studiendesign, führte alle experimentellen Untersuchungen inklusive der statistischen Auswertung der Daten durch, erstellte das Manuskript und reichte es zur Veröffentlichung ein. Prof. Dr. Günter Kampf und Prof. Dr. Peter Heisig wirkten bei der Konzipierung der Studiendesigns mit. Prof. Dr. Günter Kampf wirkte zudem bei der Auswertung der Daten mit und unterstützte die Erstellung des Manuskripts. Prof. Dr. Thomas Kohlmann hatte Zugang zu allen Rohdaten und überprüfte die Ergebnisse der durchgeführten statistischen Auswertung. Alle Autoren haben das Manuskript gelesen und zur Veröffentlichung freigegeben.

➤ **Vergleich der Wirksamkeit von 89,5 % 1-Propanol bei kurzen Anwendungszeiten mit dem Referenzverfahren der DGHM-Methode für die Hautantiseptik**

Mirja Reichel, Peter Heisig und Günter Kampf

Mirja Reichel konzipierte das Studiendesign, führte alle experimentellen Untersuchungen inklusive der statistischen Auswertung der Daten durch, erstellte das Manuskript und reichte es zur Veröffentlichung ein. Prof. Dr. Günter Kampf und Prof. Dr. Peter Heisig wirkten bei der Konzipierung der Studiendesigns mit und prüfte das Manuskript. Prof. Dr. Günter Kampf wirkte zudem bei der Auswertung der Daten mit und unterstützte die Erstellung des Manuskripts.

➤ **Skin bacteria after chlorhexidine exposure – Is there a difference in response to human β -Defensin-3?**

Mirja Reichel, Anke Heisig, Peter Heisig und Günter Kampf

Mirja Reichel konzipierte das Studiendesign, führte die Untersuchungen mit hBD-3 durch, wertete die Daten aus, erstellte das Manuskript und reichte es für die Veröffentlichung ein. Dr. Anke Heisig führte die sequenzbasierte Identifizierung der Bakterienisolate durch und unterstützte die Erstellung des Manuskripts. Prof. Dr. Günter Kampf und Prof. Dr. Peter Heisig wirkten bei der Konzipierung der Studiendesigns mit und unterstützten die Erstellung des Manuskripts. Prof. Dr. Günter Kampf wirkte zudem bei der Auswertung der Daten mit.

Versicherung an Eides statt

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Arbeiten entnommen sind, habe ich unter genauer Angabe der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht.

Hiermit erkläre ich zudem, dass ich bisher keine Promotionsversuche unternommen habe. Diese Arbeit ist zuvor weder in gleicher, noch ähnlicher Form einem Prüfungsausschuss zur Erlangung des Doktorgrades vorgelegt worden.

Hamburg, 02.06.2010

Mirja Reichel

Originalarbeiten

**Pitfalls in efficacy testing-how
important is the validation of
neutralization of chlorhexidine
digluconate?**

Reichel M, Heisig P, Kampf G

Ann Clin Microbiol Antimicrob 2008, 7:20

Research

Open Access

Pitfalls in efficacy testing – how important is the validation of neutralization of chlorhexidine digluconate?

Mirja Reichel^{*1,2}, Peter Heisig² and Günter Kampf^{1,3}

Address: ¹Bode Chemie GmbH & Co, KG, Scientific Affairs, Melanchthonstr. 27, 22525, Hamburg, Germany, ²Department of Pharmaceutical Biology and Microbiology, Institute of Pharmacy, University of Hamburg, Hamburg, Germany and ³Institute for Hygiene and Environmental Medicine, Ernst Moritz Arndt University, Walther-Rathenau-Str. 49a, 17475, Greifswald, Germany

Email: Mirja Reichel^{*} - mirja.reichel@bode-chemie.de; Peter Heisig - heisig@chemie.uni-hamburg.de; Günter Kampf - guenter.kampf@bode-chemie.de

^{*} Corresponding author

Published: 2 December 2008

Received: 28 August 2008

Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials 2008, **7**:20 doi:10.1186/1476-0711-7-20

Accepted: 2 December 2008

This article is available from: <http://www.ann-clinmicrob.com/content/7/1/20>

© 2008 Reichel et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Effective neutralization of active agents is essential to obtain valid efficacy results, especially when non-volatile active agents like chlorhexidine digluconate (CHG) are tested. The aim of this study was to determine an effective and non-toxic neutralizing mixture for a propan-1-ol solution containing 2% CHG.

Methods: Experiments were carried out according to ASTM E 1054-02. The neutralization capacity was tested separately with five challenge microorganisms in suspension, and with a rayon swab carrier. Either 0.5 mL of the antiseptic solution (suspension test) or a saturated swab with the antiseptic solution (carrier test) was added to tryptic soy broth containing neutralizing agents. After the samples were mixed, aliquots were spread immediately and after 3 h of storage at 2 – 8°C onto tryptic soy agar containing a neutralizing mixture.

Results: The neutralizer was, however, not consistently effective in the suspension test. Immediate spread yielded a valid neutralization with *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Corynebacterium jeikeium* but not with *Micrococcus luteus* ($p < 0.001$) and *Candida albicans* ($p < 0.001$). A 3-h storage period of the neutralized active agents in suspension resulted in significant carry-over activity of CHG in addition against *Staphylococcus epidermidis* ($p < 0.001$) and *Corynebacterium jeikeium* ($p = 0.044$). In the carrier test, the neutralizing mixture was found to be effective and non toxic to all challenge microorganisms when spread immediately. However, after 3 h storage of the neutralized active agents significant carry-over activity of CHG against *Micrococcus luteus* ($p = 0.004$; Tukey HSD) was observed.

Conclusion: Without effective neutralization in the sampling fluid, non-volatile active ingredients will continue to reduce the number of surviving microorganisms after antiseptic treatment even if the sampling fluid is kept cold straight after testing. This can result in false-positive antiseptic efficacy data. Attention should be paid during the neutralization validation process to the amount of antiseptic solution, the storage time and to the choice of appropriate and sensitive microorganisms.

Background

Different alcohols such as propan-1-ol, propan-2-ol and ethanol as well as chlorhexidine digluconate (CHG) have been used as effective antiseptic agents for many years.

One of the main properties of CHG is its residual antimicrobial activity which is beneficial in skin antiseptics used for catheter care [1] but not in hand hygiene [2]. Combinations of CHG and an alcohol have an advantage over single compounds. For example, the benefits of combining these substances include the immediate reduction of bacterial density by alcohols and the prolonged antibacterial effect of CHG.

The use of CHG, which has been shown to be superior to other skin antiseptics in preventing catheter-related bloodstream infections [1], is recommended by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) for skin antisepsis of catheter insertion sites [3]. The use of 2% CHG-based preparations before catheter insertion and during dressing changes is "strongly recommended for implementation and strongly supported by well-designed experimental, clinical, or epidemiologic studies" [3]. This recommendation is based on various studies which show that the incidence of catheter-associated primary bloodstream infection can be significantly reduced when CHG is used for treatment of the catheter insertion site [1].

The "residual effect" of CHG in hand hygiene preparations, however, is not measured in the same way. This is commonly determined by measuring the reduction of bacterial density, e.g. on fingertips [4,5] or hands [6].

In order to achieve valid results of practical relevance on the efficacy of skin antiseptics and hand disinfectants, they are usually tested *in vitro* and under practical conditions in healthy volunteers.

The main objective of efficacy tests is to determine the number of surviving microorganisms after a specific contact time measured at a defined time point. Therefore, the continuation of the antimicrobial effects of an antiseptic after the chosen contact time must be excluded by complete inactivation of the antimicrobial substances at this specific time. This process results in quenching the antimicrobial activity of a formulation and is defined as neutralization by the American Society for Testing and Materials (ASTM) [7].

In efficacy studies without neutralization in the sampling fluid, the number of surviving microorganisms is often remarkably low suggesting a high efficacy of CHG [8-10]. However, this effect can not be explained by efficacy during the exposure time but is achieved by continuous antimicrobial activity after the exposure time [9]. That is why

the credibility of antimicrobial efficacy results depend largely on the performance of validated neutralization [10], especially when non-volatile active agents like CHG are tested [9,11].

One crucial point in neutralization evaluation and validation is the comparability of the *in vitro* neutralizer test and the effectiveness evaluation under practical conditions [12]. In this process all relevant critical parameters of the antiseptic test should be taken into the neutralizer validation process such as different and relevant types of microorganisms and carriers as well as storage conditions used in the efficacy test.

Even though the recently published guidelines for antiseptic efficacy tests require different forms of neutralization [13,14] and neutralization validation [15], many of the efficacy data from published studies were obtained either without adequate neutralization, without validated neutralization or without specification of the neutralizing process (e.g. storage time and temperature) and the validation status [2,16,17].

For the validation of neutralization, a European norm [18] as well as an ATSM standard [7] are available. Both of these methods focus on the effectiveness of the neutralizer on the one hand and the toxicity to test organisms on the other. Both methods describe different forms of neutralization.

The ASTM E 1054-02 method encourages the use of all microorganisms of the efficacy test also in the neutralization assay. The investigator is allowed to select the appropriate, representative microorganisms for the efficacy test [7].

In contrast, the European norm (EN) 13727 requires the use of four different test organisms (*Escherichia coli* (k12) NCTC 10538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Enterococcus hirae* ATCC 10541) which may not always be appropriate for the efficacy evaluation [18]. Due to the fact that this norm is designed for *in vitro* suspension tests and not for *in vivo* tests, and that different microorganisms show different sensitivity to the carry-over effect of antiseptics, this choice of species may not be suitable for the validation of neutralization for specific tests such as skin antiseptics. However, there is no other comparable standard available besides the above mentioned ASTM method, which is obligatory for the ASTM test of skin antiseptics [19] and which includes the validation of neutralization.

In the present study, neutralization validation by chemical inhibition using an alcoholic solution containing 2% CHG was carried out using 5 bacterial species relevant for

skin antiseptics and which were, with the exception of *Staphylococcus aureus*, not part of the EN.

The aim of this study was to determine whether the validity of neutralization was influenced by the type of test (suspension test versus carrier test), by the type of microorganism or by different storage times of the neutralized antiseptic solution containing the particular microorganism.

Methods

Antiseptic solution

A solution containing 89.5% (v/v) propan-1-ol and 2% (w/w) CHG, manufactured by Bode Chemie GmbH & Co. KG, Hamburg, Germany, was used in this study. The concentrations of the active agents were checked prior to validation by gas chromatography (propan-1-ol) and ultraviolet spectroscopy (CHG). The allowed tolerance was defined as 1% relative to the propan-1-ol concentration and 3% relative to the concentration of CHG.

Test organisms

Five clinically relevant species, all found on human skin, were tested separately: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Corynebacterium jeikeium* ATCC 43734, and *Candida albicans* ATCC 10231.

Neutralizing agents

The following neutralizing agents were used:

- In tryptic soy broth: 3% polysorbate 80, 0.3% lecithin, 0.1% L-histidine, 0.5% sodium thiosulfate, 3% saponine and 1% ether sulfate. The suitability of these agents has been described previously [2]
- In tryptic soy agar: 0.1% L-histidine, 0.3% lecithin and 3% polysorbate 80.

Test procedure

Experiments were carried out according to ASTM E 1054-02 "Neutralization Assay with Recovery on Solid Medium" [7].

Inocula were prepared by transferring microorganisms from stock cultures onto tryptic soy agar plates containing neutralizer which were incubated for 24 – 48 h at $37 \pm 2^\circ\text{C}$. A second passage was generated under similar conditions. Microorganisms were suspended in saline peptone water, transferred into sterile flasks and stirred for about 10 minutes. Aliquots of selected dilutions were used for the test to ensure a microbial density of about 30 – 100 colony-forming units (CFU) in 1 mL of sampling fluid based on an initial volume of 5 mL.

Neutralizer effectiveness test

The neutralizer effectiveness tests were performed in two ways: with a rayon swab carrier and in suspension without carrier with 5 mL of tryptic soy broth containing the neutralizing agents.

• Carrier test:

The rayon swab carrier (BBL CultureSwab, Sterile, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) was placed in 2.5 mL of the antiseptic solution; after 20 s the swab was taken out of the antiseptic solution and the tip of the saturated swab was broken off and placed into the broth (amount of the antiseptic solution on the saturated swab: approx. 0.14 mL, measured as the difference in volume between a dry swab and a completely saturated swab)

• Suspension test:

0.5 mL of the antiseptic solution was added to 5 mL of broth.

Neutralizer toxicity test

The test organism was added to 5 mL of saline peptone water containing the neutralizing mixture.

Organism viability test

The test organism was added to 5 mL of saline peptone water without the neutralizing mixture.

Material control test

The test organism was added to 5 mL of the antiseptic solution.

In all tests, the sample was mixed and within 5 s an aliquot of the test organism was added.

After addition of the test organism, the samples were mixed for 30 s and:

1. within one minute, aliquots were plated in duplicate
2. after 3 h storage at $2 - 8^\circ\text{C}$, aliquots were plated in duplicate (to simulate the longest possible exposure period in the antimicrobial efficacy test).

Tryptic soy agar plates containing the neutralizing agents were used in the effectiveness tests as well as in the toxicity tests. For the detection of organism viability and material control, tryptic soy agar without neutralizer was used as a solid medium. After incubation (aerobically, 48 h at $37 \pm 2^\circ\text{C}$) the number of CFU was counted, the mean number of CFU in both plates was calculated and transformed to a $\log_{10}$ -value.

Statistical analysis

Each experiment was carried out in triplicate. The results were evaluated as arithmetic means of the $\log_{10}$ -values. An analysis of variance between the tests (neutralizer toxicity, material control, organism viability and neutralizer effectiveness) was performed for each microorganism. In the event of a significant difference ($p < 0.05$) being observed, a post-hoc test (Tukey-HSD) was carried out. Two criteria had to be met to categorize the neutralization as invalid:

The difference in the means between the neutralizer effectiveness test and the organism viability test must be

1: significant in post-hoc analysis, and

2: $> 0.2 \log_{10}$ -steps (defined limit of biological relevance)

Besides the direct comparison with the organism viability test, we calculated the difference between the CFU [$\log_{10}$] after 3 h storage and that of the immediate spread samples and compared the means of these differences for each replicate and each microorganism.

Results

The neutralizing agents showed no toxicity even after 3 h storage time. The antiseptic solution was active against all challenge microorganisms after a short time as well as after 3 h of storage (Table 1). In all cases, no microorganisms survived the material control test which resulted in significant differences in comparison to the organism viability test ($p < 0.001$) indicating that the antiseptic solution had strong activity against all five organisms tested.

In the suspension test (Table 2), after the short storage time, the neutralized antiseptic agent was capable of sig-

nificantly reducing the number of *Micrococcus luteus* CFU ($p < 0.001$; Tukey-HSD) and *Candida albicans* CFU ($p < 0.001$) in comparison to the organism viability test. After 3 h of storage, four of five neutralizations in the suspension test failed (*Staphylococcus epidermidis*, $p < 0.001$, *Micrococcus luteus* $p < 0.001$, *Candida albicans*, $p < 0.001$ and *Corynebacterium jeikeium*, $p = 0.044$).

The results of the carrier test showed that no validation failed in the neutralizer effectiveness test after immediate spreading (Table 3). After 3 h of storage, the number of *Micrococcus luteus* CFU decreased (Figure 1) which resulted in a significant difference in comparison to the number of CFU in the organism viability test ($p = 0.004$).

In four cases in the suspension test and one case in the carrier test, the number of surviving microorganisms decreased within the 3-hour storage period. Figure 1 shows the differences between the means for the 3-h stored samples and the immediate spread samples.

The highest decrease in cell number was found in the suspension test with *Candida albicans* (Δ of mean of CFU [$\log_{10}$] = -0.92 , $p = 0.004$, t-test), followed by *Staphylococcus epidermidis* (Δ of mean of CFU [$\log_{10}$] = -0.91 , $p = 0.006$). In spite of these significant differences in comparison to the organism viability test, the differences were not significant when compared with *Corynebacterium jeikeium*. Due to the fact that *Micrococcus luteus* was reduced to below the limit of detection within one minute of the contact time, no further reduction was detected after storage for 3 h. When a carrier was used, the CFU [$\log_{10}$] counts of *Micrococcus luteus* decreased within the 3-h storage period, however, this decrease was not statistically significant.

Table 1: Determination of neutralizer toxicity, material antiseptic activity and organism viability according to ASTM E 1054-02.

Storage time	Test organism exposed to (name of the test)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	<i>Candida albicans</i>
< 1 min	neutralizer in saline peptone water (neutralizer toxicity test)	1.86 ± 0.05	1.81 ± 0.03	1.77 ± 0.01	1.82 ± 0.02	2.05 ± 0.01
	antiseptic solution (material control test)	0*	0*	0*	0*	0*
	saline peptone water (organism viability test)	1.90 ± 0.05	1.84 ± 0.07	1.74 ± 0.03	1.79 ± 0.02	2.02 ± 0.03
3 h	neutralizer in saline peptone water (neutralizer toxicity test)	1.83 ± 0.02	1.81 ± 0.02	1.72 ± 0.03	1.89 ± 0.08	2.05 ± 0.06
	antiseptic solution (material control test)	0*	0*	0*	0*	0*
	saline peptone water (organism viability test)	1.88 ± 0.06	1.81 ± 0.02	1.73 ± 0.05	1.77 ± 0.08	2.03 ± 0.02

Mean and SD of the number of CFU ($\log_{10}$) when exposed to the neutralizer in saline peptone water, the antiseptic solution or saline peptone water at storage times of < 1 min and 3 h; * significant difference ($p < 0.05$) in comparison to organism viability test, Tukey-HSD

Table 2: Suspension test for validation of neutralization of chlorhexidine digluconate.

Storage time	Test organism exposed to (name of the test)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	<i>Candida albicans</i>
<1 min.	neutralized antiseptic solution (neutralizer toxicity test)	1.82 ± 0.04	1.77 ± 0.03	0*	1.66 ± 0.09	1.06 ± 0.12*
	saline peptone water (organism viability test)	1.90 ± 0.05	1.84 ± 0.07	1.74 ± 0.03	1.79 ± 0.02	2.02 ± 0.03
3 h	neutralized antiseptic solution (neutralizer toxicity test)	1.80 ± 0.02	0.86 ± 0.14*	0*	1.44 ± 0.22*	0.13 ± 0.23*
	saline peptone water (organism viability test)	1.88 ± 0.06	1.81 ± 0.02	1.73 ± 0.05	1.77 ± 0.08	2.03 ± 0.02

Mean and SD of the number of CFU ($\log_{10}$) when exposed to the neutralized antiseptic solution or saline peptone water at storage times of < 1 min and 3 h; * significant difference ($p < 0.05$) in comparison to organism viability test, Tukey-HSD

Discussion

We were able to show for the first time that the validation of neutralization is strongly influenced by the amount of active agents, the amount of neutralizing agents, the storage time of the neutralized antiseptic before plating and by the chosen microorganism.

The need for neutralization validation as a basis of antimicrobial efficacy evaluations was emphasized by the fact that in studies without neutralizing agents in the sampling fluid, the efficacy of CHG was remarkably higher than in studies with neutralization [9,10]. A major limitation of many studies regarding the efficacy of antiseptic products is that the neutralization process is not specified at all. It is often not described if the active antimicrobial agents were neutralized, if the neutralization was validated and if the validation procedure followed the conditions of the efficacy evaluation [2].

One critical point in neutralization validation is the ratio between the amount of antiseptic agent and the amount of neutralizing agents available. In our study, 0.5 mL of antiseptic agents were mixed with 5 mL of broth containing the neutralizing agents, and 0.14 mL of antiseptic agents were mixed with 5 mL of broth containing the neu-

tralizing agents in the carrier tests, this resulted in about three times more antiseptic solution in the suspension test than in the carrier test. After the short exposure time of < 1 min, neutralization failed with *Micrococcus luteus* and *Candida albicans* in the suspension test whereas neutralization was valid with all five test organisms in the carrier test. After 3 h storage of the neutralized antiseptic, the difference between the carrier tests and the suspension tests became more obvious. Neutralization failed in the suspension test with four of the five organisms tested, but only one failed (*Micrococcus luteus*) when the small amount of antiseptic solution was added in the carrier test. Whether the results depended on the type of test (carrier or suspension) could not be determined with this study design because equal amounts of the antiseptic solution were not compared in the two tests. There is some evidence in the literature which suggests a possible interaction between CHG and fibres such as cotton, therefore, we can not exclude the possibility that the swab material may have influenced the test results [20].

Based on our data it appears reasonable to conclude that validation of neutralization is acceptable for a carrier test if the experimental evidence is obtained from a suspension test and the amount of antiseptic solution in the car-

Table 3: Carrier test for validation of neutralization of chlorhexidine digluconate.

Storage time	Test organism exposed to (name of the test)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	<i>Candida albicans</i>
<1 min.	neutralized antiseptic solution (neutralizer toxicity test)	1.84 ± 0.01	1.83 ± 0.04	1.61 ± 0.05	1.84 ± 0.01	2.02 ± 0.03
	saline peptone water (organism viability test)	1.90 ± 0.05	1.84 ± 0.07	1.74 ± 0.03	1.79 ± 0.02	2.02 ± 0.03
3 h	neutralized antiseptic solution (neutralizer toxicity test)	1.87 ± 0.01	1.87 ± 0.01	1.44 ± 0.14*	1.91 ± 0.08	2.10 ± 0.04
	saline peptone water (organism viability test)	1.88 ± 0.06	1.81 ± 0.02	1.73 ± 0.05	1.77 ± 0.08	2.03 ± 0.02

Mean and SD of the number of CFU ($\log_{10}$) when exposed to the neutralized antiseptic solution or saline peptone water at storage times of < 1 min and 3 h; * significant difference ($p < 0.05$) in comparison to organism viability test, Tukey-HSD

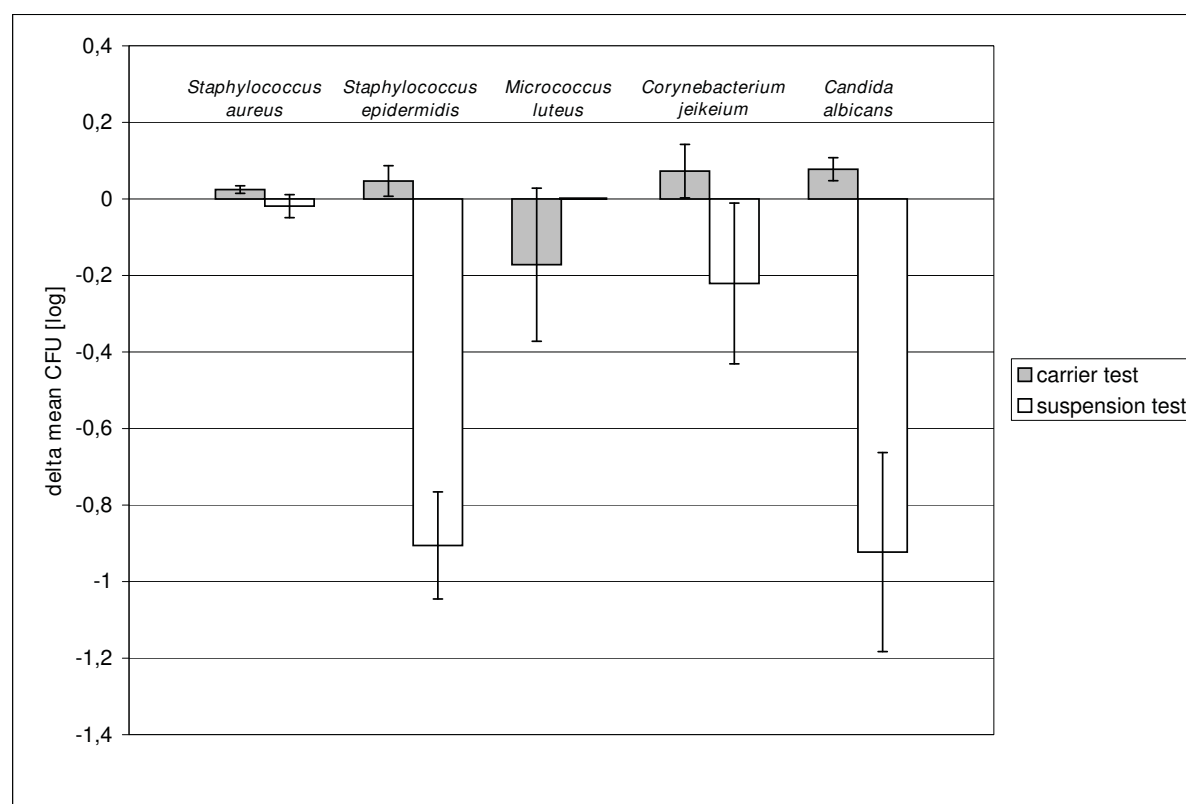


Figure 1
Delta of mean of CFU (log) between 3 h storage and immediate spread of neutralized antiseptic solution.

rier test is at least equal or less than that in the suspension test. Nevertheless, simulation of the efficacy test conditions as close as possible in the validation process is preferred.

Another critical point in neutralization validation is the storage time of neutralized antiseptic products. We were able to show that validation of neutralization is possible after a short storage time of the neutralized antiseptic product (< 1 min). If the neutralized antiseptic product, however, is stored for 3 h at 2 – 8°C, it may continue to kill microorganisms resulting in a lower number of surviving test organisms. If in an efficacy test of an antiseptic product, neutralization validation is performed with a very short storage time after sampling, and the efficacy test itself has a long storage time after sampling, this may well result in a lower number of surviving test organisms indicating better efficacy of the antiseptic product which could be classified as a false-positive efficacy result. Based on our data it is important that the storage time in the efficacy test

is not longer than the storage time in the neutralization validation.

One parameter which has been overlooked so far, especially in the EN, is the impact of test organism choice on the outcome of neutralization and neutralization validation. To our knowledge this is the first study to show the importance of the type of microorganism in the validation process which is relevant for the subsequent efficacy evaluation. Based on our results it is not advisable to draw conclusions regarding the effectiveness of a neutralizer if different microorganisms are used in the validation process than in the efficacy evaluation. The efficacy of skin antiseptics is commonly determined using mixed skin flora on different skin sites (e.g. abdominal skin, groin, forehead, arms) [15,21]. If neutralization validation of a skin antiseptic is only determined using *Staphylococcus aureus*, the overall efficacy of the skin antiseptic could be overestimated because it is possible that other resident microorganisms such as *Micrococcus luteus*, which is more

sensitive to residual CHG, will still be affected in the efficacy evaluation despite "valid neutralization".

In general the validation conditions should simulate the efficacy test conditions as closely as possible. With regard to all the challenge microorganisms used in this study, *Micrococcus luteus* was the most sensitive test organism and appears therefore to be appropriate for the sensitive detection of neutralizer validity.

Conclusion

Valid neutralization during testing is essential for the scientific assessment of antiseptic efficacy in a defined contact time. Without valid neutralization false-positive efficacy data are likely. The design of the validation process should closely follow the design of the efficacy test. Attention should be paid in the validation process to the amount of antiseptic solution, the storage time and to the choice of appropriate and sensitive microorganisms.

Competing interests

The first and the last authors are paid employees of Bode Chemie GmbH & Co. KG, Hamburg, Germany.

Authors' contributions

MR designed the study, collected and analyzed the data and drafted the manuscript. GK participated in the study design, data analysis and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The study was funded by Bode Chemie GmbH & Co. KG, Hamburg, Germany. Parts of this study were published as a poster presentation at the SHEA 18th Annual Scientific Meeting (Orlando, Florida, USA, 2008).

References

- Chaiyakunapruk N, Veenstra DL, Lipsky BA, Saint S: **Chlorhexidine compared with povidone-iodine solution for vascular catheter-site care: a meta-analysis.** *Ann Intern Med* 2002, **136**(11):792-801.
- Kampf G: **What is left to justify the use of chlorhexidine in hand hygiene?** *J Hosp Infect* 2008, **70**(1):27-34.
- O'Grady NP, Alexander M, Dellinger EP, Gerberding JL, Heard SO, Maki DG, Masur H, McCormick RD, Mermel LA, Pearson ML, et al.: **Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections.** *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002, **23**(12):759-769.
- EN 1500: **Chemical disinfectants and antiseptics. Hygienic hand disinfection. Test method and requirement (phase 2, step 2).** Brussels: CEN – Comité Européen de Normalisation; 1997.
- Rotter ML: **European norms in hand hygiene.** *J Hosp Infect* 2004, **56**(suppl. 2):S6-S9.
- Kampf G, Ostermeyer C, Heeg P, Paulson D: **Evaluation of two methods of determining the efficacies of two alcohol-based hand rubs for surgical hand antisepsis.** *Appl Environ Microbiol* 2006, **72**(6):3856-3861.
- Anonymous: **ASTM E 1054 – 02. Standard test method for evaluation of inactivators of antimicrobial agents.** 2002.
- Werner H-P, Engelhardt C: **Problematik der Inaktivierung am Beispiel des in vitro-Tests.** *Hyg Med* 1978, **3**:326-330.
- Kampf G, Shaffer M, Hunte C: **Insufficient neutralization in testing a chlorhexidin-containing ethanol-based hand rub can result in a false positive efficacy assessment.** *BMC Infect Dis* 2005, **5**:48.
- Rotter ML: **Povidone-iodine and chlorhexidine gluconate containing detergents for disinfection of hands.** *J Hosp Infect* 1981, **2**:273-276.
- Shimizu M, Okuzumi K, Yoneyama A, Kunisada T, Araake M, Ogawa H, Kimura S: **In vitro antiseptic susceptibility of clinical isolates from nosocomial infections.** *Dermatology* 2002, **204**:21-27.
- Sutton SVW: **Neutralizer evaluation as control experiments for antimicrobial efficacy tests.** In *Handbook of disinfectants and Antiseptics* Edited by: Ascenzi JM. New York: Marcel Dekker Inc; 1996:43-62.
- Christiansen B, Eggers H-J, Exner M, Gundermann K-O, Heeg P, Hingst V, Höfler U, Krämer J, Martiny H, Rüden H, et al.: **Richtlinie für die Prüfung und Bewertung von Hautdesinfektionsmitteln.** *Zbl Hyg* 1991, **192**:99-103.
- Gebel J, Werner H-P, Kirsch-Altena A, Bansemer K: **Standardmethoden der DGHM zur Prüfung chemischer Desinfektionsverfahren.** Wiesbaden: mhp-Verlag; 2002.
- Anonymous: **Tentative final monograph for health care antiseptic products; proposed rule.** *Fed Reg* 1994, **59**(116):31401-31452.
- Adams D, Quayum M, Worthington T, Lambert P, Elliott T: **Evaluation of a 2% chlorhexidine gluconate in 70% isopropyl alcohol skin disinfectant.** *J Hosp Infect* 2005, **61**(4):287-290.
- Nielsen ML, Raahave D, Stage JG, Justesen T: **Anaerobic and aerobic skin bacteria before and after skin-disinfection with chlorhexidine: an experimental study in volunteers.** *J Clin Path* 1975, **28**(10):793-797.
- 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).** Brussels: CEN – Comité Européen de Normalisation; 2007.
- Anonymous: **ASTM E 1173 – 01. Standard test method for evaluation of preoperative, precatheterization, or preinjection skin preparations.** 2001.
- Denton GV: **Chlorhexidine.** In *Disinfection, sterilization, and preservation* Edited by: Block SS. Philadelphia: Lea & Febiger; 1991:274-289.
- Kampf G, Pitten F-A, Heeg P, Christiansen B: **Efficacy of two ethanol-based skin antiseptics on the forehead at shorter application times.** *BMC Infect Dis* 2007, **7**:85.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



Alcohols for skin antiseptics at clinically relevant skin sites

Reichel M, Heisig P, Kohlmann T, Kampf G

**Antimicrob Agents Chemother 2009,
53(11):4778-4782**

Alcohols for Skin Antisepsis at Clinically Relevant Skin Sites[▽]

Mirja Reichel,^{1,2*} Peter Heisig,² Thomas Kohlmann,³ and Günter Kampf^{1,4}

Bode Chemie GmbH, Scientific Affairs, Melanchthonstr. 27, 22525 Hamburg, Germany¹; Department of Pharmaceutical Biology and Microbiology, Institute of Pharmacy, University of Hamburg, 20146 Hamburg, Germany²; Institute of Community Medicine, Ernst Moritz Arndt University, Walther-Rathenau-Str. 49a, 17487 Greifswald, Germany³; and Institute for Hygiene and Environmental Medicine, Ernst Moritz Arndt University, Walther-Rathenau-Str. 48, 17487 Greifswald, Germany⁴

Received 30 April 2009/Returned for modification 17 June 2009/Accepted 31 August 2009

The antiseptic efficacy of ethanol, isopropanol, and *n*-propanol at 60%, 70%, and 89.5% (all vol/vol) was analyzed after 2, 3, or 4 min of application to the forehead, back, and abdomen of 180 volunteers by the use of a standardized swab sampling method. Results of recolonization by the aerobic skin flora of the upper arms and backs of 20 volunteers were compared 72 h after treatment with 0.5%, 1%, or 2% chlorhexidine digluconate (CHG) in 89.5% *n*-propanol. The most effective alcohol at all skin sites was *n*-propanol, with a mean $\log_{10}$ reduction of 1.82 after 2 min on the forehead. Efficacy against the aerobic flora of the forehead was mainly influenced by the type of alcohol ($P < 0.001$), followed by the concentration ($P < 0.001$) and the application time ($P = 0.006$). Ethanol and isopropanol were significantly less effective (both $P < 0.001$). Alcohol supplemented with 0.5% or more CHG was significantly more effective than alcohol alone in the suppression of recolonization ($P < 0.05$). An 89.5% solution of *n*-propanol was the most effective alcohol for the reduction of populations of aerobic skin flora. Its combination with CHG is appropriate whenever recolonization of the skin must be limited. Further studies are needed to determine the most effective concentration of CHG in *n*-propanol to provide the best protection against recolonization of the skin, e.g., for catheter site care.

In the United States and Europe, both ethanol and isopropanol are recognized active agents in medicinal products (7, 32), e.g., to prevent surgical-site infections as recommended by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC). The U.S. Food and Drug Administration (FDA) assessed aqueous ethanol at 60% to 95% and isopropanol at 70% to 91.3% (vol/vol) as safe and effective for patient preoperative skin preparations (9). In Europe, *n*-propanol is also approved as an active ingredient in medicinal products for skin antisepsis.

For catheter site care, the CDC strongly recommends the use of a 2% chlorhexidine-based preparation (24). The suppression of the recolonization of the catheter site is important because of the permanent gap in the skin barrier and the long intervals between dressing changes. Chlorhexidine is more effective than other standard preparations in preventing catheter colonization when used for catheter site care (33). It is also more effective in reducing bloodstream infection rates, which are the most important clinical endpoints (6, 19, 22).

To the best of our knowledge, the levels of efficacy of the three alcohols used for skin antisepsis have never been studied systematically in vivo. Therefore, in this study, ethanol, isopropanol, and *n*-propanol were compared at three different concentrations and for three different application times at four clinically relevant skin sites to determine which of these antiseptic treatments is most effective in reducing the populations of aerobic skin flora. We then combined the most effective alcohol solutions identified with different concentrations of chlorhexidine digluconate (CHG) and analyzed their effects on

recolonization at two different skin sites after 72 h of sterile coverage.

MATERIALS AND METHODS

Antiseptic solutions. For part 1 of the study, aqueous solutions of ethanol, *n*-propanol, and isopropanol, at concentrations of 60%, 70%, and 89.5% (all vol/vol) each, were used.

For part 2 of the study, 89.5% (vol/vol) aqueous *n*-propanol supplemented with 0.5%, 1.0%, or 2% (all wt/wt) CHG (Evonik Degussa GmbH, Hanau, Germany) was used. All formulations were manufactured by Bode Chemie GmbH, Hamburg, Germany.

Study population. The sample size was chosen to determine the efficacy of the alcohols at a specific concentration for a specific application time for 20 subjects. The three types of alcohol were tested at three different concentrations for three application times, resulting in a total of 180 subjects in the first part of the study. For all subjects, ethanol, *n*-propanol, and isopropanol were tested in parallel at a specific concentration and for a specific application time. All four skin sites of each subject were evaluated consecutively on the same day. Volunteers were allowed to participate multiple times in the study but only once each for the evaluation of a specific concentration at a specific application time. A treatment-free interval of at least 7 days between tests of the same subject was maintained. A total of 20 different subjects participated in the second part of the study. In both parts of the study, a sex ratio of 10 women to 10 men was preferred, but a ratio of 9 to 11 or 11 to 9 was accepted.

Volunteers who were younger than 18 years of age, had a skin disease(s) such as dermatitis at one or more of the tested skin sites, or had undergone antibiotic or local antiseptic treatment 7 days before the test were excluded.

Study design. A prospective, randomized, unicenter, double-blind study design was chosen. This study was approved by an ethics commission (Freiburger Ethik-Kommission GmbH International, Freiburg, Germany; approval code 07/2064). Informed consent was obtained from each volunteer in a signed consent form.

Efficacy of alcohols. The immediate effect of the different alcohols was tested on the forehead, upper back, abdomen, and lumbar area. The alcohol solutions (each identified only by a blinded code designation) were tested with an application time of 2, 3, or 4 min.

At each of these sites, four test areas (5 cm² each in size) were marked with a sterilized metal stamp and stamp pad ink before sampling. The four test areas were arranged side by side horizontally on the forehead and in each corner of a larger square on the other skin sites. The test areas on all skin sites of each subject were randomly assigned for baseline sampling (pretreatment) and for the

* Corresponding author. Mailing address: Bode Chemie GmbH, Scientific Affairs, Melanchthonstr. 27, 22525 Hamburg, Germany. Phone: 49-40-54006276. Fax: 49-40-54006128. E-mail: mirja.reichel@bode-chemie.de.

[▽] Published ahead of print on 8 September 2009.

three types of alcohol by using a Latin-square design. The units were arranged in a four-by-four square such that each treatment appeared once in each row and each column. The rows of the square were allocated to specific skin sites, and the columns were allocated to the specific test areas. A new Latin square was constructed for each subject.

In each test area, the alcohol was applied once every minute with a rayon swab in a standardized manner. In order to ensure that the skin was kept moist during the minute, the entire test area was completely wiped three times. The swab was moistened prior to each use.

Both baseline sampling and posttreatment sampling were performed as follows. The test area was swabbed with a sterile rayon swab (BBL CultureSwab ohne medium; Becton Dickinson, Darmstadt, Germany), premoistened with broth, by pressing the swab as evenly as possible on the skin and rubbing the 5-cm² area with a total of 30 swab movements (during approximately 10 to 12 s). The tip of the swab was broken off into a sterile collection tube containing 5 ml of casein-peptone soymeal-peptone broth (Merck KgaA, Darmstadt, Germany) supplemented with 3% polysorbate 80 (Merck KgaA, Darmstadt, Germany), 0.3% lecithin (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany), 0.1% *L*-histidine, and 0.1% *L*-cysteine (both Merck KgaA, Darmstadt, Germany), and the sample was mixed for 30 s. The samples were stored at 2 to 8°C for a maximum of 3 h until spreading, because the numbers of bacteria do not change during this type of storage (16). Each sample was mixed for 5 s before dilution. Aliquots (0.5 ml) and serial dilutions were spread in duplicate on casein-peptone soymeal-peptone agar (CASO agar; Merck KgaA, Darmstadt, Germany) plates with a diameter of 90 mm.

After incubation of the CASO agar plates (aerobically for 48 h at 37 ± 2°C), the numbers of CFU were counted. For determination of the baseline bacterial density, all plates with CFU counts between 15 and 300 were evaluated. For posttreatment bacterial density determinations, all plates with CFU counts below 300, including those with less than 15 CFU, were evaluated to avoid false-positive efficacy results.

Efficacy of supplementary CHG. To test the immediate and residual effects of antiseptic containing CHG, six test areas were chosen on the upper arms and upper back. The skin sites were primarily chosen for their clinical relevance for catheter site care. The upper back is very close to the puncture site of subclavian catheters and can easily be sampled and covered with sterile dressings. The upper arm is very close to the antecubital fossa and can also easily be sampled and covered with sterile dressings. On each upper arm, three 5-cm² areas were marked, one below the other; on the upper back, two cranial areas were marked side by side, and four areas were marked just below them. The areas in the middle of each upper arm and the cranially located areas on the upper back were used to analyze the baseline counts and the immediate antiseptic effects. The allocation of different sites of the body was balanced across the groups of participants.

The baseline counts and immediate effects of the antiseptics were determined as described for the first part of the study. Casein-peptone soymeal-peptone broth containing 3% polysorbate 80, 0.3% lecithin, 0.1% *L*-histidine, and 0.5% sodium thiosulfate (Merck KgaA, Darmstadt, Germany), 3% saponin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany), and 1% sodiumlaurylthethersulfate (Cognis GmbH, Mohnheim am Rhein, Germany), previously described as suitable (14), and CASO agar containing 0.1% *L*-histidine, 0.3% lecithin, and 3% polysorbate 80 (Merck KgaA, Darmstadt, Germany) were used. The neutralization of the alcohol solution supplemented with 2% CHG was validated according to ASTM E 1054-02 (2) with five aerobic challenge microorganisms, all of which are found on human skin (25), to ensure that the carryover of residual antiseptic in vitro did not lead to false-positive efficacy results.

The other four test areas were treated randomly with 89.5% *n*-propanol with or without CHG. The application times were 30 s on the upper arms and 3 min on the back, as described for the first part of the study. After the skin had been dried, each test area was covered with a sterile, water-resistant, vapor-permeable adhesive dressing for 72 ± 2 h. The dressings were then removed and the samples collected, handled, and incubated as described for the baseline samples.

Determination of efficacy. Each efficacy evaluation was based on the mean baseline log₁₀ CFU/cm² count at the corresponding skin site. For each type of treatment, the mean log₁₀ CFU/cm² counts for all duplicate analyses were calculated. When the results of two different dilution steps were within the defined CFU range, the weighted means were calculated.

The log₁₀ reduction was calculated by subtracting the mean log₁₀ CFU/cm² count after each treatment from the mean baseline log₁₀ CFU/cm² count at each skin site.

Statistical analysis. All computer-based statistical calculations were made with SPSS 13.0 or 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

In the first part of the study, differences between the treatment groups regard-

ing different types of alcohol for a specific application time at a specific concentration were determined (using analysis of variance or, if applicable, the Welch test). When the differences were significant ($P < 0.05$), Tukey's honestly significant difference test or Tamhane's T2 test was used for post hoc analyses.

In the second part of the study, the differences in the mean log₁₀ reductions between all the treatment groups were analyzed with the Friedman test. When the P value was lower than 0.05, the Wilcoxon-Wilcox test was applied.

RESULTS

Efficacy of alcohols. The average age of the 180 volunteers was 33 ± 12 years in the first part of the study. The highest density of aerobic flora was on the forehead (mean log₁₀ CFU/cm², 3.69 ± 1.00), followed by the upper back (3.00 ± 0.90), the abdomen (2.98 ± 0.74), and the lumbar area (2.35 ± 0.70).

Overall, the most effective type of alcohol for reduction of populations of flora was *n*-propanol at 89.5% (vol/vol). The application time was of minor relevance. The results are summarized in Table 1.

All three parameters were ranked regarding their respective degrees of influence on the log₁₀ reduction at each skin site. Overall, the type of alcohol had the strongest effect (Table 2).

Post hoc analyses of the results obtained for the forehead, the upper back, and the abdomen showed that *n*-propanol was more effective at reducing populations of flora than ethanol (all $P < 0.001$) and isopropanol ($P < 0.001$ for forehead and upper back; $P = 0.001$ for abdomen), regardless of the concentration or application time.

Irrespective of the application time or type of alcohol, post hoc analyses of the different alcohol concentrations showed that a 60% concentration was less effective than 70% or 89.5% ($P < 0.001$ and $P = 0.006$) on the forehead. Furthermore, a 70% concentration was less effective than 89.5% ($P = 0.003$) on the forehead and the upper back ($P = 0.027$). On the upper back and abdomen and in the lumbar area, a concentration of 60% was significantly less effective than 89.5% ($P = 0.01$ for the upper back; $P = 0.017$ for the abdomen; $P < 0.001$ for the lumbar area).

An application time of 2 min was significantly less effective than 3 min and 4 min on the forehead and the upper back ($P = 0.048$ and $P = 0.023$ for the forehead; $P = 0.013$ and $P < 0.001$ for the upper back), regardless of the type of alcohol or its concentration.

Efficacy of 89.5% *n*-propanol supplemented with 0.5%, 1%, or 2% CHG or with no supplementation. The average age for the group of 20 volunteers was 36 ± 13 years. The baseline count, the immediate effect of *n*-propanol, and the log₁₀ reductions in the populations of flora induced by the supplemented and unsupplemented alcohol solutions after 72 h are shown in Table 3.

The effects of the four antiseptic solutions differed significantly at both skin sites, as is consistent with the maintenance of recolonization by aerobic skin flora below the baseline level after 72 h of sterile coverage ($P = 0.001$ for the upper arms and $P = 0.005$ for the upper back by the Friedman test).

On the upper arms, all supplemented antiseptic solutions were significantly more effective than *n*-propanol without CHG in maintaining the recolonization of the aerobic skin flora below the baseline level after 72 h (0.5% CHG, $P < 0.01$; 1% CHG, $P < 0.05$; 2% CHG, $P < 0.01$ [paired analyses with the Wilcoxon-Wilcox test]).

TABLE 1. Mean log₁₀ reduction of the skin flora on different skin sites by various alcohols after different application times

Skin site	Type of alcohol ^a	Concn (%)	Mean $\pm$ SD log ₁₀ reduction and <i>P</i> value at indicated time (min) ^a					
			2	<i>P</i> value	3	<i>P</i> value	4	<i>P</i> value
Forehead	prop-1	60	1.54 ^{A/AA} $\pm$ 0.94	<0.001	1.93 ^{B/BB} $\pm$ 0.73	<0.001	1.74 ^C $\pm$ 1.26	0.044
	prop-2		0.67 ^{AA} $\pm$ 0.65		0.78 ^{BB} $\pm$ 0.79		1.05 $\pm$ 0.88	
	eth		0.40 ^A $\pm$ 0.54		0.79 ^B $\pm$ 0.60		0.83 ^C $\pm$ 1.31	
Upper back	prop-1		1.90 ^D $\pm$ 0.69	0.020	2.08 $\pm$ 0.75	0.292	2.16 $\pm$ 0.97	0.596
	prop-2		1.38 $\pm$ 0.95		1.72 $\pm$ 0.92		1.87 $\pm$ 0.97	
	eth		1.09 ^D $\pm$ 1.02		1.69 $\pm$ 0.95		2.08 $\pm$ 0.80	
Abdomen	prop-1		2.25 $\pm$ 0.59	0.434	2.63 ^E $\pm$ 0.74	0.003	2.56 $\pm$ 0.77	0.182
	prop-2		2.16 $\pm$ 0.77		2.13 $\pm$ 1.07		2.14 $\pm$ 0.94	
	eth		1.94 $\pm$ 0.97		1.67 ^E $\pm$ 0.65		2.10 $\pm$ 0.86	
Lumbar area	prop-1		1.93 $\pm$ 0.60	0.754	1.81 $\pm$ 0.55	0.631	1.82 $\pm$ 0.78	0.595
	prop-2		1.79 $\pm$ 0.59		1.84 $\pm$ 0.57		1.97 $\pm$ 0.80	
	eth		1.87 $\pm$ 0.61		1.67 $\pm$ 0.60		1.72 $\pm$ 0.77	
Forehead	prop-1	70	1.73 ^F $\pm$ 0.92	0.024	1.90 ^{G/GG} $\pm$ 0.81	0.001	1.89 ^H $\pm$ 0.91	0.026
	prop-2		1.21 $\pm$ 0.65		1.26 ^{GG} $\pm$ 0.54		1.18 ^H $\pm$ 0.84	
	eth		0.98 ^F $\pm$ 0.71		1.08 ^G $\pm$ 0.64		1.23 $\pm$ 0.98	
Upper back	prop-1		1.81 $\pm$ 0.64	0.623	1.97 $\pm$ 1.36	0.806	2.53 ^{I/JJ} $\pm$ 0.91	0.002
	prop-2		1.69 $\pm$ 0.80		1.81 $\pm$ 0.99		1.67 ^{JJ} $\pm$ 0.83	
	eth		1.56 $\pm$ 1.00		1.74 $\pm$ 1.05		1.49 ^I $\pm$ 1.07	
Abdomen	prop-1		2.40 $\pm$ 0.64	0.245	2.69 $\pm$ 0.89	0.235	2.73 ^{K/KK} $\pm$ 0.81	0.002
	prop-2		2.43 $\pm$ 0.72		2.23 $\pm$ 0.95		1.69 ^{KK} $\pm$ 1.11	
	eth		2.07 $\pm$ 0.83		2.55 $\pm$ 0.77		2.02 ^K $\pm$ 0.80	
Lumbar area	prop-1		2.18 $\pm$ 0.51	0.364	2.10 $\pm$ 0.65	0.628	2.00 $\pm$ 0.86	0.731
	prop-2		2.12 $\pm$ 0.53		1.91 $\pm$ 0.60		1.90 $\pm$ 1.12	
	eth		1.94 $\pm$ 0.58		1.93 $\pm$ 0.74		1.76 $\pm$ 1.01	
Forehead	prop-1	89.5	1.82 $\pm$ 1.24	0.132	2.09 $\pm$ 1.33	0.403	2.38 ^L $\pm$ 1.17	0.002
	prop-2		1.44 $\pm$ 1.03		1.70 $\pm$ 0.93		1.88 $\pm$ 0.88	
	eth		1.17 $\pm$ 0.71		1.60 $\pm$ 0.94		1.34 ^L $\pm$ 0.52	
Upper back	prop-1		2.25 ^M $\pm$ 0.75	0.006	2.13 $\pm$ 0.53	0.445	2.59 $\pm$ 0.90	0.068
	prop-2		1.89 $\pm$ 0.91		2.00 $\pm$ 0.59		1.91 $\pm$ 1.07	
	eth		1.40 ^M $\pm$ 0.74		2.27 $\pm$ 0.85		2.02 $\pm$ 0.93	
Abdomen	prop-1		2.54 $\pm$ 0.71	0.888	2.53 $\pm$ 0.97	0.722	2.70 $\pm$ 0.97	0.070
	prop-2		2.43 $\pm$ 0.71		2.51 $\pm$ 0.85		2.29 $\pm$ 0.90	
	eth		2.50 $\pm$ 0.78		2.32 $\pm$ 0.98		1.99 $\pm$ 1.02	
Lumbar area	prop-1		2.14 $\pm$ 0.55	0.679	2.05 $\pm$ 0.69	0.793	2.36 $\pm$ 0.59	0.302
	prop-2		2.03 $\pm$ 0.52		2.15 $\pm$ 0.54		2.26 $\pm$ 0.61	
	eth		1.98 $\pm$ 0.68		2.01 $\pm$ 0.77		2.06 $\pm$ 0.65	

^a prop-1, *n*-propanol; prop-2, isopropanol; eth, ethanol.^b Different superscript uppercase characters (A to M) represent significant differences in post hoc analysis results between the different types of alcohol. Single and double superscript uppercase characters are used whenever a significant difference was found between two pairs of means. Each mean value represents data from 20 different subjects.TABLE 2. Ranking of parameters with influence on the reduction of skin flora on different skin sites (*n* = 180)

Skin site	Parameter ranking (highest influence to lowest influence)
Forehead.....	Type of alcohol (<i>P</i> < 0.001) > concn (<i>P</i> < 0.001) > application time (<i>P</i> = 0.006)
Upper back.....	Type of alcohol (<i>P</i> < 0.001) > application time (<i>P</i> < 0.001) > concn (<i>P</i> = 0.006)
Abdomen.....	Type of alcohol (<i>P</i> < 0.001) > concn (<i>P</i> = 0.024) > application time (n.s. ^a)
Lumbar area.....	Concn (<i>P</i> < 0.001) > type of alcohol (n.s.)/application time (n.s.)

^a n.s., not significant.

On the upper back, the antiseptic solutions supplemented with 0.5% and 2% CHG were significantly more effective than the *n*-propanol solution without CHG in suppressing the recolonization by the aerobic skin flora after 72 h (both *P* < 0.05).

No significant differences were observed among the three CHG-supplemented solutions at both skin sites (all paired analyses; *P* > 0.05 [Wilcoxon-Wilcox test]).

DISCUSSION

We have shown for the first time in vivo that the type of alcohol is the most important factor, followed by its concen-

TABLE 3. Mean log₁₀ reduction and suppression of recolonization of skin flora after 72 h of coverage (*n* = 20)

Skin site	Mean log ₁₀ baseline count (CFU/cm ²)	Application time	Immediate log ₁₀ reduction of <i>n</i> -propanol (89.5%)	Suppression of recolonization (expressed as log ₁₀ difference from baseline count after 72 h of sterile coverage) in <i>n</i> -propanol solution (89.5% [vol/vol]) supplemented with ^a :			
				No supplementation	0.5% CHG	1% CHG	2% CHG
Upper arms	2.36 ± 0.77	30 s	2.06 ± 0.59	0.41 ^{Δ/#!/**} ± 1.34	1.33 ^Δ ± 1.29	1.16* ± 1.23	1.24** ± 0.96
Upper back	2.94 ± 0.94	3 min	2.14 ± 0.85	0.28 ^{Δ/°} ± 1.46	1.07 ^Δ ± 1.81	1.42 ± 1.43	1.30 [°] ± 1.56

^a Different superscript characters represent significant differences of means for each skin site in post hoc analysis results.

tration and application time, in producing the best aerobic skin flora reduction.

In our study, *n*-propanol was the most effective alcohol in reducing the aerobic skin flora at all skin sites tested. To achieve the same reduction as *n*-propanol, ethanol or isopropanol must be applied at higher concentrations or for longer times or both. No systematic studies have compared the efficacy of these alcohols in skin antiseptics, although similar findings have been reported for hand hygiene (but a less systematic approach was taken in those studies) (13, 27, 31). Despite the evidence identifying *n*-propanol as the most effective alcohol, it was the only alcohol in our study that is not approved by the FDA as safe and effective (category I) for skin antiseptics (32).

We found that the skin site itself has an impact on the reduction of the skin flora by antiseptics. This is explicable by the range of densities of skin flora at different sites (4, 18, 20, 23) and probably the physiological condition of the treated skin area (15). For example, the mean baseline counts per square centimeter on the abdomen and the upper back were similar, but the log₁₀ reductions on the upper back were considerably lower.

The highest bacterial density was found on the forehead, where the log₁₀ reductions were lower than those at the other skin sites. This can be explained by the high density of sebaceous glands, which may create a protecting barrier (4, 8, 10, 18, 20, 21). Nevertheless, the greatest differences in the efficacy were observed at this site. Alcohol solutions that were effective on the forehead were also highly effective at the other skin sites. These results challenge the idea that testing antiseptics on the groin and abdomen, as recommended by the FDA and the ASTM E 1173-01 methods (3, 9), provides acceptable results for surgical procedures performed on the head, e.g., in neurosurgery.

In our study the lowest colony counts were found at the lumbar site. All treatments achieved an irreducible minimum density of the aerobic skin flora within 2 min. This area does not appear to be as critical as previously thought in Germany, where a standard application time for skin antiseptics is 10 min at the lumbar site, although there may be severe consequences if bacteria gain access to the cerebrospinal fluid during puncture (26, 28, 29).

The composition of the skin microflora and their sensitivity to antiseptic agents also depend on the skin site. Skin with many sebaceous glands is highly colonized by anaerobes, and skin with few sebaceous glands mainly harbors staphylococci and aerobic coryneforms (5, 18, 21). We did not distinguish between different floral species. Therefore, the composition of

the resident flora may also explain the variable levels of efficacy at different skin sites.

The findings with regard to the effects of CHG on the persistence of antimicrobial efficacy on human skin are supported by substantial evidence (6, 19). However, efficacy data for CHG must be assessed very carefully, because false positive results are possible when neutralization is insufficient (12). Combining CHG with alcohol is advantageous, because the slowness with which CHG takes effect is of little importance due to the immediate effect of the alcohol (8).

We found that CHG (0.5% or higher) in 89.5% *n*-propanol significantly slowed down the recolonization of the skin when it was covered for 72 h. The unsupplemented alcohol solution had only a marginal effect. This finding is supported by the results of other studies (11, 17); on the abdominal skin, 2% CHG in 70% isopropanol provided a significantly more persistent antimicrobial activity than did isopropanol alone (11). It has been shown effective in the prevention of colonization of peripheral venous catheters (1, 11, 30).

Although we found that 1% CHG in 89.5% *n*-propanol had the greatest effect on the upper back after 72 h, we found no statistically significant difference compared to the results obtained with unsupplemented alcohol. This is a surprising finding to us, and we can only explain it with the chosen statistical test, which was a pairwise comparison. But we do not doubt its biological relevance.

Our data indicate that 0.5% CHG was already effective in slowing down recolonization at two skin sites. Vallés et al. found no difference between 0.5% alcoholic CHG and 2% aqueous CHG in preventing catheter colonization (33). With alcohol used as a solvent, even a <0.5% concentration of CHG may be sufficient to slow down recolonization. Further studies are needed to clarify whether CHG concentrations lower than 2% in alcohol solutions provide equivalent results for the prevention of catheter-related bloodstream infections.

Conclusions. An 89.5% concentration of *n*-propanol was the most effective alcohol solution in reducing the aerobic skin flora. A combination with at least 0.5% CHG slowed down the recolonization of the skin flora. But further studies are needed to determine the most effective CHG-concentration in *n*-propanol for providing the best protection against recolonization of the skin, e.g., for catheter site care.

ACKNOWLEDGMENTS

The study was funded by Bode Chemie GmbH, Hamburg, Germany. Mirja Reichel and Günter Kampf are employees of Bode Chemie GmbH, Hamburg, Germany. The independent statistical analysis was carried out by Thomas Kohlmann. No compensation or funding was

received for conducting the statistical analyses. Thomas Kohlmann, who is independent of the commercial sponsor, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. Peter Heisig has no potential conflicts of interest, including specific financial interests and relationships and affiliations relevant to the subject matter or materials discussed in the manuscript.

REFERENCES

- Adams, D., M. Quayum, T. Worthington, P. Lambert, and T. Elliott. 2005. Evaluation of a 2% chlorhexidine gluconate in 70% isopropyl alcohol skin disinfectant. *J. Hosp. Infect.* **61**:287–290.
- Anonymous. 2002. ASTM E 1054-02. Standard test method for evaluation of inactivators of antimicrobial agents. ASTM, Villanova, PA.
- Anonymous. 2002. ASTM E 1173-01. Standard test method for evaluation of preoperative, precatheterization, or preinjection skin preparations. ASTM, Villanova, PA.
- Bibel, D. J., and D. J. Lovell. 1976. Skin flora maps: a tool in the study of cutaneous ecology. *J. Investig. Dermatol.* **67**:265–269.
- Bojar, R. A., and K. T. Holland. 2002. The human cutaneous microflora and factors controlling colonisation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **18**:889–903.
- Chaiyakunapruk, N., D. L. Veenstra, B. A. Lipsky, and S. Saint. 2002. Chlorhexidine compared with povidone-iodine solution for vascular catheter-site care: a meta-analysis. *Ann. Intern. Med.* **136**:792–801.
- Council of Europe. 2007. European Pharmacopoeia 6.0. Directorate for the Quality of Medicines & Health Care of the Council of Europe (EDQM), Strasbourg, France.
- Dzubow, L. M., A. C. Halpern, J. J. Leyden, D. Grossman, and K. J. McGinley. 1988. Comparison of preoperative skin preparations for the face. *J. Am. Acad. Dermatol.* **19**:737–741.
- Federal Register. 1994. Tentative final monograph for health care antiseptic products; proposed rule. *Fed. Regist.* **59**:31401–31452.
- Halpern, A. C., J. J. Leyden, L. M. Dzubow, and K. J. McGinley. 1988. The incidence of bacteremia in skin surgery of the head and neck. *J. Am. Acad. Dermatol.* **19**:112–116.
- Hibbard, J. S., G. K. Mulberry, and A. R. Brady. 2002. A clinical study comparing the skin antiseptics and safety of ChlorPrep, 70% isopropyl alcohol, and 2% aqueous chlorhexidine. *J. Infus. Nurs.* **25**:244–249.
- Kampf, G. 2009. Effect of chlorhexidine probably overestimated due to lack of neutralization after sampling. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **30**:77–79.
- Kampf, G., and A. Kramer. 2004. Epidemiologic background of hand hygiene and evaluation of the most important agents for scrubs and rubs. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**:863–893.
- Kampf, G., M. Shaffer, and C. Hunte. 2005. Insufficient neutralization in testing a chlorhexidin-containing ethanol-based hand rub can result in a false positive efficacy assessment. *BMC Infect. Dis.* **5**:48.
- Kearney, J. N., E. Ingham, W. J. Cunliffe, and K. T. Holland. 1984. Correlation between human skin bacteria and skin lipids. *Br. J. Dermatol.* **110**:593–599.
- Keswick, B. H., and D. Frank. 1987. Modified scrub technique for sampling infant skin microflora. *J. Clin. Microbiol.* **25**:2400–2401.
- Leyden, J. J., K. J. McGinley, A. N. Foglia, J. E. Wahrman, C. N. Gropper, and B. R. Vowels. 1996. A new method for in vivo evaluation of antimicrobial agents by translocation of complex dense populations of cutaneous bacteria. *Skin Pharmacol.* **9**:60–68.
- Leyden, J. J., K. J. McGinley, K. M. Nordstrom, and G. F. Webster. 1987. Skin microflora. *J. Investig. Dermatol.* **88**:658–72s.
- Maki, D. G., M. Ringer, and C. J. Alvarado. 1991. Prospective randomised trial of povidone-iodine, alcohol and chlorhexidine for prevention of infection associated with central venous and arterial catheters. *Lancet* **338**:339–343.
- Marples, M. J. 1969. Life on the human skin. *Sci. Am.* **220**:108–115.
- McGinley, K. J., G. F. Webster, and J. J. Leyden. 1978. Regional variations of cutaneous propionibacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**:62–66.
- Mimoz, O., S. Villeminey, S. Ragot, C. Dahyot-Fizelier, L. Laksiri, F. Petitpas, and B. Debaene. 2007. Chlorhexidine-based antiseptic solution vs alcohol-based povidone-iodine for central venous catheter care. *Arch. Intern. Med.* **167**:2066–2072.
- Nobel, W. C. 1975. Dispersal of skin microorganisms. *Br. J. Dermatol.* **93**:477–485.
- O'Grady, N. P., M. Alexander, E. P. Dellinger, J. L. Gerberding, S. O. Heard, D. G. Maki, H. Masur, R. D. McCormick, L. A. Mermel, M. L. Pearson, I. I. Raad, A. Randolph, and R. A. Weinstein. 2002. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **23**:759–769.
- Reichel, M., P. Heisig, and G. Kampf. 2008. Pitfalls in efficacy testing-how important is the validation of neutralization of chlorhexidine digluconate? *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **7**:20.
- Reihnsaus, E., H. Waldbaur, and W. Seeling. 2000. Spinal epidural abscess: a meta-analysis of 915 patients. *Neurosurg. Rev.* **23**:175–204.
- Rotter, M. L., R. A. Simpson, and W. Koller. 1998. Surgical hand disinfection with alcohols at various concentrations: parallel experiments using the new proposed European standards methods. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **19**:778–781.
- Sato, S., T. Sakuragi, and K. Dan. 1996. Human skin flora as a potential source of epidural abscess. *Anesthesiology* **85**:1276–1282.
- Sendi, P., T. Bregenzer, and W. Zimmerli. 2008. Spinal epidural abscess in clinical practice. *QJM* **101**:1–12.
- Small, H., D. Adams, A. L. Casey, C. T. Crosby, P. A. Lambert, and T. Elliott. 2008. Efficacy of adding 2% (w/v) chlorhexidine gluconate to 70% (v/v) isopropyl alcohol for skin disinfection prior to peripheral venous cannulation. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **29**:963–965.
- Suchomel, M., W. Koller, M. Kundi, and M. L. Rotter. 2009. Surgical hand rub: influence of duration of application on the immediate and 3-hours effects of n-propanol and isopropanol. *Am. J. Infect. Control* **37**:289–293.
- U.S. Pharmacopeial Convention. 2009. National formulary 2009, vol. USP 32-NF 27. U.S. Pharmacopeia, Rockville, MD.
- Vallés, J., I. Fernandez, D. Alcaraz, E. Chacon, A. Cazorla, M. Canals, D. Mariscal, D. Fontanals, and A. Moron. 2008. Prospective randomized trial of 3 antiseptic solutions for prevention of catheter colonization in an intensive care unit for adult patients. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **29**:847–853.

**Vergleich der Wirksamkeit von 89,5 %
1-Propanol bei kurzen
Anwendungszeiten mit dem
Referenzverfahren der DGHM-Methode
für die Hautantiseptik**

Reichel M, Heisig P, Kampf G

Hyg Med 2010, 35(3):64-69

Schlüsselwörter*Hautantiseptik**Hautflora**DGHM-Referenzverfahren**1-Propanol**2-Propanol**Nicht-Unterlegenheitsstudie***Keywords***Skin antiseptics**Skin flora**Reference method**1-propanol**2-propanol**Non-inferiority test***Mirja Reichel^{1,2*}, Peter Heisig², Günter Kampf^{1,3}**¹ BODE Chemie GmbH, Scientific Affairs, Hamburg, Deutschland² Institut für Pharmazie, Abteilung Pharmazeutische Biologie & Mikrobiologie, Universität Hamburg, Hamburg, Deutschland³ Institut für Hygiene & Umweltmedizin, Ernst-Moritz-Arndt Universität, Greifswald, Deutschland

Vergleich der Wirksamkeit von 89,5 % 1-Propanol bei kurzen Anwendungszeiten mit dem Referenzverfahren der DGHM-Methode für die Hautantiseptik

Comparison between the efficacy of 89.5 % 1-Propanol in shorter application times and the reference method of the DGHM for skin antiseptics

Zusammenfassung

Hintergrund: In Deutschland gelten Hautantiseptika als wirksam, wenn auf talgdrüsenreicher Haut die Reduktion der Hautflora nicht schlechter ist als die Reduktion durch das von der DGHM vorgegebene 10-minütige Referenzverfahren mit 70 %igem 2-Propanol. In einer früheren Studie konnten wir zeigen, dass 1-Propanol 89,5 % (V/V) wirksamer ist als der DGHM-Referenzalkohol [1]. Aus diesem Grund wurde in dieser in-vivo-Studie untersucht, ob mit dieser 1-Propanollösung bereits bei kürzeren Einwirkzeiten die Nicht-Unterlegenheit der Wirksamkeit gegenüber dem DGHM-Referenzverfahren nachgewiesen werden kann.

Methoden: Auf der Stirn, dem Abdomen, dem Nacken und im Lumbalbereich wurde die Sofortwirkung von 89,5 % 1-Propanol (V/V) bei Einwirkzeiten von 4, 3, 2 Minuten sowie 1 Minute im Vergleich zu dem DGHM-Referenzverfahren untersucht. Die Quantifizierung der Hautflora erfolgte in Anlehnung an die DGHM-Standardmethode. Die statistische Auswertung wurde auf Basis einer Nicht-Unterlegenheitsprüfung durchgeführt.

Ergebnisse: Bei einer Einwirkzeit von 3 Minuten war 89,5 % iger 1-Propanol auf allen vier Hautarealen dem DGHM-Referenzverfahren nicht unterlegen und z. T. sogar überlegen. Die niedrigsten $\log_{10}$ -Reduktionen wurden auf der Stirn gemessen, allerdings zeigte hier 89,5 % iger 1-Propanol sogar bei einer einminütigen Einwirkzeit Nicht-Unterlegenheit zu dem 10-minütigen Referenzverfahren

(Reduktionsfaktor; 1-Propanol: $1,24 \pm 0,77$; Referenzmethode: $1,51 \pm 0,91$). Auf dem Nacken war für den Nachweis der Nicht-Unterlegenheit eine Einwirkzeit von 3 Minuten erforderlich; auf dem Abdomen und im Lumbalbereich waren 2 Minuten ausreichend wirksam.

Schlussfolgerung: Eine dem DGHM-Referenzverfahren gleichwertige Reduktion der aeroben Hautflora wird auf allen vier Hautarealen mit 89,5 %igem 1-Propanol bereits bei einer Einwirkzeit von 3 Minuten erzielt. Für die Etablierung einer europäischen Standardmethode für Wirksamkeitsuntersuchungen für Hautantiseptika bietet 1-Propanol eine interessante Option für ein Referenzverfahren.

Hyg Med 2010; 35 [3]: 64–69

Summary

Background: In Germany skin antiseptics are considered to be effective on sebaceous-rich skin sites if an equal effectiveness is demonstrated compared to the reference method (RM) of the German Society for Hygiene and Microbiology (DGHM); 10 minutes application time; 70 % 2-propanol. In a previous study we were able to show that 89.5 % (V/V) 1-propanol is more effective than 70 % 2-propanol [1]. Therefore we investigated in vivo if the efficacy of 89.5 % 1-propanol is non-inferior compared to the RM in shorter application times.

Methods: The efficacy of 89.5 % 1-propanol at 4, 3, 2 minutes as well as 1 minute application time was determined at the forehead, the abdomen, the

Korrespondierende Autorin*Diplom-Pharmazeutin Mirja Reichel**

BODE Chemie GmbH

Scientific Affairs

Melanchthonstr. 27, 22525 Hamburg

E-Mail:

Mirja.Reichel@bode-chemie.de

upper back and the lumbar area compared to the RM. Quantification of the skin flora was carried out according to the standard test method of the DGHM. Statistical analysis was carried out by non-inferiority testing.

Results: 89.5 % 1-propanol showed non-inferiority to the RM at 3 minutes application time at all sites, and it was sometimes even superior. The lowest $\log_{10}$ -reductions were found at the forehead; at one minute application time 89.5 % 1-propanol showed non-inferiority [$\log_{10}$ -reduction; 1-propanol: 1.24 ± 0.77 ; RM: 1.51 ± 0.91]. At the upper back a minimum of 3 minutes application time was necessary to obtain non-inferiority; at the abdomen and the lumbar area 2 minutes were sufficient.

Conclusion: Compared to the RM, equal reduction of skin flora was obtained with 89.5 % 1-propanol at 3 minutes application time. For establishment of an European standard test method for skin antiseptics, 1-propanol represents an interesting option for the reference method.

Einleitung

Die Vermeidung nosokomialer Infektionen, wie z. B. postoperativer Wundinfektionen und katheterassoziierter Infektionen, ist von hoher Relevanz in der klinischen Praxis. Eine wichtige Infektionsquelle stellt dabei die endogene, residente Hautflora des Patienten dar. Die Reduktion der Hautflora durch die Anwendung von Hautantiseptika ist deshalb eine wichtige Maßnahme zur Infektionsprävention [2, 3]. Die Grundvoraussetzung für die Anwendung eines Präparates in der Praxis ist dabei ein zuvor erbrachter Wirksamkeitsnachweis bei definierten Einwirkzeiten.

Für die Wirksamkeit und somit auch für den Schutz des Patienten sind drei Faktoren von wichtiger Bedeutung. Neben der Art des Alkohols ist sowohl die Konzentration der alkoholischen Lösung als auch das Einhalten der notwendigen Einwirkzeit wichtig [1]. In Europa werden die Alkohole Ethanol, 2-Propanol und 1-Propanol in Präparaten für die Hautantiseptik eingesetzt. Eine europäische Norm, analog zu den Vorgaben für Wirksamkeitsprüfungen im Bereich der Händehygiene, existiert bislang für Hautantiseptika nicht. Die Wirksamkeit der in Deutschland eingesetzten Hautantiseptika wird nach einer von der DGHM etablierten Standardmethode im praxisnahen Versuch mit Probanden in vivo getestet [4]. Diese Methode dient zur Wirksamkeitsprüfung gegenüber der residenten Hautflora.

Im direkten Vergleich wird bei 20 Probanden die Wirksamkeit des Testpräparates mit der Wirksamkeit des vorgegebenen Referenzalkohols (2-Propanol in einer Konzentration von 70 % (V/V)) auf talgdrüsenreicher und auf talgdrüsenarmer Haut verglichen. Die Methode gibt vor, dass die Haut mit dem Referenzalkohol und dem Testprodukt auf talgdrüsenreicher Haut für einen Zeitraum von 10 Minuten zu benetzen ist. Daraus resultierte, dass für die talgdrüsenreichen Hautareale noch bis Ende des Jahres 2008 für alle auf dem deutschen Markt befindlichen Antiseptika eine Einwirkzeit von 10 Minuten aufgrund der Arzneimittelzulassungen zu berücksichtigen war. Die Arzneimittelzulassungen basierten auf der DGHM-Empfehlung; was dazu führte, dass die Mindesteinwirkzeit von 10 Minuten zunehmend von Wissenschaftlern kritisiert wurden [5]. Eine neuere Studie belegt allerdings, dass mit bestimmten Präparaten auch bei kürzeren Zeiten eine Wirksamkeit erzielt werden kann, die als gleichwertig zur Wirksamkeit des Referenzverfahrens anzusehen ist [6]. Eine Verkürzung der erforderlichen Einwirkzeit bei gleichbleibendem Schutz des Patienten bietet für die klinische Praxis erhebliche Vorteile und wird zu einer höheren klinischen Akzeptanz führen [7]. Der wichtigste Vorteil im klinischen Alltag ist die resultierende Zeitersparnis, die z. B. in Notfallsituationen von besonderer Bedeutung sein kann. Als weiterer wichtiger Faktor sind Kosteneinsparungen aufgrund verkürzter Einwirkzeiten zu nennen.

Aus den Ergebnissen der Dissertation, die der DGHM-Methode zugrunde gelegt wurden [8], lässt sich bereits eine unterschiedliche Wirksamkeit bzw. Reduktion der Hautflora je nach Art des Alkohols ableiten. Aus diesem Grund haben wir in einer ersten systematischen Studie zur Optimierung der Hautantiseptik die Wirksamkeit der drei Alkohole in drei unterschiedlichen Konzentrationen bei jeweils drei Einwirkzeiten ≤ 4 Minuten untersucht, um die bestwirksame Alkohollösung zu identifizieren [1]. Der Referenzalkohol der DGHM-Methode wurde ebenfalls in diese Studie mit eingeschlossen; jedoch zeigte eine 89,5 %ige 1-Propanollösung eine deutlich bessere Wirksamkeit.

Daraus resultierte die Frage, ob mit einer 89,5 %igen 1-Propanollösung eine dem Referenzverfahren gleichwertige

Reduktion bereits bei Einwirkzeiten von weniger als 10 Minuten erreicht werden kann. Aus diesem Grund haben wir geprüft, ob für die Wirksamkeit dieser antiseptischen Lösung bei Einwirkzeiten von 4, 3, 2 Minuten bzw. 1 Minute auf der Stirn, dem Abdomen, dem Nacken und dem Lumbalbereich im Vergleich zu der DGHM-Referenzmethode Nicht-Unterlegenheit nachgewiesen werden kann.

Material und Methoden

Alkoholische Lösungen

89,5 % 1-Propanol und 70 % 2-Propanol (V/V), hergestellt durch die Firma BODE Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland.

Probandenkollektiv

In beiden Studienteilen nahmen jeweils 20 freiwillige Probanden teil. Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie waren:

- Alter unter 18 Jahren,
- vorliegende Hauterkrankungen auf den zu testenden Hautarealen,
- antibiotische Therapie oder antiseptische Behandlung 7 Tage vor dem Versuch.

In beiden Teilen der Studie wurde auf ein ausgewogenes Geschlechterverhältnis Wert gelegt, um eine mögliche Beeinflussung des Ergebnisses aufgrund der unterschiedlichen Hautbesiedelung von Männern und Frauen auszuschließen [9]. Mindestens 9 Probanden und höchstens 11 Probanden des gleichen Geschlechts durften in einem Studienteil teilnehmen; in dieser Studie nahmen in beiden Teilen jeweils 11 Frauen und 9 Männer teil. Jeder Proband durfte insgesamt zweimal an dieser Studie teilnehmen, allerdings jeweils nur einmal pro Studienteil, so dass jeder Mittelwert auf den Ergebnissen von 20 unterschiedlichen Probanden basiert.

Studiendesign

Es handelt sich um eine prospektive, randomisierte, monozentrische Studie. Die Studie wurde von einer Ethikkommission genehmigt (Freiburger Ethik-Kommission GmbH International, Freiburg, Studiennummer 07/2064). Vor jedem Versuch wurde von den Probanden eine unterschriebene Einverständniserklärung eingeholt.

Probennahme

Die Sofortwirkung von 89,5 %igem 1-Propanol wurde in einem ersten Studienteil nach Einwirkzeiten von 4 und 3 Minuten sowie in einem zweiten Studienteil nach 2 Minuten sowie 1 Minute mit der Sofortwirkung von 70 %igem 2-Propanol (V/V) nach einer Einwirkzeit von 10 Minuten auf der Stirn, dem Abdomen, dem Nacken und im Lumbalbereich an jeweils 20 Probanden verglichen. Auf jedem dieser vier Hautareale wurden vier 5 cm² große Testfelder markiert (auf der Stirn nebeneinander; auf allen anderen Hautarealen in rechteckiger Anordnung). Es erfolgte eine randomisierte Zuordnung zu den unterschiedlichen Behandlungen bzw. der Entnahme des Vorwerts, um einen systematischen Fehler durch eine festgelegte Lokalisation der Testfelder auszuschließen [9]. Bei den Untersuchungen auf der Stirn wurden die Haare gegebenenfalls mit Klammern aus dem Gesicht ferngehalten. Auf eine Beprobung nach einem Zeitraum von 30 Minuten, wie in der DGHM-Methode vorgesehen, wurde verzichtet, da in anderen Studien bereits gezeigt werden konnte, dass nach so kurzer Zeit keine signifikanten Unterschiede zu den Ergebnissen der Sofortwirkung feststellbar sind. Diese Werte führen in der Regel zu dem gleichen Gesamtergebnis [6, 10].

Die unterschiedlichen alkoholischen Lösungen wurden mit einem Rayon-Tupfer (BBL CultureSwab ohne Medium, Becton and Dickinson, Darmstadt, Deutschland) nach einem standardisierten Verfahren aufgetragen. Durch eine standardisierte Benetzung der Testfelder mindestens einmal pro Minute war sichergestellt, dass die Haut über die gesamte Einwirkzeit vollständig benetzt war.

Sowohl die Vorwertentnahme als auch die Hautkeimgewinnung erfolgte folgendermaßen: Vor jeder Probennahme wurden die Testfelder mit einer sterilisierten Metallschablone und Stempelfarbe markiert, um die Beprobungsflächen zu begrenzen. Das jeweilige 5 cm² große Testfeld wurde mit einem zuvor in Bouillon angefeuchteten Tupfer mit 30 Tupferabstrichen unter möglichst gleichmäßigem Anpressdruck innerhalb von etwa 10–12 Sekunden abgerieben. Anschließend wurde die Tupferspitze in ein steriles Probengefäß mit 5 ml CSL [4] gebrochen und für 30 Sekunden gevortext. Die Bouillon war supplementiert mit einem

Neutralisationsgemisch bestehend aus 3 % Polysorbat 80, 0,3 % Lecithin, 0,1 % L-Histidin, und 0,1 % L-Cystein [4]. Bis zur Ausplattierung erfolgte eine Lagerung der Proben bei 2 bis 8 °C für maximal 3 Stunden [11, 12]. Unmittelbar vor dem Anlegen einer Verdünnungsreihe wurde jede Probe erneut für 5 Sekunden gevortext. Jeweils 0,5 ml der Probe sowie Aliquote entsprechender Verdünnungen wurden jeweils in einer Doppelbestimmung auf Casein-Pepton-Sojapepton-Agar (CASO-Agar, Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland) ausplattiert.

Nach der Inkubation der Agarplatten (aerob; 48 Stunden bei 37 ± 2 °C) erfolgte die Quantifizierung der koloniebildenden Einheiten (KBE) auf jeder Platte. Für die Bestimmung der Vorwerte wurden alle Platten mit einer Dichte von 15 bis 300 KBE in die Bewertung mit eingeschlossen. Für die Bestimmung der Nachwerte wurden zusätzlich auch alle Ergebnisse <15 KBE in die Bewertung mit eingeschlossen, um falsch-positive Wirksamkeitsergebnisse auszuschließen.

Bestimmung der Wirksamkeit

Es erfolgte die Logarithmierung der mittleren KBE-Werte pro mL Probenflüssigkeit. Das Ergebnis von 1 ml Probenflüssigkeit entsprach somit der Hautfloradichte pro cm² Hautoberfläche. Die Wirksamkeit der einzelnen Verfahren wurde auf jedem Hautareal bestimmt, indem für jeden Probanden der log₁₀-Reduktionsfaktor (RF) aus der Differenz des mittleren log₁₀-Nachwerts und des mittleren log₁₀-Vorwerts ermittelt wurde.

Statistische Auswertung

Die Datensätze aller Desinfektionsverfahren wurden zunächst für jedes Hautareal anhand des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung geprüft. Das Hauptziel der Untersuchung war die Feststellung der Nicht-Unterlegenheit der Prüfverfahren im Vergleich zum Referenzverfahren pro Hautareal und Einwirkzeit. Dazu wurde ein einseitiges 97,5 % Konfidenzintervall nach der Methode von Fieller errechnet [13]. Der Fehler 1. Grades wurde auf 0,025 festgesetzt, die Nicht-Unterlegenheitsgrenze bei 0,7. Wenn der Mittelwert des Prüfverfahrens höher war als der des Referenzverfahrens [14], wurde mit einem zweiseitigen t-Test untersucht, ob das Prüfverfahren signifikant besser wirksam war als das Referenzver-

fahren. Das Signifikanzniveau wurde für die einseitige Betrachtung auf $p < 0,05$ festgelegt.

Ergebnisse

Die mittleren Vorwerte und Reduktionsfaktoren beider Studienteile sowie deren korrespondierenden Standardabweichungen sind in den Tabellen 1 und 2 für alle Hautareale und Einwirkzeiten dargestellt. Bei allen Datensätzen konnte eine Normalverteilung nachgewiesen werden.

Auf der Stirn konnte Nicht-Unterlegenheit für die antiseptische Behandlung mit 89,5 % 1-Propanol gegenüber dem Referenzverfahren bei allen vier Zeiten nachgewiesen werden. Bei einer Einwirkzeit von 2 Minuten war diese antiseptische Lösung in der Wirksamkeit dem 10-minütigen Referenzverfahren sogar überlegen (2 Minuten Einwirkzeit: $p = 0,018$; t-Test). Bei einer Einwirkzeit von 1 Minute waren die Reduktionsfaktoren auf diesem Areal für beide Verfahren sehr niedrig; vor allem der RF des neuen Verfahrens lag hier um rund eine log₁₀-Stufe unterhalb des RF-Wertes der 2-minütigen Einwirkzeit.

Auf dem Abdomen war für die 1-Propanollösung eine Mindesteinwirkzeit von 2 Minuten erforderlich, um eine dem Referenzverfahren gleichwertige Wirksamkeit zu erreichen; bei einer Einwirkzeit von 1 Minute war keine gleichwertige Wirksamkeit nachweisbar. Ab einer Einwirkzeit von 4 Minuten zeigte sich sogar eine Überlegenheit dieses antiseptischen Verfahrens gegenüber dem Referenzverfahren ($p = 0,038$; t-Test).

Auf dem Nacken war unterhalb von 3 Minuten Einwirkzeit für die 1-propanolische Lösung keine Nicht-Unterlegenheit nachzuweisen. Dafür zeigte sich allerdings, dass ab einer 3-minütigen Einwirkzeit das optimierte Verfahren dem Referenzverfahren sogar überlegen war (3 Minuten Einwirkzeit: $p = 0,021$; 2 Minuten Einwirkzeit: $p = 0,027$).

Im Lumbalbereich unterschieden sich die Reduktionsfaktoren ab einer Einwirkzeit von 3 Minuten nur wenig von dem RF des Referenzverfahrens. Auf diesem Areal war die antiseptische Behandlung mit der 1-Propanollösung ab einer Einwirkzeit von 2 Minuten gleichwertig zu dem Referenzverfahren.

Diskussion

Tabelle 1: Vergleich von 1-Propanol 89,5 % bei 4 und 3 Minuten Einwirkzeit mit dem DGHM-Referenzverfahren (70 % 2-Propanol; 10 Minuten Einwirkzeit); (n=20).

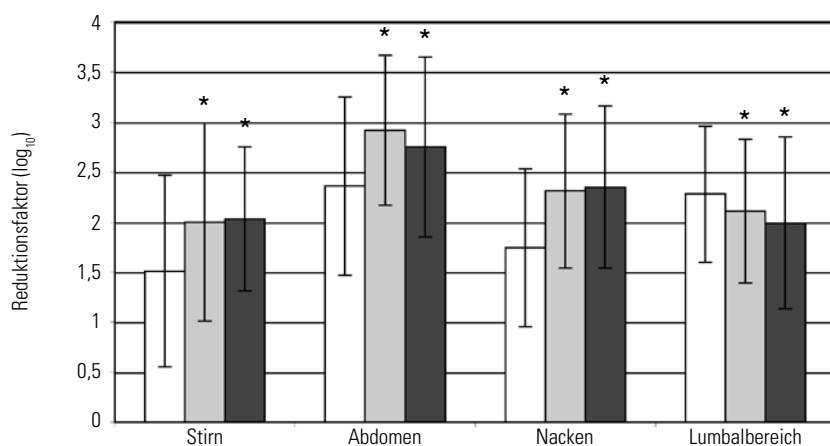
Hautareal	Vorwert (log ₁₀ KBE/cm ²)	Mittelwert RF (log ₁₀) ± SD		
		4 min	3 min	10 min (Ref.)
Stirn	3,75 ± 1,05	2,00 ± 0,99*	2,03 ± 0,72*	1,51 ± 0,96
Abdomen	3,17 ± 0,80	2,92 ± 0,75*/**	2,75 ± 0,90*	2,36 ± 0,89
Nacken	2,86 ± 0,96	2,31 ± 0,77*/**	2,35 ± 0,81*/**	1,74 ± 0,79
Lumbalbereich	2,35 ± 0,75	2,11 ± 0,72*	1,99 ± 0,86*	2,28 ± 0,68

* Nicht-Unterlegenheit (89,5 % 1-Propanol) gegenüber dem Referenzverfahren (Ref.); ** Überlegenheit ($p < 0,05$; t-Test)

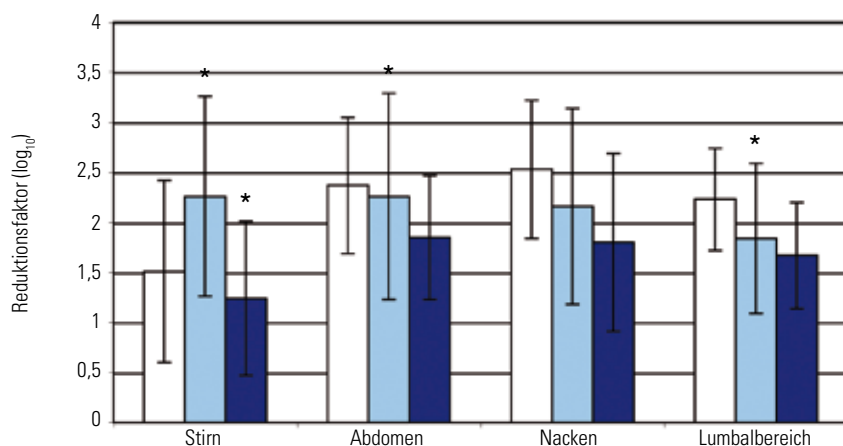
Tabelle 2: Vergleich von 1-Propanol 89,5 % bei 2 und 1 Minute Einwirkzeit mit dem DGHM-Referenzverfahren (70 % 2-Propanol; 10 Minuten Einwirkzeit); (n=20).

Hautareal	Vorwert (log ₁₀ KBE/cm ²)	Mittelwert RF (log ₁₀) ± SD		
		2 min	1 min	10 min (Ref.)
Stirn	3,75 ± 1,04	2,26 ± 1,00*/**	1,24 ± 0,77*	1,51 ± 0,91
Abdomen	3,12 ± 0,78	2,26 ± 1,03*	1,85 ± 0,62	2,37 ± 0,68
Nacken	3,10 ± 0,92	2,16 ± 0,98	1,80 ± 0,89	2,53 ± 0,69
Lumbalbereich	2,42 ± 0,61	1,84 ± 0,75*	1,67 ± 0,53	2,23 ± 0,51

* Nicht-Unterlegenheit (89,5 % 1-Propanol) gegenüber dem Referenzverfahren (Ref.); ** Überlegenheit ($p < 0,05$; t-Test)

Abbildung 1: Vergleich der mittleren log₁₀-Reduktion von 1-Propanol 89,5 % bei 4 und 3 min Einwirkzeit mit dem DGHM-Referenzverfahren; (n=20). Weiß: 70 % 2-Propanol; Einwirkzeit 10 min (Referenzverfahren) / Hellgrau: 89,5 % 1-Propanol; Einwirkzeit 4 min / Dunkelgrau: 89,5 % 1-Propanol; Einwirkzeit 3 min.

* Nicht-Unterlegenheit (89,5 % 1-Propanol) gegenüber dem Referenzverfahren

Abbildung 2: Vergleich der mittleren log₁₀-Reduktion von 1-Propanol 89,5 % bei 2 und 1 min Einwirkzeit mit dem DGHM-Referenzverfahren; (n=20). Weiß: 70 % 2-Propanol; Einwirkzeit 10 min (Referenzverfahren) / Hellblau: 89,5 % 1-Propanol; Einwirkzeit 2 min / Dunkelblau: 89,5 % 1-Propanol; Einwirkzeit 1 min.

* Nicht-Unterlegenheit (89,5 % 1-Propanol) gegenüber dem Referenzverfahren

In dieser Studie konnten wir zeigen, dass mit einer 89,5 %igen 1-Propanollösung bereits bei wesentlich kürzeren Einwirkzeiten eine zum DGHM-Referenzverfahren mindestens gleichwertige Reduktion der Hautflora zu erreichen ist. Eine Einwirkzeit von mindestens 3 Minuten war dabei auf allen vier Hautarealen ausreichend; auf der Stirn, dem Abdomen und im Lumbalbereich konnte sogar bei noch kürzeren Einwirkzeiten die Nicht-Unterlegenheit belegt werden.

Bis Ende 2008 wurde für die Hautantiseptik in Deutschland auf talgdrüsenreicher Haut eine Einwirkzeit von mindestens 10 Minuten für alle auf dem Markt befindlichen Hautantiseptika aufgrund von Ergebnissen mit Probanden von der DGHM empfohlen. Die Mindesteinwirkzeit von 10 Minuten war aufgrund der Arzneimittelzulassungen, die auf der DGHM-Empfehlung basierten, bei allen Präparaten vorgegeben. Diese wurde bereits in den Jahren zuvor zunehmend von Wissenschaftlern kritisiert [5]. Erst seit Beginn des Jahres 2009 sind Hautantiseptika mit wesentlich kürzeren Einwirkzeiten unter 10 Minuten in die VAH-Liste mit aufgenommen worden [15], da in einer Studie z. B. gezeigt werden konnte, dass eine 85 %ige ethanolische Lösung (m/m) eine dem Referenzverfahren gleichwertige Reduktion in 2,5 Minuten erreichen kann [6].

In der vorliegenden Studie unterschied sich, je nach Hautareal, die Einwirkzeit, die für den Nachweis der Nicht-

Unterlegenheit notwendig war. Eine mögliche Erklärung dafür könnte zum einen die unterschiedliche Hautfloradichte auf diesen Arealen sein [16–19]; zum anderen spielen die unterschiedlichen physiologischen Bedingungen auf den Arealen eine Rolle [20]. Die höchste Bakteriendichte fanden wir zwar auf der Stirn, die Reduktion der Bakteriendichte war hier jedoch am geringsten.

Für den Test auf talgdrüsenreicher Haut schreibt die DGHM-Methode die Stirn als Testareal vor [4]. Zum einem, da die talgdrüsenreiche Haut in Deutschland als kritisches Areal in Bezug auf die antiseptische Wirksamkeit angesehen wird und zum anderen, da sich dieses Areal aufgrund der guten Zugänglichkeit besonders gut beproben lässt. Die in Deutschland vorgenommene Einteilung in talgdrüsenarme und talgdrüsenreiche Hautareale ist nicht ganz unproblematisch, da eine scharfe Grenze zwischen diesen Gebieten nicht zu definieren ist und es in der klinischen Praxis deshalb nicht immer eindeutig ist, welche Einwirkzeit einzuhalten ist. Besonders deutlich wird das auch an der Abbildung des menschlichen Körpers in der VAH-Liste [21], in der die talgdrüsenreichen Areale dunkel hervorgehoben sind, bei denen jedoch auch keine scharfe Abgrenzung zu den umliegenden Hautbereichen zu erkennen ist.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Stirn durchaus ein geeignetes Testareal für Hautantiseptika darstellt, da alle alkoholischen Lösungen, die auf diesem Areal wirksam waren, auf allen anderen gewählten Hautarealen ebenfalls eine sehr gute Wirksamkeit zeigten. Des Weiteren zeigten sich hier die deutlichsten Unterschiede zwischen den verschiedenen alkoholischen Lösungen, was eine Differenzierung in gut wirksame und weniger gut wirksame Antiseptika ermöglicht [1].

Die optimierte Alkohollösung bestehend aus 1-Propanol in einer Konzentration von 89,5 % zeigte sich im Vergleich zu dem Referenzverfahren vor allem auch auf der Stirn als besonders gut wirksam. Sogar bei der kürzesten Einwirkzeit von nur 1 Minute konnte die Nicht-Unterlegenheit zu dem Referenzverfahren gezeigt werden. Allerdings ist anhand der Reduktionsfaktoren auf diesem Areal ein deutlicher Wirksamkeitsanstieg zwischen 1 und 2 Minuten Einwirkzeit zu erkennen, so dass der Nachweis der Nicht-

Unterlegenheit auch mit der ohnehin schon vergleichsweise geringen Wirksamkeit des Referenzverfahrens im Zusammenhang stehen kann. Immerhin konnte bei unseren Probanden mit dem 10-minütigen Referenzverfahren nur eine Reduktion um rund 1,5 $\log_{10}$ -Stufen erzielt werden. Da 89,5 % 1-Propanol dem Referenzverfahren bei einer Einwirkzeit von 2 Minuten sogar überlegen war, zeigte sich dieses Verfahren als besonders geeignet für eine Reduktion der Hautflora.

Anstelle der Oberarme, die in der DGHM-Methode für den Test auf talgdrüsenarmer Haut vorgesehen sind [4], wählten wir in dieser Studie das Abdomen, den Nacken und den Lumbalbereich. Das Abdomen stellt aus klinischer Sicht ein relevantes Hautareal dar. Auf dem Rücken fehlten bislang Untersuchungen, ob je nach Lokalisation auf diesem Areal Unterschiede bezüglich der Wirksamkeit nachzuweisen sind. Der Lumbalbereich zählt nach wie vor zu den talgdrüsenreichen Arealen und gilt damit in Deutschland als besonders kritisch für die Hautantiseptik. Dieses konnte allerdings durch unsere Ergebnisse nicht bestätigt werden, da auf diesem Areal die Hautfloradichte besonders niedrig war und auch bei sehr kurzen Zeiten eine sehr gute Wirksamkeit nachzuweisen war. Allerdings ist zu beachten, dass durch die rechteckige Anordnung der Testfelder in der unmittelbaren Nähe auf beiden Seiten der Wirbelsäule hier gemäß der Abbildung in der VAH-Liste [21] der Übergangsbereich zwischen talgdrüsenarmer und talgdrüsenreicher Haut beprobt wurde. Aufgrund der sehr guten Wirksamkeit auf der talgdrüsenreichen Stirn ist dies jedoch zu vernachlässigen, da hier ebenfalls von einer guten Wirksamkeit auszugehen ist.

Bei den Ergebnissen dieser Studie ist zu beachten, dass sich der Reduktionsfaktor für das Referenzverfahren auf dem Nacken, anders als auf den anderen Arealen, zwischen beiden Studienteilen um etwa 0,8 $\log_{10}$ -Stufen unterschied. Dies könnte im paarweisen Vergleich dazu geführt haben, dass trotz ähnlicher Werte bei 2 und bei 3 Minuten Einwirkzeit die Nicht-Unterlegenheit für 2 Minuten nicht gezeigt werden konnte.

Im Lumbalbereich wird für die meisten handelsüblichen Antiseptika basierend auf der Zulassung als Arzneimittel immer noch eine Einwirkzeit von mindestens 10 Minuten verlangt. In der

klinischen Praxis stellt diese lange Zeitspanne z. B. in Notfallsituationen ggf. ein Problem dar. Der Nachweis, dass auch bei kürzeren Einwirkzeiten, bei gleicher Sicherheit für den Patienten, eine ausreichende antiseptische Wirksamkeit erzielt werden kann, stellt eine erhebliche Verbesserung im klinischen Alltag dar. In dieser Studie war auf diesem Areal eine Einwirkzeit von 2 Minuten ausreichend, um eine dem Referenzverfahren nicht unterlegene Wirksamkeit nachzuweisen. Insgesamt zeigten beide Verfahren auf diesem Areal eine ähnlich gute Wirksamkeit. Im Gegensatz zu allen anderen Hautarealen konnte keine Überlegenheit der 1-Propanollösung zu dem Referenzverfahren gezeigt werden. Dies kann zum einen durch die sehr niedrigen Ausgangskeimzahlen bedingt sein und zum anderen durch die Tatsache, dass nach der antiseptischen Behandlung generell nur noch sehr wenige Keime auf diesem Areal nachweisbar waren. Eine mögliche Erklärung ist demnach, dass auf diesem Areal sehr schnell ein nicht weiter zu reduzierendes Minimum der Hautflora erreicht wird.

Zur Klärung der Frage, ob wässrig-alkoholische Lösungen, die sich in ihrer Zusammensetzung von dem Hautantiseptik-Referenzalkohol der DGHM unterscheiden, zu einer gleichwertigen Reduktion der aeroben Hautflora führen, sind systematische Untersuchungen bei unterschiedlichen Einwirkzeiten notwendig. In einer früheren Studie mit 180 Probanden konnten wir zeigen, dass die Art des Alkohols für die Hautantiseptik die wichtigste Einflussgröße ist. Dabei war 2-Propanol schlechter wirksam als 1-Propanol und eine Alkoholkonzentration von 70 % führte zu einer geringeren Reduktion als 89,5 % [1].

Für die chirurgische Händedesinfektion gemäß der europäischen Norm EN 12791 [22] wird 60 %iger 1-Propanol als Referenzalkohol verwendet. Rotter et al. zeigten 1998, dass 1-Propanol gegenüber der residenten Händeflora wirksamer war als 2-Propanol. Erst in einer 90 %igen Konzentration zeigte 2-Propanol eine gleichwertige Wirksamkeit im Vergleich zu 60 %igem 1-Propanol [23]. Die bessere Wirksamkeit von 1-Propanol gegenüber der residenten Händeflora wurde durch Untersuchungen von Suchomel et al. bestätigt, in denen 60 % 1-Propanol mit 70 % 2-Propanol verglichen wurde [24].

Auf Basis der Ergebnisse dieser Studie ist davon auszugehen, dass der weniger wirksame 70 %ige 2-Propanol durch eine erheblich längere Einwirkzeit ebenfalls eine bessere Wirksamkeit erzielen kann.

Der statistische Vergleich der Wirkung der Anwendungen von 1-Propanol im Vergleich zum jetzigen Referenzverfahren erfolgte auf Nicht-Unterlegenheit. Dieses Verfahren ist bisher in der DGHM-Methode zur Bestimmung der Wirksamkeit zur Hautdesinfektion nicht vorgesehen, hat aber bereits Eingang gefunden in die europäischen Methoden zur Bestimmung der Wirksamkeit zur hygienischen Händedesinfektion (EN 1500) und chirurgischen Händedesinfektion (EN 12791). Der bisher in der Methode beschriebene Vorzeichen-Rangtest für Paardifferenzen nach Wilcoxon ist geeignet, die Überlegenheit eines Desinfektionsverfahrens im Vergleich zum Referenzverfahren nachzuweisen. Da jedoch mit dem Versuch gezeigt werden soll, dass ein Verfahren zur Hautdesinfektion dem Referenzverfahren mindestens gleichwertig (also nicht unterlegen) ist, sollte die Prüfung auf Nicht-Unterlegenheit erfolgen. Der Vorzeichen-Rangtest für Paardifferenzen nach Wilcoxon ist hierfür jedoch ungeeignet. Für die Prüfung auf Nicht-Unterlegenheit muss eine Nicht-Unterlegenheitsgrenze δ festgelegt werden, nach der bei ihrer Einhaltung das Prüfverfahren als mindestens gleichwertig zum Referenzverfahren angesehen werden kann. Wir haben uns entschieden, diese für die vorliegenden Versuche bei 0,7 festzulegen, d. h. dass eine mittlere Abweichung der $\log_{10}$ -Reduktion von bis zu 0,7 noch als gleichwertig zum Referenzverfahren betrachtet wird. Der vorliegende Entwurf der EN 1500 weist beispielsweise eine Nicht-Unterlegenheitsgrenze von 0,6 auf, die für die chirurgische Händedesinfektion (EN 12791) aller Voraussicht nach bei 0,75 liegen wird (Suchomel 2010; persönliche Mitteilung). In jedem Fall sollte geprüft werden, ob die Daten Normalverteilung aufweisen, da bei Nichtvorliegen der Normalverteilung ein nicht-parametrischer Test (z. B. nach Hodges und Lehmann) verwendet werden sollte.

Schlussfolgerungen

Das Fazit dieser Studie ist, dass die gewählte 89,5 %ige 1-Propanollösung in deutlich kürzeren Einwirkzeiten eine dem 10-minütigen Referenzverfahren gleichwertige Reduktion der aeroben, residenten Hautflora auf der Stirn, dem Abdomen, dem Nacken und im Lumbalbereich erzielt. Eine Einwirkzeit von 3 Minuten führte dabei, im Vergleich zu dem Referenzverfahren, zu einer mindestens äquivalenten bzw. zum Teil sogar signifikant höheren Reduktion der Hautflora. Für die Etablierung einer europäischen Standardmethode für Wirksamkeitsuntersuchungen für Hautantiseptika bietet 1-Propanol eine interessante Option für ein Referenzverfahren.

Danksagung

Die Studie wurden von der Firma BODE Chemie GmbH gesponsert. Wir danken allen freiwilligen Probanden, die an diesen Studien teilgenommen haben und der Universität Hamburg (Department Chemie) für die Möglichkeit die entsprechenden Räumlichkeiten benutzen zu dürfen.

Interessenkonflikt

Die Autoren Prof. Dr. Günter Kampf und Mirja Reichel sind Angestellte der BODE Chemie GmbH, Hamburg.

Literatur

1. Reichel M, Heisig P, Kohlmann T, Kampf G. Alcohols for skin antiseptics at clinically relevant skin sites. *Antimicrob Agents Chemother* 2009 Nov;53(11):4778–82.
2. Anonymous. Prävention postoperativer Infektionen im Operationsgebiet. *Bundesgesundheitsbl* 2007;50(3):377–93.
3. Anonymous. Prävention Gefäßkatheter-assoziiierter Infektionen. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz* 2002;45:907–24.
4. Gebel J, Werner H-P, Kirsch-Altena A, Bansemir K. Standardmethoden der DGHM zur Prüfung chemischer Desinfektionsverfahren. Wiesbaden: mhp-Verlag; 2002.
5. Kappstein I. Hautdesinfektion: 10 Minuten auf talgdrüsenreicher Haut? *Krankenhaushygiene up-date* 2006;1(1):4.
6. Kampf G, Pitten F-A, Heeg P, Christiansen B. Efficacy of two ethanol-based skin antiseptics on the forehead at shorter application times. *BMC Infect Dis* 2007;7:85.
7. Popp W, Hansen D. Compliance in medicine - educational for hygiene? *Hyg Med* 2005;30:228–33.
8. Christiansen B: Vorschlag einer Testmethodik zur Prüfung und Bewertung von Präparaten zur Hautdesinfektion. In *Abteilung Hygiene, Sozialhygiene und Gesundheitswesen*. Kiel, Christian-Albrechts-Universität; 1987.
9. Reichel M, Heisig P, Kampf G. Bakteriendichte auf klinisch relevanten Hautarealen (Abstract). *Hyg Med* 2008;33(1):50.
10. Gundermann K-O. New methods for determining pre-operative and postoperative skin disinfection. *J Hosp Infect* 1985;6 (Supplement):51–7.
11. Reichel M, Heisig P, Kampf G. Pitfalls in efficacy testing-how important is the validation of neutralization of chlorhexidine digluconate? *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2008;7:20.
12. Keswick BH, Frank D. Modified scrub technique for sampling infant skin microflora. *J Clin Microbiol* 1987;25(12):2400–1.
13. Locke CS. An exact confidence interval from untransformed data for the ratio of two formulation means. *J Pharmacokinet Biopharm* 1984;12:649–55.
14. Committee for proprietary medicinal products (CPMP) The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA). Points to consider on switching between superiority and non-inferiority. 2000 July 27.;CPMP/EWP/482/99.
15. Desinfektionsmittelkommission im VAH, editor. Online-Desinfektionsmittelliste des VAH. Wiesbaden: mhp-Verlag; 2009.
16. Bibel DJ, Lovell DJ. Skin flora maps: a tool in the study of cutaneous ecology. *J Invest Dermatol* 1976;67:265–9.
17. Marples MJ. Life on the human skin. *Sci Am* 1969 Jan;220(1):108–15.
18. Nobel WC. Dispersal of skin microorganisms. *British Journal of Dermatology*. [Review]. 1975;93:477–85.
19. Leyden JJ, McGinley KJ, Nordstrom KM, Webster GF. Skin microflora. *J Invest Dermatol* 1987;88(3 Suppl):65s–72s.
20. Kearney JN, Ingham E, Cunliffe WJ, Holland KT. Correlation between human skin bacteria and skin lipids. *Br J Dermatol* 1984;110(5):593–9.
21. Desinfektionsmittelkommission im VAH. Desinfektionsmittelliste des VAH. Wiesbaden: mhp-Verlag; 2008.
22. EN 12791:2005. Chemical disinfectants and antiseptics. Surgical hand disinfection. Test method and requirement (phase 2, step 2). Brussels: CEN - Comité Européen de Normalisation; 2005.
23. Rotter ML, Simpson RA, Koller W. Surgical hand disinfection with alcohols at various concentrations: parallel experiments using the new proposed European standards methods. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1998;19(10):778–81.
24. Suchomel M, Koller W, Kundi M, Rotter ML. Surgical hand rub: Influence of duration of application on the immediate and 3-hours effects of n-propanol and isopropanol. *Am J Infect Control* 2009; [Epub ahead of print].

Skin bacteria after chlorhexidine exposure – Is there a difference in response to human β -Defensin-3?

Reichel M, Heisig A, Heisig P, Kampf G

**Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010 Jun;
29(6):623-32. Epub 2010 Mar 27**

**Originalveröffentlichung erschienen auf
www.springerlink.com**

Skin bacteria after chlorhexidine exposure—is there a difference in response to human β -Defensin-3?

M. Reichel · A. Heisig · P. Heisig · G. Kampf

Received: 8 December 2009 / Accepted: 27 February 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract We investigated whether exposure to sub-lethal concentrations of chlorhexidine digluconate (CHG) changed the response of five *Staphylococcus* spp. to human β -Defensin-3 (hBD-3). The change in response for each strain was determined in vitro with time–kill experiments in suspension by comparing the mean $\log_{10}$ reduction caused by hBD-3 at 1.5 and 3 h in exposed and non-exposed bacteria. The identity of staphylococcal species was verified by DNA sequence homology in the *gyrA* genes in comparison with reference strains. Baseline sub-lethal concentrations allowing visible bacterial growth were between 0.0625 and 0.25 $\mu\text{g/ml}$. Sub-lethal CHG concentrations increased within 3 days in two isolates. For *S. capitis* 19/2, CHG-exposed cells were less susceptible to 0.5 $\mu\text{g/ml}$ hBD-3 ($\log_{10}$ reduction 0.78 versus 2.06 at 1.5 h; $p < 0.001$; t -test). For *S. aureus*, however, CHG-exposed cells were more susceptible to 1 $\mu\text{g/ml}$ hBD-3. The observed changes between CHG-exposed and non-exposed cells did not indicate a general trend in response

to hBD-3. Overall, we found no consistent evidence that 3 days of exposure to CHG changed the response of five *Staphylococcus* spp. to hBD-3. The use of CHG for skin antisepsis is, based on our data, unlikely to change the natural defence activity of hBD-3.

Background

One of the main functions of the skin is to protect the host from microbial infections; however, the skin itself is a potential source of endogenous infections. The skin has established different physiological mechanisms to prevent infections, which can be caused by resident and transient skin microorganisms. Firstly, it acts as a physical barrier. In addition, the skin shows a diversity of immune-relevant processes to control the microbial ecology present on human skin.

One important mechanism for controlling colonisation of the skin is the secretion of constitutively or inducibly expressed antimicrobial peptides (AMPs), which are part of the innate immune system. These peptides are effective against pathogenic microorganisms and some of them, e.g. defensins, are multifunctional signalling molecules that trigger adaptive immune responses [1].

Human β -Defensin-3 (hBD-3), a cationic, broad-spectrum AMP of the defensin family, is one of the AMPs with multiple biological functions [2, 3]. In contrast to human β -Defensin-1 and -2, hBD-3 shows potent antimicrobial activity against Gram-positive bacteria. These include *Staphylococcus aureus* [4, 5], which is one of the most common causes of nosocomial infections, such as catheter-related bloodstream infections [6, 7], but also multidrug-resistant (MDR) nosocomial pathogens, e.g. methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and vancomycin-

M. Reichel (✉) · G. Kampf
BODE Chemie GmbH, Scientific Affairs,
Melanchthonstr. 27,
22525 Hamburg, Germany
e-mail: mirja.reichel@bode-chemie.de

M. Reichel · A. Heisig · P. Heisig
Department of Pharmaceutical Biology and Microbiology,
Institute of Pharmacy, University of Hamburg,
Bundesstr. 45,
20146 Hamburg, Germany

G. Kampf
Institute for Hygiene and Environmental Medicine,
Ernst-Moritz-Arndt University,
Walther-Rathenau-Str. 49a,
17487 Greifswald, Germany

resistant enterococci [4, 8]. The hBD-3 peptide is inducibly expressed by keratinocytes of the human skin [9]. Various stimuli which influence hBD-3 expression have been identified, e.g. the upregulation of hBD-3 expression is associated with inflammatory skin diseases like psoriasis. An enhanced amount of hBD-3 has been found after contact of the skin with bacteria [3, 4, 10]. In addition, current research findings have shown that sterile wounding of the skin may also result in increased hBD-3 expression [11].

Maisetta et al. investigated synergisms in antimicrobial activity between hBD-3 and other antibiotics against oral bacteria. They showed that a combination of chlorhexidine with hBD-3 had a beneficial antibacterial effect [12].

Chlorhexidine digluconate (CHG) is used in skin antisepsis during the placement of central venous catheters (CVCs). This is in accordance with recommendations of the Centers for Disease Control (CDC) to use alcohol or a 2% chlorhexidine-based preparation for this procedure [7]. In a previous study, we were able to show that CHG in propan-1-ol slows down recolonisation of the skin for at least 72 h [13]. We, therefore, assumed that CHG persists on the skin for at least 3 days after application when the skin is covered with an adhesive dressing after evaporation of the alcohol.

CVCs may remain in place for an average of 6–28 days and dressings are changed several times during this period [14]. Normally, the skin around the catheter site is treated with a CHG-containing antiseptic repeatedly every time the catheter dressing is changed. Thus, the skin bacteria at the catheter site are permanently exposed to CHG and the physical skin barrier, which is essential for protection of the bloodstream against microorganisms, is permanently disrupted for a long period of time. The results of Sørensen et al. showed that the concentration of hBD-3 increases within 4 days after sterile wounding [11]; therefore, we assumed that the bacteria are first exposed to CHG for at least 3 days before the hBD-3 concentration on skin increases.

It has been reported that different bacterial species are able to adapt to sub-lethal concentrations of CHG [15–20] and that this adaptation affects the susceptibility to different biocides [21] and antibiotics in *Pseudomonas stutzeri* [16, 21, 22]. Moore et al. showed that different skin bacteria were able to adapt to CHG after repeated exposure [23].

To the best of our knowledge, there are no studies on whether CHG exposure changes the response of Gram-positive bacteria to antimicrobial peptides, such as hBD-3.

The aims of this study were to analyse, using in vitro time–kill studies, whether exposure to CHG at sub-lethal concentrations for 3 days influences the response of different *Staphylococcus* spp. to hBD-3, and if this treatment reduces the potency of the natural defence.

Methods

Collection and growth of the bacterial strains

Six different isolates of skin bacteria were taken from different skin sites of two healthy, male volunteers (volunteer numbers 16 and 19). From volunteer 16, we obtained two isolates from the upper back after the application of 89.5% (v/v) propan-1-ol and one skin isolate from the abdomen. In addition, two isolates were taken from the forehead of volunteer 19 after the application of 70% (v/v) propan-2-ol or 89.5% (v/v) propan-1-ol and one isolate was collected from the abdomen. The skin bacteria were collected using a swab method which has previously been described [13]. The skin bacteria were grown aerobically on casein-peptone soymeal-peptone (CASO) agar at 37°C for 48 h; thereafter, six single colonies were isolated, plated separately on CASO agar and aerobically incubated at 37°C for 24 h. For susceptibility testing, isolate 19/3, 16/2 and 16/3 were excluded from the study due to clonal identity (see later); the chosen isolates are listed in Table 1. The bacteria were stored at –74°C using the CRYOBANK system (Mast Diagnostica Laboratoriumspräparate GmbH, Reinfeld, Germany).

Identification and characterisation of skin isolates

All isolates were Gram-positive; they were characterised by macroscopic and microscopic analyses. They were plated on CASO agar, sheep blood agar and selective agar plates (kanamycin and Mannitol salt). The presence of clumping factor, protein A and capsular polysaccharide was analysed with the Staphytect Plus™ test (Oxoid Deutschland GmbH, Wesel, Germany). For genotypic characterisation of the clonal relationship of the skin isolates, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis using the criteria of Tenover et al. [24] was used (data not shown).

Bacterial species

The following staphylococcal type strains were used to amplify the respective intragenic *gyrA* fragments for sequence-based identification of skin isolates: *S. aureus* ATCC 6538, *S. warneri* ATCC 27836, *S. warneri* ATCC 155, *S. capitis* subsp. *capitis* ATCC 27841, *S. epidermidis* ATCC 14990.

Primers

Based on a multiple DNA sequence alignment of *gyrA* genes from different staphylococcal species, regions of high homology were chosen for the design of a primer pair to be used for polymerase chain reaction (PCR) amplification and

Table 1 Characterisation of pre-selected isolates

Isolate	Species	Obtained from (after application of)	Growth on Mannitol salt agar/fermentation of Mannitol	Growth on kanamycin agar	Haemolysis on blood agar	Staphylect Plus™ test	MIC CHG (µg/ml)	MIC OXA (µg/ml)
19/1	<i>S. capitis</i>	Abdomen of a volunteer	+/+	Inhibited growth/no change in the colour of the agar	–	–	1	0.125
19/2	<i>S. capitis</i>	Forehead of a volunteer (propan-1-ol 89.5% [v/v])	+/+	Inhibited growth/no change in the colour of the agar	–	–	0.5	0.0625
16/1	<i>S. warneri</i>	Abdomen	+/+	–	–	+	1	0.125
ATCC 12228	<i>S. epidermidis</i>	DSMZ Braunschweig, Germany	+/-	–	–	–	1	0.125
ATCC 6538	<i>S. aureus</i>	DSMZ Braunschweig, Germany	+/+	Strongly inhibited growth/no change in the colour of the agar	+	+	2	<0.03 (low growth)
ATCC 29213	<i>S. aureus</i>	DSMZ Braunschweig, Germany	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2	0.25

n.d. = not determined; MIC CHG = minimum inhibitory concentration of chlorhexidine digluconate, MIC OXA = minimum inhibitory concentration of oxacillin

for cycle sequencing of the quinolone resistance-determining region (QRDR). The primer pair includes 5'-primer *gyrA* [A70V]_5'_:+73_Sau 5'-TATGCGATG(A/T)(G/C)(A/C/T) GTTAT(A/C/T)GT-3' (corresponding to nts. 73 to 82) and 3'-primer *gyrA* [A640R]_3'_+661_Sau 5'-CCGTTGG(A/G) AA(A/G)TC(A/T)GG(A/C/T)CC-3' (complementary to nts. 661 to 680), giving rise to a 608-bp intragenic PCR fragment. For cycle sequencing reactions, primer *gyrA*-A70V was used.

PCR conditions

Template DNA was isolated from three to five individual colonies of a type strain of the respective staphylococcal species and from skin isolates of volunteers using the QIAGEN Tissue Purification Kit® according to the manufacturer's protocol. Using 2.5 µl of template DNA in a total volume of 50 µl, respective intragenic fragments of the *gyrA* gene were amplified using the following reaction conditions: 1.25 mM MgCl₂, 30 (40) pMol of each primer of *gyrA* 50 µmol dNTPs, 2.5 U Taq DNA polymerase (NE Biolabs, Germany) in reaction buffer supplied by the manufacturer. After an initial denaturation at 94°C for 5 min, primer annealing followed for 45 s at 50°C, DNA synthesis at 72°C for 1 min and denaturation at 94°C for 30 s over 35 cycles. PCR fragments were purified using the Macherey–Nagel NucleoSpin® Extract II kit according to the manufacturer's protocol. Samples were eluted with 50 µl of a 1:10 diluted EB-Puffer® (QIAGEN, Hilden, Germany). Between 40 and 80 ng of purified PCR product were used for the subsequent cycle sequencing reactions, which were run for 30 cycles (denaturation at 96°C for 20 s, annealing at 50°C for 5 s and polymerisation at 60°C for 4 min, in a total volume of 20 µl using 10 pMol of the respective 5'-primer, Quick Start Kit (Beckman Coulter Krefeld, Germany), according to the manufacturer's instructions.

After completing the cycle sequencing reactions, DNA fragments were precipitated by adding 5 µl of precipitation solution (2 µl 3 M sodium acetate solution pH 5.2, 2 µl 100 mM EDTA pH 8.0 and 1 µl Glycogen) and mixed with 60 µl of absolute ethanol. Precipitated DNA was collected by subsequent centrifugation (15 min, 15,000 rpm, room temperature) and washed with ethanol (70%). Samples were air-dried and resuspended in 30 µl SLS® (Beckman–Coulter, Krefeld, Germany) and immediately cooled to 4°C before applying the DNA samples to the capillary electrophoresis column. To assign an isolate to a staphylococcal species, the DNA sequence determined for the respective *gyrA* gene fragment was aligned to a database of staphylococcal reference strains yielding homologies equal to or higher than 90%, whereas homologies below 90% were found for *gyrA* gene fragments from different species.

To assign skin isolate 16/1 to a bacterial species without doubt, an API ID 32 Staph test (bioMérieux Deutschland

GmbH, Nürtingen, Germany) was carried out for biochemical identification.

Determination of oxacillin and chlorhexidine susceptibility

The minimum inhibitory concentration (MIC) determinations were carried out by microdilution [25]. The tests were carried out with the skin isolates *S. aureus* ATCC6538 and *S. epidermidis* ATCC12228. *S. aureus* ATCC29213 was used as the control strain and oxacillin (InfectoStaph, Infectopharm) was used as the reference antibiotic. The oxacillin-containing Mueller–Hinton broth (DIFCO, Augsburg, Germany) was supplemented with 3% NaCl.

Preparation of test bacteria and time–kill analyses with hBD-3

All tubes and plates were incubated aerobically at 37°C. The following procedure was carried out separately for each isolate.

Day 0 The second passage of each test strain was generated by incubation on CASO agar for 24 h.

Day 1 Preparation of the test suspension: a small number of single colonies taken from CASO agar were suspended in physiological saline to adjust the suspension to 10^6 to 10^7 bacteria (optical density of 0.125–0.175 at 550 nm; measured with Eppendorf ECOM 6122 [Eppendorf AG, Hamburg, Germany]).

A quantity of 9.9 ml of tryptic soy broth (TSB) without any additional substances (control without CHG exposure) as well as 9.9 ml TSB containing different concentrations of CHG were inoculated with 100 µl of bacterial suspension. Both were incubated for 24 h.

Days 2 and 3 After overnight incubation, each tube was shaken and screened for visible growth. A quantity of 100 µl of the control sample was added to 9.9 ml of TSB without any additional substances (second and third passage of control in broth). From the CHG-containing samples, the sample with the highest CHG concentration and visible growth was chosen. For the inoculation of 9.9 ml TSB containing CHG (as described above), 100 µl of the suspension was taken for each sample. The control and the CHG dilution series were again incubated for 24 h.

Day 4 A quantity of 100 µl of the control sample and the sample with the highest CHG concentration with visible growth were plated homogeneously on CASO agar containing 0.1% L-histidine, 0.3% lecithin and 3% polysorbate 80, and incubated for 24 h.

Day 5 The lyophilised recombinant hBD-3 (RELIATech, Braunschweig, Germany) was solubilised and diluted in aqua bidest (pH 6.5–6.8), as recommended by the manufacturer of the peptide, to obtain a 10 µl solution containing the defined concentration of hBD-3 (Table 2). To ensure identical conditions for each test, the reconstituted hBD-3 was stored in cooled metal blocks until the test was performed. The tests were carried out within several minutes after preparing the diluted peptide solutions. Before the tests started, preliminary tests were carried out to find suitable hBD-3 concentrations for each isolate, to enable us to carry out time–kill studies at 1.5 and 3 h. For each strain, two specific hBD-3 concentrations were chosen, and it was predefined that the high concentration must contain four-fold more hBD-3 than the low concentration.

Colonies on each CASO agar plate were rinsed off with 10 ml of phosphate buffer (10 mM), the suspensions were transferred into sterile glass cylinders with glass pearls and homogenised by mixing for at least 10 min. Each suspension was diluted with phosphate buffer (10 mM) to an optical density of 0.125–0.175 as described above. A dilution series was plated in duplicate to determine the baseline bacterial density.

All tests were carried out with the CHG-exposed and non-exposed bacteria. Tests in solution were carried out in triplicate as follows:

- 100 µl of the 1:10 dilution of the adjusted suspension of bacteria was added to each of the batch so that a total volume of 1 ml was obtained in all cases.
- Control test: 900 µl phosphate buffer
- Susceptibility test with low hBD-3-concentration: 10 µl low concentration of hBD-3 solution in 890 µl phosphate buffer (10 mM)
- Susceptibility test with high hBD-3-concentration: 10 µl high concentration of hBD-3 solution in 890 µl phosphate buffer (10 mM)

After the exposure times of 1.5 and 3 h, dilution series were prepared with TSB supplemented with 3% polysorbate 80, 0.3% lecithin, 0.1% L-histidine and 0.1% L-cysteine; 100-µl aliquots were plated in duplicate on CASO agar containing 0.1% L-histidine, 0.3% lecithin and 3% polysorbate 80, and incubated for 48–72 h. The number of colony-forming units (CFUs) were counted after incubation and transferred into $\log_{10}$ values.

Statistical analysis

All computer-based statistical calculations were performed with SPSS 13.0 or 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Table 2 Comparison of log₁₀ reduction of five *Staphylococcus* spp. by human β -Defensin-3 (hBD-3) with and without previous chlorhexidine digluconate (CHG) exposure for 3 days

Isolate	Turbidity after 24h with CHG in broth (μg/ml)			Concentration of hBD-3 (μg/ml)	Exposure time to hBD-3 = 1.5h			Exposure time to hBD-3 = 3h		
	Day 1	Day 2	Day 3		CHG-exposed RF±SD	Non-CHG-exposed RF±SD	p-value	CHG-exposed RF±SD	Non-CHG-exposed RF±SD	p-value
<i>S. capitis</i> 19/1	0.25	0.25	0.25	0.5	2.48 ± 0.36	2.53 ± 0.30	0.88	3.29 ± 0.23	3.01 ± 0.26	0.24
<i>S. capitis</i> 19/2	0.0625	0.125	0.25	0.125	4.02 ± 0.06	3.74 ± 0.32	0.28	5.13 ± 0.58	5.13 ± 0	0.99
					0.12 ± 0.03	0.20 ± 0.02	0.01	0.23 ± 0.03	0.24 ± 0.06	0.93
<i>S. warneri</i> 16/1	0.25	0.5	1	0.5	0.78 ± 0.04	2.06 ± 0.11	<0.001	1.16 ± 0.09	2.58 ± 0.20	<0.001
					1.06 ± 0.51	1.22 ± 0.11	0.62	1.16 ± 0.40	2.20 ± 0.34	0.03
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	0.25	0.25	0.25	0.125	1.83 ± 0.27	2.38 ± 0.28	0.07	3.63 ± 0.63	3.89 ± 1.18	0.75
					0.30 ± 0.11	-0.01 ± 0.11	0.03	0.25 ± 0.08	-0.26 ± 0.28	0.04
<i>S. aureus</i> ATCC6538	1 (low turbidity)	0.5	0.5	0.25	1.73 ± 0.16	1.49 ± 0.04	0.06	1.90 ± 0.34	1.36 ± 0.04	0.05
					0.26 ± 0.26	0.15 ± 0.04	0.50	0.60 ± 0.14	0.28 ± 0.20	0.09
				1	1.65 ± 0.37	1.32 ± 0.15	0.22	3.18 ± 0.46	1.87 ± 0.35	0.02

RF = log₁₀ reduction

All plates with CFU between 15 and 300 were evaluated. The results were evaluated as arithmetic means of the log₁₀ values of each duplicate analysis. When the results of two different dilution steps were within the defined CFU range, the weighted means were calculated.

The log₁₀ reduction for both exposure times was calculated by subtracting the means of the triplicate analyses of the log₁₀ CFU count for hBD-3-treated samples from the mean log₁₀ CFU count of the phosphate buffer control. The change in response to hBD-3 was determined by comparing the mean log₁₀ reduction at 1.5 h as well as 3 h in exposed and non-exposed (control) bacteria.

A *t*-test was carried out to determine the differences between the log₁₀ reduction of the CHG-exposed and non-exposed samples after 1.5 and 3 h for both test concentrations of hBD-3.

Results

Characterisation of isolates and strains

Two of the isolates obtained from the forehead of volunteer 19 (19/2 and 19/3) and all three isolates from two different body sites of volunteer 16 (16/1 to 16/3) showed identical PFGE patterns (data not shown), although they were obtained from different body sites and, respectively, from different test areas of the forehead.

The chosen isolates varied in their ability to obtain agglutination with the Staphytest Plus™ test (Oxoid Deutschland GmbH, Wesel, Germany). Only isolate 16/1 showed a positive agglutination reaction. All skin isolates grew on Mannitol salt agar and fermented Mannitol. None of the skin isolates showed haemolysis on blood agar. All skin isolates were susceptible to oxacillin (MIC < 8 μ g/ml). The MICs for chlorhexidine were comparable for all tested strains (MIC 0.5–2 μ g/ml).

The comparison of the resulting DNA sequences with those determined for the staphylococcal reference strains revealed that isolates 19/1 and 19/2 should be assigned to *S. capitis* subsp. *capitis* (homology > 98%). The DNA sequencing results of an internal 284-bp PCR fragment of the *gyrA* gene obtained from isolate 16/1 revealed sequence homologies of 87, 88, 90 and 89% compared to the reference strains of *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. warneri* and *S. capitis* subsp. *capitis*, respectively. The API ID 32 Staph test (bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen, Germany) confirmed the *gyrA* gene sequence-based identification of isolate 16/1 as *S. warneri* with %id = 99.9% and *t* = 0.95; no biochemical results were found to be against the assignment to this species.

CHG exposure followed by hBD-3 time–kill test

The concentrations of the CHG exposition as well as the results for the hBD-3 time–kill tests are presented in Table 2.

A two-fold decrease in CHG susceptibility was detected for two isolates (19/2 and 16/1) after 3 days exposure to CHG. No change in susceptibility was detected for 19/1 and *S. epidermidis* ATCC 12228. However, we found only low turbidity after the first incubation of *S. aureus* ATCC 6538 with 1 µg/ml CHG and an increasing susceptibility in the second passage.

The results for the hBD-3 time–kill testing were inconsistent (Table 2). In 13 out of 20 experiments, we found no statistically significant difference in response to hBD-3 with and without previous CHG exposure. In four cases, hBD-3 killed significantly fewer bacteria which had been previously exposed to CHG, whereas in one of these, the difference was less than 0.1 log scale. We found a significant decrease in hBD-3 susceptibility for both exposure times only for *S. capitis* 19/2 and after 3 h of exposure to hBD-3 for *S. warneri* 16/1. In three cases, more CHG-exposed bacteria were killed by hBD-3 compared to non-exposed bacteria, although in one case, the difference was less than 0.4 log scales (Fig. 1).

Discussion

We found no clear evidence that exposure to sub-lethal concentrations of CHG for 3 days influenced the response of *Staphylococcus* spp. to hBD-3. Our results show variable changes in time–kill studies for different strains. In strains that showed a decrease in CHG susceptibility within the 3-day exposure period (*S. capitis* 19/2 and *S. warneri* 16/1), we found a significant decrease in response to hBD-3. This may indicate a link between CHG adaptation and a decrease in response to hBD-3. Further investigation is needed to verify this hypothesis.

Exposure to CHG has been reported to result in adaptation, e.g. in skin bacteria [23], and, thus, changes susceptibility to different antibiotics and biocides [15–22]. Therefore, an influence of previous exposure to CHG on susceptibility to hBD-3 is possible due to the structural properties of both substances and their comparable mode of action. A negatively charged cell surface is essential for the affinity of both cationic antimicrobials to Gram-positive bacteria, to allow electrostatic interactions between the molecules and the cell surface [3, 26]. For hBD-3 as well as CHG and other cationic antibiotics, changes in susceptibility on the basis of alteration of the *dlt* operon and, therefore, the cell surface charge by D-alanylation of teichoic acids is described in the literature [27–29]. For example, *dltD*-

deficient mutants of *Lactobacillus casei* were more susceptible to CHG [29]. Peschel et al. demonstrated for *S. aureus* and *S. xylosus* that inactivation of the *dlt* operon resulted in enhanced susceptibility to defensins (human defensins HNP1-3) [28]. It is also described that Gram-positive bacteria are able to sense the existence of sub-inhibitory concentrations of antimicrobial peptides like hBD-3 to control different resistance mechanisms. Li et al. showed that exposure to sub-inhibitory concentrations of hBD-3 resulted in a significant upregulation of the expression of the *dlt* operon and a subsequent increase in D-alanylation of teichoic acids in *S. epidermidis* [30]. A comparable mechanism with a change in the bacterial surface charge to resist human β -defensins is also discussed for Gram-negative bacteria [31]. Therefore, a correlation between the mechanism of bacteria to circumvent the natural host defence of the skin caused by AMPs and the mechanism for resistance to cationic antimicrobials, e.g. CHG, is likely.

Another mechanism which may also play a role in resistance to hBD-3 as well as CHG is the expression of MDR efflux pumps. Huet et al. demonstrated that, in *S. aureus*, single as well as multiple-step exposure to biocides, which were comparable to CHG, resulted in an increase in the MIC for CHG and multiple other biocides, mostly due to an upregulation of the gene expression of different MDR efflux pumps like *mepA* and *norA* [32]. These results showed that single exposure to biocides may result in a change in cell regulatory mechanisms and, therefore, a change in susceptibility. The role of an MDR efflux-related increase in MIC and skin disinfection with CHG is also discussed by DeMarco et al. [33]. Efflux mechanisms are also relevant for decreasing susceptibility, for example of *Treponema denticola*, to hBD-3 [34], although current research findings suggest that MDR efflux pumps do not play an important role in hBD-3 resistance [35].

With regard to our results, we found considerable differences in response to different concentrations of hBD-3 between the tested strains. Therefore, we assume that susceptibility is not only species-specific but also strain-specific. For *S. capitis* 19/2 and *S. epidermidis* ATCC12228, the difference in response to hBD-3 of CHG-exposed and non-exposed bacteria at a concentration of 0.125 µg/ml at 1.5 h was statistically significant, but the log₁₀ differences of the RF values were less than 0.35 log scales. Therefore, the biological relevance of these differences remains debatable.

On the basis of our results, we could not find any evidence that residual CHG has a negative influence on the host immune defence, e.g. when it is used for catheter site care. Therefore, a concluding evaluation regarding the clinical relevance of these findings is not yet possible. On the one hand, further discussion may be needed if studies verify that CHG-adapted bacteria show a reduced response

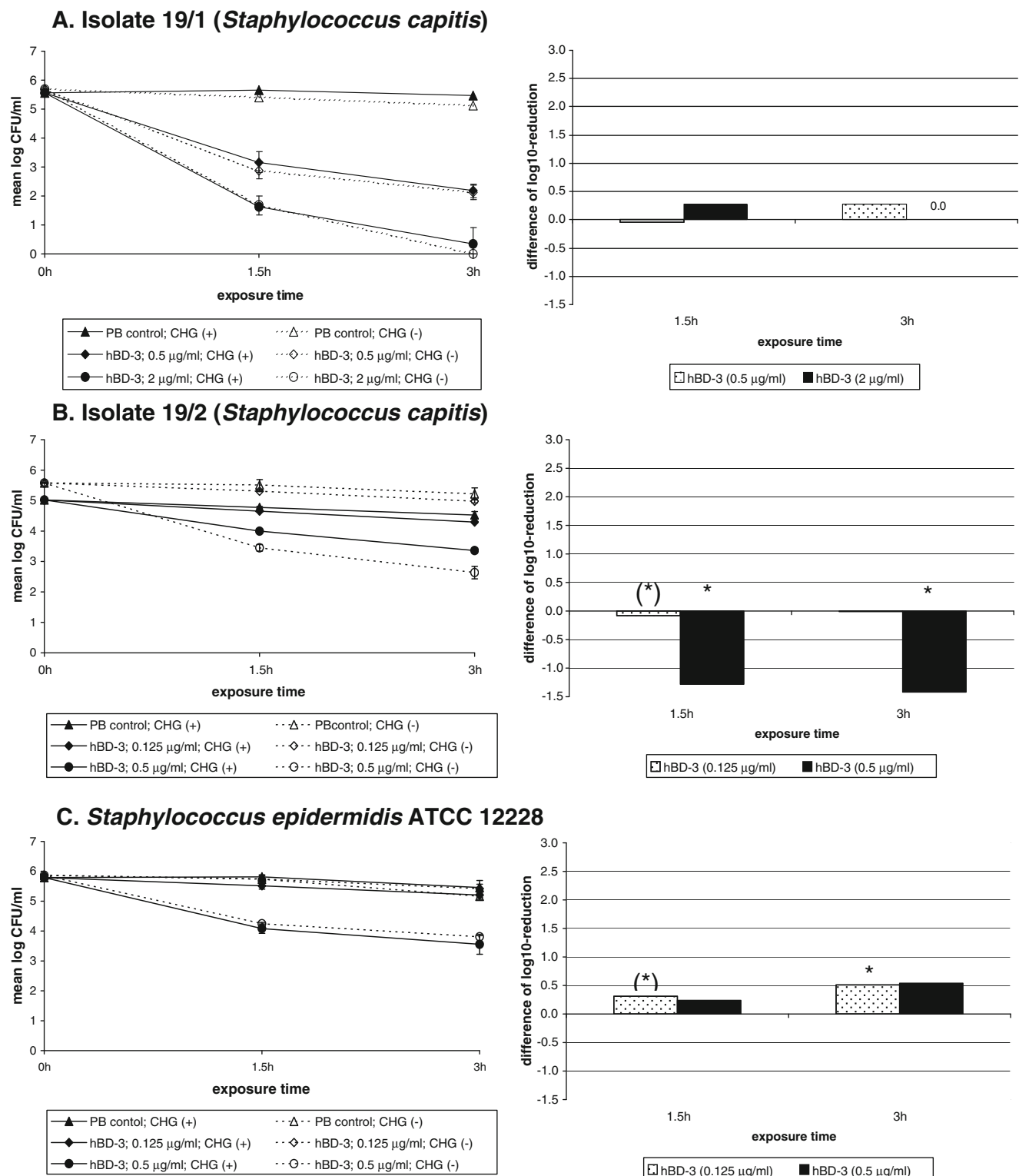
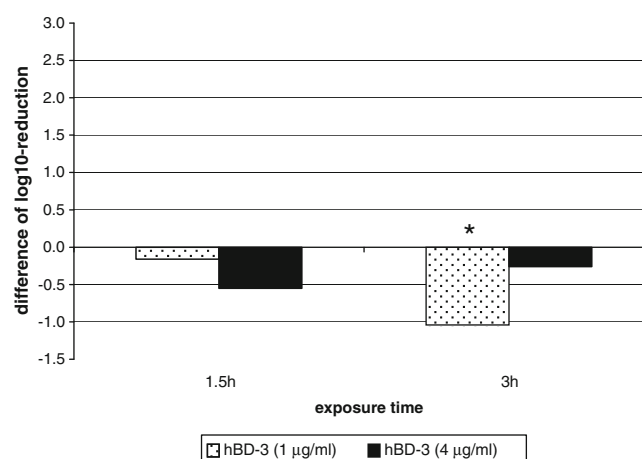
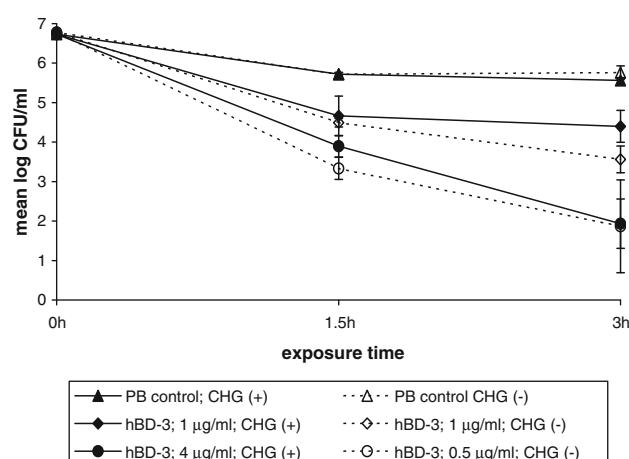
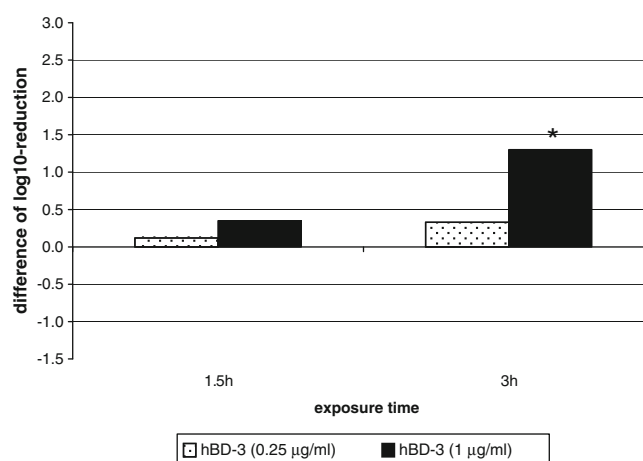
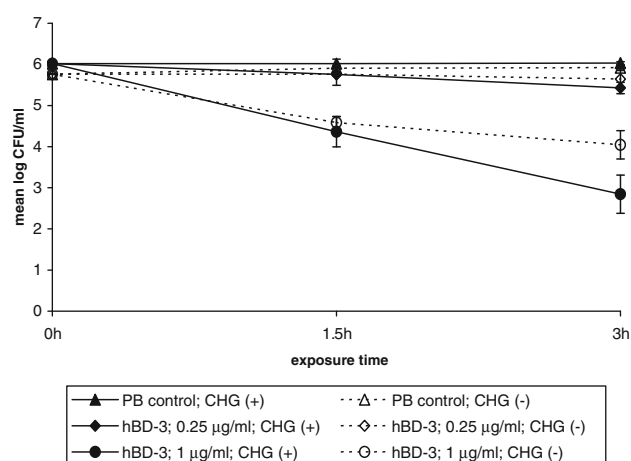


Fig. 1a–e Reduction of colony-forming unit (CFU) counts of five staphylococcal strains by human β -Defensin-3 (hBD-3) previously exposed (*closed symbols*) or not exposed (*open symbols*) for 3 days to sub-lethal concentrations of chlorhexidine digluconate (CHG). **a** Isolate 19/1 (*Staphylococcus capitis*). **b** Isolate 19/2 (*S. capitis*). **c** *S. epidermidis* ATCC 12228. **d** Isolate 16/1 (*S. warneri*). **e** *S. aureus* ATCC 6538. *Left side*: mean log CFU/ml after 1.5 and 3 h exposure to

different hBD-3 concentrations with and without previous exposure of bacteria to sub-lethal concentrations of CHG; PB=phosphate buffer; CHG (+)=CHG-exposed; CHG (-)=non-CHG-exposed. *Right side*: difference in log₁₀ reduction of CHG-exposed and non-exposed bacteria after 1.5 and 3 h exposure to hBD-3; * = significant difference; (*)=significant difference but log₁₀ difference < 0.4

D. Isolate 16/1 (*Staphylococcus warneri*)**E. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538****Fig. 1** (continued)

to hBD-3; however, it should be kept in mind that the tested CHG concentrations were much lower than the concentrations used in clinical practice. On the other hand, a beneficial effect of CHG has been shown in the prevention of catheter-related bloodstream infections, and a synergism with hBD-3 has been demonstrated. If a significant influence of CHG exposure on hBD-3 susceptibility cannot be confirmed, the presence of both substances on the skin in combination may contribute to the positive effect seen in the prevention of catheter-related bloodstream infections due to a potentially synergistic effect against skin bacteria.

However, the power of this study is limited due to the small number of strains tested. Moreover, different results may be obtained with a longer CHG exposure time prior to hBD-3 time-kill tests. It is possible that a time period of 3 days is not long enough to select bacteria which show changes in response to hBD-3. Further investigation with more test strains and other bacterial species is needed to

clarify whether CHG-adapted bacteria are significantly less susceptible to hBD-3. Although we carried out all tests in triplicate and found comparable results in the tests for the strains which showed a decrease in susceptibility after CHG exposure, it would be interesting to see if the same results can be found with another sample of the same peptide. Our data, however, do not allow us to give an answer because all tests were carried out with the same batch of hBD-3. If these findings can be verified by other studies, it would be interesting to determine if comparable or even identical resistance mechanisms are the cause.

Conclusions

Apparent differences in the response to human β -Defensin-3 (hBD-3) were found in bacteria which showed a decrease in susceptibility after exposure to sub-lethal concentrations

of chlorhexidine digluconate (CHG) for 3 days. However, we found no consistent evidence that 3 days of exposure to CHG changed the response of five *Staphylococcus* spp. to hBD-3. The use of CHG for skin antisepsis is, based on our data, unlikely to change the natural defence of hBD-3.

Acknowledgements The study was funded by BODE Chemie GmbH, Hamburg, Germany. GK and MR are paid employees of BODE Chemie GmbH, Hamburg, Germany. We thank A. Schnasse and T. Claußen for their excellent technical assistance with the DNA sequence analysis and MIC determination, respectively. Furthermore, we thank P.-M. Kaulfers for the PFGE analysis.

References

- Funderburg N, Lederman MM, Feng Z, Drage MG, Jadowsky J, Harding CV, Weinberg A, Sieg SF (2007) Human α -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(47):18631–18635
- Gallo RL, Murakami M, Ohtake T, Zaiou M (2002) Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J Allergy Clin Immunol* 110(6):823–831
- Dhople V, Krukemeyer A, Ramamoorthy A (2006) The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions. *Biochim Biophys Acta* 1758(9):1499–1512
- Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM (2001) Isolation and characterization of human beta α -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 276(8):5707–5713
- Kisich KO, Howell MD, Boguniewicz M, Heizer HR, Watson NU, Leung DY (2007) The constitutive capacity of human keratinocytes to kill *Staphylococcus aureus* is dependent on beta-defensin 3. *J Invest Dermatol* 127(10):2368–2380
- Mangram AJ, Horan TC, Pearson ML, Silver LC, Jarvis WR (1999) Guideline for prevention of surgical site infection, 1999. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. *Infect Control Hosp Epidemiol* 20(4):250–278; quiz 279–280
- O'Grady NP, Alexander M, Dellinger EP, Gerberding JL, Heard SO, Maki DG, Masur H, McCormick RD, Mermel LA, Pearson ML, Raad II, Randolph A, Weinstein RA (2002) Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. *Infect Control Hosp Epidemiol* 23(12):759–769
- Maisetta G, Batoni G, Esin S, Florio W, Bottai D, Favilli F, Campa M (2006) In vitro bactericidal activity of human beta-defensin 3 against multidrug-resistant nosocomial strains. *Antimicrob Agents Chemother* 50(2):806–809
- Sørensen OE, Cowland JB, Theilgaard-Mönch K, Liu L, Ganz T, Borregaard N (2003) Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *J Immunol* 170(11):5583–5589
- Schitteck B, Paulmann M, Senyürek I, Steffen H (2008) The role of antimicrobial peptides in human skin and in skin infectious diseases. *Infect Disord Drug Targets* 8(3):135–143
- Sørensen OE, Thapa DR, Roupé KM, Valore EV, Sjöbring U, Roberts AA, Schmidtchen A, Ganz T (2006) Injury-induced innate immune response in human skin mediated by trans-activation of the epidermal growth factor receptor. *J Clin Invest* 116(7):1878–1885
- Maisetta G, Batoni G, Esin S, Luperini F, Pardini M, Bottai D, Florio W, Giuca MR, Gabriele M, Campa M (2003) Activity of human beta-defensin 3 alone or combined with other antimicrobial agents against oral bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 47(10):3349–3351
- Reichel M, Heisig P, Kohlmann T, Kampf G (2009) Alcohols for skin antisepsis at clinically relevant skin sites. *Antimicrob Agents Chemother* 53(11):4778–4782
- Walder B, Pittet D, Tramèr MR (2002) Prevention of bloodstream infections with central venous catheters treated with anti-infective agents depends on catheter type and insertion time: evidence from a meta-analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 23(12):748–756
- Thomas L, Maillard JY, Lambert RJ, Russell AD (2000) Development of resistance to chlorhexidine diacetate in *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of a “residual” concentration. *J Hosp Infect* 46:297–303
- Suller MTE, Russell AD (1999) Antibiotic and biocide resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococcus. *J Hosp Infect* 43:281–291
- Westergren G, Emilson C-G (1980) In vitro development of chlorhexidine resistance in *Streptococcus sanguis* and its transmissibility by genetic transformation. *Scand J Dent Res* 88:236–243
- McBain AJ, Bartolo RG, Catrenich CE, Charbonneau D, Ledder RG, Gilbert P (2003) Effects of a chlorhexidine gluconate-containing mouthwash on the vitality and antimicrobial susceptibility of in vitro oral bacterial ecosystems. *Appl Environ Microbiol* 69(8):4770–4776
- Block C, Furman M (2002) Association between intensity of chlorhexidine use and micro-organisms of reduced susceptibility in a hospital environment. *J Hosp Infect* 51(3):201–206
- Braoudaki M, Hilton AC (2004) Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. *J Clin Microbiol* 42(1):73–78
- Tattawasart U, Maillard J-Y, Furr JR, Russell AD (1999) Development of resistance to chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride in *Pseudomonas stutzeri* and changes in antibiotic susceptibility. *J Hosp Infect* 42(3):219–229
- Russell AD, Tattawasart U, Maillard JY, Furr JR (1998) Possible link between bacterial resistance and use of antibiotics and biocides. *Antimicrob Agents Chemother* 42(8):2151
- Moore LE, Ledder RG, Gilbert P, McBain AJ (2008) In vitro study of the effect of cationic biocides on bacterial population dynamics and susceptibility. *Appl Environ Microbiol* 74(15):4825–4834
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33(9):2233–2239
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2003) Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth microdilution. *Clin Microbiol Infect* 9 (7 insert):1–10
- Zorko M, Jerala R (2008) Alexidine and chlorhexidine bind to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid and prevent cell activation by antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 62(4):730–737
- Boyd DA, Cvitkovitch DG, Bleiweis AS, Kiriukhin MY, Debabov DV, Neuhaus FC, Hamilton IR (2000) Defects in D-alanyl-lipoteichoic acid synthesis in *Streptococcus mutans* results in acid sensitivity. *J Bacteriol* 182(21):6055–6065
- Peschel A, Otto M, Jack RW, Kalbacher H, Jung G, Götz F (1999) Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem* 274(13):8405–8410
- Debabov DV, Kiriukhin MY, Neuhaus FC (2000) Biosynthesis of lipoteichoic acid in *Lactobacillus rhamnosus*: role of DltD in D-alanylation. *J Bacteriol* 182(10):2855–2864
- Li M, Lai Y, Villaruz AE, Cha DJ, Sturdevant DE, Otto M (2007) Gram-positive three-component antimicrobial peptide-sensing system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(22):9469–9474

31. Sahly H, Schubert S, Harder J, Rautenberg P, Ullmann U, Schröder J, Podschun R (2003) *Burkholderia* is highly resistant to human beta-defensin 3. *Antimicrob Agents Chemother* 47(5):1739–1741
32. Huet AA, Raygada JL, Mendiratta K, Seo SM, Kaatz GW (2008) Multidrug efflux pump overexpression in *Staphylococcus aureus* after single and multiple in vitro exposures to biocides and dyes. *Microbiology* 154(Pt 10):3144–3153
33. DeMarco CE, Cushing LA, Frempong-Manso E, Seo SM, Jaravaza TA, Kaatz GW (2007) Efflux-related resistance to norfloxacin, dyes, and biocides in bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 51(9):3235–3239
34. Brissette CA, Lukehart SA (2007) Mechanisms of decreased susceptibility to beta-defensins by *Treponema denticola*. *Infect Immun* 75(5):2307–2315
35. Rieg S, Huth A, Kalbacher H, Kern WV (2009) Resistance against antimicrobial peptides is independent of *Escherichia coli* AcrAB, *Pseudomonas aeruginosa* MexAB and *Staphylococcus aureus* NorA efflux pumps. *Int J Antimicrob Agents* 33(2):174–176