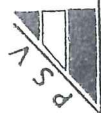


novapura

SCIENCE FOR LIFE **A LIFE FOR SCIENCE**



Gerhard F. Reinhold
PSV Montage-Service

Lüftungsanlagenreinigung

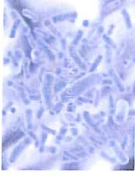
Eberhardt Str. 30 71334 Hegnach
Tel.: (0 71 51) 56 43 50 Fax: 5 75 79

Auto Tel.: (01 72) 7 68 87 66

E-Mail: g.f.reinhold@t-online.de

Novapura Deutschland GmbH
Biopark III
Josef Engert Str. 13
D- 93053 Regensburg

T: +49 171 736 34 89
E: info@novapura.de
I: www.novapura.de



Inhalt

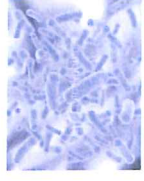
Wirkstoffe/ Konzepte

Bestehende Produkte

Anwendungs-Beispiele

Messresultate





Das Hygienekonzept von Novapura

Produkte : akafog
 Fog- IT Plus (VAH Zertifiziert)
 Fog- IT Q (VAH Zertifiziert)

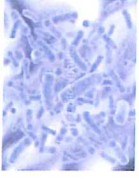
Die Ausbringung der Wirkstoffe erfolgt mittels Kaltvernebelung. Dadurch ist eine sichere und gründliche Desinfektion der Räume (Oberflächen, Raumluft, Inventar) gewährleistet.

Akafog: enthält den aktiven Wirkstoff **akacid plus**, ein kationisches Polymer aus der Gruppe der Guanidine.

akacid plus hat folgende herausragende Eigenschaften:

- Breites Wirkspektrum
- Low Tox Profil
- Depotwirkung, d.h. sehr lange Wirkdauer zum Überbrücken der Desinfektionslücke
- Nicht korrosiv, nicht explosiv, geruchlos, pH=6
- einfach und effizient in der Anwendung FFP 3 Maske

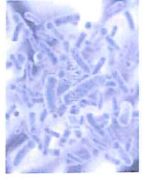




Das Hygienekonzept von Novapura

- **Fog It Plus:** aufgrund der hohen Effizienz auch täglich anwendbar, speziell in kritischen Bereichen
 - geeignet für die tägliche/ häufige Anwendung, da ohne schädliche Zusatzstoffe
 - Höchste Wirksamkeit, auch bei hoher organischer Belastung
- **Fog It Q:** für die tägliche bzw. gelegentliche Anwendung bei geringer bis mittlerer Feuchte bzw. organischer Belastung geeignet





Funktionsprinzip

- **Starke Bindung an Zellwände und Membranen**

(durch die positive Aufladung des Polymers und dem Zusammenspiel des Partialdruckes/ Feuchtigkeit auf Oberflächen und den negativ geladenen Anteils der Mikroorganismen kommt eine Art magnetischer Effekt zustande. Die Mikroorganismen kommen in Kontakt mit dem Polymer. Die Atombindung (auch kovalente Bindung, Elektronenpaarbindung oder homöopolare Bindung) ist eine Form der chemischen Bindungen und ist als solche für den festen Zusammenhalt von Atomen in vielen chemischen Verbindungen verantwortlich.)

- **Störung der Membranfunktion**

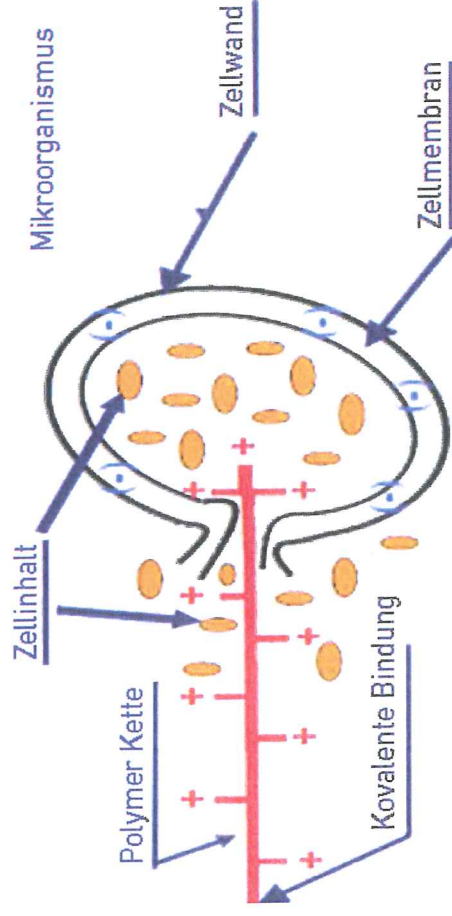
(An der Membran wird der negativ geladene Teil der Membran "geöffnet" und so die "Tür" zur Zelle geöffnet.)

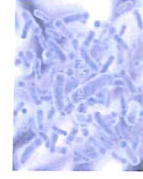
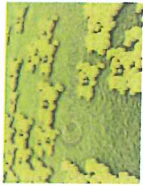
- **Herabsetzung der Membranfluidität**

(Die Biomembran ist jedoch nicht nur eine passive Trennschicht, sondern sie spielt eine aktive Rolle beim Transport von Molekülen und Informationen von einer Seite zur Anderen.)

- **Verlust von osmoregulatorischen und physiolog. Funktionen**

(Osmoregulation, die Fähigkeit aller Lebewesen mit einem Stoffwechsel, die Konzentrationen osmotisch wirksamer Stoffe kontrollieren zu können. Die Physiologie ist als Teilgebiet der Biologie die Lehre von den physikalischen, biochemischen und informationsverarbeitenden Funktionen von Lebewesen.)





Funktionsprinzip

- Entstehung von hydrophilen Poren

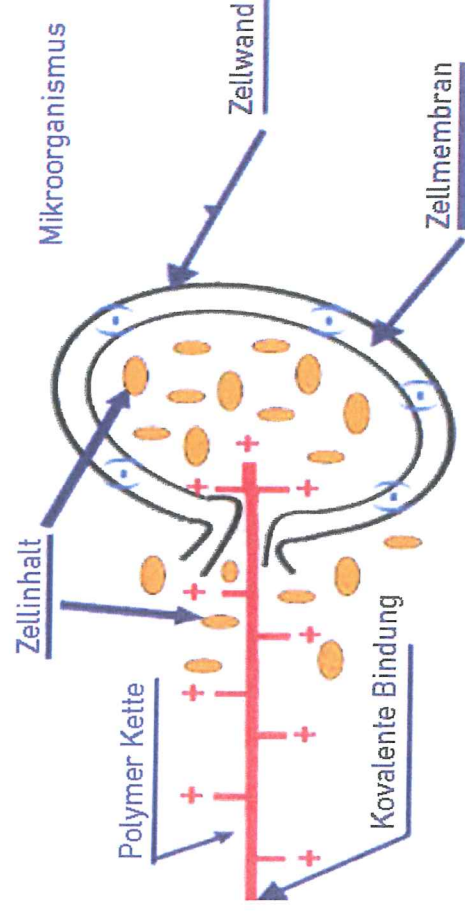
(Hydrophilie kommt aus dem Griechischen und bedeutet Wasser liebend was besagt, dass ein Stoff wasseranziehend ist. Hydrophile Stoffe können eine Membran nur durch die "Poren" passieren, die in einer biologischen Membran zu finden sind.)

- Störung der Proteinfunktion

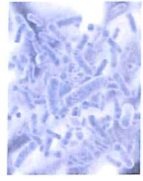
(Proteine oder Eiweiße sind aus Aminosäuren aufgebaute Makromoleküle. Proteine gehören zu den Grundbausteinen aller Zellen. Sie verleihen der Zelle nicht nur Struktur, sondern sind die molekularen „Maschinen“, die Stoffe transportieren, Ionen pumpen, chemische Reaktionen katalysieren und Signalstoffe erkennen)

- Lyse der Zelle

(Die Lyse bezeichnet in der Biologie und Medizin den Zerfall einer Zelle durch Schädigung oder Auflösung der äußeren Zellmembran (Zelltod).

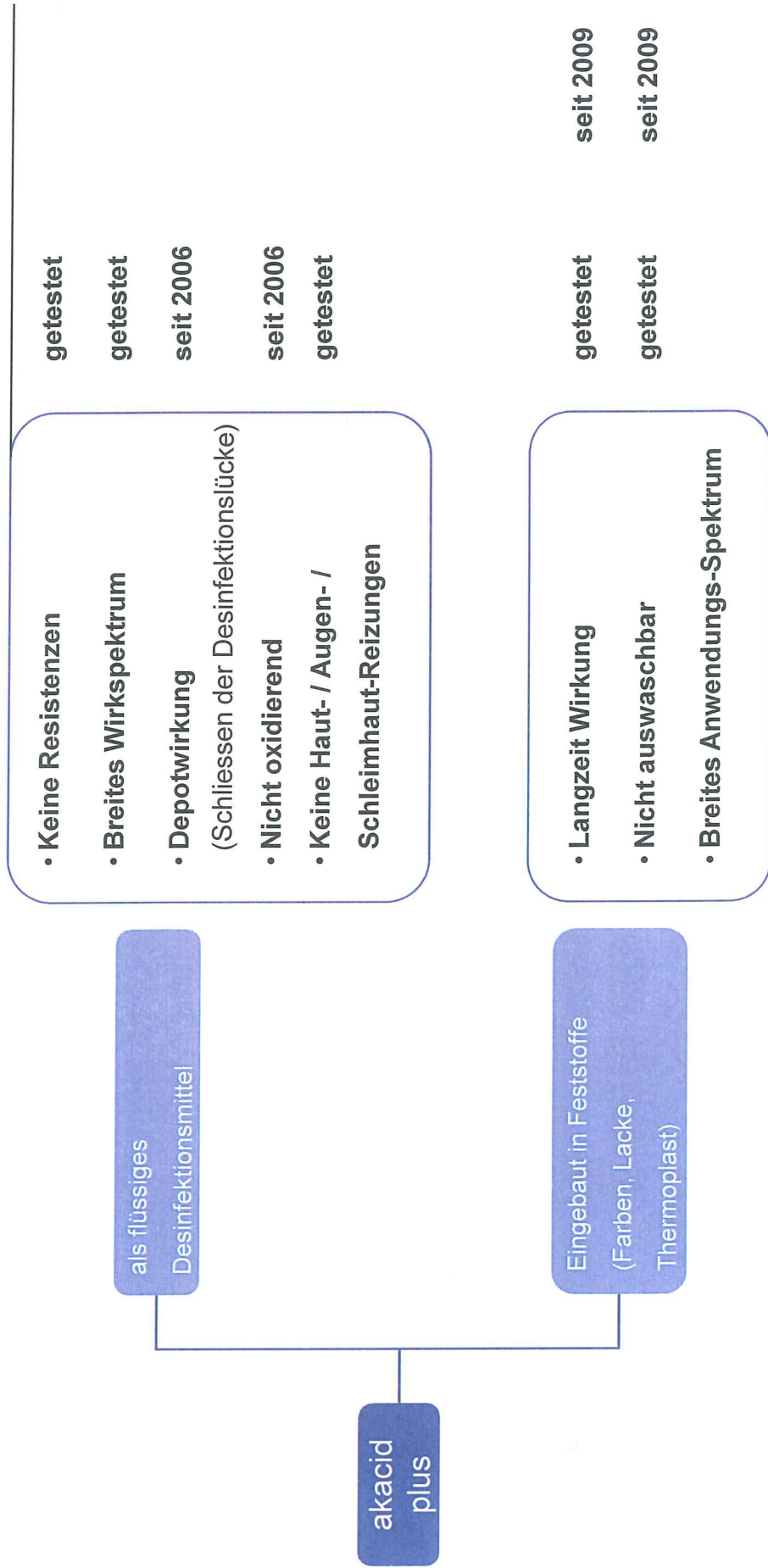


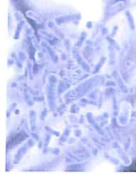
→ Wenn die Organismen abgestorben sind fallen diese vom Polymer wieder ab.



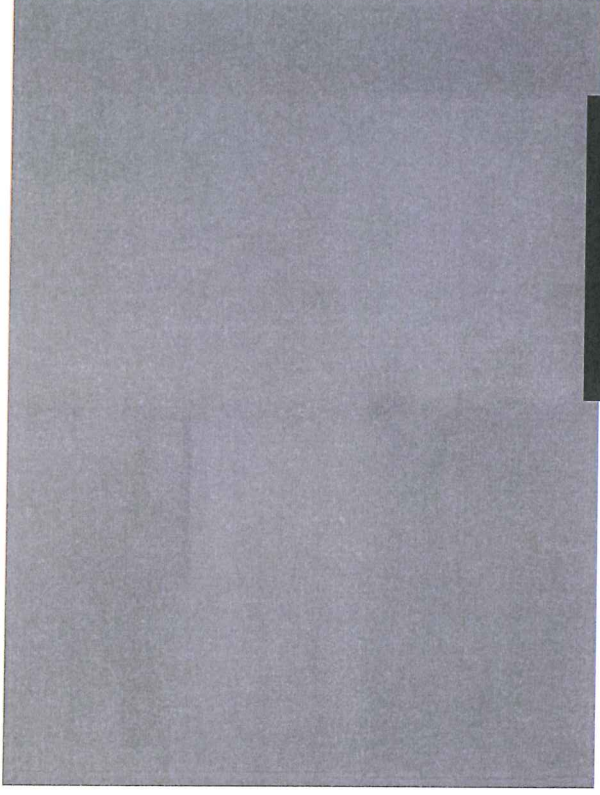
Aktiver Wirkstoff akacid plus: Eigenschaften

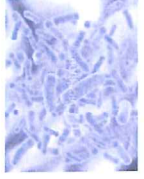
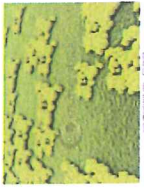
Validierung
im Labor im Feld



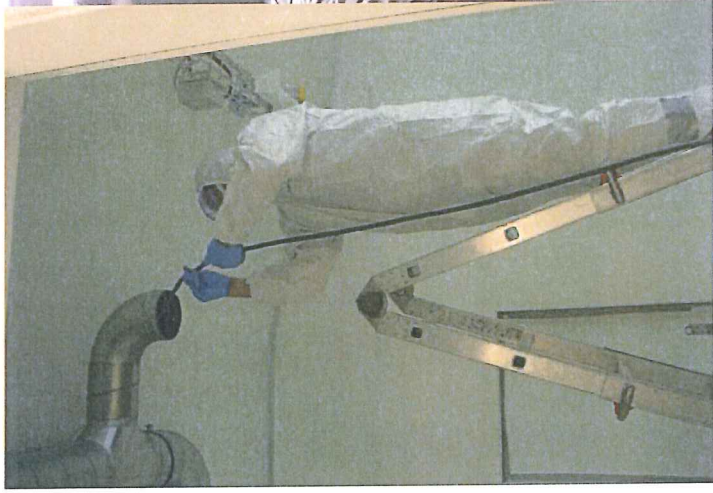


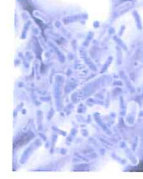
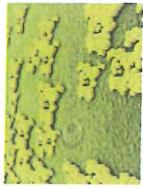
Kaltvernebelung im Klinikbereich mittels akafofog oder Fog-It Plus



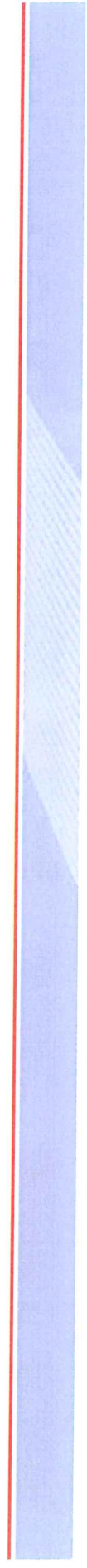
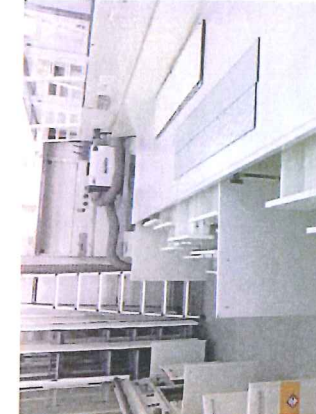


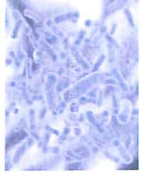
- Reinigung Lüftungskanäle (>8 km Kanäle!)





- Vernebelung Räume und Lüftungskanäle





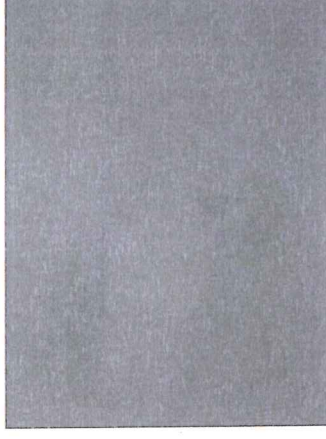
Bestehende Produkte: Desinfektion

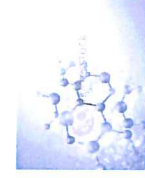
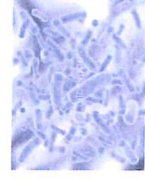
Raumdesinfektion durch Vernebelung

- Hocheffizient
- 1- 2 Stunden Zeitaufwand
- Restliche Aerosole werden durch Klima- / Lüftungsanlage wieder abgesaugt.
- Anschließend sind die Räume wieder benutzbar.

Bereiche:

- Kliniken, Rettungsdienste
- Lebensmittelindustrie
- Klimaanlagen
- Geruchsneutralisation

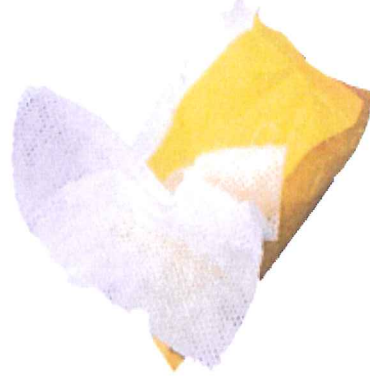
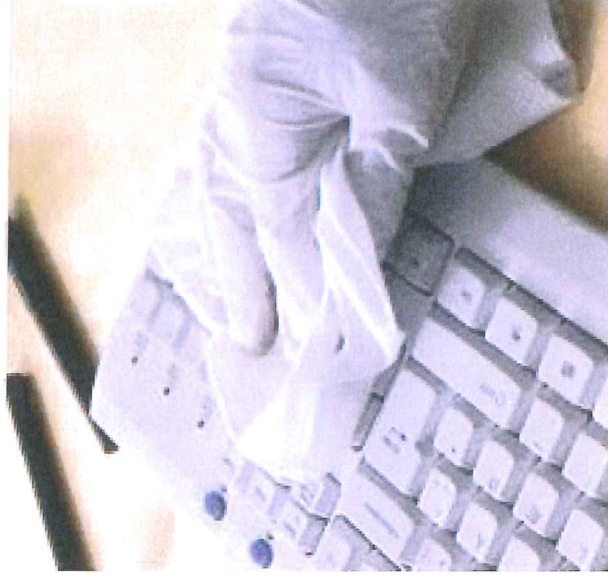


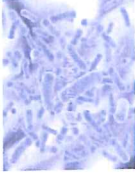


Bestehende Produkte:

Desinfektionstücher/ Desinfektionsspray

- Alkoholfrei
- Schonend für Haut und Material
- Breitbandwirkung
- Depotwirkung





Bestehende Produkte: Antimikrobielle Beschichtungen

Alle Beschichtungen sind permanent antimikrobiell.

Wände:

- Kalipura, Mineralfarbe
- BAX 55, Dispersionsfarbe (gut abwaschbar)
- Easy on plus, emissionsfreier 2k Lack

Boden:

- BAX 512, transparente oder eingefärbte Bodenbeschichtung
- Wischpflege claraclean plus (in Testphase)

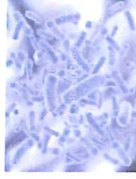
Beschläge, Griffe, Türfallen:

- Easy on plus, emissionsfreier 2k Lack
- Direkt eingebracht in PA- Türgriffe

Silikon Dichtmasse:

- Novapursil, permanent antimikrobiell





novapura
SCIENCE FOR LIFE A LIFE FOR SCIENCE

Beispiel Lebensmittelindustrie

BioRID[®]
Schimmelschutzsystem



Permanent anti-
mikrobielle Wand-
anstrich

novapursil

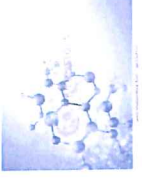
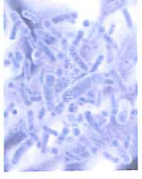
Permanent Anti-mikrobieller Silikondichtstoff



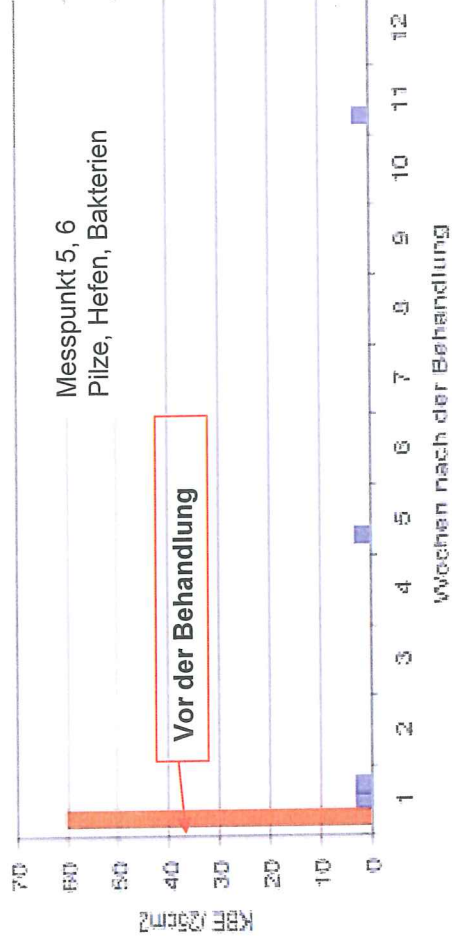
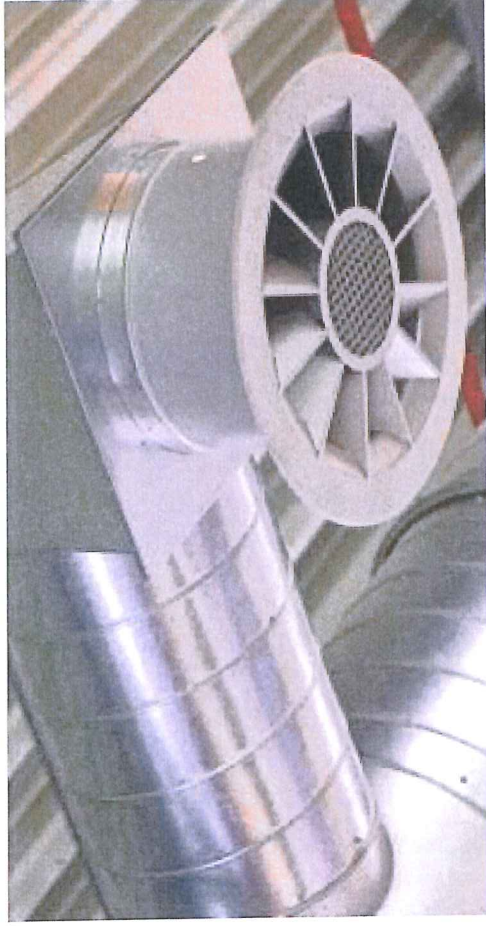
Kaltvernebelung

- nach Schimmelbehandlung
- oder
- zur Raumdesinfektion

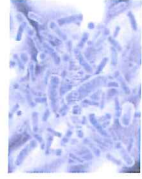




Beispiel Klimaanlage



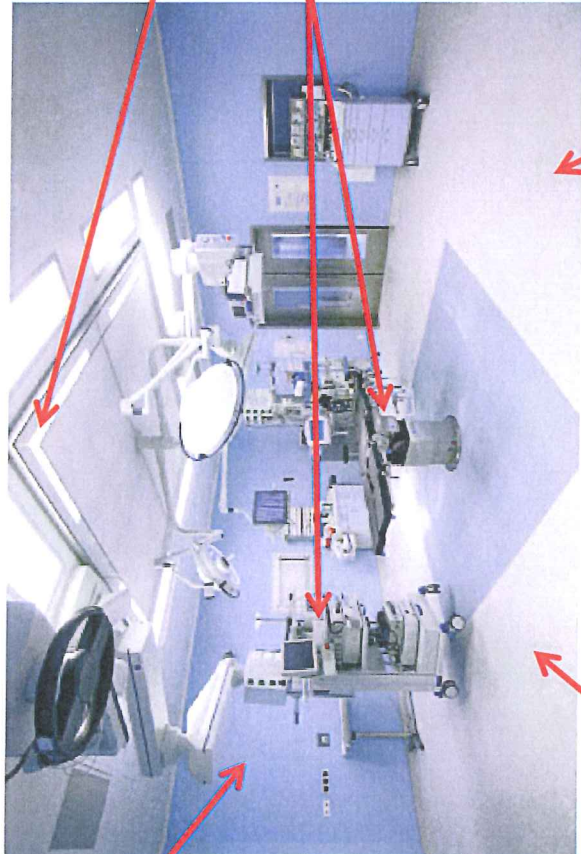
- Kaltvernebelung nach der Reinigung der Anlage
- Klimaaggregate werden bei der Kaltvernebelung mit akafog im gleichen Arbeitsgang desinfiziert



nouapura
SCIENCE FOR LIFE A LIFE FOR SCIENCE



Beispiel OP



baX[®] 55
antimicrobial

Top ELF Innenwandfarbe
Permanent antimikrobieller Wandanstrich

- Periodische Raumdesinfektion
- Desinfektion der Lüftungen

akasan wet wipes

Griffe, Tastaturen, Hebel etc.

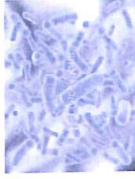
claraclean plus

Antimikrobielle Wischpflege

baX[®] 512
antimicrobial
2-Komp. Epoxylack

Permanent antimikrobielle Bodenbeschichtung



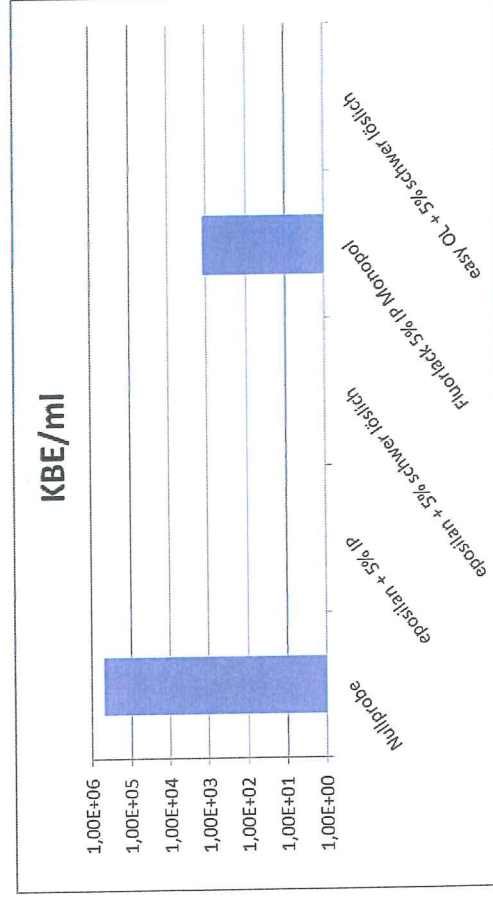
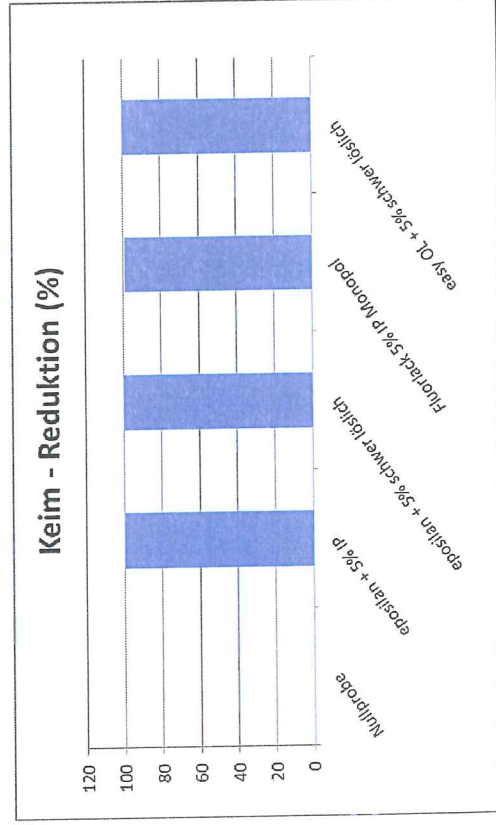


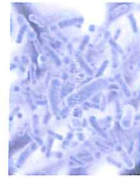
Bestehende Produkte: Antimikrobielle Lacke/ Harze

Neuer Wirkstoff, Zugabe in flüssiger Form, Applikation Sulzer Stahlmischer

Ergebnis:

Muster	Probe	KBE/ml	Reduktion (%)	Reduktion (log-Stufen)
1	Nullprobe	5E+05	-	-
2	Eposilan + 5% IP	0	100,00	>5
3	Eposilan + 5% IP schwer löslich	0	100,00	>5
4	Fluorlack 5% IP Monopol	1,08E+03	99,21	2,1
5	Easy OL + 5% schwer löslich	0	100,00	>5,0





Messresultate: **akafog**

Klinikbereich:

Effizienz der Vernebelung

Umfeldstudie | Studie für universitätsklinischen und Langzeitstudien

Umfeldstudie | Messergebnisse zur Effizienz der Vernebelung akafog® in einem universitätsklinischen Bereich

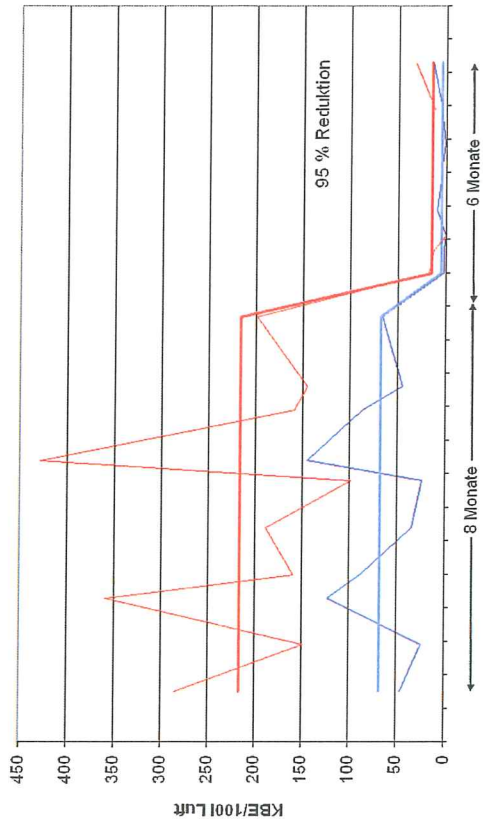
Standort:

- Universitätsklinikum Köln
- Universitätsklinikum Bonn
- Universitätsklinikum Düsseldorf
- Universitätsklinikum Essen
- Universitätsklinikum Gießen und Marburg
- Universitätsklinikum Halle (Saale)
- Universitätsklinikum Jena
- Universitätsklinikum Karlsruhe
- Universitätsklinikum Köln
- Universitätsklinikum Leipzig
- Universitätsklinikum Magdeburg
- Universitätsklinikum Mainz
- Universitätsklinikum München
- Universitätsklinikum Regensburg
- Universitätsklinikum Saarbrücken
- Universitätsklinikum Tübingen
- Universitätsklinikum Ulm
- Universitätsklinikum Wuppertal
- Universitätsklinikum Würzburg

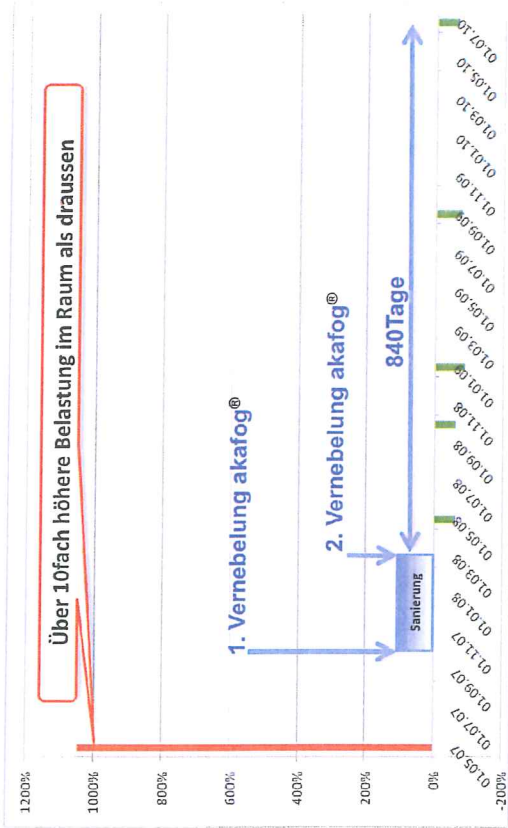
Material: akafog® 2, akafog® 3, akafog® 4, akafog® 5, akafog® 6, akafog® 7, akafog® 8, akafog® 9, akafog® 10, akafog® 11, akafog® 12, akafog® 13, akafog® 14, akafog® 15, akafog® 16, akafog® 17, akafog® 18, akafog® 19, akafog® 20, akafog® 21, akafog® 22, akafog® 23, akafog® 24, akafog® 25, akafog® 26, akafog® 27, akafog® 28, akafog® 29, akafog® 30, akafog® 31, akafog® 32, akafog® 33, akafog® 34, akafog® 35, akafog® 36, akafog® 37, akafog® 38, akafog® 39, akafog® 40, akafog® 41, akafog® 42, akafog® 43, akafog® 44, akafog® 45, akafog® 46, akafog® 47, akafog® 48, akafog® 49, akafog® 50, akafog® 51, akafog® 52, akafog® 53, akafog® 54, akafog® 55, akafog® 56, akafog® 57, akafog® 58, akafog® 59, akafog® 60, akafog® 61, akafog® 62, akafog® 63, akafog® 64, akafog® 65, akafog® 66, akafog® 67, akafog® 68, akafog® 69, akafog® 70, akafog® 71, akafog® 72, akafog® 73, akafog® 74, akafog® 75, akafog® 76, akafog® 77, akafog® 78, akafog® 79, akafog® 80, akafog® 81, akafog® 82, akafog® 83, akafog® 84, akafog® 85, akafog® 86, akafog® 87, akafog® 88, akafog® 89, akafog® 90, akafog® 91, akafog® 92, akafog® 93, akafog® 94, akafog® 95, akafog® 96, akafog® 97, akafog® 98, akafog® 99, akafog® 100.

Ergebnis: akafog® 2, akafog® 3, akafog® 4, akafog® 5, akafog® 6, akafog® 7, akafog® 8, akafog® 9, akafog® 10, akafog® 11, akafog® 12, akafog® 13, akafog® 14, akafog® 15, akafog® 16, akafog® 17, akafog® 18, akafog® 19, akafog® 20, akafog® 21, akafog® 22, akafog® 23, akafog® 24, akafog® 25, akafog® 26, akafog® 27, akafog® 28, akafog® 29, akafog® 30, akafog® 31, akafog® 32, akafog® 33, akafog® 34, akafog® 35, akafog® 36, akafog® 37, akafog® 38, akafog® 39, akafog® 40, akafog® 41, akafog® 42, akafog® 43, akafog® 44, akafog® 45, akafog® 46, akafog® 47, akafog® 48, akafog® 49, akafog® 50, akafog® 51, akafog® 52, akafog® 53, akafog® 54, akafog® 55, akafog® 56, akafog® 57, akafog® 58, akafog® 59, akafog® 60, akafog® 61, akafog® 62, akafog® 63, akafog® 64, akafog® 65, akafog® 66, akafog® 67, akafog® 68, akafog® 69, akafog® 70, akafog® 71, akafog® 72, akafog® 73, akafog® 74, akafog® 75, akafog® 76, akafog® 77, akafog® 78, akafog® 79, akafog® 80, akafog® 81, akafog® 82, akafog® 83, akafog® 84, akafog® 85, akafog® 86, akafog® 87, akafog® 88, akafog® 89, akafog® 90, akafog® 91, akafog® 92, akafog® 93, akafog® 94, akafog® 95, akafog® 96, akafog® 97, akafog® 98, akafog® 99, akafog® 100.

Ergebnis: akafog® 2, akafog® 3, akafog® 4, akafog® 5, akafog® 6, akafog® 7, akafog® 8, akafog® 9, akafog® 10, akafog® 11, akafog® 12, akafog® 13, akafog® 14, akafog® 15, akafog® 16, akafog® 17, akafog® 18, akafog® 19, akafog® 20, akafog® 21, akafog® 22, akafog® 23, akafog® 24, akafog® 25, akafog® 26, akafog® 27, akafog® 28, akafog® 29, akafog® 30, akafog® 31, akafog® 32, akafog® 33, akafog® 34, akafog® 35, akafog® 36, akafog® 37, akafog® 38, akafog® 39, akafog® 40, akafog® 41, akafog® 42, akafog® 43, akafog® 44, akafog® 45, akafog® 46, akafog® 47, akafog® 48, akafog® 49, akafog® 50, akafog® 51, akafog® 52, akafog® 53, akafog® 54, akafog® 55, akafog® 56, akafog® 57, akafog® 58, akafog® 59, akafog® 60, akafog® 61, akafog® 62, akafog® 63, akafog® 64, akafog® 65, akafog® 66, akafog® 67, akafog® 68, akafog® 69, akafog® 70, akafog® 71, akafog® 72, akafog® 73, akafog® 74, akafog® 75, akafog® 76, akafog® 77, akafog® 78, akafog® 79, akafog® 80, akafog® 81, akafog® 82, akafog® 83, akafog® 84, akafog® 85, akafog® 86, akafog® 87, akafog® 88, akafog® 89, akafog® 90, akafog® 91, akafog® 92, akafog® 93, akafog® 94, akafog® 95, akafog® 96, akafog® 97, akafog® 98, akafog® 99, akafog® 100.

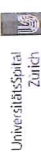
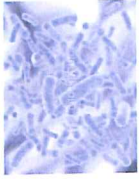


Industrie: Depotwirkung



Wohnbereich: Depotwirkung





UniversitätsSpital
Zürich

Klinik für Infektionskrankheiten
und Spitalhygiene

Umgebungsuntersuchung IPS für Brandverletzte Mikrobiologische Wirksamkeit Akacid®-Vernebelung

- Vorgehen:**
- Ausbringung der Proben am Freitag, 24.09.10, 15:30 Uhr in 10x10cm Feldern
 - Akacid®-Vernebelung am Vormittag 24.09.10 durch Fa. Nouapura
 - Abstrichentnahmen Montag, 27.09., 8:15 Uhr und Untersuchung im Labor der Spitalhygiene USZ
 - Testorganismen: *Staphylococcus aureus* (Protease-Positiv), Rindereextrakt, Leclithin, Polysorbit, Natrumsorbitol)
 - Konzentration: McFarland-Standard 0,5
 - (entpflichtet) Ballonzahl (1 ml in Mio.: 150)

Lokalisation	Material	Ergebnis
Badewanne Testkeim 2 (Sellenwand quer, fensterseitig)	Chromstahl	Kein Wachstum
Badewanne Testkeim 3 (Sellenwand quer, fensterseitig)	Chromstahl	Kein Wachstum
OPS Testkeim 4 (Oberseite Regalboden senkrecht)	Holz beschichtet	Kein Wachstum
Zimmer 9 Testkeim 1 (Schrank, quer, fensterseitig)	Holz beschichtet	Kein Wachstum
Zimmer 9 Testkeim 3 (Schrank, quer, fensterseitig)	Holz beschichtet	Kein Wachstum
Apothekenzug Testkeim 2 (Unterseite Regalboden)	Holz beschichtet	Kein Wachstum
Zimmer 3 Testkeim 4 (Medienkanal, Oberseite, mittig)	Holz beschichtet	Kein Wachstum

Testkeime:
Nr.1 = VRE (*E. faecium*)
Nr.2 = MRSA
Nr.3 = *Acinetobacter baumannii*
Nr.4 = *Pseudomonas aeruginosa*



Hygiene-Institut
Dr. Nuss GmbH

Klinikum Fulda
Abteilung Kardiologie / Umwelthygiene
Postfach 2404
99873 Fulda

Erreger: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) 48.319/1
Erreger: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) 48.319/1

Mikrobiologische Überprüfung von Raumlufttechnischen Anlagen mittels Akacid®-Vernebelung
Erregerart: *Staphylococcus aureus*, Lilligangenzentrum Z1, Z2, Z11, Z18
Erregerkonzentration: 20.03.11, 9:00 Uhr
Unterstützungszähler: 24.02 - 4.03.2011

Nr.	Probennahmestelle	Bereich	DKZ KBE/25cm ²	Schimmelpilze KBE/25cm ²
471	Zufuhrabsperr	Lamellen, sekundär	0	0
473	Filz	Becken, sekundär	0	0
475	Filz	Filz, sekundär	0	0
721	Filz	Becken, sekundär	0	1
723	Filz	Filz, sekundär	0	0
202	Filz	Becken, sekundär	0	2
203	Filz	Filz, sekundär	0	0
204	Zugabsperr	Wand	1	0
205	Filz	Filz, sekundär	0	0
206	Erreger	Becken, sekundär	4	3
207	Ventilator	Ventilatorabsperr	0	15
501	Jalousieabsperr	Lamellen, sekundär	0	1
504	Filz	Filz, sekundär	0	2
305	Dampfabsperr	Becken	0	0

Das Protokoll ist Bestandteil des Sanierungsplans und des Hygieneplans.
Gesamtzahl der Generations für Hygiene Dr. Nuss und Fulda: 20.03.2011

CSX Hygiene-Institut Dr. Nuss GmbH - Schönenbergstraße 34 - 97889 Bam Kleinplan
Erregerart: *Staphylococcus aureus*, Lilligangenzentrum Z1, Z2, Z11, Z18
Erregerkonzentration: 20.03.11, 9:00 Uhr
Unterstützungszähler: 24.02 - 4.03.2011

Nr.	Probennahmestelle	Bereich	DKZ KBE/25cm ²	Schimmelpilze KBE/25cm ²
604	Jalousieabsperr	Lamellen, sekundär	0	0
606	Filz	Becken, sekundär	2	5
621	Jalousieabsperr	Lamellen, sekundär	0	0
323	Filz	Filz, sekundär	0	1
322	Jalousieabsperr	Lamellen, sekundär	0	-
637	Tropfenabsperr	Faltrahmen, sekundär	0	0
641	Jalousieabsperr	Lamellen, sekundär	0	0
642	Filz	Filz, sekundär	0	0
643	Filz	Becken, sekundär	0	1
652	Filz	Filz, sekundär	0	1

Erregerart: *Staphylococcus aureus*, Lilligangenzentrum Z1, Z2, Z11, Z18
Erregerkonzentration: 20.03.11, 9:00 Uhr
Unterstützungszähler: 24.02 - 4.03.2011

Risikofaktoren: Detail der Abblühschichtverteilung

Risikofaktor VDI 6022: Der hygienisch-mikrobiologische Zustand der untersuchten Flächen ist zwischen 25 KBE/Platte und 100 KBE/Platte als überwiegend als unzureichend einzustufen

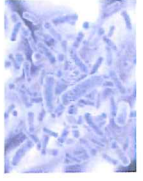
Bewertung: Der hygienisch-mikrobiologische Zustand der untersuchten Flächen ist als gut oder sehr gut zu bewerten.

Bam Kleinplan, den 04.03.2011
Hygiene-Institut Dr. Nuss GmbH
Abteilung Umwelthygiene

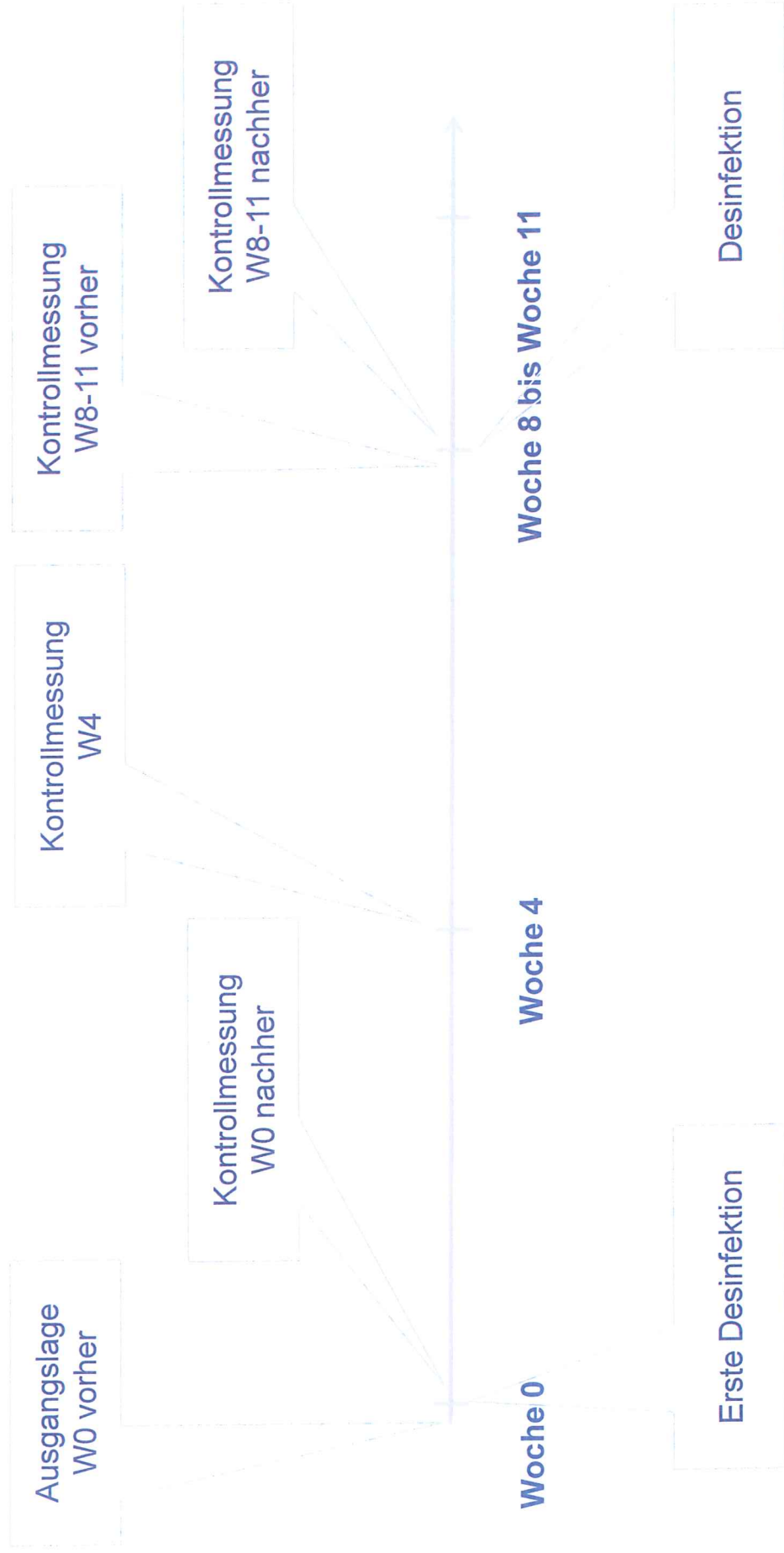
Das Protokoll ist Bestandteil des Sanierungsplans und des Hygieneplans.
Gesamtzahl der Generations für Hygiene Dr. Nuss und Fulda: 20.03.2011

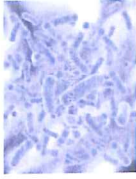
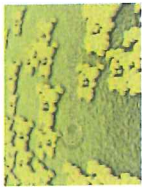
Unispital Zürich

Klinikum Fulda



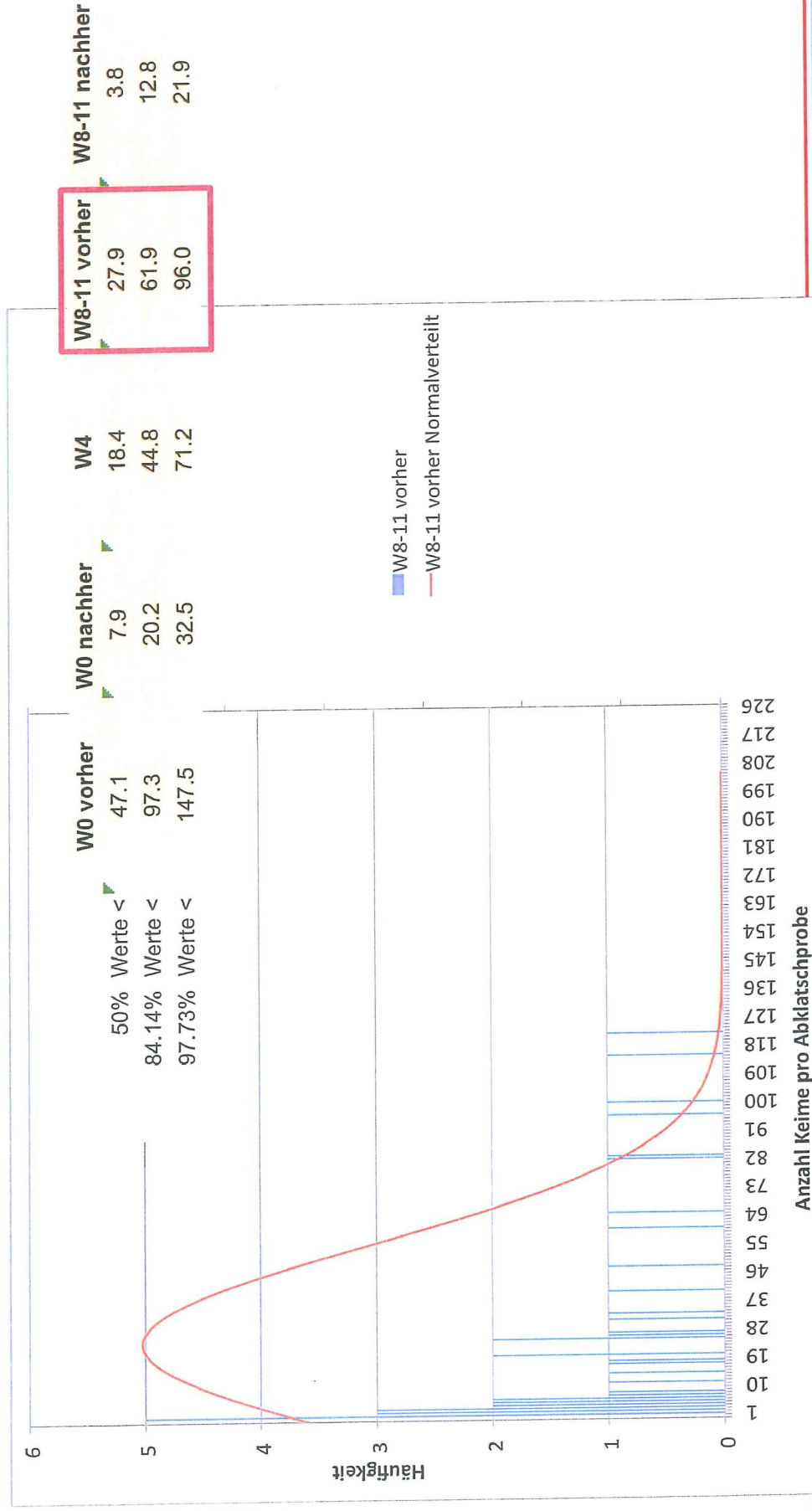
Zeitlicher Ablauf Fahrzeugdesinfektion



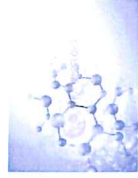
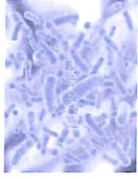


Messresultate: nach 8-11 Wochen, vorher

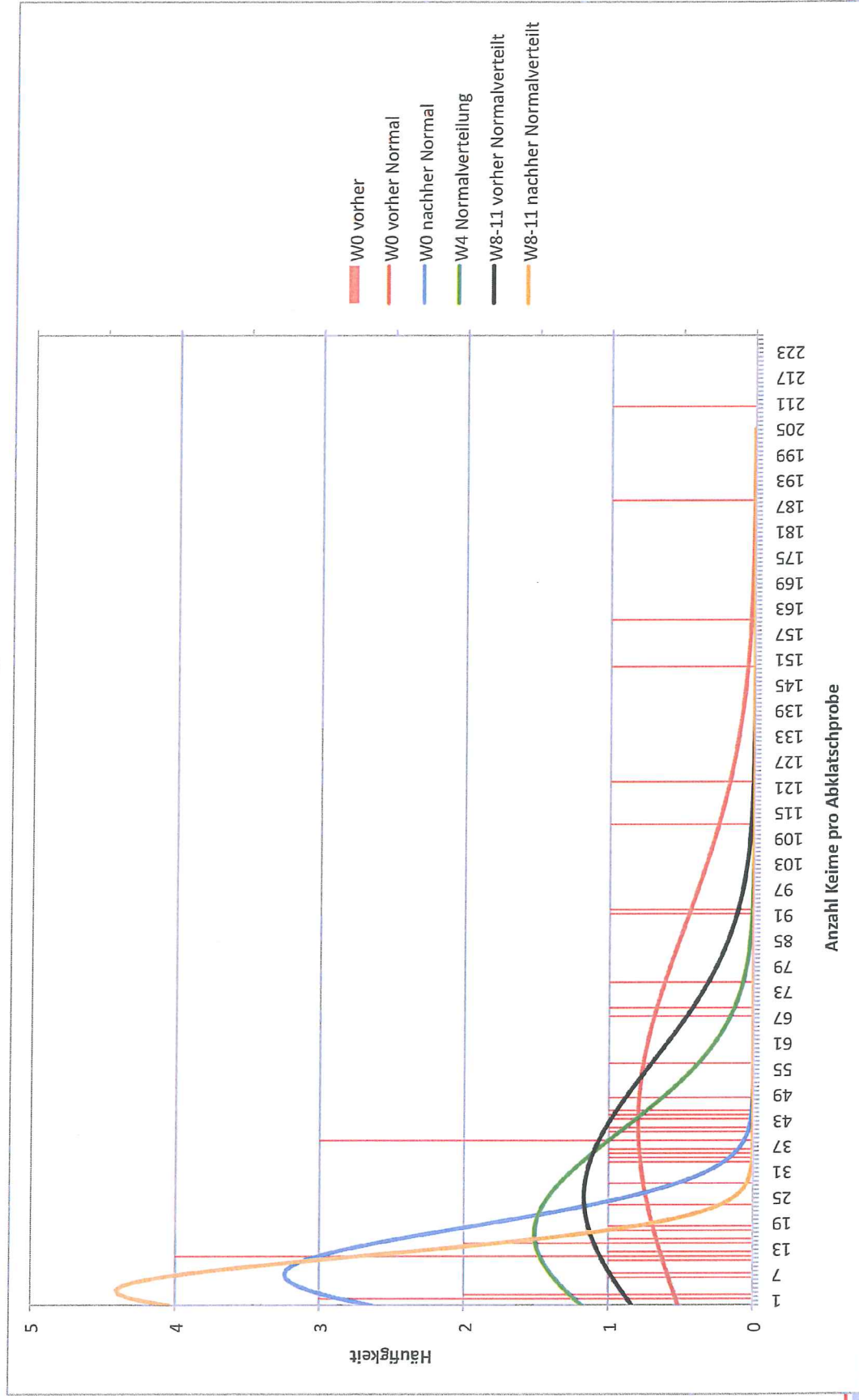
- 15 Fahrzeuge, 3-6 Messstellen pro Fahrzeug

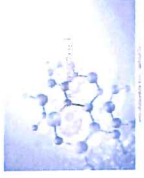
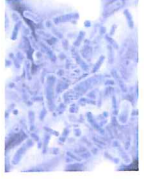
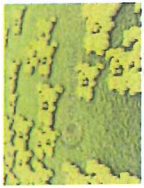


Anzahl Keime pro Abklatschprobe



Messresultate: zusammengefasst





novapura
SCIENCE FOR LIFE A LIFE FOR SCIENCE

Messresultate: easy on plus

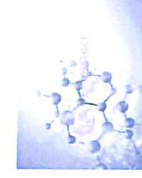
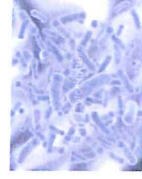
easy-on+
ANTI-BACTERIAL COATING

Sample	Mean (n=5)	Reduction * (%)	Log Reduction* Mean	sd
<i>E. coli</i>				
EPS 0%	2,19E+06	0,00		
EPS 0.25%	1,95E+05	91,11	1,0	0,1
EPS 0.5%	9,62E+04	95,62	>2	1,2
EPS 1%	1,77E+03	99,92	>3,2	0,6
<i>S. aureus</i> (n=2)				
EPS 0%	9,77E+05	0,00		
EPS 0.25%	7,02E+04	92,81	1,6	0,7
EPS 0.5%	2,34E+03	99,76	2,2	1,2
EPS 1%	2,75E+02	99,97	>3,2	0,6

* after one hour



Tests gemäss Japanischem Industrie Standard Z 2801:2000 (JIS)



Messresultate: Novapursil

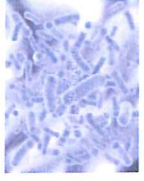
• **Wirksamkeit:** Verwendete Keime:

- *Aspergillus niger*
- *Aspergillus oryzae*
- *Penizillium variabile*
- *Geotrichum candidum*



→ **Resultat:** Novapursil hat eine **10fach höhere Anti-mikrobielle Wirkung** gegenüber einem herkömmlich fungizid ausgerüsteten Produkt.

- **Auswaschversuch:** Täglicher Wechsel von 0.9% Kochsalzlösung
Resultat: Novapursil hat eine **2.5 bis 3fach längere Wirkdauer** gegenüber einem herkömmlich fungizid ausgerüsteten Produkt.
- **Langzeit Tests bei einem großen Lebensmittelbetrieb erfolgreich abgeschlossen**



Zusammenfassung

Unsere Produkte / Anwendungen haben

- Breites Wirkspektrum
- Depotwirkung, d.h. sehr lange Wirkdauer
- Nicht korrosiv, nicht explosiv, geruchlos
- einfach und effizient in der Anwendung

In der Schweiz und in Deutschland haben wir eine große Anzahl von Referenzen.



In Vivo Activity of a Novel Polymeric Guanidine in Experimental Skin Infection with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*[∇]

Christina Kratzer,¹ Selma Tobudic,^{1,2} Karin Macfelda,²
Wolfgang Graninger,¹ and Apostolos Georgopoulos^{1,*}

Department of Internal Medicine I, Division of Infectious Diseases and Tropical Diseases,¹ and Care Unit for Biomedical Research,² Medical University of Vienna, Währinger Gürtel 18-20, 1090 Vienna, Austria

Received 29 January 2007/Returned for modification 16 March 2007/Accepted 20 June 2007

The in vivo efficacy of the novel polymeric guanidine AKACID Plus was evaluated in a guinea pig model of experimental skin infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Topical application of AKACID Plus at concentrations of $\geq 0.5\%$ was as effective as mupirocin 2% cream in the treatment of superficial skin infection with MRSA.

The polymeric guanidine AKACID Plus, a 3:1 mixture of poly-(hexamethylen-guanidinium-chloride) (Chemical Abstracts Service registry no. 57028-96-3) and poly-[2-(2-ethoxy)-ethoxyethyl]-guanidinium-chloride] (Chemical Abstracts Service registry no. 374572-91-5), is a novel member of the cationic family of polymeric antimicrobials. Due to their own positively charged molecules, cationic antiseptics have a high binding affinity to the negatively charged cell walls and membranes of bacteria and fungi. A disruption of the target cells is brought about by the perturbation of these sites (4, 6, 12). AKACID Plus shows high water solubility and combines low acute toxicity (2) and antiproliferative effects (10) with a broad antimicrobial spectrum against bacteria, yeasts, and filamentous fungi (7, 9, 13). Nebulized AKACID Plus solution 0.5% was active in eradicating bacterial quality control strains and multiantibiotic-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* in a room disinfection assay (8). However, the in vivo activity of the novel polymeric guanidine has not been studied so far. The aim of the present study was to evaluate the in vivo activities of different concentrations of AKACID Plus cream formulation in a guinea pig model of experimental skin infection with methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) compared to the activities of mupirocin, a topical antistaphylococcal antibiotic.

(This paper was presented in part at the 46th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, CA, 27 to 30 September 2006.)

AKACID Plus as a 25% aqueous solution (Ch. 1007) was acquired from Polymers of Creativity Produktion GmbH, Vienna, Austria, and diluted in Ultraphil (cream vehicle) to the desired test concentrations of 0.01, 0.1, 0.25, 0.5, and 1%. These doses were chosen due to bactericidal activity in basic and extended quantitative suspension tests (9). A commercially available mupirocin 2% cream formulation (Bactroban; Smith-

Kline Beecham Pharmaceuticals, Crawley, United Kingdom) was used as the standard substance (positive control).

Experimental skin infection was carried out by using a mupirocin-sensitive clinical MRSA strain, 912, isolated from a patient with a wound infection in 2004 at the Department of Internal Medicine I, Division of Infectious Diseases and Tropical Diseases, Medical University of Vienna. Previously, MICs of 0.125 and 0.25 $\mu\text{g/ml}$ were determined for mupirocin and AKACID Plus, respectively (2). Female and male Him-Dunkin-Hartley guinea pigs (Institute of Laboratory Animal Science, Veterinary Medicine Vienna, Austria) weighing 350 to 400 g were used for the infection experiments after an acclimatization period of 10 days. The animals were housed in single cages. Food and water were given ad libitum. The experimental protocol was approved by the Ethics Review Committee for Animal Experimentation of the Medical University of Vienna (GZNo. 66.009/0028-BrGT/2005). Prior to infection, guinea pigs were randomized to six different therapy groups (AKACID Plus 0.01% cream, AKACID Plus 0.1% cream, AKACID Plus 0.25% cream, AKACID Plus 0.5% cream, AKACID Plus 1% cream, and mupirocin 2% cream), a placebo group (Ultraphil alone), and an untreated control group. Sixty-eight guinea pigs were included in the study. Animals were anesthetized by intraperitoneal injection of xylazine (5 mg/kg of body weight)-ketamine (100 mg/kg of body weight). The backs of the animals were shaved with electric clippers, followed by wet shaves. To break down the skin integrity of the animals, a 4-cm² round iron stamp was dipped into liquid nitrogen and was applied to the dorsal right and left sides of the animals' backs for 5 s. After 5 min, each locus was inoculated with a fresh overnight bacterial suspension of MRSA 912 in tryptone soy broth (2×10^8 CFU/ml) in a volume of 0.1 ml. The liquid was gently rubbed into the skin with a sterile pipette tip until no more visible fluid was observed. Each animal had two infected areas. Placebo, test, and standard substances (0.2 g of cream per locus) were topically administered three times daily for a period of 7 days, starting 1 day after the initial infection, by which time erythematous lesions had already formed. The two lesions on each animal received either different topical treatment regimens on both sides or one topical treatment on one side and

* Corresponding author. Mailing address: Department of Internal Medicine I, Division of Infectious Diseases and Chemotherapy, Medical University of Vienna, Währinger Gürtel 18-20, 1090 Vienna, Austria. Phone and fax: 431 40400 5200. E-mail: apostolos.georgopoulos@meduniwien.ac.at.

[∇] Published ahead of print on 9 July 2007.

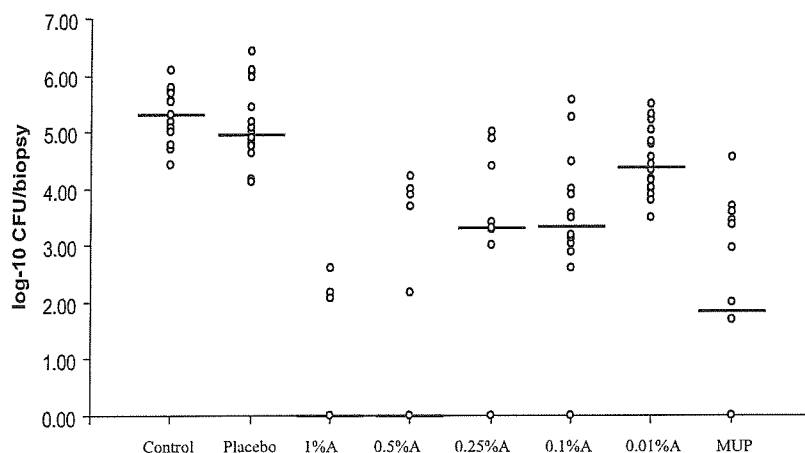


FIG. 1. Culture results for infective skin lesions with MRSA 912 following different therapy regimens with either AKACID Plus (A), mupirocin (MUP), or Ultraphil alone (placebo) compared to results for an untreated control group. The actual bacterial counts per biopsy specimen (\log_{10} CFU/biopsy specimen) are represented by circles for all therapy groups. The median value of the data for each group is shown as a horizontal bar. Sixteen lesions of 16 different guinea pigs per experimental group were investigated.

placebo treatment on the other side or one topical treatment on one side and no treatment on the other side. In accordance with the study protocol, 16 lesions (1 on each of the dorsal right sides of eight guinea pigs and 1 on each of the dorsal left sides of eight other guinea pigs) per therapy group, placebo group, and control group were treated. To evaluate the possible risk of contamination between animals in different cages, two single guinea pigs were shaved and irritated by the ice-cold iron stamp but were not infected. To test the risk of contamination between lesions on same animals, two additional animals received an uninfected lesion on one side and an infected lesion on the other side which was either treated with the placebo or received no treatment.

On day 8 postinfection, 18 to 20 h after the last topical application, the guinea pigs were humanely killed by using an intraperitoneal anesthesia overdose. A part of each infected skin lesion (approximately 5 mm^2) was excised, weighed ($17.3 \text{ mg} \pm 5.1 \text{ mg}$), and homogenized in 1 ml of sterile sodium tryptone solution supplemented with neutralizing substances, i.e., 3% saponin, 3% polysorbate 80, 0.1% histidine, and 0.1% cysteine, as described previously (9). The homogenate was diluted by serial 10-fold dilution, and the diluent was spread on tryptone soy agar supplemented with neutralizing substances to enumerate viable staphylococci. After incubation at 37°C for 48 h, the number of bacterial cells was calculated. Bacterial colonies grown on tryptone soy agar were plated on chromogenic oxacillin resistance screen agar (Oxoid, Hampshire, United Kingdom) (1) to confirm the presence of MRSA.

Actual values of the \log_{10} -transformed data (\log_{10} CFU/biopsy specimen) and corresponding median values are presented in Fig. 1. The log dose-effect curve for AKACID Plus is provided in Fig. 2. For statistical analysis, the \log_{10} -transformed data for the six therapy groups, the placebo group, and the control group (no treatment) were tested for normality using the Kolmogorov-Smirnov test and a probability-probability plot. However, no normality was found in any therapy group. Therefore, the nonparametric Kruskal-Wallis test was used to detect a statistical difference between the different

therapy regimens. To assess the dose-dependent activity of AKACID Plus, pairwise treatment comparisons by the Mann-Whitney U test adjusted for multiplicity by the Bonferroni-Holm method were made for AKACID Plus 1% treatment versus AKACID Plus 0.25% treatment, AKACID Plus 0.5% treatment versus AKACID Plus 0.1% treatment, and AKACID Plus 0.1% treatment versus AKACID Plus 0.01% treatment. All testing was performed at an overall 5% significance level, meaning that *P* values of less than 0.05 were considered statistically significant differences. The SPSS statistical software system (version 12.0 for Windows; SPSS Inc., Chicago, IL) was used for calculations.

One day after the initial infection, each animal showed one skin lesion on the dorsal right and one on the dorsal left side. The lesions were characterized by strictly bordered redness and swelling which resulted from the irritation of the skin surface by the ice-cold iron stamp. On days 5 to 8 postinfection, the erythematous areas with erosions were covered by crusts and scabs. All animals included in the experimental study sur-

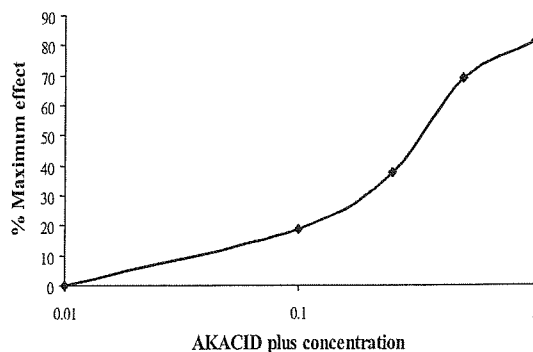


FIG. 2. Log dose-effect curve for AKACID Plus. Percentages of maximum effects of different AKACID Plus concentrations (0.01 to 1%) are defined by the following formula: percentage of negative biopsy cultures \div number of all biopsy samples per therapy group ($n = 16$).

vived during the observation period. In all animals that were shaved and irritated by the ice-cold iron stamp but not infected, the initial reddish lesions disappeared within 5 days. Figure 1 shows the culture results for the infective skin lesions following different therapy regimens with either AKACID Plus, mupirocin, or Ultraphil alone (placebo) compared to the results for an untreated control group for 7 days. Untreated lesions harbored a median value of $5.3 \log_{10}$ CFU/biopsy specimen, with a range of 4.41 to $6.08 \log_{10}$ CFU/biopsy specimen. The placebo (Ultraphil alone) did not influence the bacterial persistence because all biopsy specimens yielded MRSA in the range of 4.13 to $6.42 \log_{10}$ CFU/biopsy specimen. A significant difference ($P < 0.001$) in the numbers of CFU/biopsy specimen was found between different groups (the untreated control and placebo groups) by the Kruskal-Wallis test. After the application of AKACID Plus 0.01% cream, all biopsy specimens were positive for MRSA and viable bacterial counts ranged from 3.48 to $5.48 \log_{10}$ CFU/biopsy specimen. AKACID Plus 0.1% cream could eliminate MRSA in 3 of 16 different biopsy specimens, with a median value of $3.33 \log_{10}$ CFU/biopsy specimen. AKACID Plus 1% cream achieved the highest bacterial activity specimen, with a median value of 0.00 and maximum value of $2.60 \log_{10}$ CFU/biopsy specimen, followed by AKACID Plus 0.5%, with a median value of 0.00 and a maximum value of $4.22 \log_{10}$ CFU/biopsy specimen. AKACID Plus 0.25% killed bacterial cells in 6 of the 16 different biopsy specimens. Treatment with mupirocin 2% cream resulted in a comparable range of bacterial counts (0.00 to $4.56 \log_{10}$ CFU/biopsy specimen). Significant differences in effectiveness were found following treatment with AKACID Plus at concentrations of 1 versus 0.25% ($P = 0.003$), 0.5 versus 0.1% ($P = 0.04$), and 0.1 versus 0.01% ($P = 0.008$). The log dose-log effect curve for AKACID Plus is shown in Fig. 2. No staphylococci were detectable in any of the six uninfected lesions.

In the present guinea pig model of skin infection with MRSA, we demonstrated dose-dependent activity of the novel polymeric guanidine AKACID Plus. AKACID Plus 0.5% cream was found to be as effective as the reference substance, mupirocin 2% cream, for eradicating *S. aureus*. Mupirocin was chosen as the positive control due to topical application in humans and high in vivo activity in *S. aureus* skin models. Gisby and Bryant demonstrated comparable efficacies of local mupirocin therapy and oral antibiotic therapy in a mouse surgical wound model (5). In patients with localized superficial skin infections or in patients colonized by MRSA, topical antibiotics offer a simple, cheap, and sufficient treatment option without systemic side effects. However, for deep-seated skin infections, orally or intravenously applied antibiotics have to be used. Perl et al. showed that prophylactic intranasal application of mupirocin to suppress or eradicate *S. aureus* in patients with postoperative nasal colonization can reduce nosocomial *S. aureus* infections (11). Recently, methicillin-resistant isolates of *S. aureus* and *Staphylococcus epidermidis* have developed increasing resistance to mupirocin (3). Similarly, we evaluated 32-fold increases of the MIC₉₀ of mupirocin against MRSA compared to methicillin-sensitive *S. aureus*, whereas similar MICs for antibiotic-sensitive and multiantibiotic-resistant

strains have been determined for AKACID Plus (2). Walker et al. demonstrated the persistence of mupirocin-resistant MRSA strains after treatment with 2% mupirocin ointment for 5 days, whereas mupirocin remained effective against mupirocin-sensitive MRSA (14). The results of our preclinical study of guinea pigs suggest that AKACID Plus 0.5% cream is a potent substance and might be a possible alternative to mupirocin 2% cream in the topical treatment of skin infections with MRSA. Additional investigations concerning safety, the optimal duration of therapy and the optimal cream or solution vehicle and assessment of the emergence of resistance to AKACID Plus during therapy will be necessary to clarify the significance of AKACID Plus in the treatment of *S. aureus* skin infections in the future.

We thank Waltraud Schmidt for excellent technical advice and H. Fuehrer for statistical advice.

REFERENCES

1. Apfalter, P., O. Assadian, A. Kalczyk, V. Lindenmann, A. Makristathis, S. Mustafa, M. Rotter, and A. M. Hirschl. 2002. Performance of a new chromogenic oxacillin resistance screen medium (OXOID) in the detection and presumptive identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 44:209–211.
2. Buxbaum, A., C. Kratzer, W. Graninger, and A. Georgopoulos. 2006. Antimicrobial and toxicological profile of the new biocide Akacid Plus. *J. Antimicrob. Chemother.* 58:193–197.
3. Deshpande, L. M., A. M. Fix, M. A. Pfaller, and R. N. Jones. 2002. Emerging elevated mupirocin resistance rates among staphylococcal isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2000): correlations of results from disk diffusion, Etest and reference dilution methods. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 42:283–290.
4. Gilbert, P., and L. E. Moore. 2005. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J. Appl. Microbiol.* 99:703–715.
5. Gisby, J., and J. Bryant. 2000. Efficacy of a new cream formulation of mupirocin: comparison with oral and topical agents in experimental skin infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:255–260.
6. Kerschner, H., A. Georgopoulos, J. Wernisch, and W. Binder. 2005. Aspects of the mode of action of the novel biocide Akacid Forte on *E. coli*, abstr. P487. 15th Eur. Cong. Clin. Microbiol. Infect., Copenhagen, Denmark, 2 to 5 April 2005.
7. Kratzer, C., S. Tobudic, M. Schmoll, W. Graninger, and A. Georgopoulos. 2006. In vitro activity and synergism of amphotericin B, azoles and cationic antimicrobials against the emerging pathogen *Trichoderma* spp. *J. Antimicrob. Chemother.* 58:1058–1061.
8. Kratzer, C., S. Tobudic, O. Assadian, A. Buxbaum, W. Graninger, and A. Georgopoulos. 2006. Validation of AKACID Plus as a room disinfectant in the hospital setting. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:3826–3831.
9. Kratzer, C., S. Tobudic, W. Graninger, A. Buxbaum, and A. Georgopoulos. 2006. In vitro antimicrobial activity of the novel polymeric guanidine Akacid Plus. *J. Hosp. Infect.* 63:316–322.
10. Neuwirt, H., H. Muller, I. T. Cavarretta, M. Tiefenthaler, G. Bartsch, G. Konwalinka, and Z. Culig. 2006. Akacid-medical-formulation, a novel biocidal oligoguanidine with antitumor activity reduces S-phase in prostate cancer cell lines through the Erk 1/2 mitogen-activated protein kinase pathway. *Int. J. Oncol.* 29:503–512.
11. Perl, T. M., J. J. Cullen, R. P. Wenzel, M. B. Zimmerman, M. A. Pfaller, D. Sheppard, J. Twombly, P. P. French, and L. A. Herwaldt. 2002. Intranasal mupirocin to prevent postoperative *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* 346:1871–1877.
12. Razzaghi-Abyaneh, M., M. Shams-Ghahfarokhi, M. Kawachi, A. Estamifar, O. J. Schmidt, A. Schmidt, A. Allameh, and T. Yoshinari. 2006. Ultrastructural evidences of growth inhibitory effects of a novel biocide, Akacid(plus), on an aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. *Toxicon* 48:1075–1082.
13. Tobudic, S., C. Kratzer, A. Georgopoulos, and W. Graninger. 2006. Efficacy of new polymeric guanidine against yeasts and filamentous fungi, abstr. M-310, 46th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., San Francisco, CA, 27 to 30 September 2006.
14. Walker, E. S., J. E. Vasquez, R. Dula, H. Bullock, and F. A. Sarubbi. 2003. Mupirocin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: does mupirocin remain effective? *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 24:342–346.

Validation of AKACID Plus as a Room Disinfectant in the Hospital Setting

Christina Kratzer,¹ Selma Tobudic,¹ Ojan Assadian,² Astrid Buxbaum,¹ Wolfgang Graninger,¹ and Apostolos Georgopoulos^{1*}

Department of Internal Medicine I, Division of Infectious Diseases and Chemotherapy,¹ and Clinical Institute for Hygiene and Medical Microbiology,² Medical University of Vienna, Währinger Gürtel 18-20, 1090 Vienna, Austria

Received 15 February 2006/Accepted 13 March 2006

AKACID Plus, a novel polymeric guanidine with broad antimicrobial activity against multiantibiotic-resistant bacterial strains, was used in the present study as a room disinfectant. Disinfection of closed rooms experimentally contaminated with antibiotic-susceptible and multiresistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli* was performed using AKACID Plus at concentrations of 0.1, 0.25, and 0.5% for 100 min. Bacterial suspensions were distributed on plastic and stainless steel plates and placed in a test room. Recovery of the test microorganisms was determined before nebulizing, 60 and 100 min after initiation, and 4 h after the end of room disinfection by a simple swab-rinse technique. The swab-rinse method demonstrated a dose- and time-dependent effectiveness of AKACID Plus in eradicating *S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa* on plastic and stainless steel plates. Nebulized 0.5% AKACID Plus was successful in eliminating all hospital pathogens within 340 min. After the use of 0.25% AKACID Plus, MRSA was still detectable on microbial carrier plates. The test concentration of 0.1% AKACID Plus achieved a significant reduction of *S. aureus* and *P. aeruginosa* on plastic and stainless steel plates but was sufficient to eradicate only *E. coli*. These results suggest that nebulized AKACID Plus at a concentration of 0.5% is a potent substance for eradication of pathogenic organisms in the hospital setting.

Data from the World Health Organization show that in the United States some 14,000 individuals are infected and die each year as a result of drug-resistant microbes acquired in hospitals. In intensive care units, nosocomial infections increase the total costs by \$3,306 and the length of stay by 18.2 days per patient (3). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and multiresistant gram-negative rods are wreaking havoc in hospital wards around the world (24). Herr et al. (12) determined additional costs of hygiene measures (barrier precautions, isolation, and decontamination) required for MRSA carriers in German hospitals by averaging 372 euros for one MRSA patient hospital-day and 9,263 euros per MRSA case. Already, MRSA and extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* have spread outside hospitals. The epidemic spread of resistant bacteria and resistance genes is supported primarily by selection of resistant microorganisms by frequent application of antimicrobial agents, inadequate or inappropriate therapy, use of broad-spectrum antibiotics as growth promoters for animal foods and as pesticides for agriculture (16), and, because of lack of general hygiene measures, transmission of hospital strains to other patients and medical staff (2, 10, 18, 20).

Clearly, preventive measures for the termination of this mode of selection and transmission are of vital importance. In hospital and health care settings, antiseptics and disinfectants are essential tools for infection control and aid in prevention of nosocomial infections (5, 9). By acting rapidly, disinfectants

can prevent the spread of antibiotic-resistant pathogens (4). It has been postulated that room disinfection in hospital settings is an important measure in the prevention of colonization and new infections.

The novel polymeric guanidine AKACID Plus is a new member of the cationic family of disinfectants. It shows high water solubility with broad in vitro activity against gram-positive and gram-negative bacteria and fungi. Recently, we have demonstrated bactericidal activity of AKACID Plus in basic and extended quantitative suspension tests against bacterial quality control strains (15). Moreover, similar MICs were determined for antibiotic-sensitive and multiantibiotic-resistant bacterial strains, whereas the MIC₉₀s of chlorhexidine and mupirocin showed 4-fold and 32-fold increases for MRSA, respectively, in comparison to methicillin-sensitive *S. aureus* (A. Buxbaum, C. Kratzer, W. Graninger, and A. Georgopoulos, submitted for publication). The aim of the present study was to evaluate the antimicrobial activities of different concentrations of AKACID Plus for disinfection of closed rooms, which had been experimentally contaminated by antibiotic-susceptible and multiresistant *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli*, by a simple swab-rinse technique.

MATERIALS AND METHODS

Disinfectant and neutralizing solutions. A stock solution of AKACID Plus, a 3:1 mixture of poly(hexamethylen-guanidinium-chloride) and poly[2-(2-ethoxy)-ethoxyethyl]-guanidinium-chloride as a 25% (vol/vol) aqueous solution (Ch. 1007; POC, Vienna, Austria), was used and diluted with tap water to the desired concentrations of 0.1, 0.25, and 0.5%, vol/vol (pH 6.5). Sodium tryptone solution supplemented with neutralizing substances, i.e., 3% (wt/wt) saponin (VWR International, Fontenay sous Bois, France), 3% (wt/wt) polysorbate 80 (Merck, Hohenbrunn, Germany), 0.1% (wt/wt) histidine (Fluka, Buchs, Switzerland), and 0.1% (wt/wt) cysteine (Fluka), was used as a neutralizer as described previously (15).

* Corresponding author. Mailing address: Department of Internal Medicine I, Division of Infectious Diseases and Chemotherapy, Medical University of Vienna, Währinger Gürtel 18-20, 1090 Vienna, Austria. Phone: 431 40400 5139. Fax: 431 40400 5200. E-mail: apostolos.georgopoulos@meduniwien.ac.at.

Microorganisms. For activity testing, *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 15442, and *E. coli* ATCC 10536 were selected. The multiantibiotic-resistant clinical strains *S. aureus* 9892 (resistant to oxacillin, amoxicillin-clavulanic acid, cefazolin, gentamicin, erythromycin, clindamycin, ciprofloxacin, and mupirocin), *P. aeruginosa* A97261 (resistant to piperacillin-tazobactam, ceftazidime, cefepime, fosfomycin, tobramycin, and ciprofloxacin), and *E. coli* 1905 (resistant to mezlocillin, piperacillin, amoxicillin-clavulanic acid, cefazolin, cefotaxime, cefepime, gentamicin, trimethoprim, and ciprofloxacin) were utilized. These strains were isolated and identified in 2005 at the Department of Internal Medicine I, Division of Infectious Diseases and Chemotherapy, Medical University of Vienna, from wound, respiratory tract, and urinary tract infections.

Preparation of test plates. Plastic boards (6.5 by 5 cm) (Fackelmann, Hersbruck, Germany) and stainless steel plates (5 by 5 cm) served as microbial carriers. Viable ATCC and multiresistant strains of *S. aureus*, *P. aeruginosa*, and *E. coli* were used as test organisms. Following the procedure of the European basic quantitative suspension test (6), bacteria were grown on tryptone soy agar (TSA) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, United Kingdom) for 24 h and transferred to TSA for another 24 h. The test bacteria were then suspended in sodium tryptone solution to an optical density at 620 nm corresponding to a concentration of $(1.5 \times 10^8$ to 5×10^8 CFU/ml). One hundred microliters of the phase 1 standard test suspension was inoculated onto the hard surfaces and evenly disturbed with a sterile glass spatula. A single test plate was contaminated with the test suspension of only one test strain. Microbial carriers were dried for 1 h in a laminar airflow cabinet at a room temperature of 20 to 22°C and a relative humidity ranging from 45 to 60%.

Room disinfection in the test room. In order to evaluate the activity of AKACID Plus as a room disinfectant, a test room of approximately 41 m³ was chosen. Medical devices and equipment were left in the room. The inlet and outlet vents of the air-conditioning system were sealed with adhesive tape, and the door and windows were closed. For each test strain, microbial carrier plates were placed in a floor corner, below the table, on the work space, and on the cupboard. After the bacterial carriers were placed, 5 liters of liquid containing 0.1, 0.25, or 0.5% AKACID Plus solution or 5 liters of liquid alone (AKACID Plus-free control) was poured in a FONTAN Portastar ULV aerosol applicator (Swingtec, Isny, Germany), which produces a droplet size of 2 to 20 µm. Nebulizing with gaseous AKACID Plus or water alone was performed for 100 min.

Recovery of the test bacteria. To evaluate the antimicrobial activity of AKACID Plus, the survival of the test bacteria was determined before nebulizing (time point 0) and at 60 (time point 1) and 100 (time point 2) min after the initiation and 4 h after the end (time point 3) of room disinfection in the test room, using a simple swab-rinse technique with neutralizing solution. For this detection method, 1.5 ml neutralizing solution was transferred onto each test surface. With this fluid and a premoistened cotton swab, the test area was systematically abraded for 15 s, 0.5-ml amounts of the neutralizing solution were collected, and 10-fold dilutions in neutralizing solution were prepared and plated on TSA containing neutralizing substances. Swab-rinse cultures were incubated for 48 to 72 h at 37°C. Bacterial colonies on TSA were distinguished on the basis of different morphology (size and color of the colonies). To confirm the presence of *S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa*, bacterial cells were cultured on blood agar and identified by biochemical tests (API Staph, API 20E, and API 20NE).

Data and statistical analysis. The reduction of the number of viable bacterial cells (CFU/plate) was described by arithmetic means and standard deviations from three individual experiments for 0.1, 0.25, and 0.5% AKACID Plus in comparison to the biocide-free control at three different time points (60 and 100 min after the initiation and 4 h after the end of room disinfection) on plastic and stainless steel plates. Differences between the selected concentrations and the biocide-free control were assessed with Student's *t* test for independent samples. If significance was achieved, the multiple comparison of means was performed using the Bonferroni-Holm correction; the multiple-comparison significance level was ≤ 0.05 .

RESULTS

Room disinfection with 0.1, 0.25, and 0.5% AKACID Plus. Three room disinfection trials with 0.1, 0.25, and 0.5% AKACID Plus and with the biocide-free control were performed with antibiotic-sensitive and multiresistant strains of *S. aureus* (Fig. 1), *E. coli* (Fig. 2), and *P. aeruginosa* (Fig. 3) applied on stainless steel and plastic plates. In the presence and absence of AKACID Plus, the temperature and relative humidity in the test room increased from 21 to 23°C and 40 to

60% humidity to 24 to 25°C and 85 to 100% humidity during the nebulizing procedure. Four hours after the end of nebulizing, the relative humidity reached the initial value again, while the temperature was still elevated. Recovery of the tested strains from steel and plastic plates was evaluated before nebulizing and at 60 and 100 min after the initiation and 4 h after the end of room disinfection by a swab-rinse technique. At time point 0 (before room disinfection) 1.2×10^6 to 1.0×10^7 CFU of *S. aureus*, 6.0×10^5 to 2.2×10^6 CFU of *E. coli*, and 2.0×10^5 to 1.5×10^6 CFU of *P. aeruginosa* were detectable on stainless steel plates and 5.0×10^5 to 4.8×10^6 CFU of *S. aureus*, 2.5×10^5 to 1.3×10^6 CFU of *E. coli*, and 1.5×10^5 to 1.0×10^6 CFU of *P. aeruginosa* were detectable on plastic plates. In the absence of AKACID Plus, a moderate reduction of the bacterial count of $<1 \log_{10}$ unit was seen for *S. aureus* (Fig. 1) at 4 h after the end of nebulizing, whereas a reduction of 1 to 3 \log_{10} units was detected for the gram-negative test organisms (Fig. 2 and 3) on plastic and stainless steel plates.

Room disinfection with 0.5% AKACID Plus was successful in eliminating all tested pathogens (lower detection limit, 3 CFU/plate) on stainless steel and plastic plates within 340 min. On plastic plates, both strains of *S. aureus* ($P = 0.006$) and *E. coli* ($P = 0.005$ to 0.008) were killed within 60 min, while *P. aeruginosa* required a longer exposure for 340 min. On stainless steel plates, *E. coli* ($P = 0.007$) was eliminated within 60 min. In contrast, ATCC and antibiotic-resistant strains of *P. aeruginosa* ($P = 0.005$ to 0.007) and *S. aureus* ($P < 0.001$ to 0.002) were still detectable on steel plates after nebulization of AKACID Plus for 100 min ($\sim 10^1$ CFU/plate), but they were eradicated within 340 min.

Four hours after nebulization, 0.25% AKACID Plus stainless steel and plastic plates still yielded 6.0×10^1 to 1.2×10^2 bacterial cells of MRSA strain 9892 ($P = 0.002$ to 0.003), whereas the gram-negative microorganisms were not detectable on test materials regardless of their antibiotic susceptibility.

The test concentration of 0.1% AKACID Plus achieved a significant reduction of *S. aureus* ($P = 0.002$ to 0.005) and *P. aeruginosa* ($P = 0.006$ to 0.007) on bacterial carriers but was sufficient to eradicate only *E. coli* ($P = 0.003$ to 0.005) within 340 min.

DISCUSSION

AKACID Plus, a mixture of two different polymeric guanidine compounds (Chemical Abstracts Service registry no. 374572-91-5 and 57028-96-3), is a new commercial product of an Austrian company and is registered in the European Union. The present study demonstrates the activity of AKACID Plus as a room disinfectant of closed rooms contaminated with antibiotic-susceptible and multiresistant strains of *S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa*. Disinfectants currently validated for room disinfection achieve high antimicrobial activity but also have high toxicity. Therefore, safety guidelines have to be considered. At present the only accepted method available for decontaminating a biological safety cabinet is to use formaldehyde gas (7, 17). Formaldehyde is highly effective against bacteria, viruses, bacterial toxins, and spores (21) but also is highly toxic (23). Formaldehyde gas has a pungent, irritating odor that is detectable even at very low concentrations (below 1

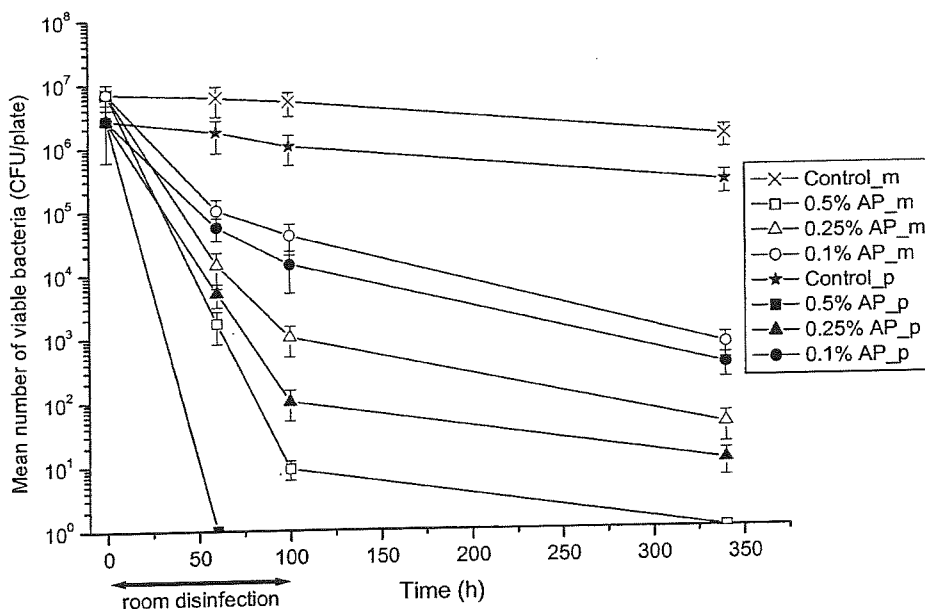
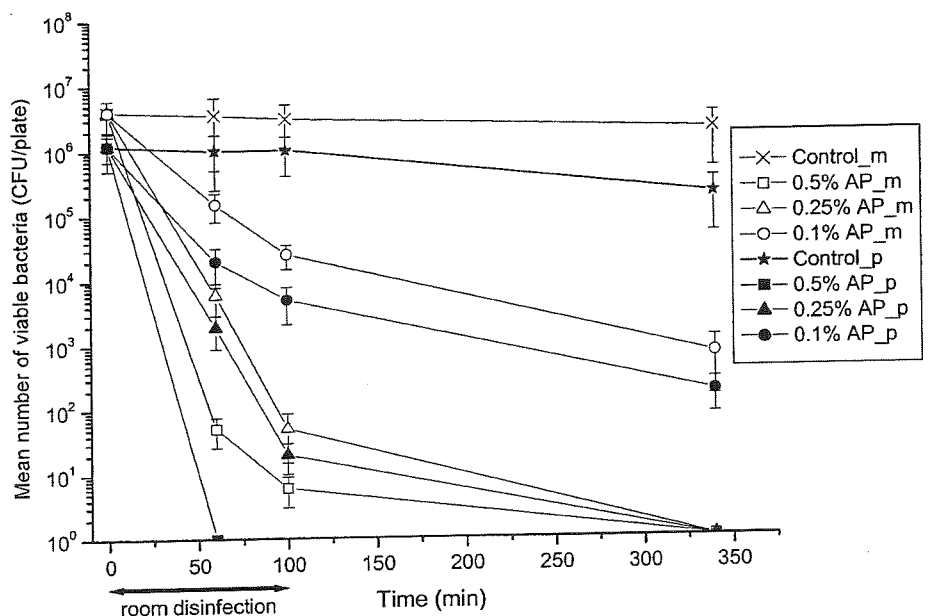


FIG. 1. Time-dependent bacterial reduction of the ATCC strain (top) and the multiantibiotic-resistant strain 9892 (bottom) of *S. aureus* on stainless steel (m) and plastic (p) plates after the use of 0.5, 0.25, and 0.1% AKACID Plus (AP) in comparison to an AKACID Plus-free control on steel and plastic plates, determined by the swab-rinse technique. Results represent averages for four samples \pm 1 standard deviation for three independent experiments.

ppm) and can cause irritation of the eye, skin, and respiratory tract even at low levels for short periods. Its vapor is between 7% and 73% flammable at room temperature, and it is explosive in the presence of strong oxidizers (1). Hydrogen peroxide

vapor, which is highly active as a room disinfectant against MRSA (8), *Clostridium botulinum* spores (13), and *Mycobacterium tuberculosis* (14), also requires exact surveillance of the gas concentration throughout the decontamination cycle due

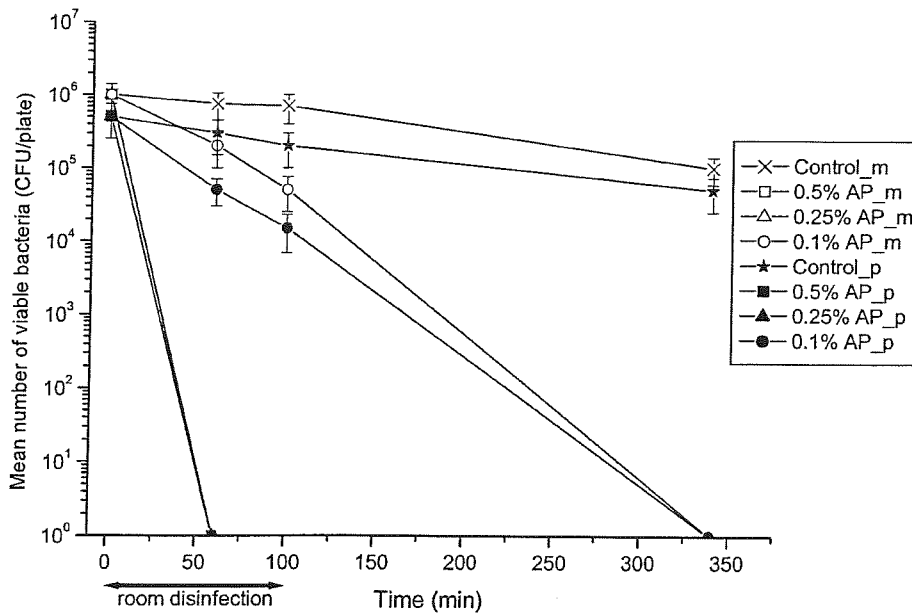
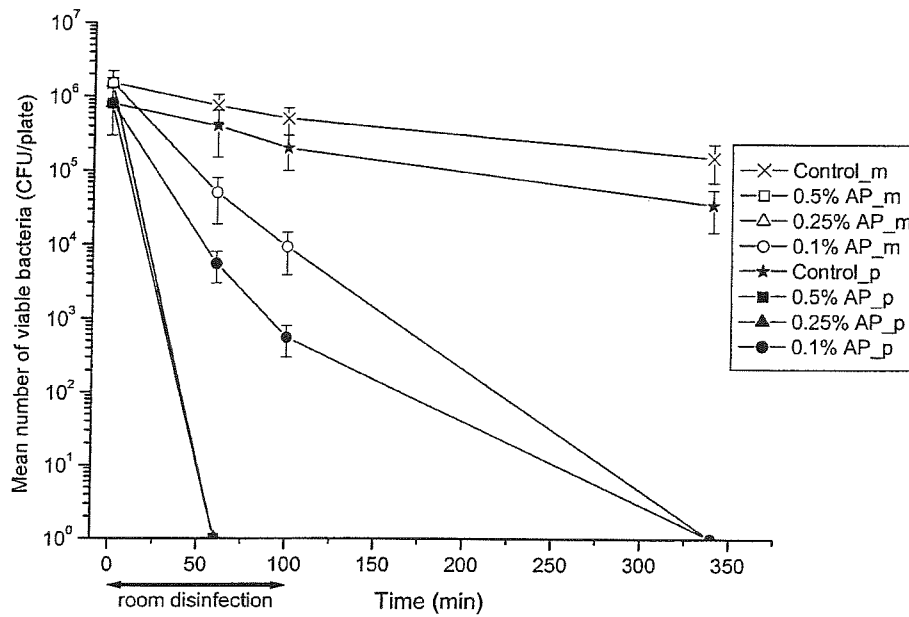


FIG. 2. Time-dependent bacterial reduction of the ATCC strain (top) and the multiantibiotic-resistant strain 1905 (bottom) of *E. coli* on stainless steel (m) and plastic (p) plates after the use of 0.5, 0.25, and 0.1% AKACID Plus (AP) in comparison to an AKACID Plus-free control on steel and plastic plates, determined by the swab-rinse technique. Results represent averages for four samples \pm 1 standard deviation for three independent experiments.

to its corrosive and toxic properties (22). In contrast, the well-known cationic antimicrobials such as benzalkonium chloride, chlorhexidine, and polyhexamethylene biguanide combine a broad antimicrobial activity and a low toxicity profile (11).

Similarly, low toxicity of AKACID Plus was detected in toxicological animal experiments. In an acute oral toxicity study and an acute dermal toxicity study with rats, a median lethal dose of AKACID Plus of $>2,000$ mg/kg body weight was de-

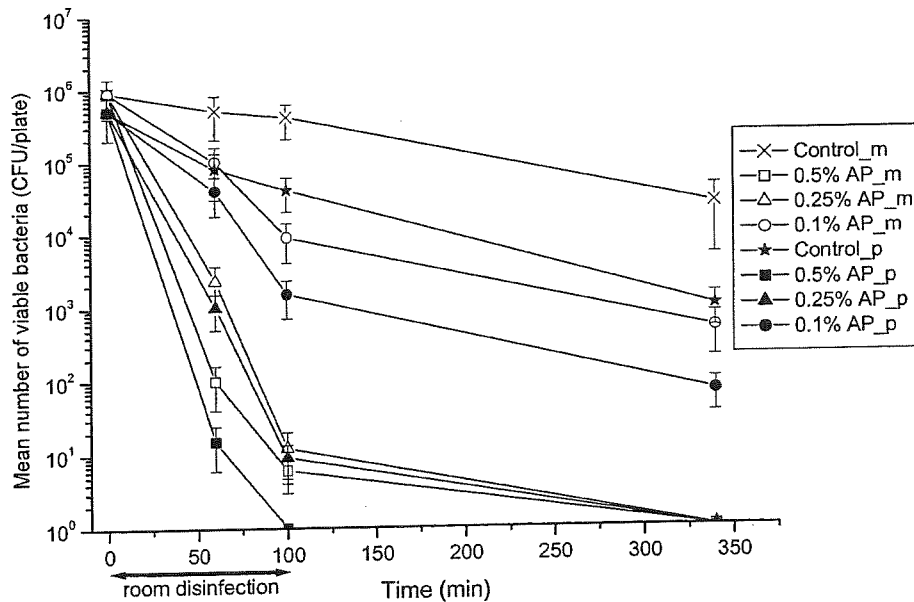
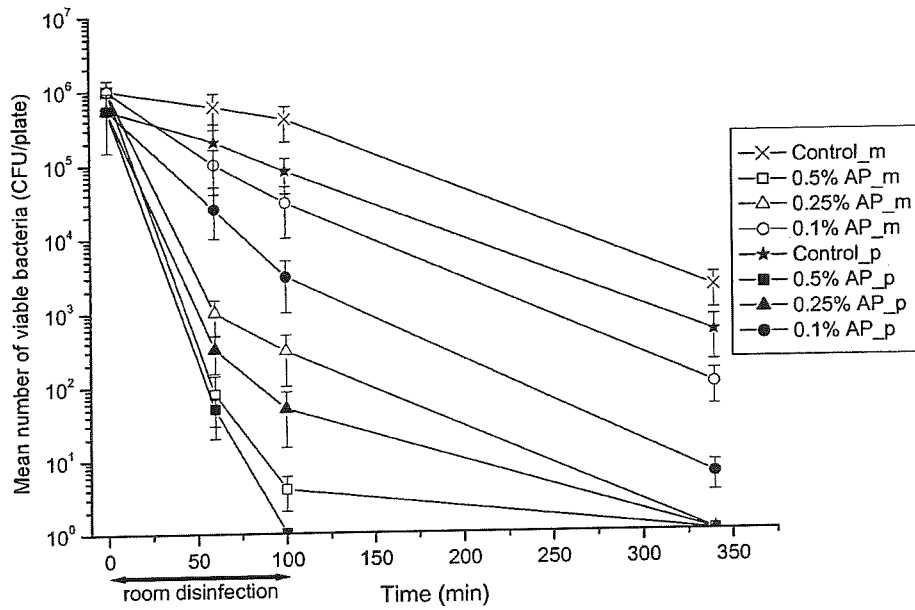


FIG. 3. Time-dependent bacterial reduction of the ATCC strain (top) and the multiantibiotic-resistant strain A9726I (bottom) of *P. aeruginosa* on stainless steel (m) and plastic (p) plates after the use of 0.5, 0.25, and 0.1% AKACID Plus (AP) in comparison to an AKACID Plus-free control on steel and plastic plates, determined by the swab-rinse technique. Results represent averages for four samples \pm 1 standard deviation for three independent experiments.

terminated. An acute dermal irritation/corrosion study did not reveal any irritating or corrosive properties of the novel polymeric guanidine (Buxbaum et al., submitted). AKACID Plus is a safe, nonflammable, nonexplosive, and odorless substance.

Patients in hospital side rooms in direct vicinity to the contaminated room are not disturbed or endangered during the disinfection process. Due to its low toxicity and noncorrosive properties, there was no need for preparations such as protec-

tion of medical devices and computer monitors or sealing of doors with adhesive tape when nebulizing was performed.

To evaluate the antimicrobial activity of AKACID Plus, quantitative cultures of experimentally contaminated stainless steel and plastic plates were performed by a simple swab-rinse technique with neutralizing solution. The detection method demonstrated a dose-dependent and time-dependent activity of nebulized AKACID Plus. All in-door controls of the bacterial pathogens applied on the stainless steel plates tended to reach higher bacterial counts than those on plastic plates. Although Neely (19) has shown a short survival time (only 1 to 7 h) for *E. coli* and *P. aeruginosa* on fabrics and plastics used in hospitals, in the present study viable bacterial cells on test materials were detectable during the whole nebulization and exposure to the AKACID Plus-free control. Nevertheless, the stainless steel and plastic plates yielded higher counts of *S. aureus* than of the gram-negative microorganisms.

The 0.5% AKACID Plus solution was active in eradicating most tested pathogens within 100 min; $\sim 10^1$ CFU of *S. aureus* ATCC 6538 and MRSA strain 9892 were still detectable on stainless steel plates. Further exposure for 4 h was required to eliminate all bacterial strains. Complete room disinfection takes on average less than 6 h.

Due to its cationic nature, AKACID Plus can be inactivated by the presence of anionic soaps. Therefore, the conventional terminal cleaning must be performed not before the nebulization but following the complete disinfection procedure.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Karin Stich of the Clinical Department for Infectious Diseases and Chemotherapy for excellent technical advice.

REFERENCES

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2004. Medical management guidelines for formaldehyde. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, Ga. [Online.] <http://www.atsdr.cdc.gov/MHMI/mmg111.html>.
- Asoh, N., H. Masaki, H. Watanabe, K. Watanabe, H. Mitsusima, K. Matsumoto, K. Oishi, and T. Nagatake. 2005. Molecular characterization of the transmission between the colonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to human and environmental contamination in geriatric long-term care wards. *Intern. Med.* 44:41–45.
- Chen, Y. Y., Y. C. Chou, and P. Chou. 2005. Impact of nosocomial infection on cost of illness and length of stay in intensive care units. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 26:281–287.
- Cozard, A., and R. D. Jones. 2003. Disinfection and the prevention of infectious disease. *Am. J. Infect. Control* 31:243–254.
- Dettenkofer, M., and C. Block. 2005. Hospital disinfection: efficacy and safety issues. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 18:320–325.
- European Committee for Standardization. 1997. European standard EN 1040: chemical disinfectants and antiseptics. Basic bactericidal activity. Test method and requirements (phase 1). CEN, Brussels, Belgium.
- Fink, R., D. F. Liberman, K. Murphy, D. Lupo, and E. Israeli. 1988. Biological safety cabinets, decontamination or sterilization with paraformaldehyde. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 49:277–279.
- French, G. L., J. A. Otter, K. P. Shannon, N. M. T. Adams, D. Watling, and M. J. Parks. 2004. Tackling contamination of the hospital environment by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a comparison between conventional terminal cleaning and hydrogen peroxide vapour decontamination. *J. Hosp. Infect.* 57:31–37.
- Gastmeier, P. 2004. Nosocomial infection surveillance and control policies. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 17:295–301.
- Geffers, C., and B. M. Farr. 2005. Risk of transmission of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from patients colonized with MRSA. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 26:114–115.
- Gilbert, P., and L. E. Moore. 2005. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J. Appl. Microbiol.* 99:703–715.
- Herr, C. E. W., T. H. Heckrodt, F. A. Hofmann, R. Schnettler, and T. F. Eikmann. 2003. Additional costs for preventing the spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and a strategy for reducing these costs on a surgical ward. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 24:673–678.
- Johnston, M. D., S. Lawson, and J. A. Otter. 2005. Evaluation of hydrogen peroxide vapour as a method for the decontamination of surfaces contaminated with *Clostridium botulinum* spores. *J. Microbiol. Methods* 60:403–411.
- Kahnert, A., P. Seiler, M. Stein, B. Aze, G. McDonnell, and S. H. E. Kaufmann. 2005. Decontamination with vaporized hydrogen peroxide is effective against *Mycobacterium tuberculosis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 40:448–452.
- Kratzer, C., S. Tobudic, W. Graninger, A. Buxbaum, and A. Georgopoulos. In vitro antimicrobial activity of the novel polymeric guanidine Akacid plus. *J. Hosp. Infect.*, in press.
- Levy, S. B. 2002. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 49:25–30.
- Munro, K., J. Lanser, and R. Flower. 1999. A comparative study of methods to validate formaldehyde decontamination of biological safety cabinets. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:873–876.
- Muto, C. A., J. A. Jernigan, B. E. Ostrowsky, H. M. Richet, W. R. Jarvis, J. M. Boyce, and B. M. Farr. 2003. SHEA guidelines for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and enterococcus. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 24:362–386.
- Neely, A. N. 2000. A survey of gram-negative bacteria survival on hospital fabrics and plastics. *J. Burn Care Rehab.* 21:523–527.
- Saiman, L., and J. Siegel. 2003. Infection control recommendations for patient with cystic fibrosis: microbiology, important pathogens, and infection control practices to prevent patient-to-patient transmission. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 24(Suppl. 5):S6–S52.
- Taylor, L. A., M. S. Barbeito, and G. G. Gremillion. 1969. Paraformaldehyde for surface sterilization and detoxification. *Appl. Microbiol.* 17:614–618.
- Watt, B. E., A. T. Proudfoot, and J. A. Vale. 2004. Hydrogen peroxide poisoning. *Toxicol. Rev.* 23:51–57.
- Wiedemann, C. L. 1994. Formaldehyde toxicity. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 78:554–555.
- World Health Organization. 2000. The big guns of resistance, chapter 4. *In Infectious disease report 2000*. World Health Organization, Geneva, Switzerland. [Online.] <http://www.who.int/infectious-disease-report/2000/>.

Antimicrobial and toxicological profile of the new biocide Akacid plus®

Astrid Buxbaum, Christina Kratzer, Wolfgang Graninger and Apostolos Georgopoulos*

Department of Internal Medicine I, Division of Infectious Diseases and Chemotherapy,
Medical University of Vienna, Vienna, Austria

Received 1 December 2005; returned 16 January 2006; revised 18 April 2006; accepted 27 April 2006

Objectives: Akacid plus® is a new member of the polymeric guanidine family of disinfectants. It was especially developed to enhance the antimicrobial activity of this class with significantly less toxicity. The *in vitro* activity of Akacid plus® compared with chlorhexidine digluconate and mupirocin was tested against a total of 369 recent clinical isolates.

Methods: The organisms tested by CLSI reference methods included the following: *Staphylococcus aureus* (98), *Staphylococcus epidermidis* (9), *Bacillus* spp. (2), *Enterococcus faecalis* (32), *Klebsiella* spp. (45), *Enterobacter* spp. (20), *Escherichia coli* (65), *Salmonella* spp. (6), *Shigella* spp. (2), *Yersinia enterocolitica* (1), *Acinetobacter* spp. (4), *Proteus* spp. (7), *Pseudomonas aeruginosa* (59), *Stenotrophomonas maltophilia* (4), *Candida* spp. (10) and *Aspergillus* spp. (7). *In vitro* selection of resistance to Akacid plus® was carried out on 24 strains. Toxicological analyses were also performed.

Results: All tested agents were more effective against *Staphylococcus* spp. and *Bacillus* spp. than against *E. faecalis* and Gram-negative bacteria. The MIC₉₀s of chlorhexidine and mupirocin showed a 4-fold and 32-fold increase for methicillin-resistant *S. aureus* in comparison with methicillin-susceptible strains, while MIC values of Akacid plus® were similar for antibiotic-susceptible and multiresistant strains. Bactericidal action of Akacid plus® was observed at 1–2× MIC. The *in vitro* selection of resistance test showed no increase in MIC values of Akacid plus® for any isolate after 30 passages. In addition, Akacid plus® showed low oral and dermal toxicity.

Conclusions: These preliminary results demonstrate the broad antimicrobial properties of Akacid plus®, which makes it a promising tool for topical application in the prophylaxis and treatment of bacterial and fungal infections.

Keywords: bactericidal, resistance, toxicity

Introduction

The discovery and application of antimicrobial chemotherapy and the use of biocides in the form of antiseptics and disinfectants, particularly in the latter half of the twentieth century, allowed control over most infectious diseases. The emergence of bacterial resistance to antimicrobial agents began shortly after their introduction to clinical practice and has developed rapidly and increasingly throughout the 1990s.¹

Biocides are clearly different from antibiotics in their mode of action, in their condition of use and in their respective acquired and intrinsic mechanisms by which bacteria resist their toxic effects, and they often display non-specific killing. In the face

of multiresistant infectious-disease organisms that are difficult and, sometimes, impossible to treat, the search for new agents that do not select for resistant clones becomes ever more important.²

However, this issue has been further complicated by the finding that, as for antibiotics, intensive exposure of hospital pathogens to biocides may result in the emergence of resistance to these agents. Evidence for reduced susceptibility to biocides from exposure to these agents has been both laboratory based³ and observed in the field.⁴

Akacid plus® is a new member of the polymeric guanidine family of disinfectants. It was especially developed to enhance the antimicrobial activity of this class with significantly less

*Corresponding author. Tel: +43-1-40400/5139; Fax: +43-1-40400/5200; E-mail: apostolos.georgopoulos@meduniwien.ac.at

toxicity. This paper evaluates the antimicrobial profile of Akacid plus® in comparison with chlorhexidine digluconate (due to its widespread use) and mupirocin [due to its topical use in the hospital setting against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)], its toxicity and the potential for induction of resistance to Akacid plus®.

Materials and methods

Bacteria

A total of 369 recent clinical isolates were tested from patients with documented infections in hospitals located in Austria. The distribution of species and strain counts was as follows: methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) (36); MRSA (62); methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) (9); vancomycin-susceptible *Enterococcus faecalis* (27); vancomycin-resistant *E. faecalis* (VRE) (5); *Klebsiella* spp. (45, 15.5% ESBLs); *Enterobacter* spp. (20); *Escherichia coli* (65, 13.8% ESBLs) *Salmonella* spp. (6), *Shigella* spp. (2); *Yersinia enterocolitica* (1); *Acinetobacter* spp. (4); *Proteus* spp. (7); *Pseudomonas aeruginosa* (59, 28.8% ESBLs); *Stenotrophomonas maltophilia* (4); *Candida* spp. (10); *Aspergillus* spp. (7). Identifications were performed using the API system. In addition, *Bacillus subtilis* (spore suspension for the inhibitor test, Merck) and *Bacillus anthracis* CH10 (anthrax spores Merck reg. no. G112/WET/ACT 36/47) were tested.

Active substances

A stock solution of Akacid plus®, a 3:1 mixture of poly-(hexamethylen-guanidinium-chloride) and poly-[2-(2-ethoxy)-ethoxyethyl]-guanidinium-chloride] (Ch. 1007, POC), as 25% aqueous solution was used and diluted with sterile distilled water to the desired concentrations. Chlorhexidine digluconate 20% (Sigma, St Louis, MO, USA) and mupirocin powder (Smith Kline Beecham, London, UK) were selected as reference substances.

Susceptibility testing

To assess the antimicrobial activity of Akacid plus® in comparison with chlorhexidine and mupirocin, MICs were determined using the CLSI broth microdilution method with Mueller–Hinton broth.⁵ For fungal testing 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid-buffered RPMI 1640 medium was used.^{6,7} MIC endpoints were read as the lowest concentration of antimicrobial that totally inhibited macroscopically visible growth of the inoculum. Quality control was provided by the concurrent testing of ATCC strains. MBCs of Akacid plus® were determined by methods published by the CLSI.⁸ All susceptibility tests were performed in duplicate.

Killing curves for Akacid plus® were carried out on *S. aureus* ATCC 29213 and *E. coli* ATCC 35218. Concentrations of Akacid plus® at 0.5×, 1×, 2× and 4× MIC were used and monitored at time point 0 and at 5 min, 30 min, 2 h, 6 h and 24 h. Three independent experiments were performed per strain.

In vitro selection of resistance

In vitro selection of resistance to Akacid plus® was carried out on 24 strains: MSSA (1), MRSA (2), MRSE (4), VRE (5), *Klebsiella* spp. (2), *E. coli* (4, 50% ESBLs), *P. aeruginosa* (4, 50% ESBLs) and *Acinetobacter* spp. (2 strains). The broth selection method described by Markopoulos *et al.*⁹ was used for the experiments. Thirty passages of each test isolate were performed. All tests were performed in triplicate for each isolate. If the three replicates differed at the end of all cycles, the highest MIC was taken as the result.

Toxicological studies

The toxicological studies were performed at the Toxicology Department of ARC Seibersdorf Research GmbH (Seibersdorf, Austria). The approval numbers for the animal experiments are LF1-TVG-5/025-2002 and LF1-TVG-5/024-2002.

The acute toxic effects of Akacid plus® after a single peroral administration to rats were determined according to EU method B.1.¹⁰ Initially the study was carried out with one group consisting of three female animals given a dose of 200 mg of active ingredient per kg of body weight. Based on these observation results the dose was increased to 2000 mg/kg of body weight. All rats were killed by inhalation of CO₂ on day 14 and subjected to a gross necropsy examination.

The acute toxic effects of Akacid plus® after a single dermal administration to rats were investigated according to EU method B.3.¹¹ Akacid plus® at a dose of 2000 mg/kg of body weight was administered once dermally on an area of ~5 × 6 cm on the dorsal thoracal region of five male and five female CRL:CD(SD) BR Sprague Dawley rats from Charles River Wiga (Germany) and the duration of the exposure was 24 h. They were killed by inhalation of CO₂ after 14 days and subjected to a necropsy including a gross pathological examination.

To examine a possible irritation or corrosion by Akacid plus® following a single application to the intact skin of rabbits the EU method B.4¹² was performed. The test substance (1.5 g) was spread on cellulose patches in a size of about 2.5 × 2.5 cm and was applied to the intact skin of each of three female New Zealand White rabbits from Charles River Wiga. At the end of the exposure period (4 h) the dressings and the patches were removed. The skin was examined for erythema/eschar and oedema as well as for other local alterations 1, 24, 48 and 72 h after patch removal.

Results

Antimicrobial activity

Table 1 illustrates the activity of Akacid plus® in comparison with chlorhexidine digluconate and mupirocin against ATCC strains and clinical bacterial and fungal isolates. MIC values of chlorhexidine digluconate and mupirocin were comparable to the results obtained by other studies.⁴ Akacid plus® showed good activity against staphylococci with MICs of 0.06–0.5 mg/L, regardless of their susceptibility to oxacillin. The MIC_{90s} of chlorhexidine and mupirocin showed a 4-fold (0.5 to 2 mg/L) and 32-fold (0.25 to 8 mg/L) increase for MRSA in comparison with methicillin-susceptible strains. All tested agents achieved lesser activity against *E. faecalis* (2–128 mg/L), but no difference in the MIC values was detected for vancomycin-susceptible *E. faecalis* and VRE. Potent activity was also observed regarding inhibition of spore germination of *B. subtilis* and *B. anthracis*. All tested substances were less active against Gram-negative bacteria. The testing of clinically relevant fungal species of *Candida* and *Aspergillus* furthermore proved the antifungal efficacy of Akacid plus® and confirmed that of chlorhexidine.

Ten strains, including CLSI quality control strains and clinical isolates of *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. pneumoniae*, *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* were tested to compare Akacid plus® MIC and MBC results. MBC values of Akacid plus® were observed at 1–2× MIC. Killing curves were also carried out using Akacid plus® concentrations at 0.5×, 1×, 2× and 4× the measured organism MIC. Killing curves for *S. aureus* ATCC 29213 and *E. coli* ATCC 35218 (inoculum 10⁶ cfu/mL) are given in Figure 1

Profile of Akacid plus[®], a new biocide

Table 1. MICs of Akacid plus[®] (AP), chlorhexidine digluconate (CHG) and mupirocin (MUP) for clinical strains of bacteria (352), fungi (17) and spores (2)

Species (no. of strains tested)	MIC	(mg/L)			
		AP	CHG	MUP	
MSSA (36)	range	0.06–0.5	0.06–1	0.06–1	
	MIC ₅₀	0.125	0.25	0.125	
	MIC ₉₀	0.25	0.5	0.25	
MRSA (62)	range	0.06–0.5	0.5–2	0.06–>256	
	MIC ₅₀	0.125	2	0.125	
	MIC ₉₀	0.25	2	8	
MRSE (9)	range	0.06–0.25	0.5–2	0.25–0.5	
	<i>E. faecalis</i> (27)	range	2–16	2–16	32–128
	MIC ₅₀	8	8	64	
VRE (5)	MIC ₉₀	16	8	64	
	range	4–16	4–16	32–64	
	Spores of <i>B. subtilis</i> (1)	range	0.125	1	1
Spores of <i>B. anthracis</i> (1)	range	0.125	1	1	
	<i>E. coli</i> (65)	range	1–8	2–8	128–256
	MIC ₅₀	2	2	128	
<i>Klebsiella</i> spp. (45) ^a	MIC ₉₀	4	8	256	
	range	1–8	4–32	32–>256	
	MIC ₅₀	2	8	256	
<i>Enterobacter</i> spp. (20) ^b	MIC ₉₀	8	16	>256	
	range	1–8	8–32	128–>256	
	MIC ₅₀	2	8	256	
<i>P. aeruginosa</i> (59)	MIC ₉₀	8	32	>256	
	range	4–32	8–32	32–>256	
	MIC ₅₀	8	16	>256	
<i>Proteus</i> spp. (7) ^c	MIC ₉₀	32	32	>256	
	range	4–32	8–64	256–>256	
	<i>Salmonella</i> spp. (6) ^d	range	1–2	2–4	128–256
<i>Shigella</i> spp. (2) ^e	range	2–4	1–2	128–256	
	<i>Y. enterocolitica</i> (1)	range	2	32	256
	<i>Acinetobacter</i> spp. (4) ^f	range	1–8	2–32	32–>256
<i>S. maltophilia</i> (4)	range	8–32	16–32	256–>256	
	<i>Candida</i> spp. (10) ^g	range	0.125–4	1–16	32–256
	<i>Aspergillus</i> spp. (7) ^h	range	1–16	8–64	64–>256

^aIncludes *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*.

^bIncludes *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*.

^cIncludes *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*.

^dIncludes *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*.

^eIncludes *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*.

^fIncludes *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter lwoffii*.

^gIncludes *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*.

^hIncludes *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*.

(lower detection limit 5×10^4 cfu/mL). Akacid plus[®] at $\geq 2 \times$ MIC and $1 \times$ MIC eradicated *S. aureus* and *E. coli* within 2 and 5 h.

In vitro selection of resistance

For this test not only susceptible ATCC strains but also multiresistant clinical isolates of Gram-positive and Gram-negative organisms were used. There was no increase in MIC values of Akacid plus[®] for any isolate after 30 passages.

Toxicological studies

The oral and dermal LD₅₀ of Akacid plus[®] in rats was found to be above 2000 mg of active ingredient/kg of body weight. After a single oral administration of Akacid plus[®] at a dose of 200 mg/kg of body weight to female rats, all animals survived and no abnormalities in life were revealed from day 1 until the end of the observation period on day 14. One female and one male rat died on account of the treatment with 2000 mg/kg. The necropsy revealed no pathological abnormalities with exception of animals no. 4 and no. 8. These rats showed light lungs, a flat liver and spleen, and light mucous membranes. After a single dermal administration of Akacid plus[®] at a dose of 2000 mg/kg of body weight all animals survived until the scheduled termination of the study and no toxic effects of the test substance were noted in life. Body weights and body weight gain were inconspicuous during the whole study in all rats, and all animals were normal at the terminal necropsy.

In the acute dermal irritation/corrosion study with rabbits, no general toxic effects of Akacid plus[®] were observed and all exposed skin sites were normal at each examination term.

Discussion

The present study demonstrates the broad antimicrobial profile of Akacid plus[®] in comparison with chlorhexidine, another of the family of cationic antimicrobials, and mupirocin, an antibiotic with high activity against Gram-positive pathogens. MIC values of chlorhexidine digluconate and mupirocin were comparable to the results obtained by other studies.⁴ Previous studies by Irizarry *et al.*¹³ and Suller and Russell¹⁴ detected MRSA strains to be less susceptible than MSSA strains to chlorhexidine, triclosan and quaternary ammonium compounds. Likewise, Kresken *et al.*¹⁵ observed mupirocin resistance almost exclusively in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus* spp. In the present work the MIC₉₀s of chlorhexidine and mupirocin showed a 4-fold and 32-fold increase for MRSA in comparison with methicillin-susceptible strains, while MIC values for Akacid plus[®] were similar for both MRSA and MSSA. Recently, we have evaluated bactericidal activity of Akacid plus[®] 0.1% after exposure for 5 min in basic quantitative suspension tests against quality control strains of *S. aureus*, *Enterococcus hirae*, *E. coli* and *P. aeruginosa*.¹⁶ Additionally, we have shown potent activity of nebulized Akacid plus[®] 0.5% for eradication of antibiotic-susceptible and multiresistant *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli* on hard surfaces.¹⁷ In the absence of neutralizing solution and presence of Akacid plus[®] bacterial cells of *S. aureus* ATCC 29213 and *E. coli* 35218 were eliminated at $1 \times$ MIC within <5 h. A multiple of the MIC of Akacid plus[®] accelerated the eradication of the exposed bacteria.

The increasing use of biocides has also raised concerns about the development of biocide resistance. In the present study we were not able to induce bacterial resistance to Akacid plus[®]. Exposure of subinhibitory concentrations did not result in reduced susceptibility of *Staphylococcus* spp., *Klebsiella* spp., *E. coli*, *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. In contrast, Markopoulos *et al.*⁹ showed significant increases in MICs of teicoplanin for *S. epidermidis* after broth and agar selection methods.

Up to now it was a well-accepted fact that biocidal activity comes at a price; that is to say that high activity equals high toxicity. Chlorhexidine, which is registered as a disinfectant and

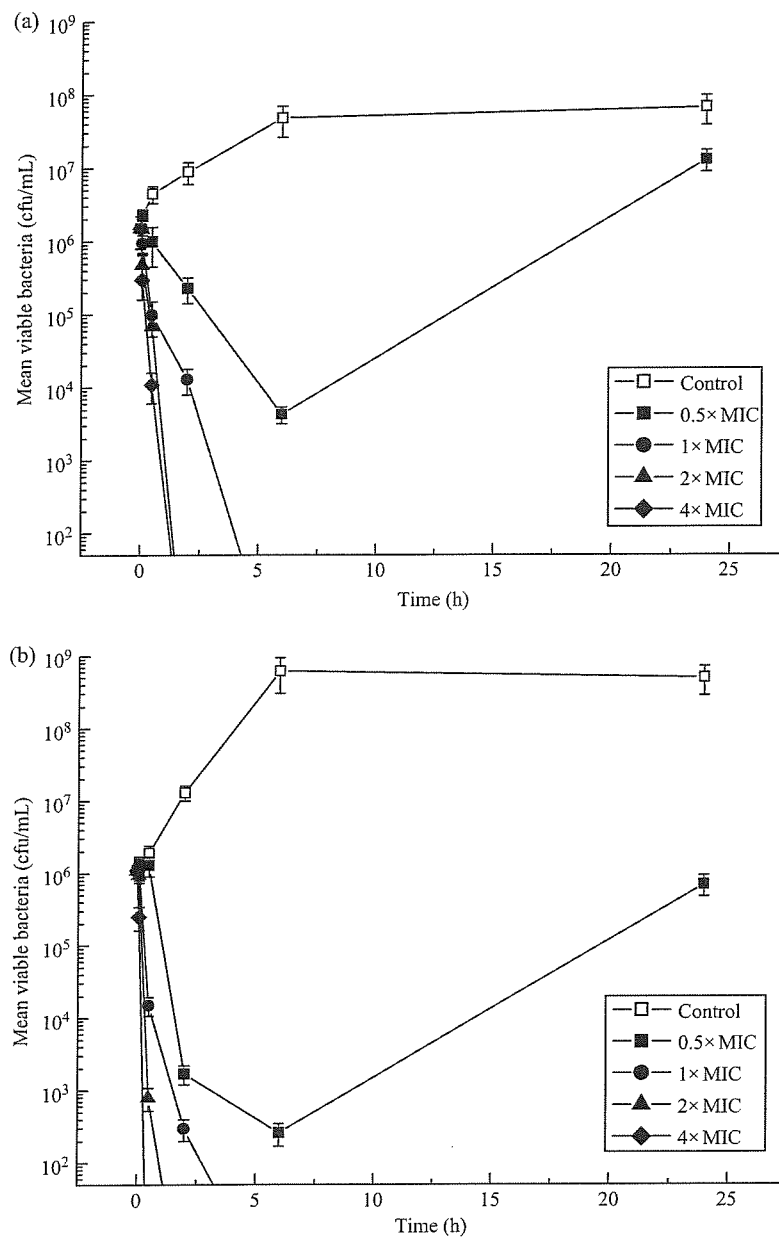


Figure 1. Time-killing curves for Akacid plus® versus *S. aureus* ATCC 29213 (MIC, 0.5 mg/L) and *E. coli* ATCC 35218 (MIC, 2 mg/L). Mean viable bacterial count (cfu/mL) of *S. aureus* (a) and *E. coli* (b) was evaluated in the presence and absence of Akacid plus® at 0.5x, 1x, 2x and 4x MIC at 5 min, 30 min, 2 h, 6 h and 24 h.

is used as a preservative in cosmetics and as a surgical rub, is irritating to the eyes. According to the results obtained in the toxicological studies, Akacid plus® showed a low acute oral and dermal toxicity with an $LD_{50} > 2000$ mg/kg of body weight (a concentration high above the therapeutic dose) and was not irritating to the skin. Further toxicity studies including acute eye toxicity, skin sensitization, mutagenicity and chronic exposure are needed to determine the complete toxicity profile of Akacid plus®.

The preliminary results of the present study demonstrate the broad antimicrobial properties, also against MRSA and ESBL-producing Gram-negatives, which make Akacid plus® a

promising tool for topical application in the prophylaxis and treatment of bacterial and fungal infections. No difference in the MIC values between MSSA and MRSA was detected. Since the exact mechanism of action of Akacid plus® is not fully understood yet, further tests are underway to study the mode of action and full range of activity of this promising new substance.

Acknowledgements

We thank W. Schmidt, K. Stich and H. Sigmund for excellent technical assistance.

Profile of Akacid plus[®], a new biocide

Transparency declarations

None to declare.

References

1. Percival A. Increasing resistance to antibiotics—public health crisis. *Hosp Pharmacol* 1997; **4**: 193–6.
2. Levy SB. Antibiotic and antiseptic resistance: impact on public health. *Ped Infect Dis* 2000; **19**: 120–2.
3. Walsh SE, Maillard JY, Russell AD *et al.* Development of bacterial resistance to several biocides and effects on antibiotic susceptibility. *J Hosp Infect* 2003; **55**: 98–107.
4. Block C, Furman M. Association between intensity of chlorhexidine use and micro-organisms of reduced susceptibility in a hospital environment. *J Hosp Infect* 2002; **51**: 201–6.
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically—Sixth Edition: Approved Standard M7-A6*. NCCLS, Wayne, PA, USA, 2003.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts—Second Edition: Approved Standard M27-A2*. NCCLS, Wayne, PA, USA, 2002.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Conidium-Forming Filamentous Fungi: Proposed Standard M38-A*. NCCLS, Wayne, PA, USA, 2002.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents: Approved Guideline M26-A*. NCCLS, Wayne, PA, USA, 1999.
9. Markopoulos E, Graninger W, Georgopoulos A. *In-vitro* selection of resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* compared with *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother* 1998; **41**: 43–7.
10. European Commission. *EU Method B.1 tris Acute oral toxicity—acute toxic class method*. Dir. 2004/73/EC; O.J. L 152, 2004.
11. European Commission. *EU Method B.3 Acute dermal toxicity*. Dir. 92/69/EEC; O.J. L383 A, 1992.
12. European Commission. *EU Method B.4 Acute toxicity: dermal irritation/corrosion*. Dir. 2004/73/EC; O.J. L 152, 2004.
13. Irizarry L, Merlin T, Rupp J *et al.* Reduced susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to cetylpyridinium chloride and chlorhexidine. *Chemotherapy* 1996; **42**: 248–52.
14. Suller MT, Russell AD. *In-vitro* selection of resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* compared with *Staphylococcus epidermidis*. *J Hosp Infect* 1999; **43**: 281–91.
15. Kresken M, Hafner D, Schmitz FJ *et al.* Prevalence of mupirocin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: results of the antimicrobial resistance surveillance study of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy. *Int J Antimicrob Agents* 2001; **23**: 577–81.
16. Kratzer C, Tobudic S, Graninger W *et al.* *In vitro* antimicrobial activity of the novel polymeric guanidine Akacid plus. *J Hosp Infect* 2006, in press.
17. Kratzer C, Tobudic S, Assadian O *et al.* Validation of Akacid plus as a room disinfectant in the hospital setting. *Appl Environ Microbiol* 2006, in press.

Antimikrobielles Wirkprofil der beiden neuen polymerischen Guanidine Akacid und Akacid plus

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

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

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

Schlüsselwörter:

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

Zusammenfassung

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

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

Key-words:

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

Summary

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

des Wirkprofil der beiden neuen

us hirae, *E. coli* and *P. aeru-*
using the quantitative suspen-
European Standard EN 1040.
selection of resistance to
was carried out on 24 different
strains. All three active sub-
were most effective against
Staphylococcus spp. and *Bacillus* spp.
Higher MIC values were detected
against *E. faecalis*, gram-negative
bacteria and fungi. MIC₅₀ and MIC₉₀

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

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

Einleitung

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

Die Gruppe der kationischen Anti-
septika umfasst chemisch sehr unter-
schiedliche Substanzen, die aber als
gemeinsames Charakteristikum stark
basische Gruppen, gebunden an ein
ziemlich massives lipophiles Molekül,
besitzen. Die wichtigsten Vertreter
sind unter den Quarternären Ammo-
niumverbindungen Benzalkonium-
chlorid und Cetrimid, unter den Bis-
biguaniden Chlorhexidin und Alexi-
din und unter den polymerischen
Biguaniden Polyhexamethylen-Biguan-
id (PHMB). Die kationisch antimik-
robiell wirksamen Substanzen wer-
den seit einem Jahrhundert zur Anti-
sepsis und Desinfektion innerhalb und
außerhalb von klinischen Einrichtun-
gen eingesetzt [1-4]. Crawford et al.
berechneten jährliche Nettogewinne
von durchschnittlich 275 Millionen
bis 1,97 Billionen US Dollar durch die
Verwendung von Chlorhexidindiglu-
conat im Verbandsmaterial zur
Prävention von Katheter-assoziierten
Infektionen [5]. Aufgrund ihrer eige-

nen positiv geladenen Moleküle
haben die kationisch antimikrobiell
wirksamen Substanzen eine hohe Bin-
dungsaaffinität an die negativ gela-
denen Zellwände und Membranen
von Bakterien. Durch Störung dieser
Angriffspunkte kommt es zunächst
zur Herabsetzung der Membranflui-
dität und zu einer Störung der osmore-
gulatorischen und physiologischen
Zellfunktionen. In weiterer Folge
entstehen hydrophile Poren in der
Phospholipidmembran, und die Pro-
teinfunktion wird gestört. Das Endre-
sultat ist eine Lyse der Zielzelle [6].
Dieser Membran-schädigende Wirk-
mechanismus konnte auch für die
polymerischen Guanidine gegenüber
Escherichia coli demonstriert wer-
den [7].

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

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

Chlorhexidin gegenüber 369 ver-
schiedenen klinischen Isolaten von
Patienten mit dokumentierten Infek-
tionen in österreichischen Spitälern,
deren Toxizität und die Fähigkeit der
Resistenzinduktion von Akacid zu
evaluieren. Zusätzlich wurde die bak-
terizide Wirksamkeit von Akacid plus
nach einer Expositionszeit von fünf
Minuten im Quantitativen Suspen-
sionstest gegenüber den Qualitäts-
kontrollstämmen von *S. aureus*, *Ent-*
erococcus hirae, *E. coli* und *P. aeru-*
ginosa untersucht.

Material und Methoden

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Die akuten toxischen Effekte von Akacid und Akacid plus nach einer einmaligen dermalen Applikation wurden anhand der EU-Methode B.3 Akute dermale Toxizität [15] untersucht. Akacid und Akacid plus in einer Dosierung von 2000 mg/kg Körpergewicht wurden 1x für eine Dauer von 24 Stunden auf ein 5x6 cm großes Areal in der dorsalen Thorakalregion von 5 männlichen und 5 weiblichen Ratten verabreicht. Die Tiere wurden abermals für 14 Tage beobachtet.

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

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

Ergebnisse

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

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

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

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

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

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

Pathogen (n)	Biozid	MHK (mg/l)		
		Bereich	MHK ₅₀	MHK ₉₀
<i>E. coli</i> (65)	Akacid	8-32	16	32
	Akacid plus	1-8	2	4
	Chlorhexidin	2-8	2	8
<i>Klebsiella</i> spp. (45) ^a	Akacid	8-16	16	16
	Akacid plus	1-8	2	8
	Chlorhexidin	4-32	8	16
<i>Enterobacter</i> spp. (20) ^b	Akacid	16-32	16	32
	Akacid plus	1-8	2	8
	Chlorhexidin	8-32	8	32
<i>Salmonella</i> spp. (6) ^c	Akacid	8-16	-	-
	Akacid plus	1-2	-	-
	Chlorhexidin	2-4	-	-
<i>Shigella</i> spp. (2) ^d	Akacid	16-32	-	-
	Akacid plus	2-4	-	-
	Chlorhexidin	1-2	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> (1)	Akacid	32	-	-
	Akacid plus	2	-	-
	Chlorhexidin	32	-	-
<i>Proteus</i> spp. (7) ^e	Akacid	8-128	-	-
	Akacid plus	4-32	-	-
	Chlorhexidin	8-64	-	-

^a *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*

^c *S. enteritidis*, *S. typhimurium*

^e *P. mirabilis*, *P. vulgaris*

^b *E. aerogenes*, *E. cloacae*

^d *S. sonnei*, *S. flexneri*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

teten Isolaten nach 30 Passagen gefunden (Tabelle 5).

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

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

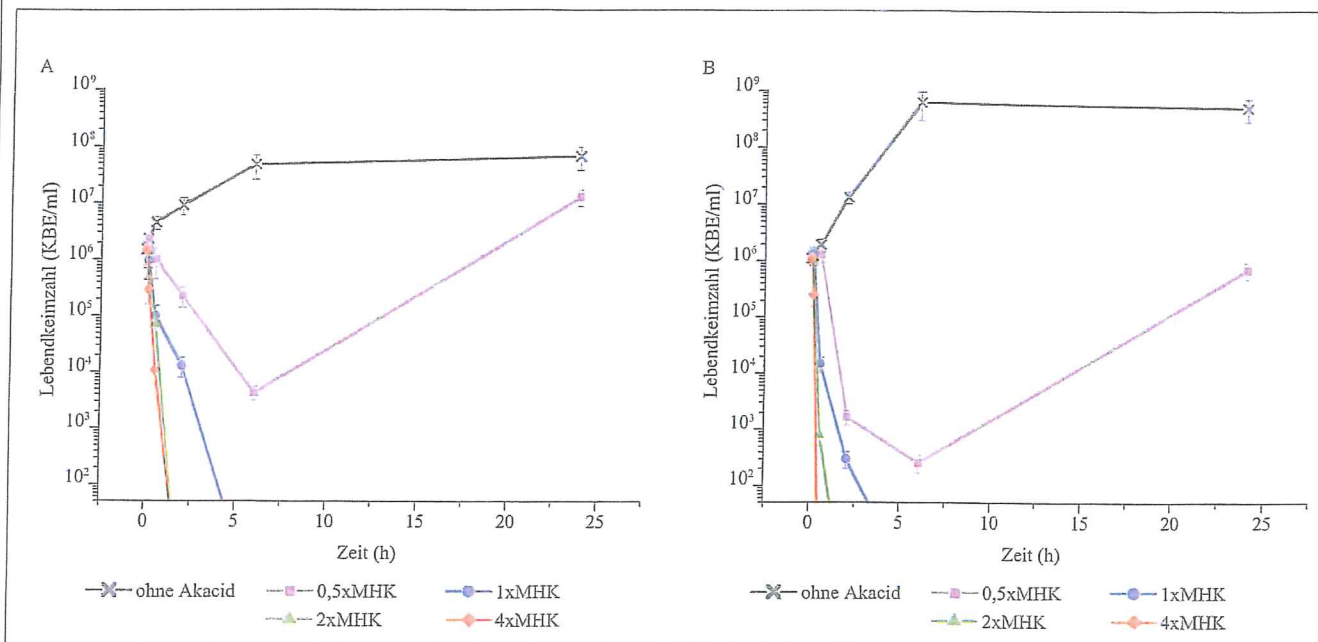


Tabelle 4: Ergebnisse des Quantitativen Suspensionstests EN 1040 von Akacid plus gegenüber *S. aureus*, *E. hirae*, *E. coli* und *P. aeruginosa* nach 5 Minuten Expositionszeit

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

N: Lebendkeimzahl in der Inokulumsuspension (KBE/ml)

R: Reduktion der Lebendkeimzahl (KBE/ml)

Diskussion

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

^a Mediane lethale Dosis

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

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

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

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

Literatur:

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

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

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

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

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

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

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

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

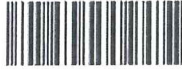
- Testing of Yeasts: Approved Standard Second Edition: NCCLS document M27-A2." NCCLS, Wayne, Pa, USA (2002).
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards: "Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Conidium-forming Filamentous Fungi. Proposed Standard M38-A." NCCLS, Wayne, Pa, USA (2002).
11. European Committee for Standardization: "European Standard EN 1040: Chemical disinfectants and antiseptics - Basic bactericidal activity - Test method and requirements (phase 1)." CEN, Brussels (1997).
12. Kampf G., Höfer M., Henning R.: "Neutralization of chlorhexidine for *in vitro* testing of disinfectants." Zent. Bl. Hyg. Umweltmed. 200 (1998) 457-464.
13. Markopoulos E., Graninger W., Georgopoulos A.: "In vitro selection of resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis* compared with *Staphylococcus epidermidis*." J. Antimicrob. Chemother. 41 (1998) 43-47.
14. European Commission: "EU Method B.1 tris Acute Oral Toxicity - Acute toxic class method." Dir. 2004/73/EC; O.J. L 152 (2004).
15. European Commission: "EU Method B.3 Acute Dermal Toxicity." Dir. 92/69/EEC; O.J. L383 A (1992).
16. European Commission: "EU Method B.4 Acute Toxicity: dermal irritation/corrosion." Dir. 2004/73/EC; O.J. L 152 (2004).
17. Dettenkofer M., Block C.: "Hospital disinfection: efficacy and safety issues." Curr. Opin. Infect. Dis. 18 (2005) 320-325.
18. Cozard A., Jones R.D.: "Disinfection and the prevention of infectious disease." Am. J. Infect. Control 31 (2003) 243-254.
19. McDonnell G., Russell A.D.: "Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance." Clin. Microbiol. Reviews 12 (1999) 147-179.
20. Cookson B.D., Bolton M.C., Platt J.H.: "Chlorhexidine resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* or just an elevated MIC? An *in vitro* and *in vivo* assessment." Antimicrob. Agents Chemother. 35 (1991) 1997-2002.
21. Irizarry L., Merlin T., Rupp J., Griffith J.: "Reduced susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to cetylpyridinium chloride and chlorhexidine." Chemother. 42 (1996) 248-52.
22. Suller M.T., Russell A.D.: "Antibiotic and biocide resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus*." J. Hosp. Infect. 43 (1999) 281-91.
23. Schmid M.B., Kaplan N.: "Reduced triclosan susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*." Antimicrob. Agents Chemother. 48 (2004) 1397-1399.
24. Block C., Furman M.: "Association between intensity of chlorhexidine use and micro-organisms of reduced susceptibility in a hospital environment." J. Hosp. Infect. 51 (2002) 201-206.
25. Lambert R.J., Joyson J., Forbes B.: "The relationships and susceptibilities of some industrial, laboratory and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to some antibiotics and biocides." J. Appl. Microbiol. 91 (2001) 972-984.

Korrespondierender Autor:

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

E-Mail:

apostolos.georgopoulos@meduniwien.ac.at



Project Status Report Geberit AG:

Beurteilung der antimikrobiellen Wirkung von Acelit Lack (eabc) gegenüber Urin.

Prüfung der antimikrobiellen Wirksamkeit von Acelit Lack gegenüber im Urin enthaltener Bakterien in Anlehnung an JIS Z2801:2000 (Japanese Industrial Standard) Test. Durch die Methode wird die Fähigkeit von Materialien, eine Vermehrung von Mikroorganismen an der Oberfläche zu verhindern, gemessen.

Material und Methoden:

Prüfobjekte: Lack auf Alufolien ausgestrichen

Probe	Beschreibung
1	Lack ohne antimikrobiellen Wirkstoff (Nullprobe)
2	Lack mit antimikrobiellen Wirkstoff Acelit
A	Ausgangslösung Urin

Durchführung:

Test 1:

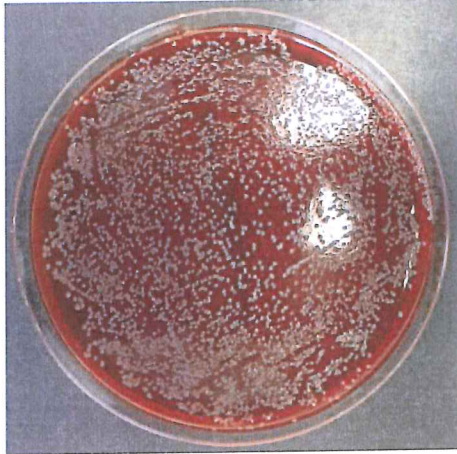
Die Testflächen (3x3cm) wurden mit je 200µl Urin beimpft und mit PE-Folie abgedeckt. Es erfolgte eine Inkubation für 20h bei 37°C bei einer Luftfeuchtigkeit von >90%. Im Anschluss wurden die Testflächen für 10min in 10ml PBS-Puffer gewaschen und die Lebendkeimzahlen durch Ausplattieren von 400µl Urin/PBS Lösung auf Columbia Blood Agar bestimmt. 100µl des ursprünglich eingesetzten Urins wurden zur Kontrolle ebenfalls ausplattiert.

Test 2:

50ml Urin wurden in zwei sterile Glasflasche gegeben und bis zu 39h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Dabei war in einer der Flaschen ein unbeschichtetes Sulzer Mischer Element aus Metall enthalten (Nullkontrolle), in der zweiten Flasche ein beschichtetes Sulzer Mischer Element aus Metall mit antimikrobiell wirksamen Lack. Nach 22h (T1) bzw. 39 h (T2) Inkubationszeit wurden die Urinlösungen untersucht und pH Wert und die optische Dichte bei 600nm bestimmt.



Ergebnis Test 1:



1



2



A

Probe	Anzahl KBE/ml	Antimikrobiell (ja / nein)
1	∞	0/3
2	0	3/0

Dargestellt sind 3 parallele Ansätze.

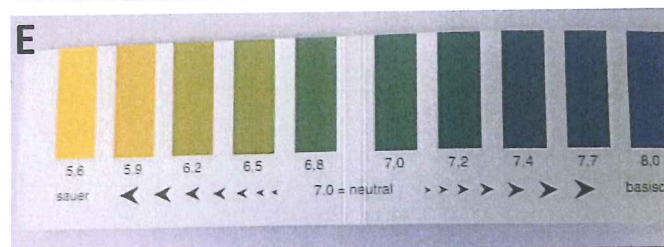
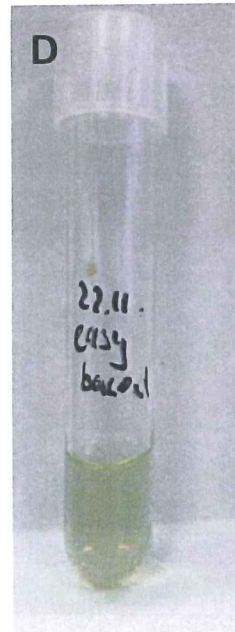
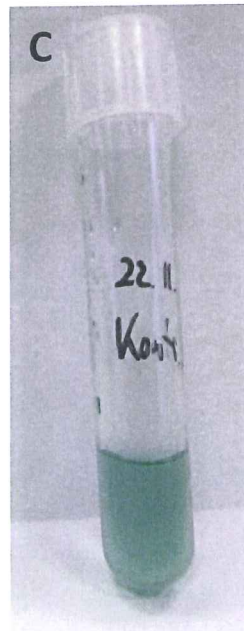
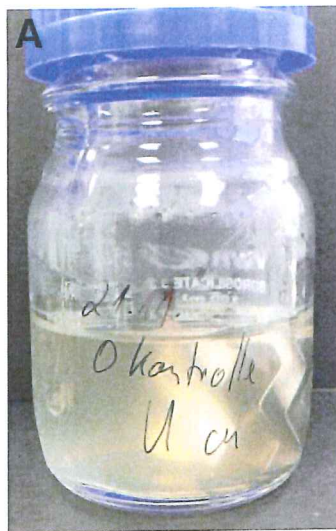
KBE –Koloniebildende Einheiten

Beurteilung:

Das Testverfahren 1 zeigt eine antimikrobielle Wirksamkeit aller Proben im Vergleich zur Nullprobe ohne Wirkstoff. Die lackbestrichenen Oberflächen besitzen Eigenschaften, die eine Vermehrung der Mikroorganismen inhibieren und ein Absterben der Bakterien bewirken. Der untersuchte Lack zeigt einen deutlichen bakteriziden Effekt und bewirkt dabei eine Reduktion des Keimgehalts von >99,9%.



Ergebnis Test 2:



Probe	OD ₆₀₀	pH-Wert (0)	pH-Wert (22h)	pH-Wert (39h)
1	0,24	5,9	6,2	7
2	0,04	5,9	5,9	5,9



Beurteilung:

Das Testverfahren 2 zeigt ein deutliches Wachstum der Bakterien im Kontrollansatz, der mit der Entwicklung von Ammoniakgeruch einhergeht. Nach 22h ist eine homogene Trübung des Urins zu beobachten, die mit fortlaufender Inkubationszeit noch weiter zunimmt (A). Die gemessene OD_{600} beträgt hier 0,24 (T2). Auch der im Urin anfangs bestimmte pH Wert von 5,9 steigt auf 6,2 (T1) und 7,0 (T2) an. Da sich vom Testpapier Indikatorfarbstoff löst, kann hier in der Urinlösung der Farbumschlag zu einem dunkleren grünlichen Farbton hin gezeigt werden (C, E).

Im Ansatz des mit dem antimikrobiellen Lack beschichteten Mischers ist hingegen zu keinem Zeitpunkt die homogene Trübung des Urins zu sehen (B). Die klare Lösung unterscheidet sich auf den ersten Blick deutlich vom Kontrollansatz, und die Geruchsbildung bleibt aus. Die gemessene OD_{600} beträgt hier 0,04 (T2). Der im Urin anfangs bestimmte pH Wert von 5,9 bleibt unverändert (T1, T2). Da sich vom Testpapier Indikatorfarbstoff löst, kann hier in der Urinlösung gezeigt werden, dass kein Farbumschlag erfolgt und der gelbliche Farbton den gleichbleibenden pH Wert von 5,9 anzeigt (D, E).

Fazit:

In beiden Testverfahren konnte eine deutliche antimikrobielle Wirksamkeit nachgewiesen werden.

Die Beigabe des induzierten Wirkstoffs konnte den pH Wert stabilisieren und Geruchsbildung neutralisieren.

Durch die deutliche bakterizide Wirkung und der Stabilisierung des pH Werts kann kausal von einer Inhibition von Urinstein ausgegangen werden.

Bescheinigung

Novapura Deutschland GmbH bescheinigt als Hersteller sowie Vertreiber der Desinfektions- und Schimmelbehandlungsmittel

Akafog Domestic, Akafog Hospital, Akafog Industrie, Akamould, Fog It Plus, Fog It Q, Fog It IQ

der Firma

PSV Montage Service, Eberhard Str. 30, 71334 Waiblingen- Hegnach

Vertreten durch Gerhard Reinhold und H. Ahrendt

die Teilnahme an unserer jährlichen Qualitätssicherungsschulung.

PSV Montage Service wird damit die Kenntnis der sachgerechten Anwendung der Novapura Produkte bescheinigt.

PSV Montage Service ist berechtigt die Novapura Produkte in Räumen, Labors, spez. Lüftungsanlagen, sowie OP und Reinraum- Anlagen anzuwenden.

Regensburg, 04.01.2012

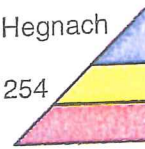

Martin Melzl


Johannes Lienhard

 **Novapura Deutschland GmbH**
Biopark III / Campus Universität
Josef-Engert-Str. 13 T: +49 941 898 498 - 0
93053 Regensburg F: +49 941 898 498-99
info@novapura.de www.novapura.de

PSV-Montage-Service e.K.
Eberhard Str.30
D-71334 Hegnach
Tel.: 07151-564350
Fax.: 07151-57579
Auto Tel.:0172-7688766
Internet.: www.psv-montage-service.de
E-Mail.: g.f.reinhold@t-online.de

Sitz D-71334 Waiblingen-Hegnach
Eberhard Str. 30
Handelsregister HRA 721254
Amtsgericht Stuttgart
Ust.-IDNr.219 849 616
Inhaber.: Gerhard Reinhold
Steuernummer: 28 90 332 / 01775
www.lueftungskanalreinigung.de



PSV-Montage-Service

Das Produkt: akafog gegen Bakterien

Keine Chemiekeulen – Vallovapor arbeitet mit akafog – akafog arbeitet physikalisch

Vereinfacht beschrieben:

- Der Wirkstoff besteht aus kationischen, stark positiv geladenen Polymeren.
- Diese Polymere docken an die stets negativ geladene Oberfläche der einzelnen Mikroorganismuszellen an. Dadurch wird deren lebensnotwendige Zellwand und Zellmembran neutralisiert, die Zellmembran wird durchlässig, lebensnotwendige Zellbestandteile wie Nährsalze und Nucleotide treten aus, sodass sich die Mikroorganismuszelle auflöst
- Der Wirkstoff wird durch feinste Kaltvernebelung im gesamten Raum verteilt, die feine Vernebelung erreicht so jeden Winkel. So werden Sporen und Keime zerstört und die toten Zellen einfach beim nächsten Lüften hinausgetragen, bei der nächsten Bodenreinigung aufgesaugt oder aufgewischt.

WICHTIG: Es besteht KEINE GEFAHR FÜR MENSCHLICHE ODER TIERISCHE ZELLEN! Der Wirkstoff kann aufgrund seiner Molekülgröße NICHT in die menschliche Haut oder Atemwege eindringen.

- akacid ist ein in Wasser gelöstes Polymer
- Der Wirkstoff enthält außer Wasser keine weiteren Lösungsmittel
- Die Wirkungsweise ist rein physikalisch – nicht chemisch oxidierend
- Es handelt sich NICHT um Nanotechnologie.
- Der Wirkstoff ist unter dem Namen akafog unter der Nummer N-32063 in Deutschland zugelassen.
- Die Unbedenklichkeit für Mensch und Tier wurde klinisch geprüft und liegt in Form einer klinischen Unbedenklichkeitsbescheinigung vor

Der Wirkstoff akacid ist die Grundlage der Produkte der aka-Gruppe. Die verschiedenen Produkte unterscheiden sich in Dosierung und Darreichungsform hinsichtlich ihres Anwendungsbereiches. So werden die Produkte ja nach Bakterien-, Keim-, Sporen- oder Pilzart und Ausprägung des Befalls ausgewählt.

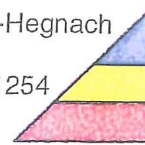
Das Verfahren:

Die Kaltvernebelung mit akacid

Das angewandte Verfahren nennt sich Kaltvernebelung. Durch die sogenannte Kaltvernebelung wird ein feiner Wirkstoffnebel in den Räumen bis in die kleinsten Zwischenräume optimal verteilt. Die mikroskopisch feine Vernebelung lässt es außerdem zu, dass sämtliche Gerätschaften und

PSV-Montage-Service e.K.
Eberhard Str.30
D-71334 Hegnach
Tel.: 07151-564350
Fax.: 07151-57579
Auto Tel.:0172-7688766
Internet.: www.psv-montage-service.de
E-Mail.: g.f.reinhold@t-online.de

Sitz D-71334 Waiblingen-Hegnach
Eberhard Str. 30
Handelsregister HRA 721254
Amtsgericht Stuttgart
Ust.-IDNr.219 849 616
Inhaber.: Gerhard Reinhold
Steuernummer: 28 90 332 / 01775
www.lueftungskanalreinigung.de



PSV-Montage-Service

Einrichtungsgegenstände im zu behandelnden Raum verbleiben. Dank der raschen Wasserverdunstung sind keine Schäden an Geräten, Unterlagen oder empfindlichen Materialien möglich. (Achtung: besondere Regeln sind bei Aquarien zu beachten!). Zudem verflüchtigt sich der Wirkstoffnebel schnell, sprich: die Einwirkzeit ist relativ kurz (auf 100 m³ ca. 2 h). Es entsteht kein feuchter Film, der Wirkstoff ist geruchsneutral, unsichtbar und gesundheitlich unbedenklich. Die hinterlassene mikroskopische Wirkstoffschicht wirkt nachhaltig Bakterien abtötend und ist dadurch präventiv.

Im Anschluss wird der Raum intensiv gelüftet.

Wenn der Wirkstoff sich vollständig abgelagert hat, wird der Boden gesaugt bzw. gereinigt.

Die individuelle Intensität und Dauer der Vernebelung richtet sich nach der Bakterienart, der Befallsstärke, der Raumgröße und dem jeweiligen **Produkt**.

Die nachhaltige und präventive Desinfektion von Räumen und Sanitätsfahrzeugen

Die routinemäßige Wischdesinfektion in Krankenhäusern, Praxisräumen und Einsatzfahrzeugen (KTW, RTW, NAW) liefert nicht immer perfekte Resultate bei der Eliminierung von Krankheitserregern. Typische Belastungen durch Staphylococcus, Pseudomonas, E. Coli, Gram(+) und Gram (-) Bakterien sowie verschiedene Pilze Non-Fermenter Pseudomonas sp., aber auch Methicillin resistente Staphylococcen (MRSA) können betriebsbedingt nicht ausgeschlossen werden.

Mit einer einfach und schnell durchgeführten, periodisch wiederholten Desinfektion mit dem Grundwirkstoff *akasan* kann eine sichere Desinfektion aller Flächen und der Raumluft erfolgen. Durch die Vernebelungstechnik gelangt der Wirkstoff überall dort hin, wo mittels Wischdesinfektion nicht desinfiziert werden kann.

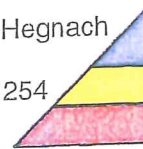
Besonders von Bedeutung für den Einsatz gegen resistente Keime im klinischen Bereich ist die bisher nicht nachweisbare Resistenzbildung des Wirkstoffs *akasan*.

Der enthaltene Grundwirkstoff *akacid* ist in der notwendigen Konzentration gegenüber herkömmlichen vernebelbaren Raum-Desinfektionsmitteln wie Formaldehyd gesundheitlich völlig unbedenklich und geruchsneutral. *akacid* wirkt nachhaltig, indem es an den Raumboflächen einen Wirkstofffilm hinterlässt und weiterhin aktiv bleibt.

Eine vollständige Fahrzeugdesinfektion beispielsweise erfolgt durch 10-minütige Vernebelung, zwei Mal monatlich und kann durch jeden eingewiesenen Mitarbeiter zum Dienstende problemlos durchgeführt werden.

PSV-Montage-Service e.K.
Eberhard Str.30
D-71334 Hegnach
Tel.: 07151-564350
Fax.: 07151-57579
Auto Tel.:0172-7688766
Internet.: www.psv-montage-service.de
E-Mail.: g.f.reinhold@t-online.de

Sitz D-71334 Waiblingen-Hegnach
Eberhard Str. 30
Handelsregister HRA 721254
Amtsgericht Stuttgart
Ust.-IDNr.219 849 616
Inhaber.: Gerhard Reinhold
Steuernummer: 28 90 332 / 01775
www.lueftungskanalreinigung.de



PSV-Montage-Service

akaindustry - für die großflächige Dekontamination

Sämtliche Behandlungen, ob Schimmel, Gerüche oder sonstige Keimbelastungen, können sowohl für den Domestic-Bereich (private/Wohnräume) als auch für Industrieflächen angewandt werden. Gerade in der Industrie ist Keimfreiheit nicht nur besonders wünschenswert, sondern gesetzlich vorgeschrieben. Hier ist es nicht immer einfach den strengen Auflagen hinreichend gerecht zu werden. Oft ist dies mit großen Aufwendungen verbunden.

Der Unterschied der industriellen Anwendung besteht im Wesentlichen in der zu behandelnden Kubikmeteranzahl. So gilt es für die Industrie oft große Werkshallen, sanitäre Großräume und industrielle Anlagen zu reinigen. Um auch hier einerseits mit der feinen Kaltvernebelung arbeiten zu können, diese aber eben raumgreifend verteilen zu können arbeiten wir zum einen mit einem speziell für die Industrie entwickelten **Verneblungsgerät und mit akaindustry...**

Schimmelentfernung oder präventive Maßnahme gegen Bakterien, Pilze, Keime und Sporen

SCHNELL (der zu behandelnde Raum ist nur während der Verneblung nicht benutzbar)

EINFACH (Einrichtung und Geräte brauchen NICHT entfernt werden)

EFFEKTIV (die Raumluft wird komplett dekontaminiert)

NEUTRAL (der eingesetzte Wirkstoff ist geruchsneutral und unsichtbar)

PRÄVENTIV (der eingesetzte Wirkstoff wirkt nachhaltig)

UNGIFTIG (klinische **Unbedenklichkeitsbescheinigung**)

NACHWEISBAR (durch Keimtest nachweisbar, Sachgutachten liegen ebenfalls vor.)

Ungiftig, geschmacksneutral, geruchsneutral

Wo mit LEBENSmitteln gearbeitet wird, herrscht auch jede Menge LEBEN. Die kleinste Lebensform sind Bakterien, Keime, Sporen und Pilze - und die sind nicht immer harmlos. Unkontrolliert vermehren sie sich so stark, dass sie selbst zu Brutstätte für Krankheitserreger bzw. vermehren sich so stark, dass sie selbst zu Krankheitserregern werden. Nicht umsonst unterliegt die Gastronomie strengen Auflagen. Diese Auflagen immer wieder zu erfüllen stellt eine fast unlösbare Aufgabe dar, will man sie einerseits gewissenhaft ausführen, andererseits weder der Gesundheit (des Personals und der Gäste) noch der Qualität (des Raumklimas sowie des Geschmacks) schaden. Aufwändige Reinigungsarbeiten konkurrieren deshalb mit scharfen Reinigungsmitteln.

akacid ist unkompliziert und neutral

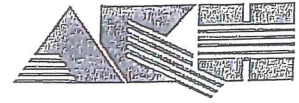
Der Wirkstoff *akacid* ist einfach in der Anwendung und neutral in Erscheinung und Geschmack - und gesundheitlich unbedenklich. Er ersetzt natürlich nicht die Gebote der Reinheit in der Gastronomie, jedoch können diverse aggressive Reinigungs- und bedenkliche Desinfektionsmittel durch die *akacid*-Anwendung ersetzt werden.



UNIVERSITÄTSKLINIK FÜR INNERE MEDIZIN I

*Abteilung für Infektionen und Chemotherapie
Mikrobiologische Laboratorien 3P*

Univ. Prof. DDr. A. Georgopoulos
Währinger Gürtel 18 - 20, A - 1090 Wien, Austria
Tel.: +43 1 40400 5139 Fax: +43 1 40400 5167
e-mail: apostolos.georgopoulos@meduniwien.ac.at



Bewertung möglicher Risiken bei der Anwendung von Akafog® für Menschen, Tiere und Pflanzen

1. Einleitung, Produktbeschreibung

akafog® wurde von der Firma POC für die Dekontamination der Raumluft und von Oberflächen in geschlossenen Räumen entwickelt.

Die Wirkung gegen Pilze und Bakterien basiert auf dem ebenfalls von POC entwickelten und produzierten Biozid Akacid® plus, einem kationischen, wasserlöslichen Polymer, welches gemäß europäischer Biozidproduktedirektive notifiziert ist. Akafog enthält - außer Wasser- keine weiteren Zusatzstoffe.

Der Vorteil dieser Vernebelungsanwendung liegt in der hohen Wirksamkeit trotz niedriger Anwendungskonzentrationen. Die geringen Tröpfchengrößen von 10-12 µm ermöglichen ein rasches Abdampfen des Wassers und somit ein Ankonzentrieren des Wirkstoffes an der Oberfläche von Partikeln und Keimen. Das enthaltene Wasser ist in Nebelform auch ein ideales Medium zum Transport des Wirkstoff in ansonsten schwer behandelbare Ritzen, Fugen und Spalten.

Die eingesetzte Menge von akafog® ist optimiert auf ein Minimum an benötigtem Wirkstoff. Die Vorgehensweise ist genau vorgegeben (Menge Akafog/m³) und je nach Raumgröße werden etwa 15- 45 Minuten für die Raumbehandlung benötigt. Der Wirkstoff haftet sich in dieser Phase auf allen Partikeln und in einer dünnen Schicht auf den Wänden an. Sobald das Vernebelungsgerät abgeschaltet wird, fällt die „künstlich“ erzeugte Luftfeuchtigkeit, die Nebelpartikel sinken aufgrund der Schwerkraft zu Boden. Nach 2 Stunden Einwirkzeit sind keine Wassertröpfchen und somit auch kein Wirkstoff in der behandelten Luft mehr vorhanden. Zusätzlich wird anschließend meist noch gelüftet um das gewohnte Raumklima zu schaffen und abgetötete Keime auf natürliche Weise abzutransportieren.

2. Bewertung der Exposition durch die beschriebene Akafog-Anwendung

Bei der Bewertung des Ausmaßes der Exposition sind folgende Gruppen zu unterscheiden:

1. Professionelle Anwender, welche eventuell über ihr ganzes Berufsleben ständig und direkt mit dem Wirkstoff hantieren
2. Wohnungsbenützer, die ihre Wohnung aufgrund von hygienischen Problemen behandeln lassen
3. Haustiere, die sich in behandelten Wohnungen aufhalten können
4. Pflanzen in behandelten Wohnungen

Gruppe 1 hat eindeutig den intensivsten Kontakt mit dem Wirkstoff. Bisher durchgeführte Untersuchungen zeigen, dass keine Resorption durch die Haut stattfindet. Eine solche ist auch aufgrund der Molekülgröße des Wirkstoffes auszuschließen. Das bedeutet, dass über die Haut und auch über die Schleimhaut Akafog nicht aufgenommen werden kann und daher beim Hantieren (Einfüllen) bzw. berühren des Wirkstoffes keine Gefahr ausgeht. Der Wirkstoff ist auch nicht sensibilisierend. Da allerdings die Anwender auch zumindest beim Abschalten des Gerätes während der Vernebelungszeit den Raum betreten müssen, inhalieren sie in dieser Zeit ohne Schutzmaßnahme die Wirkstofftröpfchen. Zwar besteht auch hierbei aufgrund der niedrigen Anwendungskonzentrationen keine akute Gefahr, zur Prävention von nie gänzlich ausschließbaren Langzeitfolgen wird jedoch das Tragen einer Partikelschutzmaske vom Hersteller vorgeschrieben. Die Verwendung einer Arbeitskleidung und von Handschuhen entspricht den allgemeinen arbeitshygienischen Vorschriften im Umgang mit Chemikalien.

Für Gruppe 2 die Wohnungsbenützer stellt sich die Situation wesentlich anders dar, da diese während der aktiven Vernebelungsphase den Raum nicht betreten. Nach den 2 Stunden Einwirkzeit (bei abgestelltem Vernebelungsgerät) ist wie bereits eingangs erläutert der behandelte Luftraum frei von Wirkstofftröpfchen. Ein Betreten ist somit gefahrlos möglich und unbedenklich. Der sich an Oberflächen gebildete dünne Wirkstofffilm verhindert eine rasche Wiederverkeimung und ist daher an zuvor kontaminierten Oberflächen erwünscht. Obwohl der Wirkstoff nach den vorgeschriebenen OECD Tests und in den angewendeten Konzentrationen auch beim Verschlucken unbedenklich ist, sollte im Sinne des Anwendungszieles ein direkter Kontakt mit Lebens- und Futtermittel vermieden werden. Da Akafog vollständig wasserlöslich ist, kann dieses jederzeit auch einfach von allen Oberflächen entfernt werden. Eine Resorption, das heißt Aufnahme durch die Haut ist wie bereits in Gruppe 1 beschrieben nicht möglich.

Für Haustiere gilt im wesentlichen das selbe wie für Gruppe 2 die Wohnungsbenützer. Allerdings werden Aquarien, während der gesamten Behandlungsdauer (aktive Vernebelungszeit plus Einwirkzeit) aufgrund der Erkenntnisse aus OECD-Studien zur Fischtoxizität vorsichtshalber abgedeckt.

Bisher durchgeführte Untersuchungen zeigen, dass Pflanzen den Wirkstoff in den angewendeten Konzentrationen sehr gut vertragen. Eine applizierte Akafog-Schicht hat jedoch ebenfalls fungizide Eigenschaften, die auf Pflanzen nicht unbedingt

erwünscht bzw. erforderlich sind. Es gibt daher die Hersteller Empfehlung, nach Möglichkeit auch Pflanzen während des Behandlungszeitraumes zu entfernen.

In nachfolgender Tabelle sind zur Übersicht die Ergebnisse der für die Bewertung möglicher Risiken der auf Basis der Wirkstoffprüfung zur Verfügung stehenden OECD-Studien angeführt (Angaben beziehen sich auf mg reinen Wirkstoff).

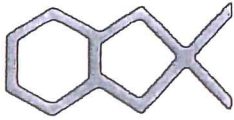
Studie	Ergebnis
Akute orale Toxizität, LD 50 oral Ratte, OECD 423	>2000 mg/kg
Akute dermale Toxizität, LD 50 dermal, OECD 402	> 2222 mg/kg
Akute Reizung der Haut, OECD 404	nicht reizend
Akute Reizung der Augen, OECD 405	nicht reizend
Sensibilisierung: local lymph node assay	nicht Haut sensibilisierend
Chromosome Aberration Test in Human Lymphocyten, OECD 473	nicht mutagen
Bacterial Reverse Mutation Assay, Ames Test, OECD 471	nicht mutagen
Akute Fisch Toxizität, LC 50 Fisch, OECD 203	0,3 mg/l

3. Zusammenfassende Stellungnahme

Zusammenfassend ist unter Berücksichtigung aller bekannter Daten und der vom Hersteller vorgegebenen Vorsichts- und Präventionsmaßnahmen die Anwendung des Produktes Akafog zur Behandlung von mikrobiell kontaminierten Wohnungen mit keinen Risiken für Mensch, Tier und Pflanze verbunden und somit als unbedenklich einzustufen.

Univ.-Prof. Dr. A. Georgopoulos
 1. Universitätsklinik für Innere Medizin
 Klin. Abtlg. f. Chemotherapie u. Infek. 3 P.
 Währinger Gürtel 18-20
 A-Unterschrift ☎ 40400/5139

26.03.07
 Ort, Datum



Hygiene-Institut Dr. Nuss GmbH • Schönbornstr. 34 • 97688 Bad Kissingen

Tel. (09 71) 78 56-0, Fax (09 71) 78 56-213, E-Mail: info@institut-dr-nuss.de

Klinikum Fulda
Abteilung Krankenhaus- / Umwelthygiene
Postfach 2364

36013 Fulda



Akkreditiertes Prüflaboratorium
für mikrobiologische, biologische
und chemische Untersuchungen
Reg. Nr. DAC-P-0055-98-10
Akkreditiertes Prüflaboratorium
für Lebensmittelanalytik Reg.-Nr.
AKS-P-20908-EU.

Zulassungen nach §15 TrinkwV, §44 IfSG, §§15 und 14 AMG.
Externe Hygieneüberwachung und -beratung für Kran-
kenhäuser, Sanatorien, Altenheime, Großküchen sowie
andere medizinische oder öffentliche Einrichtungen;
Analysen zur Hygienekontrolle und klinischen Diagnostik;
Sterilitäts-, Toxizitäts- und Resistenzuntersuchungen.
Sparkasse Bad Kissingen • Kto.Nr. 240 (BLZ 793 510 10)
www.institut-dr-nuss.de

Ihre Nachricht vom

Ihr Zeichen

Unser Zeichen
Dr.N/en

Telefon-Durchwahl
(09 71) 78 56- 231

Bad Kissingen
04.03.2011

Mikrobiologische Überprüfung von Raumluftechnischen Anlagen mittels Abklatschplatten

Entnahmeort: Klinikum Fulda, Lüftungszentralen Z1, Z2, Z11, Z18

Entnahmezeitpunkt: 23.02.11, 9:00 Uhr
Untersuchungsdauer: 24.02 – 4.03.2011

durch: Auftraggeber, Herrn Hüfner
Analysennr.: H10.608-632

Nr.	Probenahmestelle	Bereich	GKZ KBE/24 cm ²	Schimmelpilze KBE/24 cm ²
4/1	Jalousieklappe	Lamellen, sekundär	0	0
4/3	Filter	Boden, sekundär	0	3
4/6	Filter	Filter, sekundär	0	0
7/3	Filter	Boden, sekundär	0	1
7/6	Filter	Filter, sekundär	0	0
12/3	Filter	Boden, sekundär	0	2
20/2	Filter	Filter, sekundär	0	0
20/6	Zuluftkanal	Wand	1	0
26/2	Filter	Filter, sekundär	0	0
28/4	Erhitzer	Rahmen, sekundär	4	3
28/5	Ventilator	Ventilatorgehäuse	0	16
59/1	Jalousieklappe	Lamellen, sekundär	0	1
59/4	Filter	Filter, sekundär	0	2
59/6	Dampfbefeuchter	Boden	0	0

GKZ: aerobe mesophile Gesamtkeimzahl, KBE: Koloniebildende Einheiten
Untersuchungsmethode: GKZ: PC-Agar, 48 h, 30 °C; Schimmelpilze: Malzextrakt-Agar, 30 °C bis 7 d

Die Prüfergebnisse beziehen sich ausschließlich auf die Prüfgegenstände.
Ohne schriftliche Genehmigung des Institutes Dr. Nuss darf dieser Bericht nicht auszugsweise vervielfältigt werden.

Entnahmeort: Klinikum Fulda, Lüftungszentralen Z1, Z2, Z11, Z18

Entnahmezeitpunkt: 23.02.11, 9:00 Uhr
Untersuchungsdauer: 24.02 – 4.03.2011

durch: Auftraggeber, Herrn Hübner
Analysenr.: H10.608-632

Nr.	Probenahmestelle	Bereich	GKZ KBE/24 cm ²	Schimmelpilze KBE/24 cm ²
60/1	Jalousieklappe	Lamellen, sekundär	0	0
60/4	Filter	Boden, sekundär	2	5
82/1	Jalousieklappe	Lamellen, sekundär	0	0
82/3	Filter	Filter, sekundär	0	1
83/2	Mischluftklappe	Lamellen, sekundär	0	-
83/7	Tropfenabscheider	Rahmen, sekundär	0	0
84/1	Jalousieklappe	Lamellen, sekundär	0	0
84/2	Filter	Filter, sekundär	0	0
84/3	Filter	Boden, sekundär	0	1
85/2	Filter	Filter, sekundär	0	1


GKZ: aerobe mesophile Gesamtkeimzahl, KBE: Koloniebildende Einheiten
Untersuchungsmethode: GKZ: PC-Agar, 48 h, 30 °C; Schimmelpilze: Malzextrakt-Agar, 30 °C bis 7 d

-: Probe fehlt (nur Deckel der Abklatschplatte vorhanden)

Richtwerte VDI 6022: Der hygienisch-mikrobiologische Zustand der untersuchten Fläche ist zwischen 25 KBE/Platte und 100 KBE/Platte als grenzwertig und >100 KBE/Platte als unzureichend einzustufen.

Bewertung: Der hygienisch-mikrobiologische Zustand der untersuchten Flächen ist als gut oder sehr gut zu bewerten.

Bad Kissingen, den 04.03.2011


Hygiene-Institut Dr. Nuss GmbH
Laborleitung: Dr. E. Nuss



Umgebungsuntersuchung IPS für Brandverletzte Mikrobiologische Wirksamkeit Akacid®- Vernebelung

Vorgehen:

- Ausbringung der Proben am Freitag, 24.09.10, 15:30 Uhr in 10x10cm Feldern
- Akacid- Vernebelung am vormittag 25.09.10 durch Fa.NovaPura
- Abstrichnahme am Montag, 27.09. 8:15 Uhr und Untersuchung im Labor der Spitalhygiene USZ
- Trägerlösung: Letheen-Bouillon (Proteose-Pepton, Rinderextract, Lecithin, Polysorbat, Natriumchlorid)
- Konzentration: McFarland- Standard 0.5
(entspricht Bakterienzahl / ml in Mio :150)

Lokalisation	Material	Ergebnis
Badewanne Testkeim 2 (Seitenwand quer, fensterseitig)	Chromstahl	Kein Wachstum
Badewanne Testkeim 3 (Seitenwand quer, fensterseitig)	Chromstahl	Kein Wachstum
OPS Testkeim 4 (Oberseite Regalboden seitlich)	Holz beschichtet	Kein Wachstum
Zimmer 9 Testkeim 1 (Schrank, quer, fensterseitig)	Holz beschichtet	Kein Wachstum
Zimmer 9 Testkeim 3 (Schrank, quer, fensterseitig)	Holz beschichtet	Kein Wachstum
Apotheke Testkeim 2 (Unterseite Regalboden)	Holz beschichtet	Kein Wachstum
Zimmer 3 Testkeim 4 (Medienkanal, Oberseite, mittig)	Holz beschichtet	Kein Wachstum

Testkeime:

Nr.1 = VRE (E.faecium)

Nr.2 = MRSA

Nr.3 = Acinetobacter baumannii

Nr.4 = Pseudomonas aeruginosa

Zürich, 07.10.2010


Prof. Dr. med. Christian Rued
Leiter der Spitalhygiene

novapura

Das Hygienekonzept von Novapura

Der Kern unseres Hygienekonzepts bildet das System **akafog**, die Raumdeseinfektion mittels Kaltvernebelung.

akafog, wie alle unsere Produkte, enthält den aktiven Wirkstoff **akacid plus**, ein kathionisches Polymer aus der Gruppe der Guanidine.

akacid plus hat folgende herausragende Eigenschaften:

- Breites Wirkspektrum
- Low Tox Profil
- Depotwirkung, d.h. sehr lange Wirkdauer zum Überbrücken der Desinfektionslücke
- Nicht korrosiv, nicht explosiv, geruchlos, pH=6
- einfach und effizient in der Anwendung



AKAFOG® Industry, wässrige Lösung

1. Stoff-/ Zubereitungs- und Firmenbezeichnung

Handelsname: AKAFOG® Industry, wässrige Lösung
Firma: AKA Technology GmbH
Anschrift: Richard-Neutragasse 5, A-1210 Wien, Österreich
Tel./Fax.Nr. 0043 1 5136406 0 , Fax 0043 1 5136406 200

2. Zusammensetzung / Angaben zu Inhalts- stoffen

Poly-[2-(2-ethoxy)-ethoxyethyl-guanidiniumchlorid] 1,25 mg/g
CAS No: 374572-91-5
[N] R 50/53
Poly-(hexamethyldiamin-guanidiniumchlorid) 3,75 mg/g
CAS No: 57028-96-3
[N] R 50/53

3. Mögliche Gefahren

Für den Menschen:
Nicht kennzeichnungspflichtig gemäß EU-Richtlinie
Für die Umwelt:
Siehe Pkt. 12

4. Erste Hilfe - Maßnahmen

Einatmen: Frischluft
Hautkontakt: Mit Wasser abwischen. Betroffene Kleidung ausziehen
Augenkontakt: Bei geöffnetem Lidspalt mit Wasser ausspülen
Verschlucken: Reichlich Wasser nachtrinken.
Bei schlechtem Wohlbefinden Arzt konsultieren.

5. Maßnahmen zur Brandbekämpfung

Geeignete Löschmittel: Infolge eines Wassergehaltes von über 99%
ist keine Brand-Förderung bzw. Gefahr gegeben.
Alle erhältlichen Löschmittel geeignet (Wasser-, Schaum-, Pulverlöscher)
Ungeeignete Löschmittel: Nicht bekannt
Im Brandfall können sich bilden:
Kohlenstoffoxide, Stickstoffoxide und andere giftige Brandgase
Besondere Schutzausrüstung: Vollschutzanzug tragen

6. Maßnahmen bei unbe- absichtlicher Freisetzung

Personenbezogene Vorsichtsmaßnahmen :
Handschuhe aus PVC, PE oder Gummi
Umweltschutzmaßnahmen:
Nicht in die Kanalisation/Oberflächenwässer/Grundwasser
gelangen lassen
Verfahren zur Reinigung:
Ausgeschüttetes Produkt mit flüssigkeitsbindendem Material
(Sand, Kieselgur, Säurebinder, Universalbinder, Sägemehl)
aufnehmen oder aufwischen. Aufgenommenes bzw.aufgewischtes
Produkt vorschriftsmäßig entsorgen

AKAFOG® Industry, wässrige Lösung

- 7. Handhabung und Lagerung**
- Handhabung:**
siehe Pkt. 6
Vorsichtsmaßnahmen wie bei Handhabung von Chemikalien
Vor Pausen und nach Beendigung der Arbeit: Hände waschen
Außerhalb der Reichweite von Kindern lagern.
Biozide sicher verwenden. Vor Gebrauch stets Kennzeichnung und Gebrauchsinformation lesen
- Lagerung:**
Anforderungen an Lagerräume und Behälter:
Behälter gut geschlossen lagern.
Verpackung: In Originalverpackung lagern.
- 8. Expositionsbegrenzung und persönliche Schutzausrüstung:**
- Atemschutz:**
Atemschutzmaske P3 während der Vernebelungsanwendung
- Handschutz:** Handschuhe aus PVC, PE oder Gummi
- Körperschutz:** Schutz-Overall
- 9. Physikalische und chem. Eigenschaften :**
- Erscheinungsbild:**
Form: Flüssig
Farbe: Transparent
Geruch: Neutral
- Sicherheitsrelevante Daten:**
pH-Wert : 6,9
Siedepunkt/Siedebereich: 100° C
Schmelzpunkt/Schmelzbereich : Nicht anwendbar
Flammpunkt/Zündtemperatur: Nicht anwendbar
Entflammbarkeit(Feststoffe,Dämpfe). Nicht anwendbar
Selbstentzündungstemperatur : Nicht anwendbar
Explosionseigenschaften: Nicht explosiv
Oxidierende Eigenschaften : Nein
Dampfdruck : 100 Pa bei 20°C
Dichte : 1,01 g/cm³ bei 20° C
Wasserlöslichkeit : Vollständige Wasserlöslichkeit
Fettlöslichkeit : Nicht löslich
Verteilungskoeffizient (n-Oktanol/Wasser): Nicht anwendbar
- 10. Stabilität und Reaktivität**
- Zu vermeidende Bedingungen:**
Bei sachgerechter Lagerung und Handhabung nicht zu erwarten (stabil)
- Zu vermeidende Stoffe:**
Nicht mit anionischen Verbindungen (z.B. Tensiden) mischen,
da sonst keine biozide Wirksamkeit.
Gefährliche Zersetzungsprodukte : Keine bekannt



EU-SICHERHEITSDATENBLATT
Gemäß 2001/58/EG

Datum: 17. Sept. 2007
Datum: 22 Nov. 2006
Überarbeitet: 30 Juli 2007

AKAFOG Industry®, wässrige Lösung

- 11. Angaben zur Toxikologie:**
Akute orale Toxizität LD50 (Ratte) > 2000mg / kg (gemäß OECD 423)
Akute Toxizität, inhalativ LD 50 (Ratte): 1,67 mg/l 4h (100 mg/g) (OECD 403)
Reizung der Haut: nicht reizend, nicht ätzend gemäß OECD 404
Hautsensibilisierung: Nicht hautsensibilisierend (gemäß OECD 406)
Augenreizung: keine Augenreizung gemäß OECD 405
Beurteilung der Mutagenität: Negativer AMES-Test gem. OECD 471
- 12. Angaben zur Ökologie:** Biologisch nicht leicht abbaubar ("Closed bottle test")
Nicht in die Kanalisation bzw. Oberflächen- / Grundwasser gelangen lassen.
R52/R53 s.Pkt 15.
- 13. Hinweise zur Entsorgung**
Produkt und Restmengen:
Abfall gemäß lokalen behördlichen Vorschriften entsorgen.
Abfallschlüssel (Österreich): Desinfektionsmittel , Nr. 53507
Abfallschlüssel (Europa): 180107
Verpackung: kein Sondermüll
- 14. Angaben zum Transport**
Kein Gefahrgut im Sinne der Transportvorschriften ADR, RID, IMDG sowie GGVS/GGVE/GGVSee und ICAO-TI/IATA-DGR
- 15. Vorschriften**
Das Produkt ist nach EWG-Richtlinien eingestuft und gekennzeichnet:

R 52: Schädlich für Wasserorganismen
R 53: Kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkung haben.
S 61: Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
Besondere Anweisung einholen/Sicherheitsdatenblatt zu rate ziehen
- 16. Sonstige Angaben**
Produkt Verwendung : Desinfektionsmittel
Die Angaben in diesem Sicherheitsdatenblatt entsprechen nach bestem Wissen unseren Erkenntnissen zum Zeitpunkt der Überarbeitung

