



CAT
Critically Appraised Topic

Gevoeligheidsbepaling voor antiseptica: literatuurstudie en evaluatie bij carbapenemase producerende enterobacteriaceae (CPE)

Author: Dr. Elke Del Biondo

Supervisor: Prof. Dr. Veroniek Saegeman

Search/methodology verified by: Prof. Dr. P. Vermeersch

Date: 14-05-2013

CLINICAL BOTTOM LINE

Gevoeligheidsbepalingen voor antiseptica gebeuren bij evaluatie van nieuwe producten voor eventuele aankoop en implementatie. Het opzet van deze CAT is de bestaande literatuur en richtlijnen voor het uitvoeren van deze gevoeligheidsbepalingen te vergelijken en onze huidige werkwijze te toetsen aan bestaande literatuurgegevens.

Verschillende artikels ondersteunen het bestaan van verworven resistentie van bacteriën voor antiseptica. Bij stafylokokken wordt plasmide gemedieerde resistentie voor chloorhexidine en quaternaire ammoniumverbindingen beschreven. Plasmide gemedieerde resistentie wordt bij deze micro-organismen veroorzaakt door de *qac* genen. Deze genen coderen voor energie afhankelijke effluxpompen. (5,7,11,27) Bij gramnegatieven is er minder duidelijk bewijs voor het bestaan van plasmidegemedieerde resistentie voor antiseptica. In de literatuur wordt een verband gelegd tussen resistentie voor antiseptica en antibioticaresistentie. (9,13,27)

De laatste jaren zijn multiresistente gramnegatieve bacillen (GNB) zoals extended spectrum beta-lactamase producerende Enterobacteriaceae (ESBL) en carbapenemase producerende Enterobacteriaceae (CPE) prevalenter in de hospitaalomgeving. (3) De behandelingsmogelijkheden voor deze bacteriën zijn beperkt en soms zelfs afwezig. Daarom is de preventie van kruisbesmetting, zowel via de handen van het personeel als de omgeving, zeer belangrijk. Ook de decontaminatie van dragers van multiresistente GNB vraagt kennis van de efficiëntie van antiseptica op deze micro-organismen. Er is nog weinig geweten over de gevoeligheid van deze kiemen voor de antiseptica die we routinematig gebruiken in het ziekenhuis.

We willen in deze CAT dan ook evalueren of multiresistente GNB een verhoogde resistentie vertonen voor enkele antiseptica die gebruikt worden in UZ Leuven. We proberen op deze vraag een antwoord te formuleren door de werkzaamheid van de antiseptica op enkele CPE stammen te testen met de suspensietesten. De geteste stammen bestaan uit 3 CPE stammen (2 stammen van het nationale referentielaboratorium voor multiresistente gramnegatieven en 1 klinische stam uit het UZ Leuven) en 2 referentiestammen (een *E. coli* ATCC 25922 en *P. aeruginosa* ATCC 27853). We evalueren antiseptica die gebruikt worden voor de ontsmetting van medisch materiaal (Aniosyme®), ontsmetting van wonden (Dakin Cooper®, Braunol®, Hibitane 0,05%®) en decontaminatie van dragers (Hibitane®). Met de fase 2 stap 1 in vitro suspensietest (EN 1276) blijken de antiseptica voldoende werkzaam op de CPE stammen. Er wordt immers een reductie van het aantal colony forming units (CFU) bekomen die groter is dan 5 log na een inwerkingstijd van 5 minuten. Ook als de inwerkingstijd verkort wordt naar 1 minuut blijft de reductie in CFU groter dan 5 log.

Kleine verschillen in gevoeligheid tussen CPE stammen en referentiestammen kunnen met deze testen echter gemist worden. Om die reden zullen we de minimale inhibitorische concentratie (MIC) van de hierboven vermelde stammen voor de 4 hierboven vermelde antiseptica bepalen via agar dilutie.(4)

1. Definitie en werkingsmechanisme van antiseptica

Antiseptica zijn chemische substanties met een kiemdodend effect op verschillende micro-organismen. We onderscheiden een bactericide (bacterie-dodend), tuberculocide (mycobacteriën), sporicide (sporen), fungicide (gisten en schimmels) en virucide (virussen) effect. (26)

De European Committee for Standardization (CEN) definieert antiseptis als “the treatment of living tissues which kills and/or inhibits bacteria and/or fungi and/or spores and/or inactivates viruses with the intention of preventing or limiting the harmful results of infections of that tissue”. Antiseptis is een term die veelal gebruikt wordt voor levende weefsels; terwijl desinfectie vooral gebruikt wordt in het kader van dode objecten. Een ontsmettingsmiddel is de algemene term waarmee zowel antiseptica als desinfectantia worden bedoeld. (10)

In tegenstelling tot bij de antibiotica is de werking van een antisepticum aspecifiek en multifactorieel. Mogelijke werkingsmechanismen zijn het denatureren en coaguleren van eiwitten, het aantasten van de celwandpermeabiliteit (bv. alcoholen en quaternaire ammonium verbindingen), verandering van osmotische druk waardoor lysis optreedt, aspecifieke interactie met functionele groepen van proteïnen (bv. aldehyden, waterstofperoxide) en interactie met genetisch materiaal (bv. halogenen, aldehyden). (5)

De werking van antiseptica wordt beïnvloed door verschillende factoren. (5,6) De concentratie van het antisepticum in de werkoplossing speelt een belangrijke rol. De concentratie exponent (n) meet het effect van concentratie of dilutie op het gebruikte antisepticum. Antiseptica met een hoge n waarde (bv. alcoholen) verliezen snel hun werking bij dilutie, antiseptica met een lage n waarde (bv. chloorhexidine, glutaaraldehyde) behouden hun werking bij dilutie. Verder is de pH van de omgeving van belang: sommige antiseptica werken het best bij een hoge pH (bv. chloorhexidine, quaternaire ammoniumverbindingen), andere werken beter bij een lage pH.

De activiteit van antiseptica stijgt bij een hogere temperatuur. Interfererende materialen zoals bloed, etter en vuil bemoeilijken de werking van antiseptica. Ten slotte bevorderen substanties die de celwand permeabiliseren of doorgankelijk maken de werking van bepaalde antiseptica. Zo bindt ethyleendiaminetetra-azijnzuur (EDTA) divalente kationen in de celwand van *P. Aeruginosa* en bevordert zo de werking van antiseptica op dit micro-organisme. (6)

2. Resistentie voor antiseptica

In de literatuur is het soms onduidelijk wat bedoeld wordt met ‘resistentie’ van een bepaald micro-organisme voor een antisepticum. Naar analogie met resistentie voor antibiotica is een cultuur resistent voor een antisepticum als hij niet wordt geïnactiveerd door de gebruikte formule en concentratie van dat antisepticum. Indien een stam verhoogde MIC waarden vertoont voor een bepaald antisepticum wijst dit niet steeds op resistentie, hoewel die term ook in deze context vaak wordt gebruikt. Dit komt omdat in het geval van antiseptica verschillende factoren in rekening moeten worden gebracht: de concentraties gebruikt in het product, manier van aanbrengen, pH, gebruikte formule, enz. Men spreekt hier dus beter over een ‘verminderde gevoeligheid’ dan over resistentie. (6, 9)

Er wordt in de literatuur over bacteriële resistentie voor antiseptica een onderscheid gemaakt tussen twee mechanismen: intrinsieke en verworven resistentie. (5,6)

Voorbeelden van intrinsieke mechanismen zijn: impermeabiliteit van de celwand waardoor het antisepticum minder wordt opgenomen, efflux, biofilms en de constitutieve productie van enzymen die het antisepticum afbreken. Verworven resistentie voor antiseptica ontstaat door mutaties, overexpressie van bepaalde genen, efflux en enzymatische inactivatie.

In deze CAT willen we in de literatuur nagaan welke evidentie er is voor het bestaan van deze verworven resistentie, en wat de klinische impact hiervan is.

We willen eveneens nagaan of er een verband is tussen resistentie voor antiseptica en antibioticaresistentie.

QUESTIONS

1. Welke zijn de huidige richtlijnen om gevoeligheidsbepalingen voor antiseptica uit te voeren?
2. Welke evidentie is er in de literatuur voor resistentie van bacteriën tegen antiseptica? Is er een verband tussen resistentie voor antiseptica en antibioticaresistentie?
3. Kan een verminderde gevoeligheid van multiresistente GNB voor antiseptica worden aangetoond met de huidige methoden voor gevoeligheidsbepalingen?

SEARCH TERMS

- 1) *MeSH Database (PubMed): MeSH term: "chlorhexidine, disinfectant, povidone iodine, quaternary ammonium compound, antiseptic"*
- 2) *Pubmed (Medline; from 1966), SUMSearch (<http://sumsearch.uthscsa.edu/>),*
- 3) *Werkgroep infectiepreventie: www.wip.nl*
- 4) *Praktijkrichtlijnen voor de gevoeligheidsbepalingen van antiseptica: Association Française de normalisation (AFNOR); European Committee for Standardisation (CEN)*

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

- **Guidelines and Recommendations**

- (1) Association Française de normalisation (AFNOR) 1998: Antiseptiques et désinfectants.
- (2) Werkgroep infectiepreventie 2004: Beleid reiniging, desinfectie en sterilisatie.
- (3) Advies Van De Hoge Gezondheidsraad nr. 8791. Maatregelen te nemen naar aanleiding van de toename van carbapenemase producerende enterobacteriën (CPE) in België.
- (4) Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48:5-16

- **Reviews**

- (5) McDonnell G, Russel AD. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 1999, p. 147-179
- (6) Russell AD. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Lancet Infect Dis* 2003;3:794-803
- (7) Sheldon AT. Antiseptic "resistance": Real or Perceived Threat? *CID* 2005;40:1650-1656
- (8) Russel AD. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. *J Hosp Infect* 2004;57:97-104
- (9) Horner C, Mawer D, Wilcox M et al. Reduced susceptibility to chlorhexidine in staphylococci: is it increasing and does it matter? *J Antimicrob Chemother* 2012; 67:2547-2559.
- (10) Reybrouck G. Antisepsis en huidontsmetting. Vlaams infectieziekten bulletin nr. 33-2000-5. <http://www.infectieziektebulletin.be/>

- **Original Articles**

- (11) Sidhu MS, Heir E, Leergaard T et al. Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with β -lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* 2002;46:2797-2803
- (12) Vali L, Davies S, Lai LLG et al. Frequency of biocide resistance genes, antibiotic resistance and the effect of chlorhexidine exposure on clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:524-532
- (13) Abuzaid A, Hamouda A, Amyes SGB. Klebsiella pneumonia susceptibility to biocides and its association with cepA, qac Δ E and qacE efflux pump genes and antibiotic resistance. *J Hosp Infect* 2012;81:87-91

- (14)Naparstek L, Carmeli Y, Chmelnitsky I, Banin E, Navon-Venezia S. Reduced susceptibility to chlorhexidine among extremely-drug-resistant strains of Klebsiella Pneumoniae. J Hosp Infect 2012;81:15-19
- (15)Stickler DJ. Susceptibility of antibiotic-resistant Gram-negative bacteria to biocides: a perspective from the study of catheter biofilms. Journal of applied microbiology Symposium supplement 2002;92:163S-170S
- (16)Kojalg S, Naaber P, Mikelsaar M Antibiotic resistance as an indicator of bacterial chlorhexidine susceptibility. J Hosp Infect 2002;51:106-113
- (17)Buffet-Bataillon S, Branger B, Cormier M. et al. Effect of higher minimum inhibitory concentrations of quaternary ammonium compounds in clinical E.coli isolates on antibiotic susceptibilities and clinical outcomes. J Hosp Infect 2011;79:141-146
- (18)Reybrouck G. The bactericidal activity of aqueous disinfectants applied on living tissues. Pharm Weekbl Sci 1985;7:100-103
- (19)Payne DN, Babb JR, Bradley CR et al. An evaluation of the suitability of the European suspension test to reflect *in vitro* activity of antiseptics against clinically significant organisms. Lett Appl Microbiol 1999; 28:7-12
- (20)Littlejohn TG, Dibernardino D, Messeroti LJ et al. structure and evolution of a family of genes encoding antiseptic and disinfectant resistance in Staphylococcus aureus. Gene 1991; 101:59-66
- (21)Zhang M, O'Donoghue MM, Ito T et al. Prevalence of antiseptic-resistance genes in Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci colonising nurses and the general population in Hong Kong. J Hosp Infect 2011; 78:113-117
- (22)Batra R, Cooper BS, Whiteley C et al. Efficacy and Limitation of a Chlorhexidine-Based Decolonization Strategy in Preventing Transmission of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in an Intensive Care Unit. CID 2010; 50:210-217
- (23)Lee AS, Macedo-Vinas M, François P et al. Impact of Combined Low-Level Mupirocin and Genotypic Chlorhexidine Resistance on Persistent Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Carriage after Decolonization Therapy: A Case-control Study. CID 2011;52:1422-1430.
- (24)Suller MTE, Russel AD Antibiotic and biocide resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus and vancomycin-resistant enterococcus. J Hosp Infect 1999;43:281-291
- (25)Cookson BD, Bolton MC, Platt JH. Chlorhexidine Resistance in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus or Just an Elevated MIC? An In Vitro and In Vivo Assesment. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:1997-2002
- (26)Kücken D, Feucht HH, Kaulfers PM. Association of qacE and qacEΔ1 with multiple resistance to antibiotics and antiseptics in clinical isolates of Gram-negative bacteria. FEMS Microbiology Letters 2000;183:95-98
- **Reference Works, Handbooks and Databases**

(27)Cremieux A, Freney J and Davin-Regli A. Methods of Testing Disinfectants. In: Block SS. Disinfections, Sterilization, and preservation. Lipincott Williams and Wilkins; 2001: p. 1305-1327
 - **Posters, "grey literature", presentations**

(28)Bogaerts P, Rezende de Castro R, de Mendonça R, Denis O and Glupczynski Y Accreditation of Carbapenemase and ESBL Multiplex End-Point PCRs According to ISO151899 quality standards. ICAAC 2012 poster D-1447

Vraag 1: Welke zijn de huidige richtlijnen om gevoeligheidsbepalingen voor antiseptica uit te voeren?

Het bepalen van de gevoeligheid van een micro-organisme voor een antisepticum is complex. Allereerst zijn de effecten die beoogd worden door een antisepticum zowel een reinigend of fysisch aspect als een antimicrobieel of biologisch effect. Verder kan de werking van het antisepticum verschillen naargelang het type micro-organisme (bacteriën, virussen, sporen, fungi). Het gebruik van een antisepticum hangt ook af van de toepassing (medisch, dierengeneeskunde, voeding, industrie, thuissituatie) en de gewoonten en wetgeving in een bepaald land. Met deze diversiteit moet bij het testen van een antisepticum voor een bepaalde toepassing rekening worden gehouden.

Er is nog geen consensus over welke methode gebruikt moet worden, en veel landen hebben eigen testen ontwikkeld. Verschillende nationale en internationale instanties hebben richtlijnen uitgebracht waaraan wisselend belang wordt gehecht. Enkele voorbeelden zijn de AFNOR (Association Française de Normalisation), DGHM (Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie), BSI (British Standards Institute), AOAC (Association of Official Analytical Chemists).

In 1990 heeft de CEN (European Committee for Standardization) het TC 216 (Technical Committee for the standardization of methods of testing the activity of disinfectants and antiseptics) samengesteld. De eerste standaarden van deze werkgroep werden gepubliceerd in 1997 onder vorm van de EN normen.

De testen volgens de EN norm verlopen in drie stappen. Eerst wordt een 'basic' bactericide/fungicide activiteit getest. Deze test wordt ook 'fase 1' genoemd en onderzoekt de werking van het antisepticum in afwezigheid van organische bevuilding. Indien deze test voldoende activiteit van het antisepticum toont wordt een test in 'vuile' omstandigheden uitgevoerd, dus met toevoeging van interfererende factoren zoals albumine of gist extract. Dit wordt fase 2 genoemd. In een derde stap wordt het antisepticum 'in vivo' getest in de omstandigheden waarin het effectief gebruikt zal worden. Deze laatste stap werd echter nog niet gestandaardiseerd en is dus nog niet opgenomen in de EN norm. Een beknopte versie van de testen volgens de EN norm wordt weergegeven in tabellen 1, 2 en 3. (27)

Het basisprincipe voor het bepalen van de bactericide activiteit is dat het te bestuderen product in contact wordt gebracht met een micro-organisme en dat de effecten hiervan bestudeerd worden. Dit contact kan gebeuren door het antisepticum toe te voegen aan een bacteriële suspensie (suspensietesten) of door het micro-organisme uit te spreiden op een drager en deze laatste in contact te brengen met het antisepticum door immersie of verstuiving van het antisepticum over de drager (carrier testen). De bereiding van het inoculum is een kritische stap in de test. Dit moet op gestandaardiseerde wijze gebeuren. Om een reductie van 5 log op voldoende precieze wijze vast te stellen is een inoculum van 10^7 cellen/ml noodzakelijk. (27)

Het contact tussen de bacteriële suspensie en het antisepticum wordt na een gedefinieerde tijd gestopt door het toevoegen van een neutralisator. Hierbij is het belangrijk dat de neutralisator op zich niet schadelijk is voor het geteste micro-organisme. De neutralisator moet voor het uitgeteste antisepticum gevalideerd worden door het aantonen van groei uit een suspensie van bacteriën in de neutralisator en na toevoegen van het antisepticum. (18)

Het bestuderen van een bactericide effect kan door het vergelijken van het aantal bacteriën in het inoculum voor en na toevoegen van het antisepticum. Een 5 log reductie ten opzichte van het inoculum wordt gehanteerd als grens voor werkzaamheid. (27,18)

Het tellen van de overlevende bacteriën gebeurt door 1 ml van de suspensie in cultuur te brengen. De keuze van de stammen waarop de antiseptica getest worden is natuurlijk zeer belangrijk. In de fase 1 suspensietest moeten een *P. aeruginosa* ATCC 15442 en een *S. aureus* ATCC 6538 getest worden. In de fase 2 testen worden meer stammen getest. (27) Het is onduidelijk of het testen van multiresistente stammen noodzakelijk is.

Tabel 1: Basic bactericide en fungicide activiteit.

EN 1040 (bactericide) en 1275 (fungicide): Fase 1 suspensietest		
	<i>Dilutie – neutralisatie methode (voorkeur)</i>	<i>Membraan filtratie methode</i>
<i>Stammen</i>	<p><u>Bactericide effect:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442 • <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 <p><u>Fungicide effect:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 • <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404 	
<i>Inoculum</i>	<p>Suspensie van de gegroeide cultuur. Aantal cellen in aanwezigheid van het antisepticum of desinfectans: $1,5 \times 10^7$ tot 5×10^7 cfu/mL (fungi: $1,5 \times 10^6$ tot 5×10^6 cfu/mL).</p>	
<i>Diluent en geteste concentraties</i>	<p>Het te testen product wordt indien nodig verdund in gedistilleerd water.</p>	
<i>Contacttijd</i>	<p>1,5,15,30,45 of 60 min op 20°C</p>	
<i>Eliminatie van het te testen product in de subculturen</i>	<p>Transfer van 1 ml van de oplossing met desinfectant en micro-organisme in 9 ml neutralisator (dilutie 1/10).</p>	<p>Transfer van 0,1 ml van de oplossing met desinfectant en micro-organisme in een filtratie apparaat.</p>
<i>Tellen van de overlevende bacteriën</i>	<p>Uitplaten van de geneutraliseerde oplossing . Incubatie gedurende 48 u op 36°C tot 37°C (bij <i>Aspergillus</i> sp. 24 uur langer incuberen)</p>	<p>Membraan plaatsen op de agar. Incubatie gedurende 48 u op 36°C tot 37°C (bij <i>Aspergillus</i> sp. 24 uur langer incuberen)</p>
<i>Interpretatie</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Valideer de neutralisator bij elke test. • Bereken de reductie in colony forming units (CFU). Het product is werkzaam als er minstens een 5 log (fungi: 4 log) reductie wordt bekomen met een inwerkingstijd van maximum een uur. • Verdere testen zijn nodig om het product goed te keuren voor een specifieke toepassing. 	

Tabel 2: Test voor voeding, thuis, industriële en institutionele toepassing: suspensie test voor bactericide en fungicide activiteit.

EN 1276 (bactericide) en 1650 (fungicide): Fase 2 stap 1 suspensietest		
	Dilutie – neutralisatie methode (voorkeur)	Membraan filtratie methode
Stammen	<p>Bactericide effect:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442 • <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 • <i>Escherichia coli</i> ATCC 10536 • <i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541 <p>Fungicide effect:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 • <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404 	
Inoculum	Suspensie van de gegroeide cultuur. Aantal cellen in aanwezigheid van het antisepticum of desinfectans: $1,5 \times 10^7$ tot 5×10^7 cfu/mL (fungi: $1,5 \times 10^6$ tot 5×10^6 cfu/mL).	
Diluent en geteste concentraties	Het te testen product wordt indien nodig verdund in gedistilleerd water.	
Interfererende omstandigheden	Runder albumine: 'clean' (0,3 g/L) en 'dirty' (3 g/L) omstandigheden; magere melk; gist extract; sucrose; buffers, natrium lauryl sulfaat volgens het gebruik van het product	
Contacttijd	5 min en bijkomend 1,15,30 en 60 min Op 20° en bijkomend 4°C, 10°C of 40°C	
Eliminatie van het te testen product in de subculturen	Transfer van 1 ml van de oplossing met desinfectant en micro-organisme in 9 ml neutralisator (dilutie 1/10).	Transfer van 0,1 ml van de oplossing met desinfectant en micro-organisme in een filtratie apparaat.
Tellen van de overlevende bacteriën	Uitplaten van de geneutraliseerde oplossing . Incubatie gedurende 48 u op 36 tot 37°C (bij <i>Aspergillus sp.</i> 24 uur langer incuberen)	Membraan plaatsen op de agar. Incubatie gedurende 48 u op 36 tot 37°C (bij <i>Aspergillus sp.</i> 24 uur langer incuberen)
Interpretatie	<ul style="list-style-type: none"> • Valideer de neutralisator bij elke test. • Bereken de reductie in colony forming units (CFU). • Voor algemene toepassing: het product is werkzaam als er minstens een 5 log (<i>gisten: 4 log</i>) reductie wordt bekomen zowel in 'clean' als in 'dirty' conditions met een inwerkingstijd van 5 minuten op 20°C met elk van de referentiestammen. • Voor specifieke toepassing: eventueel bijkomende testen met andere stammen en andere experimentele omstandigheden (contacttijd, temperatuur, interferende omstandigheden) • Verdere testen (fase 2, stap 2) kunnen nodig zijn om het product goed te keuren voor een specifieke toepassing. 	

Tabel 3: Test voor voeding, thuis, industriële en institutionele toepassing: kwantitatieve oppervlakte test voor bactericide of fungicide activiteit.

WI 216028: Fase 2 stap 2 oppervlakte test		
	Bactericide effect	Fungicide effect
Stammen	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442 • <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 • <i>Escherichia coli</i> ATCC 10536 • <i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541 • Eventuele bijkomende stammen: <i>Salmonella typhimurium</i>, <i>Lactobacillus brevis</i>, <i>Enterobacter cloacae</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 • <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404 • Eventuele bijkomende stammen: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>
Inoculum	Suspensie van de gegroeide cultuur in vloeibaar medium: $1,5 \times 10^8$ tot 5×10^8 cfu/mL (<i>fungi</i> : $1,5 \times 10^7$ tot 5×10^7 cfu/mL). De suspensie wordt gemengd met een gelijk volume van de gekozen interfererende substantie. 0,05 mL wordt op een carrier aangebracht, het geheel wordt gedroogd bij 37°C.	
Diluent en geteste concentraties	Het te testen product wordt indien nodig verdund in gedistilleerd water. 0,1 mL van het product wordt aangebracht op de gedroogde bacteriële suspensie aangebracht op de carrier.	
Interfererende omstandigheden	Runder albumine: 'clean' (0,3 g/L) en 'dirty' (3 g/L) omstandigheden; magere melk; gist extract; sucrose; buffers, natrium lauryl sulfaat volgens het gebruik van het product	
Contacttijd	5 min en bijkomend 1,15,30 en 60 min	15 min en bijkomend 1,5,30 en 60 min
Temperatuur	18°C tot 25°C en bijkomend 4°C, 10°C, 40°C	
Carrier	Roestvrij stalen schijf (2 cm diameter): gewassen, gespoeld en behandeld met isopropanol	
Eliminatie van het te testen product in de subculturen	Transfer van de carrier in een neutralisator (simultaan gevalideerd) in aanwezigheid van glazen kralen, het geheel wordt geschud.	
Tellen van de overlevende bacteriën	Tellen van de overlevende bacteriën in de neutraliserende oplossing door uitplaten op een agar medium. Inclusie van de carrier in het agar medium.	
Interpretatie	<ul style="list-style-type: none"> • Controleer dat de spontane dood van het micro-organisme (MO) op de carrier kleiner is dan 2 log. • Valideer de neutraliserende oplossing. • Controleer dat het aantal overlevende MO op de carrier kleiner is dan 100. • Controleer de reductie in overlevende MO voor elke stam. • Voor algemene toepassing: <ul style="list-style-type: none"> ○ Het product is bactericide bij een concentratie die een 4 log reductie toont met een contacttijd van 5 minuten op 20°C. ○ Het product is fungicide bij een concentratie die een 3 log reductie toont met een contacttijd van 15 minuten bij 20°C. • Voor specifieke toepassing: indien nodig toevoegen van extra test stammen en experimentele omstandigheden (contacttijd, temperatuur en interfererende omstandigheden) 	

Vraag 2: Welke evidentie is er in de literatuur voor resistentie van bacteriën tegen antiseptica? Is er een verband tussen resistentie voor antiseptica en antibioticaresistentie?

Bacteriële resistentie voor antiseptica is geen nieuw fenomeen. In de literatuur wordt dit sinds begin 19^{de} eeuw beschreven. (8) Een goed begrip van de term 'resistentie' wanneer gesproken wordt over antiseptica is nodig om deze artikels correct te kunnen interpreteren.

1. Betekenis van gevoeligheidstesten:

Gevoeligheidstesten voor antibiotica worden geïnterpreteerd op basis van criteria die gebaseerd zijn op het werkingsspectrum, farmacokinetiek, farmacodynamiek en resultaten van klinische studies. Bijvoorbeeld: voor *Enterobacteriaceae* is een MIC voor amoxicilline van $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ geassocieerd met een succesvolle behandeling en een MIC van $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ met therapiefalen.

Voor antiseptica bestaan geen soortgelijke interpretatiecriteria. Dit is ook niet nodig omdat de concentraties die gebruikt worden in een product vele malen hoger zijn dan de concentraties die getest worden bij een MIC bepaling. Een MIC bepaling kan wel nuttig zijn om na te gaan welke bacteriën minder gevoelig zijn voor een antisepticum ten opzichte van een wild type bacterie. (7) De MIC bepaalt een bacteriostatisch effect, terwijl bij de werking van een antisepticum een bactericide effect beoogd wordt. Daarom vinden sommige auteurs het bepalen van de minimale bactericide concentratie (MBC) juist om de gevoeligheid voor een antisepticum te testen. Een MBC wordt bepaald door de concentraties van een antisepticum waarbij geen groei optreedt in cultuur te brengen. De laagste concentraties waarbij geen groei optreedt is de MBC. (6)

Bepalingen van MIC en MBC vormen een nuttig uitgangspunt, maar kwantitatieve testen zoals suspensietesten en carriertesten worden meer geschikt geacht om de werking van een antisepticum te evalueren. Met de suspensietesten wordt de activiteit van een antisepticum kwantitatief uitgedrukt als een reductie van het aantal CFU na inwerking van het antisepticum. Als criterium voor werkzaamheid wordt een reductie van 5 log vooropgesteld, meestal met een contacttijd van 5 minuten. Hierbij wordt ook steeds vermeldt met welk micro-organisme de test werd uitgevoerd, aangezien antiseptica een verschillend effect kunnen hebben op verschillende micro-organismen. (27)

2. Werkingsmechanismen van antiseptica:

Het werkingsmechanisme van een antisepticum kan bestudeerd worden op dezelfde wijze als bij antibiotica. Het effect op de celmembraan kan bestudeerd worden door microscopisch onderzoek van cellen, bestuderen van model membranen, onderzoek van opname, lysis en lekken van intracellulaire componenten. Ook het effect op intracellulaire componenten kan worden nagegaan, namelijk inhibitie van oxidatieve fosforylatie, enzyme activiteit en elektronentransport.

Hoewel het antimicrobiële spectrum van een antisepticum kan worden bestudeerd, zijn de werkingsmechanismen niet volledig gekend. Deze mechanismen zijn afhankelijk van externe factoren (concentratie van het product, pH, contacttijd en temperatuur) en van de pathogenen die gebruikt worden in de evaluatie (bacteriën, virussen, sporen, gisten). Algemeen zal het antisepticum eerst binden aan de celwand en de integriteit hiervan verstoren en nadien de cel binnendringen en inwerken op intracellulaire doelwitmoleculen. Deze doelwitmoleculen zijn niet uniek, hetgeen verschillend is van het werkingsmechanisme van de antibiotica. De werking op verschillende doelwitmoleculen zorgt er waarschijnlijk voor dat resistentie tegen antiseptica trager ontstaat. (7)

3. Resistentiemechanismen van micro-organismen voor antiseptica:

In de literatuur over resistentie tegen antiseptica wordt onderscheid gemaakt tussen twee mechanismen: intrinsieke en verworven resistentie.

3.1 *Intrinsieke resistentie:*

Mechanismen voor intrinsieke resistentie van bacteriën voor antiseptica zijn impermeabiliteit van de celwand, efflux en biofilm vorming.

Gramnegatieve bacillen (GNB) en mycobacteriën zijn gewoonlijk resistenter dan grampositieven. (5,6)

De celwand van grampositieve kokken bestaat immers vooral uit peptidoglycaan en teichoïnezuur, deze blijken geen goede barrière te vormen voor antiseptica. Bij GNB is de celwand wel vaak impermeabel voor antiseptica.

Zoals weergegeven in tabel 4 zijn de MIC waarden van *S. aureus* voor CHX en QAC significant lager dan deze van *E. Coli*. (5)

Bij *P. aeruginosa* zorgt het hoge gehalte aan divalente kationen voor sterke lipopolysaccharide (LPS) links. Verder heeft *P. aeruginosa* nauwe porines in het buitenmembraan die de diffusie van antiseptica verhinderen. Ook bij *P. mirabilis* draagt de celwand bij tot resistentie tegen chloorhexidine en QAC. (5)

In *Escherichia coli* is de *AcrAB* efflux pomp bekend als transporter van antibiotica en antiseptica.

Upregulatie van deze effluxpomp wordt gecontroleerd door de multiple antibiotic resistance activator (*MarA*). Omgevingsfactoren kunnen expressie van *MarA* stimuleren, wat leidt tot een verhoogde expressie van de *AcrAB* effluxpomp en een verminderde gevoeligheid voor antiseptica. Voorbeelden van deze omgevingsfactoren zijn het antisepticum triclosan en pine oil. (7)

Triclosan is een substraat voor multidrug effluxpompen in *Pseudomonas aeruginosa* en selecteert voor mutanten die niet alleen minder gevoelig zijn voor antiseptica maar ook voor antibiotica zoals ciprofloxacin. (7)

Een biofilm is een groep sessiele micro-organismen die vastzitten op een oppervlakte en ingebed zijn in een extracellulaire matrix. De bacteriën in een biofilm hebben een gewijzigde groeisnelheid omdat voedingsstoffen minder goed doordringen in de biofilm. Ze zijn minder gevoelig voor antiseptica door deze verminderde groeisnelheid, maar ook omdat antiseptica kunnen worden geneutraliseerd of afgebroken in de biofilm. (7)

Tabel 4: MIC waarden van enkele ontsmettingsmiddelen voor gram-positieve en gram-negatieve bacteriën.

Chemical agent	MIC ($\mu\text{g/ml}$) for:		
	<i>S. aureus</i> ^b	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Benzalkonium chloride	0.5	50	250
Benzethonium chloride	0.5	32	250
Cetrimide	4	16	64–128
Chlorhexidine	0.5–1	1	5–60
Hexachlorophene	0.5	12.5	250
Phenol	2,000	2,000	2,000
<i>o</i> -Phenylphenol	100	500	1,000
Propamine isethionate	2	64	256
Dibromopropamidine isethionate	1	4	32
Triclosan	0.1	5	>300

3.2 Verworven resistentie:

Mechanismen voor verworven resistentie zijn mutaties ter hoogte van het aangrijpingspunt (target) voor antiseptica, overexpressie van de target, plasmide gemedieerde efflux en enzymatische degradatie.

Mutaties met verandering of overexpressie van de target leiden bij antiseptica waarschijnlijk niet tot hooggradige resistentie omdat antiseptica ingrijpen op meerdere targets. (6)

Plasmidegemedieerde efflux is daarentegen wel een belangrijk mechanisme van verworven resistentie. Er zijn momenteel 11 genen bekend die coderen voor efflux gemedieerde resistentie voor antiseptica: *qacA, B, E, EΔ1, F, G, H, J, Z, smr* en *norA*. Sommige van deze genen worden teruggevonden bij stafylokokken, andere bij enterokokken of GNB. Ook de antiseptica die het substraat vormen voor de effluxpomp verschilt, zoals weergegeven in tabel 5. (9)

Tabel 5: Samenvatting van beschreven genen voor efflux gemedieerde resistentie voor antiseptica.

	Gen, Familie										
	<i>qacA</i> , MFS	<i>qacB</i> ^a MFS	<i>Smr</i> ^b , SMR	<i>qacE</i> , SMR	<i>qacE1</i> SMR	<i>qacF</i> , SMR	<i>qacG</i> , SMR	<i>qacH</i> , SMR	<i>qacJ</i> , SMR	<i>qacZ</i> , SMR	<i>norA</i> , MFS
Genera:											
stafylokokken	+	+	+		+		+	+	+		+
enterokokken					+					+	+
GNB				+	+	+					+
Substraat:											
QAC	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CHX	R	X	X	NT	R	NT	X	NT	NT	X	R

R: isolaten vertonen resistentie voor het betreffend antisepticum

NT: resistentie werd niet getest

X: het antisepticum is geen substraat voor de effluxpomp

^aEr zijn zeven nucleotiden verschil tussen *qacA* en *qacB*.

^bAndere benamingen voor *Smr* zijn *qacC*, *qacD* en *ebr*.

MFS: Major facilitator superfamilij

SMR: Small multidrug resistance family

Bij stafylokokken werd er in verschillende studies een verband gevonden tussen aanwezigheid van *qacA* en *qacB* en verhoogde MIC waarden voor CHX en benzalkonium chloride (BC). (5,7,11,27)

Voor gramnegatieven is er minder duidelijk bewijs voor plasmide gemedieerde resistentie. Een studie van Abuzaid et al. onderzocht de aanwezigheid van genen voor effluxpomp *cepA*, *qacΔE* en *qacE* bij 64 klinische isolaten van *K. pneumoniae*. Een verband tussen de aanwezigheid van deze genen en een verhoogde MIC voor de antiseptica CHX, Trigene en BC werd aangetoond. (13)

Naparstek et al. onderzochten of de aanwezigheid van de genen voor de *cepA*, *acrA* en *kdeA* effluxpomp gecorreleerd waren met verhoogde MIC waarden voor CHX bij *K. pneumoniae* sequentie type 258 (ST258), dit kon echter niet worden aangetoond. (14)

Kücken et al. bepaalden de MIC voor BC en cetyltrimethylammonium bromide alsook de aanwezigheid van de genen *qacEΔ1* en *qacE* bij 103 klinische isolaten van *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa* en *Stenotrophomonas maltophilia*. De MIC voor BC en cetyltrimethylammonium bromide verschilde niet significant tussen isolaten met of zonder *qacEΔ1* en *qacE*. (26)

4. Gevolgen van een verminderde gevoeligheid voor antiseptica:

Verschiedende studies tonen aan dat methicilline resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) minder gevoelig is voor CHX dan methicilline sensitieve *Staphylococcus aureus* (MSSA). (9,24) CHX wordt veel gebruikt voor MRSA decontaminatie, dus een verminderde gevoeligheid van MRSA voor CHX kan theoretisch therapiefalen veroorzaken. Echter, hoewel MRSA hogere MIC waarden voor CHX vertoont, is de klinische relevantie hiervan waarschijnlijk beperkt. De concentraties van CHX die gebruikt worden

in de praktijk, variërend tussen 0,5-4% zijn immers veel hoger dan de MIC die in vitro worden getest. (9)

Twee recente studies suggereren dat een verminderde CHX gevoeligheid bij MRSA toch een klinische impact kan hebben.

De eerste studie bestudeerde het effect van drie interventies op de verspreiding van MRSA in 2 intensieve eenheden in het St Thomas Hospital te Londen. In de periode van de studie waren EMRSA-15 en EMRSA-16 circulerend in de beide eenheden. Daarenboven was er op de twee eenheden een epidemie met een niet-endemische stam: ST239. De eerste twee interventies waren: A: educatie van het personeel over handhygiëne en B: cohortering van MRSA gekoloniseerde patiënten. Deze interventies hadden geen effect op de transmissie van EMRSA-15 en EMRSA-16. De derde interventie, C: gebruik van CHX voor decontaminatie van de MRSA gekoloniseerde patiënten, had tot gevolg dat de transmissie van EMRSA 15 en 16 daalde, maar de transmissie van de niet endemische stam ST239 nam toe. De 21 isolaten van ST239 werden verder onderzocht: alle stammen waren drager van de *qacA/B* genen en hadden een MIC voor CHX die driemaal hoger was dan de MIC van 21 niet-ST239 MRSA isolaten (respectievelijk 78 mg/l en 26 mg/l). Slechts één niet-ST239 isolaat was drager van de *qacA/B* genen. De auteurs besloten dat hoewel decontaminatie met CHX leidt tot een reductie van gevoelige MRSA stammen er mogelijks een selectie kan optreden van stammen die resistent zijn voor CHX. (22)

Een tweede studie toont aan dat gecombineerde laaggradige mupirocine resistentie en aanwezigheid van de *qacA/B* genen onafhankelijke risicofactoren zijn voor persisterend MRSA dragerschap na decontaminatie. Deze case-control studie werd uitgevoerd bij 75 MRSA dragers waarbij eradicatie faalde (cases) en 75 MRSA dragers waarbij eradicatie succesvol was (controls). MRSA dragers met hooggradige mupirocine resistentie werden geëxcludeerd. De decolonisatie bestond uit intranasale applicatie van mupirocine tweemaal daags gedurende 5 dagen en dagelijks baden in CHX 4% gedurende 7 dagen. (23)

Deze studies suggereren een verband tussen de aanwezigheid van de genen verantwoordelijk voor CHX resistentie en het falen van decontaminatie van MRSA dragers. Verder onderzoek is echter nodig om na te gaan of dit een echt oorzakelijk verband is.

Of het gebruik van antiseptica bacteriën die resistent zijn voor deze antiseptica kan uitselecteren staat nog ter discussie. Een studie vergelijkt de prevalentie van genen die coderen voor effluxpomp gemedieerde resistentie voor antiseptica bij *S. aureus* tussen verpleegsters en de algemene bevolking. Er werd een hogere prevalentie van de *qac* genen waargenomen bij de verpleegsters. Deze studie zou suggereren dat het gebruik van antiseptica in het ziekenhuis stammen kan selecteren die resistentie vertonen ten opzichte van deze ontsmettingsmiddelen. (21)

5. Verband tussen resistentie voor antiseptica en antibioticaresistentie:

De aanwezigheid van efflux gemedieerde resistentie voor antiseptica kan gevolgen hebben voor de gevoeligheid aan andere antimicrobiële middelen door kruisresistentie en coresistentie. De effluxpomp *norA* kan bijvoorbeeld zowel antiseptica als fluoroquinolonen uit de cel verwijderen (= kruisresistentie). Daarnaast kan ook coresistentie voorkomen omdat de genen voor CHX resistentie voorkomen op dezelfde mobiele genetische elementen als genen voor antibiotica resistentie (= coresistentie). (9)

Op genetisch niveau bewijzen verschillende studies een verband tussen resistentie voor antiseptica en antibioticaresistentie. Het *qacA* gen werd voor het eerst beschreven op het plasmide Tn4002, een plasmide waarop ook resistentiegenen voor β -lactam antibiotica werden teruggevonden. Andere plasmiden waarop het *qacA* gen kan worden teruggevonden zijn pSK1, pSK105, pSK107, pSK4032, pSK4769, pSK638 en pSK57. De families waartoe deze plasmiden behoren dragen ook genen voor antibioticaresistentie, zoals aminoglycosiden (Tn4001) en trimethoprim (Tn4003). (20)

Een Noorse studie van Sidhu et al. bestudeerde 61 isolaten van *S. aureus* en 177 isolaten van CNS uit hemoculturen en uit cutane stalen van kinderen behandeld voor kanker en HIV patiënten. 118 isolaten vertoonden een verhoogde MIC voor benzalkonium chloride. Van 78 BC resistente stafylokokken werd in 65 (83%) het *qacA/B* gen teruggevonden, in 2 (3%) *qacC*, in 43 (55%) *blaZ*. Het *qacA/B* en *blaZ* gen (dat codeert voor een bètalactamase bij stafylokokken) bevonden zich in 19 (24%) isolaten op hetzelfde plasmide. Deze studie bewijst het bestaan van coresistentie tussen benzalkonium chloride en penicilline.

Op fenotypisch niveau zijn er eveneens studies die dit verband onderbouwen. In 1971 bewees Stickler in een studie bij patiënten die intermittente blaassondage toepassen dat het ontsmetten van de perineale huid met chloorhexidine voor catheterisatie werkzaam was tegen de grampositieve flora maar niet tegen GNB zoals *P. mirabilis*, *P. stuartii* en *P. aeruginosa*. Analyse van de gevoeligheid voor 8 antibiotica die frequent gebruikt werden om urineweginfecties te behandelen (gentamicine, colistine, nitrofurantoïne, sulphafurazole, kanamycine, ampicilline, sulfametoxazole/trimethoprim en tetracycline) toonde dat deze micro-organismen hier ook resistenter voor waren. (15)

Kojalg et al. toonden aan dat een verhoogde resistentie voor ciprofloxacin, imipenem, cefotaxime, ceftazidime, gentamicine en aztreonam gepaard ging met een verhoogde minimale bactericide concentratie (MBC) voor CHX. De studie werd uitgevoerd bij 70 klinische isolaten waaronder grampositieve en gramnegatieve micro-organismen. Non-fermenters waren het minst gevoelig voor chloorhexidine, grampositieve micro-organismen het meest gevoelig. (16)

S. Buffet-Bataillon et al. vonden een correlatie tussen verhoogde MIC waarden voor quaternaire ammoniumverbindingen en een verhoogde MIC voor cotrimoxazole bij klinische isolaten van *E. coli*. De stalen werden geïsoleerd uit verschillende infectiehaarden: urine, abdominale wonden, enz. (17)

Deze studies kunnen evenwel geen onderscheid maken tussen intrinsieke resistentie bij non-fermenters voor zowel antibiotica als antiseptica (omwille van impermeabiliteit van de celwand) en plamidegedeelde resistentie.

Vraag 3: Kan een verminderde gevoeligheid van multiresistente GNB voor antiseptica worden aangetoond met de huidige methoden voor gevoeligheidsbepalingen?

In de literatuur vonden we geen gegevens over de gevoeligheid van multiresistente GNB en CPE in het bijzonder voor antiseptica. De enige beschikbare studie van Payne evalueerde de gevoeligheid van klinisch significante micro-organismen voor antiseptica met de fase 2 suspensietest, en vond geen verschil tussen klinische relevante micro-organismen en ATCC stammen (19). Er werden contacttijden van 1 en 5 minuten gehanteerd, en bij een contacttijd van 1 minuut werd meer verschil in werkzaamheid gezien tussen de verschillende antiseptica. In deze studie werden de volgende stammen getest: multiresistente *Acinetobacter baumannii*, *Candida albicans*, multiresistente *Escherichia coli*, *Enterobacter*, vancomycine resistente *Enterococcus faecalis*, *Gardnerella vaginalis*, multiresistente *Klebsiella pneumoniae*, *Propionibacterium acnes*, *Proteus mirabilis*, gentamicine resistente *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella species*, *Serratia marcescens*, methicilline resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Streptococcus pyogenes* en *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14552 en *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Er werden echter geen CPE getest.

Om een antwoord op de bovenstaande vraag te formuleren hebben we dus zelf de fase 2 stap 1 in vitro suspensietest volgens de EN 1276 norm toegepast op 3 multiresistente stammen en 2 referentiestammen. We kozen ervoor om 0,3% albumine toe te voegen aan de bacteriële suspensie en op deze manier de antiseptica te testen onder de 'clean' omstandigheden uit de fase 2 stap 1 suspensietesten omdat we de basis activiteit van de ontsmettingsmiddelen willen testen in omstandigheden die enigszins overeenkomen met de omstandigheden waarin zij dagdagelijks worden gebruikt. Het test protocol is gebaseerd op het protocol dat momenteel in routine gebruikt wordt in het labo ziekenhuishygiëne voor evaluatie van antiseptica. Dit protocol werd ontwikkeld door prof. Reybrouck. (18)

1. Materialen en methoden:

1.1 Bodems

De ATCC stammen en multiresistente GNB werden bewaard op TSA collectietube. 24 uur voor de test werden de stammen uitgeënt op een TSA bodem.

1.2 Oplosmiddel

De bacteriële suspensie en verdunningen worden gemaakt in VV9, bestaande uit 1 g tryptone en 8,5 g NaCl opgelost in 1 liter AD. De oplossing wordt geautoclaveerd na bereiding.

1.3 Neutralisator

Als neutralisator wordt lecithine 2,0%, polysorbaat 80 2,0% en sodium thiosulfaat 0,5% in gedestilleerd water (AD) gebruikt. (18) De neutralisators worden na bereiding geautoclaveerd. Onmiddellijk na het autoclavieren worden ze opgeschud om neerslagvorming te voorkomen. De werking van de neutralisators wordt voor elk antisepticum geconfirmeerd met de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

1.4 Albumine bevulling

1,5 g albumine werd opgelost in 50 ml AD (=3% oplossing) en gefilterd door een membraanfilter.

1.5 Antiseptica

Er werd gekozen voor 4 antiseptica uit verschillende klassen, namelijk Hibitane 0,05%®, Aniosyme®, Dakin Cooper® en Braunol®. In tabel 6 worden de klassen en belangrijkste toepassingen van de geteste antiseptica weergegeven. Alle antiseptica werden geleverd in hun commerciële formule. Het was bij geen van de producten nodig om deze te verdunnen voor gebruik.

Tabel 6: Uitgetestte antiseptica

Antisepticum	Klasse	Spectrum	Fabrikant	Toepassing
Hibitane 0,05%®	Chloorhexidine	<ul style="list-style-type: none">• Beperkt bactericide (grampositieven)• Niet tuberculocide• Weinig fungicide• Niet virucide• Niet sporocide	Qualiphar	<ul style="list-style-type: none">• Ontsmetting open wonden
Aniosyme®	Quaternaire ammonium verbinding	<ul style="list-style-type: none">• Beperkt bactericide, niet pseudomonacide, bacteriostatisch• Niet tuberculocide• Minder fungicide• Minder virucide• Niet sporocide	Anios Hospithera	<ul style="list-style-type: none">• Enzymatisch detergent• Reiniging van materiaal door onderdompeling
Dakin Cooper®	Chloor	<ul style="list-style-type: none">• Sterk bactericide (100 ppm)• Tuberculocide (1000 ppm)• Fungicide (1000 ppm)• Sterk virucide (1000 ppm)• Sporocide (> 1000 ppm)	Melisana	<ul style="list-style-type: none">• Ontsmetten van huid, slijmvliezen, open wonden• Ontsmetten van kleine oppervlakten
Braunol®	Povidon jodium	<ul style="list-style-type: none">• Bactericide• Tuberculocide• Fungicide• Virucide• Niet sporocide	Braun Medical	<ul style="list-style-type: none">• Ontsmetten van huid en open wonden

1.6 Test stammen

De test stammen bestaan uit 2 ATCC stammen en 3 CPE stammen. De ATCC stammen zijn een *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en *Escherichia coli* ATCC 25922. De CPE stammen bestaan uit 2 rereferentie stammen uit het nationaal referentie centrum voor multiresistente GNB (Cliniques Universitaires Mont-Godinne, UCL) van prof. Dr. Y. Glupczynski (28) en 1 klinische stam uit het UZ Leuven. Alle stammen werden moleculair getypeerd door het referentielabo.

1.7 Test protocol

De bacteriële suspensie (BS) wordt bereid door suspensie van de stam in 4,5 ml VV9, de dichtheid wordt op 1 Mc Farland gebracht. Hierbij wordt 0,5 ml van de 3% albumine oplossing gevoegd. Op deze manier bekomen we een BS met 0,3% albumine. Bij 10 ml antisepticum wordt 0,1 ml van de BS gevoegd. Na 1 minuut en 5 minuten wordt 1 ml van de suspensie toegevoegd aan 9 ml neutralisator. De suspensie wordt gevortexed. Na 5 minuten worden 1 ml van de suspensie en zijn 10^{-1} tot en met 10^{-3} verdunningen geënt op een TSA bodem. Dezelfde procedure wordt uitgevoerd met gebruik van gedestilleerd water in plaats van het ontsmettingsmiddel, zodat het aantal bacteriën in de suspensie zonder inwerking van het antisepticum berekend kan worden. De test wordt in duplo uitgevoerd. Bij discrepanties tussen de resultaten wordt de test een derde keer uitgevoerd.

Na 24 uur incubatie worden het aantal CFU op de bodems geteld. De logaritmische reductie wordt berekend door de logaritme te nemen van het aantal CFU op de testplaat (met antisepticum) en hier de logaritme van het aantal CFU op de controleplaat (met gedestilleerd water). Indien dit verschil meer dan 5 log bedraagt is het antisepticum voldoende werkzaam.

De werking van de neutralisator wordt éénmaal gecontroleerd voor elk antisepticum, voor deze test werd de *P. aeruginosa* ATCC 27853 gebruikt. Bij 9 ml van de te testen neutralisator wordt 1 ml antisepticum gevoegd, de suspensie wordt gevortexed. Na 5 minuten wordt hierbij 0,1 ml BS gevoegd. Na 5 minuten inwerkingstijd wordt de suspensie gevortexed en verder verdund. 10^0 en 10^{-3} worden geënt op een TSA bodem. Indien er **geen** groei is na 24 u incubatie is de neutralisator **niet** werkzaam.

2. Resultaten:

De resultaten van de in vitro testen worden weergegeven in Tabel 7.

Alle antiseptica geven een reductie van meer dan 5 log na een contacttijd van zowel 1 minuut als 5 minuten, zowel met de referentiestammen als met de CPE stammen.

Tabel 7: Resultaten van de fase 1 suspensietesten:

Stam	Log reductie bekomen door:							
	Chloorhexidine 0,05% (Hibitane 0,05%®)		Aniosyme®		Chloramine 0,5% (Dakin Cooper®)		Povidon Iodium 6,5% (Braunol®)	
	1 min	5 min	1 min	5 min	1 min	5 min	1 min	5 min
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>6,1	>5,7	>6,7	>5,9	>7,0	>5,8	>7,0	>6,4
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>5,0	>6,0	>5,0	>5,9	>5,0	>6,0	>4,6*	>6,0
<i>P. aeruginosa</i> VIM positief	>6,3	>6,3	>6,0	>6,0	>5,6	>5,9	>6,2	>6,0
<i>K. pneumoniae</i> Oxa 48 positief	>5,7	>6,2	>5,5	>5,1	>5,6	>6,3	>5,7	>5,9
<i>K. oxytoca</i> VIM positief**	> 5,9	>5,8	>6,1	>5,8	>6,0	>6,0	>5,7	>5,8

*Inoculum te laag om een 5 log reductie vast te stellen

**Klinische stam

3. Bespreking:

We zagen met de in vitro suspensietesten geen verschil in gevoeligheid tussen de referentiestammen en de CPE stammen. Reductie van de contacttijd tot 1 minuut zorgde evenmin voor een verschil in gevoeligheid tussen referentiestammen en CPE stammen. We kunnen hieruit besluiten dat er geen majeure resistentie voor de uitgeteste antiseptica bestaat bij de CPE stammen.

De fase2 suspensietest is echter niet geschikt om kleine veranderingen in gevoeligheid te detecteren. We weten dat de uitgeteste stammen worden gedood door een overmaat aan antisepticum, maar niet bij welke concentratie van het antisepticum er geen bacteriële killing meer optreedt. Deze laatste gegevens kunnen we wel bekomen door MIC bepalingen uit te voeren. Het lijkt ons daarom nuttig om ook MIC bepalingen uit te voeren voor de vier geëvalueerde antiseptica. (4)

To do/ACTIONS

Uittesten van de gevoeligheid van de 5 eerder vermeldde stammen voor Chloorhexidine 0,05%, Aniosyme, Chloramine 0,5%, Povidon Iodium 6,5 % met MIC bepalingen.