

¹ Mundipharma GmbH, Limburg

² Advanced Therapies, Inc., Novato, USA

³ Interdisciplinary Center for Biotechnology Research University of Florida, Gainesville, USA

⁴ Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universität Magdeburg

Molekulare Effekte eines mikrobiziden Wirkstoffes auf relevante Mikroorganismen: Elektronenmikroskopische und biochemische Untersuchungen zu Polyvidon-Iod

Molecular effects of a microbicidal substance on relevant microorganisms: Electronmicroscopic and biochemical study on Povidone-iodine

Karen Reimer¹, Hans Schreier², Gregory Erdos³, Brigitte König⁴,
Wolfgang König⁴ und Wolfgang Fleischer¹

Mit 6 Abbildungen

Abstract

The microbicidal activity of the broad spectrum antimicrobial agent povidone-iodine is due to the strong oxidizing effects of free iodine on functional groups of amino acids, nucleotides and double bonds of unsaturated fatty acids. While the chemical mechanism of action of PVP-iodine is well understood, the actual sequence of events on the cellular and molecular level that causes rapid cell death has not been fully understood. The aim of this study was to elucidate effects of povidone-iodine on cell ultrastructure by electron microscopy and to monitor changes in enzyme activity and nucleotide efflux.

Staphylococcus aureus, *E. coli* and *C. albicans*, medically relevant gram-positive, gram-negative and yeast micro-organisms, served as models. In the presence of povidone-iodine, rapid partitioning of the cytoplasm and pronounced coagulation of povidone material was noted. Especially *C. albicans* exhibited a rapid, dose-dependent „loosening“ of the cell wall; cells remained intact without lysis, rupture or wall breakage.

Changes in β -galactosidase and nucleotide concentrations were measured in *E. coli*. A rapid and dose-dependent loss of cellular β -galactosidase activity was found, with

no increase in the supernatant; loss of cellular nucleotides corresponded with an increase in the supernatant. Electron microscopy and biochemical observations support the conclusion that povidone-iodine interacts with cell walls of micro-organisms causing pore formation or generating solid-liquid interfaces at the lipid membrane level which lead to loss of cytosol material, in addition to enzyme denaturation. The chemical mechanism of action explains the fact that povidone-iodine does never generate resistance in micro-organisms.

Zusammenfassung

Die chemische Wirkung des Breitspektrum-Mikrobizids Polyvidon-Iod (PVP-Iod) besteht in der Oxidation von funktionellen Gruppen der Aminosäuren und von Doppelbindungen ungesättigter Fettsäuren durch freies Iod. Wie sich diese Wirkung auf Zellebene entfaltet, ist bis jetzt nicht vollständig bekannt bzw. dokumentiert. Ziel der Studie war es, mittels Elektronenmikroskopie die Effekte von PVP-Iod auf die Ultrastruktur der Mikroorganismenzelle und die zugrundeliegenden biochemischen Prozesse (Enzymaktivität und Nukleotidefflux) zu beleuchten.

Als Modellkeime wurden *Staphylococcus aureus*, *E. coli* und *C. albicans* gewählt. Wurden die Keime 30 min mit PVP-Iod-Lösung inkubiert, traten im normalerweise gleichmäßig granulierten Zytoplasma fleckige Veränderungen sowie eine ausgeprägte Koagulation des Kernmaterials auf. Besonders deutlich bei *C. albicans* führte die Exposition mit PVP-Iod dosisabhängig zu einer rasch einsetzenden Struktur-Schädigung der Zellwand. Wie bei *E. coli* und *Staphylococcus aureus* blieb der Zellkörper jedoch intakt, es gab kein Anzeichen für eine Wandruptur oder Lyse.

Die als Indikator in *E. coli* gemessene intrazelluläre Aktivität der β -Galaktosidase nahm unter PVP-Iod rapide und dosisabhängig ab, extrazellulär wurde kein Anstieg gemessen, da Enzyme durch Iod rasch inaktiviert werden. Für die Nukleotide wurde hingegen eine rasche photometrisch gemessene Konzentrationsverschiebung vom Zellinneren nach außen beobachtet.

Elektronenmikroskopische und biochemische Befunde erlauben den Schluß, daß Iod direkt eine Zellwandschädigung des Mikroorganismus verursacht, die zum Verlust von zellulärem Material führt. Die Ergebnisse stützen die Hypothese, daß durch Oxidation der Phospholipide „fest-flüssige Grenzonen“ in der äußersten Schutzhülle und daran entlang Poren entstehen. Bakterien haben für diese Verletzung keinen Reparaturmechanismus; dies erklärt, warum es keine Resistenzentwicklung gegenüber PVP-Iod gibt.

Einleitung

Das im Jahr 1811 entdeckte Element Iod wird seit mehr als 150 Jahren gezielt zur Verhütung und Behandlung von Infektionen – vor allem auf Wunden – eingesetzt.

Das Halogen Iod wurde zunächst in Form von ethanolischer Iodtinktur oder Iodoform [6] verwendet. Die schlechte Wasserlöslichkeit, die Instabilität und toxische Wirkungen auf Haut und Schleimhäuten mußten die medizinische Anwendung einschränken. Erst die Entwicklung der Iodophore, in denen das

Iod in einem Makromolekülkomplex gebunden und nur zum kleinen Teil frei vorliegt, ermöglichte einen breiteren Einsatz des hochpotenten antiinfektiven Wirkstoffes. Die iodabspaltende Substanz Polyvinylpyrrolidon-Iod (PVP-Iod) ist gut wasserlöslich. Die Strukturformel ist in Abbildung 1 dargestellt.

In wäßriger Lösung stellt sich ein chemisches Gleichgewicht ein. Das freie molekulare Iod ist für die mikrobizide Aktivität verantwortlich; das über Wasserstoffbrücken nichtkovalent an Polyvinylpyrrolidon gebundene, verfügbare Iod bildet ein Reservoir für die Nachlieferung aktiven Iods bei Vorhandensein von Reaktionspartnern – also bei Bedarf. So bleiben die mikrobiziden Eigenschaften uneingeschränkt erhalten, während Toxizität und Sensibilisierungsrate minimiert sind.

Das antimikrobielle Spektrum von Iod umfaßt alle relevanten Bakterien, einschließlich Mykobakterien und Sporen, Pilze, viele Virus- und Protozoenarten [8]. Auch gegenüber Antibiotika-resistenten Erregern werden durch PVP-Iod nach kurzen Kontaktzeiten (15 s bis 1 min) logarithmische Keimzahl-Reduktionsfaktoren größer 5 erreicht (16, 25).

Eine echte Resistenzentwicklung von Mikroorganismen wurde bislang nicht beobachtet (2, 13, 24).

Die bakterizide Wirksamkeit des Naturelements Iod wurde erstmals 1880 von Davaine (5) ausführlich beschrieben. Das Prinzip beruht auf dem starken oxidativen Potential, wodurch molekulares Iod rasch mit SH-, OH- und NH-Gruppen in Aminosäuren sowie mit Doppelbindungen in ungesättigten Fettsäuren reagiert (10). Dies führt zu irreversiblen Schäden an räumlichen Strukturen und Funktionsbausteinen von Mikroorganismen aller Art.

Während dieses grundsätzliche chemische Wirkungsprinzip als bekannt vorausgesetzt werden kann, fehlten bislang Erklärungen zum Ablauf der Ereignisse auf zellulärer bzw. molekularer Ebene, die die schnelle Abtötung der Mikroorganismen verursachen. Ziel der vorliegenden Studie war es, einen Beitrag zur Aufklärung der Wirkungsweise des antiseptischen Agens PVP-Iod durch Nutzung elektronenmikroskopischer und biochemischer Techniken zu leisten und die Frage zu untersuchen, warum keine Resistenzentwicklung auftritt.

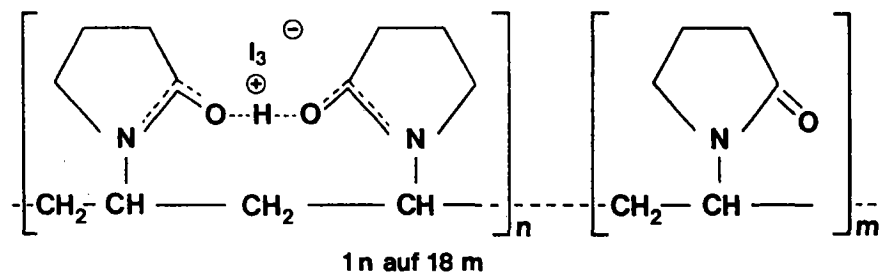


Abb. 1. Poly(1-vinyl-2-pyrrolidone)-Iod-Komplex (nach 23).

Fig. 1. Poly(1-vinyl-2-pyrrolidone) iodine complex (modified from 23).

Material und Methoden

PVP-Iod

Es wurde eine standardisierte Lösung (Betaisodona® Lösung, Mundipharma GmbH, Limburg) genutzt. Die Verdünnungen erfolgten mit destilliertem Wasser.

Mikroorganismen

Als Modellkeime wurden *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans* ausgewählt. Sie wurden über Nacht bei 37°C auf soliden Nährmedien aus Trypticase-Soja-Bouillon mit 2,5% Bacto Acar (Difco) kultiviert. Die Bakterien- bzw. Sproßpilzzellen wurden dann resuspendiert und in der Mikrozentrifuge (Eppendorf) so sedimentiert, daß 1 mm-starke Pellets entstanden.

Elektronenmikroskopie

Jedes Zellpellet wurde mit 0,1 ml der entsprechend verdünnten Testsubstanz (bzw. dest. Wasser oder Nährbouillon als Kontrolle) im Vortex Mixer resuspendiert. Die PVP-Iod-Lösung wurde als Testsubstanz unverdünnt, 1:10 und 1:100 verdünnt eingesetzt. Jeder Einzelversuch wurde 20mal wiederholt. Nach 30 min Inkubationszeit wurde die Reaktion mit dem 12fachen Volumen einer Neutralisationslösung (3% Tween 80, 0,3% Lecithin, 0,1% Histidin, 0,5% Natriumthiosulfat) gestoppt. Die Zellen wurden erneut sedimentiert und mit 1 ml 2% Glutaraldehyd in PBS (pH 7,2) für 30 min resuspendiert, dann dreimal in Puffer gewaschen und weitere 30 min mit 1% gepuffertem OsO₄ exponiert. Nach Waschen und Dehydrierung mit Ethanol erfolgte die Einbettung in eine Epon/Spurr Epoxid-Mixtur. Die Dünnschnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat gefärbt und bei 75 kV in einem Hitachi H-7000 Elektronenmikroskop untersucht.

Biochemische Untersuchungen

Um den Verlust von zytoplasmatischem Material aus den Mikroorganismenzellen zu bestimmen, wurden als Indikatoren die β -Galaktosidaseaktivität und die Nukleotidkonzentration sowohl intrazellulär (im Zellpellet) wie im Überstand von *E. coli* untersucht.

β -Galaktosidase-Aktivität: *E. coli* (OD_{600nm} = 0,6) wurde für verschiedene Zeitspannen mit unterschiedlichen Konzentrationen der PVP-Iod-Lösung inkubiert. Die Proben wurden mit 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) mit 9 mM KCl, 1 mM MgSO₄ und 5 mM Dithiothreitol (DTT) versetzt, um das restliche Iod zu binden, da sonst die colorimetrische Messung der Enzymaktivität gestört würde. Die Proben wurden in 1 M Na₂CO₃ Puffer zentrifugiert. Nach Gewinnung des Überstandes wurde das Zellpellet mit Toluol aufgebrochen, um die intrazelluläre Enzymaktivität zu bestimmen. Als Substrat der enzymatischen Reaktion diente o-Nitrophenyl- β -Galaktopyranosid (ONPG, 4 mg/ml). Der Umsatz wurde photometrisch bei 420 nm gemessen.

Nukleotide: *E. coli* wurde wie oben beschrieben kultiviert; DTT verhinderte wiederum eine Interferenz freien Iods mit dem Nukleotid-Meßspektrum. Die vollständige Freisetzung intrazellulärer Nukleotide wurde durch Inkubation der Zellen mit 1/10 (V/V) HClO₄ (70%) für 1 h bei 37°C erreicht. Die photometrische Messung erfolgte bei 254 nm.

Ergebnisse

Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der nicht mit der Testsubstanz behandelten Kontrollen zeigen die typische Form, Struktur und auch die intakte Zellwand der Mikroorganismenspezies *S. aureus* (Abb. 2A) und *E. coli* (Abb. 3A).

Nach 30minütiger Einwirkung von PVP-Iod-Lösung sind Strukturveränderungen des Zellinhaltes erkennbar. Das zuvor gleichmäßig granuliertes Zytoplasma erscheint fleckig (Abb. 2B und 3B). Manche Areale wirken grobkörniger, andere scheinen frei von Ribosomen zu sein. Es ist offensichtlich zu einer Segregation der vorher gleichartig verteilten Zellbestandteile gekommen.

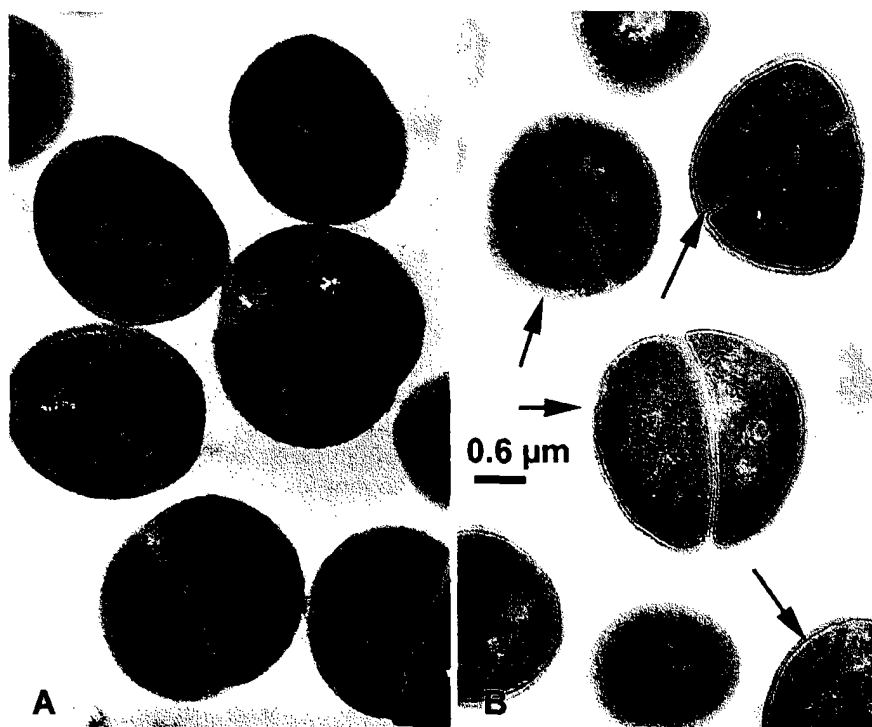


Abb. 2. Elektronenmikroskopische Darstellung von *S. aureus* ohne (A) und mit (B) Einwirkung von unverdünnter PVP-Iod-Lösung für 30 min. Die Pfeile markieren typische Segregationszonen. (Vergrößerung: $\times 60\,000$).

Fig. 2. Electron micrograph of *S. aureus* before (A) and after (B) treatment with neat povidone iodine solution for 30 min. Note segregation of cytoplasmic components (arrows) in treated cells. (Magnification: $\times 60\,000$).

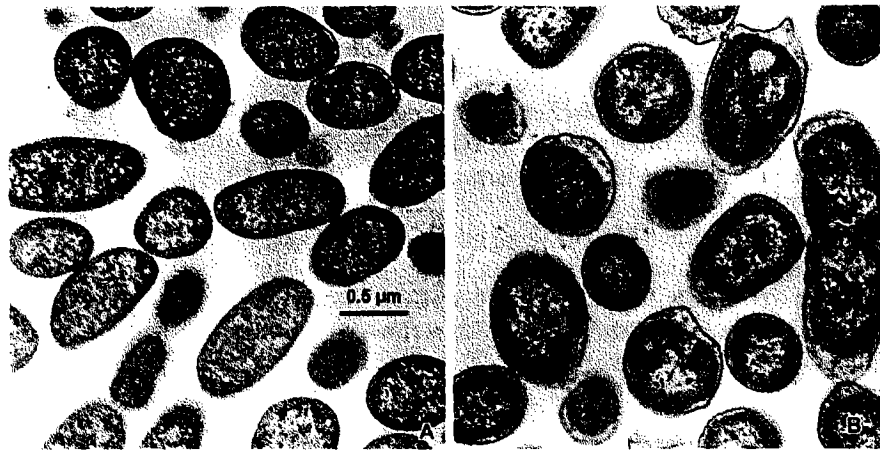


Abb. 3. Elektronenmikroskopische Darstellung von *E. coli* ohne (A) und mit (B) Einwirkung von unverdünnter PVP-Iod-Lösung für 30 min. (Vergrößerung: $\times 24\,000$).

Fig. 3. Electron micrograph of *E. coli* before (A) and after (B) treatment with neat povidone-iodine solution for 30 min. (Magnification: $\times 24\,000$).

Besonders gut bei *E. coli* zu erkennen, hat die Inkubation mit PVP-Iod auch zu einer Koagulation des chromosomalen Materials geführt (Abb. 3B).

Insbesondere bei *C. albicans* konnten konzentrationsabhängige Schädigungen der Zellwand nach 30 min Inkubation mit PVP-Iod-Lösung beobachtet und dokumentiert werden. Abb. 4A zeigt die unbehandelte, intakte Wand der Hefepilzzelle. Nach Einwirkung von 1:10 verdünnter Lösung ist die Zellwand aufgelockert und zerklüftet (Abb. 4B). Nach Inkubation mit der unverdünnten Lösung imponieren fibrillenartige Strukturen an der Zelloberfläche; die Zellwand sieht porös aus und scheint sich aufzulösen (Abb. 4C).

Bei allen drei untersuchten Spezies kommt es nicht zum plötzlichen Schrumpfen oder Platzen der Zellen.

Biochemische Untersuchungen

Die nach Aufbruch des Zellpellets intrazellulär gemessene Aktivität des Indikatorenzyms β -Galaktosidase von *E. coli* nahm unter PVP-Iod-Einfluß rapide ab. Nach 5 min Einwirkzeit wurde selbst bei niedrigen Konzentrationen (0,1%) von PVP-Iod eine deutliche Reduktion der Enzymaktivität im Zellinneren gemessen (Abb. 5). Die stärkste Abnahme der intrazellulären Enzymaktivität wurde bei 0,8 und 0,4% PVP-Iod beobachtet. Extrazellulär, also im Überstand, konnte gleichzeitig keine Zunahme der Enzymaktivität festgestellt werden.

Die photometrisch bestimmte Konzentration an Nukleotidmolekülen im Zellpellet von *E. coli* nahm unter PVP-Iod-Einfluß ebenfalls konzentrations-

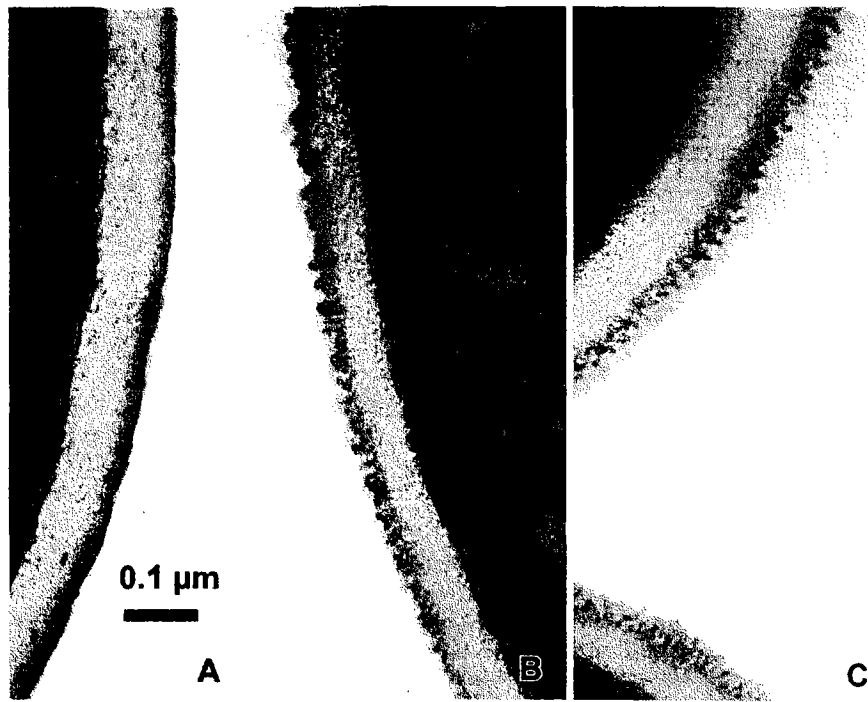


Abb. 4. Elektronenmikroskopische Darstellung der konzentrationsabhängigen Effekte von PVP-Iod auf die Zellwand von *C. albicans* (Inkubationszeit 30 min). A: unbehandelt; B: $\frac{1}{10}$ verdünnt; C: unverdünnte PVP-Iod-Lösung. (Vergrößerung: $\times 100\,000$).

Fig. 4. Electron micrograph of the concentration-dependent effects on the cell wall of *C. albicans* due to exposure to povidone iodine solution for 30 min. A: untreated; B: $\frac{1}{10}$ diluted; C: neat. (Magnification: $\times 100\,000$).

abhängig ab (Abb. 6); allerdings konnte hier eine parallele Zunahme des Nucleotidgehaltes im Überstand gemessen werden.

Diskussion

Iod ist bekannt dafür, daß es sehr schnell Bakterien abtötet (10, 12). Welche Schäden durch die oxidative Kraft des Halogens verursacht werden, ist im einzelnen nicht geklärt.

Die vorliegende Untersuchung hat die Wirkung der heute gebräuchlichsten Iod-absplattendenden Substanz PVP-Iod auf medizinisch relevante Keime beleuchtet. *E. coli*, *S. aureus* und *C. albicans* können, da sie Vertreter ganz unterschiedlich aufgebaute Mikroorganismengruppen sind, als Modellkeime für Effekte auf zellulärer und molekularer Ebene aufgefaßt werden.

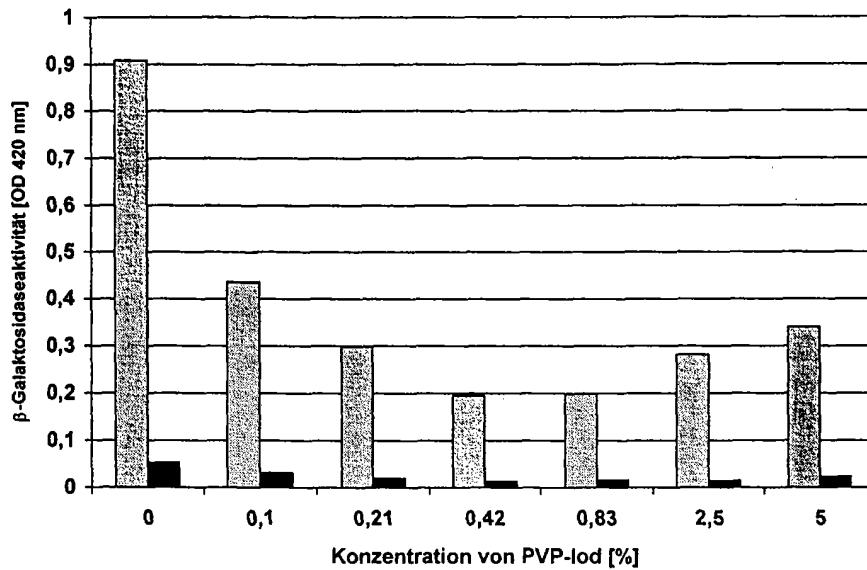


Abb. 5. Einfluß von PVP-Iod auf die β -Galaktosidaseaktivität von *E. coli* in Abhängigkeit von der PVP-Iod-Konzentration. (Inkubationszeit: 5 min).

Graue Säulen: Enzymaktivität in den Bakterienzellen (Pellet).

Schwarze Säulen: Enzymaktivität im Bakterienzellüberstand.

Fig. 5. Effect of povidone iodine on β -galactosidase activity in *E. coli* as a function of povidone iodine concentration. (Incubation time: 5 min).

Grey columns: enzyme activity in cell pellet.

Black columns: enzyme activity in supernatant.

Auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten sich nach 30minütiger Einwirkung von PVP-Iod-Lösung eine Desintegration des Zytoplasmas sowie eine ausgeprägte Koagulation des nuklearen Materials als Zeichen des Zelltods. Allerdings blieben die Zellkörper der Mikroorganismen weitestgehend intakt; es gab keine Anzeichen für Lyse oder Platzen der Zellen. Auffällig war die vor allem bei *Candida albicans* visualisierte dosisabhängige Strukturschädigung der Zellwand.

Der primäre Schritt der mikrobiziden Wirkung von PVP-Iod könnte die chemische Reaktion von molekularem Iod mit Zellwandbausteinen sein, so daß transiente oder permanente Poren entstehen. Die Arbeitshypothese, daß dadurch Zellbestandteile ausfließen, wurde durch die folgenden biochemischen Untersuchungen am Modell *E. coli* bestätigt. Die intrazelluläre Aktivität des Indikatorenzyms β -Galaktosidase nahm rapide und dosisabhängig ab. Extrazellulär wurde kein Anstieg der Aktivität gemessen, was durch eine rasche

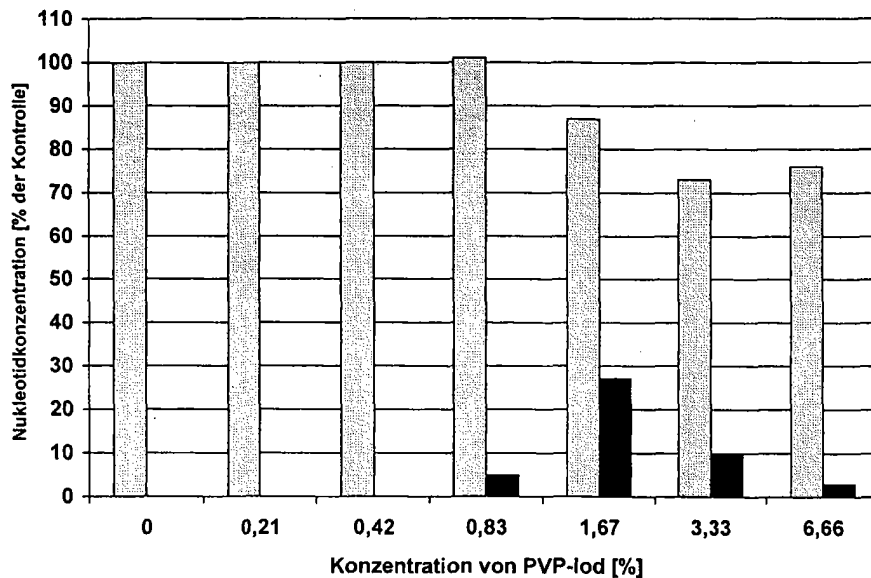


Abb. 6. Einfluß von PVP-Iod auf den Nukleotidgehalt von *E. coli* in Abhängigkeit von der PVP-Iod-Konzentration. (Inkubationszeit: 5 min).

Graue Säulen: Nukleotidgehalt in den Bakterienzellen (Pellet) im Vergleich zur Kontrolle ohne PVP-Iod (100%).

Schwarze Säulen: Nukleotidgehalt im Bakterienzellüberstand.

Fig. 6. Effect of povidone iodine on nucleotide concentration in *E. coli* as a function of povidone iodine concentration. (Incubation time: 5 min).

Grey columns: nucleotide concentration in cell pellet in comparison with control (100%).

Black columns: nucleotide concentration in supernatant.

Inaktivierung des Enzyms bei Kontakt mit PVP-Iod – auch außerhalb von Zellen – zu erklären ist (15). Für die Nukleotide – die nicht durch irgendeine funktionelle Aktivität, sondern nur durch die Konzentration der Moleküle photometrisch erfaßt werden – konnte unter PVP-Iod-Einfluß eine rasche, auch dosisabhängige Konzentrationsverschiebung vom Zellinneren nach außen beobachtet werden. Die elektronenmikroskopischen und biochemischen Befunde erlauben also den Schluß, daß Iod Zellwandschädigungen hervorruft, die zum Verlust von zellulärem Material führen. Die Ergebnisse stützen die noch unbewiesene Hypothese, daß durch Oxidation von Doppelbindungen in Phospholipiden rigide Bereiche und fest-flüssige „Grenzonen“ in der äußersten Schutzhülle und daran entlang Poren entstehen könnten. Auch ein weiteres Eindringen von Iod in das Zellinnere mit anschließenden chemischen Wirkungen auf Bestandteile des Zytoplasmas und des Kerns (bzw. Kernäquivalents) wäre so möglich.

Dieser an der Zellwand beginnende, multiple Angriffs- und Zerstörungsmechanismus kann erklären, warum es keine Resistenzentwicklung von Bakterien gegenüber PVP-Iod gibt. Auch hochresistente Keime, wie klinische Isolate von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) und *Enterokokken*, zeigen in aktuellen Untersuchungen eine unveränderte Empfindlichkeit gegenüber PVP-Iod (9, 17, 19, 20, 22).

Resistenzentwicklung ist in den letzten Jahren nicht nur für Antibiotika von großer und zunehmender Bedeutung, sondern wird auch bei Desinfektionsmitteln und antiseptischen Wirkstoffen, wie z. B. Quecksilber, Formaldehyd, Benzalkoniumchlorid und Chlorhexidin, beobachtet (14).

Lyon und Skurray (18) beschreiben Resistenzmechanismen von *S. aureus* gegenüber antiseptischen Substanzen (quarternäre Ammoniumverbindungen, Acriflavin, Ethidiumbromid) als verminderte Konzentration der Agenzien im Zellinneren der Bakterien aufgrund eines Reflux-Systems. Dieser Resistenzmechanismus könne allerdings nur effizient sein, wenn das Target des antimikrobiellen Wirkstoffes ausschließlich im Zellinnenraum liegt.

Foster (7) erklärt die Resistenz gegen Quecksilber als Folge der Entgiftung der wirksamen Quecksilberionen in der Zelle mit Ausschleusung des weniger toxischen elementaren Quecksilbers. Schleim- bzw. Kapselbildung von Erregern führt zwar im Einzelfall zur Erhöhung von minimalen Hemmkonzentrationen – wie zum Beispiel für Formaldehyd gezeigt; es handelt sich aber nicht um eine stabile Eigenschaft und auch nicht um einen echten Resistenzmechanismus (11, 14). Hingst et al. (13) zeigen in einer Untersuchung zur Epidemiologie mikrobieller Biozidresistenzen, daß bei Isolaten von *Pseudomonas*, *Klebsiellen*, *Enterobacter*, *E. coli* und anderen Spezies weder Resistenzentwicklung noch ein erhöhtes absolutes Resistenzniveau gegen PVP-Iod nachweisbar sind.

In den letzten Jahren zirkulierende einzelne Mitteilungen von Kontamination mit „resistenten“ Bakterienstämmen in PVP-Iod-Präparaten gehen letztlich auf dieselbe Quelle eines nicht-standardisierten Präparates in den USA zurück (1, 21). Die Qualität des Iod-freisetzenden Präparates (standardisierte Herstellung mit ausreichend hohem Gehalt an freiem Iod) und die korrekte Handhabung sind wichtig, wie von Panlilio et al. (21) festgestellt. Die Gruppe berichtete über Kontaminationen eines PVP-Iod-Produktes (Clinidine) mit Pseudomonaden, die sich durch Adhärenz an Kunststoffoberflächen und Bildung einer dicken Schleimschicht (Glykokalix) vor dem zu niedrig konzentrierten Iod mechanisch geschützt hatten, jedoch im Labor immer wieder empfindlich gegenüber PVP-Iod waren (1).

Bereits zehn Jahre zuvor war über Pseudobakteriämiefälle durch *Pseudomonas cepacia* in einer PVP-Iod-Lösung (Pharmadine) unter ähnlichen Umständen berichtet worden (3, 4).

Auch Lacey und Catto (17) gelangen aufgrund von Untersuchungen der Empfindlichkeit von klinischen Methicillin-resistenten und -sensitiven *Staphylococcus aureus*-Stämmen für PVP-Iod zu der Schlußfolgerung, daß auftretende Varianzen in der Empfindlichkeit durch verzögerte Iodpenetration in

Folge von Bakterienzellaggregation oder Schleimbildung bedingt sind, nicht jedoch durch primäre Resistenz oder Resistenzentwicklung.

Für die in der vorliegenden Untersuchung gezeigte multiple und an der äußersten Zellstruktur beginnende, rasche Schädigung können Mikroorganismen praktisch keinen effizienten Reparaturmechanismus entwickeln. Entgiftung und Ausschleusung kämen zu spät; Umstellung des Zellstoffwechsels kann die Vielzahl der Angriffspunkte des potenten Oxidationsmittels nicht schützen.

Die raschen molekularen Veränderungen in der mikrobiellen Zellwand sollen Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Literatur

1. Anderson, R. L., R. W. Vess, J. H. Carr, W. W. Bond, A. L. Panlilio, and M. S. Favero: Investigations of intrinsic *Pseudomonas cepacia* contamination in commercially manufactured povidone-iodine. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 12 (1991) 297-302
2. Anonym: Monographie Polyvidon-Iod. Bundesanzeiger (97) vom 29.05.1991, 3511
3. Berkelman, R. L., S. Lewin, J. R. Allen, R. L. Anderson, L. D. Budnick, S. Shapiro, S. M. Friedman, P. Nicholas, R. S. Holzman, and R. W. Haley: Pseudobacteremia attributed to contamination of povidone-iodine with *Pseudomonas cepacia*. *Ann. Intern. Med.* 95 (1981) 32-36
4. Craven, D. E., B. Moody, M. G. Conolly, N. R. Kollisch, K. D. Stottmeier, and W. R. McCabe: Pseudobacteremia caused by povidone-iodine solution contaminated with *Pseudomonas cepacia*. *N. Engl. J. Med.* 305 (1981) 621-623
5. Davaine, M. C.: Recherches sur le traitement des maladies charbonneuses chez l'homme. *Bull. Acad. Méd. Paris Ser. 2*, 9 (1880) 757-781
6. De Ruyter, G.: Zur Iodoformfrage. In: *Arbeiten aus der chirurgischen Klinik der königlichen Universität Berlin*. Hrsg. Bergmann, E. V. Hirschwald, Berlin (1887) 38-49
7. Foster, T. J.: Plasmid determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. *Microb. Rev.* 47 (1983) 361-409
8. Görtz, G., K. Reimer und H. Neef: Entwicklung, Eigenschaften und Bedeutung von PVP-Iod. In: *Topische Infektionstherapie und Prophylaxe*. Hrsg. Hierholzer, G., K. Reimer und E. R. Weissenbacher, Georg Thieme Verlag Stuttgart (1996) 3-7
9. Goldenheim, P. D.: In vitro efficacy of povidone-iodine solution and cream against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Postgrad. Med. J.* 69, Suppl. 3 (1993) 62-65
10. Gottardi, W.: Iodine and iodine compounds. In: *Disinfection, Sterilization and Preservation*. Hrsg. S. S. Block 4th Edition. Lea & Febiger, Philadelphia (1991) 152-166
11. Grün, L. und U. Heyn: Experimentelle Untersuchungen zur Erzielung einer Desinfektionsmittelresistenz gramnegativer Bakterien im Wasser. III. Mitteilung. *Hyg. Med.* 5 (1980) 530-536
12. Higashitsutsumi, M., K. Kamoi, H. Miyata, S. Ohgi, T. Shimizu, K. Koide, S. Nakajima, T. Kojima, S. Nishizawa, M. Sakamoto, T. Tuchiya, and S. Hatae: Bacteri-

- cidal effects of povidone-iodine solution to oral pathogenic bacteria in vitro. *Postgrad. Med. J.* 69, Suppl. 3 (1993) 10-14
13. *Hingst, V., K. M. Klippel und H. G. Sonntag*: Untersuchungen zur Epidemiologie mikrobieller Biozidresistenzen. *Zbl. Hyg.* 197 (1995) 232-251
 14. *Kaulfers, P. M.*: Epidemiologie und Ursachen mikrobieller Biozidresistenzen. *Zbl. Hyg.* 197 (1995) 252-259
 15. *König, B., W. König und K. Reimer*: Jod – die Stellung eines alten Desinfektionsmittels in der modernen Infektiologie. *Dtsch. Med. Wschr.* 122 (1997) 141
 16. *Koppensteiner, G.*: Die antimikrobielle Wirkung von PVP-Jod. In: *PVP-Jod in der operativen Medizin*. Hrsg. Hierholzer, G. und G. Görtz. Springer Verlag, Berlin (1984) 34-39
 17. *Lacey, R. W. and A. Catto*: Action of povidone-iodine against methicillin-sensitive and -resistant cultures of *Staphylococcus aureus*. *Postgrad. Med. J.* 69, Suppl. 3 (1993) 78-83
 18. *Lyon, B. R. and R. Skurray*: Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: Genetic basis. *Microb. Rev.* 51 (1987) 88-134
 19. *McLure, A. R. and J. Gordon*: In vitro evaluation of povidone-iodine and chlorhexidine against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Hosp. Infect.* 21 (1992) 291-299
 20. *Michel, D., G. A. Zäch, P. v. Arx und V. Geng*: Wachstumshemmende Wirksamkeit von Antiseptika im Suspensionstest in vitro auf Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli*. In: *Topische Infektionstherapie und Prophylaxe*. Hrsg. Hierholzer, G., K. Reimer und E. R. Weissenbacher. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1996) 9-13
 21. *Panlilio, A., C. M. Beck-Sague, J. D. Siegel, R. L. Anderson, S. Y. Yetts, N. C. Clark, P. N. Duer, K. A. Thomassen, R. W. Vess, B. C. Hill, O. C. Tablan, and W. R. Jarvis*: Infections and pseudoinfections due to povidone-iodine solution contaminated with *Pseudomonas cepacia*. *Clin. Infect. Dis.* 14 (1992) 1078-1083
 22. *Schäfer, V., T. A. Wichelhaus, K. P. Hunfeld, and V. Brade*: Polyvidone-iodine (Betaisodona) – Microbicidal effectiveness against highly resistant gram positives. *J. Clin. Microbiol. Infection* 3, Suppl. 2 (1997) 111
 23. *Schwarz, W. und H. U. Schenck*: Zur Chemie des PVP-Jods. In: *PVP-Jod in der operativen Medizin*. Hrsg. Hierholzer, G. und G. Görtz. Springer Verlag, Berlin (1984) 1-6
 24. *Shiraishi, T. and Y. Nakagawa*: Review of disinfectant susceptibility of bacteria isolated in hospital to commonly used disinfectants. *Postgrad. Med. J.* 69, Suppl. 3 (1993) 70-77
 25. *Werner, H. P.*: Die mikrobizide Wirksamkeit ausgewählter Antiseptika. *Hyg. Med.* 17 (1992) 51-59

Korrespondenzautor: Dr. med. *Karen Reimer*, Mundipharma GmbH, Referat Antiseptik, Mundipharmastraße 2, D-65549 Limburg (Lahn)