

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

**Mikrobiozide Wirkung von antibakteriellem Honig (Medihoney®) im
quantitativen Suspensionstest und im Prüfkörpertest im Vergleich mit
einer antiseptischen Silberwundauflage**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
(Dr. med.)
der
Medizinischen Fakultät
der
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

2011

vorgelegt von: Dorothee Igelbrink
geboren am: 04.12.1982
in: Köln

Teile der vorliegenden Arbeit basieren auf der Veröffentlichung von Igelbrink D, Koburger T, Simon A, Kramer A (2007) Mikrobiozide Wirksamkeit von Medihoney™. GMS Krankenhaushyg Interdiszip 2(3): Doc.24

Dekan: ___Prof. Dr.rer. nat. Heyo K. Kroemer

1. Gutachter: ___Prof. Dr. A. Kramer

2. Gutachter: ___PD Dr. med. Arne Simon

Tag der Disputation: ___29.07.2011_____

Ort, Raum: ___Greifswald, Seminarraum Friedrich-Löffler Institut für Medizinische
Mikrobiologie_____

Meiner Familie und Kimmi.
Danke für Eure Unterstützung.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A. baumannii	Acinetobacter baumannii
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
BI	Biokompatibilitätsindex
CATC-Agar	Citrat Azide Tween Carbonate Agar
C. albicans	Candida albicans
C. botulinum	Clostridium botulinum
CSA	Caseinpepton- Sojabohnen- pepton Agar
CSL	Caseinpepton- Sojabohnen- pepton Lösung
E. coli	Escherichia coli
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IA	Inaktivator
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
KbE	Koloniebildende Einheiten
kGy	Kilogray
KO	Kontrolle
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MRSA	Methicillin resistenter Staphylococcus aureus
NaCl	Natriumchlorid
P. aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa
PP-Dose	Polypropylen Dose
RF	Reduktionsfaktor
RSA	Rinderserumalbumin
s	Standardabweichung
S. aureus	Staphylococcus aureus
S. marcescens	Serratia marcescens
Ssp	Subspecies
Tab.	Tabelle
VRE	Vancomycinresistente Enterokokken
WSH	Wasser standardisierter Härte

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 Einleitung und Problemstellung	6
1.1 Problemstellung	6
1.2 Wissensstand zur antibakteriellen Wirkung von medizinischem Honig in vitro	9
1.3 Behandlungsergebnisse mit medizinischem Honig.....	11
1.4 Kriterien zur Definition und Unbedenklichkeit der Honigqualität	13
1.5 Bedeutung der Silberauflage Actisorb [®] silver 220	14
2 Eigene Untersuchungen.....	16
2.1 Material und Methoden	16
2.1.1 Prüfsubstanzen.....	16
2.1.2 Quantitativer Suspensionsversuch ohne und mit Belastung mit Medihoney [®]	16
2.1.3 Modifizierter quantitativer Suspensionsversuch ohne und mit Belastung mit Actisorb [®] silver	19
2.1.4 Modifizierter Keimträgertest ohne und mit Belastung mit Medihoney	21
2.1.5 Signifikanztestung.....	23
2.2 Ergebnisse.....	23
2.2.1 Quantitativer Suspensionsversuch mit verdünntem Medihoney [®] ohne und mit Belastung	23
2.2.2 Modifizierter Suspensionstest mit Actisorb [®] silver 220 ohne und mit Belastung	30
2.2.3 Keimträgertest mit Medihoney unverdünnt ohne und mit	37
2.2.4. Vergleich von Medihoney unverdünnt und Actisorb [®] silver 220 ohne und mit Belastung	46
2.3 Diskussion	47
2.3.1 Methode.....	47
2.3.2 Ergebnisse	48
3 Weiterführende Gedanken und Schlussfolgerungen	50
4 Zusammenfassung	53
5 Summary.....	54
6 Literaturverzeichnis	56

Anhang

Eidesstattliche Erklärung

Lebenslauf

Danksagung

1 Einleitung und Problemstellung

1.1 Problemstellung

Honig wird seit Jahrtausenden im antiken Griechenland, im ägyptischen Pharaonenreich und im chinesischen Reich von medizinischen Gelehrten als Heilmittel genutzt (Ransom 1937). Schon Hippokrates (460 bis 370 v. Chr.) lehrte um 400 v. Chr., dass Honigsalben Fieber senken. Bei Paracelsus (1493 bis 1541) war Honig ein wichtiger Bestandteil von Heilmixturen. Noch in den beiden Weltkriegen des 20. Jahrhunderts wurden Verwundete in den Lazaretten mit honiggetränkten Verbänden behandelt (Ahmed et al. 2003).

Durch die Entdeckung des Penicillins und die Entwicklung und Anwendung weiterer Antibiotika hat Honig als Arzneimittel in der Wundheilung zunehmend an Bedeutung verloren. Wegen der zunehmenden Resistenzentwicklung von Bakterien gegen Antibiotika ist Honig als Heilmittel in den letzten Jahren jedoch „wieder entdeckt“ worden, weil einer der Vorteile des medizinischen Honigs darin besteht, dass durch seine topische Anwendung der Resistenzentwicklung gegen Antibiotika begegnet werden kann (Blair et al. 2009).

Pädiatrisch onkologische Patienten, deren Operationswunden sich wegen fehlender Abwehr- und Wundheilungskräfte nicht schlossen, wurden erfolgreich mit Honig behandelt. Auch bei Patienten mit Verbrennungen, infizierten Wunden nach Traumen, Hauttransplantation, bei Diabetikern mit chronischem Malum perforans, bei chronischen Ulcera und bei Fournier'schem Gangrän wurde Honig erfolgreich zur Wundheilung eingesetzt (Gethin u. Cowman 2005, Simon 2006, 2008).

Die antibakterielle Wirkung von Honig wird durch verschiedene Faktoren bestimmt. Wichtig ist zunächst seine hohe Osmolarität. Aufgrund des hohen Zuckergehalts wird den Bakterien Wasser entzogen und somit deren Wachstum gehemmt (Efem et al. 1992, Subrahmanyam 2001). Zugleich wird das Wundödem reduziert, und es kommt in der Folge zu einem nicht invasiven Debridement avitaler Wundanteile (Simon 2008). Auch der pH-Wert spielt eine Rolle für die antibakterielle Wirkung des Honigs. Er liegt zwischen 3,2 und 4,5.

Aufgrund der Azidität wird das Wachstum der meisten pathogenen Mikroorganismen in Wunden unterdrückt (Molan 1996). Ein spezifischer Wirkungsmechanismus ist die Produktion von H_2O_2 durch Glucoseoxidase. Dieses Enzym wird dem Nektar durch die Bienen zugefügt und gelangt so in den Honig. Es sorgt dafür, dass über einen langen Zeitraum ein niedriger H_2O_2 -Spiegel im Gewebe aufrechterhalten wird. Dadurch werden Bakterien abgetötet, auf Grund der geringen H_2O_2 -Konzentration entsteht jedoch kein Gewebeschaden (Bang et al. 2003). Auch bestimmten Pflanzeninhaltsstoffen wie Flavonoiden oder aromatischen Säuren wird eine antimikrobielle Wirkung im Honig zugeschrieben (Henle 2007).

Wegen seiner hohen Osmolarität reduziert Honig das Wundödem, was zu einem nicht invasiven Debridement avitaler Wundanteile führt (Simon 2006). Das Naturheilmittel Honig wirkt außerdem entzündungshemmend und stimulierend auf die Geweberegeneration (Molan 1999, 2001).

Medizinisch genutzter Honig stammt vor allem vom Teebaum *Leptospermum spp.* Dieser ist in Australien und Neuseeland beheimatet. Dem Honig dieser Bäume wird eine besonders potente antibakterielle Wirkung zugeschrieben. Der Honig aus Neuseeland stammt vom Teebaum *Leptospermum scoparium*, auch Manukastrauch genannt (daher der Name Manuka-Honig). Im Manuka-Honig wurde im Jahr 2007 Methylglyoxal nachgewiesen, das maßgeblich an der antibakteriellen Wirkung des Manuka-Honigs beteiligt sein soll. Methylglyoxal ist ein zytotoxischer Metabolit, der in vivo hauptsächlich durch die Glykolyse unter hyperglykämischen Bedingungen produziert wird. Auf Grund der zytotoxischen Wirkung hat der Körper einen Abbaumechanismus entwickelt, bei dem der Metabolit durch die Enzyme *Glyoxylase I* und *Glyoxylase II* in Lactat umgewandelt wird. Methylglyoxal ist ein hoch reaktiver Metabolit, der im Organismus oxidativen Stress verursacht (Nakayama et al. 2007) und Proteine modifizieren kann, was u.a. in der Bildung von Advanced Glycation End Products (AGE's) resultiert (Laga et al. 2007). AGE's spielen eine Rolle in der Entstehung von Altersdiabetes, Atherosklerose und Myokardinfarkt (Cantero et al. 2007). In herkömmlichen Honigsorten findet sich eine Menge von 1- 2 mg/kg Methylglyoxal, im Honig des Teebaums dagegen von 300-700 mg/kg (Henle

2007). In solchen Dosen wirkt Methylglyoxal stark antibakteriell. Allerdings wurde bisher nicht geklärt, inwieweit das die Wundheilung beeinflusst. Versetzt man kommerziellen Waldhonig mit vergleichbaren Mengen Methylglyoxal, zeigt auch dieser eine entsprechende antibakterielle Wirkung (Henle 2007).

Zurzeit werden zwei Honigsorten für die therapeutische Anwendung im medizinischen Bereich vertrieben, Medihoney[®] aus Capiliano, Australien, und Active Manuka Honey[®] aus Neuseeland. Medihoney stammt von Blüten des *Leptospermum polygalifolium*. Seit 2008 ist in Deutschland als Medizinprodukt Infectohoney als Gel und Wundauflage eingeführt.

In zahlreichen Studien wurde die antibakterielle Wirkung von Honigsorten untersucht und eine Wirksamkeit gegen *S. aureus* einschließlich MRSA, Vancomycinresistente Enterokokken, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* (auch multiresistente Stämme), *C. botulinum* und weitere Bakterienspezies sowie gegen *Candida spp.* und Dermatophyten nachgewiesen (Brady et al. 1997; Ceyhan u. Ugur 2001; Al-Waili 2004a, Al-Waili et al. 2005, Estrada et al. 2005; French et al. 2005; Wilkinson et al. 2005; Chambers 2006; Irish et al. 2006; Patton et al. 2006; Fangio et al. 2007; Mercan et al. 2007).

Weitere Studien befassen sich mit der Analyse, welche Eigenschaften des Honigs für seine antibakterielle Wirksamkeit verantwortlich sind (White et al. 1963, Cushnie u. Lamb 2005, Brudzynski 2006, Sheridan et al. 2008).

Bisher wurde allerdings nur die mikrobiostatische Wirksamkeit von medizinischem Honig untersucht (Cooper 2007). Hierzu wurden als Prüfmethode der Agar-Diffusions- oder der Agar-Dilutions-Test eingesetzt. Hiermit kann lediglich die minimale Hemmkonzentration (MHK) bestimmt werden, es sind jedoch keine Aussagen zur mikrobioziden Wirksamkeit einer Substanz möglich. Für Antiseptika steht jedoch die mikrobiozide Wirksamkeit im Vordergrund des Interesses (Pitten et al. 2003). Deshalb war es Anliegen dieser Arbeit, die bisher nicht untersuchte mikrobiozide Wirksamkeit von Medihoney[®], ein im Handel verfügbares Medizinprodukt, zu untersuchen. Dabei galt es zu berücksichtigen, dass die Wirkung von auf die Wunde appliziertem Honig nicht

mit der Anwendung einer antiseptischen Lösung vergleichbar ist, weil durch die Honiganwendung im Unterschied zu Lösungen eine Einwirkzeit von mindestens einem Tag erreichbar ist.

Bei der zunächst durchgeführten orientierenden Testung von Medihoney im quantitativen Suspensionstest mit der Methode nach Pitten et al. (2003), der für Antiseptika etablierten Prüfmethode, stellte sich heraus, dass der Honig nur verdünnt eingesetzt werden konnte, um eine definierte Durchmischung mit der Bakteriensuspension und eine reproduzierbare Rückgewinnung der Testbakterien zu gewährleisten (Igelbrink et al. 2007). Damit können jedoch keine praxisrelevanten Befunde erhoben werden, da der Honig in praxi pur appliziert wird. Auf Grund dessen musste zur weiteren Untersuchung der mikrobioziden Wirksamkeit zunächst ein geeignetes Testmodell entwickelt werden, in dem unverdünnter Honig eingesetzt werden kann. Um die in dem für die Fragestellung entwickelten Test ermittelte Wirksamkeit einordnen zu können, bot es sich an, eine antiseptische Wundauflage unter identischen Versuchsbedingungen zu testen. Hierfür wurde eine häufig angewendete silberhaltige Wundauflage ausgewählt, in der das Silber gemäß Herstellerangabe als Wirkstoff fest an die Matrix gebunden ist.

1.2 Wissensstand zur antibakteriellen Wirkung von medizinischem Honig in vitro

Es existiert eine Reihe von Studien, in denen Honig auf seine antibakterielle Wirkung untersucht wurde. Mit Hilfe des Agardiffusionstests haben Lysby et al. (2005) festgestellt, dass Honig antibakteriell wirksam ist. Untersucht wurden verschiedene Honigsorten, darunter Medihoney und Manuka-Honig. Die Honigsorten wurden in fünf verschiedenen Konzentrationsstufen von 0,1 bis 20% gegen 13 Bakterienarten (*Alcaligenes faecalis*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium phlei*, *Salmonella californica*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis*) und einen Sprosspilz (*Candida albicans*) getestet. Die MHK betrug 5%. Mit Ausnahme von *Serratia marcescens* und *Candida albicans* konnte das Wachstum der Prüforganismen unterdrückt werden.

In einer Studie von French et al. (2005) wurde die Wirkung der Osmolarität auf das Wachstum von Koagulase negativen Staphylokokken untersucht. Mit Hilfe der Agar-Inkorporations-Technik wurde die MHK von Manuka-Honig, pasteurisiertem Honig und einem Zuckersirup untersucht. Die zwei Honigsorten waren ca. 8mal so wirksam wie die Zuckerlösung allein. Damit konnte gezeigt werden, dass nicht allein die osmotische Wirkung für die antibakterielle Wirkung des Honigs verantwortlich ist.

In zahlreichen Studien wurde nachgewiesen, dass ein Zusammenhang zwischen der antibakteriellen Wirksamkeit von Honig und der Produktion von H_2O_2 durch die Glukoseoxidase in Honig besteht. Als Prüfmethode wurde im Allgemeinen der Agardiffusionstest gewählt. Der Unterschied der Studien lag lediglich in den verschiedenen geprüften Honigsorten (Manuka-Honig, Medihoney[®], Honig vom Bluegum und Pincushion u. a.; Basson et al 2008) und den getesteten Bakterienarten. In allen Studien konnte gezeigt werden, dass das Wachstum der getesteten Erreger (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* u. a.) mit Ausnahme von *C. albicans* und *S. marcescens* durch die Bildung von H_2O_2 unterdrückt wurde. Entfernt man mit Hilfe von Katalase H_2O_2 , war die antibakterielle Wirksamkeit nur noch beim Manuka-Honig zu finden. Das weist darauf hin, dass die antibakterielle Aktivität von medizinischem Honig nicht allein auf die Peroxid-Produktion zurückführbar ist (Cooper et al. 2002, Henriques et al. 2006).

Willix et al. (1992) prüften den Zusammenhang zwischen H_2O_2 und der antibakteriellen Wirkung von Honig. Getestet wurden sieben Bakterienspezies gegen standardisierten Honig und Manuka-Honig. Das Wachstum aller sieben Bakterienspezies wurde bis zu einer Honigkonzentration unter 11% (v/v) unterdrückt, *S. aureus* war sogar bis zu einer Konzentration unter 5% sensibel. Es konnte gezeigt werden, dass bei dem verwendeten standardisierten Honig die antibakterielle Wirksamkeit allein auf die Aktivität des H_2O_2 zurückzuführen ist. Entfernt man mit Hilfe von Katalase das H_2O_2 , zeigte nur noch Manuka-Honig eine antibakterielle Aktivität. Als Erklärung wurden spezielle phytochemische Substanzen genannt, die noch nicht näher klassifiziert waren.

Ein Teil des produzierten H_2O_2 wird in vivo durch die sich im Gewebe und Blut befindliche Katalase abgebaut. Die klinische Anwendung mit medizinischem Honig (Manuka-Honig, Medihoney[®]) ist somit effektiver als die Anwendung von H_2O_2 allein, da sich die antibakterielle Aktivität des medizinischen Honig nicht ausschließlich auf die Produktion von H_2O_2 gründet (Cooper et al. 1999). Als weiterer Vorteil kommt die verzögerte Freisetzung geringer H_2O_2 -Mengen hinzu.

Zur Wirksamkeit gegen Viren fehlen Laborresultate. Eine vergleichende Studie zur Anwendung bei rezidivierenden Herpesinfektionen ist verfügbar (Al-Waili 2004b), wobei es sich nicht um Medihoney[®] handelte. Klinisch ist die Wirksamkeit bei Herpes labialis vergleichbar mit Aciclovir ohne das Risiko einer Resistenzentwicklung.

1.3 Behandlungsergebnisse mit medizinischem Honig

Medizinischer Honig wird wegen seiner guten Wirksamkeit, einfachen Anwendbarkeit und guten Verträglichkeit in verschiedenen Bereichen der Wundpflege angewendet. Ein besonderer Schwerpunkt ist der Einsatz bei hochgradig immunsupprimierten Patienten mit chemotherapiebedingten Wundheilungsstörungen (Simon et al. 2006, 2008). Als klinische Beobachtung wurde mitgeteilt, dass Infektionen schneller heilen. Entzündung, Schwellung und Schmerzen der Wunde bilden sich rasch zurück. Auf verkrusteten oder teilweise nekrotischen Wunden führt die Anwendung von Medihoney[®] zu einem schonenden Debridement avitaler Gewebestandteile (Molan 2001, Molan et al. 2004). Der Verbandwechsel wird erleichtert und gestaltet sich weniger schmerzvoll, denn Medihoney[®] mobilisiert Exsudat aus dem Gewebe, das die Wunde feucht hält. Eine Anwendungsbeobachtung bei einem Patienten mit Meningokokkensepsis zeigte, dass auf eine systemische Analgosedierung bei Anwendung von Medihoney[®] nach wenigen Tagen verzichtet werden konnte (erhöhte Behandlungssicherheit durch den Wegfall sedierungsbedingter Risiken, somit deutliche Reduktion des medizinischen Aufwands beim Verbandwechsel; Dunford et al. 2000, 2004).

In einer prospektiv randomisierten Studie zur Prävention von Lokalinfektionen und sekundären Blutstrominfektionen bei Dialysepatienten erwies sich die dreimalige wöchentliche Applikation von Medihoney[®] (n=50) als ebenso wirksam wie von Muporicin (n=51), wobei bei Medihoney[®] im Unterschied zu Mupirocin das Problem der Resistenzentwicklung entfällt (Johnson et al. 2005). Vardi et al. (1998) zeigten bei komplizierten infizierten Wunden von Neugeborenen mit angeborenen Herzfehlern nach kardiochirurgischen Sternuminfektionen, dass diese durch medizinischen Honig geheilt werden konnten.

Anwendungsbeobachtungen bei 8 Patienten mit MRSA-infizierten Wunden, deren Wunden unter monatelanger konventioneller Therapie nicht saniert und geheilt werden konnten, demonstrieren die antimikrobielle Wirksamkeit und eine Abheilung von Problemwunden in wenigen Wochen (Blaser et al. 2007).

In der Behandlung von Verbrennungen und Verbrühungen bis einschließlich Grad II zeigte sich ein positiver Effekt beim Einsatz von medizinischem Honig (Subrahmanyam 1998).

Sogar die unangenehmen und sozial stigmatisierenden Gerüche, die von offenen Wunden oder exophytisch wachsenden Tumoren ausgehen, werden neutralisiert, weil die von Zucker umgebenden Bakterien ihren Stoffwechsel umstellen: Es kommt nicht mehr zur Bildung von übel riechenden Stickstoff- und Schwefelverbindungen, die vor allem dann entstehen, wenn Bakterien Aminosäuren aus abgestorbenen Zellen verdauen (Dunford et al. 2000, 2004; Sofka et al. 2004). Für Patienten, die sich in einer palliativen Behandlungssituation befinden (z. B. exophytisch wachsendes metastasiertes Kehlkopfkarcinom), stellt das eine Verbesserung ihrer Lebensqualität dar.

Zusammenfassend wurden bisher folgende Wunden erfolgreich mit medizinischem Honig behandelt:

- posttraumatische oder postoperative Wunden einschließlich Amputations- und Vulvectomiewunden,
- Verbrennungen,

- Verbrühungen,
- Hautverletzungen, verursacht durch Meningokokkensepsis,
- Sternuminfektionen bei Neugeborenen,
- Hautulzerationen einschließlich venöses, diabetisches und tumorbedingtes Ulcus,
- nekrotisierende Fasziiitis und Abszesse.

1.4 Kriterien zur Definition und Unbedenklichkeit der Honigqualität

Honig für medizinische Anwendung muss bestimmte Qualitätskriterien erfüllen. Er darf nicht durch Mikroorganismen kontaminiert sein, da das zu sekundären Wundinfektionen führen kann (z. B. Gasbrand - verursacht durch Clostridien-sporen im Honig). Auch Verunreinigungen durch Herbizide, Pestizide, Schwermetalle und Radioaktivität dürfen nicht vorliegen.

Um sekundären Wundinfektionen vorzubeugen, wird daher medizinischer Honig mit Gamma-Strahlung sterilisiert. Hierzu sind 25 kGy ausreichend (Molan u. Allen 1996). So wird, anders als beim Versuch der Sterilisation durch Hitze, die antibakterielle Aktivität des Honigs nicht beeinflusst (keine Zerstörung der Enzyme und phytochemischer Substanzen). Es ist daher davon abzuraten, in Supermärkten angebotenen Honig, der allein durch Hitze sterilisiert wurde, zur Wundbehandlung einzusetzen.

Weiterhin sollte der Honig lokal (an Haut und Schleimhäuten) keine Irritationen und Sensibilisierungen hervorrufen. Gelegentlich wird über unspezifische irritative Reaktionen mit Schmerzen nach dem Auftragen von Honig berichtet, vereinzelt (ca. 2 von 100 Patienten) auch über lokale Unverträglichkeit in Form eines Kontaktekzems. Es besteht jedoch kein erhöhtes Risiko bei Patienten mit Bienengiftallergie (Simon 2008).

Honig ist auch für die Schleimhaut gut verträglich, nachgewiesen bei bestrahlungsassoziiierter Mukositis (Biswal et al. 2003) und bei oralen Entzündungen (Molan 2001).

Da im Honig keine toxikologisch relevanten Bestandteile enthalten sind, entfällt das Problem der Resorption derselben. Lediglich die Aufnahme von Methylglyoxal bedarf der Abklärung. Unabhängig davon wurden im Schrifttum keine Bedenken gegenüber einer Langzeitanwendung geäußert, und es besteht kein Anhalt für Mutagenität, Karzinogenität und Teratogenität (Simon 2008).

1.5 Bedeutung der Silberauflage Actisorb® silver 220

Antiseptische Silber-Aktivkohle-Wundauflagen werden hauptsächlich bei stark sezernierenden chronischen Wunden und chronischen Wunden mit kritischer Kolonisation angewendet, um frei werdende Toxine zu binden.

Die Wirkungsweise von Silber-Aktivkohle-Wundauflagen beruht auf der Ableitung von Wundsekret mit darin enthaltenen Mikroorganismen in die Wundauflage. An der Grenzfläche der Wundauflage und durch die Silberionen in der Aktivkohle werden Mikroorganismen und ihre Toxine inaktiviert (Rudolph et al. 2000). Überschüssiges Wundexsudat wird aufgenommen und wie bei medizinischem Honig wird die Geruchsbildung verhindert.

Bei Wundauflagen ohne Silberabgabe in die Wunde (Furr et al. 1994) sind Nebenwirkungen wie nach Anwendung antibiotischer Wundauflagen, insbesondere wie die für Aminoglycosid-Antibiotika häufig beschriebene Kontaktallergie sowie Resistenzentwicklungen, nicht zu befürchten.

Grundsätzlich sind Wundauflagen zu bevorzugen, die kein Silber in die Wundumgebung abgeben, um die Wundheilung nicht negativ zu beeinflussen. Die toxische Wirkung von Silberionen beruht auf deren Interaktion mit Zellmembranen und der Atmungskette durch Reaktion mit Cytochrom b und d sowie mit Substraten dieser Oxidation (Weber u. Rutala 2001). In der Zellkultur war eine zytotoxische Wirkung freigesetzter Silberionen nachweisbar (Müller u. Kramer 2008). In der Keratinozyten- und Fibroblasten-Zellkultur erwiesen sich Silbernitrat und nanokristallines Silber ohne Unterschied hoch zytotoxisch (7×10^{-4} % bis 55×10^{-4} %; Poon u. Burd 2004). Im Vergleich zwischen der silberfreien Kontrolle und silberfreisetzenden Wundauflagen an mesh graft Entnahmestellen wurde das Eintreten über > 90% Reepithelialisierung durch

eine silberabgebende Wundauflage verzögert ($p= 0.004$). Dabei war kein Unterschied bzgl. positiver bakteriologischer Kulturen nachweisbar. Die Narbenqualität war bei der Silber-freisetzenden Wundauflage nach 1 und 2 Monaten signifikant schlechter und hatte sich erst nach 3 Monaten angeglichen (Innes et al. 2001).

Zum Vergleich der Wirksamkeit und Verträglichkeit von Wundantiseptika wurde der sogenannte BI eingeführt (Müller u. Kramer 2008). Dieser ergibt sich aus dem unter gleichen Versuchsbedingungen ermittelten Quotienten der IC_{50} im Zytotoxizitätstest und der Konzentration, die im quantitativen Suspensionstest gegenüber Testbakterien mindestens eine Reduktion um 3 Log-Stufen ergibt. Als BI ergab sich für Silberverbindungen ein Wert $\ll 1$, d. h. die Verbindungen waren nur zytotoxisch, nicht aber antiseptisch wirksam. Das deckt sich mit den Ergebnissen der Metaanalyse von Vermeulen et al. (2007), wonach silberhaltige Wundauflagen zu keiner signifikanten Verbesserung der Ulcusheilung führten.

2 Eigene Untersuchungen

2.1 Material und Methoden

2.1.1 Prüfsubstanzen

Medizinischer Honig wurde in Form des Handelspräparats Medihoney® eingesetzt. Er ist löslich in Wasser, zwei Jahre bei Lagerung bei 30 °C stabil und besitzt einen pH-Wert zwischen 3,8 und 4,8 (s. Beipackzettel).

Zum Vergleich wurde die antiseptische Wundauflage Actisorb® Silver 220 (Johnson & Johnson Norderstedt, Germany) mit den äußeren Abmaßen 10,5 cm x 10,5 cm getestet. Die Wundauflage besteht aus einem das Innengewebe umgebenden haptisch weichen Vlies von feiner Struktur. Das innere, ebenfalls schwarze Gewebe (8,5 cm x 8,5 cm), ist vor Ausfransen geschützt, da die jeweiligen Seitenränder mit einem Zick-Zack-Schnitt versehen sind.

2.1.2 Quantitativer Suspensionsversuch ohne und mit Belastung mit Medihoney®

Testmodell: Als Test wurde der quantitative Suspensionsversuch gemäß Europäischem Standard EN 1040 (2005) ausgewählt.

Testmikroorganismen und Herstellung der Testsuspension: Es wurden die Testorganismen *P. aeruginosa* (ATCC 15442), *C. albicans* (ATCC 10231), *MRSA* (Epidermiestamm Nord), *VRE* (Herkunft Hygiene Nord GmbH Greifswald) und *S. aureus* (ATCC 6538, letzterer nicht bei Actisorb® Silver220) eingesetzt. Zur Herstellung der Bakteriensuspension wurde eine Abimpfung von Blutagar (abgestrichene Impföse) in CSL gegeben, gevortextet und - anschließend für die Versuche eingesetzt. Die ausreichende Zahl von KbE (10^8 - 10^9 /ml) wurde mittels Oberflächenkultur auf Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar (CSA; 36 ± 1 °C 48 h) durch Ausimpfung der entsprechenden Kulturen nachgewiesen. Für die Auswertung wurden nur CSA-Platten zwischen 15 und 300 KbE/Platte berücksichtigt.

Ermittlung der Verdünnungsstufe: Das gewichtete Mittel der aufeinander folgenden Verdünnungen wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$\hat{C} = \frac{c}{(n_1 + 0,1n_2)d}$$

\hat{C} = gewichtetes Mittel

c = Summe der Kolonien auf allen ausgewerteten Nährböden

n_1 = Anzahl der ausgewerteten Nährböden mit der ersten Verdünnung

n_2 = Anzahl der ausgewerteten Nährböden mit der zweiten Verdünnung

d = Verdünnungsfaktor der ersten ausgewerteten Verdünnung

Versuchsdurchführung: Zur Versuchsdurchführung wurden 1 ml der Suspension des Testorganismus mit 8 ml Produktprüflösung (1 g Medihoney[®] + 8 ml Natriumpeptonpufferlösung) und 1 ml Wasser standardisierter Härte (WSH) gründlich durchmischt. Unmittelbar nach Inkubation (sogenannter Sofortwert) sowie nach Einwirkzeiten von 30 min, 1, 3, 24 und 48 h wurden dem Prüfsubstanz-Testorganismus-Gemisch jeweils 1 ml entnommen und in 9 ml Inaktivierungsflüssigkeit (Mischung aus 3% Saponin, je 0,1% Histidin und Cystein und 3% Tween in Aqua dest.) verimpft. Nach 5 min Neutralisationszeit wurden Verdünnungsstufen von 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} und 10^{-5} in Trypton-NaCl-Lösung angelegt. Je 0,1 ml der Inaktivierungsflüssigkeit und 0,1 ml der Verdünnungen wurden anschließend im Doppelverfahren auf je 2 CSA- Platten ausgespatelt. Zur Kontrolle wurde die jeweilige Testorganismussuspension anstelle von Prüfsubstanz mit 10 ml Trypton-Natriumchlorid-Lösung vermischt. Nach 24 und 48 h wurden von diesem Ansatz in gleicher Weise Subkulturen angelegt (Abb. 1).

Zur Kontrolle der Nichttoxizität des Neutralisationsmittels wurden 8 ml Neutralisationsmedium mit 1 ml WSH vermischt. Der Ansatz wurde geschüttelt und für 5 min \pm 10 s inkubiert. 1 ml Bakteriensuspension (eines jeden Prüforganismus) wurde hinzugegeben und der Ansatz erneut durchmischt. Nach der längsten Einwirkzeit wurden sowohl aus dem Direktansatz als auch aus der 10^{-1} Verdünnung in Neutralisationsmittel je 0,1 ml auf CSA bzw. C.

albicans auf Sabauraud-Agar und für *E. faecium* auf CATC-Agar (Citrat Azide Tween Carbonate Agar) ausgespatelt.

Um die Neutralisation zu kontrollieren, wurden zu 8 ml des Neutralisationsmediums 1 ml Produktprüflösung hinzugegeben. Der Ansatz wurde geschüttelt und 5 min ± 10 s inkubiert. Auch hier wurden 1 ml der Bakteriensuspension eines jeden Prüforganismus hinzugegeben, vermischt, analog zur Kontrolle der Nichttoxizität des Neutralisationsmediums Verdünnungen hergestellt und jeweils 0,1 ml aus dem Direktansatz und der Verdünnung auf CSA bzw. für *C. albicans* auf Sabauraud-Agar und für *E. faecium* auf CATC-Agar ausgespatelt.

Alle Subkulturen wurden 48 h bei 36 ± 1 °C bebrütet und die Kolonien ausgezählt.

Nach Bestimmung des arithmetischen Mittelwerts aus sieben unabhängigen Versuchen wurde die mikrobiozide Wirkung (KR_t) pro Zeit nach folgender Formel berechnet:

$$KR_t = \log(KbE\ 1) - \log(KbE\ 2)$$

KbE 1: Anzahl der KBE pro ml ohne Einwirkung des Produkts

KbE 2: Anzahl der KBE pro ml nach Einwirkung des Produkts

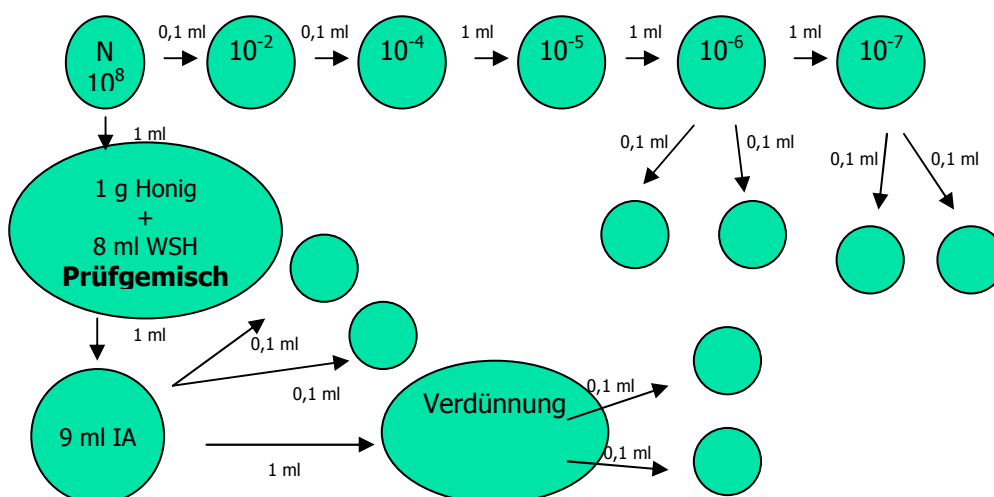


Abb. 1 Testprinzip quantitativer Suspensionstest mit verdünntem Medihoney®

2.1.3 Modifizierter quantitativer Suspensionsversuch ohne und mit Belastung mit Actisorb[®] silver

Testmikroorganismen und Herstellung der Testsuspension: wie unter 2.1.2.

Versuchsdurchführung: Für die Testung von Actisorb[®] silver 220 kam das Standardverfahren des quantitativen Suspensionstests gemäß EN 1040 nicht in Frage, weil die Wundaufgabe nicht in Suspension gebracht werden kann. Daher wurde die Wundaufgabe direkt kontaminiert.

Um einen intensiven Kontakt der Wundaufgabe mit den Testorganismen zu gewährleisten, wurden die Wundaufgaben zunächst unter aseptischen Bedingungen ausgepackt und jeweils in eine sterile Petrischale (Ø 10 cm) eingegeben. Darin wurden die Auflagen mit jeweils 2 x 3,5 ml Testorganismus-Suspension (in NaCl-Trypton) auf der gesamten Oberfläche benetzt. Im Fall der Eiweißbelastung wurde dem Ansatz der Testorganismus-Suspension vor der Benetzung der Wundaufgaben Rinderserumalbumin zugegeben, so dass die Belastung in einer Endverdünnung von 10% im Ansatz vorlag.

Für die Bestimmung des 24- und 48 h-Wertes wurden die Petrischalen zugedeckelt und mit einem Parafilm[®] verschlossen, um die Wundaufgaben vor Austrocknung zu schützen. Für den Sofort-, 30 min-, 1- und 3 h-Wert wurden die Petrischalen ausschließlich mit einem Deckel ohne zusätzlichen Parafilm[®] versehen.

Am Ende der Einwirkungszeit wurden als Neutralisationsmittel 100 ml 0,1%ige wässrige Natrium- Thioglycolat-Lösung zur Inaktivierung des Silbers in die Petrischale gegeben, so dass die Wundaufgabe vollständig bedeckt war. Anschließend wurde die Petrischale mit dem Neutralisationsmittel für 1 min geschüttelt (Schüttler). Aus dem Neutralisationsgemisch wurden Verdünnungen in NaCl-Trypton-Lösung hergestellt. 0,1 ml der jeweiligen Verdünnungen wurden auf CSA ausplattiert (Doppelbestimmung) und bei 37 °C für 48 h

inkubiert. Der RF wurde einmal zur Ausgangskoloniezahl und zum anderen zur Negativkontrolle berechnet (Abb. 2).

Wie bei Medihoney[®] wurden zur Kontrolle der Vitalität und der Koloniezahl der Testorganismen separate Kulturen ohne Wundaufgabe über den untersuchten Zeitraum von 48 h in NaCl-Trypton-Lösung inkubiert. Die Ausgangskoloniezahl blieb dabei auch hier im Wesentlichen konstant.

Die unterschiedlich großen Expositionsflächen (8 x 8 cm beim Prüfmuster und 8,5 x 8,5 cm beim Referenzprodukt) wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt, weil der Unterschied verhältnismäßig gering ist (64 cm² zu 72,25 cm²) und die Anwendungssituation dargestellt werden sollte.

Um die bakteriozide bzw. levurozide Wirksamkeit der Prüfmuster zu erfassen, wurden die Reduktionsfaktoren aus dem arithmetischen Mittel von 2 Werten wie folgt berechnet:

$$KR_t = \log(\text{KbE } 1) - \log(\text{KbE } 2)$$

KbE 1: Ausgangskoloniezahl

KbE 2: von den Wundaufgaben rückgewinnbare Kolonien

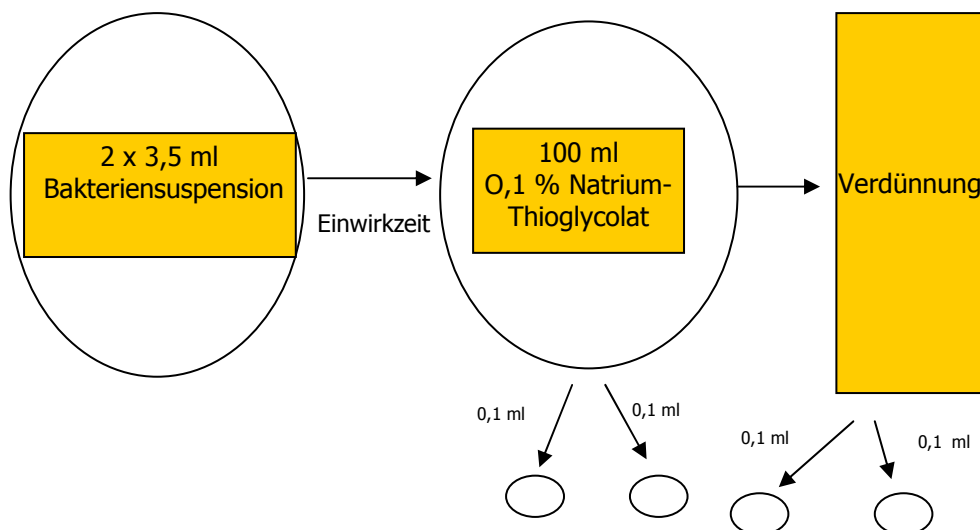


Abb. 2 Testprinzip mit Actisorb[®] silver 220

2.1.4 Modifizierter Prüfkörpertest ohne und mit Belastung mit Medihoney

Versuchsdurchführung ohne Belastung

Um die mikrobiozide Wirksamkeit des Medihoney entsprechend der Anwendungssituation unverdünnt testen zu können, erwies sich der quantitative Suspensionstests gemäß EN 1040 ungeeignet. Deshalb sollte anstelle der Verdünnung des Honigs im Suspensionstest dieser unverdünnt auf kontaminierte Prüfträger aufgebracht werden. Hierzu wurde als Methode die Prüfung von Flächendesinfektionsmitteln gemäß DGHM-Standardmethoden (2001) bzw. gemäß DIN EN 14349 (2007) ohne mechanische Wirkung zugrunde gelegt, allerdings mit anderer Belastung und anderen Einwirkungszeiten.

Als Prüfträger wurden runde Metallplättchen aus nicht rostendem Stahl mit einer planen Oberfläche von 1,2 - 1,5 mm Dicke, einer Oberflächengüte von 2 B auf beiden Seiten und einem Durchmesser von 20 mm verwendet.

Zur Kontamination wurde 1 ml der Testorganismussuspension in 9 ml WSH verimpft, davon wurden 0,05 ml auf die Metallplättchen gegeben und unter Laminar air flow in der Reinraumbank 60 min getrocknet (Abb. 3).

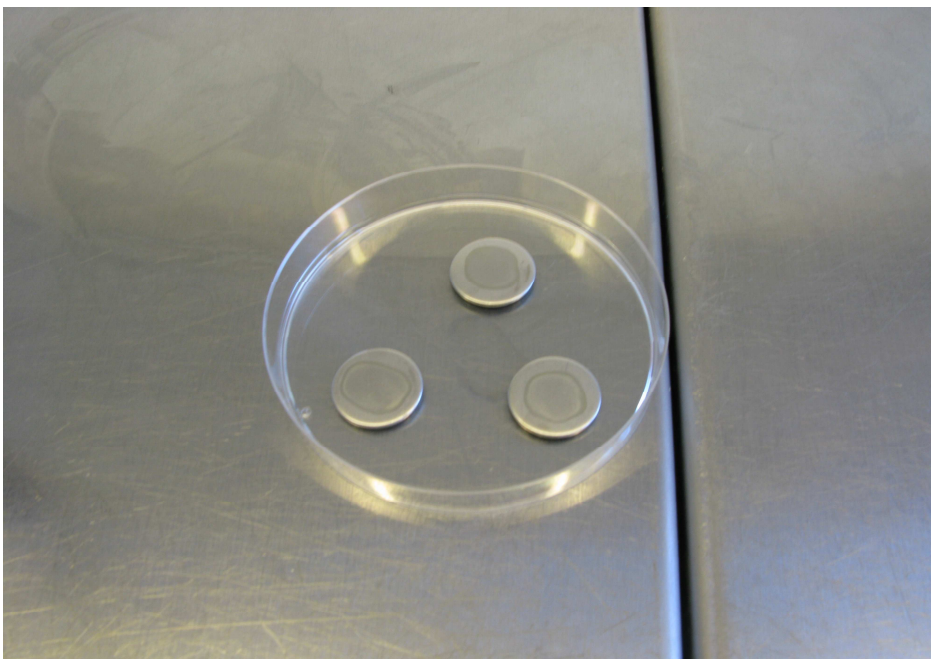


Abb. 3 Auf den Metallprüfkörpern angetrocknete Prüfbakteriensuspension

Nach Antrocknung der Testorganismen wurden auf die Metallplättchen 0,25 g Medihoney® in der Weise gegeben, dass die angetrocknete Testorganismussuspension nicht nur vollständig, sondern leicht überlappend mit dem medizinischen Honig bedeckt wurde.

Zur Ermittlung des Sofortwerts und nach Einwirkzeiten von 5 min, 10 min, 1 h, 3 h, 24 h und 48 h wurde die Testfläche mit der Oberseite nach unten in eine sterile PP-Dose (Firma BEHAWE) gelegt, die 10 ml Neutralisationsmittel (gleiches Neutralisationsmittel wie bei verdünntem Medihoney®) und sterile Glasperlen enthielt. Der Honig wurde zusammen mit der Testorganismussuspension ca. 2 min auf einer Schüttelmaschine abgeschwemmt. Nach 5 min wurden Verdünnungsstufen von 10^{-1} und 10^{-2} in NaCl-Trypton angelegt. Aus dem unverdünnten Gemisch von Neutralisator und Abschwemmung (Direktansatz) sowie den Verdünnungen wurden 0,1 ml auf CSA ausgespatelt und 48 h bei 36 ± 1 °C inkubiert (Abb. 4).

Zur Kontrolle der Koloniezahl und Überprüfung der Vitalität der Testorganismen wurden separate Abschwemmungen ohne Honig über den untersuchten Zeitraum von 24 h in NaCl-Trypton-Lösung hergestellt. Die Ausgangskoloniezahl blieb dabei im Wesentlichen konstant.

Der Reduktionsfaktor wurde analog zum quantitativen Suspensionsversuch aus dem arithmetischen Mittel von 7 Werten berechnet:

$$KR_t = \log(KbE\ 1) - \log(KbE\ 2)$$

KbE 1: Anzahl KbE pro ml ohne Einwirkung des Produkts

KbE 2: Anzahl KbE pro ml nach Einwirkung des Produkts

Versuchsdurchführung mit Medihoney bei Belastung mit 10 % Rinderalbumin: Zur Testung unter Eiweißbelastung wurden 1 ml der Testorganismussuspension mit 9 ml WSH, in das zuvor 1 g Albumin in Lösung gebracht wurde, gleichmäßig durchmischt. Davon wurden analog wie im Test ohne Belastung 0,05 ml auf die Testfläche aufgebracht und unter Laminar air flow 60 min angetrocknet. Da der Eiweißfehler nur im direkten Vergleich zwischen Prüfkörpertest mit und ohne Eiweißbelastung aussagekräftig ist, wurden diese Untersuchungen in parallelen Ansätzen durchgeführt.

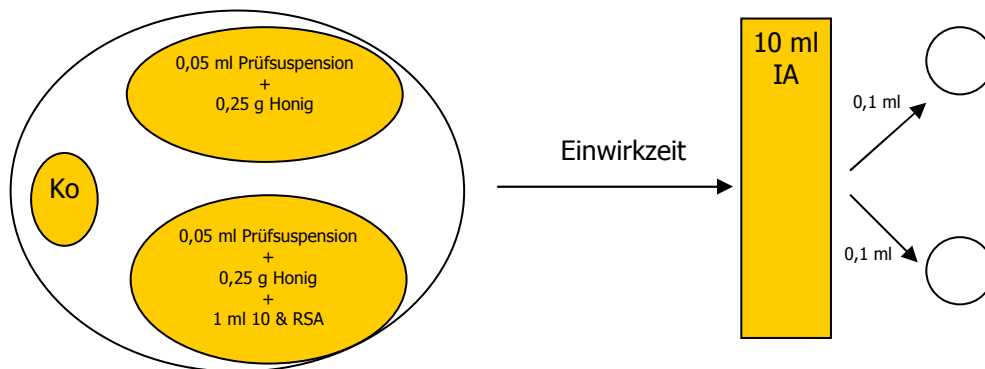


Abb. 4 Testprinzip modifizierter Prüfkörpertest mit unverdünntem Medihoney®

2.1.5 Signifikanztestung

Zur Signifikanztestung wurde in der vorliegenden Arbeit der Student t-Test verwendet. Die zu vergleichenden Zielvariablen sind normal verteilt. Verglichen wurde die Wirksamkeit von Medihoney® unverdünnt mit Actisorb® silver jeweils ohne und mit Eiweißbelastung nach 24 und 48 h. Daher wurde der t-Test für unabhängige Stichproben verwendet und in Excel berechnet.

Zum Nachweis der Wirksamkeit von Medihoney® wurde im Studienprotokoll für das Signifikanzniveau α der Wert von 0,05 (bzw. 5%) festgelegt.

2.2 Ergebnisse

2.2.1 Quantitativer Suspensionsversuch mit verdünntem Medihoney® ohne und mit Belastung

Die nicht mit Honig versetzten Testerreger-Kontrollen zeigten keine Beeinflussung der Anzahl kultivierbarer KbE.

In den mit 1:10 verdünntem Honig exponierten Ansätzen war sowohl im Sofortwert als auch nach 30 min und nach 1 h Einwirkungszeit weder bei *S. aureus* noch bei *P. aeruginosa* und *C. albicans* eine Reduktion feststellbar. Nach 24 h Einwirkzeit wurde bei *S. aureus* ein RF von 3,0 erreicht.

Gegenüber *P. aeruginosa* war Medihoney® etwas wirksamer als gegenüber *S. aureus*; der RF betrug nach 24 h 3,6 und nach 48 h 4,0.

Gegenüber *C. albicans* war Medihoney® bis 3 h Einwirkungszeit ohne Einfluss. Nach 24 und 48 h kam es in Anwesenheit des verdünnten Medihoneys® zu einer Vermehrung (Tab. 1).

Tab. 1 Ergebnisse des quantitativen Suspensionstests mit 1:10 verdünntem Medihoney® ohne Belastung

RF in den Einwirkzeiten												
Ohne Belastung												
Test-organismus	Sofortwert		30 min		1 h		3 h		24 h		48 h	
	lg x	RF	lg x	RF	lg x	RF	lg x	RF	lg x	RF	lg x	RF
<i>S. aureus</i>	8,82	-0,05	8,85	0,06	8,85	0,06	8,78	0,05	5,95	3,00	5,67	3,22
s	0,20	0,15	0,17	0,02	0,17	0,02	0,06	0,04	0,04	0,03	0,03	0,03
Kontrolle	8,77	-	8,90	-	8,90	-	8,82	-	8,95	-	8,89	-
s	0,22	-	0,15	-	0,15	-	0,08	-	0,04	-	0,03	-
<i>P. aeruginosa</i>	8,87	0,03	8,76	0,04	8,86	0,08	8,56	0,32	5,56	3,58	4,92	4,03
s	0,07	0,07	0,05	0,10	0,08	0,11	0,05	0,08	0,04	0,13	0,04	0,04
Kontrolle	8,9	-	8,80	-	8,94	-	8,86	-	9,14	-	8,95	-
s	0,03	-	0,07	-	0,04	-	0,05	-	0,11	-	0,05	-
<i>C. albicans</i>	7,80	0	7,84	0	7,89	0	7,80	0	7,94	-0,11	8,76	-1,09
s	0,04	0,03	0,03	0,06	0,05	0,05	0,03	0,07	0,03	0,04	0,04	0,05
Kontrolle	7,85	-	7,87	-	7,94	-	7,87	-	7,82	-	7,67	-
s	0,03	-	0,04	-	0,04	-	0,06	-	0,02	-	0,03	-

Mit Belastung durch 10 % Rinderserumalbumin wird die Wirksamkeit sowohl gegenüber *S. aureus* als auch gegenüber *P. aeruginosa* um bis zu 0,9 lg reduziert. *C. albicans* wird nicht inaktiviert (Tab. 2).

In beiden Versuchsreihen, das heißt ohne und mit Eiweißbelastung, war die Streuung der Ergebnisse in einen für derartige biologische Tests üblichen Bereich und unterschied sich nur unwesentlich (Tab. 1 und 2).

Tab. 2 Ergebnisse des quantitativen Suspensionstests mit verdünntem Medihoney® mit 10 % Rinderserumalbuminbelastung

RF in den Einwirkzeiten												
Mit Belastung												
Test-organismus	Sofortwert		30 min		1 h		3 h		24 h		48 h	
	lg x	RF	lg x	RF	lg x	RF	lg x	RF	lg x	RF	lg x	RF
<i>S. aureus</i>	8,8	0,09	8,87	0,04	8,79	0,05	8,74	0,15	6,47	2,64	5,65	2,89
s	0,17	0,12	0,22	0,16	0,14	0,06	0,17	0,11	0,30	0,13	0,21	0,04
Kontrolle	8,89	-	8,91	-	8,85	-	8,89	-	9,11	-	8,54	-
s	0,18	-	0,21	-	0,15	-	0,08	-	0,29	-	0,20	-
<i>P. aeruginosa</i>	8,89	0,05	8,82	0,08	8,89	0,02	8,69	0,20	6,05	2,90	5,75	3,10
s	0,03	0,09	0,17	0,06	0,11	0,06	0,06	0,07	0,09	0,13	0,15	0,02
Kontrolle	8,93	-	8,90	-	8,91	-	8,89	-	8,97	-	8,86	-
s	0,07	-	0,13	-	0,08	-	0,06	-	0,09	-	0,15	-
<i>C. albicans</i>	7,92	0,03	7,85	0,04	7,87	0,04	7,87	0,03	8,93	-0,26	8,03	-0,21
s	0,14	0,04	0,16	0,07	0,27	0,04	0,03	0,05	0,05	0,05	0,04	0,03
Kontrolle	7,95	-	7,89	-	7,91	-	7,9	-	8,67	-	7,82	-
s	0,15	-	0,19	-	0,24	-	0,02	-	0,03	-	0,04	-

In den nachfolgenden Abbildungen ist anstelle des RF's die Anzahl kultivierter KbE jeweils im Vergleich zur Kontrolle erregerbezogen ohne und mit Belastung dargestellt.

Gegenüber *S. aureus* ist sowohl ohne als auch mit Belastung ein gleichartiger Verlauf erkennbar. Bis zu 3 h unterscheiden sich die Ergebnisse praktisch nicht voneinander. Erst nach 24 h setzt die Wirksamkeit ein, wobei diese bei Belastung durchschnittlich 0,5 lg geringer ist (Abb. 5 und 6).

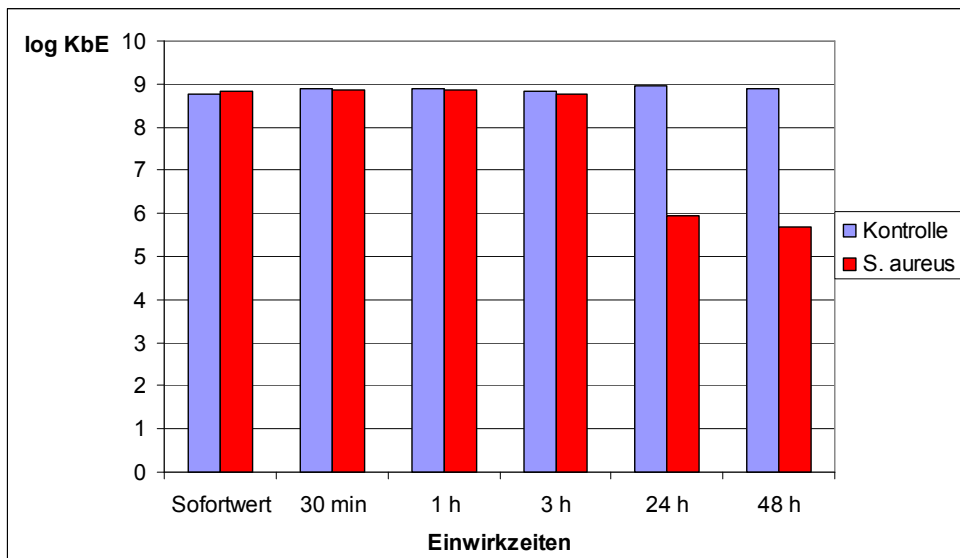


Abb. 5 Wirksamkeit von 1:10 verdünntem Medihoney[®] gegenüber *S. aureus* im quantitativen Suspensionstest ohne Belastung

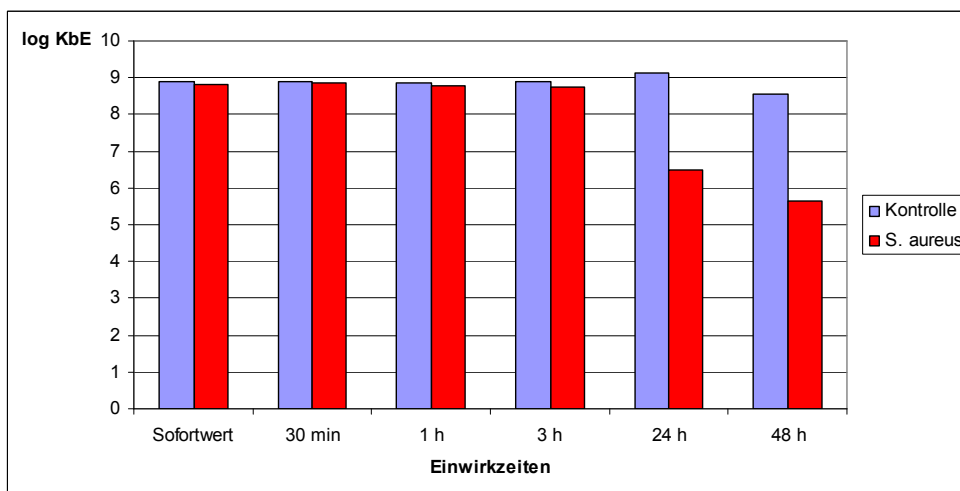


Abb. 6 Wirksamkeit von 1:10 verdünntem Medihoney[®] gegenüber *S. aureus* im quantitativen Suspensionstest mit Belastung

Bei Testung mit *P. aeruginosa* ist die Wirksamkeit ähnlich wie bei *S. aureus*. Sowohl ohne als auch mit Belastung ist die Wirksamkeit allerdings tendentiell etwas höher (durchschnittlich 0,4 lg; Abb. 7 und 8).

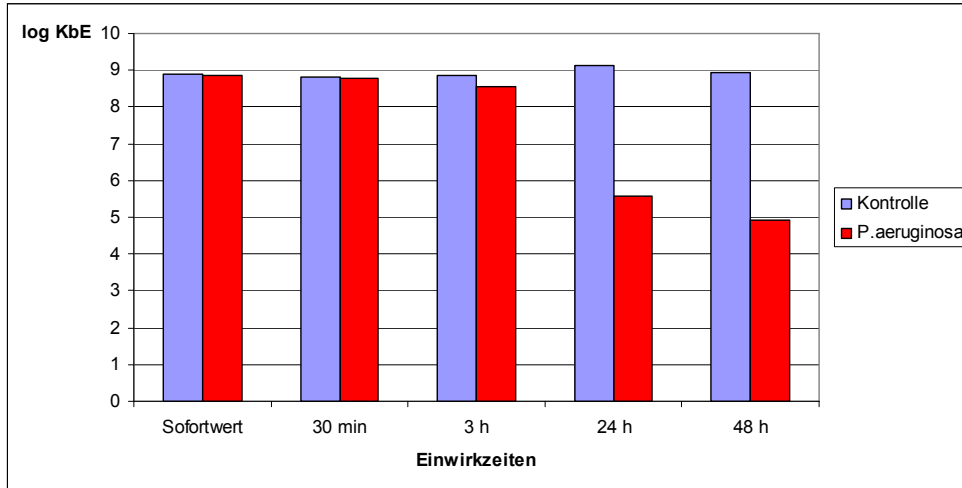


Abb. 7 Wirksamkeit von 1:10 verdünntem Medihoney[®] gegenüber *P. aeruginosa* im quantitativen Suspensionstest ohne Belastung

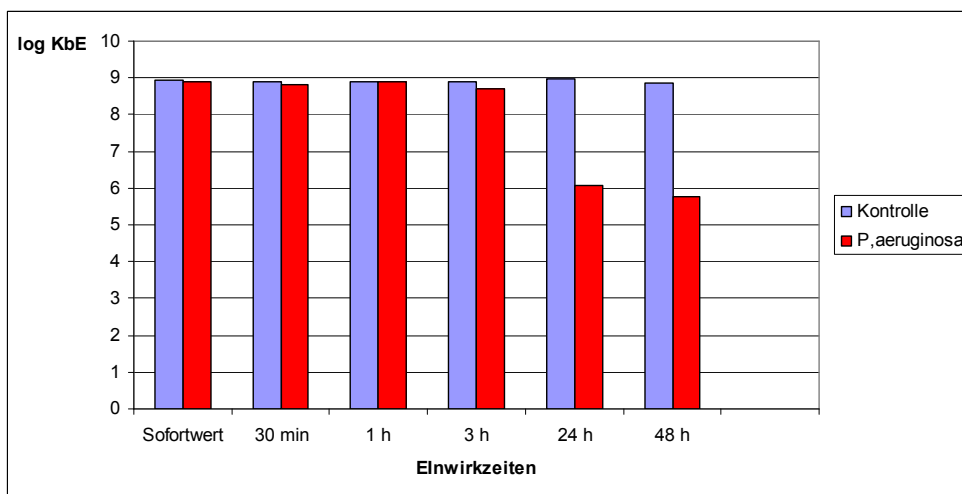


Abb. 8 Wirksamkeit von 1:10 verdünntem Medihoney[®] gegenüber *P. aeruginosa* im quantitativen Suspensionstest mit Belastung

Ein anderes Bild ergibt sich bei *C. albicans*. Analog wie gegenüber den Testbakterien ist bis 3 h Einwirkungszeit keine antimikrobielle Wirkung feststellbar. Danach kommt es zum Teil sogar zu einer Erhöhung der Ausgangskoloniezahl, das heißt Medihoney[®] wird in verdünnter Form als Nährmedium verstoffwechselt (Abb. 9 und 10).

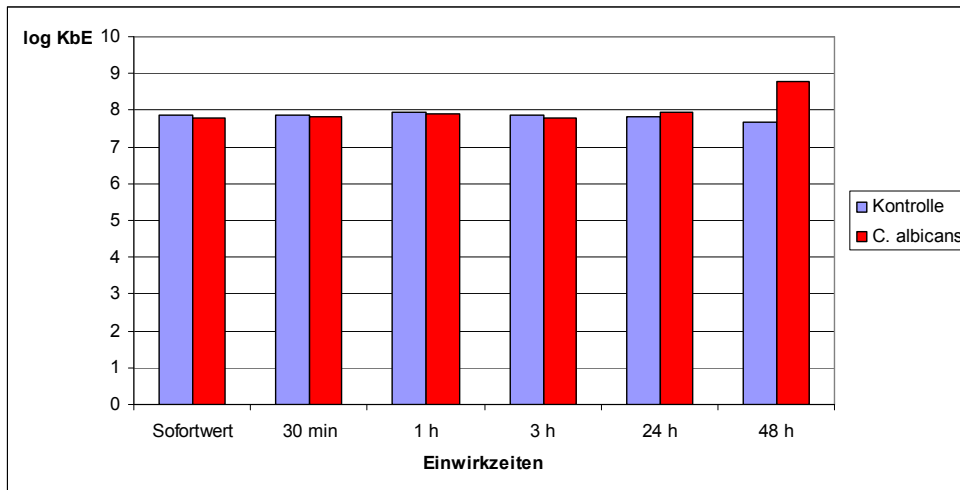


Abb. 9 Wirksamkeit von 1:10 verdünntem Medihoney[®] gegenüber *C. albicans* im quantitativen Suspensionstest ohne Belastung

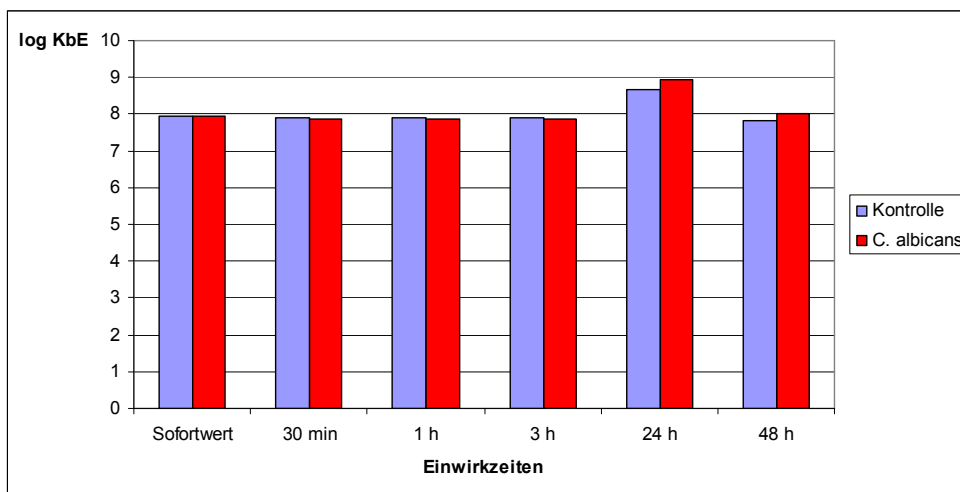


Abb. 10 Wirksamkeit von 1:10 verdünntem Medihoney[®] gegenüber *C. albicans* im quantitativen Suspensionstest mit Belastung

2.2.2 Modifizierter Suspensionstest mit Actisorb[®] silver 220 ohne und mit Belastung

Die Sofort-, 30- und 60 min-Werte zeigten bei allen Testorganismen in den Versuchsansätzen ohne und mit Belastung praktisch keine Reduktion. Lediglich gegenüber *C. albicans* war ohne Belastung mit einem RF von 0,9 eine geringe Wirksamkeit nachweisbar. Nach 3 h war bei *C. albicans* der RF auf 2,1 angestiegen (Abb. 12), während gegenüber den übrigen Prüforganismen noch keine relevante Wirksamkeit vorhanden war. Erst nach 24 h und 48 h war bei *P.*

aeruginosa der RF auf Werte > 4 angestiegen, während die Wirksamkeit gegenüber *MRSA* nach 24 h einen RF von 1,5 und nach 48 h von 2,4 erreichte. Gegen *VRE* überstieg der RF nicht den Wert > 1,2 (Tab. 3).

In der graphischen Darstellung der Anzahl gewachsener Kolonien wird deutlich, dass bei Actisorb[®] silver 220 ohne Belastung die Wirkung nach 24 h einsetzt, mit Belastung jedoch komplett aufgehoben wird (Abb. 11 und 12).

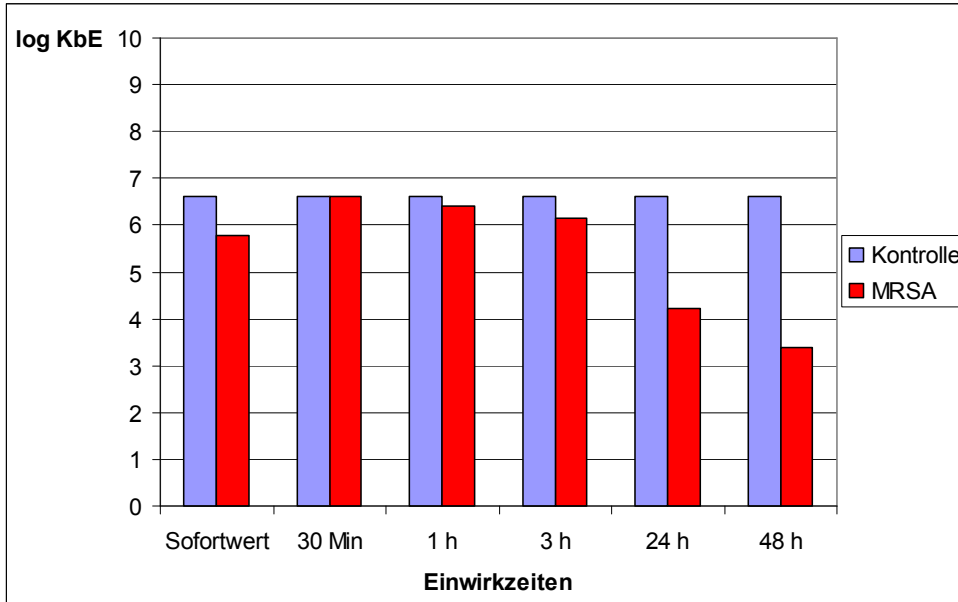


Abb.11 Wirksamkeit von Actisorb[®] silver 220 gegenüber *MRSA* im modifizierten Suspensionstest ohne Belastung

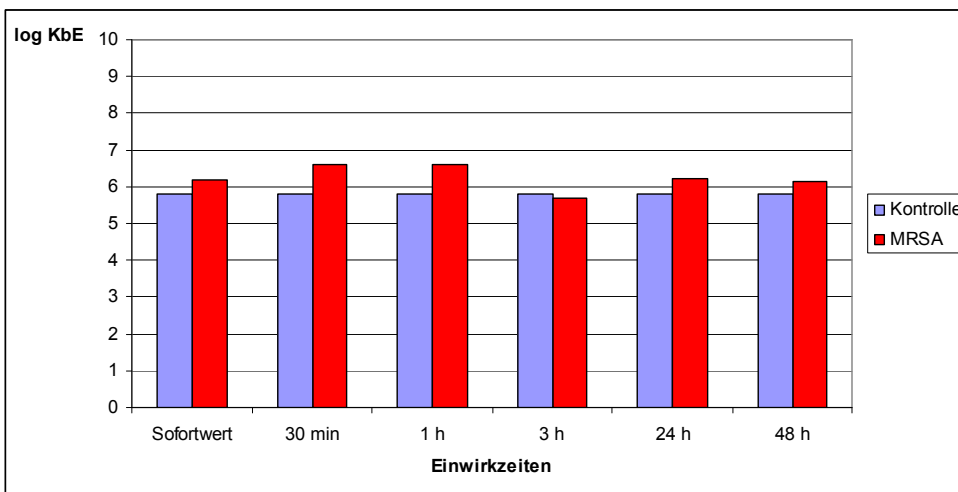


Abb.12 Wirksamkeit von für Actisorb[®] silver 220 gegenüber *MRSA* im modifizierten Suspensionstest mit Belastung

Auch gegenüber *VRE* setzt die Wirkung von Actisorb[®] silver 220 ohne Belastung relevant erst nach 24 h ein (Abb. 13). Durch Belastung wird die

Wirkung komplett aufgehoben (Abb. 14). Im Vergleich zu *MRSA* ist *VRE* unempfindlicher.

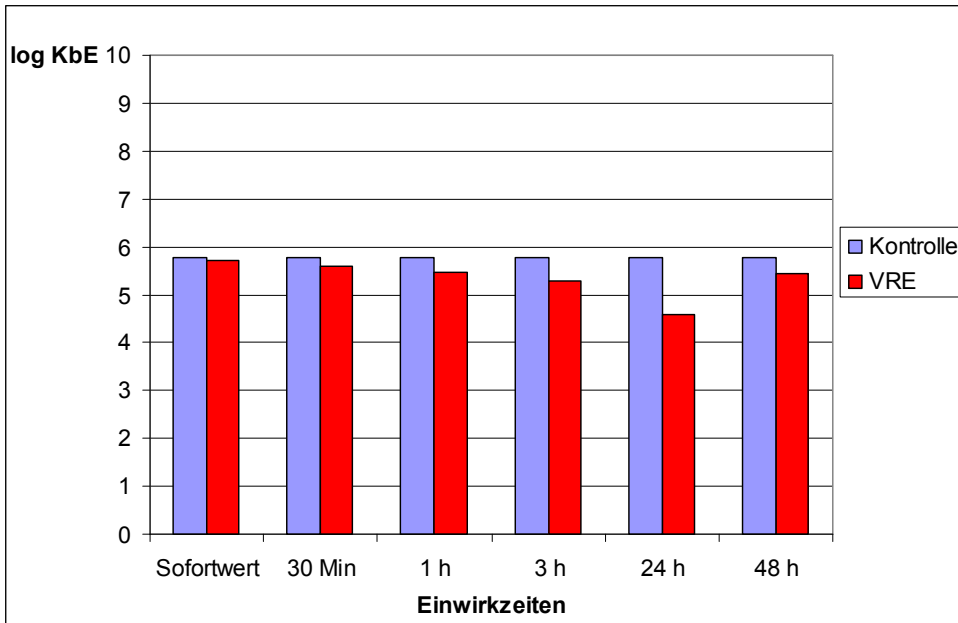


Abb.13 Wirksamkeit von Actisorb[®] silver 220 gegenüber *VRE* im modifizierten Suspensionstest ohne Belastung

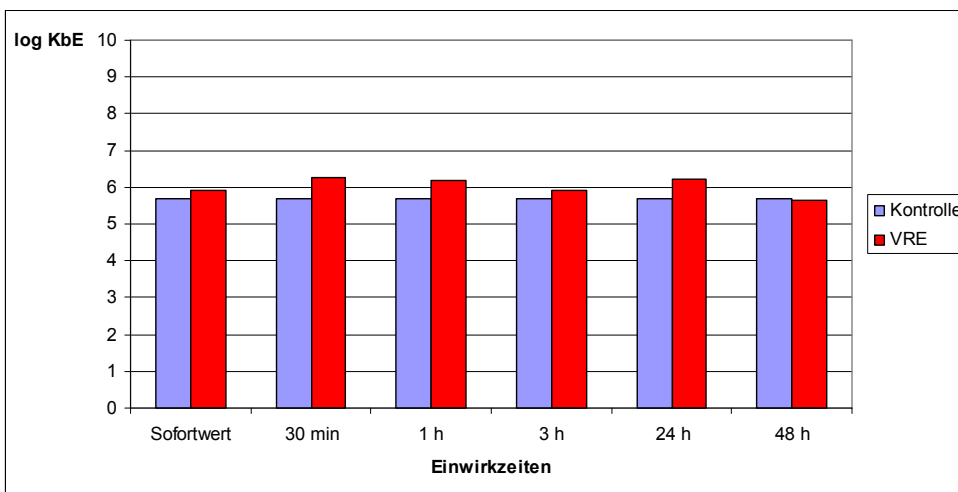


Abb.14 Wirksamkeit von Actisorb[®] silver 220 gegenüber *VRE* im modifizierten Suspensionstest mit Belastung

Gegenüber *P. aeruginosa* setzt die Wirkung von Actisorb[®] silver 220 ebenfalls erst nach 24 h ein (Abb. 15). Dieser Erreger ist deutlich empfindlicher als *MRSA* und *VRE*. Allerdings wird auch gegenüber *P. aeruginosa* die Wirkung durch

Belastung komplett aufgehoben, sogar mit der Tendenz einer Koloniezunahme nach 48 h (Abb. 16).

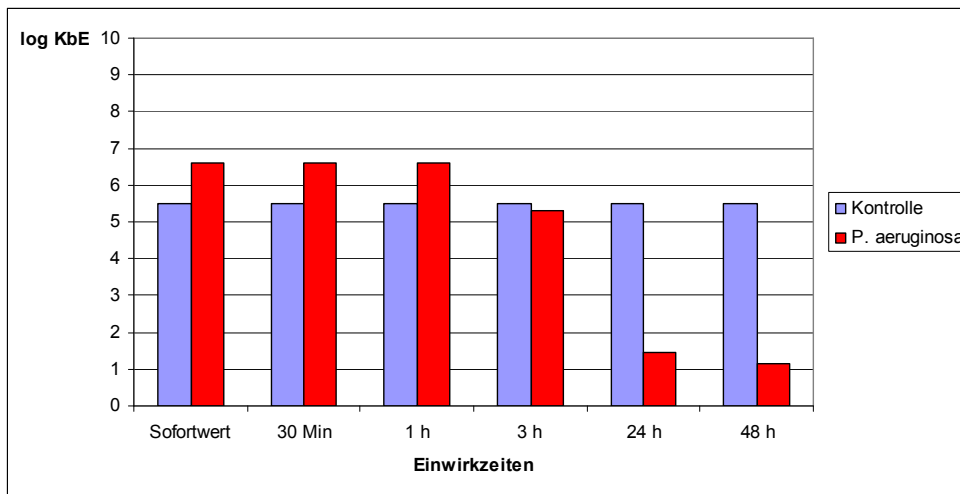


Abb.15 Wirksamkeit von Actisorb® silver 220 gegenüber *P. aeruginosa* im modifizierten Suspensionstest ohne Belastung

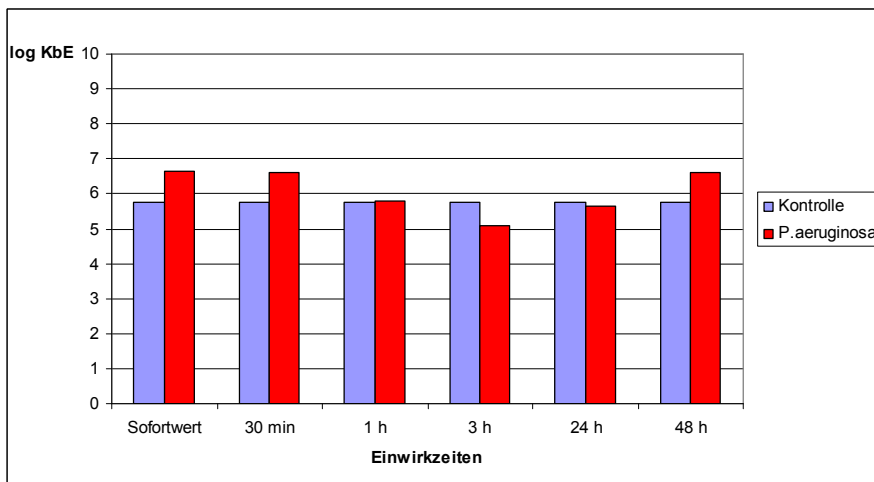


Abb.16 Wirksamkeit von Actisorb® silver 220 gegenüber *P. aeruginosa* im modifizierten Suspensionstest mit Belastung

Gegenüber *C. albicans* setzt die Wirkung von Actisorb® silver 220 schon nach 1 h ein, erreicht nach 3 h ihr Maximum mit etwa 2 lg und steigt danach nicht weiter an (Abb. 17). Durch Eiweißbelastung wird die Wirkung wiederum komplett aufgehoben (Abb. 18).

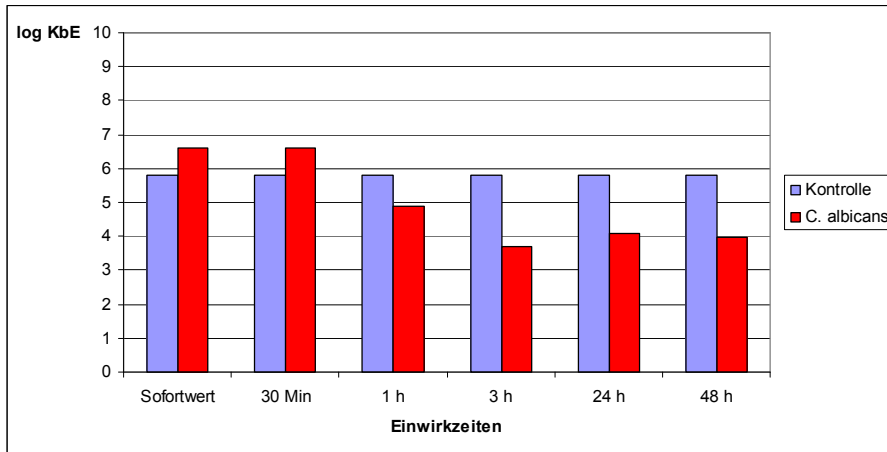


Abb.17 Wirksamkeit von Actisorb[®] silver 220 gegenüber *C. albicans* im modifizierten Suspensionstest ohne Belastung

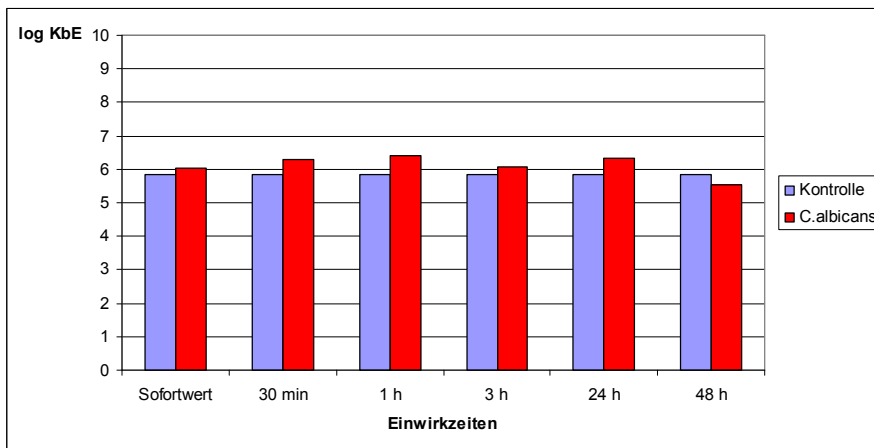


Abb. 18 Wirksamkeit von Actisorb[®] silver 220 gegenüber *C. albicans* im modifizierten Suspensionstest mit Belastung

2.2.3 Prüfkörpertest mit Medihoney unverdünnt ohne und mit Belastung

Im Sofortwert und nach 5 min war in den Versuchansätzen ohne und mit Belastung keine Reduktion erkennbar. Nach 10 min begann der Wirkungseintritt, wenn auch zunächst nur sehr gering. Nach 1 h Einwirkungszeit wurde ohne Belastung ein RF ≥ 3 Ig-Stufen erreicht. Nach 24 h und 48 h war die Wirkung noch weiter angestiegen und erreichte überwiegend Reduktionsfaktoren > 5 (Tab. 5).

Tab. 5 Ergebnisse des quantitativen Suspensionsversuchs mit unverdünntem Medihoney® ohne Eiweißbelastung

RF in den Einwirkzeiten														
Test-organismus	Sofortwert		5 min		10 min		1 h		3 h		24 h		48 h	
	lg x	RF	lg x	RF	lg x	RF	lg x	RF	lg x	RF	lg x	RF	lg x	RF
S. aureus	8,72	0	8,90	-0,06	8,71	0,03	4,73	3,76	4,19	4,12	3,68	4,74	0	≥7,39
s	0,07	0,06	0,09	0,06	0,08	0,08	0,11	0,07	0,11	0,16	0,10	0,23	0	0,10
Kontrolle	8,70	-	8,84	-	8,74	-	8,49	-	8,31	-	8,42	-	8,39	-
s	0,10	-	0,07	-	0,05	-	-	-	0,07	-	0,14	-	0,12	-
MRSA	8,91	-0,04	8,82	-0,04	8,73	0,04	3,29	5,56	3,38	5,76	0	≥7,86	0	≥7,93
s	0,10	0,10	0,10	0,10	0,09	0,19	0,09	0,11	0,05	0,11	0	0,05	0	0,10
Kontrolle	8,87	-	8,78	-	8,77	-	8,85	-	9,14	-	8,86	-	8,93	-
s	0,09	-	0,07	-	0,20	-	0,07	-	0,12	-	0,05	-	0,10	-
P. aeruginosa	8,81	-0,03	8,69	0,06	8,72	0,19	4,97	3,95	4,11	4,56	0	≥7,74	0	≥7,86
s	0,09	0,07	0,07	0,06	0,06	0,07	0,08	0,06	0,09	0,09	0	0,04	0	0,06
Kontrolle	8,77	-	8,75	-	8,91	-	8,90	-	8,66	-	8,74	-	8,86	-
s	0,12	-	0,06	-	0,05	-	0,10	-	0,05	-	0,04	-	0,06	-
VRE	8,77	-0,09	8,86	0,06	8,64	0,13	4,32	4,58	4,32	4,52	3,62	5,38	0	≥7,88
s	0,07	0,07	0,06	0,18	0,04	0,05	0,05	0,05	0,04	0,08	0,07	0,13	0	0,07
Kontrolle	8,68	-	8,92	-	8,78	-	8,90	-	8,84	-	9,00	-	8,88	-
s	0,06	-	0,15	-	0,07	-	0,04	-	0,07	-	0,08	-	0,07	-
C. albicans	7,87	0,03	4,5	3,4	4,55	3,35	2,66	5,98	0	≥6,65	0	≥6,84	0	≥6,78
s	0,07	0,07	0,07	0,05	0,07	0,07	0,04	0,07	0	0,17	0	0,11	0	0,18
Kontrolle	7,90	-	7,9	-	7,9	-	8,64	-	7,65	-	7,84	-	7,78	-
s	0,06	-	0,06	-	0,07	-	0,05	-	0,17	-	0,11	-	0,18	-

Auch bei 10% Rinderserumalbuminbelastung wurde ein RF > 3 gegenüber allen Erregern bereits nach 1 h erreicht. Mit zunehmender Einwirkungsdauer stieg der RF weiter an bis auf das im Test ablesbare Maximum (Tab. 6).

Tab. 6 Ergebnisse des quantitativen Suspensionsversuchs mit unverdünntem Medihoney® mit 10% Rinderserumalbuminbelastung

RF in den Einwirkzeiten														
Test-organismus	Sofortwert		5 min		10 min		1 h		3 h		24 h		48 h	
	lg x	RF	lg x	RF	lg x	RF	lg x	RF	lg x	RF	lg x	RF	lg x	RF
S. aureus	8,85	-0,15	8,89	-0,04	8,81	-0,06	4,69	3,80	4,79	3,52	3,91	4,51	0	≥7,39
s	0,08	0,05	0,10	0,08	0,10	0,10	0,09	0,12	0,11	0,08	0,08	0,09	0	0,06
Kontrolle	8,70	-	8,83	-	8,75	-	8,49	-	8,31	-	8,43	-	8,39	-
s	0,07	-	0,06	-	0,12	-	0,13	-	0,12	-	0,10	-	0,06	-
MRSA	8,93	-0,06	8,86	-0,08	8,89	-0,05	4,80	4,04	5,02	4,12	3,20	5,66	0	≥7,93
s	0,06	0,03	0,07	0,08	0,13	0,05	0,14	0,06	0,12	0,16	0,11	0,15	0	0,05
Kontrolle	8,87	-	8,78	-	8,84	-	8,85	-	9,14	-	8,86	-	8,93	-
s	0,07	-	0,08	-	0,10	-	0,10	-	0,09	-	0,06	-	0,05	-
P. aeruginosa	8,82	-0,03	8,79	-0,04	8,89	-0,03	5,32	3,59	4,84	3,84	0	≥7,74	0	≥7,86
s	0,08	0,03	0,09	0,14	0,11	0,15	0,07	0,03	0,08	0,11	0	0,06	0	0,04
Kontrolle	8,79	-	8,75	-	8,87	-	8,91	-	8,68	-	8,85	-	8,86	-
s	0,08	-	0,07	-	0,16	-	0,05	-	0,11	-	0,04	-	0,04	-
VRE	8,72	-0,04	8,87	0,05	8,80	-0,03	5,23	3,67	5,25	3,59	4,9	4,10	0	≥7,88
s	0,16	0,80	0,12	0,13	0,12	0,16	0,15	0,10	0,09	0,08	0,08	0,07	0	0,12
Kontrolle	8,68	-	8,92	-	8,78	-	8,9	-	8,84	-	9,0	-	8,88	-
s	0,13	-	0,09	-	0,11	-	0,13	-	0,07	-	0,12	-	0,12	-
C. albicans	7,67	0,24	5,07	2,83	5,20	2,70	2,89	5,75	0	≥6,65	0	≥6,85	0	≥6,76
s	0,07	0,15	0,13	0,11	0,11	0,18	0,13	0,08	0	0,12	0	0,12	0	0,10
Kontrolle	7,90	-	7,89	-	7,90	-	8,64	-	7,65	-	7,85	-	7,76	-
s	0,13	-	0,08	-	0,12	-	0,10	-	0,10	-	0,12	-	0,10	-

Im Unterschied zum verdünntem Medihoney[®] erreicht der unverdünnte Medihoney[®] gegenüber *S. aureus* schon nach 1 h die geforderte Wirksamkeit für ein Antiseptikum (Abb. 19).

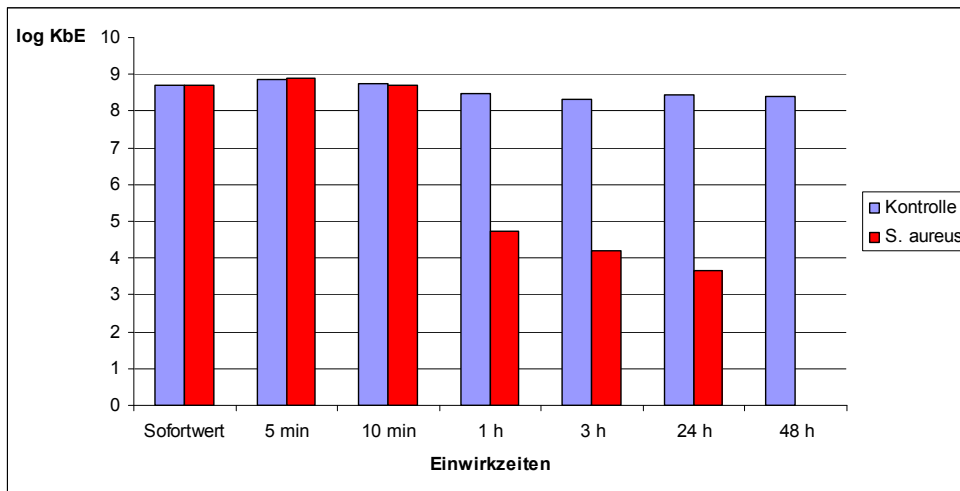


Abb. 19 Wirksamkeit von unverdünntem Medihoney[®] gegenüber *S. aureus* im quantitativen Suspensionstest ohne Belastung

Durch die Eiweißbelastung wird die Wirksamkeit nur unwesentlich beeinflusst (Abb. 20).

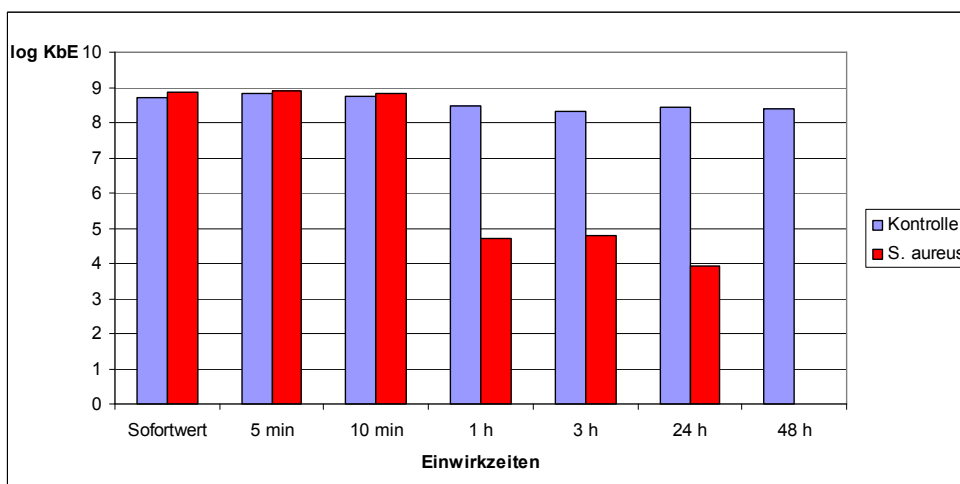


Abb. 20 Wirksamkeit von unverdünntem Medihoney[®] gegenüber *S. aureus* im quantitativen Suspensionstest mit Belastung

Gegenüber *MRSA* ist die Wirkung von Medihoney[®] sogar noch höher als gegenüber *S. aureus* (Abb. 21). Das gilt auch bei Eiweißbelastung (Abb. 22).

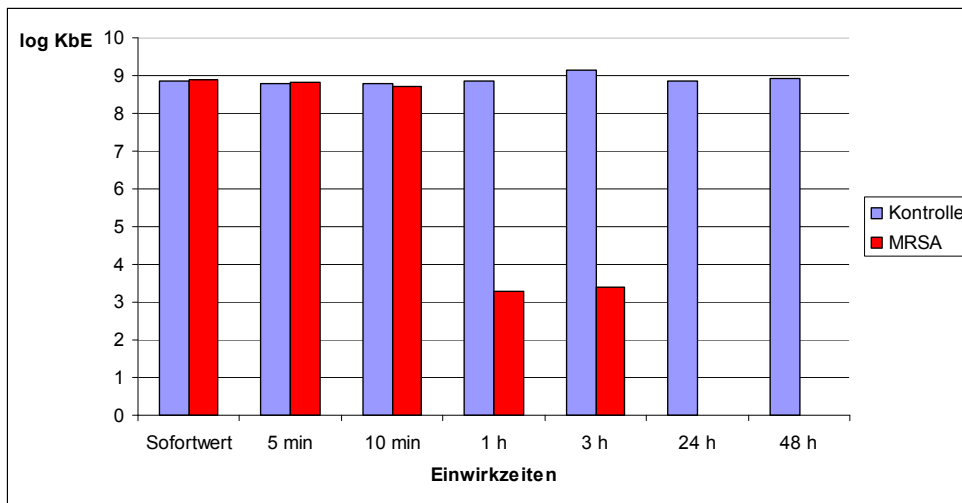


Abb. 21 Wirksamkeit von unverdünntem Medihoney[®] gegenüber *MRSA* im quantitativen Suspensionstest ohne Belastung

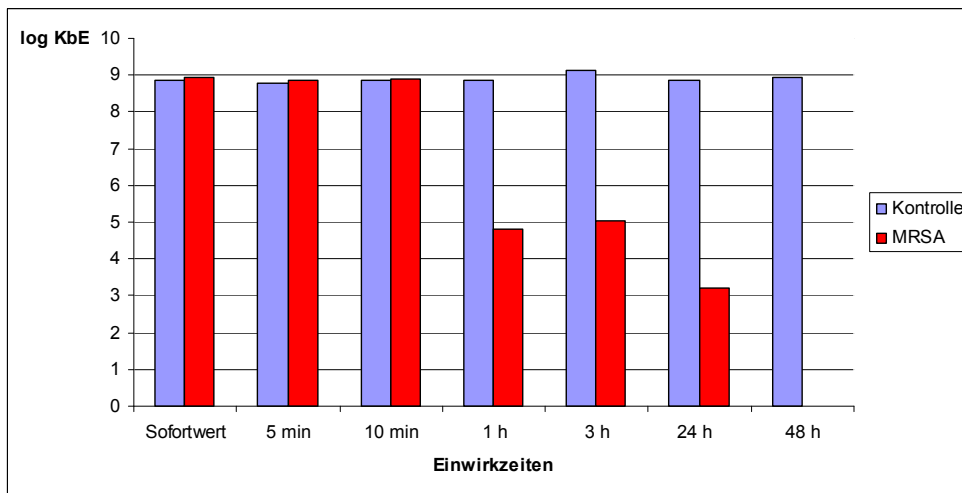


Abb. 22 Wirksamkeit von unverdünntem Medihoney[®] gegenüber *MRSA* im quantitativen Suspensionstest mit Belastung

Ähnlich wirksam ist unverdünnter Medihoney[®] gegenüber VRE sowohl ohne (Abb. 23) als auch mit Belastung, wobei durch die Belastung die Wirksamkeit etwas verringert wird (Abb. 24).

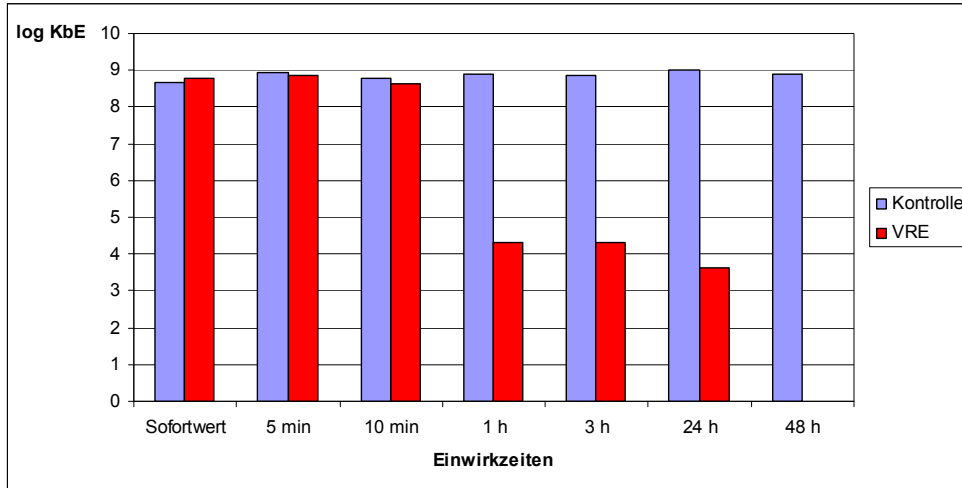


Abb. 23 Wirksamkeit von unverdünntem Medihoney[®] gegenüber VRE im quantitativen Suspensionstest ohne Belastung

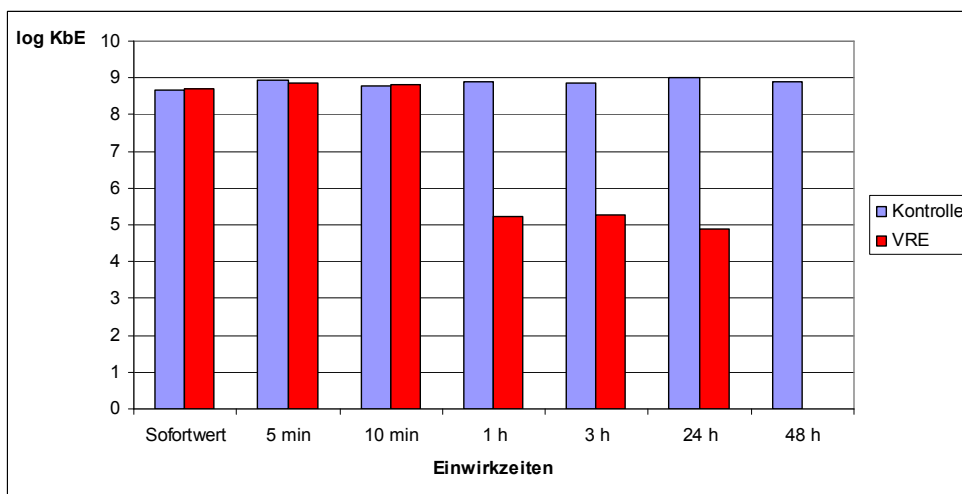


Abb. 24 Wirksamkeit von unverdünntem Medihoney[®] gegenüber VRE im quantitativen Suspensionstest mit Belastung

P. aeruginosa ist in der kurzen Einwirkungszeit von 1 h im Vergleich zu den übrigen Testorganismen unempfindlicher gegenüber unverdünntem Medihoney[®] mit und ohne Eiweißbelastung. Mit zunehmender Einwirkungszeit unterscheiden sich die Ergebnisse nicht von den anderen Prüforganismen (Abb. 25 und 26).

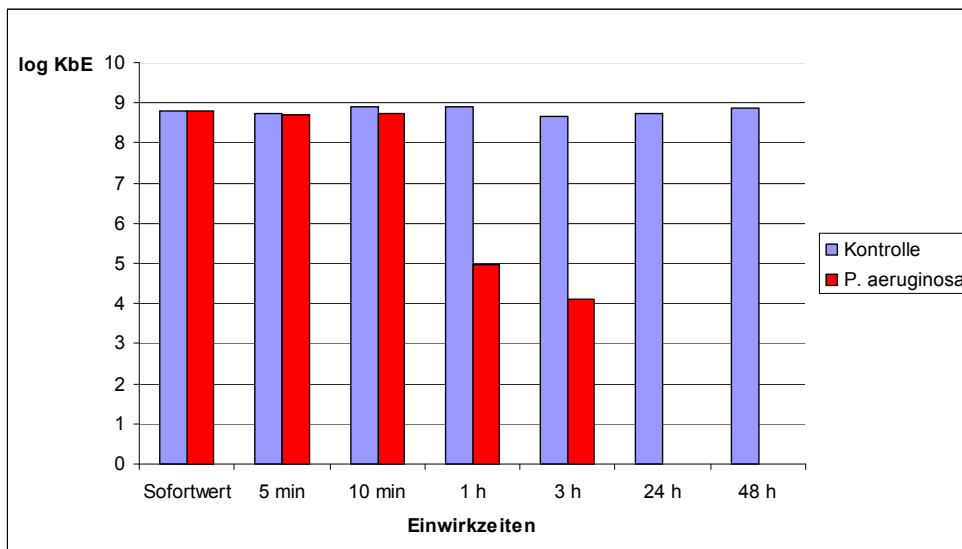


Abb. 25 Wirksamkeit von unverdünntem Medihoney[®] gegenüber *P. aeruginosa* im quantitativen Suspensionstest ohne Belastung

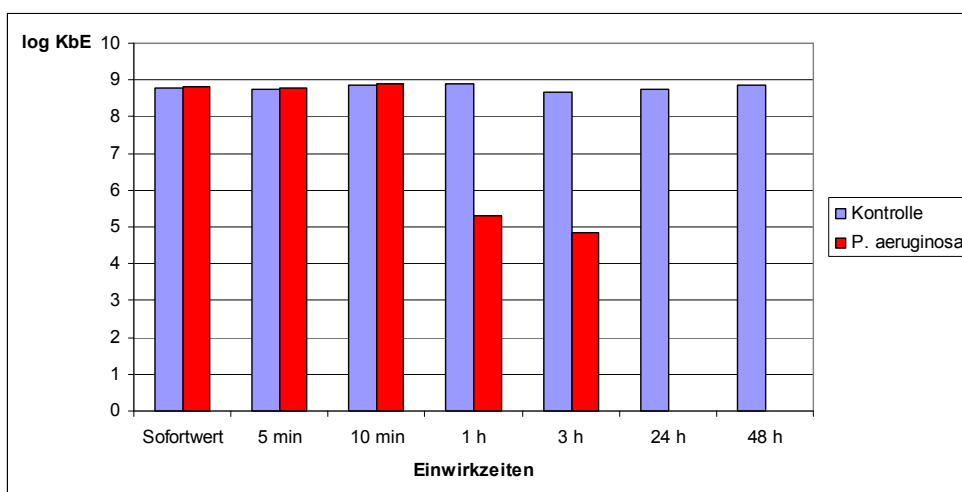


Abb. 26 Wirksamkeit von unverdünntem Medihoney[®] gegenüber *P. aeruginosa* im quantitativen Suspensionstest mit Belastung

Am empfindlichsten erwies sich *C. albicans* gegenüber unverdünntem Medihoney[®] ohne und mit Eiweißbelastung. Hier setzte die Wirkung bereits nach 5 min ein und erreichte bereits in dieser kurzen Einwirkungszeit die geforderte Wirksamkeit für ein Antiseptikum von etwa 3 lg (Abb. 27).

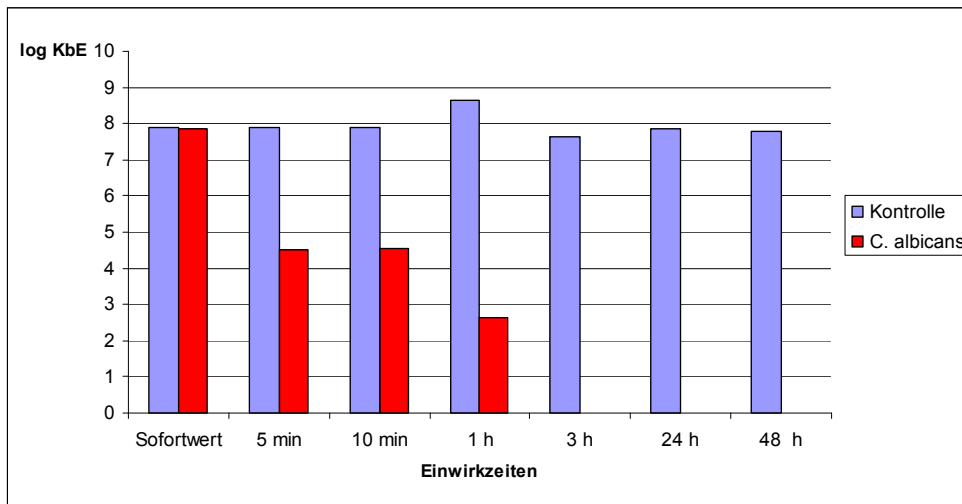


Abb. 27 Wirksamkeit von unverdünntem Medihoney[®] gegenüber *C. albicans* im quantitativen Suspensionstest ohne Belastung

Durch Eiweißbelastung wird die Wirksamkeit kaum beeinträchtigt (Abb. 28).

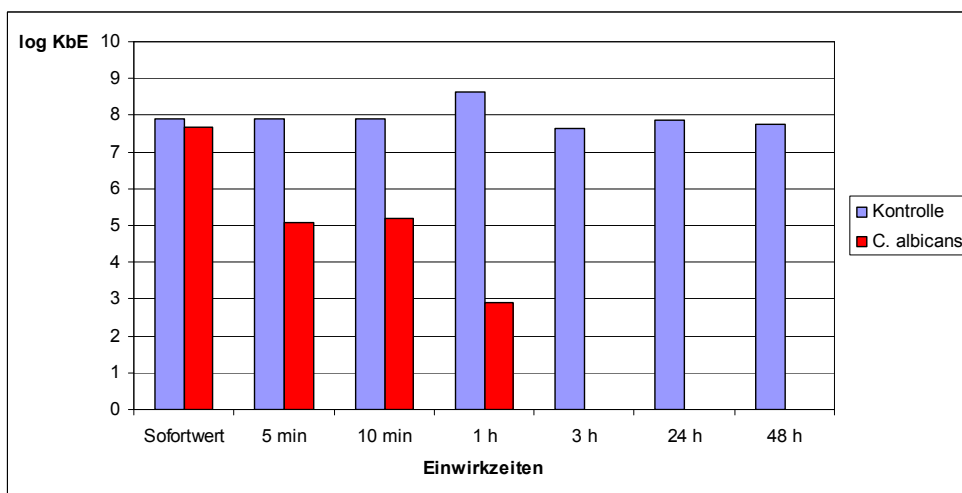


Abb. 28 Wirksamkeit von unverdünntem Medihoney[®] gegenüber *C. albicans* im quantitativen Suspensionstest mit Belastung

2.2.4. Vergleich von Medihoney unverdünnt und Actisorb[®] silver 220 jeweils ohne und mit Belastung

Verglichen wurde die Wirksamkeit von Medihoney[®] unverdünnt mit Actisorb[®] silver, beides ohne und mit Belastung bei 24 h und 48 h Einwirkungszeit, da die Wundauflage bei klinischem Einsatz zwischen 24 und 48 h auf der Wunde belassen wird (Simon 2008).

Ohne Belastung ist Medihoney[®] unverdünnt Actisorb[®] silver 220 in der Reduktion bei *C. albicans*, *P. aeruginosa* und *MRSA* bei 24 h und 48 h Einwirkungszeit überlegen. Bei der Reduktion von *VRE* konnte kein signifikanter Unterschied während 24 h und 48 h festgestellt werden (Tab. 7).

Tab. 7 Ergebnisse der Signifikanztestung von Medihoney[®] unverdünnt ohne Belastung gegen Actisorb[®] silver 220 unverdünnt ohne Belastung

Test-organismus	C. albicans		P. aeruginosa		VRE		MRSA	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Einwirkzeit	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
p-Wert	<0,001	0,002	<0,001	<0,001	0,059	0,052	0,028	0,011

Vergleicht man die Reduktionszeiten von Medihoney[®] unverdünnt und Actisorb[®] Silver 220 jeweils mit Belastung, zeigt sich ein signifikanter Unterschied bei allen getesteten Erregern nach Einwirkungszeiten von 24 h und 48 h (Tab. 8).

Tab. 8 Ergebnisse der Signifikanztestung von Medihoney[®] unverdünnt gegen Actisorb[®] silver 220 mit Belastung

Test-organismus	C. albicans		P.aeruginosa		VRE		MRSA	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Einwirkzeit	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
p-Wert	<0,001	<0,001	0,013	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	<0,001

2.3 Diskussion

2.3.1 Methode

Zur Ermittlung der mikrobioziden und levuroziden Wirksamkeit von Medihoney[®] wurde zunächst als Prüfmethode der quantitative Suspensionstest gemäß EN 1040 gewählt. Der Test ist Standard in der Wirkstofftestung von Präparaten auf Mikrobiozidie, die in flüssiger Form eingesetzt werden, weil sie dem Prüfansatz der Testorganismen in definierten Volumina zugesetzt werden können. Die Testmethode einschließlich der Ermittlung der geeigneten Inaktivierungskombination zur Ausschaltung einer Eigenwirkung von in das Kultivierungsmedium übertragenen Wirkstoffresten entspricht dem aktuellen Stand der Technik, wie es in den DGHM- Prüfrichtlinien und der DIN EN 1040 zur Antiseptikatestung standardisiert geregelt ist.

Sofern eine visköse Flüssigkeit wie Medihoney[®] getestet werden soll, muss diese soweit verdünnt werden, dass eine gleichmäßige Durchmischung mit den Testmikroorganismen mit anschließendem Anlegen von Verdünnungsreihen möglich ist. Das war erst beim Verdünnungsverhältnis 1:8 erreichbar.

Da das nicht der realen Anwendungssituation entspricht, wurde in Fortführung der Untersuchung der Prüfkörpertest zur Prüfung von Flächendesinfektionsmitteln für das Testanliegen modifiziert. Zur Testung wurde die Erregersuspension auf einen Prüfkörper aufgebracht und mit dem Medihoney[®] überschichtet. Mit dieser Zielsetzung gelang es, ein reproduzierbares Prüfmodell aufzubauen.

Analog ist die Testung von Wundauflagen nicht im quantitativen Suspensionstest möglich. Da in der getesteten Wundauflage der Wirkstoff, nanokristallines Silber, fest an die Matrix gebunden ist, war nur die Möglichkeit gegeben, die Wundauflage mit der Suspension der Prüforganismen zu tränken und nach Ablauf der Einwirkungszeiten die Erreger rückzugewinnen. Ein Auflegen auf einen Prüfkörper hätte zu einer Unterbewertung der Wirksamkeit geführt. Das Testvorgehen entspricht eher einem Suspensions- als einem Prüfkörpertest, weil die Suspension als Lösung in Kontakt mit der Wundauflage gebracht wird.

2.3.2 Ergebnisse

In in-vitro Studien wurde für medizinischen Honig bisher nur die wachstumshemmende Wirkung im Dilutionstest nachgewiesen und nicht die für ein Antiseptikum geforderte bakteriozide und levurozide Wirkung untersucht. Deshalb wurde in der vorliegenden Studie erstmals die mikrobiozide Wirkung von Medihoney untersucht. Gemäß Pitten et al. (2003) wird für Wundantiseptika in der Anwendungskonzentration und innerhalb der Einwirkungszeit folgende Wirksamkeit verlangt: RF ohne Belastung bei Bakterien ≥ 5 lg, bei *C. albicans* ≥ 4 lg, mit Belastung (10% Rinderserumalbumin) bei Bakterien und ebenso *C. albicans* ≥ 3 lg.

Medihoney[®] erfüllt die Anforderungen für ein Wundantiseptikum ohne und mit Eiweißbelastung sogar schon in der Verdünnung von 1:8 grenzwertig nach 24 h mit Belastung. Die Reduktionsfaktoren erreichten bei *S. aureus* 2,6 lg-Stufen, bei *P. aeruginosa* 2,9 lg-Stufen. Binnen 48 h wurde mit Eiweißbelastung bei beiden Testorganismen ein RF von ≥ 3 lg-Stufen erreicht. Damit ist für Medihoney[®] eine hohe Anwendungssicherheit selbst bei Verdünnung durch Wundsekret gegeben. Da Medihoney[®] mindestens für 24 h appliziert wird, meist aber die Wundaufgabe erst nach 48 h gewechselt wird, sind die Ergebnisse als praxisrelevant anzusehen.

Gegen *C. albicans* wurde allerdings keine levurozide Wirkung gefunden. Als Erklärung ist die Eigenschaft von Pilzen zu sehen, Glucose als Substrat umzusetzen, so dass Candida in verdünntem Honig ein Nährmedium findet.

Unverdünnt, also in der Anwendungsform, war Medihoney[®] gegenüber den Testbakterien und auch gegenüber *C. albicans* bereits nach 1 h ohne und mit Eiweißbelastung wirksam. Selbst bei den getesteten Problemerregern MRSA und VRE konnte eine ausreichend hohe Reduktion von ≥ 3 lg-Stufen nach nur 1 h Einwirkungszeit erreicht werden. Auf Grund der rasch einsetzenden levuroziden Wirkung innerhalb 1 h ist trotz des Wirkungsverlusts bei der 1:8 Verdünnung eine sichere Wirksamkeit anzunehmen, allein schon deshalb, weil auf chronischen Wunden keine Sprosspilzkolonisation von 5 lg/g Gewebe zu

erwarten ist (Dissemond et al. 2004). Somit finden die guten klinischen Erfolge, die mit Medihoney[®] erreicht werden, in vitro ihre Bestätigung.

Gegenüber allen Testorganismen steigt mit zunehmender Einwirkungszeit die Wirksamkeit von unverdünntem Medihoney[®]. In Abbildung 29 wird deutlich, dass unter Berücksichtigung aller eingesetzten Testorganismen nach spätestens 1 h Einwirkungszeit die für ein Antiseptikum geforderte Wirksamkeit von 3 lg erreicht wird. Da Auflagen mit Medihoney[®] üblicherweise nach 24 bzw. nach 48 h gewechselt werden, ist eine hohe Wirksamkeitsreserve vorhanden.

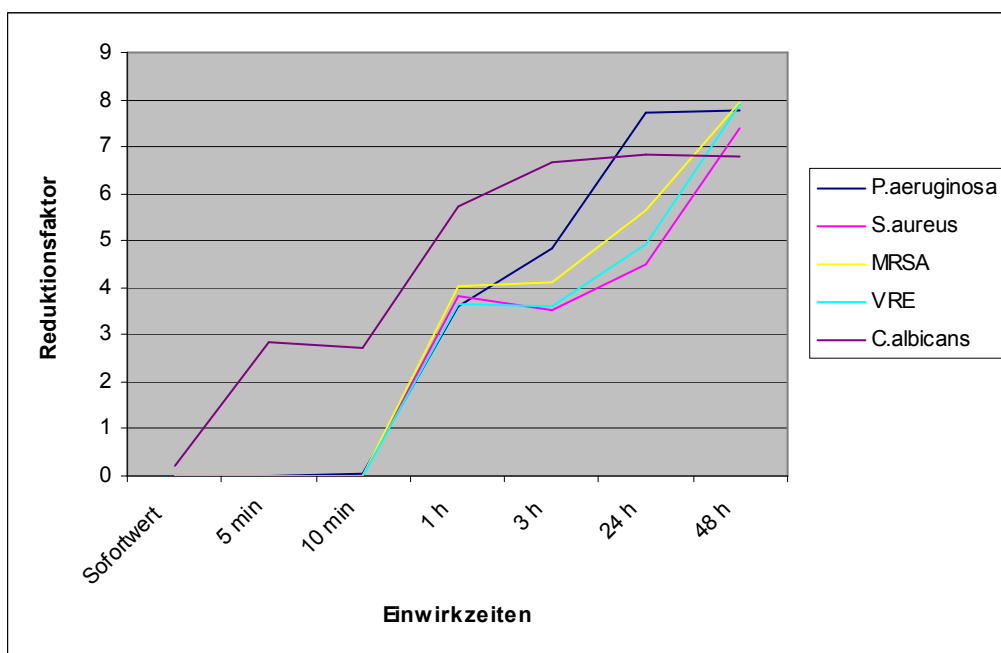


Abb. 29 Zunahme der Reduktionsfaktoren in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit

Die mikrobiozide Wirkung von medizinischem Honig basiert auf drei Faktoren (Simon 2006):

1. Osmolarität,
2. Produktion von H_2O_2 in nicht zytotoxischen Konzentrationen durch Glukoseoxidase und
3. spezielle phytochemische Inhaltsstoffe, die sich vor allem in Honig von Bienenvölkern finden, die vor Leptospernum- Gewächsen ausgesetzt werden (Simon 2006).

Außerdem wirkt medizinischer Honig klinisch entzündungshemmend und stimuliert die Zellneubildung (Lusby et al 2002).

Eigenschaften des Honigs, wie z. B. die Interaktion mit Wundsekret (durch H_2O_2 wird das Einsprossen von Kapillaren in das Wundgewebe induziert) oder eine Reduktion der Narbenbildung und Vermeidung von Geruchsbildung, werden mit den gewählten in vitro Tests nicht erfasst, tragen aber in vivo zur Abheilung einer Wunde bei und vergrößern so die Compliance des Patienten, was sich wiederum positiv auswirkt.

Schlecht heilende, infizierte, chronische Wunden stellen ein zunehmendes Problem in der Wundbehandlung dar. Aufgrund des Erregerwandels bei den Wundinfektionen sind Antibiotika nicht mehr Mittel der Wahl zur lokalen Wundbehandlung (Rudolph et al. 2008). Daher ist medizinischer Honig als eine Alternative in der Wundbehandlung gerade für chronische infizierte Wunden einzuschätzen.

Im Unterschied zu Medihoney[®] war die Wundaufgabe Actisorb[®] silver 220 selbst ohne Eiweißbelastung nicht ausreichend antiseptisch wirksam (Tab. 10). Mit Eiweißbelastung (Tab. 10) wurde die antiseptische Wirkung praktisch komplett aufgehoben, was in Übereinstimmung zur Literatur steht (Müller u. Kramer 2008). Damit ist Medihoney[®] der Silberwundaufgabe hinsichtlich mikrobiozider Wirkung deutlich überlegen und erfüllt die Anforderungen, die an ein Wundantiseptikum gestellt werden, gegenüber allen Testorganismen, da in der Behandlung von Wunden Verbände mit Medihoney[®] 48 h auf der Wunde belassen werden (Simon 2007).

Tab. 10 Vergleich der mikrobioziden Wirkung von Medihoney unverdünnt und Actisorb[®] silver 220

Test-organismus	Medihoney [®]				Actisorb [®] silver 220			
	Einwirkzeit							
	24 h		48 h		24 h		48 h	
	ohne Belastung	mit Belastung	ohne Belastung	mit Belastung	ohne Belastung	mit Belastung	ohne Belastung	mit Belastung
S. aureus	> 4,5	> 4,7	> 5	> 5	1,54	0,175	2,39	1,55
P. aeruginosa	> 5	> 5	> 5	> 5	4,05	1,25	4,35	< 0
MRSA	> 5	> 5	> 5	> 5	1,54	0	2,39	0
VRE	4,9	> 5	> 5	> 5	1,19	< 0	0,36	< 0
C. albicans	> 5	> 5	> 5	> 5	1,78	1,18	1,81	1,04

Allerdings ist für Actisorb[®] silver 220 in vitro die Fähigkeit zur Endotoxinbindung nachgewiesen (Müller et al. 2003). Außerdem ist davon auszugehen, dass Eiweiß aus dem Wundsekret nicht in das mit dem Aktivkohle-Silber-Gemisch gefüllte Vlies eindringt, so dass innerhalb des Vlies in vivo noch Silber zur antimikrobiellen Wirkung zur Verfügung stehen dürfte.

Als Fazit lässt sich ableiten, dass Medihoney[®] gegenüber einer Wundbehandlung mit Silberwundauflagen zu bevorzugen ist.

3 Weiterführende Gedanken und Schlussfolgerungen

Mit Hilfe des quantitativen Suspensions- und des Prüfkörpertest konnte nachgewiesen werden, dass Medihoney[®] nicht nur mikrobiostatisch, sondern auch mikrobiozid wirksam ist. Die Prüfmethode allein ist jedoch nicht ausreichend, den positiven Effekt, den medizinischer Honig auf die Wundheilung ausübt, zu erklären. Leider existiert zurzeit kein allgemein anerkanntes Wundinfektionsmodell, um den Einfluss auf die Wundheilung zu untersuchen und gleichzeitig die antiseptische Wirksamkeit zu bestimmen. Ein derartiges Modell hätte den Vorteil, dass unterschiedliche antiseptische Wundbehandlungsmethoden miteinander verglichen werden könnten.

Schließlich wäre es interessant, die phytochemischen Stoffe zu analysieren, die für die mikrobiozide Wirkung des Honigs verantwortlich sind und die Frage zu untersuchen, ob Methylglyoxal allein oder verschiedene Stoffe im Sinne eines Kombinationseffekts zusammen wirken und ob "normaler Honig" angereichert mit dieser/n Substanz/en die gleiche mikrobiozide und wundheilungsfördernde Potenz besitzen würde.

4 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die mikrobiozide Wirksamkeit von Medihoney[®] 1:8 verdünnt im quantitativen Suspensionstest und unverdünnt im Prüfkörpertest im Vergleich zur Silberwundauflage Actisorb[®] silver 220 untersucht. Letztere wurde direkt mit den Prüforganismen inkubiert.

Als Prüforganismen wurden *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *MRSA*, *VRE* und *C. albicans* eingesetzt. Als Einwirkzeiten wurden die Sofortwirkung sowie die Wirksamkeit nach 1 h, 3h, 24 h und 48 h gewählt. Bei Actisorb[®] silver 220 wurde außerdem nach 30 min Einwirkzeit der RF berechnet, bei Medihoney[®] wurden statt 30 min 5 und 10 min als zusätzliche Einwirkzeit gewählt.

Durch Medihoney[®] unverdünnt wurde bei allen Testorganismen ohne und mit Belastung durch 10% Rinderalbumin ein RF ≥ 3 lg-Stufen schon nach 1 h erreicht. Damit erfüllt Medihoney[®], dessen Anwendung sich üblicherweise auf 48 h erstreckt, die Anforderungen an ein Wundantiseptikum mit hoher Sicherheitsreserve.

Die 1:8 Verdünnung erreichte gegen die Testbakterien innerhalb von 24 h mit Eiweißbelastung die für ein Antiseptikum geforderte Wirksamkeit nicht ganz, wohl aber innerhalb 48 h. Damit ist selbst bei Verdünnung von aufgetragenem purem Medihoney[®] durch Wundsekret von einer ausreichenden Wirksamkeit auf Wunden auszugehen. Gegenüber *C. albicans* erreichte die Wirksamkeit bei Belastung nur etwa 1 log. Da Medihoney unverdünnt jedoch auch gegen *C. albicans* sicher wirksam ist und dieser Erreger nicht in vergleichbar hoher Kolonisationsdichte wie Bakterien auf Wunden auftritt, ist auch gegenüber diesem Erreger von einer ausreichenden Wirksamkeit auf Wunden auszugehen.

Actisorb[®] silver 220 erreichte nur bei *P. aeruginosa* nach 24 h und 48 h ohne Belastung den ausreichenden RF von ≥ 3 log-Stufen. Mit Belastung wurde die mikrobiozide Wirksamkeit praktisch aufgehoben. Damit wurde gezeigt, dass Medihoney[®] der Silberwundauflage an mikrobiozider Effektivität deutlich überlegen ist.

5 Summary

This study represents data on the microbicidal efficacy of Medihoney[®] 1:8 diluted based on the quantitative suspension test and undiluted Medihoney[®] based on germ carrier test in comparison to the silver wound dressing Actisorb[®] silver 220. The silver wound dressing was directly incubated with the test organisms.

Four bacteria strains (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *MRSA*, *VRE*) and one yeast (*C. albicans*) were used as test organisms. The activity against bacteria and yeast was tested directly after applying Medihoney[®] and Actisorb[®] silver 220 as well as after 1h, 3h, 24h and 48h. The reduction factors (RF) with Actisorb[®] silver 220 was also evaluated after 30 min. The RF with Medihoney[®] was evaluated after 5 and 10 min instead of 30 min.

The investigation revealed that medicinal honey, applied undiluted, possessed microbicidal activity against all test organisms already after 1 h in the absence of interfering substances as well as in the presence of 10% albumin with the recommended reduction factors (RF) of about 3 log. For this reason Medihoney[®] fulfills the requirements for a wound antiseptic with high safety margin, because Medihoney[®] is usually left 48 h on a wound.

Applied at a dilution of 10% in presence of 10% albumin Medihoney[®] reached barely the activity of an antiseptic after 24 h. After 48h however the recommended RF was achieved. Therefore it can be assumed that applied Medihoney[®] even after dilution on wound by wound secret is likely to be highly effective.

The levurocidal activity of diluted Medihoney[®] was not as pronounced (RF ca 1 log).

However undiluted Medihoney[®] is also effective against *C. albicans*. Because this yeast is not to be found in such a highly comparably colonisation on wounds as bacteria, we can assume that Medihoney[®] even after dilution by wound secret is effective enough against this agent.

Actiosorb[®] silver 220 possessed bactericidal activities against *P. aeruginosa* only within 24 h and 48 h in the absence of interfering substances with the recommended RF of 3 log. However, when tested under conditions in the presence of 10% albumin the effectivity was practically neutralized.

Concluding the microbicidal activity of Medihoney[®] was significant superior to the silver wound dressing.

6 Literaturverzeichnis

- Ahmed AKJ, Hoekstra MJ, Hage JJ, Karim RB (2003) Honey-medicated dressing: transformation of an ancient remedy into modern therapy. *Ann Plas Surg* 50: 143-148.
- Al-Waili NS (2004a) Investigating the antimicrobial activity of natural honey and its effects on the pathogenic bacterial infections of surgical wounds and conjunctiva. *J Med Food* 7: 210-222.
- Al-Waili NS (2004b) Topical honey application vs. acyclovir for the treatment of recurrent herpes simplex lesions. *Med Sci Monitor* 10(8): 94-98.
- Anselmi C, Ettore A, Andreassi M, Centini M et al. (2002) In vitro induction of apoptosis vs. necrosis by widely used preservatives: 2-phenoxyethanol, a mixture of isothiazolinones, imidazolidinyl urea and 1,2-pentanediol. *Biochem Pharmacol* 63(3): 437-453.
- Bang LM, Bunting C, Molan P (2003) The effect of dilution on the rate of hydrogen peroxide production in honey and its implications for wound healing. *J Altern Complement Med* 9: 267-273.
- Basson NJ, Grobler SR (2008) Antimicrobial activity of two South African honeys produced from indigenous *Leucospermum cordifolium* and *Erica* species on selected micro-organism. *BMC Complement Altern Med* 15(8): 41.
- Blaser G, Santos K, Vetter H, Simon A (2007) Effect of medical honey on wounds colonised or infected with MRSA. *J Wound Care* 16(8): 325-328.
- Blair SE, Cokcetin NN, Harry EJ, Carter DA (2009) The unusual antibacterial activity of medical-grade *Leptospermum* honey: antibacterial spectrum, resistance and transcriptome analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28(10): 1199-1208.
- Brady NF, Molan PC, Harfoot CG (1997) The sensitivity of dermatophytes to the antimicrobial activity of manuka honey and other honey. *Pharmaceutical Sciences* 2: 1-3.
- Cantero AV, Portero-Otin M, Ayala V, Auge N, Sanson M, Elbaz M, Thiers JC, Pamplona R, Salvayre R, Nègre-Salvayre A (2007) Methylglyoxal induces advanced glycation end product (AGEs) formation and dysfunction of PDGF receptor-beta: implications for diabetic atherosclerosis. *FASEB J* 21: 3096-3106.

- Ceyhan N, Ugur A (2001) Investigation of in vitro antimicrobial activity of honey. Riv Biol 94(2): 363-371.
- Chambers J (2006) Topical manuka honey for MRSA-contaminated skin ulcers. Pailiat Med 20: 557.
- Cooper RA, Molan PC, Harding KG (1999) Antibacterial activity of honey against strains of Staphylococcus aureus from infected wounds. J Royal Soc Med 92(6): 283-285.
- Cooper RA, Molan PC (1999) The use of honey as an antiseptic in managing Pseudomonas infection. J Wound Care 8(8): 161-164.
- Cooper RA, Halas E, Molan PC (2002) The efficacy of honey in inhibiting strains of Pseudomonas aeruginosa from infected burns. J Burn Care Rehabil 23(6): 366-370.
- Cooper RA (2007) Honey in wound care: antibacterial properties. GMS Krankenhaushyg Interdiszip 2(2): Doc51 (20071228).
- DGHM: Standardmethoden der DGHM zur Prüfung und Bewertung chemischer Desinfektionsverfahren (2001). Wiesbaden, mhp: 1-80.
- DIN EN 1040 (2005) Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics – Test method and requirements (phase 1).
- DIN EN 14349 (2007) Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika - Quantitativer Oberflächenversuch zur Bestimmung der bakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika für den Veterinärbereich auf nicht-porösen Oberflächen ohne mechanische Wirkung - Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2); Deutsche Fassung.
- Dissemond J, Schmid E, Esser S, Witthoff M, Goos M (2004) Untersuchungen zur bakteriellen Kolonisation chronischer Wunden in einer universitären dermatologischen Wundambulanz unter besonderer Berücksichtigung von ORSA. Hautarzt 55: 280-288.
- Dunford C, Cooper R, Molan P (2000) Using honey as a dressing for infected skin lesions. Nursing Times NTplus 96(14): 7-9.
- Dunford C, Cooper R, Molan P (2000) The use of honey in wound management. Nursing Standard 15(11): 63-68.

- Dunford C, Hanano R (2004) Acceptability to patients of a honey dressing for non-healing venous leg ulcers. *J Wound Care* 13(5): 193-197.
- Efem SEE, Udoh KT, Iwara CI (1992) The antimicrobial spectrum of honey and its clinical significance. *Infection* 20: 227-229.
- Estrada H, Gamboa MM, Arias ML, Chaves C (2005) Evaluation of the antimicrobial action of honeys against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* and *Aspergillus niger*. Evaluation of its microbiological charge. *Arch Latinoam Nutr* 55(2): 167-171.
- Fangio MF, Iurlina MO, Fritz R (2007) Antimicrobial activity of honey the southeast of Buenos Aires Province against *Escherichia coli*. *Rev Argent Microbiol* 39(2): 120-123.
- French VM, Cooper RA, Molan P (2005) The antibacterial activity of honey against coagulase-negative staphylococci. *J Antimicrob Chemother* 56: 228-231.
- Furr JR, Russel AD, Turner TD, Adrews A (1994) Antibacterial activity of Actisorb[®] plus, Actisorb[®] and SILVER nitrate. *J Hosp Inf* 27: 201-208.
- Gethin G, Cowman S (2005) Case series of use of Manuka honey in leg ulceration. *Int Wound J* 2(1): 10-15.
- Henle T (2007) Der süße Bakterienkiller. *Labor&More* 2: 50-51.
- Henriques A, Jackson S, Cooper R, Burton N (2006) Free radical production and quenching in honeys with wound healing potential. *J Antimicrob Chemother* 58: 773-777.
- Irish J, Carter DA, Shokohi T, Blair SE (2006) Honey has an antifungal effect against *Candida* species. *Med Mycol* 44(3): 289-291.
- Innes ME, Umraw N, Fish JS, Gomez M, Cartotto RC (2001) The use of silver coated dressings on donor site wounds: a prospective, controlled matched pair study. *Burns* 27(6): 621-627.
- Johnson DW, van Eps C, Mudge DW, Wiggins KJ, Armstrong K, Hawley CM, Campbell SB, Isbel NM, Nimmo GR, Gibbs H (2005) Randomized, controlled trial of topical exit-site application of honey (Medihoney) versus mupirocin for the prevention of catheter-associated infections in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 16(5): 1456-1462.

- Laga M, Cottyn A, van Herreweghe F, Vanden Berghe WV, Haegeman G, van Oostveldt P, Vanderkerckhove J, Vancompernelle K (2007) Methylglyoxal suppresses TNF-alpha-induced NF-kappaB activation by inhibiting NF-kappaB DNA-binding. *J Biochem Pharmacol* 74(4): 579-589.
- Lysby PE, Coombes A, Wilkinson JM (2002) Honey: a potent agent for wound healing? *J Wound Ostomy Continence Nurs* 29(6): 295-300.
- Lysby PE, Coombes AL, Wilkinson JM (2005) Bacterial activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Arch Med Res* 36(5): 464-467.
- Mercan N, Guvensen A, Celik A, Katircioglu H (2007) Antimicrobial activity and pollen composition of honey samples collected from different provinces in Turkey. *Nat Prod Res* 21(3): 187-195.
- Molan PC (1996) Honey as an Anti microbial Agent. In: Mizrahi A, Lensky Y (eds.) *Bee products*. New York: Plenum Press: 27-37.
- Molan PC, Allen KL (1996) The effect of gamma- irradiation on the antibacterial activity of honey. *J Pharm Pharmacol* 48: 1206-1209.
- Molan PC (1999) The role of honey in the management of wounds. *J Wound Care* 8(8): 415-418.
- Molan PC (2001) The potential of honey to promote oral wellness. *Gen Dent* 49(6): 584-589.
- Molan PC (2001) Why honey is effective as a medicine 2. The scientific explanation of its effect. *Bee World* 82(1): 22-40.
- Molan PC (2004) Potential of honey in the treatment of wounds and burns. *Am J Clin Dermatol* 2: 13-19.
- Müller G, Winkler Y, Kramer A (2003) Antibacterial Activity and endotoxin-binding capacity of Actisorb[®] Silver 220. *J Hosp Inf* 53: 211- 214.
- Nakayama M, Saito K, Sato S, Nakayama K, Terawaki H, Ito S, Kohno M (2007) Radical generation by the non-enzymatic reaction of methylglyoxal and hydrogen peroxide. *Redox Rep* 12(3): 125-133.
- Patton T, Barrett J, Brennan J, Moran N (2006) Use of a spectrophotometric bioassay for determination of microbial sensitivity to manuka honey. *J Microbiol Methods* 64(1): 84-95.
- Pitten FA, Werner HP, Kramer A (2003) A standardized test to assess the impact of different organic challenges on the antimicrobial activity of

- antiseptics. *J Hosp Inf* 55(2): 108-115.
- Poon VK, Burd A (2004) In vitro cytotoxicity of silver: implication for clinical wound care. *Burns* 30(2): 140-147.
- Ransom HM (1937) *The sacred bee in ancient times and folklore*. London, Allen & Unwin: 308.
- Rudolph P, Werner HP, Kramer A (2000) Untersuchungen zur Mikrobiozidie von Wundauflagen. *Hyg Med* 25(5): 184-186.
- Sheridan R, Policastro B, Thomas S, Rice D (2008) Analysis and occurrence of 14 sulfonamide antibacterials and chloramphenicol in honey by solid-phase extraction followed by LC/MS/MS analysis. *J Agric Food Chem* 28: 56(10): 3509-3516.
- Simon A (2006) Honey for wound healing. *Med Monatsschr Pharm* 29: 456.
- Simon A (2008) Medihoney. In: Kramer A, Assadian O (Hrsg) *Wallhäußers Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Antiseptik und Konservierung*. Stuttgart Thieme: 896-898.
- Simon A, Sofka K, Wiszniewsky G, Bode U, Fleischhack G (2006) Wound care with antibacterial honey (Medihoney) in pediatric hematology-oncology. *Support Care Cancer* 14(1): 91-97.
- Sofka K, Wiszniewsky G, Blaser G, Bode U, Simon AL (2004) Antibakterieller Honig (Medihoney™) zur Wundpflege. *Wundantiseptik bei pädiatrischen Patienten in der Hämatologie-Onkologie? Krankenhaushyg Infektionsverh* 26(5): 183-187.
- Subrahmanyam M (1998) A prospective randomised clinical and histological study of superficial burn wound healing with honey and silver sulphadiazine. *Burns* 24(2): 157-161.
- Subrahmanyam M, Archan M, Pawar SG (2001) Antibacterial activity of honey on bacteria isolated from wounds. *Ann Burns Fire Dis* 14: 22-24.
- Vardi A, Barzilay Z, Linder N, Cohen HA, Paret G, Barzilai A (1998) Local application of honey for treatment of neonatal postoperative wound infection. *Acta Paediatr* 87(4): 429-432.
- Vermeulen H, van Hattem J, Storm-Versloot M, Ubbink D (2007) Topical silver for treating infected wounds. *Cochrane Database Syst Rev* (1); CD005486.

- Weber DJ, Rutala WA (2001) Use of Metals as Microbiocides in Preventing Infections in Healthcare. In: Block SS (eds.) Disinfection, Sterilization, and Preservation. Lippincott Philadelphia: 415-430
- Wilkinson JM, Cavanagh MA (2005b) Antibacterial activity of 13 honeys against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Food* 8(1): 100-103.
- Willix DJ, Molan PC, Harfoot CG (1992) A comparison of the sensitivity of wound- infected species of bacteria to the antibacterial activity of manuka honey and other honey. *J Appl Bacteriol* 73(5): 388-394.

Eidesstattliche Erklärung

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

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

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

Oslo, den

Dorothee Igelbrink Holter

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Igelbrink Holter
Vorname: Dorothee
Geburtsdatum: 04.12.1982
Geburtsort: Dormagen
Wohnort: Mühlenbuschweg 3, D-41542 Dormagen
Familienstand: verheiratet

Bildungsweg

2002 Abitur am Katholischen Norbert-Gymnasium Knechtsteden
in Dormagen
2002 - 2008 Studium der Humanmedizin an der Ernst- Moritz- Arndt-
Universität Greifswald
2008 Staatsexamen Humanmedizin an der Ernst-Moritz-Arndt-
Universität Greifswald

Berufsausbildung

05/2009 - 01/2010 Assistenzarztausbildung Chirurgie im St. Josef-Hospital
Bremerhaven
03/2010 – 09/2010 Honorararztstätigkeit in der Orthopädie im Gesundheitspark
Bad Gottleuba
seit 10/2010 Aufenthalt in Oslo, Norwegen

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Axel Kramer für die freundliche Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung.

Herzlichst möchte ich mich bei Frau Brigitte Sümnick, Chefsekretärin des Instituts für Hygiene und Umweltmedizin Greifswald, bedanken, die mir stets zuverlässig bei der Organisation der Studie mit Rat und Tat zur Seite stand.

Bei Frau Gudrun Lindstedt und Frau Kerstin Sümnick, medizinisch-technische Assistentinnen des Instituts für Hygiene und Umweltmedizin Greifswald, bedanke ich mich für die tatkräftige Unterstützung bei der Vorbereitung und Durchführung der Studie im mikrobiologischen Labor des Instituts für Hygiene und Umweltmedizin.

Meinen Eltern sowie Kim danke ich für ihre unermüdliche und treue Unterstützung während meines Studiums.