

Originalarbeit

Antibakterielle Wirkung von Fliegenmaden (*L. sericata*) in vitro

In-vitro bactericidal activity of maggots of the green blowfly (*Lucilia sericata*)

Georg Daeschlein¹, Britta Hoffmeister¹, Harald Below¹, Axel Kramer^{1*}

¹Institut für Hygiene und Umweltmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität,
Greifswald, Deutschland

GMS Krankenhaushyg Interdiszip 2006;1(1):Doc17 vorläufiges PDF

Abstract

Maggots of *Lucilia sericata* are used as an alternative to surgical intervention and long-term antiseptic therapy for the treatment of chronic wounds. To quantify the bactericidal effect of secretions from larvae, an in-vitro test model based on the modified European quantitative suspension test (EN 1040) was developed, in which a co-culture of maggots and bacteria (*Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*) in tryptic soy broth was tested. The numbers of bacterial colonies with and without maggot exposure were compared after 24, 48, and 72 h of exposure. The mean log₁₀ reduction factor (RF) for bacterial elimination per maggot was > 4 at all examined times for all tested bacteria. Thus, maggot secretion fulfilled the required definitions of an antiseptic. In addition, maggot's ability of ingesting bacteria was also evaluated. Maggots contained viable bacteria after 48 h of contact with the respective organisms. These maggots also continued excreting bacteria.

Zusammenfassung

Maden werden vor allem zur Behandlung chronischer Wunden eingesetzt, weil dadurch vielfach chirurgische Interventionen und z. T. lang dauernde antiseptische Therapien überflüssig werden.

Zur Quantifizierung der antibakteriellen Wirkung von Maden wurde in Anlehnung an den quantitativen Suspensionstest gemäß EN 1040 ein Testmodell entwickelt, bei dem eine Kokultur von Maden und Bakterien (*M.luteus*, *MSSA*, *MRSA*, *E.coli*) in CSL-Bouillon eingesetzt wurde. In Abimpfungen aus der Bouillon wurde nach 24, 48 bzw. 72 h Exposition die Koloniezahl im Vergleich ohne bzw. mit Madenexposition ermittelt. Der mittlere lg Reduktionsfaktor (RF) für die Bakterienelimination pro Made war zu allen untersuchten Zeitpunkten für alle Testbakterien >3,0. Damit werden die Wirkungsanforderungen an ein Antiseptikum bei Eiweißbelastung erfüllt. Ergänzend wurde die Eliminationsleistung innerhalb 24 h für überwiegend aus der unbelebten Umgebung stammende Wundinfektionserreger (*E. faecium*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*) geprüft und ebenfalls ein RF >3,0 ermittelt.

Schlüsselwörter: *L. sericata* Maden, Bakterienelimination in vitro, Eliminationsleistung >3 lg

*Korrespondenzadresse: Prof. Dr. med. Axel Kramer, Institut für Hygiene und Umweltmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Walther-Rathenau-Str. 49 a, 17489 Greifswald, eMail: kramer@uni-greifswald.de

Einleitung

Erste systematische klinische Anwendungen von Fliegenmaden wurden von Baer bei chronischer Osteomyelitis 1931 publiziert [1]. In den Folgejahren begann der Einzug der Madentherapie in die Wundchirurgie vor allem in England und den USA [18], [10]. Durch die Erfolge der Antibiotikatherapie, der Wundantiseptik und der modernen Intensivtherapie verlor die Madentherapie zunächst an Bedeutung und rückte erst wieder vornehmlich im letzten Dezennium in den Blickpunkt des Interesses. Ein wesentlicher Aspekt dafür war die Möglichkeit des Verzichts auf chirurgisches Debridement speziell bei älteren Patienten mit chronischen Wunden und/oder Op-Risikofaktoren [3] sowie die Behandlung bei mangelndem Erfolg anderweitiger Therapieformen [20]. Hauptsächliche Indikationen für die Madentherapie sind chronische venöse und diabetische Ulcera und Dekubitalulcera, seltener dehiszente chirurgische Wunden, Verbrennungswunden sowie die MRSA-Sanierung [24], [19], [13], [11], [23], [25], [5].

Zur Wundbehandlung werden Maden von *L. sericata* eingesetzt. Die Wirkung auf die Wundheilung beruht auf folgenden Mechanismen: Abgabe Antibiotika-ähnlicher Wirkstoffe [9], [21], [14], [7], [6], [22], Ingestion und Digestion von Bakterien und nekrotischem Material [17], [12] sowie der Stimulation der Fibroblastenproliferation u. a. über Freisetzung des Hormons 20-Hydroxyecdysone [16].

Während zur Anwendung der Madentherapie ein umfangreiches Schrifttum vorliegt, wurde das quantitative Ausmaß der Erregerelimination durch Maden bisher nicht mit etablierten Prüfverfahren zur Prüfung von Antiseptika untersucht. In Anlehnung an den quantitativen Suspensionstest gemäß EN 1040 sollte dazu ein Testmodell in flüssiger Kokultur von Maden mit Bakterien entwickelt werden.

Material und Methoden

Fliegenmaden

Als deklariertes Arzneimittel (PZN 0305219, Biomonde GmbH Barsbüttel, Germany) wurden industriell hergestellte sterile Maden der Species *Lucilia (L.) sericata* im 2. Larvenstadium (ca. 3 mm Länge) eingesetzt.

Testung in flüssigem Kulturmedien

Lebende Maden wurden in Über-Nacht- Bakterienkultur in CSL in schräg gestellte Petrischalen eingebracht (Abbildung 1) und für 24, 48 und 72 h (bzw. bei einer Species für 96 und 120 h) bei 34°C exponiert (Abbildung 2). Durch die Schrägstellung mit 30° Neigungswinkel wird ein längeres Überleben der Maden im Flüssigmedium im Vergleich zur waagerechten Position ermöglicht.



Abbildung 1: Inkubation schräggestellter Petrischalen mit Kokulturen von Maden und Bakterien im 34°C Brutschrank



Abbildung 2: Maden in Kokultur mit MSSA

Zur Ermittlung der Anzahl überlebender Testbakterien wurden 100 µL aus jedem Testansatz auf Trypticase Soya Agar (Oxoid, Wedel, Germany) ausplattiert. Die Platten wurden bei 37°C 24 h bebrütet und anschließend die koloniebildenden Einheiten (KbE) ausgezählt. Die Reduktion der KbE (sog. Reduktionsfaktor) durch die Maden wurde aus der Differenz \lg KbE Kontrollansatz - \lg KbE Testansatz für jede Expositionszeit pro Made berechnet.

Als Bakterien-species wurden *Micrococcus luteus* (ATCC 9341) als häufiger Besiedler vor allem chronischer Wunden und *Staphylococcus aureus* als Methicillin-sensitiver Stamm (MSSA, ATCC 6538) und als methicillinresistenter Stamm (MRSA, Patientenisolat von chronischer Wundinfektion) sowie *E. coli* (ATCC 11229) als weiterer typische Erreger von Wundinfektionen eingesetzt.

In einer weiterführenden Untersuchung wurde die Eliminationsleistung gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) und *Enterococcus faecium* (ATCC 6057) als vorwiegend aus der unbelebten Umgebung stammende Erreger und gegenüber *Bacillus subtilis* (ATCC 9372) als ubiquitärem Kontaminanten bei 24 h Exposition geprüft.

Ergebnisse

Eliminationsleistung in Flüssigmedium

Bei *M. luteus* und den drei Repräsentanten für häufige Wundinfektionen konnte innerhalb 24 h Exposition mit den Maden in der Bakteriensuspension pro Made eine Reduktionsleistung >3 \lg ermittelt werden (Tabelle 1). Die höchste Reduktionsleistung war gegenüber *E. coli* mit 8,7 \lg nachweisbar. Abhängig von der Anzahl der durchgeführten Assays differierte die Streuung der Ergebnisse für die Reduktionsleistung z. T. erheblich (von 0,9 - 5,9 \lg). Bei MRSA und *E. coli* ergab sich die maximale Eliminationsleistung bereits innerhalb von 24 h (Tabelle 1). Bei MRSA und *M. luteus* übertraf die Reduktionsleistung sowohl nach 48 als auch nach 72 h die Reduktionsleistung nach 24 h.

Tabelle 1: Reduktionsfaktoren RF berechnet pro Einzelmade im Zeitverlauf von 24-72 h (Mittelwert des RF und Standardabweichung s) gegenüber M. luteus, MSSA, MRSA und E. coli

Testbak- -terien	24 h			48 h			72 h		
	RF(s)	Maden (n)	Assay (n)	RF(s)	Maden (n)	Assay (n)	RF(s)	Maden (n)	Assay (n)
M. luteus	6,7 (0,9)	105	8	7,3 (1,2)	55	4	8,3 (0,2)	30	2
MSSA	7,5 (2,2)	167	15	4,76 (3,9)	115	6	4,6 (5,4)	90	4
MRSA	4,1 (5,9)	10	2	8,6	5	1	8,8	5	1
E. coli	8,7 (1,36)	130	9	3,4 (4,8)	30	2	8,1	20	1

In orientierenden weiterführenden Versuchen ergaben sich bei 24 h Inkubation folgende Eliminationsleistungen: *E. faecium* $3,1 \pm 3,9$, *P. aeruginosa* $5,8 \pm 3,9$ und *B. subtilis* $4,9 \pm 4,2$ lg.

Diskussion

Gegenüber den geprüften grampositiven und gramnegativen Bakterienpecies war im nach EN 1040 modifizierten quantitativen Suspensionstest in der Flüssigkultur ausnahmslos eine Reduktionsleistung >3 lg pro Made nachweisbar. Diese Eliminationsrate wurde auch auf festem Kulturmedium erreicht. Für Antiseptika wird gegenüber Bakterien eine Reduktionsleistung von >5 lg ohne Belastung und ≥ 3 lg mit Belastung durch Eiweiß und Blut gefordert [15]. Da die Prüfung den Testbedingungen mit Belastung entspricht, besitzen Maden eine vergleichbare Eliminationsleistung wie Antiseptika mit dem Unterschied, dass zusätzlich nekrotisches Gewebe aufgenommen und verdaut wird. Dadurch wird den Infektionserregern zusätzlich Nährboden entzogen. Die Eliminationsleistung der Maden hielt über 72 h unvermindert an. Bei Exposition der Maden mit MSSA war auch bei Prüfung nach 96 und 120 h, was einer häufigen Anwendungsdauer auf chronischen Wunden entspricht, eine unverminderte Eliminationsleistung nachweisbar. Durch einen Therapieansatz („Biobag“ oder „Freiläufer“) werden 100 bzw. 200 Maden pro Wunde aufgebracht. Die dadurch erreichte Bakterienelimination ergäbe bei Hochrechnung auf die Wundverhältnisse innerhalb von 3 d mindestens den Wert von 10^6 . Da die Bakteriendichte auf infizierten chronischen Wunden etwa 10^5 bis 10^6 /g [2] beträgt, findet die klinische Wirksamkeit der Madentherapie ihre Erklärung in der hohen Eliminationsleistung der Maden. Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass selbst bei stark nässenden Wunden keine unseren Testbedingungen in der Flüssigkultur vergleichbare Verdünnung abgegebener antibiotischer Madensekrete vorliegt, d. h. in der Wunde dürfte die Reduktionsleistung durch die Addition von Ingestion und antibakterieller Sekretwirkung noch höher als in vitro sein.

Die Eliminationsleistung richtete sich ohne Unterschied gegen alle geprüften Bakterienpecies. Das deckt sich mit in vitro Befunden zur antibiotischen Wirkung von Madenextrakten gegen *E. coli*, *M. luteus*, *P. aeruginosa*, *Salmonella spp.*, MSSA, MRSA, *S. epidermidis* und *Listeria spp.* [22]. Pavillard und Wright [14] berichten über eine sezernierte Substanz mit antibiotischer Wirksamkeit gegenüber *Pneumokokken*, *Streptokokken* der Gruppen A und B sowie *S. aureus*, aber fehlender Wirkung gegenüber *C. albicans*, *B. subtilis*, *E. coli*, *S. typhimurium* und *P. vulgaris*. Durch Abspülen gewonnene Madensekrete hatten eine hohe Hemmwirkung gegen *S. aureus*, Streptokokken der Serogruppen A und B, waren aber nur schwach wirksam gegen MRSA und *P. aeruginosa* und unwirksam gegen *E. coli*, *P. mirabilis* und *Enterococcus spp.* [22]. Da die Maden in der von uns gewählten Versuchsanordnung auch gegen *E. coli* und *P. aeruginosa* wirksam waren, kann die Madenwirkung nicht allein auf den von Pavillard und Wright sowie von Thomas et al. isolierten Substanzen beruhen.

Unsere Versuche konnten zeigen, dass die alimentäre Aufnahme auch unabhängig von sezernierten Wirkstoffen ausreichend effektiv zu sein scheint, den Maden demnach mindestens 2 Wirkungsmechanismen der antibakteriellen Wirkung zur Verfügung stehen. Im Wundmilieu dürfte selbst bei stark nässenden Wunden keine unseren Testbedingungen vergleichbare Verdünnung der Madensekrete vorliegen, was die Bedeutung der alimentären Aufnahme bei der Bakterienreduktion unterstreicht.

Selbstverständlich sind unsere in-vitro Testansätze nicht repräsentativ für ein natürliches Wundmilieu; sie sind jedoch zur quantitativen Erfassung der Eliminationsleistung geeignet.

Wir nehmen an, dass zusätzlich zu den bisher nachgewiesenen antibakteriellen Wirkungsmechanismen auch eine peroxidasevermittelte Bakteriozidie mit Bildung von OSCN⁻ im Verdauungstrakt und in den Sekreten der Maden zustande kommt, weil wir Thiocyanat (SCN⁻) als Vorläufer von OSCN⁻ und eine exogene Peroxidaseaktivität im Madenhomogenat in vitro nachweisen konnten. Darüber hinaus kommt es bei Kultivierung von Maden auf verschiedenen Nährböden zu einem 2 bis 10fachen Anstieg des SCN⁻ Gehalts im Nährmedium innerhalb von 24 bzw. 48 h. Anschließend sinken die SCN⁻ Gehalte wieder und fallen teilweise unter das Ausgangsniveau (in Vorb.). Der Nachweis von SCN⁻ in den Maden und die Veränderung der SCN⁻ Werte in Nährmedien bei Madenkultur bestätigen nicht nur das ubiquitäre Vorkommen von SCN⁻, sondern seine spezielle Bedeutung als unspezifischer Resistenzmechanismus für Wirbellose. So enthalten Lumbriciden in allen Kompartimenten SCN⁻ in einem Konzentrationsbereich von 0,13-1,3 mg/kg bzw. L. Abhängig vom alimentären Angebot sind vergleichbare Werte in den Ausscheidungen nachweisbar. Damit kommt es durch die Lebensaktivität des Regenwurms zu einem ständigen SCN⁻ Eintrag in den Boden, was von Bedeutung für die Bodenfruchtbarkeit ist [8]. Da in jedem Wundsekret eosinophile Peroxidase und Myeloperoxidase präsent ist [4], wird unabhängig von der Peroxidaseaktivität der Maden selbst durch deren SCN⁻ Exkretion die zusätzliche Bildung mikrobiozid hoch wirksamer Oxidationsprodukte von SCN⁻ (bis O₃SCN⁻) induziert.

Angesichts der in unserer Studie nachgewiesenen hohen Reduktionsleistung >3 lg gegenüber wichtigen Wundinfektionserregern wird die historische Beschreibung der Madentherapie als "living antiseptis" [1] nachvollziehbar und der antiseptische Einsatz von Maden in der Behandlung chronischer häufig schwierig zu therapierenden infizierter bzw. besiedelter Wunden ist eine geeignete Therapieoption, deren gezielter Einsatz noch weiter zu prüfen ist.

Literatur

1. Baer WS. The treatment of chronic osteomyelitis with the maggot (larva of the blow fly). *J Bone Jt Surg.* 1931;13:438-75.
2. Bill TJ, Ratliff CR, Donovan AM, Knox LK, Morgan RF, Rodeheaver GT. Quantitative swab culture versus tissue biopsy: A comparison in chronic wounds. *Ost Wound Manag.* 2001;47(1):34-7.
3. Courtenay M. The use of larval therapy in wound management in the UK. *J Wound Care.* 1999; 8 (4):177-9.
4. Decker H. Die Bedeutung von Thiocyanat bei der Peroxidase-Aktivität. In: Weuffen W, Decker H, Hrsg. Thiocyanat - ein bioaktives Ion. Bad Saarow: Törpin; 2004. p. 203-11.
5. Dissemmond J, Koppermann M, Esser S, Schultewolter T, Goos M, Wagner SN. Therapie eines Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) im Rahmen der Behandlung eines chronischen Ulkus mittels Biochirurgie. *Hautarzt.* 2002;53:608-12.
6. Friedman E, Shaharabany M, Ravin S, Golomb E, Gollop I, Ioffe-Uspensky I, Miller J, Galun R, Mumcuoglu KY. Partially purified antibacterial agent from maggots displays a wide range of antimicrobial activity. *Third Int Conf Biother;* 1998 May 24-27; Jerusalem, Israel.
7. Jones M, Thomas S. Wound cleansing - a therapy revisited. *J Tissue viability.* 1997;7:119-21.
8. Kramer A, Weuffen W, Behrend I, Thürkow B. Untersuchungen zum Vorkommen des endogenen Wirkstoffs Thiocyanat bei Lumbriciden (Annelida). *Arch Acker-pfl Boden.* 1995;39:1-8.
9. Livingston SK, Prince LH. The treatment of chronic osteomyelitis with special reference to the use of the maggot active principle. *JAMA.* 1932;98(14):1143-9.
10. McKeever DC. Maggots in treatment of osteomyelitis. *J Bone Jt Surg.* 1933;15:85-93.
11. Mumcuoglu KY, Ingber A, Gilead L et al. Maggots therapy for the treatment of intractable wounds. *Int J Dermatol.* 1999;38:623-7.
12. Mumcuoglu KY, Miller J, Mumcuoglu M, Friger M, Tarshis M. Destruction of bacteria in the digestive tract of the maggot of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol.* 2001;38(2):162-6.
13. Namias N, Varela JE, Varas RP, Quintana O, Ward CG. Biodebridement: A case report of Maggot therapy for limb salvage after fourth-degree burns. *J Burn Care Rehabil.* 2000;21(3): 254-7.
14. Pavillard ER, Wright EA. An antibiotic from maggots. *Nature.* 1957;180:916-7.
15. Pitten FA, Werner HP, Kramer A. A standardized test to assess the impact of different organic challenges on the antimicrobial activity of antiseptics. *J Hosp Inf.* 2003;55:108-15.
16. Prete P. Growth effects of *Phaenicia sericata* larval extracts on fibroblasts: mechanism for wound healing by maggot therapy. *Life Sciences.* 1997;60:505-10.
17. Robinson W, Norwood VH. Destruction of pyogenic bacteria in the alimentary tract of surgical maggot implanted in infected wounds. *J Lab Clin Med.* 1934:581-6.
18. Robinson W, Norwood VH. The role of surgical maggots in the disinfection of osteomyelitis and other infected wounds. *J Bone Joint Surg.* 1933;15:409-16.
19. Sherman RA. Maggot debridement in modern medicine. *Infect Med.* 1998;15(9):651-6.
20. Sherman RA. Maggot versus conservative therapy for the treatment of pressure ulcers. *Wound Repair and regeneration.* 2002;10(4):208-14.
21. Simmons SW. The bactericidal properties of excretions of the maggot of *Lucilia sericata*. *Bull Entomol Res.* 1935;26:559-63.
22. Thomas S, Andrews AM, Hay NP, Bourgoise S. The antimicrobial activity of maggot secretions: results of a preliminary study. *J Tissue Viability.* 1999;9(4):127-32.

23. Thomas S, Jones M, Andrews AM. The use of larval therapy in wound management. *J Wound Care*. 1998;7:521-4.
24. Thomas S, Jones M, Shutler S, Jones S. Using larvae in modern wound management. *J Wound Care*. 1996;5:60-9.
25. Weil GC, Simon RJ, Sweadner WR. A biological, bacteriological and clinical study of larval or maggot therapy in the treatment of acute and chronic pyogenic infections. *Am J Surg*. 1933;19:36-48.