

**Vergleichende Wirkung von Argon-Kaltplasma, Polyhexanid
und NaCl auf die Keimbesiedlung von Bissverletzungen beim
Hund**

von Selina Winter

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Vergleichende Wirkung von Argon-Kaltplasma, Polyhexanid
und NaCl auf die Keimbesiedlung von Bissverletzungen beim
Hund

von Selina Winter

aus Darmstadt

München 2020

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Chirurgie der Kleintiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Frau Univ.-Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Mitbetreuung durch:

Dr. Mirja C. Nolff

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Ralf S. Müller
Univ.-Prof. Dr. Holm Zerbe
Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek
Univ.-Prof. Dr. Joachim C. Manning

Tag der Promotion: 8. Februar 2020

Für meine Familie und Alex

Teile dieser Arbeit sind bei folgender Zeitschrift zur Veröffentlichung angenommen oder bereits veröffentlicht:

Winter S, Nolf MC, Reese S, Meyer-Lindenberg A

Vergleich der Effizienz von Polyhexanid-Biguanid, Argon-Kaltplasma und Kochsalzlavage zur Dekontamination von Bisswunden beim Hund.

Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere. 2018; 46(Wiley): 73-82

Nolf MC, Winter S, Reese S, Meyer-Lindenberg A

Comparison of polyhexanide, cold atmospheric plasma and saline in the treatment of canine bite wounds.

J Small Anim Pract. 2018

Winter S, Meyer-Lindenberg A, Wolf G, Reese S, Nolf MC

In vitro evaluation of the decontamination effect of cold argon plasma on selected bacteria frequently encountered in small animal bite injuries.

J Microbiol Methods. 2019; 169: 105728

Vorträge:

DVG-Vet-Congress

28. Oktober

2016

Berlin

Tagung der DVG-Fachgruppe Chirurgie

Referent: Selina Winter

Titel: Antibakterieller Effekt von Argon-Kaltplasma auf ausgewählte Bakterien von Kleintieren

Abstract in: Proceedings der 8. Jahrestagung der DVG-Fachgruppe Chirurgie auf der 62. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kleintiermedizin der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DGK-DVG) vom 27.10.2016–30.10.2016 im Estrel Convention Center Berlin, 140-41, Hrsg.: Verlag DVG Service GmbH Gießen, ISBN: 978-3-86345-344-2

Vortragssprache: Deutsch

EWMA

12. Mai 2016

Bremen

Veterinary Wound Healing Association Symposium

Referent: Selina Winter

Titel: Antibacterial efficiency of cold Argon Plasma against selected bacteria derived from small animals

Abstract in: Proceedings of the International Conference of the Veterinary Wound Healing Association, Fighting Infection – Open Wound Bioburden and Targeted Treatment Strategies, 12.05.2016, Bremen, Deutschland

Vortragssprache: Englisch

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	5
1.	Bissverletzungen	5
1.1.	Ursachen und Vorkommen.....	5
1.2.	Kontamination.....	6
1.3.	Therapie von Bissverletzungen bei Hunden.....	8
1.3.1.	Konservative Therapie	8
1.3.2.	Chirurgische Versorgung	9
1.3.3.	Antibiotika.....	11
2.	Antiseptika	12
2.1.	Povidon-Iod (PVP-Iod)	13
2.2.	Wasserstoffperoxid - H ₂ O ₂	14
2.3.	Octenidin	15
2.4.	Chlorhexidin.....	16
2.5.	Polyhexanid.....	16
3.	Physikalische Therapie	17
3.1.	Kaltplasma.....	18
III.	PUBLIKATION I.....	21
IV.	PUBLIKATION II	43
V.	PUBLIKATION III.....	53
VI.	ÜBERGREIFENDE DISKUSSION	63
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	71
VIII.	SUMMARY.....	75
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	79
X.	DANKSAGUNG	95

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ASA	American Society of Anesthesiologists
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
DNA	deoxyribonucleic acid
Ggf.	gegebenenfalls
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HaCaT	Human adult low Calcium high Temperatur Keratinocytes
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
MDR	Multidrug-resistant
ml	Milliliter
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
NaCl	Natriumchlorid
OCT	Octenidindihydrochlorid
psi	Pound per square inch

PVP-Iod	Povidon-Iod
RNS	reactive nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
SSI	surgical site infections
UV	Ultraviolettstrahlung
z.B.	zum Beispiel

I. EINLEITUNG

Bissverletzungen sind traumatisch bedingte Wunden, welche häufig in den Sommermonaten im klinischen Alltag vorgestellt werden und durch ein erhöhtes Aktivitätsaufkommen sowie ein erhöhtes Aggressionspotenzial der Hunde zustande kommen (Harris et al. 1974). Zumeist werden die Bissverletzungen durch größere Hunde verursacht, wobei männlich intakte Rüden überpräsentiert sind (Shahar et al. 1997). Das Ausmaß der Verletzung kann ganz unterschiedlich ausfallen und unter Umständen Körperhöhlen perforieren (Goldstein 1989, Shahar et al. 1997, Cabon et al. 2015). Es sind akute Wunden, welche immer als kontaminiert anzusehen sind (Holt und Griffin 2000). Dabei werden vor allem über den Speichel der Tiere Bakterien in die entstehende Wunde eingetragen, wobei es sich meist um mehrere Bakterienspezies handelt (Saphir und Carter 1976, Bailie et al. 1978, Ordog 1986). Dies prädisponiert Bissverletzungen für Infektionen, sodass jede Bissverletzung spätestens nach 24 Stunden als infiziert anzusehen ist (Callaham 1978, Meyers et al. 2008). Vor allem durch häufigen Antibiotikaeinsatz von Breitspektrumantibiotika kann die Entstehung und Verbreitung von multiresistenten Erregern potenziert werden (Harbarth 2007, Nolff et al. 2016). Ob eine Antibiotikatherapie bei Bissverletzungen notwendig ist, wird kontrovers diskutiert und in der Literatur hierzu unterschiedliche Empfehlungen abgegeben (Callaham 1988). Eine chirurgische Versorgung der Bissverletzungen mittels Säuberung, einem Débridement und einer Wundspülung ist von großer Bedeutung (Callaham 1980, Ordog 1986). Durch Wundantiseptika sollen Wunden dekontaminiert werden, um so eine Infektion zu verhindern (Kramer 2004). Dabei sollten die Antiseptika neben einer guten Biokompatibilität und einem mikrobizidem Effekt auch eine geringe Zytotoxizität aufweisen (Willy et al. 2017). In der Tiermedizin sind Antiseptika wenig erforscht. Bisherige Ergebnisse und Empfehlungen stützen sich hierbei vor allem auf Untersuchungen von Chlorhexidin und Povidon-Iod (Sanchez et al. 1988, Lozier et al. 1992). In der Humanmedizin werden Chlorhexidin und Octenidin zur Wundlavage hingegen nicht mehr empfohlen (Hulsemann und Habenicht 2009, Schupp und Holland-Cunz 2009, Franz und Vogelin 2012, Willy et al. 2017). Demnach vielversprechend für die Wundspülung ist Polyhexanid, welches ein breites

antibakterielles Wirkspektrum aufweist und sowohl gegen grampositive, wie auch gramnegative Bakterien wirksam ist (Kaehn 2010). Die antiseptische Wirkung von Polyhexanid wird nicht von Blut oder Proteinen beeinträchtigt, es weist eine hohe Gewebeverträglichkeit auf und soll zudem die Wundheilung fördern (Kramer et al. 2004, Muller und Kramer 2008, Eberlein und Assadian 2010, Kaehn 2010). Im Vergleich zu anderen Antiseptika wie Octenisept (Wirkstoff: Octenidindihydrochlorid), Braunol (Wirkstoff: Povidon-Iod) und Betaisodona (Wirkstoff: Povidon-Iod) zeigt es eine deutlich geringere Toxizität gegenüber humanen Fibroblasten und Keratinozyten und stoppt effizient die bakterielle Proliferation schon bei einer geringen Konzentration (Hirsch et al. 2010). Eine Alternative zu Wundantiseptika bietet Kaltplasma, welches ein hohes antiseptisches Potenzial aufweist (Laroussi 2009, Von Woedtke et al. 2013). Kaltplasma ist ein hoch energetischer physikalischer Zustand, welcher durch die Bildung von Radikalen, Elektronen und Ionen sowie Lichtemission bestimmt wird (Laroussi 2002, Matthes et al. 2014). Es hat einen mikrobiziden Effekt und kann die bakterielle Zellmembran, intrazelluläre Proteine sowie die DNA bei Bakterien schädigen (Vatansever et al. 2013, Mai-Prochnow et al. 2014). Bislang wird von zwei unterschiedlichen Mechanismen ausgegangen, die zur Zerstörung von Bakterien durch eine Kaltplasmabehandlung führen. Hierunter fällt die Schädigung durch elektrostatische Kraft und zum anderen eine Schädigung durch oxidativen Stress in der Zelle. Bei der Zerstörung durch elektrostatische Kräfte sind grampositive und gramnegative Bakterien unterschiedlich empfänglich (Mendis et al. 2000, Laroussi 2002, Mai-Prochnow et al. 2014). Oxidativer Stress in der Bakterienzelle führt zur Zerstörung der Bakterien, wenn der Reparationsmechanismus nicht mehr der Schädigung der DNA, dem Verlust von Zytoplasma und der Lipidoxygenierung standhalten kann (Farr und Kogoma 1991, Gadri et al. 2000, Imlay 2003, Joshi et al. 2011). Der Effekt von Kaltplasma ist dosisabhängig, wobei geringe Dosen antibakteriell wirken und höhere Dosen zelltoxisch für die Wirtszelle sein können (Von Woedtke et al. 2013). Dadurch, dass der Effekt von Kaltplasma durch unterschiedliche Faktoren bestimmt wird, ist kein einheitliches Dosierungsprotokoll für dessen Anwendung verfügbar (Laroussi 2009, Von Woedtke et al. 2013). Bislang wurde der Effekt von Kaltplasma auf die Proliferationsphasen von Bakterien untersucht sowie auf die initial vorhandene Bakterienkonzentration (Yu et al. 2006, Fernandez et al. 2012).

Ziele dieser Doktorarbeit waren: 1. Die in Bissverletzungen bei Hunden auftretenden Bakterienspezies zu erfassen sowie deren Anteil an multiresistenten Keimen (MDR = multidrug-resistant). 2. Die Effektivität und Dekontamination von Polyhexanid und Argon-Kaltplasma in der Tiermedizin in vivo anhand von Bissverletzungen zu untersuchen und mit einer Kochsalzlavage zu vergleichen. 3. Den Effekt von Argon-Kaltplasma auf Bakterien zu untersuchen, welche in Bissverletzungen in der Tiermedizin häufig vorkommen, wobei der Einfluss der Behandlungszeit in Bezug auf die Bakterienspezies, die Proliferationsphasen der Bakterien sowie der initialen Bakterienkonzentration evaluiert werden sollten.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Bissverletzungen

1.1. Ursachen und Vorkommen

Hunde mit Bissverletzungen werden vor allem in den Sommermonaten häufig vorgestellt (Harris et al. 1974). Die Periode, welche vermutlich mit einer höheren Aktivität und somit häufigeren Spaziergängen der Tiere und ihrer Besitzer einhergeht, beginnt etwa Anfang März, erreicht ihren Höhepunkt im Juni bis August und geht vor September nicht zurück. Zu Bissverletzungen kommt es vor allem in den Nachmittagsstunden, wobei ein Peak zwischen 15 und 19 Uhr zu sehen ist (Spätnachmittag bis früher Abend). Von Bissverletzungen betroffen sind zumeist kleinere Hunde, welche oftmals multiple und schwere Bissverletzungen erlangen (Shahar et al. 1997, Shamir et al. 2002). Verursacht werden die Verletzungen überwiegend von großen bis mittelgroßen Hunderassen bei warmem Wetter, welches Einfluss auf ihr Verhalten (Aggressivität) ausübt (Harris et al. 1974, Shahar et al. 1997). Vor allem sind intakte Rüden überpräsentiert und zu einer geringeren Anzahl weibliche Tiere (Shahar et al. 1997, Shamir et al. 2002).

Das Ausmaß einer Bissverletzung und der tatsächlich daraus resultierenden Wunde kann sehr unterschiedlich sein. Generell handelt es sich bei Bissen um Quetsch-, Riss-, Ausriss-, Abriss- und punktuelle Wunden, welche in Verbindung mit Schwellung, Rötung, Blutung, Hämatomen, Ischämie, Nekrosen und devitalisierten Gewebe auftreten können sowie daraus resultierender Sepsis mit Fieber und einer Verbrauchskoagulopathie (Cardany et al. 1976, Goldstein 1989, Holt und Griffin 2000, Yokose und Dan 2007, Kramer et al. 2010). Problematisch dabei ist, dass das Ausmaß der Verletzung unter dem ersichtlichen Defekt weitaus größer sein kann. Hunde können mit ihrem Kiefer eine hohe Beißkraft ausüben, die bis zu 450 psi betragen kann (Goldstein 1989). Dabei entstehen typische Verletzungsmuster, wobei immer mit einem Einbiss und einem Gegenbiss gerechnet werden muss, entsprechend der Anatomie des Fanges. Oftmals sind die Wunden unterminiert oder können im Bereich des Thorax oder des Abdomens die jeweilige Körperhöhle perforieren (Shahar et al. 1997, Cabon et al. 2015). Da bei

einem Einbiss hohe Kräfte, sowohl auf den Körper des Opfers als auch auf den Fang des Angreifers einwirken, muss immer mit einer hohen Schädigung des Körpers des Opfers, als auch der Zähne des Angreifers gerechnet werden. Daher sollte die Bissverletzungswunde nicht nur augenscheinlich untersucht werden, sondern weitere diagnostische Maßnahmen wie beispielsweise eine Röntgenuntersuchung erfolgen, um Perforationen der Körperhöhlen als auch inokulierte Fremdkörper wie Zähne oder anderes Fremdmaterial ausschließen zu können (Kramer et al. 2010, Fossum 2011). Auf Grund des Traumas wird nicht nur die Haut und Unterhaut geschädigt, sondern auch die darunter liegende Muskulatur, Nerven, Sehnen, Gefäße sowie möglicherweise der Knochen (Kramer et al. 2010, Fossum 2011).

1.2. Kontamination

Bissverletzungen sind grundsätzlich kontaminierte Wunden. Neben makroskopisch sichtbaren Verunreinigungen wie Haare, Sand, Zähne oder Pflanzenteilen können sie auch mit makroskopisch nicht sichtbaren Kontaminanten versehen sein. Hierbei kann es sich um Bakterien, Viren und Pilze handeln. Anhand der Ursache für eine solche Verletzung ist jedoch stark von einer bakteriellen Kontamination auszugehen (Holt und Griffin 2000). Die im Speichel der Hunde natürlich vorkommenden Bakterien, welche als Kommensalen, wie auch als potentiell pathogene Krankheitserreger auftreten können, werden über eine Bissverletzung in die Wunde übertragen (Saphir und Carter 1976, Bailie et al. 1978). Nicht nur durch den Speichel, sondern auch von der Haut des Opfers können Bakterien durch den Einbiss in die Wunde übertragen werden und dort im Verlauf zu einer Infektion führen (Kramer et al. 2010). Auf Grund der möglichen Keimbelastung dieser Wunden mit potentiell pathogenen Krankheitserregern, sind Bissverletzungen stets als kontaminiert zu betrachten. Alle diese Faktoren prädisponieren Bissverletzungen für Infektionen und daraus resultierenden Wundheilungsstörungen. Spätestens nach 24 Stunden sind die meisten Wunden als infiziert anzusehen (Callaham 1978, Meyers et al. 2008, Kramer et al. 2010). Als Risikofaktoren für eine Wundinfektion stellten sich neben dem Alter des Patienten und dem Zeitraum zwischen erfolgter Bissverletzung und deren Versorgung auch die Art der Wunde und deren Tiefe heraus, wobei punktuelle Wunden neben sehr weitreichenden Wunden ein höheres Risiko für Infektionen zeigen (Callaham 1978, Dire 1991, Mouro et al. 2010). Von größter Wichtigkeit

bei der Behandlung von Bissverletzungen sind daher das Säubern, das chirurgische Débridement und die Wundspülung dieser Verletzungen (Callahan 1980, Ordog 1986). Die Häufigkeit, dass eine zuvor nicht infizierte Wunde sich infiziert, wird allerdings mit 2,7% als gering beschrieben (Ordog 1986). Es ist generell falsch anzunehmen, dass eine Kontamination oder gar Infektion einer Bissverletzung lediglich auf eine Bakterienspezies zurückzuführen ist. Meist handelt es sich um mehrere verschiedene Bakterien, welche unter Umständen potenziell pathogen sind (Ordog 1986). Nicht nur aerobe sondern auch anaerobe Bakterien spielen bei Bissverletzungen eine große Rolle (Griffin und Holt 2001). Saphir und Carter (1976) untersuchten die Maulschleimhautflora von Hunden und konnten anhand dessen sowohl grampositive als auch gramnegative Bakterien unter anderen der folgenden Bakterienspezies isolieren: alpha-, beta- und gamma-hämolytische *Streptococci* und *Micrococcaceae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Mycoplasma*, *Pasteurella* spp. mit *Pasteurella multocida* und *Pasteurella*-ähnlichen Stäbchen, *Actinomyces viscosus* und *Actinomyces* spp., *Acinetobacter calcoaceticus* var. *lwoffii* und var. *anitratius*, *Neisseria* spp., *Moraxella* spp. mit *Moraxella phenylpyruvica* und *Moraxella nonliquefaciens*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium* spp., *Enterobacter aerogenes* und *Bacillus* species. Durch Untersuchungen der aeroben Bakterienflora von oralen und nasalen Flüssigkeiten von Hunden zeigte sich vor allem eine große Häufigkeit für das Auftreten von *Pasteurella multocida* und *Staphylococcus aureus*, neben *Streptococcus epidermidis*, *Corynebacterium* spp., *Enterobacteria*, *Neisseria* spp., *Moraxella* spp. und *Bacillus* spp. (Bailie et al. 1978). In einer Studie aus der Humanmedizin (Talan et al. 1999) zeigte sich ebenso häufig das Vorkommen von *Pasteurella* spp. in infizierten Bissverletzungen von Hunden und Katzen beim Menschen, wobei hier *Pasteurella canis* am häufigsten durch einen Biss von einem Hund und *Pasteurella multocida* über einen Katzenbiss übertragen wurden. Neben bereits bekannten Isolaten wurde *Klebsiella* und anaerobe Bakterienarten wie *Fusobacterium* und *Bacteroides* vorgefunden. Anaerobe Bakterien waren häufiger in Abszessen vorzufinden im Gegensatz zu *Staphylococcus* spp. und *Streptococcus* species, welche aus nicht purulenten Wunden isoliert werden konnten. Goldstein et al. (1980) konnten anhand ihrer Studie zeigen, dass vor allem eine mikrobiologische Untersuchungen mittels Tupferabstrich aus der Wunde Aufschluss über die Kontamination mit Bakterien geben kann. Am häufigsten wurde *Pasteurella multocida* gefolgt von

Streptococcus, *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas* vorgefunden. Es wurde festgestellt, dass nicht jede Bissverletzung automatisch infiziert sein muss, obwohl jedoch Bakterien in ihr nachgewiesen werden können. Ob eine Tupferprobenentnahme während bzw. kurz nach dem chirurgischen Débridement wirklich sinnvoll ist, wird konträr diskutiert. Griffin und Holt (2001) fanden heraus, dass Bakterien, welche letztlich zu einer Wundinfektion führen nicht die gleichen sind, wie jene, die nach dem Débridement vorzufinden waren. Aus diesem Grund sind Reinkulturen von infizierten Wunden äußerst wichtig (Ordog 1986, Griffin und Holt 2001).

1.3. Therapie von Bissverletzungen bei Hunden

1.3.1. Konservative Therapie

Das konservative Wundmanagement einer Bissverletzung umfasst das Scheren der Wundumgebung und das Spülen der Wunde (Fossum 2011). Ob ein konservativer Therapieversuch durchgeführt werden kann, ist oftmals eine Frage des Ausmaßes und des Alters der Wunde, ggf. bereits bestehenden Infektionsanzeichen und ebenso eine kosmetische Frage (Fossum 2011, Xiaowei et al. 2013). In der Regel werden die Wunden nach der Spülung offen belassen und lediglich mit einer Wundauflage abgedeckt, um sie vor der Umwelt zu schützen. Sie verheilen per secundam intentionem (Fossum 2011, Xiaowei et al. 2013). Handelt es sich um Lazerationen, so ist kein signifikanter Unterschied in der Infektionsrate zwischen primär verschlossenen Bissverletzungswunden und offen gelassenen Wunden zu sehen. Trotz dessen kann die Infektionsrate bei primär verschlossenen Wunden minimal höher liegen (Xiaowei et al. 2013). Betrachtet man dies aus kosmetischer Sicht, so liegt der Vorteil und signifikante Erfolg allerdings auf der Seite der chirurgisch versorgten Wunden (Xiaowei et al. 2013, Paschos et al. 2014). Bestehen punktuelle Wunden, so ist die Wundspülung dieser Wunden sehr schwierig. Sie neigen eher zur Entwicklung von Infektionen und sollten daher besser mittels chirurgischen Débridement versorgt werden (Callahan 1980).

1.3.2. Chirurgische Versorgung

Grundsätzlich werden Patienten nach Vorstellung mit einer Bissverletzung entsprechend ihrem Allgemeinzustand stabilisiert und bis zu ihrer Narkosefähigkeit die Wunde vor Kontamination geschützt (Holt und Griffin 2000). Als „golden period“ bezeichnet man eine Zeitspanne zwischen 6 bis 8 Stunden nach erfolgter Verletzung, in welcher eine Wunde versorgt werden sollte bevor sich Bakterien vermehren (Johnston 1990, Fossum 2011). Nachdem diese Zeit abgelaufen ist, werden Wunden nicht mehr nur als kontaminiert, sondern als infiziert angesehen. Dies resultiert daraus, dass sich nach dieser Zeitspanne Mikroorganismen vermehren können und diese dann 10^5 Mikroorganismen pro Gramm Gewebe übersteigen (Cardany et al. 1976, Fossum 2011). Üblicherweise manifestieren sich Infektionen nach 24 Stunden (Kramer et al. 2010). Je früher eine Behandlung erfolgt, desto besser ist die Prognose, wobei eine Wundversorgung innerhalb der ersten 8 Stunden zu einer Reduktion der Infektionsrate führt (Paschos et al. 2014). Der Zeitpunkt der Wundversorgung ist ausschlaggebend für die Infektionsrate; wenn die Wunden erst 10 Stunden nach erfolgtem Trauma versorgt wurden stieg damit auch die Infektionsrate an (Maimaris und Quinton 1988).

Für den chirurgischen Eingriff wird die Wundumgebung geschoren und die Wunde selbst mit sterilen Tupfern abgedeckt, damit keine Haare in die Wunde gelangen (Holt und Griffin 2000, Fossum 2011). Die Haut wird mit Povidon-Iod oder Chlorhexidylglukonat-Seife gewaschen und gereinigt. Bei der Desinfektion sollte unbedingt darauf geachtet werden, dass nur die intakte Haut mit der Waschlösung und mit Alkohol in Kontakt kommt, da diese bei Kontakt zu darunter liegenden Gewebe zum Absterben desselben führen können (Sanchez et al. 1988, Holt und Griffin 2000, Fossum 2011). Bei der Wundversorgung selbst werden zunächst grobe Verunreinigungen entfernt und die Wunde in der Regel mit steriler isotonischer Kochsalzlösung (NaCl) gespült. Hierbei wird die Keimzahl in der Wunde durch die Wundspülung mechanisch reduziert, da sie die Bakterien wegspült (Fossum 2011). Im Vergleich zeigte sich, dass Wunden sich weniger häufig infizieren, wenn diese gespült werden und das Risiko einer Infektion durch ein Débridement verringert werden kann (Callahan 1978). Stevenson et al. (1976) zeigten, dass Spülungen mit hohem Druck eine bessere Wirkung und Effektivität in Hinsicht auf eine Dekontamination von infizierten

Wunden erbrachte, als Spülungen mit niedrigem Druck. Hierbei war die verwendete Menge der Spüllösung, ob 35 oder 12ml jedoch nicht signifikant für das Ergebnis der Dekontamination. In der Regel werden eine Spritze mit 35 bis 60ml und eine 18 Gauge-Kanüle verwendet, wodurch ein Druck von etwa 7 bis 8 psi erzeugt wird (Stevenson et al. 1976).

Kontaminierte, infizierte, stark traumatisierte Wunden und Wunden welche älter als 6 bis 8 Stunden sind sollten nicht primär verschlossen werden. Fremdkörper aller Art, Mikroorganismen und nekrotisches Gewebe sollten durch eine Wundtoilette bzw. Débridement entfernt werden, da diese die Heilung der Wunde verzögern können (Holt und Griffin 2000, Fossum 2011). Dabei wird devitalisiertes Gewebe unter Schonung von Sehnen, Gefäßen, Nerven und Knochen durch chirurgische Exzision entfernt. Es sollte darauf geachtet werden, kontaminiertes Fett aufgrund der Minderdurchblutung großzügig zu entfernen, da sich hier Bakterien ungehindert vermehren können (Haury et al. 1978, Fossum 2011). Ein gründliches Débridement ist daher so wichtig, da devitalisiertes Gewebe die Vermehrung von Bakterien begünstigt und damit signifikant zu einer höheren Infektionsrate führt, wenn devitalisiertes Fett, Muskulatur oder Haut nach chirurgischer Versorgung in der Wunde verbleiben (Haury et al. 1978). Damit fungiert es für Bakterien als eine Art Wachstumsmedium und setzt gleichzeitig die Leukozytenphagozytose und anschließende Tötung der Bakterien herab (Haury et al. 1978). Im Falle von perforierenden Wunden kann es nützlich und notwendig sein, die Wunde zu vergrößern, um ihr ganzes Ausmaß darunter erkennen zu können (Shahar et al. 1997). Gefahr besteht immer, wenn zu viel Gewebe entfernt wird. Für die Wundheilung sollte eine ausreichende Gefäßversorgung vorliegen, und es kann durchaus hilfreich sein eine Wunddrainage zu legen (Holt und Griffin 2000). Wunddrainagen werden in der Regel in Wunden verwendet, bei welchen es zu einer Ausbildung eines Totraumes mit Exsudatansammlung von Blut und Serum kommt (Fossum 2011). Der entstandene Totraum und dessen feuchtes Milieu bieten Bakterien ideale Voraussetzungen zur Proliferation (De Holl et al. 1974, Meyers et al. 2008). Drainagen bieten hierbei einen guten Abfluss für Wundsekret, Blut und Eiter und ermöglichen überdies den Totraum zu minimieren, sodass sich das Gewebe adaptieren kann (Fossum 2011). Unterschieden wird zwischen passiven und aktiven Drainagen. Aktive Drainagen arbeiten über ein Vakuum-System (offen

oder geschlossene Systeme), wohingegen der Sekretabfluss bei passiven Drainagen wie z.B. eine Penrose-Drainage der Schwerkraft folgt (Schebitz und Alef 2007). Daher sollte die Austrittsstelle des Drainagenendes immer an der tiefsten Stelle vorzufinden sein und über eine Stichinzision in etwa 1cm Entfernung von der Wunde extra angelegt werden. Der Wundverschluss der restlichen Wunde umfasst die Naht der Unterhaut und Haut, wobei darauf zu achten ist, dass für die Unterhaut resorbierbares Nahtmaterial verwendet wird (Fossum 2011). Passive Drainagen sind als ein offenes System anzusehen und sollten daher immer von der Umgebung mittels einer Wundabdeckung geschützt sein, um aufsteigende Infektionen zu vermeiden. Wenn das Exsudat der Wunde serosanguinös wird und die Menge des Exsudates sich wesentlich verringert hat, kann die Drainage wieder entfernt werden. Drainagen können hierbei 2 bis 5 Tage in der Wunde belassen werden, sollten danach jedoch entfernt werden, da diese wie ein Fremdkörper wirken (Fossum 2011).

1.3.3. Antibiotika

Ein heutzutage großes Problem in der Medizin und Tiermedizin stellt sich vor allem durch die immer häufigere Präsenz von multiresistenten Keimen und dadurch hervorgerufene Wundinfektionen ein (Ogeer-Gyles et al. 2006, Assadian 2007, Daeschlein 2013). Durch zu häufigen Antibiotikaeinsatz, vor allem von Breitspektrumantibiotika, wird ein Selektionsdruck erzeugt, welcher die Entstehung und Verbreitung von multiresistenten Keimen fördert (Harbarth 2007, Nolff et al. 2016). Im Zusammenhang mit Wunden wird die Antibiotikatherapie kontrovers diskutiert. So stellt sich immer wieder die Frage, ob prophylaktische Antibiosen bei Bissverletzungen wirklich zielführend sind, wenn diese bei initialer Vorstellung einer Bissverletzung verabreicht werden. Genau genommen handelt es sich dabei nicht um eine Prophylaxe, da die Antibiose erst nach erfolgter Bissverletzung verabreicht wird und nicht davor (Callahan 1988). Griffin und Holt (2001) konnten anhand ihrer Studie zeigen, dass kein einziges Antibiotikum gegen alle Bakterien wirksam ist, welche in Bissverletzungen vorgefunden wurden. Um daher eine niedrige Infektionsrate solcher Wunden zu erlangen, sollte neben dem chirurgischen Débridement und Lavage ein Breitspektrumantibiotikum eingesetzt werden. So empfehlen sie für schwerwiegende Wunden die Therapie mit Ampicillin, Fluorochinolonen oder Aminoglykosiden. Mouro et al. (2010) beschrieben einen fraglichen Effekt von

Antibiotikaeinsatz bei nicht infizierten Wunden und empfohlen daher bis zum Eintreffen der Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung die Gabe von Amoxicillin-Clavulansäure. Dies deckt sich auch mit den Empfehlungen von Meyers et al. (2008), welche ebenfalls Amoxicillin-Clavulansäure als Antibiotikum der ersten Wahl auf Grund schneller Resistenzbildung der Bakterien gegenüber anderen Antibiotika beschrieben. Sulfonamide, Amoxicillin-Clavulansäure und Cephalexin/Cephalothin zeigten hier zwar eine relativ gute Effektivität von 83 bis 89%, jedoch war auch in dieser Studie kein einziges Antibiotikum wirksam gegen alle in Bissverletzungen vorgefundenen Bakterien. Wunden sollten stets auf aerobe und anaerobe Bakterien getestet werden inklusive Resistenztest. Fluorochinole sowie Aminoglykoside sollten erst nach Erhalt der Testergebnisse verabreicht werden falls erforderlich, da diese ineffektiv gegenüber Anaerobier sind (Meyers et al. 2008). Ein prophylaktischer Antibiotikaeinsatz bei initialer Vorstellung des Patienten scheint bei nicht infizierten Wunden wenig sinnvoll zu sein, da dies das Risiko für eine Infektion nicht minimiert (Callahan 1978, Ordog 1986, Dire 1991). Zusätzlich zeigte sich, dass der prophylaktische Antibiotikaeinsatz die Multiresistenzrate der Bakterien in Wunden erhöhen kann (Nolff et al. 2016). Dennoch konträr hierzu wurde in einer anderen Studie das Risiko für eine Infektion bei schwerwiegenden Wunden durch den oralen Antibiotikaeinsatz reduziert (Dire 1991). Auch Eugster et al. (2004) fanden heraus, dass eine prä- und postoperative Antibiotikatherapie mit einem Breitspektrumantibiotikum das Risiko für postoperative Wundinfektionen (SSI = „surgical site infections“) reduziert. Eine andere Studie empfiehlt die Antibiotikatherapie nur bei bereits infizierten und risikoreichen Wunden durchzuführen und Bissverletzungen mit niedrigem Risiko ohne Antibiose zu belassen (Callahan 1988).

2. Antiseptika

Das Gebiet der Wundantiseptik ist nicht neu und begründet sich auf die zweite Hälfte des 19. Jahrhunderts (Kramer 2004). Hierbei sollten potenzielle Krankheitserreger wie Mikroorganismen während chirurgischen Eingriffen unschädlich gemacht werden, um somit eine Infektion zu verhindern und zu bekämpfen. Anforderungen dabei an das Antiseptikum selbst sind eine gute

Verträglichkeit der antiseptischen Wirkstoffe ohne systemische bzw. lokale Nebenwirkungen hervorzurufen (Biokompatibilität, geringe Zytotoxizität) bei gleichzeitig mikrobizidem Effekt (Willy et al. 2017). In der Wundbehandlung können sie sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch eingesetzt werden (Kramer 2004). Ziel hierbei ist neben der Verhinderung einer Infektion bei akuten als auch chronischen Wunden ebenso eine Dekolonisation der Wunde (Daeschlein 2013, Willy et al. 2017). Vor allem die Wundinfektion ist die wichtigste Indikation für den Einsatz von Wundantiseptika (Kramer et al. 2004). Ist eine Wunde mit Mikroorganismen kolonisiert, so kann sich leider eine Infektion entwickeln. Diese stört den normalen Wundheilungsprozess und die Heilung kann nicht oder nur verzögert stattfinden. Wenn sich eine Infektion weiter ausbreitet, so kann dies im ungünstigsten Fall in einer Sepsis münden. Zudem können die Erreger weiter verbreitet werden, was hinsichtlich multiresistenter Erreger stets zu vermeiden ist (Kramer et al. 2004).

2.1. Povidon-Iod (PVP-Iod)

Povidon-Iod besitzt ein breites antimikrobielles Spektrum und wirkt gegen vegetative Bakterienformen, Sporen, Viren, Pilze und Protozoen. Es ist ein wasserlösliches, stark saures (pH = 3,2) Iodophor (Fossum 2011). PVP-Iod enthält den Wirkstoff Poly(1-vinyl-2-pyrrolidon)-Iod-Komplex (Polyvinylpyrrolidon-Iod, Povidon-Iod), welcher das Halogen Iod freisetzt und für dessen antiseptische Wirkung verantwortlich ist (Willy et al. 2017). Es ist bei einer Biofilmbildung wirksam und es bilden sich keine Resistenzen. Erhältlich ist PVP-Iod in einer wässrigen sowie alkoholischen Lösung, wobei die alkoholische Lösung als tiefenwirksames und viruzides Wundantiseptikum gilt, welches jedoch nur zur äußerlichen Anwendung auf der Haut und nicht auf der Schleimhaut oder in Wunden bestimmt ist (Willy et al. 2017). Bei der Reinigung von Wunden mit Povidon-Iod-haltigen Detergenzien wird Gewebe geschädigt, was wiederum eine Infektion potenzieren kann. Zudem zeigt es eine toxische Wirkung auf Fibroblasten bei einer 0,5%igen Lösung (Fossum 2011). Die Resorption von Iod über die Haut oder Schleimhaut kann zu vorübergehender Beeinträchtigung der Schilddrüsenfunktion führen (Fossum 2011, Willy et al. 2017). Ebenso kann durch den niedrigen pH-Wert der Lösung eine bereits vorliegende metabolische Azidose verstärkt werden. Nebenwirkungen neben einer Schilddrüsenfunktionsstörung können Iod-Akne, Schnupfen, Konjunktivitis,

Gastroenteritis und eine Nierenfunktionseinschränkung sein (Willy et al. 2017). Weitere Kontraindikationen sind Allergien, Dermatitis, Anwendung vor oder nach einer Radioiodtherapie sowie eine Peritoneallavage. Beeinträchtigt wird die antiseptische Wirkung von PVP-Iod durch einen Eiweißfehler z.B. im Falle einer Blutung. Der Verlust der Wirkung ist an einer Entfärbung des Iods von Braun zu Gelb erkennbar, wenn die Lösung in Kontakt mit körpereigenem Eiweiß wie Blut oder Exsudat kommt (Fossum 2011, Willy et al. 2017). Aufgrund seiner kurzen Residualaktivität von 4 bis 8 Stunden ist eine häufige Applikation (alle 4 bis 6 Stunden) erforderlich. Eine 0,1%ige Lösung kann Bakterien innerhalb von 15 Sekunden abtöten, wobei bisher keine Resistenzen beschrieben wurden. (Fossum 2011).

2.2. Wasserstoffperoxid - H₂O₂

Wasserstoffperoxid (H₂O₂) hat einen antimikrobiellen Effekt und eine reinigende Wirkung in wässriger Lösung (Frey et al. 2010). Es penetriert sehr leicht durch organische Membranen und ebenso durch unversehrte Haut. H₂O₂ zerfällt sehr schnell durch in Geweben ubiquitär vorkommende Hydroxyperoxidasen (Katalasen) und setzt dabei intermediär atomaren Sauerstoff frei. Dabei ist die Wirkung von der entstehenden Konzentration an atomaren Sauerstoff abhängig. Es kann daher sowohl bakteriostatisch (0,2 bis 0,3% ig), bakterizid (0,5 bis 3% ig) oder antimykotisch (bis 10% ig), wie auch Virus-inaktivierend wirken. In höheren Konzentrationen hat H₂O₂ eine bleichende Wirkung. Die antiseptische Wirkung kann bei verschmutzten, stark zerklüfteten und schlecht heilenden Wunden eingesetzt werden. Allerdings wird der reinigende und antiseptische Effekt durch leukozytäre Enzyme (Eiter) stark verkürzt, sodass wiederholte Spülungen von Wunden notwendig sind. Die Wirkung von H₂O₂ wird durch eine Schaumbildung ersichtlich (atomarer Sauerstoff). Bildet sich kein Schaum mehr, so bedeutet dies auch das Ende der antiseptischen Wirkung (Frey et al. 2010). Generell schädigt H₂O₂ Gewebe auch in geringen Konzentrationen und hat nur eine geringe antimikrobielle Wirksamkeit. Da H₂O₂ gegen Sporen wirkt, kann es bei einer Kolonisation mit *Clostridium spp.* indiziert sein. Es sollte jedoch nicht zur Wundspülung eingesetzt werden (Fossum 2011).

2.3. Octenidin

Octenidin hat eine breite antiseptische Wirkung mit niedriger Oberflächenspannung, welche durch den Wirkstoff Octenidindihydrochlorid (OCT) bestimmt wird. Das Spektrum umfasst alle vegetativen Bakterien und Sprosspilze. OCT ist wirksam bei Vorkommen von Biofilmen und entwickelt keine Resistenz. Es ist ein kationenaktiver Wirkstoff aus der chemischen Gruppe der Bispyridine. OCT wird als wässrige Lösung angeboten, welche zur wiederholten antiseptischen Reinigung geeignet ist, und als Lösung mit Alkoholzusatz zur oberflächlichen Anwendung mit Tiefenwirksamkeit bei akuten, kontaminierten, traumatischen sowie mit Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) kolonisierten Wunden geeignet ist (Willy et al. 2017). Der antibakterielle Effekt ist sehr hoch, jedoch zeigte sich, dass Octenidin einen toxischen Effekt auf Fibroblasten, Keratinozyten und HaCaT-Zellen (Human adult low Calcium high Temperature Keratinocytes) hat. Es führt zu einem signifikanten Rückgang der Zellviabilität dieser Zellen und hat damit einen stark negativen Effekt auf die Zellproliferation (Hirsch et al. 2010, Liu et al. 2018). Kontraindikationen für die Anwendung sind eine Bauchspülung sowie die Anwendung auf Knorpel- und Nervengewebe, da es hier toxisch wirken kann (Willy et al. 2017). Als eine weitere Nebenwirkung in der Handchirurgie beim Menschen konnten ödematöse Schwellungen nach der Verwendung von OCT zur Wundspülung gesehen werden, in Verbindung mit Nekrosen von subkutanem Fett und Muskulatur. Bei tiefen perforierenden Wunden kam es zu interstitiellen Ödem sowie zu fibrotischen Muskelumbau, da es durch seinen langsamen Abbau lange im Interstitium verbleiben kann. Aus diesem Grund wurden die Warnhinweise für Octenisept® 2004 und 2008 erneuert, in welchen vor Wundspülungen unter Druck, Gewebeeinjektion und fehlender Ablaufmöglichkeiten aus Wundkavernen sowie Gewebeswellung nach Wundspülungen bei penetrierenden Handwunden gewarnt wurde (Hulsemann und Habenicht 2009, Franz und Vogelin 2012). Nicht nur ödematöse Schwellungen des subkutanen Gewebes wurden beschrieben, sondern auch aseptische Entzündungsreaktionen mit partieller Fettgewebsnekrose (Schupp und Holland-Cunz 2009). Diese Komplikationen nach einer Wundspülung konnten auch in der Veterinärmedizin bei Bissverletzungen von Hunden gesehen werden (Kaiser et al. 2015). Trotz empfohlener Drainage des Wundgebietes entwickelten sich auch hier mitunter persistierende Ödeme mit Nekrosen von Fettgewebe und Muskulatur sowie entzündliche Veränderungen des

Gewebes mit Flüssigkeitsansammlung.

2.4. Chlorhexidin

Chlorhexidin-Diacetat besitzt ein breites Wirkspektrum, jedoch sind Resistenzen von *Proteus*, *Pseudomonas* und *Candida* gegenüber Chlorhexidin beschrieben. Es hat eine lang anhaltende antimikrobielle Aktivität, wobei die Residualaktivität bis zu 2 Tage anhalten kann (Fossum 2011). Die antimikrobielle Wirkung entsteht durch Zerstörung der Zellmembran, wobei der Zellinhalt austritt. Die Wirkung bleibt auch in Gegenwart von Blut und organischen Debris erhalten. Eine wiederholte Anwendung kann die Wirksamkeit erhöhen. Es fördert generell die rasche Heilung, allerdings können Lösungen über 0,05% die Bildung von Granulationsgewebe verzögern. Die systemische Resorption und Toxizität von Chlorhexidin wird als minimal beschrieben (Fossum 2011). Eine In-vitro-Studie zeigte allerdings, dass es abhängig von der Einwirkzeit und Konzentration ebenso zytotoxisch für humane Fibroblasten, Myoblasten und Osteoblasten ist. Vor allem bei Konzentrationen über 0,02% und selbst einer kurzen Einwirkdauer zwischen 1 und 3 Minuten haben nur 6% der Zellen überlebt (Liu et al. 2018). In einer anderen Studie ergaben sich hohe Gewebetoxizitätswerte für Chlorhexidin in Zusammenhang mit einer ausgeprägte Schädigung des Gefäßsystems (Kalteis et al. 2003).

2.5. Polyhexanid

Polyhexanid (Wirkstoffname: Polyhexamethylen-Biguanid) ist ein bakterizides Antiseptikum mit breiten antibakteriellen Wirkspektrum, welches sowohl gegen grampositive als auch gramnegative Bakterien wirkt. Es kommt aus der Gruppe der Biguanide und besteht aus alternierenden hydrophilen Biguanid-Resten und Hexamethylen-Spacern, welche von hydrophilen polaren oder ionischen terminalen Gruppen flankiert werden (Kaehn 2010). Die antiseptische Wirkung entsteht durch Bindung an die negativ geladene Phospholipidmembran bei gramnegativen Bakterien, Bindung von Teicoidsäure bei grampositiven Bakterien und Peptidoglykanen, was letztlich zur Membranlyse führt und der Zellinhalt austritt (Kaehn 2010). Polyhexanid kann in die Bakterienzelle aufgenommen werden und verändert die Transkriptionsrate von bakterieller DNA, wobei es zu einer Elongation und Kondensation der Chromosomen kommt. Da es einen hohen selektiven Mechanismus aufweist, ist es für Säugetierzellen nicht schädlich,

wobei es in den Endosomen gefangen wird (Allen et al. 2006, Chindera et al. 2016). Neben der antiseptischen Wirkung, welche nicht durch Blut oder Proteine beeinträchtigt wird, fand man heraus, dass es nicht nur eine gute Gewebeverträglichkeit aufweist, sondern zudem die Wundheilung fördern kann (Kramer et al. 2004, Muller und Kramer 2008, Eberlein und Assadian 2010, Kaehn 2010). Bisher konnten keine allergenen oder mutagenen Eigenschaften sowie keine Resistenzbildung von Polyhexanid nachgewiesen werden (Muller und Kramer 2008, Koburger et al. 2010). Im Vergleich zu anderen Antiseptika wie Octenisept (Wirkstoff: Octenidindihydrochlorid), Braunol (Wirkstoff: Povidon-Iod) und Betaisodona (Wirkstoff: Povidon-Iod) zeigt es eine deutlich geringere Toxizität gegenüber humanen Fibroblasten und Keratinozyten und stoppt effizient die bakterielle Proliferation schon bei einer geringen Konzentration (Hirsch et al. 2010).

3. Physikalische Therapie

In der Desinfektion unterscheidet man physikalische und chemische Desinfektionsverfahren, wobei die physikalischen Methoden auf thermische Wirkungen und Strahlenwirkungen (UV-Strahlen) basieren (Kramer 2004). Bekannte Verfahren zur Sterilisation und Desinfektion sind die Pasteurisation, Autoklavierung, Dampfsterilisation, Gassterilisation sowie die Plasmasterilisation (Kramer 2004, Fossum 2011). Diese Verfahren wurden zur Oberflächendesinfektion von Geräten und Instrumenten, Luft und Flüssigkeiten entwickelt (Kramer 2004, Fossum 2011). Zu den physikalischen Therapiemöglichkeiten in der Wundbehandlung zählen die Kompressionstherapie, Vakuumtherapie, Ultraschalltherapie, extrakorporale Stoßwellentherapie, elektromagnetische Therapie, Elektrostimulation, Lasertherapie, photodynamische Therapie, Hydrotherapie, Infrarot-A-Strahlung (Dissemond 2010). Entsprechend unterschiedlichster Indikationen können diese Therapieformen zur Wundbehandlung eingesetzt werden. Jedoch ist die wissenschaftliche Datenlage zu diesen Verfahren und ihrer Effektivität gering. Eine weitere physikalische Therapiemethode mit antiseptischen Potenzial bietet eine Behandlung mit Kaltplasma (Laroussi 2009).

3.1. Kaltplasma

Kaltplasma ist ein hoch energetischer physikalischer Zustand, welcher durch die Bildung von Radikalen, Elektronen und Ionen sowie Lichtemission bestimmt wird (Laroussi 2002, Matthes et al. 2014). Kaltplasma entsteht, wenn einem Gas bzw. Edelgas (z.B. Argon) Energie zugeführt wird. Die Energie des Kaltplasmas hängt hierbei vom verwendeten Gas ab, also auch von Wasserstoff- und Stickstoffradikalen der jeweiligen Umgebungsatmosphäre (Laroussi 2002, Laroussi und Leipold 2004, Matthes et al. 2016). Der mikrobizide Effekt wird von reaktiven Sauerstoffradikalen (reactive oxygen species = ROS), reaktiven Stickstoffradikalen (reactive nitrogen species = RNS), energetisch geladenen Ionen und Teilchen, Ultravioletter Strahlung (UV) sowie einer Mischung an Atomen hervorgerufen (Montie et al. 2000, Laroussi und Leipold 2004, Von Woedtke et al. 2013, Mai-Prochnow et al. 2014). Bislang wurden unterschiedliche Wirkungen von Kaltplasma auf Bakterien beobachtet, worunter drei Hauptmechanismen hauptsächlich für deren Zellzerstörung verantwortlich sind: die Zerstörung der bakteriellen Zellmembran, die Schädigung intrazellulärer Proteine sowie die direkte DNA-Schädigung (Vatansever et al. 2013, Mai-Prochnow et al. 2014). Welcher Mechanismus exakt die Zellzerstörung einleitet konnte noch nicht festgestellt werden. Aus diesem Grund gibt es unterschiedliche Ansätze, Hypothesen und Untersuchungen hierzu. Hauptsächlich treten zwei ursächliche Mechanismen in der bisherigen Literatur in den Vordergrund: eine letale Schädigung der Zellen durch elektrostatische Kraft oder durch oxidativen Stress in der Zelle selbst.

Durch geladene Partikel (Ionen und Elektronen) entsteht ein elektrostatisches Feld, welches die Bakterienzellmembran penetriert. Die elektrostatische Kraft akkumuliert an der Zelloberfläche bis die äußere Zellwand dieser nachgibt und somit zerstört wird, wobei gramnegative und grampositive Bakterien unterschiedlich empfänglich sind auf Grund ihrer Zellmembranmorphologie. Bei gramnegativen Bakterien hängt dieser Effekt vermutlich mit ihrer irregulären rauen Zellwandmorphologie zusammen. Bei grampositiven Bakterien konnten hingegen keine morphologischen Zellwandveränderungen gesehen werden. Somit wird bei gramnegativen Bakterien weniger elektrostatische Kraft benötigt, um ihre äußere Zellmembran zu zerstören (Mendis et al. 2000, Laroussi 2002, Von Woedtke et al. 2013, Mai-Prochnow et al. 2014). Nicht nur grampositive und

gramnegative Bakterien werden durch Kaltplasma geschädigt, sondern auch Biofilme können inaktiviert werden (Abramzon et al. 2006). Ein weiterer wichtiger Effekt des Kaltplasmas ist die Auslösung von oxidativen Stress in der Zelle. Oxidativer Stress wird hauptsächlich durch Sauerstoffradikale verursacht. Wenn der oxidative Stress den Abwehrmechanismus der Zelle übersteigt, so führt dies zur Schädigung der Zellwand und intrazellulär gelegener Komponenten (Montie et al. 2000, Gaunt et al. 2006, Joshi et al. 2011). Es konnte in unterschiedlichen Studien herausgefunden werden, dass oxidativer Stress zu einer Lipidoxigenierung, einen Verlust von Zytoplasma, einer oxidativen Schädigung von Proteinen sowie der DNA und somit zum Zelltod führt (Farr und Kogoma 1991, Gadri et al. 2000, Imlay 2003, Gaunt et al. 2006, Joshi et al. 2011). Kaltplasma führt letztendlich zur Fragmentierung der Zelle und diese wird morphologisch sowie chemisch verändert bevor sie inaktiviert wird (Joaquin et al. 2009, Joshi et al. 2011, Zhang et al. 2013). Da der Effekt von Kaltplasma dosisabhängig ist, können geringere Dosen antibakteriell wirken, wohin gegen höhere Dosen einen zelltoxischen Effekt auch auf Wirtszellen zeigen (Von Woedtke et al. 2013). Generell ist der Effekt von Kaltplasma von unterschiedlichen Faktoren abhängig, sodass es kein einheitliches Dosierungsprotokoll hierfür gibt (Laroussi 2009, Von Woedtke et al. 2013). Der dekontaminierende Effekt kann dabei unter anderem vom Trägergas, dem Abstand der Plasmaquelle zur Behandlungsoberfläche, der Behandlungsdauer, der Proliferationsphase der Bakterien sowie der initialen Bakterienkonzentration abhängig sein (Laroussi 2002, Yu et al. 2006, Laroussi 2009, Fernandez et al. 2012, Von Woedtke et al. 2013, Taghizadeh et al. 2015).

III. PUBLIKATION I

Eingereicht am 6. November 2017 bei Tierärztliche Praxis Kleintiere, akzeptiert zur Veröffentlichung nach Revision am 26. Februar 2018.

In-vivo-Studie I: Vergleich der Effizienz von Polyhexanid-Biguanid, Argon-Kaltplasma und Kochsalzlavage zur Dekontamination von Bisswunden beim Hund

Selina Winter¹; Mirja Christine Nolff¹; Sven Reese²; Andrea Meyer-Lindenberg¹

1 Chirurgische und Gynäkologische Kleintierklinik, Ludwig-Maximilians-Universität, München;

2 Institut für Anatomie, Ludwig-Maximilians-Universität, München

Vergleich der Effizienz von Polyhexanid-Biguanid, Argon-Kaltplasma und Kochsalzlavage zur Dekontamination von Bisswunden beim Hund

Selina Winter¹; Mirja Christine Nolff¹; Sven Reese²; Andrea Meyer-Lindenberg¹

¹Chirurgische und Gynäkologische Kleintierklinik, Ludwig-Maximilians-Universität, München; ²Institut für Anatomie, Ludwig-Maximilians-Universität, München

Schlüsselwörter

Hund, Bissverletzung, Wundantiseptika, Wundversorgung, Lavage

Keywords

Dog, bite injury, wound antiseptics, wound treatment, lavage

Zusammenfassung

Ziel der Studie war, die Keimbelastung sowie die klinische Effizienz von Polyhexanid, Argon-Kaltplasma und Kochsalzlösung zur Reduktion der Bioburden bei Hundebissverletzungen zu überprüfen. **Material und Methoden:** In die Studie eingeschlossen wurden Hunde mit Bissverletzungen, die durch ein chirurgisches Debridement mit anschließender Wundbehandlung durch Lavage mit Polyhexanid-Biguanid (A), Therapie mit kaltem Argonplasma (B) oder Lavage mit physiologischer Kochsalzlösung (C) versorgt wurden. Ein bakterieller Abstrich erfolgte bei allen Patienten nach Debridement sowie nach der Lavage bzw. Behandlung mit Argon-Kaltplasma. Zur Auswertung der Resultate diente der Chi-Quadrat-Test. **Ergebnisse:** Insgesamt 40 Hunde gingen in die Studie ein (A: n = 12; B: n = 10; C: n = 18). Bei einem Großteil der Verletzten handelte es sich um geringfügige Bisswunden. Ein Keimnachweis ergab sich bei 87,5% aller Patienten, wobei 19,8% aller Isolate als multiresistent klassifiziert wurden. Eine Reduktion der Keimlast durch Lavage wurde bei 8/12 Hunden der Gruppe A, 5/10 Hunden der Gruppe B und 14/18 Hunden der Gruppe C erreicht. Eine komplette Dekontamination durch Lavage gelang bei 5/12 Hunden der Gruppe A, 2/10 der Gruppe B und 9/18 der Gruppe C. Statistisch signifikante Unterschiede oder Effekte auf spätere Komplikationen waren nicht festzustellen. **Schlussfolgerung:** Zwischen den verschiedenen Lavagekonzepten bestanden keine statistisch signifikanten Unterschiede, doch wurde in der Kaltplasma-Gruppe die geringste Dekontamination erzielt. **Klinische Relevanz:** Bei Bissverletzungen ist von einer hohen Keimbelastung auszugehen. Zudem werden zunehmend multiresistente Isolate nachgewiesen. Basierend auf diesen ersten Ergebnissen ließ sich keine Überlegenheit von Polyhexanid oder Kaltplasma gegenüber physiologischer Kochsalzlösung zur Wundlavage nachweisen.

Summary

Objective: To evaluate the bacterial contamination rate and to compare the efficacy of polyhexanide, cold argon plasma and saline at reducing bacterial bio-burden in dog bite wounds. **Material and methods:** Dogs with bite-wound injuries were included when surgical debridement was pursued with subsequent treatment using either polyhexanide-biguanide lavage (A), cold argon plasma treatment (B) or saline lavage (C). Culture swabs were taken after debridement as well as after lavage or argon treatment. Statistical analysis was performed using the chi-square test. **Results:** A total of 40 dogs were enrolled in the study (A: n = 12; B: n = 10; C: n = 18). The majority of injuries were minor and 87.5% of patients had positive bacterial culture results pre-lavage, with 19.8% of isolates classified as multidrug resistant. A reduction in wound bioburden was achieved in 8/12 patients in group A, 5/10 patients in group B and 14/18 patients in group C. Complete decontamination was achieved in 5/12 patients in group A, 2/10 in group B and 9/18 in group C. None of these differences were statistically significant nor associated with the development of complications. **Conclusion:** No statistically significant differences were detected between the treatment groups; however, the cold argon plasma treatment provided the least effective decontamination. **Clinical relevance:** Bite wounds yield a high rate of bacterial contamination, with increasing multidrug-resistance rates. Based on these preliminary results, no superior effect was detected for lavage using polyhexanide-biguanide or cold argon plasma.

Korrespondenzadresse

Dr. Mirja Christine Nolff
Chirurgische und Gynäkologische Kleintierklinik
Ludwig-Maximilians-Universität München
Veterinärstraße 13
80539 München
E-Mail: m.nolff@lmu.de

Comparison of the antibacterial efficacy of polyhexanide, cold atmospheric argon plasma and saline in the treatment of canine bite wounds

Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere 2018; 46: 73–82
<http://dx.doi.org/10.15654/TPK-170713>
Eingegangen: 6. November 2017
Akzeptiert nach Revision: 26. Februar 2018

Schlüsselwörter

Hund, Bissverletzung, Wundantiseptika, Wundversorgung, Lavage

Zusammenfassung

Ziel der Studie war, die Keimbelastung sowie die klinische Effizienz von Polyhexanid, Argon-Kaltplasma und Kochsalzlösung zur Reduktion der Bioburden bei Hundebissverletzungen zu überprüfen.

Material und Methoden: In die Studie eingeschlossen wurden Hunde mit Bissverletzungen, die durch ein chirurgisches Debridement mit anschließender Wundbehandlung durch Lavage mit Polyhexanid-Biguanid

(A), Therapie mit kaltem Argonplasma (B) oder Lavage mit physiologischer Kochsalzlösung (C) versorgt wurden. Ein bakterieller Abstrich erfolgte bei allen Patienten nach Debridement sowie nach der Lavage bzw. Behandlung mit Argon-Kaltplasma. Zur Auswertung der Resultate diente der Chi-Quadrat-Test.

Ergebnisse: Insgesamt 40 Hunde gingen in die Studie ein (A: n = 12; B: n = 10; C: n = 18). Bei einem Großteil der Verletzungen handelte es sich um geringfügige Bisswunden. Ein Keimnachweis ergab sich bei 87,5% aller Patienten, wobei 19,8% aller Isolate als multiresistent klassifiziert wurden. Eine Reduktion der Keimlast durch Lavage wurde bei 8/12 Hunden der Gruppe A, 5/10 Hunden der Gruppe B und 14/18 Hunden der Gruppe C erreicht. Eine komplette Dekontamination durch Lavage gelang bei 5/12 Hunden der Gruppe A, 2/10 der Gruppe B und 9/18 der Gruppe C. Statistisch signifikante Unterschiede oder Effekte auf spätere Komplikationen waren nicht festzustellen.

Schlussfolgerung: Zwischen den verschiedenen Lavagekonzepten bestanden keine statistisch signifikanten Unterschiede, doch wurde in der Kaltplasma-Gruppe die geringste Dekontamination erzielt.

Klinische Relevanz: Bei Bissverletzungen ist von einer hohen Keimbelastung auszugehen. Zudem werden zunehmend multiresistente Isolate nachgewiesen. Basierend auf diesen ersten Ergebnissen ließ sich keine Überlegenheit von Polyhexanid oder Kaltplasma gegenüber physiologischer Kochsalzlösung zur Wundlavage nachweisen.

Keywords

Dog, bite injury, wound antiseptics, wound treatment, lavage

Summary

Objective: To evaluate the bacterial contamination rate and to compare the efficacy of polyhexanide, cold argon plasma and saline at reducing bacterial bio-burden in dog bite wounds.

Material and methods: Dogs with bite-wound injuries were included when surgical debridement was pursued with subsequent treatment using either polyhexanide-biguanide lavage (A), cold argon plasma treatment (B) or saline lavage (C). Culture swabs were taken after debridement as well as after lavage or argon treatment. Statistical analysis was performed using the chi-square test.

Results: A total of 40 dogs were enrolled in the study (A: n = 12; B: n = 10; C: n = 18). The majority of injuries were minor and 87.5% of patients had positive bacterial culture results pre-lavage, with 19.8% of isolates classified as multidrug resistant. A reduction in wound bioburden was achieved in 8/12 patients in group A, 5/10 patients in group B and 14/18 patients in group C. Complete decontamination was achieved in 5/12 patients in group A, 2/10 in group B and 9/18 in group C. None of these differences were statistically significant nor associated with the development of complications.

Conclusion: No statistically significant differences were detected between the treatment groups; however, the cold argon plasma treatment provided the least effective decontamination.

Clinical relevance: Bite wounds yield a high rate of bacterial contamination, with increasing multidrug-resistance rates. Based on these preliminary results, no superior effect was detected for lavage using polyhexanide-biguanide or cold argon plasma.

Einleitung

Bissverletzungen machen mit etwa 10 % den drittgrößten Anteil traumatischer Verletzungen beim Hund aus (19). Durch das Zusammenspiel von Druck und Scherkräften von bis zu 3102 kPa durch die Fangzähne entsteht ein charakteristisches Verletzungsmuster (9). Aus dieser Krafteinwirkung resultiert häufig ein massives Gewebstrauma mit begleitender Ischämie (9). In den resultierenden Hohlräumen finden eingebrachte Bakterien perfekte Wachstumsbedingungen und in Kombination mit der lokalen Minderdurchblutung sowie der reduzierten Immunantwort in schlecht perfundiertem Gewebe führen Hundebisse deshalb häufig zu schweren Infektionen (28, 29, 31). In der aktuellen Literatur werden bakterielle Kontaminationsraten von bis zu 48,4 % dokumentiert, mit bis zu 6 % multiresistenten Erregern (MDR) (31). Eine vorausgegangene antibiotische Therapie sorgt hierbei nachweislich für erhöhte Resistenzraten im Vergleich zu nicht vorbehandelten Patienten (31). Multiresistenz ist heutzutage eines der gewichtigsten Probleme der modernen Medizin. Strategien zur Resistenzvermeidung erfordern neben Verbesserungen im Hygienemanagement einen restriktiven und gezielten Antibiotikaeinsatz, sodass alternative Therapien zur Keimreduktion, wie die antiseptische Behandlung, zunehmend in den Fokus des Interesses treten (2, 11, 23). Die Wundantiseptik nimmt hierbei für chirurgische Patienten einen besonders interessanten Platz ein. Wundantiseptika werden zur Behandlung akuter und chronischer Wunden eingesetzt, um Infektionen zu verhindern und die Wundheilung durch Reduktion der Keimlast zu verbessern (11, 23). Um dieser Anforderung gerecht zu werden, muss ein geeignetes Wundantiseptikum eine Balance zwischen effizienter antibakterieller Wirkung und maximaler Gewebefreundlichkeit herstellen. Die ideale Substanz soll neben Effizienz die Wundheilung begünstigen, eine Forderung, die bis dato nur Polyhexanid-Biguanid erfüllt (11, 13, 23). Aufgrund ihrer schnellen und nachhaltigen antiseptischen Wirkung, die nicht von Blut oder Proteinen in der Wunde beeinträchtigt wird, sowie fehlender allergener und mutagener Eigenschaften, schmerzfreier Applizierbarkeit und fehlender bekannter Resistenzbildung werden in der Humanmedizin aktuell Polyhexanid und Octenidin als Wundantiseptika der Wahl empfohlen (22, 30, 37). Alternative antiseptische Strategien, die aktuell untersucht werden, sind die Behandlung mittels Laser, photodynamische Therapie, Superinfektion mit nicht pathogenen

Erregern sowie kalte Plasmen (10, 11, 35). Von diesen neuen Ansätzen bietet insbesondere das Kaltplasma eine interessante Alternative mit hohem antiseptischem Potenzial (24, 35). Obwohl in der Tiermedizin die gleichen Probleme bezüglich Wundinfektionen und MDR-Entwicklung vorherrschen wie in der Humanmedizin (31, 36), gab es in den letzten zwei Jahrzehnten keine Bemühungen, den Effekt der genannten neuen Antiseptika zu erforschen. Die aktuellen Empfehlungen zur Wundantiseptik im tiermedizinischen Bereich basieren auf Ergebnissen von Lozier et al. (25) aus dem Jahr 1992 sowie Sanches et al. (26) aus dem Jahr 1988 und beschränken sich auf Chlorhexidin. Diese Empfehlung steht im Kontrast zu den aktuellen humanmedizinischen Richtlinien, in denen Chlorhexidin für die Indikation Wundlavage nicht mehr empfohlen wird (2, 37). Chlorhexidin ist nicht so effektiv wie die neueren Antiseptika, hat eine höhere Gewebetoxizität und es gibt bekannte Resistenzen (4). Darüber hinaus kann Chlorhexidin Kreuzresistenzen gegen Antibiotikaklassen wie Makrolide und Vancomycin auslösen, eine Eigenschaft, die den Einsatz im Kontext der Resistenzbekämpfung verbietet (4, 6, 37). Ziel dieser Arbeit war, die Kontaminationsrate sowie den Anteil von MDR-Keimen bei Hundebissverletzungen zu erfassen. Auf-grund der fehlenden Daten zur Effizienz der neuen Wundantiseptika sollte zudem der Dekontaminationseffekt von Polyhexanid-Biguanid und Argon-Kaltplasma im Vergleich zur Wundlavage mittels physiologischer Kochsalzlösung bei klinischen Fällen beurteilt werden. Die zugrunde liegende Hypothese war, dass die Mehrzahl aller Bissverletzungen bakteriell kontaminiert ist und dass sowohl Polyhexanid als auch Argon-Kaltplasma eine stärkere Dekontamination der Wunden bewirken als physiologische Kochsalzlösung.

Material und Methode

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Fakultät genehmigt (38–20–12–2014). Aufnahme in Studie fanden Hunde, die zwischen Januar und Juni 2015 nach Bissverletzungen in der Klinik vorgestellt wurden. Signalement der Tiere, Typ und Lokalisation der Verletzung und eventuelle Begleitverletzungen wurden erfasst. Je nach antiseptischer Behandlung intra operationem erfolgte die Zuteilung der Patienten zu einer von drei Gruppen: Gruppe A: Polyhexanid-Biguanid (ProntoVet®, B. Braun, Melsungen); Gruppe B: Argon-Kaltplasma

(kinPEN®VET, NeoPlas, Greifs-wald); Gruppe C: 0,9 %ige Kochsalzlösung (NaCl, B. Braun, Melsungen). Über die Art der Behandlung entschied das Los.

Wundbehandlung

Alle Hunde wurden in einem Zeitfenster von 6 Stunden nach Vor-stellung in der Klinik chirurgisch versorgt. Falls es der Zustand erforderte, erfolgte zunächst eine Stabilisierung der Patienten durch Infusion kristalloider Lösungen (10–50 ml/kg/h je nach Schockgeschehen). Zur chirurgischen Versorgung erhielten die Tiere eine Allgemeinanästhesie, wobei die Anästhesie basierend auf der Entscheidung des diensthabenden Anästhesisten individuell eingeleitet und aufrechterhalten wurde. Nach Abdeckung der Wunden wurde das umgebende Hautareal geschoren, gewaschen und desinfiziert (Jodosept® PVP, Vetoquinol GmbH, Ravensburg; Softa-sept® N, B. Braun, Melsungen). Alle Debridements fanden unter sterilen Bedingungen im gleichen Operationssaal statt. Nach initialem Debridement wurde der erste Abstrich genommen, indem der Tupfer (Sarstedt AG & Co, Sarstedt) unter Vermeidung eines Kontakts mit der umliegenden Haut gleichmäßig über die gesamte Wundfläche gerollt wurde. Anschließend erfolgte die Wundlavage. In den Behandlungsgruppen Polyhexanid-Biguanid und Kochsalzlösung wurde die gesamte Wundfläche mit der Lösung übergossen. In der Kaltplasma-Gruppe wurden zunächst grobe Verunreinigungen mit 20–50 ml Kochsalzlösung abgewaschen und im Anschluss die Fläche mit dem Pen behandelt (► Abb. 1). Das verwendete Handstück des portablen Plasmageräts (KinPEN®VET) besteht aus seiner 1 mm dünnen Elektrode, die von einer Quarzkapillare (1,6 mm innerer Diameter) umschlossen wird. Bei allen Patienten kam ein Gasfluss von 4–5 Standardlitern/Minute bei normaler Umgebungsluft zur Anwendung. Das Gas wird an der Spitze der Elektrode „gezündet“ und bildet ein ca. 14 mm langes sichtbares Effluent, das in etwa 1 cm² Wundfläche abdeckt. Die Temperatur dieser Argonflamme bleibt konstant bei 48 °C und die zu behandelnde Fläche wird mit ca. 1 cm Abstand kreisförmig überlappend behandelt (► Abb. 1). Die beteiligten Chirurgen wurden über die notwendigen Anwendungsschritte aufgeklärt (14 Minuten Einwirkzeit von Polyhexanid; Dauer der Behandlung mit Argon-Kaltplasma 2 Minuten je Quadratzentimeter mit einem Maximum von 15 Minuten pro Patient, um die Anästhesiedauer nicht unnötig zu verlängern). Eine Kontrolle erfolgte hierbei nicht (Intention-to-Treat-Prinzip), da die Situation im

klinischen Alltag möglichst detailgetreu widergespiegelt werden sollte. Nach abgeschlossener Lavage wurde ein weiterer Wundabstrich genommen. Zum Wundverschluss diente in allen Fällen Polydioxanon (MonoPlus®, B. Braun, Melsungen). In tiefe Taschen mit Totraumabbildung wurde ein Penrose-Drain eingelegt. Lokalisation, Größe (Länge x Breite) und makroskopische Kontamination der Wunden wurden erfasst und die Wunden nach der Klassifikation von Holt und Griffin (19) einer von fünf Kategorien zugeteilt. Nach Entnahme beider Tupfer wurde die intravenöse antibiotische Therapie mit Amoxicillin/Clavulansäure begonnen (12,5 mg/kg i. v., Amoxiclav Hikma, Hikma Pharma GmbH, Martinsried) und im Verlauf für weitere 5–7 Tage oral fortgeführt. Je nach Schweregrad der Verletzung und Einschränkung der Perfusion des Patienten erfolgte die Analgesie mittels Buprenorphin (0,01 mg/kg i. v., Buprenovet®, Animalcare Limited, York, UK) allein oder in Kombination mit Carprofen (4 mg/kg i. v., Rimadyl®, Pfizer Animal Health, Berlin) für 3–5 Tage.

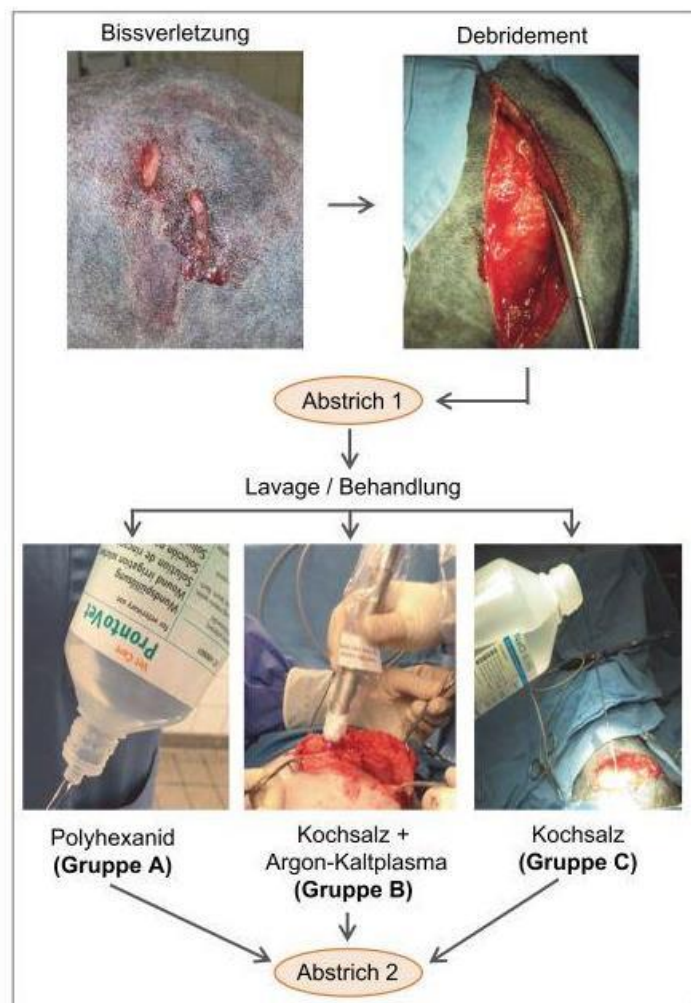


Abb. 1
Behandlungsschema für die drei Behandlungsgruppen
Fig. 1
Treatment schedule for the three treatment groups.

Mikrobiologische Untersuchung

Die Untersuchung der Tupfer führte ein akkreditiertes Labor durch. Neben einer Speziesidentifikation mittels Maldi-TOF wurde die Menge der isolierten Erreger semiquantitativ angegeben [(+): Wachstum nach Anreicherung, +: 1–10 koloniebildende Einheiten (KbE), ++: 11–100 KbE, +++: > 100 KbE). Resistenz wurde anhand der Leitlinien der Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI VET01 document) erfasst. Alle Isolate unterlagen einer Prüfung auf Empfindlichkeit gegenüber folgenden Antibiotika: Doxycyclin, Sulfonamid-Trimethoprim, Amoxicillin-Clavulansäure, Cefalothin, Cefovecin, Nitrofurantoin, Enrofloxacin, Marbofloxacin, Gentamicin, Imipenem, Ampicillin und Amikacin. Die Isolate wurden basierend auf den Leitlinien des European Centre for Disease Prevention and Control (14) sowie den Empfehlungen von Gandolfi-Dechristophoris et al. (17) als MDR klassifiziert, wenn Resistenzen gegen mehr als drei Antibiotikaklassen vorlagen.

Nachkontrollen

Alle Patienten wurden am Tag nach der Operation und während des stationären Aufenthalts täglich klinisch untersucht. Komplikationen wurden erfasst und als Minor (keine Behandlung notwendig) oder Major (chirurgische oder medikamentöse Therapie notwendig) klassifiziert. Zusätzlich erfolgte eine Kontrolle 10 Tage post operationem in der Klinik oder durch den Haustierarzt. In Fällen, bei denen es zu einer Wundinfektion kam, wurde ein Abstrich zum Zeitpunkt der Komplikation genommen und der Befund mit den Ergebnissen des Abstrichs nach der Lavage verglichen.

Statistische Auswertung

Zum Vergleich der Abstrichresultate vor und nach Lavage sowie der Komplikationsraten in den einzelnen Gruppen diente der Chi-Quadrat-Test. Zusätzlich wurde der Einfluss der Faktoren Wundgröße, Kontaminationsgrad, Wundalter, Anästhesiedauer, Operationszeit, Chirurg und Wundverschluss (mit/ohne Drainage) auf das Auftreten von Komplikationen erfasst.

Ergebnisse

Aufnahme in die Studie fanden 40 Hunde, von denen 12 mit Polyhexanid-Biguanid (Gruppe A), 10 mit Kaltplasma (Gruppe B) und 18 mit physiologischer Kochsalzlösung (Gruppe C) behandelt wurden. Das mittlere Alter der Tiere betrug 4 Jahre (1–13 Jahre), das mittlere Gewicht 16,9 kg (4,0–33,5 kg). Vertreten waren Hunde der folgenden Rassen (► Tab. 1): Mischlinge (n = 11), Beagle (n = 6), Labrador Retriever (n = 6), Siberian Husky, Rhodesian Ridgeback, Jack Russell Terrier (je n = 2), Border Collie, Dackel, Foxhound, Deutsch Kurzhaar, Golden Retriever, Hovawart, Kerry Blue Terrier, Kooikerhondje, Magyar Vizla, Malinois, Malteser, Pinscher, Pointer, Weimaraner und West Highland White Terrier (je n = 1).

Verletzungsmuster

Beim Großteil der Wunden handelte es sich um unterminierte Lazerationen (Klasse IV; 22/40), gefolgt von oberflächlichen Lazerationen (Klasse II; 12/40) und oberflächlichen punktuellen Perforationen (Klasse III 6/40). Die mittlere Wundlänge betrug 1,6 cm (0,1–5 cm) bei einer Breite von 1,3 cm (0,1–6 cm) und einer mittleren Distanz der Unterminierung von 3,2 cm (0–15 cm). Die Wunden befanden sich bei der Mehrzahl der Patienten im Bereich der Gliedmaßen (17/40), gefolgt von Kopf (11/40), Nacken (5/40), Schulter (4/40), Rücken (2/40) und Flanke (1/40). Keine Verletzung penetrierte eine Körperhöhle. Die mittlere Zeitspanne zwischen Beißerei und Vorstellung in der Klinik lag bei 6/40 Hunden unter 6 Stunden und betrug 6–12 Stunden bei 24/40 Hunden, 12–24 Stunden bei 6/40 Hunden und > 24 Stunden bei 4/40 Patienten. Keine Wunde war älter als 3 Tage. Ein Hund hatte eine antibiotische Behandlung erhalten (Gruppe B). Die meisten Verletzungen (37/40) wurden mittels Drain nach Bergmann versorgt, bei drei Patienten mit Bissverletzungen am Kopf erfolgte eine Versorgung nach Friedrich. Die mittlere Anästhesiezeit betrug 65 Minuten (20–310 Minuten) bei einer mittleren Operationszeit von 47 Minuten (15–240 Minuten). Detaillierte Daten zu den Wundcharakteristika in den drei Gruppen finden sich in ► Tab. 1.

Tab. 1 Signalement und Verletzungsmuster der Hunde sowie Komplikationen in den drei Behandlungsgruppen (A: Polyhexanid, B: Argon-Kaltplasma, C: Kochsalzlösung)

Table 1 Signalement data of the dogs, wound characteristics and complications in the three treatment groups (A: polyhexanide, B: cold argon plasma, C: saline).

	Gruppe A (n = 12)	Gruppe B (n = 10)	Gruppe C (n = 18)		Gruppe A (n = 12)	Gruppe B (n = 10)	Gruppe C (n = 18)
Signalement				Zeit bis Vorstellung			
Alter (Monate) ¹	60 (4–156)	42 (4–90)	4 (4–76)	< 6 Stunden	1		5
Gewicht (kg) ¹	17,9 (7,1–32,5)	19,9 (4,0–30)	17,2 (5,0–34,0)	6–12 Stunden	8	6	10
männlich/weiblich	10/1	8/2	10/8	12–24 Stunden	2	2	2
Wundlokalisierung				> 24 Stunden	1	2	1
Kopf	3	2	6	Behandlung			
Nacken	1	2	2	Bergmann	11	9	17
Schulter	1	1	2	Friedrich	1	1	1
Rücken	2			Operationsdauer ¹	30 (15–50)	47 (30–240)	30 (15–70)
Flanke			1	Anästhesiedauer ¹	59 (20–90)	83 (30–310)	61 (30–120)
Gliedmaße	5	5	7	Komplikationen			
Wundcharakteristika				Minor ²	4	4	7
Wundklasse I	0	0	0	Schwellung	2	2	4
Wundklasse II	5	2	5	Rötung	3	3	3
Wundklasse III	4	2	0	Hämatome	2	1	
Wundklasse IV	3	6	13	Emphysem		1	1
Länge (cm) ¹	1,1 (0,5–2,0)	1,4 (0,4–3,5)	2,2 (0,2–2,7)	Major (revisionspflichtig)		1	2
Breite (cm) ¹	0,9 (0,2–1,5)	1,4 (0,4–2,5)	1,4 (0,1–3,5)	Infektion			1
Untermierung (cm) ¹	3,5 (0–10)	2,9 (0–10)	3,3 (0–15)	Wunddehiszenz			1
makroskopisch sichtbar kontaminiert	8	7	13	Serom		1	
¹ Angabe als Mittelwert und Spanne				² Die Zahl der Minor-Komplikationen gibt an, bei wie vielen Patienten eine solche Komplikation auftrat, wobei manche Hunde mehrere Komplikationen aufwiesen.			

Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen

Bei 35/40 (87,5 %) der Patienten ließen sich Keime nachweisen, wobei 35 verschiedene Bakterienspezies identifiziert wurden. Im Durchschnitt lagen pro Wunde drei verschiedene Keime vor (Gruppe A: 0–8; Gruppe B: 0–7; Gruppe C: 0–7). Folgende Spezies wurden mehr als einmal nachgewiesen:

- *Pasteurella* spp. (*Pasteurella canis*: n = 13, *Pasteurella*-artige Bakterien: n = 9, *Pasteurella dagmatis*: n = 2)
- *Neisseria* spp. (nicht weiter klassifizierbar: n = 6, *Neisseria canis*: n = 2, *Neisseria weaveri*: n = 7, *Neisseria zoodegmatis*: n = 5)
- *Staphylococcus* spp. (*Staphylococcus epidermidis*: n = 2, *Staphylococcus hominis*: n = 1, *Staphylococcus pseudintermedius*: n = 11, *Staphylococcus saprophyticus*: n = 1, *Staphylococcus xylosus*: n = 1)
- *Streptococcus* spp. (*Streptococcus canis*: n = 5, *Streptococcus dysgalactiae*: n = 1, *Streptococcus minor*: n = 9, *Streptococcus mitis*: n = 1, α -hämolyisierende Streptokokken: n = 4, undifferenzierte Streptokokken: n = 1)

- *Corynebacterium*: n = 5
- *Acinetobacter* spp. (*Acinetobacter jejunii*: n = 1, nicht weiter klassifizierbar: n = 2)
- *Enterococcus* spp. (*Enterococcus faecalis*: n = 1, *Enterococcus faecium*: n = 2)
- *Pseudomonas aeruginosa*: n = 4

Die genaue Verteilung der Isolate innerhalb der Gruppen und ihre Häufigkeiten vor und nach der Lavage sind in ► Abb. 2 dargestellt. Eine Reduktion der Keimlast im Sinne einer KbE-Reduktion zwischen erstem und zweitem Abstrich wurde bei 8/12 Patienten der Gruppe A, 5/10 Patienten in Gruppe B und 14/18 Patienten in Gruppe C erreicht. Während eine komplette Dekontamination (negativer zweiter Abstrich nach initialem Bakteriennachweis) bei 5/12 Patienten in Gruppe A und 9/18 Patienten in Gruppe C gelang, ließ sich ein solches Ergebnis nur bei 2/10 Patienten Gruppe B (Kaltplasma) verzeichnen. Einen negativen ersten Abstrich gefolgt von einem positiven zweiten Abstrich gab es in keinem Fall. Insgesamt wurden 15 der 40 nachgewiesenen Isolate im ersten Abstrich (37,5 %) und 21 der insgesamt 106 nachgewiesenen Isolate aus beiden Abstrichen (19,8 %) als multiresistent eingestuft. Weder die Ergebnisse der Abstriche noch die Präsenz multiresistenter Erreger konnten mit dem Auftreten von Komplikationen assoziiert werden.

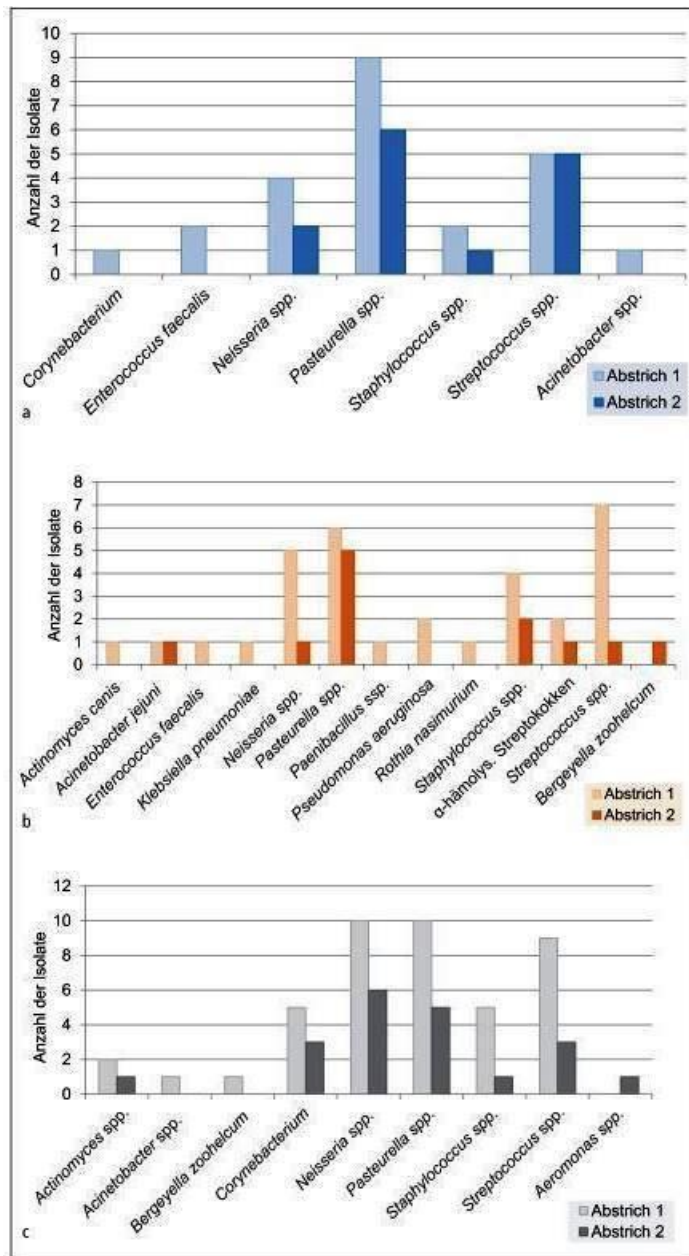


Abb. 2
Isolierte Bakterienspezies vor (Abstrich 1) und nach (Abstrich 2) a) Lavage mit Polyhexanid (Gruppe A), b) Behandlung mit Argon-Kaltplasma (Gruppe B) und c) Lavage mit Kochsalzlösung (Gruppe C)

Fig. 2
Isolated bacteria species before (swab 1) and after (swab 2) a) lavage using polyhexanide (group A), b) cold argon plasma treatment (group B) and c) lavage using saline (group C).

Tab. 2 Übersicht über die nachgewiesenen multiresistenten Isolate und deren Sensibilität gegenüber verschiedenen getesteten Antibiotika
 Table 2 Overview of individual bacterial isolates classified as multidrug-resistant and their susceptibility to the tested antibiotics.

Isolate	Summe	Dox	TS	AC	Pe/ Amp	Cef1	Cef3 ²	Nit	Str ²	Gen	Pra	Mar	Enr	Cl/ Lin ²	Ery ²	Chl	Col	MDR
<i>Acinetobacter</i> spp.	3					1	2	2	2	1				2	1		1	2/3
<i>Enterococcus</i> spp. ¹	3		2			1	2		2	1	2	2	2	1			2	2/3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	1			1		1	1						1	1			1/1
<i>Neisseria</i> spp.	20						2		2					2	2			2/20
<i>Pasteurella</i> spp.	24		1				2		3					2	1			3/24
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ¹	4	4	4	4	4	4	4	4	4		1	1	1	4	4	4		4/4
<i>Staphylococcus</i> spp. ¹	17	1	1					1	4					4	4	3	4	5/17
<i>Streptococcus</i> spp.	21	1							2			1	1	1			2	2/21

¹ Isolate mit besonders hoher Resistenzrate, ² Antibiotika, gegen die häufig Resistenzen gefunden wurden
 Summe = Gesamtzahl der Isolate in dieser Subgruppe beim ersten Abstrich, Dox = Doxycyclin, TS = Sulfonamid-Trimethoprim, AC = Amoxicillin/Clavulansäure; Pe/Amp = Penicillin/Ampicillin; Cef1 = Cefalotin/Cephalexin (1. Generation), Cef3 = Cefovecin (3. Generation), Nit = Nitrofurantoin, Str = Streptomycin, Gen = Gentamicin; Pra = Pradofloxacin, Mar = Marbofloxacin, Enr = Enrofloxacin, Cl/Lin = Clindamycin/Lincomycin, Ery = Erythromycin, Chl = Chloramphenicol, Col = Colistin, MDR = Multiresistenz

Komplikationen

Der Einsatz des Kaltplasmas führte intra operationem häufig zu elektromagnetischen Störsignalen, die insbesondere die EKG-Ableitungen betrafen und keinen klinischen Effekt hatten. Drei Patienten entwickelten Major-Komplikationen, die einen Revisionseingriff notwendig machten. Ein Hund (Gruppe B) mit einem Nachweis von *Micrococcus* ssp. im ersten Tupfer und negativem Befund beim Tupfer nach der Lavage entwickelte ein steriles Serom. Die beiden anderen Patienten (Gruppe C) handelte es sich um eine Wunddehiszenz (Ergebnis des ersten Abstrichs *Pasteurella canis* und *Staphylococcus pseudintermedius*, nach Lavage Abstrich negativ, Abstrich bei Revision negativ) und eine tiefe Wundinfektion (erster Abstrich *Neisseria weaveri*, *Pasteurella*-artige Bakterien, *Pasteurella canis*, *Streptococcus minor*; nach Lavage identische Kultur, Abstrichergebnis bei Revision: *Pasteurella canis*, *Pasteurella dagmatis*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Streptococcus minor*). Obwohl Trends verzeichnet werden konnten, war kein weiterer Faktor signifikant mit der Entwicklung postoperativer Komplikationen assoziiert.

Diskussion

Bissverletzungen stellen eine häufige Verletzungsart mit hochgradiger Kontamination sowie erheblichem Infektionsrisiko dar (33). Ähnlich wie bislang in der Literatur beschrieben zeigten sich auch in dieser Studie männliche Tiere

überrepräsentiert, ein Trend, der in erster Linie auf ein höheres Aggressionspotenzial von Rüden zurückgeführt wird (28, 33). Im Gegensatz zu aktuellen Publikationen über Hundebissverletzungen (28, 33) waren unsere Patienten mit einem mittleren Gewicht von 16,9 kg deutlich größer. Die Rassen der vorgestellten Hunde entsprachen dem Klinikaufkommen und aus keiner Rasse wurden Hunde „übermäßig häufig“ mit Bissverletzungen vorgestellt. Dieses Phänomen ist im Wesentlichen mit dem hohen Aufkommen mittelgroßer und großer Hunderassen in unserer Klientel zu erklären. Dies erklärt auch, warum im Gegensatz zu anderen Studien (7, 28, 33) die meisten Verletzungen nur einen geringen Schweregrad hatten. Shamir et al. (33) wiesen nach, dass das Verletzungsmuster vorwiegend durch die Größe des „Opfers“ beeinflusst wird. Während größere Hunde in der Regel mit geringfügigeren Verletzungen im Bereich von Kopf, Nacken und Gliedmaßen vorgestellt werden, kommen bei Patienten unter 10 kg häufig schwerwiegende Verletzungen mit Perforation von Thorax und Abdomen vor (7, 28, 33). Der Großteil der Bissverletzungen wird im Zuge des Bisses mit der oralen Flora des Angreifers, der lokalen Hautflora des Opfers oder Umweltkeimen kontaminiert (19, 28, 29). In Studien ergaben sich Kontaminationsraten zwischen 48 % und 95,8 %, wobei sich eine große Vielfalt verschiedener Bakterienspezies nachweisen ließ (28, 29, 31). Die von uns ermittelte Kontaminationsrate von 87,5 % stimmt im Wesentlichen mit den Ergebnissen anderer Studien überein (28, 29, 31). Auch die Verteilung der einzelnen Spezies entsprach weitestgehend der in anderen Studien, lediglich der hohe Anteil von *Neisseria* spp. wurde bislang nicht beschrieben. Hinsichtlich der Wirksamkeit der gängigen Antibiotika stimmten unsere Resultate ebenfalls mit denen anderer Autoren (4, 9, 29) überein, wobei Amoxicillin/Clavulansäure die beste und Clindamycin die schlechteste Resistenzsituation aufwies. Ein beunruhigender Trend ergab sich bei der Resistenzrate von 19,8 % (37,5 % bei alleiniger Berücksichtigung des ersten Abstrichs), die deutlich über bislang publizierten Werten (6 %) lag und entgegen aktueller Ergebnisse aus dem Jahr 2016 nicht immer mit einer vorhergehenden Antibiotikabehandlung korrelierte (31). Diese Entwicklung unterstreicht, dass auch in der Tiermedizin das Thema MDR größter Aufmerksamkeit bedarf. Zusätzlich ist anzumerken, dass bei den ersten Abstrichen bereits relative hohe Resistenzraten bei den gelisteten Reservesubstanzen (Fluorchinolone, Colistin und sogar Carbapeneme) festzustellen waren. Dies zeigt deutlich, dass unsere „last line of defence“ bereits

stark gelitten hat und der Einsatz dieser Substanzen in der Praxisroutine unbedingt verringert werden muss. Bei der Suche nach Alternativen zur Antibiose wird bei chirurgisch zu behandelnden Patienten insbesondere die intraoperative Wundantiseptik interessant. Allerdings mussten wir unsere Hypothese, dass antiseptische Wundspülungen zu einer besseren Dekontamination führen als eine Lavage mit Kochsalzlösung, basierend auf den vorliegenden Ergebnissen ablehnen. Der Einsatz von Polyhexanid als Wundantiseptikum ist in der Humanmedizin umfangreich untersucht (2, 13). Diese Substanz aus der Biguanid-Gruppe besteht aus alternierenden hydrophilen Biguanid-Resten und Hexamethylen-Spacern, die von hydrophilen polaren oder ionischen terminalen Gruppen flankiert werden (20). Die antiseptische Wirkung wird im Wesentlichen auf eine Bindung von Polyhexanid an die negativ geladene Phospholipidmembran gramnegativer Bakterien oder von Teicoidsäure (gram-positive Bakterien) und Peptidoglykanen zurückgeführt, die zur Membranlyse führt (20). Aufgrund hoher Selektivität dieses Mechanismus werden Säugetierzellen nicht angegriffen. Neuere Studien zeigen zudem, dass Polyhexanid eine Veränderung der Transkriptionsrate bakterieller DNA bewirkt (1). Chindera et al. (8) konnten außerdem in einer aktuellen Untersuchung nachweisen, dass Polyhexanid in die Bakterienzelle aufgenommen wird und dort zu einer Elongation und Kondensation der Chromosomen führt; ein Effekt, der bislang für keine andere Substanz nachgewiesen wurde. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen zudem, dass Polyhexanid in Säugetierzellen in den Endosomen gefangen wird und dadurch kein Schaden in den Wirtszellen entsteht (8). Polyhexanid ist somit stark bakterizid bei einem hohen therapeutischen Index, es bietet einen lang anhaltenden Effekt, wird durch Blut und Proteine in der Wunde nicht beeinflusst und fördert die Wundheilung (13, 20, 23, 30). Bislang gibt es überdies keine bekannten Resistenzen gegen die Substanz. Somit erfüllt Polyhexanid alle Anforderungen an ein modernes Wundantiseptikum. In einer großen kontrollierten Multicenter-Studie an 7862 Humanpatienten mit stark kontaminierten Weichteilverletzungen ergab sich nach Polyhexanid-Therapie eine signifikant geringere Infektionsrate als nach einer Behandlung mit Povidon-Jod, Ringer-Lösung oder Peroxid (32). Vergleichbare Untersuchungen fehlen in der Tiermedizin. Banovic et al. (Graham et al.) untersuchten die Wirkung von Polyhexanid und Chlorhexidin gegen bakterielle Isolate von Hunden *in vitro* und stellten keine Unterschiede zwischen den Substanzen fest. Betrachtet man die

umfangreichen humanmedizinischen Studien (12, 32), die den Effekt von Polyhexanid belegen, erscheinen unsere Ergebnisse überraschend. Ein wichtiger Faktor, der allerdings berücksichtigt werden muss, ist die notwendige Einwirkzeit von 10–15 Minuten (13). Obwohl alle Chirurgen explizit angewiesen wurden, diese Einwirkzeit der Substanz zu beachten, wurde nicht kontrolliert, ob dies auch bei allen Patienten korrekt erfolgte. Hierdurch ergibt sich eine wichtige Limitation der Studie. Andererseits wurde damit eine möglichst realistische klinische Situation simuliert (Intention-to-treat-Prinzip). Retrospektiv war die Überprüfung der korrekten Anwendung nicht möglich. Wird die Kontaktzeit von Polyhexanid unterschritten, kann nicht von einem antiseptischen Effekt ausgegangen werden. In diesem Fall handelt es sich um eine simple Wundspülung, die mit einer Kochsalzlavage vergleichbar ist (12). Erste Ergebnisse einer bislang unveröffentlichten Studie der Autoren weisen darauf hin, dass bei korrekter Anwendung Polyhexanid Kochsalzlösung hinsichtlich der Dekontamination überlegen ist. Eine genauere Beurteilung bleibt Folgestudien vorbehalten. Ähnlich verhält es sich mit der Anwendung von Kaltplasma. Hierbei handelt es sich um den vierten Aggregatzustand (fest, flüssig, Gas, Plasma). Basierend auf der Kombination des Trägergases und der zugeleiteten Energie können verschiedene Effluente erzeugt werden. Der antibakterielle Effekt ergibt sich durch die Wirkung von elektromagnetischer Strahlung (Infrarot, Ultraviolett und sichtbares Licht), reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies sowie elektrischen Ladungen im Effluent (34, 35). Im Gegensatz zu natürlichen Plasmazuständen sind Kaltplasmen relativ kalt (38–63 °C) und ermöglichen dadurch die medizinische Nutzung (35). Plasma wurde bislang in verschiedenen Indikationen eingesetzt, darunter Stimulation der Angiogenese, Induktion von Apoptose in neoplastischen Zellen sowie Wundheilung (35). Die Effekte sind „Dosis“-abhängig, wobei sich die Dosis aus der Bestrahlungszeit ergibt: Während geringe Dosen antibakteriell wirken und die Wirtszellen schonen, wirken höhere Dosen zelltoxisch (35). In verschiedenen Studien, die die Effizienz von Kaltplasma mit der von Chlorhexidin und Polyhexanid in vitro und am Menschen verglichen, ergab sich ein Behandlungsvorteil für das Kaltplasma (18, 21). Der in unserer Studie ermittelte geringe Effekt erscheint daher ebenfalls fraglich. Die notwendige „Dosis“ für eine Kaltplasma-Dekontamination in vivo liegt zwischen 10 Sekunden und 5 Minuten je Quadratzentimeter insgesamt (5, 16, 27). Da sich mit dem verwendeten Pen nur 1 cm² pro Minute behandeln lässt und die maximale

Therapiezeit auf 15 Minuten je Wunde festgelegt wurde, ergaben sich Behandlungszeiten am unteren Rand der empfohlenen Zeitspanne. Es ist damit möglich, dass die Behandlung nicht ausreichend lang durchgeführt wurde. Betont werden muss jedoch Folgendes: Eine länger als 15 Minuten dauernde Dekontamination, die beispielsweise im Fall einer 5 x 5 cm (25 cm²) messenden Wunde bei der höchsten angegebenen Anwendungszeit zu einer Therapiedauer von 2 Stunden führt, steht in keinem Verhältnis zu der Belastung, die eine solch lange Narkose für den Patienten bedeuten würde, und erscheint nicht praktikabel. Damit ist der korrekte Einsatz des Argon-Kaltplasmas in Form des Pen bei einem narkotisierten Patienten mit großflächiger Verletzung nicht vertretbar. Die Ergebnisse der Studie lassen sich nicht auf die Behandlung von kleineren Arealen oder wachen Patienten übertragen, bei denen die Einwirkzeit beachtet werden kann.

Interessenkonflikt

Die Autoren bestätigen, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Danksagung

Die Autoren bedanken sich bei der Firma NeoPlas, die im Rahmen der Studie das Kaltplasma-Gerät zur Verfügung gestellt hat.

Fazit für die Praxis

In der Studie ergab sich bei den Hunden ein hoher Anteil geringfügiger Verletzungen im Bereich von Gliedmaßen, Kopf und Nacken. Bei Patienten mit einem Körpergewicht unter 10 kg ist im Allgemeinen mit schwerwiegenderen Verletzungen zu rechnen. Die nachgewiesenen Bakterien entsprachen im Wesentlichen bekannten Kontaminanten im Rahmen von Bissverletzungen. Hervorzuheben ist jedoch, dass eine beunruhigende Frequenz multiresistenter Isolate mit relativ umfangreicher Resistenz gegen sogenannte Reserveantibiotika zu verzeichnen war. Diese Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit strukturierter Antiresistenzprogramme auch in der Kleintiermedizin. Die Wundlavage mit Kochsalzlösung war bezüglich der erreichten Dekontamination

vergleichbar mit der Polyhexanid-Lavage und besser wirksam als Kaltplasma, wobei in allen Gruppen nur wenige Komplikationen und nur eine nachgewiesene postoperative Infektion auftrat.

Literatur

- 1.Allen MJ, White GF, Morby AP. The response of *Escherichia coli* to exposure to the biocide polyhexamethylene biguanide. *Microbiology* 2006; 152: 989–1000.
- 2.Assadian O. From antiseptics to antibiotics – and back? *GMS Krankenhhyg Interdiszip* 2007; 2: Doc26.
- 3.Banovic F, Bozic F, Lemo N. In vitro comparison of the effectiveness of polyhexanide and chlorhexidine against canine isolates of *Staphylococcus pseudintermedius*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Malassezia pachydermatis*. *Vet Dermatol* 2013; 24: 409–13, e88–9.
- 4.Beier RC, Foley SL, Davidson MK et al. Characterization of antibiotic and disinfectant susceptibility profiles among *Pseudomonas aeruginosa* veterinary isolates recovered during 1994–2003. *J Appl Microbiol* 2015; 118: 326–342.
- 5.Bender C, Partecke LI, Kindel E, et al. The modified HET-CAM as a model for the assessment of the inflammatory response to tissue tolerable plasma. *Toxicology in vitro* 2011; 25, 530–537.
- 6.Bhardwaj P, Ziegler E, Palmer KL. Chlorhexidine Induces VanA-Type Vancomycin Resistance Genes in Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60: 2209–2221.
- 7.Cabon Q, Deroy C, Ferrand F et al. Thoracic bite trauma in dogs and cats: a retrospective study of 65 cases. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2015; 28: 448–454.
- 8.Chindera K, Mahto M, Kuma Sharma A, et al. The antimicrobial polymer PHMB enters cells and selectively condenses bacterial chromosomes. *Sci Rep* 2016; 6: 231–250.
- 9.Cowell A, Penwick R. Dog bite wounds: A study of 93 cases. *Compend Contin Educ Pract Vet* 1989; 11: 313–20.
- 10.Daeschlein G, Scholz S, Von Woedcke T et al. Cold plasma antiseptics for skin and wounds: a new antimicrobial concept in dermatology. *Exp Dermatol* 2012;

21: e39–e39.

11.Daeschlein G. Antimicrobial and antiseptic strategies in wound management. *Int Wound J* 2013; 10 Suppl 1: 9–14.

12.Dire DJ, Welsh AP. A comparison of wound irrigation solutions used in the emergency department. *Ann Emerg Med* 1990; 19: 704–708.

13.Eberlein T, Assadian O. Clinical use of polihexanide on acute and chronic wounds for antisepsis and decontamination. *Skin Pharmacol Physiol* 2010; 23: 45–51.

14.European Centre for Disease Prevention and Control (2014) <http://ecdc.europa.eu/en/activities/diseaseprogrammes/ARHAI/Pages/index.aspx> [Zugriff am 9. September 2017].

15.Fahie MA, Shettko D. Evidence-based wound management: a systematic review of therapeutic agents to enhance granulation and epithelialization. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2007; 37: 559–577.

16.Flynn PB, Higginbotham S, Alshraideh NH. et al. Bactericidal efficacy of atmospheric pressure non-thermal plasma (APNTP) against the ESKAPE pathogens. *Int J Antimicrob Agents* 2015; 46: 101–107.

17.Gandolfi-Dechristophoris P, Regula P, Petrini O et al. Prevalence and risk factors for carriage of multidrug resistant Staphylococci in healthy cats and dogs. *J Vet Sci* 2013; 14 (4): 449–456.

18.Hammann A, Huebner NO, Bender C, et al. Antiseptic efficacy and tolerance of tissue-tolerable plasma compared with two wound antiseptics on artificially bacterially contaminated eyes from commercially slaughtered pigs. *Skin Pharmacol Physiol* 2010; 23: 328–332.

19.Holt DE, Griffin G. Bite wounds in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2000; 30: 669–673.

20.Kaehn K. Polihexanide: a safe and highly effective biocide. *Skin Pharmacol Physiol* 2010; 23 Suppl: 7–16. Heruntergeladen von: LMU München. Urheberrechtlich geschützt.

21.Koban I, Holtfreter B, Hubner NO. et al. Antimicrobial efficacy of non-thermal

plasma in comparison to chlorhexidine against dental biofilms on titanium discs in vitro – proof of principle experiment. *J Clin Periodontol* 2011; 38: 956–965.

22.Koburger T, Hubner NO, Braun M et al. Standardized comparison of antiseptic efficacy of triclosan, PVP-iodine, octenidine dihydrochloride, polyhexanide and chlorhexidine digluconate. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 1712–1719.

23.Kramer A, Roth B, Muller G, et al. Influence of the antiseptic agents polyhexanide and octenidine on FL cells and on healing of experimental superficial aseptic wounds in piglets. A double-blind, randomised, stratified, controlled, parallel-group study. *Skin Pharmacol Physiol* 2004; 17: 141–146.

24.Laroussi M. Low-Temperature Plasmas for Medicine? *Ieee Transactions on Plasma Science* 2009; 37: 714–725.

25.Lozier S, Pope E, Berg J. Effects of four preparations of 0.05 % chlorhexidine diacetate on wound healing in dogs. *Vet Surg* 1992; 21: 107–112.

26.Sanchez IR, Swaim SF, Nusbaum KE et al. Effects of chlorhexidine diacetate and povidone-iodine on wound healing in dogs. *Vet Surg* 1988; 17: 291–295.

27.Matthes R, Luhrmann A, Holtfretter et al. Antibacterial activity of cold atmospheric pressure argon plasma against 78 genetically different (mecA, luk-P, agr or capsular polysaccharide type) *Staphylococcus aureus* strains. *Skin Pharmacol Physiol* 2016; 29: 83–91.

28.Meyers B, Schoemann JP, Goddard A et al. The bacteriology and antimicrobial susceptibility of infected and non-infected dog bite wounds: fifty cases. *Vet Microbiol* 2008; 127: 360–368.

29.Mouro S, Vilela CL, Niza MM. Clinical and bacteriological assessment of dog-to-dog bite wounds. *Vet Microbiol* 2010; 144: 127–132.

30.Muller G, Kramer A. Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 1281–1287.

31.Nolff M. C, Reese S, Fehr M et al. Assessment of wound bio-burden and prevalence of multi-drug resistant bacteria during open wound management. *J Small Anim Pract* 2016; 57: 255–259.

- 32.Roth B, Assadian O, Wurmitzer F et al. Surgical site infections after primary antiseptic cleansing of dirty-contaminated wounds by polihexanide, PVP iodine resp. hydrogen peroxide. *GMS Krankenhaushyg Interdiszip* 2007; 2: Doc58.
- 33.Shamir MH, Leisner S, Klement et al. Dog bite wounds in dogs and cats: a retrospective study of 196 cases. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2002; 49: 107–112.
- 34.Uchiyama H, Zhao QL, Hassan MA et al. EPR-Spin Trapping and Flow Cytometric Studies of Free Radicals Generated Using Cold Atmospheric Argon Plasma and X-Ray Irradiation in Aqueous Solutions and Intracellular Milieu. *PLoS ONE* 10 (8): e0136956.
- 35.Von Woedtke T, Reuter S, Masur K et al. Plasmas for medicine. *Physics Reports* 2013; 530: 291–320.
- 36.Weese JS. A review of multidrug resistant surgical site infections. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2008; 21: 1–7.
- 37.Willy C, ed. *Antiseptics in Surgery*, 1st edn. Stockholm: Linquist Book Publishing 2013.

IV. PUBLIKATION II

Eingereicht am 29. August 2019 bei Journal of Microbiological Methods, akzeptiert zur Veröffentlichung nach Revision am 21. September 2019.

In-vitro-Studie: In vitro evaluation of the decontamination effect of cold atmospheric argon plasma on selected bacteria frequently encountered in small animal bite injuries

S. Winter*¹, A. Meyer-Lindenberg¹, G. Wolf², S. Reese³, M.C. Nollf⁴

¹Clinic for Small Animal Surgery and Reproduction, Ludwig-Maximilians University, Munich

²Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Ludwig-Maximilians University, Munich

³ Department for Basic Veterinary Sciences, Ludwig-Maximilians University, Munich

⁴ Clinic for Small Animal Surgery, University of Zurich, Zurich



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmicmeth

In vitro evaluation of the decontamination effect of cold atmospheric argon plasma on selected bacteria frequently encountered in small animal bite injuries

S. Winter^{a,*}, A. Meyer-Lindenberg^a, G. Wolf^b, S. Reese^c, M.C. Nolff^d^a Clinic for Small Animal Surgery and Reproduction, Ludwig-Maximilians University, Munich, Germany^b Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Ludwig-Maximilians University, Munich, Germany^c Department for Basic Veterinary Sciences, Ludwig-Maximilians University, Munich, Germany^d Clinic for Small Animal Surgery, University of Zurich, Zurich, Switzerland

ARTICLE INFO

Keywords:

Cold atmospheric argon plasma
Bacterial decontamination
Time-dependent effects
Concentration-dependent effects
Bacterial growth

ABSTRACT

Beneficial effects of cold atmospheric argon plasma (CAAP) on wound healing and its capacity for bacterial decontamination has recently been documented. First, *in vivo* studies in small animals did not prove any decontamination effect in canine bite wounds. The present study evaluated the overall decontamination effect of CAAP for different bacteria frequently encountered in canine bite wounds with respect to growth phase, initial bacteria concentration and treatment duration.

Standard strains of *Escherichia (E.) coli*, *Staphylococcus (S.) pseudintermedius*, *S. aureus*, *Streptococcus (S.) canis*, *Pseudomonas (P.) aeruginosa* and *Pasteurella multocida* were investigated. To evaluate the influence of the bacterial growth phase, each bacterium was incubated for three and eight hours, before CAAP treatment. Three different bacterial concentrations were created per bacterium and growth phase, and were exposed to CAAP for 30 s, 1 min and 2 min.

CAAP treatment resulted in acceptable decontamination rates (range 98.9–99.9%) in all bacteria species *in vitro*; however, differences in susceptibility were detected. Decontamination rate was mainly influenced by initial bacterial concentration and treatment time. Growth phase only influenced decontamination in *S. pseudintermedius*. Treatment time significantly ($P < .05$) correlated with the decontamination rate in *E. coli*, *S. canis* and *S. aureus*, with an exposure time of 2 min being most effective. Initial bacterial concentration significantly ($P < .05$) influenced decontamination in *Pasteurella multocida* and *P. aeruginosa*, in which treatment time was not as important. CAAP exerts effective antibacterial activity against the tested bacteria strains *in vitro*, with species specific effects of treatment time, growth phase and concentration.

1. Introduction

Microbial multidrug-resistance (MDR) is one of the main issues that must be solved by modern medicine (Ogeer-Gyles et al., 2006; Weese, 2008). Among surgical patients, surgical site infections, and especially open wounds, represent risk groups, and antibiotic treatment frequently results in a shift to more resistant bacteria rather than in wound decontamination (Harbarth, 2007; Weese, 2008; Nolff et al., 2016). Recognition of this problem has increased research on alternative strategies for wound decontamination, including antiseptic substances and physical treatment options in human medicine (Kramer et al., 2004; Assadian, 2007). However, despite the fact that the same problem exists in small animal surgical patients (Weese, 2008; Nolff et al., 2016), there

is a paucity of studies focusing on antiseptic wound treatment in veterinary medicine (Sanchez et al., 1988; Lozier et al., 1992).

Plasma is a physical state of matter, which is highly energetic. A multimodal effect has been postulated, with the microbiocidal effect mainly attributed to reactive oxygen radicals (ROS), reactive nitrogen radicals (RNS), energetically enriched ions and charged particles, ultraviolet (UV) radiation and a mix of other atoms (Montie et al., 2000; Laroussi, 2002; Laroussi and Leipold, 2004; Matthes et al., 2014; Von Woedtke et al., 2013; Mai-Prochnow et al., 2014).

Various effects of cold atmospheric plasma on bacteria have been documented. Among these, three major impacts lead to cell destruction (Vatanever et al., 2013; Mai-Prochnow et al., 2014):

* Corresponding author.

E-mail address: vetwinter@web.de (S. Winter).<https://doi.org/10.1016/j.jmicmeth.2019.105728>

Received 29 August 2019; Received in revised form 20 September 2019; Accepted 20 September 2019

Available online 17 October 2019

0167-7012/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Destruction of the bacterial cell membrane
2. Intracellular protein damage
3. Direct DNA damage

Loaded particles, such as ions and electrons, create an electrostatic field that permeates the bacterial cell wall (Mendis et al., 2000, Laroussi et al. 2002, Von Woedtke et al., 2013). The electrostatic force accumulates on the cell surface until it causes the outward directed cell wall force to subside, leading to destruction (Mendis et al., 2000, Laroussi et al. 2002, Mai-Prochnow et al., 2014). This effect is more profound in Gram-negative bacteria, due to their more irregular rough outer membrane. While morphologic cell wall destruction has been documented in this Gram-negative bacteria species, no morphological changes occur in Gram-positive bacteria (Mendis et al., 2000, Laroussi et al. 2002). Thus, less electrostatic force is needed to destroy their outer cell wall compared to Gram-positive bacteria (Mendis et al., 2000, Laroussi et al. 2002, Mai-Prochnow et al., 2014).

In addition, oxidative stress exerts direct effects on proteins and bacterial DNA (Laroussi et al. 2009, Von Woedtke et al., 2013). Massive oxidative stress through reactive oxygen radicals results in lipid-oxidation, loss of cellular cytoplasm, proteins and oxidative damage to the DNA, leading to cell death once the repair mechanism is overcome (Gadri et al., 2000; Imlay, 2003; Joshi et al., 2011; Gaunt et al., 2006; Farr and Kogoma, 1991). Prolonged exhibition to a plasma effluent results in complete cell fragmentation (Joshi et al., 2011). Finally, the cells undergo morphological and chemical changes before inactivation (Joaquin et al., 2009; Zhang et al., 2013). The described effects are dose-dependent and individually differ between target cells (Daeschlein et al., 2010; Fluhr et al., 2012; Matthes et al., 2013; Flynn et al., 2015).

Numerous *in vitro* and *in vivo* trials in small mammals and humans have documented an effective decontamination effect combined with a wide safety margin regarding a damage of eukaryotic cells (Laroussi et al., 2003; Daeschlein et al., 2010; Hammann et al., 2010; Ermolaeva et al., 2011; Koban et al., 2011; Fluhr et al., 2012; Lademann et al., 2012; Bundscherer et al., 2013; Matthes et al., 2013; Wende et al., 2014; Flynn et al., 2015; Kisch et al., 2016; Matthes et al., 2016).

Because the effect of plasma is related to numerous factors, a unique 'dosing' protocol is not available (Laroussi, 2009; Von Woedtke et al., 2013). The type of effluent is closely related to the carrier gas, the room air and the device used for generation of the plasma state (Laroussi, 2009; Von Woedtke et al., 2013). Furthermore, the distance between the plasma source and the wound surface influences the decontamination effect (Taghizadeh et al., 2015). Longer treatment times have been observed to result in greater 'bacterial death' however, this is influenced by bacteria species, growth form (biofilm) and substrate on which the bacteria grows (Laroussi et al. 2002, Cooper et al., 2010, Cotter et al., 2011, Brelles-Marino, 2012, Taghizadeh et al., 2015).

Other factors, such as growth state (exponential or stationary phase), have been studied before by Yu et al. (2006) and initial bacterial concentration was evaluated in context of food microbiology. Fernandez et al. (2012) could show, that inactivation of *Salmonella Typhimurium* through CAP treatment is more efficient, the lower the initial bacterial concentration is. Despite these well-investigated facts, the first clinical trials evaluating the decontaminating effect of CAAP in canine bite wounds were not able to detect any decontamination effects *in vivo* (Winter et al., 2018). Therefore, it was our aim to investigate the effect of the used CAAP source in bacteria to be anticipated in canine bite wounds *in vitro* to document the *in vitro* efficacy and potential influencing factors with respect to bacteria species, bacteria growth phase and bacteria concentration. Based on a recent survey on the bacterial bio-burden of open treated wounds in small animal patients, the following bacteria were chosen for evaluation: *Escherichia (E.) coli*, *Staphylococcus (S.) aureus*, *Staphylococcus (S.) pseudintermedius*, *Streptococcus (S.) canis*, *Pasteurella multocida* and *Pseudomonas (P.) aeruginosa* (Nolff et al., 2016).

Our hypothesis was that CAAP would efficiently decontaminate all chosen isolates with an exposure time of 2 min being most effective. Furthermore, we postulated that this effect would be independent from the growth phase of the tested bacterium, and that higher bacterial concentrations would need longer exposure times for decontamination. The aim was to investigate the efficiency of CAAP *in vitro* on selected bacteria before using it in a following *in vivo* study on canine bite wounds.

2. Materials and methods

2.1. Bacteria selection and culture

For this investigation, the following bacteria were included for further validation: *Escherichia coli* DSM 1103, *Staphylococcus aureus* DSM 1104, *Staphylococcus pseudintermedius* DSM 21284, *Streptococcus canis* DSM 20715, *Pasteurella multocida* DSM 5281 as well as *Pseudomonas aeruginosa* DSM 1117. All strains were obtained from the Leibniz Institute DSMZ German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. To exclude the potential influence of different genetic alterations in wild-type bacteria, standard strains were chosen.

Bacterial suspensions were prepared using a standard-I-bouillon (No. 1.07882.0500, Merck) at a pH of 7.5 ± 0.2 at 37°C and plated on Mueller-Hinton Agar (No. 1.05435.0500, Merck). Because of growth requirements of the fastidious *S. canis* and *Pasteurella multocida*, Mueller-Hinton Agar was supplemented with 5% sheep blood. Sheep blood was drawn from in-house donors (animal house Schwere Reiter Straße 9, 80,797 Munich, sheep blood donor registration nr. 55.2-1-54-2532.0-64-2016, government of upper Bavaria).

2.2. Determination of the bacterial growth phase

Bacterial proliferation in an closed system can be divided into four phases: A lag phase with no cell division, an exponential growth phase with high metabolic activity and cell division followed by a stationary phase, and the death phase. A wound is like an open system where all phases of bacterial proliferation can occur. For this study we only used the exponential growth and stationary phase for examination. In order to detect differences of the effect of CAAP with respect to the growth phase of the investigated bacteria, the transition from exponential to stationary phase of each bacterium was determined by visual control using the McFarland standard. Each enrolled bacterium was incubated in standard I-bouillon at $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ for 48 h with a visual control every 2 h to document the increase of turbidity until the stationary phase was reached (no more detectable increase). McFarland standard was used to simplify and keep scope of the trial down. Based on the results of the detected change in turbidity, an incubation of 3 h was representative of exponential growth in all tested bacteria, while an incubation of 8 h was representative of the stationary phase. Additionally, CFUs were counted to confirm the exponential and stationary phase.

2.3. Determination of initial bacterial concentration

For determination of the colony-forming units per square centimetre (CFU/cm^2) a log₁₀ serial dilution of the inoculum for plating was used. Colony counting was done after 48 h of incubation at $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. For treatment with CAAP, three concentrations (10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3}) were plated per strain and per growth phase (6 plates per strain) on Mueller-Hinton Agar. After treatment with cold argon plasma, the plates were incubated at $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ before counting colonies in the treated areas.

2.4. Cold Argon Plasma Treatment

The plasma device used in this study (KinPen Vet-NeoPlas) was an

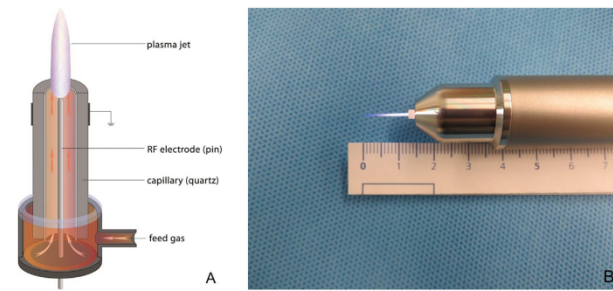


Fig. 1. Schematic (A, figure courtesy of INP Greifswald) and life (B) view of the KinPen Vet handheld device.

atmospheric plasma jet with a handheld unit, and consists of a 1 mm pin-tip electrode mounted in the centre of a quartz capillary (1.6 mm inner diameter, Fig. 1 A). Argon was selected as a working gas at a flow of 5 standard litres per minute. The gas is ignited at the tip of the electrode and creates a jet-like effluent covering approximately 1 cm^2 . The device consumes 50 W, operated at 230 V/50–60 Hz. The direct voltage within the plasma is 3 kV and has a dissipated electric capacity of 1.5–2 W. At these settings, the effluent has a visible length of 14 mm (Fig. 1 B) and a constant temperature of 48°C at the tip.

To assure repeatability of treatment, a template was created and placed on the backside of each plate for plasma irradiation (Fig. 2). Three areas of 1 cm^2 each were treated with the plasma device at an approximate distance of 1 cm above the surface for the duration of 30 s, 1 min or 2 min. The KinPen Vet was therefore moved manually over each area in a meandering pattern with parallel lines and with different angles (top-down, from left to right, top right at lower left and top left at lower right). This pattern was repeated in concern for each given treatment duration.

After the plasma treatment, plates with isolates of the six bacterial strains were incubated for 14 to 20 h at $37^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$. *S. canis* was incubated for 44 to 46 h due to the small size of colonies detected, in order to facilitate easier identification of CFUs. Experiments were repeated independently for each bacterial strain with all settings of the experiment. Three different log₁₀ dilutions for each bacterial proliferation were plated respectively on agar plates. Each agar plate had three areas for CAAP treatment, achieving 18 areas for single examination of one bacterial strain. Altogether, 36 areas ($n = 36$) for one

and 216 areas ($n = 216$) for all six different bacterial strains were examined. This resulted in different concentrations between the two tests of the bacterial strains and also for each growth phase.

2.5. Calculation of the decontamination effect

The CFU per plasma treatment zone of 1 cm^2 was divided by the CFU per 1 cm^2 without treatment, calculated from the log₁₀ dilution of the inoculum. The values were given in percentage of growth reduction as well as in logarithmic growth reduction. In case CFU could not be counted after CAAP treatment, appraisal value was used referring to the untreated area of the agar plate. An 8 log reduction has been used for calculation in terms of a 100% reduction. These results have been marked by * within the tables.

2.6. Statistics

Data were computed in Excel (Microsoft Excel 2010) and analysed using SPSS (IBM SPSS Statistics 23.0) software. Descriptive statistics were given as mean and standard deviation. Effect of treatment with respect to the investigated factors was determined using multivariate analysis of variance (ANOVA, SS Type III) and Fisher's f-test. Treatment time of CAAP, bacterial proliferation and initial bacterial concentration were tested regarding their effects on the decontamination. Significance was set at $P < .05$.

3. Results

3.1. Decontamination effect with regard to treatment time

Treatment time represents one of the major aspects of CAAP efficiency. The effect of treatment time especially influenced the decontamination of *E. coli*, *S. aureus* and *S. canis*. In all three bacterial species, significant effects could be detected (Table 1). However, improved bacterial decontamination was observed in all investigated species at both growth phases. The most efficient treatment duration was 2 min per cm^2 . Minor effects of treatment time were observed for *E. coli*, *P. aeruginosa* and *Pasteurella multocida* (Table 1). The influence of treatment time in *S. aureus* was superior to the effect of bacterial concentration.

In addition to total decontamination, another effect was observed: treatment duration correlated with the size of the inhibited area. The zone of inhibition exceeded the border of the treated area, despite the fact that all areas were treated based on the template. Extended treatment time, especially 2 min per cm^2 , increased the zone of inhibition of all tested bacteria (Fig. 3).

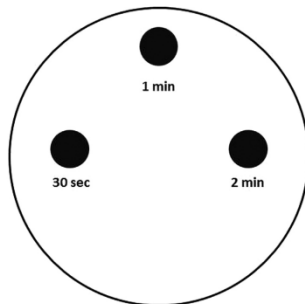


Fig. 2. Template with three areas of 1 cm^2 each for CAP treatment for 30s, 1min or 2min.

Table 1
Decontamination rate with respect to treatment time.

Bacteria species	Mean decontamination rate							
	% Decontamination (each n = 12)			Log reduction (each n = 12)			P-value	η^2
	0.5 min	1 min	2 min	0.5 min	1 min	2 min		
<i>E. coli</i>	99.98	99.99	100	4.52	5.74 ^a	5.92 ^a	0.001	0.286
<i>P. multocida</i>	89.97	99.98	99.99	3.97	5.15	5.16	0.096	0.084
<i>P. aeruginosa</i>	98.71	99.99	100	3.64	4.37	5.59 ^a	0.227	0.045
<i>S. canis</i>	83.11	97.09	99.96	2.49	3.66	3.95	0.009	0.195
<i>S. aureus</i>	72.25	79.98	97.90	1.85	2.54	4.18	0.001	0.291
<i>S. pseudintermedius</i>	67.85	68.19	78.31	2.29	2.40	2.99	0.413	0.021

^a 8 log reduction is used for calculation.

3.2. Decontamination effect with regard to bacterial growth phase

The decontamination rate per growth phase and bacterial strain is shown in Table 2. Higher decontamination rates were achieved in growing bacteria of *Pasteurella multocida*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *S. pseudintermedius* as opposed to their stationary forms. However, this difference was only significant for *S. pseudintermedius* ($P = .001$). Only *S. canis* showed a slightly higher decontaminating effect in the stationary form. In *E. coli*, no difference was detectable between the two bacterial proliferation phases.

3.3. Decontamination effect with regard to initial bacteria concentration

The decontamination rate per initial concentration and bacteria species is given in Table 3. With the exception of *E. coli*, bacteria concentration significantly influenced decontamination in all tested bacteria. This implies that with higher dilution, more effective decontamination is achieved through lower bacteria concentration.

Furthermore the effect of initial concentration ($P = .000$) seems to be higher compared with the growth phase ($P = .001$) of *S. pseudintermedius*. In *S. canis*, initial concentration ($P = .001$) has a greater effect compared to treatment time ($P = .009$).

3.4. Decontamination effect with regard to bacteria species

The overall logarithmic growth reduction of bacteria in all treated areas ($n = 216$) ranged between log 2.56 and 5.39, in percentage terms between 71.4 and 99.9%. Treatment of Gram-negative bacteria (*E. coli* 99.99% = 5.39 log ($n = 36$), *Pasteurella multocida* 96.65% = 4.76 log ($n = 36$), *P. aeruginosa* 99.6% = 4.54 log ($n = 36$)) resulted in an improved decontamination compared to Gram-positive species (*S. canis* 93.4% = 3.37 log ($n = 36$), *S. aureus* 82.1% = 2.86 log ($n = 36$) and *S. pseudintermedius* 71.4% = 2.56 log ($n = 36$)).

An overview of initial bacterial concentration of each bouillon, CFUs before and after treatment for each serial dilution, treatment time and proliferation phase of respective bacteria species is given in Table 4.

4. Discussion

The aim of this study was to investigate the *in vitro* efficiency of CAAP on selected bacteria frequently encountered in canine bite wounds. Based on the overall effect, CAAP treatment seems to represent an interesting alternative to antiseptic wound treatment, especially since no known mechanisms for bacterial resistance have been documented in the literature (Heinlin et al., 2011; Daeschlein et al., 2012a; Daeschlein et al., 2015). Flynn et al. (2015) even documented a high efficiency against so-called ESKAPE bacteria (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*), a group of pathogens frequently encountered in hospital-acquired infections in humans and

animals (Weese, 2008; Flynn et al., 2015; Nolf et al., 2016).

However, the first study evaluating its effect in bite wounds in dogs did not find any decontaminating effect *in vivo* at all (Winter et al., 2018). Based on the beneficial results in experimental and human applications, this finding seems peculiar. We therefore wanted to evaluate the effect of the plasma source used *in vivo* in dog bite wounds in an *in vitro* setting to evaluate the general efficacy. We were able to prove that several factors impact CAAP performance, including initial bacterial contamination, treatment duration, bacterial growth phase and bacterial species.

The bacterial contamination of wounds is something that cannot be influenced through the clinician as it occurs before the patient is presented for medical treatment. Nevertheless, this study underlines the importance to reduce the contamination rate of wounds as far as possible before application of CAAP in order to achieve the maximum effect. In a clinical scenario, this can be achieved by debridement and pre lavage, which should always be performed based on our *in vitro* results.

As previously reported, we could detect a superior decontamination effect on Gram-negative bacteria compared with Gram-positive isolates. Laroussi et al. (2003) had previously detected superior effects in Gram-negative bacteria. They found that CAP treatment induced cell wall destruction, leading to loss of integrity and cytoplasm was distributed in clumps in Gram-negative bacteria compared to untreated controls. In contrast, no differences between treated and untreated Gram-positive bacteria were detectable (Laroussi et al., 2003). These findings are in concordance with findings documented by Matthes et al. (2013), who reported lower decontamination rates for *S. epidermidis* compared to *P. aeruginosa*. The accumulation of the electrostatic force created by the CAP treatment is more crucial in Gram-negative species. This effect has been linked to their irregular rough outer membrane (Mendis et al., 2000; Montie et al., 2000; Laroussi et al. 2002). In contrast Lu et al. (2014) described the loss of cell integrity and additional DNA damage through time dependent CAP treatment and indicated that gram positive bacteria are more sensitive for inactivation induced by CAP than Gram-negative bacteria. The attending cannot influence the contamination under clinical conditions, and frequently there is a mixed flora of Gram-negative and Gram-positive bacteria present (Nolf et al., 2016). Despite the influence of bacteria species, the overall effect is still profound. Thus, clinical usage without knowledge of the wound status might still be helpful. However, if the contamination is known, CAAP is especially useful in treating patients affected by Gram-negative bacteria. Gram-positive bacteria should not be disregarded for CAAP treatment because of relatively good decontaminating results.

Yu et al. (2006) investigated the influence of CAP on the mid and late exponential phase as well as the stationary phase of treated bacteria. The study showed up, that exponential phases of bacteria are generally not more susceptible than their stationary phases, even cells in the mid exponential phase showed up a higher resistance than the other ones to plasma treatment. Bacteria in the stationary phase are more resistant to inimical processes than bacteria in the exponential growth phase (Dodd et al., 1997). It seems logical, that improved

S. Winter, et al.

Journal of Microbiological Methods 169 (2020) 105728

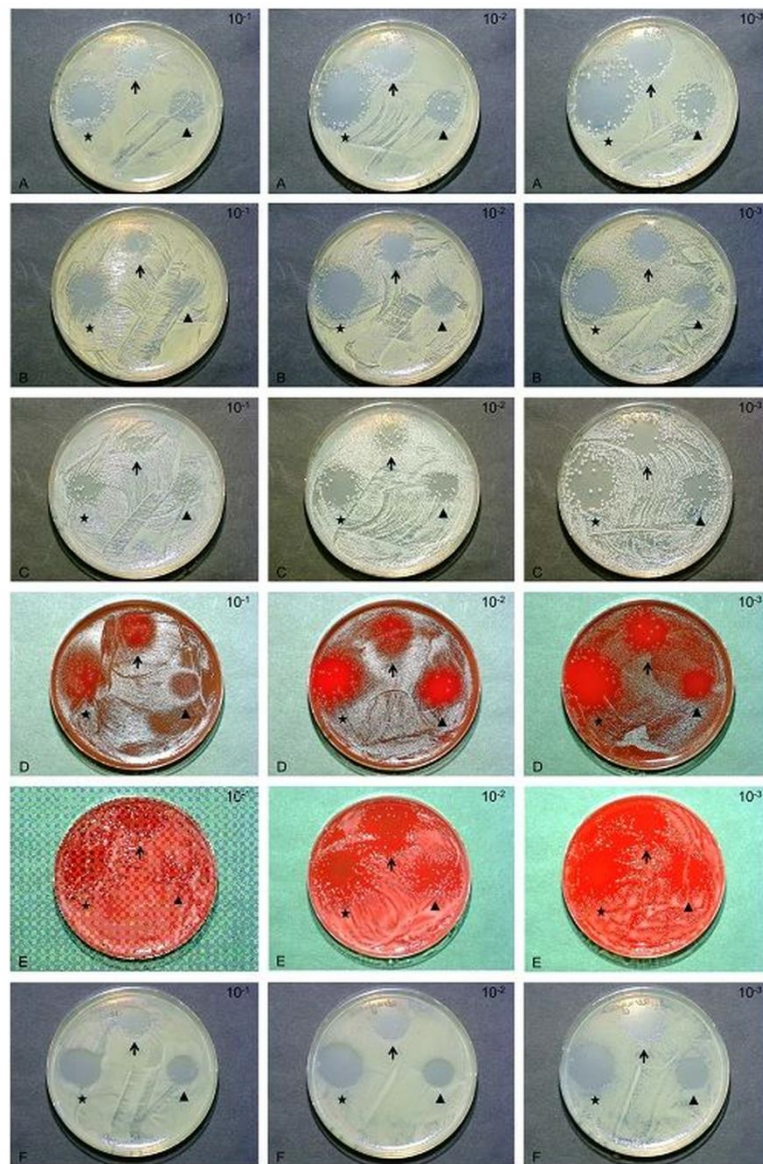


Fig. 3. Effect of treatment time (arrowhead, 30s, black arrow, 1min, *, 2min) on different concentrations (left row 10^{-1} , middle row 10^{-2} and right row 10^{-3} bacteria) of *Escherichia coli* (A), *Staphylococcus aureus* (B), *Staphylococcus pseudintermedius* (C), *Streptococcus canis* (D), *Pasteurella multocida* (E) as well as *Pseudomonas aeruginosa* (F) during the growth phase.

Table 2
Decontamination rate with respect to bacterial growth phase.

Bacteria species	Mean decontamination rate						
	% Decontamination (each n = 18)		Log reduction (each n = 18)			P-value	η^2
	Exponential	Stationary	Exponential	Stationary			
<i>E. coli</i>	99.99	99.99	5.31*	5.48*	0.944	0.000	
<i>P. multocida</i>	97.20	96.10	4.68	4.84	0.879	0.001	
<i>P. aeruginosa</i>	99.98	99.14	4.53*	4.54*	0.718	0.004	
<i>S. canis</i>	92.49	94.28	3.09	3.64	0.373	0.025	
<i>S. aureus</i>	87.66	79.09	3.18	2.54	0.428	0.020	
<i>S. pseudintermedius</i>	84.15	58.75	3.31	1.81	0.001	0.295	

* 8 log reduction is used for calculation.

metabolism, as can be encountered in growing germs, might be linked with increased susceptibility to CAP compared to a more resting, stationary phase. We found that this aspect is negligible for most Gram-positive and Gram-negative tested bacteria species, with the exception of *S. pseudintermedius*, in which growth significantly improved the CAAP effect. This finding is interesting, especially as no such difference was detected in *S. aureus*. However, individual differences, even between strains of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) have been recently described (Matthes et al., 2016).

We also detected an impact of bacteria concentration on decontamination in all tested bacteria despite *E. coli*, with higher concentrations being less susceptible than lower concentrations. This effect was especially profound in *S. pseudintermedius* and *S. canis*. Our results agree to those of Fernandez et al. (2012), who could equally confirm a higher efficiency of CAP at lower bacteria concentration. In contrast to bacteria species and growth phase, bacteria concentration can actually be influenced in clinical cases by debridement and intense lavage, which should be included to reduce the concentration and treatment time and increase the efficiency of CAAP in clinical situations.

Finally, it was observed that increased treatment time results in increased decontamination, with the first decontamination effects visible after 30 s and a treatment time of 2 min being most effective. This is in concordance with the results of Matthes et al. (2013), who described a time-dependent linear efficiency of decontamination between 30 s and 5 min (300 s). Dose represents a term that remains under debate for plasma applications (Von Woedtke et al., 2013). Several studies have defined treatment time as dose-dependent; however, the energy level and amount of energy transferred should ideally also be included in determining the effective dose (Von Woedtke et al., 2013). Furthermore, other adjunctive treatments to CAP can increase the effective dose. It has been proven that irradiation of saline solution with CAP induces ionisation in the liquid, lowers the pH and alters reactive species within the fluid, making it bactericidal (Von Woedtke et al., 2013). Thus, the addition of saline lavage before treatment might exert an even bigger effect than pure CAP treatment.

Table 3
Decontamination rate with respect to bacterial concentration.

Bacteria species	Mean decontamination rate							
	% decontamination (each n = 12)			Log reduction (each n = 12)			P-value	η^2
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}		
<i>E. coli</i>	99.99	99.99	99.99	6.75*	4.88	4.55	0.127	0.071
<i>P. multocida</i>	89.98	99.98	99.98	4.43	5.09	4.51	0.004	0.234
<i>P. aeruginosa</i>	98.74	99.98	99.97	5.15	4.40	4.06	0.004	0.228
<i>S. canis</i>	80.80	99.55	99.81	2.27	4.08	3.74	0.001	0.282
<i>S. aureus</i>	72.08	78.30	99.76	1.53	2.57	4.47	0.021	0.157
<i>S. pseudintermedius</i>	30.98	84.56	98.81	0.92	3.13	3.63	0.000	0.352

* 8 log reduction is used for calculation.

It is important to consider that CAP dose exerts an impact on bacteria as well as on host cells. Therefore, the maximum dose has to be limited below the threshold that becomes toxic for the host (Von Woedtke et al., 2013). It has been proven that lower doses of plasma increase angiogenesis in host tissue, while higher doses induce cell death (Laroussi, 2009; Von Woedtke et al., 2013). Fortunately, the lethal dose for bacteria is much smaller than the lethal dose for host tissue cells, leaving a wide safety margin for application (Hammann et al., 2010; Ermolaeva et al., 2011; Koban et al., 2011; Daeschlein et al., 2012; Lademann et al., 2012; Bundscherer et al., 2013; Matthes et al., 2013; Wende et al., 2014; Kisch et al., 2016).

Based on the significant results achieved in this *in vitro* trial, we are not able to explain the poor performance of CAAP in the clinical situation. We were able to prove, that the used device in the used setting is capable of effectively killing the most frequently encountered bacteria types. However, the data of the current trial underline the importance of appropriate exposure time. The design of the KinPen Vet is adapted to clinical use, facilitating easy application and transportability. Unfortunately, the design allows only treatment of a relatively small area about 1 cm². The duration of treatment not only influences the rate of decontamination but also increases the decontaminated area. This effect has been previously described in CAP-treated culture wells and is hypothesized to be a reflection of the plasma jet at the surface of the well. Another potential explanation for this inhibitory effect around the actual treated area might include the diffusion and activation of oxygen radicals within the perimeter of the treated area (Joshi et al., 2010).

Therefore, a needed dose of 2 min per cm² might result in a long treatment time in clinical patients, prolonging anaesthesia time and thus increasing the risk for surgical site infections. We think that this effect represents the most important clinical limitation. If the results of the study by Winter et al. (2018) are interpreted under the light of our current findings, we think that the usage of bigger devices, which allow appropriate treatment time under clinical conditions, would most likely improve performance *in vivo*.

Table 4
Overview of countable CFU's before and after cold argon plasma treatment with initial CFU per ml and CFU per cm².

Bacteria species	Trial	Incubation time of bouillon (hours)	CFU/ml inoculum bouillon (0-value)	CFU/ml for agar plate (after 3 h / 8 h of incubation)	CFU/cm ² plasma treatment (per area)	Countable CFU's in area after treatment (for serial dilution and treatment time)											
						10 ⁻¹ -and 30 s	10 ⁻¹ -and 1 min	10 ⁻¹ -and 2 min	10 ⁻² -and 30 s	10 ⁻² -and 1 min	10 ⁻² -and 2 min	10 ⁻³ -and 30 s	10 ⁻³ -and 1 min	10 ⁻³ -and 2 min			
<i>E. coli</i>	1	3	12 × 10 ⁻⁶	31 × 10 ⁻⁷	53 × 10 ⁻⁴	2	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0
	2	3	73 × 10 ⁻⁵	64 × 10 ⁻⁷	11 × 10 ⁻⁵	24	0	0	0	6	0	0	2	0	0	0	0
<i>P. multocida</i>	1	3	29 × 10 ⁻⁶	25 × 10 ⁻⁷	43 × 10 ⁻⁴	37	0	0	0	3	0	0	1	0	0	0	0
	2	3	32 × 10 ⁻⁶	83 × 10 ⁻⁷	14 × 10 ⁻⁵	14	2	0	0	3	0	0	2	0	0	0	0
	3	3	31 × 10 ⁻⁶	33 × 10 ⁻⁷	57 × 10 ⁻⁴	4	4	5	5	8	6	2	5	1	0	0	0
	4	3	26 × 10 ⁻⁶	67 × 10 ⁻⁷	12 × 10 ⁻⁵	5	2	3	4	8	3	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	1	3	69 × 10 ⁻⁶	12 × 10 ⁻⁸	21 × 10 ⁻⁵	-	19	12	15	3	1	12	3	0	0	0	0
	2	3	4 × 10 ⁻⁶	1 × 10 ⁻⁸	18 × 10 ⁻⁵	-	14	9	6	0	5	4	2	0	0	0	0
	3	3	69 × 10 ⁻⁶	11 × 10 ⁻⁷	18 × 10 ⁻⁴	14	5	0	5	2	0	0	0	0	0	0	0
	4	3	19 × 10 ⁻⁶	12 × 10 ⁻⁷	21 × 10 ⁻⁴	41	8	0	1	5	0	0	1	0	0	0	0
<i>S. cerevisiae</i>	1	3	79 × 10 ⁻⁶	11 × 10 ⁻⁷	18 × 10 ⁻⁴	24	19	0	8	0	0	0	1	0	0	0	0
	2	3	42 × 10 ⁻⁶	33 × 10 ⁻⁷	57 × 10 ⁻⁴	-	25	0	27	0	0	0	7	1	0	0	0
	3	3	16 × 10 ⁻⁶	14 × 10 ⁻⁷	24 × 10 ⁻⁴	-	18	11	18	11	8	10	2	0	0	0	0
	4	3	13 × 10 ⁻⁶	95 × 10 ⁻⁶	16 × 10 ⁻³	50	17	20	6	3	2	2	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	1	3	12 × 10 ⁻⁵	14 × 10 ⁻⁶	24 × 10 ⁻³	20	33	18	3	83	4	21	14	0	0	0	0
	2	3	38 × 10 ⁻⁴	14 × 10 ⁻⁷	45 × 10 ⁻⁴	16	33	95	211	4	20	26	5	0	0	0	0
	3	3	23 × 10 ⁻⁷	26 × 10 ⁻⁷	64 × 10 ⁻⁴	-	-	-	-	30	50	50	4	0	0	0	0
	4	3	13 × 10 ⁻⁷	37 × 10 ⁻⁷	47 × 10 ⁻⁴	30	1	100	1	100	1	30	13	0	0	0	0
<i>S. pseudintermedius</i>	1	3	77 × 10 ⁻⁶	72 × 10 ⁻⁷	12 × 10 ⁻⁵	-	-	-	-	65	33	24	16	6	0	0	0
	2	3	77 × 10 ⁻⁶	11 × 10 ⁻⁷	18 × 10 ⁻⁴	-	-	-	-	65	33	24	16	6	0	0	0
	3	3	11 × 10 ⁻⁷	27 × 10 ⁻⁶	47 × 10 ⁻³	-	-	-	-	65	33	24	16	6	0	0	0
	4	3	80 × 10 ⁻⁶	94 × 10 ⁻⁶	16 × 10 ⁻⁴	83	60	14	15	36	2	20	24	24	4	0	0
5	3	47 × 10 ⁻⁶	3 × 10 ⁻⁶	52 × 10 ⁻³	-	-	-	-	120	72	35	30	2	2	0	0	

* CFU's not countable under visual control.

S. Winter, et al.

Journal of Microbiological Methods 169 (2020) 105728

5. Conclusion

CAAP exerts a substantial decontamination effect on bacteria frequently found in animal bite injuries *in vitro*. Even if Gram-negative and positive bacteria are affected differently by CAP treatment, there is no formation of complete bacteria resistance (without any effect on bacteria), which is why this treatment might present an interesting alternative for local wound decontamination *in vivo*. However, bacteria concentration should initially be reduced as far as possible before initiation of CAAP treatment in clinical cases. Furthermore, adequate treatment time must be ensured.

Declaration of Competing Interest

NeoPlas Greifswald supplied the KinPen Vet used in this study. NeoPlas played no role in the study design, data collection, analysis and interpretation of data, or the decision to submit the manuscript for publication. None of the authors has any financial or personal relationships that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgements

The authors want to thank NeoPlas for supplying the KinPen Vet to perform this study. Preliminary results were presented as an oral presentation and abstract at the Annual Meeting of the Veterinary Wound Healing Association, Bremen, May 12th 2016 as well as the 62nd Annual Meeting of the German Veterinary Society, Berlin, 27th – 30th October 2016.

References

- Assadian, O., 2007. From Antiseptics to Antibiotics - and Back? GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär 2, Doc26.
- Brelles-Marino, G., 2012. Induction of a viable-but-non-culturable state in bacteria treated with gas discharge plasma. *J. Appl. Microbiol.* 112, 412–413 (author reply 414–415).
- Bundscherrer, L., Wende, K., Ottmüller, K., Barton, A., Schmidt, A., Bekeschus, S., Hasse, S., Weltmann, K.D., Masur, K., Lindequist, U., 2013. Impact of non-thermal plasma treatment on MAPK signaling pathways of human immune cell lines. *Immunobiology* 218, 1248–1255.
- Cooper, M., Fridman, G., Fridman, A., Joshi, S.G., 2010. Biological responses of bacillus stratosphericus to floating electrode-dielectric barrier discharge plasma treatment. *J. Appl. Microbiol.* 109, 2039–2048.
- Cotter, J.J., Maguire, P., Soberon, F., Daniels, S., O'Gara, J.P., Casey, E., 2011. Disinfection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms using a remote non-thermal gas plasma. *J. Hosp. Infect.* 78, 204–207.
- Daeschlein, G., von Woedtke, T., Kindel, E., Brandenburg, R., Weltmann, K.D., Jünger, M., 2010. Antibacterial activity of an atmospheric pressure plasma jet against relevant wound pathogens *in vitro* on a simulated wound environment. *Plasma Process. Polym.* 7, 224–230.
- Daeschlein, G., Scholz, S., Arnold, A., von Podewils, S., Haase, H., Emmert, S., von Woedtke, T., Weltmann, K.D., Jünger, M., 2012a. *In vitro* susceptibility of important skin and wound pathogens against low temperature atmospheric pressure plasma jet (APPJ) and dielectric barrier discharge plasma (DBD). *Plasma Process. Polym.* 9, 380–389.
- Daeschlein, G., Scholz, S., Ahmed, R., Majumdar, A., von Woedtke, T., Haase, H., Niggemeier, M., Kindel, E., Brandenburg, R., Weltmann, K.D., 2012b. Cold plasma is well-tolerated and does not disturb skin barrier or reduce skin moisture. *JDDG* 10, 509–515.
- Daeschlein, G., Napp, M., Lütze, S., Arnold, A., von Podewils, S., Guemdel, D., Junger, M., 2015. Skin and wound decontamination of multidrug-resistant bacteria by cold atmospheric plasma coagulation. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology* 13, 143–150.
- Dodd, C.E.R., Sharman, R.L., Bloomfield, S.F., Booth, I.R., Stewart, G.S.A.B., 1997. Inimical processes: bacterial self-destruction and sub-lethal injury. *Trends Food Sci. Technol.* 8, 238–241.
- Ermolaeva, S.A., Varfolomeev, A.F., Chernukha, M.Y., Yurov, D.S., Vasiliev, M.M., Kaminskaya, A.A., Moisevich, M.M., Romanova, J.M., Murashev, A.N., Selezneva, L.I., Shimizu, T., Sisyolovskaya, E.V., Shaginyan, L.A., Petrov, O.F., Mayevsky, E.I., Fortov, V.E., Morfill, G.E., Naroditsky, B.S., Gintsburg, A.L., 2011. Bactericidal effects of non-thermal argon plasma *in vitro*, in biofilms and in the animal model of infected wounds. *J. Med. Microbiol.* 60, 75–83.
- Farr, S.B., Kogoma, T., 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.* 55, 561–585.
- Fernandez, A., Shearer, N., Wilson, D.R., Thompson, A., 2012. Effect of microbial loading on the efficiency of cold atmospheric gas plasma inactivation of salmonella enterica serovar typhimurium. *Int. J. Food Microbiol.* 152, 175–180.
- Fluhr, J.W., Sessing, S., Lademann, O., Darvin, M.E., Schanzer, S., Kramer, A., Richter, H., Sterry, W., Lademann, J., 2012. *In vivo* skin treatment with tissue-tolerable plasma influences skin physiology and antioxidant profile in human stratum corneum. *Exp. Dermatol.* 21, 130–134.
- Flynn, P.B., Higginbotham, S., Alshraideh, N.H., Gorman, S.P., Graham, W.G., Gilmore, B.F., 2015. Bactericidal efficacy of atmospheric pressure non-thermal plasma (APNTP) against the ESKAPE pathogens. *Int. J. Antimicrob. Agents* 46, 101–107.
- Gadri, R.B., Roth, J.R., Montie, T.C., Kelly-Winterberg, K., Tsai, P.P.-Y., Helfrich, D.J., Feldman, P., Sherman, D.M., Karakaya, F., Chen, Z., 2000. Sterilization and plasma processing of room temperature surfaces with a one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAU-GDP). *Surf. Coat. Technol.* 131, 528–541.
- Gaunt, L.F., Beggs, C.B., Georgiu, G.E., 2006. Bactericidal action of the reactive species produced by gas-discharge nonthermal plasma at atmospheric pressure: a review. *IEEE Trans. on Plasma Sci.* 34, 1257–1269.
- Hammann, A., Huebner, N.O., Bender, C., Ekkernkamp, A., Hartmann, B., Hinz, P., Kindel, E., Koban, I., Koch, S., Kohmann, T., Lademann, J., Matthes, R., Müller, G., Titze, R., Weltmann, K.D., Kramer, A., 2010. Antiseptic efficacy and tolerance of tissue-tolerable plasma compared with two wound antiseptics on artificially bacterially contaminated eyes from commercially slaughtered pigs. *Skin Pharmacol. Physiol.* 23, 328–332.
- Harbarth, S., 2007. The effect of antimicrobial use on emergence and selection of resistance. *Anaesthesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther.* 42, 130–135.
- Heinlin, J., Ishary, G., Stolz, W., Morfill, G., Landthaler, M., Shimizu, T., Steffes, B., Nosenko, T., Zimmermann, J., Karrer, S., 2011. Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology. *J. Invest. Dermatol.* 125, 1–11.
- Imlay, J.A., 2003. Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 395–418.
- Joaquin, J.C., Kwan, C., Abramzon, N., Vandervoort, K., Brelles-Martino, G., 2009. Is Gas-Discharge Plasma a New Solution to the Old Problem of Biofilm Inactivation? *Microbiology* 155, 724–732 (Reading, England).
- Joshi, S.G., Paff, M., Fridman, G., Fridman, A., Brooks, A.D., 2010. Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in planktonic form and biofilms: a biocidal efficacy study of nonthermal dielectric-barrier discharge plasma. *Am. J. Infect. Control* 38, 293–301.
- Joshi, S.G., Cooper, M., Yost, A., Paff, M., Ercan, U.K., Fridman, G., Fridman, A., Brooks, A.D., 2011. Nonthermal dielectric-barrier discharge plasma-induced inactivation involves oxidative DNA damage and membrane lipid peroxidation in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 1053–1062.
- Kisch, T., Helmke, A., Schleusser, S., Song, J., Liodaki, E., Stang, F.H., Mailänder, P., Kraemer, R., 2016. Improvement of cutaneous microcirculation by cold atmospheric plasma (Besnard et al.): results of a controlled, prospective cohort study. *Microvasc. Res.* 104, 55–62.
- Koban, I., Holtfreter, B., Hubner, N.O., Matthes, R., Sietmann, R., Kindel, E., Weltmann, K.D., Welk, A., Kramer, A., Kocher, T., 2011. Antimicrobial efficacy of non-thermal plasma in comparison to chlorhexidine against dental biofilms on titanium discs *in vitro* - proof of principle experiment. *J. Clin. Periodontol.* 38, 956–965.
- Kramer, A., Roth, B., Müller, G., Rudolph, P., Klocker, N., 2004. Influence of the antiseptic agents polyhexanide and octenidine on FL cells and on healing of experimental superficial aseptic wounds in piglets. A double-blind, randomised, stratified, controlled, parallel-group study. *Skin Pharmacol. Physiol.* 17, 141–146.
- Lademann, J., Richter, H., Schanzer, S., Patzelt, A., Thiede, G., Kramer, A., Weltmann, K.D., Hartmann, B., Lange-Asschenfeldt, B., 2012. Comparison of the antiseptic efficacy of tissue-tolerable plasma and an octenidine hydrochloride-based wound antiseptic on human skin. *Skin Pharmacol. Physiol.* 25, 100–106.
- Laroussi, M., 2002. Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: review, analysis, and prospects. *IEEE Trans. Plasma Sci.* 30, 1409–1415.
- Laroussi, M., 2009. Low-temperature plasmas for medicine? *IEEE Trans. on Plasma Sci.* 37, 714–725.
- Laroussi, M., Leipold, F., 2004. Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *Int. J. Mass Spectrom.* 233, 81–86.
- Laroussi, M., Mendis, D., Rosenberg, M., 2003. Plasma interaction with microbes. *New J. Phys.* 5, 41.
- Lozier, S., Pope, E., Berg, J., 1992. Effects of four preparations of 0.05% chlorhexidine diacetate on wound healing in dogs. *Vet. Surg.* 21, 107–112.
- Lu, H., Patil, S., Keener, K.M., Cullen, P.J., Bourke, P., 2014. Bacterial inactivation by high-voltage atmospheric cold plasma: influence of process parameters and effects on cell leakage and DNA. *J. Appl. Microbiol.* 116, 784–794.
- Mai-Prochnow, A., Murphy, A.B., McLean, K.M., Kong, M.G., Ostrikov, K.K., 2014. Atmospheric pressure plasmas: infection control and bacterial responses. *Int. J. Antimicrob. Agents* 43, 508–517.
- Matthes, R., Koban, I., Bender, C., Masur, K., Kindel, E., Weltmann, K.D., Kocher, T., Kramer, A., Hübner, N.O., 2013. Antimicrobial efficacy of an atmospheric pressure plasma jet against biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Plasma Process. Polym.* 10, 161–166.
- Matthes, R., Hubner, N.O., Bender, C., Koban, I., Horn, S., Bekeschus, S., Weltmann, K.D., Kocher, T., Kramer, A., Assadian, O., 2014. Efficacy of different carrier gases for barrier discharge plasma generation compared to chlorhexidine on the survival of *Pseudomonas aeruginosa* embedded in biofilm *in vitro*. *Skin Pharmacol. Physiol.* 27, 148–157.
- Matthes, R., Lührman, A., Holtfreter, S., Kolata, J., Radke, D., Hubner, N.O., Assadian, O., Kramer, A., 2016. Antibacterial activity of cold atmospheric pressure argon plasma against 78 genetically different (mecA, luk-P, agr or capsular polysaccharide type)

S. Winter, et al.

Journal of Microbiological Methods 169 (2020) 105728

- Staphylococcus aureus strains. *Skin Pharmacol. Physiol.* 29, 83-91.
- Mendis, D., Rosenberg, M., Azam, F., 2000. A note on the possible electrostatic disruption of bacteria. *IEEE Transac. Plasma Sci.* 28, 1304-1306.
- Montie, T.C., Kelly-Wintenberg, K., Roth, J.R., 2000. An overview of research using the one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP) for sterilization of surfaces and materials. *IEEE Transac. Plasma Sci.* 28, 41-50.
- Nolff, M.C., Reese, S., Fehr, M., Dening, R., Meyer-Lindenberg, A., 2016. Assessment of wound bio-burden and prevalence of multi-drug resistant bacteria during open wound management. *J. Small Anim. Pract.* 57, 255-259.
- Ogeer-Gyles, J.S., Mathews, K.A., Boerlin, P., 2006. Nosocomial infections and antimicrobial resistance in critical care medicine. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* 16, 1-18.
- Sanchez, I.R., Swaim, S.F., Nusbaum, K.E., Hale, A.S., Henderson, R.A., McGuire, J.A., 1988. Effects of chlorhexidine diacetate and povidone-iodine on wound healing in dogs. *Vet. Surg.* 17, 291-295.
- Taghizadeh, L., Brackman, G., Nikiforov, A., van der Mullen, J., Leys, C., Coenye, T., 2015. Inactivation of biofilms using a low power atmospheric pressure argon plasma jet; the role of entrained nitrogen. *Plasma Process. Polym.* 12, 75-81.
- Vatansever, F., de Melo, W.C., Avci, P., Vecchioni, D., Sadasivam, M., Gupta, A., Chandran, R., Karimi, M., Parizotto, N.A., Yin, R., Tegos, G.P., Hamblin, M.R., 2013. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species-bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 955-989.
- Von Woedtke, T., Reuter, S., Masur, K., Weltmann, K.D., 2013. Plasmas for medicine. *Phys. Rep.* 530, 291-320.
- Weese, J.S., 2008. A review of multidrug resistant surgical site infections. *Vet. Comp. Orthopaedics Traumatol.* 21, 1-7.
- Wende, K., Strassenburg, S., Haerfel, B., Harms, M., Holtz, S., Barton, A., Masur, K., von Woedtke, T., Lindequist, U., 2014. Atmospheric pressure plasma jet treatment evokes transient oxidative stress in HaCaT keratinocytes and influences cell physiology. *Cell Biol. Int.* 38, 412-425.
- Winter, S., Nolff, M.C., Reese, S., Meyer-Lindenberg, A., 2018. Comparison of the antibacterial efficacy of polyhexanide, cold atmospheric argon plasma and saline in the treatment of canine bite wounds. *Tierärztliche Praxis, Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere* 46, 73-82.
- Yu, H., Perni, S., Shi, J., Wang, D., Kong, M., Shama, G., 2006. Effects of cell surface loading and phase of growth in cold atmospheric gas plasma inactivation of *Escherichia coli* K12. *J. Appl. Microbiol.* 101, 1323-1330.
- Zhang, Q., Liang, Y., Feng, H., Ma, R., Tian, Y., Zhang, J., Fang, J., 2013. A study of oxidative stress induced by non-thermal plasma-activated water for bacterial damage. *Appl. Phys. Lett.* 102, 203701.

V. PUBLIKATION III

Eingereicht am 1. Oktober 2018 bei Journal of Small Animal Practice, akzeptiert zur Veröffentlichung nach Revision am 18. Oktober 2018.

In-vivo-Studie II: Comparison of polyhexanide, cold atmospheric plasma and saline in the treatment of canine bite wounds

M. C. Nolff*, S. Winter*, S. Reese† and A. Meyer-Lindenberg*

* Clinic for Small Animal Surgery and Reproduction, Ludwig-Maximilians-University, Munich 80539, Germany

† Department for Basic Veterinary Sciences, Ludwig-Maximilians-University, Munich 80539, Germany

PAPER

Comparison of polyhexanide, cold atmospheric plasma and saline in the treatment of canine bite wounds

M. C. NOLFF¹*, S. WINTER²*, S. REESE¹ AND A. MEYER-LINDENBERG*

*Clinic for Small Animal Surgery and Reproduction, Ludwig-Maximilians-University, Munich 80539, Germany

¹Department for Basic Veterinary Sciences, Ludwig-Maximilians-University, Munich 80539, Germany

¹Corresponding author email: m.nolff@lmu.de

OBJECTIVES: To compare the efficacy of polyhexanide, cold argon plasma and saline in reducing bacterial bio-burden in dog bite wounds.

MATERIALS AND METHODS: Prospective blinded randomised clinical trial. Dogs were randomly assigned to one of the treatment groups by lottery and bacterial cultures obtained before and after treatment were compared. Bite wounds were surgically debrided and treated with polyhexanide, cold argon plasma or saline lavage. All wounds were cultured three times: directly after debridement, directly after prelavage with 2 mL/cm² (saline in the saline and cold argon plasma group, or polyhexanide) and following the definitive lavage. Data were analysed using a generalised linear model for ordinal data.

RESULTS: A total of 85 dogs were enrolled in this study (polyhexanide n=29, cold argon plasma n=28, saline n=28). Positive bacterial culture results after debridement were obtained in 53/85 (62.3%) wounds. Polyhexanide and saline lavage significantly reduced the bio-burden, while cold argon plasma treatment did not. This effect was evident after prelavage when polyhexanide performed significantly better than saline and cold argon plasma as well as after final treatment. No significant differences were detected after prelavage or main treatment between saline and cold argon plasma.

CLINICAL SIGNIFICANCE: Polyhexanide lavage achieved the best immediate and ultimate decontamination of bite wounds.

Journal of Small Animal Practice (2018)

DOI: 10.1111/jsap.12971

Accepted: 18 October 2018

INTRODUCTION

Bacterial contamination can occur in approximately 48.4% of bite wounds, with 6% of the bacteria classified to be multidrug resistant (MDR) (Nolff *et al.* 2016). More recent prospective investigations have even detected contamination rates as high as 87.5%, with 19.8% of all patients being affected by MDR bacteria (Winter *et al.* 2018). While rising MDR rates have led to investigation of wound antiseptics in human medicine (Kramer *et al.* 2004, Assadian 2007, Daeschlein 2013), research regarding wound antiseptics in veterinary patients is sparse. The use of chlorhexidine in small animal surgery dates back to the works of Lozier *et al.* (1992) and Sanchez *et al.* (1988). This recommendation

contrasts with the current recommendations in human medicine (Kramer *et al.* 2004, 2018, Assadian 2007, Daeschlein 2013). Most importantly, resistance against chlorhexidine has been documented and may even induce cross-resistance against different antibiotic classes, including macrolides and vancomycin (Willy 2013, Beier *et al.* 2015, Bhardwaj *et al.* 2016). Understandably, newer antiseptic alternatives such as polyhexanide-biguanide and physical treatments have gained increasing interest in human medicine (Kramer *et al.* 2004, 2018, Assadian 2007, Daeschlein 2013).

Recently, the combination of polyhexanide-biguanide was approved by the food and drug administration and licensed as a wound antiseptic in the USA (Eberlein & Assadian 2010). The

M. C. Nolff *et al.*

substance belongs to the biguanide group (as does chlorhexidine) and the proposed mechanism of action is binding and disruption of negatively charged membrane acid phospholipids (gram negative bacteria), teichoic acids (gram positive bacteria) and peptidoglycans (Kaehn 2010). Recent work by Chindera *et al.* (2016) found energy-dependent cell uptake of the chemical, causing cell elongation and chromosome condensation – a mechanism that has not been described so far for any other drug. In mammalian cells the substance is trapped in the endosomes and thus causes no harm (Ikeda *et al.* 1983, 1984, Kaehn 2010, Wessels & Ingmer 2013, Chindera *et al.* 2016). Due to this selective effect, polyhexanide is bactericidal with a high therapeutic index, displays a sustained postantiseptic effect, and is neither affected by blood nor proteins within the wound (Kramer *et al.* 2004, Müller & Kramer 2008, Eberlein & Assadian 2010, Kaehn 2010, Müller *et al.* 2013). While polyhexanide has been used in canine dermatologic indications (Mills *et al.* 2005), to our knowledge there are currently only very few veterinary reports available that investigated the effect of this modern wound antiseptic for wound decontamination (Nolff *et al.* 2015, Winter *et al.* 2018).

Among the physical antibacterial treatment options, cold plasma is one of the most highly investigated alternatives (Von Woedtke *et al.* 2013). Plasma is the fourth state of matter (solid, liquid, gas, plasma), and different effluents can be created depending on gas species, gas pressure and the amount of added energy. A mixture of electromagnetic radiation including infrared, visible and ultraviolet light, reactive oxygen and nitrogen species such as OH radicals, ozone and electric currents are created in the effluent at a tolerable temperature of between 38 and 63°C (Von Woedtke *et al.* 2013, Uchiyama *et al.* 2015). Although the exact mechanism of action is not fully understood, numerous *in vitro* studies have proven the high antibacterial efficiency of these systems (Daeschlein *et al.* 2010, 2012c, 2012d, 2015, Bender *et al.* 2011, Matthes *et al.* 2016). In addition to the *in vitro* studies, initial *in vivo* trials also showed a profound wound decontamination effect (Hammann *et al.* 2010, Daeschlein *et al.* 2012a, 2012b, Heinlein *et al.* 2013). So far, veterinary descriptions of plasma for wound decontamination are limited to the pilot study of this project, published in 2018 by Winter and colleagues. The pilot project was performed in order to allow a sample size calculation for this current follow-up study and was underpowered to detect statistical significance of treatment. Furthermore, it was an intention-to-treat design, so duration of cold argon plasma treatment as well as of polyhexanide application was not controlled.

The aim of this current study was to compare the decontaminating performance of polyhexanide, cold argon plasma and saline lavage in dog bite wounds. The study design (including treatment duration and volume) and sample size calculations were based on the results of a pilot study (Winter *et al.* 2018) that was completed before the start of the current study. No patients of the pilot study were included in the current study. Our hypothesis was that both polyhexanide and cold argon plasma treatment would result in greater bacterial bio-burden reduction than saline lavage.

MATERIALS AND METHODS

The study was performed after gaining approval of the ethics commission of our facility (38-20-12-2014) after completion of the pilot study between January and June 2015 (Winter *et al.* 2018). The results of this pilot project were used for initial evaluation of practicability of the treatments, as well as for sample size calculation. Both studies are independent from each other and were undertaken in sequence. Dogs were included if they had been presented to the clinic due to witnessed acute bite wound injuries without any prior surgical treatment between June 2015 and July 2017, and if a complete follow-up was available until suture removal. All patients were prospectively evaluated regarding signalment, injury location and type, bacterial bio-burden and effect of antiseptic treatment after debridement and randomly assigned to one of three treatment groups by lottery (polyhexanide-biguanide (ProntoVet®, B.Braun) cold argon plasma (kinPEN®VET, NeoPlas) or 0.9% saline (NaCl, B.Braun). The plasma device used in this study (kinPEN®VET) was an atmospheric plasma jet with a handheld unit and consisting of a 1-mm pin tip electrode mounted in the centre of a quartz capillary (1.6 mm inner diameter, Fig. 1). Argon was selected as a working gas at a flow of 4.5 standard L/minute. The gas was ignited at the tip of the electrode and created a jet-like effluent covering approximately 1 cm². At these settings the effluent had a visible length of 14 mm and a constant temperature of 48°C at the tip. The treatment surface was scanned at a distance of approximately 1 cm in a circular pattern.

Wound treatment

Patients were anaesthetised after stabilisation as needed (IV crystalloid fluids, electrolyte correction if necessary). The skin surrounding the wounds was aseptically prepared and washed using



FIG 1. Showing the CAP device during treatment. Note the ignited gas at the tip of the pen

bite wound antiseptics

iodine solution (Jodosept® PVP; Vetoquinol GmbH) and disinfected using alcohol (Softasept® N, B.Braun) while the wounds were covered with dry gauze. After preparation, all patients were transferred into the same operating room. Bacterial bioburden in the wounds was measured at three different time-points (baseline, after prelavage with a fixed volume of lavage solution of 2 mL/cm² wound area and no contact time, and finally after main lavage and a controlled soak time of 15 minutes after the lavage). The intention was to allow individual differentiation between the effect of time and lavage volume on total decontamination.

The wounds were surgically debrided, and the first culture swab was obtained by evenly rolling the swab over the entire wound surface, avoiding contact with the surrounding skin directly after debridement (sterile transport swab, Sarstedt AG & Co or Transystem®, Hain Lifescience GmbH). In cases with abdominal or thoracic perforation, the body cavity was closed after debridement, before the first swab was taken and lavage was performed. The size of the wounds was determined after debridement and before taking the first swab by measuring the wound length and width with a sterile ruler.

Prelavage with a defined volume of 2 mL/cm² was then performed as follows: in the saline and polyhexanide group the wound was rinsed with the assigned substance using low pressure (application using a syringe without a needle); in the cold argon plasma group the wound was prelavaged with saline. A second swab was taken directly after the used substance was fully drained from the wound surface after prelavage. Finally, the main lavage was performed using the substances of interest. Saline and polyhexanide were applied onto the wounds out of the container, with sterile gauze placed in the wound at the end of the lavage to enable a soak time of 15 minutes (Eberlein & Assadian 2010). The gauze was then removed after the 15 minutes were completed and the swab was taken from the moist wound surface as described before. For cold argon plasma treatment the maximum treatment time was set at 15 minutes, wounds that were smaller than 7.5cm² were treated in overlapping circles for 2 minutes/cm². After this, a third swab was obtained from the moist wound surface as described above. The volume used for the final lavage was at the discretion of the attending surgeon, and was recorded. The treatment volume was determined by subtracting the non-used volume from the total volume. The wounds were then closed using monofilament resorbable suture (polydioxanone, MonoPlus® B.Braun) with a Penrose drain inserted which exited at the ventral-most point adjacent to all wounds before closure. The wound and drain were covered by medical adhesive drape

(Cutiplast, Smith&Nephew). The wound location, wound size (cm²) as well as surgery time (initial incision until removal of surgery drapes), anaesthesia time (induction – extubation) and main lavage volume were documented.

Microbiological assessment

The culture swabs were routinely investigated by an accredited institute and bacterial species (maldi-TOF) as well as number of cultured bacteria (semi-quantitative score; (+)=growth after enrichment=category 1, +=1 to 10 CFU=category 2, ++ 11 to 100 CFU=category 3, +++ >100 CFU=category 4) were determined. Phenotypic antibiotic resistance was assessed according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI VET01 document) guidelines. Based on these results a summed contamination score was calculated for each time point by adding the semi-quantitative score of all detected isolates per swab (e.g. a wound with a ++ *Escherichia coli* (Bellingeri *et al.* 2016) plus (+) *Staphylococcus* (Assadian 2007) would result in a contamination score of 4 (Table S1, Supporting Information displays the distribution of summed scores at each sampling point).

All isolates were tested for susceptibility to the following: doxycycline, sulfonamide-trimethoprim, amoxicillin-clavulanic acid, cefalothin, cefovecin, nitrofurantoin, enrofloxacin, marbofloxacin, gentamicin, imipenem, ampicillin and amikacin. MDR was defined as described by Gandolfi-De Christophoris *et al.* (2013); detection of resistance (including intermediate effect; ECDC guidelines; European Centre for Disease Prevention and Control 2014) to three or more major antibiotic classes.

Follow-up

Body temperature and wound healing parameters (swelling, redness, heat and discharge from suture line or drainage exit) of all patients were evaluated the day after surgery. All animals were hospitalised as long as the drains were in place. Drains were removed on the third day after surgery or, if there was no discharge in the drape covering the drainage site in the 12 hours after drape exchange. The wound was checked finally at scheduled suture removal (at 10 days – either in our clinic or by the referring veterinarian). All complications detected during hospitalisation were recorded and graded into minor [no intervention (medical or surgical needed) and major (surgical intervention needed, death of patient)]. Complications recorded at suture removal included need for surgical revision or death. If revision was required because of infection the bacteria identified at the time of complication were compared to the results of the initial surgery.

Table 1. Overview of treatment parameters and baseline values of the different groups

Treatment Modality	Polyhexanid	Saline	CAP
Number of dogs included (n)	29	28	28
Mean wound area cm ² (sd)	63.5 (±107.2)	34.2 (±48.9)	26.8 (±36.1)
Mean surgery time in minutes (sd)	53.6 (±37.9)	61.43 (±55.4)	40.13 (±19.3)
Mean anaesthesia time in minutes (sd)	98.3 (±45.8)	61.3 (±55.4)	95.8 (±28.4)
Mean volume main lavage in ml (sd)	311.6 (±176.9)	1090 (±816.1)	–
Mean duration of argon treatment in minutes (sd)	–	–	13.8 (±2.7) (30.9 seconds/cm ²)

Statistics

A sample size analysis was performed using G*Power 3.1 software. The parameters were based on the results of the pilot study (Effect size of $d=0.8$, alpha error 0.05, power 0.8) resulting in a minimum required sample size of 28 *per* group. Statistical analysis was performed using SPSS® Statistics. Descriptive statistics were obtained, and all data were tested for normality using the Kolmogorov-Smirnov test. Intra- and intergroup comparisons of decontamination for each treatment were compared using a generalised linear model for ordinal data, with the significance level set at $P<0.05$.

RESULTS

Patient data

A total of 90 patients were initially included in this study: five were lost to follow-up resulting in a final group distribution of polyhexanide treatment, $n=29$; cold argon plasma treatment, $n=28$; and, saline, $n=28$. Altogether, 28 different breeds were included (Table S1). The mean age of patients was 5.7 months [(polyhexanide 5.7 (± 4.1) months, saline 6.1 (± 3.4) months, cold argon plasma 5.4 (± 2.6)] months, the mean weight was 17.3 kg [(polyhexanide 16.2 (± 8.9) kg, saline 16.5 (± 3.4), cold argon plasma 19.1 (± 10.6)). The majority of included patients (57%) were male (72% of these intact).

Wound data

The most frequently affected location was the extremities (23/85), followed by the thoracic wall (16/85, two perforating), neck (15/85), lateral and ventral abdomen (13/85, three perforating), back (10/85) and the perineum (1/85). The majority of patients were presented within 8 hours after injury (9/85 within the first hour, 43/85 between 1 and 8 hours after injury, 19 within 8-24 hours after injury and 14/85 more than 24 hours after injury). One patient had received antibiotics from the referring veterinarian. All patients underwent surgery within 6 hours after initial presentation to our clinic. The mean overall wound size after debridement was 41.7 cm² (± 72.6 cm²), on average, the size of the underlying wounds was 2.8 times bigger compared to the outer perforation of the skin. Mean anaesthesia time was 99.3 minutes (± 46.3 min), mean surgery time was 51.7 minutes (± 40.7 min). Further details are given in Table 1. Mean duration of hospitalisation was 2.8 days (± 2.3).

Culture results

A total of 53 of 85 (62.3%) patients had positive bacterial culture results after debridement. MDR were isolated in 21 of 53 patients with positive initial culture results (39.6%). Table 2 shows the susceptibilities of individual bacteria classed as being MDR.

A total of 45 different bacterial subspecies were detected. The following bacterial groups were detected most frequently (more than two isolates detected in first swab): *Pasteurella* species ($n=42$), *Streptococcus* species ($n=27$), *Staphylococcus* species ($n=17$), *Neisseria* species ($n=17$), *Pseudomonas* species ($n=5$) and

Table 2. Bacteria isolates being classed as MDR and susceptibility to the tested antibiotics

Isolate	Total	DOX	TSO	AMX	PEV/AMP	CEF 1	CEF 3	NIT	STR	GEN	PRA	MAR	ENR	CLIN/LINC	ERY	CHL	COL	Isolates with detected MDR
<i>Escherichia coli</i> *	2	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2/2
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1/2
<i>Pasteurella</i> like bacteria	6	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	20	11	1	1	1/6
<i>Pasteurella canis</i>	21	1	1	1	1	1	1	7	7	2	2	2	2	20	11	1	1	4/21
<i>Pasteurella dagmatis</i>	11	2	2	2	2	2	2	4	4	1	1	1	1	9	2	2	2	2/11
<i>Pasteurella multocida</i>	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1/2
<i>Pasteurella stomatis</i>	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1/2
<i>Neisseria</i> species	5	5	5	5	5	5	5	5	3	4	4	4	4	3	3	1	1	1/5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	5	5	5	5	5	5	5	3	4	4	4	4	5	5	5	5	5/5
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	11	3	7	2	9	1	4	1	4	1	1	1	1	5	4	3	9	5/11
<i>Proteus mirabilis</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1/1
<i>Streptococcus canis</i>	5	5	2	2	2	2	2	5	5	1	1	4	5	1	2	1	5	5/5

Antibiotics that were identified to be non-effective (resistant) in bacteria isolated in the first wound swab; Total total number of isolates of this bacteria-subgroup in swab 1. MDR multidrug-resistance, DOX, doxycycline, TSO sulfonamide trimethoprim, AMX amoxicillin/clavulanic acid, PEV/AMP penicillin/ampicillin, CEF1 ceftriaxone, CEF3 cefotaxime (third generation), NIT nitrofurantoin, STR streptomycin, GEN gentamycin, PRA pradofloxacin, MAR marbofloxacin, ENR enrofloxacin, CLIN/LINC clindamycin/lincosamin, ERY erythromycin, CHL chloramphenicol, COL colistin

bite wound antiseptics

Table 3. The distribution, median and range of contamination scores (CS) achieved in the included wounds at all time points. The score was calculated by adding the severity factor of each individual bacterium encountered in the wound

Study ID	Polyhexanide			Study ID	Saline			Study ID	Cold Argon Plasma		
	S1	S2	S3		S1	S2	S3		S1	S2	S3
1	3	0	0	6	5	2	0	4	1	0	0
2	0	2	0	8	6	4	0	20	2	1	2
3	3	0	0	10	9	11	7	21	2	0	0
5	0	0	1	11	3	0	0	26	7	1	1
7	0	0	0	14	3	0	0	27	2	2	0
9	6	0	0	15	1	0	0	28	8	8	7
12	27	0	0	16	0	0	0	29	9	1	2
13	12	0	0	18	3	0	0	35	0	0	0
17	0	0	0	22	0	0	0	43	2	0	0
19	3	0	0	23	0	0	0	46	0	0	0
25	0	0	0	24	0	0	0	49	0	1	0
37	0	0	0	30	1	1	1	50	20	10	13
39	0	0	0	31	0	0	0	51	4	6	5
40	0	0	0	34	9	9	9	52	0	0	0
42	3	0	0	36	0	0	0	55	0	1	0
48	0	0	0	38	0	0	0	56	0	0	2
53	2	0	0	45	2	2	1	57	4	3	3
54	0	0	0	47	2	1	0	59	3	2	2
58	0	0	0	65	6	6	1	61	0	0	2
63	0	0	0	66	0	0	0	62	0	0	0
64	8	6	2	68	4	5	11	75	6	9	9
67	2	0	0	69	0	0	0	83	3	3	2
70	1	0	0	72	1	1	1	84	10	4	7
71	0	0	0	74	6	5	5	85	2	0	0
73	2	0	0	76	12	7	3	86	4	4	4
78	7	6	3	77	8	7	1	88	6	3	1
79	0	0	0	80	0	0	0	89	2	2	3
81	15	7	0	87	1	1	1	90	1	0	0
82	4	0	0								
Median	1	0	0		1.5	1	0		2	1	2
range	0 to 27	0 to 7	0 to 3		0 to 12	0 to 11	0 to 11		0 to 20	0 to 10	0 to 13
Full Decont.	13/15 (86.6%)				7/18 (38.8%)				6/20 (30%)		

Full. Decont. wounds initially tested positive that became negative under therapy, these are marked bold

Corynebacterium (n=3) (further information on the individual subspecies is given in Supplementary Table S2).

There were no statistical differences between groups regarding the contamination score after initial debridement (saline *versus* polyhexanide P=0.548; polyhexanide *versus* cold argon plasma P=0.634), saline *versus* cold argon plasma P=0.287) (Table 3). Polyhexanide treatment resulted in a highly significant decrease of the summed wound contamination score over time (P=0.001), as did saline lavage (P=0.037). CAP did not achieve a significant bioburden reduction over time (P=0.199). Intergroup comparisons after prelavage showed that polyhexanide performed significantly better than saline prelavage (P=0.006). After the main lavage (mean volume of 4.9 mL/cm² wound area for polyhexanide and mean volume of 31.9 mL/cm² wound area for saline) followed by a soak time of 15 minutes polyhexanide still performed significantly better than saline (P=0.018). Additional treatment using cold argon plasma (mean 30 seconds/cm² wound area) after saline prelavage did not result in a further decrease in wound bioburden (Table 3). Direct comparison between cold argon plasma and the other treatment groups after final treatment showed that there was no significant difference detected between cold argon plasma and saline treatment (P=0.109) while polyhexanide performed significantly better than cold argon plasma (P<0.001).

Table 4. The percentage of patients per group affected by at least 1 MDR isolate and the complication rate per group

Substance	Polyhexanide	CAP	Saline
Overall complication rate	8/29	6/28	8/28
MDR rate	4/18	8/20	9/15

Complications

During surgery, the treatment of wounds using cold argon plasma frequently led to disturbance of electromagnetic signals, with electrocardiogram monitoring being particularly affected. These interferences were only detected during treatment and did not cause any further complications. Minor complications (incisional discharge, swelling) were detected in nine of 85 cases (10.6%). Major complications occurred in 13 of 85 (15.3%) patients – of these, nine patients required additional surgery: seroma formation (n=1), wound infection (n=2), skin necrosis (n=3), dehiscence (n=1), retained Penrose drain (n=1) and development of an indolent pocket wound (n=1). Three patients had positive cultures at the time of revision: *Staphylococcus aureus* (n=1), *Staphylococcus pseudintermedius* (n=3). All of these had cultured negative from the last swab during initial surgery. Four patients died (mortality rate

4.7%); three due to sepsis and one dog was euthanased because of ongoing infection). Three of the dogs that died had injuries to the thoracic wall (one penetrating) and one had a (non-penetrating) abdominal wall injury. All of these patients were less than 15 kg bodyweight. Neither the type of bacterium nor the presence of MDR could be correlated with the occurrence of major complications (Table 4).

DISCUSSION

We chose canine bite wounds to test for bacterial decontamination effect because they represent a frequent source of contaminated traumatic wounds in veterinary patients (Shamir *et al.* 2002). The documented contamination rate of bite wounds lies between 48% and 95.8%, with a wide variety of different bacteria encountered (Kelly *et al.* 1992, Griffin & Holt 2001, Meyers *et al.* 2008, Mouro *et al.* 2010, Nolff *et al.* 2016). In the current study 62.3% of the patients were presented with contaminated wounds and the bacterial species identified generally resembled previously published data (Kelly *et al.* 1992, Griffin & Holt 2001, Meyers *et al.* 2008, Mouro *et al.* 2010, Nolff *et al.* 2016). A total of 39.6% of patients were affected with at least one isolate classified to be MDR. This MDR rate was substantially higher than the MDR rate of 6% published by Nolff *et al.* 2016, which had been recorded between 2010 and 2014, as well as the rate reported by Winter *et al.* 2018 (19.8%). This is a concerning finding, which highlights the need for improved antibiotic stewardship programmes and the need for alternative methods for bacterial decontamination besides standard antibiotic therapy.

The data support our hypothesis that polyhexanide treatment results in more effective wound decontamination than saline lavage, with a significant increase of the effect over time, underlining the beneficial effect of an appropriate contact time. A retrospective open-label controlled multicentre randomised cohort study involving 7862 human patients with severely contaminated soft tissue injuries previously documented that the infection rate was lowest in patients treated with polyhexanide compared to PVP-iodine, ringer or hydrogen peroxide (Roth *et al.* 2007). We now show that polyhexanide also exerts a superior decontamination effect when compared with saline and cold argon plasma in dogs. Although saline also achieved a significant decrease of contamination score over time, polyhexanide significantly outperformed saline at both time-points (after prelavage as well as after definite treatment). One limitation is the potential residual activity and the consequence of this on potential results of microbiological culture (Payne *et al.* 2018). While residual antiseptic activity is a phenomenon that is desirable under clinical conditions (Kramer *et al.* 2004, Müller & Kramer 2008, Eberlein & Assadian 2010, Kaehn 2010, Müller *et al.* 2013), it might have impacted our results because of ongoing bacterial destruction after the swab was taken. Due to this effect, other authors have inactivated the polyhexanide after samples were taken in clinical trials in humans (Payne *et al.* 2018). This procedure was not followed in the current study and we can therefore not ultimately prove whether the wounds or just the swabs

were decontaminated. However, since Payne *et al.* (2018) also found that polyhexanide significantly outperformed saline, we consider it unlikely that inactivation would have influenced our final results to a great degree. In addition, compared to our pilot study, where contact time and structured lavage were not controlled for, we were now able to double the number of patients in which complete decontamination was achieved from 41% in the pilot study to 86.6% in the current study by implementing a structured treatment protocol. This indicates that the residual effect is most likely not the only explanation for the superior performance of polyhexanide in the current study, as it did not improve the outcome in the pilot project. Instead this strongly suggests the importance of a structured and controlled treatment protocol for application of wound antiseptics. However, further studies investigating the effect of antagonisation of culture swabs in clinical cases after treatment with wound antiseptics are needed to solve this potential bias. This might also change the way we handle microbiological cultures under clinical circumstances in general.

In contrast to the performance of polyhexanide, we had to reject our hypothesis that additional cold argon plasma treatment after prelavage with saline would improve wound decontamination. Indeed, additional cold argon plasma treatment did not seem to exert any decontamination effect at all. This is astonishing, because several studies have investigated cold argon plasma in comparison with other antiseptics in humans and rodents (chlorhexidine, polyhexanide), and reported that it was superior (Hammann *et al.* 2010, Koban *et al.* 2011, Matthes *et al.* 2014, Bellingieri *et al.* 2016). One possible explanation might be the setup of the plasma source. As the KinPen[®]Vet only allows treatment of approximately 1 cm² at a time, there is no possibility to treat the whole wound at once. Plasma treatment is time-dependent, with the greatest effects described for treatment times between 10 seconds *per* cm² and 5 minutes in total (Daeschlein *et al.* 2010, 2012b, 2012c, 2012d, 2015, Bender *et al.* 2011, Heinlein *et al.* 2013, Matthes *et al.* 2016). Due to the wound size, we only reached a mean treatment time of 30 seconds *per* cm² if we limited total treatment to a maximum of 15 minutes, which might not have been enough. Furthermore, while moving over the wound area, cross-contamination of treated areas by bordering non-treated areas might be of concern. We are not able to fully describe the reason for the great discrepancy between previous experimental and clinical studies and our study, but most of them used bigger plasma sources, with the capacity to treat the whole wound area at once. The drawback of large plasma sources is the cost and immobility, which was the reason why the portable plasma pen used in this study has been developed. However, based on the results of this study, we cannot recommend its usage for decontamination of bite wounds in dogs.

A major limitation of the study is the mode of evaluation of bacterial bio-burden. Despite taking great care to include the entire wound surface, our evaluation is only semi-quantitative. No tissue biopsies were taken, and no attempt was made to accurately quantify the bacterial load. Ideally, the whole treated surface should be probed (excisional biopsy) and evaluated using quantitative methods such as qPCR. However, since this was a

bite wound antiseptics

clinical study, taking additional biopsies was not considered to be ethically justifiable.

We were not able to detect any impact of residual contamination score or presence of MDR bacteria on complications, but our general complication rate was low and therefore correlations between residual wound bio-burden and occurrence of complications should be evaluated with caution. The clinical impact of the residual bacteria within the wound at the time of closure remains unclear.

In conclusion, polyhexanide lavage achieved the best immediate and ultimate decontamination of bite wounds followed by saline and is thus recommended as the lavage solution of choice in clinical cases of bite wounds. Cold argon plasma treatment using a portable plasma pen did not add any decontamination effect after saline prelavage. The bacteria identified resemble those found in previous studies on bite wound contamination. Worryingly, we detected a higher proportion of MDR isolates than previously reported. This further underlines the fact that alternative antibacterial strategies need to be investigated.

Acknowledgements

The authors wish to thank NeoPlas for providing the cold plasma device; financial support in any form was not provided.

Conflict of interest

The authors state that there is no conflict of interest.

References

- Assadian, O. (2007) From antiseptics to antibiotics - and back? *GMS Krankenhaushygiene interdisziplinär* **2**, 1-5
- Beier, R. C., Foley, S. L., Davidson, M. K., et al. (2015) Characterization of antibiotic and disinfectant susceptibility profiles among *Pseudomonas aeruginosa* veterinary isolates recovered during 1994-2003. *Journal of Applied Microbiology* **118**, 326-342
- Bellingieri, A., Falciiani, F., Trapedini, P., et al. (2016) Effect of a wound cleansing solution on wound bed preparation and inflammation in chronic wounds: a single-blind RCT. *Journal of Wound Care* **160**, 162-166
- Bender, C., Partecke, L. I., Kindel, E., et al. (2011) The modified HET-CAM as a model for the assessment of the inflammatory response to tissue tolerable plasma. *Toxicology In Vitro* **25**, 530-537
- Bhardwaj, P., Ziegler, E. & Palmer, K. L. (2016) Chlorhexidine induces VanA-type Vancomycin resistance genes in enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **60**, 2209-2221
- Chindera, K., Mahato, M., Kumar Sharma, A., et al. (2016) The antimicrobial polymer PHMB enters cells and selectively condenses bacterial chromosomes. *Scientific Reports* **6**, 23121
- Daeschlein, G. (2013) Antimicrobial and antiseptic strategies in wound management. *International Wound Journal* **10**(Suppl 1), 9-14
- Daeschlein, G., Von Woedtke, T., Kindel, E., et al. (2010) Antibacterial activity of an atmospheric pressure plasma jet against relevant wound pathogens in vitro on a simulated wound environment. *Plasma Processes and Polymers* **7**, 224-230
- Daeschlein, G., Scholz, S., Ahmed, R., et al. (2012a) Cold plasma is well-tolerated and does not disturb skin barrier or reduce skin moisture. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* **10**, 509-515
- Daeschlein, G., Scholz, S., Ahmed, R., et al. (2012b) Skin decontamination by low-temperature atmospheric pressure plasma jet and dielectric barrier discharge plasma. *Journal of Hospital Infection* **81**, 177-183
- Daeschlein, G., Scholz, S., Arnold, A., et al. (2012c) In vitro susceptibility of important skin and wound pathogens against low temperature atmospheric pressure plasma jet (APPJ) and dielectric barrier discharge plasma (DBD). *Plasma Processes and Polymers* **9**, 380-389
- Daeschlein, G., Scholz, S., Von Woedtke, T., et al. (2012d) Cold plasma antiseptics for skin and wounds: a new antimicrobial concept in dermatology. *Experimental Dermatology* **21**, e39-e39
- Daeschlein, G., Napp, M., Lutze, S., et al. (2015) Skin and wound decontamination of multidrug-resistant bacteria by cold atmospheric plasma coagulation. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* **13**, 143-150
- Eberlein, T. & Assadian, O. (2010) Clinical use of polyhexanide on acute and chronic wounds for antiseptics and decontamination. *Skin Pharmacology and Physiology* **23**, 45-51

- European Centre For Disease Prevention And Control. (2014). <http://ecdc.europa.eu/en/activities/diseaseprogrammes/ARHAI/Pages/index.aspx>. Accessed January 9, 2015
- Gandolfo-De Christoporis, P., Regula, P., Petriani, O., et al. (2013) Prevalence and risk factors for carriage of multidrug resistant staphylococci in healthy cats and dogs. *Journal of Veterinary Science* **14**, 449-456
- Griffin, G. M. & Holt, D. E. (2001) Dog bite wounds: bacteriology and treatment outcome in 37 cases. *Journal of the American Animal Hospital Association* **37**, 453-460
- Hammann, A., Huebner, N. O., Bender, C., et al. (2010) Antiseptic efficacy and tolerance of tissue-tolerable plasma compared with two wound antiseptics on artificially bacterially contaminated eyes from commercially slaughtered pigs. *Skin Pharmacology and Physiology* **23**, 328-332
- Heinlein, J., Zimmermann, J. L., Zeman, F., et al. (2013) Randomized placebo-controlled human pilot study of cold atmospheric argon plasma on skin graft donor sites. *Wound Repair and Regeneration* **21**, 800-807
- Ikeeda, T., Tazuke, S. & Watanabe, M. (1983) Interaction of biologically active molecules with phospholipid membranes. I. Fluorescence depolarization studies on the effect of polymeric biocide bearing biguanide groups in the main chain. *Biochimica et Biophysica Acta* **735**, 380-386
- Ikeeda, T., Ledwith, A., Bamford, C. H., et al. (1984) Interaction of a polymeric biguanide biocide with phospholipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* **769**, 57-66
- Kaehn, K. (2010) Polihexanide: a safe and highly effective biocide. *Skin Pharmacology and Physiology* **23**(Suppl), 7-16
- Kelly, P. J., Mason, P. R., Els, J., et al. (1992) Pathogens in dog bite wounds in dogs in Harare, Zimbabwe. *The Veterinary Record* **131**, 464-466
- Koban, I., Holtfreter, B., Hubner, N. O., et al. (2011) Antimicrobial efficacy of non-thermal plasma in comparison to chlorhexidine against dental biofilms on titanium discs in vitro - proof of principle experiment. *Journal of Clinical Periodontology* **38**, 956-965
- Kramer, A., Roth, B., Müller, G., et al. (2004) Influence of the antiseptic agents polyhexanide and octenidine on FL cells and on healing of experimental superficial aseptic wounds in piglets. A double-blind, randomised, stratified, controlled, parallel-group study. *Skin Pharmacology and Physiology* **17**, 141-146
- Kramer, A., Dissemmond, J., Kim, S., et al. (2018) Consensus on wound antiseptics: update 2018. *Skin Pharmacology and Physiology* **31**, 28-58
- Lozier, S., Pope, E. & Berg, J. (1992) Effects of four preparations of 0.05% chlorhexidine diacetate on wound healing in dogs. *Veterinary Surgery* **21**, 107-112
- Matthes, R., Hubner, N. O., Bender, C., et al. (2014) Efficacy of different carrier gases for barrier discharge plasma generation compared to chlorhexidine on the survival of *Pseudomonas aeruginosa* embedded in biofilm in vitro. *Skin Pharmacology and Physiology* **27**, 148-157
- Matthes, R., Luhrmann, A., Holtfreter, S., et al. (2016) Antibacterial activity of cold atmospheric pressure argon plasma against 78 genetically different (mecA, luk-P_{agr} agr or capsular polysaccharide type) *Staphylococcus aureus* strains. *Skin Pharmacology and Physiology* **29**, 83-91
- Meyers, B., Schoemann, J. R., Goddar, A., et al. (2008) The bacteriology and antimicrobial susceptibility of infected and non-infected dog bite wounds: fifty cases. *Veterinary Microbiology* **127**, 360-368
- Mills, P. C., Ahlstrom, L. & Wilson, W. J. (2005) Otolotoxicity and tolerance assessment of a TrisEDTA and polyhexamethylene biguanide ear flush formulation in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **28**, 391-397
- Mouro, S., Vilela, C. L. & Niza, M. M. (2010) Clinical and bacteriological assessment of dog-to-dog bite wounds. *Veterinary Microbiology* **144**, 127-132
- Müller, G. & Kramer, A. (2008) Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **61**, 1281-1287
- Müller, G., Koburger, T. & Kramer, A. (2013) Interaction of polyhexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB) with phosphatidylcholine containing o/w emulsion and consequences for microbicidal efficacy and cytotoxicity. *Chemico-Biological Interactions* **201**, 58-64
- Nolff, M. C., Layer, A. & Meyer-Lindenberg, A. (2015) Negative pressure wound therapy with instillation for body wall reconstruction using an artificial mesh in a dachshund. *Australian Veterinary Journal* **93**, 367-372
- Nolff, M. C., Reese, S., Fehr, M., et al. (2016) Assessment of wound bio-burden and prevalence of multi-drug resistant bacteria during open wound management. *The Journal of Small Animal Practice* **57**, 255-259
- Payne, H., Simmen, P., Csukaa, M., et al. (2018) Randomized controlled clinical trial on the antiseptic efficacy of polyhexanide 0.04% on acute traumatic wounds. *The Journal of Hospital Infection* **98**(4), 429-432
- Roth, B., Assadian, O., Wurmitzer, F., et al. (2007) Surgical site infections after primary antiseptic cleansing of dirty-contaminated wounds by polyhexanide, PVP iodine resp. hydrogen peroxide. *GMS Krankenhaushygiene interdisziplinär* **2**(58), 20071228
- Sanchez, I. R., Swaim, S. F., Nusbaum, K. E., et al. (1988) Effects of chlorhexidine diacetate and povidone-iodine on wound healing in dogs. *Veterinary Surgery* **17**, 291-295
- Shamir, M. H., Leisner, S., Klement, E., et al. (2002) Dog bite wounds in dogs and cats: a retrospective study of 196 cases. *Journal of Veterinary Medicine, A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine* **49**, 107-112
- Uchiyama, H., Zhao, Q. L., Hassan, M. A., et al. (2015) EPR-spin trapping and flow cytometric studies of free radicals generated using cold atmospheric argon plasma and x-ray irradiation in aqueous solutions and intracellular milieu. *PLoS One* **10**, e0136956
- Von Woedtke, T., Reuter, S., Masur, K., et al. (2013) Plasmas for medicine. *Physics Reports* **530**, 291-320

M. C. Nolff et al.

- Wessels, S. & Ingmer, H. (2013) Modes of action of three disinfectant active substances: a review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **67**, 456-467
- Willy, C. (2013) In: *Antiseptics in Surgery*, 1st edn. Ed C. Willy. Linquist Book Publishing, Stockholm, Sweden
- Winter, S., Nolff, M. C., Reese, S., et al. (2018) Comparison of the antibacterial efficacy of polyhexanide, cold atmospheric argon plasma and saline in the treatment of canine bite wounds. *Tierärztliche Praxis, Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere* **46**, 73-82

Supporting Information

The following supporting information is available for this article:

Table S1. Distribution of individual breeds within the study population

Table S2. Distribution of the different bacteria-subspecies after debridement in the study population

VI. ÜBERGREIFENDE DISKUSSION

Bissverletzungen machen einen großen Anteil an traumatisch bedingten Wunden aus, und ihre Kontamination mit verschiedensten Bakterienarten ist bekannt (Holt und Griffin 2000). Auf Grund von hohen Resistenzraten der Bakterien gegenüber Antibiotika und weitgehend fehlender Applikationsmodelle für Antiseptika, sollten im Rahmen dieser Arbeit alternative Behandlungsmethoden zur Keimreduktion und der Einsatz von antiseptischen Therapiemaßnahmen untersucht werden. Sowohl Antiseptika als auch physikalische Therapiemethoden sind jedoch in der Veterinärmedizin noch weitgehend unerforscht und bisherige Ergebnisse aus humanmedizinischen Studien zeigen, dass vor allem ein evidenzbasierter Einsatz erforderlich ist.

Vor allem bei infizierten Wunden wie Bissverletzungen treten bakterielle Kontaminationsraten zwischen 48 bis 95,8% auf, mit einer großen Vielfalt an unterschiedlichsten Bakterienspezies (Griffin und Holt 2001, Meyers et al. 2008, Mouro et al. 2010, Nolff et al. 2016). Der ungezielte Einsatz von Antibiotika führt sowohl zur Resistenzbildung gegenüber unterschiedlichen Antibiotikaklassen als auch zu möglichen Kreuzresistenzen. Anstatt durch eine Antibiotikatherapie die Bakterien zu eliminieren, werden resistente Bakterien gebildet (Harbarth 2007, Weese 2008, Nolff et al. 2016). Dabei konnte in Bissverletzungen eine Multiresistenzrate von 6% festgestellt werden (Nolff et al. 2016). Dies stimmt mit den Auswertungen der eigenen Ergebnisse überein, wobei in der In-vivo-Studie I eine Kontaminationsrate der Bissverletzungen von 87,5% und in der In-vivo-Studie II von 62,3% festgestellt werden konnte. Der Anteil an multiresistenten Bakterien lag in beiden In-vivo-Studien über den bisher publizierten Werten. So konnte in Bezug auf die positiv beprobten Wunden eine Multiresistenzrate von 42,85% (15 von 35 positiven Abstrichen) in der ersten In-vivo-Studie und von 39,6% (21 von 53 positiven Abstrichen) in der zweiten In-vivo-Studie festgestellt werden. Anteilig an allen nachgewiesenen Bakterienisolaten in der jeweiligen In-vivo-Studie ergab sich dadurch eine Multiresistenzrate von 19,8% in der ersten In-vivo-Studie und 27,6% in der zweiten In-vivo-Studie. Auffallend war hierbei auch eine hohe Resistenzrate gegenüber den Reserveantibiotika. Entsprechend der

Auswertung der In-vivo-Studie I und II, decken sich die in Bissverletzungen vorkommenden unterschiedlichen Bakterienspezies mit den Studien von Talan et al. (1999) und Goldstein et al. (1980). Lediglich der hohe Anteil von *Neisseria species* in der In-vivo-Studie I wurde bislang nicht in anderen Studien beschrieben. In den eigenen In-vivo-Studien waren besonders häufig *Pasteurella species*, *Streptococcus species*, *Staphylococcus species*, *Neisseria species*, *Pseudomonas species* und *Corynebacterium* vertreten. Zusätzlich wurden vereinzelt auch *Escherichia coli*, *Acinetobacter species*, *Actinomyces species*, *Micrococccen*, *Enterococcus species* und *Klebsiella pneumoniae* vorgefunden. Hinsichtlich der Verteilung der Bissverletzungen und deren Häufigkeit an Kopf, Nacken, Thorax und den Gliedmaßen stimmen die Auswertungen der ersten und zweiten In-vivo-Studie mit denen in der Literatur überein (Shamir et al. 2002, Meyers et al. 2008). In beiden In-vivo-Studien zeigte sich ein erhöhtes Aufkommen von verletzten männlich intakten Rüden, wodurch die Ergebnisse in bisher bestehenden Studien von Shahar et al. (1997) und Shamir et al. (2002) bestätigt werden konnte.

Für Patienten mit Wunden, die einer chirurgischen Versorgung bedürfen, treten vor allem Antiseptika für die Behandlung in den Fokus. Auf Grund der Zytotoxizität, welche bei einem Antiseptikum nicht gegeben sein sollte, sind viele Antiseptika nur eingeschränkt einsatzfähig (Hirsch et al. 2010, Willy et al. 2017). Durch eine niedrige Toxizität auf Fibroblasten und Keratinozyten im Vergleich zu anderen Antiseptika wie Octenidin, PVP-Iod, Betaisodona (Wirkstoff: Povidon-Iod) und Braunol (Wirkstoff: Povidon-Iod), stellt das Antiseptikum Polyhexanid ein vielversprechendes Mittel zur Wundbehandlung dar (Hirsch et al. 2010).

Vergleichend wurde in den beiden In-vivo-Studien die Effektivität von Wundspülungen mit NaCl, Polyhexanid und eine Argon-Kaltplasmabehandlung untersucht. Bisherige In-vitro-Studien zeigten einen hohen dekontaminierenden Effekt von Kaltplasma, welcher dem von Polyhexanid und Chlorhexidin überlegen war (Hammann et al. 2010, Koban et al. 2011), sowie eine Dekontamination von Wunden in vivo (Daeschlein et al. 2012, Daeschlein et al. 2012). Entgegen dieser Untersuchungen zeigte sich in den eigenen In-vivo-Studien kein überlegener Effekt von Argon-Kaltplasma gegenüber Wundspülungen mit NaCl oder Polyhexanid. In der In-vivo-Studie I konnte Argon-Kaltplasma nur bei der Hälfte der Wunden eine bakterielle Reduktion

hervorbringen und nur zwei von zehn Wunden wurden komplett dekontaminiert. Anhand dieser ersten Ergebnisse wurde die In-vitro-Studie durchgeführt, um die Effektivität von Argon-Kaltplasma auf verschiedene Bakterienspezies zu evaluieren und die bestmöglichen Einstellungsparameter für die zweite In-vivo-Studie auszuloten. Fehlerhaft bei der Durchführung dieser Arbeit ist sicherlich das Studiendesign, da zunächst die In-vivo-Studie I durchgeführt wurde und daraufhin erst die In-vitro-Studie folgte. In der In-vivo-Studie I wurde die Einwirkzeit von Polyhexanid (15 Minuten) und Argon-Kaltplasma (2 Minuten pro cm^2) nicht exakt kontrolliert, sondern lediglich der Operateur auf die Einhaltung der Zeit hingewiesen. In der In-vivo-Studie II wurde die Zeit mittels Stoppuhr kontrolliert. Zusätzlich gibt es eine Limitation im Studiendesign der zweiten In-vivo-Studie. Obwohl die Bestrahlung mittels Argon-Kaltplasma auf 2 Minuten pro cm^2 festgesetzt wurde, konnte diese Zeit bei großen Wunden nicht erreicht werden. Dies hängt damit zusammen, dass hier eine maximale Dauer von 15 Minuten festgesetzt wurde, um den dekontaminierenden Effekt mit der 15-minütigen Einwirkzeit von Polyhexanid vergleichen zu können. Zudem hat es sich um eine klinische Studie gehandelt, sodass die In-vivo-Studien möglichst praxisnah durchgeführt werden sollten. Auch in der In-vivo-Studie II ließ sich ein zusätzlicher Effekt einer Argon-Kaltplasmabehandlung nach der NaCl-Wundspülung nicht nachweisen, sodass hier eine komplette Dekontamination von nur 30% (sechs von 20 Wunden) erfolgte. Im Schnitt wurden die Wunden 30 Sekunden pro cm^2 mit Argon-Kaltplasma bestrahlt. Warum Argon-Kaltplasma in dieser Arbeit in vitro so gut und in vivo so schlecht abschneidet, lässt sich nur anhand von der dosisabhängigen Applikation erklären. In der In-vitro-Studie zeigte sich eine signifikant von der Zeit abhängige Reduktion der untersuchten Bakterienspezies. Am effektivsten war eine Kaltplasmabestrahlung von 2 Minuten pro cm^2 , auch wenn schon erste Dekontaminationen bei 30 Sekunden nachzuweisen waren. Insgesamt wurden alle untersuchten Bakterienspezies in beiden untersuchten Replikationsphasen von der Behandlungszeit beeinflusst. Dieses Ergebnis der In-vitro-Studie deckt sich mit der Studie von Matthes et al. (2013), in welcher ein zeitabhängiger linearer Effekt der Dekontamination zwischen 30 Sekunden und 5 Minuten beschrieben wurde, wobei ein höherer Effekt mit einer längeren Bestrahlungszeit einher ging. Somit führte auch in der eigenen In-vitro-Studie eine längere Bestrahlung mit Argon-Kaltplasma zu einer höheren Dekontamination und zeigt deutlich wie wichtig der Zeitfaktor ist. Es

sind unterschiedliche Zeitangaben in der Literatur vorzufinden, bei welchen Kaltplasma einen Effekt zeigt und die von 10 Sekunden bis 10 Minuten reichen (Laroussi 2002, Abramzon et al. 2006, Cooper et al. 2010, Cotter et al. 2011, Brelles-Marino 2012, Taghizadeh et al. 2015). Dieser dosisabhängige Effekt wurde zuvor schon von anderen Autoren beschrieben und bezieht sich nicht nur auf die Zeit, sondern auch auf das Energielevel und die Menge an geladenen Partikeln die im Argon-Kaltplasma enthalten sind (Daeschlein et al. 2010, Fluhr et al. 2012, Matthes et al. 2013, Flynn et al. 2015). Eine Behandlung mit Kaltplasma kann zwar die Angiogenese stimulieren und die Wundheilung induzieren, jedoch muss auch hier die Dosis limitiert werden, da Kaltplasma sonst toxisch wirkt und bei höherer Dosis zur Apoptose führen kann (Laroussi 2009, Von Woedtke et al. 2013). Hierbei ist von Vorteil, dass die benötigte Dosis für den Tod von Bakterien geringer ist als diejenige für Wirtszellen (Hammann et al. 2010). In der eigenen Arbeit ergibt sich hier eine Limitation der In-vivo-Studien. Es wurden keine Biopsien des Gewebes zur histologischen Untersuchung entnommen, noch die Menge an tatsächlich vorhandenen Bakterien in der Wunde bestimmt, sondern lediglich eine semiquantitative Bestimmung im Rahmen einer praxisnahen klinischen Studie durchgeführt. Somit ist ein Rückschluss auf eine dosisabhängige Gewebeschädigung nicht möglich sowie eine Bestimmung der tatsächlichen Dekontaminationsrate je Wunde.

Problematisch wird eine längere Behandlungszeit in Bezug auf Wunden die in vivo am Patienten versorgt werden. Limitierend wirkt hierbei eindeutig die Wundgröße. Eine Wunde von 5 x 5 cm (25cm^2) Größe würde, entsprechend dem Studiendesign bei einer Behandlungszeit von 2 Minuten pro cm^2 zu einer Bestrahlungszeit von 50 Minuten führen, die alleinig nur die Argon-Kaltplasmatherapie umfasst. Für den Patienten würde dies eine längere Anästhesie- sowie Operationsdauer bedeuten. In der In-vivo-Studie I lagen Operations- und Anästhesiedauer in der NaCl- und Polyhexanid-Gruppe nah beieinander, lediglich die Argon-Kaltplasmagruppe zeigte einen höheren Zeitaufwand. Nach Anpassung der Einwirkzeit von Polyhexanid in der In-vivo-Studie II waren nur minimale Unterschiede zwischen der Anästhesiezeit in der Polyhexanid- und Argon-Kaltplasmagruppe zu sehen. Die Operationszeit war im Durchschnitt in der Polyhexanid-Gruppe länger, wobei hier die Wundflächen größer waren im Vergleich zur Argon-Kaltplasmagruppe. Trotz einer kleineren

Wundfläche in der Argon-Kaltplasmagruppe ist der zeitliche Aufwand zur Bestrahlung somit länger. Dies ist in Hinsicht auf postoperative Wundinfektionen („surgical site infections“ = SSI) kritisch zu betrachten. Ein erhöhtes Risiko von SSI liegt bei erhöhter Wundkontamination, einem längeren klinischen Aufenthalt sowie bei einer höheren ASA Klasse des Patienten vor (Eugster et al. 2004). Zwar nicht signifikant aber ein abzeichnender Trend für ein erhöhtes SSI-Risiko ergab sich bei längerer Anästhesiedauer, einer erhöhten Anzahl an Personen im Operationsraum, längeren stationären Aufenthalt und längerer präoperativen Vorbereitung des Patienten (Eugster et al. 2004). Ein Zusammenhang zwischen den Komplikationsraten und der Behandlung, der Bakterienspezies oder das Auftreten von MDR-Keimen konnte in dieser Arbeit nicht hergestellt werden. In der In-vivo-Studie II lag die Verteilung der Komplikationen unter den Gruppen nah beieinander, lediglich in der In-vivo-Studie I gab es keine major Komplikation in der Polyhexanid-Gruppe. Insgesamt war die Komplikationsrate jedoch sehr gering in den eigenen In-vivo-Studien und daher nicht statistisch signifikant. Bei notwendiger Revision der Wunden auf Grund von Komplikationen bestätigte sich in der eigenen Untersuchung die Notwendigkeit der in der Literatur empfohlenen erneute mikrobiologische Tupferprobenentnahme (Ordog 1986, Griffin und Holt 2001). Sowohl in der In-vivo-Studie I als auch in der In-vivo-Studie II waren bei der Revision andere Bakterienspezies nachweisbar, als bei initialer Versorgung der Wunden. Betrachtet man das alleinige Auftreten von MDR-Keimen in den Gruppen der In-vivo-Studie II, so lag die Verteilung mit 50% in der NaCl-Gruppe über den Werten der Polyhexanid-Gruppe (26,6%) und der Kaltplasma-Gruppe (40%). Dies sollte trotz der nachgewiesenen Effektivität von Polyhexanid, anhand der mikrobiologischen Verlaufsuntersuchungen während der chirurgischen Versorgung mit in Betracht gezogen werden. Vergleicht man in der eigenen Untersuchung die Reduktion der Keimlast von Tupfer 1 zu Tupfer 3 im Verlauf, so erfuhren in der Polyhexanid-Gruppe alle Proben eine Reduktion der Bakterienanzahl nach der Wundlavage. In der NaCl-Gruppe wurden 14 von 18 und in der Kaltplasma-Gruppe 15 von 20 Proben bakteriell reduziert. Dies lässt darauf schließen, dass trotz der geringen MDR-Rate (26,6%) in der Polyhexanid-Gruppe dessen Wirkung gegenüber beiden anderen Behandlungen überwiegt.

Fernandez et al. (2012) konnten in ihrer Studie einen weiteren limitierenden

Faktor für die Effektivität von Kaltplasma ausfindig machen. Sie beschrieben für die Dekontamination einen besseren Effekt, desto weniger Bakterien initial vorhanden waren. Dieses Ergebnis konnte in der eigenen In-vitro-Studie bestätigt werden. Bis auf *Escherichia coli* war die initiale Bakterienkonzentration maßgeblich am dekontaminierenden Effekt von Argon-Kaltplasma beteiligt. Bei *Staphylococcus pseudintermedius* war eine signifikante Reduktion zwischen den drei Konzentrationen der Verdünnungsreihe zu sehen, als auch bei *Streptococcus canis*. Je weniger Bakterien initial vorzufinden waren, desto besser war in der eigenen In-vitro-Studie die Effizienz im Allgemeinen. Diese Feststellung konnte in der In-vivo-Studie II im Durchschnitt leider nicht bestätigt werden. Eine zusätzliche Argon-Kaltplasmabehandlung in der zweiten In-vivo-Studie führte zu keinem weiteren dekontaminierenden Effekt. Lediglich bei sieben von 28 untersuchten Patienten war ein weiterer Effekt nach der Vorlavage mit NaCl durch die Kaltplasmabehandlung zu sehen. Wobei die Wunde bei vier von sieben Patienten über den Verlauf der Behandlung eine Reduktion der Keimlast erfuhr, bei den anderen drei jedoch der mikrobiologische Abstrich nach Vorlavage positiv bzw. höher kontaminiert war als der initiale Abstrich nach Débridement. Dies lässt darauf schließen, dass vermutlich die Einwirkzeit von Argon-Kaltplasma mit 15 Minuten pro Wunde zu gering war für eine effektive Dekontamination, vor allem in größeren Wunden. Zudem ist fraglich, ob in den eigenen In-vivo-Studien durch die punktuelle Behandlung mit dem kINPen®Vet und dem Bewegungsmuster während der Behandlung nicht auch schon dekontaminierte Bereiche wieder reinfiziert wurden. In der Literatur ist beschrieben, dass die Behandlung von größeren Flächen nur durch das Bewegungsmuster der Plasmajets wie dem kINPen®Vet möglich ist (Von Woedtke et al. 2013). Andere Geräte, die gleichzeitig eine größere Fläche bestrahlen können, wären für den klinischen Alltag besser geeignet und könnten damit auch die gesamte Behandlungsdauer reduzieren ohne Einbußen in der effektiven Einwirkdauer des Kaltplasmas machen zu müssen (Von Woedtke et al. 2013).

Divergenzen gab es in der Untersuchung von NaCl und Polyhexanid zwischen erster und zweiter In-vivo-Studie. Kaehn und Eberlein (2009) konnten in vitro zeigen, dass Polyhexanid die Wundheilung zeitlich fördert und eine geringere Infektionsrate besteht bei der Wundspülung im Vergleich zu Kochsalzlösung.

Dies konnte in der eigenen Arbeit nur teilweise bestätigt werden. In der In-vivo-Studie I schnitt die Wundspülung mit NaCl besser ab, wobei hier in 14 von 18 Wunden die Bakterienlast reduziert wurde und eine komplette Dekontamination bei neun von 18 Wunden (50%) zu sehen war. In der In-vivo-Studie II hingegen wurden nur sieben von 18 kontaminierten Wunden komplett von der Keimlast befreit, was 38,8% entspricht. Wesentlich bessere Ergebnisse wurden mit Polyhexanid in der zweiten In-vivo-Studie erreicht, sodass hier eine komplette Dekontamination von 86,6% (13 von 15 kontaminierten Wunden) festgestellt werden konnte. Geringer fiel dieser Effekt in der ersten In-vivo-Studie aus, wobei fünf von 12 Wunden (41%) komplett dekontaminiert wurden und bei acht von 12 Wunden eine bakterielle Reduktion erreicht werden konnte. Dieser in der In-vivo-Studie I festgestellte reduzierte antibakterielle Effekt von Polyhexanid im Vergleich zur In-vivo-Studie II hängt vermutlich mit dessen Einwirkzeit zusammen. Roth et al. (2017) beschrieb für schwer infizierte Weichteilverletzungen beim Menschen eine geringere Infektionsrate, wenn die Patienten mit Polyhexanid behandelt wurden im Vergleich zu Behandlungen mit NaCl, Povidon-Iod und Wasserstoffperoxid. Auch bei chronischen Wunden zeigte sich eine Überlegenheit von Polyhexanid im Vergleich zur Wundspülung mit NaCl (Horrocks 2006). Für optimale Ergebnisse sollte Polyhexanid daher 15 Minuten auf der Wunde einwirken können (Eberlein und Assadian 2010), woraus sich eine Limitation in der In-vivo-Studie I für die Wirkung von Polyhexanid ergibt, da die Einwirkzeit hier nicht kontrolliert wurde. Somit hat es sich hier um eine einfache Wundspülung gehandelt und ein antiseptischer Effekt im Sinne einer antiseptischen Wundspülung konnte nicht erzielt werden. Nachdem die Einwirkzeit in der In-vivo-Studie II angepasst und kontrolliert wurde, konnten bessere Ergebnisse im Vergleich zur ersten In-vivo-Studie erzielt werden und damit die bisherigen Annahmen zu einem überlegenen Effekt von Polyhexanid aus anderen Studien bestätigt werden. Nach Kontrolle der Einwirkzeit konnte die Rate der kompletten Dekontamination in den eigenen In-vivo-Studien mehr als verdoppelt werden von 41% auf 86,6%. Erhöhte Volumina an Spüllösungen sollen die Wundsäuberung verbessern, jedoch ist das optimale Volumen hierfür nicht bekannt (Anglen 2001). In der zweiten In-vivo-Studie waren die Volumina für NaCl höher, als jene für Polyhexanid. Trotz dessen war Polyhexanid effektiver in der Dekontamination. Auch Stevenson et al. (1976) beschrieben den Effekt des Volumens der Spüllösung in Hinsicht auf die Dekontamination als nicht

signifikant. Ob erhöhte Spülvolumina einen höheren Auswascheffekt in der Wunde bringen bleibt daher fraglich und muss weiter untersucht werden. Die Hypothese der vorliegenden In-vivo-Studien, dass Polyhexanid eine effizientere Wirkung in der Dekontamination zeigen wird als Kochsalzlösung konnte somit nur in der zweiten In-vivo-Studie bestätigt werden. Es zeigte sich, dass Polyhexanid sowohl nach der Vorlavage als auch der Hauptlavage besser abschnitt als Wundspülungen mit NaCl. Auch im Vergleich zur Argon-Kaltplasmabehandlung war Polyhexanid deutlich effizienter. Abschließend zeigt sich, dass die Wundbehandlung mit Polyhexanid die beste Effizienz in der Dekontamination von Bissverletzungen hervorbringt. Eine Argon-Kaltplasmabehandlung mit dem kINPen®Vet führte nicht zum gewünschten Effekt und müsste weiter optimiert und untersucht werden, eventuell auch anhand anderer Kaltplasmageräte. Die Effektivität einer NaCl-Spülung ist mit der der Kaltplasmabehandlung nach den Ergebnissen der In-vivo-Untersuchungen gleichzusetzen.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Bissverletzungen sind traumatisch bedingte Wunden, welche stets als kontaminiert anzusehen sind (Holt und Griffin 2000). Vor allem sind diese Wunden mit Bakterien kontaminiert, welche durch den Speichel des Angreifers übertragen werden (Saphir und Carter 1976, Bailie et al. 1978). Bei der Behandlung von Bissverletzungen kommt dem chirurgischen Management mit der Säuberung, dem Débridement und der Wundspülung die größte Wichtigkeit zu (Ordog 1986). Werden die Wunden nicht versorgt mittels einer Wundspülung und chirurgischem Débridement, so können sich innerhalb von 24 Stunden Infektionen manifestieren (Kramer et al. 2010). Zusätzlich problematisch ist hierbei das Auftreten von multiresistenten Keimen, deren Entstehung und Verbreitung durch häufigen Antibiotikaeinsatz gefördert wird (Harbarth 2007, Nolff et al. 2016). Zur therapeutischen und prophylaktischen Behandlung von kontaminierten und infizierten Wunden eignen sich daher Wundantiseptika mit mikrobizidem Effekt und geringer Zytotoxizität (Willy et al. 2017). Bisherige Studien in der Tiermedizin umfassen die Untersuchung von Chlorhexidin und Povidon-Iod (Sanchez et al. 1988, Lozier et al. 1992). Chlorhexidin wird in der Humanmedizin zur Wundlavage bereits als obsolet angesehen (Assadian 2007).

Zur Evaluierung in beiden In-vivo-Studien wurden Hunde mit Bissverletzungen herangezogen, welche im normalen Klinikablauf der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik der LMU München vorgestellt wurden. Im Rahmen der chirurgischen Versorgung der Bissverletzungswunden wurden die Empfänglichkeit der verschiedenen Bakterienspezies und der dekontaminierende Effekt von Wundspülungen mit NaCl, Polyhexanid sowie einer Argon-Kaltplasmabehandlung untersucht. Hierfür wurden die Hunde in eine der drei Gruppen per Losverfahren eingeteilt. Zunächst wurde eine In-vivo-Studie (I) mit 40 Patienten durchgeführt. Hierbei wurde ein mikrobiologischer Tupferabstrich der Wunde nach Débridement und nach der jeweiligen Behandlung entnommen um die initiale und abschließende bakterielle Kontamination, sowie die MDR-Rate der Bakterien in der Wunde zu erfassen. Die Wunden wurden während des stationären Aufenthaltes täglich kontrolliert sowie eine Abschlusskontrolle beim

Fädenziehen durchgeführt. Um die Wirkung von Argon-Kaltplasma *in vitro* zu überprüfen wurde die *In-vitro*-Studie durchgeführt, in welcher der Effekt von Argon-Kaltplasma auf gängige grampositive und gramnegative Bakterienspezies aus Bissverletzungen untersucht wurde. Hierbei wurden die unterschiedlichen Bakterienspezies in einer Standard-I-Boillon angereichert und für 3 oder 8 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien in drei unterschiedlichen Verdünnungsreihen auf Agarplatten ausgespatelt und in einem Areal von je 1 cm^2 für 30 Sekunden, 1 Minute oder 2 Minuten mit Argon-Kaltplasma bestrahlt. Die Auswertung des dekontaminierenden Effektes von Argon-Kaltplasma wurde in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit, der Proliferationsphase der Bakterien und der initialen Bakterienkonzentration nach erneuter Inkubation der bereits bestrahlten Agarplatten durchgeführt. In der *In-vivo*-Studie II mit 85 Patienten wurde die Einwirkzeit von Polyhexanid mit 15 Minuten sowie die Argon-Kaltplasmatherapie mit 2 Minuten pro cm^2 angepasst und strikt kontrolliert. Hier wurden drei mikrobiologische Tupferabstriche entnommen: nach dem Débridement, nach der Vorlavage mit 2 ml pro cm^2 der Wundgröße und nach der abschließenden Wundlavage mit NaCl, Polyhexanid oder der Argon-Kaltplasmabehandlung. Der dritte Tupfer wurde in der *In-vivo*-Studie II zusätzlich entnommen um den alleinigen Effekt von Argon-Kaltplasma nach der Vorlavage mit NaCl bestimmen zu können. Beide *In-vivo*-Studien wurden jeweils als randomisierte geblindete Studien durchgeführt, wobei die zweite *In-vivo*-Studie als randomisierte Doppelblind-Studie durchgeführt wurde.

Entsprechend der Auswertung der mikrobiologischen Tupferproben für die jeweilige *In-vivo*-Studie ergab sich eine Multiresistenzrate von 19,8% in der ersten *In-vivo*-Studie und für die zweite *In-vivo*-Studie von 27,6%. In der zweiten *In-vivo*-Studie konnte gezeigt werden, dass das Antiseptikum Polyhexanid in seiner dekontaminierenden Wirkung dem Effekt von Wundspülungen mit NaCl und der Argon-Kaltplasmabehandlung deutlich überlegen ist. Der wichtigste Parameter als Ergebnis der beiden *In-vivo*-Studien ist der Zeitfaktor, sowohl bei der Behandlung mit Polyhexanid als auch Argon-Kaltplasma. Dabei ist vor allem die Einwirkzeit von 15 Minuten bei Polyhexanid zu beachten, da bei Unterschreiten dieser Zeit ein ausreichender antibakterieller Effekt nicht erreicht werden kann und es sich sonst lediglich um eine Wundspülung handelt. Durch Anpassungen der Einwirkzeit zwischen erster und zweiter *In-vivo*-Studie konnte

so ein höherer Effekt in der Dekontamination erzielt und von 41% auf 86,6% mehr als verdoppelt werden. Auch bei der Behandlung mit Argon-Kaltplasma war der Zeitfaktor ausschlaggebend für dessen Effizienz. Der höchste dekontaminierende Effekt wurde in der In-vitro-Studie bei einer Behandlungszeit von 2 Minuten pro cm^2 erreicht, wobei zusätzlich auch die initiale Bakterienkonzentration eine Rolle spielt. Je niedriger diese war, desto besser war die Dekontamination. Im Vergleich der beiden In-vivo-Studien schnitt Argon-Kaltplasma jedoch schlechter ab als eine herkömmliche Wundspülung mit NaCl. Aufgrund des Zeitaufwandes der Argon-Kaltplasmabehandlung und der Konstruktion des kINPen® Vet sowie der daraus resultierenden mangelhaften Effektivität in der Dekontamination, ist ein klinischer Einsatz von Argon-Kaltplasma nicht praktikabel und effizient.

VIII. SUMMARY

Bite wound injuries are traumatic wounds, which are always considered to be contaminated (Holt und Griffin 2000). These wounds are particularly contaminated with bacteria, which are transferred through salivary juice from the aggressor (Saphir und Carter 1976, Bailie et al. 1978). Major importance for the treatment of bite wound injuries belongs to the surgical management including cleansing, debridement and wound irrigation (Ordog 1986). When bite wounds are not treated with wound irrigations and surgical debridement, a wound infection can become manifest within 24 hours (Kramer et al. 2010). Additionally problematic is the occurrence of multidrug-resistant bacteria, whose formation and dissemination is promoted through frequent use of antibiotics (Harbarth 2007, Nolff et al. 2016). For therapeutic and prophylactic treatment of contaminated and infected wounds, wound antiseptics are appropriated with microbicide effect and low cytotoxicity (Willy et al. 2017). Previous studies in veterinary medicine involve investigations of chlorhexidine and PVP-Iodine (Sanchez et al. 1988, Lozier et al. 1992). Chlorhexidine is already considered to be obsolete for wound lavage in human medicine (Assadian 2007).

Dogs with bite injuries which were presented at the clinic for small animal surgery and reproduction at LMU Munich were used for evaluation in both in vivo studies. Susceptibility of the different bacteria species and the decontaminating effect of wound irrigations with sodium chloride, polyhexanide and the cold argon plasma treatment were evaluated in context of surgical treatment of bite injuries. Therefore the dogs were divided into one of these three groups by lottery. Initially the in vivo study I was performed with 40 patients. Here a microbiological swab was taken from the wound surface after debridement and after the respective treatment to gather the initial and final contamination, as well as the MDR-rate of bacteria in the wounds. The wound was controlled daily while stationary inhabitation and finally when the sutures were removed. For evaluating the effect of cold argon plasma in vitro, the in vitro study was performed, in which the effect of cold argon plasma was examined onto current gram-positive and gram-negative bacteria from bite wound injuries. In this study

the different bacteria species were enriched in a standard-I-bouillon and incubated for 3 or 8 hours. Afterwards, bacteria were plated in three different serial dilutions onto agar plates and treated with cold argon plasma within an area of 1 cm² for 30 seconds, 1 minute or 2 minutes. The evaluation of the decontaminating effect of cold argon plasma was done in addition to that of the treatment time, the proliferation phase of the bacteria and the initial bacterial concentration after cold argon plasma treatment and re-incubation of agar plates. In the in vivo study II with 85 patients the application time of polyhexanide with 15 minutes, as well as the treatment time of cold argon plasma with 2 minutes per cm² was assimilated and strictly controlled. Here, three microbiological swabs were taken: after debridement, after prelavage with 2 ml per cm² of the wound and after the final wound lavage with sodium chloride, polyhexanide or the cold argon plasma treatment. The third swab was additionally taken in the in vivo study II to determine the solitary effect of cold argon plasma after the prelavage with sodium chloride. Both in vivo studies were performed as double blinded studies.

According to the evaluation of the microbiological swabs respective for each in vivo study a MDR-rate of 19.8% in the first in vivo study and 27.6% in the second in vivo study was observed. In the second in vivo study it could be shown that the decontaminating effect of the antiseptic polyhexanide is superior to the wound irrigation with sodium chloride and the cold argon plasma treatment. The main parameter for the treatment with polyhexanide and cold argon plasma is the time factor. Strongly recommended is the application time for polyhexanide of 15 minutes, as otherwise antibacterial efficiency could not be achieved if time is undershot. Then it would only be normal wound irrigation. By adaption of application time between the first in vivo study and the second in vivo study, higher effects in decontamination were reached and could be more than doubled from 41% to 86.6%. The time factor is also crucial for the efficiency of the treatment with cold argon plasma. The best decontaminating effect could be detected for 2 minutes per square centimeter of cold argon plasma treatment, whereby the initial bacterial concentration also plays an important role. The lower the initial bacterial concentration was the better the decontamination was. In comparison to wound irrigation with sodium chloride, cold argon plasma performed worse. Based on time investment of the cold argon plasma treatment and the construction of the kINPen® Vet, as well as the resulting poor efficiency

in decontamination, a clinical use of cold argon plasma is not feasible and efficient.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

Abramzon N, Joaquin JC, Bray J, Brelles-Marino G

Biofilm destruction by RF high-pressure cold plasma jet.

IEEE transactions on plasma science. 2006; 34(4): 1304-1309

Allen MJ, White GF, Morby AP

The response of Escherichia coli to exposure to the biocide polyhexamethylene biguanide.

Microbiology. 2006; 152(Pt 4): 989-1000

Anglen JO

Wound irrigation in musculoskeletal injury.

J Am Acad Orthop Surg. 2001; 9(4): 219-226

Assadian O

From antiseptics to antibiotics - and back?

GMS Krankenhhyg Interdiszip. 2007; 2(1): Doc26

Bailie W, Stowe E, Schmitt AJJocm

Aerobic bacterial flora of oral and nasal fluids of canines with reference to bacteria associated with bites. 1978; 7(2): 223-231

Brelles-Marino G

Induction of a viable-but-non-culturable state in bacteria treated with gas discharge plasma.

J Appl Microbiol. 2012; 112(2): 412-413; author reply 414-415

Cabon Q, Derooy C, Ferrand FX, Pillard P, Cachon T, Fau D, Goy-Thollot I, Viguier E, Carozzo C

Thoracic bite trauma in dogs and cats: a retrospective study of 65 cases.

Vet Comp Orthop Traumatol. 2015; 28(6): 448-454

Callaham M

Prophylactic antibiotics in common dog bite wounds: a controlled study.

Ann Emerg Med. 1980; 9(8): 410-414

Callaham M

Controversies in antibiotic choices for bite wounds.

Ann Emerg Med. 1988; 17(12): 1321-1330

Callaham ML

Treatment of common dog bites: infection risk factors.

Jacep. 1978; 7(3): 83-87

Cardany CR, Rodeheaver G, Thacker J, Edgerton MT, Edlich RF

The crush injury: a high risk wound.

Jacep. 1976; 5(12): 965-970

Chindera K, Mahato M, Sharma AK, Horsley H, Kloc-Muniak K, Kamaruzzaman NF, Kumar S, McFarlane A, Stach J, Bentin T, Good L

The antimicrobial polymer PHMB enters cells and selectively condenses bacterial chromosomes.

Sci Rep. 2016; 6: 23121

Cooper M, Fridman G, Fridman A, Joshi SG

Biological responses of *Bacillus stratosphericus* to floating electrode-dielectric

barrier discharge plasma treatment.

J Appl Microbiol. 2010; 109(6): 2039-2048

Cotter JJ, Maguire P, Soberon F, Daniels S, O'Gara JP, Casey E

Disinfection of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms using a remote non-thermal gas plasma.

J Hosp Infect. 2011; 78(3): 204-207

Daeschlein G

Antimicrobial and antiseptic strategies in wound management.

Int Wound J. 2013; 10 Suppl 1: 9-14

Daeschlein G, Scholz S, Ahmed R, Majumdar A, von Woedtke T, Haase H, Niggemeier M, Kindel E, Brandenburg R, Weltmann KD

Cold plasma is well-tolerated and does not disturb skin barrier or reduce skin moisture.

JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft. 2012; 10(7): 509-515

Daeschlein G, Scholz S, Ahmed R, von Woedtke T, Haase H, Niggemeier M, Kindel E, Brandenburg R, Weltmann KD, Juenger M

Skin decontamination by low-temperature atmospheric pressure plasma jet and dielectric barrier discharge plasma.

J Hosp Infect. 2012; 81(3): 177-183

Daeschlein G, von Woedtke T, Kindel E, Brandenburg R, Weltmann KD, Jünger M

Antibacterial activity of an atmospheric pressure plasma jet against relevant wound pathogens in vitro on a simulated wound environment.

Plasma Processes and Polymers. 2010; 7(3-4): 224-230

De Holl D, Rodeheaver G, Edgerton MT, Edlich RF

Potential of infection by suture closure of dead space.

Am J Surg. 1974; 127(6): 716-720

Dire DJ

Cat bite wounds: risk factors for infection.

Ann Emerg Med. 1991; 20(9): 973-979

Dissemond J

[Physical treatment modalities for chronic leg ulcers].

Hautarzt. 2010; 61(5): 387-396

Eberlein T, Assadian O

Clinical use of polihexanide on acute and chronic wounds for antiseptics and decontamination.

Skin pharmacology and physiology. 2010; 23(Suppl. 1): 45-51

Eugster S, Schawalder P, Gaschen F, Boerlin P

A prospective study of postoperative surgical site infections in dogs and cats.

Vet Surg. 2004; 33(5): 542-550

Farr SB, Kogoma T

Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*.

Microbiol Rev. 1991; 55(4): 561-585

Fernandez A, Shearer N, Wilson DR, Thompson A

Effect of microbial loading on the efficiency of cold atmospheric gas plasma inactivation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

Int J Food Microbiol. 2012; 152(3): 175-180

Fluhr JW, Sassning S, Lademann O, Darvin ME, Schanzer S, Kramer A, Richter H, Sterry W, Lademann J

In vivo skin treatment with tissue-tolerable plasma influences skin physiology and antioxidant profile in human stratum corneum.

Exp Dermatol. 2012; 21(2): 130-134

Flynn PB, Higginbotham S, Alshraiedeh NH, Gorman SP, Graham WG, Gilmore BF

Bactericidal efficacy of atmospheric pressure non-thermal plasma (APNTP) against the ESKAPE pathogens.

Int J Antimicrob Agents. 2015; 46(1): 101-107

Fossum TW

Chirurgie der Kleintiere. Elsevier Health Sciences Germany, 2011

Franz T, Vogelin E

Aseptic tissue necrosis and chronic inflammation after irrigation of penetrating hand wounds using Octenisept(R).

J Hand Surg Eur Vol. 2012; 37(1): 61-64

Frey HH, Althaus FR, Löscher W

Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin: 131 Tabellen. Enke, 2010

Gadri RB, Roth JR, Montie TC, Kelly-Wintenberg K, Tsai PP-Y, Helfritsch DJ, Feldman P, Sherman DM, Karakaya F, Chen Z

Sterilization and plasma processing of room temperature surfaces with a one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP).

Surface and Coatings Technology. 2000; 131(1): 528-541

Gaunt LF, Beggs CB, Georghiou GE

Bactericidal action of the reactive species produced by gas-discharge nonthermal plasma at atmospheric pressure: a review.

IEEE Transactions on Plasma Science. 2006; 34(4): 1257-1269

Goldstein EJ

Management of human and animal bite wounds.

J Am Acad Dermatol. 1989; 21(6): 1275-1279

Goldstein EJ, Citron DM, Finegold SM

Dog bite wounds and infection: a prospective clinical study.

Ann Emerg Med. 1980; 9(10): 508-512

Graham WP, 3rd, Calabretta AM, Miller SH

Dog bites.

Am Fam Physician. 1977; 15(1): 132-137

Griffin GM, Holt DE

Dog-bite wounds: bacteriology and treatment outcome in 37 cases.

J Am Anim Hosp Assoc. 2001; 37(5): 453-460

Hammann A, Huebner NO, Bender C, Ekkernkamp A, Hartmann B, Hinz P, Kindel E, Koban I, Koch S, Kohlmann T, Lademann J, Matthes R, Muller G, Titze R, Weltmann KD, Kramer A

Antiseptic efficacy and tolerance of tissue-tolerable plasma compared with two wound antiseptics on artificially bacterially contaminated eyes from commercially slaughtered pigs.

Skin Pharmacol Physiol. 2010; 23(6): 328-332

Harbarth S

[The effect of antimicrobial use on emergence and selection of resistance].

Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther. 2007; 42(2): 130-135

Harris D, Imperato PJ, Oken B

Dog bites--an unrecognized epidemic.

Bull N Y Acad Med. 1974; 50(9): 981-1000

Haury B, Rodeheaver G, Vensko J, Edgerton MT, Edlich RF

Debridement: an essential component of traumatic wound care.

Am J Surg. 1978; 135(2): 238-242

Hirsch T, Koerber A, Jacobsen F, Dissemond J, Steinau HU, Gatermann S, Al-Benna S, Kesting M, Seipp HM, Steinstraesser L

Evaluation of toxic side effects of clinically used skin antiseptics in vitro.

J Surg Res. 2010; 164(2): 344-350

Holt DE, Griffin G

Bite wounds in dogs and cats.

Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2000; 30(3): 669-679, viii

Horrocks A

Prontosan wound irrigation and gel: management of chronic wounds.

Br J Nurs. 2006; 15(22): 1222, 1224-1228

Hulsemann W, Habenicht R

[Severe side effects after Octenisept irrigation of penetrating wounds in children].

Handchir Mikrochir Plast Chir. 2009; 41(5): 277-282

Imlay JA

Pathways of oxidative damage.

Annu Rev Microbiol. 2003; 57: 395-418

Joaquin JC, Kwan C, Abramzon N, Vandervoort K, Brelles-Marino G

Is gas-discharge plasma a new solution to the old problem of biofilm inactivation?

Microbiology. 2009; 155(Pt 3): 724-732

Johnston DE

Care of accidental wounds.

Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1990; 20(1): 27-46

Joshi SG, Cooper M, Yost A, Paff M, Ercan UK, Fridman G, Friedman G, Fridman A, Brooks AD

Nonthermal dielectric-barrier discharge plasma-induced inactivation involves oxidative DNA damage and membrane lipid peroxidation in Escherichia coli.

Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55(3): 1053-1062

Kaehn K

Polihexanide: a safe and highly effective biocide.

Skin Pharmacol Physiol. 2010; 23 Suppl: 7-16

Kaehn K, Eberlein T

In-vitro test for comparing the efficacy of wound rinsing solutions.

Br J Nurs. 2009; 18(11): S4, s6-8, s10

Kaiser S, Kramer M, Thiel C

[Severe complications after non-intended usage of octenidine dihydrochloride. A case series with four dogs].

Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere. 2015; 43(5): 291-298

Kalteis T, Luring C, Schaumburger J, Perlick L, Bathis H, Grifka J

[Tissue toxicity of antiseptics].

Z Orthop Ihre Grenzgeb. 2003; 141(2): 233-238

Koban I, Holtfreter B, Hubner NO, Matthes R, Sietmann R, Kindel E, Weltmann KD, Welk A, Kramer A, Kocher T

Antimicrobial efficacy of non-thermal plasma in comparison to chlorhexidine against dental biofilms on titanium discs in vitro - proof of principle experiment.

J Clin Periodontol. 2011; 38(10): 956-965

Koburger T, Hubner NO, Braun M, Siebert J, Kramer A

Standardized comparison of antiseptic efficacy of triclosan, PVP-iodine, octenidine dihydrochloride, polyhexanide and chlorhexidine digluconate.

J Antimicrob Chemother. 2010; 65(8): 1712-1719

Kramer A, Assadian O, Frank M, Bender C, Hinz P

Prevention of post-operative infections after surgical treatment of bite wounds.

GMS Krankenhhyg Interdiszip. 2010; 5(2)

Kramer A, Daeschlein G, Kammerlander G, Andriessen A, Aspöck C, Bergemann R, Eberlein T, Gerngross H, Görtz G, Heeg P

Konsensusempfehlung zur Auswahl von Wirkstoffen für die Wundantiseptik.

Hyg Med. 2004; 5: 147-157

Kramer A, Roth B, Muller G, Rudolph P, Klocker N

Influence of the antiseptic agents polyhexanide and octenidine on FL cells and on healing of experimental superficial aseptic wounds in piglets. A double-blind, randomised, stratified, controlled, parallel-group study.

Skin Pharmacol Physiol. 2004; 17(3): 141-146

Kramer M

Kompendium der allgemeinen Veterinärchirurgie. Schlütersche, 2004

Laroussi M

Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: review, analysis, and prospects.

IEEE Transactions on plasma science. 2002; 30(4): 1409-1415

Laroussi M

Low-temperature plasmas for medicine?

IEEE Transactions on plasma science. 2009; 37(6): 714-725

Laroussi M, Leipold F

Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure.

International Journal of Mass Spectrometry. 2004; 233(1): 81-86

Liu JX, Werner J, Kirsch T, Zuckerman JD, Virk MS

Cytotoxicity evaluation of chlorhexidine gluconate on human fibroblasts, myoblasts, and osteoblasts.

J Bone Jt Infect. 2018; 3(4): 165-172

Lozier S, Pope E, Berg J

Effects of four preparations of 0.05% chlorhexidine diacetate on wound healing in dogs.

Vet Surg. 1992; 21(2): 107-112

Mai-Prochnow A, Murphy AB, McLean KM, Kong MG, Ostrikov KK

Atmospheric pressure plasmas: infection control and bacterial responses.

Int J Antimicrob Agents. 2014; 43(6): 508-517

Maimaris C, Quinton DN

Dog-bite lacerations: a controlled trial of primary wound closure.

Arch Emerg Med. 1988; 5(3): 156-161

Matthes R, Hubner NO, Bender C, Koban I, Horn S, Bekeschus S, Weltmann KD, Kocher T, Kramer A, Assadian O

Efficacy of different carrier gases for barrier discharge plasma generation compared to chlorhexidine on the survival of *Pseudomonas aeruginosa* embedded in biofilm in vitro.

Skin Pharmacol Physiol. 2014; 27(3): 148-157

Matthes R, Koban I, Bender C, Masur K, Kindel E, Weltmann KD, Kocher T, Kramer A, Hübner NO

Antimicrobial efficacy of an atmospheric pressure plasma jet against biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*.

Plasma Processes and Polymers. 2013; 10(2): 161-166

Matthes R, Lührman A, Holtfreter S, Kolata J, Radke D, Hubner NO, Assadian O, Kramer A

Antibacterial Activity of Cold Atmospheric Pressure Argon Plasma against 78 Genetically Different (*mecA*, *luk-P*, *agr* or Capsular Polysaccharide Type) *Staphylococcus aureus* Strains.

Skin Pharmacol Physiol. 2016; 29(2): 83-91

Mendis D, Rosenberg M, Azam F

A note on the possible electrostatic disruption of bacteria.

IEEE transactions on plasma science. 2000; 28(4): 1304-1306

Meyers B, Schoeman JP, Goddard A, Picard J

The bacteriology and antimicrobial susceptibility of infected and non-infected dog bite wounds: fifty cases.

Vet Microbiol. 2008; 127(3-4): 360-368

Montie TC, Kelly-Wintenberg K, Roth JR

An overview of research using the one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP) for sterilization of surfaces and materials.

IEEE Transactions on plasma science. 2000; 28(1): 41-50

Mouro S, Vilela CL, Niza MM

Clinical and bacteriological assessment of dog-to-dog bite wounds.

Vet Microbiol. 2010; 144(1-2): 127-132

Muller G, Kramer A

Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity.

J Antimicrob Chemother. 2008; 61(6): 1281-1287

Nolff MC, Reese S, Fehr M, Dening R, Meyer-Lindenberg A

Assessment of wound bio-burden and prevalence of multi-drug resistant bacteria during open wound management.

J Small Anim Pract. 2016; 57(5): 255-259

Ogeer-Gyles JS, Mathews KA, Boerlin P

Nosocomial infections and antimicrobial resistance in critical care medicine.

Journal of Veterinary Emergency and Critical Care. 2006; 16(1): 1-18

Ordog GJ

The bacteriology of dog bite wounds on initial presentation.

Ann Emerg Med. 1986; 15(11): 1324-1329

Paschos NK, Makris EA, Gantsos A, Georgoulis AD

Primary closure versus non-closure of dog bite wounds. a randomised controlled trial.

Injury. 2014; 45(1): 237-240

Roth B, Neuenschwander R, Brill F, Wurmitzer F, Wegner C, Assadian O, Kramer A

Effect of antiseptic irrigation on infection rates of traumatic soft tissue wounds: a longitudinal cohort study.

J Wound Care. 2017; 26(3): 79-87

Sanchez IR, Swaim SF, Nusbaum KE, Hale AS, Henderson RA, McGuire JA

Effects of chlorhexidine diacetate and povidone-iodine on wound healing in dogs.

Vet Surg. 1988; 17(6): 291-295

Saphir DA, Carter GR

Gingival flora of the dog with special reference to bacteria associated with bites.

J Clin Microbiol. 1976; 3(3): 344-349

Schebitz H, Alef M

Operationen an Hund und Katze: 66 Tabellen. Parey, 2007

Schupp CJ, Holland-Cunz S

Persistent subcutaneous oedema and aseptic fatty tissue necrosis after using octenisept.

Eur J Pediatr Surg. 2009; 19(3): 179-183

Shahar R, Shamir M, Johnston DE

A technique for management of bite wounds of the thoracic wall in small dogs.

Vet Surg. 1997; 26(1): 45-50

Shamir MH, Leisner S, Klement E, Gonen E, Johnston DE

Dog bite wounds in dogs and cats: a retrospective study of 196 cases.

J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 2002; 49(2): 107-112

Stevenson TR, Thacker JG, Rodeheaver GT, Bacchetta C, Edgerton MT, Edlich RF

Cleansing the traumatic wound by high pressure syringe irrigation.

Jacep. 1976; 5(1): 17-21

Taghizadeh L, Brackman G, Nikiforov A, van der Mullen J, Leys C, Coenye T

Inactivation of biofilms using a low power atmospheric pressure argon plasma jet; the role of entrained nitrogen.

Plasma Processes and Polymers. 2015; 12(1): 75-81

Talan DA, Citron DM, Abrahamian FM, Moran GJ, Goldstein EJ

Bacteriologic analysis of infected dog and cat bites. Emergency Medicine Animal Bite Infection Study Group.

N Engl J Med. 1999; 340(2): 85-92

Vatansever F, de Melo WC, Avci P, Vecchio D, Sadasivam M, Gupta A, Chandran R, Karimi M, Parizotto NA, Yin R, Tegos GP, Hamblin MR

Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species--bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond.

FEMS Microbiol Rev. 2013; 37(6): 955-989

Von Woedtke T, Reuter S, Masur K, Weltmann K-D

Plasmas for medicine.

Physics Reports. 2013; 530(4): 291-320

Weese JS

A review of multidrug resistant surgical site infections.

Vet Comp Orthop Traumatol. 2008; 21(1): 1-7

Wiley JF, 2nd

Mammalian bites. Review of evaluation and management.

Clin Pediatr (Phila). 1990; 29(5): 283-287

Willy C, Scheuermann-Poley C, Stichling M, von Stein T, Kramer A

[Importance of wound irrigation solutions and fluids with antiseptic effects in therapy and prophylaxis : Update 2017].

Unfallchirurg. 2017; 120(7): 549-560

Xiaowei Z, Wei L, Xiaowei H, Yunbei X, Zhenhua L, Yeqing Y, Jiaqi Y, Chuanlin W

Comparison of primary and delayed wound closure of dog-bite wounds.

Vet Comp Orthop Traumatol. 2013; 26(3): 204-207

Yokose N, Dan K

Pasteurella multocida sepsis, due to a scratch from a pet cat, in a post-chemotherapy neutropenic patient with non-Hodgkin lymphoma.

Int J Hematol. 2007; 85(2): 146-148

Yu H, Perni S, Shi J, Wang D, Kong M, Shama G

Effects of cell surface loading and phase of growth in cold atmospheric gas plasma inactivation of *Escherichia coli* K12.

Journal of applied microbiology. 2006; 101(6): 1323-1330

Zhang Q, Liang Y, Feng H, Ma R, Tian Y, Zhang J, Fang J

A study of oxidative stress induced by non-thermal plasma-activated water for bacterial damage.

Applied Physics Letters. 2013; 102(20): 203701

X. DANKSAGUNG

Ich möchte mich herzlich bei Frau Prof. Meyer-Lindenberg und Frau Dr. Nolff für die Überlassung dieses Themas für meine Dissertation und die fachlich kompetente Unterstützung bei der Anfertigung bedanken. Eine immer offene Tür sowie ein offenes Ohr für Gespräche zur Optimierung waren sehr hilfreich. Vielen Dank auch für die Chance, die ersten Ergebnisse der Dissertation als Vortrag auf zwei Kongressen präsentieren zu können und die damit verbundene Erfahrung.

Vielen Dank an alle Chirurgen, die oftmals in den Abend- und Nachtstunden operiert haben und stets Stillschweigen bewahrt haben um die doppelt geblindete Studie möglich zu machen. Für euch war das Warten während der Operation nicht immer optimal im Klinikalltag.

Ich möchte mich auch sehr herzlich bei Herrn Dr. Georg Wolf und seinem Team bedanken, welche mir stets mit Rat bei Seite standen und mir den in-vitro Test ermöglicht haben. Ich wurde sehr freundlich und familiär aufgenommen und konnte jederzeit dort an dem in-vitro Teil meiner Studie arbeiten

Danke auch an Herrn Dr. Reese für die Hilfe bei der statistische Auswertung der verschiedenen Abschnitte der Dissertation und die analytischen Gespräche darüber.

Ganz herzlich möchte ich mich natürlich auch bei meiner Familie und vor allem bei meiner Mutter für die mentale Unterstützung bedanken. Danke dass Ihr immer hinter mir standet und mich habt durchhalten lassen. Es war ein langer Weg, der nicht immer einfach war. Ein Danke geht ebenso an meine Freunde, die mich zum Lachen gebracht und mich immer wieder motiviert haben weiter zu machen.