

Institut: Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

Kommissarischer Institutsleiter: PD Dr. med. habil. Philipp Christoph Warnke

ENTWICKLUNG EINER SCHNELLEN STANDARDISIERTEN
PHAGENSPEZIFITÄTSTESTUNG FÜR DIAGNOSTISCHE
ROUTINELABORE IN ANLEHNUNG AN DIE PLÄTTCHEN-
BASIERTE AGARDIFFUSIONSTESTUNG

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Universitätsmedizin Rostock

Gutachter:

OA PD Dr. med. habil. Philipp Warnke, Universität Rostock
Univ.-Prof. Dr. med. habil. Justus Groß, Universität Rostock
Univ.-Prof. Dr. med. Karsten Becker, Universität Greifswald

Vorgelegt von

Juliane Kohlen | geb. am 14.03.1997 in Wismar, aus Lübeck
Einreichung | Juli 2024
Verteidigung | Januar 2025

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00005093

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Antibiotikaresistenzen	1
1.2	Etablierte Verfahren zur Antibiotikatestung nach EUCAST	2
1.2.1	Manuelle Verfahren	2
1.2.2	Automatisierte Verfahren	3
1.2.3	Verfahren mit verkürzter Inkubationszeit	4
1.3	Historie der Phagenforschung	4
1.4	Wirkung von Bakteriophagen	6
1.5	Aktuelle Phagenforschung	8
1.6	Spezifitätstestung von Phagen	8
1.6.1	Spot Test	9
1.6.2	Double Agar Overlay Plaque Assay	9
1.6.3	Kinetic Assay	10
1.7	Zielsetzung	10
2	Material und Methoden	12
2.1	Materialien	12
2.1.1	Chemikalien	12
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	12
2.1.3	Laborgeräteausrüstung und Software	14
2.1.4	Verwendete Mikroorganismen	15
2.1.5	Kulturmedien, Puffer und Lösungen	16
2.2	Methoden	17
2.2.1	Herstellung von Bottom- und Softagar, Puffer- und Nährmedien	17
2.2.2	Quantifizierung der Bakterien	17
2.2.3	Vermehrung der Phagen	18
2.2.4	Quantifizierung der Phagensuspension im Double Agar Overlay Plaque Assay	18
2.2.5	Etablierung eines Phagogramms am Beispiel des <i>Escherichia</i> Phagen T4	19
2.2.6	Qualitätskontrolle	20
2.2.7	Übertragbarkeit des Phagogramms auf andere Phagenstämme	21
2.3	Schnelle Phagenspezifitätstestung	21
2.3.1	Allgemeiner Versuchsaufbau	21
2.3.2	Anwendung an ausgewählten Phagenstämmen	22
2.3.3	Auswertungskriterien	22
2.3.4	Ethik	24
2.3.5	Statistik	24
3	Ergebnisse	25
3.1	Vorversuche	25

INHALTSVERZEICHNIS

3.1.1	Quantifizierung der Phagensuspension	25
3.1.2	Entwicklung eines Phagogramms am Beispiel des <i>Escherichia</i> Phagen T4	25
3.1.3	Qualitätskontrolle	29
3.1.4	Übertragbarkeit des Phagogramms auf andere Phagenstämme	30
3.2	Schnelle Phagenspezifitätstestung	33
3.2.1	<i>Escherichia</i> Phage T4	33
3.2.2	<i>Staphylococcus</i> Phage MRLN	35
3.2.3	<i>Staphylococcus</i> Phage vB_SepM_Alex	37
3.2.4	<i>Pseudomonas</i> Phage 7 Lindberg	39
3.2.5	<i>Pseudomonas</i> Phage vB_PaeM-PT-MAS01	41
3.2.6	<i>Proteus</i> Phage vB_PniP-Homer	43
3.2.7	<i>Enterococcus</i> Phage vB_EfaS_Strempel1	45
3.2.8	Zusammenfassung der Versuche aller untersuchten Phagenstämme	50
<u>4</u>	<u>Diskussion</u>	<u>51</u>
<u>5</u>	<u>Zusammenfassung</u>	<u>64</u>
<u>6</u>	<u>Anhang</u>	<u>65</u>
6.1	Danksagung	65
6.2	Veröffentlichungen	66
6.3	Thesen	67
<u>7</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	<u>68</u>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
Col	Columbia Agar
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
EU	Europäische Union
HCL	Chlorwasserstoff
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IBIMA	Institutes für Biostatistik und Informatik in Medizin und Altersforschung
IMIKRO	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene Rostock
ITEM	Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin Hannover
LB	Luria Broth Base
McF	McFarland
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MH II	BD Mueller Hinton II Agar
MH-F	BD Mueller Hinton Fastidious Agar
MHK	Minimale Hemmkonzentration

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

MRSA	Methicillin resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
NaCl	Natriumchlorid
NAK	Nationales Antibiotika-Sensibilitäts-Komitee
NaOH	Natriumhydroxid
OD	Optische Dichte
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Tris-HCL	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UMR	Universitätsmedizin Rostock

Etablierte englische Begriffe und Abkürzungen	
AST	Antimicrobial Susceptibility Testing
BHI	Brain Heart Infusion
CFU	Colony Forming Units
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
EARS-Net	European Antimicrobial Resistance Surveillance Network
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EOP	Efficiency of Plating
ESBL	Extended-Spectrum-Beta-Lactamasen

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FAA	Fastidious Anaerobic Agar
GMP	Good Manufacturing Practices
MDR	Multi-Drug-resistant
MOI	Multiplicity of Infection
PFU	Plaque Forming Units
rAST	rapid Antimicrobial Susceptibility Testing
rpm	Rounds per minute

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lytischer und Lysogener Zyklus bei Bakteriophagen	7
Abbildung 2: Phagogramme des <i>Escherichia</i> Phagen T4 nach Inkubation für 18-24 Stunden unter Verwendung von Bakteriensuspensionen unterschiedlicher Trübungsstandards: McF 0.1 (links), McF 0.2 (Mitte), McF 0.5 (rechts)	26
Abbildung 3: Phagogramme des <i>Escherichia</i> Phagen T4 nach Inkubation für 18-24 Stunden, Inokulation der Proben mit <i>E. coli</i> mithilfe eines Wattestabs (links) sowie mithilfe eines Drigalskispatels (rechts).....	27
Abbildung 4: Phagogramme des <i>Escherichia</i> Phagen T4 nach Inkubation für 18-24 Stunden, 20 µl Phagensuspension je Testplättchen in den Konzentrationen 10 ¹ bis 10 ⁸ PFU/ml	28
Abbildung 5: Phagogramme des <i>Escherichia</i> Phagen T4 nach Inkubation für 18-24 Stunden, Aufbringen der Phagensuspension durch direkte Applikation (links) bzw. Aufbringen auf Testplättchen (rechts) in den Volumina 5 µl, 10 µl, 20 µl und 50 µl	29
Abbildung 6: Qualitätskontrolle zur intrinsischen lytischen Aktivität des SM-Puffers gegenüber dem Bakterienstamm <i>E. coli</i>	29
Abbildung 7: Qualitätskontrolle zur Wirtsspezifität des <i>Escherichia</i> Phagen T4. Applikation von <i>Escherichia</i> T4 Phagensuspension (10 ⁸ PFU/ml) in den Volumina 5, 10, 20 und 50 µl auf eine mit <i>Serratia marcescens</i> inokulierte Agarplatte.	30
Abbildung 8: Phagogramme der Phagenstämme nach Inkubation für 18-24 Stunden.	31
Abbildung 9: Absolute Häufigkeiten der beobachteten Ereignisse nach Einteilung in Lysekategorien in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Phagogramm vom <i>Escherichia</i> Phagen T4 und dem Referenzbakterienstamm <i>E. coli</i>	35
Abbildung 10: Fotodokumentation eines Phagogramms des <i>Escherichia</i> Phagen T4 von Versuch 2.....	35
Abbildung 11: Absolute Häufigkeiten der beobachteten Ereignisse nach Einteilung in Lysekategorien in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Phagogramm vom <i>Staphylococcus</i> Phagen MRLN und dem Referenzbakterienstamm <i>S. aureus</i>	37
Abbildung 12: Fotodokumentation eines Phagogramms des <i>Staphylococcus</i> Phagen MRLN von Versuch 2	37
Abbildung 13: Absolute Häufigkeiten der beobachteten Ereignisse nach Einteilung in Lysekategorien in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Phagogramm vom <i>Staphylococcus</i> Phagen vB_SepM_Alex und dem Referenzbakterienstamm <i>S. epidermidis</i>	39

Abbildung 14: Fotodokumentation eines Phagogramms des <i>Staphylococcus</i> Phagen vB_SepM_Alex von Versuch 3	39
Abbildung 15: Absolute Häufigkeiten der beobachteten Ereignisse nach Einteilung in Lysekategorien in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Phagogramm vom <i>Pseudomonas</i> Phagen 7 Lindberg und dem Referenzbakterienstamm <i>P. aeruginosa</i> Stamm I auf MH II Agar.....	41
Abbildung 16: Fotodokumentation eines Phagogramms des <i>Pseudomonas</i> Phagen Lindberg von Versuch 2.....	41
Abbildung 17: Absolute Häufigkeiten der beobachteten Ereignisse nach Einteilung in Lysekategorien in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Phagogramm vom <i>Pseudomonas</i> Phagen vB_PaeM-PT-MAS01 und dem Referenzbakterienstamm <i>P. aeruginosa</i> Stamm II auf MH II Agar.....	43
Abbildung 18: Fotodokumentation eines Phagogramms des <i>Pseudomonas</i> Phagen vB_PaeM-PT-MAS01 von Versuch 2.....	43
Abbildung 19: Absolute Häufigkeiten der beobachteten Ereignisse nach Einteilung in Lysekategorien in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Phagogramm vom <i>Proteus</i> Phagen vB_PniP-Homer und dem Referenzbakterienstamm <i>P. mirabilis</i> ..	45
Abbildung 20: Fotodokumentation eines Phagogramms des <i>Proteus</i> Phagen vB_PniP-Homer von Versuch 1.....	45
Abbildung 21: Absolute Häufigkeiten der beobachteten Ereignisse nach Einteilung in Lysekategorien in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Phagogramm vom <i>Enterococcus</i> Phagen vB_EfaS_Strempell und dem Referenzbakterienstamm <i>E. faecalis</i> auf MH II Agar.	47
Abbildung 22: Fotodokumentation eines Phagogramms des <i>Enterococcus</i> Phagen vB_EfaS_Strempell von Versuch 1.....	47
Abbildung 23: Absolute Häufigkeiten der beobachteten Ereignisse nach Einteilung in Lysekategorien in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Phagogramm vom <i>Enterococcus</i> Phagen vB_EfaS_Strempell und dem Referenzbakterienstamm <i>E. faecalis</i> auf MH-F Agar.	49
Abbildung 24: Fotodokumentation eines Phagogramms des <i>Enterococcus</i> Phagen vB_EfaS_Strempell von Versuch 1 auf MH-F Agar.....	49
Abbildung 25: Absolute Häufigkeiten der beobachteten Ereignisse nach Einteilung in Lysekategorien in Abhängigkeit der Inkubationszeit. Phagogramm der sieben Phagenstämme und den jeweiligen Referenzbakterienstämmen auf MH II Agar.	50

TABELLENVERZEICHNIS

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien.....	12
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	12
Tabelle 3: Laborgeräteausstattung und Software.....	14
Tabelle 4: Verwendete Mikroorganismen	15
Tabelle 5: Kulturmedien, Puffer und Lösungen.....	16
Tabelle 6: Bezeichnung und Definition der aufgetretenen Lyse.....	23
Tabelle 7: Ausgangskonzentrationen der verwendeten Referenzphagen	25
Tabelle 8: Konzentration der Bakterienlösung <i>E. coli</i> in Abhängigkeit des Trübungsstandards.....	26
Tabelle 9: Konzentrationen in CFU/ml der verwendeten Bakteriensuspension mit einem Trübungsstandard von McFarland 0.2	32
Tabelle 10: Mindestkonzentration der Phagensuspension in PFU/ml, bei der noch eine Lyse sichtbar ist.....	32
Tabelle 11: Auswertung der Lysezonen in den Phagogrammen des <i>Escherichia</i> Phagen T4 und <i>E. coli</i>	34
Tabelle 12: Auswertung der Lysezonen in den Phagogrammen des <i>Staphylococcus</i> Phagen MRLN und <i>S. aureus</i>	36
Tabelle 13: Auswertung der Lysezonen in den Phagogrammen des <i>Staphylococcus</i> Phagen MRLN und <i>S. epidermidis</i>	38
Tabelle 14: Auswertung der Lysezonen in den Phagogrammen des <i>Pseudomonas</i> Phagen 7 Lindberg und <i>P. aeruginosa</i> Stamm I.....	40
Tabelle 15: Auswertung der Lysezonen in den Phagogrammen des <i>Pseudomonas</i> Phagen vB_PaeM-PT-MAS01 und <i>P. aeruginosa</i> Stamm II	42
Tabelle 16: Auswertung der Lysezonen in den Phagogrammen des <i>Proteus</i> Phagen vB_PniP-Homer und <i>P. mirabilis</i>	44
Tabelle 17: Auswertung der Lysezonen in den Phagogrammen des <i>Enterococcus</i> Phagen vB_EfaS_Strempell und <i>E. faecalis</i> auf MH Agar.....	46
Tabelle 18: Auswertung der Lysezonen in den Phagogrammen des <i>Enterococcus</i> Phagen vB_EfaS_Strempell und <i>E. faecalis</i> auf MH-F Agar	48

Genderhinweis

In dieser Arbeit wurden bei Personenbezeichnungen und personenbezogenen Hauptwörtern das generische Maskulinum gewählt, beispielsweise Patienten. Andere, nicht benannte Geschlechtsidentitäten sind in dieser Formulierung inbegriffen, soweit es für die Aussage erforderlich ist.

1 Einleitung

1.1 Antibiotikaresistenzen

Die Gabe von Antibiotika ist eine gängige, verfügbare, evidenzbasierte und zugelassene Therapie bakterieller Infektionen. Jedoch sind die therapeutischen Optionen insbesondere bei zunehmend häufiger anzutreffenden Infektionen mit multiresistenten Erregern limitiert. Zudem kann eine antibiotische Behandlung mit einer Vielzahl von Nebenwirkungen assoziiert sein. Dazu zählen beispielsweise gastrointestinale Beschwerden wie Übelkeit, Erbrechen und Diarrhö sowie allergische Reaktionen. Antibiotika wie beispielsweise Rifampicin, Isoniazid oder Makrolide können auch die Leber schädigen. Darüber hinaus üben Antibiotika einen Selektionsdruck auf die physiologische Flora aus und verändern so das lokale Mikrobiom. [1–4]

Bereits 1945 wies Alexander Fleming in seiner Rede zum Nobelpreis auf die Gefahren der Resistenzentwicklung gegenüber Penicillin bei unsachgemäßem Gebrauch des Antibiotikums hin. [5] Kurze Zeit später wurden in mehreren Studien Beobachtungen über die Resistenzentwicklung gegenüber Penicillinen und Sulfonamiden dokumentiert. [6–9] Die fortlaufende Entwicklung und Zulassung neuer Antibiotika schien das Problem der Resistenzbildung zunächst zu lösen. Doch finanzielle und regulatorische Hürden bei der Markteinführung ließen den Zustrom neuer Antibiotika innerhalb der letzten Jahrzehnte versiegen. [10–14] Im Zeitraum von 1998 bis 2011 wurden trotz zunehmender Resistenzlage gerade einmal zehn neue Antibiotika zugelassen. Die Entwicklung antiinfektiver Medikamente erschien teurer und weniger rentabel für die Pharmaindustrie als beispielsweise die Entwicklung von Medikamenten zur Behandlung chronischer Erkrankungen. [15]

In einem Artikel, veröffentlicht 2019 im *The Lancet*, wurden Daten des European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) aus dem Jahr 2015 zu Infektionen mit antibiotikaresistenten Sepsiserregern in Ländern der Europäischen Union und des Europäischen Wirtschaftsraumes analysiert. Innerhalb eines Jahres wurden mehr als 670 000 Infektionen mit multiresistenten Keimen und über 33 000 Todesopfer als direkte Folge einer solchen Infektion gemeldet. Insbesondere Extended-Spectrum-Beta-Lactamasen (ESBL)-bildende Bakterien der Gattung

EINLEITUNG

Escherichia coli (*E. coli*) und *Klebsiella pneumoniae*, Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) und Multi-Drug-resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) waren dafür verantwortlich. Am häufigsten betroffen waren Säuglinge sowie ältere Menschen über 65 Jahre. [16, 17] Eine Studie aus dem Jahr 2019 sammelte weltweit Daten zu Todesfällen sowie durch Krankheit verlorene Lebensjahre in Zusammenhang mit Infektionen durch antibiotikaresistente Keime. Schätzungen, basierend auf diesen Daten, beinhalteten 4,95 Millionen Todesfälle im Zusammenhang mit diesen Infektionen. [17] Laut einer Schätzung des Robert-Koch-Institutes (RKI) von 2015 erkrankten in Deutschland jährlich ca. 54 500 Menschen an Infektionen ausgelöst durch antibiotikaresistente Keime. Von diesen Infektionen enden ca. 2400 letal. [18]

1.2 Etablierte Verfahren zur Antibiotikatestung nach EUCAST

Da die Gabe von Antibiotika in der Behandlung bakterieller Infektionen seit Jahrzehnten zur Standardtherapie zählt, erfolgt die Sensibilitätstestung der Bakterienisolate gegenüber den Antibiotika nach Normwerten und etablierten Verfahren. Neben dem Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ist das European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) eine der Institutionen, welche für die Festlegung dieser Grenzwerte sowie für die Entwicklung standardisierter Methoden zur phänotypischen In-Vitro-Empfindlichkeitstestung antibakterieller Substanzen zuständig ist. Für die Etablierung von EUCAST-Grenzwerten auf nationaler Ebene ist in Deutschland das Nationale Antibiotika-Sensitivitäts-Komitee (NAK) zuständig. [19]

Für die Antibiotika-Empfindlichkeitstestung, Antimicrobial Susceptibility Testing (AST), sind verschiedene Methoden in der Routinediagnostik mikrobiologischer Labore etabliert. Dabei kann in manuelle und automatisierte Verfahren unterschieden werden.

1.2.1 Manuelle Verfahren

Zu den manuellen Verfahren zählen die Agar-basierten Testungen mittels Plättchen-Agardiffusionstest und Gradientendiffusionstest sowie die Mikrobouillondilution. Dabei wird ein Bouillonmedium, meist Mueller-Hinton-Bouillon, mit definierten

EINLEITUNG

Antibiotikakonzentrationen in die Vertiefungen einer Mikrotitrationsplatte gegeben. Der zu testende Bakterienstamm wird als Flüssigkultur hinzugegeben. Nach Inkubation für 16-20 Stunden können die Proben hinsichtlich einer Inhibition des Bakterienwachstums beurteilt und die Minimale Hemmkonzentration (MHK) festgelegt werden. [20] Beim Plättchen-Agardiffusionstest werden Agarplatten mit dem zu untersuchenden Bakterienstamm beimpft und anschließend mit Antibiotika beschickte Plättchen aufgebracht. Nach einer Inkubationszeit von 16-20 Stunden erfolgt die Auswertung anhand der Größe des ausgebildeten Hemmhofs und Einordnung anhand von Grenzwerten in die Kategorien „sensibel“ (S), „sensibel bei erhöhter Exposition“ (I) und „resistent“ (R). [21, 22] Die Anleitung zur Auswertung der Hemmhöfe ist im EUCAST-Leitfaden zu finden. [23] Die Grenzwerte zur Interpretation der Hemmhofdurchmesser werden jährlich aktualisiert und sind auf der Internetseite des EUCAST zu finden (<http://www.eucast.org>). Ein weiteres manuelles Verfahren ist der Gradientendiffusions- oder Epsilometerstest. Bei gleicher Durchführung werden anstatt der Antibiotikaplättchen kommerziell gefertigte Teststreifen, beschichtet mit einem Konzentrationsgradienten des zu testenden Antibiotikums, verwendet. Nach Inkubation kann die MHK an der unteren Schnittstelle des entstandenen elliptischen Hemmhofs am Streifen auf einer Skala abgelesen werden. Die MHK beschreibt die geringste Antibiotikakonzentration, bei der das Bakterienwachstum vollständig inhibiert wurde. [24] Während beim Plättchen-Agardiffusionstest lediglich getestet wird, ob ein Bakterienstamm gegenüber einem Antibiotikum sensibel oder resistent ist, stellt der Gradientendiffusionstest ein Mittel zur MHK-Bestimmung dar, welche in bestimmten klinischen Situationen von Bedeutung sein kann (z. B. Penicillin-MHK bei infektiöser Endokarditis durch vergrünende Streptokokken).

1.2.2 Automatisierte Verfahren

Automatisierte Verfahren basieren auf der Mikrobouillondilution. Der Nachweis des Bakterienwachstums in Gegenwart des Antibiotikums erfolgt über die kontinuierliche Messung von Indikatoränderungen und Änderungen der Trübung. Vollautomatisierte Systeme zur Sensibilitätstestung sind beispielsweise das BD-Phoenix-System oder das VITEK 2-System von bioMérieux. [20] Dabei erfolgt eine kontinuierliche optische Messung inklusive der Wachstumskontrolle.

EINLEITUNG

Nach Durchführung einer algorithmischen Analyse der Wachstumskinetiken kann ein MHK-Bereich abgeleitet werden. Automatisierte Verfahren bieten den Vorteil einer besseren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und verlangen einen geringeren personellen Arbeitsaufwand als manuelle Verfahren. Nachteilig gegenüber den manuellen Verfahren sind die höheren Kosten der Verbrauchsmaterialien sowie die geringere Flexibilität bei der Auswahl zu testender Bakterien. Die Untersuchung seltener Erreger ist in den Standard-Panels nicht abgedeckt, sodass diese separat getestet werden müssen. [25, 26]

1.2.3 Verfahren mit verkürzter Inkubationszeit

Sowohl bei den manuellen als auch bei den automatisierten Systemen wurden für die Testung einiger Bakterienspezies bereits eine Verkürzung der Turn-around-Zeiten und damit eine schnellere Auswertung der Proben ermöglicht. [27]

Da in dieser Arbeit vor allem Parallelen zur manuellen Sensitivitätstestung gezogen werden, ist diese im Folgenden ausführlicher beschrieben.

Bei der schnellen Antibiotika-Empfindlichkeitstestung, rapid Antimicrobial Susceptibility Testing (rAST), einer modifizierten Form des AST, erfolgt die Beurteilung der Inhibitionszonen nach 4-8 Stunden nach entsprechenden Grenzwerten. Die Vorbereitung einer Übernachtskultur entfällt, da das Nativmaterial in Form positiver Blutkulturen direkt unverdünnt ausplattiert wird. Bisher ist die Methode nur zur Untersuchung positiver Blutkulturen mit den Keimen *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), *Enterococcus faecium* und *Acinetobacter baumannii* validiert. [28]

1.3 Historie der Phagenforschung

Als Alternative oder Ergänzung zur Antibiotikatherapie erfährt die Forschung an Bakteriophagen (kurz Phagen) aktuell eine Renaissance. Indirekt fanden sie bereits im 19. Jahrhundert in einem Bericht über die antibakterielle Aktivität von Flusswasser Erwähnung. Der britische Bakteriologe Ernest Hankin veröffentlichte 1896 seine Beobachtungen zur antibakteriellen Aktivität des Wassers aus den Flüssen Ganges und

EINLEITUNG

Jumna in Indien gegenüber dem Bakterium *Vibrio cholerae*. [29] Ähnliches beobachtete der russische Bakteriologe Gamaleya zwei Jahre später bei *Bacillus subtilis*. [30] Der britische Bakteriologe Frederick Twort stellte 1914 die Vermutung auf, es könnte sich um ein Virus handeln. Im Dezember 1915 beschrieb er im *The Lancet* seine Forschungsarbeiten am Brown Institut in London über Filter-passierende Viren. Bei seiner Arbeit mit Mikrokokken beobachtete er, wie Bereiche innerhalb der gewachsenen Mikrokokkenkulturen glasig und transparent wurden. Übertrug er Proben aus diesen Bereichen auf andere Mikrokokkenkulturen, so begann auch hier die glasige Transformation und breitete sich über die gewachsene Bakterienkultur aus. Außerhalb dieser fand der Vorgang nicht statt. Auch wenn Twort ein Virus hinter diesen Mechanismen vermutete, bezog er in seinen Schriften die Möglichkeit der Existenz eines winzigen Bakteriums oder einer kleinen Amöbe ein. [31]

Der französisch-kanadische Mikrobiologe Félix D'Herelle isolierte Mikroorganismen aus den Stuhl- und Urinproben von Patienten, die an einer Diarrhoe, ausgelöst durch *Shigella dysenteriae*, erkrankt waren und beobachtete die bakteriolytische Wirkung dieser Mikroorganismen. In seinem Bericht vom 03. September 1917 bezeichnete er sie erstmals als Bakteriophagen. [32, 33]

Durch seine Verbindung zum georgischen Wissenschaftler Professor George Eliava trug er maßgeblich zur Gründung des Eliava Instituts 1923 in Tbilisi, Georgien, bei. Es entstand die Idee, ein Weltzentrum für Phagenforschung und -therapie an diesem Ort zu erschaffen. [34]

Zunächst waren die Ergebnisse der Forschung vielversprechend und westliche Firmen begannen, Phagen als Therapie gegen Typhus und Harnwegsinfekte zu vermarkten. Mit der Entdeckung des Penicillins durch Alexander Fleming 1928 sank jedoch das Interesse der westlichen Welt, insbesondere der Vereinigten Staaten, an der Forschung und klinischen Anwendung von Phagen. [35] Im Vergleich waren die neu entdeckten Medikamente kostengünstiger in der Herstellung und die Applikations- und Lagerungsmöglichkeiten vielseitig. Zudem war durch die Elimination des Pharmakons im menschlichen Körper ein Rückschluss auf die Konzentrationsminderung über die Zeit möglich. Dies war nach Applikation von Phagen durch deren Vermehrung bei Infektion des Wirts nicht gegeben. Außerdem waren Antibiotika gegen ein breiteres Wirtsspektrum einsetzbar. [36, 37]

EINLEITUNG

Da die Länder der ehemaligen Sowjetunion nur begrenzten Zugang zu Antibiotika hatten [38], wurde die Forschung an Phagen und deren klinischer Anwendung insbesondere in Tbilisi fortgeführt [39].

1.4 Wirkung von Bakteriophagen

Bei Kontakt erfolgt eine spezifische, rezeptorvermittelte Adhäsion des Phagen an das Wirtsbakterium. Handelt es sich hierbei um einen grampositiven Erreger, so erfolgt die Erkennung über Teichonsäuren, Peptidoglykane und Zellwandproteine. Bei gramnegativen Bakterien sind ebenfalls Zellwandproteine sowie Oligosaccharide, Lipopolysaccharide, Pili oder Kapselantigene für die Erkennung während des Adhäsionsvorgangs entscheidend. Die meisten Phagen binden über distale Schwanzfaserproteine oder Proteine der Basisplatte an die Oberfläche des Bakteriums. Nach irreversibler Adhäsion des Phagen am Wirt wird die Bakterienmembran penetriert und die Phagen-DNA in die Wirtszelle freigesetzt. Die Transkription erfolgt mithilfe wirtseigener Enzyme. Die Biosynthese der Strukturproteine sowie der Hilfsproteine für die Morphogenese und DNA-Verpackung schließt sich an. Die Morphogenese neuer Phagen erfolgt im Self-assembly. Zuletzt wird die DNA in den Phagenkopf eingeschleust. Während der späten Biosynthese gebildete Endolysine greifen zum Ende der Morphogenese die Peptidoglycanschicht des Bakteriums an und führen letztlich zu dessen Lyse. Die neu gebildeten Phagenpartikel werden freigesetzt. [40] Virulente Phagen durchlaufen nach Infektion der Wirtszelle ohne zeitliche Verzögerung diesen beschriebenen lytischen Zyklus. Temperente Phagen können auch einen alternativen Entwicklungsweg nehmen, welcher als lysogener Zyklus bezeichnet wird (Abbildung 1). Dabei erfolgt nach Infektion der Wirtszelle keine Phagenproduktion. Das Genom, als Prophage bezeichnet, geht eine stabile Wechselwirkung mit seinem Wirt ein. Die genetische Information des Prophagen wird bei jeder Teilung des Bakteriums an dessen Tochterzellen weitergegeben. Ein Übergang des Prophagen in den vegetativen Zustand und somit in den lytischen Zyklus ist jederzeit möglich. [41] Bei der klinischen Anwendung werden virulente Phagen verwendet, da zum einen die Bakteriolyse sicher eintreten und zum anderen der Gentransfer auf Tochterzellen des Bakteriums vermieden werden soll. [42–44]

EINLEITUNG

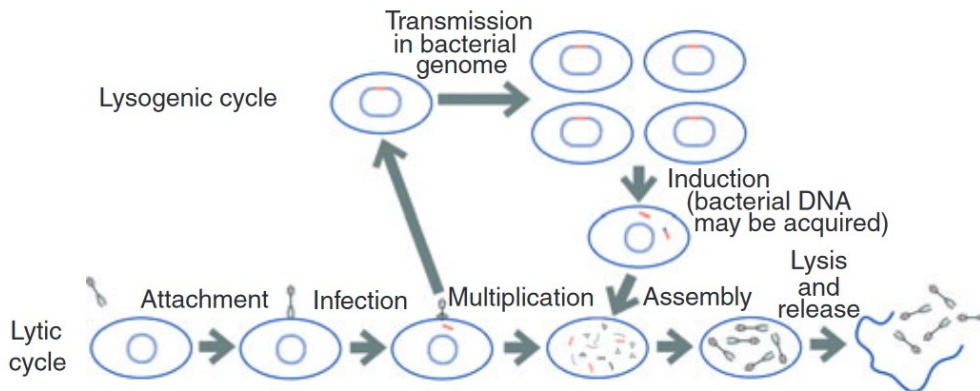


Abbildung 1: Lytischer und Lysogener Zyklus bei Bakteriophagen (Quelle: Harper and Enright 2011) [45]

Im Gegensatz zur Therapie mit Antibiotika bleibt die physiologische Flora des menschlichen Körpers bei Applikation von einzelnen Phagen durch deren Wirtsspezifität nahezu unbeeinflusst. [46] Dadurch ist jedoch auch das Spektrum an pathogenen Keimen eingeschränkt, gegen die ein Phagenstamm therapeutisch eingesetzt werden kann. Deshalb ist die detaillierte Diagnostik bei einer bakteriellen Infektion vor Therapiebeginn sowie die Spezifitätstestung von Phagen unverzichtbar. [43, 47, 48] Um die Chance einer erfolgreichen Therapie zu erhöhen, wird an Zusammensetzungen geforscht, welche mehrere Phagen beinhalten, sogenannte Phagencocktails. [49] Diese haben ein breiteres Wirtsspektrum und waren bisher in In-vitro-Versuchen sowie in Tierversuchen der Therapie mit nur einem Phagenstamm hinsichtlich der Reduktion von bakteriellem Wachstum sowie der Bildung von Resistenzen überlegen. [50–54]

Über die Entwicklung von Resistenzmechanismen der Bakterien gegenüber Phagen wird in mehreren Quellen berichtet. [55–59] Dies scheint mit einem Fitnessverlust des Bakteriums und infolgedessen einer steigenden Sensitivität gegenüber Antibiotika einherzugehen. [60–62] Zudem konnte in einigen In-Vitro-Studien eine Synergie von niedrigdosierten Antibiotika und Phagen gezeigt werden. Unter dem Einfluss einiger Antibiotika in subletaler Dosis finden Veränderungen in der Morphologie der Bakterienzelle statt, welche die Infektion und Replikation des Phagen-genoms im Inneren des Wirts fördern. [63–65]

1.5 Aktuelle Phagenforschung

Als Reaktion auf die beunruhigende Entwicklung der Antibiotikaresistenzen gerät die Forschung an Phagen und deren klinischer Anwendung in den letzten Jahren auch in Ländern der westlichen Welt wieder vermehrt in den Vordergrund. [48] Bisher wurden nur vier randomisierte klinische Studien zur therapeutischen Anwendung von Phagen abgeschlossen. Das Projekt PhagoBurn untersuchte die Wirksamkeit und Sicherheit von Phagencocktails in der Therapie infizierter Brandwunden. [66] Von Wright et al. wurde die Anwendung einer Phagenpräparation gegen *P. aeruginosa* bei chronischer Otitis media untersucht. [67] Sarker et al. verabreichten gesunden und an Diarrhö erkrankten Kindern Phagencocktails wirksam gegen *E. coli*. [68, 69] In der jüngsten abgeschlossenen randomisierten klinischen Studie von Leitner et al. wurde die Wirkung eines intravesikal applizierten Phagencocktails bei Harnwegsinfekten untersucht. [70]

Unter den laufenden Projekten sind zum einen PhagoFlow zu nennen, ein europäisches Projekt, welches die Praktikabilität einer zeitnahen und auf den Patienten individuell angepassten Phagentherapie bei Infektionen mit Bakterien der ESKAPE-Gruppe prüft. Diese Gruppe fasst sechs häufig auftretende, multiresistente Erreger nosokomialer Infektionen zusammen und beinhaltet *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *P. aeruginosa* und *Enterobacter-Spezies* [71], wobei nur die drei letztgenannten in dem Forschungsprojekt berücksichtigt wurden. [72] Ein weiteres Projekt ist Phage4Cure, bei dem ein Phagenhaltiges Inhalativum gegen *P. aeruginosa* an Patientinnen mit chronischer Besiedlung getestet werden soll. [73]

1.6 Spezifitätstestung von Phagen

Während die Antibiotikatherapie oft nach einem festgelegten Schema und die Sensibilitätstestung der Bakterienisolate nach standardisierten Methoden und Grenzwerten erfolgt, existieren in der Therapie mit Phagen bisher weder Standards in der Applikation noch in der prätherapeutischen Diagnostik. In bisherigen Studien angewandte Methoden werden im Folgenden zusammengefasst.

1.6.1 Spot Test

Der Spot Test eignet sich vor allem, wenn der Titer der Phagensuspension sowie die Spezifität des Phagen für den zu untersuchenden Bakterienstamm nicht bekannt ist. Circa 5-20 µl einer Phagensuspension werden auf eine Bakterien-inokulierte Agarplatte aufgetropft und nach Inkubation hinsichtlich einer erfolgten Lyse untersucht. [74] Vorteil dieser Methode ist eine gleichzeitige Testung verschiedener Phagenstämme auf derselben Bakterienprobe sowie ein geringer Material- und Zeitaufwand. In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben zur Inokulationsart der Agarplatte, zur Auswahl des Agarmediums sowie zur Mindestkonzentration der eingesetzten Phagensuspension. [75–78]

1.6.2 Double Agar Overlay Plaque Assay

Beim Double Agar Overlay Plaque Assay wird eine Phagensuspension zu einem Bakterienstamm in einen Softagar gegeben und unter Verwendung zweier halbfester Agarmedien in verschiedenen Konzentrationen ausplattiert. Dabei wird das Verhältnis aus Phagenkonzentration zur Bakterienkonzentration als Multiplicity of infection (MOI) bezeichnet. Bei lytischer Aktivität der Phagen bilden sich nach Inkubation Plaques im Bakterienrasen. [79] Die Efficiency of Plating (EOP) gibt an, wie wirksam eine Phageninfektion einer zu untersuchenden Bakterienkultur im Vergleich zur Infektion des Referenz-Wirtsstamms ist. Dazu ist die EOP definiert als Quotient aus gemessenem Phagentiter anhand des zu untersuchenden Bakterienstamms und maximal beobachtbaren Titer, gemessen am Referenzstamm.

$$EOP = \frac{\text{Phagenkonzentration [zu untersuchender Bakterienstamm]}}{\text{Phagenkonzentration [Referenzbakterienstamm]}}$$

Ist der Quotient ≥ 0.5 wird der Kombination aus Phagen und Bakterien eine hohe Produktionseffizienz zugeschrieben. Das heißt, dass bei der Infektion des zu untersuchenden Bakteriums mindestens 50% der PFU beobachtet werden konnten, die bei der Infektion des Referenzstamms detektiert wurden. Eine EOP zwischen 0.1 und 0.5 wird als mittlere Produktionseffizienz und eine EOP < 0.1 als geringe Produktionseffizienz

EINLEITUNG

beschrieben. [76] Vorteil gegenüber dem Spot Test ist die Möglichkeit, eine quantitative Aussage hinsichtlich der Effektivität der Phageninfektion zu treffen. Phagen mit einem positiven Spot Test aber ineffizientem EOP-Ergebnis sind möglicherweise in der Lage, eine Lyse beim Bakterium hervorzurufen, ohne dabei gleichzeitig die Fähigkeit zu besitzen, genügend Phagen zu produzieren. [80] Der Nachteil der beiden beschriebenen Assays unter Verwendung halbfester Medien ist die starke Variation der Ergebnisse in Abhängigkeit von Untersuchern, Medium und Versuchsbedingungen. [81]

1.6.3 Kinetic Assay

Dieses Verfahren zählt zu den Assays mit Flüssigmedien. Beim Kinetic Assay wird die Bakterienkultur meist in Trypticase-Soja-Bouillon, in die Vertiefungen von Mikrotiterplatten gegeben. Pufferlösungen mit einzelnen Phagenstämmen oder Phagencocktails werden in unterschiedlicher MOI zur Bakterienkultur gegeben und inkubiert. Parallel wird eine Bakterienkultur ohne Zusatz von Phagen als Vergleichsprobe inkubiert. Durch wiederholte Messung der optischen Dichte (OD) während der Inkubation wird das bakterielle Wachstum beobachtet. Bei einer Abnahme der OD bzw. einer geringeren OD als in der Vergleichsprobe wird eine bakteriolytische Aktivität der Phagen angenommen. [81, 82]

Vorteil dieser Methode ist die gleichzeitige Testung vieler verschiedener Phagensuspensionen, da jede Vertiefung der Mikrotiterplatte individuell befüllt werden kann. Zudem ist die Messung der OD untersucherunabhängig. Da jedoch auch Zelltrümmer der lysierten Bakterien die OD beeinflussen, kann dies zu einer Unterschätzung der eigentlichen lytischen Aktivität der Phagen führen. [81]

1.7 Zielsetzung

Infolge der Zunahme antibiotikaresistenter Keime und daraus resultierender therapeutischer Herausforderungen erlebt die Forschung an Phagen und ihr Einsatz in der Therapie bakterieller Infektionen eine Renaissance. Die Spezifitätstestung der Phagen gegenüber Bakterien wurde bislang mittels Spot Test, durch Bestimmung der EOP oder im Kinetic Assay nicht standardisiert durchgeführt. Eine Eingliederung der Spezifitätstestung

EINLEITUNG

von Phagen in die Routinediagnostik ist von großer Bedeutung, da nur so eine zielgerichtete und zeitnahe Therapie bakterieller Infektionen mit Phagen möglich werden kann. Eine standardisierte, akkreditierbare und schnelle Testung der Phagen mit festgelegten Standards wie bei der Sensibilitätstestung von Antibiotika fehlt jedoch noch.

Diese Dissertation soll im Rahmen einer Machbarkeitsstudie aufzeigen, ob die Durchführung und Auswertung der Wirksamkeitstestung von Bakteriophagen innerhalb eines Arbeitstages durchführbar ist und damit dazu beitragen, eine schnelle, standardisierte Methodik zur Anfertigung von Phagogrammen in der Routinediagnostik zu entwickeln. Der Fokus der Arbeit liegt dabei auf der Entwicklung einer beschleunigten Testung der Phagen gegenüber Bakterien in Anlehnung an die schnelle Sensibilitätstestung von Antibiotika (rAST).

MATERIAL UND METHODEN

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Agar bacteriological No. 1 Oxoid	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Aqua dest.	Nährmedientechnik des IMIKRO, Rostock, D
Glycerin (85%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Magnesiumsulfat dried (MgSO ₄)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D
Miller's LB Broth Base™ powder Invitrogen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Tris-Hydrochlorid, 1 M-Lösung (Tris-HCL)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Antibiotika-Testblättchen, Ø 6 mm, Whatman	GE Healthcare, Chicago, USA
BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood (Col-Agar)	Becton Dickinson S.A., Fraga, ESP
BD Mueller Hinton II Agar, Ø 150 mm (MH II)	Becton Dickinson S.A., Fraga, ESP
BD Mueller Hinton Fastidious Agar, Ø 150 mm (MH-F)	Becton Dickinson S.A., Fraga, ESP
Desinfektionsmittel AHD2000®	Lysoform Dr. Hans Rosemann GmbH, Berlin, D
Desinfektionsmittel Bacillol®	AF BODE Chemie GmbH, Hamburg, D

MATERIAL UND METHODEN

Desinfektionsmittel Sekusept™ Plus	ECOLAB Deutschland GmbH, Monheim am Rhein, D
Drigalskispatel	Karl Hammacher GmbH, Solingen, D
Einmalhandschuhe Gr. XS, Preha-soft® nitrile	Paul Hartmann AG, Heidenheim, D
Impfösen, 10 µl	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Küvetten 10 x 4 x 45 mm	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, D
Petrischalen, steril, unbefüllt (65 x 15 mm), BD RODAC™	Becton Dickinson S.A., Fraga, ESP
Pipettenspitzen 200 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, D
Plastikröhrchen Cellstar® Tubes 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, AUT
Reagiergefäße 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, D
Rührstab aus Glas	Omnilab Laborzentrum GmbH und Co. KG, Bremen, D
Serologische Pipetten 25 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, D
Spritzen 5 ml BD Discardit™ II	Becton Dickinson S.A., Fraga, ESP
Spritzenfilter, PES, 0,45 µm, steril	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D
Tube (50 ml; 15 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, D
Wattestab PS, Ø 2,5 x 150 mm	Nerbe plus GmbH & Co. KG, Winsen, D

MATERIAL UND METHODEN

2.1.3 Laborgeräteausstattung und Software

Tabelle 3: Laborgeräteausstattung und Software

Laborgeräteausstattung	Hersteller
Analysenwaage Adventure Pro AV53, SNR: 1203220328	Ohaus Corporation, Pine Brook, USA
Brutschrank, Thermo Heraeus B6060	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
Densicheck Vitek 2	bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen, D
DSC-W170 Super Steady Shot Digitalkamera	Sony Europe B.V, Weybridge, UK
Kompaktschüttler KS 15 B control	Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, D
Kühlschrank Gastroline, 6°C	Liebherr Machines Bulle SA, Bulle, CHE
Megazentrifuge 2.0	IBS Ingenieurbüro Simon KG, Taucha, D
Mikrowelle Micromaxx®	Medion AG, Essen, D
Pipetman® Einkanalpipette (20; 100; 200; 1000 µl)	Gilson Incorporated, Middleton, USA
Pipettierhilfe Strippetor™ ultra	Corning Incorporated, New York, USA
Spectrophotometer DS-C	DeNovix Incorporated, Wilmington, USA
BioWizard Biosafety cabinet	Kojair Tech Oy, Mänttä-Vilppula, FIN
Wasserbad	GFL® Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, D
Vortex Mixer VM-300, Serial No. 513830	neoLab 7-2020 Heidelberg, D
Vortex Mixer RS-VF10	Phoenix Instrument, Garbsen, D
Software	Entwickler
IBM SPSS Statistics 26	IBM Deutschland GmbH, Ehningen, D
Microsoft Office Home and Student 2019	Microsoft Corporation, Redmond, USA

MATERIAL UND METHODEN

2.1.4 Verwendete Mikroorganismen

Die in den Versuchen verwendeten Phagen und Bakterien stammen aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) Braunschweig. Die Auswahl der Phagen für die Versuche dieser Arbeit erfolgte entsprechend der am häufigsten nachgewiesenen Bakterienspezies an der Universitätsmedizin Rostock (UMR).

Tabelle 4: Verwendete Mikroorganismen

Phagen	Bakterienstämme
<i>Escherichia</i> Phage T4 (DSM 4505)	<i>Escherichia coli</i> (DSM 613)
<i>Staphylococcus</i> Phage MRLN (DSM 26857)	<i>Staphylococcus aureus</i> (DSM 104437)
<i>Staphylococcus</i> Phage vB_SepM_Alex (DSM 108061)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (DSM 3269)
<i>Pseudomonas</i> Phage 7 Lindberg (DSM 21514)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Stamm I (DSM 21382)
<i>Pseudomonas</i> Phage vB_PaeM-PT-MAS01 (DSM 109904)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Stamm II (DSM 19880)
<i>Proteus</i> Phage vB_PniP-Homer (DSM 107146)	<i>Proteus mirabilis</i> (DSM 30116)
<i>Enterococcus</i> Phage vB_EfaS_Strempel1 (DSM 110103)	<i>Enterococcus faecalis</i> (DSM 32036)
	<i>Serratia marcescens</i> (DSM 30121)

MATERIAL UND METHODEN

2.1.5 Kulturmedien, Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Kulturmedien, Puffer und Lösungen

SM-Puffer (1000 ml, pH = 7,5)	
NaCl	0,1 M
MgSO ₄	8 mM
Tris-HCL	50 mM
Softagar (500 ml, 0,4%)	
LB Broth Base™ powder	12,5 g
Agar bacteriological No.1 Oxoid	2 g
Aqua. dest.	ad 500 ml
Bottomagar (500 ml, 1%)	
LB Broth Base™ powder	12,5 g
Agar bacteriological No.1 Oxoid	5 g
Aqua dest.	ad 500 ml
LB-Medium (500 ml)	
LB Broth Base™ powder	12,5 g
Aqua dest.	ad 500 ml
Natriumchlorid (200 ml, 0,9%)	
NaCl	1,8 g
Aqua dest.	200 ml

MATERIAL UND METHODEN

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung von Bottom- und Softagar, Puffer- und Nährmedien

Für die Herstellung von 20 Agarplatten mit je 25 ml Bottomagar wurden 12,5 g LB Broth Base™ powder und 5 g Agar bacteriological No.1 Oxoid in 500 ml destilliertem Wasser suspendiert. Die Suspension wurde bei 121 °C, 2 bar für 20 min autoklaviert und anschließend unter der sterilen Werkbank in Petrischalen á 25 ml portioniert. Nachdem der Agar sich verfestigt hatte wurden die Petrischalen abgedeckt im Kühlschrank bei 6 °C gelagert.

Für die Herstellung von 500 ml Softagar wurden 12,5 g LB Broth Base™ powder und 2 g Agar bacteriological No.1 Oxoid in 500 ml destilliertem Wasser suspendiert. Die Portionierung á 4 ml erfolgte in sterile Plastikröhrchen mit Schraubdeckeln. Vor Verwendung wurde der Softagar in der Mikrowelle bis zur Verflüssigung erhitzt und im Wasserbad bei 60 °C warmgehalten.

Zur Herstellung des SM-Puffers wurden zunächst 5,844 g NaCl in destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wurden 0,96 g MgSO₄ und 50 ml 1 molare Tris-HCL zugegeben. Durch die Zugabe von HCL und NaOH wurde die Pufferlösung auf einen pH von 7,5 eingestellt und anschließend die Lösung mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1000 ml aufgefüllt.

Um 500 ml LB-Medium bereitzustellen wurden 12,5 g Agar bacteriological No.1 Oxoid in 500 ml destilliertem Wasser gelöst.

Alle Kulturmedien, Puffer und Lösungen wurden nach Herstellung bei 121 °C, 2 bar für 20 min autoklaviert.

2.2.2 Quantifizierung der Bakterien

Aus Übernachtkulturen wurden jeweils einige Kolonien in NaCl überführt und anhand fotometrischer Messungen (Denscheck Vitek 2) die Suspension auf eine festgelegte OD eingestellt. Zur Quantifizierung dieser Bakteriensuspension wurde eine Verdünnungsreihe in NaCl angelegt, die Verdünnungsstufen 10^{-4} bis 10^{-7} auf Col-Agar ausplattiert und 18-24 Stunden bei 37 °C (5% CO₂-Anreicherung) inkubiert. Die Kolonien wurden ausgezählt und die Konzentration in CFU/ml bestimmt.

MATERIAL UND METHODEN

2.2.3 Vermehrung der Phagen

Die Vermehrung der Phagen erfolgte stets mit den in Tabelle 4 angegebenen zugehörigen Wirtsbakterien in einem CO₂-angereicherten Inkubator bei 37 °C nach folgendem Protokoll:

1. 4 ml des Flüssignährmediums (LB-Medium) wurden mit der jeweiligen Bakterienkultur beimpft und für drei Stunden inkubiert. Diese Suspension wurde bis zur OD von 0.2 bei 600 nm, gemessen mit dem Spectrophotometer DS-C, verdünnt.
2. Je 100 µl der Phagen- und Bakteriensuspension wurden in 4 ml Softagar gegeben, gevortext und anschließend auf Bottomagar ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von 16-20 Stunden wurden 4 ml SM-Puffer auf jede Platte gegeben und diese bei Raumtemperatur für 5 Stunden geschwenkt (~90 rpm).
3. Die Flüssigkeit wurde mit einer Pipette abgenommen, zentrifugiert (4000 rpm, 10 min, 15 °C) und der Überstand filtriert (0,45 µm). Eine so gewonnene Phagensuspension enthielt eine Konzentration von ca. 10⁷ - 10⁹ PFU/ml.

2.2.4 Quantifizierung der Phagensuspension im Double Agar Overlay Plaque

Assay

Eine flüssige Übernachtskultur in 5 ml LB-Medium des Bakterienstamms wurde 1:100 mit LB-Medium verdünnt und die Suspension für 5 Stunden inkubiert. Es erfolgte die Herstellung einer seriellen Verdünnungsreihe in 10er Verdünnungsstufen mit Transfer von je 100 µl Volumen der zu quantifizierenden Phagensuspension in 900 µl SM-Puffer. Zum Verflüssigen des Softagars wurde dieser in der Mikrowelle erwärmt und im Wasserbad bei 60 °C flüssig gehalten. Jede Softagarprobe wurde mit je 100 µl Bakteriensuspension und 100 µl Phagensuspension der zu untersuchenden Verdünnungsstufe beimpft. Der so inokulierte Softagar wurde anschließend über dem Bottomagar ausgegossen, sodass ein zweischichtiger Agar vorlag. Zum Austrocknen wurden diese für circa 20 min unter der Sterilwerkbank belassen und dann abgedeckt für 16-20 Stunden inkubiert. Die Plaque bildenden Einheiten, Plaque forming Units (PFU), wurden pro Platte gezählt und die Konzentration in PFU/ml nach folgender Formel berechnet:

MATERIAL UND METHODEN

$$\text{PFU/ml} = \frac{\text{durchschnittliche Anzahl der Plaques}}{\text{Verdünnungsstufe} \times 0.1 \text{ ml}}$$

2.2.5 Etablierung eines Phagogramms am Beispiel des *Escherichia* Phagen T4

Die folgenden Parameter wurden für die Etablierung eines Phagogramms untersucht: die Konzentration der Bakteriensuspension, die Methode der Agarinokulation sowie des Aufbringens der Phagensuspension und deren Konzentration.

2.2.5.1 Variation der Bakterienkonzentration und Untersuchung der Auswirkung auf die Dichte des Bakterienrasens im Phagogramm

Um eine geeignete Dichte des Bakterienrasens festzulegen wurden 100 µl der Bakteriensuspension in jeweils unterschiedlichem Trübungsstandard (McFarland 0.1, 0.2 und 0.5) eingesetzt.

2.2.5.2 Vergleich zweier Methoden zum Aufbringen der Bakteriensuspension

Zur Festlegung einer geeigneten Methode zum Aufbringen der Bakteriensuspension wurde das Ausplattieren mithilfe eines sterilen Wattestäbchens gegenüber der Verwendung eines sterilen Drigalskispatels untersucht. Verwendet wurden jeweils 100 µl der Bakteriensuspension mit einem Trübungsstandard von McFarland 0.2. Je vier sterile Testplättchen wurden auf die beimpften Agarplatten aufgelegt und anschließend Phagensuspension (10^8 PFU/ml) in den Volumina 5 µl, 10 µl, 20 µl und 50 µl auf die Plättchen gegeben. Nach 18-24-stündiger Inkubationszeit bei 37 °C (5% CO₂-Anreicherung) erfolgte die Auswertung.

2.2.5.3 Variation der Phagenkonzentration und Untersuchung der Auswirkung auf die Morphologie der Lysezonen im Phagogramm

Um eine geeignete Konzentration der Phagensuspension festzulegen, wurden je Testplättchen 20 µl Phagensuspension der Konzentrationen 10^1 bis 10^8 PFU/ml aufgetragen.

2.2.5.4 Vergleich zweier Methoden zum Aufbringen der Phagensuspension

Die Phagensuspension wurde in den Volumina 5 µl, 10 µl, 20 µl und 50 µl direkt auf die Oberfläche einer inokulierten Agarplatte gegeben. Parallel dazu wurden zunächst mit einer sterilen Pinzette Testplättchen auf die inokulierte Platte gelegt und darauf die Phagensuspension in den verschiedenen Volumina aufgetragen.

2.2.6 Qualitätskontrolle

Um eine lytische Aktivität des SM-Puffers gegenüber *E. coli* sowie eine unspezifische Bakteriolyse des T4 Phagen auszuschließen, wurden Negativkontrollen durchgeführt.

2.2.6.1 Untersuchung der intrinsischen Wachstumshemmung des SM-Puffers

Auf einer mit *E. coli* inokulierten MH II Agarplatte erfolgte die Applikation von SM-Puffer in den Volumina 5 µl, 10 µl, 20 µl und 50 µl auf die gelegten Testplättchen. Nach Inkubation für 18-24 Stunden bei 37 °C (5% CO₂-Anreicherung) erfolgte die Auswertung.

2.2.6.2 Untersuchung der Wirtsspezifität des Escherichia Phagen T4

Auf einer mit *Serratia marcescens* (0.2 McFarland) inokulierten MH II Agarplatte erfolgte die Applikation von T4 Phagensuspension (10⁸ PFU/ml) in den Volumina 5 µl, 10 µl, 20 µl und 50 µl auf die gelegten Testplättchen. Nach Inkubation für 18-24 Stunden bei 37 °C (5% CO₂-Anreicherung) wurde die Versuchsreihe hinsichtlich einer stattgehabten Lyse ausgewertet.

MATERIAL UND METHODEN

2.2.7 Übertragbarkeit des Phagogramms auf andere Phagenstämme

Nach Auswertung der Versuche mit dem *Escherichia* Phagen T4 und dem Bakterienstamm *E. coli* wurden die Parameter für die einzelnen Arbeitsschritte zum Anlegen eines Phagogramms für diese Arbeit definiert und die Übertragbarkeit an den folgenden sechs Phagenstämmen untersucht:

- *Proteus* Phage vB_PniP-Homer
- *Pseudomonas* Phage 7 Lindberg
- *Pseudomonas* Phage vB_PaeM-PT-MAS01
- *Staphylococcus* Phage MRLN
- *Staphylococcus* Phage vB_SepM_Alex
- *Enterococcus* Phage vB_EfaS_Strepell

100 µl einer Bakteriensuspension mit dem Trübungsstandard McFarland 0.2 wurden auf einer MH II Agarplatte mithilfe eines Drigalskispatels verteilt. Nach kurzem Antrocknen wurden mit einer sterilen Pinzette zwei Testplättchen aufgelegt und je 20 µl der unverdünnten Phagensuspension aufgetragen. Nach Inkubation für 18-24 Stunden bei 37 °C (5% CO₂-Anreicherung) konnten die Phagogramme hinsichtlich einer stattgehabten Lyse untersucht werden. Ergänzend wurde der Versuch mit dem Phagenstamm *Enterococcus* Phage vB_EfaS_Strepell auf MH-F Agarplatten durchgeführt.

2.3 Schnelle Phagenspezifitätstestung

2.3.1 Allgemeiner Versuchsaufbau

Die Versuchsdurchführung orientierte sich an der Methodenbeschreibungen von EUCAST zur schnellen Sensibilitätsstestung positiver Blutkulturen gegenüber Antibiotika. [83]

Aus einer Übernachtskultur des Wirtsbakterienstammes auf Col-Agar wurde ein Trübungsstandard von McFarland 0.2 in NaCl eingestellt. Von der Bakteriensuspension wurden 100 µl mittels Drigalskispatel auf MH II Agar verteilt. Mit einer sterilen Pinzette wurden 2 unbeschickte Testplättchen auf den Agar aufgebracht und auf jedes Plättchen 20 µl Phagensuspension gegeben. Nach einer 15-minütigen Trocknungszeit unter der Sterilwerkbank wurden die Proben abgedeckt und bei 36 °C inkubiert.

MATERIAL UND METHODEN

Die Beurteilung der Phagogramme hinsichtlich einer erfolgten Lyse erfolgte nach 4, 6, 7, 8, 9 und 24 Stunden.

2.3.2 Anwendung an ausgewählten Phagenstämmen




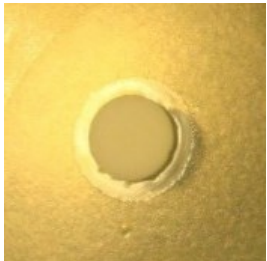
Die schnelle Wirksamkeitstestung wurde für alle in Tabelle 4 aufgeführten Phagenstämme untersucht. Für den *Enterococcus* Phagen vB_EfaS_Strempel1 wurde die schnelle Wirksamkeitstestung zusätzlich auf MH-F Agar und einer Inkubation bei 37 °C (5% CO₂-Anreicherung) getestet.

2.3.3 Auswertungskriterien

Dokumentiert wurden die Beobachtungen in MS Excel. Dabei wurden sie in eine von vier zuvor definierten Kategorien eingeordnet. Die Inspektion der Proben erfolgte in einem Abstand von 30 cm zum Auge des Betrachters und ohne die Verwendung von Hilfsmitteln. Die Kategorien sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 6: Bezeichnung und Definition der aufgetretenen Lyse

Bezeichnung der Lyse	Zugeordnete Zahl	Definition	Beispiel
Keine Lyse	0	Kein Unterschied in der Struktur um das Testplättchen sichtbar	 A photograph of a petri dish containing a yellow agar plate. A single, small, circular white test spot is visible in the center, with no visible change in the surrounding agar structure.
Fragliche Lyse	1	Beim Betrachten der Platte aus einem 45° Winkel oder Halten der Platte gegen Licht ist ein leichter Kontrast zwischen unmittelbarer Umgebung des Testplättchens und restlicher Agarplatte sichtbar	 A photograph of a petri dish containing a yellow agar plate. A single, circular white test spot is visible in the center. There is a very faint, light-colored halo or ring immediately surrounding the spot, indicating a slight contrast with the rest of the agar.
Sichtbare Lyse	2	Beim Betrachten der Platte aus einem 45° Winkel ist ein Kontrast zwischen unmittelbarer Umgebung des Testplättchens und restlicher Agarplatte sichtbar	 A photograph of a petri dish containing a yellow agar plate. A single, circular white test spot is visible in the center. A distinct, light-colored ring is clearly visible around the spot, showing a clear contrast with the surrounding agar.
Gut sichtbare Lyse	3	Beim Betrachten der Platte aus einem 90° Winkel ist ein deutlicher Kontrast zwischen unmittelbarer Umgebung des Testplättchens und restlicher Agarplatte sichtbar	 A photograph of a petri dish containing a yellow agar plate. A single, circular white test spot is visible in the center. A very prominent and thick, light-colored ring is clearly visible around the spot, indicating a strong contrast with the surrounding agar.

Alle Experimente wurden mit 3 technischen und 3 biologischen Replikaten durchgeführt.

2.3.4 Ethik

Die Studie wurde ohne Verwendung von menschlichen oder tierischen Probanden und/oder Geweben durchgeführt.

2.3.5 Statistik

Das Setting dieser Arbeit wurde mit dem „Arbeitsbereich Biostatistik“ des Institutes für Biostatistik und Informatik in Medizin und Altersforschung (IBIMA) erörtert. Im Rahmen der Machbarkeitsstudie der vorliegenden Untersuchungen ging es um die Prüfung der Durchführbarkeit einer Wirksamkeitstestung von Phagen im beschriebenen Setting innerhalb eines Arbeitstages und Festlegung entsprechender Versuchsbedingungen und -abläufe. Somit bedarf es hier keiner statistischen Betrachtung im Sinne der Inferenz.

ERGEBNISSE

3 Ergebnisse

3.1 Vorversuche

3.1.1 Quantifizierung der Phagensuspension

Nach Vermehrung des *Escherichia* Phagen T4 konnten im Double Agar Overlay Plaque Assay für unterschiedliche Verdünnungsstufen die PFU gezählt werden. Daraus errechnete sich eine Ausgangskonzentration der ursprünglichen Phagensuspension von 10^8 PFU/ml.

$$\text{PFU/ml} = \frac{1 \text{ PFU}}{10^{-7} \times 0.1 \text{ ml}}$$

Analog zu diesem Versuch wurden die Ausgangskonzentrationen der anderen vermehrten Referenzphagen bestimmt und die Ergebnisse in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Ausgangskonzentrationen der verwendeten Referenzphagen

Phagenstamm	Konzentration in PFU/ml
<i>Escherichia</i> Phage T4 (DSM 4505)	1×10^8
<i>Staphylococcus</i> Phage MRLN (DSM 26857)	1×10^8
<i>Staphylococcus</i> Phage vB_SepM_Alex (DSM 108061)	1×10^8
<i>Pseudomonas</i> Phage 7 Lindberg (DSM 21514)	3×10^9
<i>Pseudomonas</i> Phage vB_PaeM-PT-MAS01 (DSM 109904)	2×10^9
<i>Proteus</i> Phage vB_PniP-Homer (DSM 107146)	1×10^9
<i>Enterococcus</i> Phage vB_EfaS_Streppe11 (DSM 110103)	4×10^8

3.1.2 Entwicklung eines Phagogramms am Beispiel des *Escherichia* Phagen T4

3.1.2.1 Definition der Bakterienrasendichte als Oberflächenkultur

Um eine geeignete Dichte des Bakterienrasens festzulegen, wurden 100 μ l der Bakteriensuspension in jeweils unterschiedlichem Trübungsstandard (McF 0.1, 0.2 und 0.5) eingesetzt. Jede inokulierte Agarplatte wurde mit 4 Testplättchen

ERGEBNISSE

bestückt und mit T4 Phagensuspension in den Volumina 5, 10, 20 und 50 µl beimpft. Nach Inkubation für 18-24 Stunden bei 37 °C (5% CO₂-Anreicherung) war bei allen Versuchen der Bakterienrasen sichtbar gewachsen, sodass eine Abgrenzung der Lysezonen möglich war. Die Morphologie des Bakterienrasens zeigte Unterschiede in Abhängigkeit der eingesetzten Trübungsstandards. Bei der Agarinkokulation mit einer Bakteriensuspension von McFarland 0.1 zeigte sich die Agaroberfläche dünn und lückenhaft bewachsen. Bei den Bakteriensuspensionen mit höherem Trübungsstandard war der Bakterienrasen dicht und homogen ausgebildet. Eine Lysezone in der Umgebung des Testplättchens war scharf abgrenzbar. Innerhalb der Lysezone wurden vereinzelte Bakterienkolonien beobachtet. Unter Verwendung eines Trübungsstandards von McFarland 0.5 waren mehr Kolonien sichtbar als bei Verwendung einer Bakteriensuspension mit dem Trübungsstandard 0.2.

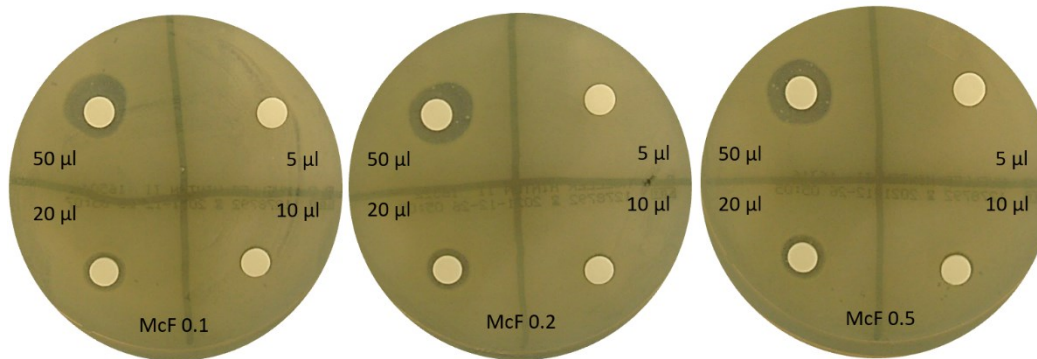


Abbildung 2: Phagogramme des *Escherichia* Phagen T4 nach Inkubation für 18-24 Stunden unter Verwendung von Bakteriensuspensionen unterschiedlicher Trübungsstandards: McF 0.1 (links), McF 0.2 (Mitte), McF 0.5 (rechts)

Die Konzentrationen der eingesetzten Bakteriensuspensionen in Abhängigkeit des eingestellten Trübungsstandards sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Konzentration der Bakterienlösung *E. coli* in Abhängigkeit des Trübungsstandards

Bakterienstamm	Konzentrationen der Bakterienlösungen		
	McFarland 0.1	McFarland 0.2	McFarland 0.5
<i>Escherichia coli</i>	$2,5 \times 10^6$ CFU/ml	$3,3 \times 10^7$ CFU/ml	1×10^8 CFU/ml

ERGEBNISSE

3.1.2.2 Definition der Agar-Inokulationsmethode

Zur Festlegung einer geeigneten Methode zum Aufbringen der Bakteriensuspension wurde das Ausplattieren mithilfe eines sterilen Wattestabs gegenüber der Verwendung eines sterilen Drigalskispatels untersucht. Die mittels Wattestab inokulierte Agarplatte zeigte einen unregelmäßig und teilweise lückenhaft bewachsenen Bakterienrasen. Auf der mittels Drigalskispatel inokulierten Probe war der Bakterienrasen homogen und dicht ausgebildet. Auf beiden Proben war eine Abgrenzung zwischen einer Lysezone und dem bewachsenen Bakterienrasen sichtbar.

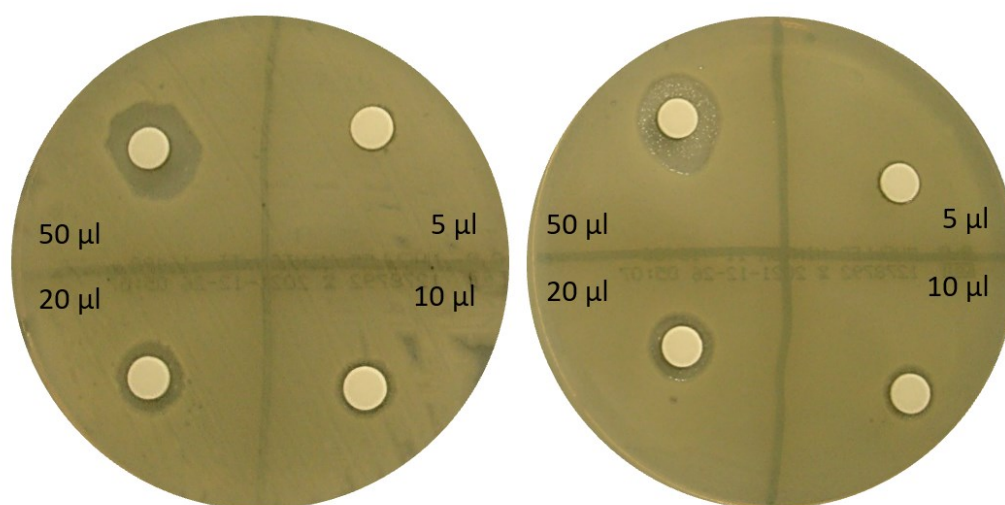


Abbildung 3: Phagogramme des *Escherichia* Phagen T4 nach Inkubation für 18-24 Stunden, Inokulation der Proben mit *E. coli* mithilfe eines Wattestabs (links) sowie mithilfe eines Drigalskispatels (rechts)

3.1.2.3 Definition der einzusetzenden Phagenkonzentration

Um eine geeignete Konzentration der zu applizierenden Phagensuspension festzulegen, wurden je Testplättchen 20 µl Phagensuspension der Konzentrationen 10^1 bis 10^8 PFU/ml aufgetragen. Während unter Verwendung einer Phagenkonzentration von 10^4 und 10^5 PFU/ml nur vereinzelte kleine Lysepunkte sichtbar waren, bildete sich bei den Konzentrationen 10^6 bis 10^8 PFU/ml eine klare Lysezone in der Umgebung des Testplättchens aus. Bei den Konzentrationen von 10^1 bis 10^3 PFU/ml war keine Lyse sichtbar.

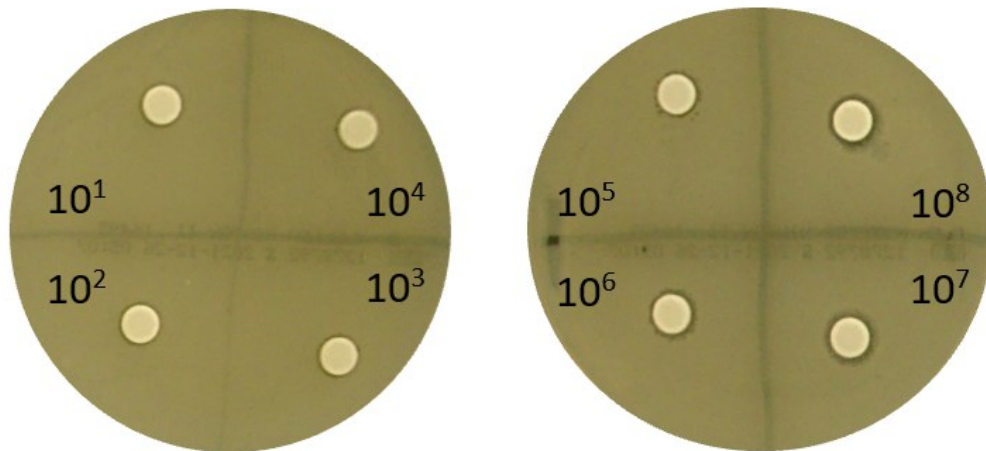


Abbildung 4: Phagogramme des *Escherichia* Phagen T4 nach Inkubation für 18-24 Stunden, 20 µl Phagensuspension je Testplättchen in den Konzentrationen 10^1 bis 10^8 PFU/ml

3.1.2.4 Definition der Phagenapplikation

Um eine geeignete Methode zum Aufbringen der Phagensuspension festzulegen, wurden die Phagen zum einen direkt auf den inokulierten Agar gegeben und zum anderen auf zuvor aufgelegte sterile Testplättchen appliziert. Nach Inkubation für 18-24 Stunden bei 37 °C (5% CO₂-Anreicherung) waren in beiden Versuchen Lysezonen vom Bakterienrasen abgrenzbar. Je größer das applizierte Volumen der Phagensuspension war, desto größer war die Lysezone. Während sich bei direkter Applikation der Phagen unregelmäßig geformte Lysezonen zeigten, waren diese unter Verwendung der Testplättchen gleichmäßig rund. Bei dem verwendeten Volumen von 5 µl war nur bei der direkten Applikation eine Lyse sicher abgrenzbar.

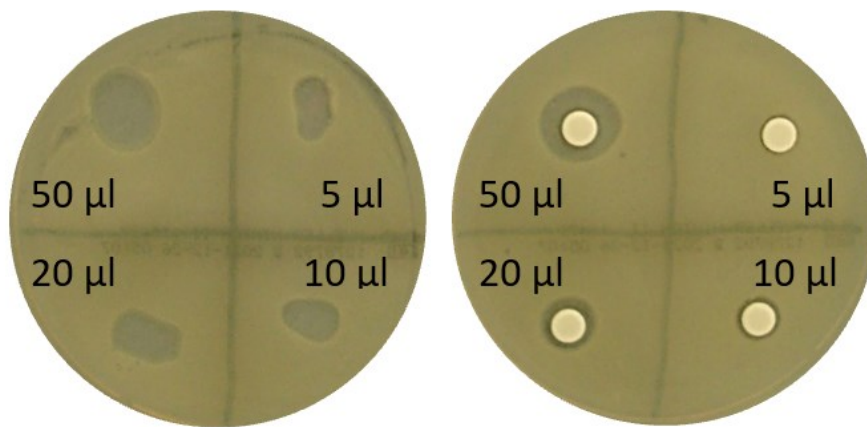


Abbildung 5: Phagogramme des *Escherichia* Phagen T4 nach Inkubation für 18-24 Stunden, Aufbringen der Phagensuspension durch direkte Applikation (links) bzw. Aufbringen auf Testplättchen (rechts) in den Volumina 5 µl, 10 µl, 20 µl und 50 µl

3.1.3 Qualitätskontrolle

3.1.3.1 Untersuchung der intrinsischen Lyseaktivität des SM-Puffers

Um eine intrinsische lytische Aktivität des verwendeten SM-Puffers ausschließen zu können, wurde auf eine mit *E. coli* inokulierte Agarplatte SM-Puffer in verschiedenen Volumina aufgetropft und die Probe anschließend für 18-24 Stunden bei 37 °C (5% CO₂-Anreicherung) inkubiert. Es zeigte sich ein gleichmäßiger Bakterienrasen ohne Hinweise auf eine stattgehabte Lyse.

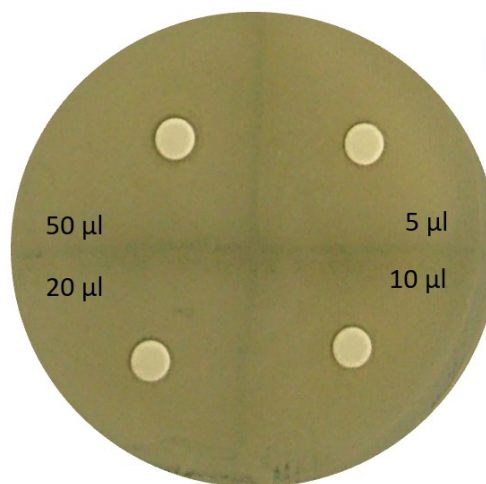


Abbildung 6: Qualitätskontrolle zur intrinsischen lytischen Aktivität des SM-Puffers gegenüber dem Bakterienstamm *E. coli*

ERGEBNISSE

3.1.3.2 Untersuchung der Wirtsspezifität des *Escherichia* Phagen T4

Zur Überprüfung der Wirtsspezifität des *Escherichia* Phagen T4 wurde die Phagensuspension auf eine mit dem Bakterium *Serratia marcescens* inokulierte Agarplatte aufgetragen. Nach Inkubation für 18-24 Stunden bei 37 °C (5% CO₂-Anreicherung) war der Bakterienrasen gleichmäßig gewachsen, ohne dass Hinweise für eine stattgehabte Lyse sichtbar waren.

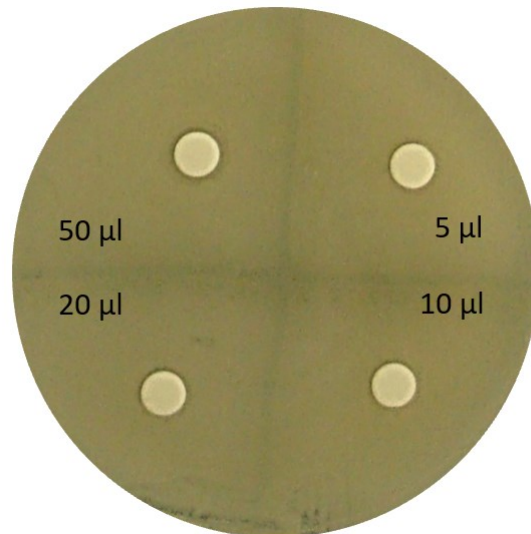


Abbildung 7: Qualitätskontrolle zur Wirtsspezifität des *Escherichia* Phagen T4. Applikation von *Escherichia* T4 Phagensuspension (10⁸ PFU/ml) in den Volumina 5, 10, 20 und 50 µl auf eine mit *Serratia marcescens* inokulierte Agarplatte.

3.1.4 Übertragbarkeit des Phagogramms auf andere Phagenstämme

Nach Auswertung der Vorversuche mit dem *Escherichia* Phagen T4 und dem zugehörigen Wirtstamm *E. coli* wurde für die Anfertigung eines Phagogramms folgendes Protokoll festgelegt:

1. Einstellen der Bakteriensuspension aus einer Übernachtskultur und NaCl (0,85 %) -Lösung auf einen Trübungsstandard von McFarland 0.2
2. Inokulation der Agarplatten mit 100 µl Bakteriensuspension mittels Drigalskispatel
3. Auflegen von zwei sterilen Testplättchen pro Agarplatte
4. Applikation von 20 µl Phagensuspension je Testplättchen
5. Inkubation für 18-24 Stunden bei 37 °C (5% CO₂-Anreicherung)

ERGEBNISSE

Dieses Protokoll wurde für die in Tabelle 4 aufgeführten Referenzphagenstämme mit den jeweiligen Wirtsbakterien durchgeführt.

Bei allen Proben war nach 18-24-stündiger Inkubation eine klare Lysezone abgrenzbar. Die Größe der Lysezonen variierte in Abhängigkeit der eingesetzten Phagen. Dies ist in Abbildung 8 dargestellt. Unterschiede in der Größe der Lysezonen beim *Enterococcus* Phagen in Abhängigkeit des verwendeten Agars (MH II bzw. MH-F) zeigten sich nicht. Allerdings war der Kontrast zwischen Lysezone und Bakterienrasen auf dem MH-F Agar stärker und deutlicher sichtbar als auf dem MH II Agar.

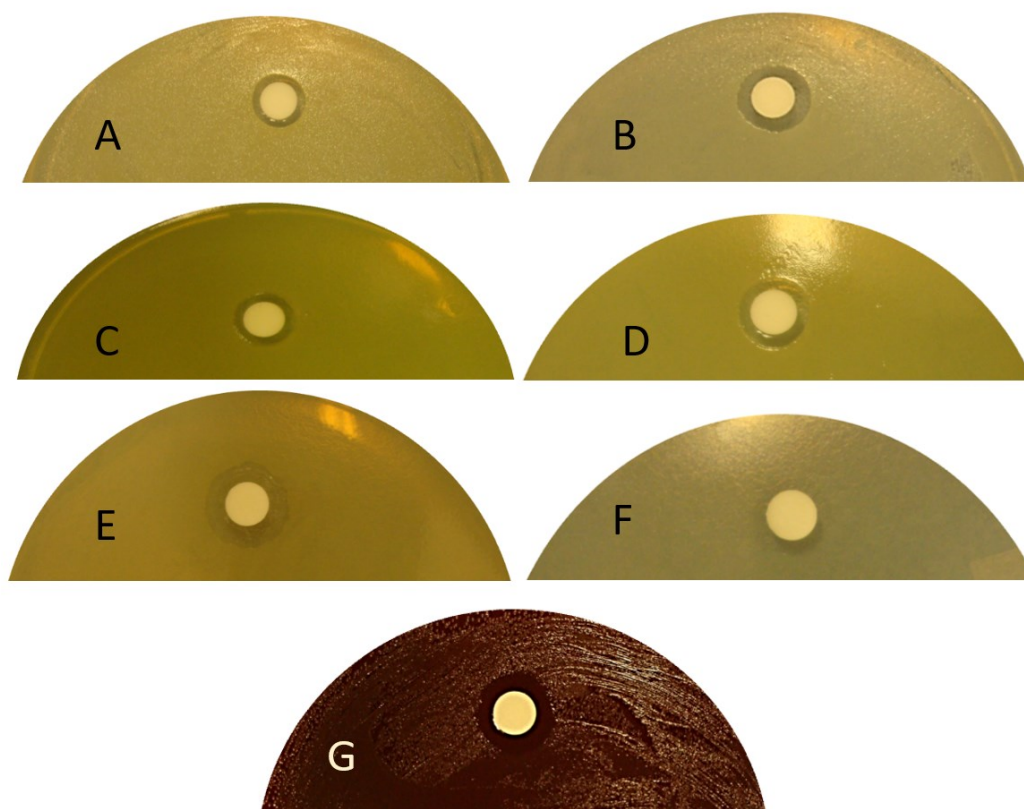


Abbildung 8: Phagogramme der Phagenstämme nach Inkubation für 18-24 Stunden. Inokulation von MH II- bzw. MH-F-Agar mit je 100 µl einer Bakteriensuspension, je Testplättchen Applikation von 20 µl Phagensuspension. A: *Staphylococcus* Phage MRLN. B: *Staphylococcus* Phage vB_SepM_Alex. C: *Pseudomonas* Phage 7 Lindberg. D: *Pseudomonas* Phage vB_PaeM-PT-MAS01. E: *Proteus* Phage vB_PniP-Homer. F: *Enterococcus* Phage vB_EfaS_Strempel1 auf MH II. G: *Enterococcus* Phage vB_EfaS_Strempel1 auf MH-F.

Die Konzentrationen der verwendeten Bakterienstämme mit einem Trübungsstandard von McFarland 0.2 sind in Tabelle 9 aufgeführt:

ERGEBNISSE

Tabelle 9: Konzentrationen in CFU/ml der verwendeten Bakteriensuspension mit einem Trübungsstandard von McFarland 0.2

Bakterienstamm	Konzentration bei McFarland 0.2
<i>Escherichia coli</i> (DSM 613)	3,3 x 10 ⁷ CFU/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> (DSM 104437)	4,5 x 10 ⁷ CFU/ml
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (DSM 3269)	6,0 x 10 ⁷ CFU/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (DSM 19880)	4,0 x 10 ⁷ CFU/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (DSM 21382)	9,0 x 10 ⁷ CFU/ml
<i>Proteus mirabilis</i> (DSM 30116)	1,2 x 10 ⁸ CFU/ml
<i>Enterococcus faecalis</i> (DSM 32036)	6,6 x 10 ⁸ CFU/ml

Analog zu den Versuchen mit dem *Escherichia* Phagen T4 im Kapitel 3.1.2.3 wurde über eine Verdünnungsreihe die Konzentration der Phagensuspensionen definiert, bei der noch eine Lysezone sichtbar war. Die erforderliche Mindestkonzentration war bei den beiden *Staphylococcus* Phagen mit 10⁷ PFU/ml am höchsten. Die geringste Konzentration, bei der noch eine Lyse sichtbar war, zeigte sich beim *Proteus* Phagen vB-PniP-Homer. Die Tabelle 10 fasst die einzusetzenden Mindestkonzentrationen der Phagensuspensionen für eine sichtbare Lyse zusammen.

Tabelle 10: Mindestkonzentration der Phagensuspension in PFU/ml, bei der noch eine Lyse sichtbar ist

Phagenstamm	Mindestkonzentration
<i>Escherichia</i> Phage T4	10 ⁵ PFU/ml
<i>Staphylococcus</i> Phage MRLN	10 ⁷ PFU/ml
<i>Staphylococcus</i> Phage vB_SepM_Alex	10 ⁷ PFU/ml
<i>Pseudomonas</i> Phage 7 Lindberg	10 ⁶ PFU/ml
<i>Pseudomonas</i> Phage vB_PaeM-PT-MAS01	10 ⁶ PFU/ml
<i>Proteus</i> Phage vB_PniP-Homer	10 ⁴ PFU/ml
<i>Enterococcus</i> Phage vB_EfaS_Strempel1	10 ⁵ PFU/ml

3.2 Schnelle Phagenspezifitätstestung

In Anlehnung an die schnelle Antibiotikasensibilitätstestung wurden Phagogramme der sieben beschriebenen Phagenstämme und der jeweiligen Referenzbakterienstämme angelegt und nach 4, 6, 7, 8, 9 und 24 Stunden Inkubationszeit hinsichtlich einer stattgehabten Lyse beurteilt. Die Beobachtungen wurden in vier Kategorien eingeteilt und den beiden Hauptkategorien „nicht beurteilbare Lyse“ und „beurteilbare Lyse“ zugeordnet. Erstere umfasst die Kategorien „Keine Lyse“ und „Fragliche Lyse“. Die zweite umfasst die Kategorien „Sichtbare Lyse“ und „Gut sichtbare Lyse“. Die farblich hinterlegten Felder der Tabellen sollen den Zeitpunkt verdeutlichen, ab dem in allen Versuchen der jeweiligen Testreihe die Beobachtungen in die Hauptkategorie „beurteilbare Lyse“ einordbar waren.

3.2.1 *Escherichia* Phage T4

Wie in Kapitel 2.3 beschrieben, wurde ein Phagogramm mit dem *Escherichia* Phagen T4 und dem Referenzbakterienstamm *E. coli* angelegt und hinsichtlich einer stattgehabten Lyse beurteilt.

ERGEBNISSE

Tabelle 11: Auswertung der Lysezonen in den Phagogrammen des *Escherichia* Phagen T4 und *E. coli*

		Keine Lyse	Fragliche Lyse	Sichtbare Lyse	Gut sichtbare Lyse
Zeit in Stunden (h) seit Beginn der Inkubationszeit	4 h	▲▲▲ ●●●			
	6 h	▲▲▲ ●●●			
	7 h		▲▲▲ ●●●		
	8 h			▲▲▲ ●●●	
	9 h				▲▲▲ ●●●
	24 h				▲▲▲ ●●●
<p>Übersicht der qualitativen Beurteilung der Lysezonen nach Anlegen eines Phagogramms mit dem <i>Escherichia</i> Phagen T4 und dem Bakterienstamm <i>E. coli</i> nach verschiedenen Inkubationszeiten in replikativer Messung. Absolute Häufigkeiten der Beobachtungen. Zeilen: Ableszeitpunkt entsprechend der Inkubationszeit, Spalten: Einteilung der beobachteten Lyse in 4 Kategorien. Darstellung der biologischen Replikate durch Symbole: ▲=Versuch 1, ■=Versuch 2, ●=Versuch 3. Je biologischem Replikate 3 technische Replikate.</p>					

Bei den Phagogrammen des *Escherichia* Phagen T4 war nach vierstündiger Inkubationszeit bei keinem der insgesamt neun Versuche ein Bakterienwachstum und folglich auch keine Lyse beobachtbar. Nach sechs Stunden zeigte sich teilweise bereits eine fragliche Lyse. Nach sieben Stunden konnte sowohl fragliche als auch sichtbare Lyse dokumentiert werden. Nach acht Stunden war bei allen Versuchen eine Lysezone sichtbar oder gut sichtbar. Nach neun Stunden sowie nach 24 Stunden zeigten alle Versuche eine gut sichtbare Lyse. Die Unterschiede zwischen den biologischen Replikaten können der Tabelle 11 entnommen werden. Unterschiede innerhalb der technischen Replikate wurden nicht beobachtet. Beispielhaft ist in Abbildung 10 die zeitabhängige Entwicklung der Lysezone eines Phagogramms dargestellt.

ERGEBNISSE

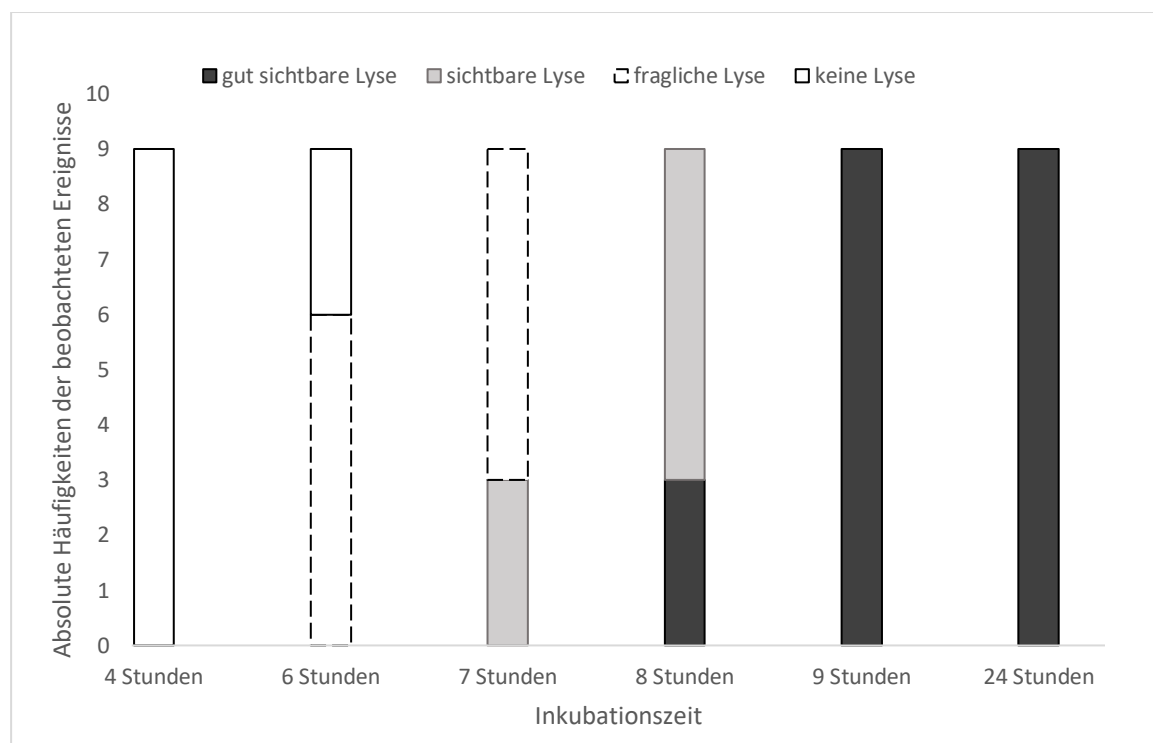


Abbildung 9: Absolute Häufigkeiten der beobachteten Ereignisse nach Einteilung in Lysekategorien in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Phagogramm vom *Escherichia* Phagen T4 und dem Referenzbakterienstamm *E. coli* auf MH II Agar. 3 biologische Replikate mit je 3 technischen Replikaten

Während nach sieben Stunden einige Proben noch der übergeordneten Kategorie „nicht beurteilbare Lyse“ zugeordnet wurden, waren 100 % der Phagogramme nach achtstündiger Inkubationszeit hinsichtlich des Lyseverhaltens beurteilbar.

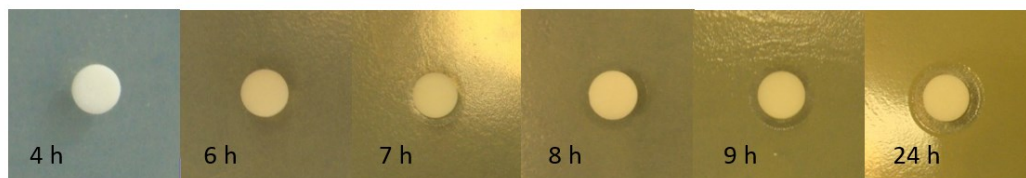


Abbildung 10: Fotodokumentation eines Phagogramms des *Escherichia* Phagen T4 von Versuch 2

3.2.2 *Staphylococcus* Phage MRLN

Analog wurde ein Phagogramm mit dem *Staphylococcus* Phage MRLN und dem Referenzbakterienstamm *S. aureus* angelegt und hinsichtlich einer erfolgten Lyse beurteilt.

ERGEBNISSE

Tabelle 12: Auswertung der Lysezonen in den Phagogrammen des *Staphylococcus* Phagen MRLN und *S. aureus*

		Keine Lyse	Fragliche Lyse	Sichtbare Lyse	Gut sichtbare Lyse
Zeit in Stunden (h) seit Beginn der Inkubationszeit	4 h	▲▲▲ ●●●			
	6 h		▲▲▲	 ●●●	
	7 h				▲▲▲ ●●●
	8 h				▲▲▲ ●●●
	9 h				▲▲▲ ●●●
	24 h				▲▲▲ ●●●
<p>Übersicht der qualitativen Beurteilung der Lysezonen nach Anlegen eines Phagogramms mit dem <i>Staphylococcus</i> Phagen MRLN und dem Bakterienstamm <i>S. aureus</i> nach verschiedenen Inkubationszeiten in replikativer Messung. Absolute Häufigkeiten der Beobachtungen. Zeilen: Ablesezeitpunkt entsprechend der Inkubationszeit, Spalten: Einteilung der beobachteten Lyse in 4 Kategorien. Darstellung der biologischen Replikate durch Symbole: ▲=Versuch 1, ▮=Versuch 2, ●=Versuch 3. Je biologischem Replikate 3 technische Replikate.</p>					

Der Bakterienrasen war nach vierstündiger Inkubation nicht bewachsen und deshalb eine Beurteilung zur Lyse nicht möglich. Nach sechsstündiger Inkubationszeit zeigten sich erste Lysezonen. Unterschiede zwischen den technischen Replikaten innerhalb einer Versuchsreihe wurden nicht beobachtet. Nach siebenstündiger Inkubation war eine Lysezone in allen durchgeführten Versuchen gut sichtbar. Beispielhaft ist dies in der Abbildung 12 dargestellt.

ERGEBNISSE

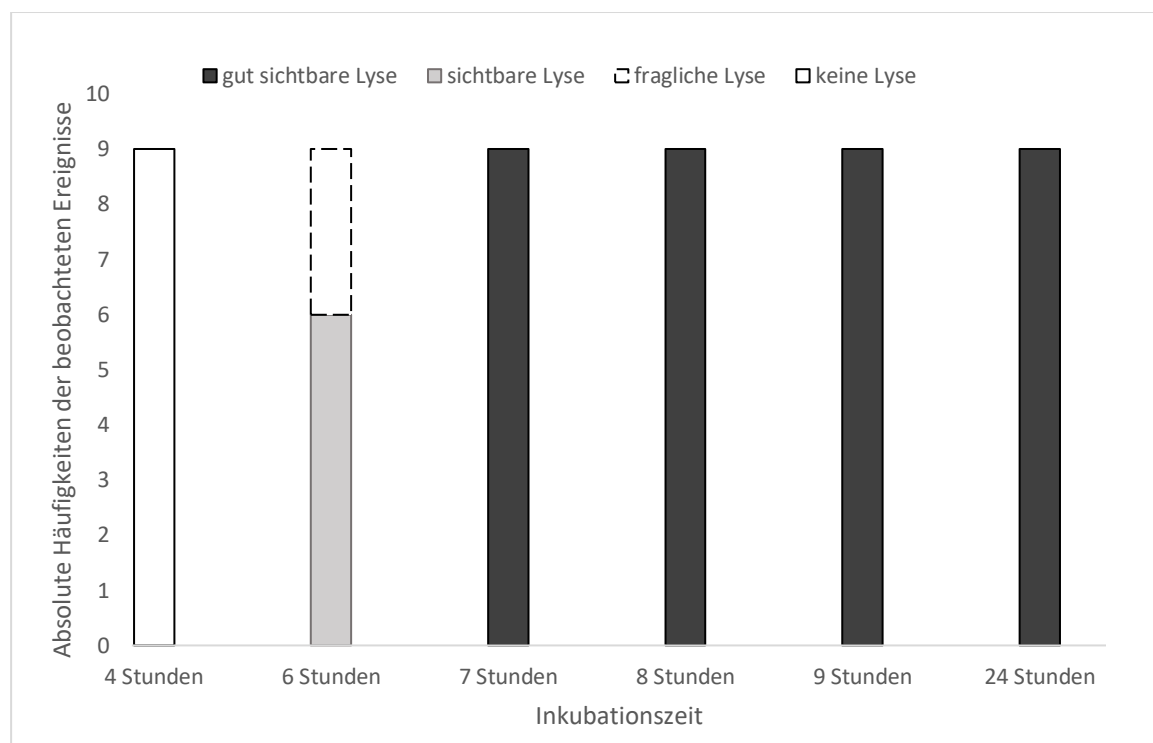


Abbildung 11: Absolute Häufigkeiten der beobachteten Ereignisse nach Einteilung in Lysekategorien in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Phagogramm vom *Staphylococcus* Phagen MRLN und dem Referenzbakterienstamm *S. aureus* auf MH II Agar. 3 biologische Replikate mit je 3 technischen Replikaten

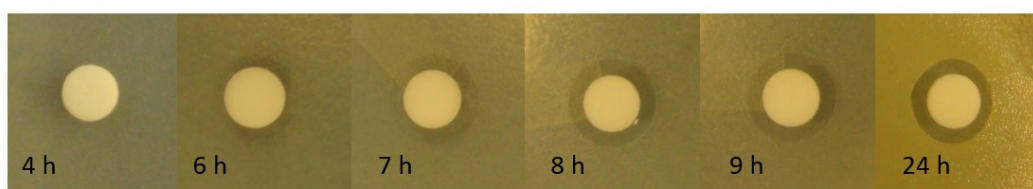


Abbildung 12: Fotodokumentation eines Phagogramms des *Staphylococcus* Phagen MRLN von Versuch 2

3.2.3 *Staphylococcus* Phage vB_SepM_Alex

Für die im Folgenden beschriebene Versuchsreihe wurden Phagogramme mit dem *Staphylococcus* Phagen vB_SepM_Alex und dem Referenzbakterienstamm *S. epidermidis* angelegt.

ERGEBNISSE

Tabelle 13: Auswertung der Lysezonen in den Phagogrammen des *Staphylococcus* Phagen MRLN und *S. epidermidis*

		Keine Lyse	Fragliche Lyse	Sichtbare Lyse	Gut sichtbare Lyse
Zeit in Stunden (h) seit Beginn der Inkubationszeit	4 h	▲▲▲ ●●●			
	6 h	▲▲▲	●●●		
	7 h		▲▲▲	 ●●●	
	8 h			▲▲▲	 ●●●
	9 h				▲▲▲ ●●●
	24 h				▲▲▲ ●●●
<p>Übersicht der qualitativen Beurteilung der Lysezonen nach Anlegen eines Phagogramms mit dem <i>Staphylococcus</i> Phagen vB_SepM_Alex und dem Bakterienstamm <i>S. epidermidis</i> nach verschiedenen Inkubationszeiten in replikativer Messung. Absolute Häufigkeiten der Beobachtungen. Zeilen: Ableszeitpunkt entsprechend der Inkubationszeit, Spalten: Einteilung der beobachteten Lyse in 4 Kategorien. Darstellung der biologischen Replikate durch Symbole: ▲=Versuch 1, ▮=Versuch 2, ●=Versuch 3. Je biologischem Replikat 3 technische Replikate.</p>					

Auch beim Phagogramm mit dem Bakterium *S. epidermidis* war nach vierstündiger Inkubationszeit keine Lyse sichtbar. Nach sechs Stunden konnte teilweise eine fragliche oder sichtbare Lyse beobachtet werden. Die Unterschiede zwischen den biologischen Replikaten können der Tabelle 13 entnommen werden. Unterschiede innerhalb der technischen Replikate wurden nicht beobachtet. Nach sieben Stunden war in zwei von drei Versuchen eine sichtbare Lyse detektierbar. Die Einordnung in „beurteilbare Lyse“ in allen biologischen Replikaten war nach acht Stunden möglich. Nach neun Stunden war die Lyse in allen Versuchen sehr gut sichtbar. Beispielhaft ist dies in Abbildung 14 dargestellt.

ERGEBNISSE

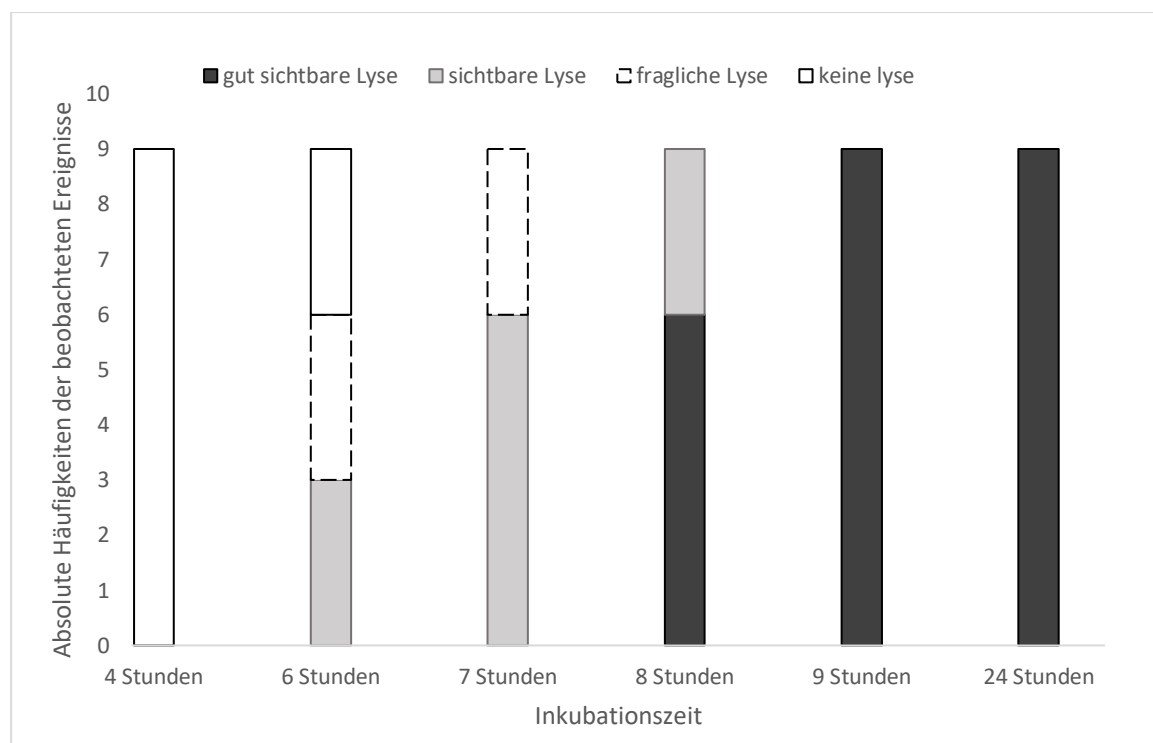


Abbildung 13: Absolute Häufigkeiten der beobachteten Ereignisse nach Einteilung in Lysekategorien in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Phagogramm vom *Staphylococcus* Phagen vB_SepM_Alex und dem Referenzbakterienstamm *S. epidermidis* auf MH II Agar. 3 biologische Replikate mit je 3 technischen Replikaten

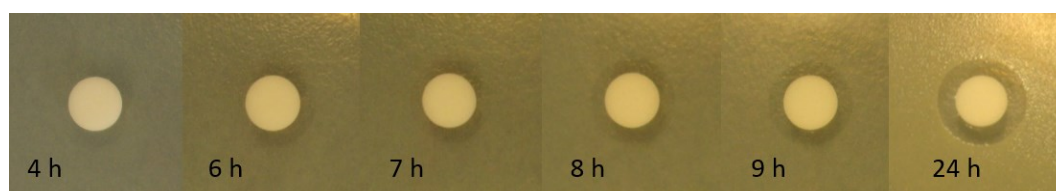


Abbildung 14: Fotodokumentation eines Phagogramms des *Staphylococcus* Phagen vB_SepM_Alex von Versuch 3

3.2.4 *Pseudomonas* Phage 7 Lindberg

Analog zu den vorherigen Versuchen wurden für diese Phagogramme der *Pseudomonas* Phage 7 Lindberg mit dem Referenzbakterienstamm *P. aeruginosa* Stamm I verwendet.

ERGEBNISSE

Tabelle 14: Auswertung der Lysezonen in den Phagogrammen des *Pseudomonas* Phagen 7 Lindberg und *P. aeruginosa* Stamm I

		Keine Lyse	Fragliche Lyse	Sichtbare Lyse	Gut sichtbare Lyse
Zeit in Stunden (h) seit Beginn der Inkubationszeit	4 h	▲▲▲	 ●●●		
	6 h		▲▲▲ 	●●●	
	7 h			▲▲▲ ●●●	
	8 h				▲▲▲ ●●●
	9 h				▲▲▲ ●●●
	24 h				▲▲▲ ●●●
<p>Übersicht der qualitativen Beurteilung der Lysezonen nach Anlegen eines Phagogramms mit dem <i>Pseudomonas</i> Phagen Lindberg und dem Bakterienstamm <i>P. aeruginosa</i> Stamm I nach verschiedenen Inkubationszeiten in replikativer Messung. Absolute Häufigkeiten der Beobachtungen. Zeilen: Ableszeitpunkt entsprechend der Inkubationszeit, Spalten: Einteilung der beobachteten Lyse in 4 Kategorien. Darstellung der biologischen Replikate durch Symbole: ▲=Versuch 1, ▮=Versuch 2, ●=Versuch 3. Je biologischem Replikat 3 technische Replikate.</p>					

Hier zeigte sich nach vierstündiger Inkubationszeit bei zwei von drei Versuchen bereits eine fragliche Lyse. In Abbildung 16 ist die Entwicklung von Bakterienrasen und Lysezone in einer Phagentestung beispielhaft dokumentiert. Nach sechs Stunden konnte teilweise eine fragliche bzw. bereits sichtbare Lyse beobachtet werden. Nach siebenstündiger Inkubationszeit war die Lyse in allen Replikaten sichtbar und nach neun Stunden gut sichtbar. Die Unterschiede zwischen den biologischen Replikaten können der Tabelle 14 entnommen werden. Unterschiede innerhalb der technischen Replikate wurden nicht beobachtet.

ERGEBNISSE

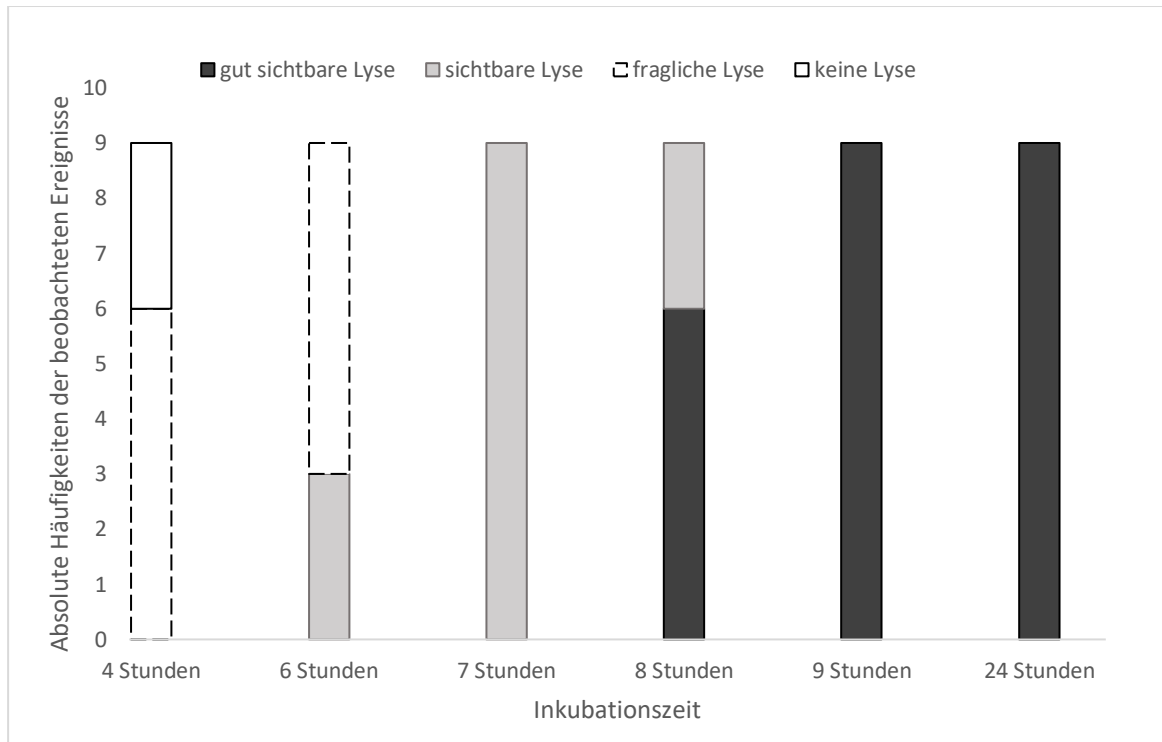


Abbildung 15: Absolute Häufigkeiten der beobachteten Ereignisse nach Einteilung in Lysekategorien in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Phagogramm vom *Pseudomonas* Phagen 7 Lindberg und dem Referenzbakterienstamm *P. aeruginosa* Stamm I auf MH II Agar. 3 biologische Replikate mit je 3 technischen Replikaten

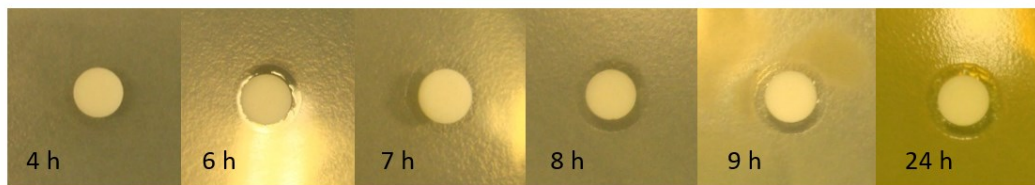


Abbildung 16: Fotodokumentation eines Phagogramms des *Pseudomonas* Phagen Lindberg von Versuch 2

3.2.5 *Pseudomonas* Phage vB_PaeM-PT-MAS01

Für die Versuchsreihe des *Pseudomonas* Phagen vB_PaeM-PT-MAS01 wurden die Phagogramme mit dem Referenzbakterienstamm *P. aeruginosa* Stamm II angelegt.

ERGEBNISSE

Tabelle 15: Auswertung der Lysezonen in den Phagogrammen des *Pseudomonas* Phagen vB_PaeM-PT-MAS01 und *P. aeruginosa* Stamm II

		Keine Lyse	Fragliche Lyse	Sichtbare Lyse	Gut sichtbare Lyse
Zeit in Stunden (h) seit Beginn der Inkubationszeit	4 h	▲▲▲ ●●●			
	6 h	●●●	▲▲▲ 		
	7 h		●●●	▲▲▲ 	
	8 h			●●●	▲▲▲
	9 h			●●●	▲▲▲
	24 h				▲▲▲ ●●●

Übersicht der qualitativen Beurteilung der Lysezonen nach Anlegen eines Phagogramms mit dem *Pseudomonas* Phagen vB_PaeM_PT_MAS01 und dem Bakterienstamm *P. aeruginosa* Stamm II nach verschiedenen Inkubationszeiten in replikativer Messung. Absolute Häufigkeiten der Beobachtungen. Zeilen: Ableszeitpunkt entsprechend der Inkubationszeit, Spalten: Einteilung der beobachteten Lyse in 4 Kategorien. Darstellung der biologischen Replikate durch Symbole: ▲=Versuch 1, ■=Versuch 2, ●=Versuch 3. Je biologischem Replikat 3 technische Replikate.

Beim Phagogramm dieses *Pseudomonas* Phagen wurde nach sechsständiger Inkubation teilweise eine fragliche Lyse beobachtet. Nach sieben Stunden war die Lyse bereits in zwei Versuchsreihen sichtbar. Ab achtständiger Inkubationszeit war in allen Versuchsreihen zumindest eine „beurteilbare Lyse“ detektierbar. Nach 24 Stunden war die Lyse in allen Phagogrammen gut sichtbar. Zwischen den technischen Replikaten innerhalb eines Versuchs wurden keine Unterschiede beobachtet. Die zeitliche Entwicklung von Bakterienrasen und Lysezone ist in Abbildung 18 fotografisch beispielhaft dokumentiert.

ERGEBNISSE

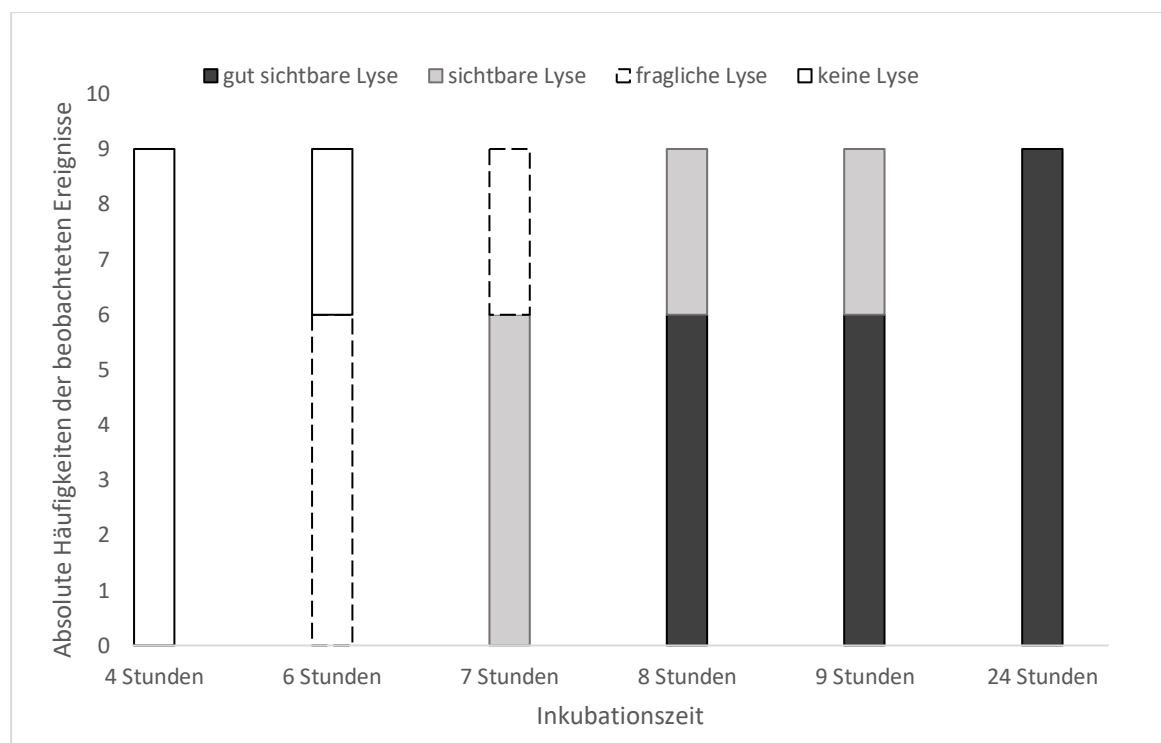


Abbildung 17: Absolute Häufigkeiten der beobachteten Ereignisse nach Einteilung in Lysekategorien in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Phagogramm vom *Pseudomonas* Phagen vB_PaeM-PT-MAS01 und dem Referenzbakterienstamm *P. aeruginosa* Stamm II auf MH II Agar. 3 biologische Replikate mit je 3 technischen Replikaten

Wie in Abbildung 17 dargestellt zeigte sich nach einer achtstündigen Inkubationszeit bei allen Phagogrammen eine vom Bakterienrasen abgrenzbare Lysezone, sodass die Einordnung mindestens in der Kategorie „sichtbare Lyse“ erfolgte.

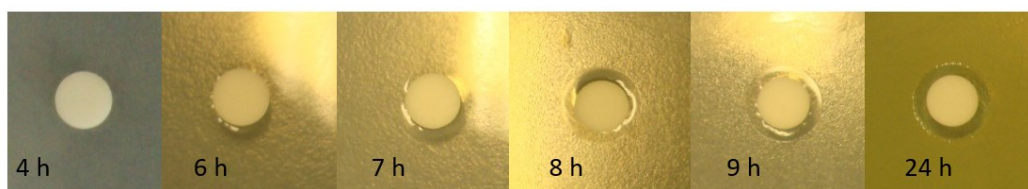


Abbildung 18: Fotodokumentation eines Phagogramms des *Pseudomonas* Phagen vB_PaeM-PT-MAS01 von Versuch 2

3.2.6 *Proteus* Phage vB_PniP-Homer

Analog zu den vorherigen Versuchen wurden für die folgenden Phagogramme der *Proteus* Phage vB_PniP-Homer mit dem Referenzbakterienstamm *P. mirabilis* verwendet.

ERGEBNISSE

Tabelle 16: Auswertung der Lysezonen in den Phagogrammen des *Proteus* Phagen vB_PniP-Homer und *P. mirabilis*

		Keine Lyse	Fragliche Lyse	Sichtbare Lyse	Gut sichtbare Lyse
Zeit in Stunden (h) seit Beginn der Inkubationszeit	4 h	▲▲▲ 	●●●		
	6 h		▲▲▲ 	●●●	
	7 h			▲▲▲ ●●●	
	8 h				▲▲▲ ●●●
	9 h				▲▲▲ ●●●
	24 h				▲▲▲ ●●●
<p>Übersicht der qualitativen Beurteilung der Lysezonen nach Anlegen eines Phagogramms mit dem <i>Proteus</i> Phagen vB_PniP-Homer und dem Bakterienstamm <i>P. mirabilis</i> nach verschiedenen Inkubationszeiten in replikativer Messung. Absolute Häufigkeiten der Beobachtungen. Zeilen: Ableszeitpunkt entsprechend der Inkubationszeit, Spalten: Einteilung der beobachteten Lyse in 4 Kategorien. Darstellung der biologischen Replikate durch Symbole: ▲=Versuch 1, ▮=Versuch 2, ●=Versuch 3. Je biologischem Replikate 3 technische Replikate.</p>					

Nach vierstündiger Inkubation konnte teilweise bereits eine fragliche Lyse und nach sechs Stunden eine sichtbare Lyse beobachtet werden. Eine sichtbare Lyse in allen Phagogrammen war ab sieben Stunden und eine gut sichtbare Lyse nach neun Stunden Inkubation vorhanden. In Tabelle 16 sind die Unterschiede zwischen den biologischen Replikaten aufgeführt. Unterschiede zwischen den technischen Replikaten innerhalb eines Versuchs wurden nicht beobachtet. Die Entwicklung von Bakterienrasen und Lysezone in Abhängigkeit der Inkubationszeit ist in Abbildung 20 exemplarisch dargestellt.

ERGEBNISSE

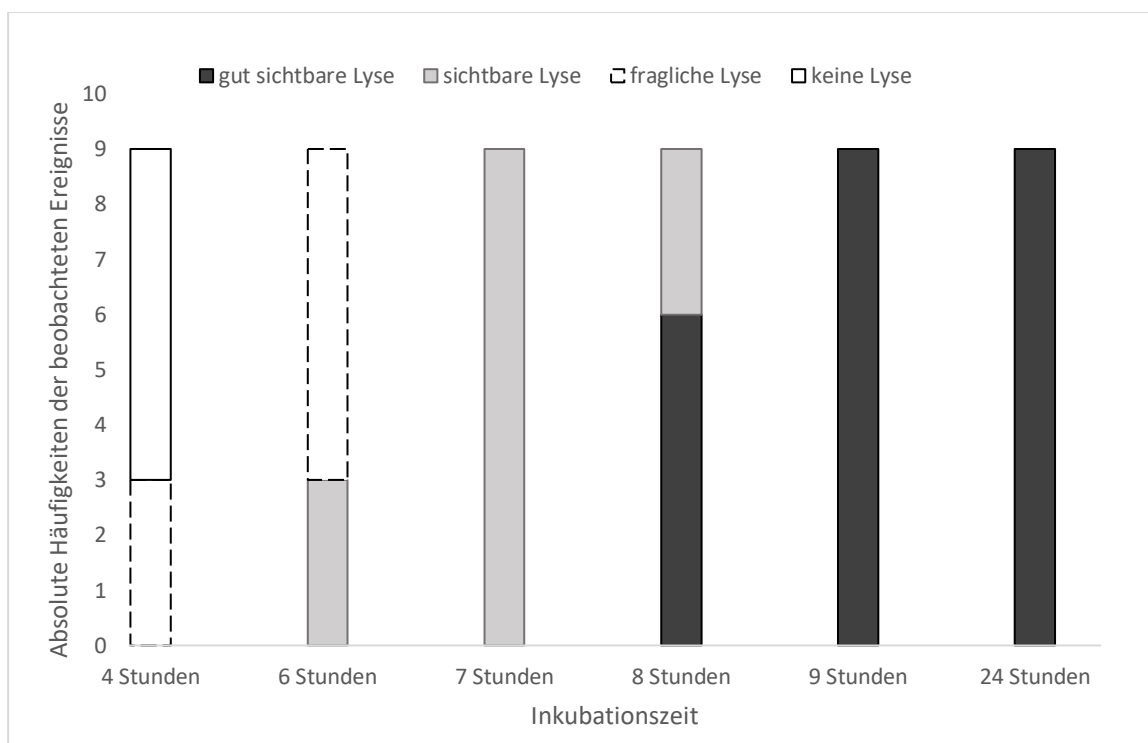


Abbildung 19: Absolute Häufigkeiten der beobachteten Ereignisse nach Einteilung in Lysekategorien in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Phagogramm vom *Proteus* Phagen vB_PniP-Homer und dem Referenzbakterienstamm *P. mirabilis* auf MH II Agar. 3 biologische Replikate mit je 3 technischen Replikaten

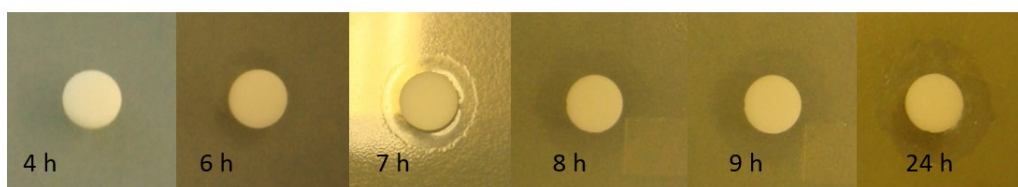


Abbildung 20: Fotodokumentation eines Phagogramms des *Proteus* Phagen vB_PniP-Homer von Versuch 1

3.2.7 *Enterococcus* Phage vB_EfaS_Streppe11

Die Versuchsreihe zum *Enterococcus* Phagen vB_EfaS_Streppe11 und dem Referenzbakterienstamm *E. faecalis* wurden auf MH II sowie auf supplementiertem Agarmedium (MH-F) durchgeführt.

ERGEBNISSE

3.2.7.1 Versuchsreihe auf BD Mueller Hinton II Agar

Tabelle 17: Auswertung der Lysezonen in den Phagogrammen des *Enterococcus* Phagen vB_EfaS_Strepell und *E. faecalis* auf MH Agar

		Keine Lyse	Fragliche Lyse	Sichtbare Lyse	Gut sichtbare Lyse
Zeit in Stunden (h) seit Beginn der Inkubationszeit	4 h	▲▲▲ ●●●			
	6 h		▲▲▲ ●●	●	
	7 h		●●	▲▲▲ ●	
	8 h			●●	▲▲▲ ●
	9 h				▲▲▲ ●●●
	24 h				▲▲▲ ●●●
<p>Übersicht der qualitativen Beurteilung der Lysezonen nach Anlegen eines Phagogramms mit dem <i>Enterococcus</i> Phagen vB_EfaS_Strepell und dem Bakterienstamm <i>E. faecalis</i> nach verschiedenen Inkubationszeiten in replikativer Messung. Absolute Häufigkeiten der Beobachtungen. Zeilen: Ableszeitpunkt entsprechend der Inkubationszeit, Spalten: Einteilung der beobachteten Lyse in 4 Kategorien. Darstellung der biologischen Replikate durch Symbole: ▲=Versuch 1, ■=Versuch 2, ●=Versuch 3. Je biologischem Replikat 3 technische Replikate.</p>					

Nach sechsständiger Inkubation waren eine fragliche Lyse und bei einem Phagogramm bereits eine sichtbare Lyse detektierbar. Bereits die Mehrheit (n=7) der angefertigten Phagogramme zeigte nach 7 Stunden eine sichtbare Lyse. Eine „beurteilbare Lyse“ war in allen Testreihen nach acht Stunden und eine gut sichtbare Lyse in allen Phagogrammen nach neun Stunden sichtbar. Die Entwicklung von Bakterienrasen und Lysezone in Abhängigkeit der Inkubationszeit zeigt die Abbildung 22 exemplarisch.

ERGEBNISSE

Im Unterschied zu den bisherigen Versuchsreihen konnten hier Unterschiede innerhalb der technischen Replikationen beobachtet werden. Eine Übersicht über die einzelnen Beobachtungen der biologischen und technischen Replikate ist in Tabelle 17 aufgeführt.

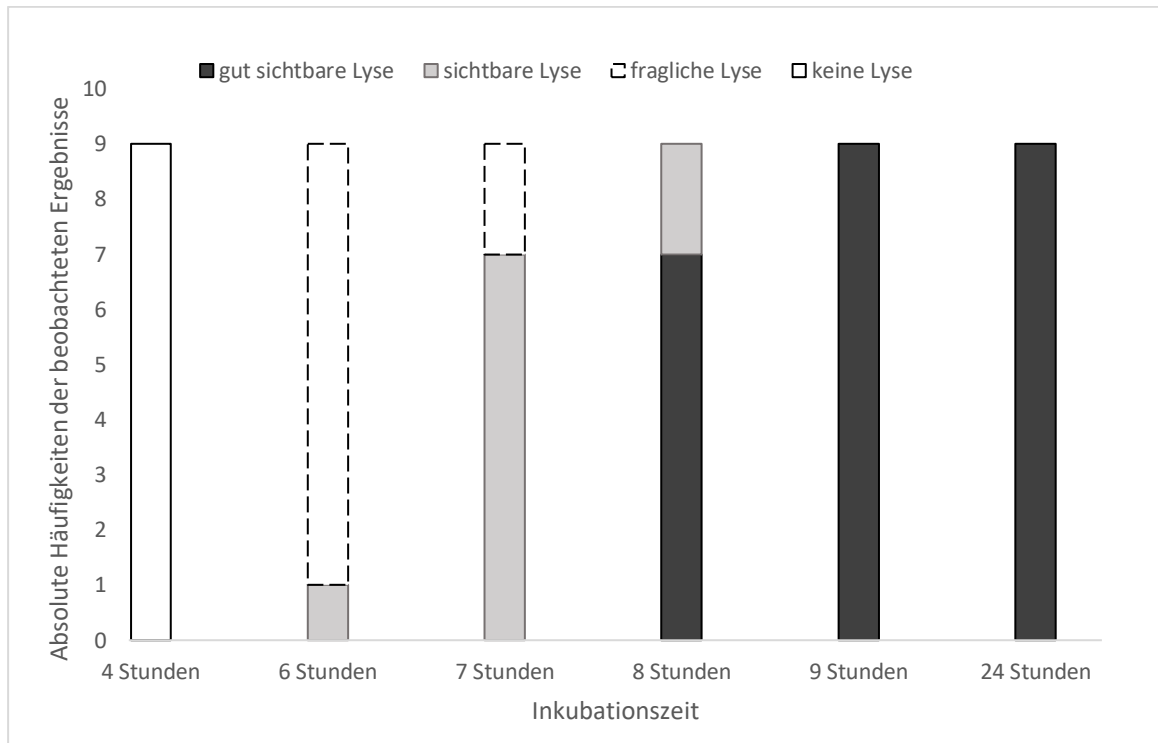


Abbildung 21: Absolute Häufigkeiten der beobachteten Ereignisse nach Einteilung in Lysekategorien in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Phagogramm vom *Enterococcus* Phagen vB_EfaS_Strempel1 und dem Referenzbakterienstamm *E. faecalis* auf MH II Agar. 3 biologische Replikate mit je 3 technischen Replikaten

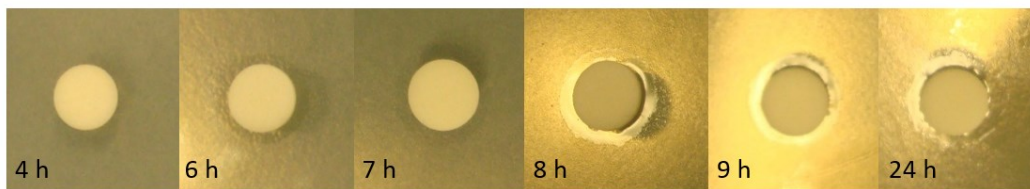


Abbildung 22: Fotodokumentation eines Phagogramms des *Enterococcus* Phagen vB_EfaS_Strempel1 von Versuch 1

ERGEBNISSE

3.2.7.2 Versuchsreihe auf supplementiertem Agarmedium

Zusätzlich zur Versuchsreihe auf MH II Agarmedium wurden Phagogramme mit dem *Enterococcus* Phagen vB_EfaS_Strempell und dem Referenzbakterienstamm *E. faecalis* auf supplementiertem Agarmedium MH-F angelegt. Zudem wurden die Phagogramme bei (5%) CO₂-angereicherter Atmosphäre und 37 °C inkubiert.

Tabelle 18: Auswertung der Lysezonen in den Phagogrammen des *Enterococcus* Phagen vB_EfaS_Strempell und *E. faecalis* auf MH-F Agar

		Keine Lyse	Fragliche Lyse	Sichtbare Lyse	Gut sichtbare Lyse
Zeit in Stunden (h) seit Beginn der Inkubationszeit	4 h	▲▲▲	 ●●●		
	6 h			▲▲▲ ●●●	
	7 h				▲▲▲ ●●●
	8 h				▲▲▲ ●●●
	9 h				▲▲▲ ●●●
	24 h				▲▲▲ ●●●
<p>Übersicht der qualitativen Beurteilung der Lysezonen nach Anlegen eines Phagogramms auf MH-F Agar mit dem <i>Enterococcus</i> Phagen vB_EfaS_Strempell und dem Bakterienstamm <i>E. faecalis</i> nach verschiedenen Inkubationszeiten in replikativer Messung. Absolute Häufigkeiten der Beobachtungen. Zeilen: Ableszeitpunkt entsprechend der Inkubationszeit, Spalten: Einteilung der beobachteten Lyse in 4 Kategorien. Darstellung der biologischen Replikate durch Symbole: ▲=Versuch 1, =Versuch 2, ●=Versuch 3. Je biologischem Replikate 3 technische Replikate.</p>					

Nach vierstündiger Inkubation war bereits teilweise eine fragliche Lyse sichtbar. Nach sechs Stunden war in allen Versuchsreihen eine sichtbare Lyse, nach sieben Stunden eine gut sichtbare Lyse detektierbar. Unterschiede innerhalb der biologischen Replikate können

ERGEBNISSE

der Tabelle 18 entnommen werden. Unterschiede zwischen den technischen Replikaten innerhalb eines Versuchs traten nicht auf.

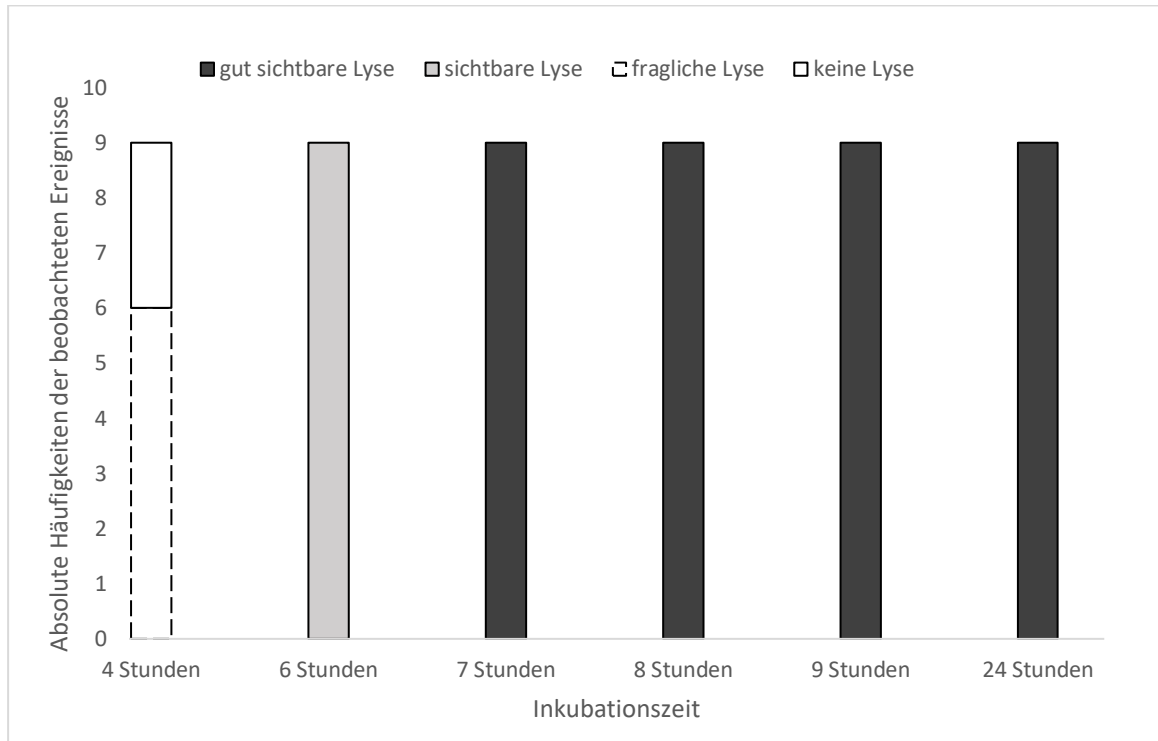


Abbildung 23: Absolute Häufigkeiten der beobachteten Ereignisse nach Einteilung in Lysekategorien in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Phagogramm vom *Enterococcus* Phagen vB_EfaS_Strempel1 und dem Referenzbakterienstamm *E. faecalis* auf MH-F Agar. 3 biologische Replikate mit je 3 technischen Replikaten

Wie in Abbildung 23 ersichtlich wird, waren 100 % der insgesamt neun Phagogramme nach sechsständiger Inkubation hinsichtlich einer erfolgten Lyse beurteilbar. Für die Phagentestung aus Versuch 1 ist die Entwicklung von Bakterienrasen und Lysezone in Abhängigkeit der Inkubationszeit in Abbildung 24 fotografisch dargestellt.

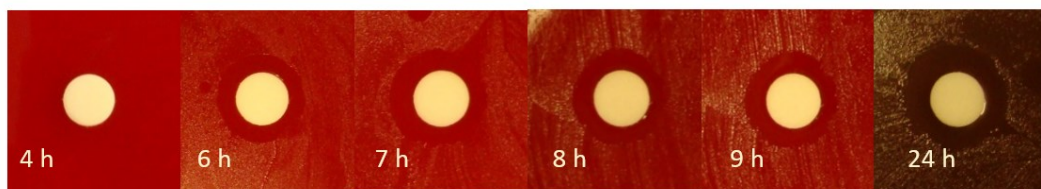


Abbildung 24: Fotodokumentation eines Phagogramms des *Enterococcus* Phagen vB_EfaS_Strempel1 von Versuch 1 auf MH-F Agar

ERGEBNISSE

3.2.8 Zusammenfassung der Versuche aller untersuchten Phagenstämme

In Anlehnung an die schnelle Sensibilitätstestung positiver Blutkulturen gegenüber Antibiotika nach EUCAST (rAST) wurde die Beurteilbarkeit einer erfolgten Lyse in Phagogrammen sieben verschiedener Phagenstämme gegenüber ihren jeweiligen Referenzbakterienstämmen unterschiedlicher Wirtsspezies nach verkürzter Inkubationszeit geprüft. Nach achtstündiger Inkubation war die Bewertung als „beurteilbare Lyse“ bei allen verwendeten Phagenstämmen möglich. Dies ist in Abbildung 25 synoptisch dargestellt. Der früheste Zeitpunkt der Einordnung in die Kategorie „beurteilbare Lyse“ variierte sowohl zwischen den Phagenstämmen als auch innerhalb eines Phagenstamms zwischen den biologischen und technischen Replikaten. Die Mehrheit der Phagogramme war bereits nach 7 Stunden hinsichtlich der Lyseaktivität beurteilbar.

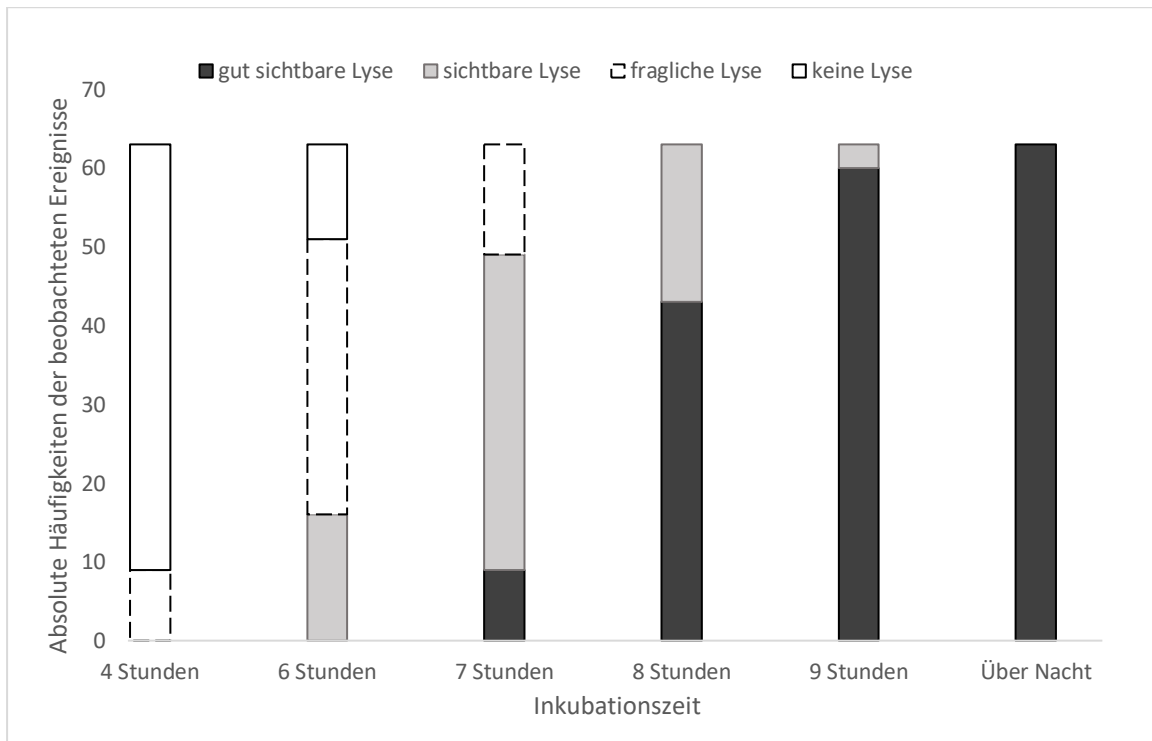


Abbildung 25: Absolute Häufigkeiten der beobachteten Ereignisse nach Einteilung in Lysekategorien in Abhängigkeit der Inkubationszeit. Phagogramm der sieben Phagenstämme und den jeweiligen Referenzbakterienstämmen auf MH II Agar. 7 Phagen-Bakterienkombinationen, je 3 biologische Replikate mit je 3 technischen Replikaten

4 Diskussion

Um die Rahmenbedingungen für eine beschleunigte Phagentestung in dieser Machbarkeitsstudie zu evaluieren, wurden in Anlehnung an die schnelle Sensibilitätstestung aus positiven Blutkulturen (rAST) nach EUCAST Phagogramme zur Spezifitätstestung sieben verschiedener Phagenstämme angelegt und nach zuvor festgelegten Ablesezeitpunkten hinsichtlich einer erfolgten Lyse beurteilt. Der Fokus bei der Auswertung der Proben lag auf einer validen Beurteilbarkeit einer Lysezone innerhalb der kürzest möglichen Zeitspanne.

Um bei der Evaluation den größtmöglichen klinischen Bezug zu erzielen, erfolgte die Auswahl der Phagen entsprechend der am häufigsten nachgewiesenen Bakterienspezies aus Patientenmaterialien der Universitätsmedizin Rostock (UMR) zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente auf Grundlage des Surveillanceberichtes aus dem Jahr 2020. Dabei schloss die Auswahl sowohl gramnegative als auch grampositive Bakterien ein. Im Folgenden sind die häufigsten Erreger aufgeführt. Dabei beschreiben die eingeklammerten Zahlen die absoluten Häufigkeiten des Bakteriennachweises in den eingesandten Proben im Jahr 2020 an der UMR. *E. coli* (2208), *S. aureus* (1530), *S. epidermidis* (1158), *E. faecalis* (1080), *P. aeruginosa* (619) und *P. mirabilis* (593). [84] Auch 2022 wurden diese Erreger noch als die häufigsten aufgelistet. [85] Das Europäische Zentrum für die Prävention und Kontrolle von Krankheiten, European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), veröffentlichte 2022 einen Bericht zur Entwicklung von Infektionen mit antibiotikaresistenten Bakterien im Zeitraum von 2016 bis 2020. Dabei zeigten sich signifikante Anstiege in der Anzahl der Erkrankungen sowie der damit assoziierten Mortalität. Den größten Anteil an den untersuchten Infektionserregern hatte dabei *E. coli* mit einer Resistenz gegenüber Cephalosporinen der dritten Generation. [86] Der Bedrohung durch die stetig steigende Zahl an antibiotikaresistenten Erregern kann nur durch einen multimodalen Lösungsansatz entgegengewirkt werden. Da ein steigender Antibiotikaverbrauch mit einem vermehrten Aufkommen antibiotikaresistenter Bakterien korreliert, stellt die Reduktion nichtindizierter Antibiotikaverordnungen, beispielsweise bei viralen Infekten, einen Ansatz dar. [87] Zusammengefasst werden die Maßnahmen zur Förderung eines verantwortungsvollen Umgangs mit Antibiotika im Antibiotic Stewardship. [88, 89] Auch die Verbesserung der hygienischen Maßnahmen wie

DISKUSSION

beispielsweise die Einhaltung einer konsequenten hygienischen Händedesinfektion kann zur Reduktion bakterieller Infektionen beitragen. [90–92] Um Infektionen mit multiresistenten Bakterien behandeln zu können, ist eine fortlaufende Entwicklung neuer Antibiotika notwendig. Jedoch nimmt die Anzahl neu zugelassener Antibiotika in den letzten Jahren stetig ab. [11, 15] Deshalb wird in Zukunft eine Alternative oder Ergänzung der Antibiotikatherapie erforderlich sein, zum Beispiel durch Rückkehr zur Phagentherapie. Im Gegensatz zur Therapie mit Antibiotika wirken Phagen sehr spezifisch und sind eher für eine individuelle Therapie geeignet. [93] Bei kritisch kranken Patienten müssen innerhalb kurzer Zeit zunächst der Keim identifiziert und dann große Phagenbanken nach dem geeigneten Phagen durchsucht werden. [4] Bisher sind Phagentestungen nicht standardisiert und die bisher beschriebenen Verfahren unterscheiden sich hinsichtlich der Menge der aufgebrauchten Phagensuspension, Zusammensetzung und individuell hergestellten Agarmedien. [75–78] Die Standardisierung ist jedoch zwingend erforderlich, um eine breite Anwendung und eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu ermöglichen. Daher ist die Entwicklung einfach handhabbarer und zeitsparender Spezifitätstestungen in Form von Phagogrammen für die Diagnostik notwendig. Dabei soll die Methodik im Idealfall schnell und in jedem mikrobiologischen Routinediagnostik-Labor implementiert werden können.

Zunächst musste anhand von Vorversuchen eine standardisierbare Methodik entwickelt werden, welche im Nachgang dann in ihrer Durchführung zeitlich optimiert werden kann. Für die Vorversuche wurde der gut etablierte und charakterisierte *Escherichia* Phage T4 verwendet, da dieser als Teil des von M. Delbrück 1946 definierten T-Systems, zu einer Gruppe umfangreich genetisch untersuchter Phagen gehört. [94–98] In allen Versuchen dieser Arbeit wurden ausschließlich die jeweiligen vom DSMZ empfohlenen Referenzbakterienstämme genutzt. [99]

T4 Phagen wurden auch bereits in klinischen Studien untersucht. In einer 2017 veröffentlichten randomisierten klinischen Sicherheitsstudie in Bangladesch wurden gesunden Kindern sowie an Diarrhö erkrankten Kindern ein Phagencocktail mit T4-ähnlichen Phagen verabreicht. Zuvor war der Phagencocktail in höherer Dosierung an gesunden Erwachsenen getestet worden. [68, 69, 100] Eine weitere Sicherheitsstudie erfolgte in Colorado. Dabei wurde ein Cocktail mit Phagen gegen *E. coli* gesunden

DISKUSSION

Erwachsenen oral verabreicht und die Auswirkungen auf die physiologische Darmflora untersucht. [101] Weitere internationale Studien untersuchten ebenfalls die Sicherheit und den Nutzen der Applikation von in dieser Arbeit verwendeten Phagen. [102–105]

Eine abgeschlossene randomisierte klinische Studie zur Evaluation einer Phagentherapie bei Harnwegsinfektionen aus dem Jahr 2021 untersuchte die Wirkung einer intravesikalen Installation eines Phagencocktails, unter anderem gegen die Zielpathogene *S. aureus*, *E. coli* und *P. aeruginosa*. [70] In einer britischen ebenfalls randomisierten Placebo-kontrollierten klinischen Therapiestudie von 2019 wurden Patienten mit einer chronischen Otitis ein Phagencocktail mit *Pseudomonas* Phagen lokal appliziert. [67] In Deutschland wurde im Rahmen des Projekts PhagoBurn ein Phagencocktail zur Behandlung von *P. aeruginosa*-infizierter Brandwunden topisch eingesetzt. [66] Zusammenfassend konnten in den bisher abgeschlossenen klinischen Studien zur Applikation von Phagen teilweise klinische Verbesserungen beobachtet werden. Relevante mit der Phagentherapie assoziierte Nebenwirkungen oder Toxizität wurden nicht beschrieben.

Bei Phage4Cure ist der im inhalativen Arzneimittel enthaltene Phagenstamm gegen *P. aeruginosa* wirksam und soll bei chronischer Besiedlung insbesondere bei Patienten mit Mukoviszidose angewandt werden. [73] Ähnlich den Versuchen dieser Arbeit werden im Rahmen des Projekts PhagoFlow verschiedene Zielpathogene (*S. aureus*, *E. coli* und *P. aeruginosa*) und dagegen wirksame Phagen untersucht. Dabei wird der Schwerpunkt des Projekts auf die Untersuchung der Praktikabilität der Phagentherapie gelegt. [72] Eine weitere Gemeinsamkeit mit diesem Projekt lässt sich in dem Ziel, ein Phagogramm in der Routinediagnostik mikrobiologischer Labore zu etablieren, finden. Über den Fortschritt von PhagoFlow hinsichtlich des Phagogramms konnten bisher keine Publikationen gefunden werden.

Für die phänotypische Antibiotika-Empfindlichkeitstestung von Bakterien existieren Empfehlungen von EUCAST und CLSI. In Anlehnung an die materialbezogenen und methodischen Vorgaben von EUCAST wurden diese zum Anfertigen eines Phagogramms hinsichtlich Spezifitätsergebnis und Praktikabilität im Rahmen dieser Arbeit getestet und miteinander verglichen. Die Anfertigung eines Phagogramms sollte vor allem standardisierte Arbeitsschritte enthalten, die zu reproduzierbaren Ergebnissen führen und

DISKUSSION

dabei die vorhandenen und qualitätskontrollierten Ressourcen eines akkreditierten mikrobiologisch diagnostischen Routinelabors nutzen. Dazu wurde zunächst gebrauchsfertiger Mueller Hinton Agar (MH II bzw. MH-F) als Festnährmedium der Agar-basierten Testung verwendet.

In der Literatur zum Double Agar Overlay Plaque Assay und Spot Test, bei welchen kein gebrauchsfertiger Agar verwendet wird, finden sich verschiedene Zusammensetzungen des Bottom-Agars, welche zwischen 1-1,5% Agargehalt und je nach verwendetem Wirtsbakterium im Grundmedium (z. B. LB-Medium oder Casein-Soja-Pepton-Agar) variieren. [75, 77, 106–113] Auch ist der Zusatz von Elektrolyten wie beispielsweise CaCl_2 [107] und MgCl_2 [77] in der Literatur zu finden. Die Verwendung von kommerziell verfügbaren, zertifizierten Agar-Platten zeigt neben einer standardisierten Zusammensetzung Vorteile in Arbeitszeit und -aufwand. Sie sind direkt einsetzbar und können gekühlt längere Zeit auf Vorrat aufbewahrt werden. Die Zusammensetzung kommerziell verfügbarer Agarplatten ist konstant und damit die Reproduzierbarkeit bei der Anfertigung eines Phagogramms hoch. Auch die Kosten in der Anschaffung sind geringer als der Kauf der individuellen Komponenten.

Das Aufbringen der Bakteriensuspension wurde an akkreditierte Methoden angepasst. Grundlage der Versuchsplanung war die Plättchen-basierte Agardiffusionstestung nach EUCAST zum Anlegen eines AST. [114] Diese beruht auf der Arbeit von Bauer und Kirby, welche 1966 eine standardisierte Methode zur Plättchen-basierten Sensibilitätestung von Bakterien gegenüber Antibiotika veröffentlichten. [115] Im Hinblick auf einen homogen gewachsenen Bakterienrasen sind in dieser Arbeit drei Faktoren zu diskutieren: die Art der Inokulation, die Konzentration der verwendeten Bakteriensuspension und das Inokulationsvolumen. Während von EUCAST das Ausplattieren der Bakteriensuspension mithilfe eines Wattestabs beschrieben wird, wurden in diesen Versuchen das Ausplattieren sowohl mithilfe eines Drigalskispatels als auch mithilfe eines Wattestabs getestet. Unter Verwendung des Drigalskispatels war der Bakterienrasen nach Inkubation gleichmäßiger gewachsen als in den Versuchsreihen unter Verwendung des Wattestabs. Die Ausbildung eines homogenen Bakterienrasens erleichterte die Beurteilung hinsichtlich einer erfolgten Lyse. Eine experimentelle Studie mit *E. coli* von 2021 beschreibt einen Zusammenhang zwischen der Lokalisation der ersten ausplattierten Bakterienzelle und dem

DISKUSSION

Koloniewachstum. [116] Demnach hat das Ausplattieren und damit die Lokalisation der Bakterien auf der Agarplatte einen Einfluss auf die Morphologie des Bakterienrasens. Wie die Zellen proliferieren und sich der Bakterienrasen ausbildet, hängt zudem von der Spezies ab. Auch die Dichte der Kolonien auf der Platte ist entscheidend. Erst ab einer bestimmten Bakterienkonzentration kann sich ein Bakterienrasen ausbilden. Bei Konzentrationen unterhalb dieser Schwelle sind nur einzelne Kolonien anstatt eines konfluierenden Rasens sichtbar. [117] Bakterienkonzentrationen unterscheiden sich trotz gleicher Trübungsstandards. Das lässt sich darauf zurückführen, dass das Streuverhalten abhängig von Größe und Form der einzelnen Bakterien ist und sich somit zwischen den verschiedenen Spezies unterscheidet. In dieser Arbeit wurde statt des OD-Wertes bei 600 nm der McFarland-Trübungsstandard zur Einstellung der Bakterienkonzentration verwendet. Die Verwendung eines definierten McFarland-Trübungsstandards ist in der Anfertigung von Antibiotogrammen üblich. Dies bietet den Vorteil, dass keine Inkubation der Bakteriensuspension notwendig ist und somit Zeit- und Arbeitsaufwand eingespart wird. [118] Schwankungen der Konzentrationen innerhalb einer Spezies müssen auf Messungenauigkeiten zurückgeführt werden.

Ein weiterer Unterschied zur Plättchen-basierten Agardiffusionstestung nach EUCAST ist das Volumen der aufgetragenen Bakteriensuspension. Während bei der Antibiotikatestung der Wattestab in die Bakteriensuspension getaucht und dann auf der Agarplatte ausgestrichen wird [21], wurde bei dem hier entworfenen Phagogramm ein definiertes Volumen von 100 µl Bakteriensuspension direkt auf die Agarplatte gegeben und dann mit dem Drigalskispatel bzw. dem Wattestab verteilt, um eine geringere Schwankung in der Menge an ausplattierten Bakterien zu garantieren. [119] So kann davon ausgegangen werden, dass innerhalb einer Bakterienspezies jedes Phagogramm bei zuvor definierter Konzentration der Bakteriensuspension mit einer annähernd gleichen Anzahl an CFU angelegt wird. Im Double Agar Overlay Plaque Assay und Spot Test wird die Bakteriensuspension ebenfalls in einem definierten Volumen in den Softagar gegeben und anschließend auf dem Bottomagar ausgegossen. Die Volumina variieren in der Literatur jedoch deutlich von 100-200 µl. [75, 107, 112] Die Festlegung auf eine Bakterienkonzentration ist für die standardisierte Anwendung von Phagogrammen notwendig, da die Konzentration des Wirtsbakteriums Einfluss auf die Geschwindigkeit

DISKUSSION

der Phagenvermehrung und somit Auftreten einer sichtbaren Lyse nimmt. Zunächst korreliert die Zunahme der Vermehrungsgeschwindigkeit mit einer steigenden Bakterienkonzentration, da dies den Kontakt zwischen Phagen und Wirtszelle begünstigt. Sehr hohe Bakterienkonzentrationen wirken sich jedoch negativ auf die Vermehrungsgeschwindigkeit aus, da die Diffusion der Phagen durch das Volumen der Bakterien behindert und so die Ausbreitung und Infektion weiterer Bakterien behindert wird. [120]

In den Versuchen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein direktes Ausplattieren der Bakteriensuspension ohne Verwendung eines Softagars für das Wachsen eines konfluenten Bakterienrasens geeignet ist. Auch in den Versuchsprotokollen von Mazzocco et al. ist die direkte Inokulation ohne Verwendung von Softagar beschrieben. [121] Insbesondere im Hinblick auf die Standardisierung erscheint dieses Verfahren geeigneter, da es schneller, einfacher und effizienter als die herkömmliche Double Agar Overlay Technik ist. Der beim Spot Test verwendete Softagar variiert in der Agarkonzentration in Literaturangaben zwischen 0,4-0,7 % [75, 76, 109, 111, 112]. Dies kann die Größe der ausgebildeten Plaques beeinflussen, da die Diffusion der Phagen innerhalb des Agars von dessen Viskosität abhängt. Bei geringeren Agarkonzentrationen wird die Ausbildung größerer Plaques erfolgen als unter Verwendung höherer Agarkonzentrationen. [122] Dementsprechend müssen für ein standardisiertes Phagogramm nicht nur Bakterienkonzentrationen und -volumina sondern auch die Verwendung von kommerziell verfügbaren, einheitlichen Agarplatten festgelegt werden. Dies ist im bisher in Studien angewandten Spot Test nicht gegeben. [75–78] Die Variabilität in der Durchführung des Spot Tests ohne einheitlich festgelegte Standards birgt ein hohes Risiko für Messungenauigkeiten von Phagenspezifitätstestungen. Durch den in dieser Arbeit beschriebenen standardisierten Aufbau können diese Ungenauigkeiten reduziert werden.

Die Verwendung von unbeschickten Testplättchen als Trägermaterial für die Phagensuspension resultierte bei den getesteten Phagenstämmen in der Ausbildung kreisrunder Lysezonen im Vergleich zum Spot Test, bei dem sich zum Teil unregelmäßig geformte Lysezonen ausbilden. Insbesondere im Hinblick auf mögliche Folgeuntersuchungen mit Bestimmung des Durchmessers zu Erhebungen im Rahmen einer Qualitätssicherung erscheinen regelmäßig runde Formen geeigneter als die unregelmäßigen

DISKUSSION

Konturen der Lysezonen beim direkten Auftragen der Phagensuspension. In dieser besseren Beurteilbarkeit kann deshalb ein Vorteil des Phagogramms gegenüber dem Spot Test gesehen werden. Perspektivisch wären bereits mit Phagen beschickte Testplättchen, wie sie in der Antibiotikatestung eingesetzt werden, erstrebenswert. Allerdings bestehen hier noch diverse Herausforderungen was Haltbarkeit, Galenik und Konzentrationskonstanz anbelangt.

Wird direkt eine hohe Konzentration an Phagen appliziert, können theoretisch alle Bakterien infiziert und lysiert werden. Bei einer geringeren Phagenkonzentration wird primär nur ein Teil der Bakterien infiziert, lysiert und neue Phagen gebildet. Trotzdem muss eine bestimmte Bakteriendichte mindestens vorhanden sein, damit die Replikation der Phagen stattfinden kann. [123]

In den Versuchen dieser Arbeit wurde mit Phagenkonzentrationen von 10^8 bis 10^9 PFU/ml gearbeitet. Dies entspricht in etwa den Konzentrationen, welche in Fallstudien zur Therapie mit Phagen angewendet wurden. [124–126] Somit ist davon auszugehen, dass die im Phagogramm erzielten Ergebnisse eine fundierte Übertragbarkeit für die in vivo Anwendung bieten können. In der PhagoBurn Studie erwiesen sich auch niedriger konzentrierte Phagensuspensionen hinsichtlich der Infektion und Lyse von Bakterien als effektiv. [66]

Eine weitere Möglichkeit, die einzusetzenden Konzentrationen von Bakterien- und Phagensuspensionen festzulegen, ist die Verwendung der Multiplicity Of Infection (MOI). Um eine Infektion möglichst vieler Bakterien einer Kultur zu erreichen, wird häufig eine MOI von 10 angestrebt. [82] Da in dieser Arbeit der Fokus auf einem zeit- und arbeitssparenden diagnostischen Verfahren lag und die Wirkung der Phagen eher qualitativ statt quantitativ untersucht werden sollte, wurden Phagen und Bakterien in zu Beginn festgelegten Konzentrationen verwendet, ohne dass jede Phagen-Bakterien-Kombination nach einer festgelegten MOI untersucht wurde.

Nach Auswertung der Vorversuche wurden die Arbeitsschritte zur Anlegung eines Phagogramms für die schnelle Spezifitätstestung im Hauptversuch festgelegt. In diesen Versuchen zur Implementierung einer schnellen Phagenspezifitätstestung konnte gezeigt werden, dass das Ablesen der Phagogramme mit den getesteten Phagen- und Bakterienstämmen innerhalb eines Arbeitstages von acht Stunden möglich ist. Zwar

DISKUSSION

erfolgte die Ablesung der Proben analog zur schnellen Sensibilitätstestung von Bakterien gegenüber Antibiotika, jedoch bestanden relevante Unterschiede in der Durchführung der Testung. Während beim rAST Nativmaterial aus positiven Blutkulturen entnommen und unverdünnt auf die Agarplatten gegeben wird [28], wurde für die schnelle Phagenspezifitätstestung zunächst eine Übernachtskultur des Bakterienstamms angelegt und dieser dann in NaCl(0,85 %)-Lösung verdünnt ausplattiert. Die Ablesung einer Testung ist nur bei suffizient gewachsenem Bakterienrasen möglich. Dieses Wachstum ist unter konstanten Wachstumsbedingungen maßgeblich von der Teilungsrate der Bakterien abhängig. Auch für die Phagenspezifitätstestung scheint die direkte Inokulation der Agarplatten mit positivem Blutkulturmaterial oder anderen primär sterilen Materialien wie beispielsweise Gelenkpunktaten möglich, um die Zeit bis zum Ergebnis einer lytischen Phagenaktivität weiter zu verkürzen. Diab et al verglichen in einer Studie den herkömmlichen Plättchendiffusionstest mit vorheriger Anzucht der Bakterienkultur auf Agarplatten mit der direkten Inokulation der Platten aus Blutkulturen. Bei gleichem zeitlichem Arbeitsaufwand waren die Ergebnisse beim AST nach 35-48 h und beim rAST nach 19-24 h verfügbar. [127]

Neben MH Agar wird der Plättchendiffusionstest von EUCAST für bestimmte Spezies auch auf anderen Festnährmedien empfohlen. Beispielsweise soll die Testung von Streptokokken der Gruppen A, B, C und G auf MH-F Agar durchgeführt werden. Gleiches gilt für die Testung von *Haemophilus influenzae*. Anaerobier wie *Bacteroides sp.* benötigen Fastidious Anaerobic Agar (FAA) zur Sensibilitätstestung. EUCAST führt Tabellen mit klinischen Breakpoints zur Auswertung der Antibiogramme unter der Verwendung des jeweils für das Bakterium geeigneten Agar. [128] Die Phagogramme dieser Arbeit wurden für alle verwendeten Bakterien auf MH Agar durchgeführt. Auch wenn für *E. faecalis* nicht empfohlen, wurde die Spezifitätstestung des *Enterococcus* Phagen zusätzlich auf MH-F Agar durchgeführt. So konnte gezeigt werden, dass dieser ebenfalls für die Phagenspezifitätstestung geeignet ist und sogar früher eine Lyse detektierbar war als auf dem MH Agar. Die Phagenspezifitätstestung an den von EUCAST empfohlenen Spezies wie *Haemophilus influenzae* mit entsprechenden Phagen auf MH-F Agar bleibt noch zu untersuchen ebenso wie die Testung unter Verwendung anderer Nährmedien wie FAA.

DISKUSSION

Die Auswertung der Phagenspezifitätstestung erfolgte durch Kategorisierung der Beobachtungen in „Keine Lyse“, „Fragliche Lyse“, „Sichtbare Lyse“ und „gut sichtbare Lyse“, bzw. binärisiert in „beurteilbare Lyse“ und „nicht beurteilbare Lyse“. In anderen Studien wurde ebenfalls eine pragmatische Kategorisierung der Lyse vorgenommen. Merabishvili et al. beispielsweise legte die Kategorien „konfluente Lyse“, „blickdichte Lyse“, „semikonfluente Lyse“ und „negative Reaktion“ fest. [106] Bei Chang et al. erfolgt die Einteilung der Lyse in „klar“, „trüb“ und „keine Reaktion“. [75] Um die Reproduzierbarkeit bei der Ablesung und Auswertung des Phagogramms zu verbessern, müsste ein einheitlicher Leitfaden entworfen werden, wie ihn EUCAST für das AST zur Verfügung stellt.

Die Reduktion der Dauer der mikrobiologischen Diagnostik und somit ein früherer Beginn einer gezielten antimikrobiellen Therapie ist insbesondere im Hinblick auf das Überleben beispielsweise septischer Patienten entscheidend. Mehrere Studien zeigen eine Korrelation zwischen einer angemessenen antimikrobiellen Erstbehandlung und einer steigenden Überlebensrate. Im Gegensatz dazu sinkt die Überlebensrate bei inadäquater Ersttherapie oder verzögertem Beginn einer wirksamen Behandlung. [129–132] In einer klinischen Studie von 2022 zur Auswirkung der beschleunigten gegenüber der konventionellen Sensitivitätstestung auf die Therapie einer Sepsis mit gramnegativen Bakterien zeigte sich eine bis zu 24 Stunden frühere Umstellung von einem unwirksamen auf ein wirksames Antibiotikum. Eine geringere Mortalität in der rAST-Gruppe wurde detektiert, war jedoch nicht signifikant. Größere Studien wären notwendig, um die Auswirkung einer früheren gezielteren antibiotischen Therapie hinsichtlich der Resistenzbildungen im Vergleich zu einer um 24 Stunden verzögerten Therapieanpassung zu untersuchen. [133] Hinsichtlich der Nebenwirkungen erscheint eine frühere Umstellung der breiten empirischen auf eine gezielte antibiotische Therapie zusätzlich von Vorteil. Gouliouris et al. beschrieben in ihrer Studie von 2018 eine Zunahme des Risikos einer Bakteriämie mit Vancomycin resistenten Enterokokken (VRE) je länger eine intravenöse Antibiose mit Vancomycin, Meropenem oder einem Fluorchinolon erfolgte. [134] Es stellt sich die Frage, ob eine zeitlich verkürzte mikrobiologische Phagenspezifitätstestung auch zu einem früheren Therapiebeginn führen würde, beziehungsweise ob die schnelle Verfügbarkeit von Phagenpräparaten zur Therapieanwendung in Europa gegeben ist. Patienten, die für eine Phagentherapie in

DISKUSSION

Deutschland infrage kommen, stellen eine kritisch kranke Klientel dar. Insbesondere für diese Gruppe wäre eine frühestmögliche Therapie erfolgversprechend und somit erstrebenswert. Zur Behandlung bakterieller Infektionen mit antibiotikaresistenten Keimen wird in fortlaufend wachsendem Umfang eine Vielzahl verschiedener und gut charakterisierter Phagen vonnöten sein. Dem kann durch die Etablierung großer Sammlungen zuvor in klinischen Studien getesteter Phagen nachgekommen werden. Eine Erweiterung der Phagensammlungen, stets überprüft in klinischen Studien, müsste kontinuierlich erfolgen, um schnell auf eine therapeutische Alternative bei schwer therapierbaren Infektionen, z. B. durch multiresistente Erreger, zurückgreifen zu können. [76]. Bisher sind größere Phagensammlungen in Bern und Zürich (Schweiz), Brüssel (Belgien), Tbilisi (Georgien), Novosibirsk (Russland), Braunschweig (Deutschland), Helsinki (Finnland) und Quebec (Kanada) vorhanden [135] und dementsprechend ist eine flächendeckende schnelle Verfügbarkeit von Phagen nicht gegeben.

Das Projekt PhagoFlow untersucht die infrastrukturellen Gegebenheiten im Hinblick auf die Praktikabilität von Selektion und Vermehrung von Phagen sowie Herstellung patientenindividueller Phagenpräparate in der Krankenhausapotheke zur Behandlung von Wundinfektionen. [72] Eine zeitliche Verkürzung der Spezifitätstestung beispielsweise durch die Verwendung von Nativmaterial wie beim rAST wäre insbesondere dann sinnvoll, wenn auch die Verfügbarkeit von therapeutischen Phagen ausgebaut und verbessert wird. Als Alternative zum individualisierten Therapieansatz besteht die Möglichkeit zur Nutzung von „Ready-to-use“-Phagencocktails. Wenn diese zeitnah zur Verfügung stünden, wäre die notwendige Keimbestimmung inklusive Phagenspezifitätstestung des Cocktails gegenüber dem Patientenisolat vor Therapiebeginn der limitierende Zeitfaktor. Im Gegensatz zur antibiotischen Therapie, die auch regelhaft kalkuliert ohne vorangehende Testung indiziert sein kann, wird die Notwendigkeit einer Phagentestung vor Therapiebeginn aufgrund der spezifischen Wirkung von Phagen und dem folglich schmalen Wirkspektrums bestehen bleiben. [47]

Ein weiteres Hindernis auf dem Weg zur Etablierung der Phagentherapie in Deutschland ist die fehlende Einordbarkeit von Phagen in bestehende Richtlinien und Gesetze. Bisher gibt es keine Passage zur Herstellung oder zum Umgang mit Bakteriophagen im Arzneimittelbuch für Deutschland. [136] Die therapeutische Anwendung von

DISKUSSION

Bakteriophagen entspricht einer personalisierten Therapie, bei der hochspezifische Phagencocktails verwendet werden. Bei diesen für den Patienten individuell zubereiteten Formulierungen kann nicht immer im Vorfeld eine Aussage über das Wirkungs-/Nebenwirkungsprofil getroffen werden aufgrund fehlender klinischer Studien für jeden Phagen und jede Indikation. Die Isolation, Charakterisierung und Aufbereitung der jeweiligen Phagen für die Anwendung erfüllen die Kriterien eines industriellen Prozesses. Deshalb liegen Phagentherapeutika am ehesten zwischen magistralen Rezepturen und industriell hergestellten Arzneimitteln. [137] Phagentherapeutika müssten vor der klinischen Anwendung GMP-konform aufbereitet werden, um gleichbleibende Qualitätsstandards bei der Produktion zu gewährleisten. Dies beinhaltet alle Details des Herstellungsprozesses wie beispielsweise die Zusammensetzung des Nährmediums, aber auch die Methoden zur Überprüfung der Wirksamkeit. [138–140] Für einen zeitkritischen individualisierten Therapieansatz ist dieses Vorgehen nicht praktikierbar, sodass entsprechende Regelungen im Arzneimittelbuch wünschenswert wären.

Bisher erfolgte mit dem vorgestellten Phagogramm nur die Testung einer limitierten Anzahl Phagen und den jeweiligen Referenzwirten. Die Testung weiterer Kombinationen ist wünschenswert sowie die Phagenspezifitätstestung an Patientenisolaten. So könnten wichtige Informationen zur Praktikabilität des Phagogramms bei nicht optimalen Bedingungen und zur Interaktion zwischen Phagen und Wirt gewonnen werden. Bisher weist das Phagogramm eine stattgehabte Lyse an einem Bakterienstamm durch die verwendete Phagenlösung in-vitro nach, kann deshalb aber noch keinen therapeutischen Erfolg prognostizieren. Deshalb müsste insbesondere im Rahmen klinischer Therapiestudien der Zusammenhang zwischen in-vitro Diagnostikergebnis und klinischem Outcome untersucht werden. In den bisherigen klinischen Studien wurde diese Korrelation zwischen Lysezone und klinischem Outcome nicht standardisiert untersucht.

Die Versuche zur schnellen Spezifitätstestung der ausgewählten Phagenstämme gegenüber ihren Wirtsbakterienstämmen erfolgten mit je drei biologischen und drei technischen Replikaten. Aufgrund der nur sehr geringen Abweichungen zwischen den Replikaten ist die Spezifitätstestung in dieser Form als robust anzusehen. Die geringen Unterschiede in den biologischen Replikaten könnten durch die Beeinflussung der Phagen von Umweltfaktoren wie Temperatur, UV-Licht und Ionenkonzentrationen begründet werden.

DISKUSSION

Tey et al. wiesen in ihrer experimentellen Arbeit den Einfluss von pH-Wert und Temperatur auf die Eigenschaften des M13 Phagen mit dem Wirtsbakterium *E. coli* nach. [141] Rountree beschrieb die Wirkung divalenter Kationen wie beispielsweise Calcium auf die Adhäsion von Phagen an Bakterien. [142] Zwar sind in diesen Versuchen verwendete Phagen relativ stabil gegenüber diesen Umwelteinflüssen, trotzdem könnte dieser Umstand die gering abweichenden Ergebnisse zwischen den biologischen Replikaten erklären. [42] Nicht nur Phagen zeigen Änderungen ihrer Wirkungsweise in Abhängigkeit von exogenen Faktoren. Auch bei Bakterien wurden in Stresssituationen Veränderungen beobachtet. Beispielsweise können Temperatur- oder pH-Wertveränderungen auch das Bakterienwachstum beeinflussen. [65, 143, 144] Auch Änderungen der Nährstoffkonzentration in der Umgebung der Bakterien wirken sich auf deren Wachstumsrate aus. [145, 146]

Im Hinblick auf die Standardisierung des Phagogramms muss die Ablesung der Testergebnisse durch nur eine Person kritisch hinterfragt werden. Im Paper von Matuschek et al. über die Entwicklung des Plättchendiffusionstests nach EUCAST zur Anfertigung eines AST wurde das Ablesen der Hemmhöhe als die schwierigste Variable zur Standardisierung angegeben. Zwar wird durch Vermessung des Hemmhofdurchmessers eine objektivierbare Größe geschaffen, die Inspektion der Zonenränder und die Beurteilung des Bakterienrasens bleibt jedoch eine Variable in Abhängigkeit der Beobachter. [21] Die Phagentestung in der hier vorgestellten Form ist eher eine qualitative Testung. Es wird nur zwischen vorhandener und nicht vorhandener Lyse unterschieden. Die Durchmesser der Lysezonen sind dabei bisher nicht bedeutsam. Im Gegensatz dazu ist die Plättchen-basierte Sensibilitätstestung nach Kirby und Bauer semiquantitativ, da hier anhand der Hemmhofdurchmesser die Sensibilität der Bakterien gegenüber entsprechenden Antibiotika bestimmt wird. [115] Im Hinblick auf das hier vorgestellte Phagogramm würde die Auswertung durch mehrere Untersucher, eventuell unterschiedlicher Qualifikationslevel, zur weiteren Standardisierung beitragen.

Für die Nutzung der synergistischen Wirkung von Phagen und Antibiotika muss auch eine Erweiterung der mikrobiologischen Diagnostik in diesem Bereich erfolgen. Bisherige Versuche zu dieser Synergie wiesen vergrößerte Lysezonen entweder auf Agarplatten nach oder untersuchten die lytischen Eigenschaften in Kinetic Assays. [60, 147]

DISKUSSION

Nachweismethoden für die synergistische Wirkung mehrerer Antibiotika bestehen bereits. [148, 149] Die Beschichtung von Trägern, beispielsweise Testplättchen wie sie in den Versuchen dieser Arbeit verwendet wurden, würde die diagnostischen Arbeitsabläufe erleichtern und wäre ein weiterer Schritt in Richtung eines standardisierten, Untersucherunabhängigen Phagogramms oder sogar einer standardisierten Synergietestung von Phagen und Antibiotika.

Im Bereich Medizinischer Laboratoriumsdiagnostik wird eine Akkreditierung durch die Deutsche Akkreditierungsstelle (DAkkS) basierend auf der DIN EN ISO 15189 durchgeführt. Da viele Entscheidungen in der Patientenversorgung auf Grundlage der Ergebnisse der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik getroffen werden, ist es umso wichtiger, dass diese kompetent durchgeführt wird. [150] Insbesondere im Hinblick auf eine zukünftige Akkreditierbarkeit eines Phagogramms müssen möglichst viele Arbeitsschritte einheitlich und Untersucherunabhängig sein. Auf Basis des hier entwickelten Phagogramms inklusive Durchführung mit verkürzter Ablesezeit wäre eine Akkreditierung der Phagenspezifitätstestung in Zukunft denkbar.

5 Zusammenfassung

Aufgrund der wachsenden Bedrohung durch multiresistente Keime rückt die Therapie mit Phagen in den Vordergrund der aktuellen antimikrobiellen Forschung. Durch die hohe Spezifität der Phagen gegenüber Bakterien und damit schmalen Wirtsspektrums ist die Spezifitätstestung vor Therapiebeginn essentiell. Während in der Routinediagnostik mikrobiologischer Labore Verfahren zur Sensibilitätstestung von Bakterien gegenüber Antibiotika existieren, fehlen diese für die Testung von Phagen. Ziel dieser Arbeit war es, im Rahmen einer Machbarkeitsstudie ein Verfahren zur schnellen Spezifitätstestung von Phagen in Anlehnung an die Methodik zur schnellen Antibiotika-Sensibilitätstestung nach EUCAST zu entwickeln. Dazu wurden Phagogramme von sieben verschiedenen Phagen-Wirtskombinationen erstellt und nach verkürzter Inkubationszeit ausgewertet. Alle Proben konnten innerhalb von acht Stunden und somit innerhalb eines Arbeitstages hinsichtlich einer erfolgten Lyse beurteilt werden. Eine Korrelation der *in-vitro* Ergebnisse mit dem klinischen Outcome nach Phagentherapie bleibt Gegenstand zukünftiger Studien. Auch die kombinierte Testung von Phagen und Antibiotika bleibt zu untersuchen. Die im Rahmen der Pilotversuche gezeigten Versuchsbedingungen und -abläufe können die Grundlage für diese zukünftigen Projekte darstellen.

Diese Arbeit beschreibt erstmalig ein Phagogramm mit verkürzter Ablesezeit und trägt zur methodischen Entwicklung eines Verfahrens bei, welches standardisiert und mit bestehenden Ressourcen in allen Routinelaboren, in denen auch das rAST etabliert ist, durchführbar und perspektivisch damit auch akkreditierbar ist.

6 Anhang

6.1 Danksagung

Ich danke PD Dr. Philipp Warnke und Dr. Romy Skusa vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene für die Betreuung während der Promotion. PD Dr. Justus Groß danke ich für den Anstoß, sich mit Bakteriophagen zu beschäftigen. Für die Einführung in die Phagenforschung und die Techniken danke ich Dr. Christine Rohde und Dr. Johannes Wittmann vom DSMZ Braunschweig. Mein Dank gilt ebenso Dipl. Ing. Yvonne Humboldt vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Julia Wilking von der Biobank Rostock, PD Dr. Glass vom Institut für Biostatistik und Informatik in Medizin und Altersforschung und Dr. Thomas Eickner. Zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden für die aufmunternden und motivierenden Worte und die Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

6.2 Veröffentlichungen

Aus dieser Arbeit hervorgegangene Veröffentlichungen:

- I. Skusa, Romy; Groß, Justus; **Kohlen, Juliane**; Schafmayer, Clemens; Ekat, Katharina; Podbielski, Andreas; Warnke, Philipp (2022): Proof-of-Concept Standardized Approach Using a Single-Disk Method Analogous to Antibiotic Disk Diffusion Assays for Routine Phage Susceptibility Testing in Diagnostic Laboratories. In: Applied and environmental microbiology 88 (23), e0030922. DOI: 10.1128/aem.00309-22.
- II. Skusa, Romy; **Kohlen, Juliane**; Podbielski, Andreas; Warnke, Philipp (2023): Introducing “Rapid phage susceptibility testing” (RPST): an accelerated lytic phage activity test for routine diagnostic laboratories within eight hours. In: Diagnostic microbiology and infectious disease 107 (4), S. 116054. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2023.116054.

Weitere Veröffentlichungen:

- I. Christian Helbig, Anja Wollny, Attila Altiner, Annette Diener, **Juliane Kohlen**, Manuela Ritzke, Stefanie Frech, Rudolf F Guthoff: Treatment Complexity in Primary Open-Angle Glaucoma (POAG): Perspectives on Patient Selection in Micro-Invasive Glaucoma Surgery (MIGS) Using Stents. Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde 2021 Mar;238(3):302-310. DOI: 10.1055/a-1241-4489. Epub 2020 Nov 30.
- II. Simon Junghans, Sebastian V Rojas, Romy Skusa, Anja Püschel, Eberhard Grambow, **Juliane Kohlen**, Philipp Warnke, Jan Gummert, Justus Gross: Bacteriophages for the Treatment of Graft Infections in Cardiovascular Medicine. Antibiotics (Basel) 2021 Nov 25;10(12):1446. DOI: 10.3390/antibiotics10121446

6.3 Thesen

1. Die Zunahme an Antibiotikaresistenzen in den letzten Jahren und konsekutive Einschränkungen in der Auswahl antibiotischer Therapien stellt eine erstzunehmende Bedrohung für die Bevölkerung dar.
2. Durch fehlende Einführungen neuer Antibiotika steht die Therapie mit Bakteriophagen als Alternative oder Ergänzung im Fokus der aktuellen Forschung.
3. Aufgrund der hohen Wirtsspezifität der Phagen ist eine prätherapeutische Spezifitätstestung essentiell.
4. Da ein rascher Therapiebeginn insbesondere bei septischen Patienten mit einer höheren Überlebenschance korreliert, muss eine Testung idealerweise innerhalb möglichst kurzer Zeit erfolgen.
5. Standardisierte und akkreditierte Verfahren wie die Sensibilitätstestung nach der EUCAST-Methodik bei der Antibiotikatherapie existieren für die Phagenspezifitätstestung nicht.
6. Bisher angewandte Verfahren zur Phagentestung wie der Spot Test und EOP-Bestimmung erscheinen aufgrund des hohen Zeit- und Arbeitsaufwands sowie der Diversität an in der Literatur aufgeführten Durchführungen nicht geeignet für die standardisierte Phagenspezifitätstestung.
7. In dieser Arbeit entworfene Phagogramme sind einfach handhabbar, in jedem Labor der mikrobiologischen Routinediagnostik durchführbar und innerhalb eines Arbeitstages auswertbar.
8. In zukünftigen Studien muss die Anwendbarkeit des Phagogramms im klinischen Kontext und die Testung mit weiteren Phagen-Wirtskombinationen sowie Patientenisolaten untersucht werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Westphal JF, Vetter D, Brogard JM. Hepatic side-effects of antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1994; 33: 387–401
2. Willmann M, Vehreschild MJGT, Biehl LM, et al. Distinct impact of antibiotics on the gut microbiome and resistome: a longitudinal multicenter cohort study. *BMC Biology* 2019; 17
3. Willmann M, El-Hadidi M, Huson DH, et al. Antibiotic Selection Pressure Determination through Sequence-Based Metagenomics. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2015; 59: 7335–7345
4. Pirisi A. Phage therapy--advantages over antibiotics? *The Lancet* 2000; 356: 1418
5. NobelPrize.org. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1945. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1945/fleming/lecture/> (letzter Zugriff am: 28.03.2022)
6. BARBER M, WHITEHEAD JEM. Bacteriophage types in penicillin-resistant staphylococcal infection. *British medical journal* 1949; 2: 565–569
7. Spink WW, Vivino JJ. SULFONAMIDE-RESISTANT STAPHYLOCOCCI: CORRELATION OF IN VITRO SULFONAMIDE-RESISTANCE WITH SULFONAMIDE THERAPY. *The Journal of clinical investigation* 1944; 23: 267–278
8. PLOUGH HH. Penicillin resistance of *Staphylococcus aureus* and its clinical implications. *American journal of clinical pathology* 1945; 15: 446–451
9. Barber M, Rozwadowska-Dowzenko M. INFECTION BY PENICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCI. *The Lancet* 1948; 252: 641–644
10. Spellberg B, Gilbert DN. The future of antibiotics and resistance: a tribute to a career of leadership by John Bartlett. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2014; 59 Suppl 2: S71-5
11. Bartlett JG, Gilbert DN, Spellberg B. Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2013; 56: 1445–1450
12. Finland M, Kirby WM, Chabbert YA, et al. Round table: are new antibiotics needed? *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1965; 5: 1107–1114
13. Talbot GH, Bradley J, Edwards JE, Gilbert D, Scheld M, Bartlett JG. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2006; 42: 657–668
14. Spellberg B, Guidos R, Gilbert D, et al. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2008; 46: 155–164
15. Doron S, Davidson LE. Antimicrobial stewardship. *Mayo Clinic Proceedings* 2011; 86: 1113–1123
16. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the

LITERATURVERZEICHNIS

- European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *The Lancet Infectious Diseases* 2019; 19: 56–66
17. Murray CJL, Ikuta KS, Sharara F, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet* 2022; 399: 629–655
 18. RKI - Antibiotikaresistenz - Neue Zahlen zu Krankheits-last und Todes-fällen durch antibiotika-resistente Erreger in Europa. https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Antibiotikaresistenz/Uebersichtsbeitraege/AMR_Europa.html (letzter Zugriff am: 03.03.2022)
 19. Hintergrund - Nationales Antibiotika-Sensitivitätstest-Komitee (NAK). <https://www.nak-deutschland.org/nak-deutschland/hintergrund.html> (letzter Zugriff am: 15.11.2021)
 20. 1.2 Automatisierung in der Mikrobiologie (Identifizierung und antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung). In: Neumeister B (Hrsg.). *Mikrobiologische Diagnostik*. Stuttgart, New York, NY: Thieme, 2009
 21. Matuschek E, Brown DFJ, Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2014; 20: O255-66
 22. Robert Koch-Institut. EUCAST-Neudefinition der Kategorie „I“ – zum Umgang hinsichtlich der Meldepflicht 2019
 23. EUCAST. EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing. https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology
 24. Neumeister, B, Geiss, HK, Braun, R, Kimmig, P (Hrsg.). *Mikrobiologische Diagnostik*. Stuttgart: Thieme, 2009
 25. Felmingham D, Brown DF. Instrumentation in antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2001; 48 Suppl 1: 81–85
 26. Ericsson HM, Sherris JC. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. Section B: Microbiology and immunology* 1971; 217: Suppl 217:1+
 27. Ha J, Hong SK, Han GH, Kim M, Yong D, Lee K. Same-Day Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria in Positive Blood Culture Broths Using Short-Term Incubation on Solid Medium with the MicroFlex LT, Vitek-MS, and Vitek2 Systems. *Annals of Laboratory Medicine* 2018; 38: 235–241
 28. 2008, ESCMID - European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. EUCAST: Rapid AST in bloodcultures. https://www.eucast.org/rapid_ast_in_blood_cultures/ (letzter Zugriff am: 24.02.2022)
 29. Hankin ME. L'action bactéricide des eaux de la Jumna et du Gange sur le microbe du choléra. *Annales de l'Institut Pasteur* 1896: 511–523
 30. Gamaleya, NF. Bacteriolysins-ferments destroying bacteria: 607–613
 31. Twort FW. AN INVESTIGATION ON THE NATURE OF ULTRA-MICROSCOPIC VIRUSES. *The Lancet* 1915; 186: 1241–1243

LITERATURVERZEICHNIS

32. D'Herelle F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de L'Academie des sciences 1917: 373–375
33. D'Herelle F. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. 1917. Research in microbiology 2007; 158: 553–554
34. institute. History - institute. <http://eliava-institute.org/about/?lang=en> (letzter Zugriff am: 15.02.2022)
35. Parfitt T. Georgia: an unlikely stronghold for bacteriophage therapy. The Lancet 2005; 365: 2166–2167
36. Cisek AA, Dąbrowska I, Gregorczyk KP, Wyżewski Z. Phage Therapy in Bacterial Infections Treatment: One Hundred Years After the Discovery of Bacteriophages. Current microbiology 2017; 74: 277–283
37. Fauconnier A. Phage Therapy Regulation: From Night to Dawn. Viruses 2019; 11
38. Stone R. Bacteriophage therapy. Stalin's forgotten cure. Science (New York, N.Y.) 2002; 298: 728–731
39. Summers WC. The strange history of phage therapy. Bacteriophage 2012; 2: 130–133
40. Heller KJ, Loessner MJ, Fieseler L. Bakteriophagen. Hamburg: Behr, 2011
41. Klaus S, Krüger DH, Meyer J. Bakterienviren. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag Jena, 1992
42. Fernández L, Gutiérrez D, García P, Rodríguez A. The Perfect Bacteriophage for Therapeutic Applications-A Quick Guide. Antibiotics (Basel, Switzerland) 2019; 8
43. Brives C, Pourraz J. Phage therapy as a potential solution in the fight against AMR: obstacles and possible futures. Palgrave Commun 2020; 6
44. Torres-Barceló C. The disparate effects of bacteriophages on antibiotic-resistant bacteria. Emerging microbes & infections 2018; 7: 168
45. Harper DR, Enright MC. Bacteriophages for the treatment of Pseudomonas aeruginosa infections. Journal of applied microbiology 2011; 111: 1–7
46. Dubey K, Chandraker S, Sao S, Gupta A, Dubey SK. Bacteriophages as an Antibacterial Agent: A Promising Alternative. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci 2016; 5: 231–234
47. Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B, Delattre A-S, Lavigne R. Learning from bacteriophages - advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. Current Protein & Peptide Science 2012; 13: 699–722
48. Ruiz J, Castro I, Calabuig E, Salavert M. Non-antibiotic treatment for infectious diseases. Revista espanola de quimioterapia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Quimioterapia 2017; 30 Suppl 1: 66–71
49. Pirnay J-P, Vos D de, Verbeken G, et al. The phage therapy paradigm: prêt-à-porter or sur-mesure? Pharmaceutical research 2011; 28: 934–937
50. Chadha P, Katare OP, Chhibber S. In vivo efficacy of single phage versus phage cocktail in resolving burn wound infection in BALB/c mice. Microbial pathogenesis 2016; 99: 68–77
51. Gu J, Liu X, Li Y, et al. A method for generation phage cocktail with great therapeutic potential. PloS one 2012; 7: e31698

LITERATURVERZEICHNIS

52. Tanji Y, Shimada T, Yoichi M, Miyanaga K, Hori K, Unno H. Toward rational control of *Escherichia coli* O157:H7 by a phage cocktail. *Applied microbiology and biotechnology* 2004; 64: 270–274
53. Fischer S, Kittler S, Klein G, Glünder G. Impact of a single phage and a phage cocktail application in broilers on reduction of *Campylobacter jejuni* and development of resistance. *PloS one* 2013; 8: e78543
54. Hall AR, Vos D de, Friman V-P, Pirnay J-P, Buckling A. Effects of sequential and simultaneous applications of bacteriophages on populations of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in wax moth larvae. *Applied and environmental microbiology* 2012; 78: 5646–5652
55. Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature reviews. Microbiology* 2010; 8: 317–327
56. Koskella B, Brockhurst MA. Bacteria-phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities. *FEMS microbiology reviews* 2014; 38: 916–931
57. Goldfarb T, Sberro H, Weinstock E, et al. BREX is a novel phage resistance system widespread in microbial genomes. *The EMBO journal* 2015; 34: 169–183
58. Ofir G, Melamed S, Sberro H, et al. DISARM is a widespread bacterial defence system with broad anti-phage activities. *Nature microbiology* 2018; 3: 90–98
59. Cairns BJ, Timms AR, Jansen VAA, Connerton IF, Payne RJH. Quantitative models of in vitro bacteriophage-host dynamics and their application to phage therapy. *PLoS pathogens* 2009; 5: e1000253
60. Chan BK, Siström M, Wertz JE, Kortright KE, Narayan D, Turner PE. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific reports* 2016; 6: 26717
61. Scott AE, Timms AR, Connerton PL, El-Shibiny A, Connerton IF. Bacteriophage influence *Campylobacter jejuni* types populating broiler chickens. *Environmental microbiology* 2007; 9: 2341–2353
62. Gordillo Altamirano F, Forsyth JH, Patwa R, et al. Bacteriophage-resistant *Acinetobacter baumannii* are resensitized to antimicrobials. *Nature microbiology* 2021; 6: 157–161
63. Oechslin F, Piccardi P, Mancini S, et al. Synergistic Interaction Between Phage Therapy and Antibiotics Clears *Pseudomonas Aeruginosa* Infection in Endocarditis and Reduces Virulence. *The Journal of infectious diseases* 2017; 215: 703–712
64. Comeau AM, Tétart F, Trojet SN, Prère M-F, Krisch HM. Phage-Antibiotic Synergy (PAS): beta-lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth. *PloS one* 2007; 2: e799
65. Kim M, Jo Y, Hwang YJ, et al. Phage-Antibiotic Synergy via Delayed Lysis. *Applied and environmental microbiology* 2018; 84
66. Comm/rtd. Final Report Summary - PHAGOBURN (Evaluation of phage therapy for the treatment of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections (Phase I-II clinical trial)) | FP7 | CORDIS | European Commission. <https://cordis.europa.eu/project/id/601857/reporting/de> (letzter Zugriff am: 28.02.2022)

LITERATURVERZEICHNIS

67. Wright A, Hawkins CH, Anggård EE, Harper DR. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clinical otolaryngology : official journal of ENT-UK ; official journal of Netherlands Society for Oto-Rhino-Laryngology & Cervico-Facial Surgery* 2009; 34: 349–357
68. Sarker SA, Berger B, Deng Y, et al. Oral application of *Escherichia coli* bacteriophage: safety tests in healthy and diarrheal children from Bangladesh. *Environmental microbiology* 2017; 19: 237–250
69. Sarker SA, McCallin S, Barretto C, et al. Oral T4-like phage cocktail application to healthy adult volunteers from Bangladesh. *Virology* 2012; 434: 222–232
70. Leitner L, Ujmajuridze A, Chanishvili N, et al. Intravesical bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *The Lancet. Infectious diseases* 2021; 21: 427–436
71. ESKAPE | Deutsches Zentrum für Infektionsforschung. <https://www.dzif.de/de/glossar/eskape> (letzter Zugriff am: 19.02.2024)
72. PhagoFlow | Detaillierte Projektbeschreibung (letzter Zugriff am: 28.02.2022)
73. Phage4Cure | Entwicklung von Bakteriophagen als zugelassenes Medikament gegen bakterielle Infektionen. Entwicklung von Phagen als Arzneimittel | Phage4Cure. <https://phage4cure.de/de/projekt/> (letzter Zugriff am: 28.02.2022)
74. Harper, DR, Abedon, ST, Burrowes, BH, McConville, ML (Hrsg.). *Bacteriophages*. Cham: Springer International Publishing, 2021
75. Chang H-C, Chen C-R, Lin J-W, et al. Isolation and characterization of novel giant *Stenotrophomonas maltophilia* phage phiSMA5. *Applied and environmental microbiology* 2005; 71: 1387–1393
76. Khan Mirzaei M, Nilsson AS. Isolation of phages for phage therapy: a comparison of spot tests and efficiency of plating analyses for determination of host range and efficacy. *PloS one* 2015; 10: e0118557
77. Shirling EB, Speer M. Spot test method for rapid serological grouping of streptomycete bacteriophages. *Applied microbiology* 1967; 15: 456–457
78. Viscardi M, Perugini AG, Auriemma C, et al. Isolation and characterisation of two novel coliphages with high potential to control antibiotic-resistant pathogenic *Escherichia coli* (EHEC and EPEC). *International journal of antimicrobial agents* 2008; 31: 152–157
79. Daubie V, Chalhoub H, Blasdel B, et al. Determination of phage susceptibility as a clinical diagnostic tool: A routine perspective. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2022; 12: 1000721
80. Kutter E. Phage host range and efficiency of plating. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2009; 501: 141–149
81. Henry M, Biswas B, Vincent L, et al. Development of a high throughput assay for indirectly measuring phage growth using the OmniLog(TM) system. *Bacteriophage* 2012; 2: 159–167
82. Kasman LM, Kasman A, Westwater C, Dolan J, Schmidt MG, Norris JS. Overcoming the phage replication threshold: a mathematical model with implications for phage therapy. *Journal of virology* 2002; 76: 5557–5564

LITERATURVERZEICHNIS

83. 2008, ESCMID - European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. EUCAST: Methods. https://www.eucast.org/rapid_ast_in_blood_cultures/methods/ (letzter Zugriff am: 02.02.2022)
84. PD Warnke, P. Surveillancebericht für das Klinikum der Universitätsmedizin Rostock. Rostock
85. PD Warnke, P. Surveillancebericht für das Klinikum der Universitätsmedizin Rostock. Rostock
86. European Centre for Disease Prevention and Control. Assessing the health burden of infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU/EEA, 2016-2020
87. Goossens H, Ferech M, Vander Stichele R, Elseviers M. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet (London, England)* 2005; 365: 579–587
88. Dyar OJ, Huttner B, Schouten J, Pulcini C. What is antimicrobial stewardship? *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2017; 23: 793–798
89. Policy statement on antimicrobial stewardship by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA), the Infectious Diseases Society of America (IDSA), and the Pediatric Infectious Diseases Society (PIDS). *Infection control and hospital epidemiology* 2012; 33: 322–327
90. Grayson ML, Stewardson AJ, Russo PL, et al. Effects of the Australian National Hand Hygiene Initiative after 8 years on infection control practices, health-care worker education, and clinical outcomes: a longitudinal study. *The Lancet. Infectious diseases* 2018; 18: 1269–1277
91. Ojanperä H, Kanste OI, Syrjala H. Hand-hygiene compliance by hospital staff and incidence of health-care-associated infections, Finland. *Bulletin of the World Health Organization* 2020; 98: 475–483
92. Aiello AE, Coulborn RM, Perez V, Larson EL. Effect of hand hygiene on infectious disease risk in the community setting: a meta-analysis. *American journal of public health* 2008; 98: 1372–1381
93. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG. Bacteriophage therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2001; 45: 649–659
94. DOERMANN AH. Lysis and Lysis Inhibition with *Escherichia coli* Bacteriophage. *Journal of bacteriology* 1948; 55: 257–276
95. DELBRUCK M. Bacterial viruses or bacteriophages. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 1946; 21: 30–40
96. HERSHEY AD. Nucleic acid economy in bacteria infected with bacteriophage T2. *The Journal of general physiology* 1953; 37: 1–23
97. HERSHEY AD, DIXON J, CHASE M. Nucleic acid economy in bacteria infected with bacteriophage T2. I. Purine and pyrimidine composition. *The Journal of general physiology* 1953; 36: 777–789
98. HERSHEY AD, CHASE M. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *The Journal of general physiology* 1952; 36: 39–56

LITERATURVERZEICHNIS

99. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Details. <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-4505> (letzter Zugriff am: 07.04.2022)
100. Sarker SA, Sultana S, Reuteler G, et al. Oral Phage Therapy of Acute Bacterial Diarrhea With Two Coliphage Preparations: A Randomized Trial in Children From Bangladesh. *EBioMedicine* 2016; 4: 124–137
101. Febvre HP, Rao S, Gindin M, et al. PHAGE Study: Effects of Supplemental Bacteriophage Intake on Inflammation and Gut Microbiota in Healthy Adults. *Nutrients* 2019; 11
102. Rose T, Verbeken G, Vos D de, et al. Experimental phage therapy of burn wound infection: difficult first steps. *International Journal of Burns and Trauma* 2014; 4: 66–73
103. Rhoads DD, Wolcott RD, Kuskowski MA, Wolcott BM, Ward LS, Sulakvelidze A. Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. *Journal of wound care* 2009; 18: 237-8, 240-3
104. Ooi ML, Drilling AJ, Morales S, et al. Safety and Tolerability of Bacteriophage Therapy for Chronic Rhinosinusitis Due to *Staphylococcus aureus*. *JAMA otolaryngology-- head & neck surgery* 2019; 145: 723–729
105. Bruttin A, Brüßow H. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2005; 49: 2874–2878
106. Merabishvili M, Pirnay J-P, Verbeken G, et al. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PloS one* 2009; 4: e4944
107. BERTANI G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 1951; 62: 293–300
108. Stachurska X, Roszak M, Jabłońska J, Mizielińska M, Nawrotek P. Double-Layer Agar (DLA) Modifications for the First Step of the Phage-Antibiotic Synergy (PAS) Identification. *Antibiotics (Basel, Switzerland)* 2021; 10
109. Kamal F, Dennis JJ. *Burkholderia cepacia* complex Phage-Antibiotic Synergy (PAS): antibiotics stimulate lytic phage activity. *Applied and environmental microbiology* 2015; 81: 1132–1138
110. Santos SB, Carvalho CM, Sillankorva S, Nicolau A, Ferreira EC, Azeredo J. The use of antibiotics to improve phage detection and enumeration by the double-layer agar technique. *BMC Microbiology* 2009; 9: 148
111. Loś JM, Golec P, Wegrzyn G, Wegrzyn A, Loś M. Simple method for plating *Escherichia coli* bacteriophages forming very small plaques or no plaques under standard conditions. *Applied and environmental microbiology* 2008; 74: 5113–5120
112. Kaur S, Harjai K, Chhibber S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* phage plaque size enhancement using sublethal concentrations of antibiotics. *Applied and environmental microbiology* 2012; 78: 8227–8233
113. Zhang G, Zhao Y, Paramasivan S, et al. Bacteriophage effectively kills multidrug resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates from chronic rhinosinusitis patients. *International forum of allergy & rhinology* 2018; 8: 406–414

LITERATURVERZEICHNIS

114. 2008, ESCMID - European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. EUCAST: Disk diffusion methodology. https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology/ (letzter Zugriff am: 24.02.2022)
115. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American journal of clinical pathology* 1966; 45: 493–496
116. Xue H, Kurokawa M, Ying B-W. Correlation between the spatial distribution and colony size was common for monogenetic bacteria in laboratory conditions. *BMC Microbiology* 2021; 21: 114
117. Cooper AL, Dean AC, Hinshelwood C. Factors affecting the growth of bacterial colonies on agar plates. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 1968; 171: 175–199
118. Zapata A, Ramirez-Arcos S. A comparative study of McFarland turbidity standards and the Densimat photometer to determine bacterial cell density. *Current microbiology* 2015; 70: 907–909
119. Warnke P, Warning L, Podbielski A. Some are more equal--a comparative study on swab uptake and release of bacterial suspensions. *PloS one* 2014; 9: e102215
120. You L, Yin J. Amplification and spread of viruses in a growing plaque. *Journal of theoretical biology* 1999; 200: 365–373
121. Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of bacteriophages using the small drop plaque assay system. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2009; 501: 81–85
122. Adams, MH (Hrsg.). *Bacteriophages*. New York, NY: Interscience Publishers, 1959
123. Payne RJ, Jansen VA. Understanding bacteriophage therapy as a density-dependent kinetic process. *Journal of theoretical biology* 2001; 208: 37–48
124. Exarchos V, Tkhilaishvili T, Potapov E, Starck C, Trampuz A, Schoenrath F. Successful bacteriophage treatment of infection involving cardiac implantable electronic device and aortic graft: a Trojan horse concept. *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology* 2020; 22: 597
125. Tkhilaishvili T, Winkler T, Müller M, Perka C, Trampuz A. Bacteriophages as Adjuvant to Antibiotics for the Treatment of Periprosthetic Joint Infection Caused by Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2019; 64
126. Mulzer J, Trampuz A, Potapov EV. Treatment of chronic left ventricular assist device infection with local application of bacteriophages. *European journal of cardiothoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 2020; 57: 1003–1004
127. Diab M, El-Damarawy M, Shemis M. Rapid identification of methicillin-resistant staphylococci bacteremia among intensive care unit patients. *The Medscape Journal of Medicine* 2008; 10: 126

LITERATURVERZEICHNIS

128. 2008, ESCMID - European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. eucast: Clinical breakpoints and dosing of antibiotics. https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (letzter Zugriff am: 16.02.2023)
129. Kumar A, Ellis P, Arabi Y, et al. Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest* 2009; 136: 1237–1248
130. Kollef MH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ. Inadequate antimicrobial treatment of infections: a risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *Chest* 1999; 115: 462–474
131. Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest* 2000; 118: 146–155
132. Barenfanger J, Drake C, Leon N, Mueller T, Troutt T. Clinical and financial benefits of rapid detection of respiratory viruses: an outcomes study. *Journal of clinical microbiology* 2000; 38: 2824–2828
133. Anton-Vazquez V, Suarez C, Planche T. Impact of rapid susceptibility testing on antimicrobial therapy and clinical outcomes in Gram-negative bloodstream infections. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2022; 77: 771–781
134. Gouliouris T, Warne B, Cartwright EJP, et al. Duration of exposure to multiple antibiotics is associated with increased risk of VRE bacteraemia: a nested case-control study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2018; 73: 1692–1699
135. Moelling K, Broecker F, Willy C. A Wake-Up Call: We Need Phage Therapy Now. *Viruses* 2018; 10
136. Deutsches Arzneibuch 2022 Digital. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, 2022
137. Fauconnier A. Regulating phage therapy: The biological master file concept could help to overcome regulatory challenge of personalized medicines. *EMBO reports* 2017; 18: 198–200
138. Parracho HM, Burrowes BH, Enright MC, McConville ML, Harper DR. The role of regulated clinical trials in the development of bacteriophage therapeutics. *Journal of molecular and genetic medicine : an international journal of biomedical research* 2012; 6: 279–286
139. Bretaudeau L, Tremblais K, Aubrit F, Meichenin M, Arnaud I. Good Manufacturing Practice (GMP) Compliance for Phage Therapy Medicinal Products. *Frontiers in microbiology* 2020; 11: 1161
140. Withington R. Regulatory issues for phage-based clinical products. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2001; 76: 673–676
141. Tey BT, Ooi ST, Yong KC, Tan Ng MY, Ling TC, Tan WS. Production of fusion m13 phage bearing the di-sulphide constrained peptide sequence (C-WSFFSNI-C) that interacts with hepatitis B core antigen. *African Journal of Biotechnology* 2009: 268–273
142. ROUNTREE PM. The role of divalent cations in the multiplication of staphylococcal bacteriophages. *Journal of general microbiology* 1955; 12: 275–287
143. Presser KA, Ross T, Ratkowsky DA. Modelling the growth limits (growth/no growth interface) of *Escherichia coli* as a function of temperature, pH, lactic acid

LITERATURVERZEICHNIS

- concentration, and water activity. *Applied and environmental microbiology* 1998; 64: 1773–1779
144. Thomas LV, Wimpenny JW, Davis JG. Effect of three preservatives on the growth of *Bacillus cereus*, Vero cytotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, on plates with gradients of pH and sodium chloride concentration. *International journal of food microbiology* 1993; 17: 289–301
145. Nguyen J, Fernandez V, Pontrelli S, Sauer U, Ackermann M, Stocker R. A distinct growth physiology enhances bacterial growth under rapid nutrient fluctuations. *Nature communications* 2021; 12: 3662
146. Matsushita M, Fujikawa H. Diffusion-limited growth in bacterial colony formation. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* 1990; 168: 498–506
147. Chaudhry WN, Concepción-Acevedo J, Park T, Andleeb S, Bull JJ, Levin BR. Synergy and Order Effects of Antibiotics and Phages in Killing *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *PloS one* 2017; 12: e0168615
148. Banerjee R, Fernandez MG, Enthaler N, Graml C, Greenwood-Quaintance KE, Patel R. Combinations of ceftazidime plus other β -lactams are synergistic in vitro against community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 2013; 32: 827–833
149. Soltani R, Khalili H, Shafiee F. Double-disk synergy test for detection of synergistic effect between antibiotics against nosocomial strains of *staphylococcus aureus*. *Journal of research in pharmacy practice* 2012; 1: 21–24
150. Medizinische Labore / DIN EN ISO 15189 - DAkkS - Deutsche Akkreditierungsstelle GmbH. <https://www.dakks.de/de/medizinische-labore-din-en-iso-15189.html> (letzter Zugriff am: 05.04.2022)