

BEWILLIGUNGSEMPFÄNGER

Lisando GmbH

Abschlussbericht zur Förderinitiative nachhaltige Pharmazie 3:

Ersatz von Antibiotika und toxischen Kupfersulfat-Lösungen durch biologisch schnell abbaubare, umweltfreundliche und antimikrobiell wirkende Proteine zur Bekämpfung von Dermatitis digitalis bei Milchkühen

Art des Berichtes:

Abschlussbericht zum Vorhaben mit dem Aktenzeichen AZ 32709/01-31,
gefördert durch die Deutsche Bundesstiftung Umwelt

gefördert durch



Deutsche
Bundesstiftung Umwelt

www.dbu.de

Verfasser: Dr. Anneleen Cornelissen, Dr. Stefan Miller

Regensburg, 06.03.2019

06/02		Projektkennblatt der Deutschen Bundesstiftung Umwelt			
Az	32709/01-31	Referat	31	Fördersumme	299.204€
Antragstitel		Ersatz von Antibiotika und toxischen Kupfersulfat-Lösungen durch biologisch schnell abbaubare, umweltfreundliche und antimikrobiell wirkende Proteine zur Bekämpfung von Dermatitis digitalis bei Milchkühen			
Stichworte					
Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)		
42 Monate	06.07.2015	5.1.2019			
Zwischenberichte	05.01.2017				
Bewilligungsempfänger			Lisando GmbH Am BioPark 13 93053 Regensburg		
			Tel +49 941 28096-208 Fax +49 941 28096-940		
			Projektleitung Dr. Stefan Miller		
			Bearbeiter		
Kooperationspartner					
Zielsetzung und Anlaß des Vorhabens					
<p>Die Behandlung der Mortellaro'sche Krankheit (lat. Dermatitis digitalis, DD), einer Bakterieninfektion durch <i>Treponema</i> die ursächlich ist für starke Rückgänge in der Milchleistung von Rindern, führt heute entweder zu einem hoher Eintrag von Antibiotika in die Umwelt, mit den Folgen möglicher Resistenzbildungen, oder dem Einbringen entsprechend giftiger Substanzen, verbunden mit der Notwendigkeit diese zu entsorgen. Ziel des Projekts ist die Entwicklung spezifisch antimikrobiell wirkender Proteine (s. g. Artilysin®e) gegen <i>Treponema</i>, die im Gegensatz zu den bisher angewendeten Verfahren umweltfreundlich und biologisch abbaubar sind, um so die Umwelt zu schonen.</p>					
Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden					
<p>Zu Beginn des Projektes wurden geeignete <i>Treponema</i>-Stämme ausgewählt und kultiviert. Die Gattung <i>Treponema</i> besteht aus einer Reihe Gram-negativer Bakterien, deren Membran ungewöhnlich aufgebaut ist und eine hohe Stabilität aufweist. Da aus anderen Projekten bereits eine umfangreiche Bibliothek an Artilysin®en bestand, wurden diese als Ausgangsbasis für erste Tests ausgewählt. Aufgrund des ungewöhnlichen Aufbaus der Zelloberfläche von <i>Treponema</i> mussten im Rahmen des Projektes neue Artilysin®e entwickelt werden. D.h. es wurden gezielt Phagen (bzw. deren DNA) bioinformatisch analysiert, um neue Endolysine zu identifizieren, die dann zu Artilysin®en weiterentwickelt wurden. Die Wirkung der Artilysin®e auf die Erreger wurde in umfangreichen antimikrobiellen Screenings untersucht.</p> <p>Aufgrund der anspruchsvollen Wachstumsbedingungen der <i>Treponema</i> Bakterien mussten erhebliche zusätzliche Anstrengungen unternommen werden, um die geeignete Aktivitätstestungen durchführen zu können. Aus diesem Grund musste auch die Laufzeit des Projektes verlängert werden.</p> <p>Alle bisherigen Standardtestverfahren für Artilysin®e, wie MIC-Testung, Plattentestung oder photometrische Lysetests, funktionierten nicht. Daher mussten nochmals Alternativen gesucht werden und weitere Testverfahren charakterisiert und neu etabliert werden.</p> <p>Bei der Mikrokolorimetrie wird das Wachstum bzw. die Wachstumsinhibition über die Wärmeentwicklung (µW) detektiert. An der Charité in Berlin wurde dies bereits mit anderen Spirochaeten (Borrelien) durchgeführt. Dadurch konnten Probleme durch die deutlich geringere Zelldichte, die in Flüssigkultur erreicht wird, ausgeglichen werden.</p>					
Deutsche Bundesstiftung Umwelt • An der Bornau 2 • 49090 Osnabrück • Tel 0541/9633-0 • Fax 0541/9633-190 • http://www.dbu.de					

Im Zuge der Entwicklungsarbeiten konnte ein stabiles Verfahren für eine Aktivitätstestung auf der Basis der Mikrokalorimetrie etabliert werden. Aufgrund der aufgetretenen Verzögerungen mussten insbesondere Teile der Formulierungsentwicklung und die Durchführung der Applikationsversuche auf die Zeiten nach Projektende verschoben werden. Sie werden dann von Lisando auf eigene Kosten durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Im Verlauf des Projektes konnten folgende Meilensteine erfolgreich erreicht werden:

1. Aufbau einer Stammsammlung bei Lisando, die repräsentativ die wichtigsten *Treponema* Spezies umfasst, die bei Dermatitis Digitalis des Rindes von Bedeutung sind.
2. Entwicklung von Kultivierungsbedingungen und weitere Optimierung zur Erhöhung der Bakteriendichte in Kultur. Letzteres war von entscheidender Bedeutung zur Entwicklung geeigneter Assays für die Testung antibakterieller Substanzen.
3. Aufgrund der speziellen Wachstumsanforderungen von *Treponema*-Spezies konnten Standardverfahren zur Testung der enzymatischen Aktivität und der antibakteriellen Aktivität nicht zur Charakterisierung von Artilynsin auf *Treponema*-Spezies eingesetzt werden. Da das Peptidoglykan von *Treponema* sp. und anderen Gram-negativen Bakterien fast identisch sind, wurden von *Treponema* abgeleitete Endolysine auf Zellwandpräparationen von *P.aeruginosa* getestet. Um die Aktivität von Artilynsin gegen *Treponema* zu charakterisieren mussten neue Assays etabliert werden: Ein Resazurin-basierter Makrodilutionstest und ein Test mit Hilfe der isothermalen Mikrokalorimetrie erlaubten beide eine sensitive und genaue Messung der antibakteriellen Aktivität vergleichbar zu Standardtests der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC).
4. Von acht Endolysinen (6 *Treponema*-spezifische, 2 von anderen Spirochäten) die durch weitergehende Recherchen in wissenschaftlicher Literatur und entsprechenden Datenbanken identifiziert werden konnten, wurden sieben erfolgreich exprimiert und vier davon zeigten enzymatische Aktivität. Diese vier *Treponema*-spezifischen und enzymatisch aktiven Endolysine wurden als Bausteine für die Entwicklung von 47 einzigartigen *Treponema*-spezifischen Artilynsin@en genutzt. Diese wurden parallel zu 16 Artilynsin@en aus der "Lisando Artilynsin Toolbox" für Gram-negative Bakterien weiter getestet.
5. Zwei Artilynsin@e, das *Treponema*-spezifische Art-CB16 und Art-CB11 aus der "Lisando Artilynsin Toolbox", zeigten gute antibakterielle Aktivität gegen *T.denticola* DSM 14222, wie Tests mit isothermaler Mikrokalorimetrie belegen.

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

Über das Projekt und die erreichten Fortschritte wurde regelmäßig in den von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt durchgeführten Veranstaltungen berichtet.

Somit wurde das Fachpublikum über den aktuellen Entwicklungsstand auf dem Laufenden gehalten. Im Zuge der weiteren Arbeiten werden derzeit intensive Gespräche mit potentiellen Industriepartnern geführt. Die weitere Produktumsetzung wird dann einer intensiven Öffentlichkeitsarbeit begleitet werden, um den neuen Ansatz der Behandlung von Dermatitis digitales einer breiteren Öffentlichkeit zugänglich zu machen.

Fazit

Die zwei gefundenen Artilynsin@-Leitmoleküle (Art-CB11 und Art-CB16) werden derzeit weiter *in vitro* gegen andere *Treponema* Spezies getestet, um ihr Aktivitätsspektrum gegen diese Bakterien zu analysieren. Darüber hinaus werden beide Artilynsin@ derzeit einem breiten Pufferscreening unterzogen, um geeignete Formulierungsbedingungen zu entwickeln die eine stabile Langzeitlagerung und maximale Aktivität für die Anwendung *in vivo* ermöglichen. Basierend auf bereits etablierten Kontakten ist der nächste Schritt dann eine Testung beider Leit-Artilynsin@e in einem *in vivo* Modell für Dermatitis Digitalis beim Rind.

Inhaltsverzeichnis

PROJEKTKENNBLATT	1
1. EINFÜHRUNG UND MOTIVATION.....	5
2. METHODIK, VORGEHENSWEISE UND PROJEKTABLAUF	6
3. PROJEKTERGEBNISSE	9
4. ÖFFENTLICHKEITSARBEIT, VERÖFFENTLICHUNGEN UND VORTRÄGE	18
5. FAZIT UND AUSBLICK	19
6. LITERATURVERZEICHNIS	20

Verzeichnis von Bildern, Zeichnungen, Grafiken und Tabellen

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Wachstumskurve von <i>T. denticola</i> DSM 14222 und <i>T. brennaborensis</i> DSM 12168.9	
Abbildung 2: Etablierung des antimikrobiellen Testverfahrens für <i>Treponema</i>	12
Abbildung 3: Hintergrund der isothermalen Mikrokalorimetrie Assays.	13
Abbildung 4: „Muralytische“ Aktivität der potenziellen <i>Treponema</i> -wirksamen Endolysine – gezeigt an <i>P. aeruginosa</i> PAO1p Zellen nach Chloroform (CHCl ₃) Vorbehandlung.	14
Abbildung 5: Isothermaler Mikrokalorimetrie Test von Art-CB11 auf <i>Treponema denticola</i> DSM 14222.	16
Abbildung 6: Isothermale Mikrokalorimetrie Tests von Art-CB16 auf <i>Treponema denticola</i> DSM 14222.	17

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: In-silico Analyse der für das <i>Treponema</i> Projekt identifizierten relevanten Endolysine.	13
--	----

1. Einführung und Motivation

Die Mortellaro'sche Krankheit (lat. bovine dermatitis digitalis, DD) ist ein weit verbreitetes Problem in der Milchproduktion, die bei betroffenen Rindern Zehenhautentzündungen verursacht. Studien in den Niederlanden (Somers et al., 2003; Holzhauer et al., 2006) wiesen Dermatitis digitalis bei Rindern in 91-100% der Herden und 21-26% der Kühe nach. Neben den gesundheitlichen Aspekten führt DD zu signifikanten wirtschaftlichen Verlusten für die Milchwirtschaft unter anderem durch Gewichtsverlust der Tiere, verringerte Milchproduktion, frühzeitiges Aussondern und damit verbundene Behandlungskosten (Blowey, 1998; Hernandez et al., 2001). DD verursacht Kosten von 216 USD pro Kuh, wobei der Hauptanteil (42%) auf die Behandlungskosten entfällt, gefolgt von Verlusten durch geringere Fruchtbarkeit (31%) und verringerte Milchproduktion (27%) (Chaa et al. 2010).

Epidemiologische Untersuchungen zeigen, dass die Krankheit durch Bakterien, im Speziellen durch Spirochaeten der Gattung *Treponema* ausgelöst wird. Die Behandlung dieser Erkrankungen erfolgt heutzutage üblicherweise mittels zweier Ansätze:

1. Einzelbehandlung der betroffenen Tiere mittels Antibiotika.
2. Gruppenbehandlungen mithilfe chemischer Fußbäder.

Das Problem ist, dass dabei eine hohe Menge an Antibiotika in die Umwelt gelangt, mit der Folge möglicher Resistenzbildung. Des Weiteren wird die Umwelt durch die giftigen, schwermetallhaltigen Kupfersulfat-Fußbäder stark belastet.

Innerhalb dieses Projekts sollte eine neue Methode zur Behandlung von Nutztvieh in der industriellen Milchwirtschaft am Beispiel der Infektionskrankheit DD entwickelt werden. Hierbei stellen Artilysin®e eine wichtige, neue und umweltschonende Alternative zu den klassischen Antibiotika- oder Kupfersulfatbehandlungen der Rinder dar.

Artilysin®e sind rekombinante Polypeptide mit hoher Wirksspezifität gegen bakterielle Pathogene. Sie durchdringen die äußere Membran der Gram-negativen Bakterien und führen zu einer Destabilisierung der Zellwand. Diese Funktionsweise hat den Vorteil, dass nicht in den Metabolismus der Bakterien eingegriffen wird. Daher ist bis heute keine bakterielle Resistenz gegen ein Artilysin® bekannt.

Ziel des Projektes war es erstmals hochspezifische Artilysin®e gegen *Treponema* als Ersatz für Antibiotika und die bislang eingesetzten toxischen Substanzen in Fußbädern zu entwickeln und somit deren Eintrag in die Umwelt künftig deutlich zu reduzieren. Durch die hohe Spezifität dieser künstlich hergestellten Proteine und der antimikrobiellen Wirkweise, die ohne Eingriff in den Metabolismus der tier- und/oder humanpathogenen Bakterien auskommt, können zum einen infektiöse Bakterien gezielt zerstört und zum anderen die Möglichkeiten einer Resistenzentwicklung signifikant minimiert werden. Die einfache und schnelle biologische Abbaubarkeit der Artilysin®e verhindert zudem eine Anreicherung in der Umwelt.

2. Methodik, Vorgehensweise und Projektablauf

Im Rahmen des Projektes sollten auf Basis einer bereits vorhandenen umfangreichen Artilysin®-Bibliothek erste Tests durchgeführt werden, um die grundsätzliche Wirksamkeit der Artilysin®e gegen *Treponema* spp. zu untersuchen.

In einer zweiten Stufe war dann geplant, neue Artilysin®e zu entwickeln, die eine gezielte Bekämpfung der pathogenen Zielbakterien erlauben. Zu diesem Zweck wurden *Treponema*-spezifische Phagen (bzw. deren DNA) bioinformatisch gescreent um neue Enzyme, sogenannte Endolysine, mit muralytischer Wirkung zu identifizieren, die dann zu Artilysin®en weiterentwickelt werden konnten. Die Wirkung der Artilysin®e auf die Zielbakterien wurde dann in umfangreichen antimikrobiellen Screenings untersucht.

Im Rahmen dieses Projektes wurden verschiedene Arbeitspakete erfolgreich abgearbeitet:

Arbeitspaket I: "Auswahl und Kultivierung verschiedener *Treponema* Spezies", die relevant für Dermatitis digitalis sind. Dieses Arbeitspaket konnte erfolgreich abgeschlossen werden.

Arbeitspakete II und IV: "Etablierung von Aktivitätstests".

Aufgrund der anspruchsvollen Wachstumsbedingungen der *Treponema*-Zellen mussten erhebliche zusätzliche Anstrengungen unternommen werden, um die notwendigen Aktivitätstests etablieren und durchführen zu können. Dies resultierte dann auch in einer Verlängerung der Laufzeit des Projektes.

Alle bislang bei Lisando etablierten Standardtestverfahren für Artilysin®e, wie MIC-Testung, Plattentestung oder photometrische Lysetests funktionierten im Falle von *Treponema* nicht. Daher wurden folgende alternative Testmethoden identifiziert:

a) Mikrokalorimetrie:

Bei diesem Verfahren wird das Wachstum bzw. die Wachstumsinhibition von Bakterien über die Wärmeentwicklung (μ W) detektiert. An der Charité (AG PD Dr. Andrej Trampuz) in Berlin wurde dies bereits mit anderen Spirochaeten (Borrelien) durchgeführt.

b) Resazurin-Makrodilutionsassay:

Dieses Verfahren misst die Änderung der Fluoreszenzintensität von Resazurin, das durch lebende Bakterienzellen in Resorufin umgewandelt wird.

c) Alternativ sollten parallel dazu neue lumineszierende Substrate der Firma Biosynth eingesetzt werden:

Durch Lyse (spezifisch oder unspezifisch) der Bakterien werden intrazelluläre Enzyme (z.B. β -Galaktosidase) freigesetzt, die ein lumineszierendes Substrat umsetzen. Die Lumineszenz gibt eine quantitative Aussage über die ursprüngliche Zellzahl (unspezifische Lyse) oder die Effektivität eines Artilysin®s. Dieser Ansatz wurde dann allerdings nicht mehr weiterverfolgt, da die Mikrokalorimetrie gute Ergebnisse lieferte.

Beide Verfahren sollten im Detail entwickelt werden. Die Probleme mit der Aktivitätstestung hatten die Arbeiten im Projekt leider deutlich verzögert.

Im Zuge der Entwicklungsarbeiten konnte dann ein stabiles Verfahren für die Aktivitätstestung auf Basis der Mikrokalorimetrie etabliert werden. Ein einzelnes Experiment mittels der Mikrokalorimetrie benötigt allerdings 6 Tage. Zu Beginn ergab sich darüber hinaus ein grundsätzliches Problem, da unter den Versuchsbedingungen im Mikrokalorimeter kein

Wachstum der Bakterien, - auch nicht in der Positivkontrolle, nachgewiesen werden konnte. Daher wurden als erstes die Anzuchtbedingungen den für die Messung im Mikrokalorimeter notwendigen Messküvetten optimiert. Schlussendlich gelang es die Kultivierung der *Treponema* Bakterien erfolgreich im Mikrokalorienmeter zu etablieren. Hierbei konnten auch grundlegende Erfahrungen gesammelt werden, die sich auf andere komplexe Bakterien gut übertragen lassen.

Arbeitspaket III: "Screening Endolysine/Artilysin®e".

Wie in der Planung vorgesehen, wurde die Wirksamkeit von bereits existierenden und hoch aktiven Artilysin®en für Gram-negative Bakterien gegen *Treponema* untersucht. Insgesamt wurden 16 Artilysin®e gegen Gram-negative Bakterien auf ihre Wirksamkeit gegen *Treponema denticola* mittels des neu entwickelten sensitiven Resazurin-basierten Macrodilutions-Protokolls getestet.

Arbeitspaket V: Design und Herstellung von Artilysin®en

In der 2. Projekthälfte lag der Fokus auf dem Design, der Optimierung und Charakterisierung der Artilysin®e. Im Hinblick auf Letzteres war es möglich mit der isothermalen Mikrokalorimetrie einen zweiten, sehr sensitiven Aktivitätstest zu etablieren (Von Ah et al., 2009, Braissant et al., 2010). Diese Tests führten zur erfolgreichen Identifizierung zweier Artilysin®e mit antibakterieller Aktivität gegen *T. denticola in vitro*.

Arbeitspaket VI: Charakterisierung der ersten Artilysin®e – Strukturelle Analyse und Beurteilung der Aktivität geeigneter Artilysin®e

Zur strukturellen Beurteilung der neuen Artilysin®e werden typischerweise eine Reihe bioinformatischer Methoden angewendet. Bereits vor der Konstruktion der Artilysin®e kann so die Struktur der Artilysin®e und die Wechselwirkung des Endolysins mit dem antimikrobiellen Peptid analysiert werden. Da diese Methoden sehr gut funktionieren und die erheblichen Mehraufwandwände zur Etablierung der Aktivitätstestung zu deutlichen Verzögerungen geführt hatten, wurde auf eine weiterergende biophysikalische und biochemische Analyse verzichtet, sondern gute Artilysin®e hinsichtlich von Eigenschaften wie der Expressionsrate und damit Produzierbarkeit im Labor, sowie von Stabilität und Löslichkeit charakterisiert.

Arbeitspaket VII: Optimierung der Artilysin®e

Die im Rahmen des Projektes entwickelten Artilysin®e besitzen eine gute Wirksamkeit gegen *Treponema* spp. Darüber hinaus wurden die Artilysin®e bereits in der Entwicklungsphase so konstruiert, dass diese neben der antimikrobiellen Aktivität auch eine gute Löslichkeit und Stabilität aufweisen.

Arbeitspaket VIII: Auswahl und Validierung der optimierten Artilysin®-Varianten

Die gefundenen Artilysin®e zeigen eine gute Wirksamkeit gegen die getesteten *Treponema*-Spezies. Eine eventuell notwendige Optimierung der Artilysin®e wird nach Projektende dann durchgeführt.

Arbeitspaket IX: Formulierung und die Applikationsversuche im Stall

Aufgrund der aufgetretenen Projektverzögerung wurde die Formulierungsentwicklung erst am Projektende begonnen und die Durchführung der Applikationsversuche auf die Zeit nach Projektende verschoben. Basierend auf den Ergebnissen aus der geförderten Projektphase über die Kultivierung von *Treponema* spp. und die Identifizierung aktiver Artilysin®e wird Lisando die weitere Formulierungsentwicklung und nachfolgende Applikationsversuche auf eigene Kosten durchführen.

Arbeitspaket X: Bewertung und Analyse der Ergebnisse

In der Folge arbeitet Lisando nun daran, die beiden identifizierten Artilysin®e hinsichtlich ihrer möglichen Anwendbarkeit in einem *in vivo* Modell für DD bei Rindern näher zu untersuchen. Das derzeit durchgeführte Pufferscreening soll die Entwicklung einer geeigneten Formulierung ermöglichen, die maximale Stabilität und Aktivität garantiert. Parallel dazu konnten bereits erste Kontakte zur Applikationstestung der formulierten Artilysin®e bei Dermatitis digitalis etabliert werden.

Weitergehende Formulierungsentwicklung und die Durchführung der Applikationsversuche wurden zum Teil am Projektende gestartet und die weiteren Arbeiten auf die Zeit nach Projektende verschoben. Diese werden dann von Lisando auf eigene Kosten durchgeführt.

Aufgrund der Verzögerungen im Projekt und der guten bioinformatischen Charakterisierung ergab sich auch ein geringerer Aufwand für synthetische Gene und Sequenzierungen, da ohne einen guten Aktivitätstest die Optimierung noch nicht gestartet werden konnte und aufgrund der guten Charakterisierung diese nicht im ursprünglich geplanten Umfang während der Projektlaufzeit anfielen und die Optimierung erst nach Ablauf des Projektes durchgeführt werden wird.

3. Projektergebnisse

Treponema - Kultivierung

Zu Beginn der Projektarbeiten war es zunächst wichtig, eine Sammlung der relevanten Stämme für die Mortellaro'sche Krankheit (lat. bovine dermatitis digitalis) mitverursachenden *Treponema*-Gattungen und deren Kultur im Labor zu etablieren, um so die Grundlage zur Entwicklung und Evaluierung spezifischer Artilysin®e zu haben. Auf der Basis der vergleichenden 16S-rRNA Sequenzanalyse konnten aus Proben unterschiedlicher Rinderherden drei typische *Treponema*-Arten ("*Treponema medium*/*Treponema vincentii-like*", "*Treponema phagedenis-like*" and "*Treponema denticola*/*Treponema pedis-like*") identifiziert werden (Evans et al., 2009). Eine besondere Herausforderung war in der Folge die Etablierung geeigneter Kultivierungsbedingungen, da die Kultivierung von *Treponema* kaum beschrieben und ziemlich aufwendig ist. Daher gestaltete sich auch der Erwerb der relevanten Spezies aus unterschiedlichen öffentlichen Instituten und Sammlungen als sehr schwierig, da relevante *Treponema*-Stämme nur in wenigen Sammlungen vorliegen bzw. von diesen abgegeben werden. Insgesamt war es aber möglich aus den identifizierten Arten, 3 *Treponema*-Stämme vom Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH zu erhalten

- a) *Treponema denticola* (DSM 14222),
- b) *Treponema brennaborensis* (DSM 12168)
- c) *Treponema pedis* (DSM 18691).

Alle drei Stämme konnten erfolgreich rekultiviert, auf ihre Reinheit geprüft, in die Lisando Culture Collection (LiCC) überführt und bei -80°C gelagert werden.

Im nächsten Schritt erfolgte dann die Optimierung der Kultivierungsbedingungen, um die notwendige hohe Zelldichte für die weiteren Experimente generieren zu können.

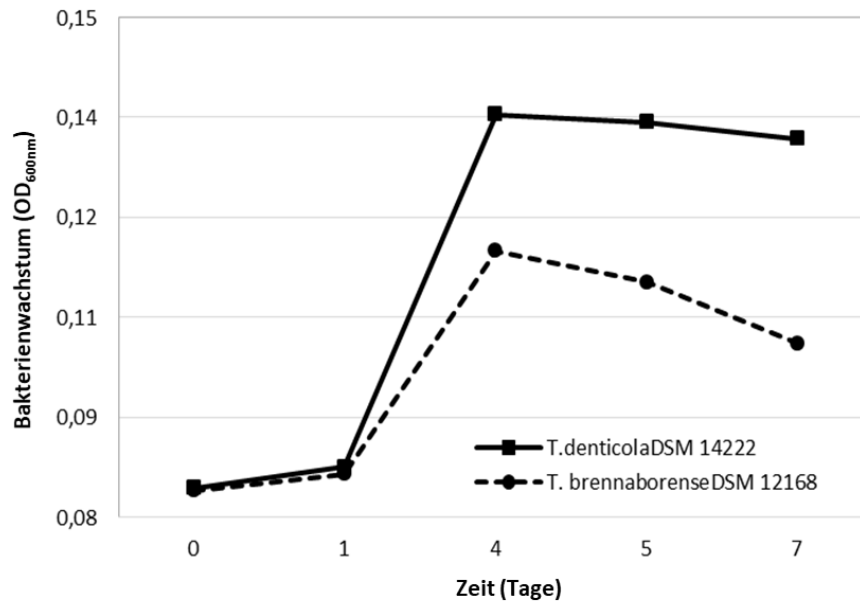
Zur Kultivierung der *Treponema*-Isolate wurden zwei unterschiedlichen Medien etabliert. Die Basis war zum einen ein FAB-Flüssigmedium (engl.: fastidious anaerobe basal broth) und zum anderen EAV-Flüssigmedium (engl.: enhanced anaerobe basal broth with volatile fatty acids). Beide Medien wurden mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (FCS) ergänzt und unter anaeroben Bedingungen äquilibriert [N₂/H₂/CO₂, 85:10:5].

Die Formulierung des EAV-Mediums wurde angepasst, um die Kultivierung der Bakterien gezielt zu verbessern. Durch die Zugabe der 2-fachen Zuckermenge in Kombination mit einer Volatile Fatty Acids-Lösung konnte das Wachstum in der Tat deutlich gesteigert werden. Dies konnte durch indirekte Bestimmung der Zellzahl durch Messung der optischen Dichte bei OD_{600nm} mit einer Zunahme um ~0.15 beobachtet werden.

Als optimale Wachstumstemperatur erwies sich bei allen *Treponema*-Spezies 37°C, - bei Messungen in einem Temperaturbereich von 30 – 42°C. Zellen, die niedrigeren Temperaturen ausgesetzt waren (≤ Raumtemperatur) zeigten kein Wachstum und waren auch nachfolgend bei optimalen Temperaturbedingungen nicht mehr kultivierbar (Daten nicht gezeigt). Die max. Zelldichte lag bei etwa 1.4 x 10⁸ Bakterienzellen / ml, was nach einer Inkubationszeit von 3 - 4 Tagen erreicht wurde (Mittlere Log-Phase, Abbildung 1).

Abbildung 1: Wachstumskurve von *T. denticola* DSM 14222 und *T. brennaborensis* DSM 12168.

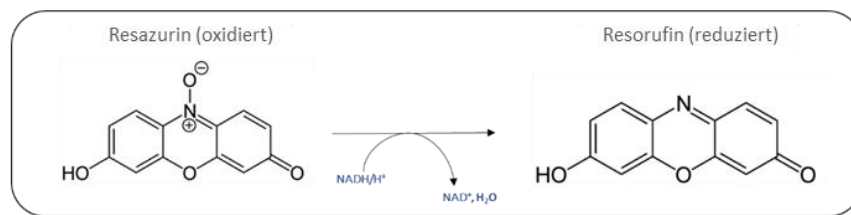
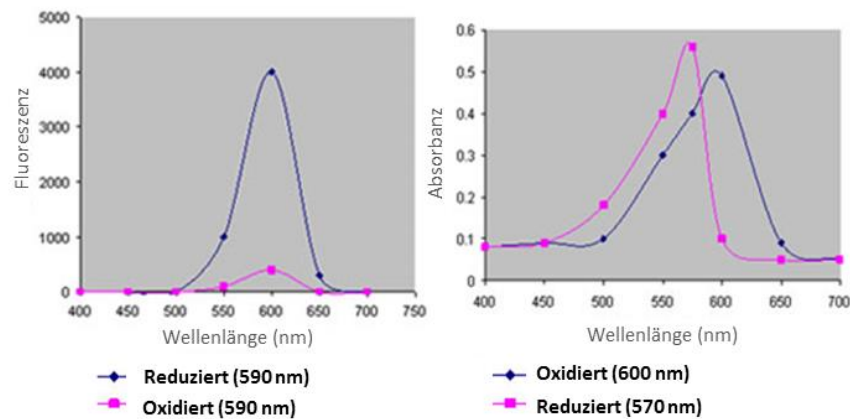
Gezeigt ist die Wachstumsrate für *T. denticola* DSM 14222 und *T. brennaborensis* DSM 12168 in EAV-Medium. Nach zweimaliger Passage in EAV wurden 1x10⁸ Zellen in der mittleren Log-Phase in 10 ml EAV aufgenommen und die optische Dichte zeitabhängig gemessen.



Unter dem Lichtmikroskop war deutlich erkennbar, dass die Zellen in Flüssigmedium sehr mobil waren und unterschiedliche Bewegungsmuster (Rotations-, Gleitbewegungen und ruckartiges Zucken) zeigten. In älteren Kulturen zeigten sich (mit Beginn der stationären Phase) abgekugelte Formen und ein Absinken der Spirochaeten auf den Gefäßboden. Alle *Treponema*-Spezies konnten erfolgreich bei -80°C in Glycerol-Medien 40 % (v/v) gelagert werden.

Ein weiterer wichtiger Schritt war die Etablierung neuer Aktivitätstests, da die bislang bei Lisando verwendeten Tests durch die schlechte Kultivierbarkeit der Zellen, - insbesondere durch die niedrigen hierdurch erreichbaren Zellzahlen, hier nicht eingesetzt werden können. Eine standardisierte Methode um die bakterizide Wirkung, *in vitro* messen zu können, lag auch in der Literatur für *Treponema* nicht vor. Um die minimale Hemmkonzentration (MHK) bestimmen zu können, konnte bei verschiedenen Spirochaeten wie *Leptospira*, *Borrelia* and *Brachyspira* genera (Hunfeld et al. 2005; Karlsson et al. 2003; Murray and Hospenthal 2004; Ruzic-Sabljić et al. 2005) der Einsatz von Mikroverdünnungen mit Medium als gängige Methode recherchiert werden.

Der im Rahmen des Projektes durchgeführte Ansatz beruht dagegen auf der Entwicklung und Implementierung eines Resazurin-basierten Makroverdünnungs-Protokolls, um die antimikrobielle Aktivität der Artilysin®e gegen *Treponema* untersuchen zu können. Resazurin ist ein blauer Farbstoff, der sich bei Anwesenheit der aktiven Dehydrogenase lebender Zellen in ein pinkfarbenes, stark fluoreszentes Molekül (Resorufin) umwandelt. Die Intensität der Fluoreszenz korreliert direkt proportional mit der Zahl der lebenden Zellen.

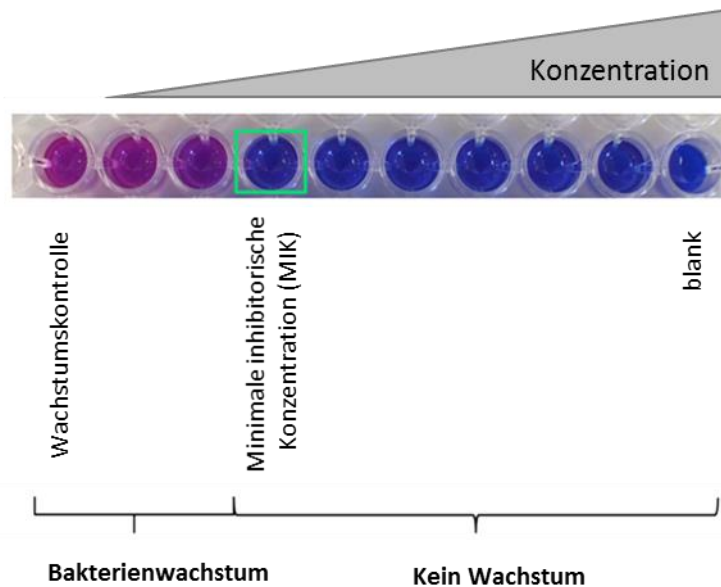
[A]**[B]**

Im weiteren Verlauf wurden Methoden zur Untersuchung der Wachstumskurven von *Treponema* entwickelt. Die Untersuchung der Wachstumscharakteristika für jede *Treponema*-Spezies ist notwendig, um diese in einer Mikroverdünnung zu kennen. Um die Wachstumskurven jeder Spezies aufzunehmen, wurde die Absorption in einer Zellkulturplatte bei einer Wellenlänge von 540 nm über einen Zeitraum von 7 Tagen täglich aufgenommen. Zum Einsatz kam dabei ein Tecan ELISA Reader (Infinite® 200 PRO, TECAN Deutschland GmbH). Die späte exponentielle Wachstumsphase / frühe stationäre Phase stellte sich für *Treponema denticola* DSM 1422) und *Treponema brennaborensis* DSM 12168 nach 3 - 4 Tagen ein.

Im nächsten Schritt wurde die bakterizide Aktivität der Artilylin®e auf die *Treponema*-Stämme untersucht. Hierbei wurde das Resazurin-basierte Makrodilution--Protokoll in sterilen 96-well Kulturplatten (Abbildung 2) eingesetzt.

Abbildung 2: Etablierung des antimikrobiellen Testverfahrens für *Treponema*.

Exemplarische Darstellung des Resazurin-basierten „Mikrotiterplatten Assays“. Nach 3 - 4 Tagen Inkubationszeit werden die Platten dem Inkubator entnommen und den einzelnen Wells 20 µl der Resazurin-Farbstofflösung (0,02 %) hinzugefügt. Der Farbumschlag von blau zu pink zeigt das Wachstum (pink) der Isolate bzw. eine Inhibition des Wachstums (blau) bei definierten Konzentrationen der antimikrobiellen Substanzen. So kann die MHK der antimikrobiellen Substanzen bestimmt werden.



Die Untersuchungen wurden mit zwei unterschiedlichen Wachstumsmedien durchgeführt:

- (1) FAB zur Untersuchung der bakteriziden Aktivität der Antibiotika
- (2) FAB/Mueller-Hinton zur Untersuchung der bakteriziden Aktivität der Artilylin®e.

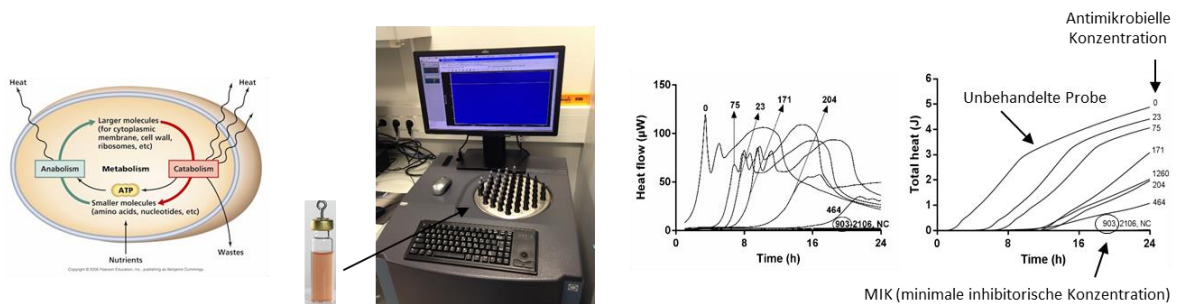
Die Versuche zeigten, dass bei einer geeigneten Verdünnung von allen *Treponema* Kulturen ein konstantes Wachstum feststellbar war, solange bis eine Inhibition durch die zugesetzten Artilylin®e eintrat. Weiterhin wurde die antimikrobielle Wirksamkeit jedes Substrats auf Basis der inhibitorisch wirkenden niedrigsten Konzentration in den einzelnen Wells bestimmt. Zellwachstum und -dichte wurden durch vergleichende Fluoreszenzmessungen nach der zuvor definierten kritischen Wachstumsphase von 3 - 4 Tagen bestimmt. In Analogie zur konventionellen MIC-Bestimmung mit Antibiotika konnte so ein neues standardisiertes Verfahren zur MIC-Bestimmung für Artilylin® über Macrodilutions-Tests etabliert werden.

Als sehr sensitive und genaue Alternative zu der MIC-Testung wurde in Zusammenarbeit mit PD Dr. Trampuz (Charité - Universitätsmedizin Berlin) die isothermale Mikrokolorimetrie (IMC) für die verschiedenen *Treponema*-Spezies etabliert, um die antimikrobielle Aktivität der entwickelten Artilylin®e zu charakterisieren.

Isothermale Mikrokolorimetrie detektiert die, im Rahmen des bakteriellen Stoffwechsels von lebenden Bakterien, entstehende Wärme auf Mikrowatt-Level (Figure 3; Von Ah et al., 2009; Braissant et al., 2010; Gonzalez-Moreno et al. 2017). Etwa 10.000 bis 100.000 stoffwechselaktive Bakterienzellen sind bereits ausreichend, um ein Signal in Echtzeit zu generieren, dass eine dynamische Abhängigkeit von der Zellzahl aufweist. Die IMC erlaubt die Wärmeentwicklung und somit das langsame Wachstum von *Treponema* über mehrere Tage zu messen, ohne die Probe zu verändern, was im Falle von *Treponema* die Lebensfähigkeit der sehr empfindlichen *Treponema*-Kulturen negativ beeinflussen könnte.

Abbildung 3: Hintergrund der isothermalen Mikrokalorimetrie Assays.

Stoffwechselprozesse in lebenden Bakterienzellen produzieren kleine Mengen an Wärme, die sehr genau im Mikrokalorimeter gemessen werden kann. In Anwesenheit antibakteriell wirksamer Substanzen wird die Hitzeentwicklung (heat flow (μW)) und die gesamte Wärmeentwicklung (total heat (J)) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle reduziert. Die MHIC (minimal heat inhibiting concentration) ist definiert als die geringste Konzentration einer antimikrobiellen Substanz die nötig ist, um das Bakterienwachstum und damit die Wärmeentwicklung komplett zu unterdrücken (Von Ah et al., 2009; Braissant et al., 2010; Gonzalez-Moreno et al. 2017).



Ein weiterer wichtiger Entwicklungsaspekt war nachfolgend die Identifikation und Charakterisierung der Endolysine. Über Recherchen in Literatur und elektronischen Datenbanken wurden vier Prophagen-kodierte Endolysine identifiziert und in der Folge *in vitro* (Tabelle 1: top 4 Konstrukte) evaluiert.

Tabelle 1: *In-silico* Analyse der für das *Treponema* Projekt identifizierten relevanten Endolysine.

Die Expressionsorganismen und die Proteinausbeute für jedes Protein sind ebenfalls dargestellt.

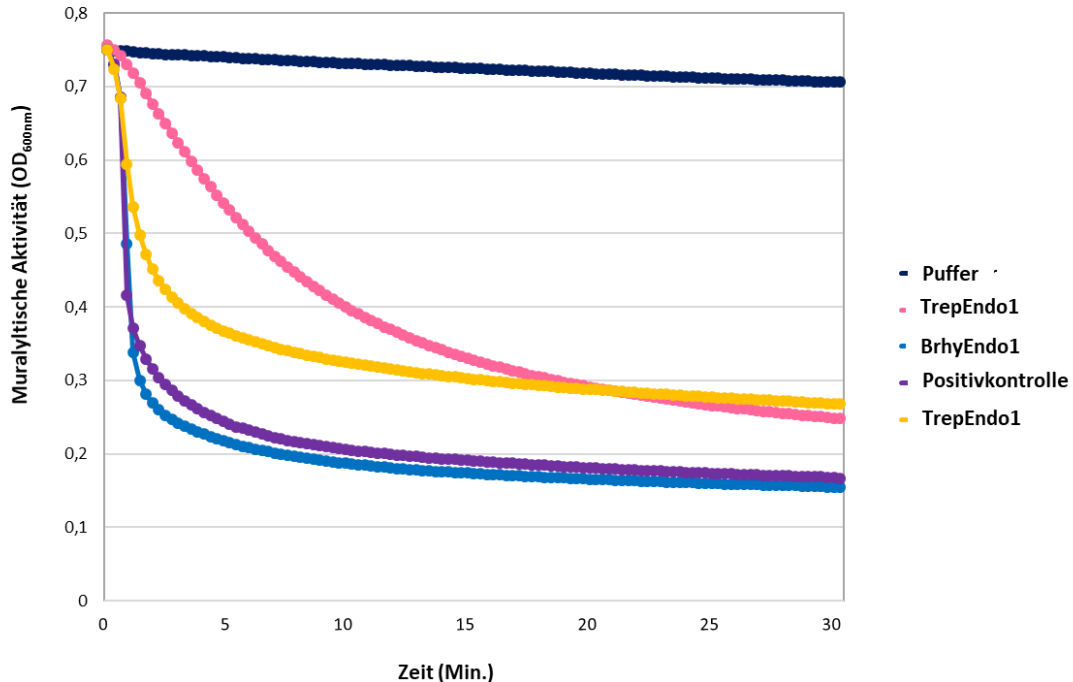
Endolysin	Expressionsstamm	Ausbeute [mg/L]
BrHyEndo1	<i>E. coli</i>	15,7
TrepEndo1	<i>E. coli</i>	43,5
TrepEndo2	<i>E. coli</i>	2.8
SpEndo1	<i>E. coli</i>	unlöslich
TrepEndo3	<i>E. coli</i>	9.4
TrepEndo4	<i>E. coli</i>	1.5
TrepEndo5	<i>E. coli</i>	5.3
TrepEndo6	<i>E. coli</i>	19.3

Die ausgewählten Endolysine wurden in Form von extern generierten synthetischen Gensequenzen in ein *Escherichia coli* Expressionssystem kloniert und zunächst über einen „Muralytischen Assay“ auf ihre enzymatische Aktivität überprüft. (Abbildung 4). Bei diesem Assay werden die Zielbakterien mit den Endolysinen inkubiert und die Zeitabhängige Reduktion der Zelltrübung vermessen. Gram-negative Bakterien müssen dabei zuvor mit einem Chloroform-haltigen Puffer behandelt werden, um die äußere Membran, zu permeabilisieren, da sie sonst nicht durchlässig für die Endolysine sind. Dabei bestätigte sich wiederum die Widerstandsfähigkeit von *Treponema* gegenüber äußeren Einflüssen, da trotz mehrfacher Versuche die äußere Membran nicht entfernt werden konnte. Für die Chloroform-Behandlung wurde daher nicht Zellen von *Treponema*, sondern von *Pseudomonas aeruginosa* PAO1p eingesetzt, die über ein chemisch identisches Peptidoglykan verfügen und sich daher zur Charakterisierung der enzymatischen Aktivität der ausgewählten Endolysine einsetzen lassen.

Abbildung 4: „Muralytische“ Aktivität der potenziellen *Treponema*-wirksamen Endolysine – gezeigt an *P. aeruginosa* PAO1p Zellen nach Chloroform (CHCl₃) Vorbehandlung.

(A) Zeitabhängige Reduktion der Zelltrübung nach Zugabe äquimolarer Mengen an BrHyEndo1, TrepEndo1, TrepEndo2 im Vergleich mit einer Positiv-Kontrolle. (B) Erreichte Reduktion der Zelltrübung im Vergleich mit der Pufferkontrolle (in %) bei optischer Dichtemessung (OD_{600nm}).

[A]



[B]

Wirtstamm	Reduktion der Zelltrübung (%)			
	TrepEndo1	TrepEndo2	BrHyEndo1	Positivkontrolle
PAO1p	58,40	61,36	73,57	71,89

Aufgrund der muralytischen Messungen mit *Pseudomonas aeruginosa* PAO1p konnten BrHyEndo1, TrepEndo1 und TrepEndo2 grundsätzlich als funktional wirksam identifiziert werden. Diese wurden als Basismoleküle zur Entwicklung der ersten Artilysin®e gegen *Treponema*-Spezies genutzt.

Die Ausweitung der Recherche in wissenschaftlicher Literatur und entsprechenden Datenbanken nach weiteren Endolysinen von *Treponema*-spezifischen Prophagen und ihre anschließende *in vitro* Aktivitätstestung (Tabelle 1; untere 4 Konstrukte) ermöglichte es weitere Artilysin®e mit antibakterieller Aktivität gegen *Treponema*-Spezies zu entwickeln und zu optimieren.

Die vier neuen *Treponema*-spezifischen Endolysine konnten alle mit guter Ausbeute exprimiert werden, aber nur TrepEndo5 zeigte muralytische Aktivität auf PAO1p Zellen (Trübungsabnahme 43,0 %). Insgesamt wurden von den 8 zur Verfügung stehenden Endolysinen, 7 erfolgreich exprimiert und 4 zeigten in dem Vorscreening auch enzymatische Aktivität. Diese Endolysine wurden in der Folge als Grundlage für das Design der Artilysin®e verwendet, die im Anschluss auf der Basis ihrer jeweiligen Aktivität gelistet wurden.

Entwicklung und Screening der Artilysin®e

Initiales Artilysin® Screening mit Lisando-Toolbox-Artilysin®en: Wie in der Planung vorgesehen, wurde die Wirksamkeit der bereits existierenden Artilysin®e für Gram-negative Bakterien auf die Aktivität von *Treponema* untersucht. In der ersten Projektphase wurden insgesamt 16 bereits verfügbaren Artilysin®e aus der Lisando Toolbox gegen Gram-negative Bakterien (Stand Verfügbarkeit Juli 2016) auf *Treponema denticola* DSM 14222 unter Anwendung des neu etablierten Resazurin-basierten Makrodilutions-Protokolls getestet.

Als Kontrolle inhibiert Ampicillin das Wachstum von *Treponema denticola* DSM 14222 bereits bei Konzentration < 2 µg/ml (Abbildung 5B). Dieser, so mit dem neuen Protokoll ermittelte MIC-Wert für Ampicillin gegen *Treponema denticola* DSM 14222 stimmt mit den Literaturwerten überein und bestätigt somit die Funktionalität des Resazurin-basierten Verfahrens (Evans et al., 2008). Die unter diesen Bedingungen in der frühen Phase des Projektes getesteten Toolbox-Artilysin®e waren unter den Testbedingungen nicht aktiv.

Weitere Arbeiten im Verlauf des Projektes und eine damit einhergehende Verbesserung der zur Verfügung stehenden Aktivitätstests ermöglichte im späteren Projektverlauf ein erfolgreiches Screening nach geeigneten Artilysin®en aus der Lisando-Toolbox.

Entwicklung und Aktivitätstestung von *Treponema*-spezifischen Artilysin®en & weiteres Screening von neu entwickelten Lisando Toolbox Artilysin®en.

Basierend auf der muralytischen Aktivität gegen Chloroform-behandelte *Pseudomonas aeruginosa* PAO1p wurden die Endolysine BrHyEndo1, TrepEndo1, TrepEndo2, TrepEndo5 als Kandidaten zur Entwicklung der neuen Artilysin®e ausgewählt.

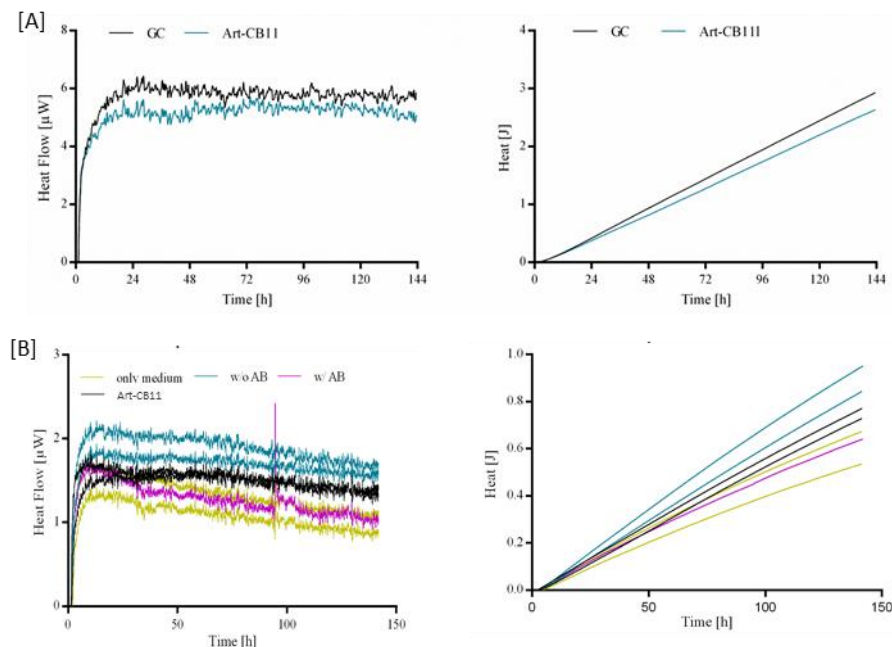
Bereits vorhandene „Toolbox“ Peptide sowie neue Peptide mit Wirksamkeit gegen *Treponema*-Spezies (basierend auf einer weitergehenden, vertieften Literaturrecherche) wurden mit den Endolysinen fusioniert. Insgesamt wurde ein Set von sieben Peptiden und Peptid-Varianten an die verschiedenen Endolysine fusioniert. Dadurch wurde ein Set von 47 neuen Artilysin®en spezifisch für *Treponema*-Spezies entwickelt. Außerdem wurden fünf neue

Moleküle aus der "Lisando Toolbox Artilysin® Plattform, die das Ergebnis der kontinuierlichen Verbesserung der existierenden Artilysin®e in den letzten beiden Jahren waren, ebenfalls für die nächste Screening-Runde auf *Treponema* Spezies ausgewählt.

Artilysin Art-CB11 ausgewählt aus der "Lisando Toolbox Artilysin® Plattform" zeigt antibakterielle Aktivität in den isothermalen Mikrokalorimetrie Assays auf *T. denticola* DSM 14222 (Abbildung 5). Sowohl bei frisch angeimpften, exponentiell wachsenden Kulturen (Abbildung 5A) als auch bei spät-logarithmischen Kulturen, die eher chronischen Infektionen vergleichbar wären (Abbildung 5B), konnte eine verringerte Wärmeproduktion im Vergleich zur Kontrolle für die Kulturen gemessen werden, die mit Art-CB11 inkubiert worden waren, was die antibakterielle Aktivität von Art-CB11 auf *T. denticola* DSM 14222 widerspiegelt.

Abbildung 5: Isothermale Mikrokalorimetrie Test von Art-CB11 auf *Treponema denticola* DSM 14222.

(A) Eine frisch angeimpfte *T. denticola* DSM 14222-Kultur wurde anaerob bei 37°C in Anwesenheit von Art-CB11 inkubiert, parallel dazu eine identische Wachstumskontrolle ohne Artilysin-Zugabe (GC)). Die Wärmeentwicklung (μW) und die gesamte Wärmemenge (J) wurden über einen Zeitraum von fünf Tagen verfolgt. (B) Identische 3 Tage alte Kulturen (die die spät-logarithmische Phase erreicht hatten) wurden anaerob bei 37°C ohne Antibiotikum (w/o AB; Wachstumskontrolle), mit Kanamycin (w/ AB; 0,1 mg/ml; Positiv-Kontrolle) und mit Art-CB11 versetzt und inkubiert. Ein Reaktionsgefäß, das nur mit Wachstumsmedium gefüllt und nicht mit *Treponema denticola* angeimpft wurde, dient als Basislinie der Wärmeentwicklung und der gesamten Wärmemenge in Abwesenheit von Bakterienwachstum. Alle Bedingungen wurden in Duplikaten getestet. Die Wärmeentwicklung (μW) und die gesamte Wärmemenge (J) wurden über einen Zeitraum von fünf Tagen verfolgt.

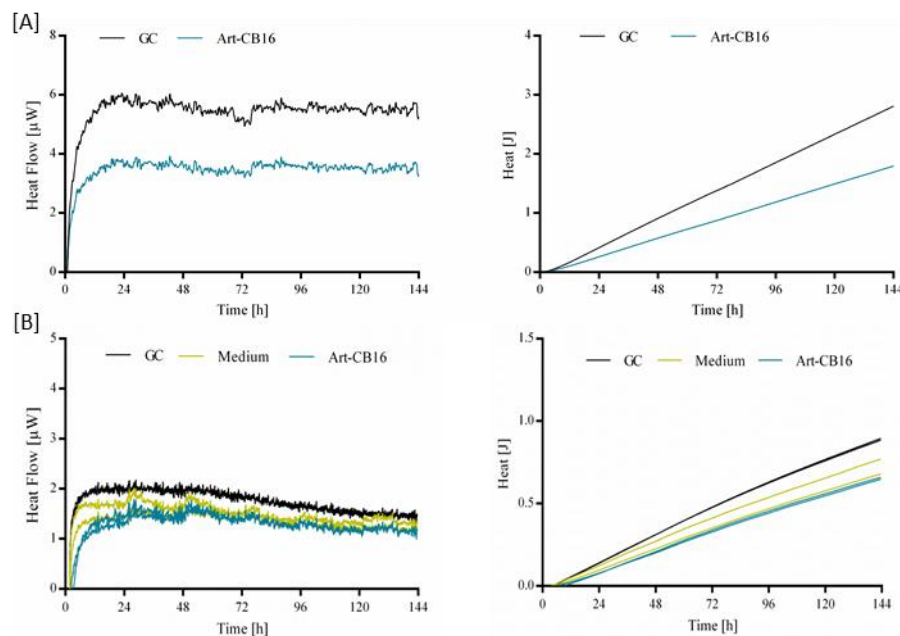


Neben Art-CB11 zeigt auch Artilysin Art-CB16 das innerhalb der *Treponema*-spezifischen Artilysin® Plattform konstruiert wurde, eine antibakterielle Aktivität gegen *T. denticola* DSM 14222. Auch hier wurde die antibakterielle Aktivität nicht nur in frühen Wachstumsphasen von

T. denticola (Abbildung 7A) beobachtet, sondern auch mit älteren Kulturen, die eine spät-logarithmische bis früh-stationäre Phase erreicht hatten (Abbildung 7B).

Abbildung 6: Isothermale Mikrokalorimetrie Tests von Art-CB16 auf *Treponema denticola* DSM 14222.

(A) Eine frisch angeimpfte *T. denticola* DSM 14222-Kultur wurde anaerob bei 37°C mit Art-CB16 inkubiert, parallel zu einer identischen Wachstumskontrolle ohne antibakterielle Substanz (GC). Die Wärmeentwicklung (μW) und die gesamte Wärmemenge (J) wurden über einen Zeitraum von fünf Tagen verfolgt. (B) Identische 3 Tage alte Kulturen (die die spät-logarithmische Phase erreicht hatten) wurden anaerob bei 37°C mit Art-CB16 versetzt und inkubiert. Eine Wachstumskontrolle und eine Probe, die nur Medium enthielt dienten als Basislinie der Wärmeentwicklung und der gesamten Wärmemenge in Abwesenheit von Bakterienwachstum. Alle Bedingungen wurden in Duplikaten getestet. Die Wärmeentwicklung (μW) und die gesamte Wärmemenge (J) wurden über einen Zeitraum von fünf Tagen verfolgt.



4. Öffentlichkeitsarbeit, Veröffentlichungen und Vorträge

Über das Projekt und die erreichten Fortschritte wurde regelmäßig in den von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt durchgeführten Veranstaltungen berichtet.

Folgende Vorträge wurden gehalten:

2015/04/14; Dr. WaiLing Chang; DBU Environmental relief through development of biodegradable Artilysin®s for treating Dermatitis digitalis of cattle” – Project Kick-off

2015/09/25; Dr. WaiLing Chang; DBU Sustainable Chemistry Conference 2015: the way forward; “Artilysin®: a new antimicrobial platform”

2015/10/27; Dr. WaiLing Chang; DBU-Forum: “Environmental relief through development of biodegradable Artilysin®s for treating Dermatitis digitalis of cattle”

2016/09/28; Dr. WaiLing Chang; DBU-Forum: “Environmental relief through development of biodegradable Artilysin®s for treating Dermatitis digitalis of cattle”

2018/10/16; Dr. Stefan Miller; DBU-Forum Sanfte Medizin für gesunde Tiere: „ARTILYSIN®: Antimikrobielle Proteine gegen Zehenhautentzündung“

Somit wurde das Fachpublikum über den aktuellen Entwicklungsstand auf dem Laufenden gehalten. Im Zuge der weiteren Arbeiten werden derzeit intensive Gespräche mit potentiellen Industriepartnern geführt. Die weitere Produktumsetzung wird dann von einer intensiven Öffentlichkeitsarbeit begleitet werden, um den neuen Ansatz der Behandlung von *Dermatitis digitales* einer breiteren Öffentlichkeit zugänglich zu machen.

5. Fazit und Ausblick

Im Verlauf des Projektes konnten folgende Meilensteine erfolgreich erreicht werden:

1. Aufbau einer ersten Stammsammlung bei Lisando, die repräsentativ die wichtigsten *Treponema*-Spezies umfasst, die bei Dermatitis digitalis des Rindes von Bedeutung sind.
2. Entwicklung von Kultivierungsbedingungen für die relevanten *Treponema*-Spezies und weitere Optimierung der Kultivierungsbedingungen zur Erhöhung der Bakteriendichte in Kultur. Letzteres war von entscheidender Bedeutung zur Entwicklung geeigneter Assays für die Testung antibakterieller Substanzen.
3. Aufgrund der speziellen Wachstumsanforderungen von *Treponema*-Spezies konnten etablierte Standardverfahren zur Testung der enzymatischen Aktivität und der antibakteriellen Aktivität nicht zur Charakterisierung von Endolysinen und Artilysinen gegen *Treponema*-Spezies eingesetzt werden. Da das Peptidoglykan von *Treponema* spp. und anderen Gram-negativen Bakterien fast identisch sind, wurden von *Treponema* abgeleitete Endolysine erfolgreich auf Zellwandpräparationen von *P. aeruginosa* getestet. Um die Aktivität von Artilysinen gegen *Treponema* zu charakterisieren mussten neue Assays etabliert werden: Ein Resazurin-basierter Makrodilutionstest und ein Test mit Hilfe der isothermalen Mikrokolorimetrie erlaubten beide eine sensitive und genaue Messung der antibakteriellen Aktivität vergleichbar mit Standardtests der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC).
4. Von acht Endolysinen die sorgfältig durch weitergehende Recherchen in wissenschaftlicher Literatur und entsprechenden Datenbanken identifiziert werden konnten, wurden sieben erfolgreich exprimiert und vier davon zeigten enzymatische Aktivität. Diese vier *Treponema*-spezifischen und enzymatisch aktiven Endolysine wurden als Bausteine für die Entwicklung von 47 einzigartigen *Treponema*-spezifischen Artilysin®en genutzt. Die so entwickelten Artilysin®e wurden parallel zu 16 Artilysin®en aus der "Lisando Artilysin Toolbox" für Gram-negative Bakterien weiter getestet.
5. Zwei Artilysin®e, das *Treponema*-spezifische Art-CB16 und Art-CB11 aus der "Lisando Artilysin Toolbox", zeigten gute antibakterielle Aktivität gegen *T.denticola* DSM 14222, wie Tests mit isothermaler Mikrokolorimetrie belegen.

Die zwei Artilysin® -Leitmoleküle (Art-CB11 und Art-CB16) werden derzeit weiter *in vitro* gegen andere *Treponema* Spezies getestet, um ihr Aktivitätsspektrum weiter zu analysieren. Darüber hinaus werden beide Artilysin®e einem breiten Pufferscreening unterzogen, um geeignete Formulierungsbedingungen zu entwickeln, die eine stabile Langzeitlagerung und maximale Aktivität für die Anwendung *in vivo* ermöglichen. Basierend auf bereits etablierten Kontakten ist der nächste Schritt dann eine Testung beider Leit-Artilysin®e in einem *in vivo* Modell für Dermatitis digitalis beim Rind.

6. Literaturverzeichnis

- Blowey, R. W. (1998). Welfare aspects of foot lameness in cattle. *Irish Vet. J.* 51, 203-206.
- Braissant, O., Wirz, D., Göpfert, B, Daniels, A.U. (2010). Use of isothermal microcalorimetry to monitor microbial activities. *FEMS Microbiol. Lett.* 303: 1-8.
- Chaa, E., Hertla, J.A., Barb, D., Gröhn, Y.T. (2010). The cost of different types of lameness in dairy cows calculated by dynamic programming. *Prev. Vet. Med.* 97, 1-8.
- Evans, N. J., Brown, J., Demirhan, I., Murray, R. D., Vink, D., Blowey, R. W., Hart, C. A., Carter, S. D. (2008). Three unique groups of spirochetes isolated from digital dermatitis lesions in UK cattle. *Vet Microbiol* 130, 141–150.
- Evans, N. J., Brown, J., Demirhan, I., Murray, R. D., Britles, R. J., Hart, C. A., Carter, S. D. (2009). *Treponema pedis* sp. nov., a spirochaete isolated from bovine digital dermatitis lesions. *Int J Syst Evol Microbiol.* 59(Pt 5):987-91.
- Gonzalez Moreno, M., Trampuz, A. & Di Luca, M. (2017). Synergistic antibiotic activity against planktonic and biofilm-embedded *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus oralis*. *J Antimicrob Chemother.* 72, 3085–3092.
- Hernandez, J., Shearer, J.K. Webb, D.W. (2001). Effect of lameness on the calving-to conception interval in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218, 1611-1614.
- Holzhauser, M., Hardenberg, C., Bartels, C. J. M., & Frankena, K (2006). Herd- and cow-level prevalence of digital dermatitis in The Netherlands and associated-risk factors. *J. Dairy Sci.* 89, 580-588.
- Hunfeld, K.P., Ruzic-Sabljić, E., Norris, D.E., Kraiczy, P., Strle, F., (2005). In vitro susceptibility testing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates cultured from patients with erythema migrans before and after antimicrobial chemotherapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49,1294–1301
- Hunger, F.G. (2014): Mitteilung per Mail zur entwickelten Kalkulationsgrundlage bei Dermatitis digitalis. Landwirtschaftskammer Oberösterreich, Abteilung Bildung und Beratung, Referat Betriebswirtschaft, Linz, im April 2014
- Karlsson, M., Fellstrom, C., Gunnarsson, A., Landen, A., Franklin, A., (2003). Antimicrobial susceptibility testing of porcine *Brachyspira (Serpulina)* species isolates. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2596–2604.
- Murray, C.K., Hospenthal, D.R. (2004). Determination of susceptibilities of 26 *Leptospira* sp. serovars to 24 antimicrobial agents by a broth micro-dilution technique. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 4002–4005.
- Ruzic-Sabljić, E., Podreka, T., Maraspin, V., Strle, F. (2005). Susceptibility of *Borrelia afzelii* strains to antimicrobial agents. *Int. J. Antimicrob. Agents* 25, 474–478.
- Somers, J. G. J. C., Frankena, K, Noordhuizen-Stassen, E. N. and Metz, J. H. M. (2003). Prevalence of claw disorders in Dutch dairy cows exposed to several floor systems. *J. Dairy Sci.* 86, 208-209.
- Von Ah, U., Wirz, D., Daniels, A.U. (2009). Isothermal micro calorimetry – a new method for MIC determinations: results for 12 antibiotics and reference strains of *E. coli* and *S. aureus*. *BMC Microbiol.* 9:106.
- EUROPÄISCHE KOMMISSION (2013). Durchführungsverordnung (EU) Nr. 1033/2013 der Kommission vom 24. Oktober 2013 über die Zulassung von Kupfersulfat-Pentahydrat als alter Wirkstoff zur Verwendung in Biozidprodukten der Produktart 2. Online verfügbar unter

<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013R1033&from=EN>,
zuletzt geprüft am 22.07.2014

BUNDESANSTALT FÜR ARBEITSSCHUTZ UND ARBEITSMEDIZIN (BAuA) (2013): Faltblatt:
Die neue Biozid-Verordnung, Nr. 528/2012. Online verfügbar unter
<http://www.baua.de/de/Publikationen/Faltblaetter/F86.html>, zuletzt geprüft am 21.07.2014.

Sicherheitsdatenblatt KUPFER-(II)-SULFAT gemäß 1907/2006/EG, Artikel 31 Einstufung gemäß
Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 Aquatic Acute 1: H400 Sehr giftig für Wasserorganismen .
Aquatic Chronic 1: H410 Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung. Acute
Tox. 4: H302 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. Skin Irrit. 2: H315 Verursacht
Hautreizungen. Eye Irrit. 2: H319 Verursacht schwere Augenreizung

<http://www.rinderskript.net/skripten/wlInfo/b1-10WI.html>