

Projektkennblatt
der
Deutschen Bundesstiftung Umwelt



| | | | | | |
|----|--------------|---------|-----------|-------------|------------------|
| Az | 32726 | Referat | 32 | Fördersumme | 499.368 € |
|----|--------------|---------|-----------|-------------|------------------|

Antragstitel Verminderung des Einsatzes von Antibiotika in der Geflügelhaltung durch Bakteriophagen

Stichworte Bakteriophagen, *E. coli*, Colibacillose, Antibiotikareduktion, Geflügelmast

| | | | |
|------------------|-----------------|------------------|-----------------|
| Laufzeit | Projektbeginn | Projektende | Projektphase(n) |
| 30 Monate | 1.1.2016 | 30.6.2018 | 1 |

Zwischenberichte **01.02.2017**

| | | | |
|------------------------------|--|----------------|-----------------------------|
| Bewilligungsempfänger | PTC Phage Technology Center GmbH Im Kompetenzzentrum Bio-Security Siemensstrasse 42 59199 Bönen | Tel | 02383 919 174 |
| | | Fax | 02383 919 179 |
| | | Projektleitung | Dr. Hansjörg Lehnerr |
| | | Bearbeiter | Dr. Hans-Christian Schaefer |

Kooperationspartner

FINK TEC GmbH
Oberster Kamp 23
59069 Hamm

Leibniz-Institut DSMZ- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
Inhoffenstrasse 7B
38124 Braunschweig

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover

Zielsetzung und Anlaß des Vorhabens

Der Einsatz von Antibiotika in der Tiermast ist unerwünscht, weil dadurch antibiotikaresistente Bakterien selektioniert werden, die über die Lebensmittelkette auch zum Menschen gelangen können. Trotzdem setzen Tierärzte und Landwirte im Sinne von Tiergesundheit und Tierwohl Antibiotika ein, weil ihnen keine wirksamen Alternativen zur Verfügung stehen. Ziel des Vorhabens war es deshalb einen Bakteriophagencocktail gegen pathogene *Escherichia coli* zu entwickeln um die Tiergesundheit zu fördern und damit den Einsatz von Antibiotika in der Tiermast reduzieren zu können.

Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

Eine breite bakterielle Stammsammlung mit Fokus auf *E. coli* Isolate aus der Geflügelmast, aber auch mit apathogenen und klinischen Isolaten, wurde zusammengestellt. Aus Umweltproben wurden Bakteriophagen spezifisch gegen *E. coli* isoliert und bezüglich ihres Wirtsspektrums gegenüber dieser bakteriellen Stammsammlung, sowie weiterer spezifischer Bakteriophageigenschaften (lytisch oder temperent, Stabilität, Effizienz der Plaquebildung, Wachstumsbedingungen, etc.) charakterisiert. Alle isolierten Bakteriophagen wurden sequenziert und bioinformatisch charakterisiert. Eine Nachweismethode um einen spezifischen *E. coli* Stamm von einer Vielzahl von Stämmen im Mikrobiom des Hähnchendarms zu unterscheiden wurde entwickelt. Ein Bakteriophagencocktail mit hoher Aktivität gegen diesen Zielkeim wurde zusammengestellt. In zwei Versuchen unter kontrollierten Bedingungen wurden Hähnchen mit dem Zielkeim infiziert und die Auswirkungen der Verabreichung des Bakteriophagencocktail auf den Infektionsverlauf, sowie auf weitere Parameter des Hähnchen-Mikrobioms, untersucht. In zwei Feldversuchen unter realen Mastbedingungen wurden die Auswirkungen einer Bakteriophagenfütterung auf den *E. coli*-Kolonisierungsverlauf und auf die Tiergesundheit untersucht.

Ergebnisse und Diskussion

Aus verschiedenen Umweltproben ist es gelungen über 100 Bakteriophagen auf einem breiten Spektrum pathogener und ESBL-bildender *E. coli* zu isolieren. Diese Bakteriophagen wurden morphologisch (Elektronenmikroskopie) begutachtet, auf ihre Stabilität unter variablen Bedingungen (Temperatur, pH, Nährmedium) untersucht und auf ihren Wirtsbereich überprüft. Als Vorbereitung auf die *in-vivo* Versuche wurde ein *E. coli* Zielkeim festgelegt, der sich von andern *E. coli* Stämmen im Hähnchenmikrobiom unterscheiden lies. Daraufhin wurde ein spezifischer Bakteriophagencocktail mit breitem Wirtsspektrum zusammengestellt, in dem jede Einzelkomponente auch in der Lage war den Zielkeim zu lysieren. Die Genome dieser Bakteriophagen wurden sequenziert und bioinformatisch charakterisiert. So konnte sichergestellt werden, dass nur lytische Bakteriophagen zum Einsatz kamen, die auch keine Virulenzfaktoren wie Toxingene oder Antibiotika-Resistenzgene trugen. *In-vitro* Experimente in Flüssigkultur zeigten, dass der so zusammengestellte Cocktail nicht nur hoch wirksam gegen den ausgewählten Zielkeim war, sondern auch kein Wachstum phagen-resistenter Varianten des Zielkeims beobachtet werden konnte. Deshalb wurde dieser Bakteriophagencocktail in zwei Tierversuchen unter kontrollierten Bedingungen präventiv verabreicht. *In vivo* zeigte der Bakteriophagencocktail jedoch nicht die gleiche Effizienz wie *in-vitro*. So konnte die Infektion des Hähnchendarms durch den Zielkeim nicht verhindert werden und einmal etabliert konnte der Zielkeim auch nicht mehr eliminiert werden. Trotz dieses Fehlschlags konnten aus den Versuchen wichtige Erkenntnisse gewonnen werden. So zeigte sich, dass die oral verabreichten Bakteriophagen keine negativen Auswirkungen auf die Tiergesundheit hatten, sich im Hähnchendarm vermehren konnten und dass sich trotz des Selektionsdrucks keine gegen Bakteriophagen resistente Bakterienstämme im Mikrobiom durchsetzen konnten. In einem der Versuche konnte zudem ein nicht erwarteter Effekt des Bakteriophagencocktails, eine Reduktion der *E. coli* Gesamtkonzentration im Hähnchendarm in den ersten Versuchstagen, beobachtet werden. Dieser Effekt konnte jedoch in zwei Feldversuchen in einem kommerziellen Mastbetrieb nicht reproduziert werden, was möglicherweise auf die verzögerte Anwendung der Bakteriophagen im Mastbetrieb, verglichen mit den Versuchen unter kontrollierten Bedingungen, zurückgeführt werden kann. Weitere Versuche werden notwendig sein um das in diesem Projekt etablierte, bisher einzigartige, *in-vivo* Hähnchenmodell besser zu verstehen und damit auch mögliche Anwendungen von Bakteriophagen in der Hähnchenmast zu optimieren und so dem Ziel, den Einsatz von Antibiotika in der Geflügelhaltung zu reduzieren, näher zu kommen.

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

1. Geflügelfleisch - Phagentherapie im Hähnchenstall. Radio Report Deutschlandfunk- Forschung aktuell 21.03.2016.
2. Kittler S., Klein G. (2016) Bakteriophagen-Anwendung in der Veterinärmedizin- Aktuelle Aspekte zu Sicherheit, Beurteilung und Zulassung VbT-Fortbildung Landesverband beamteter Tierärzte Niedersachsen 25.05.2016 Verden, Deutschland (Vortrag)
3. Kittler S, Wittmann J, Mengden RALP, Klein G, Rohde C, Lehnherr H. (2016) The use of bacteriophages as One-Health approach to reduce multidrug-resistant bacteria. Sustainable Chemistry and Pharmacy. 2016 July; DOI: 10.1016/j.scp.2016.06.001
4. Kittler S, Schmidt I, Bierbrodt A, Mengden R, Wittmann J, Lehnherr T, Klein G, Lehnherr H (2016) Bacteriophages for the reduction of multidrug-resistant bacteria in the broiler production. Viruses of Microbes conference 18-22.07.2016 Liverpool UK, Conference proceedings page 95. (Poster)
5. Schmidt I, Kittler S, Bierbrodt A, Mengden RALP, Wittmann J, Lehnherr T, Fink M, Klein G and Lehnherr H (2016) Reduction of ESBL *E. coli* in poultry farming by preventative use of bacteriophages. "Phages 2016" Bacteriophages in Medicine, Food and Biotechnology 6th Annual Conference 7.-8.09.2016 Oxford UK, Conference proceedings page 17-18. (Poster)
6. Mengden R, Kittler S, Klein G (2016) Bakteriophagen im Einsatz gegen ESBL-bildende *Escherichia coli* in der Geflügelmasthaltung. 57. DVG Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene 27.-30.09.2016 Garmisch-Patenkirchen, Deutschland.
7. Schmidt I, Riedel T, Schober I, Bunk B, Spröer C, Bierbrodt A, Lehnherr H, Wittmann J. (2017) Genome Sequence of *Escherichia coli* E28, a Multidrug-Resistant Strain Isolated from a Chicken Carcass, and Its Spontaneously Inducible Prophage. doi: 10.1128/genomeA.00348-17 (Original Artikel)
8. Schmidt I, Bierbrodt A, Wittmann J, Kittler S, Mengden R, Lehnherr T, Fink M, Rohde C, Rohde M, Lehnherr H (2017) Application of phages in poultry farming as One Health approach, 1st German Phage Symposium, University of Hohenheim, Stuttgart, Deutschland
9. Schmidt I, Bierbrodt A, Wittmann J, Kittler S, Mengden R, Lehnherr T, Fink M, Klein G Rohde C, Rohde M, Lehnherr H (2017) Phage application aiming at the reduction of ESBL-producing *E. coli* in livestock farming, Microbiology and Infection 2017 - 5th Joint Conference of the DGHM & VAAM (Vortrag)
10. Wittmann J, Schmidt I, Sabirova J, Bunk B, Spröer C, Rohde M, Rohde C (2017) Isolation, characterisation and genomic analysis of bacteriophages against ESKAPE pathogens, Microbiology and Infection 2017 - 5th Joint Conference of the DGHM & VAAM (Poster)
11. Bierbrodt A, Schmidt I, Kittler S, Mengden R, Wittmann J, Lehnherr T, Fink M, Lehnherr H. (2108) Can a

- phage application reduce ESBL-*E. coli* in a chicken shed? EMBO Workshop Viruses of Microbes Wrocław, Poland (Poster)
12. Schmidt I, Bunk B, Spröer C, Rohde M, Wittmann J (2018) Digging in the dirt for *E. coli* phage diversity – Still something new to discover, EMBO Workshop Viruses of Microbes Wrocław, Poland (Poster)
 13. Lehnherr T, und Lehnherr H. (2018) Can a phage application reduce *E. coli* in a chicken shed? 8th International Annual Conference „Phages 2018“ Bacteriophage in Medicine, Food and Biotechnology, Oxford, UK (Vortrag)
 14. Lehnherr, H. (2018) Bakteriophagen als Antibiotikaersatz in der Geflügelhaltung. DBU Forum „Sanfte Medizin für gesunde Tiere“ Osnabrück, Deutschland (Vortrag)

Fazit

Das Hauptziel des Förderprojekts, die Reduzierung des Antibiotikaeinsatzes in der Hähnchenmast mittels Bakteriophagen, konnte innerhalb der Projektlaufzeit nicht erreicht werden. Aber, die im Projekt erarbeiteten Resultate haben uns diesem Ziel ein großes Stück nähergebracht. Die Isolierung und Charakterisierung neuer Bakteriophagen gegen *E. coli* lieferte nicht nur neues Material für den praktischen Einsatz, sondern auch wichtige Erkenntnisse darüber, wie ein wirksamer Bakteriophagencocktail aufgebaut werden kann. Das neu etablierte In vivo-Mastmodell konnte viele offene Fragen zur Bakteriophagenanwendung beantworten und hat uns auch die Grenzen der In vitro-Voruntersuchungen aufgezeigt. Dieses Modell wird in weiteren Anwendungsversuchen eine wichtige Rolle spielen. Auch die beiden Versuche in der kommerziellen Mast waren in sich nicht erfolgreich, haben uns aber die Richtung aufgezeigt in der erfolgsversprechend weiter geforscht werden kann. Alle Projektpartner werden die in diesem Förderprojekt gestartete Forschung auch nach Projektabschluss weiterführen. Zudem werden die in dem Projekt an der DSMZ isolierten Bakteriophagen in die öffentliche Sammlung der DSMZ aufgenommen und somit der Forschungsgemeinschaft für weiterführende Untersuchungen zugänglich gemacht.

„Verminderung des Einsatzes von Antibiotika in der Geflügelhaltung durch Bakteriophagen“

AZ 32726/01; Abschlussbericht

Projektpartner:

PTC Phage Technology Center GmbH

Siemensstraße 42

D- 59199 Bönen

Tel.: 49 (0) 2383 919 174

Fax: 49 (0) 2383 919 179

FINK TEC GmbH

Oberster Kamp 23

D-59069 Hamm

Tel.: 49 (0) 2385 730

Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

Inhoffenstraße 7B

D-38124 Braunschweig

Tel.: 49 (0) 531 2616 0

Fax: 49 (0) 531 2616 418

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover,

Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit

Bischofsholer Damm 15

D-30173 Hannover

Tel.: 49 (0) 511 856 7257

Fax: 49 (0) 511 856 7694

1. Ausgangslage und Zielsetzung des Projektes

1.1 Antibiotika-Resistenzen, aktuelle Entwicklungen und Verbreitung

Antibiotikaresistente Bakterien sind für die Gesundheit der Bevölkerung, den Verbraucher und die Tiergesundheit ein ernst zu nehmendes Problem, wie die aktuellen Aussagen der WHO [WHO 2014, www.who.int] oder verschiedene zu diesem Thema erschienene Reviews belegen (O'Neill 2014)(Blair et al. 2015). Die Nationalakademie Leopoldina appellierte im Juni 2013 an andere Wissenschaftsakademien der G8-Staaten, das Thema beim G8-Gipfel zu behandeln: Prof. Jörg Hacker sprach von einer der größten Gefahren für die Gesundheit der Weltbevölkerung und einer Gefährdung des medizinischen Fortschritts. Vor allem im Krankenhausumfeld hat das ubiquitäre Auftreten von Antibiotikaresistenzen in der normalen bakteriellen Mikroflora der menschlichen Haut, des Oropharynx und des Darms große Auswirkungen, da sich Patienten mit Immunsuppressionen aufgrund operativer oder intensivmedizinischer Behandlungen häufig durch die eigene Mikroflora infizieren. In der Literatur gibt es vermehrt Hinweise darauf, dass das humane und das tierische Mikrobiom zoonotisch im Austausch stehen und Antibiotikaresistente Bakterien auch über die Lebensmittelkette vom Tier auf den Menschen übertragen werden können (Leverstein-van Hall et al. 2011)(Kola et al. 2012)(Reuland et al. 2014). Trotz des wachsenden Bewusstseins für einen verantwortungsvollen Umgang mit Antibiotika bleibt der Eintrag der Substanzen in Ökosysteme für das Problem kritisch. Vor allem über aquatische Kompartimente wie Tränken, Stallabwässer, Gülle, Bäche, Tümpel, Flüsse und Seen verbreiten sich antimikrobielle Resistenzen schnell weiter, da Bakterien in der Lage sind, über mobile genetische Elemente Selektionsvorteile weiterzugeben. Die Molekularbiologie spricht vom „Mobilom“ und bezeichnet damit die bakterielle Gesamtausstattung mobiler genetischer Elemente, z.B. Plasmide, die von Zelle zu Zelle direkt weitergegeben werden.

1.2 ESBL *E. coli* als Zielorganismus des Vorhabens, seine Rolle bei Zoonosen

Das Auftreten multiresistenter Bakterien wie Extended-Spektrum β -Laktamase (ESBL) oder AmpC-bildenden Enterobakterien (Jacoby 2009), insbesondere *Escherichia coli* und *Salmonella*, wird auch von der Presse und Öffentlichkeit zunehmend als

Bedrohung wahrgenommen. In den letzten zehn Jahren haben die antibiotikaresistenten *Enterobacteriaceae*, im weiten Sinne menschliche und tierische Fäkalkeime, weltweit drastisch zugenommen. Hierbei handelt es sich explizit um sehr schnell vermehrungsfähige und besonders weit verbreitete, sowie anpassungsfähige Bakterien mit diversen Endo- und Exotoxinen, die vielfältige Krankheitssymptome hervorrufen können. ESBL, d.h. die genannten Keime, die den ESBL-Phänotyp ausprägen, haben stark zugenommen (<http://sari.eu-burden.info>), Anstiege wurden z.B. für ESBL-*E. coli* dokumentiert für Resistenzen gegen die Antibiotika Cefuroxim, Cefotaxim und Ciprofloxacin (www.p-e-g.de/resistenz). Im Verlauf 2009 bis 2013 haben fünf Carbapenemasen bei Enterobakterien sehr zugenommen (Neuhauser 2013). Stellen Antibiotikaresistenzen in apathogenen Bakterien noch nicht direkt eine Gefahr dar, so können sie durch unterschiedliche Mechanismen (s.o., mobile genetische Elemente) Resistenzen an pathogene Bakterien weitergeben und so für die Entstehung behandlungsresistenter Krankheitserreger sorgen. Diese lang unterschätzte Tendenz hat bedrohliche Ausmaße angenommen und zeigt sich dramatisch im Krankenhausbereich wo nicht nur MRSA-Staphylokokken (gram-positiv), sondern auch als ESBL- oder MRGN-Erreger (gram-negativ) auftreten. Multiresistente ESBL-Enterobakterien, treten auch in der Tierhaltung auf. Hähnchenfleisch ist das am häufigsten mit ESBL-bildenden Bakterien belastete Fleisch und kann somit wichtig in der Übertragung dieser multiresistenten Bakterien auf den Menschen sein (Overdevest et al. 2011). Der Forschungsverbund RESET (www.reset-verbund.de) gab in Querschnittsstudien der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover und der FU Berlin in den Jahren 2011 und 2012 eine 100% Belastung der beprobten Geflügelbestände mit ESBL-verdächtigen *E. coli* bekannt. Im Zoonose Monitoring des BVL, 2015, wird auf höhere Resistenzraten bei Masthähnchen als bei Mastrindern hingewiesen, sowie auf eine weitere Erhöhung von 2011 auf 2013. Eine Studie in den Niederlanden ergab 79.8%ige Prävalenz von ESBL-Genen in Hähnchenfleisch und identische ESBL-Genmuster in humanen Darmproben (Overdevest et al. 2011). Mehrere β -Laktamase-Varianten konnten 2012 in Deutschland beim Menschen und bei Masttieren, inklusive Geflügel, durch RESET nachgewiesen werden.

Neben dem problematischen Einsatz von Antibiotika und der Optimierung von Hygienemaßnahmen stehen der Masttierhaltung bisher kaum wirksame Keim-Minimierungsmaßnahmen zur Verfügung. Ausgehend von den Zucht- und

Mastbetrieben werden Infektionserreger durch alle Stufen der Lebensmittelkette verteilt und kontaminieren das Endprodukt. Durch kontaminierte Lebensmittel ausgelöste Infektionen beim Verbraucher stellen ein großes Problem dar. Der Fäkalkeim *E. coli* kommt in für den Menschen gefährlichen Varianten vor, wie der in 54 Fällen tödliche EAHEC-Ausbruchstamm (enteroaggregative hemorrhagic E. coli) im Jahr 2011 zeigte (Rasko et al. 2011). Hinzu kommt ein nicht zu unterschätzender Aversionsfaktor gegen Fäkalkeime in der Bevölkerung. Ziel dieses Projektes war die Entwicklung von Maßnahmen zur Reduktion von ESBL durch eine Senkung des Antibiotikaeinsatzes bei Masthähnchen mittels des Einsatzes von Bakteriophagen. Die durch aviär pathogene *E. coli* ausgelöste Colibazillose ist eine häufige Erkrankung von Masthähnchen, die auf Grund der zum Teil hohen Morbidität und Mortalität behandelt werden muss (Dziva and Stevens 2008). Die eingesetzten Antibiotika sind zum Teil von großer Wichtigkeit für die Behandlung schwerer Erkrankungen in der Humanmedizin (WHO 2016) und das Auftreten multiresistente ESBL-*E. coli* Stämme stellt ein ernst zu nehmendes Problem für die Behandlung von Erkrankungen beim Tier und beim Menschen dar.

1.3 Bakteriophagen - ihre Vorteile gegenüber Antibiotika

Bakteriophagen sind ein idealer Ersatz für den Einsatz von Antibiotika, um Bakterien in Tierställen gezielt, ohne Beeinflussung anderer Bakterienspezies, zu reduzieren. Sie kommen überall in der Umwelt und auch natürlich auf Lebensmitteln vor, sie entsprechen damit dem Bedürfnis nach naturnaher Lebensmittelproduktion. Die „Bioverfügbarkeit“ der Phagen kann als sehr effektiv vorausgesagt werden, da Phagen selbst-vermehrend, aber gleichzeitig selbst-limitierend sind. Ihre Vermehrung kann mit Hilfe der verfügbaren bakteriellen Wirtszellen rasant schnell stattfinden, wobei die Bakterienzelle abstirbt. Sind keine Bakterienzellen mehr vorhanden, vermehren sich die Phagen nicht weiter. Die Verbreitung im gesamten tierischen Körper ist erwünscht und auch gegeben und prinzipiell vergleichbar mit der humanmedizinischen Phagenanwendung (Abedon et al. 2011). Damit kann die Flora der gesamten Prozesskette der Fleischverarbeitung positiv für Verbraucher, Umwelt und menschliche Gesundheit gelenkt werden. Als erwünschter Nebeneffekt lässt sich durch den Einsatz von Phagen der Einsatz von Antibiotika in der gesamten Wertschöpfungskette reduzieren. Bakterienreduktion *in-vivo* und unter Feldbedingungen durch Phagen wurde in eigenen Arbeiten der Antragsteller an

Campylobacter und Salmonellen bereits erprobt. Phagenprodukte für lebensmittelassoziierte Keime wie Listerien sind bereits auf dem Markt (Miguéis, Saraiva, and Esteves 2017). Phagen verändern weder chemische, physikalische noch organoleptische Produkteigenschaften. Eine Wirkung auf eukaryotische Zellen (Eukaryonten: sämtliche höhere Lebewesen) ist ausgeschlossen: der Rezeptor fehlt. Ferner sind Phagen die häufigsten lebenden Einheiten auf der Erde (etwa hundertfache Menge verglichen mit dem Bakterienvorkommen), ständig nehmen wir Phagen mit der Nahrung, Wasser und durch Umweltkontakte auf, ohne dabei Nebenwirkungen zu beobachten. Die natürliche Mikrobiota von Mensch und Tier (Darmgesundheit) bleiben unter Phagenanwendung erhalten, da Phagen eine hohe Wirtsspezifität besitzen und selten über die bakterielle Artgrenze wirksam sind. So ist ihr Einsatz eine wirtschaftliche, verbrauchernahe Minimierungsstrategie, auf allen Produktionsstufen einsetzbar, unschädlich und effektiv. Bei der Entwicklung der Phagenpräparate soll jedoch berücksichtigt werden, dass die Phagen nach sorgfältigen Tests in ihrem Wirtsstammspektrum eine Bandbreite diverser Sero- und Pathotypen erreichen, z.B. auch O157:H7-Stämme (EHEC). Aus diesen Gründen ist die Anwendung von Phagencocktails Phagen-Monopräparaten vorzuziehen, zumal ein Einzelphage *E. coli* Vertreter aller Sero- und Pathotypen nicht erreichen kann. Mit der Auswahl der Wirtsstämme zum Screenen neuer Phagen gestaltet sich das Muster der Phagenpräparate. z. B. konnten umgehend neue Phagen gegen den O104:H4 EAHEC-Ausbruchstamm aus dem Jahr 2011 gefunden werden (Merabishvili et al. 2012). Im vorliegenden Vorhaben sollen auch ESBL *E. coli* zum Screenen neuer Phagen verwendet werden.

1.4 Phagen-Mischpräparate (Cocktails) und präventiver Einsatz von Phagen

Der Einsatz von Phagencocktails bietet den entscheidenden Vorteil einer kontinuierlichen und damit präventiven Anwendbarkeit. Dies erscheint auf den ersten Blick problematisch, doch gegen Phagen resistente Bakterien haben häufig wichtige Virulenzfaktoren eingebüßt und besitzen generelle selektive Nachteile gegenüber Phagen-sensitiven Bakterien. Häufig geht die Bildung von Resistenzen gegen Phagen mit einem Funktionsverlust der veränderten Bakterienstruktur einher und kann daher ein Nachteil für die resistenten Bakterien sein, sobald keine Phagen anwesend sind (Hancock and Reeves 1975). In Studien an *Campylobacter* wurde beobachtet, dass die empfänglichen Isolate sich *in-vivo* auf Dauer selbst in Anwesenheit von Phagen

gegen resistente Isolate durchsetzen konnten und dass die Reduktion der Bakterien durch Phagen so nur leicht abgeschwächt aber nicht verhindert wurde (Fischer et al. 2013a)(Kittler et al. 2014). Bei *E. coli* spielt der Verlust der Virulenz durch die Phagenresistenz eine große Rolle (Zhang et al. 2013) und auch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika kann eine Folge der Resistenz sein (Tamaki, Sato, and Matsushashi 1971). Deshalb ist ein präventiver Einsatz von Phagen ohne Nachteile möglich und von der Wirkungseffizienz günstig. Verschiedene Verfahren wurden entwickelt, die die Bildung von Resistenzen gegenüber den Phagen trotzdem weitgehend verhindern sollen.

1. Der Einsatz von Cocktails aus verschiedenen Phagengruppen, so dass die Veränderung einer Struktur für eine Resistenz gegen den verabreichten Cocktail nicht ausreicht (Y. Tanji, T. Shimada, M. Yoichi, K. Miyanaga, K. Hori, H. Unno 2004).
2. Durch die Selektion von wirksamen Phagen auf resistenten Bakterien können zudem solche Phagen ausgewählt oder sogar „gezüchtet“ werden, die bereits Umgehungsmechanismen gegen Resistenzen erworben haben.
3. Von den Antragstellern wurde zudem ein Verfahren entwickelt, durch das sich einfach und mit wenig Material eine regelmäßige Kontrolle auf Resistenzbildung durchführen lässt (Fischer et al. 2013b).
4. Einzelne Phagen im Cocktail können dann jederzeit durch andere, gegen die keine Resistenzen vorliegen, ersetzt werden.

Das präventive Argument spielt besonders in der Tiermasthaltung (Stallhaltung) eine besondere Rolle, da im Gegensatz zum Patienten mit infizierter Wunde oder infiziertem Organ etc. in der Tiermast ein wesentlich höher dimensioniertes Erreger-Reservoir vorliegt. Doch auch bei erfolgreichem Einsatz von Phagen bleibt die Notwendigkeit strenger Stallhygiene und strenger Hygiene während der gesamten Verarbeitungskette bestehen. Phagenpräparate können nur gegen die jeweiligen Zielkeime wirken, weshalb allgemeine Stallhygieneprobleme nicht durch Phagen gelöst werden können.

Das Vorhaben zielt auf die biologische Eliminierung oder starke Reduzierung (Bio-Kontrolle) von *E. coli* ab, da *E. coli* schnell wächst, als Fäkalkeim anzusehen ist und Antibiotikaresistenzen weitergeben kann. Der Focus auf die Primärproduktion bringt bei einer erfolgreichen Anwendung direkte Vorteile in der gesamten

Fleischverarbeitungskette, z. B. kommt es beim Schlachtprozess zu einer Kontamination des Fleisches und würde deshalb von einem reduzierten Keimeintrag enorm profitieren. Die am vorliegenden Projekt beteiligten Partner sind langjährige Experten auf dem Gebiet und die PTC GmbH besitzt die Fermenterkapazität, um Phagen im 100 Liter Maßstab zu produzieren und ermöglicht damit eine direkte Umsetzung der Forschungsergebnisse in praktische Anwendungen.

2. Material und Methoden

2.1 *E. coli* Stämme zur Isolation und Charakterisierung von Phagen

Zur Isolation neuer Phagen wurden bei der Phage Technology Center GmbH die Stämme E50, E51 und E53 verwendet, bei denen es sich um nicht sequenzierte ESBL-*E. coli* Wildisolate von Geflügelfleisch handelt, sowie die Stämme ECOR-06 und ECOR-17 aus der *E. coli* Collection of Reference (ECOR) (Ochman and Selander 1984)(Lai, Wang, and Uhlin 1999)(Mazel et al. 2000). Zur Charakterisierung wurden insgesamt 47 ESBL-bildende *E. coli* Wildisolate aus der Stammsammlung der Phage Technology Center GmbH verwendet (E7-E44; E49-E57), von denen zehn Stämme im Zuge des Projektes durch die Alere Technology GmbH (Jena, Thüringen) typisiert wurden (s. Absatz 2.3.1). Zehn ebenfalls typisierte ESBL-bildende *E. coli* Stämme aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Leibniz-Institut DSMZ, Braunschweig) (E192-E200) wurden sowohl zur Isolation als auch Charakterisierung von Phagen genutzt.

Zur Isolation von Phagen wurden am Leibniz-Institut DSMZ sowohl der Laborstamm K12, als auch Wildisolate (APEC- und ESBL-Isolate von Schlachtkörpern (DSM 103242-103266) und klinische Isolate (DSM 101101-101142) verwendet um eine möglichst große Vielfalt an Phagen isolieren zu können.

APEC (Avian pathogenic *Escherichia coli*) – Stämme, die im Zeitraum vom Juli 1999 bis März 2005 in Deutschland isoliert wurden, wurden von Prof. Dr. Marcus Fulde (Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Freie Universität Berlin) zur Verfügung gestellt.

Patientenisolate, welche im Zeitraum von August bis September 2015 in Kliniken im Raum Hildesheim/Hameln gesammelt wurden, wurden von Dr. med. H.-M. Groß (Partnerschaftspraxis für Laboratoriumsmedizin und Mikrobiologie, Hildesheim/Hameln) analysiert und bereitgestellt.

Eine Liste aller typisierten Stämme, der verwendeten ECOR-Stämme, welche 2015 durch das Bundesamt für Verbraucherschutz bewertet wurden [BVL, 2015], und aller APEC-Stämme ist im Folgenden in **Tabelle 1** dargestellt. Antibiotikaresistenzen von Patientenisolaten wurden in **Tabelle 2** aufgeführt.

Tabelle 1: Stammliste Phagenisolation und –charakterisierung (NM=nicht motil [BVL, 2015]).

| Bezeichnung | alternative Bezeichnung | Wirt | Material/ Vorbericht | Datum | Region | Serotyp | Bemerkung |
|-----------------------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------|------------|-----------------|-------------------------------|--|
| E1/ DSM 6897 | DH5 α | | | | - | - | Laborstamm |
| E7/ DSM 103242 | Wildisolat | Huhn | Schlachtkörper | 17.09.2012 | Niederlande | O:H48 | ESBL <i>blaSHV</i> |
| E8/ DSM 103243 | Wildisolat | Huhn | Schlachtkörper | 17.09.2012 | Niederlande | O:H48 | ESBL <i>blaSHV</i> |
| E17/ DSM 103244 | Wildisolat | Huhn | Schlachtkörper | 17.09.2012 | Belgien | O:H39 | ESBL <i>blaTEM</i> |
| E18/ DSM 103245 | Wildisolat | Huhn | Schlachtkörper | 17.09.2012 | Belgien | O:H39 | ESBL <i>blaTEM</i> |
| E28/ DSM 103246 | Wildisolat | Huhn | Schlachtkörper | 08.10.2012 | Deutschland | O:H34 | ESBL <i>ctxM9</i> |
| E29/ DSM 103247 | Wildisolat | Huhn | Schlachtkörper | 08.10.2012 | Deutschland | O:H7 | ESBL <i>blaTEM</i> |
| E37/ DSM 103248 | Wildisolat | Huhn | Schlachtkörper | 08.10.2012 | Frankreich | O:H10 | ESBL <i>blaTEM</i> |
| E43/ DSM 103249 | Wildisolat | Huhn | Schlachtkörper | 08.10.2012 | Frankreich | O:H10 | ESBL <i>ctxM9 + blaTEM</i> |
| E45/ DSM 18039 | MG1655 | | | | - | - | Laborstamm, F ⁽⁺⁾ , λ ⁽⁻⁾ |
| E50/ DSM 103250 | Wildisolat | Huhn | Schlachtkörper | 13.01.2014 | Niederland | O:H25 | ESBL <i>blaCTX-M1</i> , <i>blaCTX-M15</i> |
| E53/ DSM103251 | Wildisolat | Huhn | Schlachtkörper | 13.01.2014 | Niederlande | O91:H7 | ESBL <i>blaCTX-M1</i> , <i>blaCTX-M15</i> |
| E119 | ECOR-06 | Mensch (gesund) | Stuhl | - | USA (Iowa) | O173:H ⁻ | Gruppe A Stamm; Risikogruppe 1 [BVL, 2015] |
| E130 | ECOR-17 | Schwein (gesund) | Kot | - | Indonesien | O106:NM | Gruppe A Stamm; Risikogruppe 1 [BVL, 2015] 1 |
| E141/ DSM 103898 | ECOR-28 | Mensch (gesundes Kind) | Stuhl | - | USA (Iowa) | O104:NM | Gruppe B1; Risikogruppe 1 [BVL, 2015] |
| E142/ DSM 103899 | ECOR-29 | Kängururatt e (gesund) | Kot | - | USA (Nevada) | O150:H21 | Gruppe B1 Stamm; Risikogruppe 1 [BVL, 2015] |
| E160/ DSM 103252 | ECOR-47 | Schaf | unbekannt | | New Guinea | ONT:H18 | Group D strain from a healthy sheep |
| E185/ DSM 103253 | ECOR-72 | Mensch | unbekannt | | Schweden | O144:H8 | Group B1 strain from a patient with a UTI and acute pyelonephritis |
| DSM 101101 | | Mensch | Urin | 25-09-2016 | Deutschland | O25:H4 | ESBL, Risikogruppe 2 |
| DSM 101102 | | Mensch | | 25-09-2016 | Deutschland | O102:H ^{NT} | ESBL, Risikogruppe 2 |
| DSM 101103 | | Mensch | | 25-09-2016 | Deutschland | O ^{NT} :H4 | ESBL, Risikogruppe 2 |
| DSM 101104 | | Mensch | Urin | 29-09-2015 | Deutschland | O7:H5 | ESBL, Risikogruppe 2 |
| DSM 101105 | | Mensch | | 29-09-2015 | Deutschland | O ^{NT} :H4 | ESBL, Risikogruppe 2 |
| DSM 101106 | | Mensch | Urin | 28-09-2015 | Deutschland | O75:H9 var. 7 | ESBL, Risikogruppe 2 |
| DSM 101107 | | Mensch | Urin | 28-09-2015 | Deutschland | O ^{rough} :H6 | ESBL, Risikogruppe 2 |
| DSM 101108 | | Mensch | Urin | 30-09-2015 | Deutschland | O25:H4 | ESBL, Risikogruppe 2 |
| DSM 101109 | | Mensch | Urin | 30-09-2015 | Deutschland | O25:H4 | ESBL, Risikogruppe 2 |
| DSM 101110 | | Mensch | | 01-10-2015 | Deutschland | O ^{NT} :H9 var. 7 | ESBL, Risikogruppe 2 |
| DSM 101111 | | Mensch | | 01-10-2015 | Deutschland | O25:H4 | ESBL <i>blaCTX-M1</i> , - <i>M15</i> , Risikogruppe 2 |

| | | | | | | | |
|---------------------|---------------|---------------------|---------------------------------|------------|-------------|------------------------|---|
| DSM 101112 | | Mensch | | 01-10-2015 | Deutschland | O25:H4 | ESBL <i>bla</i> CTX-M1, -M15, Risikogruppe 2 |
| DSM 101113 | | Mensch | | 18-09-2015 | Deutschland | O25:H4 | ESBL <i>bla</i> CTX-M1, -M15, <i>bla</i> TEM, Risikogruppe 2 |
| DSM 101114 | | Mensch | | 22-09-2015 | Deutschland | O25:H4 | ESBL <i>bla</i> CTX-M1, -M15, <i>bla</i> TEM, Risikogruppe 2 |
| DSM 101115 | | Mensch | | 23-09-2015 | Deutschland | O75:H9 var. 7 | ESBL, Risikogruppe 2 |
| DSM 101116 | | Mensch | | 24-09-2015 | Deutschland | ONT:H15 | ESBL, Risikogruppe 2 |
| DSM 101117 | | Mensch | Urin | 11-09-2015 | Deutschland | O25:H4 | ESBL, Risikogruppe 2 |
| DSM 101118 | | Mensch | | 12-09-2015 | Deutschland | O25:H4 | ESBL, Risikogruppe 2 |
| DSM 101120 | | Mensch | | 17-09-2015 | Deutschland | O25:H4 | ESBL <i>bla</i> CTX-M1, -M15, <i>bla</i> TEM, Risikogruppe 2 |
| DSM 101121 | | Mensch | | 09-09-2015 | Deutschland | ONT:H1 | ESBL <i>bla</i> CTX-M1, -M15, <i>bla</i> TEM, Risikogruppe 2 |
| DSM 101122 | | Mensch | | 10-09-2015 | Deutschland | O7:H5 | ESBL <i>bla</i> CTX-M1, -M15, <i>bla</i> TEM, Risikogruppe 2 |
| DSM 101123 | | Mensch | | 10-09-2015 | Deutschland | O7:H5 | ESBL, Risikogruppe 2 |
| DSM 101124 | | Mensch | Urin | 29-08-2015 | Deutschland | ONT:H15 | ESBL <i>bla</i> CTX-M1, -M15, Risikogruppe 2 |
| DSM 101125 | | Mensch | | 28-08-2015 | Deutschland | ONT:H9 var. 7 | ESBL, Risikogruppe 2 |
| DSM 101126 | | Mensch | Urin | 29-08-2015 | Deutschland | O75:H9 var. 7 | ESBL, Risikogruppe 2 |
| DSM 101127 | | Mensch | | 02-09-2015 | Deutschland | O25:H4 | ESBL, Risikogruppe 2 |
| DSM 101128 | | Mensch | | 02-09-2015 | Deutschland | O25:H4 | ESBL, Risikogruppe 2 |
| DSM 101129 | | Mensch | Urin | 03-09-2015 | Deutschland | O25:H4 | ESBL, Risikogruppe 2 |
| DSM 101131 | | Mensch | Urin | 22-08-2015 | Deutschland | O25:H4 | ESBL, Risikogruppe 2 |
| DSM 101132 | | Mensch | | 22-08-2015 | Deutschland | O _{rough} :H4 | ESBL, Risikogruppe 2 |
| DSM 101133 | | Mensch | | 22-08-2015 | Deutschland | ONT:H18 | ESBL, Risikogruppe 2 |
| DSM 101134 | | Mensch | Urin | 23-08-2015 | Deutschland | O7:H5 | ESBL, Risikogruppe 2 |
| DSM 101135 | | Mensch | Urin | 23-08-2015 | Deutschland | O25:H4 | ESBL, Risikogruppe 2 |
| DSM 101136 | | Mensch | Urin | 23-08-2015 | Deutschland | O25:H4 | ESBL, Risikogruppe 2 |
| DSM 101137 | | Mensch | | 23-08-2015 | Deutschland | ONT:H18 | ESBL, Risikogruppe 2 |
| DSM 101138 | | Mensch | | 27-08-2015 | Deutschland | O1:H6 | ESBL, Risikogruppe 2 |
| DSM 101139 | | Mensch | | 24-08-2015 | Deutschland | O1:H6 | ESBL <i>bla</i> CTX-M1, -M15, Risikogruppe 2 |
| DSM 101140 | | Mensch | | 24-08-2015 | Deutschland | ONT:H6 | ESBL, Risikogruppe 2 |
| DSM 101141 | | Mensch | | 23-08-2015 | Deutschland | O15:H1 | ESBL, Risikogruppe 2 |
| DSM 101142 | | Mensch | | 27-08-2015 | Deutschland | ONT:H4 | ESBL, Risikogruppe 2 |
| E201 | K12 wildtype/ | | | | DSMZ | | Laborstamm, <i>E. coli</i> |
| DSM 498 | IMG1711 | | | | | | (Migula 1895) Castellani and Chalmers 1919 |
| A2133/ DSM103254 | APEC | Huhn, 5 Tage | Luftsack, Luftsackentzündung | | Deutschland | O78++ | astA -, CDTIII -, CNF1/2 -, FyuA -, irp2 -, hlyA -, aer +, tsh +, fimC +, papC +, hlyE -, stx2f - |
| A2248/ DSM103255 | APEC | Huhn | Peritoneum, Peritonitis | | Deutschland | O78++ | astA +, CDTIII -, CNF1/2 -, FyuA +, irp2 +, hlyA -, aer +, tsh +, fimC +, papC -, hlyE -, stx2f - |
| A2285/ DSM103256 | APEC | Huhn, Legehennen | Keimisolat | | Freising | O2:K1 | |
| A2293/ DSM103257 | APEC | Huhn, Legehennen | Kehllappen | | Cuxhafen | O2:K1 | |
| A2469/ DSM103258 | APEC | Broiler | Tupfer | | Ludwigslust | O2:K1 | |

| | | | | | | |
|------------------------------------|------|--------------------|---------------------------------|-------------|---------|---|
| A2494/ DSM103259 | APEC | Legehennen | Knochenmarktufer | Cuxhafen | O2 | |
| A2540/ DSM103260 | APEC | Huhn, 38 Wochen | Herzblut, Peritonitis | Deutschland | O1:H- | astA +, CDTIII -, CNF1/2 -, FyuA +, irp2 +, hlyA -, aer +, tsh +, fimC +, papC +, hlyE -, stx2f - |
| A4498/ DSM103261 | APEC | Huhn, Mastelertier | Unbekannt, Coliseptikämie | Deutschland | O2:K1 | |
| A4500/ DSM103262 | APEC | Huhn, Mastelertier | Unbekannt, Coliseptikämie | Deutschland | O1:K1 | |
| A4507/ DSM103263 | APEC | Huhn, Mastelertier | Herzblut, Coliseptikämie | Deutschland | O78:K80 | aerA+, tsh+ |
| A5211/ DSM103264 | APEC | Huhn, Legehennen | Keimisolat, Coliseptikämie | Berlin | O1:K1 | |
| A9062/ DSM103265 | APEC | Taube | Keimisolat, Jungtaubenkrankheit | Deutschland | O1:H15 | Col-, Hly-, |
| A10400/ DSM103266 | APEC | Huhn | Keimisolat, Peritonitis | Erfurt | O2 | astA-, iss +, irp2 +, papC -, iuc D +, tsh +, vat -, cvi/cva + |

Tabelle 2: Klinische ESBL-*E.coli*-Stämme: Die Untersuchung auf Antibiotikaempfindlichkeit (AST: antimicrobial susceptibility testing) wurde mittels VITEK 2 (Biomerieux) unter Verwendung von AST-N263 bzw. AST-N214 Karten (Biomerieux) durchgeführt und die Ergebnisse anhand der MHK-Interpretationsrichtlinie GLOBAL 2014 D in die Kategorien sensibel (S), intermediär (I) und resistent (R) eingeordnet (- = unbekannt).

| Nummer | Material | Amoxicillin | Ampicillin | Amoxicillin/Clavulansäure | Ampicillin/Sulbactam | Piperacillin | Piperacillin/Tazobactam | Cefaclor | Cefalexin | Cefazolin | Cefuroxim | Cefuroxim-Axeil | Cefixim | Cefpodoxim | Cefotaxim | Ceftazidim | Ceftriaxon | Cefepim | Imipenem | Meropenem | Gentamicin | Ciprofloxacin | Levofloxacin | Moxifloxacin | Ofloxacin | Tigecycline | Fosfomycin | Nitrofurantoin | Trimethoprim/Sulfamthoxazol | Ertapenem | Amikacin | Tetracyclin |
|---------------------------|----------|-------------|------------|---------------------------|----------------------|--------------|-------------------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------------|---------|------------|-----------|------------|------------|---------|----------|-----------|------------|---------------|--------------|--------------|-----------|-------------|------------|----------------|-----------------------------|-----------|----------|-------------|
| 150956148-1/ DSM101101 | U | R | R | R | R | R | I | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | S | R | R | R | R | R | S | S | S | S | - | - | - |
| 150956861-1/ DSM101102 | - | R | R | R | R | R | I | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | S | R | R | R | R | R | S | S | S | R | - | - | - |
| 150956862-1/ DSM101103 | - | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | S | R | R | R | R | R | S | S | S | R | - | - | - |
| 150957224-1/ DSM101104 | U | R | R | R | R | R | I | R | R | R | R | R | R | R | R | I | R | R | S | S | S | R | R | R | R | S | S | S | S | - | - | - |
| 150957236-1/ DSM101105 | - | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | S | R | R | R | R | R | S | S | S | R | - | - | - |
| 150957238-1/ DSM101106 | U | R | R | R | R | R | I | R | R | R | R | R | R | R | R | I | R | R | S | S | S | R | R | R | R | S | S | S | R | - | - | - |
| 150957249-1/ DSM101107 | U | R | R | R | R | R | I | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | S | R | R | R | R | R | S | S | S | S | - | - | - |
| 150957672-1/ DSM101108 | U | R | R | R | R | R | I | R | R | R | R | R | R | R | R | I | R | R | S | S | S | R | R | R | R | S | S | S | R | - | - | - |
| 150957676-1/ DSM101109 | U | R | R | R | R | R | I | R | R | R | R | R | R | R | R | I | R | R | S | S | S | R | R | R | R | S | S | S | R | - | - | - |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 150957680-1/ DSM101110 | - | R | R | R | R | R | I | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | S | S | R | R | R | R | I | S | S | R | - | - | - | | |
| 150958145-1/ DSM101111 | - | R | R | R | R | R | I | R | - | R | R | R | R | R | R | I | R | R | S | S | S | R | R | - | R | S | - | - | R | S | - | R | | |
| 150958246-1/ DSM101112 | - | R | R | R | R | R | I | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | S | S | R | R | R | R | S | S | S | R | - | - | - | | |
| 150954596-1/ DSM101113 | - | R | R | R | R | R | I | R | - | R | R | R | R | R | R | I | R | R | S | S | S | R | R | - | R | S | - | - | R | S | - | S | | |
| 150955505-1/ DSM101114 | - | R | R | R | R | R | I | R | - | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | S | R | R | R | - | R | S | - | - | R | S | - | R | | |
| 150956164-1/ DSM101115 | - | R | R | R | R | R | I | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | S | R | R | R | R | R | S | S | S | R | - | - | - | | |
| 150956255-1/ DSM101116 | - | R | R | R | R | R | I | R | - | R | R | R | R | R | R | I | R | R | S | S | R | R | R | - | R | S | - | - | R | S | - | R | | |
| 150952599-1/ DSM101117 | U | R | R | R | R | R | I | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | S | S | R | R | R | R | S | S | S | R | - | - | - | | |
| 150953360-1/ DSM101118 | - | R | R | R | R | R | I | R | - | R | R | R | R | R | R | I | R | R | S | S | S | R | R | - | R | S | - | - | R | S | - | S | | |
| 150953477-1/ DSM101119 | - | R | R | R | R | R | I | R | - | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | S | S | R | R | - | R | S | - | - | R | S | - | S | | |
| 150953862-1/ DSM101120 | - | R | R | R | R | R | I | R | - | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | S | S | R | R | - | R | S | - | - | R | S | - | R | | |
| 150951823-1/ DSM101121 | - | R | R | R | R | R | I | R | - | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | S | S | S | S | - | S | S | - | - | S | S | - | R | | |
| 150952271-1/ DSM101122 | - | R | R | R | R | R | I | R | - | R | R | R | R | R | R | I | R | R | S | S | S | R | R | - | R | S | - | - | S | S | - | S | | |
| 150952587-1/ DSM101123 | - | R | R | R | R | R | I | R | R | R | R | R | R | R | R | I | R | R | S | S | S | R | R | R | R | S | S | S | S | - | - | - | | |
| 150856982-1/ DSM101124 | U | R | R | R | R | R | I | R | R | R | R | R | R | R | R | I | R | R | S | S | R | R | R | R | R | S | S | S | R | S | - | R | | |
| 150857063-1/ DSM101125 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| 150857279-1/ DSM101126 | U | R | R | R | R | R | I | R | R | R | R | R | R | R | R | I | R | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | - | - | - |
| 150950278-1/ DSM101127 | - | R | R | R | R | R | I | R | - | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | S | S | R | R | - | R | S | - | - | S | S | - | R | | |
| 150950280-1/ DSM101128 | - | R | R | R | R | R | I | R | - | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | S | S | R | R | - | R | S | - | - | S | S | - | R | | |
| 150950189-1/ DSM101129 | U | R | R | R | R | R | I | R | R | R | R | R | R | R | R | I | R | R | S | S | S | R | R | R | R | S | S | S | R | - | - | - | | |
| 150950545-1/ DSM101130 | - | R | R | R | R | R | I | R | R | R | R | R | R | R | R | I | - | - | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | - | - | - | |
| 150855253/ DSM101131 | U | R | R | R | R | R | I | R | R | R | R | R | R | R | R | I | R | R | S | S | S | R | R | R | R | S | S | S | R | - | - | - | | |
| 150855388/ DSM101132 | - | R | R | R | R | R | I | R | - | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | S | S | R | R | - | R | S | - | - | R | S | - | R | | |
| 150854431/ DSM101133 | - | R | R | R | R | R | I | R | R | R | R | R | R | R | R | I | R | R | S | S | R | S | S | S | S | S | S | S | I | R | - | - | - | |
| 150855571/ DSM101134 | U | R | R | R | R | R | I | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | - | - | - | |
| 150855573/ DSM101135 | U | R | R | R | R | R | I | R | R | R | R | R | R | R | R | I | R | R | S | S | S | R | R | R | R | S | S | S | S | - | - | - | | |
| 150855602/ DSM101136 | U | R | R | R | R | R | I | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | S | S | R | R | R | R | S | S | S | R | - | - | - | | |
| 150855610/ DSM101137 | - | R | R | R | R | R | I | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | S | S | R | R | R | R | S | S | I | R | - | - | - | | |
| 150856560/ DSM101138 | - | R | R | R | R | R | I | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | S | S | R | R | R | R | S | S | S | R | - | - | - | | |

E. coli- Kultur etwa 50-fach vervielfältigt und mit Biotin-11-dUTP markiert. Durch die Verwendung von nur einem Antisense- Primer ist das Produkt einzelsträngige, markierte DNA, welche an DNA Oligonukleotide des Mikroarrays hybridisiert wird. Dabei wird die Serogenotypisierung als Einzelbestimmung und die Ermittlung von Resistenz- und Virulenzgenen als Duplikat durchgeführt. Die Spotidentifikation erfolgt automatisch anhand eines Digitalfotos des Arrays.

2.3.2 Biolog/Omnilog-Assay

Das OmniLog™ ID System (Biolog) erlaubt unter Verwendung der GEN III MicroPlate™ (Biolog) die standardisierte Phänotypisierung von Bakterien mittels 94 verschiedener biochemischer Tests (71 Kohlenstoffquellen, 23 Chemikalien-Sensitivitätstests) in einem 96-well Format. Die dazu nötigen Nährstoffe/Chemikalien befinden sich in getrockneter Form in der Platte. Ein Tetrazolium-Redoxfarbstoff indiziert kolorimetrisch die Nutzung der Kohlenstoffquellen bzw. die Resistenz gegenüber inhibitorischen Substanzen. Der Farbstoff ist im oxidierten Zustand löslich und farblos. Wird er jedoch durch NADH/NADPH stoffwechselaktiver Bakterien reduziert, bilden sich violette Kristalle aus, deren Farbintensität durch das Gerät ermittelt wird.

Am Vorabend wurde ein Vereinzelausstrich auf einer TSB-Agarplatte mit dem zu untersuchenden *E. coli*-Stamm angelegt und bei 37°C inkubiert. Einzelkolonien wurden am nachfolgenden Tag in Inokulationsflüssigkeit IF-A (Biolog) suspendiert und mit Hilfe eines Trübungsmessgerätes (Biolog) auf eine Transmission von 90 % eingestellt. Diese Suspension wurde den Angaben des Herstellers folgend in eine GEN III MicroPlate™ (Biolog) überführt und bei 37°C für 48 h im OmniLog™ ID System (Biolog) inkubiert. Alle 15 Minuten wurde der Intensitätsverlauf des Redoxfarbstoffes automatisch gemessen. Daten wurden mit Hilfe des Programmes pmm_kinetik.exe und des R-Pakets opm analysiert und der Kurvenverlauf visualisiert. Die Plattenbelegung ist in **Abbildung 1** dargestellt.

GEN III MicroPlate™

| | | | | | | | | | | | |
|--|------------------------------------|--------------------------------------|---|-----------------------------------|------------------------------------|--|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|
| A1 Negative Control | A2 Dextrin | A3 D-Maltose | A4 D-Trehalose | A5 D-Cellobiose | A6 Gentobiose | A7 Sucrose | A8 D-Turanose | A9 Stachyose | A10 Positive Control | A11 pH 6 | A12 pH 5 |
| B1 D-Raffinose | B2 α -D-Lactose | B3 D-Melibiose | B4 β -Methyl-D-Glucoside | B5 D-Salicin | B6 N-Acetyl-D-Glucosamine | B7 N-Acetyl- β -D-Mannosamine | B8 N-Acetyl-D-Galactosamine | B9 N-Acetyl Neuraminic Acid | B10 1% NaCl | B11 4% NaCl | B12 8% NaCl |
| C1 α -D-Glucose | C2 D-Mannose | C3 D-Fructose | C4 D-Galactose | C5 3-Methyl Glucose | C6 D-Fucose | C7 L-Fucose | C8 L-Rhamnose | C9 Inosine | C10 1% Sodium Lactate | C11 Fusidic Acid | C12 D-Serine |
| D1 D-Sorbitol | D2 D-Mannitol | D3 D-Arabitol | D4 myo-Inositol | D5 Glycerol | D6 D-Glucose-6-PO4 | D7 D-Fructose-6-PO4 | D8 D-Aspartic Acid | D9 D-Serine | D10 Troleandomycin | D11 Rifamycin SV | D12 Minocycline |
| E1 Gelatin | E2 Glycyl-L-Proline | E3 L-Alanine | E4 L-Arginine | E5 L-Aspartic Acid | E6 L-Glutamic Acid | E7 L-Histidine | E8 L-Pyroglytamic Acid | E9 L-Serine | E10 Lincomycin | E11 Guanidine HCl | E12 Niaproof 4 |
| F1 Pectin | F2 D-Galacturonic Acid | F3 L-Galactonic Acid Lactone | F4 D-Gluconic Acid | F5 D-Glucuronic Acid | F6 Glucuronamide | F7 Mucic Acid | F8 Quinic Acid | F9 D-Saccharic Acid | F10 Vancomycin | F11 Tetrazolium Violet | F12 Tetrazolium Blue |
| G1 β -Hydroxy-Phenylacetic Acid | G2 Methyl Pyruvate | G3 D-Lactic Acid Methyl Ester | G4 L-Lactic Acid | G5 Citric Acid | G6 α -Keto-Glutaric Acid | G7 D-Malic Acid | G8 L-Malic Acid | G9 Bromo-Succinic Acid | G10 Nalidixic Acid | G11 Lithium Chloride | G12 Potassium Tellurite |
| H1 Tween 40 | H2 γ -Amino-Butyric Acid | H3 α -Hydroxy-Butyric Acid | H4 β -Hydroxy-D,L-Butyric Acid | H5 α -Keto-Butyric Acid | H6 Acetoacetic Acid | H7 Propionic Acid | H8 Acetic Acid | H9 Formic Acid | H10 Aztreonam | H11 Sodium Butyrate | H12 Sodium Bromate |

Abbildung 1: Belegung einer GEN III MicroPlate™.

2.3.3 Überprüfung von Wildstämmen auf die Bildung von ESBL

APEC-Stämme und Isolate von Geflügelfleisch wurden mit Hilfe des Extended β Lactam ID Kits (CPD10, Mast Diagnostika GmbH) den Herstellerangaben folgend auf die Fähigkeit der ESBL-Bildung untersucht.

2.3.4 Antibiogramm

Die Testung der Antibiotikaempfindlichkeit der *E. coli*-Stämme wurde mit dem Agar-Diffusionstest in Anlehnung an den deutschen Standard DIN 58940 durchgeführt. 1 ml einer 10^{-3} verdünnten Übernachtskultur wurde auf einer Müller-Hinton-Agar-Platte (38 g/l Müller-Hinton-Agar (OXOID)) gleichmäßig verteilt und der Überstand entfernt. Nach dem vollständigen Trocknen der Platten wurden diese mit jeweils drei Antibiotika-Plättchen (alle OXOID) bestückt. Folgende Antibiotika wurden dabei untersucht:

Penicillin G (10 IE), Oxacillin (5 μ g), Ampicillin (10 μ g), Ticarcillin (75 μ g), Mezlocillin (30 μ g), Cefalotin (30 μ g), Cefazolin (30 μ g), Cefotaxime (30 μ g), Aztreonam (30 μ g), Imipenem (10 μ g), Tetracyclin (30 μ g), Chloramphenicol (30 μ g), Gentamycin (10 μ g), Amikacin (30 μ g), Vancomycin (30 μ g), Erythromycin (15 μ g), Lincomycin (15 μ g), Ofloxacin (5 μ g), Norfloxacin (10 μ g), Colistin (10 μ g), Pipemidsäure (20 μ g), Nitrofurantoin (100 μ g), Bacitracin (10 IE), Polymyxin B (300 IE), Kanamycin (30 μ g),

Neomycin (30 µg), Doxycyclin (30 µg), Ceftriaxone (30 µg), Clindamycin (10 µg), Fosfomycin (50 µg), Moxifloxacin (5 µg), Linezolid (10 µg), Nystatin (100 IE), Quinupristin/Dalfopristin (15 µg), Teicoplanin (30 µg), Piperacillin/Tazobactam (40 µg). Nach der Inkubation bei 37°C für 18 h wurde der Hemmhofdurchmesser bestimmt.

2.3.5 Medien und Kulturanzucht

2.3.5.1 LB-Nährmedien

Die Anzucht von *E. coli* und Phagen erfolgte in LB Flüssigmedium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl). LB-Festmedien enthielten zudem 1,5 % Agar-Agar Kobe I, während bei der Phagenquantifizierung LB-Topagar (0,3 % Agar-Agar Kobe I, 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl) verwendet wurde.

2.3.5.2 TSB-Nährmedien

Die Anzucht von *E. coli* und Phagen erfolgte in TSB-Flüssigmedium (30 g/l Tryptone Soya Broth (Thermo Scientific, OXOID)). TSB-Festmedien enthielten zudem 1,5 % Agar, während bei der Phagenquantifizierung TSB-Topagar mit 0,3 % oder 0,75 % Agar verwendet wurde.

2.4 Phagenvermehrung

Zur Herstellung einer neuen Phagencharge wurde ein Kolben mit LB-Medium mit einer ü. N. Kultur des Wirtsbakteriums 1:100 beimpft und bei 37°C und 150 rpm im Schüttler bebrütet. Die Zugabe der Phagen erfolgte bei einer optischen Dichte (OD) von 0,3 im Verhältnis 1:100, wobei das Wachstum der Kultur halbstündlich durch Bestimmung der OD₆₀₀ überprüft wurde. Bei deutlicher Abnahme der Werte, bzw. einer sichtbaren Klärung etwa 1-2 Stunden nach Phagenzugabe, wurde zur Vervollständigung der Lyse der infizierten Zellen Chloroform im Verhältnis 1:1000 zugegeben. Anschließend wurden Zelldebris bei 10.000 rpm für 20 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein steriles Gefäß überführt und nach Zugabe von Chloroform bei 4°C gelagert. Gebrauchsmengen der Phagen wurden vor Verwendung steril filtriert. Gemäß Punkt 2.6.1 wurden standardmäßig die Titer neuer Chargen auf ihren Wirtstämmen bestimmt. Zur Herstellung eines neuen Phagen-Lysats wurde am Vortag der Wirt aus einer Glycerinkultur auf einer TSB-Platte fraktioniert ausgestrichen und bei 37°C für etwa 18 Stunden inkubiert. Davon wurde Material abgenommen und 20 ml TSB-

Medium damit beimpft. Nach etwa zweistündiger Inkubation bei 37°C und 123 rpm wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauerkammer bestimmt und die Wirtsbakterien durch Zugabe der entsprechenden Menge Phagenlysats mit der MOI 0,1 infiziert. Zur Adsorption wurde nach der Phagenzugabe etwa 10 min bei RT inkubiert, bevor die Kultur bei 37°C und 123 rpm bebrütet wurde. Das Wachstum des Bakteriums wurde regelmäßig bewertet und bis zur sichtbaren Klärung bzw. für 4-5 Stunden inkubiert. Das Lysat wurde entweder ü. N. bei 10°C gelagert oder direkt zentrifugiert (8000 rpm, 10 min) und sterilfiltriert (0,45 µm, MinisartCA Sartorius AG, Göttingen). Lysate wurden bei 10°C gelagert.

2.5 Phagenisolation aus Umweltproben

Zur Isolation von Phagen aus Oberflächenwasser, Klärwasser oder Klinikabwasser wurden die Proben bei 8000 rpm für 10 min zentrifugiert (Heraeus™ Biofuge Primo™R, Thermo Scientific™) und anschließend sterilfiltriert (0,45 µm, MinisartCA Sartorius AG, Göttingen).

Geflügelkot wurde zunächst zu gleichen Teilen mit SM-Puffer (0,1 M NaCl, 8 mM MgSO₄*7H₂O, 50 mM Tris-HCl, pH7,5) versetzt und aufgeschlämmt. Nach etwa 4 stündiger Inkubation bei Raumtemperatur und 150 rpm wurde die Probe wie oben beschrieben zweifach zentrifugiert und sterilfiltriert.

Um Phagen aus (Schweine-) Gülle zu isolieren, wurden die Proben zweimal bei 8000 rpm für 10 min zentrifugiert. Da es nicht möglich war die so erhaltenen Überstände zu filtrieren, wurden diese mit 1% (v/v) Chloroform versetzt und bei Raumtemperatur und 100 rpm für 30 min geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand für die erste Anreicherung verwendet.

Als Anreicherungskultur wurde die Probe mit dem identischen Volumen an 2fach konzentriertem TSB-Medium (60 g/l TSB) und 5% (v/v) einer exponentiellen Kultur des Wirtstammes versetzt und bei 37°C und 123 rpm für etwa 5 h bzw. bei Raumtemperatur und 150 rpm über Nacht inkubiert. Als Wirtsstämme wurden sowohl klinische Isolate, Wild-, APEC- als auch Laborstämme eingesetzt. Nach erfolgter Zentrifugation und Sterilfiltration wurden 100 µl einer seriellen Verdünnung in TSB-Medium mit 3 ml 0,3 bzw. 0,75 %igem Weichagar und 100 µl einer exponentiellen Kultur des Wirtstammes gemischt und auf einer TSB-Agar-Platte verteilt. An die

Bebrütung bei 37°C für etwa 18 h schloss sich die Überprüfung der Platten auf Plaquebildung an.

Da die Proben aus Gülle nicht vor der ersten Anreicherung sterilfiltriert werden konnten, schlossen sich zwei weitere Anreicherungen an, die wie beschrieben durchgeführt wurden, bevor die Proben auf die Anwesenheit von Phagen überprüft wurden.

Zur Reinigung der Phagen wurden Einzelplaques in SM-Puffer aufgenommen und ein Vereinzelausstrich auf einer Doppelagar-Platte angelegt. Dieser Vorgang wurde mindestens 4-mal durchgeführt, bevor ein erstes Lysat hergestellt wurde. Dazu wurde erneut ein Einzelplaque in 50 µl SM-Puffer suspendiert und 25 µl dieser Lösung in 2 ml einer exponentiell wachsenden Kultur des Wirtsstamm überführt und bei 37°C und 123 rpm bis zur vollständigen Klärung oder für 5 h inkubiert. Nach der Zentrifugation bei 8000 rpm für 10 min wurde das Lysat sterilfiltriert und die Anzahl von Plaque bildenden Einheiten (PFU engl. Plaque forming units) bestimmt.

2.5.1 Hochdurchsatzisolation

Diese Methode wurde verwendet, um Phagen mittels sequentieller Anreicherung im Flüssigmedium aus einer großen Anzahl von Umweltproben zu isolieren. Dazu wurden insgesamt 192 Gülleproben und Klärschlämme aus unterschiedlichen Klärschritten und Quellen aufbereitet, die festen Bestandteile abgetrennt und bei 4°C gelagert. Von diesen Proben konnten gleichzeitig jeweils 96 auf einem Bakterienstamm getestet werden. Zur Anreicherung der Phagen wurde LB-Medium in einer 96-Deep-Well-Platte im Verhältnis 1:400 mit einer Übernachtskultur des bakteriellen Teststammes beimpft. Die aufbereiteten Umweltproben wurden im Verhältnis 1:5 zugegeben und die Ansätze für 6 h bei 37°C und 600 rpm inkubiert, anschließend mit Chloroform versetzt und zentrifugiert. Für jede weitere Anreicherung wurde anstatt der ursprünglichen Umweltproben die vorangegangene Anreicherung eingesetzt. Eine erfolgreiche Anreicherung von Phagen zeigte sich in der wiederholten Klärung der Bakterienkulturen an den gleichen Plattenpositionen. Zur Vereinzlung der angereicherten Phagen wurden die klaren Kulturen gemäß Punkt 2.6.1 titriert. Nach Bebrüten der Platten wurden Einzelplaques isoliert, in LB-Medium resuspendiert und der Vorgang mindestens dreimal wiederholt.

2.6 Charakterisierung der Einzelphagen

2.6.1 Phagenquantifizierung (Titration)

Bei der klassischen Titration werden die Phagentiter über eine Quantifizierung der Plaque bildenden Einheiten pro Milliliter (PFU/ml) bestimmt. Dazu wurde zunächst eine 1:100 Verdünnungsreihe der zu quantifizierenden Phagenkultur in LB-Medium hergestellt. Jeweils 100 µl der 1:10⁶ und 1:10⁸ Verdünnungsstufen wurden mit 100 µl einer ü. N. Kultur des entsprechenden Wirtsstammes und 4 ml geschmolzenen Topagars auf LB-Agarplatten verteilt und bei 37°C ü. N. inkubiert. Anhand der Plaqueanzahl im Bakterienrasen wurde anschließend der Titer gemäß folgender Formel bestimmt:

$$\text{Phagentiter} \left[\frac{\text{PFU}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{PFU}}{\text{aufgebrachtes Volumen [ml]} * \text{Verdünnung}}$$

2.6.2 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Phagen

Alle TEM-Aufnahmen wurden durch die Arbeitsgruppe von Prof. Manfred Rohde (Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Zentrale Einrichtung für Mikroskopie, Braunschweig) durchgeführt. Zur Herstellung von Kohleträger-Filmen wurde Graphit im Hochvakuum durch Widerstandsheizung zum Sublimieren gebracht und auf der Oberfläche von frisch gespaltenem Muskovit (Glimmerplättchen) zur Kondensation gebracht. Zur Kontrastierung wurden die Phagen (Lysate mit einem Titer von 10¹⁰ PFU/ml bzw. über einen Cäsiumchlorid-Gradienten konzentrierte/gereinigte Phagen) mit 2% (w/v) wässriger Uranylacetatlösung gefärbt und in einem TEM 910 Transmissionselektronenmikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV untersucht. Die Aufnahme von Bildern erfolgte mit einer Slow-Scan CCD-Kamera (ProScan, Scheuring) und der ITEM-Software (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster).

2.6.3 One step growth Assay

Exponentiell wachsende E28 wurden auf eine Zellzahl von 2x10⁸ CFU/ml mit Medium verdünnt und mit einer MOI von 0,001 infiziert. Nach einer Adsorption von 10 min bei Raumtemperatur, wurden diese zentrifugiert und im ursprünglichen Volumen frischem Medium aufgenommen, und für bis zu 100 min bei 37°C inkubiert. Zu angegebenen

Zeitpunkten wurden Proben entnommen und deren Titer mittels Plaque-Assay bestimmt. Aus den Ergebnissen wurden die Latenzzeit und die durchschnittliche Wurfgröße ermittelt.

2.7 DNA-Isolation und Sequenzierung von Phagen

2.7.1 Konzentrierung von Phagen mittels PEG-Fällung

300 ml eines Lysates mit einem Titer von $>10^9$ PFU/ml wurden mit 1 M NaCl und 10 % (w/v) PEG 8000 versetzt und unter Rühren gelöst. Nachfolgend wurde 1 h auf Eis gerührt und die Fällung der Phagen über Nacht bei 4 °C fortgesetzt. Die Lösung wurde bei 30 min bei 15 °C und 10000 rpm zentrifugiert (Sorvall RC 6 Plus, Thermo Scientific™) und das entstandene Pellet in 3 ml SM-Puffer auf einem Schüttler bei 10°C und 150 rpm für etwa 2 h gelöst.

2.7.2 Konzentrierung von Phagen mittels eines CsCl₂-Gradienten

Zunächst wurden die Phagen eines 300 ml Lysats mit einem Titer von $>10^9$ PFU/ml durch Zentrifugation bei 14000 rpm und 15°C für 2 h pelletiert. Die Pellets wurden in insgesamt 2 ml SM-Puffer auf einem Schüttler bei RT und 100 rpm für etwa 2 h gelöst. Für den Gradienten wurden in der Regel je 500 µl der CsCl₂-Lösungen mit der Dichte von 1,6/ 1,5/ 1,4 bzw. 1,3 vorsichtig in einem Zentrifugenröhrchen (Thinwall, Polypropylene, 4 ml, 11 x 60 mm; Beckman Coulter) überschichtet und darauf etwa 2 ml Probe aufgetragen. Nach einer Zentrifugation bei 4°C und 35000 rpm (Optima L-100XP, Beckman Coulter) für 2 h wurde das Röhrchen an der Unterseite mit einer Kanüle angestochen und die phagenhaltige Bande aufgefangen. Die Probe wurde gegen SM-Puffer dialysiert (Membra-Cel™, Ø 6 mm, Wandstärke 0,051 mm).

2.7.3 Entfernung bakterieller DNA/RNA

Im Anschluss an die PEG-Fällung oder den CsCl₂-Gradienten wurden die Proben zur Entfernung bakterieller DNA/RNA mit 1/10 des Volumens mit 10fach Reaktionspuffer (100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 25 mM MgCl₂ und 1 mM CaCl₂), 1/50 Volumen RNase A (10 mg/ml, Thermo Fisher Scientific) und 1/500 Volumen DNase I (1 U/µl, Thermo Fisher Scientific) versetzt und über Nacht bei 37°C und 300 rpm im Thermomix (Eppendorf) inkubiert.

2.7.4 DNA-Isolation und Quantifizierung

Phagen-DNA wurde durch Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert und unter Zusatz von 0,1 Volumen 3 M Natriumacetatlösung und 2,5 Volumen 100%igem Ethanol für 15 min bei -80°C gefällt. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in TE-Puffer (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH8) gelöst.

Alternativ wurde Phagen DNA mit Hilfe des Phagen Isolation Kits (Norgen) isoliert. Bakterielle DNA wurde mit dem Kit GenElute Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma Aldrich) isoliert.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe des Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) den Angaben des Herstellers folgend.

2.7.5 Sequenzierung

Die Sequenzierungen mit dem PacBio RSII und die dafür notwendige Library-Herstellung wurden durch die Arbeitsgruppe von Dr. Cathrin Spröer (DSMZ, Braunschweig) durchgeführt. Die Herstellung von SMRTbell™ Template Bibliotheken wurde entsprechend den Angaben des Protokolls von PacificBiosciences, Menlo Park, CA, USA, (Procedure & Checklist Greater than 10 kb Template Preparation and Sequencing) hergestellt. Dazu wurden etwa 4 µg DNA mit Hilfe von Covaris S220 (Covaris, Woburn, USA) nach Herstellerangaben fragmentiert. Anschließend wurden die Enden der DNA repariert und über Nacht an Barcode markierte SMRTbell™ Adapter unter Verwendung Komponenten des DNA/Polymerase Binding Kit P6 (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, USA) ligiert, wie im Protokoll des Herstellers angegeben. 7 bis 8 SMRTbell™ Templates wurden äquimolar vereinigt. Unvollständige Ligationen wurden durch die Behandlung mit den Exonukleasen ExoIII und ExoVII (Affymetrix, High Wycombe, UK) entfernt oder eine BluePippin™ 4 kb-Größenauswahl nach Herstellerangaben durchgeführt (Sage Science, Beverly, MA, USA). Die Reaktionsbedingungen für die Primeranlagerung und Bindung der Polymerase an die gereinigten SMRTbell™ Vorlagen wurde mit dem Rechner der RS Remote (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, USA) abgeschätzt. Die Sequenzierung (SMRT, engl. Single Molecule, Real-Time) wurde mit dem PacBio RSII (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, USA) durchgeführt, wobei je 10 kb Bibliothek ein zweistündiger Film aufgenommen wurde.

Alternativ wurden Libraries nach dem Protokoll von Baym et al. hergestellt (Baym et al. 2015). Dazu wurden 0,5 ng DNA mit 1,25 µl Puffer und 0,083 µl Enzym (Illumina-

Kit FC-121-1030) gemischt und 10 min bei 55°C inkubiert. Darauf folgte die Zugabe von 11 µl KAPA-Mastermix (Library Amplification Kit (KAPA KK2611)) und je 4,4 µl Forward/Reverse-Primer. In einem PCR-Cycler wurde nach folgendem Protokoll inkubiert:

72°C für 3 min

98°C für 5 min

13 Zyklen:

98°C für 10 sec

62°C für 30 sec

72°C für 30 sec

72°C für 5 min

4°C ∞

Das PCR-Produkt wurde mit Hilfe von magnetischen Beads (Ampure XP) gereinigt. Nach der Konzentrationsbestimmung erfolgte die Einstellung der DNA auf 4 nM und das Poolen der zu sequenzierenden Phagen entsprechend der zu erwartenden Genomgrößen. Sequenziert wurde von der Arbeitsgruppe von Dr Cathrin Spröer unter Verwendung des MiSeq Reagent Kits v3 (600-cycle, MS-102-3003, Illumina) mit dem MiSeq System (Illumina).

Die Sequenzierung von E28 wurde bereits publiziert (Schmidt et al. 2017).

Zur Sequenzierung der Mutante E28.G28R3 wurden 150 ng DNA in MicroTUBE AFA Fiber Snap-Caps (Covaris) mit Covaris® S2 DNA shearing Technology fragmentiert unter Verwendung von Einstellungen, die die Bildung von Fragmenten der Größe 300 bp begünstigen. Libraries wurden unter Zuhilfenahme des NEBNext Ultra™ Kits (New England Biolabs) den Herstellerangaben folgend hergestellt. 55,5 µl fragmentierte DNA wurden zur Adapter Ligation und USER (Uracil-Specific Excision Reagent) Verdau eingesetzt, gefolgt von einer Selektion für Insertgrößen von 300 bp. NEBNext® Multiplex Oligos für Illumina® (Index Primers Set 1) wurden für die Vermehrung mittels PCR eingesetzt und die Sequenzierung mit dem NextSeq™ System (Illumina) durchgeführt.

2.7.6 Demultiplexing, Assemblierung und Annotation

Die sich bei der Sequenzierung mittels PacBio Sequencing in einer SMRTcell befindenden, aber mit unterschiedlichen Barcodes markierten Sequenzen wurden zunächst mit Hilfe des Programms SMRTAnalysis demultiplext und sortiert.

Anschließend erfolgte die Assemblierung der jeweils mit unterschiedlichen Barcodes markierten Sequenzen. Der Standardparameter für die Genomgröße lag dabei bei 100kb, wurde bei größeren Genomen aber angepasst, um einen finalen Contig zu gewährleisten. Assemblierte Contigs wurden über Sequenzabdeckung auf terminale Redundanzen und Genomenden überprüft und wenn vorhanden angepasst. Die mit dem Illumina-System ermittelten Sequenzen wurden mit Hilfe von SPAdes assembliert, die Abdeckung anschließend mit VarScan ermittelt.

Finale Genomsequenzen wurden zunächst über Prokka automatisch annotiert und anschließend manuell kuriert. Weiterführende Annotation beinhaltete u.a. die Analyse von möglichen Transkriptionsterminatoren, Homologien zu konservierten Domänen, tRNA-Genen und Sequenzvergleiche mit bereits bekannten Phagen.

2.7.7 Vergleich E28 Mutante mit Wildtyp

Die detektierten phagen-resistenten Kolonien von E28 wurden mehrfach vereinzelt, deren DNA isoliert und mit Illumina Technologie sequenziert. Um die Unterschiede zum Genom des Wildtyps zu ermitteln, wurden die Illumina-Sequenzen mit Hilfen von VarScan auf die Sequenz des Wildtyps gemappt. Dabei konnten die vermutlich für Phagenresistenz verantwortlichen Deletionen im Genom detektiert werden.

2.8 Beurteilung der Cocktaileffizienz *in-vitro*

2.8.1 Inhibitionstest

Diese Methode dient zur Bestimmung der maximalen Bakteriendichte, die durch einen Einzelphagen oder Cocktail erfolgreich lysiert werden kann, und ist damit ein Maß für seine Wirksamkeit im Flüssigmedium. Zunächst wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe eines bakteriellen Teststammes in LB-Medium hergestellt und jede Verdünnungsstufe je nach untersuchtem Anwendungstiter mit 10^5 , 10^6 oder 10^7 PFU/mL Phagenkultur versetzt. Der Test wurde in Mikrotiterplatten mit mehreren Bakterienstämmen parallel durchgeführt, wobei als Kontrollen Verdünnungsreihen dienten, denen keine Phagen zugesetzt wurden. Die Inkubation erfolgte bei 37°C ü. N. Im Anschluss wurde die optische Dichte der einzelnen Ansätze bei einer Wellenlänge von 620 nm mithilfe eines Mikroplattenlesers dokumentiert und die Inhibition des bakteriellen Wachstums im Vergleich zur Kontrolle festgestellt.

2.8.2 Biolog-Assay

Von einer frischen Übernachtskultur wurden Einzelkolonien von einer TSB-Agar-Platte in TSB-Medium suspendiert und bei 37°C und 123 rpm für etwa 2 h inkubiert. Nachfolgend wurde die Kultur auf eine Keimzahl von $1 \cdot 10^8$ CFU/ml eingestellt. Je Well einer 96-Well-Platte (Thermo Fisher Scientific) wurden 20 µl dieser Kultur mit 160 µl TSB-Medium inkl. 1% (v/v) DyeA (Tetrazolium-Farbstoff, Biolog) und 20 µl Lysat (eingestellt auf einen Titer von $1 \cdot 10^7$ PFU/ml) versetzt, um eine Infektionsdosis (MOI: engl. multiplicity of infection) von 0,1 zu erhalten.

Als Kontrollen dienten entsprechende Ansätze ohne DyeA (Biolog), Bakterien bzw. Phagen wobei das entsprechende Volumen durch TSB-Medium ersetzt wurde. Es wurden sowohl Einzelphagen als auch Phagencocktails, welche die Einzelphagen in identischen Verhältnissen enthielten, untersucht.

Die Mikrotiterplatten wurden im OmniLog™ System (Biolog) bei 37°C für 48 h inkubiert. Alle 15 Minuten wurde der Intensitätsverlauf des Redoxfarbstoffs automatisch gemessen. Zur Visualisierung wurden die Daten mit Hilfe des Programms pmm_kinetik.exe transformiert.

2.8.3 Lysevermögen gegenüber E28

Analog zu der unter 2.8.1 beschriebenen Durchführung wurden Mikrotiterplatten für die Inkubation in dem Plattenlesegerät Infinite® Pro 200 (Tecan) vorbereitet mit der Modifikation, dass das TSB-Medium nicht mit dem Tetrazolium-Farbstoff versetzt wurde. Die Optische Dichte (OD) bei 600 nm wurde alle 15 min über einen Zeitraum von 48 h bei einer Inkubationstemperatur von 37°C gemessen. Dabei wurde mit einer Amplitude von 6 mm geschüttelt.

2.9 Phagenresistente Mutanten

2.9.1 Isolation und Sensibilitätstestung

100 µl einer exponentiellen E28 Kultur wurden mit einer MOI von 100 mit den Phagen G28, AB27, Kra2, Ew2, TriM oder TB49 infiziert und zur Adsorption für 10 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Mischung in 3 ml 0,3%igen Weichagar überführt und auf einer TSB-Agarplatte verteilt. Nach einer Inkubation bei 37°C für 18 h wurden die Platten auf resistente Kolonien untersucht. Zur Reinigung wurde mindestens 4-mal Material einer Einzelkolonie auf einer neuen Platte vereinzelt ausgestrichen und über

Nacht bei 37°C inkubiert. Analog zur Titerbestimmung wurden auf die resistenten Stämme serielle Verdünnungen der Phagen getropft und nach der Inkubation bei 37°C auf die Ausbildung von Einzelplaques überprüft.

2.9.2 Analyse der Kohlenstoffquellennutzung Phagen-resistenter Mutanten mittels Biolog GN2 MicroPlate™ Assay

Im 96 well-Format können Bakterien mit Hilfe der GN2 MicroPlate™ im OmniLog™ ID System (Biolog, Hayward CA, USA) hinsichtlich der Nutzung 95 verschiedener Kohlenstoffquellen phantypisiert werden. Dazu liegen die Substrate in getrockneter Form in den MicroPlates vor. Wie unter 2.3.2 beschrieben, wird die Nutzung der Kohlenstoffquellen durch die Farbänderung des Redoxfarbstoffes angezeigt. Wildtyp E28 und die Mutanten wurden wie beschrieben kultiviert und in 20 ml GN/GP-inoculating fluid (0.40% NaCl, 0.03% Pluronic F-68, 0.02% Gellan Gum; Biolog, Hayward CA, USA) suspendiert und auf eine Transmission von 61% eingestellt. 150 µl der Zellsuspension wurden in jedes Well der Platte pipettiert und diese für 48 h bei 37°C inkubiert. Messung und Analyse erfolgten wie oben beschrieben. Die Substrate Gentiobiose, D-Psicose, Turanose, Ameisensäure, L-Alaninamid, L-Histidin, L-Ornithin, L-Threonin und Tween 80 wurden nicht analysiert, da keine reproduzierbaren Ergebnisse bei dem Wildtyp E28 erhalten werden konnten.

2.9.3 Wachstum und Mobilität Phagen-resistenter Mutanten

Eine Übernachtskultur des zu untersuchenden Stammes wurde mit TSB-Medium 1:400 verdünnt und davon 200 µl in eine 96well-Platte überführt. Die Inkubation erfolgte im Plattenlesegerät Infinite® Pro 200 (Tecan) bei 37°C und einer Schüttelamplitude von 6 mm. Der Verlauf der OD_{600nm} wurde alle 15 min über einen Zeitraum von 24 h automatisch gemessen.

1 µl einer Übernachtskultur wurde in die Mitte einer LB-Platte (55 mm, 2,5% Miller's LB Broth Base™ powder (Invitrogen) und 0.3% (w/v) Agar bacteriological NO. 1 (Oxoid)) getropft. Nach der Inkubation bei 37°C für 18 h wurde der Durchmesser der Kolonie bestimmt.

2.10 Effizienz *in-vitro* und auf Hähnchenhaut – Methodenvergleich

Die Efficiency of plating (EOP) der fünf Bakteriophagen TriM, G28, KRA2, EW2 und TB49 wurden auf zehn ESBL-bildenden *E. coli*-Stämmen untersucht. Darüber hinaus

wurde in Flüssigmedium sowie auf Hähnchenhaut ihre wachstumshemmende bzw. reduzierende Wirkung auf die *E. coli*-Stämme bestimmt. Eine Übersicht der getesteten Methoden ist in **Tabelle 4** gegeben.

Die Durchführung der EOP wurde im Punkt 2.6.1 beschrieben. Als Standard diente in diesem Fall das Wirtsbakterium des jeweiligen Bakteriophagen. Die Untersuchung der Wachstumsinhibition in Flüssigmedium (LB-Flüssigmedium, Carl Roth, Deutschland) erfolgte in 48-Well-Mikrotiterplatten durch Messung der optischen Dichte bei 595 nm (Tecan Infinite F200Pro, ThermoFisher, Germany) über 18 Stunden bei 37°C. Die optische Dichte des jeweiligen *E. coli*-Stammes ohne Phagenzusatz wurde als ungehemmtes Wachstum mit der Zahl Null kodiert und die optische Dichte des LB-Nährmediums ohne Bakterien einer vollen Hemmung und der Zahl Eins gleichgesetzt. Die Messwerte der einzelnen Bakterien-Phagen-Kombinationen nach 18 Stunden wurden dazu in Relation gesetzt.

Die Efficiency-in-situ (EIS) wurde auf 5 x 5 cm großen, gammasterilisierten Hähnchenhautstücken durchgeführt. Diese wurden jeweils in einen kleinen Plastikbeutel gelegt. Anschließend wurde 100 µl einer Bakteriensuspension des jeweiligen Stammes ($\log_{10} 6$ KbE/ml) auf der Oberfläche verteilt. Zehn Minuten später wurden 100 µl der Phagensuspension in einer Konzentration von $\log_{10} 8$ PbE/ml in gleicher Weise auf der Hähnchenhaut verteilt. Die Proben und die Kontrollen (nur Bakterien, nur Phagen auf Hähnchenhaut) wurden jeweils einzeln in einer Plastiktüte bei 3 ± 1 °C für 24 Stunden gelagert. Anschließend wurden die Proben mit 20 ml SM-Puffer gespült und aus der so gewonnenen Flüssigkeit eine Verdünnungsreihe hergestellt. Die Konzentration des jeweiligen *E. coli*-Stammes sowie der Phagen wurde auf LB-Agar (Carl Roth, Deutschland) mittels Plattengussverfahren bzw. im Overlay-Verfahren mit LB-Medium bestimmt. Die Untersuchung wurde für jede Bakterien-Phagen-Kombination zweimal, bzw. für die Untersuchungen mit E16 dreimal, wiederholt. Aus der Verdünnungsreihe wurden *E. coli* wiedergewonnen und wie für die EOP beschrieben, im Overlay-Verfahren auf ihre Empfänglichkeit für die eingesetzten Phagen getestet.

Für den Vergleich der Ergebnisse mit der Anwendung auf einem Hähnchenprodukt wurden sechs Hähnchenschenkel aus dem Großmarkt aufgetaut und in einen, mit *E. coli* vorbeimpften (6 ml $\log_{10} 4$ KbE/ml), Plastikbeutel platziert. Die Hähnchenschenkel wurden fünf Minuten auf der beimpften Innenseite des Beutels entlanggerollt, um eine natürliche Kontamination am Schlachtband zu simulieren.

Anschließend wurden die Schenkel einzeln in einem kleineren Plastikbeutel platziert, es wurde 5 ml Phagensuspension (\log_{10} 8 PbE/ml) zugefügt und durch Schütteln verteilt. Die Konzentration von *E. coli* und Phagen wurde nach 24 Stunden bei $3 \pm 1^\circ\text{C}$ oder nach 22 Stunden bei $3 \pm 1^\circ\text{C}$ und 2 Stunden bei 37° gemessen.

Tabelle 4: Übersicht der an den einzelnen Isolaten durchgeführten Untersuchungen.

| ESBL- <i>E. coli</i> | Methode | | | | |
|----------------------|---------|----------------|-----|-------------------|----------------------|
| | EOP | Inhib. Flüssig | EIS | Hähnchen-schenkel | Follow-up-Experiment |
| E8 | X | | X | | |
| E11 | X | X | X | | X |
| E16 | X | X | X | | |
| E28 | X | X | X | | X |
| E29 | X | X | X | | X |
| E30 | X | X | X | X | X |
| E31 | X | X | X | X | X |
| E50 | X | X | X | | |
| E51 | X | X | X | | |
| E192 | X | X | X | | |
| E194 | X | X | X | | |

2.11 Produktion des Cocktails

2.11.1 Anzucht der Vorkulturen

Zum Animpfen der Industrie-Fermenter bei der Produktion der Cocktailintermediate wurden Vorkulturen der Einzelphagen gemäß Punkt 2.4 im 1 l-Maßstab angezogen. Die Produktion der Cocktailintermediate erfolgte in Industrie-Fermentern mit einem Füllvolumen von 100 l. Diese wurden vor Verwendung in einem mehrschrittigen Prozess gereinigt und dampfsterilisiert. Mithilfe von Systec Mediapräparatoren wurden 100 l steriles LB Medium hergestellt und die Fermenter steril befüllt. Das Medium wurde auf 37°C vorgeheizt und unter konstanter Sauerstoffbegasung über einen Sauerstoffsterilfilter mit dem Rührwerk des Fermenters umgewälzt, um eine gleichmäßige Sauerstoffkonzentration im Medium zu gewährleisten. Anschließend wurde es mit 1 l ü.N. Kultur des *E. coli* Wirtsstammes (1:100) beimpft und bei 37°C für mehrere Stunden bebrütet. In halbstündlichen Intervallen wurde das Wachstum der

Kultur durch Bestimmung der OD_{600} überwacht. Mit Erreichen einer OD_{600} von 0,3 wurde eine wie unter Punkt 2.11.1 vorbereitete Vorkultur (1:100) zugeben und der gesamte Ansatz weiter fermentiert. Der Fermentationsvorgang sowie die halbstündlichen Messungen wurden bis zum Eintritt der Lyse fortgeführt. Der Fermentationsansatz wurde auf 24°C abgekühlt, abgelassen und bis zur Separation bei RT in Tanks zwischengelagert. Eine Probe des Ansatzes wurde im Verhältnis 1:1000 mit Chloroform versetzt und bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Titer des Überstandes wurde gemäß Punkt 2.6.1 bestimmt und im Zuge der Qualitätskontrolle dokumentiert.

2.11.2 Separation und Filtration

Der Schritt der Separation diente einer ersten Abtrennung der bakteriellen Zelldebris aus dem Fermentationsprodukt. Die Feststoffabtrennung erfolgte in einem Separator (Modell Clara) der Firma Alfa Laval (Lund, Schweden) durch Zentrifugation der eingeleiteten Flüssigkeit in gestapelten Trennscheiben. Nach einer ersten Separation wurde die optische Dichte des Produktes dokumentiert. Wurden Werte von mehr als OD_{600} 0,02 erreicht, folgte ein zweiter Separationsschritt. Das Produkt wurde mit 10 l PBS Puffer nachgespült und direkt zur Filtration eingesetzt. Auch nach dem Schritt der Separation wurde der Titer des Produktes dokumentiert.

Während der Filtration werden Reste bakterieller Zellbestandteile aus dem Produkt gefiltert und die Phagen mithilfe eines durch die PTC patentierten Rückwaschverfahrens aufgereinigt. Das mehrstufige Filtrationssystem setzt sich zusammen aus einem Vorfilter mit einer 0,65 µm porigen Membran zur Abtrennung mittelgroßer Zellbruchstücke und Membranvesikel, gefolgt von einer 0,2 µm porigen Membran zur Sterilfiltration und einem 0,03 µm porigen Rückwaschfilter. In diesem Schritt werden die Phagen zurückgehalten und niedermolekulare Verunreinigungen, wie Ribosomen, gefiltert. Durch Spülung mit PBS Puffer wurden die Phagen zurückgewonnen und in einem weiteren Schritt steril filtriert. Abschließend wurde standardmäßig der Titer der Intermediate gemäß Punkt 2.6.1 dokumentiert.

2.11.3 Mischung und Abfüllung

Die einzelnen Intermediate des Cocktails wurden in einem Mischtank zu einem Cocktail vermengt. Das Mischverhältnis wurde dabei so angepasst, dass alle Phagen

mit einem Titer von 1×10^8 PFU/ml eingesetzt wurden. Über eine dampfsterilisierte Abfüllanlage wurde der Cocktail in Kegs steril abgefüllt und bei 4°C gelagert.

2.11.4 Durchführung des Tierversuches

Als Indikatorstamm wurden der ESBL-*E. coli* E28 ausgewählt. Für den quantitativen Nachweis wurde ein modifizierter Tryptone Bile X-Glucuronide (mTBX)- Agar entwickelt der, zusätzlich zu den im normalen TBX- Agar (Carl Roth, Deutschland) enthaltenen Inhaltsstoffen, Kanamycin (Carl Roth, Deutschland) in einer Konzentration von 0,1 g/L sowie Potassium- Tellurit (Sigma-Aldrich, Deutschland) in einer Konzentration von 2,5 mg/L enthielt. Dieser ermöglichte eine selektive Anzucht von E28 unter Hemmung der in den Kotproben enthaltenen nicht-E28-*E. coli*.

Im ersten Versuch wurden zwei Gruppen mit je 16 Ross 308 Küken direkt nach dem Schlupf getrennt in die Ställe der Tierärztlichen Hochschule eingestallt. Die Tierdichte betrug etwa drei Tiere/ m^2 und es wurde kommerzielles Komplettfutter ad libitum zur Verfügung gestellt. Der Kontrollgruppe wurde Wasser ohne Bakteriophagen zur Verfügung gestellt. In der Versuchsgruppe wurde das Wasser mit einem Phagencocktail in einer mittleren Konzentration von $\log_{10} 4,6$ PbE/ml supplementiert. Der Cocktail in diesem Versuch enthielt die Bakteriophagen AB27, TB49, G28, TriM, KRA2 und EW2 zu gleichen Teilen. An Tag 6 wurde jedem Hähnchen $\log_{10} 8,99$ KbE oral eingegeben.

Der Versuch wurde über einen Zeitraum von 35 Tagen durchgeführt. Die Wasseraufnahme wurde in beiden Gruppen täglich erfasst. Frische Kotproben wurden in regelmäßigen Abständen auf Bakteriophagen und den Indikatorstamm E28 sowie die Gesamtzahl an *E. coli* im Darm untersucht. Zusätzlich wurden Proben aus der Stallumgebung sowie aus der Umwelt vor den Lüftungsklappen (vor dem Stall) genommen.

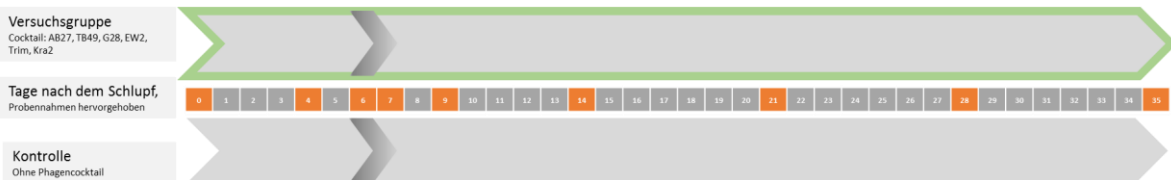
Die Durchführung des zweiten Versuches entsprach weitgehend dem ersten Versuch. Die Tierzahl war in beiden Versuchen gleich. Der Cocktail bestand nun aus den Phagen AB27, TB49, G28 und EW2 und wurde dem Tränkwasser in einer mittleren Konzentration von $\log_{10} 6,7$ PbE/ml zugesetzt. Die orale Inokulation mit dem Indikatorstamm E28 erfolgte an Tag 7 mit einer Dosis von $\log_{10} 4,67$ KbE/Tier.

Die Untersuchung der Proben erfolgte im Labor der Arbeitsgruppe Bakteriophagen im Research Center for Emerging Infections and Zoonoses an der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Es wurde mit jeder Probe eine dezimale Verdünnungsreihe in

Kochsalzlösung mit Pepton hergestellt. Ein Milliliter jeder Verdünnungsstufe wurde im doppelten Ansatz im Gussplattenverfahren mit Agar gemischt und für 20 ± 2 Stunden bei 44°C aerob bebrütet. Die modifizierten Platten für die Quantifizierung von E28 wurden bei 42°C bebrütet, da bei dieser Bebrütungstemperatur die Auslesbarkeit besser war.

Für die Messung der Konzentration der Bakteriophagen wurde jeweils die erste Verdünnungsstufe der Proben über Nacht bei 4°C geschüttelt und anschließend bei $4700 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde filtriert ($0,2 \mu\text{m}$) und es wurde eine dezimale Verdünnungsreihe in SM- Puffer mit E28 mittels Overlay-Verfahren im doppelten Ansatz ausplattiert. Die Bebrütung erfolgte für 24 Stunden bei 37°C .

Tierversuch 1



Tierversuch 2

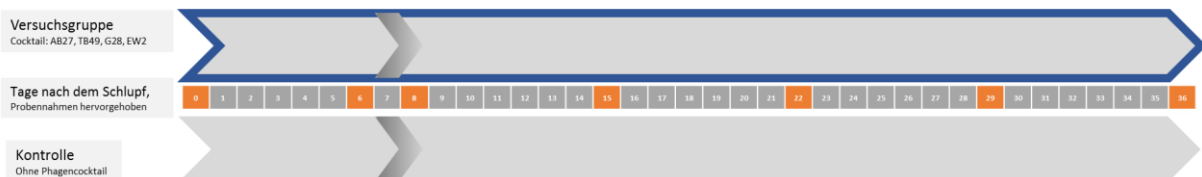


Abbildung 2: Zeitlicher Ablauf der Tierversuche. Die Applikation der Phagen erfolgte kontinuierlich, die Eingabe des Indikatorstammes E28 ist durch die grauen Pfeile in den einzelnen Gruppen gekennzeichnet.

Von den bebrüteten Platten wurden präsumtive E28 zur Bestätigung des Serotyps (flic H34) mittels PCR gewonnen. Zweiunddreißig rückgewonnene Isolate (im Folgenden als Reisolat bezeichnet) präsumtiver E28 sowie hundert Reisolat von den TBX Platten wurden für die weiterführenden Untersuchungen pro Gruppe und Untersuchungstag gewonnen. Es wurden Resistenzuntersuchungen der E28 Reisolat mittels Routine Test Dilution und EOP durchgeführt sowie Untersuchungen der TBX-Reisolat auf den E28 Phänotyp (Wachstum auf modifiziertem TBX und Test auf ESBL-Phänotyp).

Nach Abschluss der Versuche wurden 1996 Resistenztests mit 203 Isolaten aus dem ersten Versuch und 115 Isolaten aus dem zweiten Versuch durchgeführt. Der E28-

Phänotyp wurde bei insgesamt 1590 Reisolaten von TBX-Agarplatten aus Versuch 1 sowie 329 Reisolaten von zwei Untersuchungszeitpunkten aus Versuch 2 untersucht (**Abbildung 2**).

Weitere Untersuchungen zur Populationsdynamik in der Darmflora wurden gemeinsam mit den Projektpartnern der DSMZ mit den gewonnenen Reisolaten durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung einer bakteriellen Stammsammlung zur Isolation und Charakterisierung von Phagen

Um ein breites Spektrum von pathogenen und ESBL-bildenden *E. coli* durch einen Phagencocktail abdecken zu können, sollte die Isolation von virulenten Coliphagen über möglichst unterschiedliche *E. coli* Stämme erfolgen. Daher wurden sowohl von Geflügelfleisch und aus dem klinischen Umfeld isolierte ESBL-bildende Stämme als auch APEC- und Laborstämme bei der Isolation als Wirts-/ Indikatorstämme herangezogen. Um die Verwendung identischer Stämme auszuschließen, wurden ausgewählte Stämme genotypisch und phänotypisch untersucht. APEC-Stämme wurden mit dem Extended B Lactam ID Kit (CPD10, Mast Diagnostika GmbH) auf die Fähigkeit der ESBL-Bildung untersucht mit dem Ergebnis, dass keiner der APEC-Stämme ESBL bildet. Die APEC-Stämme wurden trotzdem zur Isolation von Phagen verwendet, um bei dem Einsatz eines späteren Phagencocktails gleichzeitig neben ESBL-bildenden *E. coli* auch Krankheitserreger der Colibacillose an sich eliminieren zu können. Bei der Auswahl der APEC-Stämme wurde darauf geachtet, dass sie den Serotypen O1, O2 und O78, welche häufig bei der Erkrankung festgestellt werden, angehören.

3.1.1 Typisierung von ESBL *E. coli*-Stämmen

10 ESBL *E. coli* Wildstämme und 15 klinische Isolate wurden anhand der Genotypisierung PanType durch die Firma Alere Technologies GmbH auf ihren O-/H-Serotyp sowie verschiedene Resistenz- und Virulenzgene untersucht. In Tabelle 5 und Tabelle 6 sind die Ergebnisse zusammengefasst, wobei Marker, die bei allen Stämmen negativ waren, nicht aufgeführt sind. Eine vollständige Liste der untersuchten Marker ist unter Abschnitt 5.1 zu finden. Wie aus Tabelle 5 hervorgeht, weisen bis auf eine Ausnahme (E29) alle Stämme neben der Resistenz gegenüber Beta-Lactam-Antibiotika die genetische Grundlage für Resistenzen gegen andere Antibiotikaklassen auf. Über 50% der Stämme besitzen genetische Marker zur Abwehr von mindestens vier weiteren Antibiotika. Generell wurden in der Gruppe der *E. coli* Wildstämme weniger resistenz-assoziierte Gene gegenüber Antibiotika identifiziert als in der Gruppe der klinischen Isolate. Fast alle Wildstämme waren frei von Markern für eine Resistenz gegen Makrolid-Antibiotika bzw. Trimethoprim, während entsprechende Marker bei fast allen klinischen Isolaten gefunden wurden. Auch hinsichtlich der

Resistenz gegenüber Beta-Lactam-Antibiotika konnte festgestellt werden, dass die Wildstämme meist nur Träger eines Resistenz-assoziierten Genes, hingegen die klinischen Isolate Träger von bis zu vier Resistenz-assoziierten Genen sind. Unter allen typisierten Stämmen waren 64% Träger für blaCTX-M1/-M15, 52% für blaTEM, 20% für blaOXA-1, je 8% für blaCTX-M9 bzw. blaSHV und 4% für blaOXA-2. In den Wildstämmen wurde zu 50% der Marker für blaTEM nachgewiesen, welcher auch in einer ähnlichen Verteilung bei den klinischen Isolaten wiedergefunden werden konnte. Mit einer Häufigkeit von 93% wurden innerhalb der klinischen Isolate die Resistenz-assoziierten Gene blaCTX-M1/-M15 identifiziert, welche nur bei zwei Wildstämmen nachgewiesen werden konnten. Während die Gene blaCTX-M9 und blaSHV nur innerhalb der Wildstämme vorkamen, waren die Gene für blaOXA-1 und -2 nur bei den klinischen Isolaten zu finden. Die Genotypisierung zeigte des Weiteren, dass die klinischen Isolate deutlich mehr Virulenz-assoziierte Gene besitzen als die Wildisolate. So konnten in den Wildstämmen keine Gene für Adhesine, Bestandteile von Sekretionssystemen oder Serinprotease Autotransporter nachgewiesen werden. Gene, welche für Fimbrien kodieren, wurden lediglich bei zwei Stämmen gefunden. Hingegen wurde bei 60% der klinischen Isolate das Gen für ein iron-regulated homologue adhesin (iha) und bei zwei Stämmen zusätzlich das Gen nonfimbrial adhesion (nfaE) ermittelt. 80% der klinischen Stämme waren positiv für die Fimbrien-kodierenden Gene prfB und IpfA. Die Gruppe der Gene, die für Toxine kodieren, ist recht heterogen und weist am häufigsten die Gene cma (Colicin M) und astA (EAST-1 toxin) mit je 24% auf. Das Gen sat (autotransporter toxin) wurde in 60% der klinischen Isolate nachgewiesen. Die genotypisierten Stämme weisen demnach eine genetische Vielfalt auf, wodurch sie als Indikatorstämme bei der Isolation von Phagen genutzt werden können.

Tabelle 5: Ergebnisse der Genotypisierung ausgewählter ESBL-*E. coli* Stämme.

| Stamm | Resistenz-assoziierte Gene gegenüber | | | | | | |
|-----------|--------------------------------------|---|-----------------|----------------------|-------------|-------------|-----------------------|
| | Aminoglykosid-Antibiotika | Beta-Lactam-Antibiotika | Chloramphenicol | Makrolid-Antibiotika | Tetracyclin | Sulphonamid | Trimethoprim |
| E7 | aadA1, aadA2 | blaSHV | cmlA1 | | tetA | sul3 | |
| E8 | aadA1, aadA2 | blaSHV | cmlA1 | | tetA | sul3 | |
| E17 | strB | blaTEM | | | tetA | | |
| E18 | strA, strB | blaTEM | | | tetA | | |
| E28 | aadA2, aphA, strA, strB | blaCTX-M9 | | | tetB | sul1, sul2 | |
| E29 | | blaTEM | | | | | |
| E37 | strB | blaTEM | | | | sul2 | dfrA14 |
| E43 | aadA1, aadA2 | blaTEM, blaCTX-M9 | cmlA1 | | tetB | sul3 | dfrA1 |
| E50 | | blaCTX-M1, blaCTX-M15 | | | | sul2 | |
| E53 | | blaCTX-M1, blaCTX-M15 | | | | sul2 | |
| DSM101102 | aadA4, strA, strB | blaCTX-M1, blaCTX-M15 | floR | mphA, mrx | tetA, tetB | sul1, sul2 | dfrA17, dfrA19 |
| DSM101104 | strB | blaCTX-M1, blaCTX-M15, blaTEM | | mphA, mrx | | sul2 | |
| DSM101105 | aadA1, aphA, aadA4 | blaCTX-M1, blaCTX-M15, blaOXA-1 | catA1 | | tetB | sul1, sul2 | dfrA7, dfrA17, dfrA19 |
| DSM101111 | aac6, aac6lb, aadA4 | blaCTX-M1, blaCTX-M15, blaOXA-1 | catB3 | mphA, mrx | tetA | sul1 | dfrA17, dfrA19 |
| DSM101112 | aac6, aac6lb, aadA4, strA, strB | blaCTX-M1, blaCTX-M15, blaOXA-1 | catB3 | mphA, mrx | tetA | sul1, sul2 | dfrA17, dfrA19 |
| DSM101113 | aac6, aac6lb, aadA4 | blaCTX-M1, blaCTX-M15, blaOXA-1, blaTEM | catB3 | mphA, mrx | | sul1 | dfrA17, dfrA19 |
| DSM101114 | strA, strB, aadA4 | blaCTX-M1, blaCTX-M15, blaTEM | | mphA, mrx | tetA | sul1, sul2 | dfrA5, dfrA17, dfrA19 |
| DSM101120 | aadA4 | blaCTX-M1, blaCTX-M15, blaTEM | | mphA, mrx | tetA, tetB | sul1 | dfrA17 |
| DSM101121 | strB | blaCTX-M1, blaCTX-M15, blaTEM | | mphA | tetB | sul2 | |
| DSM101122 | strB | blaCTX-M1, blaCTX-M15, blaTEM | | | | sul1, sul2 | |
| DSM101124 | aadA1, aphA, strB | blaCTX-M1, blaCTX-M15, blaOXA-2 | | mphA, mrx | tetA | sul1, sul2 | dfrA1 |
| DSM101126 | aadA1 | blaCTX-M1, blaCTX-M15 | | | | sul1, sul2 | dfrA1 |
| DSM101133 | aadA1, aadB, ant2, strA, strB | blaCTX-M1, blaCTX-M15, blaTEM | catA1, floR | | tetA | sul1, sul2 | |
| DSM101134 | | blaTEM | | mphA, mrx | tetB | | dfrA1 |
| DSM101139 | aac6, aac6lb, aadA4 | blaCTX-M1, blaCTX-M15, blaOXA-1 | catA1, catB3 | mphA, mrx | tetA, tetB | sul1 | dfrA17 |

Tabelle 6: Ergebnisse der Genotypisierung ausgewählter ESBL-*E. coli* Stämme (Fortsetzung).

| Stamm | Serogenotypisierung | | Virulenzfaktor | | | | | Verschiedenes |
|-----------|---------------------|-------------------|----------------|----------|-------------------|-------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|
| | O-Antigen | H-Antigen | Adhesine | Fimbrien | Sekretionssysteme | Serinprotease Autotransporter | Toxine | |
| E7 | | fliC H48 | | | | | cma | hemL, intl1, iroN, iss |
| E8 | | fliC H48 | | | | | cma | hemL, intl1, iroN, iss |
| E17 | | fliC H39 | | | | | astA | hemL, iss |
| E18 | | fliC H39 | | | | | astA | hemL, iss |
| E28 | | fliC H34 | | prfB | | | astA | hemL, ireA |
| E29 | | fliC H7 | | | | | astA | hemL, iss |
| E37 | | fliC H10 | | | | | | hemL |
| E43 | | fliC H10 | | | | | cma, mchF | hemL, intl1, intl2, iroN, iss |
| E50 | | fliC H25 | | | | | cma | hemL, ireA, iroN, iss |
| E53 | O91 | fliC H7 | | lpfA | | | cma | hemL, iroN, iss |
| DSM101102 | | fliC H6 | | prfB | | | | hemL |
| DSM101104 | | fliC H5 | iha | prfB | | vat | sat, senB | hemL |
| DSM101105 | | fliC H4 | | lpfA | | | mcmA | hemL, intl1, ireA |
| DSM101111 | | fliC H4 | iha, nfaE | prfB | | | sat | intl1, iss |
| DSM101112 | | fliC H4 | iha | prfB | | | astA, sat, senB | iss |
| DSM101113 | | fliC H4 | iha, nfaE | prfB | | | sat | intl1, iss |
| DSM101114 | | fliC H4 | iha | prfB | | | cnf1, sat, senB | iss |
| DSM101120 | | fliC H4 | iha | prfB | | | sat | intl1 |
| DSM101121 | | fliC H1, fliC H46 | iha | prfB | espA_C_rodentium | pic, vat | cba, cma, mchB, mchC, mchF, mcmA, sat | hemL, ireA, iroN |
| DSM101122 | | fliC H5 | iha | prfB | | vat | sat, senB | hemL |
| DSM101124 | | fliC H15 | | | | | | hemL, intl1 |
| DSM101126 | | fliC H9 | | lpfA | | tsh | ccl, mchF | hemL, intl1, iroN, iss |
| DSM101133 | | fliC H18 | | | | espP | astA, toxB | hemL, intl1, iss |
| DSM101134 | | fliC H5 | iha | prfB | | vat | sat, senB | hemL, intl2, ireA |
| DSM101139 | | fliC H6 | | | | | | hemL, iss |

Tabelle 7: Totale und prozentuale Verteilung untersuchter Marker in Wild- und klinischen Isolaten.

| Marker | Wildisolate | | Klinische Isolate | | Gesamt | |
|-----------------------|-------------|----|-------------------|----|--------|----|
| | Σ | % | Σ | % | Σ | % |
| aac6 | 0 | 0 | 4 | 27 | 4 | 16 |
| aac6lb | 0 | 0 | 4 | 27 | 4 | 16 |
| aadA1 | 3 | 30 | 4 | 27 | 7 | 28 |
| aadA2 | 4 | 40 | 0 | 0 | 4 | 16 |
| aadA4 | 0 | 0 | 8 | 53 | 8 | 32 |
| aadB | 0 | 0 | 1 | 7 | 1 | 4 |
| ant2 | 0 | 0 | 1 | 7 | 1 | 4 |
| aphA | 1 | 10 | 2 | 13 | 3 | 12 |
| strA | 2 | 20 | 4 | 27 | 6 | 24 |
| strB | 4 | 40 | 8 | 53 | 12 | 48 |
| blaCTX-M1, blaCTX-M15 | 2 | 20 | 14 | 93 | 16 | 64 |
| blaCTX-M9 | 2 | 20 | 0 | 0 | 2 | 8 |
| blaOXA-1 | 0 | 0 | 5 | 33 | 5 | 20 |
| blaOXA-2 | 0 | 0 | 1 | 7 | 1 | 4 |
| blaSHV | 2 | 20 | 0 | 0 | 2 | 8 |
| blaTEM | 5 | 50 | 8 | 53 | 13 | 52 |
| catA1 | 0 | 0 | 3 | 20 | 3 | 12 |
| catB3 | 0 | 0 | 4 | 27 | 4 | 16 |
| cmIA1 | 3 | 30 | 0 | 0 | 3 | 12 |
| floR | 0 | 0 | 2 | 13 | 2 | 8 |
| mphA | 0 | 0 | 11 | 73 | 11 | 44 |
| mxr | 0 | 0 | 10 | 67 | 10 | 40 |
| tetA | 4 | 40 | 8 | 53 | 12 | 48 |
| tetB | 2 | 20 | 6 | 40 | 8 | 32 |
| sul1 | 1 | 10 | 11 | 73 | 12 | 48 |
| sul2 | 4 | 40 | 10 | 67 | 14 | 56 |
| sul3 | 3 | 30 | 0 | 0 | 3 | 12 |
| dfrA1 | 1 | 10 | 3 | 20 | 4 | 16 |
| dfrA5 | 0 | 0 | 1 | 7 | 1 | 4 |
| dfrA7 | 0 | 0 | 1 | 7 | 1 | 4 |
| dfrA14 | 1 | 10 | 0 | 0 | 1 | 4 |
| dfrA17 | 0 | 0 | 8 | 53 | 8 | 32 |
| dfrA19 | 0 | 0 | 6 | 40 | 6 | 24 |
| iha | 0 | 0 | 9 | 60 | 9 | 36 |
| nfaE | 0 | 0 | 2 | 13 | 2 | 8 |
| lpfA | 1 | 10 | 2 | 13 | 3 | 12 |
| prfB | 1 | 10 | 10 | 67 | 11 | 44 |
| espA_C_rodentium | 0 | 0 | 1 | 7 | 1 | 4 |
| espP | 0 | 0 | 1 | 7 | 1 | 4 |
| pic | 0 | 0 | 1 | 7 | 1 | 4 |
| tsh | 1 | 10 | 1 | 7 | 2 | 8 |
| vat | 0 | 0 | 4 | 27 | 4 | 16 |
| astA | 4 | 40 | 2 | 13 | 6 | 24 |
| cba | 0 | 0 | 1 | 7 | 1 | 4 |
| ccl | 0 | 0 | 1 | 7 | 1 | 4 |
| cma | 5 | 50 | 1 | 7 | 6 | 24 |
| cnf1 | 0 | 0 | 1 | 7 | 1 | 4 |
| mchB | 0 | 0 | 1 | 7 | 1 | 4 |
| mchC | 0 | 0 | 1 | 7 | 1 | 4 |
| mchF | 1 | 10 | 2 | 13 | 3 | 12 |
| mcmA | 0 | 0 | 2 | 13 | 2 | 8 |

| | | | | | | |
|-------|----|-----|----|----|----|----|
| sat | 0 | 0 | 9 | 60 | 9 | 36 |
| senB | 0 | 0 | 5 | 33 | 5 | 20 |
| toxB | 0 | 0 | 1 | 7 | 1 | 4 |
| hemL | 10 | 100 | 10 | 67 | 20 | 80 |
| intl1 | 3 | 30 | 7 | 47 | 10 | 40 |
| intl2 | 1 | 10 | 1 | 7 | 2 | 8 |
| ireA | 2 | 20 | 3 | 20 | 5 | 20 |
| iroN | 5 | 50 | 2 | 13 | 7 | 28 |
| iss | 8 | 80 | 7 | 47 | 15 | 60 |

Zur Identifizierung eines Stammes, der zum Einsatz im *In-vivo*-Versuch geeignet ist, wurden folgende Bedingungen an diesen Stamm gestellt: Zum einen sollte es sich um einen Stamm handeln, bei dem nicht mit einem pathogenen Verlauf nach der Infektion zu rechnen ist, um eine symptomlose intestinale Besiedlung mit APEC Stämmen nach zu ahmen, zum anderen musste jedoch eine Kolonisierung im Masthähnchen erzielt werden können. Gleichzeitig sollte für diesen Stamm eine möglichst große Anzahl an virulenten Phagen zur Verfügung stehen. Um den Stamm von kommensal im Magen-Darm-Trakt der Tiere vorkommenden *E. coli* abgrenzen zu können, wurde außerdem nach einem Feldstamm gesucht, der eine seltene (Antibiotika-) Resistenz aufweist. Daher wurden zehn Stämme, die von Geflügelfleisch isoliert und bereits genotypisiert wurden, hinsichtlich ihres Antibiotika-Resistenzmusters untersucht. Wie in **Abbildung 3** dargestellt ist, wiesen alle Stämme bei etwa 40%-60% der getesteten Antibiotika ein gehemmtes Wachstum auf. Drei Stämme E07, E28 und E43 wiesen einmalige Resistenzen auf. E07 besaß als einziger Stamm Resistenzen gegenüber Chloramphenicol und Amikacin, E28 besaß eine Kanamycin-Resistenz und E43 Resistenzen gegenüber Norfloxacin, Ofloxacin und Moxifloxacin. Jedoch wurde bisher nur für den Stamm E28 eine ausreichend hohe Anzahl an virulenten Phagen gefunden, um einen Cocktail zusammenzustellen. Zudem sollten die Cocktailphagen *per se* ein weites Wirtsspektrum aufweisen, was für die E28-lysierenden Phagen zutreffend war.

Tabelle 8: Antibiotika-Resistenz von ESBL-*E. coli* Wildstämmen.

| Antibiotikum | E07 | E08 | E17 | E18 | E28 | E29 | E37 | E43 | E50 | E53 |
|-------------------------|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Hemmhofdurchmesser [mm] | | | | | | | | | | |
| Amikacin | 0 | 22 | 23 | 22 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Ampicillin | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Aztreonam | 14 | 12 | 24 | 23 | 22 | 22 | 22 | 23 | 19 | 20 |
| Bacitracin | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cefalotin | 9 | 6 | 8 | 8 | 0 | 7 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| Cefazolin | 14 | 13 | 14 | 14 | 0 | 13 | 13 | 0 | 0 | 0 |
| Cefotaxim | 20 | 20 | 18 | 19 | 14 | 18 | 16 | 16 | 14 | 15 |

| | | | | | | | | | | |
|---------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Ceftriaxone | 20 | 20 | 20 | 12 | 11 | 18 | 16 | 14 | 12 | 12 |
| Chloramphenicol | 0 | 10 | 22 | 22 | 18 | 24 | 20 | 10 | 23 | 20 |
| Clindamycin | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Colistin | 12 | 13 | 14 | 12 | 14 | 13 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| Doxycyclin | 10 | 14 | 14 | 12 | 6 | 22 | 22 | 8 | 20 | 21 |
| Erythromycin | 6 | 0 | 7 | 8 | 0 | 8 | 9 | 7 | 8 | 8 |
| Fosfomycin | 32 | 34 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 28 | 30 | 30 |
| Gentamycin | 20 | 20 | 20 | 20 | 18 | 18 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Imipenem | 32 | 32 | 32 | 31 | 32 | 30 | 30 | 30 | 30 | 28 |
| Kanamycin | 21 | 20 | 21 | 20 | 0 | 20 | 18 | 20 | 20 | 20 |
| Lincomycin | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Linezolid | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Mezlocillin | 10 | 10 | 10 | 10 | 8 | 8 | 10 | 9 | 6 | 6 |
| Moxifloxacin | 22 | 24 | 24 | 22 | 16 | 21 | 30 | 0 | 26 | 28 |
| Neomycin | 16 | 16 | 17 | 16 | 6 | 16 | 15 | 16 | 16 | 16 |
| Nitrofurantoin | 22 | 22 | 23 | 23 | 10 | 21 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Norfloxacin | 27 | 24 | 24 | 22 | 13 | 20 | 30 | 0 | 28 | 30 |
| Nystatin | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ofloxacin | 24 | 24 | 22 | 20 | 14 | 21 | 30 | 0 | 24 | 24 |
| Oxacillin | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Penicillin G | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Pipemidsäure | 14 | 14 | 14 | 14 | 0 | 14 | 26 | 0 | 26 | 20 |
| Piperacillin/tazobactam | 24 | 24 | 27 | 24 | 24 | 24 | 24 | 24 | 24 | 24 |
| Polymyxin B | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 |
| Quinupristin/Dalfopristin | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Teicoplanin | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tetracyclin | 0 | 7 | 6 | 6 | 0 | 22 | 23 | 0 | 22 | 22 |
| Ticarillin | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Vancomycin | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Um neben der Kanamycin-Resistenz, welche zwar innerhalb der untersuchten Stämme einmalig war, jedoch mit 11,8%iger Wahrscheinlichkeit im Kot von Masthähnchen aufzufinden ist (Zoonose Monitoring 2013, BVL 2015), einen weiteren Marker nutzen zu können, wurden weitere Untersuchungen zur Identifizierung eines Markers durchgeführt, über den der *E. coli*-Stamm nach der Infektion eindeutig re-identifiziert werden konnte. Dazu wurde die Phänotypisierung der Stämme mit Hilfe des OmniLog™ ID Systems durchgeführt. Dabei wurde die Fähigkeit der Stämme auf verschiedenen Kohlenstoffquellen zu wachsen bzw. die Resistenz gegenüber inhibierender Substanzen ermittelt. **Abbildung 3** zeigt, dass hinsichtlich der Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen (Spalte 1-9) zwischen E28 und den übrigen untersuchten Stämmen kein nutzbarer Unterschied besteht. Auch hinsichtlich

der Fähigkeit unter hemmenden Bedingungen zu wachsen, konnte bei dem Stamm E28 keine wesentliche Besonderheit festgestellt werden, bis auf die Ausnahme, dass zusammen mit dem Stamm E43 ein Wachstum bei Anwesenheit von Kaliumtellurit (Well G12, vergleiche **Abbildung 1**) möglich war. Zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl von *E. coli* im Kot der Versuchstiere kann demnach TBX (Tryptone Bile X-Glucuronide)-Agar und für die Selektion von E28 im Kot TBX-Agar mit dem Zusatz von Kanamycin und Kaliumtellurit eingesetzt werden (TBX ist nach ISO Norm 16649-2:2001 ein geeignetes Medium zur selektiven Zählung von *E. coli*). Darüber hinaus wurde E28 vollständig sequenziert und annotiert (Schmidt et al. 2017). Die Resistenzgene *aph(3'')-Ib* (Eco28_04784), *aph(six)-Id* (Eco28_04785), *aph(3')-Ic* (Eco28_04786), *aadA2* (Eco28_05120), *blaCTX-M-14b* (Eco28_05116), *sul2* (Eco28_04812), *sul1* (Eco28_05118), *tet(B)* (Eco28_04800) und *dfrA16* (Eco28_05121) konnten dadurch identifiziert werden. In diesem Zuge wurde auch auf das Vorhandensein putativer Prophagen untersucht. Acht Regionen konnten identifiziert werden, die möglicherweise intakte Prophagen enthalten (Pro1: Eco28_01223-Eco28_01239, Pro2: Eco28_01264-Eco28_01314, Pro3: Eco28_01418-Eco28_01475, Pro4: Eco28_02472-Eco28_02548, Pro5: Eco28_02723-Eco28_02788, Pro6: Eco28_03037-Eco28_03084, Pro7: Eco28_04580-Eco28_04628 und Pro 8: Eco28_05122-Eco28_05161).

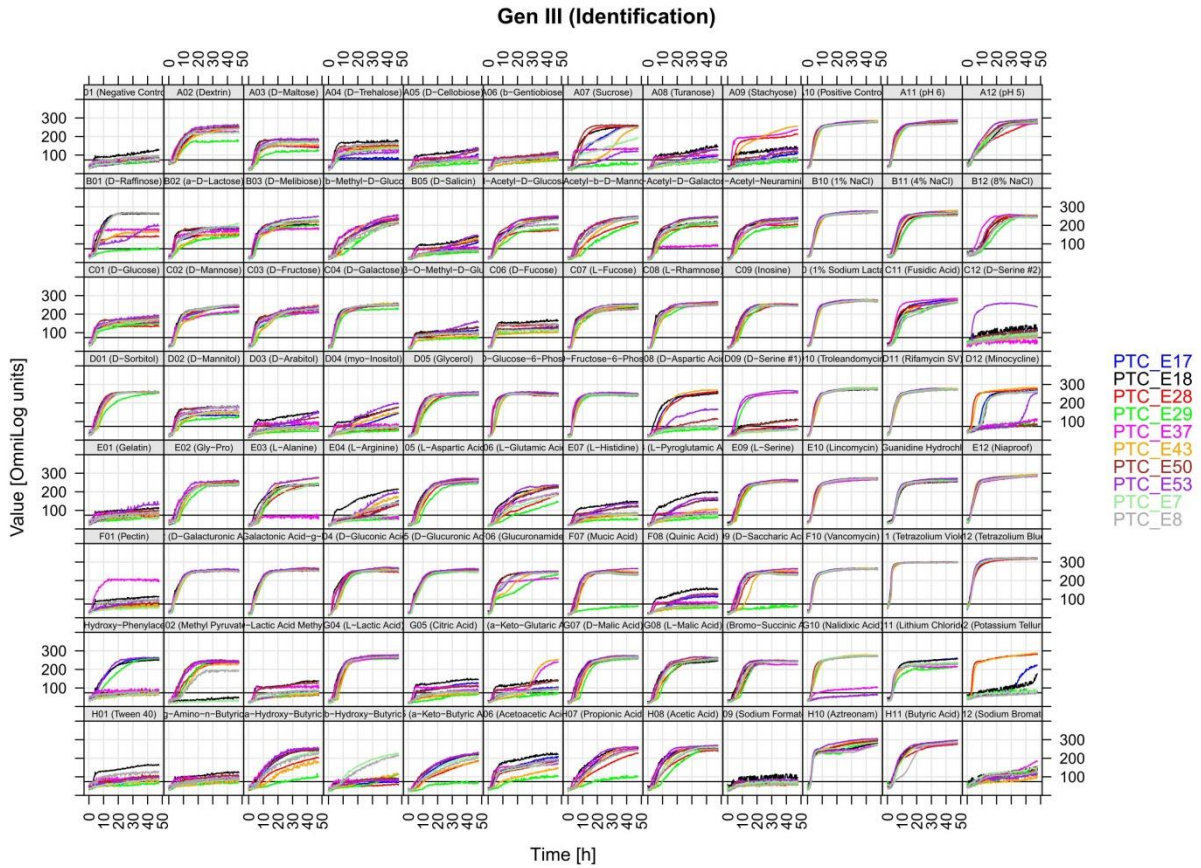


Abbildung 3: Wachstumskurven von ESBL-*E. coli*-Wildstämmen auf verschiedenen Substraten über einen Zeitraum von 48 h.

3.2

3.3 Isolierung von Bakteriophagen aus Umweltproben

Innerhalb des Projektzeitraumes wurde ein Phage, DrH1, auf dem Laborstamm E45 (MG1655) aus Oberflächenwasser isoliert, sowie fünf Weitere, GvR, RiS, TriM, YeV und Ciri(S), auf den Stämmen E119 und E130 aus Schweinegülle. Bei E119 und E130 handelte es sich um *E. coli* Stämme mit geringer Abdeckung durch die Phagen der PTC Sammlung, da durch eine Isolation auf schwierig zu infizierenden *E. coli* Stämmen Phagen mit hohem Potential für die Bekämpfung von bakteriellen Problemstämmen präferiert werden sollten. Vier Phagen wurden außerhalb des Projektzeitraumes isoliert und entstammen der Phagensammlung von PTC. Nach ihrer Isolation wurden die Phagen auf Bakterienstämmen amplifiziert, auf denen die höchsten Titer erzielt werden konnten. Als Wirtsstämme wurden entweder Laborstämme oder Stämme mit Risikoeinstufung durch die Zentrale Kommission für biologische Sicherheit (ZKBS) im Hinblick auf das Fehlen von Toxingenen und

hämolytischer bzw. cytotoxischer Eigenschaften [BVL, 2015] ausgewählt. Eine Liste der Phagen ist in **Tabelle 9** aufgeführt.

Des Weiteren wurden Phagen an der DSMZ isoliert und die Sammlung auf geeignete Phagen überprüft. Dafür wurden 15 Phagen im Zuge des Projektes (WF4596, WF5505, WFA4431, WFB4431, WFC1823, WFD1823, WFH5679, WFI7279, WFK6982, WFL6982, WFM8246, WFN8246, WFaE185, WFbE185, WFIE160) und sechs Phagen, welche im Rahmen des Phagetrapper-Projektes resultierten und bei der DSMZ hinterlegt sind (PT-GWK01, PT-GWK02, PT-MH-01, PT-XU04, PT-XU05, PT-XU06), aus Klärwasser (Braunschweig, Wolfenbüttel, Göttingen, Saarbrücken) isoliert.

Aus Braunschweiger Oberflächenwasser konnten die vier Phagen D5505, Ö5505, R4596, R5505 und aus Abwasser einer Braunschweiger Klinik die fünf Phagen KAW1APEC2540, KAW1APEC4500, KAW1E185, KAW3E185, KAW4APEC2540 gewonnen werden.

Während aus Pferdemit nur ein Phage (PT-MM01) isoliert werden konnte, lieferten Geflügelmistproben eine Vielzahl von Phagen (PT-MM02, EASG3498, EdH4498, EdSG2498, HASG4498, HdH2498, HdK1498, HdK5498, TdH1498, VAH1498, AI1E185, AI2E185, AII2A2293, AII2A2540, AIII1A2248, AIII3E17, AIII1A2248). PT-MM01 und PT-MM02 waren bereits vor Projektbeginn bei der DSMZ hinterlegt. Die Geflügelmistproben stammten aus Arnsberg, Braunschweig, Bückeburg und Goslar. Die größte Anzahl von Phagen (G10400, G17_1, G17_3, G18, G2133, G2248, G2285, G2293, G2469, G2494, G2540_1, G2540_2, G2540_3, G2540_4, G28, G29_1, G29_2, G37_3, G37_5, G4498, G4500, G4507, G50, G5211, G53, G7, G8, G9062) konnten aus (Schweine-) Gülle, die vom Institut für Düngemittel und Saatgut, LUFA Nord-West, Hameln bezogen wurden, isoliert werden.

Stämme, die zur Isolation verwendet wurden, sind aus **Tabelle 9** zu entnehmen.

Tabelle 9: Isolierte Phagen.

| Phage | Datum | Quelle | Isolationsstamm | | Wirtsstamm |
|----------------|--------------|--------------------------------------|-----------------|-------------------|------------|
| | | | Bezeichnung | Bemerkung | |
| DrH1 | 08.03.2016 | Oberflächenwasser (NRW) | E45 | MG1655 | E45 |
| GvR | 08.03.2016 | Gülle | E130 | ECOR-17 | E45 |
| RIS | 08.03.2016 | Gülle | E130 | ECOR-17 | E45 |
| TriM | 08.03.2016 | Gülle | E130 | ECOR-17 | E141 |
| YeV | 08.03.2016 | Gülle | E130 | ECOR-17 | E45 |
| Ciri(S) | 08.03.2016 | Gülle | E119 | ECOR-06 | E142 |
| AB27 | 27.01.2015 | Gülle | E53 | ESBL Wildisolat | E160 |
| EW2 | 2013 | Oberflächenwasser (NRW) | E1 | DH5α | E45 |
| TB49 | 2014 | Gülle | E64 | ECOR-13 | E126 |
| KRA2 | 2008 | Oberflächenwasser (Portici, Italien) | E1 | DH5α | E45 |
| WF4596 | Nov 2015 | Klärwasser (Wolfenbüttel) | DSM 101113 | Klinisches Isolat | |
| WF5505 | Nov 2015 | Klärwasser (Wolfenbüttel) | DSM 101114 | Klinisches Isolat | |
| WFA4431 | Nov/Dez 2015 | Klärwasser (Wolfenbüttel) | DSM 101133 | Klinisches Isolat | |
| WFB4431 | Nov/Dez 2015 | Klärwasser (Wolfenbüttel) | DSM 101133 | Klinisches Isolat | |
| WFC1823 | Nov/Dez 2015 | Klärwasser (Wolfenbüttel) | DSM 101121 | Klinisches Isolat | |
| WFD1823 | Nov/Dez 2015 | Klärwasser (Wolfenbüttel) | DSM 101121 | Klinisches Isolat | |
| WFH5679 | Nov/Dez 2015 | Klärwasser (Wolfenbüttel) | DSM 101139 | Klinisches Isolat | |
| WFI7279 | Nov/Dez 2015 | Klärwasser (Wolfenbüttel) | DSM 101126 | Klinisches Isolat | |
| WFK6982 | Nov/Dez 2015 | Klärwasser (Wolfenbüttel) | DSM 101124 | Klinisches Isolat | |
| WFL6982 | Nov/Dez 2015 | Klärwasser (Wolfenbüttel) | DSM 101124 | Klinisches Isolat | |
| WFM8246 | Nov/Dez 2015 | Klärwasser (Wolfenbüttel) | DSM 101112 | Klinisches Isolat | |
| WFN8246 | Nov/Dez 2015 | Klärwasser (Wolfenbüttel) | DSM 101112 | Klinisches Isolat | |
| WFaE185 | Feb 2016 | Klärwasser (Wolfenbüttel) | E185 | ECOR-Stamm | |
| WfbE185 | Feb 2016 | Klärwasser (Wolfenbüttel) | E185 | ECOR-Stamm | |
| WFIE160 | Feb 2016 | Klärwasser (Wolfenbüttel) | E160 | ECOR-Stamm | |

| | | | | |
|---------------------|--------------------------|----------------------------------|------------|-------------------|
| PT-GWK01 | Phage-Trapper Projekt | Abwasser (Saarbrücken) | DSM 30053 | |
| PT-GWK02 | | Abwasser (Saarbrücken) | DSM 498 | Laborstamm |
| PT-MH-01 | | Klärwasser (Göttingen) | DSM 498 | Laborstamm |
| PT-XU04 | | Klärwasser (Wolfenbüttel) | DSM 613 | Laborstamm |
| PT-XU05 | | Klärwasser (Wolfenbüttel) | DSM 498 | Laborstamm |
| PT-XU06 | | Klärwasser (Braunschweig) | DSM 498 | Laborstamm |
| D5505 | Nov 2015 | Oberflächenwasser (Braunschweig) | DSM 101114 | Klinisches Isolat |
| Ö5505 | Nov 2015 | Oberflächenwasser (Braunschweig) | DSM 101114 | Klinisches Isolat |
| R4596 | Nov 2015 | Oberflächenwasser (Braunschweig) | DSM 101113 | Klinisches Isolat |
| R5505 | Nov 2015 | Oberflächenwasser (Braunschweig) | DSM 101114 | Klinisches Isolat |
| KAW1APEC2540 | Apr/Mai 2016 | Klin. Abwasser (Braunschweig) | A2540 | APEC-Stamm |
| KAW1APEC4500 | Apr/Mai 2016 | Klin. Abwasser (Braunschweig) | A4500 | APEC-Stamm |
| KAW1E185 | Apr/Mai 2016 | Klin. Abwasser (Braunschweig) | E185 | ECOR-Stamm |
| KAW3E185 | Apr/Mai 2016 | Klin. Abwasser (Braunschweig) | E185 | ECOR-Stamm |
| KAW4APEC2540 | Apr/Mai 2016 | Klin. Abwasser (Braunschweig) | A2540 | APEC-Stamm |
| PT-MM01 | Feb/März 2016t | Pferdemist (Braunschweig) | DSM 498 | Laborstamm |
| PT-MM02 | Feb/März 2016 | Entenkot (Braunschweig) | DSM 498 | Laborstamm |
| EASG3498 | Feb/März 2016 | Entenkot (Goslar) | DSM 498 | Laborstamm |
| EdH4498 | Feb/März 2016 | Entenkot (Braunschweig) | DSM 498 | Laborstamm |
| EdSG2498 | Feb/März 2016 | Entenkot (Goslar) | DSM 498 | Laborstamm |
| HASG4498 | Feb/März 2016 | Hühnerkot (Goslar) | DSM 498 | Laborstamm |
| HdH2498 | Feb/März 2016 | Hühnerkot (Braunschweig) | DSM 498 | Laborstamm |
| HdK1498 | Feb/März 2016 | Hühnerkot (Bückeberg) | DSM 498 | Laborstamm |
| HdK5498 | Feb/März 2016 | Hühnerkot (Bückeberg) | DSM 498 | Laborstamm |
| TdH1498 | Feb/März 2016 | Taubenkot (Braunschweig) | DSM 498 | Laborstamm |
| VAH1498 | Feb/März 2016 | Sittichkot (Braunschweig) | DSM 498 | Laborstamm |
| AI1E185 | Apr/Mai 2016 | Geflügelkot (Goslar) | E185 | ECOR-Stamm |
| AI2E185 | Apr/Mai 2016 | Geflügelkot (Goslar) | E185 | ECOR-Stamm |
| AI2A2293 | Mai 2015 | Hühnerkot (Arnsberg) | A2293 | APEC-Stamm |
| AI2A2540 | Mai 2015 | Hühnerkot (Arnsberg) | A2540 | APEC-Stamm |

| | | | | |
|-------------------|----------|----------------------------|--------|------------|
| AIII1A2248 | Mai 2015 | Geflügelkot (Braunschweig) | A2248 | APEC-Stamm |
| AIII3E17 | Mai 2015 | Geflügelkot (Braunschweig) | E17 | Wildstamm |
| G10400 | Aug 2016 | Gülle (Raum Hameln) | A10400 | APEC-Stamm |
| G17_1 | Aug 2016 | Gülle (Raum Hameln) | E17 | Wildstamm |
| G17_3 | Aug 2016 | Gülle (Raum Hameln) | E17 | Wildstamm |
| G18 | Aug 2016 | Gülle (Raum Hameln) | E18 | Wildstamm |
| G2133 | Aug 2016 | Gülle (Raum Hameln) | A2133 | APEC-Stamm |
| G2248 | Aug 2016 | Gülle (Raum Hameln) | A2248 | APEC-Stamm |
| G2285 | Aug 2016 | Gülle (Raum Hameln) | A2285 | APEC-Stamm |
| G2293 | Aug 2016 | Gülle (Raum Hameln) | A2293 | APEC-Stamm |
| G2469 | Aug 2016 | Gülle (Raum Hameln) | A2469 | APEC-Stamm |
| G2494 | Aug 2016 | Gülle (Raum Hameln) | A2494 | APEC-Stamm |
| G2540_1 | Aug 2016 | Gülle (Raum Hameln) | A2540 | APEC-Stamm |
| G2540_2 | Aug 2016 | Gülle (Raum Hameln) | A2540 | APEC-Stamm |
| G2540_3 | Aug 2016 | Gülle (Raum Hameln) | A2540 | APEC-Stamm |
| G2540_4 | Aug 2016 | Gülle (Raum Hameln) | A2540 | APEC-Stamm |
| G28 | Aug 2016 | Gülle (Raum Hameln) | E28 | Wildstamm |
| G29_1 | Aug 2016 | Gülle (Raum Hameln) | E29 | Wildstamm |
| G29_2 | Aug 2016 | Gülle (Raum Hameln) | E29 | Wildstamm |
| G37_3 | Aug 2016 | Gülle (Raum Hameln) | E37 | Wildstamm |
| G37_5 | Aug 2016 | Gülle (Raum Hameln) | E37 | Wildstamm |
| G4498 | Aug 2016 | Gülle (Raum Hameln) | A4498 | APEC-Stamm |
| G4500 | Aug 2016 | Gülle (Raum Hameln) | A4500 | APEC-Stamm |
| G4507 | Aug 2016 | Gülle (Raum Hameln) | A4507 | APEC-Stamm |
| G50 | Aug 2016 | Gülle (Raum Hameln) | E50 | Wildstamm |
| G5211 | Aug 2016 | Gülle (Raum Hameln) | A5211 | APEC-Stamm |
| G53 | Aug 2016 | Gülle (Raum Hameln) | E53 | Wildstamm |
| G7 | Aug 2016 | Gülle (Raum Hameln) | E7 | Wildstamm |
| G8 | Aug 2016 | Gülle (Raum Hameln) | E8 | Wildstamm |
| G9062 | Aug 2016 | Gülle (Raum Hameln) | A9062 | APEC-Stamm |

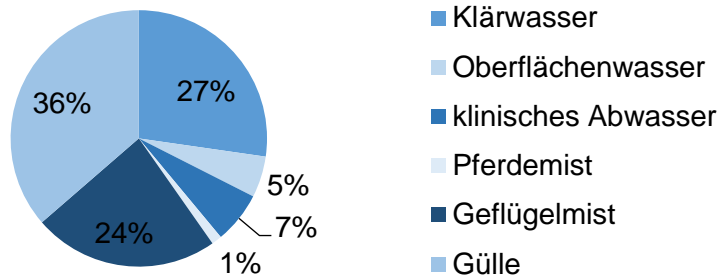


Abbildung 4: Verteilung isolierter Phagen auf die Art der Umweltproben.

3.4 Charakterisierung der isolierten Bakteriophagen; Sequenzierung und bioinformatische Charakterisierung

3.4.1 Phylogenetische Einordnung

Von ausgewählten Phagen wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Manfred Rohde (Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Zentrale Einrichtung für Mikroskopie, Braunschweig) TEM-Aufnahmen angefertigt, um die Phagen taxonomisch einordnen zu können. Die Klassifizierung erfolgte anhand morphologischer Gesichtspunkte. Die Aufnahmen sind in **Tabelle 10** dargestellt. Alle untersuchten Phagen konnten der Ordnung *Caudovirales* (geschwänzte Bakteriophagen) zugeordnet werden. Davon waren 58 Phagen der Familie *Myoviridae* (Schwanz kontraktile), 32 Phagen der Familie *Siphoviridae* (Schwanz lang, nicht kontraktile) und fünf Phagen der Familie *Podoviridae* (Schwanz kurz) zugehörig (siehe **Abbildung 5** und **Tabelle 10**). *Siphoviridae* wurden nach Ackermann (2001 [Ackermann & DuBow, 1987]) den Morphotypen B1 (30)/B2 (2) und die *Podoviridae* dem Morphotyp C1 (4)/C3 (1) zugeordnet. Von den 58 Phagen der Familie *Myoviridae* waren 19 Phagen dem Morphotyp A1 und 38 Phagen dem Morphotyp A2 zugehörig. Lediglich TriM entspricht dem Morphotyp A3. Dabei werden die Phagen G17_1, G17_3 und G18 den Jumbo-Phagen zugeordnet.

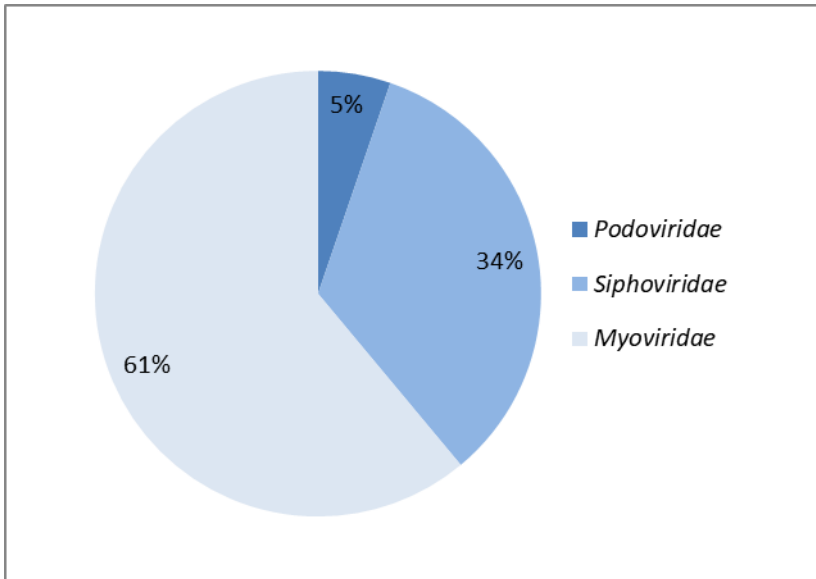
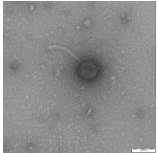
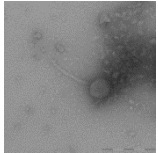
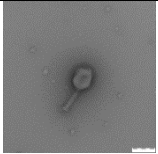
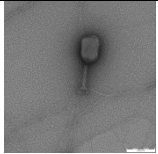
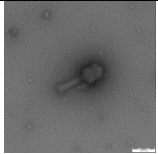
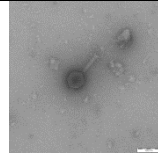
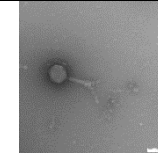
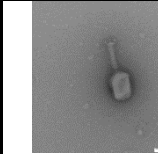
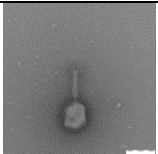
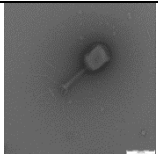
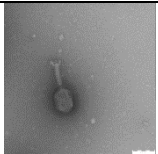
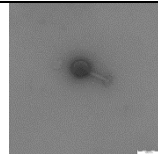
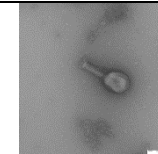
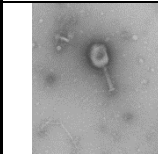
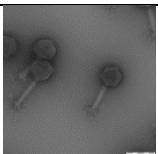
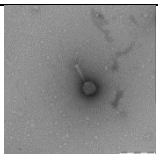
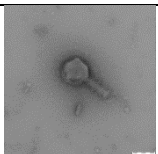
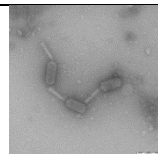
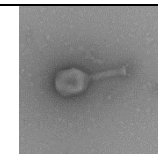
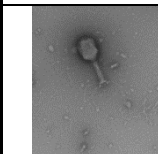
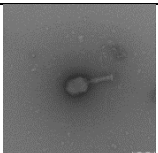
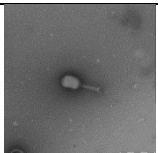
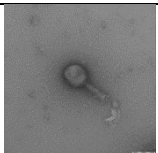
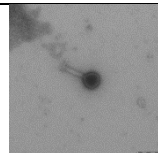
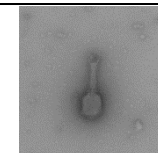
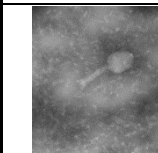

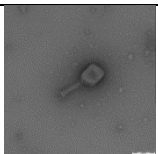


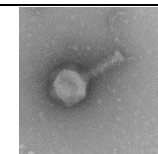

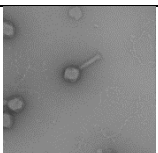
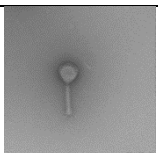

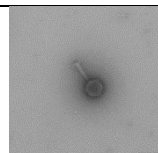
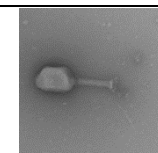
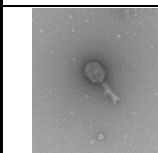


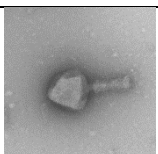
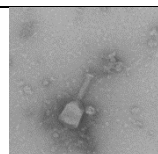
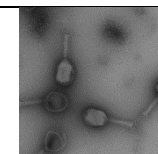
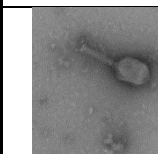
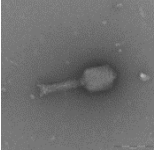

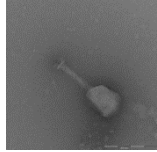
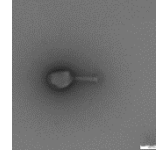
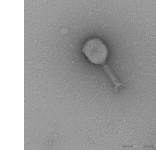
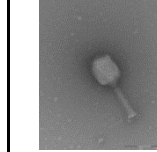
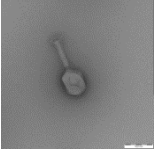
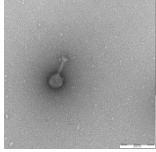
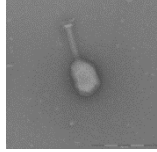
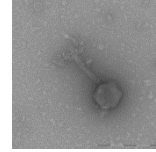
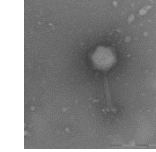
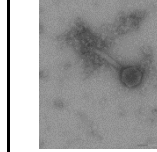
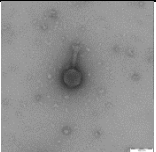
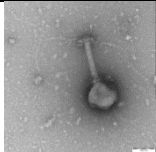
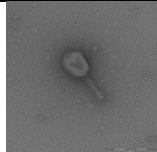
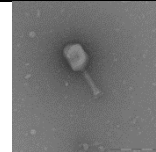


Abbildung 5: Verteilung der isolierten Phagen auf die Familien der Ordnung Caudovirales.

Tabelle 10: Morphologische Merkmale der Phagen und deren Zuordnung zu den Familien der Ordnung Caudovirales. Die abgebildeten TEM-Aufnahmen wurden durch Prof. Manfred Rohde (Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Zentrale Einrichtung für Mikroskopie, Braunschweig) erstellt.

| <i>Podoviridae</i> | | | | | |
|---------------------|--------|--------|---------|-----------|--------|
| | | | | | |
| KAW1A4500 | R4596 | PTXU04 | WFI | KAW1A2540 | |
| <i>Siphoviridae</i> | | | | | |
| | | | | | |
| WFIE160 | EASG3 | HASG4 | VAH1 | HdH2 | PTXU05 |
| | | | | | |
| PTXU06 | PTMH01 | PTMM01 | PTGWK01 | PTGWK02 | WF4596 |
| | | | | | |
| WF5505 | TdH2 | EdSG2 | G29_2 | HdK1 | HdSG1 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
|  |  | | | | |
| AI1E185 | KAW4A2540 | | | | |
| <i>Myoviridae</i> | | | | | |
|  |  |  |  |  |  |
| G2540_1 | MM02 | G37_3 | GvR | Schickerm | G10400 |
|  |  |  |  |  |  |
| G4500 | G4507 | WFaE185 | RiS | G28 | DrH1 |
|  |  |  |  |  |  |
| EdH4 | HdK5 | G17_3 | TriM | R5505 | AB19 |
|  |  |  |  |  |  |
| G5211 | WFK | G29_1 | YeV | G37_5 | G7 |
|  |  |  |  |  |  |
| G9062 | KAW1E185 | AB27 | Ciri(S) | G17_1 | G50 |
|  |  |  |  |  |  |
| WFC | WFH | EW2 | TB49 | G53 | G2248 |
|  |  |  |  |  |  |
| D5505 | Ö5505 | G18 | KAW3E185 | G2285 | G2293 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|--|---|
|  |  |  |  |  |  |
| G2494 | G2540_4 | G2540_3 | G2469 | G2540_2 | WFL6982 |
|  |  |  |  |  |  |
| G5211_1 | KRA2 | WFbE185 | KWBSE43_2 | KWBSE43_6 | AIII3E17 |
|  |  |  |  | | |
| AIIA2293 | AIII1A2248 | G4498 | G8 | | |

Bei der Zusammenstellung von Phagencocktails ist die Verwendung von Phagen unterschiedlicher phylogenetischer Gruppen vorteilhaft, um seine Effizienz zu erhöhen, bakterielle Abwehrmechanismen zu umgehen und Resistenzbildungen zu vermeiden. Zur phylogenetischen Einordnung der Phagen wurden ihre Genome sequenziert und eine BLASTn Analyse gegen die Nukleotid-Datenbank von NCBI *National Center for Biotechnology Information* durchgeführt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 11** zusammengefasst. Zur Zuordnung der Phagen anhand ihrer Homologien zu Phagengenomen der Nukleotid-Datenbank wurde die aktuelle Taxonomie des *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) hinzugezogen [ICTV 2017; <http://www.ictvonline.org>]. Die Genomsequenzen der Phagen GvR, AB27 und TB49 waren fragmentiert, weshalb keine Genomgrößen und GC-Gehalte angegeben wurden.

Tabelle 11: Sequenzierungs- und BLAST-Ergebnisse der Phagen (Sequenzierung durch Microsynth).

| Phage | Genom (bp) | GC (%) | BLASTn | | | | |
|---------|------------|--------|-----------|-----------|------------------------------------|-------------|---|
| | | | Ident (%) | Query (%) | Bezeichnung | Zugriffsnr. | Phylogenie |
| DrH1 | | | 97 | 89 | <i>E. coli</i> Phage vG EcoM-UFV13 | KU867876.1 | <i>Myoviridae</i> , |
| | | | 98 | 88 | Enterob. Phage T4 Stamm 147 | KJ477685.1 | <i>Myoviridae</i> , <i>Tevenvirinae</i> , T4-ähnliche Phagen |
| GvR | - | - | 98 | 95 | Enterob. Phage ECGD1 | KU522583.1 | <i>Myoviridae</i> |
| | | | 98 | 94 | Enterob. Phage phi92 | FR775895.2 | <i>Myoviridae</i> , <i>Vequintavirinae</i> , rv5-ähnliche Phagen |
| RiS | 148.172 | 37,5 | 98 | 94 | Enterob. Phage phi92 | FR775895.2 | <i>Myoviridae</i> , <i>Vequintavirinae</i> , rv5-ähnliche Phagen |
| | | | 98 | 94 | Enterob. Phage ECGD1 | KU522583.1 | <i>Myoviridae</i> |
| TriM | 53.346 | 45,7 | 96 | 98 | <i>Salmonella</i> Phage BP63 | KM366099.1 | <i>Myoviridae</i> , BP63 |
| YeV | 148.402 | 37,4 | 97 | 96 | Enterob. Phage ECGD1 | KU522583.1 | <i>Myoviridae</i> |
| | | | 98 | 95 | Enterob. Phage phi92 | FR775895.2 | <i>Myoviridae</i> , <i>Vequintavirinae</i> , rv5-ähnliche Phagen |
| Ciri(S) | 166.836 | 40,5 | 97 | 95 | Enterob. Phage phi1 | EF437941.1 | <i>Myoviridae</i> , <i>Tevenvirinae</i> , RB49-ähnliche Phagen |
| | | | 98 | 96 | Enterob. Phage RB49 | AY343333.1 | <i>Myoviridae</i> , <i>Tevenvirinae</i> , RB49-ähnliche Phagen |
| AB27 | - | - | 98 | 94 | Enterob. Phage phi92 | FR775895.2 | <i>Myoviridae</i> , <i>Vequintavirinae</i> , rv5-ähnliche Phagen |
| | | | 98 | 94 | Enterob. Phage ECGD1 | KU522583.1 | <i>Myoviridae</i> |
| EW2 | 136.949 | 43,6 | 97 | 97 | <i>E. coli</i> Phage rv5 | DQ832317.1 | <i>Myoviridae</i> , <i>Vequintavirinae</i> , rv5-ähnliche Phagen |
| | | | 98 | 99 | <i>E. coli</i> Phage slur12 | LN881735.1 | <i>Myoviridae</i> |
| TB49 | - | - | 96 | 94 | <i>E. coli</i> Phage HY01 | KF925357.1 | <i>Myoviridae</i> , <i>Tevenvirinae</i> , T4-ähnliche Phagen |
| | | | 96 | 94 | <i>E. coli</i> Phage PEC04 | KR233165.1 | <i>Myoviridae</i> |
| KRA2 | 138662 | 46 | 97 | 93 | <i>Salmonella</i> Phage PVP-SE1 | GU070616.1 | <i>Myoviridae</i> , <i>Vequintavirinae</i> , rv5-ähnliche Phagen |
| | | | 98 | 88 | <i>Salmonella</i> Phage SSE-121 | JX181824.1 | <i>Myoviridae</i> , <i>Vequintavirinae</i> |
| G28 | 170121 | 35,4 | | | HY01 | | <i>Myoviridae</i> , |
| | | | | | PE37 | | T4viruses |

Tabelle 12: Sequenzierungsergebnisse weiterer Phagen (Sequenzierung durch die DSMZ).

| Phage | Morphologie | Genomgröße (bp) | GC (%) |
|----------------|--------------------|------------------------|---------------|
| HASG4 | Siphoviridae | 120603 | 39.02 |
| G5211 | Myoviridae | 164278 | 40.44 |
| G37-3 | Myoviridae | 167832 | 40.33 |
| G17 | Myoviridae | 370817 | 34.33 |
| EASG3 | Siphoviridae | 120715 | 39.04 |
| EdH4 | Myoviridae | 136031 | 43.65 |
| HdH2 | Siphoviridae | 120120 | 39.32 |
| HdK5 | Myoviridae | 139328 | 43.63 |
| KAW1A4500 | Podoviridae | 44241 | 45.18 |
| R4596 | Podoviridae | 45130 | 44.84 |
| Schickermooser | Myoviridae | 151194 | 39.01 |
| WFC | Myoviridae | 72472 | 46.01 |
| WFH | Myoviridae | 71283 | 46.12 |
| WFI(e160) | Siphoviridae | 45536 | 54.57 |
| WF5505 | Siphoviridae | 47082 | 54.3 |
| VAH1 | Siphoviridae | 124537 | 38.61 |
| HDK1rev | Siphoviridae | 64059 | 44.07 |
| G29 | Myoviridae | 168241 | 35.33 |
| G2540 | Myoviridae | 168886 | 35.36 |
| G2248 | Myoviridae | 170678 | 40.52 |
| KAW1E185 | Myoviridae | 164987 | 35.37 |
| G50 | Myoviridae | 167728 | 35.52 |
| G53 | Myoviridae | 167834 | 37.75 |
| G2285 | Myoviridae | 166675 | 37.54 |
| G2469 | Myoviridae | 170452 | 37.57 |
| G2540-3 | Myoviridae | 168654 | 35.33 |
| G10400 | Myoviridae | 170182 | 35.29 |
| WFK | Myoviridae | 164590 | 37.58 |
| MM02 | Myoviridae | 169201 | 37.6 |
| G4507 | Myoviridae | 168828 | 35.37 |
| G9062 | Myoviridae | 168670 | 35.3 |
| G4500 | Myoviridae | 168363 | 35.32 |
| G8 | Myoviridae | 169650 | 35.33 |
| KAW3E185 | Myoviridae | 170187 | 37.55 |
| OE5505 | Myoviridae | 168756 | 35.22 |
| R5505 | Myoviridae | 167317 | 35.36 |
| WFI101126 | Podoviridae | 77307 | 42.07 |
| G2133 | Myoviridae | 168959 | 35.33 |

| | | | |
|------------|--------------|--------|-------|
| G2494 | Myoviridae | 168327 | 40.32 |
| PTXU04 | Podoviridae | 61600 | 52.84 |
| AIII1A2248 | Myoviridae | 237307 | 46.53 |
| HdSG1 | Siphoviridae | 63595 | 43.87 |
| PTXU06 | Siphoviridae | 42321 | 54.44 |
| G29-2 | Siphoviridae | 51739 | 44.02 |
| KWBSE43-6 | Myoviridae | 158607 | 46.09 |
| MM01 | Siphoviridae | 43157 | 43.77 |
| D5505 | Myoviridae | 168409 | 35.39 |
| WFL6982 | Myoviridae | 164279 | 37.56 |
| WFbE185 | Myoviridae | 170429 | 37.6 |
| G4498 | Myoviridae | 167826 | 35.46 |

Wie man schon anhand der morphologischen Charakterisierung erkennen konnte, weisen die Phagen eine große Diversität auf. Genomgrößen reichen von 42 – 371 kb. Bei allen isolierten Phagen handelt es sich um Vertreter der *Caudovirales*, innerhalb dieser Ordnung können sie weiter in die Familien *Myoviridae*, *Siphoviridae* und *Podoviridae* unterteilt werden. Den *Myoviridae* sind insgesamt sechs Subfamilien untergeordnet, darunter die *Vequintavirinae*, zu denen die Phagen rv5, PVP-SE1 (Santos et al. 2011), vB_EcoM_FV3 (Truncaite et al. 2012) und phi92 (Schwarzer et al. 2012) gezählt werden, und die *Tevenvirinae*, mit den *T4-ähnlichen* und *RB49-ähnlichen Phagen*. [ICTV 2017; <http://www.ictvonline.org>]. Von den isolierten Phagen besitzen GvR, RiS, YeV und AB27 auf Basis ihrer genomischen Sequenzen große Ähnlichkeit mit den Phagen phi92 (Schwarzer et al. 2012) und können somit den *rv5-ähnlichen Phagen* zugeordnet werden. Die Genomgrößen von RiS und YeV liegen mit 148.172 bp und 148.402 bp ebenfalls im Bereich von phi92 (148.612 bp), wohingegen ECGD1 mit 146.647 bp ein geringfügig kleineres Genom besitzt. Auch EW2 und KRA2 können aufgrund ihrer Homologien zum namensgebenden Phagen rv5 bzw. dem Phagen PVP-SE1 der Gattung der *rv5-ähnlichen Phagen* zugeordnet werden. DrH1 dagegen weist mit seinem 168.062 bp großen Genom deutliche Sequenzübereinstimmungen mit den Phagen T4 Stamm 147 (Bryson et al. 2015) auf und gehört daher vermutlich zu den *T4-ähnlichen Phagen*. Gleiches gilt für TB49, da er Homologien zu HY01 aufweist und dieser vor kurzem als *T4-ähnlicher Phage* klassifiziert wurde (Lee et al. 2016). Ciri(S) hingegen weist Homologien zu den Phagen phi1 (Arbiol et al. 2010) und RB49 (Monod et al. 1997) auf und ist damit in eine weitere Gattung der *Tevenvirinae*,

die *RB49-ähnlichen Phagen*, einzuordnen, während der Phage TriM lediglich Übereinstimmungen mit dem *Salmonella* Phagen BP63 [Zugriffsnr. KM366099.1] zeigt, welcher innerhalb der *Myoviridae* nicht näher klassifiziert ist.

Die morphologischen Merkmale der meisten Phagen spiegeln dementsprechend die phylogenetische Einordnung wider, welche auf Basis ihrer genetischen Merkmale durchgeführt wurde. Lediglich der Phage TB49, welcher genetisch den *T4-ähnlichen Phagen* zugeordnet wurde, zeigt äußerlich den Morphotyp A1, welcher für *Tevenvirinae* untypisch ist.

Da die taxonomische Einordnung der Phagen keine Aussage über die Evolution oder Phylogenie der Phagen zulässt, wurden ausgewählte Phagen sequenziert und mit bereits bekannten Genomsequenzen verglichen. Zusätzlich sollte die Sequenzierung der Phagen Aufschluss über den Replikationszyklus der Phagen liefern. Es wurden von 61 Phagen DNA isoliert, diese sequenziert und annotiert. Basierend auf dieser Charakterisierung spricht nichts gegen den Einsatz dieser Phagen für Therapiezwecke, da sie aufgrund fehlender Gene für Repressoren und Integrasen vermutlich obligat virulent sind und nur den lytischen Lebenszyklus verfolgen können und zudem keine Gene, die für Toxine codieren, im Genom detektiert wurden. Die Phagen, welche an der DSMZ isoliert wurden, können demnach der Öffentlichkeit zugänglich gemacht werden und stehen für weitere Forschungen/ Anwendungen zur Verfügung.

Die Phagen EdH4 und HdK5 weisen beide Homologien zur Familie der *rv5-ähnlichen Phagen* auf. Dazu gehören die Phagen Murica, FFH2 und APCEc02, wobei FFH2 *E. coli* O157:H7 in Rinderhackfleisch und Spinat vermindern kann und auch APCEc02 bereits als vielversprechender Therapiephage beschrieben wurde (Dalmasso et al. 2016)(Hong et al. 2014).

Der Siphovirus HdH2 weist Sequenzähnlichkeiten zur Familie der *T5-ähnlichen Phagen* auf. Der ebenfalls dazugehörige Phage FFH1 wird wie der Phage FFH2 im Zusammenhang mit der Lebensmitteldekontamination beschrieben (Hong et al. 2014) (**Abbildung 6**).

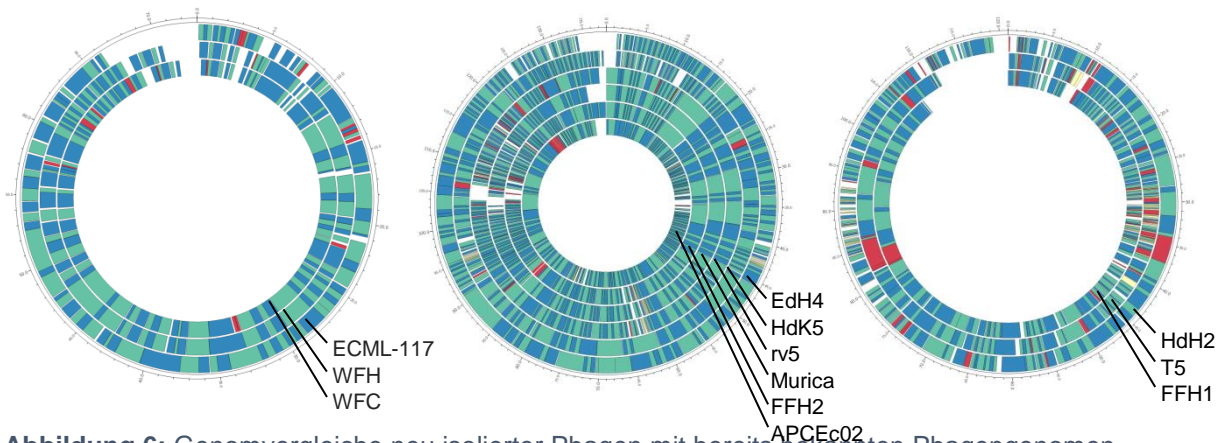


Abbildung 6: Genomvergleiche neu isolierter Phagen mit bereits bekannten Phagengenomenen. Kodierende DNA-Sequenzen (engl. Coding DNA sequences (CDS)) mit Orthologen sind in grün und blau, CDS ohne Orthologe in rot und tRNAs als gelbe Bereiche dargestellt. Die Abbildungen wurden mit Circos dargestellt.

Die Phagen WFH und WFC weisen eine hohe Ähnlichkeit zu dem Myovirus ECML-117 auf, welcher Bestandteil des Phagencocktails EcoShield™ ist. Dieser ist in der Lage die Kontamination von Fleisch und Salat mit *E. coli* O157:H7 zu reduzieren (Carter et al. 2012). Die Phagen WFH und WFC unterscheiden sich lediglich in Genen, welche für die Schwanzfibern der Phagen kodieren, die eine Rolle bei der Adsorption an der Wirtszelle spielen. Durch diese Unterschiede der sonst sehr ähnlichen Phagen lassen sich die verschiedenen Wirtsspektren (**Abbildung 7**) erklären.

3.4.2 Wirtsspektren

Für die Zusammenstellung eines Phagencocktails ist es erstrebenswert, dass die Phagen selbst ein möglichst weites Wirtsspektrum besitzen, um eine möglichst große Bandbreite an potenziell pathogenen *E. coli*-Stämmen eliminieren zu können, ohne Änderungen am Cocktail vornehmen zu müssen. Wie aus **Abbildung 7**, **Tabelle 7** und **Tabelle 9** zu entnehmen ist, lässt sich aus dem Ursprung der Phagen keine Spezifität für die Lyse der Wirtsstämme oder den Wirtsbereich ableiten. Die Wirtabdeckung der Phagen variiert sehr stark und reicht von 1% bis 54%. 15 Phagen lysieren 1-10%, 46 Phagen lysieren 11-30% und 15 Phagen >31% der Stämme. Auch die Anzahl von Phagen, die einen Stamm lysieren, ist sehr unterschiedlich. Während ein Stamm (E43) bisher von keinem Phagen abgedeckt ist, werden 14 Stämme von mehr als 31% der Phagen lysiert. 41 Stämme werden von 11-30% der Phagen lysiert und 17 Stämme nur von weniger als 10% der Phagen abgedeckt.

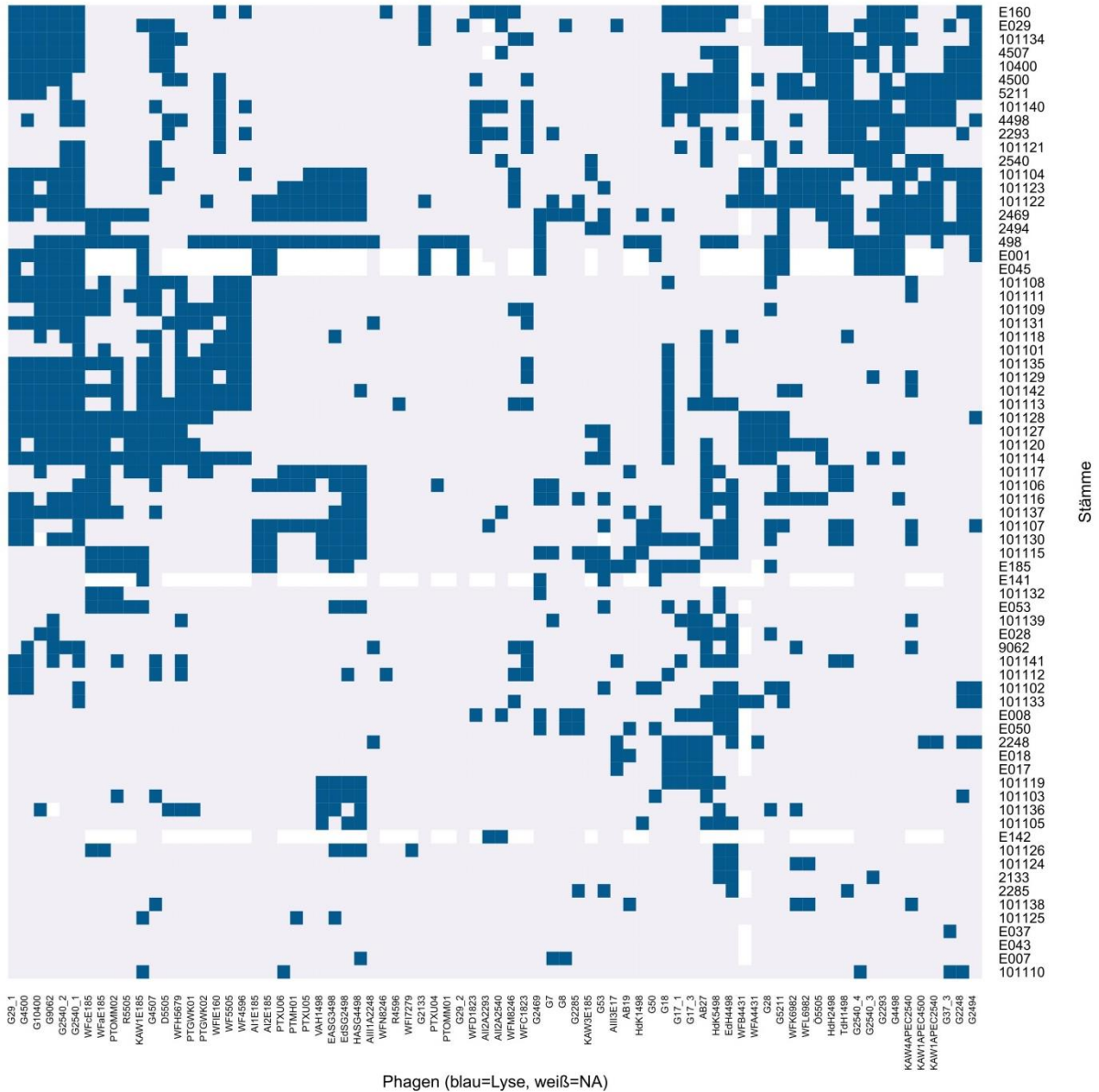


Abbildung 7: Wirtsspektrum von 76 Coliphagen auf 42 klinischen Stämmen (101101-101142), Wildstämmen (E07-E53, E160, E185), APEC-Stämmen (2133-10400) und Laborstämmen (498, E001, E045, E141, E142).

Tabelle 13: Fähigkeit von Coliphagen Wirtsstämme zu lysieren.

| Phage | Σ lysierter Stämme | % lysierter Stämme | Phage | Σ lysierter Stämme | % lysierter Stämme |
|---------|--------------------|--------------------|--------------|--------------------|--------------------|
| G2540_1 | 39 | 54 | VAH1498 | 13 | 18 |
| AB27 | 35 | 49 | WFA4431 | 13 | 18 |
| G2540_2 | 35 | 49 | WFL6982 | 13 | 18 |
| G9062 | 32 | 44 | G2469 | 12 | 17 |
| EdH4498 | 31 | 43 | KAW1APEC2540 | 12 | 17 |
| G29_1 | 31 | 43 | PTGWK01 | 12 | 17 |
| G4500 | 31 | 43 | PTGWK02 | 12 | 17 |
| G10400 | 29 | 40 | WF5505 | 12 | 17 |

| | | | | | |
|--------------|----|----|--------------|----|----|
| G4507 | 29 | 40 | G2540_4 | 11 | 15 |
| HdK5498 | 28 | 39 | G37_3 | 11 | 15 |
| G18 | 25 | 35 | R5505 | 11 | 15 |
| KAW1E185 | 24 | 33 | AI1E185 | 10 | 14 |
| G5211 | 23 | 32 | AI2E185 | 10 | 14 |
| G28 | 22 | 31 | G50 | 10 | 14 |
| WfFaE185 | 22 | 31 | KAW1APEC4500 | 10 | 14 |
| TdH1498 | 21 | 29 | WFM8246 | 10 | 14 |
| WFH5679 | 21 | 29 | AI12A2540 | 9 | 13 |
| G2494 | 20 | 28 | AB19 | 8 | 11 |
| HASG4498 | 20 | 28 | G7 | 8 | 11 |
| HdH2498 | 20 | 28 | PTMH01 | 8 | 11 |
| KAW4APEC2540 | 20 | 28 | PTXU05 | 8 | 11 |
| WFcE185 | 20 | 28 | PTXU06 | 8 | 11 |
| EASG3498 | 19 | 26 | WFB4431 | 8 | 11 |
| EdSG2498 | 19 | 26 | G2133 | 7 | 10 |
| G4498 | 19 | 26 | G2285 | 7 | 10 |
| G17_3 | 17 | 24 | HdK1498 | 7 | 10 |
| G2293 | 17 | 24 | KAW3E185 | 7 | 10 |
| G2540_3 | 17 | 24 | WFD1823 | 7 | 10 |
| WFK6982 | 17 | 24 | AI113E17 | 6 | 8 |
| WFIE160 | 17 | 24 | AI12A2293 | 5 | 7 |
| D5505 | 16 | 22 | G8 | 5 | 7 |
| G2248 | 16 | 22 | AI111A2248 | 4 | 6 |
| PTOMM02 | 16 | 22 | G29_2 | 4 | 6 |
| WF4596 | 16 | 22 | PTXU04 | 2 | 3 |
| G17_1 | 14 | 19 | WfN8246 | 2 | 3 |
| G53 | 14 | 19 | PTOMM01 | 1 | 1 |
| Ö5505 | 14 | 19 | R4596 | 1 | 1 |
| WFC1823 | 14 | 19 | WFI7279 | 1 | 1 |

Tabelle 14: Abdeckung von Wirtsstämmen durch Phagen.

| Stamm | Σ lysierender Phagen | % lysierender Phagen | Stamm | Σ lysierender Phagen | % lysierender Phagen |
|--------|----------------------|----------------------|--------|----------------------|----------------------|
| 498 | 45 | 59 | 101121 | 16 | 21 |
| 2469 | 38 | 50 | 2494 | 16 | 21 |
| 101122 | 37 | 49 | 101141 | 15 | 20 |
| 101104 | 32 | 42 | 101131 | 14 | 18 |
| E160 | 31 | 41 | 101118 | 13 | 17 |
| E029 | 30 | 39 | 2540 | 13 | 17 |
| 101114 | 29 | 38 | 101102 | 12 | 16 |
| 4500 | 28 | 37 | E053 | 12 | 16 |
| 101123 | 27 | 36 | 2248 | 12 | 16 |

| | | | | | |
|--------|----|----|--------|----|----|
| 101140 | 25 | 33 | 9062 | 11 | 14 |
| 5211 | 25 | 33 | 101101 | 10 | 13 |
| 101107 | 24 | 32 | 101133 | 10 | 13 |
| 101113 | 24 | 32 | 101136 | 10 | 13 |
| 101134 | 24 | 32 | E008 | 10 | 13 |
| 101120 | 23 | 30 | 101103 | 9 | 12 |
| 101142 | 23 | 30 | 101112 | 9 | 12 |
| 4498 | 23 | 30 | 101119 | 9 | 12 |
| 101116 | 22 | 29 | 101126 | 8 | 11 |
| 101128 | 22 | 29 | 101139 | 8 | 11 |
| 101130 | 22 | 29 | 101105 | 7 | 9 |
| 4507 | 22 | 29 | E028 | 7 | 9 |
| 101115 | 21 | 28 | E050 | 7 | 9 |
| 101117 | 21 | 28 | E018 | 6 | 8 |
| 101127 | 21 | 28 | 101110 | 5 | 7 |
| 101106 | 20 | 26 | 101132 | 5 | 7 |
| 101135 | 20 | 26 | 101138 | 5 | 7 |
| E001 | 20 | 26 | E017 | 5 | 7 |
| 101129 | 19 | 25 | 101124 | 4 | 5 |
| 10400 | 19 | 25 | E141 | 4 | 5 |
| 101137 | 18 | 24 | 2285 | 4 | 5 |
| E185 | 18 | 24 | 101125 | 3 | 4 |
| 101108 | 17 | 22 | E007 | 3 | 4 |
| 101109 | 17 | 22 | 2133 | 3 | 4 |
| E045 | 17 | 22 | E142 | 2 | 3 |
| 2293 | 17 | 22 | E037 | 1 | 1 |
| 101111 | 16 | 21 | E043 | 0 | 0 |

Genauere Kenntnis über Breite und Spezifität von Phagen-Wirtsspektren ist Voraussetzung für die Erstellung eines effizienten Cocktails. Vorteilhaft ist dabei die Verwendung von Phagen mit breiten, sich ergänzenden Spektren, um eine möglichst breite Abdeckung der phänotypischen Diversität eines Zielbakteriums zu erzielen. Daher wurden die Wirtsspektren der Phagen durch Titration auf einer möglichst diversen Sammlung von Labor- und ESBL *E. coli* Stämmen bestimmt, die im Hinblick auf ihren regionalen Ursprung und den Isolationszeitraum ausgewählt wurden. Die erzielten Phagentiter sind in **Tabelle 15** dargestellt, die darauf basierenden Wirtsspektren in **Tabelle 16**. Diese Spektren dienen zugleich zur Auswahl eines *E. coli* Stammes für den Einsatz im *in-vivo* Versuch.

Tabelle 15: Phagentiter auf den Labor- und ESBL *E. coli* Stämmen.

Angabe der Titer in PFU/ml

| <i>E. coli</i> | | Phagen | | | | | | | | |
|----------------|---------|--------------|----------|----------|-----------|----------|-----------|----------|----------|-----------|
| PTC # ID | Serotyp | Ciri(S).E142 | EW2.E45 | RiS.E45 | TB49.E126 | YeV.E45 | AB27.E160 | DrH1.E45 | GvR.E45 | TriM.E141 |
| E45 | | 9.00E+09 | 1.70E+10 | 2.80E+08 | 4.50E+08 | 3.00E+09 | 5.00E+09 | 1.00E+10 | 2.00E+09 | 0 |
| E28 | H24 | 0 | 9.00E+09 | 7.80E+07 | 1.00E+09 | 2.00E+07 | 5.00E+09 | 0 | 1.00E+08 | 3.40E+10 |
| E194 | H4 | 0 | 6.20E+08 | 2.10E+08 | 1.00E+09 | 5.00E+09 | 5.00E+09 | 0 | 3.00E+07 | 4.00E+05 |
| E201 | | 5.00E+09 | 5.00E+09 | 4.80E+06 | 1.00E+09 | 9.00E+07 | 0 | 6.00E+09 | 6.00E+07 | 0 |
| E8 | H48 | 7.00E+07 | 6.70E+08 | 1.00E+07 | 0 | 1.00E+07 | 1.00E+07 | 0 | 0 | 1.00E+07 |
| E29 | H7 | 0 | 6.00E+09 | 1.70E+08 | 8.00E+09 | 5.60E+06 | 1.00E+06 | 0 | 0 | 1.60E+10 |
| E7 | H48 | 1.20E+08 | 1.06E+09 | 2.00E+07 | 0 | 1.20E+06 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| E199 | H15 | 1.00E+09 | 2.40E+08 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.00E+09 | 0 | 0 |
| E50 | H25 | 0 | 2.00E+05 | 1.00E+06 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| E53 | O91:H7 | 0 | 0 | 4.00E+05 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3.00E+07 | 0 |
| E76 | | 5.40E+04 | 0 | 0 | 2.20E+08 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| E192 | H4 | 0 | 3.00E+09 | 0 | 5.00E+07 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| E195 | H4 | 0 | 0 | 0 | 5.00E+09 | 0 | 0 | 4.00E+09 | 0 | 0 |
| E196 | H4 | 1.20E+04 | 0 | 0 | 2.00E+06 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| E197 | H1 | 0 | 0 | 1.03E+06 | 1.00E+09 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| E198 | H5 | 1.00E+09 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.00E+09 | 0 | 0 |
| E17 | H39 | 1.37E+09 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| E18 | H39 | 2.00E+09 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| E200 | H6 | 1.00E+03 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| E37 | H10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| E43 | H10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| E193 | H4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Geringe Phagentiter [PFU/ml] geben Hinweise auf mögliche spezifische Abwehrmechanismen der Bakterien gegen die getesteten Phagen und sind damit ein erster Anhaltspunkt bei der Einschätzung der Lyseeffizienz. Die breitesten Einzelspektren zeigten die Phagen Ciri(S), EW2, RiS und TB49, die damit vielversprechende Kandidaten bei der Zusammenstellung von Breitbandcocktails darstellen. Je nach Anforderung an den Cocktail können jedoch auch Phagen mit vergleichsweise engen Wirtsspektren, wie GvR und TriM, geeignete Cocktailkomponenten darstellen, sofern sie beispielsweise das Gesamtspektrum des Cocktails erweitern oder die Zielbakterien besonders effizient lysieren.

Tabelle 16: Wirtsspektren der Phagen basierend auf Titration.

| <i>E. coli</i> | | Phagen | | | | | | | | | Summe |
|----------------|---------|---------|-----|-----|------|-----|------|------|-----|------|-------|
| PTC # ID | Serotyp | Ciri(S) | EW2 | RiS | TB49 | YeV | AB27 | DrH1 | GvR | TriM | |
| E45 | | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 8 |
| E28 | H24 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 7 |
| E194 | H4 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 7 |
| E201 | | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 7 |
| E8 | H48 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 6 |
| E29 | H7 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 6 |
| E7 | H48 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| E199 | H6 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 3 |
| E50 | H25 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| E53 | O91:H7 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 |
| E76 | | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| E192 | H4 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| E195 | H4 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| E196 | H1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| E197 | H5 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| E198 | H15 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| E17 | H39 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| E18 | H39 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| E200 | | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| E37 | H10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| E43 | H10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| E193 | H4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Summe | | 11 | 10 | 10 | 10 | 7 | 5 | 5 | 5 | 4 | |

Die besten Abdeckungen wurden auf dem *E. coli* Laborstamm E45 (MG1655; 9/10 Phagen positiv), dem Laborstamm E201 (K12; 7/10 Phagen positiv), dem ESBL Wildisolat E28 (7/10 Phagen positiv) und dem klinischen ESBL Isolat E194 (7/10 Phagen positiv) erzielt. Vor allem E28 stellt damit einen vielversprechenden Teststamm für einen Einsatz im *in-vivo* Versuch mit Eintagsküken dar, da er eine gute Phagenabdeckung zeigt und aufgrund seiner Isolationsherkunft (Huhn, Schlachtkörper) vielversprechendes Potential bei der Kolonialisierung des Hühner Magen-Darmtrakts besitzt. Zudem wurde bereits eine seltene Kanamycin-Resistenz für E28 nachgewiesen, die eine Abgrenzung von den Darmkommensalen der Versuchstiere ermöglicht. Insgesamt waren von den getesteten Phagen sieben zur Bildung von Plaques auf einem Rasen des Stammes E28 in der Lage. Die höchsten Titer und damit die größte Plaueformungseffizienz zeigten darunter die Phagen EW2,

TB49, AB27 und TriM, was einen Hinweis auf ihre generelle Lyseeffizienz gegenüber E28 darstellt.

3.4.3 Inhibitionstests

Um nach der Bestimmung der Wirtsspektren auch die Lyseeffizienz der sieben Plaque formenden Phagen zu quantifizieren, wurden Inhibitionstests der Einzelphagen auf E28 durchgeführt. Da RiS, GvR und YeV trotz ihrer Fähigkeit zur Plaquebildung (s. Punkt 3.3.2 Wirtsspektren) das Wachstum des Teststammes nur unzureichend inhibierten, wurde zusätzlich der Phage KRA2 aus der PTC Sammlung in den Inhibitionstest eingeschlossen. In **Abbildung 8** sind die Ergebnisse zusammengefasst:

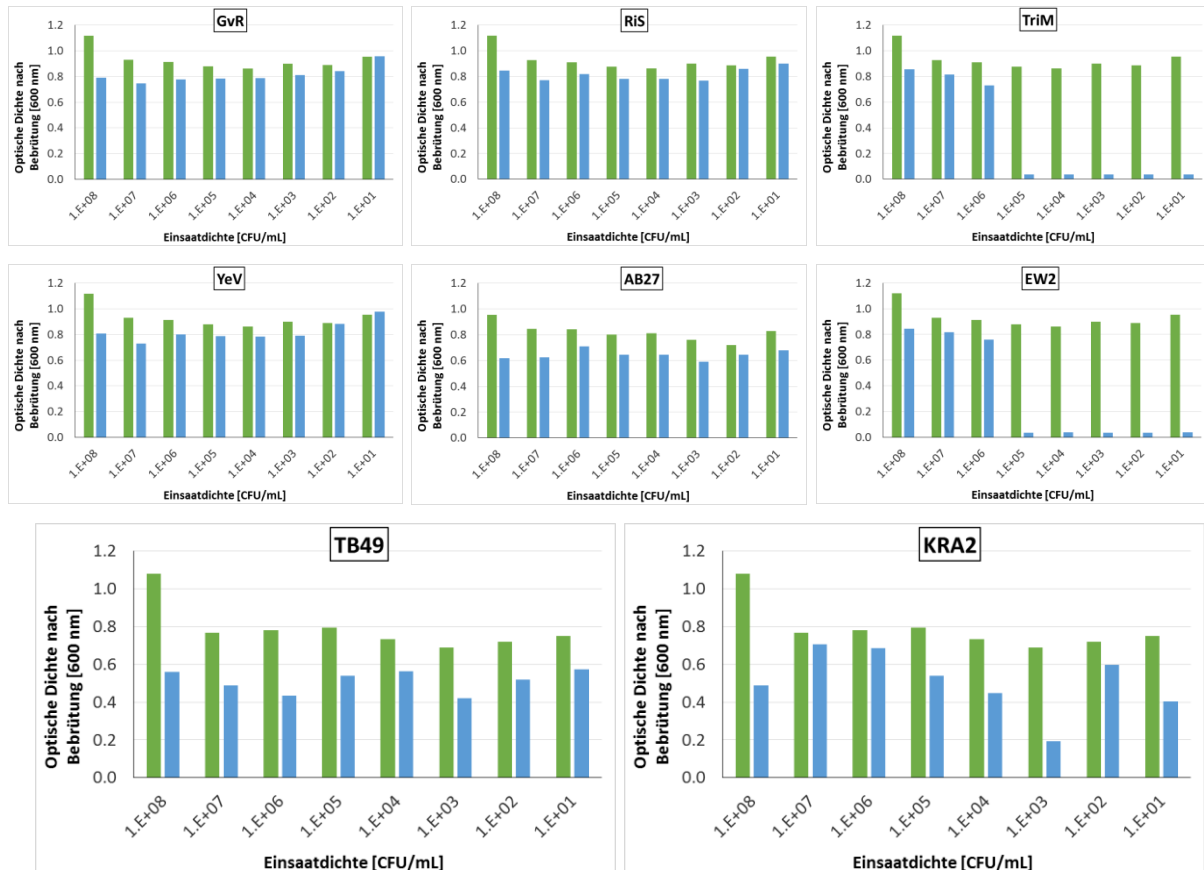


Abbildung 8: Inhibitionstest auf dem ESBL Stamm E28.

Die Negativkontrolle (-E28/+Cocktail) war bei allen Versuchen negativ.

Grün Positivkontrolle (+E28/-Cocktail)

Blau Testansatz (+E28/+Cocktail)

Die Einzelphagen TriM und EW2 zeigten sich gegenüber E28 sehr effizient und inhibierten das Wachstum des Stammes bis zu einer bakteriellen Einsaatdichte von 10^5 CFU/ml vollständig. Bei TB49 und KRA2 war insgesamt eine deutliche Reduktion des bakteriellen Wachstums im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten, während die übrigen Phagen lediglich einen geringfügigen Effekt zeigten.

3.4.4 Entwicklung eines Phagencocktails für die *in-vivo* Anwendung

3.4.4.1 Konzeption des Cocktails

Unter Berücksichtigung der Daten zu Phylogenie, Wirtsspektren und Effizienz der Lyse des Teststammes E28 wurde aus den untersuchten Phagen ein Cocktail konzipiert, welcher TriM, AB27, EW2, TB49 und KRA2 zum Bestandteil hatte. Damit ist der Cocktail aus Phagen zusammengesetzt, die Homologien zu BP63 (TriM), phi92 (AB27), rV5 (EW2), HY01/T4 (TB49), T4 (G28) und PVP-SE1 (KRA2) aufweisen und somit genetische Varianz besitzen. Auf diese Weise sollte die kombinatorische Cocktailwirkung verbessert und die Wahrscheinlichkeit der Bildung von bakteriellen Resistenzen vermindert werden (Bourdin et al. 2014). Die einzelnen Phagen wurden aus verschiedenen Gründen für den *in-vivo* Versuch ausgewählt. TriM und EW2 zeigten auf E28 im Inhibitionstest bereits als Einzelphagen eine hervorragende Lyseeffizienz, wobei sich EW2 zusammen mit TB49 ebenfalls durch sein breites Spektrum auszeichnete. Auch Phagen, die einzeln lediglich schwache bis mäßige Effizienz bei der Inhibition eines Teststammes zeigen, können in Kombination mit anderen Phagen den Gesamteffekt deutlich verbessern. Aus diesem Grunde wurden auch KRA2 und AB27 als Cocktailbestandteile ausgewählt. Zudem zeigte AB27 Homologien zu phi92, für den in der Literatur ein Set von unterschiedlichen Schwanzfibern beschrieben wurde, welche den Phagen zur Infektion von Bakterienstämmen mit und ohne Kapselbildung gleichermaßen befähigen (Schwarzer et al. 2012)(Schwarzer et al. 2015). Eine Kapsel aus Polysacchariden, Glykokalyx genannt, zählt zu den bakteriellen Abwehrmechanismen und stellt für viele Phagen eine physische Barriere dar, welche eine Infektion der Zelle erschwert. Somit sind Phagen, die kapseltragende Stämme durch spezielle Schwanzfibern infizieren oder die bakteriellen Kapseln mithilfe von spezifischen Endosialidasen abbauen können, wertvolle Cocktailbestandteile. Auch synergistische Effekte zwischen Phagen eines Cocktails wurden in der Literatur bereits beschrieben (Schmerer, Molineux, and Bull 2014). Ein Einfluss des Phagen KRA2 auf die Effizienz des Cocktails wurde im

Folgenden in Inhibitionstests untersucht. Auch wenn die Phagen TB49 und G28 eine hohe Homologie aufweisen, wurden beide aufgrund unterschiedlicher Effizienz und Wirtsbereiche in den Cocktail aufgenommen.

3.4.4.2 Cocktaileffizienz gegen E28 *in-vitro*

Zunächst wurden *in-vitro* Inhibitionstests mit einem 4er-Cocktail aus den Phagen TriM, AB27, EW2 und TB49 auf dem *E. coli* Stamm E28 durchgeführt. Dabei wurden Phagentiter von 10^7 , 10^6 und 10^5 PFU/ml je Cocktailekomponente eingesetzt, um seine Wirksamkeit gegen E28 sowie einen geeigneten Titer für die Anwendung im *in-vivo* Versuch abzuschätzen. Später wurde der Cocktail um den Phagen KRA2 ergänzt, um den Einfluss eines einzelnen Phagen auf die Wirkung des Cocktails zu untersuchen. Das Ergebnis ist in **Abbildung 9** dargestellt:

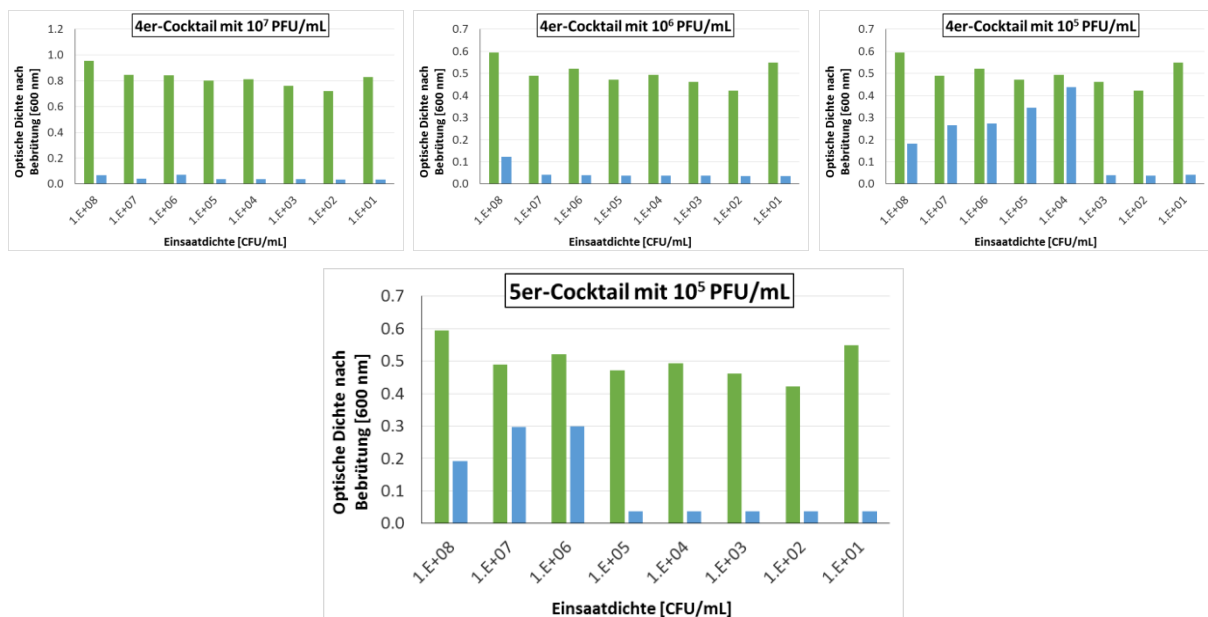


Abbildung 9: Einfluss unterschiedlicher Anwendungstiter und des Phagen KRA2 auf die Cocktailwirksamkeit. Der 4er-Cocktail beinhaltet die Phagen TriM, AB27, EW2 und TB49, der 5er-Cocktail zusätzlich den Phagen KRA2. Die Negativkontrolle (-E28/+Cocktail) war bei allen Versuchen negativ.

Grün Positivkontrolle (+E28/-Cocktail)

Blau Testansatz (+E28/+Cocktail)

Der ausgewählte 4er-Cocktail war bei Anwendungstitern von 10^7 PFU/ml und 10^6 Pfu/ml hocheffizient, da das Wachstum des Stammes E28 unabhängig von der Inokulationsdichte des Teststammes vollständig inhibiert wurde. Erst bei einem Anwendungstiter von 10^5 PFU/ml war eine Abnahme der Cocktailwirkung feststellbar.

Sie war dort auf eine maximal hemmbare Einsaatdichte von 1×10^3 CFU/ml limitiert, was einer MOI von 100 entspricht. Im Anschluss konnte auch ein Einfluss des Einzelphagen KRA2 auf die Wirksamkeit des Cocktails festgestellt werden. So zeigte ein 5er-Cocktail, der zusätzlich zu TriM, AB27, EW2 und TB49 auch KRA2 enthielt, eine im Vergleich zum 4er-Cocktail um zwei bakterielle Logstufen verbesserte Wirkung, obwohl der Einzelphage das Wachstum von E28 zuvor nur schwach reduziert hatte (s. Punkt 3.3.3 Inhibitionstests). Um im Vorfeld der Tierversuche schon erste Aussagen über die Wirksamkeit des Phagencocktails zu erhalten, wurden Einzelphagen (**Abbildung 10**, **Abbildung 10 A**) und Phagencocktails (**Abbildung 10**, **Abbildung 11**) hinsichtlich ihrer Fähigkeit die metabolische Aktivität von E28 zu unterdrücken (**Abbildung 10**) bzw. eine Kultur von E28 zu lysieren (**Abbildung 11**) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Phagen AB27, G10400, G17_3, G9062 und TB49 allein bei der MOI 0,1 nicht in der Lage sind, einen Einfluss auf das Wachstum von *E. coli* E28 auszuüben, da sich der Anstieg der Intensität des Redoxfarbstoffs (angegeben in relativen Einheiten) bei Phagenanwesenheit nicht von der Kontrolle (E28) unterscheidet. Hingegen war der Anstieg der Signalintensität in Anwesenheit der Phagen EdH4, EW2, HdK5, TriM um etwa 8 Stunden, in Gegenwart des Phagen G28 um etwa 10 Stunden verzögert (**Abbildung 10 A**). Es ist zu vermuten, dass es sich dabei um Phagen-resistente Bakterien handelt, die durch spontane Mutation entstanden sind. Wie in **Abbildung 10 B** deutlich wird, ist die Effizienz der Cocktails sehr unterschiedlich. Während sich der Cocktail aus AB27 und TB49 als ineffizient herausstellte, nahm die Wirkkraft durch die Phagen EW2, TriM und G28 zu. Bei dem Zusatz des 6er Cocktails wurde das Wachstum der E28-Kultur sogar vollständig inhibiert, da kein Anstieg der Signalstärke des Redoxfarbstoffs zu detektieren war. Der Vorteil der Effizienzprüfung im OmniLog-System liegt darin, dass gleichzeitig mehrere Platten inkubiert und analysiert werden können. Jedoch ist es nicht möglich eine Aussage über das Lysevermögen der Phagen allein oder in Form von Cocktails zu treffen, da die Bildung des Redoxfarbstoffs irreversibel ist. Daher wurden zusätzlich Wachstumskurven im 96well Format mit Hilfe eines Platteninkubators aufgenommen. Dabei wurde die E28-Kultur nach zweistündiger Inkubation mit Einzelphagen bzw. den Cocktails infiziert. Auch bei dieser Methode konnte gezeigt werden, dass die Phagen EdH4, EW2, HdK5, TriM und G28 einen Einfluss auf das Wachstum von E28 ausüben, da der ermittelte Kurvenverlauf von der Kontrolle abweicht. Bei Anwesenheit des Phagen EW2 konnte im Zeitraum von 4 bis

7 Stunden ein Abfall der optischen Dichte gemessen werden, nach etwa 10 Stunden steigt die OD jedoch, vermutlich durch das Wachstum resistenter Bakterien, wieder an. In Anwesenheit der Phagen EdH4 und HdK5 konnte keine Lyse festgestellt werden, jedoch war das bakterielle Wachstum im Zeitraum von 4 bis 7 Stunden inhibiert und erst nach etwa 10 Stunden ein Anstieg der optischen Dichte zu verzeichnen. Wurde G28 der Kultur zugesetzt, sank die OD ab dem Zeitpunkt von 7 Stunden bis zum Versuchsende um etwa 1/3 ab (**Abbildung 11 A**). Analog zu den Untersuchungen im OmniLog System, konnte auch mit Hilfe der Aufnahme von Wachstumskurven gezeigt werden, dass der 6er Cocktail aus den Phagen AB27, TB49, EW2, TriM, Kra2 und G28 die höchste Effizienz besitzt und in der Lage ist eine Kultur von E28 zu lysieren, wie durch den Abfall der OD nach etwa 8 Stunden zu erkennen ist (**Abbildung 11**).

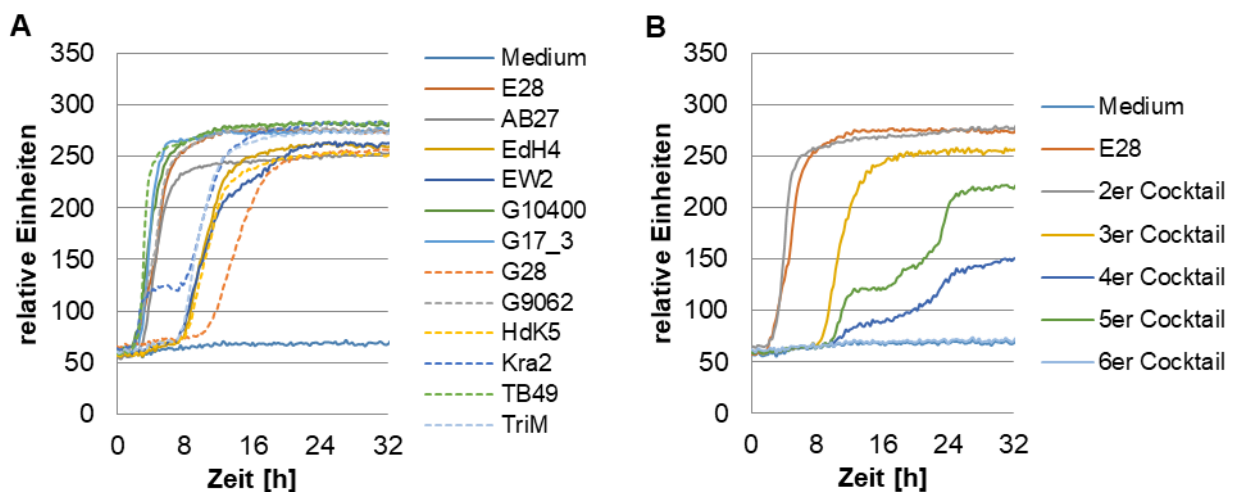


Abbildung 10: Vergleich der metabolischen Aktivität von E28 in Anwesenheit A) verschiedener Einzelphagen, B) verschiedener Cocktails. Die Kultur von exponentiell wachsendem E. coli E28 wurde dazu jeweils mit einer MOI von 0,1 infiziert und im OmniLog-System bei 37°C inkubiert. Für die Cocktails wurden die Phagenlysate zu gleichen Teilen gemischt. (2er Cocktail: AB27, TB49; 3er Cocktail: AB27, TB49, EW2, 4er Cocktail: AB27, TB49, EW2, TriM, 5er Cocktail: AB27, TB49, EW2, TriM, Kra2, 6er Cocktail: AB27, TB49, EW2, TriM, Kra2, G28)

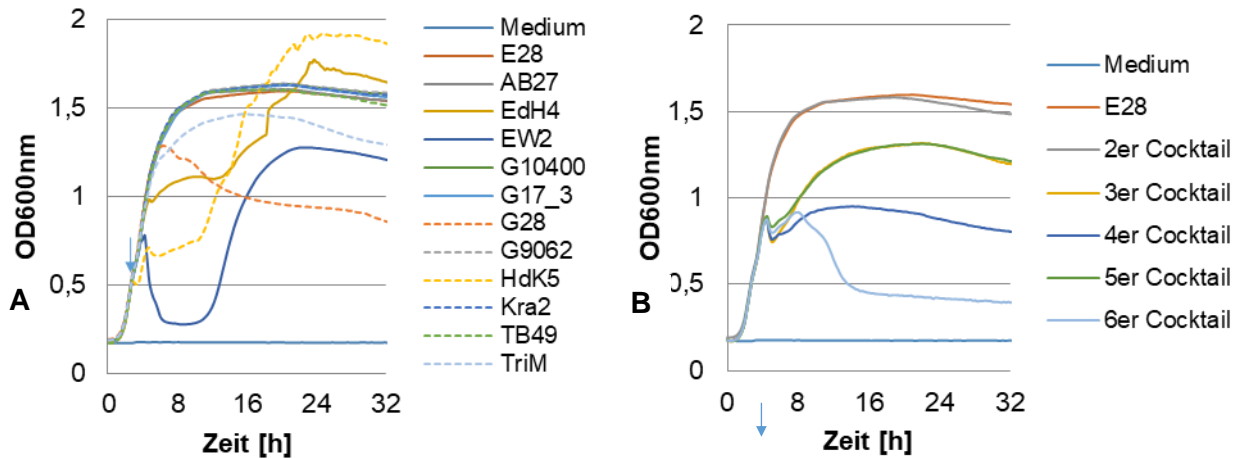


Abbildung 11: Vergleich des Lysevermögens A) verschiedener Einzelphagen bzw. B) verschiedener Cocktails gegenüber E28. Nach zweistündigem Wachstum wurde eine *E. coli* E28 Kultur jeweils mit $2 \cdot 10^6$ PFU infiziert (siehe blauer Pfeil) und im Platteninkubator (Tecan) bei 37°C inkubiert. Für die Zusammensetzung der Cocktails siehe **Abbildung 10**.

3.4.4.3 Untersuchungen zur Stabilität von Phagen

Phagen, die als Cocktail im Tierversuch eingesetzt werden sollten, wurden hinsichtlich ihrer pH-Stabilität untersucht, um den Einsatz instabiler Phagen auszuschließen. Wie in **Abbildung 12** zu erkennen sind alle untersuchten Phagen oberhalb von einem pH-Wert von 4 über den Untersuchungszeitraum von 24 h stabil. Unterhalb des pH-Wertes von 4 sank der Titer der Phagenlösung schnell stark ab. Nach der Inkubation für eine Stunde bei pH 1 konnten keine aktiven Phagen mehr nachgewiesen werden. Bei pH 2 waren die Titer der Phagen TB49, EW2 und G28 um etwa 2 bis 3 logarithmische Stufen reduziert, während die Aktivität der Phagen TriM und Kra2 bereits bei einem pH-Wert von 3 um etwa 3 logarithmische Stufen reduziert war. Auch nach vierstündiger Inkubation stellten sich die Phagen EW2 und G28 bei niedrigen pH-Werten am stabilsten dar. Da bei der Magen-Darm-Passage im Geflügel lediglich im Muskelmagen ein pH-Wert von 2,6 für etwa 2 Stunden (Richter et al. 1992, Grundwerte der Tiergesundheit und Tierhaltung) überwunden werden muss, ist davon auszugehen, dass die untersuchten Phagen eine ausreichend hohe pH-Stabilität für die Passage im Tier besitzen. Bei der Untersuchung der Stabilität bei Raumtemperatur für 24 h, konnten bei neutralem pH-Wert keine Stabilitätseinbußen verzeichnet werden. Zudem wurde für die Langzeitlagerung die Stabilität im Zeitraum von 6 Wochen untersucht. Dabei waren alle Phagen mit der Ausnahme von G28 in PBS, PBS mit 0,5% NaCl sowie LB-Medium stabil. G28 wies einen Aktivitätsverlust von gut

2 logarithmischen Stufen im Beobachtungszeitraum auf bei Lagerung in PBS und eine Reduktion um 1 logarithmische Stufe bei der Lagerung in PBS mit 0,5% NaCl.

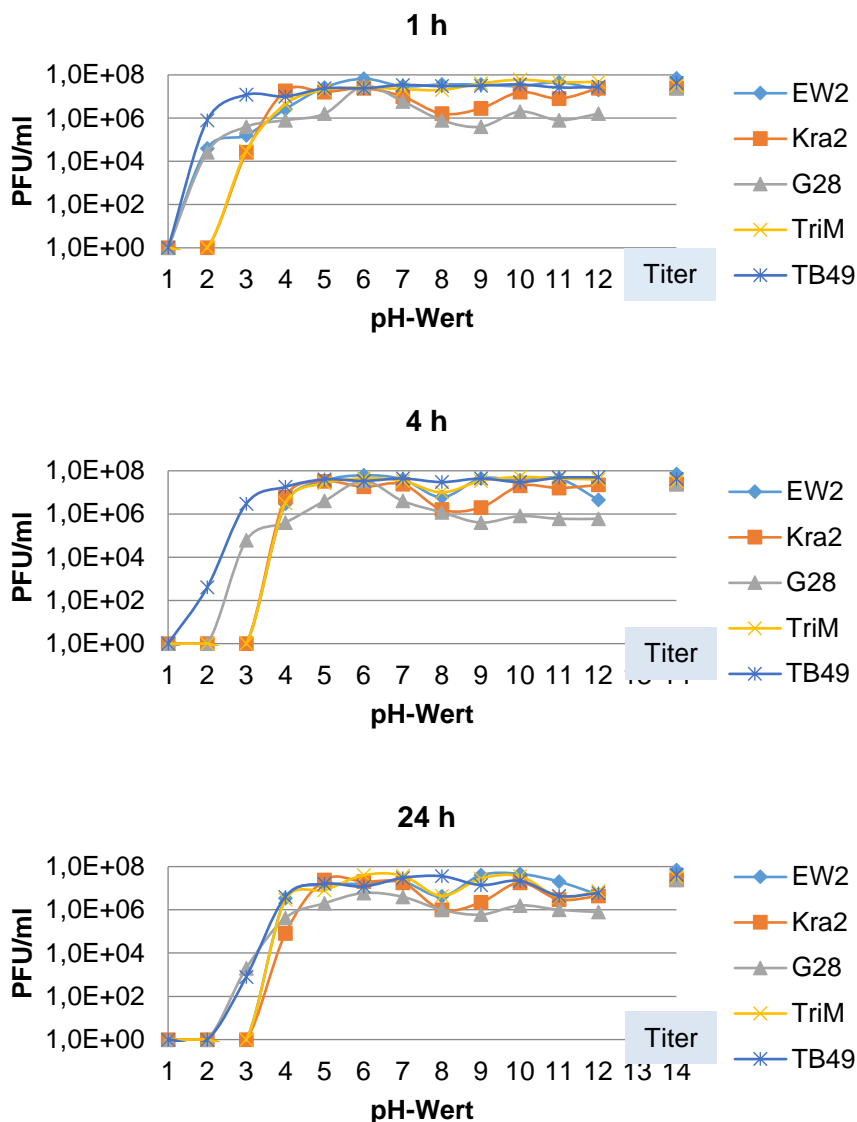


Abbildung 12: pH-Stabilität der Cocktailphagen nach 1, 4, und 24 Stunden.

3.4.4.4 Untersuchungen zur Vermehrung der Phagen

Die potentiellen Cocktailphagen wurden hinsichtlich ihres Wachstums untersucht, da generell angenommen wird, dass Phagen mit einer großen Wurfgröße und kurzen Latenzzeit besonders gut für den Einsatz zu Therapiezwecken geeignet sind.

Die Phagen EW2, TB49, Kra2 und G28 wiesen dabei jeweils eine kurze Latenzzeit von 20-25 min auf, wohingegen es bei den Phagen Ab27 und TriM deutlich länger (35-40 min) bis zur Freisetzung neuer Phagenpartikel dauerte. Die Wurfgröße variierte von knapp 10-200 freigesetzten Phagen pro infizierter Zelle. AB27 und TB49 hatten eine

geringe Wurfgröße von 6 bzw. 7 neuen Phagen, die Wurfgröße von EW2 (46 PFU/Zelle), Kra2 (32 PFU/Zelle) und G28 (80 PFU/Zelle) liegen im mittleren Bereich, während TriM mit 190 PFU/Zelle die meisten Phagen in einem Infektionszyklus produzierte.

3.4.5 Auftreten von Resistenzen gegenüber Phagen

Das Auftreten von Resistenzen gegenüber Phagen wurde bereits kurz nach der Entdeckung der Phagen beobachtet (d'Herelle 1930). Um ausschließen zu können, dass die Bildung von resistenten Mutanten den Erfolg des Cocktaileinsatzes nachteilig beeinflusst, sollte die Resistenzbildung *in-vitro* untersucht werden. Dazu wurde eine Kultur von E28 mit den Einzelphagen des Cocktails und der MOI 100 infiziert und die Doppelagar-Platten nach der Inkubation auf das Vorhandensein von resistenten Kolonien untersucht. Die Infektion von E28 mit den Phagen Ew2, Kra2, TriM bzw. TB49 führte zu einer vollständigen Lyse des Bakterienrasens, jedoch waren bereits nach 18-stündiger Inkubation pro Platte 10-100 resistente Kolonien mit veränderter Koloniemorphologie zu beobachten. Das Wachstum von resistenten Kolonien konnte nach der Infektion mit dem Phagen G28 erst nach 48-stündiger Inkubation auf den Doppelagar-Platten aufgezeichnet werden. Davon wurden jeweils Kolonien mit unterschiedlicher Morphologie gepickt und durch wiederholtes Ausstreichen gereinigt. Die Infektion mit dem Phagen AB27 führte hingegen auch bei einer MOI von 100 nicht zu einer konfluenten Lyse der Platten. Die Stämme, die jeweils gegenüber einem Phagen resistent waren, wurden auf die Sensibilität gegenüber den anderen Cocktailphagen untersucht. Wie aus **Tabelle 17** zu entnehmen ist, war jeder resistente Stamm zumindest gegenüber einem der Cocktailphagen sensibel. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Stämme, die die höchste Resistenz aufweisen (E28.G28 R2-R4, E28.TB49 R2c) ein deutlich reduziertes Wachstum aufweisen (**Abbildung 13**). Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Entstehung von resistenten Mutanten keine ernstzunehmende Gefahr darstellt und die Phagen verschiedene Rezeptoren nutzen. Des Weiteren wurden die Mutanten hinsichtlich ihrer Fähigkeit 95 verschiedene Kohlenstoffquellen zu verstoffwechseln mittels Biolog Assay analysiert. Die metabolische Aktivität der Mutanten E28.EW2, E28.KRA2, EW2.TriM und E28.AB27 wiesen dabei nur minimale Abweichungen im Vergleich zum Wildtyp auf. Im Gegensatz dazu zeigten die Mutanten E28.G28R3 und E28.TB49R2c in 25/28 Fällen eine reduzierte metabolische und jeweils in 8 Fällen eine erhöhte

metabolische Aktivität auf. Zudem konnten 12 Kohlenstoffquellen weniger genutzt werden, als durch den Wildtyp. Darüber hinaus haben wir die Beweglichkeit der Bakterien untersucht mit dem Ergebnis, dass die Mutanten E28.G28R3 und E28.TB49R2c ihre Beweglichkeit komplett verloren haben, was zusammenfassend möglicherweise Einfluss auf die Fähigkeit zur Kolonisierung der Mutanten haben kann. Um den Resistenzmechanismus der Mutante E28.G28R3 zu ermitteln wurde diese vollständig sequenziert. Dabei konnte die Deletion von etwa 55 kb festgestellt werden, die möglicherweise auf einer Transposase-Aktivität beruht. In diesem Bereich sind u. a. Gene für verschiedenen Transporterproteine, ein konserviertes FlhA-ähnliches Protein (COG1298), ein MotB domain Protein (COG1360), welches zur OmpA-Familie gehört und ein putatives Protein der äußeren Membran (COG3203) der OmpC-Familie. Diese Gene tragen möglicherweise zur Resistenz der Mutante bei.

Tabelle 17: Sensibilität von resistenten Mutanten gegenüber anderen Phagen des Cocktails. Serielle Verdünnungen der Einzelphagen wurden auf Doppelagar-Platten der resistenten Stämme aufgetropft und nach der Inkubation auf Plaquebildung untersucht (+=sensibel, -=resistent, (-)= eingeschränkte Sensibilität).

| <i>E. coli</i> Stamm/ Mutante | Bakteriophagen | | | | | |
|-------------------------------|----------------|-----|------|------|------|------|
| | G28 | EW2 | KRA2 | AB27 | TriM | TB49 |
| E28 | + | + | + | + | + | + |
| E28.G28R3 | - | (-) | + | (-) | - | (-) |
| E28.EW2R3 | + | - | + | (-) | + | + |
| E28.TB49R2c | (-) | (-) | + | (-) | (-) | - |
| E28.Kra2R3 | + | - | - | (-) | + | + |
| E28.TriMR3 | + | + | + | (-) | - | + |
| E28.AB27R2 | + | + | + | (-) | + | + |

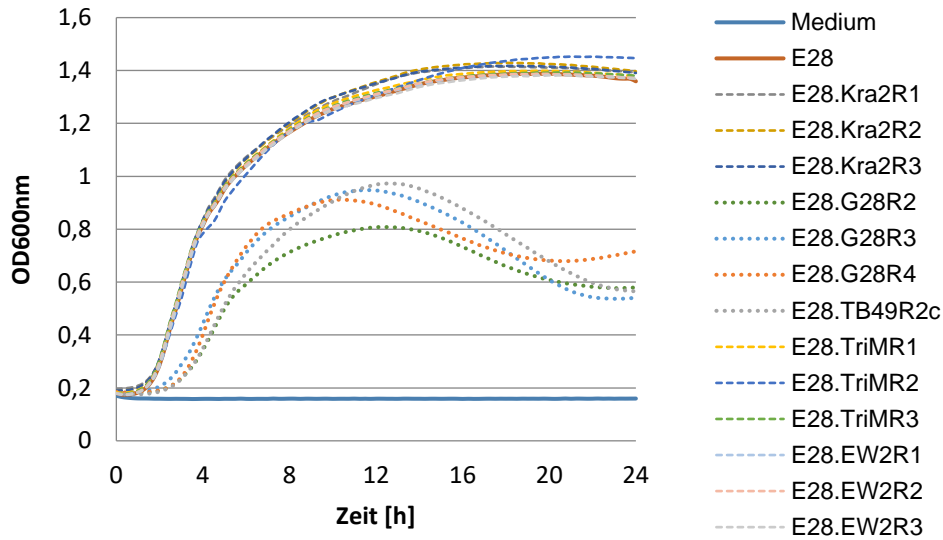


Abbildung 13: Wachstum Phagen-resistenter Mutanten im Vergleich zum Wildtyp *E. coli* E28.

3.4.6 Produktion des Cocktails

Für die *in-vivo* Versuche wurden die sechs Cocktaillkomponenten TriM, AB27, EW2, TB49, KRA2 und G28 im großen Maßstab separat fermentiert und anschließend in einem mehrschrittigen Verfahren aufgereinigt.

3.4.7 Effizienz *in-vitro*, *in-situ* und auf dem Lebensmittel – Methodenvergleich

Eine Reduktion von ESBL- und/oder AmpC-bildenden Enterobakterien im Lebensmittel kann am Anfang der Produktionskette im Hähnchenstall, oder auf dem Endprodukt, vor dem Transport zum Endverbraucher, erfolgen (Singh 2018). Ein Vorteil der Reduktion auf dem Endprodukt besteht darin, dass nach dieser Produktionsstufe nur noch geringfügige Änderungen der Bakterienzusammensetzung auf dem Produkt erfolgen und die Zusammensetzung der Phagen auf die vorhandenen Bakterien abgestimmt werden kann (Tanji et al. 2004). Das Risiko einer Rekontamination ist bei diesem Vorgehen zudem wesentlich geringer als bei einer Reduktion in den vorhergehenden Produktionsschritten.

Ein besonders wichtiger Schritt für die erfolgreiche Phagen-Anwendung ist die Auswahl von geeigneten Kandidaten für die Applikation (Carter et al. 2012), wobei Ergebnisse von *in-vitro* Tests nicht immer eine Aussage über die Effektivität auf dem Produkt zulassen (Maura et al. 2012). In diesem Teilprojekt wurde daher eine Methode entwickelt, die eine Testung der Phageneffizienz auf Hähnchenhaut unter

standardisierten Laborbedingungen ermöglicht. Die Ergebnisse dieser Methode wurden mit denen anderer Testsysteme verglichen, die zurzeit für die Auswahl von Phagen genutzt werden. Darüber hinaus wurden ausgewählte Bakteriophagen auf gespickten Hähnchenschenkeln getestet und die Ergebnisse wurden mit den Ergebnissen der anderen Methoden verglichen.

Die Bildung von Plaques durch die fünf Phagen TriM, G28, KRA2, EW2 und TB49 wurde im Overlay-Verfahren mit zehn ESBL-*E. coli*-Stämmen getestet und in Relation zur Plaquebildung mit Wirtsbakterien des jeweiligen Phagen gesetzt. Die relative Plaquebildung im Vergleich zum Wirtsbakterium ist in **Tabelle 18** dargestellt. Auf fünf der getesteten Bakterienstämme zeigten vier Phagen eine Plaquebildung, die der auf dem Wirtsbakterium entsprach oder diese sogar übertraf. Dies traf bei TriM für fünf Bakterien zu, bei G28 für 3 und bei Kra2 für ein Bakterium. EW2 bildete auf einem Bakterium annähernd so viele Plaques wie auf dem Wirtsbakterium. TB49 zeigte auf allen zur Untersuchung verwendeten Bakterien eine Plaquebildung, die geringer war als die Plaquebildung auf dem Wirtsbakterium. Auf dem ESBL-*E. coli*-Stamm E194 zeigte keiner der Phagen eine Plaquebildung.

Tabelle 18: Efficiency of Plating von fünf Bakteriophagen auf elf ESBL-*E. coli*-Stämmen. Die Versuche wurden zweimal wiederholt (Isolat E31 nur einmal). Ein EOP-Wert von 1 bedeutet, dass die Plaquebildung des Isolates der des Wirtsbakteriums entspricht. Die mit einer Raute gekennzeichneten Kombinationen zeigten keine Plaquebildung.

| Phage/ ESBL- <i>E. coli</i> | TriM | G28 | KRA2 | EW2 | TB49 |
|--------------------------------|-------|--------|-------|-------|-------|
| E8 | 0,013 | # | # | 0,151 | # |
| E11 | 0,042 | 0,027 | 0,050 | 0,003 | 0,419 |
| E16 | 1,481 | 0,000 | # | # | 0,009 |
| E28 | 1,559 | 30,089 | 2,117 | 0,963 | 0,204 |
| E29 | 1,872 | 0,924 | 0,763 | 0,859 | 0,388 |
| E30 | 1,114 | 5,994 | 0,784 | 0,495 | 0,307 |
| E31 | 1,733 | 8,500 | 0,591 | 0,230 | 0,149 |
| E50 | # | # | 0,013 | 0,002 | 0,001 |
| E51 | # | # | 0,024 | 0,001 | 0,001 |
| E192 | # | # | # | # | # |
| E194 | 0,001 | 0,000 | 0,763 | 0,702 | 0,153 |

Bei der Untersuchung der wachstumshemmenden Wirkung der Phagen auf die ESBL-*E. coli*-Stämme in Flüssigmedium, führten G28 und TB49 bei einem bzw. drei der Bakterien zu einer vollständigen Wachstumshemmung. G28 zeigte bei zwei weiteren Bakterien eine starke Wachstumshemmung, wogegen die Phagen TriM und KRA 2 die Bakterien in ihrem Wachstum kaum hemmten. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in **Tabelle 19** und **Tabelle 20** dargestellt.

Tabelle 19: Wachstumsinhibierende Wirkung von fünf Bakteriophagen auf zehn ESBL-*E. coli*-Stämme in flüssigem Nährmedium im Vergleich zu vollem Wachstum des Bakteriums ohne Bakteriophagen. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. Gemessen wurde die optische Dichte, diese wurde ins Verhältnis zum OD bei vollem Wachstum des Bakteriums ohne Bakteriophagen gesetzt und zur besseren Vergleichbarkeit mit **Tabelle 18**. Der Wert Eins bedeutet damit eine Vollständige Hemmung des Wachstums, der Wert Null dagegen ein Wachstum wie in Abwesenheit von Bakteriophagen. Bedingt durch den Rechenweg können Werte >1 zustande kommen.

| Phage/ ESBL- <i>E. coli</i> | TriM | G28 | KRA2 | EW2 | TB49 |
|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| E 11 | 0,081 | 0,104 | 0,041 | 0,058 | 0,132 |
| E 16 | 0,283 | 0,401 | 0,131 | 0,169 | 0,464 |
| E28 | 0,284 | 0,986 | 0,319 | 0,584 | 0,999 |
| E 29 | 0,059 | 0,066 | 0,028 | 0,038 | 0,908 |
| E 30 | 0,088 | 1,001 | 0,023 | 0,022 | 0,117 |
| E31 | 0,319 | 0,835 | 0,124 | 0,367 | 0,790 |
| E 50 | 0,026 | 0,047 | 0,002 | 0,066 | 0,065 |
| E 51 | 0,055 | 0,045 | 0,045 | 0,061 | 0,036 |
| E 192 | 0,023 | 0,050 | 0,028 | 0,025 | 0,012 |
| E 194 | 0,164 | 0,086 | 0,145 | 0,274 | 0,893 |

Tabelle 20: Reduktion von ESBL-*E. coli*-Stämmen auf Hähnchenhaut (Efficiency *in situ*-EIS) in Relation zur Kontrolle ohne Behandlung. Jede Phagen-Bakterien-Kombination wurde zweimal getestet. Die Werte wurden zur besseren Vergleichbarkeit mit **Tabelle 18** und **Tabelle 19** invertiert. Der Wert Eins bedeutet, dass eine vollständige Reduktion stattgefunden hat, der Wert Null, dass keine Reduktion stattgefunden hat. Ein Wert von 0,900 stellt damit eine Reduktion um eine Log₁₀-Stufe dar und ein Wert von 0,990 eine Reduktion um zwei Log₁₀-Stufen. Negative Werte kommen zustande, wenn mehr Bakterien auf der mit Bakteriophagen behandelten Haut wiedergefunden wurden als auf der Kontrolle.

| Phage/ ESBL- <i>E. coli</i> | TriM | G28 | KRA2 | EW2 | TB49 |
|--------------------------------|--------|--------|--------|---------|--------|
| E8 | -0,033 | -0,317 | -0,265 | -0,317 | 0,071 |
| E 11 | 0,068 | 0,612 | 0,022 | 0,100 | 0,150 |
| E 16 | 0,172 | 0,229 | 0,374 | 0,110 | 0,259 |
| E28 | 0,306 | 0,470 | 0,447 | 0,215 | 0,376 |
| E 29 | 0,406 | -0,116 | 0,036 | 0,199 | 0,141 |
| E 30 | 0,377 | 0,650 | 0,430 | 0,340 | 0,458 |
| E31 | 0,416 | 0,656 | 0,309 | 0,334 | 0,501 |
| E 50 | 0,214 | 0,218 | 0,725 | -0,204 | -0,148 |
| E 51 | -0,124 | 0,289 | 0,104 | 0,321 | 0,031 |
| E 192 | -0,207 | -0,440 | -0,336 | -14,209 | -0,214 |
| E 194 | 0,278 | 0,086 | 0,016 | 0,322 | 0,179 |

Bei der Untersuchung der Reduktionseffizienz der Bakteriophagen auf Hähnchenhaut konnte bei keinem der 50 Kombinationen eine signifikante Hemmwirkung festgestellt werden. Die Phagen TriM und EW2 erreichten auf keinem der Bakterien eine Effizienz von über 0,5 (wobei eine Effizienz von 0,9 einer Reduktion um eine Log₁₀-Stufe entspricht). Die im Zwischenbericht genannte Reduktion des Stammes E185 konnte in mehreren Wiederholungen nicht reproduzierbar nachgewiesen werden. In den Nachuntersuchungen zur Empfänglichkeit der rückgewonnenen *E. coli*-Isolate wiesen diese volle Empfänglichkeit für die Phagen auf.

Auch bei der Untersuchung der Effektivität der Bakteriophagen auf Hähnchenschenkeln konnte unter zwei unterschiedlichen Inkubationsbedingungen keiner der Bakteriophagen eine signifikante Reduktion der ESBL-*E. coli*-Stämme E30 oder E31 erreichen (**Abbildung 14**)

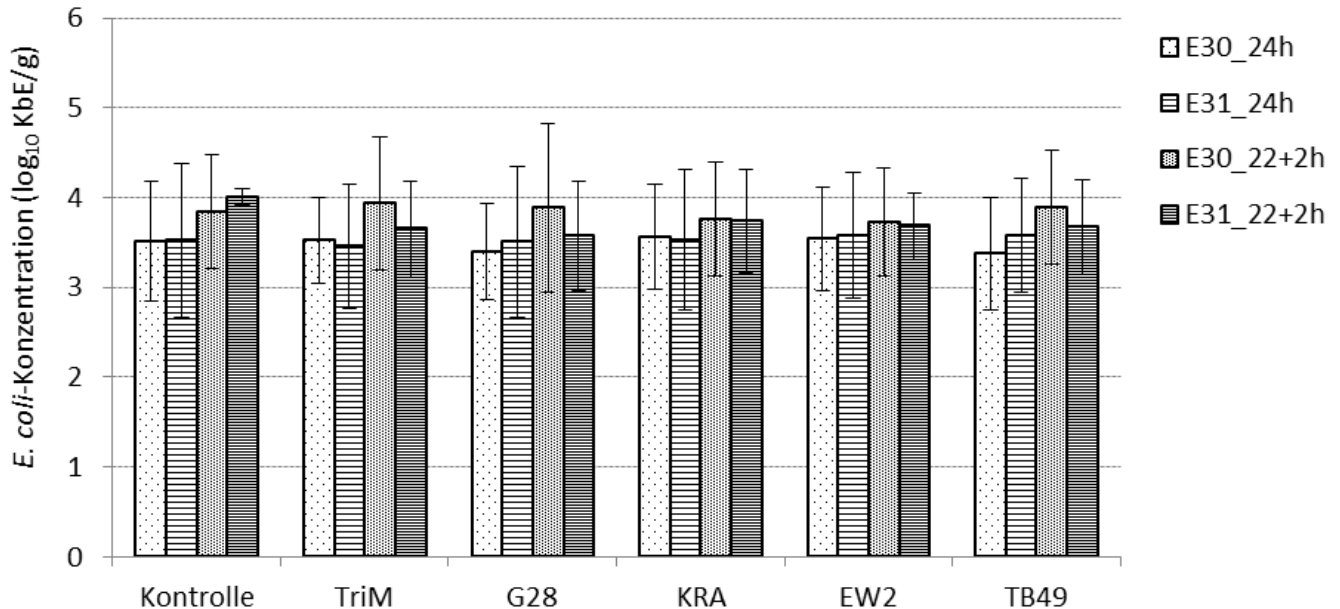


Abbildung 14: Vergleich der Bakterienkonzentration (Mittelwert \pm Standardabweichung) mit und ohne Phagenbehandlung auf mit zwei ESBL-*E. coli*-Stämmen gespickten Hähnchenschenkeln. Alle Versuche wurden dreimal wiederholt. Es wurden pro Bakterienstamm zwei Experimente mit unterschiedlichen Inkubationsbedingungen durchgeführt. Die mittlere Bakterienkonzentration auf den mit E30 gespickten Proben ist durch gepunktete Säulen dargestellt, die auf mit E31 gespickten durch gestreifte. Die Schenkel wurden nach der Behandlung im Kühlschrank (3 ± 1 °C) gelagert. Die enger gemusterten Säulen stellen die Ergebnisse der Versuche dar, in denen sich dieser Inkubation eine zweistündige Inkubation im Brutschrank anschloss. Die statistische Analyse ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Bakterienkonzentrationen auf behandelten und unbehandelten Proben. Die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken dargestellt.

Die fünf Bakteriophagen zeigten eine hohe oder mittlere EOP in neun bzw. sechs der 55 getesteten Kombinationen. Die Bildung sichtbarer Plaques durch Bakteriophagen in einem Overlay hängt von verschiedenen Faktoren ab (Abedon and Yin 2009). Die EOP ist ein gutes Maß für die Infektiosität von Bakteriophagen auf einem bestimmten Bakterienstamm. Die Anzahl der sichtbaren Plaques wird zwar häufig als Kriterium für die Auswahl von Bakteriophagen genutzt, kann jedoch nur eine sehr begrenzte Aussage darüber machen, wie effizient ein Bakteriophage bei der Reduktion eines Bakteriums ist (Abedon 2018). Da sich auf der Oberfläche von frisch geschlachteten Hähnchenschlächtkörpern ein Flüssigkeitsfilm befindet, wurde ein zweiter Test in Flüssigmedium durchgeführt, da dies den Bedingungen auf dem Schlachtkörper näher

kam. In diesem Testsystem wiesen die Bakteriophagen eine deutlich geringere Hemmwirkung auf die Bakterien auf als auf Grund der Ergebnisse der EOP erwartet worden war. Auch Isolate mit einer sehr hohen EOP zeigten zum Teil keine Hemmwirkung in der Flüssigkultur. Eine Überschätzung der lytischen Fähigkeiten auf Grundlage der EOP wurde bereits in vorherigen Studien beschrieben (Tsonos et al. 2014). Die Ergebnisse der Efficiency-*in-situ* (EIS) Untersuchung auf Hähnchenhäuten sowie auf kommerziellen Hähnchenschenkeln weisen darüber hinaus auf ein fehlendes Reduktionsvermögen der Bakteriophagen auf dieser komplexen Matrix hin. Die unebene Oberflächenstruktur der Häute mit vielen Poren sowie die Anwesenheit von Proteinen und Hautpartikeln im Feuchtfilm auf der Oberfläche könnten zu einer Adhäsion der Bakteriophagen an solche Partikel oder zu einer Abschirmung der Bakterien geführt haben (Maura et al. 2012). Bakteriophagen und Bakterien wurden jedoch annähernd vollständig von den Häuten wiedergewonnen, was gegen ein Eindringen in die Poren oder eine Inaktivierung durch Anheftung an Partikel spricht. Es wurde vermutet, dass durch das Milieu der Hähnchenhaut ein verändertes metabolischer Zustand der Bakterien hervorgerufen wird und eine Infektion durch Bakteriophagen verhindert. Daher wurde das Plaquebildungsvermögen einiger Bakteriophagen auf Bakterienisolaten getestet, die von Hähnchenhäuten rückgewonnen wurden. Dabei konnte in allen auswertbaren Tests eine Plaquebildung beobachtet werden, die der auf einem nativen Bakterienisolat entsprach (also auf einem Bakterium ohne vorherigen Kontakt zu Hähnchenhaut). Der Test wurde auf vier Isolaten (E11, E28, E29, E31) mit allen Bakteriophagen durchgeführt, war jedoch mit E28 nur mit einem Phagen (TB49) und bei E31 nur bei zwei Bakteriophagen (G28, TB49) auswertbar. Eine fehlende *in-vivo*- oder *in-situ*-Effizienz von Bakteriophagen trotz vielversprechender Ergebnisse *in-vitro* wurde bereits von anderen Autorinnen beschrieben (Tsonos et al. 2014)(Chibani-Chennoufi et al. 2004).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die lytischen Eigenschaften eines Bakteriophagen nicht immer an der Bildung von Plaques beurteilt werden kann und auch das Milieu auf dem Lebensmittel einen starken Einfluss auf die Reduktionseffizienz von Bakteriophagen zu haben scheint. Der hier entwickelte *In situ*-Test ist einfach durchzuführen und erscheint nach unseren Ergebnissen für die Auswahl von Bakteriophagen für Anwendungen auf Hähnchenprodukten besser geeignet als andere Tests unter weniger anwendungsnahen Bedingungen.

3.5 Reduktion von ESBL-*E. coli* im Tierversuch

3.5.1 Indikatorstamm E28

Als Indikatorstamm wurde der ESBL-*E. coli* E28 ausgewählt. Er zeigte hohe Phagenempfindlichkeit und stammte aus einer Kotprobe, besaß also die Fähigkeit, den Hähnchendarm zu kolonisieren. Neben einer Kanamycin-Resistenz (*aphA*), deren chromosomaler Ursprung mittels Plasmidanalyse und Southern-Blot-Hybridisierung überprüft und später durch die Sequenzierungsdaten bestätigt wurde, konnte eine Tellurit-Toleranz für die Herstellung eines selektiven Nähragars (mTBX-Agar) genutzt werden. Die Selektivität wurde durch Ausstriche verschiedener ESBL-*E. coli* bestätigt. Durch Verdünnungsreihen mit E28 auf dem modifizierten und dem unveränderten TBX-Agar konnte gezeigt werden, dass zwischen dem Wachstum auf den zwei Nährböden kein Unterschied bestand. Die Selektivität wurde zusätzlich während des Versuches durch eine PCR-Bestätigung des Serotyps präsumptiver E28 aus jeder Probe überprüft. Zusätzlich wurde das Verhältnis von TBX-Reisolaten mit E28 Phänotyp (Wachstum auf mTBX und ESBL-Phänotyp) zu TBX-Reisolaten ohne E28 Phänotyp verglichen (**Abbildung 15**). Auch diese Untersuchung bestätigte die Ergebnisse aus der selektiven Quantifizierung.

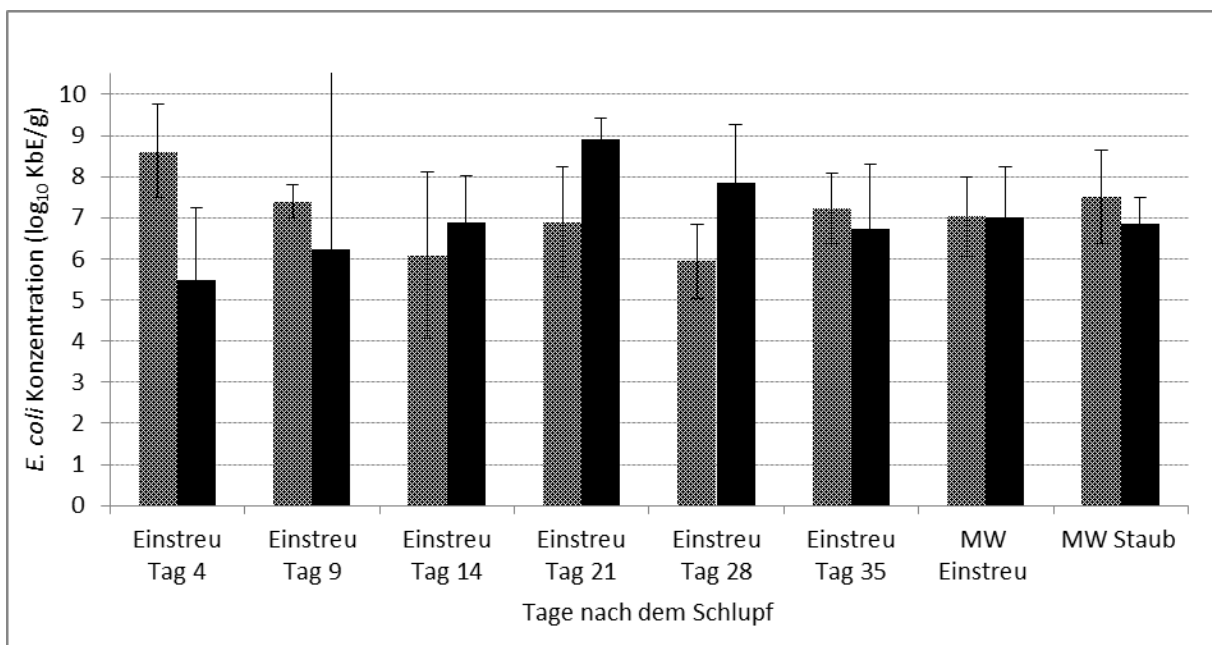


Abbildung 15: Konzentration von *E. coli* in Umweltproben aus dem ersten Versuch (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=2$). Die mittlere Konzentration in Proben der Kontrollgruppe ist als schraffierte Säule dargestellt, die der Versuchsgruppe in schwarz. Da Staub nicht immer in ausreichender Menge zur Untersuchung verfügbar war, wurden in der Versuchsgruppe und in der Kontrollgruppe nur an Tag 28 und 35 Proben untersucht.

3.5.2 Kolonisation des Darmes durch E28

Der *E. coli* E28 zeigte nach oraler Inokulation eine stabile Kolonisation des Darmes. Die Inokulationsdosis im ersten Versuch betrug \log_{10} 8,9 KbE. Die Konzentration im Kot betrug im Mittel einen Tag nach der Inokulation in der Kontrollgruppe \log_{10} 8,4 KbE/g Kot und in der Versuchsgruppe \log_{10} 7,7 KbE/g Kot (**Abbildung 16**). Die geringere Besiedlung der Versuchsgruppe um 0,7 Log₁₀-Stufen war nicht signifikant ($P = 0,19$). Nach 24 Stunden lag die Konzentration bei \log_{10} 6,1 KbE/g in der Kontrollgruppe und 6,7 KbE/g in der Versuchsgruppe (**Abbildung 16**). Die Analyse der Reisolat zeigte, dass E28 sechs Stunden nach der Inokulation etwa siebzig Prozent der Gesamt-*E. coli* in den Hähnchen beider Gruppen ausmachte. Einen Tag später war die Konzentration von E28 in beiden Gruppen auf unter 20% gesunken (**Abbildung 15**). Ab Tag neun bis zum Ende des Versuchs lag die Konzentration von E28 unter \log_{10} 6 KbE/g Kot. In der Kontrollgruppe sank die Konzentration auf unter \log_{10} 4 KbE/g, während sie in der Versuchsgruppe \log_{10} 5,2 KbE/g nicht unterschritt (**Abbildung 16**).

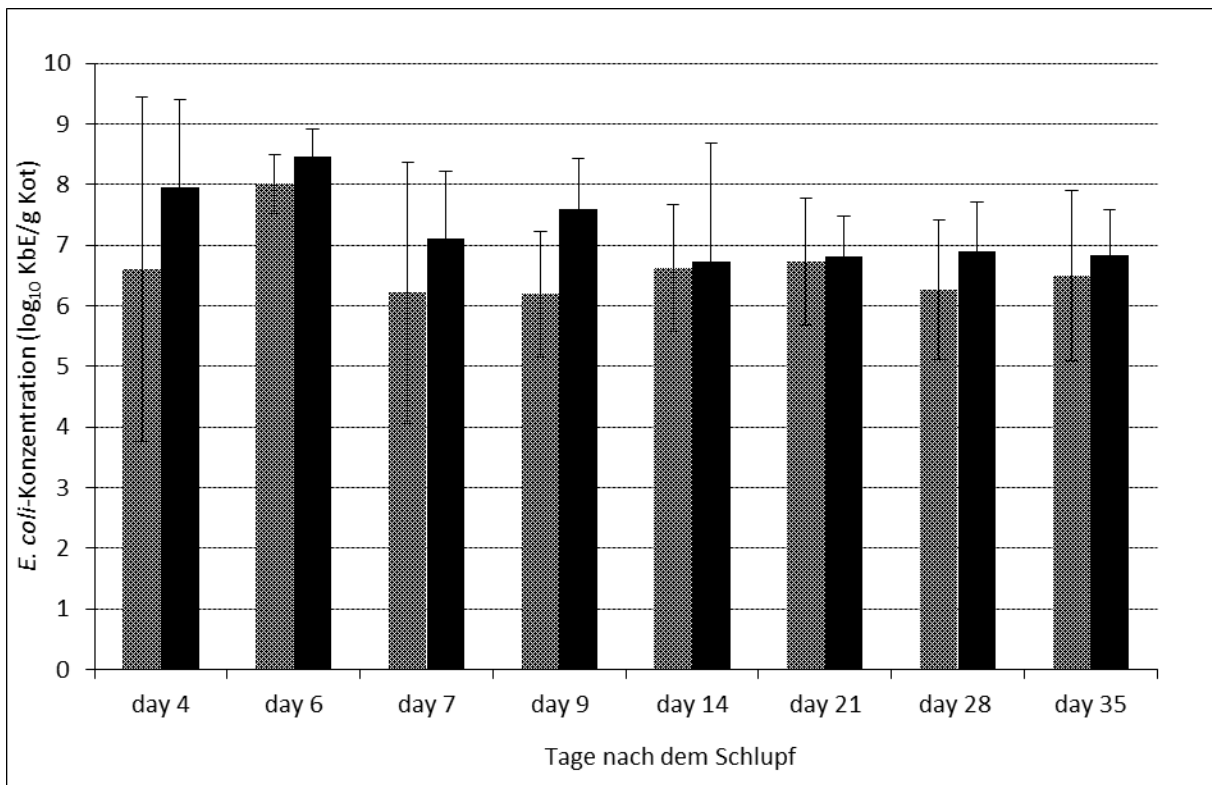


Abbildung 16: Konzentration von *E. coli* im ersten Versuch (Mittelwert \pm Standardabweichung). Es wurden frische Kotproben der 16 Tiere quantitativ auf TBX- Platten untersucht. Die mittlere Konzentration in Proben der der Kontrollgruppe ist als schraffierte Säule dargestellt, die der Versuchsgruppe in schwarz.

Im zweiten Versuch wurde die Inokulation mit einer geringeren Dosis von \log_{10} 6,7 KbE durchgeführt. Einen Tag nach der Inokulation betrug die E28-Konzentration \log_{10} 0,4 KbE/g Kot in der Kontrollgruppe und \log_{10} 2,6 KbE/g Kot in der Versuchsgruppe (**Abbildung 17**). Damit war die Kolonisation in der Kontrollgruppe signifikant geringer als in der Versuchsgruppe. Eine signifikant niedrigere Konzentration von E28 in der Kontrollgruppe bestand auch an Tag 15 und 22.

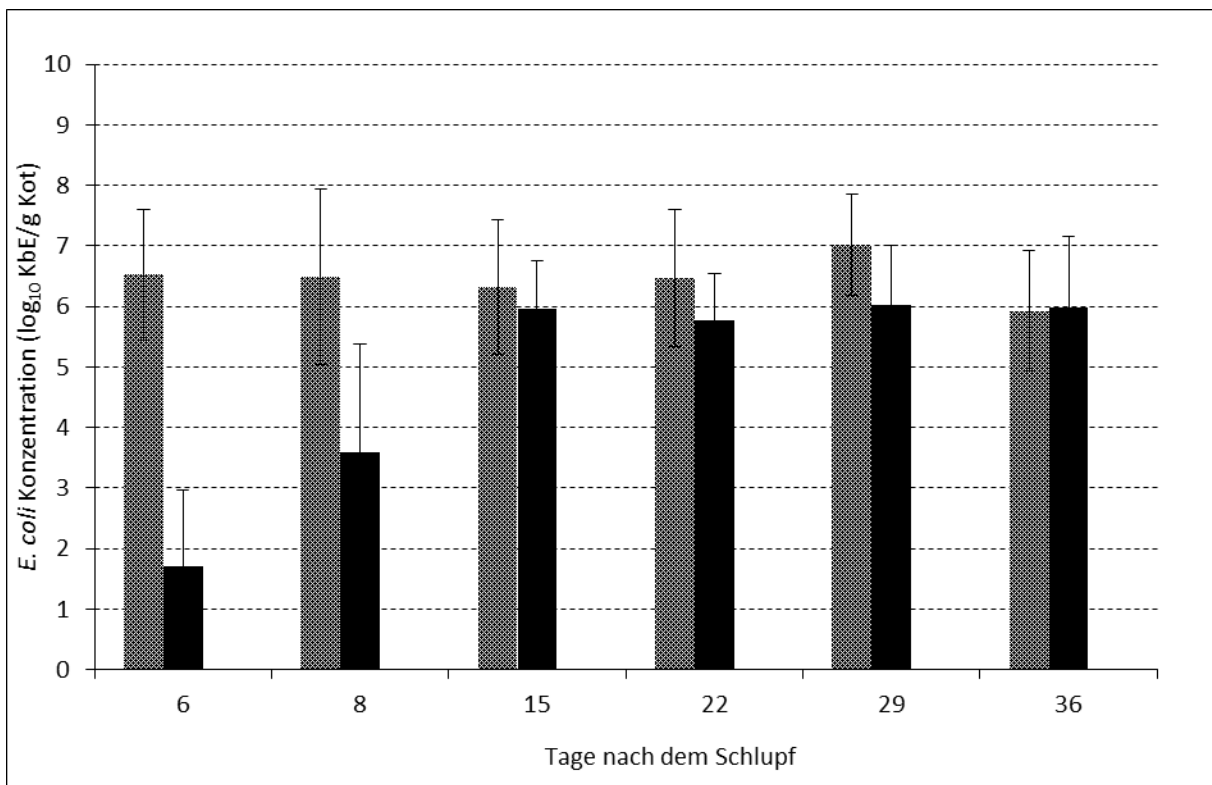


Abbildung 17: Konzentration von *E. coli* im zweiten Versuch (Mittelwert \pm Standardabweichung). Es wurden frische Kotproben der 16 Tiere quantitativ auf TBX- Platten untersucht. Die mittlere Konzentration in Proben der der Kontrollgruppe ist als schraffierte Säule dargestellt, die der Versuchsgruppe in schwarz.

3.5.3 Kolonisation des Darmes durch *E. coli*

Das Wirtsspektrum des verabreichten Cocktails wies, wie oben beschrieben, in *in-vitro* Tests eine Spezifität für E28 auf, verlangsamte jedoch im zweiten Versuch die Kolonisation des Darmes mit *E. coli*. Die Kriterien und *in-vitro* Ergebnisse die zur Auswahl der Cocktailphagen führten, wurden bereits beschrieben. Die Phagen des Cocktails zeigten auf Nicht-E28-*E. coli*-Reisolaten aus dem ersten Versuch in vier von 24 Untersuchungen eine geringe Plaquebildung, die übrigen 20 Untersuchungen

wiesen keine Plaquebildung auf. Eine Reduktion der Gesamt-*E. coli*-Konzentration durch die Phagen wurde in diesem Versuch nicht beobachtet.

Die getesteten Nicht-E28-*E. coli*-Reisolate aus dem zweiten Versuch wiesen *in-vitro* eine geringe Empfänglichkeit für den Cocktail auf (2 Kombinationen mit reduzierter und 10 Kombinationen ohne Plaquebildung von 12 getesteten Kombinationen). Im Gegensatz zum ersten Versuch wurde jedoch eine deutlich verzögerte Besiedlung des Darmes mit *E. coli* beobachtet (**Abbildung 18**).

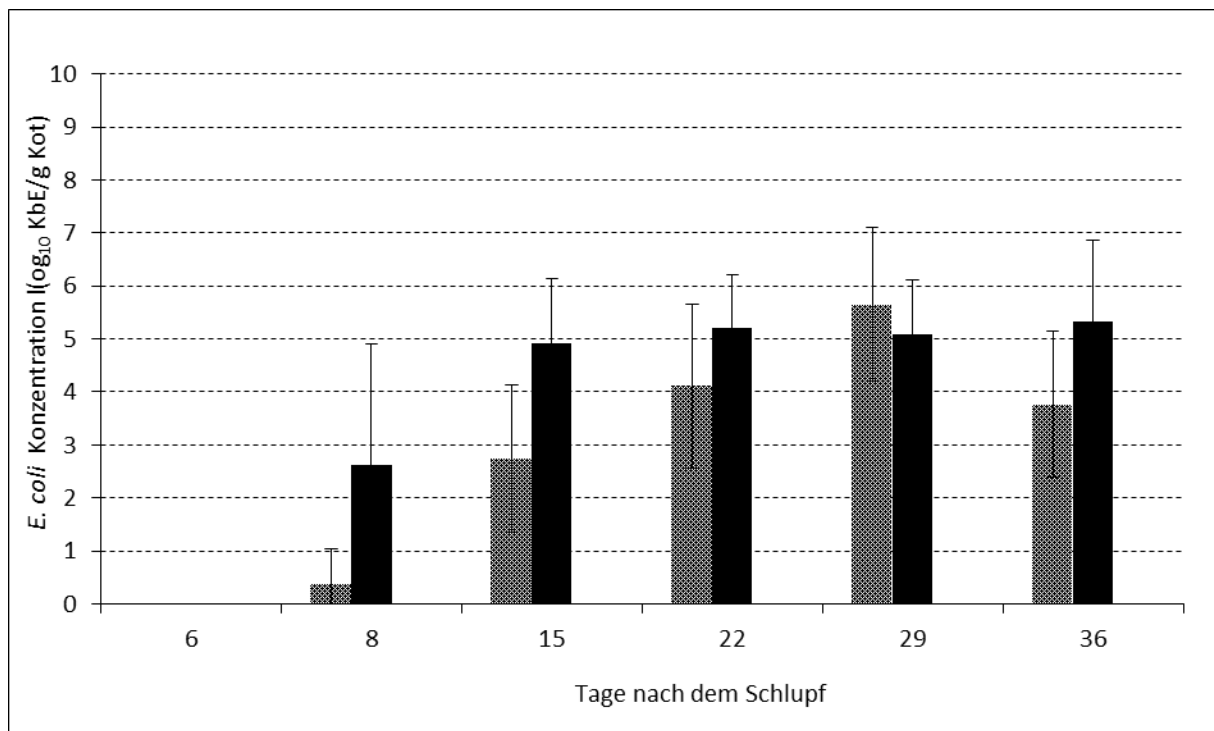


Abbildung 18: Konzentration von E28 im zweiten Versuch (Mittelwert \pm Standardabweichung). Es wurden frische Kotproben der 16 Tiere quantitativ auf TBX- Platten mit Zusatz von Kanamycin und Kalium-Tellurit untersucht. Die mittlere Konzentration in Proben der der Kontrollgruppe ist als schraffierte Säule dargestellt, die der Versuchsgruppe in schwarz.

3.5.4 Phagenkonzentration

Im ersten Versuch wurde im Tränkewasser eine mittlere Phagenkonzentration von $\log_{10} 4,6 \pm 1,6$ PbE/ml gemessen. Die maximale gemessene Konzentration lag bei $\log_{10} 6,0$ PbE/ml und die minimale Konzentration bei $\log_{10} 4,0$ PbE/ml. Das Wasser der Stülptränken, dem in der Versuchsgruppe die Phagen zugesetzt waren, wurde täglich erneuert. Innerhalb von 24 Stunden sank die Phagenkonzentration in den Stülptränken um 0,2 bis 1,0 Log₁₀-Stufen ab. Im zweiten Versuch betrug die mittlere Phagenkonzentration im Tränkewasser $\log_{10} 6,7 \pm 0,7$ PbE/ml. Die maximale Konzentration betrug $\log_{10} 7,5$ PbE/ml und die minimale $\log_{10} 5,1$ PbE/ml. Der

Konzentrationsverlust in den Stülptränken lag zwischen 0,36 und 1,4 Log₁₀-Stufen innerhalb von 24 Stunden. Um herauszufinden, ob sich die Phagen im Hähnchendarm vermehrt hatten, wurde eine Berechnung der erwarteten Phagenkonzentration im Kot vorgenommen. Diese wurde durch die Formel

$$E = (p * w) / (f + w)$$

berechnet. Die Phagenkonzentration im Tränkewasser (p) wurde mit der verbrauchten Wassermenge aus den Stülptränken multipliziert und durch das erwartete Kotvolumen (erwartete Futteraufnahme (f) und gemessene Wasseraufnahme (w)) dividiert. Dadurch war ein Schätzwert für die Tage mit vollständigen Messwerten gegeben, der die Phagenausscheidung ohne Vermehrung jedoch vermutlich leicht überschätzt. Dies ist durch die fehlende Einbeziehung von durch die Vögel verschüttetem Wasser und aufgenommene Einstreu begründet. Für beide Parameter lagen weder Mess- noch Schätzwerte vor, die eine Berechnung eines exakteren Schätzwertes ermöglicht hätten. Auf Grund dieser Berechnungen kann von einer starken Vermehrung der Phagen zu Beginn von Tierversuch ausgegangen werden, sowie einer leichten Vermehrung an den übrigen Untersuchungstagen ausgegangen werden (**Tabelle 21**). Ob diese Vermehrung in Zellen des Indikatorstammes E28 oder in Zellen anderer *E. coli* im Darm stattfand, kann nicht genau bestimmt werden.

Tabelle 21: Mittlere gemessene und maximal mögliche Phagenkonzentration und erwartete Konzentration ohne Vermehrung im Darm.

| Probentage Versuch 1 | 6 dph | 7 dph | 9 dph | 14 dph | 21 dph | 28 dph | 35 dph |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Mittlere Phagenkonzentration im Kot (log ₁₀ PbE/g) | 7,3 | 6,1 | 4,8 | ^b | 4,1 | ^b | 5,1 |
| Erwartung ohne Vermehrung (max. log ₁₀ PFU/g) ^a | ^b | 4,1 | ^b | 4,7 | ^b | 4,1 | ^b |
| Probentage Versuch 2 | 6 dph | 8 dph | - | 15 dph | 22 dph | 29 dph | 36 dph |
| Mittlere Phagenkonzentration im Kot (log ₁₀ PbE/g) | ^b | 3,5 | ^b | 6,4 | 6,9 | 6,3 | 6,3 |
| Erwartung ohne Vermehrung (max. log ₁₀ PFU/g) ^a | ^b | ^b | ^b | ^b | 7,1 | 6,8 | ^b |

^a Schätzwert kalkuliert aus Wasserverbrauch pro Tier, gemessener Phagendosis in der Tränke und erwartete Futteraufnahme (aus den Performance Objectives für Ross 308 Broiler)

^b Keine Messwerte oder keine Kalkulation möglich auf Grund fehlender Messwerte

dph = days post hatch

3.5.5 Resistenzen gegen die eingesetzten Phagen

Resistenzen gegen den Cocktail traten in der Versuchsgruppe des ersten Versuches auf (**Tabelle 22**), diese lagen bei 2% und die Reisolat stammten von Probenahmen am 9. und 21. Tag nach dem Schlupf. Gegen den Einzelphagen G28 traten in keinem der Versuche Resistenzen auf, wogegen einige E28-Reisolat eine verminderte

Empfänglichkeit für EW2, Kra2 und TB49 aufwiesen. In der Versuchsgruppe des ersten Versuches lagen die Anteile von Isolaten mit verminderter Empfänglichkeit für EW2 bei 12%, für Kra2 bei 10% und für TB 49 bei 0%, in der Versuchsgruppe des zweiten Versuches für EW2 bei 20% und für TB49 bei 10%. Auch in den Kontrollgruppen tragen sporadische Resistenzen gegen den Phagen TB49 auf (2% im ersten Versuch, 4% im zweiten Versuch).

Tabelle 22: E28 Reisolat mit reduzierter Empfänglichkeit gegenüber den Einzelphagen und dem Cocktail (%).

| Versuch 1 ^a | Cocktail | EW2 | Kra2 | TB49 | AB27 | TriM | G28 |
|------------------------|----------|-----|------|------|------|------|-----|
| Versuchsgruppe | 2 | 12 | 10 | 0 | 4 | 2 | 0 |
| Kontrollgruppe | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Versuch 2 ^b | Cocktail | EW2 | - | TB49 | AB27 | - | G28 |
| Versuchsgruppe | 0 | 20 | - | 10 | 7 | - | 0 |
| Kontrollgruppe | 0 | 0 | - | 4 | 0 | - | 0 |

a Reduzierte Efficiency of Plating (EOP, serial dilution) um mindestens 2 log₁₀ verglichen mit E28 ohne Darmpassage

b Reduzierte Plaquebildung in Overlays mit Routine test Dilution um mindestens 2 log₁₀ cverglichen mit E28 ohne Darmpassage

3.5.6 Wohlergehen der Tiere und Mastleistung

In keiner der Gruppen wurden Anzeichen für ein beeinträchtigt Wohlergehen der Tiere beobachtet. Während dem ersten Versuch verstarb ein Tier aus der Versuchsgruppe 31 Tage nach dem Schlupf ohne vorher klinisch auffällig gewesen zu sein. Wie ein weiteres Tier aus der Versuchsgruppe und drei Tiere aus der Kontrollgruppe wies es geringgradige Flüssigkeitsansammlungen in der Bauchhöhle oder im Herzbeutel auf. Im zweiten Versuch verstarb je ein Tier an Tag 17 und an Tag 34 nach dem Schlupf ohne klinische Symptome gezeigt zu haben. Beide Tiere stammten aus der Kontrollgruppe. Bei der Sektion wiesen zwei Tiere der Versuchsgruppe sowie ein Tier der Kontrollgruppe einen Herzbeutelerguss auf. Das Endgewicht der ausgebluteten Tiere der Versuchsgruppe lag im ersten Versuch bei 3196 ± 205 g und in der Kontrollgruppe bei 2890 ± 146 g. Im zweiten Versuch betrug das mittlere Gewicht nach dem Ausbluten 3218 ± 183 g in der Kontrollgruppe und 2797 ± 178 g in der Versuchsgruppe (**Abbildung 19**). Während in den Performance Objectives von Ross-308-Hähnchen für Tag 35 bzw. 36 Zielgewichte von 2225 g bzw. 2324 g angegeben werden (anonymous 2017), wiesen die Versuchstiere im Mittel über durchschnittliches Endgewichte auf. Herz-Kreislauf-Versagen stellt eine häufige

Todesursache in Hähnchenherden mit hohen Gewichtszunahme dar. Daher ist das leicht erhöhte Vorkommen von Herz-Kreislauf-Insuffizienz nicht überraschend. Die Sektion der Tiere ergab darüber hinaus keine Auffälligkeiten. Dies deutet darauf hin, dass die Gesundheit der Tiere durch die Besiedlung mit E28 und die Supplementierung der Bakteriophagen nicht beeinträchtigt wurde. Die Tränkwasseraufnahme stieg vom ersten Tag bis zur letzten Lebenswoche von 30 bzw. 45 ml/Tier auf 346 ± 29 ml/Tier in der Kontrollgruppe und 367 ± 59 ml/Tier in der Versuchsgruppe des ersten Versuches. Im zweiten Versuch stieg die Wasseraufnahme auf 314 ± 66 ml/Tier in der Kontrollgruppe und 356 ± 61 ml/Tier in der Versuchsgruppe. Auf Grund des Wasseraufnahmeverhaltens der Tiere kann das Volumen des von den Tieren aufgenommenen Wassers nicht getrennt von Wasserverlusten beim Trinken erfasst werden. Die Unterschiede zwischen den Gewichten und der Wasseraufnahme beider Gruppen war in beiden Versuchen nicht signifikant unterschiedlich. Bei der Untersuchung der Milz aller Tiere konnte bei einem Tier aus der Kontrollgruppe des ersten Versuches eine einzelne *E. coli* Kolonie nachgewiesen werden, während in keiner der Lebern und Nieren *E. coli* nachgewiesen werden konnte.

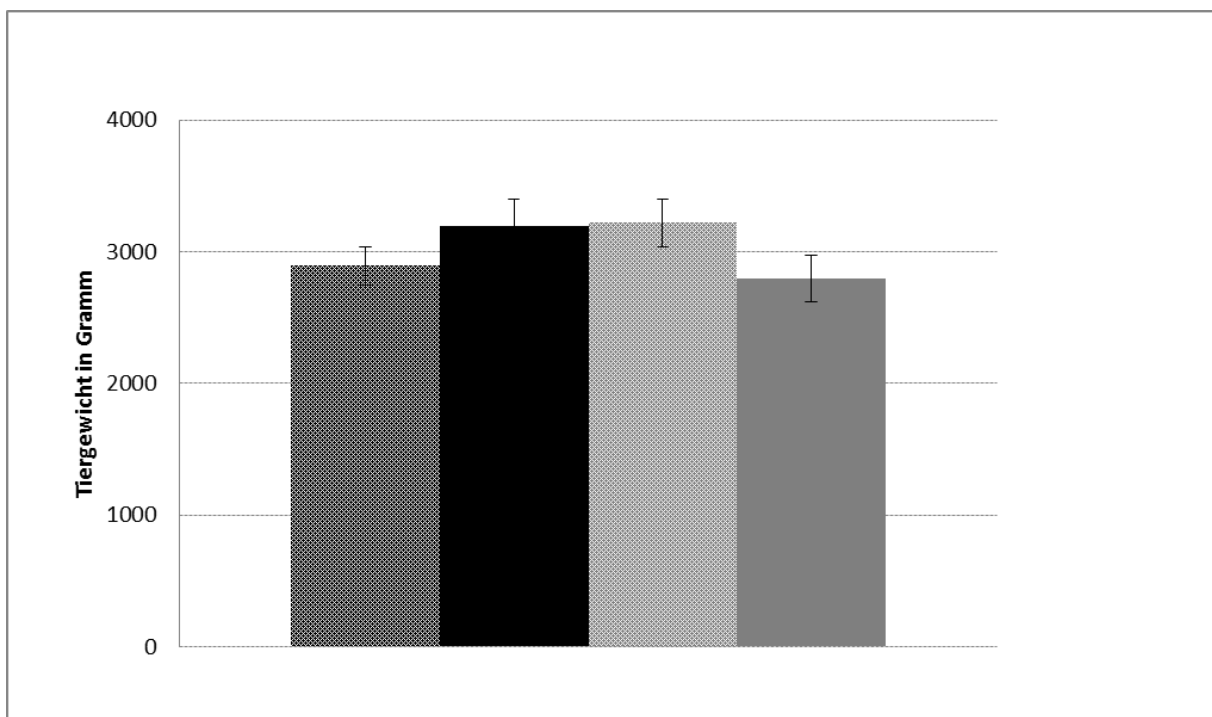


Abbildung 19: Gewicht der Tiere in Versuchs- und Kontrollgruppen am Ende des ersten Versuches. Die Gewichte der Tiere wurden nach dem Entbluten vor der Sektion gemessen. Das Mittlere Gewicht der Tiere aus der Kontrollgruppe des ersten Versuches ist in schwarz-schraffiert dargestellt, das der Versuchsgruppe in schwarz. Das Mittlere Gewicht der Tiere aus der Kontrollgruppe des zweiten Versuches ist in hellgrau-schraffiert dargestellt, das der Versuchsgruppe in grau. Die Fehlerbalken

stellen die Standardabweichung dar. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Gewichten der jeweiligen Gruppen festgestellt werden.

3.5.7 Konzentration von E28 im Hähnchendarm

Im ersten Versuch wurde die erste Konzentrationsmessung für den Indikatorstamm E28 sechs Stunden nach der Inokulation durchgeführt. Dies entspricht etwa der Dauer der Darmpassage eines Hähnchens. Es wurde eine mittlere Konzentration von \log_{10} 7,7 PbE/g Kot in der Versuchsgruppe und \log_{10} 8,4 PbE/g Kot in der Kontrollgruppe gemessen (**Abbildung 20**). Die 0,7 \log_{10} -Stufen geringere Konzentration in der Versuchsgruppe war nicht signifikant ($P = 0,92$). Bei allen folgenden Probennahmen waren die Konzentrationen von E28 in der Versuchsgruppe höher als in der Kontrollgruppe (**Abbildung 20**). Diese Unterschiede waren ab dem neunten Tag nach dem Schlupf bis zum Ende des Versuches signifikant [9 Tage nach dem Schlupf (days post hatch (dph)) ($P < 0,0001$), 14 dph ($P = 0,005$), 21 dph ($P = 0,0159$), 28 dph ($P = 0,0004$), 35 dph ($P = 0,0004$)].

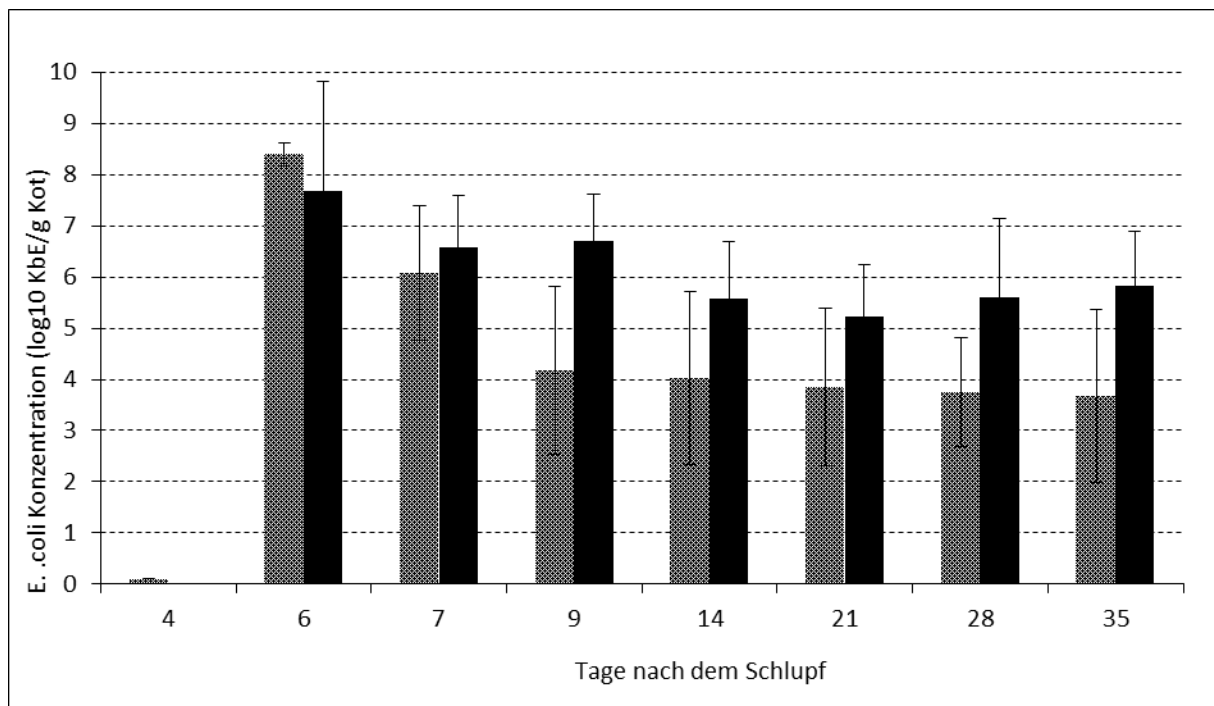


Abbildung 20: Konzentration von E28 im ersten Versuch (Mittelwert \pm Standardabweichung). Es wurden frische Kotproben der 16 Tiere quantitativ auf TBX-Platten mit Zusatz von Kanamycin und Kalium-Tellurit untersucht. Die mittlere Konzentration in Proben der Kontrollgruppe ist als schraffierte Säule dargestellt, die der Versuchsgruppe in schwarz.

Im zweiten Versuch etablierte sich der Indikatorstamm E28 in der Versuchsgruppe schneller als in der Kontrollgruppe (**Abbildung 18**). Die Mittelwerte der

Konzentrationen im Kot waren an Tag 8, 15, 22 und 36 in der Versuchsgruppe signifikant höher als in der Kontrolle [8 dph ($P = 0,0015$), 15 dph ($P = 0,0003$), 22 dph ($P = 0,04$) and 36 dph ($P = 0,0146$)]. Neunundzwanzig Tage nach dem Schlupf war die Konzentration in der Versuchsgruppe niedriger als in der Kontrolle, der Unterschied war jedoch nicht signifikant ($P = 0,29$).

3.5.8 Gesamtkonzentration von *E. coli* im Hähnchendarm

Die Gesamtkonzentration von *E. coli* im Kot war zu Beginn des ersten Versuches in der Versuchsgruppe mit $\log_{10} 8,5$ KbE/g Kot an Tag sechs nach dem Schlupf und $\log_{10} 7,6$ KbE/g Kot an Tag neun höher als in der Kontrollgruppe mit $\log_{10} 8$ KbE/g Kot und $\log_{10} 6,2$ KbE/g Kot (**Abbildung 16**).

Im zweiten Versuch wurde in der Versuchsgruppe eine verzögerte Besiedlung des Darmes mit *E. coli* beobachtet (**Abbildung 17**). Die mittlere Konzentration von *E. coli* im Kot war in der Versuchsgruppe vom 6. Tag nach dem Schlupf bis zum 29. Tag nach dem Schlupf niedriger als in der Kontrollgruppe. Während die Konzentration in der Versuchsgruppe sechs Tage nach dem Schlupf im Mittel $\log_{10} 1,7$ KbE/g Kot betrug, war die Kontrollgruppe zu diesem Zeitpunkt vollständig kolonisiert ($\log_{10} 6,5$ KbE/g Kot, $P < 0,0001$). Die Konzentration in der Versuchsgruppe erreichte 15 Tage nach dem Schlupf eine mittlere Konzentration von $\log_{10} 5,9$ KbE/g Kot. In der Versuchsgruppe überstieg die Konzentration $\log_{10} 6$ KbE/g nicht, während die *E. coli*-Konzentration in der Kontrollgruppe im Versuchsverlauf zwischen $\log_{10} 6$ und $\log_{10} 7$ KbE/g Kot schwankte. Die geringere Kolonisation der Versuchsgruppe war an Tag 6, 8 und 29 ($P < 0,0001$; $P = 0,0012$; $P = 0,0072$).

3.5.9 Konzentration von E28 in der Stallumgebung

Die Konzentration von E28 in der Einstreu wurde nur im ersten Versuch erfasst (**Abbildung 21**). Im Mittel betrug sie in der Kontrollgruppe $\log_{10} 5,2 \pm 1,1$ KbE/g und in der Versuchsgruppe $\log_{10} 5,9 \pm 1,7$ KbE/g. Im Staub konnte die Konzentration von E28 auf Grund der verfügbaren Staubmenge nur an den letzten beiden Versuchstagen untersucht werden. In der Versuchsgruppe konnten zusätzlich Staubproben von Tag 9 und 21 untersucht werden. Im Mittel betrug die Konzentration in der Kontrollgruppe $\log_{10} 5 \pm 0,6$ KbE/g und in der Versuchsgruppe $\log_{10} 6,4 \pm 1$ KbE/g Staub. Eine Probe außen am Abluftkanal des Stalls enthielt keine E28 und keine Bakteriophagen, auf die Konzentration von *E. coli* wurde nicht untersucht.

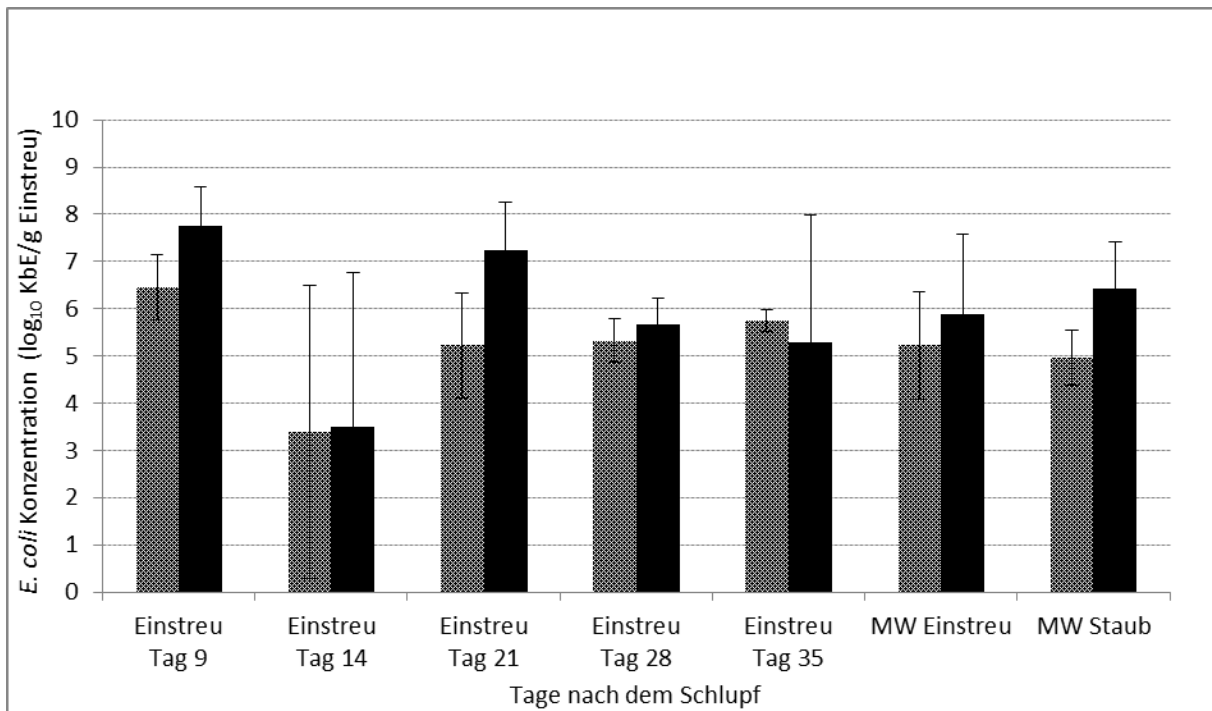


Abbildung 21: Konzentration von E28 in Umweltproben aus dem ersten Versuch (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=2$). Die mittlere Konzentration in Proben der der Kontrollgruppe ist als schraffierte Säule dargestellt, die der Versuchsgruppe in schwarz. Da Staub nicht immer in ausreichender Menge zur Untersuchung verfügbar war, wurden in der Versuchsgruppe lediglich an Tag 9, 21, 28 und 35 und in der Kontrollgruppe nur an Tag 28 und 35 Proben untersucht.

3.5.10 Konzentration von *E. coli* und Phagen in der Stallumgebung

In der Einstreu betrug die mittlere Konzentration von *E. coli* $\log_{10} 7,0 \pm 1$ KbE/g in der Kontrollgruppe und $\log_{10} 7,0 \pm 1,2$ KbE/g in der Versuchsgruppe (**Abbildung 21**). Im Staub konnte auf Grund der verfügbaren Staubmenge die Gesamtkonzentration von *E. coli* nur an den letzten beiden Proben Tagen gemessen werden. Sie betrug in der Kontrollgruppe im Mittel $\log_{10} 7,5 \pm 1,1$ KbE/g und in der Versuchsgruppe $\log_{10} 6,9 \pm 0,6$ KbE/g. In allen Proben der Versuchsgruppe wurden Phagen qualitativ nachgewiesen, wogegen in keiner der Proben aus der Kontrollgruppen Phagen nachgewiesen wurden (Tag 9, 21, 35).

3.5.11 Eigenschaften von Reisolaten aus den Tierversuchen

In weiterführenden Untersuchungen zur Resistenz, zum Stoffwechsel und zum Wachstum von ausgewählten Reisolaten aus den Versuchen wurde keine Veränderung der Eigenschaften festgestellt. Wie in **Abbildung 22 A** und **Abbildung 22 B** dargestellt, unterschieden sich die Prozentanteile von E28 an der Gesamtflora

von *E. coli* zwischen Kontrollgruppe und Versuchsgruppe nur wenig. In der Versuchsgruppe sank der E28-Anteil etwas langsamer und stieg zum Ende des Versuches wieder deutlich an.

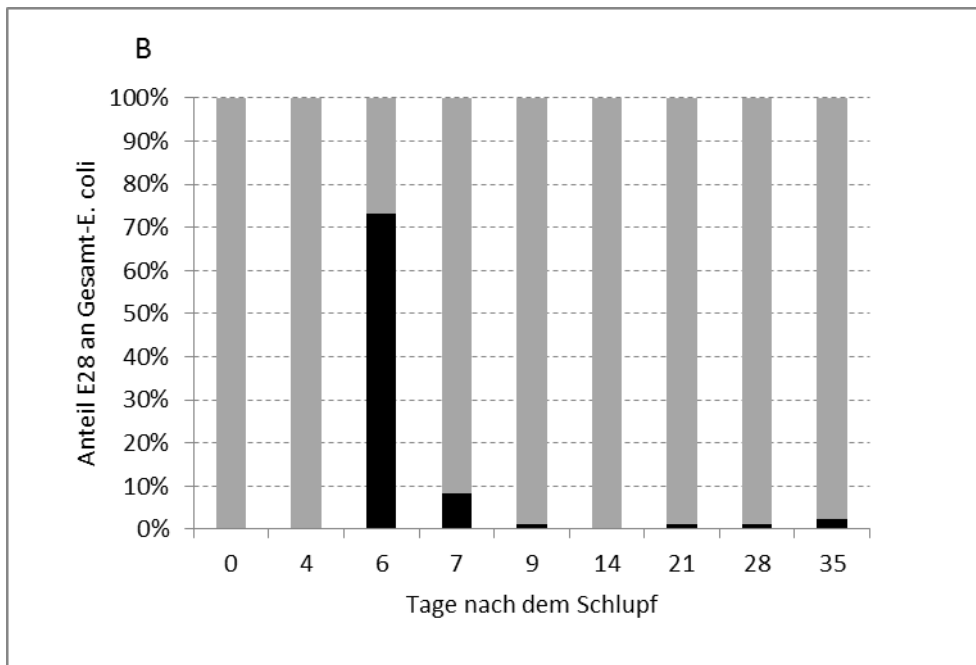
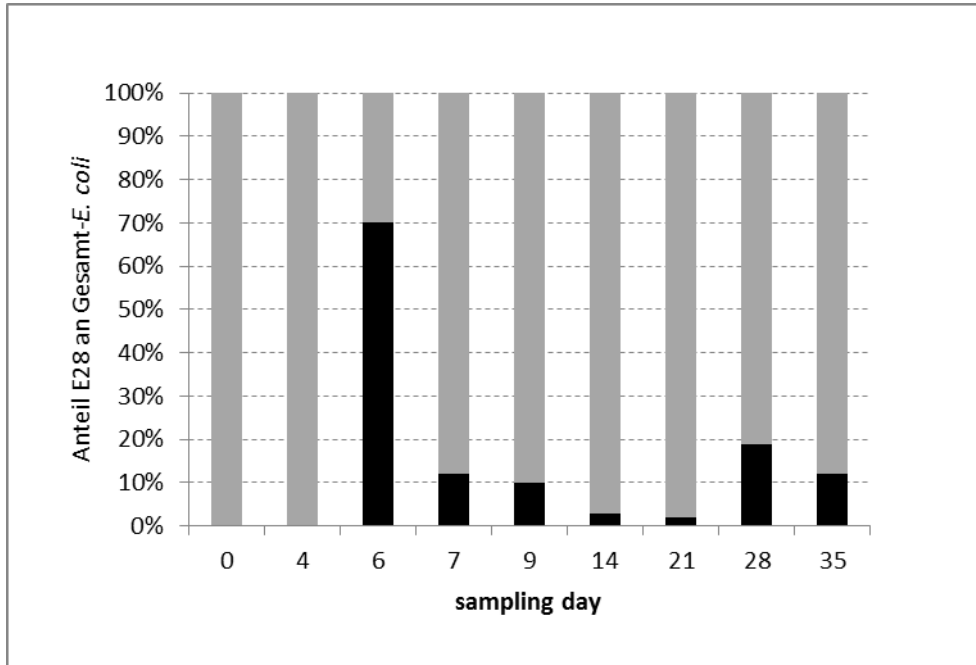


Abbildung 22: Anteil von Reisolaten mit E28-Phänotyp an den Gesamt-*E. coli* in der Kontrollgruppe (A) und der Versuchsgruppe (B). Hundert Isolate pro Untersuchungstag wurden von den TBX-Platten isoliert und auf ihren ESBL-Phänotyp sowie ihr Wachstum auf mit Kanamycin und Kalium-Tellurit supplementiertem TBX-Agar untersucht. Die Anteile der präsumptiven E28 Isolate sind in schwarz dargestellt, relativ zum Anteil der Isolate ohne E28-Phänotyp in grau.

3.6 Reduktion von ESBL-*E. coli* im Feldversuch.

Nach Abschluss der Versuche unter kontrollierten Bedingungen in Hannover wurden zwei Feldversuche unter realen Mastbedingungen durchgeführt, um zu untersuchen, ob sich die beobachtete Reduzierung der Besiedlungsgeschwindigkeit auch im größeren Maßstab reproduzieren ließe. Dazu wurden in den Zeiträumen vom 17.10.2017-13.11.2017 und 22.05.2018-25.06.2018 jeweils 30.000 gesunde männliche Ross HatchCare Küken in einen Versuchsstall (mit Phagenbehandlung) und einen Kontrollstall (ohne Phagenbehandlung) eingestallt. Die Bestimmung der *E. coli* Belastung im Geflügel erfolgte über eine Keimzahlbestimmung in Kotproben. Dazu wurde jeweils frischer Kot mit PBS Puffer versetzt und die Keimzahlen auf selektiven TBX Platten bestimmt. Am Einstalltag wurden die Kotproben dem Kükenpapier in den Transportboxen des Brutbetriebes entnommen, an allen darauffolgenden Tagen der Einstreu in den Ställen.

Ein Bakteriophagencocktail mit der Zusammensetzung PERMVI, AB7, EW2, AB27, AB3, AB19 und TB49 wurde über eine im Stall vorhandene Dosieranlage (Dosatron) direkt ins Tränkwasser der Küken eindosiert. In der Zusammensetzung des Cocktails wurde bereits darauf reagiert, dass die Bakteriophagen TriM und Kra2 sich in den vorangehenden Versuchen als nicht stabil erwiesen haben. Um die Wirksamkeit des Cocktails gegenüber der Stallflora zu überprüfen wurden zu Beginn der Versuche 20 *E. coli* Stämme aus Kotproben auf dem Kükenpapier isoliert und die Aktivität mittels Titration bestimmt. **Tabelle 23** zeigt, dass eine *in-vitro* Abdeckung von 90% der Isolate erreicht werden konnte.

Tabelle 23: Untersuchung der Sensitivität der Stallflora zu Beginn der Versuche. Isolate aus dem Teststall sind orange markiert, solche aus dem Kontrollstall in cyan.

| Test | Cocktail | Kontrolle | Cocktail |
|------|----------|-----------|----------|
| SAM1 | 2.20E+06 | SAM11 | 3.00E+05 |
| SAM2 | 2.00E+05 | SAM12 | 1.30E+06 |
| SAM3 | 1.70E+06 | SAM13 | 4.90E+06 |
| SAM4 | 9.00E+05 | SAM14 | |
| SAM5 | 4.00E+05 | SAM15 | |
| SAM6 | 7.00E+05 | SAM16 | 2.30E+06 |
| SAM7 | 2.40E+06 | SAM17 | 1.20E+06 |

| | | | |
|-------|----------|-------|----------|
| SAM8 | 2.10E+04 | SAM18 | 2.00E+06 |
| SAM9 | 8.70E+04 | SAM19 | 1.70E+06 |
| SAM10 | 6.00E+03 | SAM20 | 1.30E+06 |

Abbildung 23 und **Abbildung 24** zeigen den Verlauf der *E. coli* Konzentration in den beiden Versuchen vom Herbst 2017 und Frühling 2018. Die Kurven zeigen, dass die *E. coli* Konzentration bereits zu Beginn der Versuche 1×10^6 CFU/g Kot übersteigen, in den ersten Tagen des Mastzyklus auf fast 1×10^9 CFU/g Kot hochwachsen und sich danach bei etwa 1×10^7 CFU/g Kot stabilisieren. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Testställen in denen der Phagencocktail verabreicht wurde und den Kontrollställen, die nicht behandelt wurden.

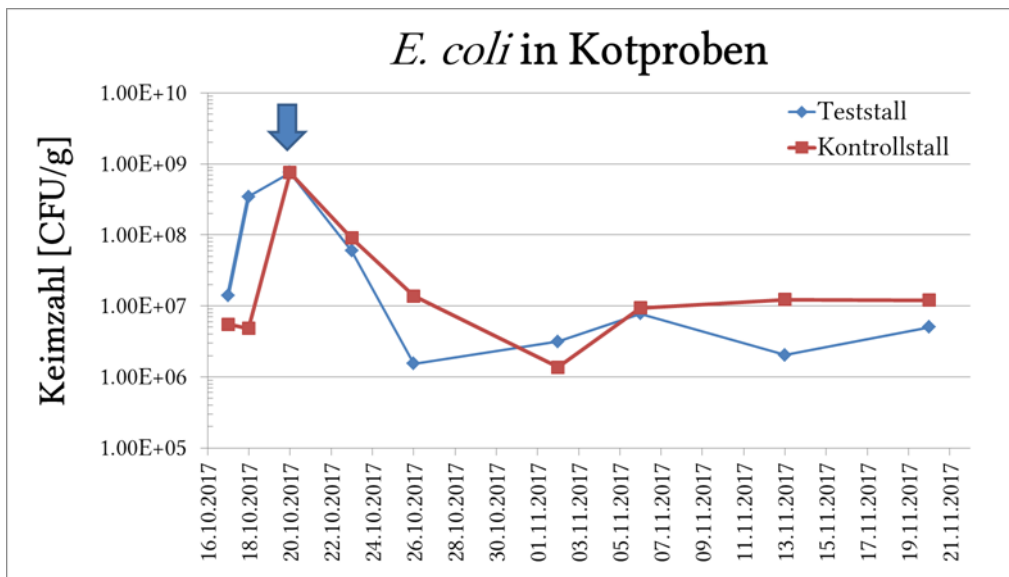


Abbildung 23: *E. coli* Keimzahlen [CFU/g] im Verlaufe des Feldversuches vom Herbst 2017. Blauer Pfeil: Zugabe von Baytril.

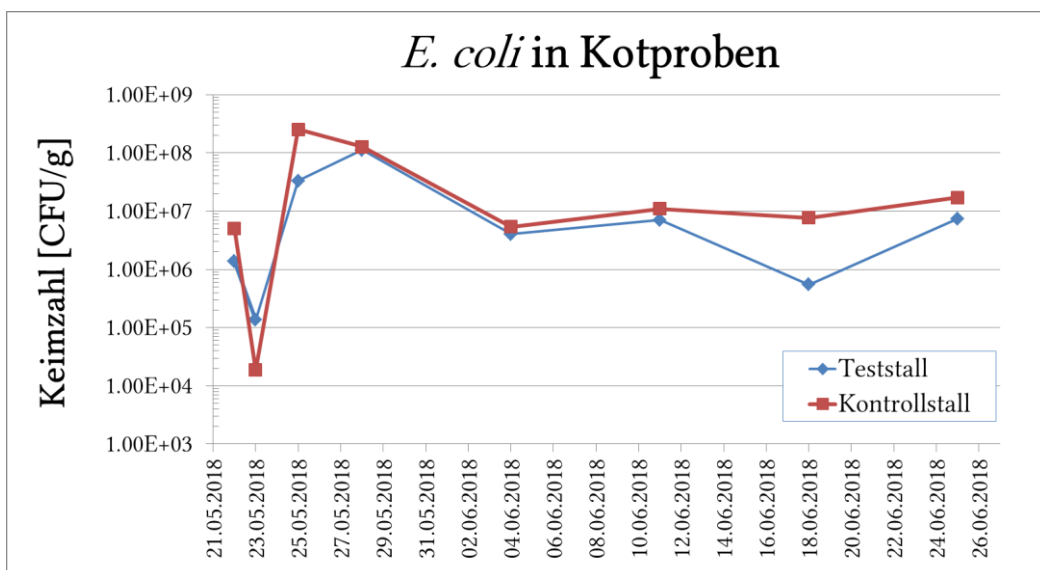


Abbildung 24: *E. coli* Keimzahlen [CFU/g] im Verlaufe des Feldversuches vom Frühling 2018.

Weitere versuchsrelevante Parameter wie die Anzahl der toten Tiere (**Abbildung 25** und **Abbildung 26**) oder die Gewichtszunahme pro Tier (**Abbildung 27** und **Abbildung 28**) wurden über die Stallkarte erfasst.

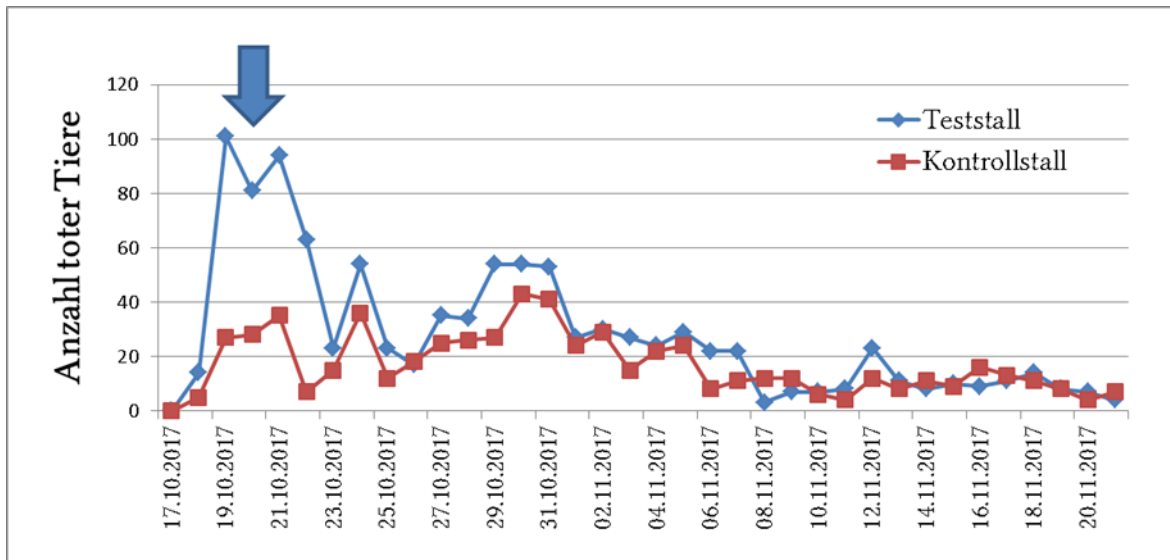


Abbildung 25: Anzahl toter Hähnchen im Verlauf des Feldversuches vom Herbst 2017. Blauer Pfeil: Zugabe von Baytril.

Im ersten Versuch im Herbst 2017 wurde im mit Phagen behandelten Versuchsstall zum Start des Mastzyklus kein Antibiotikum eingesetzt, während die Tiere im Kontrollstall über die ersten drei Tage mit dem Präparat Lincospectin behandelt wurden. Dies führte jedoch dazu, dass die Zahl der toten Tiere im Versuchsstall rasch anstieg (**Abbildung 25**). Als an Tag 3 über 100 Tiere verendeten, entschlossen sich Tierarzt und Mäster mithilfe des Antibiotikums Baytril zu intervenieren. Daraufhin glich sich die Mortalitätsrate im Versuchsstall wieder derjenigen im Kontrollstall an.

Im zweiten Versuch im Frühling 2018 wurden beide Versuchsställe gleichermaßen mit dem Präparat Lincospectin behandelt. Interessanterweise zeigte sich hier in den ersten Tagen ein erhöhter Anstieg der Mortalitätsrate im Kontrollstall, der jedoch nicht mittels einer weiteren Antibiotikagabe behandelt wurde (**Abbildung 26**).

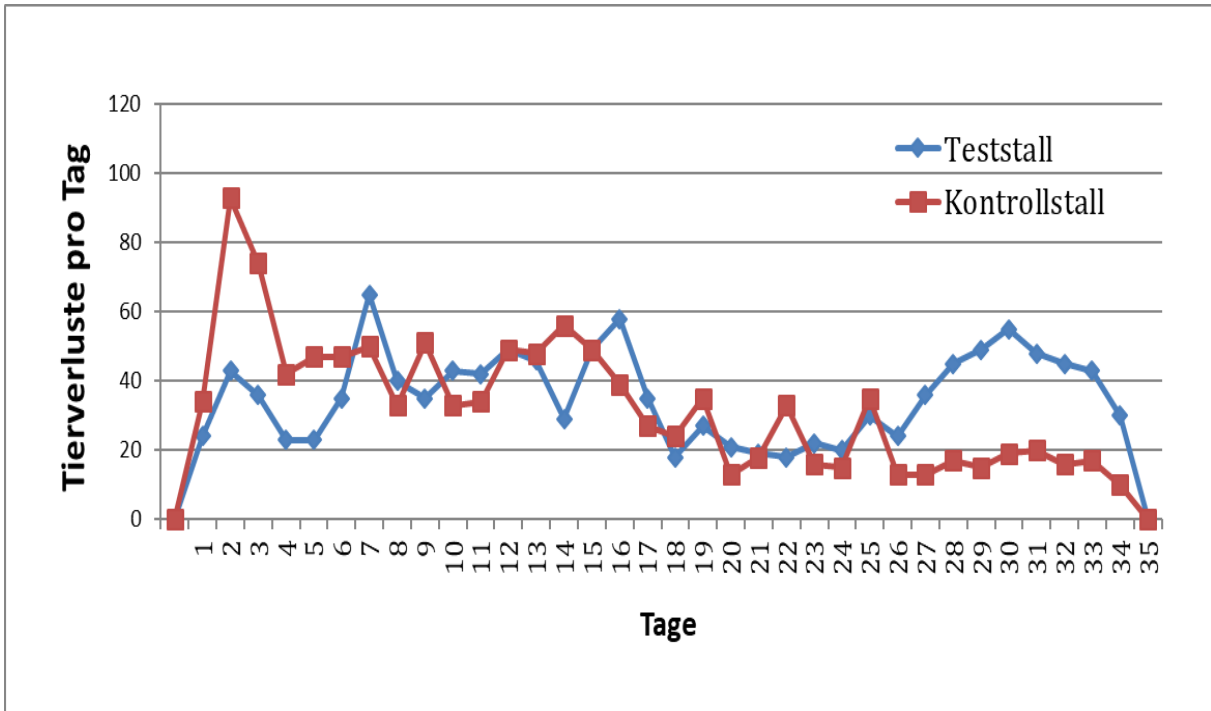


Abbildung 26: Anzahl toter Hähnchen im Verlauf des Feldversuches vom Frühling 2018.

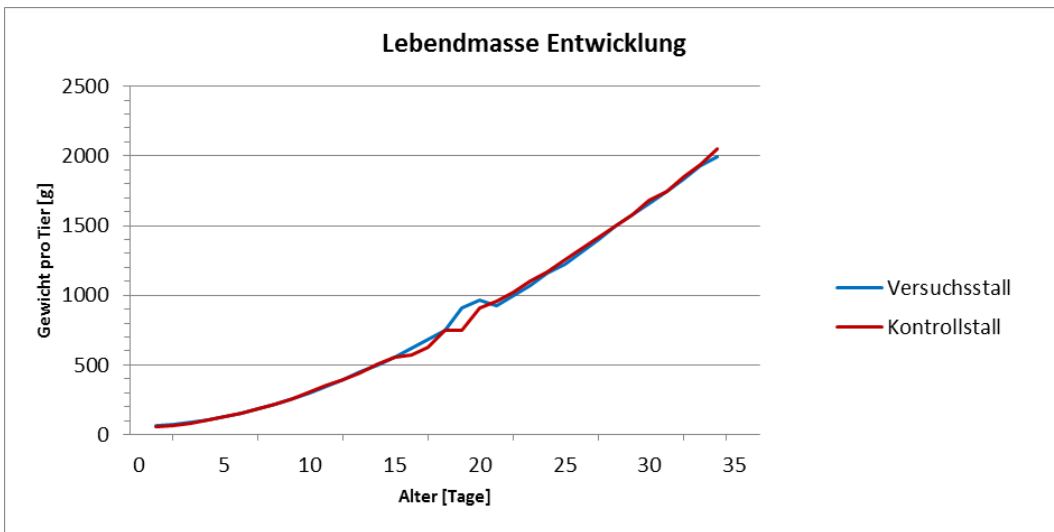


Abbildung 27: Tägliche Entwicklung der Lebendmasse pro Tier im Herbst 2017.

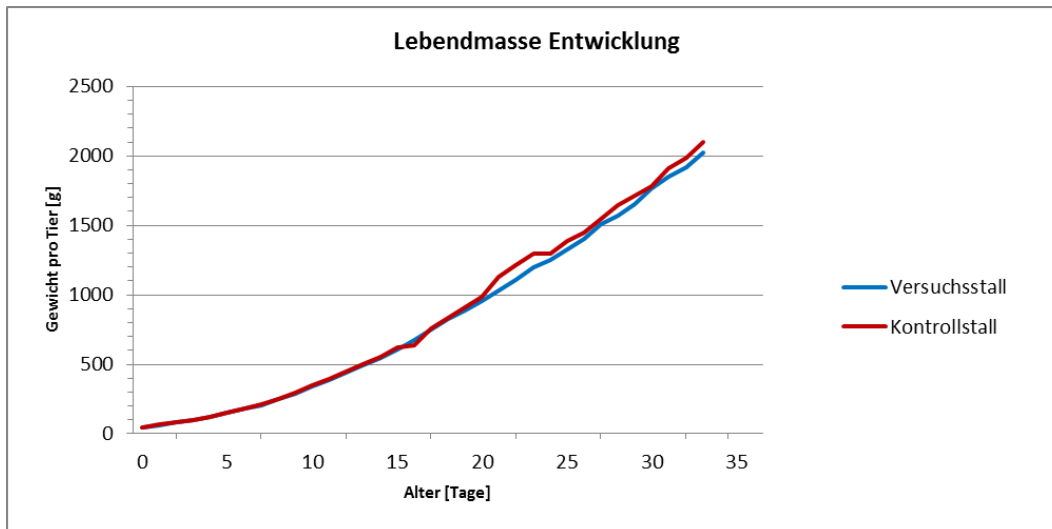


Abbildung 28: Tägliche Entwicklung der Lebendmasse pro Tier im Frühling 2018.

Auch die Entwicklung der Lebendmasse zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Versuchsstall und Kontrollstall und auch keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Feldversuchen. Dies lässt den Schluss zu, dass der Einsatz der Bakteriophagen in diesen beiden Feldversuchen weder einen positiven noch einen negativen Einfluss auf alle untersuchten, mastrelevanten Parameter hatte und somit keinerlei Wirkung zeigte.

4. Diskussion

Ziel dieses Forschungsprojekts war es einen Bakteriophagencocktail zu entwickeln, der präventiv in der Hähnchenmast eingesetzt werden kann um durch pathogene *E. coli* verursachte Schäden zu vermeiden oder zu mindern. Dadurch könnte der Einsatz von Antibiotika in der Mast, der bisher zur Bekämpfung von *E. coli* notwendig ist, reduziert werden, ohne die Gesundheit der Nutztiere negativ zu beeinflussen. Im Erfolgsfall würde der Einsatz von Bakteriophagen in der Tiermast eine Komponente einer mehrstufigen Strategie zur Produktion antibiotika-freier Lebensmittel werden.

Die durchgeführten Arbeiten können in vier Teilbereiche gegliedert werden, die jedoch direkt voneinander abhängen. Im ersten Teilbereich wurde ein Bakteriophagencocktail gegen einen spezifischen, selektiv nachweisbaren *E. coli* Stamm entwickelt. Im zweiten Teilbereich wurde dieser Bakteriophagencocktail in einem Hähnchenmast-Modellversuch untersucht und im dritten Teilbereich wurde versucht die Resultate aus dem Modellversuch in einem kommerziellen Mastbetrieb zu reproduzieren. In einem vierten Teilbereich wurden drei Methoden zur Vorhersage der Effektivität von Phagen untereinander und mit den Ergebnissen einer Anwendung auf dem Lebensmittel verglichen.

4.1 Entwicklung eines Bakteriophagencocktails.

Um ein großes Arsenal an genetisch diversen Bakteriophagen zur Verfügung zu haben, wurden mehrere Isolationsrunden auf einem breiten Spektrum pathogener und ESBL-bildender *E. coli* durchgeführt, sowie Bakteriophagen aus vorhandenen Sammlungen zusammengeführt. Dadurch entstand eine Sammlung aus über 100 Bakteriophagen, die mit großem Aufwand charakterisiert wurde.

Als Vorbereitung auf die kontrollierten *in-vivo* Versuche wurde ein *E. coli* Bakterienstamm (E28) identifiziert, der sich über eine Kanamycin- und eine Kalium-Tellurit-Resistenz leicht von andern *E. coli* Stämmen unterscheiden lies. Daraufhin wurde ein Bakteriophagencocktail mit breitem Wirtsspektrum zusammengestellt, in dem jede Einzelkomponente auch spezifisch in der Lage war den Zielkeim E28 zu lysieren. Die Genome dieser Bakteriophagen wurden sequenziert und bioinformatisch charakterisiert. So konnte sichergestellt werden, dass nur lytische Bakteriophagen

zum Einsatz kamen, die auch keine Virulenzfaktoren wie Toxingene oder Antibiotika-Resistenzgene trugen.

Eine wichtige Eigenschaft für Bakteriophagen zur praktischen Anwendung ist ihre Stabilität unter variablen Bedingungen. Während sich die Laborbedingungen in einem engen Bereich von Temperatur, pH und Medium bewegen, finden sich in einer Praxis extremere Milieus. So dauert die Magenpassage im Hähnchen etwa 60-90 Minuten bei einem pH von etwa 2,6. Trotzdem gelten Bakteriophagen im allgemeinen, als Dauerform in der Natur, als stabil, ihre Widerstandskraft gegen tiefe pH-Werte ist jedoch limitiert (Niu et al. 2012)(Jung, Ding, and Ahn 2017). Unsere Untersuchungen im Vorfeld der Anwendungsstudien zeigten eine pH-Stabilität die ausreichen sollte um die Magenpassage im Hähnchen zu überwinden.

Eine morphologische Charakterisierung im Elektronenmikroskop identifizierte alle ausgewählten Bakteriophagen als Myoviridae innerhalb der Ordnung der Caudovirales. Glücklicherweise enthält die Familie der Myoviridae eine Vielzahl genetisch diverser Bakteriophagen. So konnte hier ein Bakteriophagencocktail mit sechs Einzelphagen aus fünf genetisch unabhängigen Klassen zusammengestellt werden. Dadurch erhöhte sich die Wahrscheinlichkeit, dass diese Bakteriophagen auch unterschiedliche Rezeptoren zur Adsorption an die Bakterienoberfläche nutzen, auch wenn die tatsächlich genutzten Rezeptoren noch nicht bekannt sind. Unterschiedliche Rezeptoren sind wichtig, weil dadurch die Entstehung und Ausbreitung von Resistenzen gegenüber den eingesetzten Bakteriophagen verhindert werden kann (Hooton, Atterbury, and Connerton 2011)(Tanji et al. 2004)(Gu et al. 2012). Unsere *in-vitro* Experimente zeigten, dass phagen-resistente Varianten, die gegen eine Komponente des Cocktails resistent waren, noch immer gegenüber mindestens einer andern Komponente des Cocktails sensitiv waren. Entsprechend war der zusammengesetzte Cocktail in Flüssigkulturen nicht nur hoch wirksam gegen den Zielkeim E28, sondern es wurde auch kein Wachstum phagen-resistenter Varianten beobachtet. Während sich diese Herangehensweise *in-vitro* hervorragend eignet einen effizienten Cocktail zusammen zu stellen, ist unklar ob sich dies auch auf *in-vivo* Experimente übertragen lässt, wo nicht nur ein einziger spezifischer Zielkeim vorhanden ist, sondern eine Vielzahl oft nicht charakterisierter Stämme die Regel ist.

4.2 Tierversuch unter kontrollierten Bedingungen.

Unter kontrollierten Bedingungen wurde in einem Versuchsstall der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover der vorangehend entwickelte Bakteriophagencocktail präventiv in einem Tierversuch verabreicht. Mit dem Modellkeim E28 sollte untersucht werden ob es gelingen kann, bestimmte *E. coli* Stämme an der Kolonisation des Darmes zu hindern oder sie zu eliminieren. Wenn eine Reduktion des, durch eine Antibiotikaresistenz markierten, Modellkeimes gelänge, könnten auch Aviär pathogene *E. coli* durch die Applikation eines spezifischen Phagencocktails gezielt in dem Reservoir Darm bekämpft werden. Die Prävention von Erkrankungen durch den Ausschluss pathogener Bakterien aus ihrem Reservoir im Darm könnte viele Behandlungen mit Antibiotika unnötig machen und gleichzeitig das Leiden der Tiere durch klinische Erkrankungen verhindern. Dieser präventive Ansatz zur Bekämpfung von Colibazillose im Hähnchen mit einer kontinuierlichen Gabe der Bakteriophagen über das Tränkewasser war neu und der Tierversuch konnte viele der sich ergebenden Fragen beantworten:

- Der Testkeim E28 konnte als Modellkeim im Hähnchenkot selektiv quantifiziert werden und zeigte eine stabile Kolonisation des Hähnchendarms. Die Gesundheit der Tiere wurde in keinem der beiden Versuche beeinträchtigt.
- Die Applikation der Bakteriophagen über das Tränkewasser war erfolgreich. Allerdings ließen sich nur vier der sechs im ersten Versuch eingesetzten Bakteriophagen im Kot der Tiere nachweisen. Warum die Phagen TriM und Kra2 die Magen/Darmpassage nicht überlebten ist noch unklar und lies sich auch aus den Vorarbeiten nicht ableiten, zeigte doch TriM gute Stabilität auch im Bereich von pH 3,0.
- Die Bakteriophagen zeigten eine Vermehrung im Verdauungstrakt der Hähnchen. Dies konnte dadurch gezeigt werden, dass höhere Phagenmengen im Kot der Tiere nachgewiesen werden konnten, als über das Tränkewasser zugeführt wurden.
- Die Empfänglichkeit von E28 gegenüber dem Gesamtcocktail blieb im Versuchsverlauf bestehen. Das Auftreten von zwei Isolaten mit verminderter Empfänglichkeit gegenüber dem Cocktail im ersten Versuch, führte nicht zu einer dominierenden Population resistenter E28 bis zum Versuchsende.

Gegen die Einzelphagen traten zum Teil hohe Resistenzraten auf, die jedoch die Wirksamkeit des Gesamtcocktails nicht verminderten. Der eingesetzte Bakteriophagencocktail führte nicht zu einer Eliminierung der *E. coli* Population im Hähnchendarm. In beiden Versuchen erreichte die *E. coli* Konzentration nach etwa 14 Tagen eine Gleichgewichtskonzentration um 10^7 KbE/ml.

Obwohl der Bakteriophagencocktail spezifisch auf den Teststamm E28 ausgerichtet war und *in-vitro* hohe Abtötungseffizienz gezeigt hatte, konnte das Ziel des Versuches, mittels eines präventiv verabreichten Bakteriophagencocktails die Kolonisierung des Hähnchendarms mit dem Teststamm E28 zu verhindern, nicht erreicht werden. Sowohl im ersten Versuch mit hoher Infektionsdosis und tieferer Phagenkonzentration, als auch im zweiten Versuch mit reduzierter Infektionsdosis und höherer Phagenkonzentration konnte sich E28 im Darm der Versuchstiere etablieren. Einmal etabliert konnte der Teststamm auch durch kontinuierliche Phagenapplikation nicht mehr aus dem Darm der Versuchstiere eliminiert werden. Verschiedene Faktoren für könnten für diese Ergebnisse *in-vivo* verantwortlich sein. So ist etwa die Viskosität im Hähnchendarm sehr viel höher als im Flüssignährmedium im Reagenzglas und dies wird sich negativ auf die passive Mobilität der Bakteriophagen auswirken. Das im Hähnchendarm anwesende Mikrobiom könnte ebenfalls dazu führen, dass die Effizienz, mit der Bakteriophagen ihre Wirtsbakterien erkennen, reduziert ist. Das aerobe Milieu im Reagenzglas unterscheidet sich auch dezidiert von der mikroaerophilen Umgebung im Hähnchendarm und dies könnte zu unterschiedlicher Expression von Rezeptoren auf der Bakterienoberfläche führen. Dies wiederum könnte die Wirtsspezifität bzw. die Infektionseffizienz der Bakteriophagen entscheidend beeinflussen.

Obwohl in diesen Versuchen der Teststamm E28 im Vordergrund stand, wurde doch auch das gesamte *E. coli*-Mikrobiom untersucht. Im zweiten Versuch mit höherer Bakteriophagenkonzentration zeigte sich eine signifikant verzögerte Etablierung der *E. coli*-Kolonisation, verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe. Auch wenn der im zweiten Versuch eingesetzte Bakteriophagencocktail aus vier Bakteriophagen mit einem möglichst breiten Wirtsspektrum zusammengestellt wurde, war ein so genereller Effekt auf die gesamte *E. coli*-Population überraschend. Vermutlich verursacht durch

die verzögerte Etablierung blieb der, im ersten Tierversuch und in den Feldversuchen beobachtete, rasante Anstieg der *E. coli* Population in den ersten Tagen der Mast in diesem Versuch aus. Wenn es gelingen könnte die verzögerte Etablierung des *E. coli* Microbioms aus dem Versuchsstall auf pathogene *E. coli* im Maststall zu übertragen, so könnte dies zu einer Verbesserung der Tiergesundheit im Maststall führen und potentiell auch den Einsatz von Antibiotika reduzieren.

Weitere Versuche werden notwendig sein um das in diesem Projekt etablierte, bisher einzigartige, *in-vivo* Hähnchenmodell besser zu verstehen und damit auch mögliche Anwendungen von Bakteriophagen in der Hähnchenmast zu optimieren.

4.3 Feldversuche in der kommerziellen Hähnchenmast.

Feldversuche zur Verzögerung der Kolonisation durch Bakteriophagen in kommerziellen Mastställen wurden im dritten Projektteil durchgeführt. Mit Ausnahmegenehmigungen, ausgestellt durch die zuständige Behörde (LANUV NRW; Amtliche Futtermittelüberwachung) wurden zwei Fütterungsversuche in der kommerziellen Hähnchenmast durchgeführt. Zulassungstechnisch wird ein „Bakteriophagencocktail“ als zotechnischer Futtermittelzusatzstoff eingestuft. Der eingesetzte Cocktail war eine Weiterentwicklung, basierend auf den ersten beiden Projektteilen, mit möglichst breitem Wirtsspektrum. Um den präventiven Ansatz aus den Vorversuchen zu kopieren wurde die Bakteriophagenlösung bereits vor dem Einstellen der Masthähnchen in die Wasserleitung des Versuchsstalls eindosiert. Damit wurde sichergestellt, dass die eingestellten Küken bereits bei der ersten Wasseraufnahme auch Bakteriophagen mit aufnahmen.

In beiden Feldversuchen zeigte sich kein signifikanter Effekt der Bakteriophagen, weder auf das *E. coli*-Mikrobiom noch auf andere mastrelevante Parameter, wie die Mortalitätsrate oder die Gewichtszunahme. Eine mögliche Erklärung dafür wäre fehlende Aktivität der Bakteriophagen gegenüber den im Stall vorhandenen *E. coli*-Isolaten. Dies konnte jedoch mit einer Überprüfung des Mikrobioms, zum Zeitpunkt der Einnistung (Kükenpapier), ausgeschlossen werden, da 90% der untersuchten Isolate sensitiv gegenüber dem Bakteriophagencocktail waren. Die in den Versuchen durchgeführten Keimzahlbestimmungen zeigten jedoch, dass die *E. coli* Konzentration im Kot der Küken, zum Zeitpunkt der Einnistung Werte von bereits über 10^6 CFU/ml Kot erreicht hatten. Dies im Gegensatz zu den Versuchen in kontrollierter Umgebung,

wo dieser Wert noch unter 10 CFU/ml Kot lag. Dieser Unterschied lässt sich damit erklären, dass die eingestellten Küken nicht gleich alt waren. In den kontrollierten Versuchen wurden die frisch geschlüpften Küken direkt aus der Brüterei abgeholt und innerhalb von 3 Stunden in den Versuchsstall gebracht, wo sie das erste Wasser und Futter erhielten. Die Küken aus der kommerziellen Mast erhielten bereits in der Brüterei das erste Wasser und Futter und es dauerte dann etwa zwei Tage bis sie im Maststall eintrafen. Laboruntersuchung zeigen, dass man auch im Reagenzglas keine Reduktion einer Bakterienpopulation erreichen kann, wenn man 10^6 Bakteriophagen zu 10^6 sensitiven Wirtsbakterien gibt. Unter diesen Bedingungen stellt sich ein natürliches Fließgleichgewicht zwischen Bakteriophagen und Bakterien ein, in dem beide Populationen stabil bleiben. Entsprechend kann es auch nicht gelingen die Bakterienpopulation im Masthähnchen zu reduzieren, wenn wir die Tiere erst behandeln können, wenn sie bereits mit über 10^6 CFU/ml *E. coli* besiedelt sind. Der Einsatz der Bakteriophagen im Maststall erfolgt dementsprechend zu spät. Um den gewünschten Effekt, die verzögerte Etablierung des *E. coli*-Mikrobioms zu erreichen, sollte der Einsatz der Bakteriophagen bereits in der Brüterei erfolgen.

4.4 Methodenvergleich zur Effizienztestung

Im Rahmen des vierten Projektteils wurden die Ergebnisse von drei Effizienztests verglichen und hinsichtlich ihrer Vorhersage mit einem Reduktionsversuch auf Hähnchenschenkeln überprüft. Der im Rahmen dieses Projektes entwickelte In situ-Test ist einfach durchzuführen und erscheint nach unseren Ergebnissen für die Auswahl von Bakteriophagen für Anwendungen auf Hähnchenprodukten besser geeignet als andere Tests unter weniger anwendungsnahen Bedingungen.

4.5 Fazit

Das Hauptziel des Förderprojekts, die Reduzierung des Antibiotikaeinsatzes in der Hähnchenmast mittels Bakteriophagen, konnte innerhalb der Projektlaufzeit nicht erreicht werden. Aber, die im Projekt erarbeiteten Resultate haben uns diesem Ziel ein großes Stück nähergebracht. Die Isolierung und Charakterisierung neuer Bakteriophagen gegen *E. coli* lieferte nicht nur neues Material für den praktischen Einsatz, sondern auch wichtige Erkenntnisse darüber, wie ein wirksamer Bakteriophagencocktail aufgebaut werden kann. Das neu etablierte *in-vivo* Mastmodell konnte viele offene Fragen zur Bakteriophagenanwendung beantworten und hat uns

auch die Grenzen der *in-vitro* Voruntersuchungen aufgezeigt. Dieses Modell wird in weiteren Anwendungsversuchen eine wichtige Rolle spielen. Auch die beiden Versuche in der kommerziellen Mast waren in sich nicht erfolgreich, haben uns aber die Richtung aufgezeigt in der erfolgsversprechend weiter geforscht werden kann. Alle Projektpartner werden die in diesem Förderprojekt gestartete Forschung auch nach Projektabschluss weiterführen.

5. Literatur

- Abedon, Stephen T., Sarah J. Kuhl, Bob G. Blasdel, and Elizabeth Martin Kutter. 2011. "Phage Treatment of Human Infections." *Bacteriophage* 1 (2): 66–85. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.15845>.
- Abedon, Stephen T. 2018. "Phage Therapy: Various Perspectives on How to Improve the Art." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1734: 113–27. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7604-1_11.
- Abedon, Stephen T, and John Yin. 2009. "Bacteriophage Plaques: Theory and Analysis." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 501: 161–74. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_17.
- anonymous. 2017. "ROSS 308 AP Performance Objectives 2017." *Aviagen, Vol. 0217-AVNR-077: Www.Aviagen.Com; 2017*.
- Arbiol, Christine, André M. Comeau, Mzia Kutateladze, Revaz Adamia, and H. M. Krisch. 2010. "Mobile Regulatory Cassettes Mediate Modular Shuffling in T4-Type Phage Genomes." *Genome Biology and Evolution* 2 (1): 140–52. <https://doi.org/10.1093/gbe/evq006>.
- Baym, Michael, Sergey Kryazhimskiy, Tami D Lieberman, Hattie Chung, Michael M Desai, and Roy Kishony. 2015. "Inexpensive Multiplexed Library Preparation for Megabase-Sized Genomes." *PloS One* 10 (5): e0128036. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128036>.
- Blair, Jessica M A, Mark A Webber, Alison J Baylay, David O Ogbolu, and Laura J V Piddock. 2015. "Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance." *Nature Reviews. Microbiology* 13 (1): 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>.
- Bourdin, Gilles, Armando Navarro, Shafiqul A. Sarker, Anne C. Pittet, Firdausi Qadri, Shamima Sultana, Alejandro Cravioto, Kaisar A. Talukder, Gloria Reuteler, and Harald Brüßow. 2014. "Coverage of Diarrhoea-Associated Escherichia Coli Isolates from Different Origins with Two Types of Phage Cocktails." *Microbial*

Biotechnology 7 (2): 165–76. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12113>.

- Braun, Sascha D., Marwa F.E. Ahmed, Hosny El-Adawy, Helmut Hotzel, Ines Engelmann, Daniel Wei, Stefan Monecke, and Ralf Ehricht. 2016. "Surveillance of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Escherichia Coli in Dairy Cattle Farms in the Nile Delta, Egypt." *Frontiers in Microbiology* 7 (JUL). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01020>.
- Bryson, Alexandra L., Young Hwang, Scott Sherrill-Mix, James D. Lewis, Lindsay Black, Tyson A. Clark, and Frederic D. Bushman. 2015. "Covalent Modification of Bacteriophage T4 DNA Inhibits CRISPR-Cas9." *Nature Reviews. Microbiology* 6 (3): 1–9. <https://doi.org/10.1128/mBio.00648-15.Editor>.
- Carter, Chandi D., Adam Parks, Tamar Abuladze, Manrong Li, Joelle Woolston, Joshua Magnone, Andre Senecal, Andrew M. Kropinski, and Alexander Sulakvelidze. 2012. "Bacteriophage Cocktail Significantly Reduces Escherichia Coli O157." *Bacteriophage* 2 (3): 178–85. <https://doi.org/10.4161/bact.22825>.
- Chibani-Chennoufi, Sandra, Josette Sidoti, Anne Bruttin, Elizabeth Kutter, Shafiq Sarker, and Harald Brüssow. 2004. "In Vitro and in Vivo Bacteriolytic Activities of Escherichia Coli Phages: Implications for Phage Therapy." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (7): 2558–69. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.7.2558-2569.2004>.
- Dalmasso, Marion, Ronan Strain, Horst Neve, Charles M.A.P. Franz, Fabien J. Cousin, R. Paul Ross, and Colin Hill. 2016. "Three New Escherichia Coli Phages from the Human Gut Show Promising Potential for Phage Therapy." *PLoS ONE* 11 (6): 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156773>.
- Dziva, Francis, and Mark P. Stevens. 2008. "Colibacillosis in Poultry: Unravelling the Molecular Basis of Virulence of Avian Pathogenic Escherichia Coli in Their Natural Hosts." *Avian Pathology* 37 (4): 355–66. <https://doi.org/10.1080/03079450802216652>.
- Fischer, Samuel, Sophie Kittler, Günter Klein, and Gerhard Glünder. 2013a. "Impact

of a Single Phage and a Phage Cocktail Application in Broilers on Reduction of *Campylobacter* Jejuni and Development of Resistance.” Edited by Glenn Francis Browning. *PloS One* 8 (10): e78543.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078543>.

———. 2013b. “Microplate-Test for the Rapid Determination of Bacteriophage-Susceptibility of *Campylobacter* Isolates-Development and Validation.” *PloS One* 8 (1): e53899. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053899>.

Gu, Jingmin, Xiaohe Liu, Yue Li, Wenyu Han, Liancheng Lei, Yongjun Yang, Honglei Zhao, et al. 2012. “A Method for Generation Phage Cocktail with Great Therapeutic Potential.” *PLoS ONE* 7 (3).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031698>.

Hancock, R E, and P Reeves. 1975. “Bacteriophage Resistance in *Escherichia Coli* K-12: General Pattern of Resistance.” *Journal of Bacteriology* 121 (3): 983–93.

Hong, Yingying, Yanying Pan, Nicholas J Harman, and Paul D Ebner. 2014. “Complete Genome Sequences of Two *Escherichia Coli* O157 : H7 Phages” 2 (5): 2012–13. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00519-14>. Copyright.

Hooton, Steven P T, Robert J Atterbury, and Ian F Connerton. 2011. “Application of a Bacteriophage Cocktail to Reduce *Salmonella* Typhimurium U288 Contamination on Pig Skin.” *International Journal of Food Microbiology* 151 (2): 157–63. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.015>.

Jacoby, George a. 2009. “AmpC Beta-Lactamases.” *Clinical Microbiology Reviews* 22 (1): 161–82. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08>.

Jung, Lae seung, Tian Ding, and Juhee Ahn. 2017. “Evaluation of Lytic Bacteriophages for Control of Multidrug-Resistant *Salmonella* Typhimurium.” *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 16 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0237-6>.

Kittler, Sophie, Samuel Fischer, Amir Abdulmawjood, Gerhard Glünder, and Günter

- Klein. 2014. "Colonisation of a Phage Susceptible *Campylobacter* Jejuni Population in Two Phage Positive Broiler Flocks." *PloS One* 9 (4): e94782. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094782>.
- Kola, A, C Kohler, Y Pfeifer, F Schwab, K Kuhn, K Schulz, V Balau, et al. 2012. "High Prevalence of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Organic and Conventional Retail Chicken Meat, Germany." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67 (11): 2631–34. <https://doi.org/10.1093/jac/dks295>.
- Lai, X H, S Y Wang, and B E Uhlin. 1999. "Expression of Cytotoxicity by Potential Pathogens in the Standard *Escherichia Coli* Collection of Reference (ECOR) Strains." *Microbiology (Reading, England)* 145 (Pt 1 (November): 3295–3303. <https://doi.org/10.1099/00221287-145-11-3295>.
- Lee, Heyn, Hye Jin Ku, Dong Hoon Lee, You Tae Kim, Hakdong Shin, Sangryeol Ryu, and Ju Hoon Lee. 2016. "Characterization and Genomic Study of the Novel Bacteriophage HY01 Infecting Both *Escherichia Coli* O157:H7 and *Shigella Flexneri*: Potential as a Biocontrol Agent in Food." *PLoS ONE* 11 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168985>.
- Leverstein-van Hall, M. A., C. M. Dierikx, J. Cohen Stuart, G. M. Voets, M. P. van den Munckhof, A. van Essen-Zandbergen, T. Platteel, et al. 2011. "Dutch Patients, Retail Chicken Meat and Poultry Share the Same ESBL Genes, Plasmids and Strains." *Clinical Microbiology and Infection* 17 (6): 873–80. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03497.x>.
- Maura, Damien, Matthieu Galtier, Chantal Le Bouguéneq, and Laurent Debarbieux. 2012. "Virulent Bacteriophages Can Target O104:H4 Enteroaggregative *Escherichia Coli* in the Mouse Intestine." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (12): 6235–42. <https://doi.org/10.1128/AAC.00602-12>.
- Mazel, Didier, Broderick Dychinco, Vera A. Webb, and Julian Davies. 2000. "Antibiotic Resistance in the ECOR Collection: Integrons and Identification of a Novel Aad Gene." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (6): 1568–74.

<https://doi.org/10.1128/AAC.44.6.1568-1574.2000>.

Merabishvili, Maia, Daniel de Vos, Gilbert Verbeken, Andrew M. Kropinski, Dieter Vandenhoevel, Rob Lavigne, Pierre Wattiau, et al. 2012. "Selection and Characterization of a Candidate Therapeutic Bacteriophage That Lyses the Escherichia Coli O104:H4 Strain from the 2011 Outbreak in Germany." *PLoS ONE* 7 (12): 8–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052709>.

Miguéis, S., C. Saraiva, and A. Esteves. 2017. "Efficacy of LISTEX P100 at Different Concentrations for Reduction of *Listeria Monocytogenes* Inoculated in Sashimi." *Journal of Food Protection* 80 (12): 2094–98. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-098>.

Monod, C, F Repoila, M Kutateladze, F Tetart, and H M Krisch. 1997. "The Genome of the Pseudo T-Even Bacteriophages, a Diverse Group That Resembles T4." *Journal of Molecular Biology* 267 (2): 237–49. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0867>.

Neuhauser, Hannelore. 2013. "Epidemiologisches Bulletin." *Robert Koch Institut*, no. 13: 105–14. http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2013/Ausgaben/13_13.pdf?__blob=publicationFile.

Niu, Yan D., Kim Stanford, Andrew M. Kropinski, Hans Wolfgang Ackermann, Roger P. Johnson, Yi Min She, Rafiq Ahmed, Andre Villegas, and Tim A. McAllister. 2012. "Genomic, Proteomic and Physiological Characterization of a T5-like Bacteriophage for Control of Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli O157:H7." *PLoS ONE* 7 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034585>.

O'Neill, Jim. 2014. "Antimicrobial Resistance : Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations."

Ochman, H., and R. K. Selander. 1984. "Standard Reference Strains of Escherichia Coli from Natural Populations." *Journal of Bacteriology* 157 (2): 690–93. <https://doi.org/10.1152/jn.01312.2007>.

- Overdevest, Ilse, Ina Willemsen, Martine Rijnsburger, Andrew Eustace, Li Xu, Peter Hawkey, Max Heck, et al. 2011. "Extended-Spectrum β -Lactamase Genes of *Escherichia Coli* in Chicken Meat and Humans, the Netherlands." *Emerging Infectious Diseases* 17 (7): 1216–22. <https://doi.org/10.3201/eid1707.110209>.
- Rasko, David A, Dale R Webster, Jason W Sahl, Ali Bashir, Nadia Boisen, Flemming Scheutz, Ellen E Paxinos, et al. 2011. "Origins of the *E. Coli* Strain Causing an Outbreak of Hemolytic-Uremic Syndrome in Germany." *The New England Journal of Medicine* 365 (8): 709–17. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1106920>.
- Reuland, E. A., N. al Naiemi, S. A. Raadsen, P. H M Savelkoul, J. A J W Kluytmans, and C. M J E Vandenbroucke-Grauls. 2014. "Prevalence of ESBL-Producing Enterobacteriaceae in Raw Vegetables." *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 33 (10): 1843–46. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2142-7>.
- Santos, S. B., A. M. Kropinski, P.-J. Ceysens, H.- W. Ackermann, A. Villegas, R. Lavigne, V. N. Krylov, C. M. Carvalho, E. C. Ferreira, and J. Azeredo. 2011. "Genomic and Proteomic Characterization of the Broad-Host-Range *Salmonella* Phage PVP-SE1: Creation of a New Phage Genus." *Journal of Virology* 85 (21): 11265–73. <https://doi.org/10.1128/JVI.01769-10>.
- Schmerer, Matthew, Ian J. Molineux, and James J. Bull. 2014. "Synergy as a Rationale for Phage Therapy Using Phage Cocktails." *PeerJ* 2: e590. <https://doi.org/10.7717/peerj.590>.
- Schmidt, Imke, Thomas Riedel, Isabel Schober, Boyke Bunk, and Cathrin Spröer. 2017. "Genome Sequence of *Escherichia Coli* Isolated from a Chicken Carcass , and Its Spontaneously Inducible Prophage." *Genome Announcements* 5 (22): 4784–85.
- Schwarzer, D., Christopher Browning, Katharina Stummeyer, Astrid Oberbeck, Martina Mühlenhoff, Rita Gerardy-Schahn, and Petr G. Leiman. 2015. "Structure and Biochemical Characterization of Bacteriophage Phi92 Endosialidase." *Virology* 477: 133–43. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.11.002>.

- Schwarzer, D., F. F. R. Buettner, C. Browning, S. Nazarov, W. Rabsch, A. Bethe, A. Oberbeck, et al. 2012. "A Multivalent Adsorption Apparatus Explains the Broad Host Range of Phage Phi92: A Comprehensive Genomic and Structural Analysis." *Journal of Virology* 86 (19): 10384–98. <https://doi.org/10.1128/JVI.00801-12>.
- Singh, Veer Pal. 2018. "Recent Approaches in Food Bio-Preservation - a Review." *Open Veterinary Journal* 8 (1): 104. <https://doi.org/10.4314/ovj.v8i1.16>.
- Tamaki, S., T. Sato, and M. Matsushashi. 1971. "Role of Lipopolysaccharides in Antibiotic Resistance and Bacteriophage Adsorption of Escherichia Coli K-12." *Journal of Bacteriology* 105 (3): 968–75.
- Tanji, Y, T Shimada, M Yoichi, K Miyanaga, K Hori, and H Unno. 2004. "Toward Rational Control of Escherichia Coli O157:H7 by a Phage Cocktail." *Applied Microbiology and Biotechnology* 64 (2): 270–74. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1438-9>.
- Truncaite, Lidija, Eugenijus Simoliunas, Aurelija Zajanckauskaite, Laura Kaliniene, Roma Mankeviciute, Juozas Staniulis, Vytautas Klausas, and Rolandas Meskys. 2012. "Bacteriophage VB_EcoM_FV3: A New Member of 'RV5-like Viruses'." *Archives of Virology* 157 (12): 2431–35. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1449-x>.
- Tsonos, Jessica, Leon H. Oosterik, Huruma N. Tuntufye, Jochen Klumpp, Patrick Butaye, Henri De Greve, Jean Pierre Hernalsteens, Rob Lavigne, and Bruno M. Goddeeris. 2014. "A Cocktail of in Vitro Efficient Phages Is Not a Guarantee for in Vivo Therapeutic Results against Avian Colibacillosis." *Veterinary Microbiology* 171 (3–4): 470–79. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.10.021>.
- WHO. 2016. "Critically Important Antimicrobials for Humane Medicine."
- Y. Tanji, T. Shimada, M. Yoichi, K. Miyanaga, K. Hori, H. Unno. 2004. "Toward Rational Control of Escherichia Coli O157:H7 by a Phage Cocktail." *Appl Microbiol Biotechnol.* 64 (2): 270–74.

Zhang, Can, Wenli Li, Wenhua Liu, Ling Zou, Chen Yan, Kai Lu, and Huiying Ren.

2013. "T4-like Phage Bp7, a Potential Antimicrobial Agent for Controlling Drug-Resistant *Escherichia coli* in Chickens." *Applied and Environmental Microbiology* 79 (18): 5559–65. <https://doi.org/10.1128/AEM.01505-13>.

6. Publikationen/ Öffentlichkeitsarbeit

1. Geflügelfleisch - Phagentherapie im Hähnchenstall. Radio Report Deutschlandfunk-Forschung aktuell 21.03.2016.
2. Kittler S., Klein G. (2016) Bakteriophagen-Anwendung in der Veterinärmedizin- Aktuelle Aspekte zu Sicherheit, Beurteilung und Zulassung VbT-Fortbildung Landesverband beamteter Tierärzte Niedersachsen 25.05.2016 Verden, Deutschland (Vortrag)
3. Kittler S, Wittmann J, Mengden RALP, Klein G, Rohde C, Lehnherr H. (2016) The use of bacteriophages as One-Health approach to reduce multidrug-resistant bacteria. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 2016 July; DOI: 10.1016/j.scp.2016.06.001
4. Kittler S, Schmidt I, Bierbrodt A, Mengden R, Wittmann J, Lehnherr T, Klein G, Lehnherr H (2016) Bacteriophages for the reduction of multidrug-resistant bacteria in the broiler production. *Viruses of Microbes conference* 18-22.07.2016 Liverpool UK, Conference proceedings page 95. (Poster)
5. Schmidt I, Kittler S, Bierbrodt A, Mengden RALP, Wittmann J, Lehnherr T, Fink M, Klein G and Lehnherr H (2016) Reduction of ESBL *E. coli* in poultry farming by preventative use of bacteriophages. "Phages 2016" *Bacteriophages in Medicine, Food and Biotechnology 6th Annual Conference* 7.-8.09.2016 Oxford UK, Conference proceedings page 17-18. (Poster)
6. Mengden R, Kittler S, Klein G (2016) Bakteriophagen im Einsatz gegen ESBL-bildende *Escherichia coli* in der Geflügelmasthaltung. 57. DVG Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene 27.-30.09.2016 Garmisch-Partenkirchen, Deutschland.
7. Schmidt I, Riedel T, Schober I, Bunk B, Spröer C, Bierbrodt A, Lehnherr H, Wittmann J. (2017) Genome Sequence of *Escherichia coli* E28, a Multidrug-Resistant Strain Isolated from a Chicken Carcass, and Its Spontaneously Inducible Prophage. doi: 10.1128/genomeA.00348-17 (Original Artikel)
8. Schmidt I, Bierbrodt A, Wittmann J, Kittler S, Mengden R, Lehnherr T, Fink M, Rohde C, Rohde M, Lehnherr H (2017) Application of phages in poultry farming as One Health approach, 1st German Phage Symposium, University of Hohenheim, Stuttgart, Deutschland

9. Schmidt I, Bierbrodt A, Wittmann J, Kittler S, Mengden R, Lehnherr T, Fink M, Klein G, Rohde C, Rohde M, Lehnherr H (2017) Phage application aiming at the reduction of ESBL-producing *E. coli* in livestock farming, *Microbiology and Infection* 2017 - 5th Joint Conference of the DGHM & VAAM (Vortrag)
10. Wittmann J, Schmidt I, Sabirova J, Bunk B, Spröer C, Rohde M, Rohde C (2017) Isolation, characterisation and genomic analysis of bacteriophages against ESKAPE pathogens, *Microbiology and Infection* 2017 - 5th Joint Conference of the DGHM & VAAM (Poster)
11. Bierbrodt A, Schmidt I, Kittler S, Mengden R, Wittmann J, Lehnherr T, Fink M, Lehnherr H. (2108) Can a phage application reduce ESBL-*E. coli* in a chicken shed? EMBO Workshop Viruses of Microbes Wrocław, Poland (Poster)
12. Schmidt I, Bunk B, Spröer C, Rohde M, Wittmann J (2018) Digging in the dirt for *E. coli* phage diversity – Still something new to discover, EMBO Workshop Viruses of Microbes Wrocław, Poland (Poster)
13. Lehnherr T, und Lehnherr H. (2018) Can a phage application reduce *E. coli* in a chicken shed? 8th International Annual Conference „Phages 2018“ Bacteriophage in Medicine, Food and Biotechnology, Oxford, UK (Vortrag)
14. Lehnherr, H. (2018) Bakteriophagen als Antibiotikaersatz in der Geflügelhaltung. DBU Forum „Sanfte Medizin für gesunde Tiere“ Osnabrück, Deutschland (Vortrag)

7. Anhang

7.1 Liste von Markern der Genotypisierung (PanType):

dnaE, gad, gapA, ihfA, ipaH9.8, rrs, O4, O6, O7, O8, O9, O15, O26, O52, O53, O55, O79, O86, O91, O101, O103, O104, O111, O113, O114, O121, O128, O157, O172, fliC H01, fliC H02, flkA H03, fliC H04, fliC H05, fliC H06, fliC H07, fliC H08, fliC H09, fliC H10, fliC H11, fliC H12, fliC H14, fliC H15, fliC H16, fliC H18 fliC H19, fliC H20, fliC H21, fliC H23, fliC H24, fliC H25, fliC H26, fliC H27, fliC H28, fliC H29, fliC H30, fliC H31, fliC H32, fliC H33, fliC H34, fliC H37, fliC H38, fliC H39, fliC H40, fliC H41, fliC H42, fliC H43, fliC H45, fliC H46, fliC H48, fliC H49, fliC H51, fliC H52, flkA H53, flmA H54, fliC H56, fliC Marker, fljA Repressor, fliC non-motile, aac_aph, aac3, aac3Ia, aac3IVa, aac6, aac6Ib, aadA1, aadA2, aadA4, aadB, ant2, aphA, armA, ble, grm, npmA, rmtA, rmtB, rmtC, rmtD, sph, strA, strB, blaACC, blaACT, blaCMY, blaKHM, blaMOX-CMY9, blaCTX-M1, blaCTX-M15, blaCTX-M2, blaCTX-M8, blaCTX-M26, ctxM9, blaDHA-1, blaFOX, blaGES-1, blaGIM-1, blaIMI-3, blaIMP, blaKPC-4, blaLAP-1, blaLEN-1, blaMOX, blaOXA-1, blaOXA-2, blaOXA-7, blaOXA-9, blaOXA-23, blaOXA-40, blaOXA-48, blaOXA-51, blaOXA-54, blaOXA-55, blaOXA-58, blaOXA-60, blaPER-1, blaPER-2, blaPSE-1, blaSHF-1, blaSHV, blaSME-1, blaSPM-1, blaTEM, blaVEB-1, blaVIM (old) , catA1, catB3, catB8, catIII, cmlA1, floR, vatE, ermB, ereA, ereB, mphA, mrx, qepA, qnrA1, qnrB, qnrD, qnrS, arr, tet37, tetA, tetB, tetC, tetD, tetE, tetG, tetX, sul1, sul2, sul3, dfrA1, dfrA5, dfrA7, dfrA12, dfrA13, dfrA14, dfrA15, dfrA17, dfrA19, eae - consensus, efa1, fasA, fedA, fedF, fim41a, iha, nfaE, espB_O157, espB_O26, saa, bfpA, cfaC, cofA, f17-A, f17-G, fanA, K88ab, lngA, lpfA, perA, prfB, sfaS, cif, espA_C_rodentium, espA, espC, espF, espF_C_rodentium, espF_O103H2, espl, espJ, etpD, nleA, nleB, nleB O157:H7, nleB Salmonella, nleC, tccP, espP, pic, rpeA, sepA, sigA, tsh, vat, eaaA, eatA, epeA, astA, cba, ccl, cdtB, celB, cma, cnf1, hlyA, hlyE, ipaD, ltcA, mchB, mchC, mchF, mcmA, pet, sat, senB, sta1, sta2, stb, subA, toxB, virF, stx1 - consensus, stx2 - consensus, stx2b, stx2e, stx2f, stx2g, stx2a,c,d, hemL, intI1, intI2, ireA, iroN, iss, katP, tir

8. Abbildungsverzeichnis:

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Belegung einer GEN III MicroPlate™ | 15 |
| Abbildung 2: Zeitlicher Ablauf der Tierversuche. Die Applikation der Phagen erfolgte kontinuierlich, die Eingabe des Indikatorstammes E28 ist durch die grauen Pfeile in den einzelnen Gruppen gekennzeichnet. | 30 |
| Abbildung 3: Wachstumskurven von ESBL- <i>E. coli</i> -Wildstämmen auf verschiedenen Substraten über einen Zeitraum von 48 h. | 40 |
| Abbildung 4: Verteilung isolierter Phagen auf die Art der Umweltproben. | 45 |
| Abbildung 5: Verteilung der isolierten Phagen auf die Familien der Ordnung Caudovirales. | 46 |
| Abbildung 6: Genomvergleiche neu isolierter Phagen mit bereits bekannten Phagengenomen. Kodierende DNA-Sequenzen (engl. Coding DNA sequences (CDS)) mit Orthologen sind in grün und blau, CDS ohne Orthologe in rot und tRNAs als gelbe Bereiche dargestellt. Die Abbildungen wurden mit Circos dargestellt. | 53 |
| Abbildung 7: Wirtsspektrum von 76 Coliphagen auf 42 klinischen Stämmen (101101-101142), Wildstämmen (E07-E53, E160, E185), APEC-Stämmen (2133-10400) und Laborstämmen (498, E001, E045, E141, E142). | 54 |
| Abbildung 8: Inhibitionstest auf dem ESBL Stamm E28. | 59 |
| Abbildung 9: Einfluss unterschiedlicher Anwendungstiter und des Phagen KRA2 auf die Cocktailwirksamkeit. Der 4er-Cocktail beinhaltete die Phagen TriM, AB27, EW2 und TB49, der 5er-Cocktail zusätzlich den Phagen KRA2. Die Negativkontrolle (-E28/+Cocktail) war bei allen Versuchen negativ. | 61 |
| Abbildung 10: Vergleich der metabolischen Aktivität von E28 in Anwesenheit A) verschiedener Einzelphagen, B) verschiedener Cocktails. Die Kultur von exponentiell wachsendem <i>E. coli</i> E28 wurde dazu jeweils mit einer MOI von 0,1 infiziert und im Omnilog-System bei 37°C inkubiert. Für die Cocktails wurden die Phagenlysate zu gleichen Teilen gemischt. (2er Cocktail: AB27, TB49; 3er Cocktail: AB27, TB49, EW2, 4er Cocktail: AB27, TB49, EW2, TriM, 5er Cocktail: AB27, TB49, EW2, TriM, Kra2, 6er Cocktail: AB27, TB49, EW2, TriM, Kra2, G28)..... | 63 |
| Abbildung 11: Vergleich des Lysevermögens A) verschiedener Einzelphagen bzw. B) verschiedener Cocktails gegenüber E28. Nach zweistündigem Wachstum wurde eine <i>E. coli</i> E28 Kultur jeweils mit $2 \cdot 10^6$ PFU infiziert (siehe blauer Pfeil) und im Platteninkubator (Tecan) bei 37°C inkubiert. Für die Zusammensetzung der Cocktails siehe Abbildung 10 | 64 |
| Abbildung 12: pH-Stabilität der Cocktailphagen nach 1, 4, und 24 Stunden. | 65 |
| Abbildung 13: Wachstum Phagen-resistenter Mutanten im Vergleich zum Wildtyp <i>E. coli</i> E28. | 68 |
| Abbildung 14: Vergleich der Bakterienkonzentration (Mittelwert \pm Standardabweichung) mit und ohne Phagenbehandlung auf mit zwei ESBL- <i>E. coli</i> -Stämmen gespickten Hähnchenschenkeln. Alle Versuche wurden dreimal wiederholt. Es wurden pro Bakterienstamm zwei Experimente mit unterschiedlichen Inkubationsbedingungen durchgeführt. Die mittlere Bakterienkonzentration auf den mit E30 gespickten Proben ist durch gepunktete Säulen dargestellt, die auf mit E31 gespickten durch gestreifte. Die Schenkel wurden nach der Behandlung im Kühlschrank (3 ± 1 °C) gelagert. Die enger gemusterten Säulen stellen die Ergebnisse der Versuche dar, in denen sich dieser Inkubation eine zweistündige Inkubation im Brutschrank anschloss. Die statistische Analyse ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Bakterienkonzentrationen auf behandelten und unbehandelten Proben. Die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken dargestellt. | 72 |
| Abbildung 15: Konzentration von <i>E. coli</i> in Umweltproben aus dem ersten Versuch (Mittelwert \pm Standardabweichung, n=2). Die mittlere Konzentration in Proben der der Kontrollgruppe ist als schraffierte Säule dargestellt, die der Versuchsgruppe in schwarz. Da Staub nicht immer in ausreichender Menge zur Untersuchung verfügbar war, wurden in der Versuchsgruppe und in der Kontrollgruppe nur an Tag 28 und 35 Proben untersucht. | 74 |

Abbildung 16: Konzentration von *E. coli* im ersten Versuch (Mittelwert \pm Standardabweichung). Es wurden frische Kotproben der 16 Tiere quantitativ auf TBX- Platten untersucht. Die mittlere Konzentration in Proben der der Kontrollgruppe ist als schraffierte Säule dargestellt, die der Versuchsgruppe in schwarz..... 75

Abbildung 17: Konzentration von *E. coli* im zweiten Versuch (Mittelwert \pm Standardabweichung). Es wurden frische Kotproben der 16 Tiere quantitativ auf TBX- Platten untersucht. Die mittlere Konzentration in Proben der der Kontrollgruppe ist als schraffierte Säule dargestellt, die der Versuchsgruppe in schwarz..... 76

Abbildung 18: Konzentration von E28 im zweiten Versuch (Mittelwert \pm Standardabweichung). Es wurden frische Kotproben der 16 Tiere quantitativ auf TBX- Platten mit Zusatz von Kanamycin und Kalium-Tellurit untersucht. Die mittlere Konzentration in Proben der der Kontrollgruppe ist als schraffierte Säule dargestellt, die der Versuchsgruppe in schwarz. 77

Abbildung 19: Gewicht der Tiere in Versuchs- und Kontrollgruppen am Ende des ersten Versuches. Die Gewichte der Tiere wurden nach dem Entbluten vor der Sektion gemessen. Das Mittlere Gewicht der Tiere aus der Kontrollgruppe des ersten Versuches ist in schwarz-schraffiert dargestellt, das der Versuchsgruppe in schwarz. Das Mittlere Gewicht der Tiere aus der Kontrollgruppe des zweiten Versuches ist in hellgrau-schraffiert dargestellt, das der Versuchsgruppe in grau. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Gewichten der jeweiligen Gruppen festgestellt werden..... 80

Abbildung 20: Konzentration von E28 im ersten Versuch (Mittelwert \pm Standardabweichung). Es wurden frische Kotproben der 16 Tiere quantitativ auf TBX- Platten mit Zusatz von Kanamycin und Kalium-Tellurit untersucht. Die mittlere Konzentration in Proben der der Kontrollgruppe ist als schraffierte Säule dargestellt, die der Versuchsgruppe in schwarz. 81

Abbildung 21: Konzentration von E28 in Umweltproben aus dem ersten Versuch (Mittelwert \pm Standardabweichung, n=2). Die mittlere Konzentration in Proben der der Kontrollgruppe ist als schraffierte Säule dargestellt, die der Versuchsgruppe in schwarz. Da Staub nicht immer in ausreichender Menge zur Untersuchung verfügbar war, wurden in der Versuchsgruppe lediglich an Tag 9, 21, 28 und 35 und in der Kontrollgruppe nur an Tag 28 und 35 Proben untersucht..... 83

Abbildung 22: Anteil von Reisolaten mit E28-Phänotyp an den Gesamt-E. coli in der Kontrollgruppe (A) und der Versuchsgruppe (B). Hundert Isolate pro Untersuchungstag wurden von den TBX-Platten isoliert und auf ihren ESBL-Phänotyp sowie ihr Wachstum auf mit Kanamycin und Kalium-Tellurit supplementiertem TBX-Agar untersucht. Die Anteile der präsumptiven E28 Isolate sind in schwarz dargestellt, relativ zum Anteil der Isolate ohne E28-Phänotyp in grau. 84

Abbildung 23: *E. coli* Keimzahlen [CFU/g] im Verlaufe des Feldversuches vom Herbst 2017. Blauer Pfeil: Zugabe von Baytril..... 86

Abbildung 24: *E. coli* Keimzahlen [CFU/g] im Verlaufe des Feldversuches vom Frühling 2018..... 87

Abbildung 25: Anzahl toter Hähnchen im Verlauf des Feldversuches vom Herbst 2017. Blauer Pfeil: Zugabe von Baytril..... 87

Abbildung 26: Anzahl toter Hähnchen im Verlauf des Feldversuches vom Frühling 2018..... 88

Abbildung 27: Tägliche Entwicklung der Lebendmasse pro Tier im Herbst 2017. 88

Abbildung 28: Tägliche Entwicklung der Lebendmasse pro Tier im Frühling 2018. 89

9. Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Stammliste Phagenisolation und –charakterisierung (NM=nicht motil [BVL, 2015]). 9

Tabelle 2: Klinische ESBL-*E.coli*-Stämme: Die Untersuchung auf Antibiotikaempfindlichkeit (AST: antimicrobial susceptibility testing) wurde mittels VITEK 2 (Biomérieux) unter Verwendung von AST-

| | |
|---|----|
| N263 bzw. AST-N214 Karten (Biomerieux) durchgeführt und die Ergebnisse anhand der MHK-Interpretationsrichtlinie GLOBAL 2014 D in die Kategorien sensibel (S), intermediär (I) und resistent (R) eingeordnet (- = unbekannt). | 11 |
| Tabelle 3: Wirtsstämme bei der Produktion der Cocktailphagen..... | 13 |
| Tabelle 4: Übersicht der an den einzelnen Isolaten durchgeführten Untersuchungen. | 27 |
| Tabelle 5: Ergebnisse der Genotypisierung ausgewählter ESBL- <i>E. coli</i> Stämme. | 34 |
| Tabelle 6: Ergebnisse der Genotypisierung ausgewählter ESBL- <i>E. coli</i> Stämme (Fortsetzung)..... | 35 |
| Tabelle 7: Totale und prozentuale Verteilung untersuchter Marker in Wild- und klinischen Isolaten. | 36 |
| Tabelle 8: Antibiotika-Resistenz von ESBL- <i>E. coli</i> Wildstämmen. | 37 |
| Tabelle 9: Isolierte Phagen..... | 42 |
| Tabelle 10: Morphologische Merkmale der Phagen und deren Zuordnung zu den Familien der Ordnung <i>Caudovirales</i> . Die abgebildeten TEM-Aufnahmen wurden durch Prof. Manfred Rohde (Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Zentrale Einrichtung für Mikroskopie, Braunschweig) erstellt. | 46 |
| Tabelle 11: Sequenzierungs- und BLAST-Ergebnisse der Phagen (Sequenzierung durch Microsynth). | 49 |
| Tabelle 12: Sequenzierungsergebnisse weiterer Phagen (Sequenzierung durch die DSMZ). | 50 |
| Tabelle 13: Fähigkeit von Coliphagen Wirtsstämme zu lysieren. | 54 |
| Tabelle 14: Abdeckung von Wirtsstämmen durch Phagen..... | 55 |
| Tabelle 15: Phagentiter auf den Labor- und ESBL <i>E. coli</i> Stämmen. | 57 |
| Tabelle 16: Wirtsspektren der Phagen basierend auf Titration..... | 58 |
| Tabelle 17: Sensibilität von resistenten Mutanten gegenüber anderen Phagen des Cocktails. Serielle Verdünnungen der Einzelphagen wurden auf Doppelagar-Platten der resistenten Stämme aufgetropft und nach der Inkubation auf Plaquebildung untersucht (+=sensibel, -=resistent, (-)= eingeschränkte Sensibilität)..... | 67 |
| Tabelle 18: Efficiency of Plating von fünf Bakteriophagen auf elf ESBL- <i>E. coli</i> -Stämmen. Die Versuche wurden zweimal wiederholt (Isolat E31 nur einmal). Ein EOP-Wert von 1 bedeutet, dass die Plaquebildung des Isolates der des Wirtsbakteriums entspricht. Die mit einer Raute gekennzeichneten Kombinationen zeigten keine Plaquebildung..... | 69 |
| Tabelle 19: Wachstumsinhibierende Wirkung von fünf Bakteriophagen auf zehn ESBL- <i>E. coli</i> -Stämme in flüssigem Nährmedium im Vergleich zu vollem Wachstum des Bakteriums ohne Bakteriophagen. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. Gemessen wurde die optische Dichte, diese wurde ins Verhältnis zum OD bei vollem Wachstum des Bakteriums ohne Bakteriophagen gesetzt und zur besseren Vergleichbarkeit mit Tabelle 18 . Der Wert Eins bedeutet damit eine Vollständige Hemmung des Wachstums, der Wert Null dagegen ein Wachstum wie in Abwesenheit von Bakteriophagen. Bedingt durch den Rechenweg können Werte >1 zustande kommen..... | 70 |
| Tabelle 20: Reduktion von ESBL- <i>E. coli</i> -Stämmen auf Hähnchenhaut (Efficiency <i>in situ</i> - EIS) in Relation zur Kontrolle ohne Behandlung. Jede Phagen-Bakterien-Kombination wurde zweimal getestet. Die Werte wurden zur besseren Vergleichbarkeit mit Tabelle 18 und Tabelle 19 invertiert. Der Wert Eins bedeutet, dass eine vollständige Reduktion stattgefunden hat, der Wert Null, dass keine Reduktion stattgefunden hat. Ein Wert von 0,900 stellt damit eine Reduktion um eine Log ₁₀ -Stufe dar und ein Wert von 0,990 eine Reduktion um zwei Log ₁₀ -Stufen. Negative Werte kommen zustande, wenn mehr Bakterien auf der mit Bakteriophagen behandelten Haut wiedergefunden wurden als auf der Kontrolle. | 71 |
| Tabelle 21: Mittlere gemessene und maximal mögliche Phagenkonzentration und erwartete Konzentration ohne Vermehrung im Darm..... | 78 |
| Tabelle 22: E28 Reisolat mit reduzierter Empfänglichkeit gegenüber den Einzelphagen und dem Cocktail (%). | 79 |
| Tabelle 23: Untersuchung der Sensitivität der Stallflora zu Beginn der Versuche. Isolate aus dem Teststall sind orange markiert, solche aus dem Kontrollstall in cyan. | 85 |