

FREIE UNIVERSITÄT BERLIN

Antibiotikaresistenz und Biofilmbildung bei Erregern der bovinen Mastitis

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Julia Assmann

Berlin, 2019

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen Oktober 2015 und Dezember 2019 unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Wieler am Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Freien Universität Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Lothar H. Wieler

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am 11.06.2020

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Prof. Dr. Lothar H. Wieler für die Bereitstellung des Themas, die Unterstützung und Betreuung während meiner Promotion danken.

Ich danke Prof. Dr. Rupert Mutzel für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich danke allen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen für das entspannte Arbeitsklima und die schöne Zeit.

Im Besonderen möchte ich mich bei Dr. Astrid Bethe für die Betreuung, die Geduld und die Zeit bedanken. Auch wenn die tabellarische Arbeitsbeschreibung nicht ausgereicht hat, war es am Ende hoffentlich die Mühe wert.

Ich danke Dr. Christoph Schaudinn für seine unermüdliche Unterstützung bei der Etablierung des Silicone-Disc-Assays und der Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie.

Ein spezieller Dank gilt auch Kira van Vorst. Hanni, ich bin froh, dass es dich nach Berlin verschlagen hat und du mir immer mit Rat und Tat zur Seite standest. Ohne deine Unterstützung wäre diese Arbeit nur halb so schön gewesen.

Ich danke Fereshteh Ghazisaedi für all die lieben Worte und die Aufmunterung, wenn sie mal nötig war. Denn wie wir wissen, haben wir alle unsere Päckchen zu tragen.

Julia Böttger danke ich, weil sie es zum Glück in all den Jahren mit mir ausgehalten hat und mir stets zur Seite stand.

Ich danke meinem Partner, Jan Maschitzki, dass er mich durch diese Zeit begleitet hat und immer an mich geglaubt hat.

Der größte Dank gilt meiner Mutter. Danke, dass du mir all das ermöglicht und mich immer unterstützt hast.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis	iv
Tabellenverzeichnis	v
Abkürzungsverzeichnis	vi
1. Einleitung	1
2. Schrifttum	2
2.1. Biofilme	2
2.1.1. Definition und Geschichte	2
2.1.2. Bedeutung für Industrie und Infektionskrankheiten	4
2.1.3. Experimentelle Verfahren zur Untersuchung von Biofilmen	6
2.1.4. Lebenszyklus von Biofilmen	9
2.1.5. Extrazelluläre Matrix	10
2.1.6. Kommunikation der Bakterien in Biofilmen und komplexe Biofilme	13
2.2. Antimikrobiell wirksame Peptide (AMPs)	14
2.2.1. Bedeutung und Synthese	16
2.2.2. Wirkungsweise	18
2.2.3. Anwendung und Einsatz von AMPs	20
3. Material und Methoden	23
3.1. Geräte	23
3.2. Chemikalien und Enzyme	23
3.3. Puffer	25
3.4. Medien	26
3.5. Bakterienisolate	26
3.6. Software	27
3.7. Weitere Materialien	28

3.8. Mikrobiologische Methoden	29
3.8.1. Kryokonservierung	29
3.8.2. Kultivierung von Bakterien	29
3.8.3. Minimale Hemmkonzentrationen verschiedener Antibiotika	30
3.8.4. Agardiffusionstest	31
3.8.5. Kristallviolett-Assay	32
3.8.6. Etablierung des Silicone-Disc-Assays	33
3.8.7. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	33
3.8.8. Rasterelektronenmikroskopie	34
3.8.9. Minimale Hemmkonzentrationen antimikrobiell wirksamer Peptide (AMP)	35
3.8.10. Antimikrobiellen Eigenschaften AMP-beschichteter Oberflächen	37
3.9. DNA-analytische Methoden	38
3.9.1. Extraktion chromosomaler DNA aus Bakterien	38
3.9.2. Extraktion chromosomaler DNA aus <i>E. coli</i>	39
3.9.3. Extraktion chromosomaler DNA aus <i>S. dysgalactiae</i>	39
3.9.4. Extraktion chromosomaler DNA aus <i>S. aureus</i>	39
3.9.5. Bestimmung der DNA-Konzentration	40
3.9.6. Sequenzierung chromosomaler bakterieller DNA	40
4. Ergebnisse	41
4.1. Erfassung der Isolate und ihrer Resistenzen	41
4.1. Sequenzanalyse ausgewählter Isolate	46
4.2. Biofilm-bildende Eigenschaften	48
4.2.1. Kristallviolett-Assay	50
4.2.2. Etablierung des Silicone-Disc-Assays	56
4.3. Testung ausgewählter Antimikrobiell wirksamer Peptide (AMPs)	69
4.3.1. Minimale Hemmkonzentration (MHK)	69
4.3.2. Antimikrobielle Eigenschaften AMP-beschichteter Oberflächen	71
5. Diskussion	73

5.1. Charakterisierung der Isolate	74
5.2. Biofilm-bildende Eigenschaften der Isolate	80
5.3. Antimikrobielle Peptide	87
Zusammenfassung	92
Summary	94
6. Literaturverzeichnis	96
A. Anhang	viii

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von Biofilmen.....	10
Abb. 2: Übersicht über die Herkunft antimikrobieller Peptide	15
Abb. 3: Strukturen antimikrobieller Peptide	16
Abb. 4: Modelle zur Wirkungsweise von AMPs mit prokaryotischen Zellmembranen	19
Abb. 5: Darstellung einer Mikrotiterplatte zur MHK-Bestimmung.....	31
Abb. 6: Grafische Darstellung der Resistenzverteilung	45
Abb. 7: Grafische Auswertung des Kristallviolett-Assays.....	51
Abb. 8: CLSM-Aufnahme eines <i>S. epidermidis</i> -Biofilms, gefärbt mit Kristallviolett.....	53
Abb. 9: CLSM-Aufnahme der einzelnen Matrixbestandteile eines <i>S. epidermidis</i> -Biofilms ..	54
Abb. 10: Übereinander gelegte CLSM-Aufnahme der Matrix eines <i>S. epidermidis</i> -Biofilms	55
Abb. 11: Auswertung des Silicone-Disc-Assays der Referenzstämme	57
Abb. 12: Auswertung des Silicone-Disc-Assays für <i>E. coli</i> und <i>Klebsiella</i> spp.....	58
Abb. 13: Auswertung des Silicone-Disc-Assays für die <i>Streptococcus</i> spp.	59
Abb. 14: Autoaggregation verschiedener Streptokokkenisolate im Silicone-Disc-Assay	60
Abb. 15: Auswertung des Silicone-Disc-Assays für <i>S. aureus</i> und <i>Enterococcus</i> spp.....	61
Abb. 16: Vergleich der Biofilm-bildenden Eigenschaft unterschiedlicher Mastitis-Erreger ...	62
Abb. 17: REM-Aufnahmen von Silikoncoupons bewachsen mit <i>E. coli</i> IMT38014	64
Abb. 18: REM-Aufnahmen von Silikoncoupons bewachsen mit <i>S. aureus</i> IMT37556	65
Abb. 19: REM-Aufnahmen von Silikoncoupons bewachsen mit <i>E. faecalis</i> IMT37502	66
Abb. 20: Biofilm-bildende Eigenschaft ausgewählter Isolate in zufälliger Kombination	67
Abb. 21: Biofilm-bildende Eigenschaft ausgewählter Isolate aus einer Milchprobe.....	68
Abb. 23: Wirkung AMP-beschichteter Oberflächen und Überstände gegen <i>E. coli</i>	71
Abb. 24: Wirkung AMP-beschichteter Oberflächen und Überstände gegen MRSA	72

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Testsysteme zur Untersuchung von Biofilmen.....	8
Tab. 2: Bestandteile der Biofilmmatrix und ihre Funktionen.....	12
Tab. 3: Eingesetzte Geräte.....	23
Tab. 4: Verwendete Enzyme.....	24
Tab. 5: Verwendete Chemikalien.....	24
Tab. 6: Eingesetzte Medien.....	26
Tab. 7: Verwendete Referenz- und IMT-Stämme.....	27
Tab. 8: Verbrauchsmaterialien.....	28
Tab. 9: Eingesetzte Antibiotikaplättchen.....	29
Tab. 10: Layout der MICRONAUT-S Mastitis 3 Platte.....	31
Tab. 11: Eingesetzte Farbstoffe für CLSM.....	34
Tab. 12: AMPs für MHK-Testung.....	36
Tab. 13: Übersicht über die Stammsammlung.....	42
Tab. 14: Weitere asservierte Spezies.....	42
Tab. 15: Antibiotikasensitivitätsprofile der getesteten Mastitisisolate.....	44
Tab. 16: Übersicht über die Gesamtgenom-sequenzierten Isolate.....	47
Tab. 17: Herkunft der für die Biofilm-Assays ausgewählten Isolate.....	49
Tab. 18: Übersicht der Ergebnisse des Kristallviolett-Assays.....	52
Tab. 19: MHK-Werte ausgewählter AMPs gegen Mastitiserreger.....	69
Tab. 20: MHK-Werte ausgewählter AMPs gegen Isolate der IMT-Stammsammlung.....	70
Tab. 21: RemuNa-Stammsammlung und ermittelte MHK-Werte.....	viii

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AMP	antimikrobielles Peptid
BAP	engl. Biofilm- associated surface proteins
BHI	engl. brain heart infusion
BLE	Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CLSM	engl. confocal laser scanning microscopy
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. deoxyribose nucleic acid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eEF2	eukaryotischer Elongationsfaktor 2
engl.	englisch
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
ESBL	Extended-Spectrum β -Lactamase
EU	Europäische Union
HMDS	Hexamethyldisilazan
HNP1	engl. human neutrophil protein 1
<i>ica</i>	engl. intercellular adhesion
<i>K. oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KbE	Koloniebildende Einheiten
lat.	lateinisch
LB	engl. lysogeny broth
LPS	Lipopolysaccharide
MALDI- TOF MS	engl. Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry

MDR	engl. multidrug resistant
MH	Mueller-Hinton
MHB	Mueller-Hinton-Bouillon
MHK	minimale Hemmkonzentration
mRNA	engl. messenger ribonucleic acid
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin-sensitiver <i>Staphylococcus aureus</i>
OD	Optische Dichte
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAMP	engl. pathogen associated molecular pattern
PBS	engl.. phosphate buffered saline
PIA	engl. polysaccharide intercellular adhesin
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	engl. ribonucleic acid
<i>S. agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. dysgalactiae</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S. uberis</i>	<i>Streptococcus uberis</i>
<i>sp.</i>	lat. <i>species</i>
<i>spp.</i>	lat. <i>species pluralis</i>
ST	Sequenztyp
SUAM	<i>Streptococcus uberis</i> Adhäsionsmolekül
<i>subsp.</i>	lat. <i>subspecies</i>
Tab.	Tabelle
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Die bovine Mastitis ist die bedeutendste Erkrankung der Milchkühe und führt zu enormen finanziellen Belastungen, die besonders durch die verringerte Milchleistung erkrankter Tiere, aber auch aufgrund der Verluste durch mit Hemmstoffen belasteter Milch und Remontierungskosten bedingt sind [1]. Neben diesen wirtschaftlichen Faktoren sind Mastitiden auch für das Tierwohl von großer Bedeutung, da diese Infektionskrankheiten zu starken Schmerzen und einer Einschränkung des Allgemeinbefindens führen können. Auch subklinische Mastitiden sind häufig und können zu einer erhöhten Zellzahl in der Milch führen und so die Qualität der Milch und folglich die Einnahmen reduzieren [2]. In den meisten Fällen sind bakterielle Mikroorganismen Auslöser der bovinen Mastitis, seltener sind toxische oder traumatische Ursachen verantwortlich. Zur Behandlung werden Antibiotika eingesetzt, wobei der Erfolg stark vom ursächlichen Agens und dessen Resistenzprofil in Kombination mit dem eingesetzten Wirkstoff abhängig ist. Besonders die Beteiligung (multi-) resistenter Pathogene am Infektionsgeschehen kann zu einer langwierigen oder erfolglosen Behandlung führen. In deutschlandweiten Studien konnten in bis zu 4,3 % der Milchproben von klinisch an Mastitis erkrankten Rindern β -Laktamasen mit einem erweiterten Substratspektrum (engl. Extended-Spectrum beta-Lactamase, ESBL) produzierende *Escherichia (E.) coli* nachgewiesen werden [3, 4]. Darüber hinaus sind viele der Mastitis-assoziierten Bakterienspezies in der Lage, Biofilme zu bilden. In diesen von einer schleimartigen Matrix umgebenen sessilen mikrobiellen Gemeinschaften [5] tolerieren Bakterien eine vielfache erhöhte Konzentration antimikrobieller Wirkstoffe als planktonische Bakterien [6, 7]. Die Besiedlung verschiedener Oberflächen durch Biofilme spielt nicht nur in der Landwirtschaft und Lebensmittelindustrie eine entscheidende Rolle, sondern auch in der Human- und Veterinärmedizin. Aufgrund ihrer hohen Widerstandsfähigkeit gegen unterschiedlichste äußere Einflüsse stellen Biofilme besondere Herausforderungen an die Dekontamination und Desinfektion. In Biofilmen können Resistenz-vermittelnde Gene zudem mit einer stark erhöhten Rate innerhalb und auch zwischen den beteiligten bakteriellen Spezies ausgetauscht und somit effektiv verbreitet werden [7].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die Resistenzprofile aktueller Mastitisisolate und die Eigenschaft der Isolate, Biofilme zu bilden, analysiert werden. Um einen Überblick über die Resistenzlage aktueller Mastitisisolate zu gewinnen, sollten die phänotypischen Resistenzprofile durch die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) gängiger zur Behandlung von Mastitis zugelassener Antibiotika ermittelt werden. Für die Bestimmung der

Biofilm-bildenden Fähigkeiten der Isolate sollte ein neuer und vor allem quantifizierbarer Assay etabliert werden. Darüber hinaus sollte ein am Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie etabliertes Verfahren zur Kopplung antimikrobieller Peptide an verschiedene Oberflächen auf seine Wirksamkeit hin untersucht werden. Dabei sollte sich die Analyse an der DIN ISO 22196 (Messung von antibakterieller Aktivität auf Kunststoff- und anderen porenfreien Oberflächen) orientieren. Diese Oberflächenmodifikation soll der Ausbildung von Biofilmen durch eine Verminderung der initialen Adhäsion entgegen wirken und die mikrobielle Keimlast der Oberflächen insgesamt reduzieren.

2. Schrifttum

2.1. Biofilme

2.1.1. Definition und Geschichte

Als Biofilm bezeichnet man eine Gemeinschaft von Mikroorganismen, die an einer lebenden oder unbelebten Oberfläche zwischen zwei verschiedenen Phasen haftet und von einer selbst produzierten Matrix umgeben ist [5]. Bereits im 17. Jahrhundert beschrieb Antoni van Leeuwenhoek kleinste lebende Strukturen auf seinen Zähnen [8], bei denen es sich, wie heute bekannt ist, um Bakterien handelte, die in einem Biofilm organisiert waren. Die Tendenz mariner Bakterien sich insbesondere auf festen Oberflächen anzusiedeln, wurde bereits im Jahr 1936 beschrieben [9].

Für Biofilm-Fossilien aus dem südafrikanischen Barberton Greenstone Belt konnte ein Alter von ca. 3,4 Milliarden Jahre nachgewiesen werden [10]. Ähnliche Fossilien in einer Hydrothermalquelle in Australien wurden auf ein Alter von 3,2 Millionen Jahre datiert [11]. Dies unterstreicht die Bedeutung von Biofilmen als natürliche Lebensweise von Bakterien und steht in starkem Kontrast zu den meisten experimentellen Kultivierungsbedingungen, die oft lediglich planktonische Bakterien berücksichtigen. Arbeiten an singulären, planktonischen Zellen lassen zwar Rückschlüsse hinsichtlich Genetik, Metabolismus und der Beteiligung einzelner Pathogene an bestimmte Krankheiten zu, sind jedoch für das Verständnis des Zusammenlebens von Bakterien unzureichend [12].

Da es sich bei Biofilmen nicht nur um die natürliche, sondern auch um eine besonders hinsichtlich der Pathogenität relevante Lebensweise handelt, ist die detaillierte Entschlüsselung von Prozessen bei der Entstehung und dem Erhalt von Biofilmen elementar [13].

Bakterien, die in einem Biofilm leben, zeigen eine hohe Toleranz gegenüber physikalischen Einflüssen wie Strahlung und Austrocknung, gegen chemische Einwirkung wie Oxidation, aber auch gegen die Wirkung von Bioziden und Antibiotika [14]. Seit langem ist bekannt, dass sessile Bakterien in Biofilmen bis zu 1.000-fach höhere Antibiotika-Konzentrationen im Vergleich zu den gleichen Bakterien in ihrem planktonischen Zustand tolerieren können [6, 7]. Die Resistenz gegen verschiedene Biozide kann um ein 50-faches bis 600-faches erhöht sein [15]. Ausgelöst werden diese Resistenzen durch eine Kombination verschiedener Mechanismen. Antibiotika sind teils nicht in der Lage, in einen Biofilm zu diffundieren, da sie von der extrazellulären Matrix aufgehalten werden. Geladene Polysaccharide und die enthaltene extrazelluläre Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribose nucleic acid, DNA) können zudem verschiedene geladene Antibiotika wie Vancomycin binden und inaktivieren [16, 17]. Die negativ-geladene DNA ist dabei ein Chelatbildner für einige positiv geladene Antibiotika [18] und für Metallionen [19, 20]. Sind multi-resistente (engl. multi-drug resistant; MDR) Erreger an der Ausbildung von Biofilmen beteiligt, addieren sich die entsprechenden Resistenzen auf und die Widerstandsfähigkeit des gesamten Biofilms steigt. Der in Biofilmen erhöhte horizontale Gentransfer kann zudem zu einer effektiveren Ausbreitung der genetischen Grundlagen der Resistenzen und somit auch der phänotypischen Resistenz führen – sowohl innerhalb einer als auch zwischen verschiedenen bakteriellen Spezies [21].

Bakterien werden in einem Biofilm unterschiedlich stark mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. In tiefliegenden Schichten sorgt die geringe Bioverfügbarkeit dieser Stoffe für einen stark reduzierten Metabolismus der Bakterien, was eine Unempfindlichkeit dieser ruhenden Population gegenüber solchen antibiotischen Wirkstoffen mit sich bringt, die vor allem auf sich teilende Zellen wirken, beispielhaft genannt sei hier die Gruppe der β -Lactam-Antibiotika [22].

Die Matrix, die zu großen Teilen von den Bakterien selbst produziert ist und sie umhüllt [23], schützt Biofilme nicht nur vor antimikrobiell wirksamen Substanzen, sondern auch vor dem Immunsystem des Wirtes und verhindert durch die Maskierung antigener Strukturen auf der Bakterienoberfläche die Wirkung von Antikörpern [24], Bakteriophagen [25] und phagozytierenden Zellen [26, 27].

Der Biofilm bietet weiterhin Schutz vor dem Abschwemmen der Bakterien, beispielsweise in marinen Lebensräumen oder aber durch den Blutstrom und bildet die Quelle für Neuinfektionen [28, 29].

2.1.2. Bedeutung für Industrie und Infektionskrankheiten

Zu den Bereichen, in denen verstärkt mit einer Biofilmbildung zu rechnen ist, zählen Rohrleitungen, wie das Abwasserleitungs- und –aufbereitungssystem sowie Trinkwassersysteme. Leitungen können durch die Biofilme teils stark verstopfen, was die Fließgeschwindigkeit des Wassers herabsetzt und mit einem höheren Energieaufwand für den Betrieb der Leitungen verbunden ist [30, 31]. Selbst ein erhöhter Chlorgehalt im Wasser verhindert die Biofilmbildung nicht vollständig [32]. In Kühltürmen und Wärmetauschern behindern aufgewachsene Biofilme den Wärmetransfer und mindern die Effektivität der Geräte [33]. Die Ansiedlung von vor allem aus Algen bestehenden Biofilmen auf Schiffsrümpfen führt durch einen erhöhten Wasserwiderstand zu einem steigenden Kraftstoffverbrauch und somit ökonomischen Folgen für die Reedereien [34].

Das Anhaften von Bakterien an Lebensmitteln oder an Oberflächen, die mit Lebensmitteln in Kontakt kommen, kann zu einem vorzeitigen Verderben der Waren führen [35, 36]. In der Milchindustrie bilden unzureichend gereinigte und desinfizierte Gerätschaften eine der Hauptkontaminationsquellen für Milch und Milchprodukte [37]. Der Verzehr solch kontaminierter Produkte birgt ein Gesundheitsrisiko für den Menschen [38].

Biofilme spielen in verschiedensten Infektionsgeschehen eine entscheidende Rolle. Nach Schätzungen des Centers for Disease Control and Prevention (CDC) der USA werden 65 % aller mikrobiellen Infektionen im menschlichen Körper durch Biofilme verursacht [39]. Zu den bedeutendsten Biofilm-assoziierten humanen Infektionen zählt die Mukoviszidose. Dabei bildet sich in der Lunge ein dicker, verklebter Schleim, der die Atemwege blockiert und die Atmung behindert [40]. Achtzig Prozent der Patienten leiden unter einer chronischen *Pseudomonas (P.) aeruginosa* Infektion, die in vielen Fällen nosokomial erworben wurde [41, 42]. Die in der Lunge gebildeten Biofilme sind ein Herd permanenter Reinfektionen für den Patienten [43]. Darüber hinaus verursachen verschiedene Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa*, wie Alginat, weitere Organschäden durch eine gesteigerte Antikörperproduktion und Bildung von Immunkomplexen [44]. Es kommt zu einer Aktivierung des Komplementsystems, einer verstärkten Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und der Ausschüttung lysierender Enzyme [45, 46].

Die menschliche Mundhöhle bildet ein einzigartiges Biotop für über 700 verschiedene Prokaryoten [47]. Das gesunde Mikrobiom des Mundes und die Zusammensetzung eines Zahnstein verursachenden Biofilms, der mit Krankheiten wie Karies, Parodontitis und Gingivitis assozii-

iert ist, unterscheiden sich grundlegend [48]. Das natürliche Mikrobiom des Mundes beinhaltet hauptsächlich Gram-positive Kokken wie verschiedene Streptokokken, Gram-positive Stäbchen wie *Actinomyces* spp. und einige Gram-negative Kokken wie *Neisseria* spp. Mit steigender Dicke des Plaques nimmt die Zahl anaerober Bakterien wie *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis*, zu [49].

In chronischen, schwer heilenden Wunden können häufig Biofilme verschiedener Spezies wie beispielsweise *S. aureus* und *P. aeruginosa*, nachgewiesen werden [50, 51]. Eine besondere Herausforderung stellen Biofilme im Zusammenhang mit dem Einsatz und der Implantation von Medizinprodukten dar. So lassen sich beispielsweise auf und in nahezu allen eingesetzten Blasenkatetern Biofilme nachweisen, die in der Lage sind, Harnwegsinfekte auszulösen oder durch die Verlegung des Lumens den Austausch des Katheters erforderlich machen [52]. Staphylokokken sind die häufigsten Auslöser von Infektionen an künstlichen Gelenken [53], da sie die Implantatoberfläche bei einer Bakteriämie über das Blut oder die Lympheflüssigkeit erreichen oder während bzw. kurz nach der Operation in die Wunde gelangen können [54]. Das durchschnittliche Risiko nach einer Bakteriämie an einer Implantat-assoziierten Infektion zu erkranken ist mit 0,3 % gering [55]. Ist jedoch *S. aureus* für diese Bakteriämie verantwortlich konnte ein weitaus höheres Erkrankungsrisiko von bis 34 % nachgewiesen werden [56]. Wie es zu diesem deutlich erhöhten Risiko kommt, konnte nicht abschließend geklärt werden. Alle genannten Biofilm-assoziierten Infektionen sind auch in der Veterinärmedizin von großer Bedeutung und stehen hier ebenfalls mit nosokomial erworbenen Infektionen in Zusammenhang. So konnten beispielsweise in vaskulären Kathetern beim Pferd Biofilm-bildende Bakterien wie *Acinetobacter baumannii* nachgewiesen werden [57]. Eine weitere veterinärmedizinische Erkrankung, in der Biofilme eine entscheidende Rolle spielen, ist die bovine Mastitis. Es handelt sich dabei um die finanziell kostspieligste Erkrankung in der Milchviehhaltung. Sie kann beispielsweise von *S. aureus* unter anderem durch den Kontakt mit kontaminiertem Material (Zitgummi, Hände des Melkenden) während des Melkprozesses ausgelöst werden [58-60].

2.1.3. Experimentelle Verfahren zur Untersuchung von Biofilmen

In den vergangenen 40 Jahren konnten aufgrund des steigenden Verständnisses für die Relevanz von Biofilmen, aber auch durch technologische Fortschritte, zahlreiche neue Erkenntnisse über diese mikrobiellen Gemeinschaften gewonnen werden. Neue bildgebende Verfahren geben Einblicke in die Struktur und Architektur von Biofilmen [61]. Proteom- und Transkriptomanalysen ermöglichen die Charakterisierung der genotypischen und phänotypischen Unterschiede verschiedener Bakterienpopulationen innerhalb eines Biofilms [62]. Grundlage für diese Untersuchungen bilden jedoch Protokolle, die die Quantifizierung Biofilm-bildender Eigenschaften und die stabile und reproduzierbare Anzucht von Biofilmen ermöglichen [63]. Eine Methodenübersicht ist in Tabelle 1 (Tab. 1) aufgeführt. Die verbreitetste unter diesen Methoden ist die Kultivierung von Biofilmen in Mikrotiterplatten. Diese Methode wurde ursprünglich genutzt, um die Anlagerung von Bakterien an abiotische Oberflächen zu untersuchen [64]. Verlängerte Inkubationszeiten erlauben die Analyse reiferer Biofilme [65]. Zu verschiedenen Zeitpunkten können die planktonischen Bakterien durch sorgfältig standardisierte Waschschriffe entfernt werden und die sessilen Biofilme im weiteren Verlauf unter Nutzung von Färbeprotokollen zur Bestimmung der Biofilmmasse oder das Ablösen des Biofilms und die Bestimmung der Kolonie-bildenden Einheiten (KbE) untersucht werden. Die Analyse von Biofilmen in Mikrotiterplatten erlaubt die Testung zahlreicher Biofilme innerhalb kürzester Zeit. Die hier bestimmte Biofilmmasse kann zu gewissen Teilen allerdings aus sedimentierten und von der Matrix eingeschlossen Bakterien bestehen, die nicht in die eigentliche Ausbildung des Biofilms involviert sind [63]. Eine Möglichkeit dies zu umgehen bietet das Calgary-Biofilm-Device, bei dem die Biofilmbildung nicht am Boden der Mikrotiterplatten, sondern an einem mit Ausstülpungen versehenem Deckel erfolgt. Dieses Verfahren wird unter anderem zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration bestimmter antimikrobieller Wirkstoffe auf Biofilme eingesetzt. Ein aufgewachsener Biofilm kann mittels Ultraschall abgelöst und weiter analysiert werden [7]. Dabei ist zu beachten, dass nur unter bestimmten Voraussetzungen die gesamte bakterielle Population abgelöst wird [66, 67] und die physiologischen Eigenschaften der abgelösten Bakterien nicht zwingend mit denen der sessilen Population übereinstimmen [68]. Weiterhin können Biofilme in verschiedenen Reaktoren angezüchtet werden. Der Drip Flow Biofilmreaktor besteht aus vier parallel angeordneten, mit Ventilen versehenen Kammern durch die Medium geleitet wird und in denen die Biofilmbildung auf speziellen Coupons erfolgt [69]. Er bietet ein einfaches, platzsparendes Handling und erlaubt die Verwendung verschiedener Materialien, die als Coupons eingesetzt werden

können [63, 70]. In verschiedenen rotierenden Biofilmreaktoren können Biofilme unter konstanten Scherkräften auf unterschiedlichen Materialien angezüchtet werden. Allerdings ist die Anzahl der parallel analysierbaren Isolate gering und der offene Aufbau führt leicht zu Kontaminationen [63]. Diverse Systeme, wie Flusszellen, erlauben weiterhin die direkte mikroskopische Untersuchung von Biofilmen [71, 72].

Für die Analyse von Biofilmen kann beispielsweise die Biomasse, der untersuchten Biofilme z.B. durch den Einsatz von Kristallviolett verglichen werden [64, 73]. Kristallviolett färbt neben lebenden und toten Bakterien auch Bestandteile der Biofilmmatrix an und lässt sich einfach und in Hochdurchsatz-Verfahren einsetzen [74]. Limitierende Faktoren dieser Methode sind die Waschschriffe, die notwendig sind, um planktonische Bakterien und den ungebundenen Farbstoff zu entfernen, da sie so standardisiert werden müssen, dass der Assay reproduzierbar ist und möglichst wenige, dem Biofilm zugehörige Bakterien entfernt werden [75]. Die unspezifische Färbung der Matrixbestandteile durch Kristallviolett und die Vielzahl verschiedener Protokolle für diesen Assay beeinträchtigen die Vergleichbarkeit der in unterschiedlichen Laboren gewonnenen Ergebnisse deutlich [76]. Andere kolorimetrische Verfahren, wie der Einsatz von 2,3-bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide, das kurz als XTT bezeichnet wird [77] oder Resazurin [78, 79], ermöglichen den Nachweis metabolisch aktiver Bakterienzellen in einem Biofilm. Diese Assays können bei einer Vielzahl verschiedener Mikroorganismen angewendet werden und ihre einfache Handhabung ermöglicht Hochdurchsatz-Verfahren. Die hohe Nachweisgrenze der Methoden von ca. 10^3 - 10^8 KBE/Biofilm und die fehlende Möglichkeit der Untersuchung komplexer Biofilme aufgrund unterschiedlicher metabolischer Umsätze der einzelnen mikrobiellen Spezies und dem damit einhergehend unterschiedlichen Anteil an der Farbstoffumsetzung sind die Nachteile der kolorimetrischen Assays [80, 81]. Über diese indirekten Nachweismethoden hinaus erlauben mikroskopische Verfahren die direkte Untersuchung bestehender Biofilme, zum Teil in Form von Lebendzell-Mikroskopie [63].

Tab. 1: Testsysteme zur Untersuchung von Biofilmen

Verfahren	Anwendung	Vorteile	Nachteile
Anzucht in Mikrotiterplatten	Nachweis der Biofilmbildung auf abiotischen Oberflächen [64, 65]	Hochdurchsatzverfahren Kostengünstig Einfache Durchführung kein spezielles Equipment notwendig [63]	Schwierige Standardisierung Schlechte Reproduzierbarkeit Nachweis von lediglich sedimentierten Bakterien Endpunktmessungen [63]
Calgary-Biofilm-Device	Nachweis der Biofilmbildung Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von antimikrobiellen Wirkstoffen gegen Biofilme [7]	Hochdurchsatzverfahren Einfache Durchführung [7]	Vollständige Ablösung des gesamten Biofilms muss gewährleistet sein [66, 67] Abgelöste Bakterienpopulation teils mit anderen Eigenschaften als Biofilm [68]
Biofilmreaktoren	Nachweis der Biofilmbildung auf Coupons [69]	Unkomplizierte Handhabung Analyse verschiedener Materialien möglich [63, 70]	Kein Hochdurchsatzverfahren Hohes Kontaminationsrisiko [63]

2.1.4. Lebenszyklus von Biofilmen

Der Lebenszyklus eines Biofilms lässt sich in mehrere Phasen unterteilen, die in Abbildung 1 (Abb. 1) dargestellt sind. In der ersten Phase, der initialen Anlagerung, beginnen Bakterien lose und reversibel an einer Oberfläche anzuhaften. Die angesiedelten Bakterien durchlaufen noch nicht den Differenzierungsprozess, der zu einer Biofilmbildung führt, können sich wieder ablösen und zu ihrer planktonischen Lebensweise zurückkehren [82]. Angelagerte Bakterien können sich zuckend bewegen und Aggregate bilden [65]. Während der irreversiblen Anlagerung in der zweiten Phase beginnen die Bakterien extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) zu produzieren und fest am Untergrund zu haften [83]. Die beginnende Reifung des Biofilms ist als dritte Phase seines Lebenszyklus durch die Ausbildung der ersten Poren und Wasserkanäle gekennzeichnet. In der vierten Phase hat sich ein reifer Biofilm mit einer komplexen Struktur aus Mikrokolonien, Poren und Wasserkanälen gebildet [84]. Bakterien, die in einem Biofilm wachsen, unterscheiden sich hinsichtlich Genexpression und Proteinprofil deutlich von planktonischen Bakterien, in denen hohe Zellwachstumsraten und eine schnelle Reproduktion nachweisbar sind. Die im Biofilm stark exprimierten Proteine und Gene regulieren den Metabolismus, die Phospholipidsynthese, den Membrantransport und die Sekretion [85]. Der Lebenszyklus eines Biofilms schließt mit der fünften Phase, der Freisetzung von planktonischen Zellen, die in der Lage sind, neue Oberflächen zu besiedeln. Dieser Prozess ist aktiv steuerbar, beispielsweise durch eine reduzierte Produktion von EPS [86] oder die Synthese von EPS degradierenden Enzymen [23].

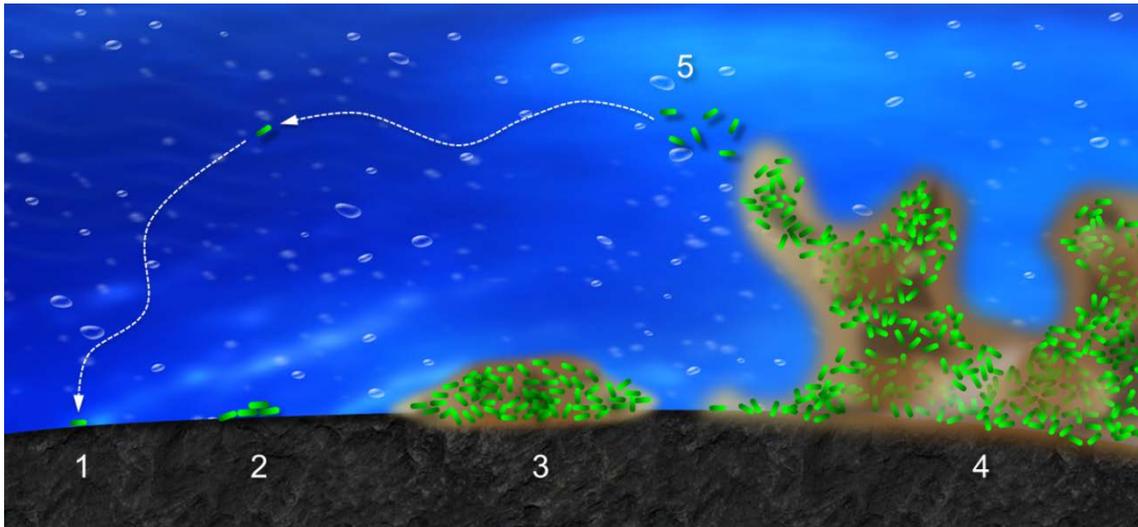


Abb. 1: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von Biofilmen

Die Entwicklung eines Biofilms lässt sich in fünf Phasen unterteilen: Nach dem ersten, reversiblen Kontakt der Bakterien mit einer Oberfläche (1), beginnen die Bakterien fest an der Oberfläche zu haften und extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) zu produzieren (2). Im weiteren Prozess bildet sich die Architektur eines Biofilms aus (3), die in einem reifen Biofilm durch Poren und Wasserkanäle gekennzeichnet ist (4). Der Lebenszyklus schließt mit der Freisetzung planktonischer Bakterien (5). Eigene Darstellung modifiziert nach Stoodley et al. 2002 [83]

2.1.5. Extrazelluläre Matrix

Bakterien, die in einem Biofilm leben, sind von einer selbstproduzierten, schleimartigen Matrix umgeben, die aus Wasser sowie EPS zusammengesetzt ist. Zu den EPS gehören Polysaccharide, Proteine, Lipide und Nukleinsäuren [21, 87]. Die Trockenmasse eines Biofilms besteht lediglich zu 10 % aus Bakterienzellen, das Gros macht mit 90 % die extrazelluläre Matrix des Biofilms aus [23]. Wasser wiederum bildet den Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix. Im Falle von Schwankungen der Wasserversorgung in der Umgebung werden so gleichbleibende Bedingungen für die angesiedelten Bakterien sichergestellt [88].

Neben Wasser bilden die Exopolysaccharide den größten Anteil an der extrazellulären Matrix [89, 90]. Die langen linearen oder verzweigten Polysaccharide lagern sich an die Zelloberflächen der Bakterien an und bilden Netzwerke zwischen diesen aus [91]. Bestimmte Exopolysaccharide sind auch wichtige Pathogenitätsfaktoren wie beispielsweise das Polysaccharid Interzelluläres Adhäsion (PIA) von *Staphylococcus (S.) aureus* oder *S. epidermidis*, das es den Bakterien ermöglicht, sich beispielsweise auf medizinischen Implantaten anzusiedeln [92]. Zu den in EPS vorkommenden Proteinen zählen Enzyme, deren Hauptfunktion im Abbau von Polymeren der Biofilmmatrix besteht und die auf diese Weise Kohlenstoffquellen für die Biofilmpopulation bereitstellen. Somit kann die Matrix als Energiespeicher des Biofilms

betrachtet werden [23, 93]. Die Synthese und Aktivierung dieser Enzyme erfolgt unter anderem in Abhängigkeit wechselnder Umweltbedingungen wie einem sich ändernden Nährstoffangebot [94, 95]. Andere Proteine sind für die strukturelle Stabilität und Integrität der Matrix verantwortlich und stützen das Exopolysaccharid-Netzwerk [96, 97]. Eine weitere Gruppe bilden Biofilm-assoziierte Oberflächenproteine (engl. Biofilm-associated surface proteins, BAP) in *S. aureus*. Durch die Förderung der Biofilmbildung sind diese Proteine in den Infektionsprozess involviert [98]. Bestimmte Eiweißbestandteile lagern sich zu Amyloiden zusammen und vermitteln die Bindung an die zu besiedelnde Oberfläche [99]. Lipide erfüllen in der Biofilmmatrix strukturelle Aufgaben, wie die Anlagerung an bestimmte Oberflächen [100] und ermöglichen durch das Lösen hydrophober Stoffe deren Aufnahme durch die Bakterien [101].

Die in der Matrix enthaltene extrazelluläre DNA ist nicht allein ein Überrest lysierter Bakterien, sondern wird zudem aktiv zur Stärkung der strukturellen Integrität des Biofilms sezerniert [21, 102]. Nach der Zugabe von DNase und dem damit verbundenen Abbau der extrazellulären DNA kann die Auflösung von Biofilmen mikroskopisch beobachtet werden [103]. Die extrazelluläre DNA ist damit ausschlaggebend für strukturelle Verbindungen zwischen den Bakterien [104] und die koordinierte Ausbreitung des Biofilms [105], indem sich Bakterien an konzentrierten DNA-Molekülen ausrichten [106].

In Tab. 2 ist ein Überblick über die extrazellulären Bestandteile von Biofilmen und deren Funktion gegeben.

Tab. 2: Bestandteile der Biofilmmatrix und ihre Funktionen

Matrixbestandteil	Funktion
Wasser	Aufrechterhaltung beständiger Bedingungen im Biofilm bei Schwankungen der äußeren Einflüsse [88]
Polysaccharide	Strukturelle Vernetzung der Matrix [91], Pathogenitätsfaktoren [92]
Proteine, Enzyme	Bereitstellung von Kohlenhydratquellen [23, 93], Stützen der Struktur als Gerüstproteine [96, 97], Verstärkung der Bindung an die Oberfläche [99]
Lipide	Vermittlung des Anhaftens an bestimmte Oberflächen [100], Lösen hydrophober Stoffe [101]
Extrazelluläre DNA	Strukturelle Vernetzung [104], Koordination des Biofilms [105]

Die Matrix bildet das Grundgerüst für die strukturelle Stabilität und den Zusammenhalt eines Biofilms [107] und vermittelt die Adhäsion an die besiedelte Oberfläche [23]. Darüber hinaus ermöglicht der enge Kontakt und die damit einhergehenden Interaktionen zwischen den Zellen, vermittelt durch die EPS, die Zell-Zell-Kommunikation (siehe Kapitel 2.1.6). Mit der Matrix stellt ein Biofilm permanent Nährstoffe in Form sekretierter EPS und der aus lysierten Bakterien freigesetzten Stoffe für die im Inneren lokalisierten Bakterienzellen bereit [23]. Da zu den freigegebenen Substraten auch Nukleinsäuren zählen, erhöht sich der horizontale Gentransfer in einem Biofilm um ein Vielfaches im Vergleich zu planktonisch lebenden Bakterien [21, 108]. Die Zusammensetzung der EPS variiert stark je nach beteiligten Mikroorganismen, auftretenden Scherkräften, der Temperatur und den verfügbaren Nährstoffen in der Umgebung, zwischen verschiedenen, aber auch innerhalb einzelner Biofilme [87, 102]. Durch die unterschiedliche Verteilung von EPS in einem Biofilm bilden sich Bereiche verschiedener biochemischer Umgebungen aus, die enzymatisch modifiziert werden und der bakteriellen Gemeinschaft die schnelle Reaktion auf sich verändernde Umweltbedingungen ermöglichen [109, 110].

2.1.6. Kommunikation der Bakterien in Biofilmen und komplexe Biofilme

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass Bakterien eine strikt einzellige Lebensweise führen. In einem Biofilm gehen die zwischen Bakterien stattfindenden Interaktionen jedoch über den rein physikalischen Kontakt hinaus. Die Kommunikation zwischen den einzelnen Zellen erfolgt durch die Synthese, Sekretion und Detektion kleiner, diffusionsfähiger Moleküle, sogenannter Autoinducer, und wird als Quorum Sensing bezeichnet [111, 112]. Die Konzentration dieser Autoinducer gibt den am Biofilm beteiligten Zellen unter anderem Auskunft über die Populationsdichte. Gene, welche die Biofilmbildung auslösen, können koordiniert exprimiert werden, wodurch die bakterielle Gemeinschaft in der Lage ist, auf sich ändernde äußere Einflüsse zu reagieren [111, 112]. Bei bis-zyklischem Guanosinmonophosphat handelt es sich um ein für die Regulation des Lebenszyklus und der Ausbildung von Biofilm besonders relevantes Molekül [113]. Es gilt in den meisten Fällen als Promotor der Biofilmbildung und aktiviert die Expression von Adhäsien und Matrixbestandteilen [114].

Erst seit kurzem ist bekannt, dass Bakterien in Biofilmen auch durch die Übertragung elektrischer Signale kommunizieren können [115]. Dies ermöglicht Gram-positiven wie –negativen Bakterien über Speziesgrenzen hinweg eine Verständigung durch pulsierende Wellen von Kalium-Ionen, die sich im Biofilm und darüber hinweg auch in dessen Umgebung ausbreiten können [115]. Dieser oszillierende Kaliumgradient führt zu einem „metabolischen Gleichklang“ im Biofilm, welcher der Versorgung der Gemeinschaft mit Nährstoffen insgesamt dient. Darüber hinaus können durch Kaliumgradienten motile Bakterien anderer Spezies, wie z.B. *Pseudomonas (P.) aeruginosa* angelockt werden, die dann in den Biofilm einwandern [115].

Natürlich vorkommende Biofilme bestehen in der Regel nicht nur aus einer Spezies, sondern setzen sich aus Bakterien mehrerer Spezies zusammen. Die für die Bildung eines Biofilm ausschlaggebenden Interaktionen zwischen den Bakterien erfolgen über Speziesgrenzen hinweg und in Abhängigkeit der jeweiligen Umweltbedingungen [116]. Adhäsine vermitteln die Koaggregation in Multispezies-Biofilmen [117] und die Interaktion zwischen Bakterien und Pilzen [118, 119]. Das Adhäsin SspB von *Streptococcus oralis*, einem der primären Besiedler der humanen Mundhöhle, interagiert mit dem Zellwandprotein Als3 von *Candida albicans* und vermittelt auf diese Weise die Kommunikation zwischen Bakterien und Pilzen [120]. Für die Ausbildung eines komplexen Biofilms sind darüber hinaus Flagellen und Pili vorteilhaft. So konnte die Bindung von *P. aeruginosa* Typ IV Pili an extrazelluläre DNA bei der Ausbil-

dung eines Biofilms mit *S. aureus* nachgewiesen werden [117]. Biofilme aus Bakterien mehrerer Gattungen, vor allem *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Pseudomonas* spp. oder verschiedener Enterobakterien, konnten mikroskopisch in Biopsieproben chronischer Wundinfektionen und aus blockierten Harnkathetern in unterschiedlichen Kombinationen nachgewiesen werden [50, 121-126].

2.2. Antimikrobiell wirksame Peptide (AMPs)

Antimikrobielle Peptide (AMPs) wurden erstmalig 1939 beschrieben. René Dubos gelang es, einen Peptidcocktail aus den AMPs, Gramicidin A, B und C, mit einer Länge von jeweils 15 Aminosäuren und je nur einer Aminosäure Unterschied aus dem Bodenbakterium *Bacillus brevis* zu isolieren, das sowohl *in vitro* als auch *in vivo* starke antimikrobielle Eigenschaften gegen Gram-positive Bakterien zeigt [127, 128].

Die antimikrobiellen Eigenschaften konnten in unterschiedlichen Experimenten nachgewiesen werden. So schützte es Mäuse vor einer Infektion mit Pneumokokken, führte zu einer beschleunigten Wundheilung und zeigte einen positiven Effekt auf infizierte Wunden im Mausmodell [127]. Seit ihrer Erstbeschreibung sind in „The Antimicrobial Peptide Database“ derzeit über 3000 antimikrobielle Peptide gelistet (Stand Dezember 2019) [129].

AMPs können in nahezu allen Lebewesen, von Prokaryonten bis zum Menschen, nachgewiesen werden (Abb. 2). Bakterien produzieren AMPs, vornehmlich um den eigenen Zugang zu Nährstoffen sicherzustellen und konkurrierende mikrobielle Spezies abzutöten [130]. In höheren Organismen handelt sich um einen evolutionär alten und elementaren Aspekt des angeborenen Immunsystems [131, 132].

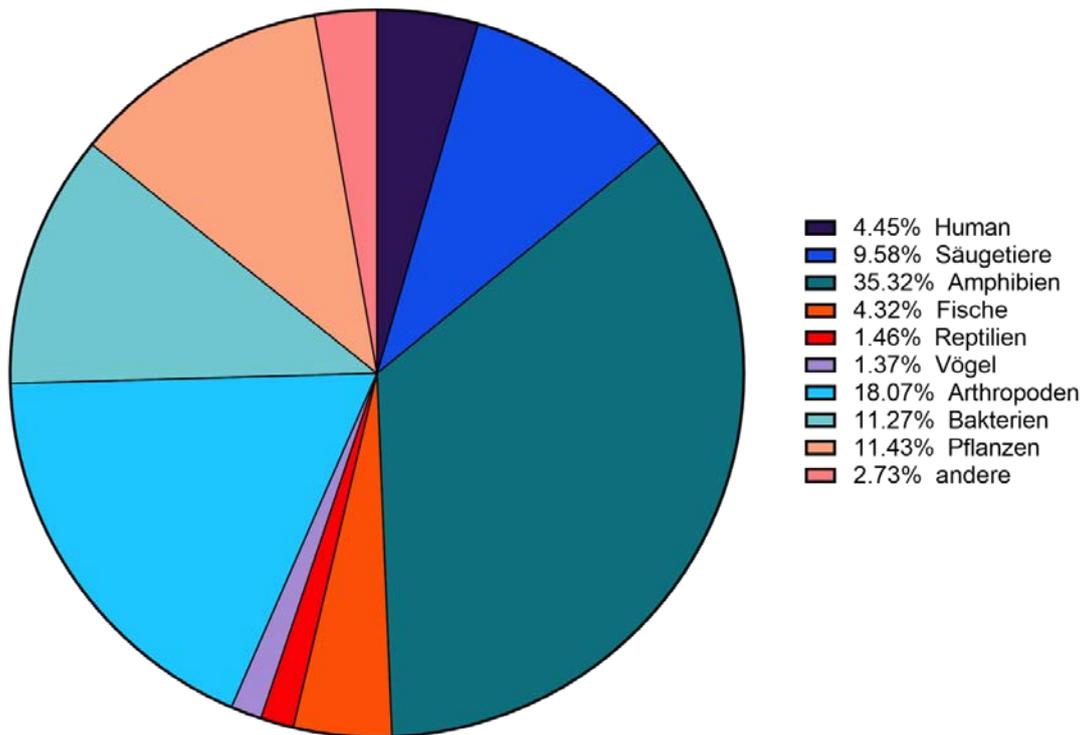


Abb. 2: Übersicht über die Herkunft antimikrobieller Peptide

Stand Dezember 2019 aus der „Antimicrobial Peptide Database“ (Zugriff am 04.12.2019, <http://http://aps.unmc.edu/AP/>) [129]

Bei den meisten AMPs handelt es sich um relativ kurze Peptide, bestehend aus bis zu 100 Aminosäuren, mit einer positiven Nettoladung aufgrund eines hohen Anteils an Arginin, Lysin oder auch Histidin. Dies begünstigt die Interaktion mit den meist negativ geladenen Zellmembranen von Prokaryonten [133, 134]. AMPs sind weiterhin amphipatisch und besitzen somit sowohl hydrophile als auch lipophile Eigenschaften, was zu ihrer flexiblen Struktur beiträgt [135]. Aufgrund ihrer lipophilen Bestandteile, beispielsweise durch die häufig in den Peptiden vorkommenden Aminosäuren Valin, Leucin, Isoleucin und Alanin, können sich AMPs in Zellmembranen einlagern und deren Integrität stören [136].

Die Einteilung von AMPs erfolgt anhand ihrer Sekundärstruktur in α -helikale Peptide, Peptide mit β -Faltblattelementen, die durch Disulfidbrücken stabilisiert werden sowie Peptide mit flexiblen oder linearen Strukturen (Abb. 3) [132, 134, 137].

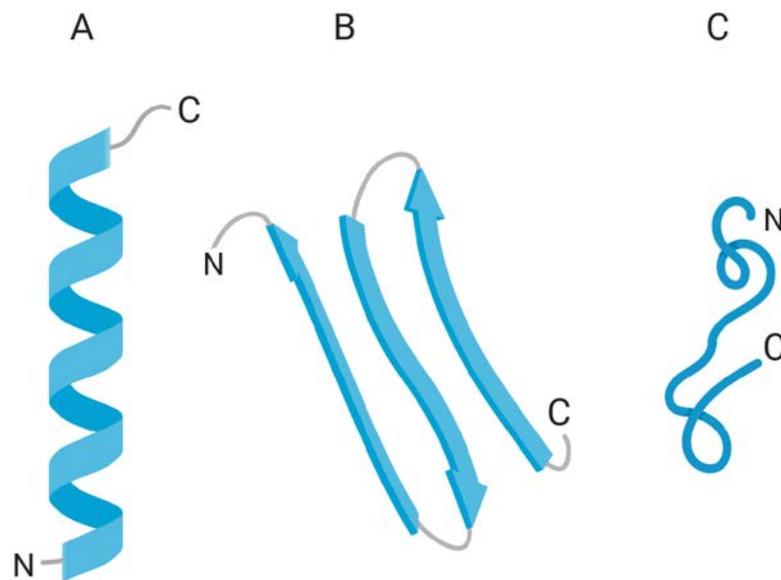


Abb. 3: Strukturen antimikrobieller Peptide

AMPs Einteilung aufgrund ihrer Sekundärstruktur in α -helikale Peptide (a), Peptide mit β -Faltblattelementen (b) und Peptide mit flexiblen Strukturen (c), eigene Darstellung erstellt mit Bio-Render.com

2.2.1. Bedeutung und Synthese

Verschiedene AMPs sind in der Lage, sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien, sowie Pilze und Viren abzutöten [131, 138, 139]. Darüber hinaus wirken einige AMPs gegen Tumorzellen, durch deren erhöhten Anteil an negativ geladenen Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche [133, 140]. Über diese direkte Wirkung hinaus können bestimmte AMPs auch das Immunsystem regulieren und auf diesem Wege antiinfektiv wirken [141, 142]. Da Pflanzen und Wirbellose nicht über ein erworbenes Immunsystem verfügen, sind AMPs für sie entscheidend bei der Abwehr von Infektionen [143, 144]. In Säugetieren lassen sie sich in allen Geweben, die an der initialen Abwehr von Pathogenen beteiligt sind, nachweisen. Sie werden, meist als inaktive Precursor mit mehreren Kopien des jeweiligen AMP [145, 146], vor allem in Leukozyten produziert und in deren Granula eingelagert oder von Haut- bzw. Schleimhautepithelzellen sezerniert [147, 148]. Die Aktivierung der großen Precursormoleküle erfolgt durch proteolytische Spaltung [145]. Die AMP-Synthese kann weiterhin durch die Ausschüttung von Cytokinen oder das Erkennen von mikrobiellen Pathogen-assoziierten Mustern (engl. pathogen associated molecular patterns, PAMPs) induziert werden [131, 137]. Das bovine β -Defensin der Luftröhre wird beispielsweise zur Abwehr einer Infektion von den dortigen Epithelzellen synthetisiert, sobald Bakterien oder Lipopolysaccharide (LPS) einge-

atmet werden. Bindet das LPS an den spezifischen Rezeptor der Wirtszelle, wird eine Signalkaskade über den NF- κ B-Komplex ausgelöst, die in der Expression des Peptids resultiert und durch die Bildung von Poren in der bakteriellen Zellwand zu deren Lyse führt [149, 150]. Ein weiteres Beispiel für die Freisetzung von AMPs ist die Ausschüttung Defensin-haltiger Granula durch die Paneth-Zellen des Dünndarms nach Stimulation durch bakterielle Bestandteile der Nahrung [151, 152].

Die Bedeutung von AMPs für die Haut als Barriere zwischen potenziell pathogenen Erregern, der Umgebung und dem Organismus wird besonders durch eine Studie von Nizet et al. (2001) deutlich [153]. Dabei wurde in Mäusen das Gen *Cnlp* ausgeknockt, welches das murine Cathelicin CRAMP kodiert. CRAMP wird von neutrophilen Granulozyten produziert und nach Verletzungen in großen Mengen sekretiert [154]. Die Knockout-Tiere erlitten nach der Infektion mit Gruppe A Streptokokken schwerste nekrotisierende Infektionen der Haut. Dieselbe Infektionsdosis führt in Wildtyp-Mäusen lediglich zu einer leichten, selbst limitierenden Hautinfektion, wodurch die Bedeutung des Cathelicins in der Infektabwehr eindrucksvoll dargestellt werden konnte [153].

Die Synthese von AMPs erfolgt durch die Translation von mRNA oder durch eine Peptidsynthese ohne die Beteiligung von Ribosomen, wobei letztere vor allem in Bakterien stattfindet. Die ribosomale AMP-Synthese erfolgt in allen Lebensformen, einschließlich Prokaryonten [148]. Aktive antimikrobielle Peptide werden meist durch die proteolytische Spaltung eines größeren Precursors freigesetzt, der über eine Signalsequenz verfügt [132]. Dies gilt beispielsweise für das Histon 2A, das in großen Mengen in den Epithelzellen des Magens von Menschen und anderen Wirbeltieren synthetisiert wird. Nach der Sekretion ins Magenlumen wird das Protein durch Pepsin zu dem hochwirksamen AMP Buforin II gespalten, das an der Magenwand haften bleibt und einen potenten Schutz gegen Bakterien bildet [155]. An einigen AMPs erfolgen zur abschließenden Aktivierung auch posttranslationale Modifikationen wie beispielsweise Glykosylierungen [156].

2.2.2. Wirkungsweise

Die Wirkungsweise der antimikrobiellen Peptide lässt sich auf grundlegende Unterschiede zwischen eukaryotischen und prokaryotischen Zellmembranen zurückführen, ist allerdings nicht final aufgeklärt. Die negative Nettoladung bakterieller Membranen resultiert aus dem hohen Anteil bestimmter Phospholipide wie Phosphatidylglycerol und ermöglicht die Anziehung zwischen der Membran und den meist kationischen AMPs, wohingegen die meist neutralen eukaryotischen Zytoplasmamembranen kaum mit den Peptiden interagieren [133, 142, 157, 158]. Wechselwirkungen zwischen Säugerzellen und den hydrophoben Anteilen der AMPs sind, verglichen mit den elektrostatischen Wechselwirkungen der AMPs mit Bakterienzellen, relativ schwach. Der hohe Anteil an Cholesterol in Zellmembranen von Wirbeltieren dient als weiterer Schutz vor der ungezielten und ungewünschten Einwirkung von AMPs, da es die Membranen zusätzlich stabilisiert [132, 133, 137].

AMPs können entweder direkt auf die Membranen von Bakterienzellen einwirken, sie destabilisieren und zur Lyse führen, oder sie passieren die Membran und wirken auf ein zytoplasmatisches Ziel [141]. Die Interaktion der AMPs mit der zytoplasmatischen Membran erfolgt zwischen den geladenen Aminosäuren der Peptide und den hydrophilen Kopfgruppen der membranassoziierten Phospholipide sowie zwischen den hydrophoben Bereichen der AMPs und den hydrophoben, im Inneren der Membran gelegenen Bereichen der Phospholipide. Auf diese Weise verlagern sich die AMPs immer weiter in die Membran hinein [158]. Der genaue Ablauf der Membranlyse ist nicht bekannt. Verschiedene Modelle versuchen, diesen Prozess zu beschreiben (Abb. 4). In dem Barrel-Stack-Modell lagern sich die AMPs zunächst parallel an der Membran an, bevor sie sich senkrecht in die Lipiddoppelschicht einlagern [159]. Im Weiteren führen Peptidinteraktionen zur Bildung einer Pore, vergleichbar mit der Formation eines trans-Membranproteins (Abb. 4A). Ausschlaggebend ist in diesem Modell die amphipatische Struktur der Peptide, welche die Wechselwirkung mit den Phospholipiden in der Zellmembran ermöglicht [160]. Im Unterschied dazu geht das Toroidal-Pore-Modell zwar auch von einer senkrechten Einlagerung der Peptide in die Membran aus, es wird jedoch keine direkte Peptid-Peptid-Interaktion beschrieben [161]. Die Pore besteht teils aus AMPs und teils aus Phospholipiden (Abb. 4B). In beiden Modellen führt die Porenbildung zur Depolarisierung der Membran, dem osmotischen Einstrom von Wasser und schließlich zum Zelltod. Ein weiteres Modell, das die Wirkung von AMPs beschreibt, ist das Carpet-Modell. Dabei lagern sich die Peptide parallel auf der Membran an und bilden nach dem Erreichen einer bestimmten kritischen Konzentration einen Teppich auf dem Pathogen (Abb. 4C) [133, 140]. Der

entstehende Teppich führt entweder zu einer Porenbildung nach dem Toroidal-Pore-Modell (Abb. 4B) oder es kommt einem Poren-unabhängigen Auflösen der Membran durch die Bildung von Membran-Peptid-Mizellen (Abb. 4D), die zum Verlust der Membranintegrität führen [162].

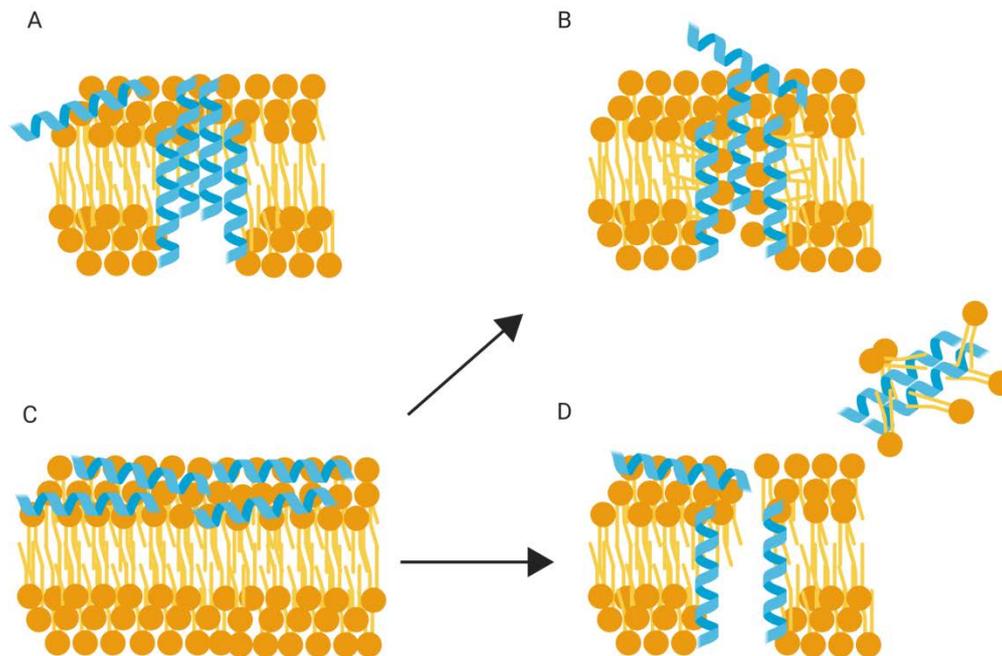


Abb. 4: Modelle zur Wirkungsweise von AMPs mit prokaryotischen Zellmembranen

Die Wirkungsweise von AMPs ist noch nicht vollständig bekannt. Verschiedene Modelle versuchen diesen Vorgang durch die Bildung von Poren, bestehend aus AMPs im Barrel-Stave-Modell (A) oder unter Beteiligung der Phospholipide im Toroidal-Pore-Modell (B), der großflächigen Auflagerung der Peptide als Teppich im Carpet-Modell (C) oder der Bildung von Membran-Peptid-Mizellen im Detergent-like-Modell (D) zu erklären. Erstellt mit Biorender.com, modifiziert nach Kumar et al. 2018 [143]

Einige AMPs führen nicht zu einer Lyse der Zellen, sondern passieren die Zellmembran und wirken zytoplasmatisch, meist auf die DNA der Bakterien [163]. Die Peptide passieren dabei entweder direkt die Membran oder werden über Endozytose aufgenommen [164, 165]. Im Zytosol angelangt können AMPs anionische Strukturen wie DNA und RNA im Zytoplasma bakterieller Pathogene binden und sie auf diese Weise abtöten [134]. Das AMP Indolicidin inhibiert beispielsweise die DNA-Synthese nahezu vollständig und löst so eine Filamentierung der Bakterien aus, die zu deren Absterben führt [166].

Über die direkte Interaktion und Lyse von Pathogenen hinaus zeigen viele AMPs auch eine immunmodulatorische oder toxinneutralisierende Wirkung [167]. Humane α -Defensine sind in der Lage, Toxine der Mono-ADP-Ribosyltransferase-Familie zu inhibieren. Zu dieser

Toxinfamilie zählen unter anderem das Cholera- und das Diphtherie-Toxin [168, 169]. Das α -Defensin HNP1 (human neutrophil protein 1) inhibiert die Ribosylierung des eEF2 (eukaryotischer Elongationsfaktor 2) durch das Diphtherie-Toxin und verhindert *in vitro* die durch dieses Toxin ausgelöste Lyse von HeLa Zellen [170].

Die Regulation des Immunsystems erfolgt dabei auf verschiedenen Wegen. Die Sekretion des humanen LL-37 führt zur Rekrutierung von Neutrophilen, T-Zellen und Mastzellen an den Entzündungsherd und reguliert so die Chemotaxis [171, 172]. Darüber hinaus kann LL-37 in Monozyten und Makrophagen verschiedene genetische Regulationsvorgänge auslösen z.B. die Induktion von Chemokinen, wie IL8 und deren Rezeptoren und die Regulation von in Kommunikation und Beweglichkeit von Zellen involvierten Genen [173]. Weiterhin haben einige AMPs einen antiinflammatorischen Effekt und verhindern so Schäden durch ein Überschießen der Immunantwort [137].

2.2.3. Anwendung und Einsatz von AMPs

Antimikrobielle Peptide sind aufgrund der sich immer stärker ausbreitenden Antibiotikaresistenzen [174] und der Stagnation in der Entdeckung und Entwicklung neuer Antibiotikaklassen und -wirkstoffe [175, 176] bereits lange von besonderem Interesse. Die aktuelle Suche nach neuen, potenten antimikrobiellen Wirkstoffen ließ AMPs weiter in den Fokus rücken. Im Gegensatz zu konventionellen Antibiotika interagieren AMPs mit vielen verschiedenen Angriffspunkten mit einer geringen Affinität und es findet keine klassische Interaktion mit nur einer Zielstruktur statt. Dies verhindert, dass sich Mikroben durch eine einzige Resistenzstrategie vor der Lyse durch AMPs schützen können [177]. Da die meisten AMPs die Integrität der prokaryotischen Zellmembran beeinträchtigen, müssten sich Bakterien durch die Umstrukturierung dieser vor der Peptidwirkung schützen, ohne dabei Funktionalität und Struktur einzubüßen, wobei es sich um einen energetisch kostspieligen Prozess handelt [137]. Durch ein verstärktes Einlagern des positiv geladenen Lipid A können jedoch bestimmte Spezies beispielsweise der Gattungen *Pseudomonas* oder *Burkholderia* der antimikrobiellen Wirkung der Peptide entgehen [178, 179]. Durch den aktiven Transport von AMPs aus dem Zytosol [180] oder die Sekretion von Proteasen [181] kann die Effektivität von zytoplasmatisch wirkenden AMPs gegen bestimmte Bakterien ebenfalls sinken.

Die bisher erläuterten Charakteristika lassen den Einsatz antimikrobieller Peptide insgesamt als hoffnungsvolle neue Strategie zur Abwehr von Infektionskrankheiten erscheinen. Da die AMPs lediglich aus Aminosäuren aufgebaut sind, können Risiken durch mögliche Abbau- oder Stoffwechselprodukte nahezu ausgeschlossen werden [182]. Selbst synthetische AMPs zeigen eine geringere Immunogenität als rekombinant produzierte Antikörper oder Proteine [183]. Auch ihre Wirkung über die antimikrobiellen Eigenschaften hinaus wie die Rekrutierung von Immunzellen machen sie zu einem vielversprechenden Forschungsansatz für potenzielle Medikamente. Trotz allem finden heutzutage nur einige wenige AMPs medizinische Anwendung. Das aus *Bacillus brevis* gewonnene Gramacidin wird zur topischen Behandlung bakterieller Infektionen als Augen- und Ohrentropfen, zur Behandlung von Wundinfektionen und Genitalgeschwüren eingesetzt [127, 184, 185]. Eine modifizierte Variante des Echinocandin, Caspofungin, wird unter dem Namen Candidas® (Merck, USA) zur Behandlung von Infektionen mit *Candida albicans* eingesetzt [186]. Das natürlich vorkommende Peptid ist aufgrund seiner hohen hämolytischen Aktivität für den klinischen Einsatz ungeeignet. Dieses für die Vorbehandlung von Stammzelltransplantaten und zur Behandlung von invasiven Aspergillosen und Hefeinfektionen zugelassene Lipopeptid zeichnet sich durch seine geringe Toxizität und die durch Lipidstrukturen vermittelte lange Halbwertszeit aus. Aufgrund der geringen Bioverfügbarkeit ist eine intravenöse Applikation notwendig [186-188].

Trotz der großen Anzahl von klinischen Studien an AMPs ist die Zahl der Zulassungen gering [167]. Die Gründe hierfür sind vielfältig. Die Wirkung von AMPs wird stark von den vorherrschenden Bedingungen beeinflusst, was zu teils deutlichen Diskrepanzen zwischen der *in vitro* und *in vivo* bestimmten minimalen Hemmkonzentration (MHK) führen kann [189]. Im Mausmodell konnten AMPs vor allem in Konzentrationen nachgewiesen werden, die unterhalb der ermittelten MHK lagen [154]. Eine Theorie, die versucht diesen Widerspruch zu erklären, führt die hauptsächliche Wirkung von AMPs auf ihre immunmodulatorischen Effekte zurück [141]. Viele hochpotente Peptide mit niedrigen *in vitro* MHK-Werten werden im Körper schnell degradiert und zeigen daher eine geringe oder keine antimikrobielle Wirkung. Diese Instabilität der Peptide ist ein weiterer Grund für ihren seltenen Einsatz in der Medizin [190]. Der orale Einsatz von AMPs zur Therapie ist generell ungeeignet, da sie zum einen im Magen-Darm-Trakt durch die Vorgänge der Verdauung zu Aminosäuren abgebaut werden und zum anderen nur in geringem Maße über das Darmepithel aufgenommen werden können. Auch die intravenöse Gabe als Medikament ist aufgrund der eher kurzen Halbwertszeit der Peptide, den Abbau durch Peptidasen und die Ausscheidung über Leber und Niere nur bedingt anwendbar [182]. Dies beschränkt den Einsatz von AMPs auf die lokale Anwendung, bei-

spielsweise in Cremes, Salben oder Nasenspray, was den Abbau durch proteolytische Enzyme verringert. Zur Stabilisierung der Peptide werden häufig künstliche Modifikationen, wie Ringschlüsse oder in der Natur nicht vorkommende Aminosäuren, eingesetzt [191]. Die Peptidsynthese ist, in starker Abhängigkeit von der Länge des Peptides, mit hohen Kosten verbunden, um die Herstellung eines Produktes von medizinischem Standard zu ermöglichen [192]. Darüber hinaus weisen viele AMPs in hohen Konzentrationen eine zytotoxische Wirkung gegenüber eukaryontischen Zellen auf [193, 194].

Eine mögliche Strategie, die Wirkung von AMPs zu nutzen, ist die Kopplung der Peptide an Oberflächen, mit der das Anhaften von Bakterien als erster Schritt der Biofilmbildung verhindert werden kann [195]. Die Kopplung der AMPs kann dabei sowohl nicht-kovalent, bei der der Wirkstoff kontinuierlich an die Umgebung abgeben wird [196], als auch kovalent, bei der das Peptid fest an die Oberfläche gebunden ist [197], erfolgen. Die Generierung antimikrobiell aktiver Oberflächen ist besonders für die Implantationsmedizin interessant, um die Kolonisierung der Implantate mit Bakterien zu verhindern und einer Infektion vorzubeugen [198, 199]. Darüber hinaus können AMPs aufgrund ihrer immunmodulatorischen Eigenschaften Entzündungsreaktionen herunterregulieren, die zu einer Abstoßung des Implantats führen können [200]. Verschiedenste Materialien, wie Edelstahl [201], Titan [202] oder eingesetzte medizinische Geräte, wie Katheter [203], unter anderem aus Silikon [204], können mit gebundenen AMPs modifiziert werden.

3. Material und Methoden

3.1. Geräte

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Geräte sind in Tab. 3 aufgeführt.

Tab. 3: Eingesetzte Geräte

Gerät	Hersteller
CO ₂ -Inkubator Heraeus Function Line	Thermo Fisher Scientific Inc., Berlin, Deutschland
Eppendorf Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Leo Gemini 1530 REM	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
McFarland Densitometer	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland
Qubit 2.0 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Berlin, Deutschland
Schüttelinkubator	Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, Deutschland
SEM Coating Unit E5100	Quorum Technologies Ltd, Laughton, Großbritannien
Sterilbank Thermo HeraSafe	Kendro, Langenselbold, Deutschland
Tecan Reader Sunrise	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Ultraschallbad SONOREX DIGITEC DT 510	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Vortex Genie 2	SI Scientific Instruments GmbH, Berlin, Deutschland
ZEISS LSM 880	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland

3.2. Chemikalien und Enzyme

Die in der vorliegenden Arbeit genutzten Reagenzien sind in Tab. 4 und Tab. 5 aufgeführt.

Tab. 4: Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
Lysostaphin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Lysozym	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Proteinase K	Fermentas GmbH., St. Leon-Rot, Deutschland
RNase A	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland

Tab. 5: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Agarose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Borsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Concanavalin A	Thermo Fisher Scientific Inc., Berlin, Deutschland
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Hexamethyldisilazan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kristallviolett	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Nilrot	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Salzsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Sypro Orange®	Thermo Fisher Scientific Inc., Berlin, Deutschland

3.3. Puffer

PBS: 137 mM NaCl
2,7 mM K₂CO₃
8,8 mM Na₂HPO₄
0,7 mM KH₂PO₄, pH 7,2
in ddH₂O, autoklaviert bei 121 °C für 20 min

0,1 M Phosphatpuffer: 0,1 M KH₂PO₄ (Stocklösung 1)
in ddH₂O
0,1 M Na₂HPO₄ · 2H₂O (Stocklösung 2)
in ddH₂O
Finale Lösung: 390 ml Stocklösung 1 und
610 ml Stocklösung 2, pH 7,0
autoklaviert bei 121 °C für 20 min

3.4. Medien

Alle Medien wurden mit destilliertem Wasser nach Herstellerangaben angesetzt und vor der Nutzung bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

Tab. 6: Eingesetzte Medien

Medium	Hersteller
BHI (engl.. brain heart infusion) - Medium	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Chrom Orientierungsagar	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Columbia-Agar mit Schafblut	Oxoid GmbH, Wesel, Germany
LB (engl. lysogenic broth)-Agar	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
LB (engl. lysogenic broth)-Medium	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Mueller-Hinton (MH)-Agar	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Mueller-Hinton (MH)-Medium	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Mueller-Hinton (MH)-Medium mit Blut	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

3.5. Bakterienisolate

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Bakterienisolate wurden im Rahmen des durch die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung geförderten Verbundprojektes RemuNa im Zeitraum von 2012 bis 2017 aus Milchproben an Mastitis erkrankten Rindern isoliert. Es wurde das projektinterne Ziel definiert, 50 Isolate je Spezies in die Stammsammlung aufzunehmen. Die Diagnostik erfolgte durch die Projektpartner RIPAC-Labor GmbH (Potsdam, Deutschland) und bovicare GmbH (Potsdam, Deutschland). Die Identifizierung wurde mittels MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry) durch RIPAC-Labor GmbH überprüft. Eine vollständige Übersicht über die projektinterne Stammsammlung lässt sich dem Anhang (A Seite viii) entnehmen.

Darüber hinaus wurden die in Tab. 7 aufgeführten ATCC-Referenzstämme und Isolate der Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie und Tierseuchen (IMT) genutzt.

Tab. 7: Verwendete Referenz- und IMT-Stämme

Stamm	Verwendung	Referenz, Herkunft
<i>Escherichia (E. coli)</i> ATCC25922	Referenzstamm (Gram-negativ) für die MHK-Bestimmung	Schoenknecht et al. 1946
<i>Staphylococcus (S.) aureus</i> ATCC29213	Referenzstamm (Gram-positiv) für die MHK-Bestimmung	U.S.Code of Federal Regulations. Title 21 (1977)
<i>Staphylococcus (S.) epidermidis</i> ATCC12228	Negativkontrolle Biofilm-Assay	Zhang et al. 2003
<i>Staphylococcus (S.) epidermidis</i> ATCC35984 (RP62A)	Positivkontrolle Biofilm-Assay	Christensen et al. 1982
<i>Pseudomonas(P.) aeruginosa</i> DSM939	Positivkontrolle Biofilm-Assay	Herman et al. 1972
<i>Pseudomonas(P.) aeruginosa</i> PAO1	Positivkontrolle Biofilm-Assay	Holloway et al. 1955
<i>Escherichia (E.) coli</i> IMT16357	MHK-Bestimmung AMPs	Wildvogel, klinisch gesund
<i>Escherichia (E.) coli</i> IMT20130	MHK-Bestimmung AMPs	Hund, Harnwegsinfektion
<i>Staphylococcus (S.) aureus</i> IMT24778	MHK-Bestimmung AMPs	Pferd, Wundheilungsstörung
<i>Staphylococcus (S.) aureus</i> IMT33878	MHK-Bestimmung AMPs	Katze, Nasenausfluss

3.6. Software

Zur Aufarbeitung der mikroskopischen Aufnahmen wurde die Software Fiji eingesetzt [205]. Die Erstellung der Graphen und die zugehörigen statistischen Analysen erfolgten mit Prism8 (GraphPad Software, San Diego, USA). Schematische Darstellungen wurden mit BioRender.com erstellt.

Die Genomanalysen wurden mit Geneious 11.1.5 (Biomatters Ltd., Auckland, Neuseeland)

durchgeführt. Die Kontrolle der Sequenzen der automatisch identifizierten Gene erfolgte mittels BLAST (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA) über den Algorithmus blastx [206].

3.7. Weitere Materialien

Die eingesetzten Verbrauchsmaterialien sind in Tab. 8 aufgeführt.

Tab. 8: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
96-Well Plates Cellstar Standard	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland
96-Well Plates CORN3599	Thermo Scientific Heraeus, Schwerte, Deutschland
MICRONAUT-S Mastitis 3	Merlin GmbH, Rüsselsheim, Deutschland
Silikonfolie	bess medizintechnik GmbH, Berlin, Deutschland
TC-Platte 24 Well	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Für die phänotypische Antibiotikasensitivitätstestung mittels Agardiffusionstest sowie den phänotypischen Bestätigungstest zum Nachweis der ESBL-Bildung wurden verschiedene, mit definierten Antibiotikakonzentrationen getränkte Testplättchen (Antimicrobial Susceptibility Test Discs) der Firma Oxoid GmbH (Wesel, Deutschland) verwendet. Eine vollständige Übersicht ist in Tab. 9 gegeben.

Tab. 9: Eingesetzte Antibiotikaplättchen

Antibiotikum	Abkürzung	Beladung in μg
Ampicillin	AMP	10
Cefotaxim	CTX	30
Cefotaxim/Clavulansäure	CTX+CLA	30+10
Cefoxin	FOX	30
Ceftazidim	CAZ	30
Ceftazidim/Clavulansäure	CAZ+CLA	30+10
Erythromycin	ERY	15
Oxacillin	OX	1, 5
Penicillin G	PEN	10

3.8. Mikrobiologische Methoden

3.8.1. Kryokonservierung

Zur dauerhaften Lagerung von Bakterienstämmen wurden Kryokulturen angelegt. Dazu wurden 5 ml BHI-Medium mit einer Einzelkolonie des jeweiligen Bakterienstammes angeimpft und bei 300 rpm für ca. 4 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 700 μl der Kultur mit 200 μl sterilem Glycerol vermischt und zügig bei -80 °C eingefroren. Zur erneuten Anzucht wurden die Isolate direkt aus den Kryoröhrchen auf Columbia-Blutagar ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.8.2. Kultivierung von Bakterien

Die Anzucht der verschiedenen Bakterienspezies erfolgte auf unterschiedlichen Nährmedien entsprechend der jeweiligen Wachstumsbedürfnisse. Eine vollständige Liste der eingesetzten Medien findet sich unter Kapitel 3.4.

Ein mit 5 % Schafblut versetzter Columbia-Blutagar diente als Basismedium. Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Bebrütung bei 37 °C über Nacht. Vor der weiteren Verwendung in den unterschiedlichen Assays erfolgte stets eine visuelle Kontrolle der Kolonien auf die typische Morphologie sowie auf Reinheit der Gesamtkultur.

3.8.3. Minimale Hemmkonzentrationen verschiedener Antibiotika

Für die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) wurde die kommerziell verfügbare Platte MICRONAUT-S Mastitis 3 der Firma Merlin GmbH (Rüsselsheim, Deutschland) verwendet. Zur Qualitätskontrolle wurden die Referenzstämme *E. coli* ATCC25922 und *S. aureus* ATCC29213 mitgeführt und die erhaltenen MHK anhand der Grenzwerte der CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) aus den Dokumenten VET08 (2018) [207] und M100 (2019) [208] abgeglichen. Zusätzlich wurden zur Interpretation die Grenzwerte nach Feßler et al. 2017 [209] hinzugezogen.

Koloniematerial einer Übernachtkultur wurde zur Einstellung einer Bakteriensuspension in 0,9 % NaCl verwendet, deren Keimdichte einem McFarland-Standard von 0,5 (ca. $1,5 \times 10^8$ Kolonie-bildende Einheiten pro Milliliter (KbE/ml)) entspricht. Es wurden 50 µl dieser Suspension in 11 ml Mueller-Hinton-Medium überführt. Dieses wurde als Inokulum weiterverwendet. Für die Testung der Streptokokken wurde dem Medium 2,5 % lysiertes Pferdeblut frisch zugesetzt. In jedes Well der beschichteten 96-Well-Platte wurden 50 µl des Inokulums pipettiert. Die auf der Platte aufgebrauchten Antibiotika lassen sich Tab. 10 entnehmen. Zur Bestimmung der Einsaatdichte sowie zur Prüfung der Reinheit des Inokulums wurden 10 µl des Mueller-Hinton-Inokulums in 10 ml 0,9 % NaCl-Lösung gegeben und nach kräftigem Vortexen 100 µl auf Columbia-Blutagar ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C erfolgten die Kontrolle der Reinheit und die Bestimmung der Koloniezahl. Nur die Ansätze mit einer Koloniezahl zwischen 20 und 80 pro Platte (entspricht $2 - 8 \times 10^6$ KbE/ml) wurden für die Auswertung herangezogen.

Nach 20 h Inkubation bei 37 °C wurden die MHK-Werte für die einzelnen Antibiotika abgelesen. Die MHK wurde für jeden Wirkstoff als die geringste Konzentration definiert, bei der makroskopisch kein Wachstum der Bakterien mehr feststellbar ist. In Abb. 5 ist beispielhaft das Foto einer MHK-Platte gezeigt.

Tab. 10: Layout der MICRONAUT-S Mastitis 3 Platte

Antibiotika	Abkürzung	Getesteter Konzentrationsbereich in $\mu\text{g/ml}$
Amoxicillin/Clavulansäure	AMC	4/2 – 32/16
Ampicillin	AMP	4 – 16
Cefazolin	CEZ	4 – 32
Cefoperazon	CPZ	2 – 16
Cefquinom	CEQ	2 – 8
Erythromycin	ERY	0,125 – 4
Kanamycin/Cephalexin	K/C	4/0,4 – 32/3,2
Marbofloxacin	MAF	0,25 – 2
Oxacillin	OXA	1 – 4
Penicillin G	PEN	0,125 – 8
Pirlimycin	PIR	1 – 4

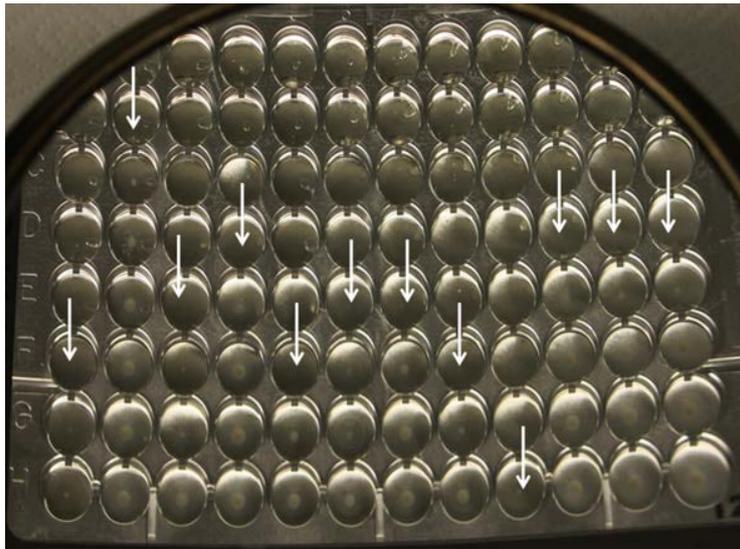


Abb. 5: Darstellung einer Mikrotiterplatte zur MHK-Bestimmung

Beispiel einer Mikrotiterplatte zur MHK-Bestimmung nach 20 h Inkubation; Pfeile weisen auf fehlende Sedimentation durch gehemmtes Bakterienwachstum hin

3.8.4. Agardiffusionstest

Diese Methode wurde auch eingesetzt um *E. coli*-Isolate mit als resistent interpretierten MHK-Werten gegen Cephalosporine der dritten Generation auf die Bildung von β -Laktamasen mit erweitertem Spektrum (ESBL, engl. Extended-Spectrum β -Lactamase) zu

untersuchen. Dazu wurde zunächst Koloniematerial einer Übernachtskultur zur Einstellung einer Suspension mit einer Zelldichte entsprechend McFarland 0,5 in Mueller-Hinton-Medium genutzt. Die erhaltene Suspension wurde mit einem sterilen Tupfer gleichmäßig auf eine Mueller-Hinton-Platte aufgetragen. Anschließend wurden kommerziell erhältliche Plättchen mit definierten Antibiotikakonzentrationen aufgelegt, die Platten für 20 h bei 37°C inkubiert und die Durchmesser der entstandenen Hemmhöfe bestimmt. Die Interpretation erfolgte nach den in der CLSI VET08 (2018) und M100 (2019) vorgegebenen Grenzwerten [207, 208].

Es wurden Plättchen mit Cefotaxim und Cefotaxim sowie auch ohne Clavulansäure auf den Agarplatten aufgebracht. Per Definition vermitteln ESBL-kodierende Gene eine Resistenz gegen eine Vielzahl an β -Laktam-Antibiotika, einschließlich Cephalosporinen der dritten Generation, sind aber durch den Zusatz von β -Laktamasehemmern, beispielsweise Clavulansäure, inhibierbar.

3.8.5. Kristallviolett-Assay

Die Biofilmbildung ausgewählter Mastitisisolate wurde nach dem Protokoll des Microtiter Dish Biofilm Formation Assay nach O'Toole (2011) mittels Kristallviolett untersucht [210]. Neben dem Einsatz in der Gram-Färbung wird Kristallviolett auch zum Anfärben von Biofilmen eingesetzt. Welche Komponenten des Biofilms dabei angefärbt werden, ist jedoch nicht genau bekannt. Für die Bestimmung der Biofilm-bildenden Eigenschaften wurde eine Übernachtskultur in BHI-Medium 1:100 verdünnt, 100 μ l der Bakteriensuspension in jedes Well einer 96-Well-Platte übertragen und für 24 h bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Als Negativkontrolle diente unbeimpftes BHI-Medium. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Platte vorsichtig mit ddH₂O gewaschen, um ungebundene Bakterien zu entfernen. Es wurden 125 μ l einer Lösung aus 0,1 % Kristallviolett in ddH₂O auf die Biofilme gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit ddH₂O wurde die Mikrotiterplatte über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Am folgenden Tag erfolgte die Lösung des anhaftenden Kristallvioletts durch die Zugabe von 125 μ l einer 30 % Essigsäurelösung. Nach einem Inkubationsschritt von 15 min wurden 125 μ l der erhaltenen Lösung in eine saubere 96-Well-Platte übertragen und die Absorption bei 550 nm im Tecan Reader Sunrise (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) bestimmt.

3.8.6. Etablierung des Silicone-Disc-Assays

Zur quantifizierbaren Bestimmung der Biofilm-bildenden Eigenschaften wurde mit dem Silicone-Disc-Assay ein neuer Biofilm-Assay etabliert. Eine Übernachtskultur wurde in BHI-Medium verdünnt und in einer 24-Well Platte über Nacht unter leichtem Schütteln auf Silikoncoupons (bess medizintechnik GmbH, Berlin, Deutschland) mit einem Durchmesser von 5 mm und einer Fläche von $19,635 \text{ mm}^2$ inkubiert. Nach einem Waschschriff in ddH₂O wurden die Coupons in Phosphatpuffer überführt und der Biofilm in einem Ultraschallbad (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland) von der Oberfläche gelöst. Das eingesetzte Ultraschallbad verfügt über die sogenannte Sweep-Technologie. Die meisten Ultraschallreinigungsggeräte verfügen über starre Arbeitsfrequenzen, die unter Umständen zu stehenden Wellen im Ultraschallbad führen können. Durch diese inhomogene Beschallung kann es zu einer unregelmäßigen Ablösung, zu einer Beschädigung oder zum Abtöten der Bakterien kommen. Mittels Sweep-Technologie wird ein homogenes Ultraschallfeld in der gesamten Reinigungswanne erzeugt und Beschädigungen der Bakterien werden durch eine permanente Änderung der Kavitationsmaxima sicher verhindert [211]. Anschließend wurde die KbE/Coupon mittels Drop-Plating auf LB-Agar bestimmt [212].

3.8.7. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Um Rückschlüsse auf das Färbeverhalten von Kristallviolett zu gewinnen, wurden Biofilme mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (engl. confocal laser scanning microscopy, CLSM) untersucht. Dazu wurden Übernachtskulturen der *S. epidermidis* Referenzstämme ATCC12228 und RP62A auf ca. 10^5 KbE/ml in BHI-Medium verdünnt. Glasdeckgläser wurden in eine 24-Well-Platte gelegt und mit 1 ml der Bakteriensuspension beimpft. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 150 rpm wurden die Deckgläser vorsichtig in ddH₂O gewaschen und mit den entsprechenden Farbstoffen versetzt, die an unterschiedliche, definierte Matrixbestandteile binden. Die Färbelösung setzte sich aus 150 µl ddH₂O, 150 µl DMSO, 1 µl DAPI, 7 µl Sypro Orange®, 9 µl Concanavalin A und 1 µl Nilrot zusammen. Ein Überblick über die eingesetzten Farbstoffe lässt sich Tab. 11 entnehmen. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Anschließend wurden 25 µl einer 0,1 % Kristallviolettlösung in ddH₂O auf die Deckgläser gegeben. Kristallviolett wird eigentlich zur Bestimmung der Biofilmmasse eingesetzt (siehe

Seite 33, Kapitel 3.8.6). Hier wurde jedoch seine Fluoreszenz untersucht. Die einzelnen Fluorophore in diesem Versuch emittieren Licht verschiedener Wellenlängen und können dadurch separat detektiert werden. Durch das Übereinanderlegen der einzelnen Aufnahmen sollte die Kollokalisierung der fluoreszenzmarkierten Matrixbestandteile und des Signals von Kristallviolett ermittelt werden.

Tab. 11: Eingesetzte Farbstoffe für CLSM

Farbstoff	Anregungs-/Emissionswellenlänge (in nm)	Angefärbte Bestandteile
Concanavalin A	488/501-541	α -D-Mannose, α -D-Glucose
DAPI	405/420-515	DNA
Nilrot	594/608-677	Triacylglycerole
Sypro Orange®	488/550-632	Proteine

3.8.8. Rasterelektronenmikroskopie

Durch die Analyse der im Silicone-Disc-Assay beimpften Silikoncoupons im Rasterelektronenmikroskop (REM) sollte die Verteilung der Bakterien auf den Coupons genauer untersucht werden. Dazu wurden die Proben aus dem Silicone-Disc-Assay nach dem Waschen mit ddH₂O schrittweise in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30 %, 50 %, 75 %, 90 %, 95 %, 100%) dehydriert. Die ersten Dehydrierungsschritte erfolgten über mindestens 10 min. Die Inkubation mit 95 % und 100 % Ethanol wurde zweimal für mindestens 30 min wiederholt. Im letzten Schritt wurde zunächst für 30 min und anschließend über Nacht Hexamethyldisilazan (HMDS) zugegeben. Die getrockneten Proben wurden anschließend im Sputter-Beschichtungsverfahren mit einer 16 nm dicken Schicht Gold bedeckt und im REM bei einer Beschleunigungsspannung von 3 kV mikroskopiert.

3.8.9. Minimale Hemmkonzentrationen antimikrobiell wirksamer Peptide (AMP)

Neben den verschiedenen Antibiotika wurden die MHK für AMPs (Tab. 12) nach dem Protokoll von Wiegand et al. bestimmt [213]. Die eingesetzten AMPs wurden in 1:2 Verdünnungsschritten in Konzentrationen von 8 µg/ml bis 1 mg/ml in Polystyrol-96-Well-Platten der Firma Corning, Inc. (Berlin, Deutschland) vorgelegt. Die zu testenden Bakterienisolate wurden über Nacht auf Columbia-Blutagar angezüchtet und am folgenden Tag zur Herstellung einer Suspension (McFarland 0,5) in 5 ml 0,85 % NaCl verwendet. Das erhaltene Inokulum wurde 1:15 verdünnt. Es wurden jeweils 50 µl in die Vertiefungen der vorbereiteten 96-Well-Platte überführt. Nach einer 20-stündigen Inkubation wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm (OD_{600nm}) in den Wells der Platte mittels Tecan Reader Sunrise (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) bestimmt. Zusätzlich wurde durch die Ermittlung der K_{bE}/ml die bakterizide Wirkung der AMPs bis zur vollständigen Abtötung der Bakterien kontrolliert. Dafür wurden passende Verdünnungsstufen gewählt und auf LB-Agar ausplattiert. Es handelte sich dabei um den ermittelten MHK-Wert und eine jeweils niedrigere und eine höhere Verdünnungsstufe. Zur Kontrolle des experimentellen Aufbaus und der Durchführung wurde die Keimdichte des Inokulums durch das Ausplattieren von 100 µl entsprechender Verdünnungsstufen bestimmt.

Tab. 12: AMPs für MHK-Testung

AMP	Aminosäure-Sequenz	Molekulargewicht (g/mol)	Referenz
AMP126	KWCRKWQWRGVKFIKCV	2251,8	Romani et al. 2013 [214]
AMP72	KGCALVKVRGLTLKVKCK	1816,4	Romani et al. 2013 [214]
BMAP-27	GRFKRFRKKFKKLFKKLSPVIPLLHL	3226,1	Skervlavaj et al. 1996 [215]
BMAP-Fragment	GRFKRFRKKFKKLF	1886,4	unveröffentlicht Rapsch et al. 2015
Esculentin-1a (1-21)	GIFSKLAGKKIKNLLISGLKG	2184,4	Simmaco et al. 1993 [216]
OH-CATH30	KFFKKLKNSVKKRAKKFFKKPRVIGVSIPF	3595,5	Zhao et al. 2008 [217]
Protamin	MPRRRRSSSRPVRRRRRPRVSRRRRRRGRRRR	4381,2	Louie et al. 1974 [218]

Es wurden die MHK-Werte der verschiedenen AMPs gegen den multiresistenten *E. coli* IMT37453, den Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) IMT37556, das *K. pneumoniae*-Isolat IMT38020 und das *E. faecium*-Isolat IMT38014 bestimmt. Die Bestimmung erfolgte weiterhin mit ausgewählten AMPs für einen im Silicone-Disc-Assay (Seite 56, Kapitel 4.2.2) als sehr guter Biofilmbilder identifizierter *E. coli* (IMT37450, siehe Abb. 12). Darüber hinaus wurden vier Isolate aus der bestehenden Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie und Tierseuchen, die aus anderen Infektionsgeschehen stammten und einen anderen genetischen Hintergrund aufweisen, getestet. Es handelt sich um zwei *E. coli*- (IMT16357, IMT20130) und zwei *S. aureus*-Isolate (IMT24778, IMT33878) zur Abbildung Gram-negativer und –positiver Spezies. Die Testung dieser Isolate sollte die Wirksamkeit der ausgewählten AMPs gegen Erreger bestätigen, die nicht aus einem Mastitisgeschehen isoliert wurden. Dabei wurde auf die Testung aller AMPs verzichtet und gezielt die beiden wirksamsten AMPs, OH-CATH30 und Protamin, sowie das weniger aktive Esculentin als Kontrolle ausgewählt. Zum Vergleich der erzielten Ergebnisse wurden weiterhin die beiden Referenzstämme *E. coli* ATCC25922 und *S. aureus* ATCC29213 untersucht. Dadurch konnten sowohl eine Gram-negative als auch eine Gram-positive Spezies abgebildet werden.

3.8.10. Antimikrobiellen Eigenschaften AMP-beschichteter Oberflächen

Die Immobilisierung der Peptide erfolgte durch das Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie nach einem dort etablierten Protokoll [219]. Dabei wurden mittels Plasma aktivierte, vorbehandelte Silikon-Oberflächen sowie unterschiedliche, etablierte Kopplungsmethoden für die Immobilisierung der antimikrobiellen Peptide verwendet (Silanisierung, Allylamin-Polymerisation, 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid /N-Hydroxysuccinimid-Aktivierung und N-Hydroxysuccinimid-Polyethylenglycol-Maleimidopropionyl-Aktivierung). Die Versuche wurden mit dem AMP OH-CATH30 durchgeführt. Als Referenzpeptid diente BMAP-27, dessen antimikrobielle Wirkung bekannt ist [220].

Die Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität der generierten Oberflächen erfolgte in Anlehnung an die DIN ISO 22196 (Messung von antibakterieller Aktivität auf Kunststoff- und anderen porenfreien Oberflächen). Das Protokoll wurde angepasst und auf eine Testoberfläche von 1 cm² reduziert. Bei den getesteten Isolaten handelte es sich um zwei Isolate der projektinternen Stammsammlung, einem multiresistenten (engl. multidrug resistant, MDR) *E. coli* (IMT37453) und einem Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) IMT37556. Die Bakterien wurden über Nacht in BHI-Medium bei 37 °C angezogen. Im Anschluss daran wurde die optische Dichte photometrisch bestimmt und die Suspension auf eine Ausgangskonzentration von 1x10⁶ Kbe/ml in Mueller-Hinton-Bouillon (MHB) eingestellt. Um ungebundene AMPs zu entfernen, erfolgten vier Waschschrte, je zweimal mit 1xPBS und zweimal mit MHB. Anschließend wurden die Oberflächen zur Äquilibration mit 100 µl MHB überschichtet und für 1 h bei 37 °C in einer Feuchtigkeitskammer inkubiert. Die Feuchtigkeitskammer minimierte die Verdunstung der Flüssigkeiten auf den Oberflächen. Die Überstände wurden abgenommen, zu gleichen Teilen mit dem jeweiligen Inokulum versetzt und über 3 h bei 37 °C inkubiert, um die Überstände auf eventuell enthaltene, von der Oberfläche freigesetzte AMPs zu testen. Die Bestimmung der Kbe/ml erfolgte durch Anlegen einer Verdünnungsreihe mit 1xPBS und Drop-Plating [212]. Antimikrobielle Eigenschaften, welche in diesen Proben nachweisbar waren, wurden auf Peptide zurückgeführt, welche sich im Laufe der Inkubation von der Oberfläche gelöst hatten. Unbehandelte Oberflächen dienten als Negativkontrolle.

Für die Ermittlung der antimikrobiellen Eigenschaften der kovalenten Oberflächenbeschichtung wurden die zuvor äquilibrierten Oberflächen mit 70 µl einer frischen Bakterienkultur mit 1x10⁶ Kbe/ml überschichtet. Die Oberflächen wurden daraufhin für 3 h bei 37 °C ohne

Schütteln in einer Feuchtigkeitskammer inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand von der Oberfläche entfernt und die Oberflächen einmal mit 70 µl sterilen MHB gespült. Diese Spülflüssigkeit wurde im Anschluss daran mit dem Überstand gemischt um eine möglichst genaue, quantitative Bestimmung der Bakterienzahl gewährleisten zu können. Die antimikrobiellen Eigenschaften wurden evaluiert, indem die erhaltenen Bakteriensuspensionen logarithmisch verdünnt und die Verdünnungsstufen von 10^0 bis 10^{-6} mittels Drop-Plating auf MHB-Agarplatten ausplattiert wurden [212]. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden die KBE/ml ermittelt.

3.9. DNA-analytische Methoden

3.9.1. Extraktion chromosomaler DNA aus Bakterien

Für die Isolierung und Aufreinigung bakterieller DNA wurden in Abhängigkeit von der Spezies modifizierte Protokolle des QIAGEN QIAamp DNA Mini Kit angewendet. Nach den in den folgenden Kapiteln 3.9.2 bis 3.9.4 geschilderten spezies-spezifischen Schritten wurden folgende Schritte für alle Proben durchgeführt. Die vorbereiteten Proben wurden mit 200 µl Ethanol (abs.) versetzt, auf die DNA-Bindungssäulen überführt und für 1 min bei 6000 x g auf die Säulenmembran zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen. Nach der Zugabe von 500 µl des Waschpuffers AW1 wurde erneut für 1 min bei 6000 x g zentrifugiert. Das Filtrat wurde abermals verworfen. Es folgte ein weiterer Waschschriff mit 500 µl des Puffers AW2. Die Zentrifugation wurde hier bei 16000 x g für 3 min durchgeführt, um die Säulenmembran vollständig von Waschpufferresten zu befreien. Die Elution der gebundenen DNA erfolgte in zwei Schritten mit jeweils 20 µl Wasser für 1 min bei 6000 x g, um die DNA-Ausbeute zu erhöhen. Das Eluat wurde anschließend bis zur Weiterverwendung bei 4 °C gelagert.

3.9.2. Extraktion chromosomaler DNA aus *E. coli*

Für die Extraktion bakterieller DNA aus *E. coli* wurden Bakterienpellets gewonnen. Hierzu wurde 1 ml einer über 4 h bei 37 °C und 350 rpm in BHI angezogenen Bakterienkultur für 5 min bei 7500 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden in 180 µl ATL Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 20 µl Proteinase K (0,1 mg/ml) wurde die Probe im Schüttelinkubator für 20 min bei 56 °C und 450 rpm inkubiert. Durch die anschließende Zugabe von 2 µl RNase A (5 µg/ml) wurden Kontaminationen der gewonnenen DNA-Probe mit RNA abgebaut. Der Ansatz wurde kräftig für 15 s gemischt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren 10-minütigen Inkubationsschritt bei 56 °C und 450 rpm wurde der Ansatz erneut kurz bei 7500 rpm zentrifugiert.

3.9.3. Extraktion chromosomaler DNA aus *S. dysgalactiae*

Zur Extraktion chromosomaler DNA aus *S. dysgalactiae* wurden Bakterienpellets gewonnen. Dazu wurden 500 µl einer BHI-Übernachtskultur für 10 min bei 7500 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden in 180 µl Lysozymlösung (20 mg/ml Lysozym in TE-Puffer) aufgenommen und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 20 µl Proteinase K und 1 µl RNase A (2 µg/µl) zugegeben. Die Proben wurden durch Invertieren gemischt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 200 µl AL-Puffer wurden die Proben für 1 h bei 56 °C inkubiert.

3.9.4. Extraktion chromosomaler DNA aus *S. aureus*

Eine Einzelkolonie einer Übernachtskultur wurde für 5 h bei 37 °C in 4 ml BHI inkubiert und anschließend 1 ml der Suspension für 1 min bei 7500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet mit 25 µl Lysostaphin (0,1 mg/ml) versetzt. Nachdem die Probe gründlich gemischt wurde, folgte ein Inkubationsschritt bei 37 °C für 15 min. Anschließend wurden 75 µl TE-Puffer und 25 µl Proteinase K (0,1 mg/ml) zugegeben und die Probe für 25 min bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wurde mit 75 µl PBS und 1 µl RNase A (2 µg/µl) versetzt, invertiert und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 200 µl AL-Puffer folgte ein weiterer 15-minütiger Inkubationsschritt bei 56 °C.

3.9.5. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der Konzentration chromosomaler bakterieller DNA erfolgte mit dem Qubit Fluorometer nach dem Qubit® dsDNA HS (High Sensitivity) Assay. Im Gegensatz zur Messung der Absorption von Ultraviolettstrahlung bei einer Wellenlänge von 260 nm zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren ist die Messung mit dem Qubit Fluorometer genauer, da jeweils spezifische Fluoreszenzfarbstoffe zur Verfügung stehen [221]. Das erhaltene Fluoreszenzsignal verhält sich direkt proportional zu der Konzentration der jeweiligen Nukleinsäure. Der in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Assay ist hoch selektiv für doppelsträngige DNA [222].

Zur Herstellung der Arbeitslösung dieses Assays wurde das Qubit® dsDNA HS Reagenz jeweils frisch 1:200 in Qubit® dsDNA HS Puffer verdünnt. Der im Kit enthaltene Qubit® Standard wurde 1:10 in der Arbeitslösung verdünnt und sorgfältig gemischt. Die DNA-Proben wurden 1:100 in der Arbeitslösung verdünnt und ebenfalls gründlich resuspendiert. Nach einer 2-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der DNA-Konzentration.

3.9.6. Sequenzierung chromosomaler bakterieller DNA

Das Gesamtgenom ausgewählter und im Silicone-Disc-Assay untersuchter Isolate wurde unter Verwendung der Illumina MiSeq-300-bp-Paired-End-Technologie sequenziert mit einer Coverage von > 90X. Für die De-novo-Assemblierung in größere zusammenhängende Sequenzen (Contigs) wurde SPAdes v3.11 verwendet. Alle Draft-Genome wurden mit Prokka annotiert [223]. Diese Arbeiten wurden freundlicherweise vom Fachgebiet MF2 (Genomsequenzierung) sowie der Nachwuchsgruppe NG1 (Mikrobielle Genomik) des Robert Koch-Institutes übernommen. Für die genotypische Charakterisierung der Gesamtgenomdaten wurden Online-Tools des Center for Genomic Epidemiology (<https://cge.cbs.dtu.dk/services>) genutzt, einschließlich Bestimmung des Sequenztyps (ST) mittels MLSTFinder sowie außerdem spaTyper 1.0 und ResFinder 2.1 (Schwellenwert: 95% ID, 80% Mindestlänge) [224-226].

4. Ergebnisse

Die Charakterisierung der asservierten Isolate umfasste das Erstellen des Antibiotika-Sensitivitätsprofils gegen die zur Behandlung von boviner Mastitis eingesetzten Antibiotika, sowie die Untersuchung der Biofilm-bildenden Eigenschaften. Weiterhin wurden verschiedene antimikrobielle Peptide (AMP) auf ihre Wirksamkeit gegen ausgewählte Isolate der Stammsammlung untersucht. Abschließend wurde die antibakterielle Effektivität AMP-beschichteter Oberflächen ermittelt.

4.1. Erfassung der Isolate und ihrer Resistenzen

Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt 496 bakterielle Isolate aus aktuellen Geschehen klinischer und subklinischer boviner Mastitis in Deutschland isoliert. Eine Übersicht der Isolate, verteilt auf die 9 als relevant definierten Zielspezies, lässt sich Tab. 13 entnehmen. Den mit Abstand größten Anteil an der Stammsammlung stellten Vertreter von *Streptococcus (S.) uberis* mit 124 Isolaten. Dies entsprach 25,1 % der gewonnenen Isolate. Mit absteigender Häufigkeit konnten *Escherichia (E.) coli* (n=90; 18,2 %), *Staphylococcus (S.) aureus* (n=69; 14,0 %), *Streptococcus (S.) dysgalactiae* (n=62; 12,6 %), *Streptococcus (S.) agalactiae* (n=43; 8,7 %), *Klebsiella (K.) pneumoniae* (n=45; 9,1 %), *Enterococcus faecalis* (n=37; 7,5 %), *Enterococcus faecium* (n=15; 3,0%), und *Klebsiella (K.) oxytoca* (n=11; 2,2 %) identifiziert werden. Im Verlauf des Projektes wurden einige Spezies gezielt isoliert und asserviert. Dieser Schritt erfolgte um das projektinterne Ziel, 50 Isolate pro Spezies zu charakterisieren, auch für selten isolierte Spezies zu erfüllen. Dies gelang für alle Spezies mit Ausnahme von *S. agalactiae*, wobei die beiden Enterokokken- und Klebsiellen-Spezies zusammengefasst wurden.

Tab. 13: Übersicht über die Stammsammlung

Spezies	Anzahl asservierter Isolate n und prozentualer Anteil (%) an 496 Isolaten
<i>Escherichia (E.) coli</i>	90 (18,2 %)
<i>Klebsiella (K.) oxytoca</i>	11 (2,2 %)
<i>Klebsiella (K.) pneumoniae</i>	45 (9,1 %)
<i>Staphylococcus (S.) aureus</i>	69 (14,0 %)
<i>Enterococcus (E.) faecalis</i>	37 (7,5 %)
<i>Enterococcus (E.) faecium</i>	15 (3,0 %)
<i>Streptococcus (S.) agalactiae</i>	43 (8,7 %)
<i>Streptococcus (S.) dysgalactiae</i>	62 (12,6 %)
<i>Streptococcus (S.) uberis</i>	124 (25,1 %)

Es wurden darüber hinaus zusätzlich die in Tab. 14 aufgelisteten Spezies asserviert.

Tab. 14: Weitere asservierte Spezies

Spezies	Anzahl asservierter Isolate n
<i>Enterococcus cecorum</i>	1
<i>Enterococcus saccharolyticus</i>	3
<i>Enterobacter ludwigii</i>	1
<i>Enterococcus spp.</i>	1
<i>Lactococcus garvieae</i>	18
<i>Lactococcus lactis</i>	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	1
<i>Streptococcus parauberis</i>	1
<i>Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis</i>	1

Die Charakterisierung der asservierten Isolate mittels phänotypischer Resistenztestung erfolgte durch die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) unter Nutzung der kommerziell erhältlichen MICRONAUT-S Mastitis-3 Platten (MERLIN Diagnostika, Bornheim-Hersel, Deutschland). Es wurden jeweils mindestens 50 Isolate jeder Spezies getestet. Im Falle von *S. agalactiae* konnten im Projektverlauf lediglich 43 Isolate aus dem Probenmaterial angezüchtet werden. Das Resistenzprofil von 42 der gesammelten *S. agalactiae* wurde

bestimmt. Das verbleibende Isolat konnte in dem für die MHK-Bestimmung eingesetzten Medium nicht kultiviert werden und wurde deshalb nicht in die Betrachtung einbezogen. Eine vollständige Übersicht über die Resistenzprofile der asservierten Stämme befindet sich im Anhang (Tab. 21, Seite viii).

Es konnten sieben Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA), ein Extended-Spektrum Beta-Laktamase (ESBL-) bildender und 11 multi-resistente (MDR) *E. coli* identifiziert werden. Die phänotypische Identifizierung des MRSA sowie der ESBL-Produktion erfolgte nach den CLSI-Vorgaben im Agardiffusionstest. Ein Bakterienisolat gilt als resistent, wenn das eingesetzte Antibiotikum am Infektionsort die notwendige Konzentration zum vollständigen Abtöten bzw. der effektiven Hemmung der Bakterien trotz der empfohlenen Dosis nicht erreicht [227]. Dabei muss die Indikation des Medikaments für die Erkrankung und für die zu behandelnde Spezies berücksichtigt werden [228]. Nach gängigen Definitionen gilt ein Isolat als multiresistent, wenn es unempfindlich gegen mindestens ein Antibiotikum aus drei oder mehr Wirkstoffklassen ist [229, 230].

Die Resistenzmuster der *Streptococcus* spp. sowie der *Klebsiella* spp. zeigten zwischen den Isolaten einen hohen Grad an Übereinstimmung. Daher wurde nach der Auswertung der Resistenzprofile von 69 *S. uberis*-Isolaten auch aus wirtschaftlichen Gründen darauf verzichtet, die Resistenzprofile der verbliebenen *S. uberis* zu bestimmen. Ein Überblick über die erstellten Resistenzprofile ist in Tab. 15 gegeben. Die erhaltenen prozentualen Verteilungen der Resistenzen sind für *E. coli*, *S. aureus* und *Enterococcus* spp. in Abb. 6 gezeigt.

Tab. 15: Antibiotikasensitivitätsprofile der getesteten Mastitisisolate

Antibiotikum		<i>E. coli</i> (n=90)	<i>Klebsiella</i> spp. (n=62)	<i>S. aureus</i> (n=68)	<i>Enterococcus</i> spp. (n=52)	<i>S. agalactiae</i> (n=42)	<i>S. dysgalactiae</i> (n=54)	<i>S. uberis</i> (n=69)
Amoxicillin/Clavulansäure	R	0	0	0	0	0	0	0
	I	1	0	0	0	0	0	0
	S	89	62	68	52	42	54	69
Ampicillin	R	25	22	1	0	0	0	0
	I	0	26	*	0	0	0	0
	S	65	14	*	52	42	54	69
Cefazolin	R	12	1	3	37	0	0	0
	I	0	0	0	*	0	0	0
	S	78	61	65	*	42	54	69
Cefoperazon	R	12	1	0	*	0	0	0
	I	0	0	0	*	0	1	0
	S	78	61	68	39	42	53	69
Cefquinom	R	11	0	0	13	0	0	0
	I	0	0	0	14	0	0	0
	S	79	62	68	25	42	54	69
Erythromycin	R	/	/	43	4	2	2	7
	I	/	/	0	34	1	0	3
	S	/	/	25	14	39	52	59
Kanamycin/Cephalexin	R	8	0	2	/	9	0	0
	I	0	0	0	/	0	0	0
	S	82	62	66	/	33	54	69
Marbofloxacin	R	9	0	10	2	0	0	0
	I	3	0	0	4	0	0	0
	S	78	62	58	46	42	54	69
Oxacillin	R	/	/	7	35	0	0	0
	I	/	/	0	0	0	0	0
	S	/	/	61	17	42	54	69
Penicillin G	R	/	/	12	0	0	0	0
	I	/	/	0	0	0	0	0
	S	/	/	56	52	42	54	69
Pirlimycin	R	/	/	43	/	1	6	17
	I	/	/	0	/	0	0	0
	S	/	/	25	/	41	48	52

n: Anzahl der Isolate, R: resistent, I: intermediär, S: sensibel, /: kein Breakpoint nach CLSI Guidelines M100 und VET08 und Feßler et al. (2017) angegeben bzw. Antibiotikum wird nicht gegen diese Spezies eingesetzt, *: Antibiotikakonzentrationen der MICRONAUT-S Mastitis-3 lassen keine Interpretation zu

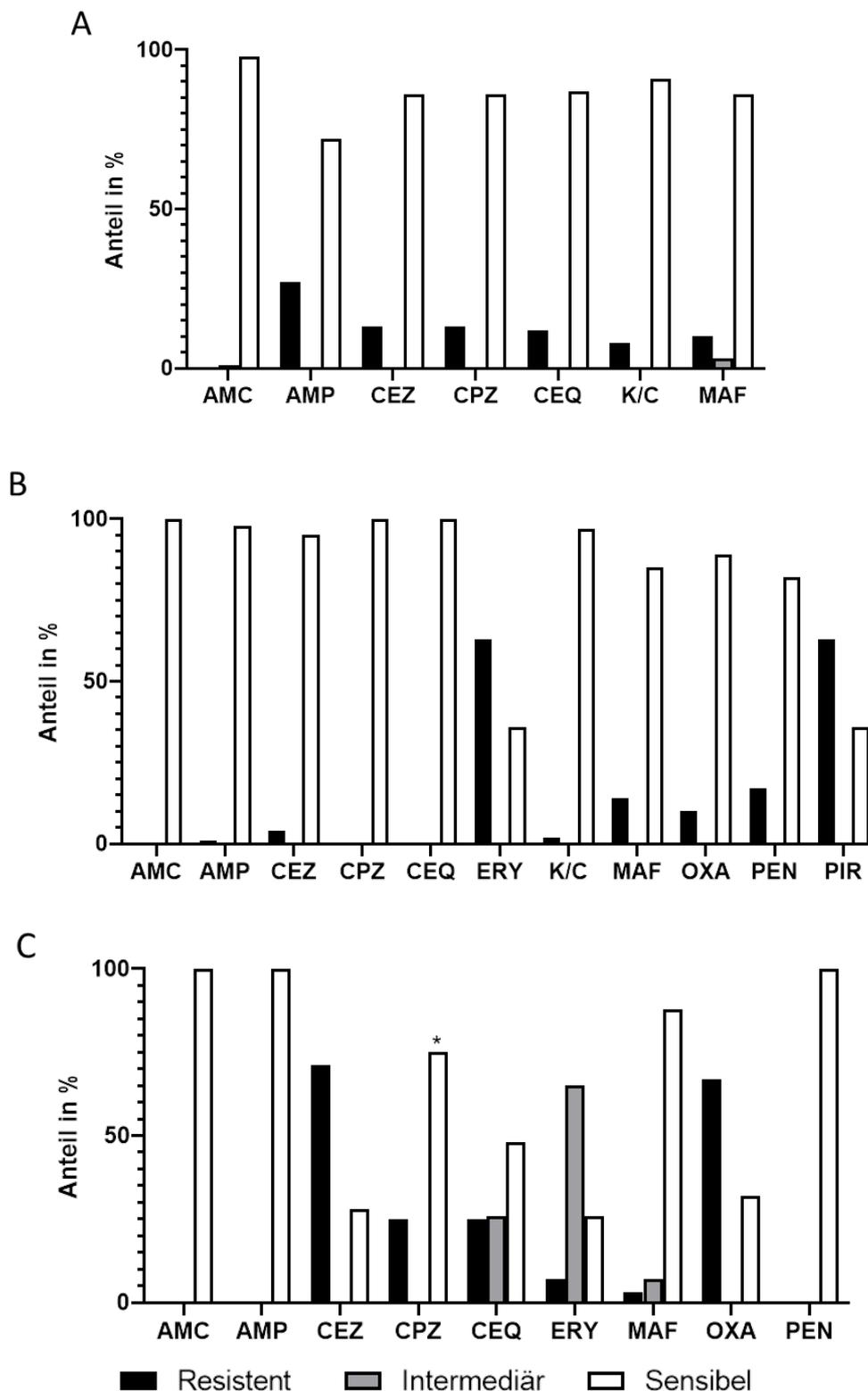


Abb. 6: Grafische Darstellung der Resistenzverteilung

Prozentuale Anteile der resistenten (schwarz), intermediären (grau) und sensiblen (weiß) Isolate an den gesamten Isolaten von *E. coli* (A), *S. aureus* (B) und *Enterococcus* spp. (C) gegen die getesteten Antibiotika AMC (Amoxicillin/Clavulansäure), AMP (Ampicillin), CEZ (Cefazolin), CPZ (Cefoperazon), CEQ (Cefquinom), ERY (Erythromycin), K/C (Kanamycin/Cephalexin), MAF (Marbofloxacin), OXA (Oxacillin), PEN (Penicillin G) und PIR (Pirlimycin), *: Antibiotikabeschichtung erlaubt keine eindeutige Interpretation zwischen sensibel und intermediär

4.1. Sequenzanalyse ausgewählter Isolate

Ein Teil der auch im Silicone-Disc-Assay untersuchten Isolate wurde zusätzlich mittels Gesamtgenomsequenzierung untersucht. Dabei lag der Fokus vor allem auf den Spezies *E. coli* und *S. aureus*, um eine Gram-positive und eine Gram-negative Spezies abzubilden. Weiterhin wurde das Spektrum um 8 *S. dysgalactiae*-Isolate erweitert, um auch die in der bovinen Mastitis relevanten Streptokokken abbilden zu können. Die erhaltenen Ergebnisse lassen sich Tab. 16 entnehmen. Die identifizierten Antibiotika-Resistenzgene wurden mittels NCBI Blastx kontrolliert und auf eventuelle Sequenzunterschiede hin untersucht. Die Annotierungen der Genome wurde auf zusätzlich vorhandene antimikrobielle Resistenzgene geprüft. Dabei wurde besonders auf Diskrepanzen zwischen phänotypisch und genotypisch nachgewiesenen Resistenzen geachtet. Die beiden *E. coli*-Isolate IMT37484 und IMT37431 zeigten phänotypisch keine Resistenzen gegen die getesteten Antibiotika, verfügen jedoch über das Gen *mdfA*. Dieses Gene kodiert einen trans-Membrantransporter, der neben Resistenzen gegen verschiedene lipophile Chemikalien auch Unempfindlichkeiten gegenüber diversen Antibiotika wie Chloramphenicol und Erythromycin vermittelt [231]. Zusätzlich zu den auch mittels MHK-Bestimmung nachgewiesenen Resistenzen konnten im Genom der drei *E. coli*-Isolate IMT37477, IMT38014 und IMT37450 die zwei Varianten von Tetracyclin-Effluxpumpen, *tet(A)* und *tet(B)* nachgewiesen werden [232]. Weiterhin wurden die beiden Gene *strA* und *aph(6)*-Id (entspricht *strB*) in den Isolaten IMT37477 und IMT37450 nachgewiesen, die Resistenzen gegen Aminoglykoside vermitteln [233]. Die Gesamtgenomdaten von IMT37450, IMT37477 und IMT38014 enthalten die Sulfonamid-Resistenzgene *sul1*, *sul2* und *sul3*.

Die MRSA-Isolate IMT37556, IMT38253 und IMT38254 verfügen zusätzlich zu *mecA*, welches die Oxacillin-Resistenz vermittelt, über Gene für die Tetracyclin-Effluxpumpen Tet(K) und Tet(M). Für IMT37556 konnten phänotypisch Resistenzen gegen Erythromycin und Pirlimycin nachgewiesen werden. Während einer eingehenderen Analyse der Genomdaten konnte in allen *S. aureus*-Isolaten das Gen *mepA* identifiziert werden, das zur multidrug and toxin extrusion (MATE) family gehört und eine Multidrug-Effluxpumpe kodiert [234]. Darüber hinaus konnten für das *S. aureus*-Isolat IMT37547 die Gene *aadK*, das die Resistenz gegen Streptomycin vermittelt [235], und *emrE* –eine weitere Multidrug-Effluxpumpe, identifiziert werden.

Tab. 16: Übersicht über die Gesamtgenom-sequenzierten Isolate

Phänotypischem Resistenzmuster und genotypischen Charakteristika der 22 Isolate

Spezies	Isolat- Nummer	ST	phänotypisches Resistenzmuster ^a	Antimikrobielle Resistenzgene
<i>E. coli</i>	IMT37431	ST-442	/	<i>mdf(A)</i> -like
	IMT37450	ST-410	AMP, MAF	<i>aadA1</i> -like, <i>aph(6)</i> -Id, <i>bla_{TEM-1B}</i> , <i>dfrA1</i> -like, <i>floR</i> -like, <i>mdf(A)</i> -like, <i>strA</i> -like, <i>sul3</i> , <i>tet(A)</i>
	IMT37453	ST-23	AMP, CEZ, CPZ, CEQ	<i>bla_{OXA-1}</i> , <i>bla_{TEM-1A}</i> , <i>catA1</i> -like, <i>dfrA1</i> , <i>floR</i> -like, <i>mdf(A)</i> -like, <i>sul1</i> , <i>sul2</i>
	IMT37459	ST-58	AMP	<i>mdf(A)</i> -like
	IMT37477	ST-446	AMP	<i>aph(6)</i> -Id, <i>bla_{TEM-1B}</i> , <i>floR</i> -like, <i>mdf(A)</i> -like, <i>strA</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i> -like
	IMT37484	ST-2325	/	<i>mdf(A)</i> -like
	IMT38014	ST-88	AMP, K/C	<i>aph(3'')</i> -Ib, <i>aph(3')</i> -Ia, <i>aph(6)</i> -Id, <i>bla_{TEM-1B}</i> , <i>dfrA5</i> , <i>mdf(A)</i> -like, <i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>
<i>S. aureus</i>	IMT18132	ST-97	K/C, MAF	<i>blaZ</i> -like
	IMT37545	ST-479	/	/
	IMT37547	ST-1380	PIR, ERY	/
	IMT37556	ST-398	ERY, PEN, PIR, OXA	<i>blaZ</i> -like, <i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i>
	IMT37632	ST-97	ERY, MAF, K/C, PIR	/
	IMT37695	ST-5	PIR, ERY	/
	IMT38253	ST-398	OXA	<i>blaZ</i> -like, <i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i>
	IMT38254	ST-398	OXA	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i>
<i>S. dysgalactiae</i>	IMT37576	NG	ERY, PIR	<i>tet(O)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>lnu(D)</i> , <i>aadE</i> , <i>cat(pC221)</i> , <i>erm(B)</i>
	IMT37584	NG	/	<i>tet(M)</i>
	IMT37587	NG	/	/
	IMT37590	NG	/	/
	IMT37599	NG	PIR	<i>tet(M)</i> , <i>lnu(B)</i> , <i>aph(3')</i> -III, <i>ant(6)</i> -Ia, <i>aadE</i>
	IMT37601	NG	/	<i>tet(M)</i>
	IMT37602	NG	/	/

ST: Sequenztyp, ^a: nach CLSI Guidelines M100 und VET08 und Feßler et al. 2017, /: kein Nachweis, NG: nicht getestet

Mehrere *S. dysgalactiae*-Isolate zeigten nach dem Ausstrich sowohl Kolonien mit α -Hämolyse (Vergrünung) als auch Kolonien ohne wahrnehmbare Hämolyse. Auch durch Subkultivierung ließ sich keine Kultur mit einheitlicher Hämolyse gewinnen. Um zu bestätigen, dass es sich um ein Isolat mit verschiedenen Morphologien handelte, wurde die DNA jeweils einer Kolonie jedes Phänotyps isoliert und anschließend sequenziert. Die erhaltenen Contigs wurden mittels Geneious 11.1.5 (Biomatters Ltd., Auckland, Neuseeland) zusammengefügt und miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass beide Genome übereinstimmen.

4.2. Biofilm-bildende Eigenschaften

Die Fähigkeit der Isolate, Biofilme zu bilden, wurde in der vorliegenden Arbeit durch zwei unterschiedliche Protokolle verifiziert. Es wurden je 8 Isolate der Mastitis-relevanten Spezies auf ihre Biofilm-bildenden Eigenschaften hin untersucht. Isolate der Genera *Klebsiella* (*K. pneumoniae* und *K. oxytoca*) sowie *Enterococcus* (*E. faecalis* und *E. faecium*) wurden für diese Assays zusammengefasst. Die Isolate wurden vorallem nach ihrem Resistenzmuster (Tab. 15) aber auch –soweit bekannt- nach ihrer zeitlichen und geografischen Verteilung ausgewählt, um ein möglichst breites Spektrum an verschiedenen Pathogenen bei der Testung zu berücksichtigen.

Tab. 17: Herkunft der für die Biofilm-Assays ausgewählten Isolate

Spezies	IMT Nr.	Einsendung	Herkunft
<i>E. coli</i>	IMT37431	2012	Niedersachsen
	IMT37450	2013	Schleswig-Holstein
	IMT37453, IMT37459	2014	Bayern
	IMT37466	2014	Nordrhein-Westfalen
	IMT37477	2015	Sachsen-Anhalt
	IMT37484	unbekannt	unbekannt
	IMT38013	2015	unbekannt
<i>E. faecalis</i>	IMT37502	unbekannt	Brandenburg
	IMT37912, IMT37913, IMT37914, IMT38030, IMT38031	2015	unbekannt
<i>E. faecium</i>	IMT38034, IMT38033	2015	unbekannt
	IMT37501	2011	unbekannt
<i>K. oxytoca</i>	37533	unbekannt	unbekannt
<i>K. pneumoniae</i>	IMT37911, IMT38017, IMT38020	2015	unbekannt
	IMT10809	2005	unbekannt
	IMT37624	2013	Niedersachsen
	IMT37625	2015	Bayern
<i>S. agalactiae</i>	IMT37615	2015	Sachsen-Anhalt
	IMT38021, IMT38022, IMT38023, IMT38025, IMT38025, IMT38026, IMT38028	2015	unbekannt
<i>S. aureus</i>	IMT18132	2009	unbekannt
	IMT37545	2013	Schleswig-Holstein
	IMT37547	2014	Bayern
	IMT37556	2015	Sachsen-Anhalt
	IMT37632	2010	Mecklenburg- Vorpommern
	IMT37695	2012	Niedersachsen
	IMT38253, IMT38254	2015	unbekannt

Spezies	IMT Nr.	Einsendung	Herkunft
<i>S. dysgalactiae</i>	IMT37576	2013	Bayern
	IMT37584	2013	Nordrhein-Westfalen
	IMT37587	2013	Schleswig-Holstein
	IMT37590	2014	Niedersachsen
	IMT37599, IMT37601	2015	Bayern
	IMT37602	2015	Sachsen-Anhalt
<i>S. uberis</i>	IMT37568, IMT37572	unbekannt	unbekannt
	IMT37640, IMT37641	2012	Niedersachsen
	IMT37661, IMT37662, IMT37663	2014	Bayern
	IMT37675	2015	Sachsen-Anhalt

4.2.1. Kristallviolett-Assay

Zunächst wurden jeweils acht *E. coli*- und *S. aureus*-Isolate sowie zusätzlich zwei *S. epidermidis*-Referenzstämme im Kristallviolett-Assay untersucht. In diesem Verfahren wird der Biofilm durch Kristallviolett angefärbt und die optische Dichte ermittelt. Die grafische Darstellung der Ergebnisse aus drei unabhängigen Testungen nach Abzug der unbeimpften Kontrolle lässt sich Abb. 7 entnehmen. Die beiden *S. epidermidis*-Referenzstämme ATCC12228 und RP62A bildeten einen Biofilm mit einer mittleren OD_{550nm} unter 0,2. Für das *E. coli*-Isolat IMT37484 ließ sich mit einer ermittelten OD_{550nm} von 0,35 der stärkste Biofilm von allen getesteten Isolaten nachweisen. Das zu den MDR *E. coli* gehörende Isolat IMT37453 bildete den schwächsten Biofilm unter den untersuchten *E. coli*-Isolaten aus ($OD_{550nm} = 0,158$). Die OD_{550nm} der übrigen sechs getesteten *E. coli*-Isolate lagen in einem sehr ähnlichen Bereich zwischen OD_{550} 0,214 und 0,264.

Für die beiden *S. aureus*-Isolate IMT18132 ($OD_{550nm}=0,227$) und den MRSA IMT37556 ($OD_{550nm}=0,238$) ließen sich die stärksten Biofilme im Kristallviolett-Assay nachweisen. Die restlichen sechs *S. aureus*-Isolate bildeten vergleichsweise geringere Biofilme, mit einer mittleren OD_{550nm} von 0,14.

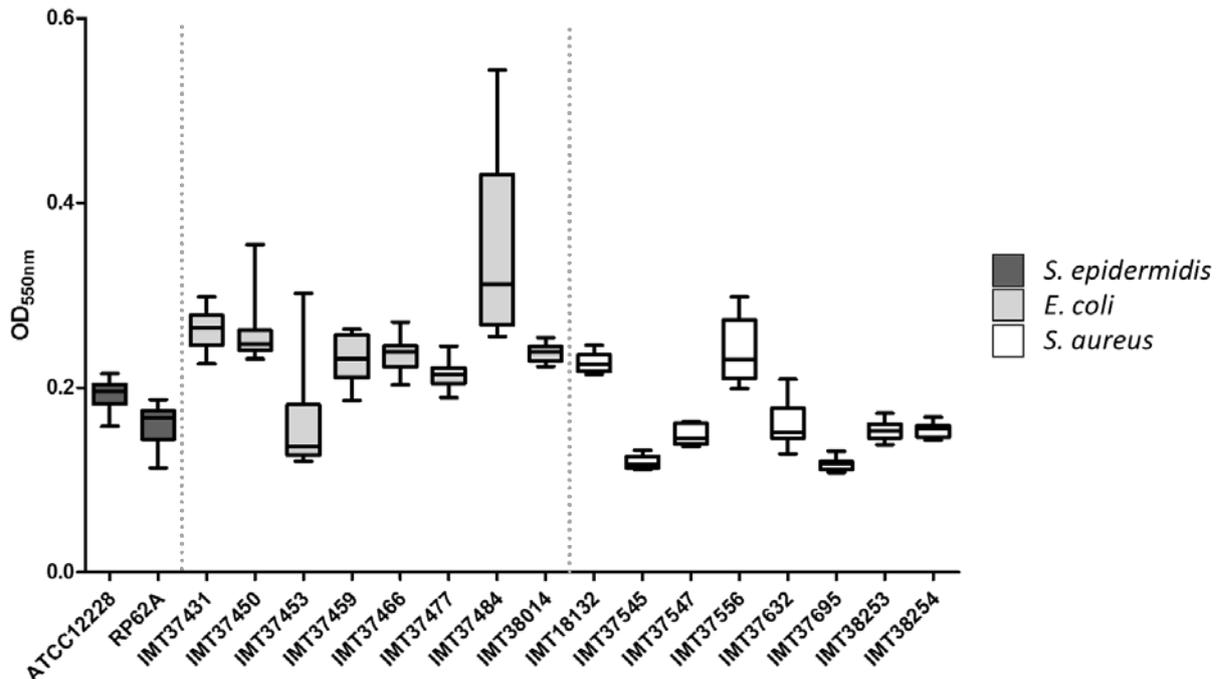


Abb. 7: Grafische Auswertung des Kristallviolett-Assays

Vergleich der normalisierten OD_{550nm} nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 150 rpm im Schüttelinkubator in 96-Well-Platten, Darstellung als Box-Plot: Mediane (zentrale Linie), mittlere Quantile (Box), 10. und 90. Perzentil (Whiskers), Mittelwerte aus drei unabhängigen Replikaten mit Standardabweichungen aufgetragen

Generell wiesen viele Isolate in den drei Replikaten des Kristallviolett-Assay hohe Standardabweichungen auf. Dies galt insbesondere für die *E. coli*-Isolate IMT37450, IMT37453 und IMT37484. Eine Übersicht über die ermittelten Mittelwerte der OD_{550nm} mit den jeweiligen Standardabweichungen ist in Tab. 18 aufgeführt.

Tab. 18: Übersicht der Ergebnisse des Kristallviolett-Assays

Spezies	Isolat	Mittelwert OD _{550nm}	Standardabweichung
<i>E. coli</i>	IMT37431	0,264	0,022
	IMT37450	0,257	0,032
	IMT37453	0,158	0,051
	IMT37459	0,231	0,026
	IMT37466	0,237	0,020
	IMT37477	0,214	0,015
	IMT37484	0,350	0,103
	IMT38014	0,238	0,009
<i>S. aureus</i>	IMT18132	0,227	0,010
	IMT37545	0,119	0,007
	IMT37547	0,148	0,011
	IMT37556	0,238	0,034
	IMT37632	0,160	0,023
	IMT37695	0,116	0,007
	IMT38253	0,153	0,010
	IMT38254	0,154	0,008
<i>S. epidermidis</i>	RP62A	0,160	0,022
	ATCC12228	0,193	0,015

Die fluoreszierende Eigenschaft von Kristallviolett wurde zudem genutzt, Biofilme mittels Konfokalmikroskopie (engl. Confocal laser scanning microscopy, CLSM) zu untersuchen und Rückschlüsse auf die Natur der Biofilmbestandteile zu ziehen, die durch diesen Farbstoff angefärbt werden. In Abb. 8 sind die filamentartigen Strukturen des ausgebildeten Biofilms nach der Färbung mit Kristallviolett mit Pfeilen markiert.

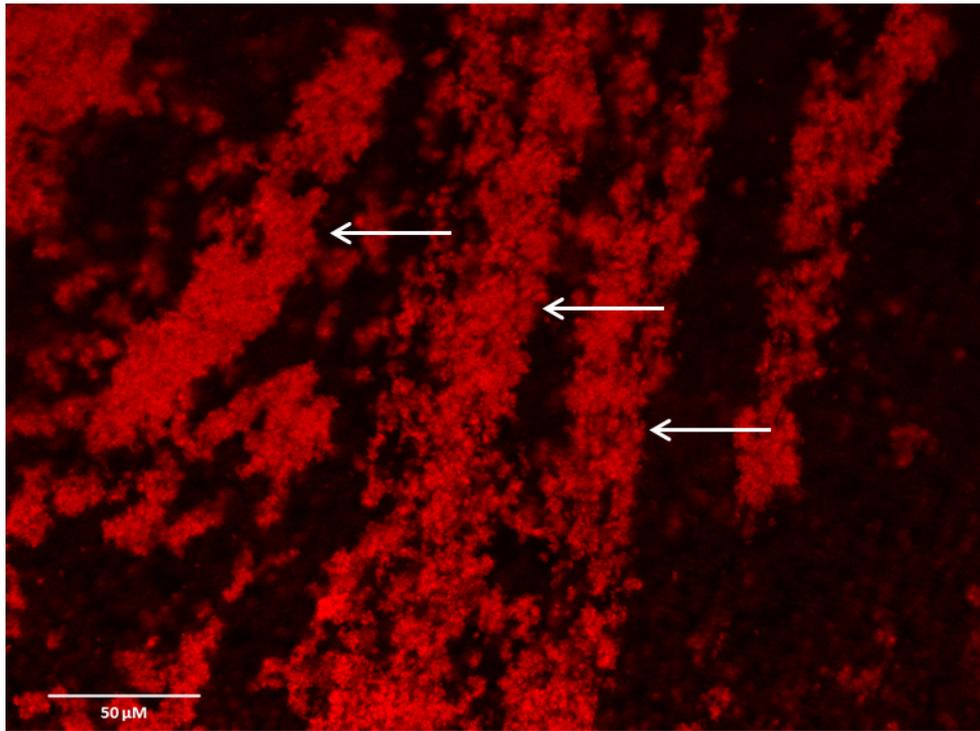


Abb. 8: CLSM-Aufnahme eines *S. epidermidis*-Biofilms, gefärbt mit Kristallviolett

Repräsentativer Ausschnitt eines für 24 h bei 37 °C und 150 rpm auf Glasdeckgläsern kultivierten *S. epidermidis*-Biofilms (ATCC12228), Kristallviolett gefärbte Bereiche in Rot dargestellt, Markierung der filamentartigen Strukturen durch Pfeile, Aufnahme in 20x Vergrößerung

In einem weiteren Versuch sollte näher untersucht werden, welche Bestandteile von Biofilmen durch Kristallviolett angefärbt werden. Dazu wurde ein Biofilm des *S. epidermidis*-Referenzstamms ATCC12228 angezchtet und neben Kristallviolett (Abb. 9C) mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt, die an unterschiedliche, definierte Matrixbestandteile binden. So konnten in diesem Versuch α -D-Mannose und α -D-Glucose mit Concanavalin A (Abb. 9A), Proteine mit Sypro Orange (Abb. 9B) und DNA mit DAPI (Abb. 9D) des Biofilms gefärbt werden.

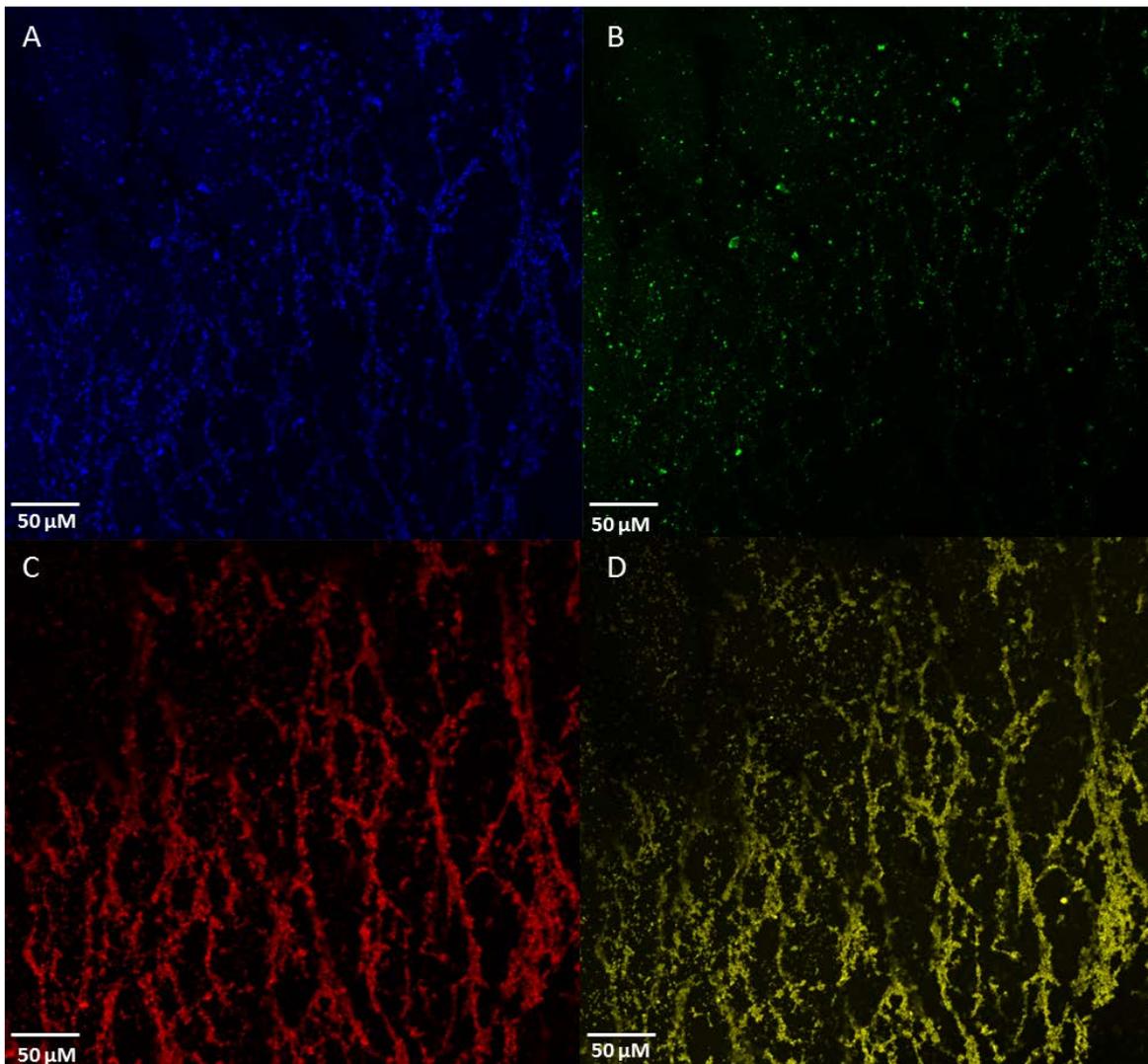


Abb. 9: CLSM-Aufnahme der einzelnen Matrixbestandteile eines *S. epidermidis*-Biofilms

Repräsentativer Ausschnitt eines 24 h angezogenen *S. epidermidis*-Biofilms (ATCC12228). Färbung von α -D-Mannose und α -D-Glucose (Concavalin A) (A), Proteine (Sypro Orange) (B), DNA (DAPI) (C) und Kristallviolett-bindenden Komponenten (C) und DNA (D), Aufnahmen in 63x Vergrößerung

In Abb. 10 sind die übereinandergelegten Fluoreszenzaufnahmen der vier eingesetzten Farbstoffe gezeigt. Dadurch lassen sich Bereiche erkennen in denen die Signale der Matrixspezifischen Farbstoffe mit dem Signal von Kristallviolett kolokalisieren.

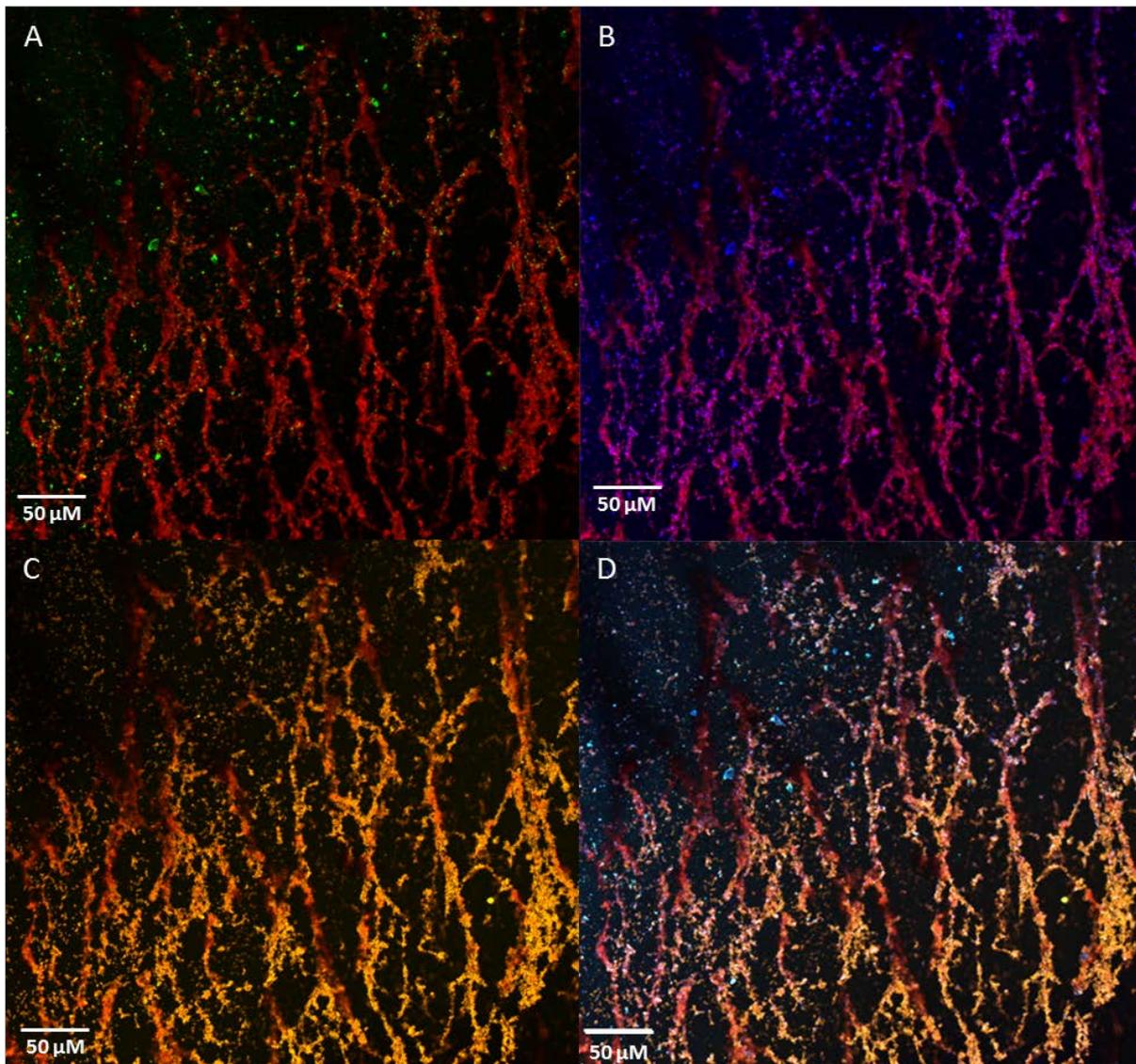


Abb. 10: Übereinander gelegte CLSM-Aufnahme der Matrix eines *S. epidermidis*-Biofilms

Repräsentativer Ausschnitt eines 24 h kultivierten *S. epidermidis*-Biofilms (ATCC12228), übereinander gelegte Fluoreszenzaufnahmen verschiedener Biofilmkomponenten und der Kristallviolett-Färbung einer Mehrfachfärbung, zusammengefügte Aufnahmen jeweils von Kristallviolett und Proteine (A), α -D-Mannose und α -D-Glucose (B), DNA (C), allen gefärbten Komponenten (D), Aufnahmen in 63x Vergrößerung

4.2.2. Etablierung des Silicone-Disc-Assays

Neben der Charakterisierung der Biofilm-bildenden Eigenschaften durch den Kristallviolett-Assay wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Silicone-Disc-Assay als neuer Biofilm-Assay etabliert. Neben den im Kristallviolett-Assay untersuchten *E. coli*- und *S. aureus*-Isolaten wurden auch je 8 Isolate der anderen ausgewählten Mastitiserreger unter Verwendung von Silikoncoupons (5mm Durchmesser) analysiert. Dabei wurden die eng miteinander verwandten *Klebsiella*- und *Enterococcus*-Spezies jeweils zusammengefasst. Die neue Methode wurde in drei unabhängigen Replikaten je Isolat durchgeführt und evaluiert. Für das final etblierte Protokoll wurde eine Übernachtkultur auf ca. 10^5 KbE/ml in BHI-Medium verdünnt. In einer 24-Well Platte wurden Silikoncoupons (bess medizintechnik GmbH, Berlin, Deutschland) mit einem Durchmesser von 5 mm und einer Fläche von $19,635 \text{ mm}^2$ platziert. Es wurde 1 ml der verdünnten Übernachtkultur vorsichtig auf die Silikoncoupons gegeben um das Ablösen der Coupons vom Boden der Wells zu verhindern. Die Inkubation erfolgte über 24 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ unter leichtem Schütteln bei 150 rpm. Anschließend wurden nicht-adhärenente Bakterien durch einmaliges Waschen der Coupons in ddH₂O entfernt und diese in 500 μl Phosphatpuffer überführt. Der Biofilm wurde in einem Ultraschallbad (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland) bei einer Intensität von 100 % über 10 min von der Oberfläche gelöst. Anschließend wurde die KbE/Coupon der abgelösten Bakterien-suspensionen mittels Drop-Plating auf LB-Agar bestimmt [212].

Für die als sehr gute Biofilmbildner bekannten Referenzstämme *P. aeruginosa* DSM939 und PAO1 und *S. epidermidis* RP62A ergaben sich mittlere KbE/Coupon von $7,2 \times 10^7$, $2,5 \times 10^8$ und $2,1 \times 10^7$. Diese Werte wurden zur Definition eines starken Biofilmbildners ab einer KbE/Coupon von 1×10^7 herangezogen. Für den als Biofilm negativen beschriebenen Stamm ATCC12228 ergab sich eine mittlere KbE/Coupon von $4,7 \times 10^6$. Die grafische Auswertung für die getesteten Referenzstämme ist in Abb. 11 gezeigt.

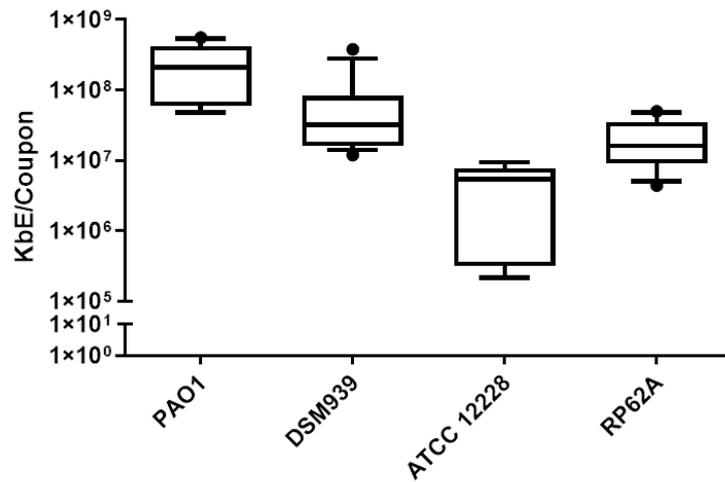


Abb. 11: Auswertung des Silicone-Disc-Assays der Referenzstämme

Vergleich der KbE je Coupon (5 mm Durchmesser) nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 150 rpm, Darstellung als Box-Plot: Mediane (Linie), mittlere Quantile (Box), 10. und 90. Perzentil (Whiskers), Ergebnisse aus drei unabhängigen Replikaten

In Abb. 12 sind die Ergebnisse für alle 8 *E. coli*- und *Klebsiella* spp.-Isolate dargestellt. Unabhängig von der Spezies bildeten die meisten Isolate einen Biofilm mit einer KbE/Coupon von über 1×10^6 . Die *E. coli*-Isolate IMT37431, IMT37450 und IMT38014 und *K. oxytoca* IMT37533 wurden dabei mit einer KbE/Coupon von über 1×10^7 als starke Biofilmbildner identifiziert.

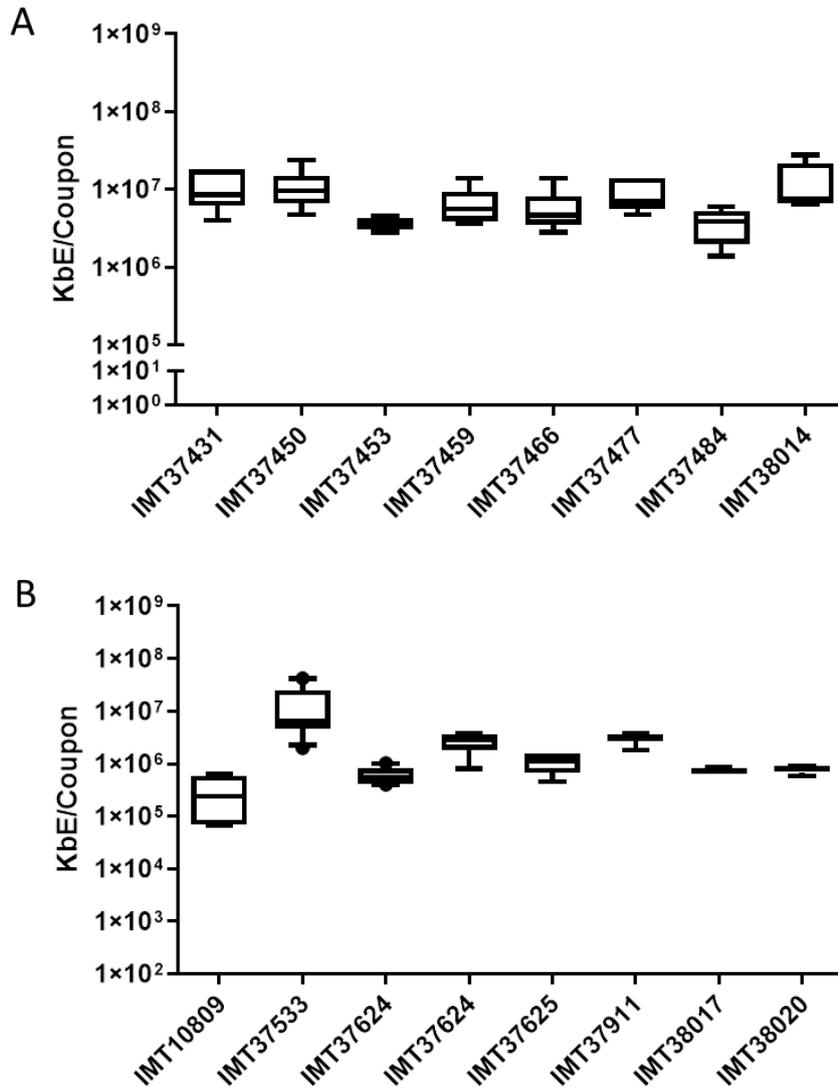


Abb. 12: Auswertung des Silicone-Disc-Assays für *E. coli* und *Klebsiella* spp.

Vergleich der KbE je Coupon (5 mm Durchmesser) nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 150 rpm, Darstellung als Box-Plot: Mediane (Linie), mittlere Quantile (Box), 10. und 90. Perzentil (Whiskers), *E. coli*-Isolate (A), *Klebsiella* spp.-Isolate (B), Ergebnisse aus drei unabhängigen Replikaten

Die untersuchten *Streptococcus* spp. bildeten generell einen geringeren Biofilm aus. Lediglich für das Isolat IMT37615 der Spezies *S. agalactiae* konnte eine KbE/Coupon von über 1×10^7 nachgewiesen werden (Abb. 13).

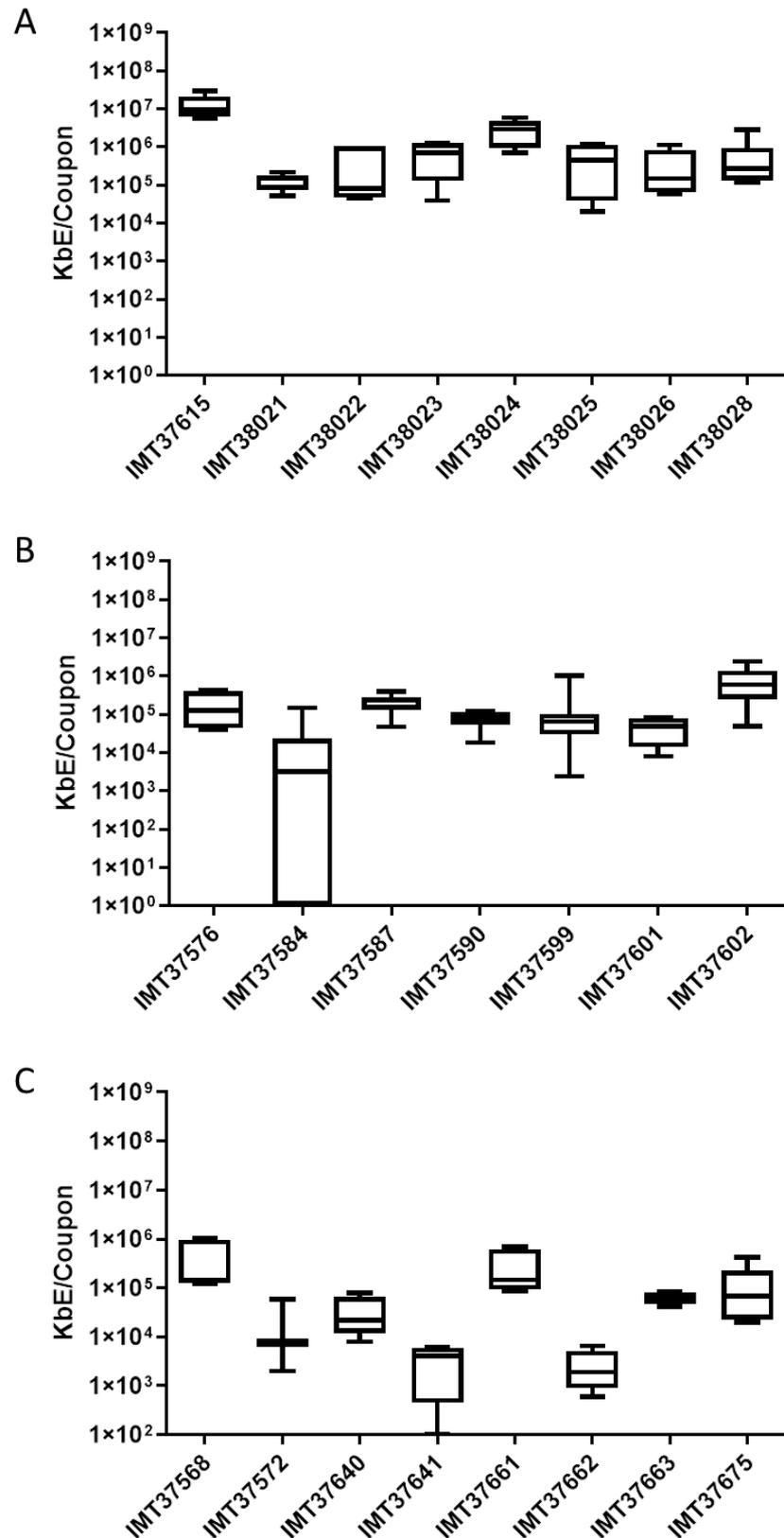


Abb. 13: Auswertung des Silicone-Disc-Assays für die *Streptococcus* spp.

Vergleich der KbE je Coupon (5 mm Durchmesser) nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 150 rpm, Darstellung als Box-Plot: Mediane (Linie), mittlere Quantile (Box), 10. und 90. Perzentil (Whiskers), *S. agalactiae*-Isolate (A), *S. dysgalactiae* (B) und *S. uberis* (C), Ergebnisse aus drei unabhängigen Replikaten

Bei den untersuchten drei untersuchten Isolaten der *Streptococcus* spp. trat besonders häufig eine Autoaggregation auf. Dabei hafteten die Bakterien verstärkt aneinander und nicht an der Silikonoberfläche (Abb. 14.).

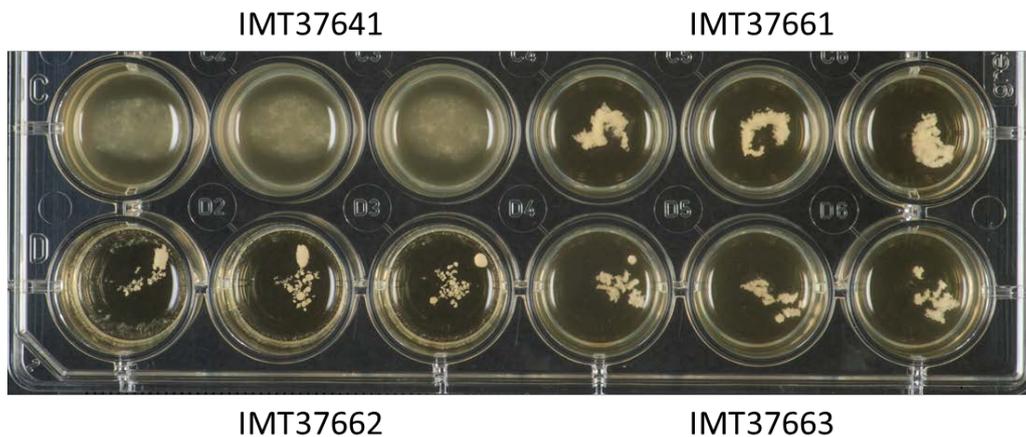


Abb. 14: Autoaggregation verschiedener Streptokokkenisolate im Silicone-Disc-Assay

Streptococcus-Isolate nach 24 h Inkubation unter leichtem Schütteln (150 rpm) bei 37 °C auf Silikon-coupons, Ausbildung eines schwachen Biofilms und verstärkte Aggregation aneinander

Die getesteten *S. aureus*-Isolate ließen sich in zwei Gruppen unterteilen, mit Biofilmen über ($n=3$) und unter 1×10^7 KbE/Coupon ($n=5$). Die niedrigste bestimmte KbE/Coupon lag bei $3,3 \times 10^6$ (IMT37632) und die höchste ermittelte KbE/Coupon bei $2,0 \times 10^7$ (IMT18132) (Abb. 15).

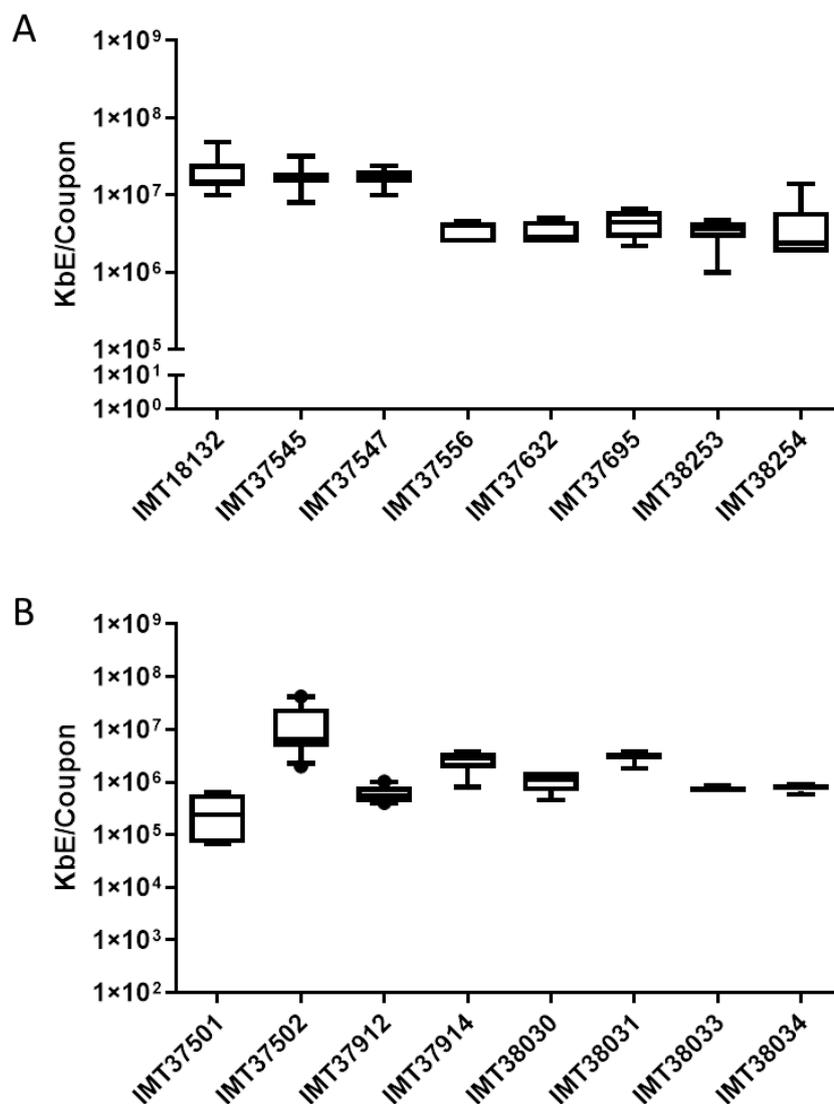


Abb. 15: Auswertung des Silicone-Disc-Assays für *S. aureus* und *Enterococcus* spp.

Vergleich der KbE je Coupon (5 mm Durchmesser) nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 150 rpm, Darstellung als Box-Plot: Mediane (Linie), mittlere Quantile (Box), 10. und 90. Perzentil (Whiskers), *S. aureus*-Isolate (A) und *Enterococcus* spp. (B), Ergebnisse aus drei unabhängigen Replikaten

Der Silicone-Disc-Assay lies deutliche Unterschiede in den Biofilm-bildenden Eigenschaften zwischen den getesteten Spezies erkennen (Abb. 16). Die analysierten Enterobakterien *E. coli* und *Klebsiella* spp. sowie *S. aureus* zeigten hier eine besonders dicht bewachsene Couponoberfläche. Für die 8 *E. coli*-Isolate betrug der Mittelwert $7,8 \times 10^6$ KbE/Coupon und für die *Klebsiella* spp. $1,0 \times 10^7$ KbE/Coupon. Zwischen den 8 getesteten *S. aureus*-Isolaten schwankte die Fähigkeit, einen Biofilm auszubilden mit KbE/Coupon zwischen $3,3 \times 10^6$ und $2,0 \times 10^7$. Der Mittelwert betrug hier $3,3 \times 10^6$ KbE/Coupon.

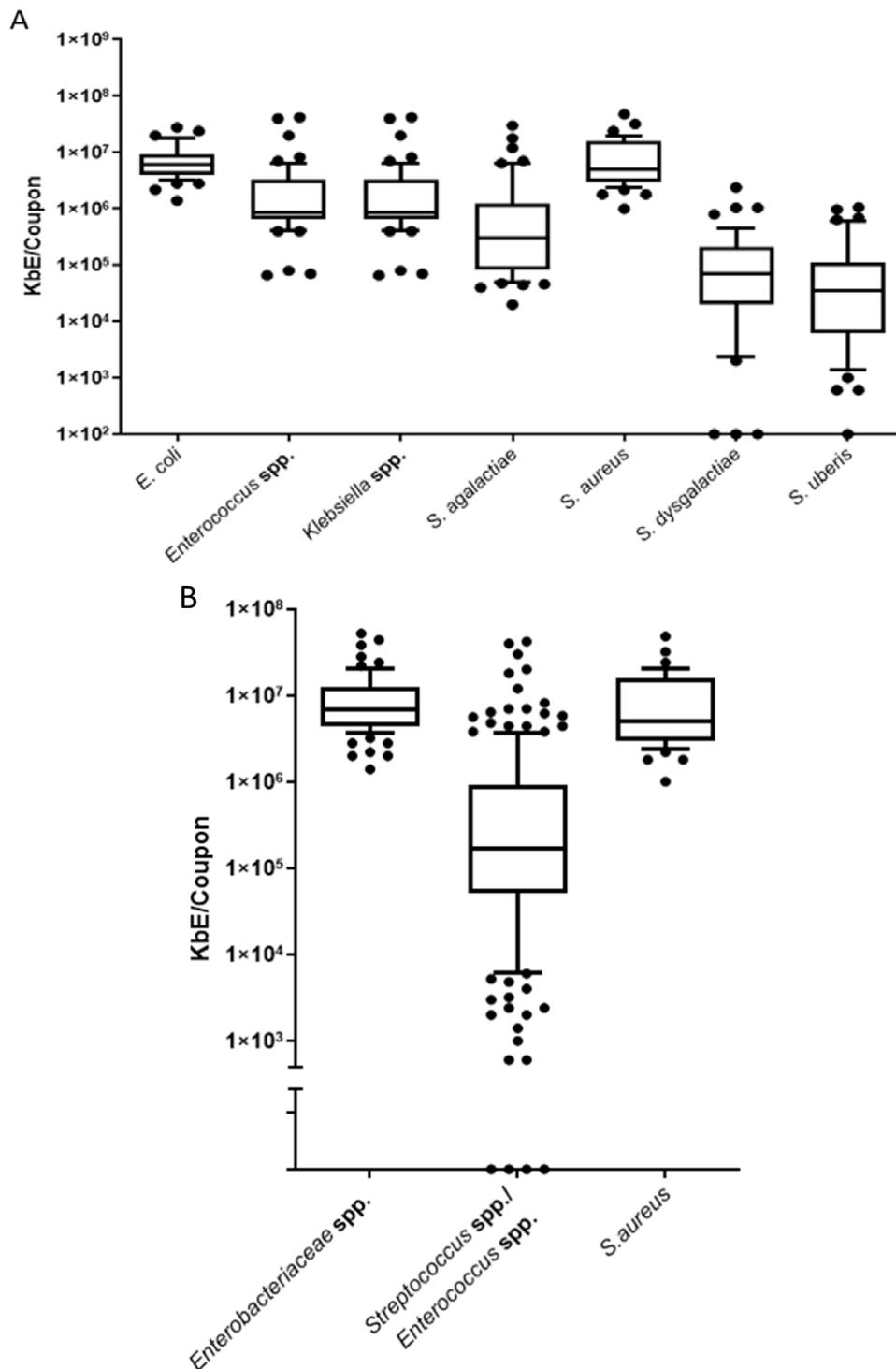


Abb. 16: Vergleich der Biofilm-bildenden Eigenschaft unterschiedlicher Mastitis-Erreger

Vergleich der KbE/Coupon (5 mm Durchmesser) nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 150 rpm, Darstellung als Box-Plot: Medians (Linie), mittlere Quantile (Box), 10. und 90. Perzentil (Whiskers), Ausreißer (Punkte), alle getesteten Isolate je Spezies zusammengefasst, Mittelwerte der KbE/Coupon: *E. coli* ($7,8 \times 10^6$), *Enterococcus spp.* ($6,0 \times 10^5$, *E. faecalis* und *E. faecium*), *Klebsiella spp.* ($1,0 \times 10^7$, *K. pneumoniae* und *K. oxytoca*), *S. agalactiae* ($5,4 \times 10^5$), *S. aureus* ($9,5 \times 10^6$), *S. dysgalactiae* ($8,0 \times 10^4$), *S. uberis* ($1,2 \times 10^5$) (A); zusammengefasste Mittelwerte der KbE/Coupon: *Enterobacteriaceae spp.* ($9,6 \times 10^6$, *E. coli* und *Klebsiella spp.*), *Staphylococcus spp.* ($9,5 \times 10^6$), *Streptococcus* und *Enterococcus spp.* ($9,4 \times 10^5$) (B)

Sowohl die Enterokokken als auch die Streptokokken bildeten einen vergleichsweise schwachen Biofilm mit einer mittleren KbE/Coupon von $9,4 \times 10^5$. Die beiden analysierten Enterokokkenspezies *E. faecium* und *E. faecalis* wiesen eine mittlere KbE/Coupon von $6,0 \times 10^5$, *S. agalactiae* von $5,4 \times 10^5$ und *S. uberis* von $1,2 \times 10^5$ auf. Von den untersuchten Spezies bildete *S. dysgalactiae* mit $8,0 \times 10^4$ KbE/Coupon den geringsten Biofilm.

Um einen Überblick über die Verteilung der Bakterien auf den Silikoncoupons zu erhalten wurden ausgewählte Isolate nach der Inkubation auf den Coupons mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) untersucht. Dabei konnte für *E. coli* IMT38014 und *S. aureus* IMT37556 nach der Inkubationszeit die Ausbildung erster Aggregate nachgewiesen werden (Abb. 17 und Abb. 18). In der 10000x Vergrößerung waren bei beiden Isolaten auch erste Strukturen erkennbar, die die Bakterien einhüllten und miteinander verbanden (Abb. 17 und Abb. 18, jeweils Bildausschnitt C). Darüber hinaus bildeten sich erste Strukturen der Biofilmarchitektur. *E. faecalis* IMT37502 wies eine besonders homogene Verteilung auf dem Silikoncoupon auf (Abb. 19A). Die Bakterien lagerten sich zu kurzen Ketten zusammen und waren ebenfalls von einer Hüllstruktur umgeben (Abb. 19C).

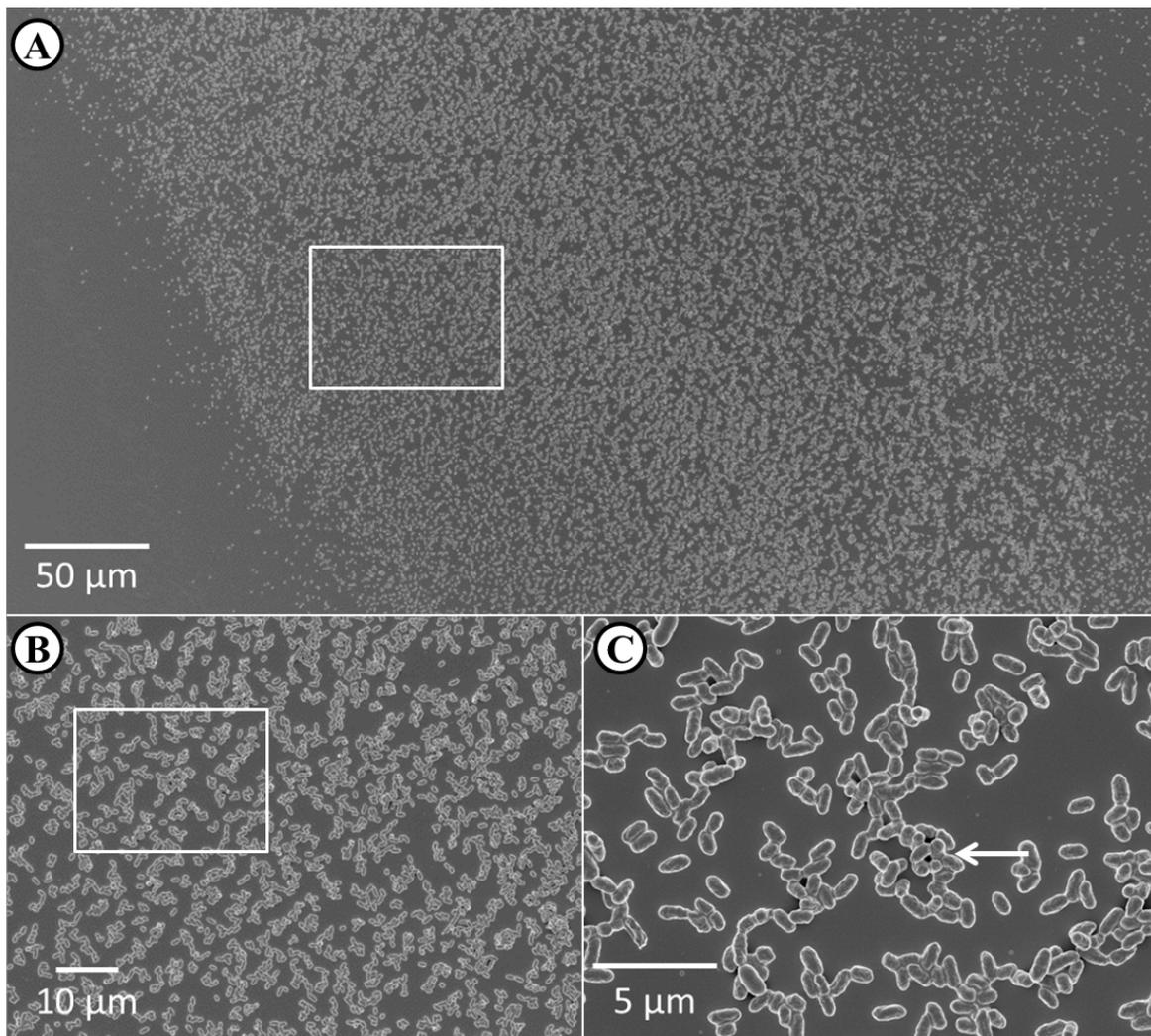


Abb. 17: REM-Aufnahmen von Silikoncoupons bewachsen mit *E. coli* IMT38014

Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen nach der Inkubation von IMT38014 für 24 h bei 37 °C und 150 rpm auf Silikoncoupons, Silikoncoupon vollständig von Bakterien bedeckt, 500x Vergrößerung (A), Ausbildung erster Aggregate, 2000x Vergrößerung (B) und kapsel-artige Hüllstrukturen (Pfeil), 10000x Vergrößerung (C).

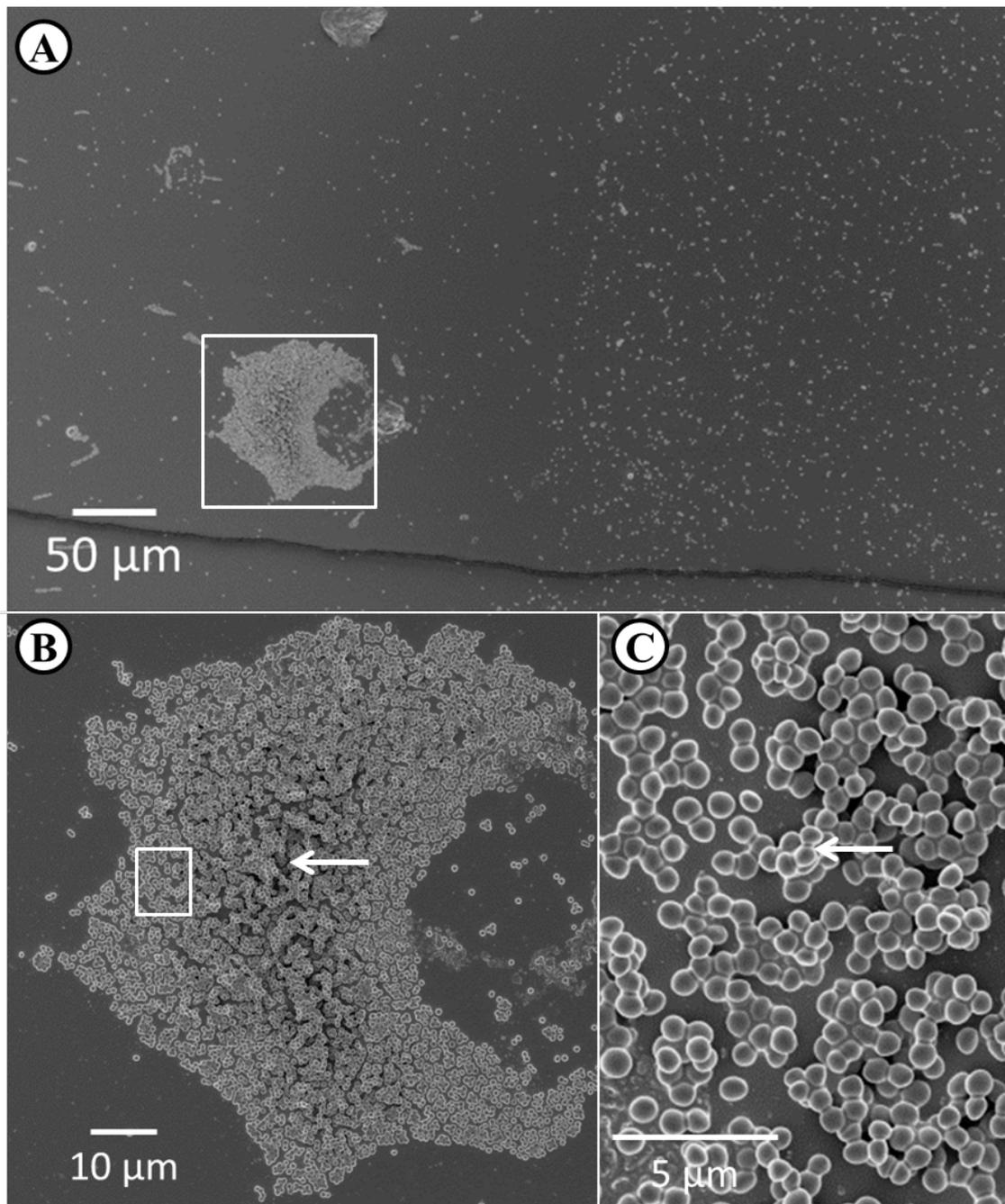


Abb. 18: REM-Aufnahmen von Silikoncoupons bewachsen mit *S. aureus* IMT37556

Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen nach der Inkubation von IMT37556 für 24 h bei 37 °C und 150 rpm auf Silikoncoupons. Silikoncoupon unregelmäßig von Bakterien bedeckt, 500x Vergrößerung (A), Ausbildung teils deutlich mehrdimensionale Strukturen der Biofilmarchitektur, wie Kanäle aus (Pfeil), 2000x Vergrößerung (B), kompakt gelagerte Bakterien, die über eine Hülle (Pfeil) verbunden sind, 10000x Vergrößerung (C).

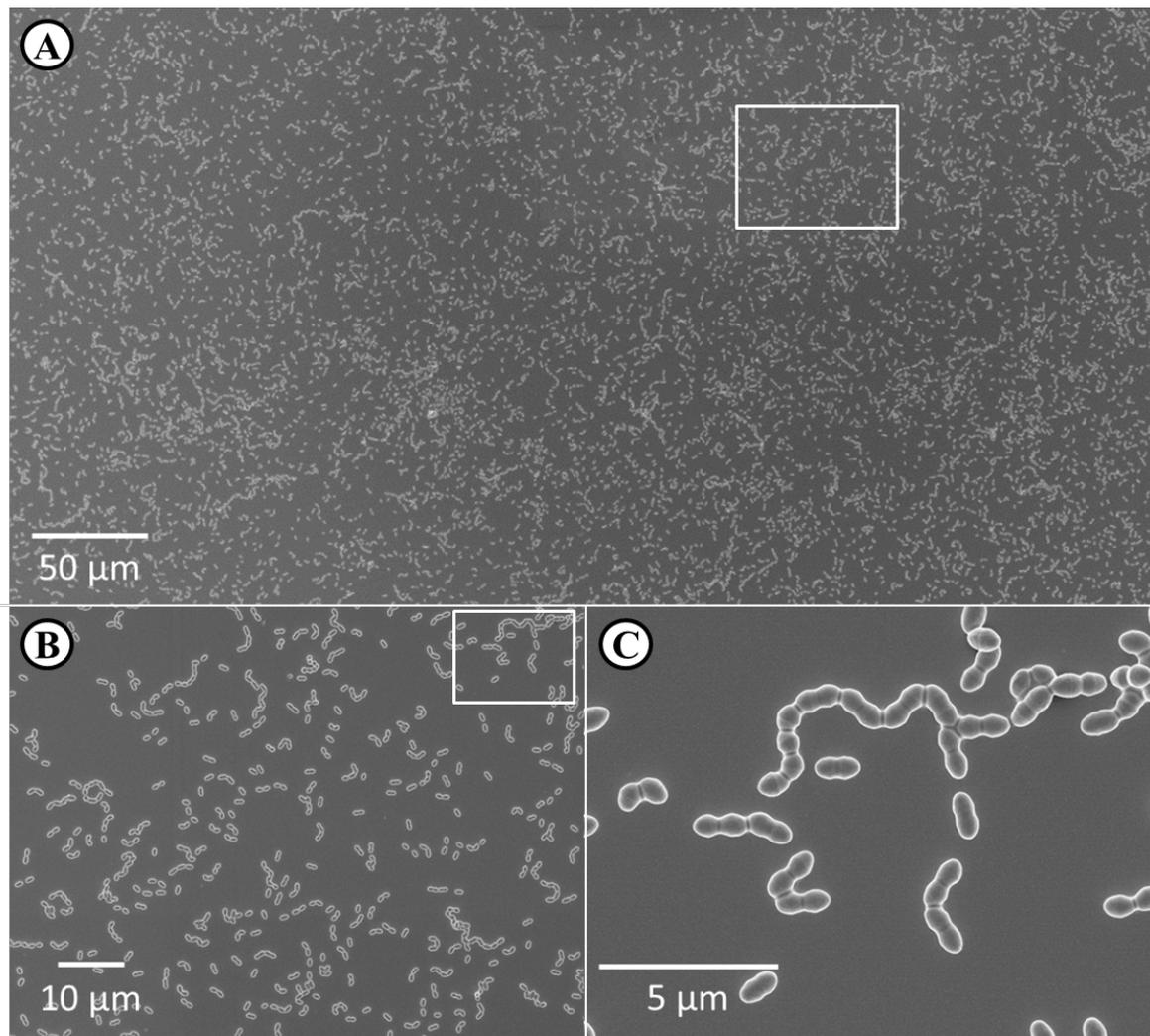


Abb. 19: REM-Aufnahmen von Silikoncoupons bewachsen mit *E. faecalis* IMT37502

Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen nach der Inkubation von IMT37502 für 24 h bei 37 °C und 150 rpm auf Silikoncoupons, Coupon gleichmäßig von Bakterien bedeckt, 500x Vergrößerung (A), Ausbildung erster kleinerer Aggregate, 2000x Vergrößerung (B) und Zusammenlagern zu Ketten 10000x Vergrößerung (C).

Weiterhin wurde der Silicone-Disc-Assay für die Untersuchung von komplexen Multispezies-Biofilmen eingesetzt. Das Drop-Plating zur Bestimmung der Keimzahlen erfolgte dabei auf Chrom-Orientierungsagar. Der Silicone-Disc-Assay für komplexe Biofilme wurde mit Hilfe der bereits im Monospezies-Ansatz getesteten Isolate in zufälligen Kombinationen etabliert. In Abb. 20 sind die Ergebnisse dreier verschiedene Erregerkombinationen dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Kombination IMT37628 (*K. pneumoniae*) und IMT37431 (*E. coli*), im Vergleich zu einer einzelnen Kultivierung der beiden Isolate, eine verringerte Biofilmbildung aufwies. IMT37453 (*E. coli*), und IMT37502 (*E. faecalis*) wurden durch das jeweils andere Isolat nicht in ihrer Biofilmbildung beeinflusst. Für den untersuchten MRSA IMT37556 konnte in der Kombinationstestung mit *E. coli* IMT37453 im Vergleich zu einer

einzelnen Testung dieses Isolats ein reduzierter Biofilm nachgewiesen werden. Bei einer Kokultivierung mit *E. faecalis* IMT37502 veränderte sich die Biofilmbildung im Vergleich zur Einzeltestung des MRSA hingegen nicht.

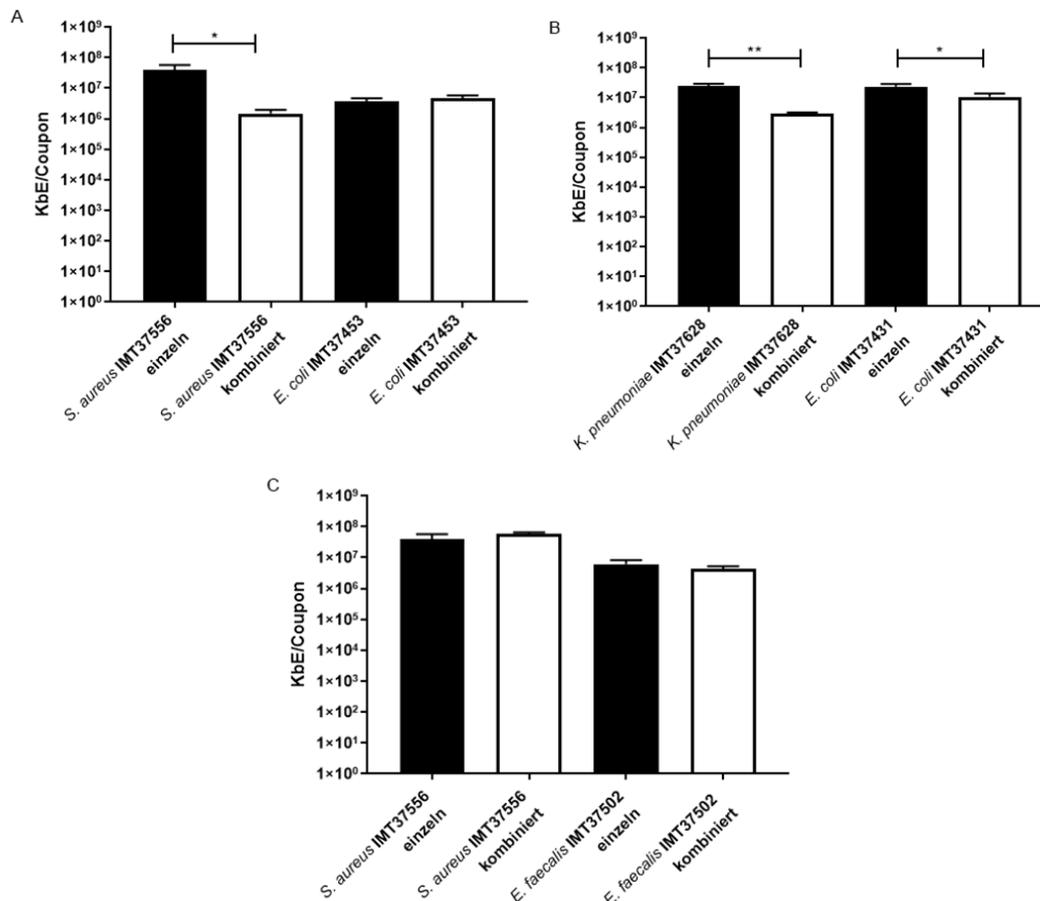


Abb. 20: Biofilm-bildende Eigenschaft ausgewählter Isolate in zufälliger Kombination

Vergleich der KbE je Coupon (5 mm) nach 24 h Inkubation, statistische Analyse mittels T-Test, Mittelwerte der KbE/Coupon der Untersuchungen der Monospeziesbiofilme („einzeln“) sowie der komplexen Biofilme („kombiniert“), Testung von *E. coli* IMT37453 und *S. aureus* IMT37556 (A), Testung von *K. pneumoniae* IMT37628 und *E. coli* IMT37431 (B), Testung von *S. aureus* IMT37556 und *E. faecalis* IMT37453 (C), statische Analyse mittels t-Test für unverbundene Stichproben in 3 unabhängigen Replikaten

Nach der erfolgreichen Etablierung des Protokolls wurden komplexe Biofilme aus Isolaten, die aus derselben Milchprobe stammen, getestet. Dadurch konnten Bakteriengemeinschaften analysiert werden, die sich bereits ein gemeinsames Habitat geteilt hatten. Einige Isolate (*E. coli* IMT37442 und *K. pneumoniae* IMT37620, *S. uberis* IMT37650 und *S. aureus* IMT37454) zeigten in den kombinierten Ansätzen ein vergleichbares Wachstum wie in einem Monospezies-Biofilm (Abb. 21 A und B), während andere Isolate (*S. uberis* IMT37638 und IMT37655) in Anwesenheit anderer Bakterien (*S. aureus* IMT37698 und *E. coli* IMT37454) eine verminderte Biofilmbildung zeigten (Abb. 21 C und D).

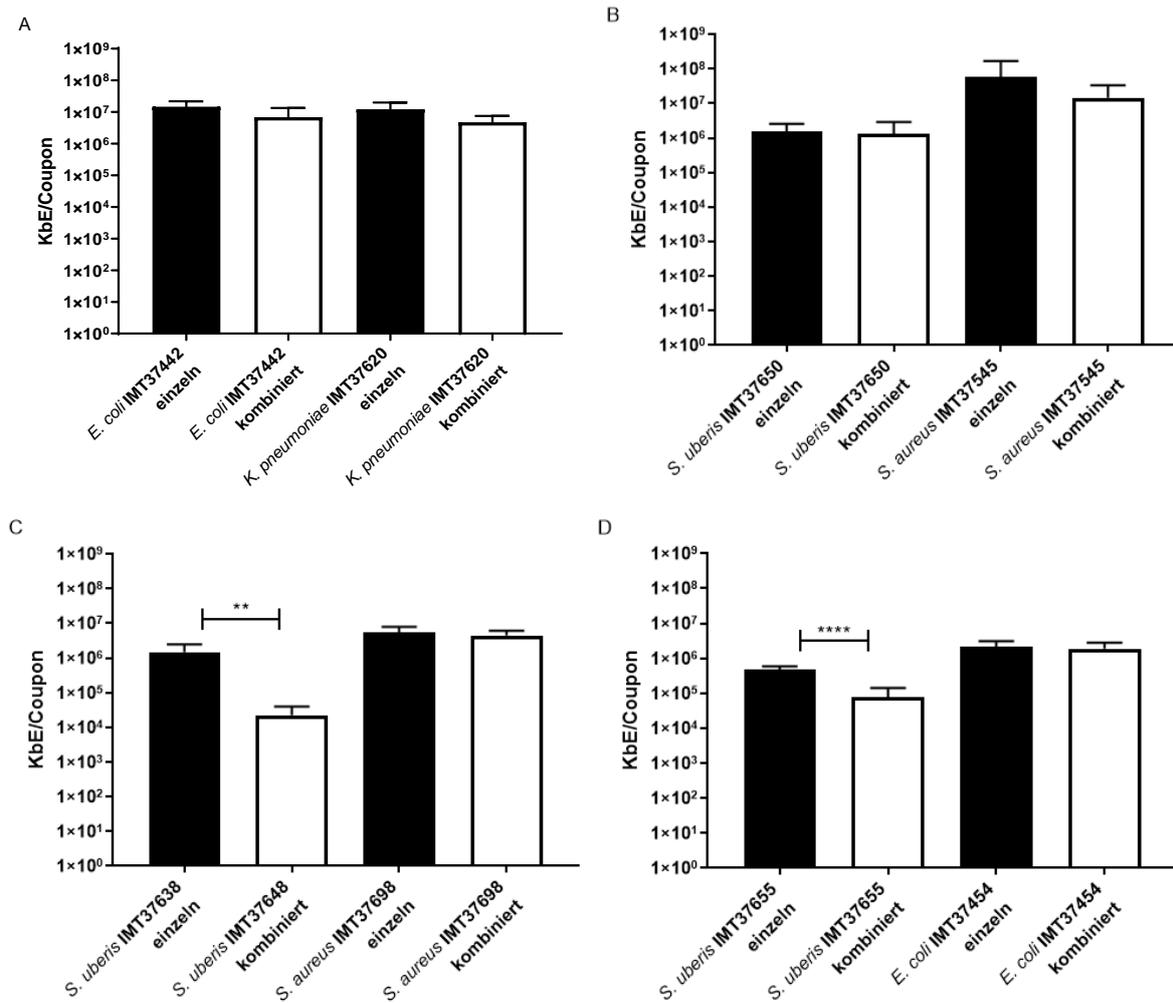


Abb. 21: Biofilm-bildende Eigenschaft ausgewählter Isolate aus einer Milchprobe

Vergleich der KbE je Coupon (5 mm) nach 24 h Inkubation, statistische Analyse mittels T-Test, Mittelwerte der KbE/Coupon der Untersuchungen der Monospeziesbiofilme („einzeln“) sowie der komplexen Biofilme („kombiniert“), Testung von *E. coli* IMT37453 und *S. aureus* IMT37556 (A), Testung von *K. pneumoniae* IMT37628 und *E. coli* IMT37431 (B), Testung von *S. aureus* IMT37556 und *E. faecalis* IMT37453 (C), statistische Analyse mittels t-Test für unverbundene Stichproben in 3 unabhängigen Replikaten

4.3. Testung ausgewählter Antimikrobiell wirksamer Peptide (AMPs)

4.3.1. Minimale Hemmkonzentration (MHK)

Die Testung der MHK für ausgewählte AMP-Erreger-Kombinationen wurde nach dem Protokoll von Wiegand et al. [213] durchgeführt.

Bei den analysierten Isolaten der projektinternen Stammsammlung handelte es sich um einen multi-resistenten *E. coli* (IMT37453), einen MRSA (IMT37556), ein *K. pneumoniae*- (IMT38020) und ein *E. faecium*-Isolat (IMT38034). Die ermittelten MHK-Werte gegen die genutzten AMPs lassen sich Tab. 19 entnehmen. Insbesondere Protamin und OH-CATH30 zeigten eine starke antimikrobielle Wirkung gegen alle getesteten Mastitisisolate. Für AMP72, AMP126 und Esculentin lagen die ermittelten MHK-Werte hingegen zwischen 250 µg/ml und 500 µg/ml für getesteten Isolate. Die größten Unterschiede der MHK-Werte zwischen den verschiedenen getesteten Isolaten konnten für BMAP-Fragment nachgewiesen werden. Die MHK-Werte lagen für *E. coli* IMT37453 mit 15,6 µg/ml in einem sehr niedrigen Bereich und stiegen auf 125 µg/ml für den MRSA IMT37556 und 250 µg/ml für *E. faecium* IMT38014. Gegen *K. pneumoniae* IMT38020 konnte im dem getesteten Konzentrationsbereich zwischen 1 mg/ml und 8 µg/ml keine antimikrobielle Wirkung von BMAP-Fragment nachgewiesen werden.

Tab. 19: MHK-Werte ausgewählter AMPs gegen Mastitiserreger

Isolate der RemuNa-Stammsammlung, Ergebnisse angegeben in µg/ml

	<i>E. coli</i> IMT37453	<i>S. aureus</i> IMT37556	<i>K. pneumoniae</i> IMT38020	<i>E. faecium</i> IMT38034
AMP72	500	500	500	250
AMP126	500	500	500	250
BMAP-Fragment	15,6	125	>1000	250
Esculentin	250	500	500	250
OH-CATH30	7,8	62,5	15,6	7,8
Protamin	62,5	15,6	62,5	31,3

Ein Überblick über die untersuchten Isolate der IMT-Stammsammlung und der untersuchten Referenzstämme sowie die ermittelten MHK-Werte ist in Tab. 20 gegeben. Gegen die untersuchten *E. coli* und *S. aureus*-Isolate ließen sich Protamin MHK-Werte zwischen 31,3 und 125 µg/ml ermitteln. Die Werte für OH-CATH30 gegen die *E. coli*-Isolate fielen mit 7,8 und 15,6 µg/ml geringer aus als die gegen *S. aureus* ermittelten Werte (250µg/ml bzw. 1 mg/ml).

Tab. 20: MHK-Werte ausgewählter AMPs gegen Isolate der IMT-Stammsammlung

Ergebnisse angegeben in µg/ml

	<i>E. coli</i> IMT16357	<i>E. coli</i> IMT20130	<i>E. coli</i> IMT37450	<i>S. aureus</i> IMT24778	<i>S. aureus</i> IMT33878	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>S. aureus</i> ATCC29213
Esculentin	500	1000	500	>1000	>1000	>1000	>1000
OH-CATH30	15,6	7,8	7,8	250	250	15,6	1000
Protamin	125	31,3	31,3	31,3	31,3	31,25	15,6
Wirtsspezies	Wildvogel	Hund	Rind	Pferd	Katze	Mensch	Mensch
klinisches Bild	klinisch gesund	Harnwegs- infektion	Mastitis	Wundheilungs- störung	Nasenausfluss	Wundisolat	klinisches Isolat
zusätzliche Information	ST648	ST131	ST410, starker Biofilmbildner	MRSA	MSSA	ST73 [236]	MSSA, ST5 [237]

MRSA: Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*, MSSA: Methicillin-sensitiver *Staphylococcus aureus*, ST: Sequenztyp

4.3.2. Antimikrobielle Eigenschaften AMP-beschichteter Oberflächen

Am Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie wurde, neben dem Referenzpeptid BMAP-27, das AMP OH-CATH30 an die bereits im Silicone-Disc-Assay eingesetzten Silikonfolien gekoppelt und die antimikrobielle Wirksamkeit der so behandelten Oberflächen bestimmt.

Bei Verwendung des MDR *E. coli* IMT37453 (Abb. 22A) konnte nach 3-stündiger Inkubation bei 37 °C die Keimlast im Vergleich zur unbeschichteten Kontrolle von $4,7 \times 10^7$ auf $5,8 \times 10^5$ für BMAP-27 und $1,7 \times 10^5$ für OH-CATH30 reduziert werden. Somit konnte sowohl mit dem Referenzpeptid als auch mit OH-CATH30 eine Reduktion der Keimlast um 2 log-Stufen erzielt werden. Um die Beständigkeit der Kopplung der AMPs zu überprüfen und die Aktivität eventuell gelöster AMPs zu verifizieren, wurden die Oberflächen eingangs für 1 h mit MHB inkubiert. Dieses Medium wurde anschließend für 3 h mit der Bakteriensuspension inkubiert. Es konnte auch in den Überständen eine antimikrobielle Aktivität nachweisen werden (Abb. 22B). Im Vergleich zu der Wachstumskontrolle unbehandelter Oberflächen, zeigte sich eine Reduktion der Keimlast um ca. 1 log-Stufe.

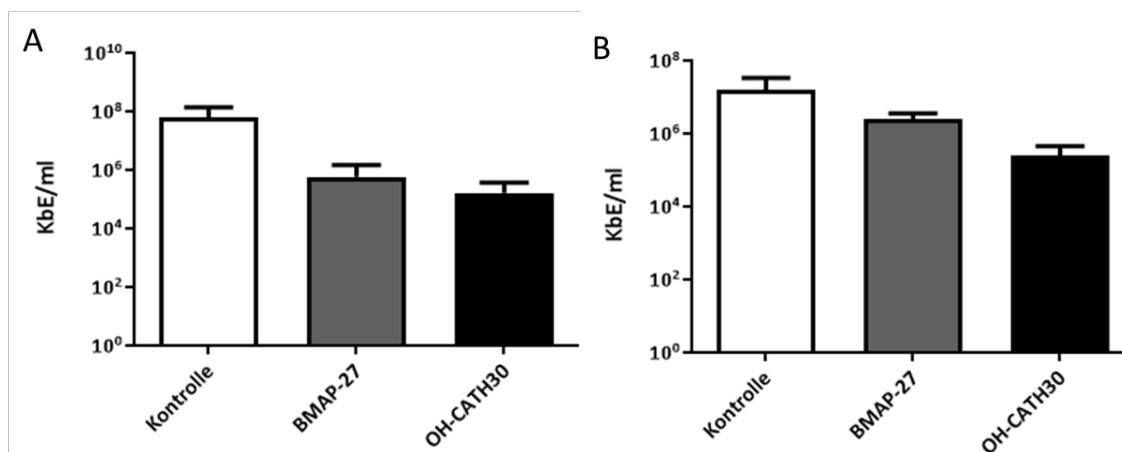


Abb. 22: Wirkung AMP-beschichteter Oberflächen und Überstände gegen *E. coli*

KbE/ml nach Inkubation des *E. coli*-Isolats IMT37453 auf den AMP-beschichteten Silikoncoupons (A), KbE/ml des Überstandes zum Nachweis abgelöster AMPs (B), Mittelwerte der ermittelten KbE (nach 3h Inkubation bei 37°C) mit Standardabweichungen, Kontrolle: Wachstumskontrolle, behandelte Oberfläche ohne gekoppeltes Peptid behandelt mit PBS

Darüber hinaus wurde, als Vertreter Gram-positiver Bakterien, das MRSA-Isolat IMT37556 untersucht (Abb. 23). Auch für dieses Isolat konnte durch die AMP-Beschichtung eine Reduktion der Keimlast nach 3 h um 2 log-Stufen erzielt werden (Abb. 23A). Im Vergleich zu den für eine Stunde auf der unbeschichteten Kontrolloberfläche inkubierten Überständen führten die Analysen der Überstände beschichteter Oberflächen zu einer Reduktion der KbE/ml um etwa 1 log-Stufe (Abb. 23B).

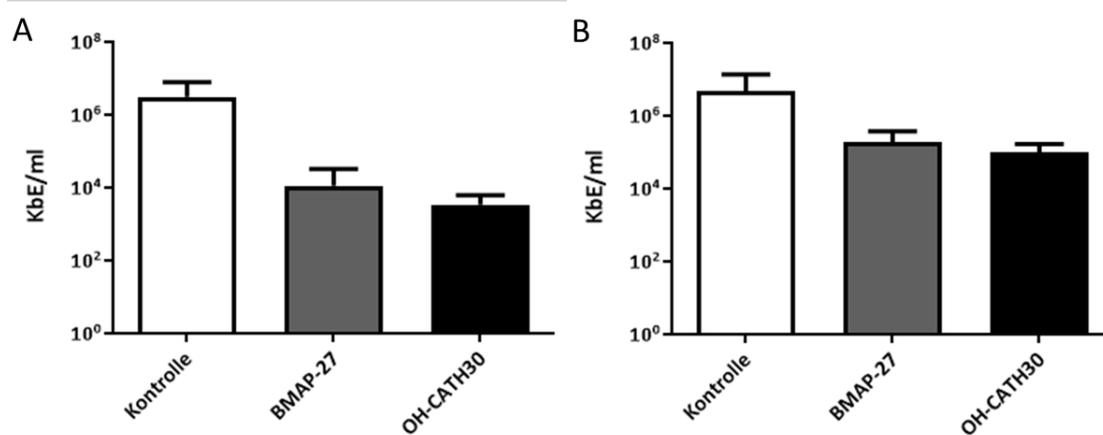


Abb. 23: Wirkung AMP-beschichteter Oberflächen und Überstände gegen MRSA

KbE/ml nach Inkubation des MRSA IMT37556 auf den AMP-beschichteten Silikoncoupons (A), KbE/ml des Überstandes zum Nachweis abgelöster AMPs (B), Mittelwerte der ermittelten KbE (nach 3h Inkubation bei 37°C) mit Standardabweichungen, Kontrolle: Positivkontrolle, Oberfläche ohne gekoppeltes Peptid behandelt mit PBS

5. Diskussion

Bakterien und andere Mikroorganismen leben in Gemeinschaften, die an lebenden oder toten Oberflächen anhaften und von einer schleimartigen Matrix umgeben sind. Diese hoch komplexen Netzwerke bezeichnet man als Biofilme [5]. Biofilme sind maßgeblich an der Entstehung und Aufrechterhaltung verschiedener human- und veterinärmedizinisch bedeutsamer Erkrankungen wie beispielsweise Mukoviszidose [41, 42], Parodontitis [48] und Implantat-assoziierten Infektionen [52, 53] beteiligt. Darüber hinaus bilden Biofilme in der Lebensmittelindustrie eine entscheidende Kontaminationsquelle [35-37] und stellen durch den Verzehr verunreinigter Produkte somit ein Gesundheitsrisiko dar [38].

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des durch die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) geförderten Verbundprojektes RemuNa (Reduktion multiresistenter, pathogener Bakterien in der Milchgewinnung: Einsatz antimikrobiell wirkender Peptide zur Bekämpfung bakterieller Infektionserreger in Biofilmen sowie Entwicklung eines Schnelltests zum Nachweis von Krankheitserregern) angefertigt. Ziel dieses Projektes war die Reduktion der bakteriellen Keimlast an relevanten Oberflächen in Milchviehbetrieben. Die Ergebnisse lassen sich jedoch auch auf andere Bereiche anwenden, in denen die Anlagerung von Bakterien und die Ausbildung von Biofilmen vermieden werden soll.

Die Mastitis des Rinds führt nicht nur zu einer Minderung des Tierwohls, sondern verursacht in der Milchviehhaltung enorme Kosten, die sich vor allem durch die verringerte Milchleistung erkrankter Kühe und hohe Remontierungskosten ergeben. Hinzu kommen weitere Kosten für Arzneimittel, den Tierarzt, die Entsorgung Hemmstoff-belasteter Milch und die Mehrarbeit des Landwirts bzw. der Landwirtin [1].

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, einen breiten Einblick in verschiedenste aktuelle Mastitisisolate und der Resistenzlage zu gewinnen. Es konnte ein neuer, quantifizierbarer Assay zur Analyse der Biofilm-bildenden Eigenschaften diverser bakterieller Spezies etabliert werden, der deutliche Vorteile gegenüber dem Kristallviolett-Assay aufweist. Mit Hilfe modifizierter, AMP-beschichteter Oberflächen konnte eine Reduktion der Keimlast auf Silikonoberflächen nachgewiesen werden. Mit Hilfe weiterer Optimierungen dieses Kopplungsprozesses könnte die Keimlast sowohl im Umfeld der Milchindustrie als auch in der Human- und Veterinärmedizin reduziert werden.

5.1. Charakterisierung der Isolate

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit konnten insgesamt 496 im Zeitraum von 2012 – 2017 gewonnene Isolate asserviert und weitergehend charakterisiert werden. Die initiale Untersuchung der Milchproben laktierender Kühe mit klinischer oder subklinischer Mastitis aus deutschen Betrieben wurde von der bovicare GmbH und der RIPAC-Labor GmbH durchgeführt und die Isolate an das Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen (IMT) übersendet. Das Projekt fokussierte sich dabei auf die 9 Zielspezies *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* und *Streptococcus uberis*. Mit insgesamt 124 Isolaten (25,1 %) konnte *S. uberis* mit Abstand am häufigsten in den Proben nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurden häufig weitere Streptokokkenspezies (*S. dysgalactiae* und *S. agalactiae*), *S. aureus*, verschiedene Enterobakterien und Enterokokken nachgewiesen und in die Stammsammlung aufgenommen.

Die Verteilung der untersuchten Mastitisisolate lässt nur bedingt Rückschlüsse auf ihr anteilmäßiges Vorkommen in der bovinen Mastitis in Deutschland im Untersuchungszeitraum zu, da im Verlauf des Projektes gezielt einzelne Spezies in die Stammsammlung aufgenommen wurden, um das projektinterne Ziel, 50 Isolate je Spezies zu asservieren, zu erreichen. Es lässt sich jedoch erkennen, dass besonders *S. uberis* als Mastitiserreger aktuell von großer Bedeutung ist, was auch in anderen Studien belegt werden konnte [238-240]. Laut Jahresbericht 2017 des Landeskontrollverbandes Berlin-Brandenburg e.V. wurden in den dort untersuchten Milchproben besonders häufig umweltassoziierte Erreger wie Koagulase-negative Staphylokokken und coliforme Keime (inklusive *E. coli*) nachgewiesen [241]. Bei den euterassoziierten Erregern konnte vor allem *S. aureus* isoliert werden. Zu den seltenen Mastitiserregern zählen laut dieser Erfassung unter anderem verschiedene Hefen, Nocardien, Prototheken, Mykoplasmen und Mykobakterien [241]. Auf die Untersuchung dieser Keime wurde im Rahmen dieser Arbeit verzichtet, da sie nur sporadisch auftreten und teils besondere Kultivierungsbedingungen für weiterführende Analysen erfordern [241]. Die Koagulase-negativen Staphylokokken wurden ebenfalls nicht untersucht, da sie eine heterogene Gruppe vieler verschiedener *Staphylococcus* spp. bilden. Somit war zu Projektbeginn davon auszugehen, dass von den einzelnen Spezies nicht ausreichend Isolate in die Stammsammlung aufgenommen werden können, um das Ziel, 50 Isolate je Spezies für weiterführende Untersuchungen zu asservieren, zu erreichen.

Neben den oben aufgeführten Zielspezies wurden im Projektverlauf auch weitere Erreger in die Stammsammlung aufgenommen, da sie mit zunehmender Häufigkeit in den untersuchten Milchproben isoliert wurden. Dazu zählten im Besonderen verschiedene *Lactococcus* Spezies, wie *Lactococcus lactis*, die bekanntermaßen für Mastitiserkrankungen verantwortlich sein können [242, 243]. Diese Isolate stehen für zukünftige Fragestellungen außerhalb des beschriebenen Projektes zur Verfügung, um Rückschlüsse auf ihr Resistenzprofil einschließlich dessen Entwicklung, ihre Biofilm-bildenden Eigenschaften und ihre Bedeutung für die bovine Mastitis in den kommenden Jahren zu evaluieren.

Die Testung der Sensitivitätsprofile wurde für die angelegte Stammsammlung unter Verwendung der kommerziell erhältlichen MICRONAUT-S Mastitis 3 durchgeführt, um Rückschlüsse auf die aktuelle Feldsituation zu gewinnen. Isolate werden als resistent bezeichnet, wenn ein Antibiotikum nach dem Einsatz der empfohlenen Dosis nicht in der Lage ist, einen Erreger am Infektionsort vollständig abzutöten oder dessen Wachstum effektiv zu hemmen [244, 245]. Sowohl für sieben *E. coli*-Isolate, als auch acht *S. aureus*-Isolate und acht *S. dysgalactiae*-Isolate, wurde eine Gesamtgenomanalyse durchgeführt und Ergebnisse der phänotypischen Sensitivitätstestung mit den genomischen Daten verglichen. Auf diese Weise konnten zusätzlich vorhandene Gene identifiziert werden, die Resistenzen gegen Antibiotika vermitteln, die in der MHK-Bestimmung nicht berücksichtigt wurden. Da es sich bei den getesteten Antibiotika speziell um zur Behandlung der bovinen Mastitis eingesetzte Medikamente handelt, wurde kein vollständiger Überblick über die potenziellen phänotypischen Resistenzen der Isolate gewonnen. Da der Fokus der Arbeit jedoch auf der Charakterisierung von Mastitisisolaten lag und das verwendete Layout der Microtiterplatte für die Indikation Mastitis anwendbaren Wirkstoffen abbildet, wurde das Testpanel an Antibiotika nicht erweitert. Einen zusätzlichen Einblick in die Resistenzlage konnte über die Gesamtgenomsequenzierung gewonnen werden.

Die minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) verschiedener in Deutschland zur Behandlung der bovinen Mastitis zugelassener Antibiotika wurden bestimmt. Für diese Versuche erfolgte die Kultivierung der Bakterien in Mueller-Hinton-Medium. Es handelt sich dabei um ein antagonistenfrees Medium, in dem es nicht zu Wechselwirkung zwischen den getesteten Antibiotika und Bestandteilen des Mediums kommen kann. Zur Kultivierung der Streptokokken wurde das Medium mit 2,5 % lysiertem Pferdeblut versetzt um die Wachstumsbedingungen an diese Spezies anzupassen. Für das *S. agalactiae*-Isolat IMT39970 konnte trotz dieser Supplementierung kein Wachstum in den hemmstofffreien Kontrollkavitäten nachgewiesen werden. Es wurde von der Bestimmung der MHK ausgeschlossen.

Die Ergebnisse der MHK-Bestimmungen lassen keine Rückschlüsse auf die Prävalenz von resistenten respektive multiresistenten Erregern in der bovinen Mastitis zu, da im Laufe des Projektes gezielt (multi-) resistente Isolate ausgewählter Spezies (MRSA, MDR *E. coli*, *S. agalactiae*) in die Stammsammlung aufgenommen wurden und ihr Vorkommen daher nicht repräsentativ ist.

Zwölf *E. coli*-Isolate wiesen Resistenzen gegen die untersuchten Cephalosporine der ersten, dritten und vierten Generation auf. Durch die Synthese von Hydrolasen sind verschiedene Bakterien in der Lage, β -Laktamantibiotika zu spalten und auf diese Weise zu inaktivieren [246]. Durch Mutationen erlangen bestimmte β -Laktamasen ein erweitertes Substratspektrum. Diese sogenannten β -Laktamasen mit einem erweiterten Substratspektrum (engl. Extended-Spectrum beta-Lactamase, ESBL) gehören zu den Serin- β -Laktamasen und sind in der Lage sind oxyimino- β -Laktame zu hydrolysieren [247, 248]. Die phänotypische Unempfindlichkeit von *Enterobacteriaceae* spp. gegen Cefoperazon, ein Cephalosporin der dritten Generation, wurde als Verdachtsmoment für die ESBL-Bildung gewertet. Die phänotypische Bestätigung erfolgte durch den „confirmatory combined-disk test“ nach Vorgaben der CLSI. Dabei handelt es sich um einen Agardiffusionstest unter Verwendung der Cephalosporine Cefotaxim und Ceftazidim und der Kombination dieser Wirkstoffe mit dem β -Laktamase-Inhibitor Clavulansäure, welcher die Wirkung der ESBL hemmt [208]. Es konnten ein ESBL-bildendes *E. coli*-Isolat und 11 Isolate, bei denen es sich nicht um klassische ESBL-Bildner handelt, identifiziert werden. Bei diesen Isolaten handelte es sich um multiresistente Vertreter, welche die ESBL-Definition nicht erfüllen, da der geforderte Unterschied im Durchmesser der Hemmhöfe nicht erreicht wurde. Ein Bakterienisolat gilt als multiresistent, wenn es nicht empfindlich gegen mindestens ein Antibiotikum aus drei oder mehr Wirkstoffgruppen ist [229, 230]. Dabei sollte sowohl die Indikation als auch die Spezies des Erregers berücksichtigt werden [249]. Obwohl sich aus den Daten keine Rückschlüsse auf die Prävalenz von resistenten und/oder multiresistenten Mastitis-assoziierten *E. coli* ziehen lassen, legen Daten aus der Routinediagnostik und Literatur jedoch nahe, dass deren Beteiligung an diesen Infektionen niedrig ist. In Bayern konnte eine Studie in 4 % der untersuchten *E. coli*-Isolate aus an akuter Mastitis erkrankten Rindern (Beprobungszeitraum 2014-2016) ESBL-assoziierte Gene detektieren [3]. Eine deutschlandweite Studie konnte für 1,3 % der analysierten *E. coli*-Isolate ESBL-Bildung nachweisen [4].

Für einzelne *E. coli*-Isolate ergaben sich Unterschiede zwischen den phänotypisch und genotypisch bestimmten Sensitivitätsprofilen. Obwohl phänotypisch keine Resistenz nachweisbar war, wurde in beiden Isolaten IMT37484 und IMT37431 das Gen *mdfA* nachgewiesen. Dabei

handelt es sich um ein Gen, das eine Effluxpumpe codiert, die diverse Antibiotika, wie Chloramphenicol und Erythromycin und Kationen aus der Bakterienzelle transportiert [231]. Die Sequenz des Gens enthielt weder in IMT47484 noch in IMT37431 ein vorzeitiges Stoppcodon, das auf eine fehlerhafte oder unvollständige Expression des Gens hinweisen könnte. Es ist möglich, dass das Transkript nicht translatiert wird oder eventuell notwendige posttranslationale Modifikationen nicht erfolgen können. Da es sich um ein membranständiges Protein handelt, könnte auch der vesikuläre Transport in den beiden Isolaten fehlerhaft sein und es daher nicht zu einer phänotypisch ausgeprägten Resistenz kommt.

Das in den *E. coli*-Isolaten IMT37477, IMT37453 und IMT37450 vorhandene Gen *floR* vermittelt eine Resistenz gegen Florfenicol und dem strukturell ähnlichen Chloramphenicol [250], das in der Veterinärmedizin nicht zur Behandlung von Lebensmittelproduzierenden Tieren eingesetzt werden darf [251]. Florfenicol ist in der EU zugelassen zur Behandlung von Infektionen der Atemwege in Schweinen und Rindern [251]. Der Nachweis dieses Resistenzgens in verschiedenen *E. coli*-Isolaten könnte ein Hinweis darauf sein, dass das Isolat auch an anderen Infektionen beteiligt war oder die Resistenz durch horizontalen Gentransfer erworben hat. Die drei in IMT37450, IMT37477 und IMT38014 nachgewiesenen Sulfonamid-Resistenzgene *sul1*, *sul2* und *sul3* sind auf Plasmiden lokalisiert [252, 253].

S. aureus kann verschiedenste Infektionen auslösen und verfügt über unterschiedliche Exotoxine [254]. Es ist als Pathogen sowohl in der Human- als auch Veterinärmedizin von großer Bedeutung [255] und stellt dabei, insbesondere als nosokomialer Erreger, eine besondere, globale Herausforderung dar [256-259]. Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) aber auch Methicillin-sensible *Staphylococcus aureus* (MSSA) können, beispielsweise in Pferden, verschiedenste Infektion, wie Osteomyelitis, Metritis und Pneumonien auslösen [260]. Obwohl *S. aureus* einen der wichtigsten Erreger der bovinen Mastitis darstellt [261], spielen MRSA dabei jedoch eine untergeordnete Rolle [262, 263]. Es konnten phänotypisch sieben MRSA detektiert werden. Mittels Sequenzanalyse konnte in drei der Stämme die Methicillin-Resistenzdeterminante *mecA* nachgewiesen werden. Das Gen *mecA* kodiert ein Penicillin-bindendes Protein mit einer sehr geringen Affinität gegenüber β -Laktam-Antibiotika [264]. Diese Antibiotikaklasse inhibiert in sensitiven Bakterien die Zellwandsynthese durch die irreversible Bindung an diese Proteine, die als Transpeptidasen fungieren und für die Quervernetzung der Peptidoglykane verantwortlich sind [265, 266]. Die MRSA-Isolate IMT37556, IMT38253 und IMT38254 verfügen zusätzlich zu *mecA*, welches die Oxacillin-Resistenz vermittelt, über die Tetracyclin-Effluxpumpen *tet(K)* und *tet(M)*. Die Bestimmung der Sensitivität der Isolate gegen dieses Antibiotikum könnte die

phänotypische Ausprägung der Resistenz nachweisen. Für IMT37556 konnten phänotypisch Resistenzen gegen Erythromycin und Pirlimycin nachgewiesen werden. Während einer eingehenderen Analyse der Genomdaten konnte das Gen *mepA* identifiziert werden, die zur multidrug and toxin extrusion (MATE) family gehört und eine Multidrug-Effluxpumpe codiert [234]. MATE vermittelte Resistenzen gegen verschiedene Biozide und Fluorchinolone [234].

Unter den drei untersuchten Streptokokkenspezies konnten nur wenige resistente Isolate nachgewiesen werden. Die publizierten geringen Resistenzraten in der bovinen Mastitis, insbesondere der untersuchten Streptokokkenspezies, spiegeln sich auch in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wider.

Die phänotypischen Sensitivitätsprofile der Streptokokken finden jeweils im genotypischen Profil ihre Grundlage. Zusätzlich zu den phänotypisch überprüften Wirkstoffen verfügen IMT37476, IMT37584 und IMT37599 über verschiedene Tetracyclin-Resistenzgene (*tet(O)*, *tet(L)* und *tet(M)*). Tetracyclin-Resistenzen konnten für Mastitis-assoziierte Streptokokken weltweit nachgewiesen werden [267-269].

Mit ihrer Vielzahl an intrinsischen Resistenzen gegen verschiedene antimikrobielle Wirkstoffe, wie Clindamycin, Penicillin G oder Cephalosporine, nehmen Enterokokken eine Sonderstellung im Vergleich zu anderen Mastitis-assoziierten Pathogenen ein. Zudem wurde bei Enterokokken häufig das Vorhandensein erworbener Resistenzen gegenüber Ampicillin, Makrolidantibiotika und Lincosamide beschrieben [270-272], was sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt hat. Es konnten Resistenzen gegen alle untersuchten Cephalosporine der 1., 3. und 4. Generation, gegen Oxacillin, Erythromycin und Marbofloxacin nachgewiesen werden. Enterokokken sind Teil des humanen und tierischen Mikrobioms und machen dabei in einem gesunden Erwachsenen etwa 1 % der Mikrobiota des Dünndarms aus [270, 271]. *E. faecalis* und *E. faecium* sind als Kommensale im Dünndarm beschrieben, können aber als opportunistische Pathogene Endokarditis, Harnwegsinfekte, Katheter-assoziierte Infektionen [273, 274] und bovine Mastitis auslösen [275, 276]. Enterokokken produzieren häufig Penicillin-bindende Proteine und in selteneren Fällen β -Laktamasen [277, 278]. Sowohl *E. faecalis* als auch *E. faecium* sind gegen Cephalosporine intrinsisch resistent. In der Humanmedizin wird seit den 1980er Jahren eine Zunahme der Infektion mit (multi-) resistenten Enterokokken beobachtet. Bereits 1980 konnten in den US-amerikanischen Krankenhäusern erste Ampicillin-resistente Stämme isoliert werden [279]. Für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten *Enterococcus*-Isolate ließ sich gegen die β -Laktame Penicillin und Ampicillin phänotypisch keine Resistenz nachweisen. Es handelt sich hierbei jedoch um *in vitro*

Testungen, die oftmals nicht die reale Wirksamkeit von antimikrobiellen Wirkstoffen im Tier bzw. Patienten widerspiegeln, da hierbei die natürlichen Bedingungen wie das Eindringen und die Verteilung der Medikamente im Gewebe, eines Infektionsgeschehens nur unzureichend nachgestellt werden. In einer chinesischen Studie konnten *in vitro* Resistenzen in bis zu 85 % der 60 analysierten Isolate gegen Penicillin und bis 15 % gegen Ampicillin nachgewiesen werden [280]. Dagegen wurden in einer Studie in Litauen zwischen 2007 und 2009 Resistenzen gegen Penicillin in 5,9 % der untersuchten *E. faecalis* (n=19) und in 63,7 % der *E. faecium*-Isolate (n=14) nachgewiesen. Auch die Resistenzen gegen Ampicillin und Amoxicillin in Kombination mit Clavulansäure lagen mit 87,5 % (*E. faecalis*) und 57,1 % (*E. faecium*) deutlich über denen in der vorliegenden Arbeit ermittelten Resistenzen [281]. Die Resistenzen scheinen somit starken regionalen Schwankungen zu unterliegen. Im Vergleich dazu zeigten *Enterococcus* spp. aus an Mastitis erkrankten Rindern in verschiedenen Regionen weltweit grundsätzlich keine erhöhten Resistenzen [282-284]. Diese Daten konnten mit den in der Arbeit erhaltenen Resistenzprofilen bestätigt werden.

Trotz der aus Literatur und Routinediagnostik bekannten und in der vorliegenden Arbeit bestätigten geringen Verbreitung von Resistenzen in der bovinen Mastitis, handelt es sich um eine oftmals schwierig therapierbare und rezidivierende Erkrankung. Neben anatomischen Gegebenheiten der Milchdrüse und immunologischen Einflussfaktoren der Wirtsseite wird die Ausbildung von Biofilmen durch die Mastitis-assoziierten Pathogenen als eine mögliche Erklärung für das Versagen der Therapie angesehen [285]. Bakterien, die in Biofilmen leben, zeigen eine deutlich erhöhte Toleranz gegenüber physikalischen (z.B. Strahlung) und chemischen Einflüssen (z.B. Bioziden und Antibiotika) [14]. Ceri et al. konnten bereits 1999 zeigen, dass sesshafte Bakterien in Biofilmen bis zu 1.000-fach höhere Antibiotikakonzentrationen tolerieren können als im planktonischen Zustand [7]. Diese Form der erhöhten Toleranz auf Gemeinschaftsebene unterscheidet sich von Resistenzmechanismen, die auf zellulärer Ebene wirken und sollte daher bei Behandlungen in Betracht gezogen werden [14].

5.2. Biofilm-bildende Eigenschaften der Isolate

Um das Potenzial der Biofilmbildung der untersuchten Isolate zu evaluieren und um unterschiedliche Assays zur Biofilmbildung vergleichen zu können, wurden zwei Assays durchgeführt. Dazu wurden 8 Isolate je Spezies hinsichtlich ihrer Resistenzprofile und geografischen Verteilung ausgewählt, um ein möglichst breites Spektrum an verschiedenen Mastitis-assoziierten Bakterien untersuchen zu können. Die ausgewählten *E. coli*- und *S. aureus*-Isolate wurden zusammen mit zwei *S. epidermidis*-Referenzstämmen im Kristallviolett-Assay untersucht. Bei dem Referenzstamm ATCC12228 handelt es sich laut Literatur um einen Stamm, der nicht in der Lage ist einen Biofilm auszubilden [286]. Hingegen wird der Stamm RP62A (ATCC35984), der ursprünglich aus einer Katheter-assoziierten Sepsis isoliert wurde [287], als sehr starker Biofilmbildner beschrieben [288]. Neben seinem Einsatz in der Gramfärbung wird Kristallviolett ebenfalls zur Färbung von Biofilmen eingesetzt [210]. Für den Stamm ATCC12228 konnte im Kristallviolett-Assay eine mittlere Optische Dichte bei 550 nm (OD_{550nm}) von 0,193 und für RP62A von 0,160 ermittelt werden. Dieses Ergebnis steht in starkem Kontrast zu den bisherigen Beschreibungen und Charakterisierungen der beiden Stämme. In der vorliegenden Arbeit wurde für den als nicht-Biofilm-bildend beschriebenen ATCC12228 ein stärkerer Biofilm nachgewiesen als für den als besonders starken Biofilm-Bildner beschriebenen RP62A. Dies kann zum einen an den unterschiedlichen Medien liegen, die für den Kristallviolett-Assay eingesetzt wurden, oder an den hohen Standardabweichungen des Assays. Von den acht getesteten *E. coli*-Isolaten konnte im Vergleich zu RP62A nur für IMT37453 eine etwas geringere OD_{550nm} von 0,158 ermittelt werden. Auch für zwei *S. aureus*-Isolate IMT18132 und IMT37556 wurde mit $OD_{550nm} = 0,227$ und $OD_{550nm} = 0,238$ eine höhere OD_{550nm} gemessen.

Besonders ungünstig sind in diesem Assay die bereits erwähnten, sehr hohen Standardabweichungen zwischen den einzelnen Testungen und den jeweiligen Replikaten (Tab. 18 Seite 52) und die mangelhafte Reproduzier- und Vergleichbarkeit der Resultate innerhalb eines aber auch zwischen verschiedenen Laboren. Dies liegt vor allem an den schwer zu standardisierenden Waschschritten. Bereits kleine Mengen an verbleibenden Kristallviolett im Überstand führen zur Beeinflussung des Versuchsdurchganges und der Ergebnisse des Versuchs. So konnten zwischen den einzelnen technischen Replikaten in der vorliegenden Arbeit große Schwankungen der gemessenen OD_{550} von bis zu 100% nachgewiesen werden (Abb. 7 und Tab. 18).

Die Unterschiede in der Durchführung und Handhabung des Kristallviolett-Assays können zwischen verschiedenen Laboren und auch innerhalb eines Labors zu verschiedenen hohen Standardfehlern führen. Bei der Verwendung dieses Assays muss daher bei allen Arbeitsschritten auf eine hohe Standardisierung geachtet werden. Der Einsatz elektronischer Pipetten mit einer einstellbaren Ansaug- und Auslassgeschwindigkeit kann zu geringeren Abweichungen zwischen den Testungen beitragen. Eine weitere Problematik dieses Assays ist, dass es sich bei dem Einsatz von Kristallviolett um eine ungerichtete Färbemethode handelt und verschiedenste negativ geladene Strukturen eines Biofilms, wie Polysaccharide und extrazelluläre DNA, gefärbt werden können [289]. So können Biofilme bestehend aus Bakterien, die in ihrer Matrix vermehrt Kristallviolett-bindende Bestandteile akkumulieren, stärker angefärbt werden, obwohl der von ihnen gebildete Biofilm nicht ausgeprägter ist als der anderer Isolate. Um weitere Rückschlüsse auf die durch Kristallviolett-bindenden Bestandteile des Biofilms zu erhalten, wurden Biofilme mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (engl. confocal laserscanning microscopy, CLSM) visualisiert. Dabei wurde die fluoreszierende Eigenschaft von Kristallviolett ausgenutzt und ein Biofilm sowohl mit Kristallviolett als auch weiteren Fluoreszenzfarbstoffen, die an definierte Matrixbestandteile binden, gefärbt. Durch die Überlagerung der unterschiedlichen Fluoreszenzaufnahmen konnte gezeigt werden, dass das Signal von Kristallviolett mit dem Fluoreszenzsignal der gefärbten DNA und verschiedener Zuckerkomponenten der Matrix, im Speziellen α -D-Mannose und α -D-Glucose, kolokalisiert ist. Die Signale von Kristallviolett und Matrix-assoziierten Proteinen kolokalisieren dagegen kaum (Abb. 10). Biofilme, die eine vermehrte Produktion und Sekretion von Zuckern aufweisen, zeigen demnach besonders hohe OD_{550} -Werte im Kristallviolett-Assay und können so zu falschen Rückschlüssen auf ihre Biofilm-Bildung führen. Um das Bindungsschema von Kristallviolett in der Untersuchung von Biofilmen genauer charakterisieren zu können, müssen weitere Bindungsexperimente durchgeführt werden.

Eine zweite Methode zur Untersuchung der biofilm-bildenden Eigenschaften, der Silicone-Disc-Assay, wurde im Rahmen dieser Arbeit basierend auf dem „Bead Assay for Biofilms“ von Konrat et al. [290] etabliert. Die Anzucht der Biofilme erfolgte dabei auf einer Silikonfolie, die in der Humanmedizin bei Implantationen eingesetzt wird. Darüber hinaus ist Silikon ein weitverbreitetes Material in der Produktion von Zitzengummis und bietet so die Möglichkeit, die erhaltenen Ergebnisse auf die Milchindustrie zu übertragen. Nach der erfolgten Anzucht wurden die auf dem Silikon anhaftenden Bakterien mittels oszillierenden Ultraschallwellen von der Oberfläche gelöst. Durch diese homogene Beschallung der Oberfläche werden die Bakterien gleichmäßig abgelöst und nicht beschädigt [211]. Als Ergebnis lieferte dieser

Assay eine konkrete Aussage hinsichtlich der Kolonie-bildende Einheiten (KbE) auf einer Oberfläche definierter Größe. In drei unabhängigen Wiederholungen konnte die Reproduzierbarkeit des neuen Assays bestätigt werden.

Die Reifung eines Biofilms benötigt in Abhängigkeit der bakteriellen Spezies und den allgemeinen Wachstumsbedingungen ca. 2 – 4 Tage [291, 292]. Nach 2 bis 4 h bilden sich bereits stark an der Oberfläche anhaftende Mikrokolonien und nach 6 bis 12 h beginnen die Bakterien mit der Bildung von EPS. Mit der einsetzenden Produktion der Matrix steigt die Resistenz gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen der bakteriellen Mikrokolonien an. Der in der vorliegenden Arbeit etablierte Silicone-Disc-Assay sieht das Aufwachsen der Bakterien auf den eingesetzten Silikoncoupons über einen Zeitraum von 24 Stunden vor, eine Aussage zur Tendenz in der Oberflächenbesiedlung und der einsetzenden Biofilmbildung ist bereits nach dieser Zeit abzuleiten. So beginnen Bakterien der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* bereits 15 min nach der initialen Anlagerung an eine Oberfläche mit der Produktion von Alginat und gehen somit von der planktonischen Lebensweise über in die Bildung eines Biofilms [293]. Dies wird auch durch die Aufnahmen im Rasterelektronenmikroskop deutlich, die für die drei hier untersuchten Isolate die Ausbildung erster Aggregate und Strukturen zeigt. Bei einer länger andauernden Kultivierung des Biofilms steigt die Kontaminationsgefahr, da das Medium in regelmäßigen Abständen gewechselt werden muss, um die Nährstoffversorgung der Bakterien zu sichern. Weiterhin wird ein stark ausgereifter, vielschichtiger Biofilm auf den eingesetzten Silikoncoupons instabil. In einem Testversuch mit einem über 2 Wochen kultivierten Biofilm, dessen Ergebnisse hier nicht gezeigt sind, konnte das Protokoll nicht mehr umgesetzt werden. Während der nötigen Wechsel des Mediums lösten sich, trotz vorsichtiger Handhabung, bereits erste Teile des Biofilms von der Oberfläche. Im vorgesehenen Waschschrift löste sich der Biofilm nahezu vollständig ab, da er nicht ausreichend an der Silikonoberfläche haftete. Für die Untersuchung von reifen Biofilmen, z.B. zur Analyse der Matrixbestandteile, muss das Protokoll und vor allem dieser Waschschrift in zukünftigen Studien angepasst werden.

Unabhängig davon bietet der hier etablierte Silicone-Disc-Assay die Möglichkeit schnell, effektiv und ohne einen hohen Kostenaufwand die Biofilm-bildenden Fähigkeiten verschiedener Bakterienspezies zu bestimmen. Der Assay ist einfach, modifizierbar und gut an die Wachstumsbedingungen verschiedenster Spezies anzupassen.

Für die untersuchten Enterobakterien, *E. coli*, *K. pneumoniae* und *K. oxytoca*, konnten nach 24-stündiger Anzucht stabile Biofilme mit durchschnittlich $7,8 \times 10^6$ KbE/Coupon nachgewiesen werden. Isolate mit KbE/Coupon von über 1×10^7 wurden als starke Biofilmbildner einge-

stuft. Dieser Wert ergab sich durch die Testung, der als starke Biofilmbilder bekannten Referenzstämme *P. aeruginosa* DSM939 und PAO1 und *S. epidermidis* RP62A ergaben sich mittlere KbE/Coupon von $7,2 \times 10^7$, $2,5 \times 10^8$ und $2,1 \times 10^7$.

E. coli, als ubiquitär vorkommendes Bakterium, kann über den Strichkanal in das Euter eindringen und dort eine Entzündung hervorrufen [294, 295]. Dabei verfügen einige Vertreter über verschiedene Virulenzfaktoren, wie die Produktion von Toxinen, Adhäsinen, Invasinen und die Bildung einer Kapsel, welche das Überleben und Vermehren im Wirt ermöglichen und für die Ausprägung der Symptomatik verantwortlich sind [296]. Eine durch *E. coli* verursachte Mastitis kann sich sowohl durch einen relativ milden Verlauf mit lokal beschränkten Symptomen, als auch durch schwerste systemische Verläufe mit akuten Gewebeschäden, einer stark verringerten oder völlig erliegenden Milchproduktion, Festliegen und dem Tod des Tieres äußern [297, 298]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle getesteten *E. coli*-Isolate in der Lage waren, einen stabilen Biofilm zu bilden. Dieses Ergebnis deckt sich mit verschiedenen Studien [295, 299] und weist auf einen Zusammenhang zwischen schwer auszutherapezierenden Mastitiden und der Bildung von Biofilmen hin [300]. Da es sich bei Mastitis-assoziierten *E. coli*-Isolaten meist um ubiquitär vorkommende Bakterien aus der Umgebung handelt [295], könnte es sich unter anderem bei der Biofilmbildung um einen entscheidenden Faktor für die längerfristige Besiedlung des Eutergewebes handeln. Jeder Pathotyp dieser Spezies ist in der Lage, Mastitis auszulösen. Dies gilt auch für fakultativ pathogene Vertreter [301]. Die Fähigkeit, stabile Biofilme zu bilden, ermöglicht es *E. coli*-Isolaten neben belebten Oberflächen, wie dem Eutergewebe des Rindes, auch unbelebte Oberflächen, wie beispielsweise Katheter, künstliche Gelenke oder Melkzeug, zu besiedeln [60, 302].

Die untersuchten *S. aureus*-Isolate zeigten zwischen den einzelnen Isolaten eine relativ variable Biofilmbildung mit einer mittleren KbE/Coupon von $9,5 \times 10^6$. Dabei lag die niedrigste KbE/Coupon bei $3,3 \times 10^6$ (Isolat IMT37632) und die höchste ermittelte KbE/Coupon bei $2,0 \times 10^7$ (Isolat IMT18132). In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass *S. aureus*-Isolate aus Proben von klinischen Mastitisgeschehen in der Lage sind, einen Biofilm auszubilden [303-305]. Darüber hinaus sind Staphylokokken in der Lage, in die Epithelzellen des Eutergewebes zu gelangen und dort zu überleben [306], was besonders in Kombination mit der Fähigkeit, einen stabilen Biofilm sowie eine Kapsel auszubilden, zu gravierenden und schwer therapierbaren Erkrankungen führen kann [307]. Eine Korrelation zwischen der Stärke der Biofilmbildung und der Invasion von Epithelzellen konnte nicht nachgewiesen werden [308]. Die gebildete Kapsel besteht unter anderem aus verschiedenen Polysacchari-

den, welche die Glykokalyx bilden und die Bakterienzelle umschließen. Sie vermittelt die Adhäsion an die Epithelzellen und schützt die Bakterienzelle vor der Opsonierung, Phagozytose und der Anlagerung von Antikörpern und Faktoren des Komplementsystems [309]. Weltweit ist *S. aureus* unter anderem aufgrund dieser Faktoren für 5% bis 70% aller an Mastitis erkrankten Rinder in verschiedenen Ländern verantwortlich [310]. In Berlin und Brandenburg konnten für das Jahr 2018 in 7,8 % aller Milchproben, aus denen Mikroorganismen kultiviert werden konnten, *S. aureus* nachgewiesen werden [311]. Die EPS-Produktion verschiedener *S. aureus*-Isolate konnte in einem Infektionsmodell in Schafen, in dem Muttertieren eine Bakteriensuspension (10^2 KbE/ml) direkt in die Zitzen injiziert wurde, nachgewiesen werden [312]. Darüber hinaus gilt die Bildung eines Biofilms als ein für den Verlauf einer Mastitiserkrankung ausschlaggebender Virulenzfaktor [313]. Alle acht sequenzierten *S. aureus*-Isolate enthalten das vollständige *ica*-(engl. intercellular adhesion) Operon. Dieser Locus vermittelt die Produktion des Polysaccharid Interzellulären Adhäsins (PIA) und verschiedener Zucker, die eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung von Biofilmen in Staphylokokken spielen [314]. Unterschiede zwischen ermittelten KbE/Coupon der einzelnen Isolate deuten darauf hin, dass nicht nur das *ica*-Operon eine Rolle bei der Ausbildung von Biofilmen unter den untersuchten Bedingungen spielt. Ein weiterer Regulator der Biofilmbildung und des Quorum-Sensing in Staphylokokken ist das *agr* (engl. accessory gene regulator)-System. Die Synthese von Zellwand-assoziierten Adhäsinen, die maßgeblich sind für Biofilme, wird durch das *agr*-System herunterreguliert. Die Besiedlung von Oberflächen in Form von Biofilmen tritt in *agr*-defizienten Vertreter weitaus stärker auf als in *agr*-positiven [315]. Das Isolat IMT37695 verfügt über *agrR*. Es zeigt jedoch weder im Kristallviolett- noch im Silicone-Disc-Assay eine erhöhte Biofilmbildung im Vergleich zu den anderen untersuchten *S. aureus*-Isolaten. Dies könnte auf die gewählten Bedingungen in den beiden Assays zurückzuführen sein, in denen das Quorum-Sensing eventuell eine untergeordnete Rolle spielt.

Streptokokken sind häufige Verursacher der bovinen Mastitis. Die im Silicone-Disc-Assay untersuchten Isolate waren nicht in der Lage, *in vitro* einen stabilen Biofilm auszubilden (mittlere KbE/Coupon $9,4 \times 10^5$). Studien konnten allerdings belegen, dass Mastitis-assoziierte *S. uberis* durchaus in der Lage sind, einen stabilen Biofilm zu bilden [316, 317]. Die Biofilmbildung von Streptokokken kann durch das in Milch enthaltene α - und β -Casein induziert werden [317]. Dieses Ergebnis wird durch weitere Studien unterstützt, die die Bedeutung von Milch und deren Bestandteilen, wie Proteine, für das Biofilmwachstum und die Adhäsion der Bakterien an die Zellen des Eutergewebes darstellen [318]. In weiterführenden Versuchen mit dem Silicone-Disc-Assay könnte untersucht werden, ob die im Rahmen dieser Arbeit analy-

sierten Streptokokkenisolate sich durch den Zusatz von Milch oder verschiedener Milchbestandteile zu einer erhöhten Biofilmbildung im Silicone-Disc-Assay anregen lassen. Vertreter der Spezies *S. uberis*, *S. dysgalactiae* und *S. agalactiae* wurden auch in anderen Studien untersucht und als schwache Biofilmbildner identifiziert [319-321]. Dennoch handelt es sich um relevante Pathogene der bovinen Mastitis. Sie müssen daher über andere Pathogenitätsfaktoren und Virulenzfaktoren verfügen. Vor allem bei *S. uberis* handelt es sich um ein weit verbreitetes Bakterium, das sowohl Rinder, als auch deren Umgebung, kolonisiert [322, 323]. Obwohl *S. uberis* einen verhältnismäßig schwachen Biofilmbildner ist, können sich Vertreter dieser Spezies an das Epithelgewebe im Euter anlagern und in die Zellen eindringen [324, 325]. Dieser Prozess wird unter anderem durch das *S. uberis* Adhäsionsmolekül (SUAM) ermöglicht [326]. Das Molekül vermittelt zudem die Bindung an Lactoferrin, das unter anderem in der Milch sowie anderen Körperflüssigkeiten vorkommt [327]. Weiterhin produzieren diese Bakterien verschiedene Enzyme wie die Hyaluronidase, die durch das Auflösen interzellulärer Verbindungen zur Invasion in das Gewebe beitragen [328, 329]. Ein weiterer Virulenzfaktor verschiedener Streptokokkenspezies kann die Ausbildung einer Kapsel aus Hyaluronsäure sein, welche einen Phagozytoseschutz darstellt [330]. Die Kapsel-bildende Variante von *S. uberis* konnte häufiger aus Mastitis-assoziierten Milchproben isoliert werden als aus der Einstreu in Kuhställen. Allerdings sind beide Stämme in der Lage eine Mastitis auszulösen und der Wirkung der neutrophilen Granulozyten zu entgehen; der Umfang der Bedeutung der Kapsel bei Mastitiserkrankungen ist somit nicht abschließend geklärt [331]. Diese Virulenzfaktoren, wie die Ausbildung einer Kapsel und die Produktion von Hyaluronidase, sind unter anderem eine Erklärung für die hohe Relevanz der verschiedenen Streptokokken in der bovinen Mastitis, ohne dass ein stabiler Biofilm notwendig ist.

Biofilme werden unter natürlichen Bedingungen nicht nur von einer Spezies gebildet. Ein besonderes Beispiel für die mögliche Diversität sind die Biofilme bzw. der „Plaque“ der Mundhöhle, in dem über 700 verschiedene Spezies nachgewiesen werden konnten und die neben dem Mikrobiom des Darms eines der komplexesten Mikrobiome des Körpers formen [332]. Die Resistenz gegen antimikrobielle Wirkstoffe ist in solch diversen mikrobiellen Gemeinschaften im Vergleich zu Monospezies-Biofilmen erhöht. Spezies, die in der Lage sind, Antibiotika-spaltende Enzyme zu sekretieren, bilden eher oberflächennahe Regionen des Biofilms, können somit eindringende Antibiotika inaktivieren und eine günstigere Umgebung für innenliegende, empfindliche Bakterien zu schaffen [333, 334].

Der in der vorliegenden Arbeit etablierte Silicone-Disc-Assay wurde zur Analyse komplexer Biofilme eingesetzt. Dazu erfolgte das Drop-Plating auf Chrom-Orientierungsagar [212], dem verschiedene Chromogene zugesetzt sind, die durch bakterielle Enzyme in verschiedenfarbige Abbauprodukte zersetzt werden und auf diese Weise eine direkte Unterscheidung der Bakterien erlauben [335]. Es konnten sowohl Unterschiede als auch Übereinstimmungen in der Stärke eines in Monokultur ausgebildeten Biofilms und dem in Kokultivierung mit einem anderen Isolat gebildeten Biofilms nachgewiesen werden. Da sich Isolate derselben Spezies unterschiedlich durch die Anwesenheit Isolate anderer Spezies beeinflussen lassen, scheint es sich bei der Biofilmbildung in einer Gemeinschaft um eine Isolat- und nicht um eine Spezies-spezifische Eigenschaft zu handeln. In Versuchen zur Kokultivierung von Mundhöhlenassoziierten Bakterien konnten ebenfalls Unterschiede zwischen der Biofilmmasse einzelner Spezies in Mono- und Multispeziesbiofilmen gezeigt werden [336]. Zwischen verschiedenen marinen Bakterienspezies konnten Unterschiede zwischen den einzeln ausgebildeten und den kokultivierten Biofilmen ermittelt werden [337]. Eine weitere Studie konnte ebenfalls verschiedene Auswirkungen der Kokultivierung diverser bakterieller Spezies in einem Biofilm nachweisen [338].

Die im Silicone-Disc-Assay generierten Bedingungen spiegeln nicht die natürlichen Bedingungen im Euter wider. Die untersuchten Isolate könnten sich in einer anderen Umgebung völlig anders verhalten und sich auch mehr oder weniger durch die Anwesenheit anderer Isolate beeinflussen lassen. Durch die bereits erwähnte Zugabe von Milch oder Milchbestandteilen können die Bedingungen weiter modifiziert und angepasst werden. Trotzdem wird sich mit diesem Assay kein realitätsnahes Modell entwickeln lassen. Der Assay erlaubt es jedoch, Rückschlüsse auf die Biofilm-bildenden Eigenschaften von Bakterien zu ziehen. Der im Projekt gewählte Einsatz des Chrom-Orientierungsagars limitiert die Testung von komplexen Biofilmen, da sich lediglich Isolate untersuchen lassen, die auf dem Agar eindeutig zu unterscheiden sind. Auch die Testung von mehr als zwei Isolaten gleichzeitig erschwert die Auswertung. Alternativ könnte für künftige Studien der Einsatz von Antibiotika-haltigen Medien für die Keimzahlbestimmung gewählt werden, sofern sich die untersuchten Isolate durch die Wirkstoffe eindeutig selektieren und somit separieren lassen. Durch diese einfach durchzuführenden Modifikationen lässt sich der Silicone-Disc-Assay auf ein breites Spektrum verschiedener komplexer Biofilme anwenden und Einblicke in das Zusammenleben unterschiedlicher Erreger ermöglichen. Darüber hinaus können die Coupons durch den Einsatz verschiedener mikroskopischer Verfahren (Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie) weiterführend untersucht werden.

Die Fähigkeit von Bakterien, Biofilme auszubilden, muss bei der Behandlung von Mastitiden und weiteren Biofilm-assoziierten Infektionen in der Veterinär- und auch der Humanmedizin berücksichtigt werden [339]. Im Vergleich zur planktonischen Lebensweise von Bakterien konnte in Biofilmen ein verstärkter horizontaler Gentransfer beobachtet [21]. Im Hinblick auf die Verbreitung von Resistenz-vermittelnden Genen ist dieser Austausch von zentraler Bedeutung. Um diese Ausbreitung zu minimieren, ist der gezielte Einsatz von Antibiotika von größter Wichtigkeit. Der Einsatz von Antibiotika sollte nur bei dem mikrobiologischen Nachweis bakterieller Erreger, bestenfalls inklusive Antibioqram erfolgen [339, 340].

Biofilm-assoziierte Infektionen, nicht nur die bovine Mastitis, verlaufen häufig chronisch. Eine Antibiotikatherapie kann die Ausbreitung der Infektion durch planktonische Bakterien verhindern, die sich aus der bakteriellen Gemeinschaft des Biofilms gelöst haben, und zu einer gewissen Reduktion des Biofilms führen. Die vollständige Abtötung des reifen Biofilms bleibt in den meisten Fällen jedoch aus [341, 342], da die dafür notwendigen Konzentration *in vivo* kaum erreicht werden können [343].

Eine gezielte Antibiose empfiehlt sich daher schon bei dem Verdacht auf eine Biofilm-assoziierte Infektion, da Biofilme während ihrer frühen Entwicklungsphase wesentlich empfindlicher gegen Antibiotika sind als reife Biofilme [343, 344]. In der mikrobiologischen Diagnostik ist es notwendig, nicht nur die MHK für planktonische Bakterien zu bestimmen, sondern auch die MHK für Biofilme [7, 343]. Dazu können die zu untersuchenden Biofilme in einem kommerziell erhältlichen System, dem Calgary Biofilm Device, angezüchtet werden. Die Bakterien lagern sich dabei an eine Oberfläche an und werden nach einem Waschschrift in eine 96-Well-Platte mit entsprechenden Antibiotika überführt [7].

5.3. Antimikrobielle Peptide

Da sich Resistenzen gegen verschiedenste Antibiotika weltweit immer stärker ausbreiten [174], ist das Interesse und der Bedarf an Alternativen erheblich. In Anbetracht dessen werden antimikrobielle Peptide (AMPs) als mögliche Ersatzstoffe diskutiert. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene AMPs zunächst auf ihre Wirksamkeit gegen zwei Referenzstämme als auch gegen vier aktuelle Mastitisisolate der Spezies *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* und *E. faecium* untersucht.

Das AMP Protamin wurde ursprünglich aus Lachsspermien isoliert, in denen es die Aufgabe von Histonen während der Reifung der Spermien übernimmt [218]. Es handelt sich um ein

kationisches Peptid, dass im Gegensatz zu vielen anderen AMPs nicht durch die Perforation der Membran zu einer Zelllyse führt, sondern das Membranpotenzial der Bakterien beeinflusst [345]. Schon in geringen Konzentrationen zeigte Protamin eine hohe antimikrobielle Aktivität gegen die getesteten Mastitisisolate und Referenzstämme.

Die getesteten AMPs beiden synthetischen AMP72, AMP126 [214] und das aus dem Teichfrosch isolierte Esculentin [216] zeigten in Lösung nur eine geringe antimikrobielle Wirksamkeit gegen die vier analysierten Mastitisisolate. Sie wurden daher für die weiterführenden Versuche nicht in Betracht gezogen. Auch BMAP-Fragment wurde aufgrund der variablen MHK-Werte gegen die getesteten Mastitisisolate nicht für die Kopplung eingesetzt. Da sich das stark antimikrobiell wirksame Protamin auf Grund seines intrazellulären Wirkmechanismus nicht für die Kopplung an Oberflächen und damit einhergehenden Immobilisierung eignet, wurde neben dem Referenzpeptid BMAP-27 nach vorangegangener Literaturrecherche auch OH-CATH30 für die Kopplungsversuche ausgewählt.

Bei dem getesteten AMP OH-CATH30 handelt es sich um ein Derivat eines aus der Königskobra isolierten Cathelicidins mit einer hohen antimikrobiellen Aktivität und einer geringen Zytotoxizität gegen Säugerzellen [217]. OH-CATH30 interagiert mit der Membran der Bakterien und führt so zu deren Lyse [346]. Die im Rahmen anderer Publikationen ermittelten MHK-Werte dieses Peptides gegen den Referenzstamm *E. coli* ATCC25922 lagen ebenfalls unter 10 µg/ml [347]. In der vorliegenden Arbeit konnte für diesen Stamm ein MHK-Wert von 15,6 µg/ml bestimmt werden. Dieser Unterschied lässt sich vermutlich auf verschiedene Protokolle und den damit verbundenen Einsatz unterschiedlicher Nährmedien zurückführen. Die publizierten MHK-Werte für dieses Peptid gegen verschiedene *Escherichia* spp. (zwischen 4 µg/ml und 128 µg/ml) und *Klebsiella* spp. (zwischen 8 µg/ml und 128 µg/ml) konnten auch für die hier eingesetzten Isolate bestätigt werden [348]. In den durchgeführten Versuchen wurden für die getesteten MSSA-Stämme MHK-Werte von 250 µg/ml und 1 mg/ml ermittelt. Für den untersuchten MRSA IMT24778 lag der MHK-Wert für OH-CATH30 ebenfalls bei 250 µg/ml. Das analysierte Mastitisisolat IMT37556, bei dem es sich ebenfalls um einen MRSA handelte, lag der Wert deutlich niedriger, bei 62,5 µg/ml. Nahezu alle diese Werte liegen deutlich über den veröffentlichten MHK-Werten von 32 µg/ml [348], obwohl auch hier nach dem Protokoll von Wiegand et al. gearbeitet wurde [213]. Um zu ermitteln, warum diese starken Resistenzunterschiede zwischen Vertretern derselben Spezies bestehen, sind weiterführende Untersuchungen notwendig. Die Resistenzmechanismen gegen Antibiotika und AMPs unterscheiden sich grundsätzlich und korrelieren nicht miteinander [349]. Eine mögliche Erklärung können die unterschiedlichen Oberflächenstrukturen von MRSA und

MSSA sein [350]. Eine umstrukturierte Zellmembran kann die Bakterien vor der Wirkung von AMPs schützen [137]. Eine abgeänderte Struktur der verschiedenen Stämme kann eventuell durch elektronenmikroskopische Aufnahmen nachgewiesen werden [351]. Auf diese Weise konnte unter anderem das Anschwellen und die Verkürzung in *E. coli* und die Bildung von Ausstülpungen unter Zugabe von Gramicidin beobachtet werden. Für den untersuchten *S. aureus* wurde das Aufplatzen und die Porenbildung nachgewiesen [351]. Darüber hinaus könnten die gegenüber den AMPs resistenteren Isolate über einen gesteigerten oder einen zusätzlichen Transportmechanismus zum Export der AMPs aus dem Zytosol oder über eine zusätzliche Proteaseproduktion verfügen [180, 181].

Der Einsatz medizinischer Implantate wie verschiedene Katheter, künstliche Gelenke und künstliche Herzklappen hat stark zugenommen [195, 352]. Durch die steigende Lebenserwartung der Bevölkerung wird die Anzahl dieser medizinischen Eingriffe weiter steigen. Allein in Deutschland werden jährlich über 2,5 Millionen biomedizinische Geräte und Implantate, wie Katheter, künstliche Linsen und Gelenke, eingesetzt [353]. Ein damit einhergehendes Problem ist die steigende Zahl Implantat-assoziiertes Infektionen. Weltweit wird dabei von mehreren Millionen Infektionen und allein in Deutschland von 100.000 Infektionen jährlich ausgegangen [353]. Die infektiöse Dosis beispielsweise für *S. aureus* an Implantaten liegt weiteraus niedriger als an Stellen ohne einen solchen Fremdkörper und angelagerte Bakterien können einen Biofilm bilden [354]. Die Infektionsgefahr nach dem Einsetzen künstlicher Gelenke ist hoch und liegt für künstliche Hüft- und Kniegelenke bei 0,5-1 % und für künstliche Ellenbogen- oder Knöchelgelenke bei über 5 % [355, 356].

Die Behandlung solcher Infektionen erfolgt meist durch eine Kombination verschiedener Antibiotika, wie beispielsweise Vancomycin und Rifampicin. Für die erfolgreiche Therapie einer Biofilm-assoziierten Infektion sind dabei weitaus höhere Konzentrationen notwendig [357]. Staphylokokken sind hauptsächlich für die Infektionen an Implantaten verantwortlich und sprechen häufig nur schlecht auf die gewählten Therapien an [358, 359]. Die erfolgreiche Behandlung einer Biofilm-assoziierten Infektion setzt in vielen Fällen die Entfernung des besiedelten Fremdkörpers voraus [360, 361]. Studien belegen, dass bereits eine relativ geringe Erregeranzahl von 10^2 KBE/ml von *S. aureus* ausreichend ist, um im Tierversuch zu einer Infektion an einem Fremdkörper zu führen. Im Kontrast dazu führt erst die Injektion von 10^8 KBE/ml desselben Erregers zur Ausbildung eines Abszesses [354]. Eine mögliche Erklärung ist die herabregulierte Phagozytose und Leukozytenaktivität in der Gegenwart von Implantaten oder anderen Fremdkörpern [362].

Da AMPs durch ähnliche Mechanismen wie konventionelle Antibiotika an ihrer Wirkung gegen Biofilme beeinträchtigt werden, wurde weiterhin die Wirksamkeit AMP-gekoppelter Oberflächen untersucht. Durch deren Einsatz sollte die initiale Anheftung von Bakterien an relevanten Oberflächen und somit die Ausbildung eines Biofilms verhindert werden.

Die antimikrobielle Wirksamkeit gekoppelter AMPs wurde repräsentativ auf Silikon als Trägermaterial bestimmt, da dieses Material sowohl als Zitzengummi in der Milchviehhaltung aber auch in verschiedenen veterinär- und humanmedizinischen Bereichen verwendet wird. Dabei handelte es sich um die gleiche Silikonfolie (bess medizintechnik gmbH, Berlin, Deutschland), die auch für den Silicone-Disc-Assay eingesetzt wurde. Durch den Einsatz der am Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie AMP-beschichteten Oberflächen ließ sich die Keimlast im Vergleich zu unbeschichteten Kontrollcoupons um bis zu zwei log-Stufen reduzieren. In weiterführenden Versuchen könnte eine Kombination beider Peptide und deren Effektivität untersucht werden. Das Panel der AMPs könnte dabei erweitert werden, da BMAP-27 eine hohe Zytotoxizität aufweist, die die Anwendungsmöglichkeiten einschränkt [219]. OH-CATH30 ist im Gegensatz zu BMAP-27 nur in hohen anwendungsfernen Konzentrationen zytotoxisch [346] und ist daher für die Anwendung am Tier und Mensch geeignet. In der vorliegenden Arbeit konnte lediglich eine geringe antimikrobielle Aktivität der AMP-gekoppelten Oberflächen nachgewiesen werden. Die getesteten Peptide führten zu einer Reduktion der Keimlast von zwei log-Stufen. Darüber hinaus konnte im analysierten Überstand eine antimikrobielle Aktivität ermittelt werden. Die Kopplung der AMPs auf den Oberflächen ist demzufolge nicht stabil und bereits nach der Inkubationszeit des Mediums von einer Stunde beginnen sich die Peptide zu lösen. Auf Grund der geringen antimikrobiellen Aktivität der untersuchten AMPs und des Referenzpeptids und des Ablösens der Peptide von der Oberfläche muss sowohl die Kopplungsstrategie als auch die Auswahl der AMPs überarbeitet werden. Die geringe nachgewiesene Wirksamkeit der beschichteten Oberflächen macht sie insbesondere für die Milchindustrie mit ihrem hohen Kostendruck nicht attraktiv. Die Anschaffung hochpreisiger Zitzengummies muss für die Landwirtin oder den Landwirt zu einer deutlichen Reduktion der Mastitiserkrankungen in ihrem Bestand führen, damit der Erwerb in Betracht gezogen werden kann. Da in den beschriebenen Versuchen mit einer in der Humanmedizin eingesetzten Silikonfolie gearbeitet wurde, liegt der Einsatz beschichteter Oberflächen auch in diesem Bereich nahe. Weitere Experimente zur Optimierung der AMP-Beschichtung von Oberflächen sind notwendig, um diesen Ansatz zur Infektionsprophylaxe in die Medizin zu überführen. Da das Upscaling des Prozesses prinzipiell möglich ist, könnte dieses Verfahren die Produktion antimikrobiell wirksamer Oberflächen erlauben.

Da es sich bei Biofilmen um komplexe Gemeinschaften handelt, die präzise aufeinander abgestimmt sind, kann ein Eingriff in die Kommunikation zu einer Reduktion des Biofilms führen. Biofilme können mittels sogenannter Autoinducer unter anderem die Populationsdichte messen und ihr gemeinschaftliches Verhalten steuern. Dieser Prozess wird als Quorum Sensing bezeichnet und bietet einen Ansatz für neuartige Behandlungsmethoden [112, 363-365]. Die Biofilmbildung konnte durch den Einsatz RNAIII-inhibierenden Peptide im Tierversuch deutlich reduziert werden. Die Peptide interagieren mit dem TRAP/Agr-System von *S. aureus* und verhindert die Ausbildung von Biofilmen [366]. Ein möglicher vielversprechender Ansatz ist die Kopplung dieser AMPs an Implantate.

Der Einsatz antimikrobieller Peptide kann in Anbetracht der sich immer weiter ausbreitenden Resistenzen gegenüber konventionellen Antibiotika einen wichtigen Beitrag zur Behandlung sowie Vermeidung von Infektionen sowohl in Human- und Veterinärmedizin leisten. Dazu müssen zuvor die bereits erwähnten Defizite der Peptide umgangen oder ausgeglichen werden. Ihr Einsatz in gekoppelter Form kann dabei entscheidend sein

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen eines Verbundprojektes durchgeführt, das von der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE)- gefördert wurde. Ziel dieses Projektes war die Reduktion (multi-) resistenter bakterieller Erreger in der Milchviehhaltung durch den Einsatz antimikrobieller Peptide (AMP). Dazu wurde eine insgesamt 496 Isolate umfassende Stammsammlung Mastitis-assoziiierter bakterieller Pathogene etabliert, die für jede der 9 Zielspezies (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* und *Streptococcus uberis*) 50 Isolate beinhalten sollte. Durch diese Vorgehensweise konnten dabei nur bedingt Rückschlüsse auf die Prävalenz der Erregerspezies gezogen werden, da einige Spezies für die vorliegende Arbeit gezielt asserviert wurden. Die besondere Bedeutung von *Streptococcus uberis* als Erreger der bovinen Mastitis spiegelte sich jedoch in der hohen Isolationsrate wider.

Die asservierten Bakterien wurden hinsichtlich ihrer Sensivität gegenüber therapeutisch relevanter Antibiotika charakterisiert. Dabei konnten 12 *Escherichia coli*-Isolate mit einer Resistenz gegen verschiedene Cephalosporine (1., 3. und 4. Generation) und sieben Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* identifiziert werden. Auch hier kann die vorliegende Arbeit keinen Hinweis auf die Prävalenz (multi-) resistenter Erreger liefern, da im Verlauf der Studie gezielt resistente Isolate asserviert wurden.

Weiterhin wurden die Biofilm-bildenden Eigenschaften der Mastitis-assoziierten Isolate untersucht. Die klinische Relevanz Biofilm-assoziiierter Infektionen liegt unter anderem in der vermittelten erhöhten Resistenz der beteiligten Bakterien gegenüber antibiotischen Medikamenten und, damit verbunden, der schlechteren Prognose sowie einer teils langwierigen und intensiven Therapie. Als Alternative für den schwer zu standardisierenden Kristallviolett-Assay wurde der einfach durchzuführende, hoch reproduzierbare und ressourcenschonende Silicone-Disc-Assay etabliert. Durch die Anzucht der Bakterien auf Silikoncoupons ermöglicht er die Quantifizierung der bakteriellen Biofilme auf einem sowohl in der Milchindustrie als auch in der Human- und Veterinärmedizin relevanten Material. Mit Ausnahme der Vertreter der untersuchten *Streptococcus* spp. bildeten die getesteten Isolate *in vitro* einen Biofilm aus, was wertvolle Informationen für die Therapie bakterieller Mastitiden vermittelt. Die höchste ermittelte KbE/Coupon konnte für das *Escherichia coli* Isolat IMT38014 mit $1,3 \times 10^7$ nachgewiesen werden. Die niedrigste KbE wurde für die untersuchten *Streptococ-*

cus dysgalactiae Isolate mit einer durchschnittlichen KbE/Coupon von $8,0 \times 10^4$ bestimmt. AMPs sind in Zeiten der zunehmenden Bedrohung durch multi- oder panresistente bakterielle Infektionserreger eine mögliche Alternative für die Bekämpfung der Pathogene. In diesem Projekt wurden AMPs sowohl in gelöster, als auch in gekoppelter, immobilisierter Form im Hinblick auf ihre Wirksamkeit gegenüber Mastitis-assoziierten Pathogenen getestet. Dabei konnte für Protamin und OH-CATH30 die höchste Wirksamkeit nachgewiesen werden. Die Kopplung der AMPs erfolgte auf Silikon und führte im Experiment zu einer Reduktion der Keimlast um bis zu zwei log-Stufen. Nach dreistündiger Inkubation der *Escherichia coli* IMT37453 konnte auf der unbeschichteten Kontrolloberfläche eine KbE von $4,7 \times 10^7$ bestimmt werden. Die Kopplung von BMAP-27 reduzierte die Keimlast auf $5,8 \times 10^5$ und die Kopplung von OH-CATH30 auf $1,7 \times 10^5$. Durch Optimierungen des Kopplungsprozesses und den Einsatz zusätzlicher AMPs, auch in Kombinationen, könnte die antimikrobielle Aktivität der Oberflächen weiter gesteigert werden. Aufgrund des flexibel und vielseitig eingesetzten Materials Silikon könnte die Anwendung der antimikrobiellen Oberflächen auf verschiedene Bereiche der Veterinärmedizin, der Humanmedizin und weitere Gebiete übertragen werden.

Summary

The present work was carried out as part of a Federal Office for Agriculture and Food (BLE) - funded consortium project. The aim of this project was the reduction of (multi-) resistant bacterial pathogens in dairy cattle husbandry through the use of antimicrobial peptides (AMPs). For this purpose, a total of 496 isolates of selected mastitis-associated bacterial pathogens were gathered in a strain collection. The strain collection should included 50 isolates of the nine target species *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis*. It could be drawn only limited conclusions about the occurrence of the pathogen species, as some species were specifically asserved for the present work. However, the special significance of *Streptococcus uberis* as a causative agent of bovine mastitis was reflected in the high isolation rate.

The conserved bacteria were characterized for their sensitivity to therapeutically relevant antibiotics. 12 *Escherichia coli* isolates with resistance to cephalosporins (1st, 3rd and 4th generation) and seven methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* were identified. Again, the present work can provide no indication of the prevalence of (multi-) resistant pathogens, as in the course of the study targeted resistant isolates were asserved.

Furthermore, the biofilm-forming properties of the mastitis-associated isolates were investigated. The clinical relevance of biofilm-associated infections lies, amongst others, in the increased resistance of the bacteria to antibiotics and, associated therewith, the worse prognosis as well as a sometimes lengthy and intensive therapy. As an alternative to the difficult-to-standardize crystal violet assay, the easy-to-implement, highly reproducible and resource-saving silicone disc assay has been established. By cultivating bacteria on silicone coupons, it enables the quantification of bacterial biofilms on a material that is relevant in the dairy industry as well as in human and veterinary medicine. Apart from the examined *Streptococcus* spp., the tested isolates formed a biofilm in vitro, which provides valuable information for the therapy of bacterial mastitis. The highest colony forming units (CFU)/coupon could be detected for the *Escherichia coli* isolate IMT38014 with 1.3×10^7 . The lowest CFU was determined for the investigated *Streptococcus dysgalactiae* isolates with a mean CFU/coupon of 8.0×10^4 . AMPs are a potential alternative for combating pathogens in times of increasing threat from multi- or pan-resistant bacterial infectious agents. In this project, AMPs were tested both in solution and immobilized to surfaces, for their efficacy against mastitis-associated pathogens.

Protamin and OH-CATH30 were identified as active against both reference strains and selected mastitis isolates. The coupling of the AMPs was carried out on silicone and led to a reduction of the germ load by up to two log levels. Further optimization of the coupling process and the use of additional AMPs, even in combinations, could further increase the antimicrobial activity of the surfaces, making them a valuable supplement in the dairy industry and thus contributing to the overall reduction of germination. Due to the flexible and versatile silicone material, the application of antimicrobial surfaces could be transferred to various areas of veterinary medicine, human medicine and other areas.

6. Literaturverzeichnis

1. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, *Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Bestandsproblem*. 2002: Gießen.
2. Ott, S.L. and P.R. Novak, *Association of herd productivity and bulk-tank somatic cell counts in US dairy herds in 1996*. J Am Vet Med Assoc, 2001. 218(8): p. 1325-30.
3. Eisenberger, D., et al., *Molecular Characterization of Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing Escherichia coli Isolates from Milk Samples of Dairy Cows with Mastitis in Bavaria, Germany*. Microb Drug Resist, 2018. 24(4): p. 505-510.
4. Freitag, C., et al., *Detection of plasmid-borne extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) genes in Escherichia coli isolates from bovine mastitis*. Veterinary Microbiology, 2017. 200: p. 151-156.
5. Donlan, R.M. and J.W. Costerton, *Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms*. Clin Microbiol Rev, 2002. 15(2): p. 167-93.
6. Costerton, J.W., et al., *Microbial biofilms*. Annu Rev Microbiol, 1995. 49: p. 711-45.
7. Ceri, H., et al., *The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms*. J Clin Microbiol, 1999. 37(6): p. 1771-6.
8. Dobell, C. and A. Van Leeuwenhoek, *Antony Van Leeuwenhoek and His Little Animals; Being Some Account of the Father of Protozoology and Bacteriology and His Multifarious Discoveries in These Disciplines; - Scholar's Choice Edition*. 2015: Bibliolife DBA of Bibilio Bazaar II LLC.
9. Zobell, C.E. and D.Q. Anderson, *Observations on the multiplication of bacteria in different volumes of stored sea water and the influence of oxygen tension and solid surfaces*. The Biological Bulletin, 1936. 71(2): p. 324-342.
10. Westall, F., et al., *Early Archean fossil bacteria and biofilms in hydrothermally-influenced sediments from the Barberton greenstone belt, South Africa*. Precambrian Research, 2001. 106(1-2): p. 93-116.
11. Rasmussen, B., *Filamentous microfossils in a 3,235-million-year-old volcanogenic massive sulphide deposit*. Nature, 2000. 405(6787): p. 676-9.
12. Costerton, J.W., et al., *Bacterial biofilms in nature and disease*. Annu Rev Microbiol, 1987. 41: p. 435-64.
13. Costerton, J.W., P.S. Stewart, and E.P. Greenberg, *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections*. Science, 1999. 284(5418): p. 1318-22.
14. Penesyan, A., M. Gillings, and I.T. Paulsen, *Antibiotic Discovery: Combatting Bacterial Resistance in Cells and in Biofilm Communities*. Molecules, 2015. 20(4): p. 5286-5298.
15. Luppens, S.B.I., et al., *Development of a standard test to assess the resistance of Staphylococcus aureus biofilm cells to disinfectants*. Applied and Environmental Microbiology, 2002. 68(9): p. 4194-4200.
16. Anderl, J.N., M.J. Franklin, and P.S. Stewart, *Role of antibiotic penetration limitation in Klebsiella pneumoniae biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. 44(7): p. 1818-24.
17. Suci, P.A., et al., *Investigation of ciprofloxacin penetration into Pseudomonas aeruginosa biofilms*. Antimicrob Agents Chemother, 1994. 38(9): p. 2125-33.
18. Doroshenko, N., et al., *Extracellular DNA Impedes the Transport of Vancomycin in Staphylococcus epidermidis Biofilms Preexposed to Subinhibitory Concentrations of Vancomycin*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2014. 58(12): p. 7273-7282.
19. Johnson, L., et al., *Extracellular DNA-induced antimicrobial peptide resistance in Salmonella enterica serovar Typhimurium*. BMC Microbiology, 2013. 13.

20. Lewenza, S., *Extracellular DNA-induced antimicrobial peptide resistance mechanisms in Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 2013. 4.
21. Molin, S. and T. Tolker-Nielsen, *Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure*. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003. 14(3): p. 255-261.
22. Ashby, M.J., et al., *Effect of Antibiotics on Nongrowing Planktonic Cells and Biofilms of Escherichia-Coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1994. 33(3): p. 443-452.
23. Flemming, H.C. and J. Wingender, *The biofilm matrix*. *Nature Reviews Microbiology*, 2010. 8(9): p. 623-633.
24. Baltimore, R.S. and M. Mitchell, *Immunologic investigations of mucoid strains of Pseudomonas aeruginosa: comparison of susceptibility to opsonic antibody in mucoid and nonmucoid strains*. *J Infect Dis*, 1980. 141(2): p. 238-47.
25. Govan, J.R., *Mucoid strains of Pseudomonas aeruginosa: the influence of culture medium on the stability of mucus production*. *J Med Microbiol*, 1975. 8(4): p. 513-22.
26. Peterson, P.K., et al., *Influence of encapsulation on staphylococcal opsonization and phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes*. *Infect Immun*, 1978. 19(3): p. 943-9.
27. Leid, J.G., et al., *The exopolysaccharide alginate protects Pseudomonas aeruginosa biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing*. *Journal of Immunology*, 2005. 175(11): p. 7512-7518.
28. Jefferson, K.K., *What drives bacteria to produce a biofilm?* *Fems Microbiology Letters*, 2004. 236(2): p. 163-173.
29. Douglas, L.J., *Candida biofilms and their role in infection*. *Trends in Microbiology*, 2003. 11(1): p. 30-36.
30. Ridgeway, H.F. and B.H. Olson, *Scanning electron microscopic evidence for bacterial colonization of a drinking water distribution system*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1981. 41: p. 274-278.
31. LeChevalier, M.W., T.M. Bancock, and R.G. Lee, *Examination and characterization of distribution system biofilms*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987. 52: p. 2714-2724.
32. Block, J.C., *Biofilms in Drinking Water Distribution Systems*, in *Biofilms — Science and Technology*, L.F. Melo, et al., Editors. 1992, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 469-485.
33. Bott, T.R., *Introduction to the Problem of Biofouling in Industrial Equipment*, in *Biofilms — Science and Technology*, L.F. Melo, et al., Editors. 1992, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 3-11.
34. Lewin, R., *Microbial Adhesion Is a Sticky Problem*. *Science*, 1984. 224(4647): p. 375-377.
35. Holah, J.T. and L.R. Kearney, *Introduction to Biofilms in the Food-Industry*. *Biofilms - Science and Technology*, 1992. 223: p. 35-41.
36. Carpentier, B. and O. Cerf, *Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry*. *J Appl Bacteriol*, 1993. 75(6): p. 499-511.
37. Czechowski, M.H., *Gasket and Stainless-Steel Surface Sanitation - Environmental Parameters Affecting Bacterial Attachment (Reprinted)*. *Australian Journal of Dairy Technology*, 1990. 45(1): p. 38-39.
38. Zottola, E.A., *Microbial Attachment and Biofilm Formation - a New Problem for the Food-Industry*. *Food Technology*, 1994. 48(7): p. 107-114.
39. Potera, C., *Microbiology - Forging a link between biofilms and disease*. *Science*, 1999. 283(5409): p. 1837-+.
40. Lyczak, J.B., C.L. Cannon, and G.B. Pier, *Lung infections associated with cystic fibrosis*. *Clin Microbiol Rev*, 2002. 15(2): p. 194-222.

41. Jones, A.M., et al., *Spread of a multiresistant strain of Pseudomonas aeruginosa in an adult cystic fibrosis clinic*. Lancet, 2001. 358(9281): p. 557-8.
42. Hoiby, N., O. Ciofu, and T. Bjarnsholt, *Pseudomonas aeruginosa biofilms in cystic fibrosis*. Future Microbiol, 2010. 5(11): p. 1663-74.
43. Johansen, H.K., et al., *Colonisation and infection of the paranasal sinuses in cystic fibrosis patients is accompanied by a reduced PMN response*. Journal of Cystic Fibrosis, 2012. 11(6): p. 525-531.
44. Pedersen, S.S., et al., *Role of alginate in infection with mucoid Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis*. Thorax, 1992. 47(1): p. 6-13.
45. Dasgupta, M.K., et al., *Prognostic Implications of Circulating Immune-Complexes and Pseudomonas-Aeruginosa-Specific Antibodies in Cystic-Fibrosis*. Journal of Clinical & Laboratory Immunology, 1987. 23(1): p. 25-30.
46. Moss, R.B., et al., *Association of Systemic Immune-Complexes, Complement Activation, and Antibodies to Pseudomonas-Aeruginosa Lipopolysaccharide and Exotoxin-a with Mortality in Cystic-Fibrosis*. American Review of Respiratory Disease, 1986. 133(4): p. 648-652.
47. Zaura, E., et al., *Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities*. BMC Microbiol, 2009. 9: p. 259.
48. Sbordone, L. and C. Bortolaia, *Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease*. Clin Oral Investig, 2003. 7(4): p. 181-8.
49. Listgarten, M.A., *Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopic study*. J Periodontol, 1976. 47(1): p. 1-18.
50. James, G.A., et al., *Biofilms in chronic wounds*. Wound Repair Regen, 2008. 16(1): p. 37-44.
51. Hall, M.R., E. McGillicuddy, and L.J. Kaplan, *Biofilm: basic principles, pathophysiology, and implications for clinicians*. Surg Infect (Larchmt), 2014. 15(1): p. 1-7.
52. Jacobsen, S.M., et al., *Complicated catheter-associated urinary tract infections due to Escherichia coli and Proteus mirabilis*. Clin Microbiol Rev, 2008. 21(1): p. 26-59.
53. Matthews, P.C., et al., *Diagnosis and management of prosthetic joint infection*. BMJ, 2009. 338: p. b1773.
54. Trampuz, A. and W. Zimmerli, *Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment*. Swiss Medical Weekly, 2005. 135(17-18): p. 243-251.
55. Ainscow, D.A.P. and R.A. Denham, *The Risk of Haematogenous Infection in Total Joint Replacements*. Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume, 1984. 66(4): p. 580-582.
56. Murdoch, D.R., et al., *Infection of orthopedic prostheses after Staphylococcus aureus bacteremia*. Clinical Infectious Diseases, 2001. 32(4): p. 647-649.
57. Vanechoutte, M., et al., *Acinetobacter baumannii-infected vascular catheters collected from horses in an equine clinic*. J Clin Microbiol, 2000. 38(11): p. 4280-1.
58. Melchior, M.B., J. Fink-Gremmels, and W. Gaastra, *Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture*. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 2006. 53(7): p. 326-32.
59. Melchior, M.B., H. Vaarkamp, and J. Fink-Gremmels, *Biofilms: a role in recurrent mastitis infections?* Vet J, 2006. 171(3): p. 398-407.
60. Weber, M., et al., *Bacterial community composition of biofilms in milking machines of two dairy farms assessed by a combination of culture-dependent and -independent methods*. PLoS One, 2019. 14(9): p. e0222238.

61. Neu, T.R. and J.R. Lawrence, *Innovative techniques, sensors, and approaches for imaging biofilms at different scales*. Trends Microbiol, 2015. 23(4): p. 233-42.
62. Raes, J. and P. Bork, *Molecular eco-systems biology: towards an understanding of community function*. Nat Rev Microbiol, 2008. 6(9): p. 693-9.
63. Azeredo, J., et al., *Critical review on biofilm methods*. Crit Rev Microbiol, 2017. 43(3): p. 313-351.
64. Fletcher, M., *The effects of culture concentration and age, time, and temperature on bacterial attachment to polystyrene*. Canadian Journal of Microbiology, 1977. 23(1): p. 1-6.
65. O'Toole, G.A. and R. Kolter, *Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development*. Molecular Microbiology, 1998. 30(2): p. 295-304.
66. Edmonds, J.M., et al., *Surface Sampling of Spores in Dry-Deposition Aerosols*. Applied and Environmental Microbiology, 2009. 75(1): p. 39-44.
67. Müller, P., et al., *Potential of shock waves to remove calculus and biofilm*. Clinical Oral Investigations, 2011. 15(6): p. 959-965.
68. Grand, I., et al., *Possible Overestimation of Surface Disinfection Efficiency by Assessment Methods Based on Liquid Sampling Procedures as Demonstrated by *In Situ* Quantification of Spore Viability*. Applied and Environmental Microbiology, 2011. 77(17): p. 6208-6214.
69. Goeres, D.M., et al., *A method for growing a biofilm under low shear at the air-liquid interface using the drip flow biofilm reactor*. Nature Protocols, 2009. 4: p. 783.
70. Buckingham-Meyer, K., D.M. Goeres, and M.A. Hamilton, *Comparative evaluation of biofilm disinfectant efficacy tests*. Journal of Microbiological Methods, 2007. 70(2): p. 236-244.
71. Tolker-Nielsen, T. and C. Sternberg, *Growing and analyzing biofilms in flow chambers*. Curr Protoc Microbiol, 2011. Chapter 1: p. Unit 1B 2.
72. Bakker, D.P., et al., *Comparison of Velocity Profiles for Different Flow Chamber Designs Used in Studies of Microbial Adhesion to Surfaces*. Applied and Environmental Microbiology, 2003. 69(10): p. 6280-6287.
73. Christensen, G.D., et al., *Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices*. J Clin Microbiol, 1985. 22(6): p. 996-1006.
74. Pitts, B., et al., *A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal*. J Microbiol Methods, 2003. 54(2): p. 269-76.
75. Gómez-Suárez, C., H.J. Busscher, and H.C. van der Mei, *Analysis of Bacterial Detachment from Substratum Surfaces by the Passage of Air-Liquid Interfaces*. Applied and Environmental Microbiology, 2001. 67(6): p. 2531-2537.
76. Stepanovic, S., et al., *Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci*. APMIS, 2007. 115(8): p. 891-9.
77. Koban, I., et al., *XTT assay of ex vivo saliva biofilms to test antimicrobial influences*. GMS Krankenhhyg Interdiszip, 2012. 7(1): p. Doc06.
78. O'Brien, J., et al., *Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity*. Eur J Biochem, 2000. 267(17): p. 5421-6.
79. Pettit, R.K., et al., *Microplate Alamar blue assay for Staphylococcus epidermidis biofilm susceptibility testing*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. 49(7): p. 2612-7.
80. Van den Driessche, F., et al., *Optimization of resazurin-based viability staining for quantification of microbial biofilms*. J Microbiol Methods, 2014. 98: p. 31-4.

81. Sandberg, M.E., et al., *Pros and cons of using resazurin staining for quantification of viable Staphylococcus aureus biofilms in a screening assay*. Journal of Microbiological Methods, 2009. 78(1): p. 104-106.
82. Marshall, K.C., R. Stout, and R. Mitchell, *Mechanism of Initial Events in Sorption of Marine Bacteria to Surfaces*. Journal of General Microbiology, 1971. 68(Nov): p. 337-&.
83. Stoodley, P., et al., *Biofilms as complex differentiated communities*. Annu Rev Microbiol, 2002. 56: p. 187-209.
84. Davies, D.G., et al., *The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm*. Science, 1998. 280(5361): p. 295-8.
85. Sauer, K., et al., *Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm*. J Bacteriol, 2002. 184(4): p. 1140-54.
86. Lamed, R. and E.A. Bayer, *Contact and Cellulolysis in Clostridium-Thermocellum Via Extensile Surface Organelles*. Experientia, 1986. 42(1): p. 72-73.
87. Allison, D.G., I.W. Sutherland, and T.R. Neu, *Biofilm Communities: Order from Chaos?*, ed. A. McBain. 1998, Cardiff: BioLine.
88. Or, D., S. Phutane, and A. Dechesne, *Extracellular polymeric substances affecting pore-scale hydrologic conditions for bacterial activity in unsaturated soils*. Vadose Zone Journal, 2007. 6(2): p. 298-305.
89. Frolund, B., et al., *Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin*. Water Research, 1996. 30(8): p. 1749-1758.
90. Wingender, J., et al., *Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from Pseudomonas aeruginosa*. Methods Enzymol, 2001. 336: p. 302-14.
91. Sutherland, I.W., *Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework*. Microbiology-Uk, 2001. 147: p. 3-9.
92. Gotz, F., *Staphylococcus and biofilms*. Molecular Microbiology, 2002. 43(6): p. 1367-1378.
93. Zhang, X.Q. and P.L. Bishop, *Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances*. Chemosphere, 2003. 50(1): p. 63-69.
94. Sauer, K., et al., *Characterization of nutrient-induced dispersion in Pseudomonas aeruginosa PAO1 biofilm*. Journal of Bacteriology, 2004. 186(21): p. 7312-7326.
95. Gjermansen, M., et al., *Characterization of starvation-induced dispersion in Pseudomonas putida biofilms*. Environmental Microbiology, 2005. 7(6): p. 894-906.
96. Lynch, D.J., et al., *Glucan-binding proteins are essential for shaping Streptococcus mutans biofilm architecture*. Fems Microbiology Letters, 2007. 268(2): p. 158-165.
97. Higgins, M.J. and J.T. Novak, *Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation*. Journal of Environmental Engineering-Asce, 1997. 123(5): p. 479-485.
98. Lasa, I. and J.R. Penades, *Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation*. Research in Microbiology, 2006. 157(2): p. 99-107.
99. Larsen, P., et al., *Amyloid adhesins are abundant in natural biofilms*. Environmental Microbiology, 2007. 9(12): p. 3077-3090.
100. Sand, W. and T. Gehrke, *Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria*. Research in Microbiology, 2006. 157(1): p. 49-56.
101. Matsuyama, T. and Y. Nakagawa, *Surface-active exolipids: Analysis of absolute chemical structures and biological functions*. Journal of Microbiological Methods, 1996. 25(2): p. 165-175.

102. Wingender, J., T. Neu, and H.C. Flemming, *Microbial Extracellular Polymeric Substances*, ed. J. Wingender, T. Neu, and H.C. Flemming. 1999, Heidelberg: Springer.
103. Whitchurch, C.B., et al., *Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation*. Science, 2002. 295(5559): p. 1487.
104. Yang, L., et al., *Effects of iron on DNA release and biofilm development by Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology-Sgm, 2007. 153: p. 1318-1328.
105. Gloag, E.S., et al., *Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013. 110(28): p. 11541-11546.
106. Smalyukh, II, et al., *Elasticity-mediated nematiclike bacterial organization in model extracellular DNA matrix*. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 2008. 78(3 Pt 1): p. 030701.
107. Flemming, H.C., et al., *Cohesiveness in biofilm matrix polymers*. Community Structure and Cooperation in Biofilms, 2000: p. 87-105.
108. Hausner, M. and S. Wuerztz, *High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis*. Applied and Environmental Microbiology, 1999. 65(8): p. 3710-3713.
109. Lawrence, J.R., et al., *In situ evidence for microdomains in the polymer matrix of bacterial microcolonies*. Can J Microbiol, 2007. 53(3): p. 450-8.
110. Wagner, M., et al., *Combined use of confocal laser scanning microscopy (CLSM) and Raman microscopy (RM): investigations on EPS-Matrix*. Water Res, 2009. 43(1): p. 63-76.
111. Miller, M.B. and B.L. Bassler, *Quorum sensing in bacteria*. Annual Review of Microbiology, 2001. 55: p. 165-199.
112. Waters, C.M. and B.L. Bassler, *Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria*. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2005. 21: p. 319-346.
113. Hengge, R., et al., *Bacterial Signal Transduction by Cyclic Di-GMP and Other Nucleotide Second Messengers*. J Bacteriol, 2016. 198(1): p. 15-26.
114. Hengge, R., *Principles of c-di-GMP signalling in bacteria*. Nature Reviews Microbiology, 2009. 7(4): p. 263-273.
115. Prindle, A., et al., *Ion channels enable electrical communication in bacterial communities*. Nature, 2015. 527(7576): p. 59-63.
116. Rickard, A.H., et al., *Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms*. Trends Microbiol, 2003. 11(2): p. 94-100.
117. Yang, L., et al., *Current understanding of multi-species biofilms*. Int J Oral Sci, 2011. 3(2): p. 74-81.
118. Zhao, X., et al., *ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a Candida albicans adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p*. Microbiology, 2004. 150(Pt 7): p. 2415-28.
119. Li, F. and S.P. Palecek, *Distinct domains of the Candida albicans adhesin Eap1p mediate cell-cell and cell-substrate interactions*. Microbiology, 2008. 154(Pt 4): p. 1193-1203.
120. Silverman, R.J., et al., *Interaction of Candida albicans cell wall Als3 protein with Streptococcus gordonii SspB adhesin promotes development of mixed-species communities*. Infect Immun, 2010. 78(11): p. 4644-52.
121. Stickler, D.J., *Bacterial biofilms and the encrustation of urethral catheters*. Biofouling, 1996. 9(4): p. 293-305.
122. Ganderton, L., et al., *Scanning electron microscopy of bacterial biofilms on indwelling bladder catheters*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1992. 11(9): p. 789-96.

123. Nickel, J.C., A.G. Gristina, and J.W. Costerton, *Electron-Microscopic Study of an Infected Foley Catheter*. Canadian Journal of Surgery, 1985. 28(1): p. 50-&.
124. Ohkawa, M., et al., *Bacterial and Crystal Adherence to the Surfaces of Indwelling Urethral Catheters*. Journal of Urology, 1990. 143(4): p. 717-721.
125. Ramsay, J.W.A., et al., *Biofilms, Bacteria and Bladder Catheters - a Clinical-Study*. British Journal of Urology, 1989. 64(4): p. 395-398.
126. Dowd, S.E., et al., *Polymicrobial nature of chronic diabetic foot ulcer biofilm infections determined using bacterial tag encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP)*. PLoS One, 2008. 3(10): p. e3326.
127. Dubos, R.J., *Studies on a Bactericidal Agent Extracted from a Soil Bacillus : I. Preparation of the Agent. Its Activity in Vitro*. J Exp Med, 1939. 70(1): p. 1-10.
128. Burkhart, B.M., et al., *Gramicidin D conformation, dynamics and membrane ion transport*. Biopolymers, 1999. 51(2): p. 129-44.
129. Wang, G., X. Li, and Z. Wang, *APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education*. Nucleic Acids Res, 2016. 44(D1): p. D1087-93.
130. Hassan, M., et al., *Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance*. J Appl Microbiol, 2012. 113(4): p. 723-36.
131. Hancock, R.E. and G. Diamond, *The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences*. Trends Microbiol, 2000. 8(9): p. 402-10.
132. Zasloff, M., *Antimicrobial peptides of multicellular organisms*. Nature, 2002. 415(6870): p. 389-95.
133. Yeaman, M.R. and N.Y. Yount, *Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance*. Pharmacol Rev, 2003. 55(1): p. 27-55.
134. Jenssen, H., P. Hamill, and R.E. Hancock, *Peptide antimicrobial agents*. Clin Microbiol Rev, 2006. 19(3): p. 491-511.
135. Nakatsuji, T. and R.L. Gallo, *Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas*. J Invest Dermatol, 2012. 132(3 Pt 2): p. 887-95.
136. Aoki, W. and M. Ueda, *Characterization of Antimicrobial Peptides toward the Development of Novel Antibiotics*. Pharmaceuticals (Basel), 2013. 6(8): p. 1055-81.
137. Lai, Y. and R.L. Gallo, *AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense*. Trends Immunol, 2009. 30(3): p. 131-41.
138. Reddy, K.V., R.D. Yedery, and C. Aranha, *Antimicrobial peptides: premises and promises*. Int J Antimicrob Agents, 2004. 24(6): p. 536-47.
139. Marr, A.K., W.J. Gooderham, and R.E. Hancock, *Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook*. Curr Opin Pharmacol, 2006. 6(5): p. 468-72.
140. Deslouches, B. and Y.P. Di, *Antimicrobial peptides with selective antitumor mechanisms: prospect for anticancer applications*. Oncotarget, 2017. 8(28): p. 46635-46651.
141. Hancock, R.E. and H.G. Sahl, *Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies*. Nat Biotechnol, 2006. 24(12): p. 1551-7.
142. Yeung, A.T., S.L. Gellatly, and R.E. Hancock, *Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications*. Cell Mol Life Sci, 2011. 68(13): p. 2161-76.
143. Kumar, P., J.N. Kizhakkedathu, and S.K. Straus, *Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo*. Biomolecules, 2018. 8(1).
144. Hancock, R.E., K.L. Brown, and N. Mookherjee, *Host defence peptides from invertebrates--emerging antimicrobial strategies*. Immunobiology, 2006. 211(4): p. 315-22.

145. Ganz, T., *The role of antimicrobial peptides in innate immunity*. Integr Comp Biol, 2003. 43(2): p. 300-4.
146. Ganz, T., *Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2003. 3(9): p. 710-20.
147. Ganz, T., et al., *Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils*. J Clin Invest, 1985. 76(4): p. 1427-35.
148. Hancock, R.E. and D.S. Chapple, *Peptide antibiotics*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. 43(6): p. 1317-23.
149. Diamond, G., J.P. Russell, and C.L. Bevins, *Inducible expression of an antibiotic peptide gene in lipopolysaccharide-challenged tracheal epithelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(10): p. 5156-60.
150. Sass, V., et al., *Human beta-Defensin 3 Inhibits Cell Wall Biosynthesis in Staphylococci*. Infection and Immunity, 2010. 78(6): p. 2793-2800.
151. Ouellette, A.J. and M.E. Selsted, *Paneth cell defensins: endogenous peptide components of intestinal host defense*. FASEB J, 1996. 10(11): p. 1280-9.
152. Qu, X.D., et al., *Secretion of type II phospholipase A2 and cryptdin by rat small intestinal Paneth cells*. Infect Immun, 1996. 64(12): p. 5161-5.
153. Nizet, V., et al., *Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection*. Nature, 2001. 414(6862): p. 454-7.
154. Dorschner, R.A., et al., *Cutaneous injury induces the release of cathelicidin antimicrobial peptides active against group A Streptococcus*. J Invest Dermatol, 2001. 117(1): p. 91-7.
155. Kim, H.S., et al., *Pepsin-mediated processing of the cytoplasmic histone H2A to strong antimicrobial peptide buforin I*. J Immunol, 2000. 165(6): p. 3268-74.
156. Bulet, P., et al., *A novel inducible antibacterial peptide of Drosophila carries an O-glycosylated substitution*. J Biol Chem, 1993. 268(20): p. 14893-7.
157. Giuliani, A., G. Pirri, and S. Fabiole Nicoletto, *Antimicrobial peptides: An overview of a promising class of therapeutics*. Central European Journal of Biology, 2007. 2: p. 1-33.
158. Ebenhan, T., et al., *Antimicrobial peptides: their role as infection-selective tracers for molecular imaging*. Biomed Res Int, 2014. 2014: p. 867381.
159. Ehrenstein, G. and H. Lecar, *Electrically gated ionic channels in lipid bilayers*. Q Rev Biophys, 1977. 10(1): p. 1-34.
160. Brogden, K.A., *Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?* Nat Rev Microbiol, 2005. 3(3): p. 238-50.
161. Wimley, W.C., *Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model*. ACS Chem Biol, 2010. 5(10): p. 905-17.
162. Lee, T.H., K.N. Hall, and M.I. Aguilar, *Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure*. Curr Top Med Chem, 2016. 16(1): p. 25-39.
163. Toke, O., *Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections*. Biopolymers, 2005. 80(6): p. 717-35.
164. Cudic, M. and L. Otvos, Jr., *Intracellular targets of antibacterial peptides*. Curr Drug Targets, 2002. 3(2): p. 101-6.
165. Nicolas, P., *Multifunctional host defense peptides: intracellular-targeting antimicrobial peptides*. FEBS J, 2009. 276(22): p. 6483-96.
166. Subbalakshmi, C. and N. Sitaram, *Mechanism of antimicrobial action of indolicidin*. FEMS Microbiology Letters, 1998. 160(1): p. 91-96.
167. Kosikowska, P. and A. Lesner, *Antimicrobial peptides (AMPs) as drug candidates: a patent review (2003-2015)*. Expert Opin Ther Pat, 2016. 26(6): p. 689-702.

168. Domenighini, M. and R. Rappuoli, *Three conserved consensus sequences identify the NAD-binding site of ADP-ribosylating enzymes, expressed by eukaryotes, bacteria and T-even bacteriophages*. Mol Microbiol, 1996. 21(4): p. 667-74.
169. Han, S. and J.A. Tainer, *The ARTT motif and a unified structural understanding of substrate recognition in ADP-ribosylating bacterial toxins and eukaryotic ADP-ribosyltransferases*. Int J Med Microbiol, 2002. 291(6-7): p. 523-9.
170. Kim, C., et al., *Human alpha-defensins neutralize toxins of the mono-ADP-ribosyltransferase family*. Biochemical Journal, 2006. 399: p. 225-229.
171. De, Y., et al., *LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells*. J Exp Med, 2000. 192(7): p. 1069-74.
172. Niyonsaba, F., et al., *A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis*. Immunology, 2002. 106(1): p. 20-6.
173. Mookherjee, N., et al., *Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37*. J Immunol, 2006. 176(4): p. 2455-64.
174. World Health Organization, <https://amr-review.org/>. Antimicrobial resistance 2014: global report on surveillance.
175. Livermore, D.M., D. British Society for Antimicrobial Chemotherapy Working Party on The Urgent Need: Regenerating Antibacterial Drug, and Development, *Discovery research: the scientific challenge of finding new antibiotics*. J Antimicrob Chemother, 2011. 66(9): p. 1941-4.
176. Theuretzbacher, U. and J.W. Mouton, *Update on antibacterial and antifungal drugs - can we master the resistance crisis?* Curr Opin Pharmacol, 2011. 11(5): p. 429-32.
177. Peschel, A. and H.G. Sahl, *The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance*. Nat Rev Microbiol, 2006. 4(7): p. 529-36.
178. Manniello, J.M., H. Heymann, and F.W. Adair, *Resistance of spheroplasts and whole cells of Pseudomonas cepacia to polymyxin B*. Antimicrob Agents Chemother, 1978. 14(3): p. 500-4.
179. Viljanen, P. and M. Vaara, *Susceptibility of gram-negative bacteria to polymyxin B nonapeptide*. Antimicrob Agents Chemother, 1984. 25(6): p. 701-5.
180. Guina, T., et al., *A PhoP-regulated outer membrane protease of Salmonella enterica serovar typhimurium promotes resistance to alpha-helical antimicrobial peptides*. J Bacteriol, 2000. 182(14): p. 4077-86.
181. Stumpe, S., et al., *Identification of OmpT as the protease that hydrolyzes the antimicrobial peptide protamine before it enters growing cells of Escherichia coli*. J Bacteriol, 1998. 180(15): p. 4002-6.
182. Vlieghe, P., et al., *Synthetic therapeutic peptides: science and market*. Drug Discov Today, 2010. 15(1-2): p. 40-56.
183. McGregor, D.P., *Discovering and improving novel peptide therapeutics*. Curr Opin Pharmacol, 2008. 8(5): p. 616-9.
184. National Center for Biotechnology Information. *PubChem Compound Database: Gramicidin*. [cited 2018 18 Sept]; Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16130140>.
185. Falagas, M.E., A.P. Grammatikos, and A. Michalopoulos, *Potential of old-generation antibiotics to address current need for new antibiotics*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2008. 6(5): p. 593-600.
186. McCormack, P.L. and C.M. Perry, *Caspofungin - A review of its use in the treatment of fungal infections*. Drugs, 2005. 65(14): p. 2049-2068.
187. Denning, D.W., *Echinocandins: a new class of antifungal*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2002. 49(6): p. 889-891.

188. Balani, S.K., et al., *Metabolites of caspofungin acetate, a potent antifungal agent, in human plasma and urine*. Drug Metab Dispos, 2000. 28(11): p. 1274-8.
189. Dorschner, R.A., et al., *The mammalian ionic environment dictates microbial susceptibility to antimicrobial defense peptides*. FASEB J, 2006. 20(1): p. 35-42.
190. Mahlapuu, M., et al., *Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents*. Front Cell Infect Microbiol, 2016. 6: p. 194.
191. Fjell, C.D., et al., *Designing antimicrobial peptides: form follows function*. Nature Reviews Drug Discovery, 2011. 11: p. 37.
192. Bray, B.L., *Large-scale manufacture of peptide therapeutics by chemical synthesis*. Nat Rev Drug Discov, 2003. 2(7): p. 587-93.
193. Conway, S.P., et al., *Intravenous colistin sulphomethate in acute respiratory exacerbations in adult patients with cystic fibrosis*. Thorax, 1997. 52(11): p. 987-993.
194. Hancock, R.E., T. Falla, and M. Brown, *Cationic bactericidal peptides*. Adv Microb Physiol, 1995. 37: p. 135-75.
195. Darouiche, R.O., *Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence*. Clin Infect Dis, 2001. 33(9): p. 1567-72.
196. Shukla, A., et al., *Controlling the release of peptide antimicrobial agents from surfaces*. Biomaterials, 2010. 31(8): p. 2348-57.
197. Onaizi, S.A. and S.S. Leong, *Tethering antimicrobial peptides: current status and potential challenges*. Biotechnol Adv, 2011. 29(1): p. 67-74.
198. Geipel, U., *Pathogenic organisms in hip joint infections*. Int J Med Sci, 2009. 6(5): p. 234-40.
199. Campoccia, D., L. Montanaro, and C.R. Arciola, *The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance*. Biomaterials, 2006. 27(11): p. 2331-9.
200. Zhou, L., et al., *Inflammatory and biocompatibility evaluation of antimicrobial peptide GL13K immobilized onto titanium by silanization*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2017. 160: p. 581-588.
201. Hequet, A., et al., *Optimized grafting of antimicrobial peptides on stainless steel surface and biofilm resistance tests*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2011. 84(2): p. 301-9.
202. Chen, R., et al., *Antimicrobial peptide melimine coating for titanium and its in vivo antibacterial activity in rodent subcutaneous infection models*. Biomaterials, 2016. 85: p. 142-51.
203. Veenstra, D.L., et al., *Efficacy of antiseptic-impregnated central venous catheters in preventing catheter-related bloodstream infection: a meta-analysis*. JAMA, 1999. 281(3): p. 261-7.
204. Mishra, B., et al., *Site specific immobilization of a potent antimicrobial peptide onto silicone catheters: evaluation against urinary tract infection pathogens*. Journal of Materials Chemistry B, 2014. 2(12): p. 1706-1716.
205. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. Nature Methods, 2012. 9(7): p. 676-682.
206. Altschul, S.F., et al., *Basic Local Alignment Search Tool*. Journal of Molecular Biology, 1990. 215(3): p. 403-410.
207. Clinical and Laboratory Standards Institute, *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals, 4th Edition*. 2019, Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne.
208. Clinical and Laboratory Standards Institute, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI Approved Standard M100-S15*. 2018, Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne.

209. Feßler, A.T., et al., *Mikrotiterplattenlayouts für Kleintiere, Großtiere und Mastitis : Aktualisierung der Layouts des DVG-Arbeitskreises „Antibiotikaresistenz“*. . Deutsches Tierärzteblatt, 2017. 65: p. 472-481.
210. O'Toole, G.A., *Microtiter dish biofilm formation assay*. J Vis Exp, 2011(47).
211. BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, <https://bandelin.com/ultraschall/sweep-technologie/>. SweepTec -Frequenzautomatik bei SONOREX Ultraschallbädern.
212. Naghili, H., et al., *Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests*. Vet Res Forum, 2013. 4(3): p. 179-83.
213. Wiegand, I., K. Hilpert, and R.E. Hancock, *Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances*. Nat Protoc, 2008. 3(2): p. 163-75.
214. Romani, A.A., et al., *In vitro activity of novel in silico-developed antimicrobial peptides against a panel of bacterial pathogens*. J Pept Sci, 2013. 19(9): p. 554-65.
215. Skerlavaj, B., et al., *Biological characterization of two novel cathelicidin-derived peptides and identification of structural requirements for their antimicrobial and cell lytic activities*. Journal of Biological Chemistry, 1996. 271(45): p. 28375-28381.
216. Simmaco, M., et al., *Novel Antimicrobial Peptides from Skin Secretion of the European Frog Rana-Esculenta*. Febs Letters, 1993. 324(2): p. 159-161.
217. Zhao, H., et al., *Identification and characterization of novel reptile cathelicidins from elapid snakes*. Peptides, 2008. 29(10): p. 1685-91.
218. Louie, A.J. and G.H. Dixon, *Enzymatic Modifications of Protamines .2. Separation and Characterization of Phosphorylated Species of Protamines from Trout Testis*. Canadian Journal of Biochemistry, 1974. 52(6): p. 536-546.
219. Rapsch, K., et al., *Identification of Antimicrobial Peptides and Immobilization Strategy Suitable for a Covalent Surface Coating with Biocompatible Properties*. Bioconjugate Chemistry, 2014. 25(2): p. 308-319.
220. Blodkamp, S., et al., *In vitro activity of human and animal cathelicidins against livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Vet Microbiol, 2016. 194: p. 107-111.
221. Invitrogen AG, <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Technical-Notes/fluorescence-UV-quantitation-comparison-tech-note.pdf>. Comparison of fluorescence-based quantitation with UV absorbance measurements.
222. Invitrogen AG, <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Application-Notes/qubit-dsDNA-assay-specificity-app-note.pdf>. Qubit dsDNA assay specificity in the presence of single-stranded DNA.
223. Seemann, T., *Prokka: rapid prokaryotic genome annotation*. Bioinformatics, 2014. 30(14): p. 2068-2069.
224. Larsen, M.V., et al., *Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria*. J Clin Microbiol, 2012. 50(4): p. 1355-61.
225. Zankari, E., et al., *Genotyping using whole-genome sequencing is a realistic alternative to surveillance based on phenotypic antimicrobial susceptibility testing*. J Antimicrob Chemother, 2013. 68(4): p. 771-7.
226. Bartels, M.D., et al., *Comparing whole-genome sequencing with Sanger sequencing for spa typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol, 2014. 52(12): p. 4305-8.
227. Simjee, S., *Generation, Presentation, and Application of Antimicrobial Susceptibility Test Data for Bacteria of Animal Origin: A Report*. 2011: Clinical and Laboratory Standards Institute.
228. Schwarz, S., A. Loeffler, and K. Kadlec, *Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine*. Veterinary Dermatology, 2017. 28(1): p. 82-+.

229. Magiorakos, A.P., et al., *Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance*. Clin Microbiol Infect, 2012. 18(3): p. 268-81.
230. Schwarz, S., et al., *Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2010. 65(4): p. 601-604.
231. Edgar, R. and E. Bibi, *MdfA, an Escherichia coli multidrug resistance protein with an extraordinarily broad spectrum of drug recognition*. J Bacteriol, 1997. 179(7): p. 2274-80.
232. Chopra, I. and M. Roberts, *Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance*. Microbiol Mol Biol Rev, 2001. 65(2): p. 232-60 ; second page, table of contents.
233. Shaw, K.J., et al., *Molecular-Genetics of Aminoglycoside Resistance Genes and Familial Relationships of the Aminoglycoside-Modifying Enzymes*. Microbiological Reviews, 1993. 57(1): p. 138-163.
234. Kaatz, G.W., F. McAleese, and S.M. Seo, *Multidrug resistance in Staphylococcus aureus due to overexpression of a novel multidrug and toxin extrusion (MATE) transport protein*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005. 49(5): p. 1857-1864.
235. Davis, I.J., et al., *Linkage of a novel mercury resistance operon with streptomycin resistance on a conjugative plasmid in Enterococcus faecium*. Plasmid, 2005. 54(1): p. 26-38.
236. Kwon, T., et al., *Comparative genomic analysis and characteristics of NCCP15740, the major type of enterotoxigenic Escherichia coli in Korea*. Gut Pathogens, 2017. 9(1): p. 55.
237. Suzuki, M., et al., *Identification of the clonal complexes of Staphylococcus aureus strains by determination of the conservation patterns of small genomic islets*. Journal of Applied Microbiology, 2009. 107(4): p. 1367-1374.
238. Wentz, N., et al., *Associations between Streptococcus uberis strains from the animal environment and clinical bovine mastitis cases*. Journal of Dairy Science, 2019. 102(10): p. 9360-9369.
239. Unnerstad, H.E., et al., *Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors*. Veterinary Microbiology, 2009. 137(1-2): p. 90-97.
240. Zadoks, R.N., et al., *Molecular Epidemiology of Mastitis Pathogens of Dairy Cattle and Comparative Relevance to Humans*. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 2011. 16(4): p. 357-372.
241. Landeskontrollverband Berlin-Brandenburg eV., *Jahresbericht 2017*. 2017: Waldsiedersdorf.
242. Rodrigues, M.X., et al., *The Lactococcus genus as a potential emerging mastitis pathogen group: A report on an outbreak investigation*. Journal of Dairy Science, 2016. 99(12): p. 9864-9874.
243. Plumed-Ferrer, C., et al., *Antimicrobial susceptibilities and random amplified polymorphic DNA-PCR fingerprint characterization of Lactococcus lactis ssp lactis and Lactococcus garvieae isolated from bovine intramammary infections*. Journal of Dairy Science, 2015. 98(9): p. 6216-6225.
244. Simjee, S., et al., *VET05-R : Generation, presentation, and application of antimicrobial susceptibility test data for bacteria of animal origin : A Report*. CLSI document / Clinical and Laboratory Standards Institute. Vol. 17. 2011, Wayne, Pa.: Clinical and Laboratory Standards Institute.

245. Witte, W. and I. Klare, *Antibiotikaresistenz bei bakteriellen Infektionserregern* Mikrobiologisch-epidemiologische Aspekte. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 1999. 42(1): p. 8-16.
246. Bush, K., *Past and Present Perspectives on β -Lactamases*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2018. 62(10): p. e01076-18.
247. Livermore, D.M., *beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance*. Clin Microbiol Rev, 1995. 8(4): p. 557-84.
248. Bush, K., G.A. Jacoby, and A.A. Medeiros, *A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure*. Antimicrob Agents Chemother, 1995. 39(6): p. 1211-33.
249. Sweeney, M.T., et al., *Applying definitions for multidrug resistance, extensive drug resistance and pandrug resistance to clinically significant livestock and companion animal bacterial pathogens*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2018. 73(6): p. 1460-1463.
250. Doublet, B., et al., *Florfenicol resistance gene floR is part of a novel transposon*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005. 49(5): p. 2106-2108.
251. Schwarz, S., et al., *Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol*. FEMS Microbiol Rev, 2004. 28(5): p. 519-42.
252. Skold, O., *R-Factor-Mediated Resistance to Sulfonamides by a Plasmid-Born, Drug-Resistant Dihydropteroate Synthase*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1976. 9(1): p. 49-54.
253. Perreten, V. and P. Boerlin, *A new sulfonamide resistance gene (sul3) in Escherichia coli is widespread in the pig population of Switzerland*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003. 47(3): p. 1169-1172.
254. Dinges, M.M., P.M. Orwin, and P.M. Schlievert, *Exotoxins of Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev, 2000. 13(1): p. 16-34, table of contents.
255. Weese, J.S. and E. van Duijkeren, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus and Staphylococcus pseudintermedius in veterinary medicine*. Veterinary Microbiology, 2010. 140(3-4): p. 418-429.
256. Tiemersma, E.W., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Europe, 1999-2002*. Emerging Infectious Diseases, 2004. 10(9): p. 1627-1634.
257. Tong, S.Y., et al., *Genome sequencing defines phylogeny and spread of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a high transmission setting*. Genome Res, 2015. 25(1): p. 111-8.
258. Falagas, M.E., et al., *MRSA in Africa: filling the global map of antimicrobial resistance*. PLoS One, 2013. 8(7): p. e68024.
259. Nickerson, E.K., et al., *Staphylococcus aureus disease and drug resistance in resource-limited countries in south and east Asia*. Lancet Infect Dis, 2009. 9(2): p. 130-5.
260. Anderson, M.E.C., et al., *Retrospective multicentre study of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in 115 horses*. Equine Veterinary Journal, 2009. 41(4): p. 401-405.
261. Tenhagen, B.A., et al., *Prevalence of pathogens in milk samples of dairy cows with clinical mastitis and in heifers at first parturition*. Journal of Dairy Research, 2009. 76(2): p. 179-187.
262. Monecke, S., et al., *Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of Staphylococcus aureus isolates from cattle*. Vet Microbiol, 2007. 125(1-2): p. 128-40.
263. Tenhagen, B.A., et al., *Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany*. Journal of Dairy Science, 2006. 89(7): p. 2542-2551.

264. Hartman, B.J. and A. Tomasz, *Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 1984. 158(2): p. 513-6.
265. Ghuysen, J.M., *Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins*. Annu Rev Microbiol, 1991. 45: p. 37-67.
266. Ghuysen, J.M., *Molecular structures of penicillin-binding proteins and beta-lactamases*. Trends Microbiol, 1994. 2(10): p. 372-80.
267. Kaczorek, E., et al., *Phenotypic and genotypic antimicrobial susceptibility pattern of Streptococcus spp. isolated from cases of clinical mastitis in dairy cattle in Poland*. Journal of Dairy Science, 2017. 100(8): p. 6442-6453.
268. Boireau, C., et al., *Antimicrobial resistance in bacteria isolated from mastitis in dairy cattle in France, 2006-2016*. Journal of Dairy Science, 2018. 101(10): p. 9451-9462.
269. Tian, X.Y., et al., *Antimicrobial resistance and virulence genes of Streptococcus isolated from dairy cows with mastitis in China*. Microbial Pathogenesis, 2019. 131: p. 33-39.
270. Sghir, A., et al., *Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization*. Appl Environ Microbiol, 2000. 66(5): p. 2263-6.
271. Aarestrup, F.M., P. Butaye, and W. Witte, *Nonhuman reservoirs of enterococci*, in *1st International ASM Conference on Enterococci*, M. Gilmore, Editor. 2002, American Society for Microbiology (ASM): Banff, AB, Canada. p. 55 - 99.
272. Grayson, M.L., et al., *Increasing Resistance to Beta-Lactam Antibiotics among Clinical Isolates of Enterococcus-Faecium - a 22-Year Review at One Institution*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1991. 35(11): p. 2180-2184.
273. Murray, B.E., *The life and times of the Enterococcus*. Clin Microbiol Rev, 1990. 3(1): p. 46-65.
274. Noble, C.J., *Carriage of group D streptococci in the human bowel*. J Clin Pathol, 1978. 31(12): p. 1182-6.
275. Rysanek, D., M. Zouharova, and V. Babak, *Monitoring major mastitis pathogens at the population level based on examination of bulk tank milk samples*. Journal of Dairy Research, 2009. 76(1): p. 117-123.
276. Wyder, A.B., et al., *Streptococcus spp. and related bacteria: Their identification and their pathogenic potential for chronic mastitis - A molecular approach*. Research in Veterinary Science, 2011. 91(3): p. 349-357.
277. Fontana, R., et al., *Mechanisms of resistance to growth inhibition and killing by beta-lactam antibiotics in enterococci*. Clin Infect Dis, 1992. 15(3): p. 486-9.
278. Fontana, R., et al., *Mechanisms of resistance of enterococci to beta-lactam antibiotics*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1990. 9(2): p. 103-5.
279. Murray, B.E., *Vancomycin-resistant enterococcal infections*. N Engl J Med, 2000. 342(10): p. 710-21.
280. Wu, X.H., et al., *Prevalence of virulence and resistance to antibiotics in pathogenic enterococci isolated from mastitic cows*. Journal of Veterinary Medical Science, 2016. 78(11): p. 1663-1668.
281. Klimiene, I., et al., *Prevalence of Gram Positive Bacteria in Cow Mastitis and Their Susceptibility to Beta-Lactam Antibiotics*. Veterinarija Ir Zootechnika, 2011. 56(78): p. 65-72.
282. Pitkala, A., et al., *Bovine mastitis in Finland 2001 - Prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance*. Journal of Dairy Science, 2004. 87(8): p. 2433-2441.
283. Nam, H.M., et al., *Infectious aetiologies of mastitis on Korean dairy farms during 2008*. Research in Veterinary Science, 2010. 88(3): p. 372-374.
284. Werner, G., et al., *Improved identification including MALDI-TOF mass spectrometry analysis of group D streptococci from bovine mastitis and subsequent molecular*

- characterization of corresponding Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium isolates. Veterinary Microbiology, 2012. 160(1-2): p. 162-169.*
285. Wolter, W., et al., *Die Mastitis des Rindes : ein Kursbuch. 2002, Universitätsbibliothek: Gießen.*
286. Zhang, Y.Q., et al., *Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming Staphylococcus epidermidis strain (ATCC 12228). Molecular Microbiology, 2003. 49(6): p. 1577-1593.*
287. Christensen, G.D., et al., *Nosocomial Septicemia Due to Multiply Antibiotic-Resistant Staphylococcus-Epidermidis. Annals of Internal Medicine, 1982. 96(1): p. 1-10.*
288. Tojo, M., et al., *Isolation and Characterization of a Capsular Polysaccharide Adhesin from Staphylococcus-Epidermidis. Journal of Infectious Diseases, 1988. 157(4): p. 713-722.*
289. Li, X.G., Z. Yan, and J.P. Xu, *Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of Candida albicans. Microbiology-Sgm, 2003. 149: p. 353-362.*
290. Konrat, K., et al., *The Bead Assay for Biofilms: A Quick, Easy and Robust Method for Testing Disinfectants. PLoS One, 2016. 11(6): p. e0157663.*
291. Costerton, J.W., *The etiology and persistence of cryptic bacterial infections: a hypothesis. Rev Infect Dis, 1984. 6 Suppl 3: p. S608-16.*
292. Bester, E., et al., *Metabolic differentiation in biofilms as indicated by carbon dioxide production rates. Appl Environ Microbiol, 2010. 76(4): p. 1189-97.*
293. Davies, D.G. and G.G. Geesey, *Regulation of the alginate biosynthesis gene algC in Pseudomonas aeruginosa during biofilm development in continuous culture. Appl Environ Microbiol, 1995. 61(3): p. 860-7.*
294. Lipman, L.J., et al., *Identification of Escherichia coli strains from cows with clinical mastitis by serotyping and DNA polymorphism patterns with REP and ERIC primers. Vet Microbiol, 1995. 43(1): p. 13-9.*
295. Suojala, L., et al., *Phylogeny, virulence factors and antimicrobial susceptibility of Escherichia coli isolated in clinical bovine mastitis. Vet Microbiol, 2011. 147(3-4): p. 383-8.*
296. Kaper, J.B., J.P. Nataro, and H.L. Mobley, *Pathogenic Escherichia coli. Nat Rev Microbiol, 2004. 2(2): p. 123-40.*
297. Weigt, U., *Clinical aspects of coliform mastitis in the bovine. Vet Res Commun, 1983. 7(1-4): p. 253-7.*
298. Hazlett, M.J., et al., *Fatal Mastitis of Dairy-Cows - a Retrospective Study. Canadian Journal of Comparative Medicine-Revue Canadienne De Medecine Comparee, 1984. 48(2): p. 125-129.*
299. Schonborn, S., et al., *In vitro ability of mastitis causing pathogens to form biofilms. J Dairy Res, 2017. 84(2): p. 198-201.*
300. Gomes, F., M.J. Saavedra, and M. Henriques, *Bovine mastitis disease/pathogenicity: evidence of the potential role of microbial biofilms. Pathog Dis, 2016. 74(3).*
301. Shpigel, N.Y., S. Elazar, and I. Rosenshine, *Mammary pathogenic Escherichia coli. Curr Opin Microbiol, 2008. 11(1): p. 60-5.*
302. Reisner, A., et al., *Type 1 Fimbriae Contribute to Catheter-Associated Urinary Tract Infections Caused by Escherichia coli. Journal of Bacteriology, 2014. 196(5): p. 931-939.*
303. Darwish, S.F. and H.A. Asfour, *Investigation of biofilm forming ability in Staphylococci causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. ScientificWorldJournal, 2013. 2013: p. 378492.*
304. Raza, A., et al., *Biofilm Producing Staphylococcus aureus and Bovine Mastitis: A Review. Molecular Microbiology Research, 2013. 3: p. 1-8.*

-
305. Seixas, R., et al., *Short communication: Antimicrobial resistance and virulence characterization of methicillin-resistant staphylococci isolates from bovine mastitis cases in Portugal*. J Dairy Sci, 2014. 97(1): p. 340-4.
306. Garzoni, C. and W.L. Kelley, *Staphylococcus aureus: new evidence for intracellular persistence*. Trends Microbiol, 2009. 17(2): p. 59-65.
307. Bardiau, M., et al., *Associations between properties linked with persistence in a collection of Staphylococcus aureus isolates from bovine mastitis*. Vet Microbiol, 2014. 169(1-2): p. 74-9.
308. Oliveira, M., et al., *Invasive potential of biofilm-forming Staphylococci bovine subclinical mastitis isolates*. J Vet Sci, 2011. 12(1): p. 95-7.
309. Arslan, S. and F. Özkardes, *Slime production and antibiotic susceptibility in staphylococci isolated from clinical samples*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2007. 102: p. 29-33.
310. Zeconi, A. and F. Scali, *Staphylococcus aureus virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases*. Immunol Lett, 2013. 150(1-2): p. 12-22.
311. Landeskontrollverband Berlin-Brandenburg eV., *Jahresbericht 2018*. 2019: Waldsiefersdorf.
312. Baselga, R., et al., *Phase variation of slime production in Staphylococcus aureus: implications in colonization and virulence*. Infect Immun, 1993. 61(11): p. 4857-62.
313. Vasudevan, P., et al., *Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of Staphylococcus aureus for biofilm formation*. Vet Microbiol, 2003. 92(1-2): p. 179-85.
314. Heilmann, C., et al., *Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming Staphylococcus epidermidis*. Molecular Microbiology, 1996. 20(5): p. 1083-1091.
315. Vuong, C., et al., *Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in Staphylococcus aureus*. Journal of Infectious Diseases, 2000. 182(6): p. 1688-1693.
316. Elizabeth Moore, G., *Biofilm Production by Streptococcus uberis Associated with Intramammary Infections*. 2019.
317. Varhimo, E., et al., *Alpha- and beta-casein components of host milk induce biofilm formation in the mastitis bacterium Streptococcus uberis*. Vet Microbiol, 2011. 149(3-4): p. 381-9.
318. Almeida, R.A., et al., *Binding of host glycosaminoglycans and milk proteins: possible role in the pathogenesis of Streptococcus uberis mastitis*. Vet Microbiol, 2003. 94(2): p. 131-41.
319. Kaczorek, E., et al., *Biofilm production and other virulence factors in Streptococcus spp. isolated from clinical cases of bovine mastitis in Poland*. BMC Vet Res, 2017. 13(1): p. 398.
320. Reinoso, E.B., et al., *Distribution of virulence-associated genes in Streptococcus uberis isolated from bovine mastitis*. Fems Microbiology Letters, 2011. 318(2): p. 183-188.
321. Ebrahimi, A., et al., *Biofilm formation, hemolysin production and antimicrobial susceptibilities of Streptococcus agalactiae isolated from the mastitis milk of dairy cows in Shahrekord district, Iran*. Vet Res Forum, 2013. 4(4): p. 269-72.
322. Wendt, K., et al., *Handbuch Mastitis*. 1998, Osnabrück: Kamlage Verlag GmbH & Co.
323. Krömker, V., et al., *Short textbook milk and milk hygiene*. 2007, Stuttgart: PareyVerlag.
324. Matthews, K.R., R.A. Almeida, and S.P. Oliver, *Bovine mammary epithelial cell invasion by Streptococcus uberis*. Infect Immun, 1994. 62(12): p. 5641-6.

325. Ditcham, W.G., et al., *Adhesion of Streptococcus uberis to monolayers of cultured epithelial cells derived from the bovine mammary gland*. FEMS Immunol Med Microbiol, 1996. 14(2-3): p. 145-50.
326. Almeida, R.A., et al., *Predicted antigenic regions of Streptococcus uberis adhesion molecule (SUAM) are involved in adherence to and internalization into mammary epithelial cells*. Vet Microbiol, 2011. 148(2-4): p. 323-8.
327. Smith, K.L. and S.P. Oliver, *Lactoferrin: a component of nonspecific defense of the involuting bovine mammary gland*. Adv Exp Med Biol, 1981. 137: p. 535-54.
328. Oliver, S.P., R.A. Almeida, and L.F. Calvino, *Virulence factors of Streptococcus uberis isolated from cows with mastitis*. Zentralbl Veterinarmed B, 1998. 45(8): p. 461-71.
329. Schaufuss, P., et al., *Isolation and characterization of hyaluronidase from Streptococcus uberis*. Zentralbl Bakteriologie, 1989. 271(1): p. 46-53.
330. Matthews, K.R. and S.P. Oliver, *Encapsulation of streptococci isolated from bovine milk*. Zentralbl Veterinarmed B, 1993. 40(9-10): p. 597-602.
331. Field, T.R., et al., *The hyaluronic acid capsule of Streptococcus uberis is not required for the development of infection and clinical mastitis*. Infection and immunity, 2003. 71(1): p. 132-139.
332. Human Microbiome Project, C., *Structure, function and diversity of the healthy human microbiome*. Nature, 2012. 486(7402): p. 207-14.
333. Nadell, C.D., et al., *Cutting through the complexity of cell collectives*. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences, 2013. 280(1755).
334. Hengzhuang, W., et al., *High beta-lactamase levels change the pharmacodynamics of beta-lactam antibiotics in Pseudomonas aeruginosa biofilms*. Antimicrob Agents Chemother, 2013. 57(1): p. 196-204.
335. Rambach, A., *New plate medium for facilitated differentiation of Salmonella spp. from Proteus spp. and other enteric bacteria*. Appl Environ Microbiol, 1990. 56(1): p. 301-3.
336. Foster, J.S. and P.E. Kolenbrander, *Development of a multispecies oral bacterial community in a saliva-conditioned flow cell*. Applied and Environmental Microbiology, 2004. 70(7): p. 4340-4348.
337. Guillonnet, R., et al., *Multispecies Biofilm Development of Marine Bacteria Implies Complex Relationships Through Competition and Synergy and Modification of Matrix Components*. Frontiers in Microbiology, 2018. 9.
338. Roder, H.L., et al., *Interspecies interactions result in enhanced biofilm formation by co-cultures of bacteria isolated from a food processing environment*. Food Microbiology, 2015. 51: p. 18-24.
339. Sordillo, L.M., *Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility*. Livestock Production Science, 2005. 98(1-2): p. 89-99.
340. du Preez, J.H., *Bovine mastitis therapy and why it fails*. J S Afr Vet Assoc, 2000. 71(3): p. 201-8.
341. Hoiby, N., et al., *Antibiotic resistance of bacterial biofilms*. Int J Antimicrob Agents, 2010. 35(4): p. 322-32.
342. Hoiby, N., *Recent advances in the treatment of Pseudomonas aeruginosa infections in cystic fibrosis*. BMC Med, 2011. 9: p. 32.
343. Hengzhuang, W., et al., *Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and imipenem on mucoid and nonmucoid Pseudomonas aeruginosa biofilms*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. 55(9): p. 4469-74.
344. Hoiby, N., et al., *The clinical impact of bacterial biofilms*. Int J Oral Sci, 2011. 3(2): p. 55-65.

345. Aspedon, A. and E.A. Groisman, *The antibacterial action of protamine: Evidence for disruption of cytoplasmic membrane energization in Salmonella typhimurium*. Microbiology-Sgm, 1996. 142: p. 3389-3397.
346. Li, S.A., W.H. Lee, and Y. Zhang, *Efficacy of OH-CATH30 and its analogs against drug-resistant bacteria in vitro and in mouse models*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. 56(6): p. 3309-17.
347. Zhang, Y., et al., *Structure-function relationship of king cobra cathelicidin*. Peptides, 2010. 31(8): p. 1488-93.
348. Zhao, F., et al., *King cobra peptide OH-CATH30 as a potential candidate drug through clinic drug-resistant isolates*. Zool Res, 2018. 39(2): p. 87-96.
349. Lazar, V., et al., *Antibiotic-resistant bacteria show widespread collateral sensitivity to antimicrobial peptides*. Nature Microbiology, 2018. 3(6): p. 718-731.
350. Pinho, M.G., H. De Lencastre, and A. Tomasz, *An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant and drug-susceptible staphylococci*. Clinical Infectious Diseases, 2001. 33(7): p. 1090-1090.
351. Hartmann, M., et al., *Damage of the Bacterial Cell Envelope by Antimicrobial Peptides Gramicidin S and PGLa as Revealed by Transmission and Scanning Electron Microscopy*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010. 54(8): p. 3132-3142.
352. Kwakman, P.H.S. and S.A.J. Zaat, *Preventive Measures Against Transcutaneous Device Infections*, in *Biomaterials Associated Infection: Immunological Aspects and Antimicrobial Strategies*, T.F. Moriarty, S.A.J. Zaat, and H.J. Busscher, Editors. 2013, Springer New York: New York, NY. p. 229-248.
353. Mack, D., et al., *Mechanisms of biofilm formation in Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses*. Int J Med Microbiol, 2004. 294(2-3): p. 203-12.
354. Zimmerli, W., et al., *Pathogenesis of foreign body infection: description and characteristics of an animal model*. J Infect Dis, 1982. 146(4): p. 487-97.
355. Zimmerli, W., A. Trampuz, and P.E. Ochsner, *Prosthetic-joint infections*. N Engl J Med, 2004. 351(16): p. 1645-54.
356. Krenek, L., et al., *Complication and revision rates following total elbow arthroplasty*. J Hand Surg Am, 2011. 36(1): p. 68-73.
357. Saginur, R., et al., *Multiple combination bactericidal testing of staphylococcal biofilms from implant-associated infections*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. 50(1): p. 55-61.
358. Götz, F. and G. Peters, *Colonization of Medical Devices by Coagulase-Negative Staphylococci*, in *Infections Associated with Indwelling Medical Devices, Third Edition*. 2000, American Society of Microbiology.
359. Mack, D., et al., *Staphylococcal Factors Involved in Adhesion and Biofilm Formation on Biomaterials*, in *Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods, and Applications*, Y.H. An and R.J. Friedman, Editors. 2000, Humana Press: Totowa, NJ. p. 307-330.
360. Wu, H., et al., *Strategies for combating bacterial biofilm infections*. Int J Oral Sci, 2015. 7(1): p. 1-7.
361. Burns, C.A., *Daptomycin-rifampin for a recurrent MRSA joint infection unresponsive to vancomycin-based therapy*. Scand J Infect Dis, 2006. 38(2): p. 133-6.
362. Zimmerli, W., P.D. Lew, and F.A. Waldvogel, *Pathogenesis of foreign body infection. Evidence for a local granulocyte defect*. J Clin Invest, 1984. 73(4): p. 1191-200.
363. Federle, M.J., *Autoinducer-2-Based Chemical Communication in Bacteria: Complexities of Interspecies Signaling*. Bacterial Sensing and Signaling, 2009. 16: p. 18-32.

364. Federle, M.J. and B.L. Bassler, *Interspecies communication in bacteria*. Journal of Clinical Investigation, 2003. 112(9): p. 1291-1299.
365. von Bodman, S.B., J.A. Willey, and S.P. Diggle, *Cell-cell communication in bacteria: United we stand*. Journal of Bacteriology, 2008. 190(13): p. 4377-4391.
366. Balaban, N., et al., *Treatment of Staphylococcus aureus biofilm infection by the quorum-sensing inhibitor RIP*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. 51(6): p. 2226-9.

A. Anhang

Tab. 21: RemuNa-Stammsammlung und ermittelte MHK-Werte

AMC: Amoxicilli/Clavulansäure, AMP: Ampicillin, CEZ: Cefazolin, CPZ: Cefoperazon, CEQ: Cefquinom, ERY: Erythromycin, K/C: Kanamycin/Cephalexin, MAF: Marbofloxacin, OXA: Oxacillin, PEN: Penicillin G, PIR: Pirlimycin, na: nicht analysiert

IMT Nr.	Spezies	AMC	AMP	CEZ	CPZ	CEQ	ERY	K/C	MAF	OXA	PEN	PIR
10338	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	8	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
10491	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	8/0,8	1	<1	<0,125	< 1
10654	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	>= 4
10809	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	>= 16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
11073	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	>= 16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
11177	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	>= 16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
11996	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	>= 16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
15295	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	< 0,25	<1	0,5	<0,125
16405	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	>= 4
17756	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	2	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	>= 4
18132	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	0,5	>=32/3,2	>=2	<1	<0,125	< 1
19925	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	< 1
19926	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	< 1
20631	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	< 1
25173	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	>= 4

IMT Nr.	Spezies	AMC	AMP	CEZ	CPZ	CEQ	ERY	K/C	MAF	OXA	PEN	PIR
29810	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,126	>= 4
30267	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	>= 4
30393	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	>= 4
31032	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	>= 4
31181	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	>= 4
31601	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	>= 4
31602	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
33331	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	>= 4
33833	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	>= 4
35069	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	0,25	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	< 1
35101	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	>= 4
37431	<i>E. coli</i>	< 4/2	8	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37432	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37433	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37434	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37435	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37436	<i>E. coli</i>	< 4/2	>= 16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37437	<i>E. coli</i>	< 4/2	>= 16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37438	<i>E. coli</i>	< 4/2	>= 16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37439	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37440	<i>E. coli</i>	< 4/2	>= 16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4

IMT Nr.	Spezies	AMC	AMP	CEZ	CPZ	CEQ	ERY	K/C	MAF	OXA	PEN	PIR
37441	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37442	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37443	<i>E. coli</i>	< 4/2	>= 16	< 4	8	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37444	<i>E. coli</i>	< 4/2	>= 16	< 4	4	2	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37445	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37446	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37447	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37448	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37449	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37450	<i>E. coli</i>	< 4/2	>= 16	< 4	4	< 1	>= 4	< 4/0,4	>= 2	>= 4	>= 8	>= 4
37451	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37452	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37453	<i>E. coli</i>	< 4/2	>= 16	16	>= 16	>= 8	>= 4	< 4/0,4	>= 2	>= 4	>= 8	>= 4
37454	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37455	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37456	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37457	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37458	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37459	<i>E. coli</i>	< 4/2	>= 16	< 4	8	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37460	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	>= 2	>= 4	8	>= 4
37461	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4

IMT Nr.	Spezies	AMC	AMP	CEZ	CPZ	CEQ	ERY	K/C	MAF	OXA	PEN	PIR
37462	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37463	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37464	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37465	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37466	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37467	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37468	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	8	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37469	<i>E. coli</i>	8/4	>= 16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	>= 2	>= 4	>= 8	>= 4
37470	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37471	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37472	<i>E. coli</i>	< 4/2	>= 16	< 4	8	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37473	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37474	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37475	<i>E. coli</i>	< 4/2	8	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37476	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37477	<i>E. coli</i>	< 4/2	>= 16	< 4	4	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37478	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37479	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37480	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37481	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37482	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	2	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4

IMT Nr.	Spezies	AMC	AMP	CEZ	CPZ	CEQ	ERY	K/C	MAF	OXA	PEN	PIR
37483	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37484	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	4	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37485	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37486	<i>E. coli</i>	< 4/2	>= 16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37487	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37488	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37489	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37490	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37491	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37492	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37493	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	2	8	>= 4
37494	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37495	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37496	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37497	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37498	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37499	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37500	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37501	<i>E. faecium</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	2	32/3,2	2	>= 4	2	< 1
37502	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	16	16	2	0,5	16/1,6	1	>= 4	1	2
37503	<i>E. faecium</i>	< 4/2	< 4	>= 32	>= 16	>= 8	< 0,125	>= 32/3,2	1	>= 4	2	>= 4

IMT Nr.	Spezies	AMC	AMP	CEZ	CPZ	CEQ	ERY	K/C	MAF	OXA	PEN	PIR
37504	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	>= 16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37529	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37530	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37531	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	>= 16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37532	<i>K. oxytoca</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37533	<i>K. oxytoca</i>	< 4/2	16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37534	<i>K. oxytoca</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37535	<i>K. oxytoca</i>	< 4/2	8	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37536	<i>K. oxytoca</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37537	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	< 1	< 0,125	>= 4
37538	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	8	< 2	2	>= 4	< 4/0,4	>= 2	< 1	< 0,125	< 1
37539	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	>= 2	< 1	0,25	< 1
37540	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	>= 2	< 1	< 0,125	>= 4
37541	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	< 1	< 0,125	>= 4
37542	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	< 1	< 0,125	>= 4
37543	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	0,5	< 4/0,4	< 0,25	< 1	< 0,125	< 1
37544	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	8	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	< 1	< 0,125	>= 4
37545	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	0,5	< 4/0,4	< 0,25	< 1	< 0,125	< 1
37546	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	< 1	< 0,125	>= 4
37547	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	4	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	< 1	< 0,125	>= 4
37548	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	8	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	< 1	< 0,125	>= 4

IMT Nr.	Spezies	AMC	AMP	CEZ	CPZ	CEQ	ERY	K/C	MAF	OXA	PEN	PIR
37549	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	>= 4
37550	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	>=2	<1	1	>= 4
37551	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	0,25	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	<1
37552	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	>=2	<1	<0,125	>= 4
37553	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	<1
37554	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	>= 4
37555	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	< 0,25	<1	0,25	<1
37556	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	16	2	>= 4	8/0,8	< 0,25	>= 4	8	>= 4
37557	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	>=2	<1	<0,125	>= 4
37558	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	>= 4
37559	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	>= 4
37560	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	< 1
37561	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	0,25	< 4/0,4	< 0,25	<1	0,25	< 1
37562	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	>= 4
37563	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	2	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	>= 4
37564	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	2	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	< 1
37565	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	>= 4
37566	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	>=2	<1	<0,125	>= 4
37567	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	>= 4
37568	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	0,5	< 4/0,4	0,5	>= 4	<0,125	4
37569	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	>= 4

IMT Nr.	Spezies	AMC	AMP	CEZ	CPZ	CEQ	ERY	K/C	MAF	OXA	PEN	PIR
37570	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37571	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37572	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	4
37573	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37574	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37575	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37576	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	>= 4
37577	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37578	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37579	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37580	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	4
37581	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37582	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37583	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37584	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37585	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37586	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	4	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37587	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37588	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37589	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	1	<1	<0,125	< 1
37590	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1

IMT Nr.	Spezies	AMC	AMP	CEZ	CPZ	CEQ	ERY	K/C	MAF	OXA	PEN	PIR
37591	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37592	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	< 1
37593	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	< 1
37594	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37595	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	< 1
37596	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37597	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	< 1
37598	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	2
37599	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	4
37600	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	2
37601	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37602	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37603	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37604	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	2
37605	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37606	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	< 1
37607	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37608	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37609	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	< 1
37610	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	4
37611	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	< 1

IMT Nr.	Spezies	AMC	AMP	CEZ	CPZ	CEQ	ERY	K/C	MAF	OXA	PEN	PIR
37612	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37613	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	4
37614	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37615	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	16/1,6	1	<1	<0,125	2
37616	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	>= 16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37617	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37618	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37619	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	>= 16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37620	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37621	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	>= 16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37622	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	>= 16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37623	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	>= 16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37624	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37625	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	4	>= 4
37626	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37627	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	>= 16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37628	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	8	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37629	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	>= 16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37630	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37631	<i>S. aureus</i>	< 4/2	16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	>=2	<1	<0,125	>= 4
37632	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	>=32/3,2	>=2	<1	<0,125	>= 4

IMT Nr.	Spezies	AMC	AMP	CEZ	CPZ	CEQ	ERY	K/C	MAF	OXA	PEN	PIR
37633	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	2
37634	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	2
37635	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	2
37636	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	2
37637	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	1	<1	<0,125	< 1
37638	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	>= 4
37639	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37640	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	0,5	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	2
37641	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	1	<1	<0,125	>= 4
37642	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	4
37643	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37644	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	2
37645	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37646	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	< 1
37647	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	2
37648	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37649	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37650	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37651	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	1	<1	<0,125	< 1
37652	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	>= 4
37653	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	4

IMT Nr.	Spezies	AMC	AMP	CEZ	CPZ	CEQ	ERY	K/C	MAF	OXA	PEN	PIR
37654	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	>= 4
37655	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	2
37656	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	>= 4
37657	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	>= 4
37658	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37659	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37660	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	4
37661	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	2
37662	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	2
37663	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	0,5	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	2
37664	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37665	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37666	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37667	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	4
37668	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37669	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37670	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37671	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	8/0,8	0,5	<1	<0,125	< 1
37672	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37673	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	1	<1	<0,125	< 1
37674	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	< 1

IMT Nr.	Spezies	AMC	AMP	CEZ	CPZ	CEQ	ERY	K/C	MAF	OXA	PEN	PIR
37675	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	>= 4
37676	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37677	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37678	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37679	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	4
37680	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37683	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37684	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37685	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37686	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37687	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37688	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37689	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37690	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	>=4
37691	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	4
37692	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37693	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37694	<i>S. uberis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37695	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	>= 4
37696	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	>=4
37697	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	>=4

IMT Nr.	Spezies	AMC	AMP	CEZ	CPZ	CEQ	ERY	K/C	MAF	OXA	PEN	PIR
37698	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	0,25	< 4/0,4	<0,25	<1	<0,125	< 1
37699	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	8	2	0,5	< 4/0,4	< 0,25	>=4	8	< 1
37701	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	>= 16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37847	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37848	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	< 1
37849	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	< 1
37850	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37851	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	< 1
37852	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37853	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	< 1
37854	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	< 1
37855	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37856	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	< 1
37857	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37858	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37859	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
37860	<i>S. uberis</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
37861	<i>S. uberis</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
37862	<i>S. uberis</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
37863	<i>S. uberis</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
37864	<i>S. uberis</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na

IMT Nr.	Spezies	AMC	AMP	CEZ	CPZ	CEQ	ERY	K/C	MAF	OXA	PEN	PIR
37865	<i>S. uberis</i>	na										
37866	<i>S. uberis</i>	na										
37867	<i>S. uberis</i>	na										
37868	<i>S. uberis</i>	na										
37869	<i>S. uberis</i>	na										
37870	<i>S. uberis</i>	na										
37871	<i>S. uberis</i>	na										
37872	<i>S. uberis</i>	na										
37873	<i>S. uberis</i>	na										
37874	<i>S. uberis</i>	na										
37875	<i>S. uberis</i>	na										
37876	<i>S. uberis</i>	na										
37877	<i>S. uberis</i>	na										
37878	<i>S. uberis</i>	na										
37879	<i>S. uberis</i>	na										
37880	<i>S. uberis</i>	na										
37881	<i>S. uberis</i>	na										
37882	<i>S. uberis</i>	na										
37883	<i>S. uberis</i>	na										
37884	<i>S. uberis</i>	na										
37885	<i>S. uberis</i>	na										

IMT Nr.	Spezies	AMC	AMP	CEZ	CPZ	CEQ	ERY	K/C	MAF	OXA	PEN	PIR
37886	<i>S. uberis</i>	na										
37887	<i>S. uberis</i>	na										
37888	<i>S. uberis</i>	na										
37889	<i>S. uberis</i>	na										
37890	<i>S. uberis</i>	na										
37891	<i>S. uberis</i>	na										
37892	<i>S. uberis</i>	na										
37893	<i>S. uberis</i>	na										
37894	<i>S. uberis</i>	na										
37895	<i>S. uberis</i>	na										
37896	<i>S. uberis</i>	na										
37897	<i>S. uberis</i>	na										
37898	<i>S. uberis</i>	na										
37899	<i>S. uberis</i>	na										
37900	<i>S. uberis</i>	na										
37901	<i>S. uberis</i>	na										
37902	<i>S. uberis</i>	na										
37903	<i>S. uberis</i>	na										
37904	<i>S. uberis</i>	na										
37905	<i>S. uberis</i>	na										
37906	<i>S. uberis</i>	na										

IMT Nr.	Spezies	AMC	AMP	CEZ	CPZ	CEQ	ERY	K/C	MAF	OXA	PEN	PIR
37907	<i>S. uberis</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
37908	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	0,25	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	>= 4
37909	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	>= 4
37910	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	>= 4
37911	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	>= 16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37912	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	8	8	< 1	1	16/1,6	1	<1	0,5	4
37913	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	16	16	4	0,5	16/1,6	0,5	>= 4	2	< 1
37914	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	8	8	< 1	>= 4	< 4/0,4	0,5	< 1	0,5	>= 4
37915	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
37916	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	4	>= 4
37917	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
38013	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
38014	<i>E. coli</i>	< 4/2	>= 16	< 4	< 2	< 1	>= 4	32/3,2	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
38015	<i>K. oxytoca</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
38016	<i>K. oxytoca</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
38017	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	8	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
38018	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	8	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
38019	<i>K. oxytoca</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
38020	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
38021	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
38022	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1

IMT Nr.	Spezies	AMC	AMP	CEZ	CPZ	CEQ	ERY	K/C	MAF	OXA	PEN	PIR
38023	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
38024	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
38025	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
38026	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
38027	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
38028	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
38029	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	< 4	4	< 1	1	>=32/3,2	0,5	<1	0,25	2
38030	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	< 4	4	< 1	1	>=32/3,2	< 0,25	<1	0,5	4
38031	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	< 4	4	< 1	>= 4	>=32/3,2	0,5	<1	0,5	>= 4
38032	<i>E. faecium</i>	< 4/2	< 4	< 4	8	8	2	< 4/0,4	0,5	<1	0,25	< 1
38033	<i>E. faecium</i>	< 4/2	< 4	>= 32	16	>= 8	4	< 4/0,4	0,5	<1	0,5	< 1
38034	<i>E. faecium</i>	< 4/2	< 4	>= 32	>= 16	>= 8	< 0,125	8/0,8	1	<1	1	4
38035	<i>S. uberis</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
38036	<i>S. uberis</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
38037	<i>S. uberis</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
38038	<i>S. uberis</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
38039	<i>S. uberis</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
38040	<i>S. uberis</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
38041	<i>S. uberis</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
38253	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	4	< 1	<0,125	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	4	< 1
38254	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	4	2	0,25	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	0,5	< 1

IMT Nr.	Spezies	AMC	AMP	CEZ	CPZ	CEQ	ERY	K/C	MAF	OXA	PEN	PIR
38255	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
38256	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	>= 16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
38334	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	16/1,6	< 0,25	<1	<0,125	< 1
38335	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	8	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
38930	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
38931	<i>E. faecium</i>	< 4/2	< 4	>=32	>=16	>=8	2	<4/0,4	2	>= 4	1	<1
38932	<i>E. faecium</i>	< 4/2	< 4	>=32	>=16	>=8	2	8/0,8	>=2	4	2	<1
38933	<i>E. faecium</i>	< 4/2	< 4	>=32	>=16	>=8	4	>=32/3,2	2	>= 4	2	<1
38934	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	< 4	8	< 1	1	16/1,6	0,5	<1	0,5	4
38935	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	8	8	< 1	2	<4/0,4	0,5	<1	0,5	4
38936	<i>L. garvieae</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
38937	<i>L. garvieae</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
38938	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	8	2	0,25	<4/0,4	0,5	>=4	2	<1
38939	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>=8	>= 4
38940	<i>E. faecium</i>	< 4/2	< 4	>= 32	>= 16	>= 8	2	>=32/3,2	>=2	>=4	0,5	<1
38941	<i>L. garvieae</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
38942	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	16	8	4	1	16/1,6	1	>= 4	1	4
38943	<i>K. oxytoca</i>	< 4/2	16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
38944	<i>L. garvieae</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
38945	<i>L. garvieae</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
38946	<i>Enterococcus spp.</i>	< 4/2	< 4	>=32	>=16	>=8	4	32/3,2	2	>= 4	2	<1

IMT Nr.	Spezies	AMC	AMP	CEZ	CPZ	CEQ	ERY	K/C	MAF	OXA	PEN	PIR
38947	<i>L. garvieae</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
38948	<i>L. garvieae</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
38949	<i>E. faecium</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	< 0,125	< 4/0,4	< 0,25	<1	< 0,125	4
38950	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	32	>=16	4	0,5	<=32/3,2	1	>= 4	2	4
38952	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	< 0,125	< 4/0,4	0,5	< 1	< 0,125	< 1
39026	<i>E. saccharolyticus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	< 0,125	< 4/0,4	>= 2	>= 4	< 0,125	< 1
39027	<i>L. garvieae</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
39028	<i>K. oxytoca</i>	< 4/2	8	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
39029	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	>= 16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
39030	<i>L. garvieae</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
39031	<i>L. garvieae</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
39032	<i>L. garvieae</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
39033	<i>K. oxytoca</i>	< 4/2	>= 16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
39034	<i>L. garvieae</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
39035	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	16	16	2	1	16/1,6	1	4	0,5	< 1
39036	<i>E. faecium</i>	< 4/2	< 4	>= 32	>= 16	>= 8	2	8/0,8	1	>= 4	1	<1
39037	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	0,5	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	<1
39038	<i>L. garvieae</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
39039	<i>L. garvieae</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
39040	<i>L. garvieae</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
39041	<i>S. dysgalactiae</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na

IMT Nr.	Spezies	AMC	AMP	CEZ	CPZ	CEQ	ERY	K/C	MAF	OXA	PEN	PIR
39042	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	<1
39043	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
39044	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	<1
39045	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
39046	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
39047	<i>S. dysgalactiae</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
39048	<i>S. dysgalactiae</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
39049	<i>S. dysgalactiae</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
39930	<i>E. cecorum</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	< 0,125	< 4/0,4	1	<1	< 0,125	<1
39931	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	32	>=16	4	0,5	16/1,6	1	>= 4	1	2
39932	<i>S. dysgalactiae</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
39933	<i>S. dysgalactiae</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
39934	<i>S. dysgalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	< 1
39935	<i>S. dysgalactiae</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
39936	<i>L. garvieae</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
39937	<i>L. garvieae</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
39938	<i>L. garvieae</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
39939	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>=8	>= 4
39940	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	>= 16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
39941	<i>E. saccharolyticus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	< 0,125	< 4/0,4	1	<1	< 0,125	<1
39942	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	8/0,8	1	<1	<0,125	< 1

IMT Nr.	Spezies	AMC	AMP	CEZ	CPZ	CEQ	ERY	K/C	MAF	OXA	PEN	PIR
39943	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	< 1
39944	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	>= 16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
39945	<i>E. saccharolyticus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	< 0,125	< 4/0,4	<0,25	<1	< 0,125	<1
39946	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	16	16	2	1	16/1,6	1	>= 4	1	4
39947	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	8	16	2	0,5	< 4/0,4	< 0,25	>=4	8	< 1
39948	<i>S. aureus</i>	< 4/2	< 4	< 4	8	2	0,25	< 4/0,4	< 0,25	>=4	4	< 1
39949	<i>E. coli</i>	< 4/2	>= 16	>=32	>= 16	>= 8	>= 4	32/3,2	2	>= 4	>= 8	>= 4
39950	<i>E. coli</i>	< 4/2	>= 16	>=32	>= 16	>= 8	>= 4	16/1,6	2	>= 4	>= 8	>= 4
39951	<i>E. coli</i>	< 4/2	>= 16	>=32	>= 16	>= 8	>= 4	32/3,2	>= 2	>= 4	>= 8	>= 4
39952	<i>K. pneumoniae</i>	8/4	>= 16	16	>=16	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
39953	<i>E. faecalis</i>	8/4	< 4	32	>=16	8	0,25	8/0,8	2	>= 4	2	4
39954	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>=8	>= 4
39955	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	16	8	2	1	8/0,8	1	>= 4	1	4
39956	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	16	8	< 1	0,25	8/0,8	0,5	>= 4	0,5	4
39957	<i>L. lactis</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
39958	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>=8	>= 4
39959	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>=8	>= 4
39960	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	8	8	< 1	1	< 4/0,4	1	2	0,5	< 1
39961	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	32	16	2	1	16/1,6	1	>= 4	1	< 1
39962	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	16	16	< 1	1	8/0,8	0,5	>= 4	1	< 1
39963	<i>Enterobacter ludwigii</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na

IMT Nr.	Spezies	AMC	AMP	CEZ	CPZ	CEQ	ERY	K/C	MAF	OXA	PEN	PIR
39964	<i>E. coli</i>	< 4/2	>= 16	>=32	>= 16	>= 8	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
39965	<i>E. faecium</i>	< 4/2	< 4	>= 32	>= 16	>= 8	4	>=32/3,2	0,5	>= 4	< 0,125	>= 4
39966	<i>E. faecium</i>	< 4/2	< 4	>= 32	>= 16	>= 8	0,25	>=32/3,2	1	>=4	2	< 1
39967	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>=4	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	>=4
39968	<i>Streptococcus spp.</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
39969	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	8/0,8	0,5	<1	<0,125	< 1
39970	<i>S. agalactiae</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
39971	<i>E. coli</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	8	>= 4
39972	<i>S. dysgalactiae</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
40431	<i>E. coli</i>	< 4/2	>= 16	>=32	>= 16	>= 8	>= 4	16/1,6	>= 2	>= 4	>= 8	>= 4
40432	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	>= 16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
40433	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>=8	>= 4
40434	<i>E. coli</i>	< 4/2	>= 16	>=32	>= 16	>= 8	>= 4	8/0,8	>= 2	>= 4	>= 8	>= 4
40435	<i>E. coli</i>	< 4/2	>= 16	>=32	>= 16	>= 8	>= 4	16/1,6	>= 2	>= 4	>= 8	>= 4
40436	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>=8	>= 4
40437	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>=8	>= 4
40438	<i>E. coli</i>	< 4/2	>= 16	>=32	>= 16	>= 8	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
40670	<i>S. parauberis</i>	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
40671	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	1	<1	<0,125	< 1
40672	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	< 4	4	< 1	>=4	8/0,8	0,5	<1	0,5	>=4
40673	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1

IMT Nr.	Spezies	AMC	AMP	CEZ	CPZ	CEQ	ERY	K/C	MAF	OXA	PEN	PIR
40674	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	16/1,6	1	<1	<0,125	< 1
40675	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
40676	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	1	<1	<0,125	< 1
40677	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
40678	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
40679	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	16	16	2	0,5	16/1,6	1	>=4	1	4
40680	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	16	8	2	1	8/0,8	0,5	4	1	>=4
40681	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
40682	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
40683	<i>E. coli</i>	< 4/2	>= 16	>=32	>= 16	>= 8	>= 4	>=32/3,2	< 0,25	>= 4	>= 8	>= 4
40684	<i>E. coli</i>	< 4/2	>= 16	>=32	>= 16	>= 8	>= 4	< 4/0,4	>= 2	>= 4	>= 8	>= 4
40685	<i>E. coli</i>	16/8	>= 16	>=32	>= 16	< 1	>= 4	< 4/0,4	2	>= 4	>= 8	>= 4
40687	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	32	8	2	4	>=32/3,2	1	2	0,5	>=4
40688	<i>E. faecium</i>	< 4/2	< 4	16	8	2	0,5	8/0,8	1	>=4	1	4
41523	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	16	16	4	1	16/1,6	1	>=4	1	4
41524	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>=8	>= 4
41525	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>=8	>= 4
41526	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>=8	>= 4
41527	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	16	16	4	1	16/1,6	0,5	>=4	1	4
41528	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	16	16	4	1	16/1,6	< 0,25	>=4	1	4
41529	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>=8	>= 4

IMT Nr.	Spezies	AMC	AMP	CEZ	CPZ	CEQ	ERY	K/C	MAF	OXA	PEN	PIR
41530	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	16	8	< 1	0,25	16/1,6	0,5	>=4	0,25	4
41531	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	1	8/0,8	0,5	>=4	< 0,125	< 1
41532	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	16	16	4	1	16/1,6	0,5	>=4	1	2
41533	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>=8	>= 4
41534	<i>E. faecium</i>	< 4/2	< 4	>= 32	>= 16	>= 8	2	16/1,6	1	>=4	1	> 1
41535	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	1	<1	<0,125	< 1
41536	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	1	<1	<0,125	< 1
41537	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	1	<1	<0,125	< 1
41538	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	1	<1	<0,125	< 1
41539	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	8/0,8	1	<1	<0,125	< 1
41540	<i>S. gallolyticus</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
41541	<i>K. pneumoniae</i>	< 4/2	16	< 4	< 2	< 1	>= 4	< 4/0,4	< 0,25	>= 4	>=8	>= 4
41542	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
41543	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
41544	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	< 1
41545	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	8	16	< 1	1	32/3,2	1	>=4	1	2
41546	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	16	16	< 1	1	32/3,2	1	>=4	1	< 1
41547	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	8/0,8	1	<1	<0,125	< 1
41548	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	1	<1	<0,125	< 1
41549	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	16	16	2	1	16/1,6	0,5	4	1	4
41550	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	1	<1	<0,125	< 1

IMT Nr.	Spezies	AMC	AMP	CEZ	CPZ	CEQ	ERY	K/C	MAF	OXA	PEN	PIR
43661	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	< 0,25	<1	<0,125	< 1
43662	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
43663	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
43664	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	<0,125	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
43665	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	0,5	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
43666	<i>S. agalactiae</i>	< 4/2	< 4	< 4	< 2	< 1	>=4	< 4/0,4	0,5	<1	<0,125	< 1
43667	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	16	16	< 1	2	<4/0,4	1	4	1	2
43668	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	8	16	< 1	0,25	<4/0,4	< 0,25	<1	1	2
43669	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	8	8	< 1	1	<4/0,4	0,5	<1	0,5	>=4
43670	<i>E. faecalis</i>	< 4/2	< 4	8	8	< 1	>=4	<4/0,4	0,5	<1	0,5	>=4

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe. Es wurden von mir ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität als Prüfungsleistung eingereicht.

Julia Assmann