

Aus dem Institut für Tierpathologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

**Erste Untersuchungen zu Vorkommen und Zusammensetzung
von Biofilmen bei Hunden, Katzen und Pferden
mit chronischen Wundnahtinfektionen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Lydia Marie König
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2015

Journal-Nr.: 3794

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Betreuung: Univ.-Prof. Dr. Achim Gruber, Ph.D.(Cornell Univ.)
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Achim Gruber, Ph.D.(Cornell Univ.)
Zweiter Gutachter: PD Dr. Sebastian Günther
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Christoph Lischer

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

cats, dogs; horses; sutures; wound infections; biofilms; genome analysis

Tag der Promotion: 21.03.2016

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-710-1

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2015

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2016

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Für Jassi

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Biofilme - eine Strategie der bakteriellen Gemeinschaft	2
1.1.1 Extrazelluläre, polymere Matrix	2
1.1.2 Entwicklung, Struktur und Ablösung von Biofilmen.....	3
1.1.3 Diagnostik von Biofilmen	4
1.1.3.1 Paradigmenwechsel bei der Erforschung von Biofilmen	4
1.1.3.2 Nachweisverfahren für Biofilme	5
1.1.3.2.1 Elektronenmikroskopie.....	5
1.1.3.2.2 Konfokalmikroskopie.....	5
1.1.3.2.3 Lichtmikroskopie	5
1.1.4 Methoden zur Identifizierung von Bakterien aus Biofilmen	5
1.1.4.1 Bakterielle Anzucht in der Kultur	6
1.1.4.2 Polymerase-Kettenreaktion.....	6
1.1.4.3 Next Generation Genome Sequencing	7
1.2 Biofilme als Krankheitsauslöser.....	7
1.2.1 Biofilme an Grenzflächen	8
1.2.2 Studiengegenstand: Nahtmaterial	9
1.2.3 Die Therapieresistenz von Bakterien in Biofilmen.....	9
1.2.4 Biofilminfektion - bakterieller Schutz und verminderte Immunabwehr	10
1.2.5 Prophylaxe der Biofilm-Entwicklung und Therapie von Biofilm-Infektionen.....	11
1.3 Ziele der Doktorarbeit	13
2 Eigene Forschung	16
2.1 Erste Publikation: Prevalence of Biofilms on Suture Segments in Dogs, Cats and Horses with Postoperative Surgical Site Infection	16
2.2 Zweite Publikation: Next Generation Sequencing Analysis of Biofilms from Three Dogs with Postoperative Surgical Site Infection.....	20

3	Zusammenfassende Diskussion.....	26
3.1	Schlussfolgerung	32
3.2	Ausblick.....	33
4	Zusammenfassung.....	34
5	Summary	36
6	Referenzen.....	38
7	Publikationsliste.....	49
8	Danksagung	50
9	Selbstständigkeitserklärung	51

Abkürzungsverzeichnis

AHL	Acyl-Homoserin-Lacton
DAR	Debridement, Antibiotics and Retention
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EPM	extrazelluläre, polymere Matrix
FFPE	formalinfixiert und paraffineingebettet
HE	Hämatoxylin-Eosin
Lux	Lumineszenz-Proteine
LuxI	Autoinduktor von Lumineszenz-Gene
LuxR	Transkriptionaler Aktivator, der an den Autoinduktor von Lumineszenz-Genen bindet
NGGS	Next Generation Genome Sequencing
OP	Operation
PAS	Periodsäure-Schiff
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäuren

1 Einleitung

Bakterielle Infektionen stellten in allen Epochen besondere Herausforderungen an die Medizin. Die Entwicklung antibakterieller Substanzen erzielte zwar einen erheblichen Fortschritt für die Therapie von Patienten, doch ist auch ihr Einsatz durch die Eigenschaften der Bakterien begrenzt. Die heute gängige These, dass ausschließlich der auf Bakterien ausgeübte Selektionsdruck durch Desinfektionsmittel in Kliniken oder der vermehrte Einsatz von Antibiotika in der Tiermast zu resistenten Bakterien führen, wurde allerdings widerlegt. So zeigten 30.000 Jahre alte Bakterien, isoliert aus Sedimenten, bereits Resistenzgene gegen Antibiotika (D'Costa *et al.* 2011). Bakterien haben also schon vor Urzeiten Mechanismen entwickelt, die sie vor antibakteriell wirkenden Stoffen schützen. Einzelne, planktonische Bakterien können Resistenzen durch eine genetische Varianz entwickeln, während bakterielle Gemeinschaften durch die Ausbildung eines Biofilms ihr Überleben in einem feindlichen Milieu sichern können. A. T. Henrici beschrieb 1933 diese Lebensweise bereits: „It is quite evident that for the most part the water bacteria are not free floating organisms but grow upon submerged surfaces“ (Henrici 1933). Biofilme sind also Ansammlungen von Mikroorganismen auf einer Grenzfläche unter Ausbildung einer selbst produzierten, extrazellulären, polymeren Matrix (EPM; Costerton 1999). Forschungen zeigten, dass Bakterien im Biofilm in der Lage sind, miteinander zu kommunizieren und sich an Lebensbedingungen anzupassen.

Natürlicherweise kommen Biofilme in Gewässern, auf Pflanzen und auf Steinen vor und bilden sich daher auch auf Schiffsrümpfen und in Industrieanlagen. Zusätzlich zu hohen Kosten, die durch die Beseitigung von Biofilmen entstehen, können diese für den Menschen auch zu gesundheitlichen Problemen führen. Im medizinischen Bereich stehen sie im Zusammenhang mit chronischen Wundheilungsstörungen und Infektionen nach dem Einsetzen medizinischer Implantate. Die Schwierigkeit liegt in der Bekämpfung der biofilmbildenden Bakterien, da sie insbesondere durch das Ausbilden einer Matrix einen Schutz gegen Umwelteinflüsse genießen.

Über das Auftreten von Biofilmen in entzündeten Wunden bei Tieren ist bisher wenig bekannt. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Inzidenz von Biofilmen auf Naht- und Tupfermaterial in Wunden von Hunden, Katzen und Pferden zu untersuchen und anschließend die detektierten Biofilme auf ihre bakterielle Zusammensetzung hin zu analysieren. Hierzu wurde ein histopathologisches Nachweisverfahren mit einer neuartigen Sequenzierungsmethode kombiniert. Wichtige Ergebnisse dieser Studie waren (1.) der Nachweis von Biofilmen bei Wundinfektionen mit Nahtmaterial bei Tieren, (2.) die Beobachtung, dass die Inzidenz von Biofilmen bei Tieren geringer sein könnte als für den Menschen beschrieben und (3.) die Unterschiede und Gemeinsamkeiten bezüglich der Zusammensetzung der untersuchten Biofilme im Vergleich zu früheren Studien.

1.1 **Biofilme - eine Strategie der bakteriellen Gemeinschaft**

Biofilme sind Ansammlungen von Mikroorganismen auf Grenzflächen unter Ausbildung einer extrazellulären, polymeren Matrix (Costerton *et al.* 1999). Diese Lebensform bietet Bakterien die Möglichkeit, Zustände ihrer Umwelt auszugleichen, in denen sie als Individuen nicht existieren könnten. Wann Bakterien einen Biofilm ausbilden, ist von der Art der Bakterien und den Umweltbedingungen abhängig (Novick 2003). Einige Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* und *Pseudomonas fluorescens* scheinen die Lebensform des Biofilms unter jeglichen Bedingungen zu bevorzugen (O'Toole *et al.* 1998a), andere werden erst sesshaft, wenn sich ihre Lebensbedingungen zum Negativen ändern, wie z.B. durch ein vermindertes Nährstoffangebot, welches bei *Escherichia coli* O517:H7 eine Formation zum Biofilm auslöst (Dewanti *et al.* 1995).

Diese für Bakterien außerordentlich vorteilhafte Strategie bedeutet gleichzeitig für den Menschen eine Auseinandersetzung mit einer Lebensweise, die nicht mit den bisherigen Ansätzen zur bakteriellen Elimination beseitigt werden kann. Allein in den USA sterben über eine halbe Million Menschen jährlich an dieser Art der Infektion und es entstehen 94 Billionen US-Dollar Kosten durch Infektionen, verursacht durch Bakterien im Biofilmmodus (Wolcott *et al.* 2010a).

1.1.1 **Extrazelluläre, polymere Matrix**

Die extrazelluläre, polymere Matrix (EPM) ist das entscheidende Kriterium, welches biofilmbildende Mikroorganismen von planktonischen, also frei beweglich lebenden Mikroorganismen unterscheidet. Ein Biofilm setzt sich aus etwa 20-25 % überlebensfähigen Bakterien und etwa 75-80 % EPM zusammen. Die Matrix besteht zum größten Teil aus Wasser, Polysacchariden, Proteinen, Desoxyribonukleinsäuren (DNA) und Ribonukleinsäuren (RNA). Zusätzlich können Lipide, Phospholipide und weitere Zellkomponenten enthalten sein (Costerton *et al.* 1995; Hall-Stoodley *et al.* 2004; Sutherland 2001).

Die Struktur der Matrix ist abhängig von der Art der auftretenden Bakterien, den verfügbaren Nährstoffen und den aktuellen Umweltbedingungen (Sutherland 2001). Sie hat einen Einfluss auf das Wasserbindungsvermögen, die mechanische Stabilität, die Sorptionsfähigkeit, also das Vermögen zur Anreicherung von Stoffen, sowie auf die Diffusionseigenschaften des Biofilms (Flemming 1995; Mayer *et al.* 1999). Die Matrix bietet den Bakterien Schutz vor Umwelteinflüssen wie Austrocknung, Hitze und Strahlung und auch vor chemischen und biologischen Gefahren durch Antibiotika, Biozide und Desinfektionsmittel. Innerhalb eines Fremdorganismus bietet sie einen umfassenden Schutz vor der wirtseigenen Immunabwehr (Domenech *et al.* 2013).

1.1.2 Entwicklung, Struktur und Ablösung von Biofilmen

Die Entwicklung eines Biofilms erfolgt in verschiedenen, aufeinanderfolgenden Schritten. Sie ist abhängig von der Art der Mikroorganismen und den vorliegenden Umweltbedingungen wie der Temperatur, der Oberflächenbeschaffenheit und der Menge an vorhandenem Wasser. Die Bakterien reagieren außerdem auf Stressoren wie Zelldichte und Nährstoffqualität, Änderungen des pH-Wertes oder der Osmolarität (Fraunhofer IGB, 2014; Novick 2003). Auch korreliert die Inzidenz von Biofilmen mit Eigenschaften wie Rauheit und der freien Energie der Oberflächen (Hall-Stoodley *et al.* 2004; Teughels *et al.* 2006).

Die reversible, nicht spezifische Anheftung von Bakterien an einer Grenzfläche wird durch die Kontaktaufnahme mittels Flagellenbewegung, Van-der-Waals-Kräften, hydrophoben Wechselwirkungen und elektrostatischen Kräften eingeleitet. Schon nach wenigen Minuten wird die Expression spezifischer Adhäsionsgene induziert, die die Synthese von extrazellulären Proteinen stimulieren. Mit diesem Schritt ist die Anheftung irreversibel und der Biofilm beginnt zu reifen (Costerton 1999; Golovlev 2002; O'Toole *et al.* 1998b; Thewes *et al.* 2014). Zur Maturation gehören die Ausbildung einer Matrix, der biofilmtypischen Architektur sowie die Zell-Zell-Interaktion.

Die Zell-Zell-Interaktion erfolgt mittels Kommunikation zwischen den Bakterienzellen durch das Quorum-Sensing-System, einem auf Signalmolekülen, sogenannten Autoinducern, basierenden Mechanismus. Diese Signalmoleküle werden von den Bakterien gebildet und ermöglichen die Synchronisation der Bakterien bei der Synthese von Polysacchariden, zur Erfassung der Bakteriendichte sowie dem kollektiven Start zur Produktion von Virulenzfaktoren und damit dem Beginn der Resistenzausbildung (Holm *et al.* 2014). Gramnegative Bakterien gebrauchen das LuxI/LuxR-Typ System, welches mit Acyl-Homoserin-Lacton (AHL) als Signalmolekül arbeitet. Grampositive Bakterien benutzen ein Oligopeptide-two-component-Typ Quorum-Sensing, für das kleine Proteine als Signalmoleküle dienen. Ein LuxS-encoded Autoinducer-2-System kommt in grampositiven sowie gramnegativen Bakterien vor (Li *et al.* 2012; Waters *et al.* 2005). Der Vergleich zwischen planktonisch lebenden Bakterien und ihrem Biofilmmodus zeigt für *Pseudomonas aeruginosa*, dass lediglich 1 % der Gene unterschiedlich zum planktonischen Stadium exprimiert waren. Im Biofilmmodus zeigten sich 0,5 % mehr und 0,5 % weniger exprimierte Gene (Whiteley *et al.* 2001). Im Jahre 1999 beschrieben Costerton *et al.* noch einen Unterschied von 30-40 % bei der Ausbildung von Proteinen zwischen planktonischen Bakterien und dem Biofilmmodus (Costerton 1999).

Die Strukturen von Biofilmen lassen sich in zwei Typen einteilen, die Mono- und die Multilayer. Jedes Bakterium, welches Teil eines sogenannten Monolayers, also eines einschichtigen Biofilms ist, haftet ausschließlich an der Oberfläche, auf der es sich befindet. Bakterien in Multilayern, den mehrschichtigen Biofilmen, haben zusätzlich auch Kontakt zu

benachbarten Bakterien. Die Architektur von Biofilmen kann ebenfalls in zwei Klassen eingeteilt werden. Welche der Klassen ausgebildet wird, ist abhängig von der Zusammensetzung des Mediums, dem Vorkommen von Surfactant, der Motilität und dem Quorum-Sensing (Purevdorj *et al.* 2002). Man unterscheidet die flachen, kompakten Strukturen von pilzförmigen, unregelmäßigen und weniger dichten Strukturen mit einer eher punktförmigeren Ausbreitung (Karatan *et al.* 2009).

Die Dauer der Entwicklung eines Biofilms *in vivo* wurde bisher nur spärlich untersucht. Costerton *et al.* (1987) konnten Biofilme auf Implantaten in weniger als drei Tagen nachweisen (Costerton *et al.* 1987). Davis *et al.* (2008) konnten bereits nach 48 Stunden biofilm-ähnliche Strukturen in experimentell infizierten Wunden von Schweinen beobachten (Davis *et al.* 2008). Ebenfalls nach 48 Stunden konnte eine Biofilmformation in der Maulschleimhaut von Beaglen auf eingesetztem Nahtmaterial registriert werden (Leknes *et al.* 2005).

Das Ablösen von Bakterien aus Biofilmen entsteht bei Prozessen, die als Verschorfung und Erosion bezeichnet werden, wobei unter Erosion die Ablösung von kleinen, bei Verschorfung die Ablösung von großen Anteilen eines Biofilms verstanden wird (Cho *et al.* 2007; Stoodley *et al.* 2001). Es handelt sich bei diesen Vorgängen meist um passive Abläufe, die durch mechanische Prozesse oder Strömungskräfte eingeleitet werden (Cho *et al.* 2007). Weiteren Einfluss auf die Ablösung von Biofilmmaterial haben Umweltbedingungen wie das Nährstoffaufkommen und der Einfluss von Antimikrobiota (Parsek *et al.* 2003). Schnell wachsende Biofilme haben eine höhere Ablösungsrate als langsam wachsende Biofilme unter gleichen hydrodynamischen Bedingungen (Piciooreanu *et al.* 2001). Von einem Biofilm abgelöste, einzelne, also planktonische Bakterien können anschließend akute Sekundärinfektionen hervorrufen (Costerton *et al.* 1999; Ymele-Leki *et al.* 2007). Wenn sich ganze Teile eines Biofilms ablösen, bleiben die Bakterien innerhalb der Matrix und behalten weitestgehend die Eigenschaften, die sie auch als sessiler Teil des Biofilms an der Oberfläche innehatten (Wilkins *et al.* 2014).

1.1.3 Diagnostik von Biofilmen

1.1.3.1 Paradigmenwechsel bei der Erforschung von Biofilmen

Die Diagnostik von Biofilmen kann in zwei Teile gegliedert werden: Den Nachweis von Biofilmen und die Identifikation der vorhandenen Bakterien in einem Biofilm. Für beide Bereiche gibt es in der Literatur verschiedene Ansätze. Die jeweils angewendete Methode oder die Kombination aus verschiedenen Methoden hängt vom vorhandenen Gewebe und der Laborausstattung des Untersuchenden ab. Große Unterschiede weisen die Verfahren in ihrer Spezifität und Sensitivität auf.

1.1.3.2 Nachweisverfahren für Biofilme

Als Nachweisverfahren eines Biofilms gelten Verfahren, die einen Biofilm als Ganzes, also mit allen Komponenten sichtbar machen können. Hierzu gehört die Darstellung von Bakterien auf einer Grenzfläche, die von einer Matrix umgeben sind. In der Literatur wird als gängige Technik die Mikroskopie verwendet.

1.1.3.2.1 Elektronenmikroskopie

Der Biofilmnachweis mittels Elektronenmikroskopie ist prinzipiell möglich, erfordert allerdings einen hohen Aufwand durch die aufwändige Vorbereitung der Proben sowie hohe Anschaffungskosten für das Gerät. Das Verfahren ist daher für die Detektion von Biofilmen in der Routinediagnostik nicht geeignet (Marrie *et al.* 1983, 1984b; Marrie *et al.* 1982; Nickel *et al.* 1985; Nickel *et al.* 1986; Palestrant *et al.* 2004). Vorteilhaft ist die gute Visualisierbarkeit von Biofilmen im Gewebe (Marrie *et al.* 1982; Nickel *et al.* 1985).

1.1.3.2.2 Konfokalmikroskopie

Die Konfokalmikroskopie ist ein Verfahren, das den Nachweis von Biofilmen mit einer hohen Sensitivität und hohen Auflösung ermöglicht. Sie ist jedoch arbeitsaufwändig und mit hohen Kosten verbunden (Inglis *et al.* 1995; Universität Wien, 2014; Zhuo *et al.* 2014).

1.1.3.2.3 Lichtmikroskopie

Durch die Anwendung einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) und einer Gramfärbung ist es möglich, schon mittels eines Lichtmikroskops Biofilme zu diagnostizieren (Davis *et al.* 2008). Es handelt sich bei den Färbungen um Standardfärbeverfahren, die in jedem Histologielabor verfügbar sind. Die Färbungen sind auf formalinfixiertem und paraffineingebettetem (FFPE) Gewebe anwendbar und vergleichsweise kostengünstig.

Die hohe Sensitivität der HE-Färbung wurde bei der Detektion von Biofilmen mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung bestätigt (Hochstim *et al.* 2010).

1.1.4 Methoden zur Identifizierung von Bakterien aus Biofilmen

Die Identifikation dient dem Nachweis von Bakterien eines Biofilms. Auch hier gibt es verschiedene Ansätze. Diese reichen von der klassischen Anzucht bis zu neusten molekulargenetischen Verfahren.

1.1.4.1 Bakterielle Anzucht in der Kultur

Die Anzucht von Bakterien aus einem Biofilm in einer Kultur ist aufgrund zweier Punkte kritisch zu beurteilen:

Der „Viable but not culturable“- Zustand der Bakterien:

Die Bakterien nehmen diesen „lebendigen, aber nicht kultivierbaren“ Zustand durch eine geringere Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen in den unteren Schichten im Biofilm ein. Konsequenz dieser Mangelversorgung ist eine geringere metabolische Aktivität der Bakterien, die sich auch auf ihre Vermehrungsrate auswirkt. Dies kann dazu führen, dass anwesende, lebende Bakterien in der Kultur nicht anzüchtbar sind. Ein falsch-negatives Ergebnis ist die Folge (Anderl *et al.* 2003; Fux *et al.* 2005). Außerdem ist es möglich, dass sich Bakterien unter Laborbedingungen anders entwickeln, als es unter *in vivo*-Bedingungen der Fall wäre (Siggins *et al.* 2012).

Unvollständiger Nachweis:

Eine meist aus Tupferproben entwickelte Anzucht kann ein unvollständiges Bild des Bakterienspektrums erzeugen, da die Proben häufig nur aus einem Bereich und nur sehr oberflächlich genommen werden. Dies führt zu Unterschieden in den Ergebnissen aus molekularen Verfahren und Kultur-Anzuchten (Fazli *et al.* 2009). Schwierig mittels Kultur ist auch der Nachweis komplexer, bakterieller Zusammensetzungen. Dies liegt besonders an unterschiedlichen Konzentrationen einzelner Spezies sowie ihrer Konkurrenz zueinander (Martin *et al.* 2009). Ein Vergleich zwischen molekularen Techniken und traditioneller Kultur zeigte auch, dass mittels Kultur nur ca. 1 % der Bakterien aus chronischen Wunden nachweisbar waren (Martin *et al.* 2009).

Ein Vorteil einer kulturellen Anzucht ist der ausschließliche Nachweis lebender Mikroorganismen (Martin *et al.* 2009).

1.1.4.2 Polymerase-Kettenreaktion

Das Problem eines Nachweises mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zeigt sich darin, dass die für den Biofilmmodus aktivierten Gene bei verschiedenen Bakterienspezies und Bakterienstämmen unterschiedlich sind und darum vor dem Identifizierungsverfahren bekannt sein müssen. Dies macht eine Identifizierung von Bakterien, insbesondere bei Biofilmen, an denen mehrere verschiedene Spezies beteiligt sind, schwierig. Außerdem

können die nachgewiesenen Gene ebenfalls in planktonisch lebenden Bakterien ausgeprägt sein. Mittels PCR ist darum lediglich das Vorkommen der Bakterien in der Probe, nicht aber ihr Vorliegen im Biofilmmodus nachweisbar (Fux *et al.* 2005; Nyvad *et al.* 2013; Trevors 2011). Vorteil der PCR ist ein hohes Maß an Spezifität und Sensitivität.

1.1.4.3 Next Generation Genome Sequencing

Neueste Publikationen weisen darauf hin, dass der Einsatz neuer Technologien wie beispielsweise das Next Generation Genome Sequencing (NGGS) sinnvoll bei der Identifizierung von Bakterien aus Biofilmen ist (Do *et al.* 2013). Allerdings ist das Verfahren sehr kostspielig und nur wenige Labore verfügen über die nötige Ausstattung. Das Verfahren eignet sich daher nicht für die Routinediagnostik. Für die Auswertung der Daten ist außerdem viel Erfahrung nötig. Vorteile dieser Methode sind zum einen die nur geringen Mengen an benötigtem Material, was insbesondere für retrospektive Studien erfreulich ist. Zum anderen werden alle DNA-Fragmente gleichwertig berücksichtigt. Es besteht nicht die Gefahr, dass wie bei einer Anzucht Bakterien aufgrund des Nährmediums bessere Wachstumsbedingungen vorfinden als andere Bakterien und damit fälschlicherweise als dominierende Spezies interpretiert werden. Außerdem muss kein gesondertes Verfahren zur Erfassung anaerober Bakterien oder Bakterien aus tiefliegenden Schichten des Biofilms durchgeführt werden. Auch ist die Zahl der identifizierbaren Familien nicht beschränkt, wie es bei der Anzucht in einer Kultur der Fall ist.

1.2 **Biofilme als Krankheitsauslöser**

Mehr als 80 % aller Infektionen in der Humanmedizin sind biofilmassoziiert (Romero *et al.* 2008). Parsek und Singh entwickelten Kriterien, die den Startpunkt einer biofilmassoziierten Infektion beschreiben. Dieser Definition nach müssen die Infektionen folgende Punkte erfüllen (Parsek *et al.* 2003):

- a) Die infektiösauslösenden Bakterien sind einer Oberfläche oder einem Substrat anhaftend.
- b) In dem infizierten Gewebe können Bakterien in Verbänden oder Mikrokolonien, umgeben von einer extrazellulären Matrix, nachgewiesen werden.
- c) Die Infektion ist auf eine Lokalisation beschränkt.
- d) Die Infektion ist trotz Antibiotikaeinsatz schwer bis gar nicht zu beseitigen.

1.2.1 Biofilme an Grenzflächen

Als Grenzfläche kommen für die Entwicklung eines Biofilms natürliche sowie künstliche Oberflächen in Frage. Als natürliche Flächen dienen Übergänge von einer Gewebeart zur anderen. Die Bildung eines Biofilms kann daher für die Entstehung einer Infektion vollständig oder teilweise verantwortlich sein. Künstliche Grenzflächen sind Oberflächen von körperfremden Materialien, die zum kurzzeitigen oder dauerhaften Verbleib im Menschen oder im Tier vorgesehen sind. In der Humanmedizin wurden Biofilme z.B. an folgenden natürlichen Grenzflächen direkt oder indirekt nachgewiesen:

- Ohrschleimhaut bei Otitis media (Thornton *et al.* 2011)
- Tracheobronchialschleimhaut bei Mukoviszidose (Davey *et al.* 2000; Govan *et al.* 1996)
- Mesothel bei Peritonitis (Lamont *et al.* 1998),
- Kardiales Endothel bei Endokarditiden (Freedman 1987)
- Urothel bei infektiösen Nierensteinen (Nickel *et al.* 1986)
- Spongiosa bei Osteomyelitis (Gristina *et al.* 1985b)
- Nasenschleimhaut bei Rhinosinusitis (Foreman *et al.* 2010).

Weiterhin wurden Biofilme z.B. an den folgenden synthetischen Grenzflächen direkt oder indirekt nachgewiesen:

- Nahtmaterial (Gristina *et al.* 1985c; Leknes *et al.* 2005)
- Herzschrittmacher (Marrie *et al.* 1984a; Marrie *et al.* 1982)
- Katheter (Jacques *et al.* 1987; Nickel *et al.* 1989; Nickel *et al.* 1985)
- orthopädische Prothesen (Gristina *et al.* 1985a; Trampuz *et al.* 2007; Ward *et al.* 1992)
- orthopädische Stahlimplantate (Gristina *et al.* 1985a)
- Cochlea-Implantate (Ruellan *et al.* 2010).

In der Tiermedizin konnten an folgenden natürlichen Grenzflächen bereits Biofilme direkt oder indirekt nachgewiesen werden:

- Digitale Dermatitis von Milchkühen (Schlafer *et al.* 2008)
- Mastitiden von Kühen (Fernandes *et al.* 2011)
- Osteomyelitis bei Pferden (Goodrich 2006),
- Otitiden von Hunden (Pye *et al.* 2013)
- Tracheobronchialschleimhaut von Schweinen (Kaplan *et al.* 2005)
- Periodontitiden von Hunden (Senhorinho *et al.* 2011)
- Wundoberflächen von Pferden (Westgate *et al.* 2011)
- Wundoberflächen von Hunden (Swanson *et al.* 2014)

An der folgenden synthetischen Grenzfläche konnte in der Veterinärmedizin bereits ein Biofilm nachgewiesen werden:

- Blasenkatheeter von Hunden (Segev *et al.* 2013)

1.2.2 Studiengegenstand: Nahtmaterial

Nahtmaterial dient Bakterien in Geweben als eine Grenzfläche zur Ausbildung eines Biofilms. Die Art des verwendeten Nahtmaterials sowie die Zeit, in der die Bakterien in Kontakt mit dem Nahtmaterial stehen, sind entscheidend für die Menge der Bakterien, die am Nahtmaterial haften. Dies zeigten Studien mit radioaktiv markierten Bakterien (Chu *et al.* 1984). So haften z.B. Bakterien bis zu hundertfach besser an Catgut, also natürlichem Faden, als an Nylon, einem synthetischen Produkt (Sugarman *et al.* 1981). Eine nur geringe Anziehung von Bakterien zu Nylon bestätigte auch Katz *et al.* (1981), die zeigten, dass Bakterien zu geflochtenem Nahtmaterial eine fünf- bis zehnmals höhere Anziehung haben als zu Nylonfäden. In dieser Studie konnte auch eine Korrelation zwischen dem Grad der Entzündung und der Art des verwendeten Fadens beobachtet werden. So zeigte sich, dass die Schwere der Infektion durch das eingebrachte, bakterienbesiedelte Nahtmaterial stieg, je höher die Affinität der Bakterien zum Nahtmaterial war (Katz *et al.* 1981). Auch Leknes und Kollegen wiesen 2005 nach, dass die Gewebereaktion umso stärker ist, wenn das Nahtmaterial aus geflochtener Seide, also einem polyfilen Faden, anstatt aus Polytetrafluoroethylen, einem monofilen Faden, besteht. Wichtig ist dabei, dass es nicht nur mobilen, sondern auch immobil Bakterien möglich ist, sich im Zwischenraum von polyfilen Fäden anzulagern. Die Ausbreitung der Bakterien in den Faden hinein ist vor allem abhängig von der Größe der Kapillarkräfte des Materials (Blomstedt *et al.* 1977). Auch wenn Studien zeigen, dass polyfiler Faden von Bakterien bevorzugt besiedelt wird, so kommen Biofilme auch auf monofilem Faden vor (Kathju *et al.* 2010).

1.2.3 Die Therapieresistenz von Bakterien in Biofilmen

Das Verhalten von Mikroorganismen, die sich im biofilmbildenden Modus befinden, unterscheidet sich signifikant von dem ihrer planktonischen Lebensweise unter gleichen Umweltbedingungen. Bakterien in einem Biofilm sind resistent gegen Antibiotika, Phagozytose, Surfactant, Antikörper, Bakteriozide und Bakteriophagen (Costerton *et al.* 1987; Costerton *et al.* 1981).

Eine Antibiotikatherapie kann also die Symptome beseitigen, die durch die planktonisch lebenden Bakterien verursacht werden, nicht jedoch aber einen Biofilm eliminieren (Francolini *et al.* 2010). Im Gegensatz zu planktonisch lebenden Bakterien oder jungen Biofilmen, wird

bei Biofilmen, die älter als zehn Tage alt sind, 80 % der Masse nicht durch die gleiche antibiotische Therapie ausgelöscht, oder sie erholen sich nach der Therapie (Anwar *et al.* 1992). Ein Vergleich zwischen *Staphylococcus aureus* in Biofilmen und in einem planktonischen Wachstumsmodus zeigte eine bis zu hundertmal höhere Resistenz der Bakterien im Biofilm gegenüber Antibiotika (Anwar *et al.* 1992).

Die EPM spielt eine wichtige Rolle in Bezug auf die Resistenz von Biofilmen. Das Ausmaß des Schutzes der Matrix ist abhängig von dem eingesetzten Antibiotikum, der Bindungskapazität der Matrix, der eingesetzten therapeutischen Menge und der Wachstumsrate der Mikrokolonien relativ zur Diffusionsrate (Hoyle *et al.* 1992).

Die Matrix hat einen schützenden Effekt durch eine Limitierung der Penetration von Molekülen durch die Matrix. Ein Stoff, dessen Wirkung durch eine langsame Diffusion durch die Matrix verzögert eintritt, wirkt nur mit reduzierter Dosis. Dementsprechend ist ein Gefälle von penetrierenden Antibiotika von der freien Seite des Biofilms zu seiner an eine Oberfläche gebundenen Seite zu registrieren (Fux *et al.* 2005). Hinzu kommt, dass die negativ geladene Exopolysaccharid-Matrix in der Lage ist, positiv geladene Aminoglycosid-Antikörper zu binden und einen Eintritt in die Matrix zu verhindern (Lewis 2001).

In *in vitro*-Versuchen konnte gezeigt werden, dass Mutanten, denen die Glykokalix fehlt, schneller und mit einer geringeren Mukusqualität wachsen als Wildtypen (Costerton *et al.* 1981). Nachweislich können sich nicht-Polysaccharid-produzierende Mutanten zwar mit einer vergleichbaren Menge Bakterien an eine Oberflächen anheften, allerdings sind diese nicht in der Lage, Mikrokolonien oder Biofilme zu formen, wie es der Wildtyp tut (Allison *et al.* 1987). Ein weiterer Vorteil der Biofilmstruktur für die Bakterien ist eine gesenkte Wachstumsrate der Bakterien innerhalb eines Biofilms, da schnell wachsende Bakterien anfälliger sind für Antibiotika als langsam wachsende Bakterien (Lewis 2001).

1.2.4 Biofilminfektion - bakterieller Schutz und verminderte Immunabwehr

Typisch für biofilmassoziierte Infektionen ist, dass sich akute Phasen mit Phasen eines physiologischen Zustandes abwechseln. Oft sprechen Patienten auf eine Antibiotikagabe im Anfangsstadium positiv an. Darauf folgt jedoch meist ein Rückschlag, denn die bakterielle Biofilmzusammensetzung besteht häufig aus Haut- und Darmkeimen, die nur schwer aus dem Gewebe um das Fremdmaterial oder von dem Fremdmaterial selbst zu entfernen sind (Costerton *et al.* 1987). Das Auftreten dieser Symptome resultiert aus den Eigenschaften des eingesetzten Fremdmaterials und der wirtseigenen Immunabwehr. Durch das Einbringen von Fremdmaterial entsteht ein *locus minoris resistentiae*, also verwundetes, schlecht vaskularisiertes Gewebe. An diesem können sich sowohl bei einem Eingriff eingebrachte als auch planktonisch im Körper bereits vorhandene Bakterien vereinfacht niederlassen (Trebše 2012).

Im Falle einer Infektion reduziert dieser Gewebsdefekt außerdem die Möglichkeiten der körpereigenen Abwehr auf die Entzündung zu reagieren und bietet stattdessen eine ideale Anheftungsfläche für Bakterien (Mulcahy 2010; Wolcott *et al.* 2008).

Jensen *et al.* (1993) zeigten, dass das Komplementsystem und als Folge davon auch die Induktion der Phagozytose im Vergleich zu planktonischen Bakterien reduziert ist, wenn sich Bakterien in einem Biofilm befinden (Jensen *et al.* 1993).

Ist das Komplementsystem und damit die Phagozytose aber aktiviert, werden im Zuge der nicht gelingenden Elimination der Bakterien immer mehr Entzündungsmediatoren abgegeben und schädigen so das Gewebe um den Biofilm, allerdings ohne diesen zu zerstören (Clutterbuck *et al.* 2007). Bereits im Jahr 2002 konnte nachgewiesen werden, dass Leukozyten zwar einen *Staphylococcus-aureus*-Biofilm penetrieren können, aber nicht die Bakterien darin angreifen können (Leid *et al.* 2002). Außerdem konnte z.B. für *Staphylococcus aureus* bei 65 % der untersuchten Stämme eine Bindungsfähigkeit an Fibrinogen, Fibronectin, Laminin und Kollagen, also Proteinen, die an der Wundheilung beteiligt sind, nachgewiesen werden (Elgalai *et al.* 2003).

1.2.5 Prophylaxe der Biofilm-Entwicklung und Therapie von Biofilm-Infektionen

Faktoren, die bei einem chirurgischen Eingriff auf eine Besiedelung von Fremdmaterial Einfluss haben, sind das Maß an Sterilität, der prä- und postoperative Antibiotikaeinsatz, die Oberflächenbeschaffenheit des Materials und sein Energielevel. Biofilmassoziierten Infektionen versucht man auf zwei Wegen entgegenzuwirken: Zum einen **prophylaktisch**, durch eine Verhinderung der Anhaftung von Bakterien an Fremdmaterial und damit der Verhinderung des initialen Prozesses bei der Biofilmentwicklung. Zum anderen ist dies **therapeutisch** durch die Eliminierung von Bakterien in bereits gebildeten Biofilmen möglich.

Ein **prophylaktischer** Ansatz, um die Besiedelung von Fremdoberflächen mit Biofilmbildnern zu verhindern, ist die Vorabbesiedelung von Oberflächen medizinischer Geräte mit eukaryotischen Zellen (Gristina 1987). Wenn Gewebezellen Erstbesiedler eines Implantates sind, müssen sich nachfolgende Bakterien mit lebenden Zellen auseinandersetzen. Dies erschwert die Besiedelung für die Bakterien. Sind jedoch Bakterien zuerst zur Stelle, können Gewebezellen diese Besiedlung kaum noch verdrängen (Gristina 1987). Ein weiteres prophylaktisches Verfahren ist das Anbringen einer Beschichtung auf Fremdmaterialien, die das Anheften von Bakterien verhindert. So konnte gezeigt werden, dass beispielsweise eine glycolalixähnliche, antiadhäsive Oberfläche auf Kathetern einer Besiedelung mit *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* vorbeugte (Chauhan *et al.* 2014). Eine mögliche Prophylaxe ist auch das Aufbringen eines antibakteriellen Coatings. Auf diese Weise konnte in einer *in vitro*-Studie die Bildung von Biofilmen auf Brustimplantaten erfolgreich verhindert werden (van Heerden *et al.* 2009).

Um Biofilme nach ihrer Entstehung zu beseitigen, wurden verschiedene **therapeutische** Verfahren entwickelt. Durch den Einsatz verschiedener Antibiotikakombinationen konnte in *in vivo*- und in *in vitro*-Versuchen die vollständige, langanhaltende Eliminierung von Biofilmen erreicht werden (Lebeaux *et al.* 2014). Es handelte sich jedoch um experimentell induzierte *in vivo*-Biofilme mit bekannter bakterieller Zusammensetzung aus einer oder nur wenigen Bakterienspezies. So konnte z.B. eine *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli*-induzierte, katheterassoziierte Biofilminfektion mit Gentamicin ergänzt durch L-Arginin bei lokaler Anwendung in Ratten ausgelöscht werden (Lebeaux *et al.* 2014).

Der Einsatz von Silber-Nanopartikeln ist ebenfalls ein vielversprechender Ansatz zur Eliminierung von Biofilmen, wie *in vitro*-Untersuchungen an *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus epidermidis* zeigten (Kalishwaralal *et al.* 2010; Markowska *et al.* 2013).

Als weitere Therapie ist der Einsatz von lytischen Bakteriophagen möglich. Diese bewirkten eine deutliche Reduktion der *in vitro* produzierten Biofilme (Carson *et al.* 2010). Zu diesem Verfahren liegen bisher noch keine *in vivo*-Daten vor.

Um den Bakterien die Möglichkeit zu nehmen, sich zu einem folgenschweren Biofilm zu entwickeln, wird als Angriffspunkt das Quorum-Sensing-System genutzt. An verschiedenen Punkten kann in die bakterielle Kommunikation eingegriffen werden. So sind die Verhinderung der Synthese von Signalmolekülen, die Hemmung der Interaktion zwischen Signalmolekül und Rezeptor sowie der Abbau von Signalmolekülen mögliche Angriffspunkte (Tay *et al.* 2013). Nachteil dieser Methode ist der Verbleib der Bakterien innerhalb der Läsion, da lediglich die Ausbildung eines Biofilmes unterdrückt werden kann, jedoch keine Abtötung der Bakterien erfolgt. Nachteilig ist ebenfalls, dass die Quorum-Sensing-Moleküle spezifisch für jede Spezies sind. Für Biofilme unbekannter Zusammensetzung *in vivo* ist der Einsatz der Methode daher ungeeignet (Tay *et al.* 2013). Vorteilhaft ist, dass durch das Überleben der Bakterien und den so ausbleibenden Selektionsdruck die Ausbildung von Resistenzen geringer als bei einem Antibiotikaeinsatz sein kann (Rasko *et al.* 2010; Tay *et al.* 2013).

Die Durchführung eines Debridements, also einer Wundsäuberung mit Entfernung von nekrotischem und infiziertem Gewebe, wird als wirksames Verfahren beschrieben, um die Bakterien aus der Läsion zu eliminieren (Leknes *et al.* 2005). Die Erfolge des Verfahrens können darin begründet sein, dass 99 % der Bakterien im Schorf chronischer Wunden angesiedelt sind (Bisno 1984; Zhao *et al.* 2010). Allerdings sind meist eine wiederholte Anwendung, die Kombination mit einer systemischer Antibiose nach der Identifizierung der Erreger und die lokale Anwendung von Bakterioziden nötig, um den gewünschten Erfolg zu erzielen (Wolcott *et al.* 2009). Je früher mit dem Debridement begonnen wird, desto besser werden die Heilungschancen prognostiziert (Wolcott *et al.* 2010b).

Eine antiseptische Wundbehandlung mit anschließendem Einsetzen einer neuen Prothese erzielte in 85 % der Fälle bei Penisprothesen-Infektionen eine erfolgreiche Elimination der

Infektion. Bei infizierten Gelenksprothesen tritt durch eine ein- oder zwei-phasige Therapie in ca. 80 % der Fälle eine Heilung ein (Aboltins *et al.* 2014; Mulcahy 2010; Tsukayama *et al.* 1996). Hierbei wird entweder ein neues Gelenk direkt nach der Entfernung des alten mit Hilfe eines mit Antibiotika versetzten Knochenzements wieder eingesetzt, oder es wird an den Ausbau des Gelenkes erst eine circa sechswöchige Antibiotikatherapie angeschlossen, bevor ein neues Gelenk eingesetzt wird (Aboltins *et al.* 2014). Eine hohe Variabilität der Ergebnisse sind mit dem DAR-(Antibiotics, Debridement and Retention)-Konzept beobachtet worden. Das Ziel dieser Therapie ist das Verbleiben des Implantats im Körper und die Eliminierung der Bakterien durch ein Debridement und eine Antibiotikagabe (Aboltins *et al.* 2014).

1.3 Ziele der Doktorarbeit

In der Literatur ist ein Zusammenhang zwischen chronischen Wundinfektionen und im Biofilm lebenden Bakterien beschrieben, der besonders häufig bei postoperativen Wundinfektionen im Anschluss an ein Einsetzen von medizinischem Material beobachtet wurde. An entnommenem, infiziertem Nahtmaterial von Menschen wiesen 100 % der 46 untersuchten Proben Biofilme auf (Edmiston *et al.* 2013). Der Nachweis von Biofilmen erfolgte mittels Kultur, biochemisch, histopathologisch und / oder molekulargenetisch. Bei den typischerweise identifizierten Bakterien handelte es sich um Staphylococcacea, Streptococcacea und Pseudomonadacea. Folgende Hypothesen sollten deshalb in veterinärmedizinischen Proben geprüft werden:

Hypothese I:

Biofilme kommen bei Wundinfektionen von Tieren vor.

Biofilme spielen in der Humanmedizin nachgewiesenermaßen eine große Rolle und verursachen jährlich Kosten in Millionenhöhe (Wolcott *et al.* 2010a). Da nur wenige Daten aus der Tiermedizin vorliegen, die eine quantitative Aussage über das Auftreten von Biofilmen bei Tieren zulassen, war das erste Ziel eine retrospektive Studie zur groben Abschätzung der Häufigkeiten von Biofilmen bei Hunden, Katzen und Pferden.

Ziel I: Ermittlung der Inzidenz von Biofilmen bei Tieren

Um eine grobe Abschätzung über das Auftreten von Biofilmen bei Tieren zu treffen, wurde ein Nachweisverfahren angewendet, welches alle Komponenten eines Biofilms erfasst. Eine Kombination aus verschiedenen pathohistologischen Färbungen stellte die einzelnen Bestandteile im Lichtmikroskop dar. Eine HE-Färbung wurde angewendet, um die Grenzfläche zwischen dem Nahtmaterial und dem Gewebe zu veranschaulichen. Mittels einer Gram- und einer Giemsa-Färbung konnten die Bakterien bzw. ihre DNA gezeigt werden. Eine Periodic-Acid-Schiff (PAS)-Reaktion wies die von den Bakterien gebildete EPM nach.

Hypothese II:

An der Bildung von Biofilmen bei Tieren sind komplexe Bakterienpopulationen beteiligt.

Durch Berichte aus der Humanmedizin und den wenigen vorliegenden veterinärmedizinischen Artikeln ist bekannt, dass Biofilme häufig aus komplexen bakteriellen Zusammensetzungen bestehen.

Ziel II: Identifizierung der an den Biofilmen beteiligten Spezies

Die Identifizierung von bakteriellen Spezies erfolgte bisher meist durch die Anzucht in einer Kultur (Westgate *et al.* 2011). Da diese Methode durch die neuesten Publikationen jedoch als unzureichend eingeschätzt wird, wurden die an den Biofilmen beteiligten Bakterien-spezies mittels Next Generation Genome Sequencing (NGGS) bestimmt.

Hypothese III:

Es gibt Übereinstimmungen und Unterschiede in der bakteriellen Zusammensetzung von Biofilmen in Human- und Tiermedizin.

Die bisher publizierten Daten zeigen eine partielle Überlappung, aber auch Unterschiede zwischen bakteriellen Familien und Spezies aus Isolaten von Wunden im Vergleich von Tier- und Humanmedizin. Bestimmte Spezies, wie *Pseudomonas aeruginosa*, werden dabei häufiger in der Human- und Tiermedizin identifiziert als andere Spezies (Westgate *et al.* 2011).

Ziel III: Vergleich von NGGS-Daten aus vorangegangenen Untersuchungen der Human- und Tiermedizin zu biofilmassoziierten Wundinfektionen mit den Daten der vorliegenden Studie

Die biofilmbildenden Bakterien bei Hunden, Katzen, Pferden und dem Menschen wurden miteinander verglichen, um Übereinstimmungen der Daten zu finden und bisher nicht als Biofilmbildner in Erscheinung getretene Bakterien zu identifizieren.

2 Eigene Forschung

2.1 Erste Publikation: Prevalence of Biofilms on Suture Segments in Dogs, Cats and Horses with Postoperative Surgical Site Infection

Autoren: König L, Klopffleisch R, Kershaw O, Gruber AD

Jahr: 2015

Zeitschrift: *Veterinary Pathology*

Bibliografische Quelle: König L, Klopffleisch R, Kershaw O, Gruber AD (2015) Prevalence of Biofilms on Surgical Suture Segments in Wounds of Dogs, Cat and Horses. *Veterinary Pathology* 52:295-297

Eine Genehmigung der Zeitschrift *Veterinary Pathology* für das Einfügen des Artikels in eine Doktorarbeit ist laut Verlagsauskunft nicht notwendig (<http://www.sagepub.com/journalsPermissions.nav>).

Kennzeichnung der eigenen Beiträge an der Publikation

Beiträge von L. König: Archiv-Recherche, Probenauswahl, histologische Auswertung, Verfassen des vollständigen Manuskriptentwurfs

Beiträge der anderen Autoren: Idee und Planung der Studie durch A.D. Gruber, Unterstützung der Auswertung der histologischen Schnitte und bei der Erstellung des Manuskripts durch R. Klopffleisch und O. Kershaw

DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/0300985814535609>

You must read this part online.

2.2 Zweite Publikation: Next Generation Sequencing Analysis of Biofilms from Three Dogs with Postoperative Surgical Site Infection

Autoren: König L, Klopffleisch R, Höper D, Gruber AD

Jahr: 2014

Online-Zeitschrift: International Scholarly Research Notices

Bibliografische Quelle: König L, Klopffleisch R, Höper D, Gruber AD (2014) Next Generation Sequencing Analysis of Biofilms from Three Dogs with Postoperative Surgical Site Infection. *International Scholarly Research Notices* Artikel ID 282971

Es ist keine Genehmigung für die Verwendung des Artikels notwendig, da es sich bei *International Scholarly Research Notices* um ein open-access-Journal handelt und das Copyright bei den Autoren bleibt.

Kennzeichnung der eigenen Beiträge an der Publikation

Beiträge von L. König: Idee zur Verwendung der Methode, Probenauswahl, DNA-Isolierung, Auswertung der Daten, Verfassen des Manuskriptentwurfs mit Ausnahme der Beschreibung der Methode des Next Generation Genome Sequencing

Beiträge der anderen Autoren: Idee und Finanzierung der Studie durch A.D. Gruber, Durchführung des Next Generation Genome Sequencing und Unterstützung bei der Datenauswertung sowie die Beschreibung der Methode im Manuskript durch D. Höper, Unterstützung bei der Erstellung des Manuskripts durch R. Klopffleisch

DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/282971>

Research Article

Next Generation Sequencing Analysis of Biofilms from Three Dogs with Postoperative Surgical Site Infection

L. M. König,¹ R. Klopfleisch,¹ D. Höper,² and A. D. Gruber¹

¹ Department of Veterinary Pathology, College of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, 14163 Berlin, Germany

² Friedrich-Loeffler-Institute, Federal Research Institute for Animal Health, Greifswald, 17498 Insel Riems, Germany

Correspondence should be addressed to R. Klopfleisch; robert.klopfleisch@fu-berlin.de

Received 5 August 2014; Accepted 21 September 2014; Published 10 December 2014 Academic Editor: Abdul Hamood

Copyright © 2014 L. M. König et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The composition of biofilms in chronic wound infections of dogs is unclear. In the present study, histologically identified biofilms attached to sutures in chronically infected wounds of three dogs were examined by next generation sequencing of total DNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded tissue samples. The analysis identified an inhomogeneous bacterial composition in three tissues containing biofilms. Some of the identified bacterial families such as *Staphylococci* and *Streptococci* have been found before in biofilms associated with human and canine wounds but in this study were quantitatively in the minority. The majority of the reads classified as bacterial sequences had the highest identity with sequences belonging to the Porphyromonadaceae, Deinococcaceae, Methylococcaceae, Nocardiaceae, Alteromonadaceae, and Propionibacteriaceae and thus taxons of so far minor relevance in veterinary medicine.

The composition of biofilms in chronic wound infections of dogs is unclear. In the present study, histologically identified biofilms attached to sutures in chronically infected wounds of three dogs were examined by next generation sequencing of total DNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded tissue samples. The analysis identified an inhomogeneous bacterial composition in three tissues containing biofilms. Some of the identified bacterial families such as *Staphylococci* and *Streptococci* have been found before in biofilms associated with human and canine wounds but in this study were quantitatively in the minority. The majority of the reads classified as bacterial sequences had the highest identity with sequences belonging to the Porphyromonadaceae, Deinococcaceae, Methylococcaceae, Nocardiaceae, Alteromonadaceae, and Propionibacteriaceae and thus taxons of so far minor relevance in veterinary medicine.

1. Introduction

Biofilms are accumulations of microorganisms which are attached to surfaces and embedded in a polymeric matrix in contrast to free-floating planktonic bacteria [1]. Biofilms receive increasing attention in human medicine due to postoperative surgical site infections after implantation of medical devices which in up to 54% of cases may contain biofilms [2]. In contrast to these results, we recently identified a much lower prevalence of biofilms on surgical suture segments in wounds of dogs, cats, and horses [3]. Their significance and factors that modulate their genesis and relevance are largely unknown.

The bacterial families and genera involved in the formation of biofilms on implanted medical devices significantly differ among the different studies in human and the only veterinary study [4]. Bacteria most commonly identified by culturing of biofilms on human material are *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* [5]. However, a greater proportion of bacteria organized in biofilms are not cultivable by common microbiological culture techniques [6]. 16S rRNA sequencing has thus been

suggested as a promising approach for the characterization of biofilm composition [7].

The present study aimed at identifying the composition of biofilms on suture material in chronically infected wounds of dogs using next generation sequencing (NGS) on formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue samples. Biofilms were identified in FFPE tissue samples submitted for routine diagnostic examination as recently described [8]. Briefly, biofilms were defined by three criteria, presence of suture material, an attached periodic-acid-Schiff's-reaction (PAS) positive polymeric matrix, and gram- and Giemsa-stainable bacteria.

2. Materials and Methods

Bacterial DNA was purified from FFPE tissue sections using a commercial kit (NucleoSpin Kit, Macherey-Nagel, Düren, Germany) as recently described [9, 10]. A total of 8100 ng of total DNA was extracted and used for NGS. Purified DNA was fragmented by sonication (M220 Focused-Ultrasonicator; Covaris, Woburn, Massachusetts, USA) and 500 ng of the fragmented DNA was used as input for library

TABLE 1: Bacterial families identified by NGS in three suture associated biofilms in dogs (total read number/family >40).

(a)	
	Biofilm # 1
5014	Porphyromonadaceae
4010	Fusobacteriaceae
399	Peptostreptococcaceae
325	Clostridiaceae
317	Bacteroidaceae
241	Streptococcaceae
146	Propionibacteriaceae
140	Flavobacteriaceae
95	Prevotellaceae
88	Rikenellaceae
72	Enterobacteriaceae
72	Alteromonadaceae
65	Desulfomicrobiaceae
58	Comamonadaceae
56	Spirochaetaceae
50	Bacillaceae
49	Leptotrichiaceae
46	Lachnospiraceae
43	Streptomycetaceae
(b)	
	Biofilm # 2
3219	Deinococcaceae
1954	Methylobacteriaceae
833	Nocardiaceae
598	Mycobacteriaceae
426	Corynebacteriaceae
375	Propionibacteriaceae
284	Pseudonocardiaceae
251	Gordoniaceae
228	Streptomycetaceae
184	Micrococcaceae
166	Streptococcaceae
151	Rhodocyclaceae
148	Sphingomonadaceae
142	Staphylococcaceae
136	Dietziaceae
127	Geodermatophilaceae
98	Micromonosporaceae
93	Xanthomonadaceae
84	Pseudomonadaceae
83	Cellulomonadaceae
79	Rhizobiaceae
75	Bradyrhizobiaceae
70	Microbacteriaceae
70	Nakamurellaceae
69	Burkholderiaceae
67	Fusobacteriaceae
63	Nocardioidaceae

(b) Continued.

	Biofilm # 2
62	Tsukamurellaceae
60	Porphyromonadaceae
59	Frankiaceae
51	Enterobacteriaceae
50	Dermacoccaceae
48	Lactobacillaceae
47	Nocardiopsaceae
47	Promicromonosporaceae
46	Comamonadaceae
42	Flavobacteriaceae
41	Moraxellaceae
40	Rhodobacteraceae
(c)	
	Biofilm # 3
163	Porphyromonadaceae
42	Alteromonadaceae
40	Fusobacteriaceae

preparation with the aid of a SPRI-TE instrument (Beckman Coulter, Krefeld, Germany) with SPRIworks II cartridges and NEXTflex-96 DNA Barcodes (Bioo Scientific, Austin, TX, USA). Library preparation was done without automatic size selection and the resultant libraries were instead manually size selected (peak size 500 bp) with Ampure XP Beads (Beckman Coulter). Finally, the size selected libraries were quantified using the KAPA Library Quantification Kit, Illumina/Universal (KAPA Biosystems, Cape Town, South Africa) and sequenced with an Illumina MiSeq instrument (MiSeq Reagent Kit v2 (500 cycle); Illumina, San Diego, USA). The raw reads were analyzed using RIEMS (zit).

To clarify relevant results of DNA sequences and associated bacterial families, a deliberate mark of all families with a quantity of >40 reads was set and these families were selected (Table 1).

3. Results

The tissue sample with biofilm one was derived from an ovariohysterectomized uterus stump which included polyfilic suture segments of an adult female Jack-Russell (Figure 1). Histopathology revealed a chronic-active, lymphoplasmacytic, and granulomatous inflammation, and a biofilm associated with the suture material. NGS resulted in 1625631 high quality reads of which approximately two-thirds were classified as host sequences and roughly 12.5% could not be classified by similarity at the nucleic acid sequence level. Of the remainder, 12905 reads (0.8%) were assigned as bacterial sequences. The assigned families are shown in Table 1. The most prominent families were Porphyromonadaceae, Fusobacteriaceae, and Peptostreptococcaceae, representing 73% of all identified bacterial sequences.

The tissue sample with biofilm two was derived from a postcastration skin wound with polyfilic suture segments associated in an adult female Yorkshire Terrier. NGS obtained

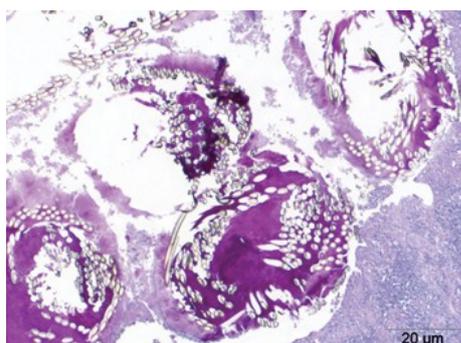


Figure 1: Case 1: PAS-positive extracellular polymeric matrix of a biofilm associated with polyfilic suture material, PAS-reaction.

360974 high quality reads of which approximately one-third were classified as host sequences. 11,610 reads (3.2%) were assigned as bacterial reads. The most prominent families were Deinococcaceae, Methylobacteriaceae, and Nocardiaceae representing 16.2% of all identified bacterial sequences.

The tissue with biofilm three was derived from a surgical skin wound with polyfilic suture segments associated in an adult, female Labrador Retriever. NGS obtained 1,459,690 high quality reads of which approximately 50% were classified as host sequences and 649 reads (0.1%) were assigned as bacterial reads. The most prominent families were Porphyromonadaceae, Alteromonadaceae, and Fusobacteriaceae, representing 37.8% of all identified bacterial sequences.

In a comparison regarding bacterial families, it is conspicuous that Fusobacteriaceae and Porphyromonadaceae were present in all three cases (Figure 2). In addition, Porphyromonadaceae and Alteromonadaceae were present in cases one and three. There were concordant DNA sequences of several bacterial families present in cases one and two, that is, Propionibacteriaceae, Streptomycetaceae, Streptococcaceae, Enterobacteriaceae, Comamonadaceae, and Flavobacteriaceae. In contrast, Deinococcaceae, Methylococcaceae, and Nocardiaceae were the most prominent bacterial families in case two. Nevertheless, Propionibacteriaceae, Methylobacteriaceae, Lactobacillaceae, and Streptococcaceae which were present in tissues of dogs number 1 and number 2 have also been detected in the previous report on biofilms from wounds of a single dog (Figure 2) [4].

The composition of bacterial species present in the three tissues with biofilms only partly overlapped, except for case number 3 which only contained species that were also present in case 1 (Figure 2). In contrast, cases number 1 and number 2 only partly overlapped in bacterial species and cases number 2 and number 3 did not overlap at all. *Tannerella forsythia* was the most common bacterial species in cases number 1 and number 3; in number 2 it was *Deinococcus geothermalis* (Figure 2).

4. Discussion

Biofilms can be a single species microbial population or a community of multiple microbial species and may cover a

vast array of abiotic and biotic surfaces [11]. The diagnosis of the composition of biofilms by the conventional culturing methods is however difficult. Recent studies compared culture techniques and molecular techniques to identify the bacterial composition of biofilms in wounds. They found that only 10% of the bacterial species in wounds can be identified using standard culture technique when compared to the higher number of species identified by molecular techniques [12]. It is thus not surprising that at least two of the biofilms analyzed in this study contained a wide variety of DNA sequences which could be attributed to numerous different bacterial species.

Porphyromonadaceae (*Tannerella forsythia*) was the most common bacterial family in biofilms one and three. In contrast, Deinococcaceae, Methylococcaceae, and Nocardiaceae were the most prominent bacterial families in the tissue with biofilm two. The composition of bacterial families present in the three tissues with biofilms was thus only partly overlapping, except for case three which only contained species that were also present in case one. Bacterial families which were present in two tissues with biofilms were Alteromonadaceae, Propionibacteriaceae, Streptomycetaceae, Streptococcaceae, Enterobacteriaceae, Comamonadaceae, and Flavobacteriaceae and may thus be interesting candidates for further analysis as initiators of chronic wound infection in dogs.

Comparison with the only recent study on the composition of wound-associated biofilms in dogs revealed partly overlapping bacterial species with the present study. Pyrosequencing of those biofilms detected Propionibacteriaceae, Methylobacteriaceae, Lactobacillaceae, and Streptococcaceae which were also present in biofilms one and two in our study [4].

So far only few studies on wound-associated biofilm composition using NGGS are available in human medicine. These studies however revealed that up to 60% of chronic wounds contained biofilms whereas acute wounds showed biofilm structures in only 6% of the cases. Molecular analysis also discovered a large variety of bacteria, including strictly anaerobic bacteria, which were not detectable by culture. Amongst others, molecular analysis identified Prevotellaceae, Pseudomonadaceae, Staphylococcaceae, and Porphyromonadaceae in these biofilms, all of which were also detected in the biofilms of the present study [13].

Extraction and sequencing of DNA from FFPE material by NGGS was successfully applied to identify bacterial species in chronic wounds. Obviously, NGGS is still by far too expensive for routinely examinations. The present study however shows that it nevertheless can give valuable additional information on the composition of the biofilm. Further studies however have to proof whether the bacterial species and families identified by the present approach are really present and viable in the wounds and thus contribute to the clinical symptom. The present study thus gives first hints towards which culturing media and conditions are necessary to analyze biofilms in chronic wounds of dogs.

Taken together our study shows that biofilms on suture material in chronic wounds of dogs may be composed of a wide variety of bacterial species which may not be covered by conventional bacterial culturing. Further studies however

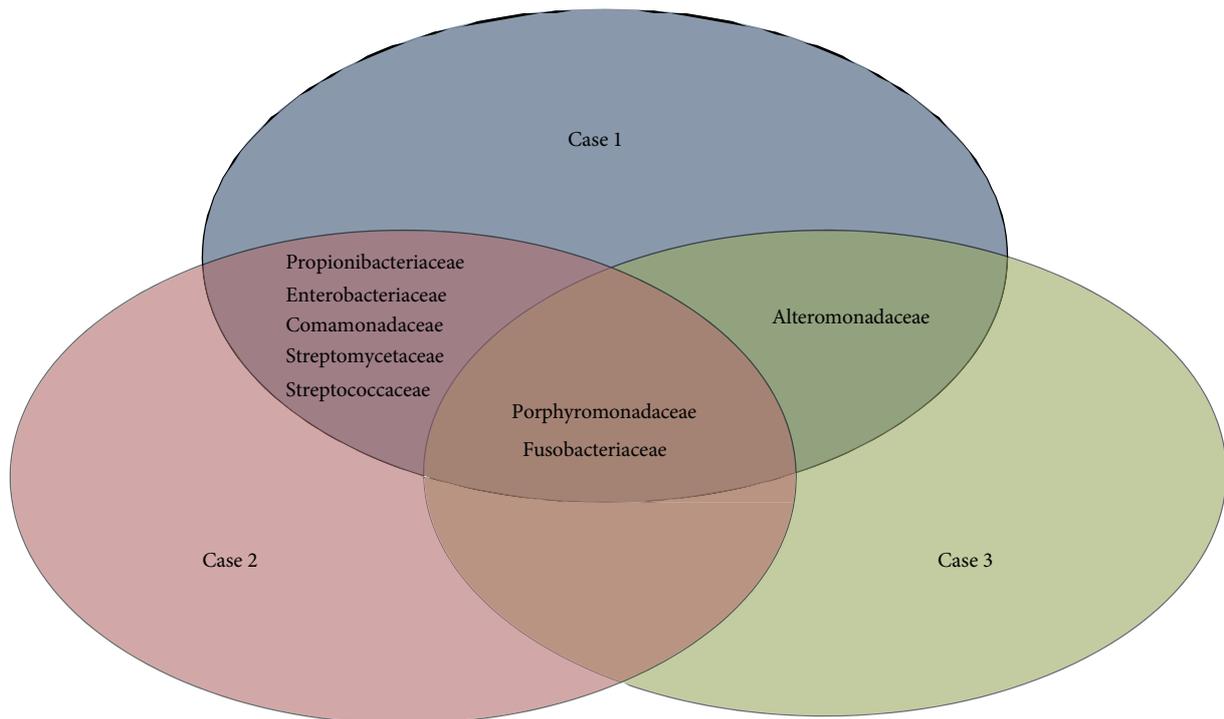


Figure 2: Bacterial families with overlapping presence in the three tissues with biofilms.

have to confirm which of the identified bacterial species are actually contributing to the morphologically identified biofilms and which are just bystander infections. Molecular methods like NGGS may thus be an alternative approach to identify the bacterial species involved in these chronic infections and to choose the correct therapeutic measures in the future.

Conflict of Interests

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organisations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgment

The present study is part of the doctoral thesis of L. M. König.

References

- [1] J. W. Costerton, P. S. Stewart, and E. P. Greenberg, "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections," *Science*, vol. 284, no. 5418, pp. 1318–1322, 1999.
- [2] C. E. Edmiston Jr., C. J. Krepel, R. M. Marks et al., "Microbiology of explanted suture segments from infected and noninfected surgical patients," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 51, no. 2, pp. 417–421, 2013.
- [3] L. König, R. Klopffleisch, O. Kershaw, and A. D. Gruber, "Prevalence of biofilms on surgical suture segments in skin wounds of dogs, cats and horses," *Veterinary Pathology*, 2014.
- [4] E. A. Swanson, L. J. Freeman, M. N. Seleem, and P. W. Snyder, "Biofilm-infected wounds in a dog," *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 244, no. 6, pp. 699–707, 2014.
- [5] K. Freeman, E. Woods, S. Welsby, S. L. Percival, and C. A. Cochrane, "Biofilm evidence and the microbial diversity of horse wounds," *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 55, no. 2, pp. 197–202, 2009.
- [6] S. Safaee, G. C. Weiser, E. F. Cassirer, R. R. Ramey, and S. T. Kelley, "Microbial diversity in bighorn sheep revealed by culture-independent methods," *Journal of Wildlife Diseases*, vol. 42, no. 3, pp. 545–555, 2006.
- [7] B. Nyvad, W. Crielaard, A. Mira, N. Takahashi, and D. Beighton, "Dental caries from a molecular microbiological perspective," *Caries Research*, vol. 47, no. 2, pp. 89–102, 2013.
- [8] L. König, "Biofilms in dogs," *Veterinary Pathology*, 2013.
- [9] R. Klopffleisch, A. T. A. Weiss, and A. D. Gruber, "Excavation of a buried treasure—DNA, mRNA, miRNA and protein analysis in formalin fixed, paraffin embedded tissues," *Histology and Histopathology*, vol. 26, no. 6, pp. 797–810, 2011.
- [10] A. T. A. Weiss, N. M. Delcour, A. Meyer, and R. Klopffleisch, "Efficient and cost-effective extraction of genomic dna from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues," *Veterinary Pathology*, vol. 48, no. 4, pp. 834–838, 2011.
- [11] M. E. Davey and G. A. O'Toole, "Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 64, no. 4, pp. 847–867, 2000.
- [12] S. E. Dowd, Y. Sun, P. R. Secor et al., "Survey of bacterial diversity in chronic wounds using Pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing," *BMC Microbiology*, vol. 8, article 43, 2008.

- [13] G. A. James, E. Swogger, R. Wolcott et al., "Biofilms in chronic wounds," *Wound Repair and Regeneration*, vol. 16, no. 1, pp. 37–44, 2008.

3 Zusammenfassende Diskussion

Hypothese I: Nachweis von Biofilmen

Das Auftreten von Biofilmen im Zusammenhang mit chronischen Wundinfektionen und implantatassoziierten Infektionen ist ein in der Humanmedizin bekanntes Phänomen, welches in der Tiermedizin jedoch bisher ungenügend untersucht ist. Dass Biofilme allgemein auch eine Rolle bei Wundinfektionen von Tieren spielen, ist daher Gegenstand der ersten Hypothese.

Entscheidend zur Beantwortung dieser Fragestellung ist die Art der Methode, mit der die Proben bearbeitet werden. Die Literaturrecherche zeigte schnell, dass die Ansicht über die Effizienz der eingesetzten Nachweismethoden für Biofilme nicht einheitlich ist. Um einen Biofilm allerdings tatsächlich in Gänze nachzuweisen, müssen alle Bestandteile seiner ihm ganz eigenen Struktur dargestellt werden. Nur so kann ein Biofilm von einer Mikrokolonie unterschieden werden. Dieser vollständige Nachweis war das Ziel des von uns angewendeten histologischen Verfahrens. Eine HE-Färbung wurde angewendet, um die Grenzfläche zwischen dem Nahtmaterial und dem Gewebe zu veranschaulichen sowie das Vorliegen einer Entzündung beurteilen zu können. Durch eine Gram- und eine Giemsa-Färbung konnten Bakterien bzw. ihre DNA gezeigt werden. Eine PAS-Reaktion wies die von den Bakterien gebildete Matrix nach. Retrospektiv wurden 91 Proben untersucht, von diesen stammten 68 von Hunden, 15 von Katzen und acht von Pferden. In 91 Proben konnten so zwei Biofilme detektiert werden.

Eine der positiven Proben, aus einer Hautwunde nach einer Kastration stammend, zeigte eine hochgradige, eitrig-granulomatöse Entzündung. Die zweite Probe, aus einem Uterusstumpf einer Ovariohysterektomie stammend, wies eine subakute bis chronische, lymphoplasmazelluläre Entzündung auf. Die Ergebnisse der Untersuchung zeigten in beiden positiven Proben Bakterien innerhalb der Einzelfilamente eines polyfilamentösen Fadens. Dieses entspricht den Angaben in der Literatur, wonach Infektionen insbesondere in Zusammenhang mit dieser Art von Faden auftreten (Sugarman *et al.* 1981). Berücksichtigt werden muss allerdings der verschwindend geringe Anteil von monofilem Nahtmaterial in der Studie. Die hohe Inzidenz in humanmedizinischen Biofilmstudien weicht drastisch von den vorliegenden Ergebnissen ab. **Zum Ersten** kann die unterschiedliche Inzidenz von Biofilmisolationen bei humanen und animalen medizinischen Implantaten möglicherweise durch das Auftreten unterschiedlicher, bakterieller Stämme bedingt sein. Trisikonis und Kollegen verglichen 2012 das Potential von bakteriellen Isolationen zur Biofilmbildung in humaner und animaler Fäzes und fanden heraus, dass *Escherichia faecium* und *Escherichia faecalis* der humanen Proben ein höheres Potential zur Biofilmproduktion hatten (Tsirikonis *et al.* 2012). Ähnliche Ergeb-

nisse zeigten sich auch bei der Untersuchung von Raumluft, in der sich entweder Menschen oder Tiere aufhielten. Auch hier zeigten die aus der Luft der Menschen isolierten Bakterienstämme eine ausgeprägtere Fähigkeit zur Biofilmbildung (Seo *et al.* 2008). Auch zwei aus Biofilmen isolierte humane Stämme von *Streptococcus suis* zeigten im Vergleich zu isolierten Stämmen aus Schweinen eine deutlich höhere Fähigkeit zur Biofilmbildung (Guo *et al.* 2012). **Zum Zweiten** ist keine Information über das Operations(OP)-Management bei Eingriffe bekannt, aus denen die Proben stammen. Es liegen keine Daten zur präoperativen, antibiotischen Abdeckung der Patienten vor, die eine Ansammlung von Bakterien schon initial verhindern hätten können. Ebenfalls liegen keine Daten über die angewendeten OP-Methoden, verwendete Desinfektionsmittel und die postoperative Versorgung der Patienten vor. Dass diese Faktoren einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung von Biofilmen haben können, zeigte eine Studie, welche die Implantation von Penisprothesen unter unterschiedlichen Bedingungen untersucht hat. Bezüglich der Effektivität von Desinfektionsverfahren der Haut konnte hierbei gezeigt werden, dass bei Prothesenimplantationen mit präoperativer Desinfektion der Haut mittels Chlorhexidin-Alkohol 40 % weniger Infektionen der OP-Wunden auftraten, als mit dem gängigen Povidone-Iodine (Darouiche *et al.* 2010). Ebenso konnte bei einem Vergleich zwischen zwei OP-Techniken gezeigt werden, dass ein nicht-Hautberührendes OP-Verfahren im Vergleich zur der Methode mit Hautkontakt zwei Drittel weniger Infektionen (0,7 % zu 2,2 %) nach sich zog (Siegrist 2008).

Zum Dritten basieren die Ergebnisse aus der Literatur auf sehr unterschiedlichen Nachweisverfahren und auf unterschiedlichen Definitionen eines Biofilms. Es fehlt bisher die Festlegung eines Goldstandards, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse herzustellen. **Viertens** unterscheidet sich das Konsumverhalten von Menschen und Tieren deutlich. Menschen mit einem regelmäßigen Alkohol- und Zigarettenkonsum leiden nachweislich unter einer signifikant schlechteren Wundheilung (Benveniste *et al.* 1981; Freiman *et al.* 2004). Da eine schlechte Vaskularisierung und Nekrosen die Biofilmentwicklung fördern, könnte der Konsum von Genussmitteln eine höhere Inzidenz von Biofilmen bei Menschen ebenfalls erklären. Beobachtet wurde der Zusammenhang zwischen Wundheilungsstörungen und der Anheftung von Bakterien bereits in durch Implantateinsetzung geschädigtem Gewebe (Mulcahy 2010; Wolcott *et al.* 2008). Auch das Essverhalten hat einen Einfluss auf die Biofilmentwicklung. Die Verfügbarkeit von Nährstoffen beeinflusst die Entwicklung der Bakterienzusammensetzung im Mund. Dies wurde bereits 1967 durch den Vergleich zwischen essenden Personen und Menschen, die durch eine Magensonde ernährt wurden, bewiesen (Littleton *et al.* 1967). Tierversuche haben gezeigt, dass die Fütterung von Glukose und Saccharose einen, wenn auch geringen, Effekt auf die Entwicklung von oralen Biofilmen in der Anfangsphase im Maul hat (Bowden *et al.* 1997). Da der Mensch Zucker in weit höherem Maße konsumiert als Tiere, könnte auch dies eine Biofilmbildung begünstigen.

Das zum Nachweis von Biofilmen durchgeführte, histologische Verfahren kann trotz des geringen Nachweises von Biofilmen in der vorliegenden Studie als praktikables und für die Routinediagnostik hilfreiches Verfahren eingestuft werden. Durch die Anwendung von Standardfärbemethoden und der Beurteilung der Schnitte unter einem Lichtmikroskop sind keine Investitionen in Gerätschaften zur Sichtbarmachung von Biofilmen nötig. Weitere Vorteile dieser Methode sind die einfache Handhabung der Proben durch Standardfixierung und die Anwendbarkeit in retrospektiven Studien durch die Möglichkeit der Anwendung auf FFPE-Material. Allerdings ist die Sensitivität des Nachweises noch fraglich. Die Ermittlung einer Sensitivitätsgrenze wäre auch für den klinischen Einsatz der Biofilmdiagnostik wichtig, da noch junge, mit wenig Matrix ausgestattete Biofilme deutlich besser therapierbar sind als alte, voluminöse Biofilme (Anwar *et al.* 1992). Sollte es also möglich sein, Biofilme schon in ihrem Anfangsstadium zu diagnostizieren, stiegen die Heilungschancen bei einer gezielten Therapie.

Hypothesen II und III: Next Generation Genome Sequencing-Ergebnisse

Die Identifizierung der in Biofilmen enthaltenen Bakterien kann einen Aufschluss über die Ursache und den Weg der Einschleppung der Infektion geben. Treten gehäuft Infektionen verursacht durch die gleichen Bakterien in derselben Einrichtung auf, kann dieses Muster analysiert werden und zur Optimierung von Prämedikationen, OP-Verfahren und der post-operativen Behandlung der Patienten beitragen. Auch Arbeitsabläufe sowie die Handhabung und Auswahl der eingesetzten medizinischen Geräte können verbessert werden, um die bestmöglichen Voraussetzungen für eine Wundheilung bzw. ein unproblematisches Verbleiben von Dauerimplantaten im Körper zu erreichen.

Zwei der Proben zur Identifizierung stammten aus dem ersten Teil der Studie. Eine dritte Probe konnte aus einem Kooperationsprojekt gewonnen werden. Nach Isolierung der DNA aus dem FFPE-Material wurde ein NGGS durchgeführt, welches der Überprüfung der Hypothesen II und III diente. Diese Hypothesen supponieren komplexe Populationen bei der Bildung von Biofilmen bei Tieren sowie Unterschiede aber auch Schnittmengen in der Zusammensetzung im Vergleich zu humanen Biofilmen.

Die angewandte Methode, das NGGS, identifizierte für die drei Biofilme teils überlappende, teils aber auch sehr unterschiedliche bakterielle Familien. Die Auswertung beschränkt sich auf die Angabe von bakteriellen Familien, da die vorhandenen DNA-Sequenzen nur wahrscheinlich, nicht jedoch definitiv bakteriellen Spezies zugeordnet werden können.

Die mittels NGGS ermittelten Ergebnisse zeigen komplexe Populationen von Bakterien in den drei Biofilmen. Es ergaben sich Bakterienfamilien, die bei allen Biofilmen vorkamen, aber auch Familien, die ausschließlich in einer der Proben detektiert wurden. Auch die Anzahl der Familien die mit grösser / gleich 40 Reads in unsere Studie eingegangen sind, variierte. So beinhaltete der erste Biofilm 19, der zweite 39 und der dritte Biofilm nur drei bakterielle

Familien. Bei der ersten Probe handelte es sich um Gewebe aus einem Uterusstumpf einer Ovariohysterektomie, bei der zweiten um die Hautwunde nach einer Kastration und bei der dritten um eine Hautnaht nach einem chirurgischen Eingriff. Alle Proben stammten von Hunden. Die überlappenden Familien in allen drei Biofilmen waren Fusobacteriaceae und Porphyromonadaceae, wobei den Porphyromonadaceae in zwei von den drei Biofilmen die meisten Reads zugeordnet wurden. Es handelt sich bei beiden Familien um überwiegend anaerob lebende und nicht motile, gramnegative Bakterien. Sie gehören nicht zu der normalen Hautflora von Menschen und Tieren. Fusobacteriaceae werden der Darmflora des Menschen zugeordnet. Ein Zusammenhang mit Biofilmen konnte für *Fusobacterium nucleatum* z.B. auch in humanen, oralen Biofilmen von Stimmprothesen und bei Periimplantitiden nach Einsetzung von oralen Implantaten detektiert werden (Bertl *et al.* 2014; Da Silva *et al.* 2014). *Fusobacterium nucleatum* gilt außerdem als Wegbereiter zur Adhäsion weiterer Bakterien bei der Biofilmformation (Kolenbrander *et al.* 1993). Die den Porphyromonadaceae angehörenden Spezies *Tannerella forsythia* und *Porphyromonas endodontalis* / *Porphyromonas* spp. gelten außerdem als Risikoindikatoren für periodontale Krankheiten in subgingivalen Biofilmen beim Menschen (Lourenço *et al.* 2014).

Warum jedoch diese beiden Bakterienspezies in so hohem Maße in den von uns untersuchten Läsionen vorkamen, konnte nicht geklärt werden. Eine Möglichkeit wäre, dass sich die beiden Familien gegenseitig in ihrer Entwicklung fördern, da bereits Synergien in der Entwicklung von Biofilmen mit *Fusobacterium nucleatum* und *Tannerella forsythia* durch Zell-Zell-Interaktion beobachtet wurden (Sharma *et al.* 2005). Auch könnten ähnliche Präferenzen in Bezug auf die Umweltbedingungen für optimales Wachstum ein gleichzeitiges, hohes Auftreten in zwei von drei Proben erklären. Erstaunlich ist, dass es sich bei beiden Familien um immobile Bakterien handelt, die sich also nicht aktiv zwischen die Filamente des polyfilamentösen Nahtmaterials begeben haben können. Wie bereits erwähnt, ist die Ausbreitung der Bakterien in den Faden hinein vor allem abhängig von der Größe der Kapillarkräfte des Materials (Blomstedt *et al.* 1977).

Im Gegensatz dazu zeigte einer der drei untersuchten Biofilme bei der Sequenzierung Deinococcaceae, Methylococcaceae und Nocardiaceae als häufigste Familien. Die zu den Deinococcaceae gehörenden Spezies *Deinococcus geothermalis* findet als Biofilmbildner insbesondere in der Papierherstellung und -verarbeitung große Aufmerksamkeit durch ihren Nachweis an im wässrigen Milieu befindlichen Maschinen (Peltola *et al.* 2008; Peltola *et al.* 2011). Ein Nachweis über die medizinische Relevanz dieser Familie wurde bisher nicht erbracht. Die Spezies der Familie Methylococcaceae sind nachweislich an der Formation von pinkfarbenen Biofilmen beteiligt, wie sie häufig in Nasszellen und Wasserleitungen vorkommen (Yano *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2009).

Aus der Familie der Nocardiaceae konnte *Rhodococcus equi* aus humanen Lungen isoliert und der Nachweis der Biofilmbildung erbracht werden (Remuzgo-Martinez *et al.* 2013). Auch konnte für die Spezies *Rhodobacter sphaeroides* und *Rhodococcus erythropolis* das Potential zur Biofilmbildung beobachtet werden, wenn auch nicht im medizinischen Bereich (De Carvalho *et al.* 2009; Wilkinson *et al.* 2011).

In zwei von den drei Biofilmen konnten Alteromonadaceae, Propionibacteriaceae, Streptomycetaceae, Streptococcaceae, Enterobacteriaceae, Comamonadaceae und Flavobacteriaceae nachgewiesen werden. Allen diesen Familien und auch den mittels Datenbankabgleich identifizierten Spezies wurden biofilmbildende Eigenschaften zugesprochen.

Für die Familie Alteromonadaceae ist die Fähigkeit zur Biofilmbildung beschrieben, insbesondere *Marinobacter hydracarbonoclasticus* ist als Biofilmbildner an Grenzflächen von Wasser zu hydrophoben, organischen Verbindungen bekannt (Klein *et al.* 2008). *Propionibacterium acnes* aus der Familie der Propionibacteriaceae ist in biofilmassoziierten Entzündungen nach Einsatz von Brustimplantaten, Gelenkprothesen, Herzklappenprothesen, intraokulare Linsen, internen cerebrospinalen Fluid-Shunts und Wirbelsäulenimplantaten registriert worden (Portillo *et al.* 2013). Für *Streptomyces griseus* (Streptococcaceae) konnte die Fähigkeit zur Biofilm-Bildung *in vitro* nachgewiesen werden (Winn *et al.* 2014), allerdings gibt es bisher keinen Nachweis einer medizinischen Relevanz. *Streptococcus suis*, eine Spezies aus der Familie der Streptococcaceae, konnte eine ausgeprägte Fähigkeit zur Biofilmformation nachgewiesen werden. Diese variiert zwischen den Serotypen und ist stark vom Nährstoffangebot, d.h. insbesondere von der Verfügbarkeit von Glukose abhängig (Guo *et al.* 2012). Vielen Spezies, die der Familie Enterobacteriaceae angehören, werden biofilmbildende Eigenschaften zugesprochen. So konnten in 400 Enterokokken-Isolaten aus Krankenhäusern in Polen 69,8 % Stämme von *Enterococcus faecalis*, 30 % von *Enterococcus faecium* und 0,2 % von *Enterococcus casseliflavus* identifiziert werden. Für 65,7 % der Enterokokken konnte *in vitro* die Fähigkeit zur Biofilmbildung bestätigt werden. Biofilmbildner waren beteiligt an Harntrakt-, Wund-, Respirationstrakt- und Gastrointestinaltraktinfektionen (Dworniczek *et al.* 2014). Enterococcus-Spezies machten außerdem mit 22 % die größte Gruppe von Bakterien aus, die aus 343 Gallengangsprothesen isoliert wurden (Schneider *et al.* 2014).

Zu *Delftia acidovorans*, aus der Familie der Comamonadaceae, existieren Fallberichte, die eine Beteiligung des Bakteriums an antibiotikaresistenten, wiederkehrenden Infektionen eines Hämodialysekatheters und eines Gefäßkatheters beschreiben, die auf biofilmbildende Eigenschaften des Bakteriums hinweisen (Chotikanatis *et al.* 2011; Khan *et al.* 2012). Aus der Familie der Flavobacteriaceae sind insbesondere die biofilmbildenden Spezies *Flavobacterium columnare* und *Flavobacterium psychrophilum* beschrieben, die als Fischpathogene vorwiegend Kiemen und Haut der Fische befallen (Cai *et al.* 2013; Sundell *et al.* 2011).

Allerdings ist nicht nur die Vergleichbarkeit des Nachweises von Biofilmen durch unterschiedliche Methoden schwierig. Gleiches gilt auch für die Identifizierung der Bakterien aus Biofilmen. Bei der Anwendung unterschiedlicher Verfahren zeigt sich meist eine deutliche Divergenz der Ergebnisse (Gristina *et al.* 1985a; Tunney *et al.* 1999). Auch für die Identifikation der Bakterien ist noch kein Goldstandard gefunden. So weisen alle bisher angewendeten Methoden noch starke Schwächen bezüglich der Belastbarkeit der erbrachten Daten auf. Ein großer Nachteil aller molekularbiologischen Verfahren ist, dass ausschließlich die Mikroorganismen nachgewiesen werden, die durch die eingesetzten Sonden detektiert werden (Nyvad *et al.* 2013). Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist also von der Art der verwendeten Sonden abhängig und kann im Vorfeld bereits verdächtige Mikroorganismen lediglich bestätigen oder ausschließen. Eine überraschende Detektion unerwarteter Bakterien im Biofilm ist mit dieser Methode nicht möglich. Ein weiterer Ansatz den Biofilmmodus von Bakterien zu detektieren ist der Nachweis von Signalmolekülen, die von den Bakterien ausschließlich in diesem Zustand zur Kommunikation untereinander verwendet werden. Hier stellt sich allerdings wiederum das Problem, dass ausschließlich nach bekannten Signalmolekülen verdächtigter Spezies gesucht werden kann. Die Erforschung der Signalmoleküle ist zwar fortschreitend, steht allerdings noch am Anfang. Bisher ist nur für einzelne Bakterien Genaueres über die Transkription und den Auslöser hierfür bekannt.

Eine Anzucht von Bakterien aus Biofilmen in einer Kultur ist kein effizienter Weg zur Identifizierung der Bakterien. Die Vermehrung der Bakterien kann sowohl durch den „viable but not culturable“-Effekt als auch durch die oft unzureichende Probennahme (Fazli *et al.* 2009) oder die begrenzte Anzahl nachweisbarer Spezies aus einer Probe misslingen. Sollte eine Anzucht von Bakterien aus einer Probe Erfolg haben, kann dies der Nachweis von Bakterien sein, die zwar in der Probe sind, jedoch nicht an der Bildung des Biofilms beteiligt sein müssen. Hauptproblem der Diagnostik bei der Identifizierung von Bakterien aus Biofilmen bleibt also die Unterscheidung von planktonischen Bakterien im Vergleich zu jenen Bakterien, die sich tatsächlich im Biofilmmodus befinden. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu minimieren, wäre der Nachweis eines Biofilms mittels histologischer Färbungen und ein anschließendes Ausschneiden des entsprechenden Bereiches aus dem histologischen Schnitt, der die Bakterien zentral in der polymeren Matrix zeigt. Dieser Teil könnte anschließend sequenziert werden und die identifizierten Bakterien könnten auf einem weiteren Schnitt der Probe immunhistologisch bestätigt werden.

Das Problem der Unterscheidung von planktonischen Bakterien zu Bakterien im Biofilm besteht ebenfalls bei der Identifikation von bakteriellen Spezies mittels PCR und auch beim NGGS. Vorteil des NGGS-Verfahrens im Gegensatz zu anderen Verfahren ist, dass der Anzahl der zu erfassenden Bakterien keine technische Grenze gesetzt ist (Martin *et al.* 2009).

Außerdem verfügt es über eine ähnliche Sensitivität und Spezifität wie andere molekulargenetische Methoden und kann im Gegensatz zur Kultur auch FFPE-Material auswerten. Daher zählt das NGGS zu den geeignetsten Verfahren, um Biofilme zu analysieren (Martin *et al.* 2009).

3.1 **Schlussfolgerungen und kritische Reflexion**

In dieser Studie wurden zwei Biofilme in 91 untersuchten Proben detektiert und eine Next Generation Genome Sequencing Analyse erbrachte eine stark heterogen, teilweise überlappende bakterielle Zusammensetzung aus typischen sowie bisher in der Literatur noch nicht als Biofilmbildner beschriebenen Familien. Die Einordnung dieses Ergebnisses in den Kontext der weltweiten Biofilmforschung ist allerdings schwierig oder sogar unmöglich, da die Daten in der Literatur zur Detektion von Biofilmen und der in ihnen enthaltenen Bakterien auf sehr unterschiedlichen diagnostischen Verfahren basieren. Außerdem handelt es sich bei den ausgewerteten Proben in der Literatur um einen sehr heterogenen Pool. Die Proben stammen aus unterschiedlichen Spezies, aus unterschiedlichen Lokalisationen und Läsionen unterschiedlicher Genese. Bei fremdkörperassoziierten Biofilmen dienen unterschiedlichste Materialien den Bakterien als Grenzfläche. Doch selbst innerhalb eines Materials, wie z.B. dem Metall, gibt es unterschiedliche Legierungen, Rauheiten, Formen und Größen der Implantate sowie unterschiedliche Positionierungen im Körper. Diese Vielzahl an Faktoren, die einen Einfluss auf die Bildung und die bakterielle Zusammensetzung eines Biofilms haben können, müssten bei der Auswertung von Studien beachtet werden, da sonst ein verzerrtes Bild von Häufigkeiten und den enthaltenen Keimen entstehen kann.

Trotzdem lässt das Ergebnis dieser Studie isoliert betrachtet und unter Berücksichtigung der Vor- und Nachteile der angewendeten Verfahren zunächst vermuten, dass Biofilme in der Tiermedizin eventuell eine geringere Rolle spielen als bisherige, humanmedizinische Studien vermuten lassen und dass das Spektrum der detektierten Bakterien sich teilweise überschneidet, aber auch Unterschiede beinhaltet.

3.2 **Ausblick**

Die Erforschung bakterieller Biofilme ist seit der Entdeckung dieser Lebensweise von Bakterien stark voran geschritten. Um die Forschung auf diesem Gebiet vergleichbar zu gestalten, sollte ein einheitliches Verfahren zum Nachweis von Biofilmen sowie zur Identifikation der beteiligten Bakterien entwickelt werden. Aus klinischer Sicht wäre ein schnelles, kostengünstiges Verfahren zu bevorzugen, welches einfach zu interpretierende Daten liefert und somit auch in der Routinediagnostik Anwendung finden kann.

Eine erfolgreiche Elimination von Bakterien aus Wundinfektionen ist das klinische Ziel der Biofilmforschung. Möglichkeiten hierzu sind der Einsatz lytischer Bakteriophagen, die Beeinflussung der Biofilmbildung durch das Quorum-Sensing-System und der Einsatz von Silber-Nanopartikeln. Die Weiterentwicklung dieser Ansätze durch das Studieren der Genexpression im Biofilmmodus und der zur Kommunikation verwendeten Signalmoleküle ist daher erstrebenswert. Denkbar ist auch die Entwicklung von lytischen Substanzen, die die Bakterien aus der Matrix freilegen und so der natürlichen Abwehr sowie antibiotischen Substanzen wieder zugänglich machen. Durch *in vivo*-Versuche kann das Verhalten der Bakterien am realistischsten nachgestellt werden. Daher sind Tiermodelle ein wichtiger Aspekt dieser Forschung.

Bei diesen Modellen sollte der Fokus in der Interaktion von unterschiedlichen Spezies miteinander liegen, da Bakterien in Monokulturen ein anderes Wachstumsverhalten zeigen können als im Biofilm. Kombinationen aus anaeroben und aeroben sowie gramnegativen und grampositiven Spezies sollten hierbei berücksichtigt werden.

Prophylaktische Verfahren, die die Anheftung von Bakterien gar nicht erst zulassen, sind ein weiterer, bereits angestrebter Ansatz in der Biofilmforschung. Hierzu wurden bisher verschiedene Studien zur Vorabbesiedlung mit unschädlichen Zellen, mit glykokalixähnlichen Strukturen sowie mit antibakteriellen Coatings entwickelt. Um eine Biofilmentwicklung also grundsätzlich zu verhindern, müssen Oberflächen geschaffen werden, die durch ihre Struktur oder eine antimikrobielle Beschichtung der Anhaftung von Mikroorganismen vorbeugen.

Um prophylaktisch den Einsatz von chirurgischen, therapeutischen oder diagnostischen Materialien so risikolos wie nur möglich zu gestalten, ist eine Optimierung des gesamten Operationsvorgangs nötig. Hierzu müssen die Beschaffenheiten der unterschiedlichen Materialien von eingesetzten Geräten bezüglich ihrer Eigenschaften für die Anheftung von Bakterien und ihrer Gewebsschädigung in gleichartigen Versuchen getestet werden und Studien zu Resistenzen von Bakterien gegen Desinfektionsmittel durchgeführt werden, um Räume, Personal und Arbeitsgeräte steril zu halten. Auch die Vor- und Nachteile von OP-Verfahren bezüglich ihrer Invasivität und Verursachung von Gewebstraumata sowie der Gefahr einer bakteriellen Kontamination müssen geprüft werden.

4 Zusammenfassung

Erste Untersuchungen zu Vorkommen und Zusammensetzung von Biofilmen bei Hunden, Katzen und Pferden mit chronischen Wundnahtinfektionen

Lydia König

In der Medizin stellen resistente Bakterien bei der Behandlung von chronischen, infizierten Wunden zunehmend ein Problem dar. Dies ist in unterschiedlichen Resistenzmechanismen begründet, die Bakterien zu ihrem Schutz entwickelt haben. Als Gemeinschaft können Bakterien durch die Ausbildung einer extrazellulären, polymeren Matrix (EMP) einen Biofilm bilden, der eine Barriere für viele antimikrobielle Faktoren, einschließlich der traditionellen, antibiotischen Therapie bakterieller Infektionen, darstellt. Insbesondere das Einbringen von Nahtmaterial und chirurgischem Material wie Implantaten bietet den Bakterien eine Grenzfläche, die als Ausgangspunkt für die Besiedelung und für die Entwicklung eines Biofilms genutzt werden kann.

Der erste Teil der Untersuchung war eine retrospektive Studie zur Abschätzung der Inzidenz von Biofilmen bei ausgewählten Tierarten aus dem Archivmaterial des Instituts für Tierpathologie der Freien Universität Berlin. Untersucht wurden 91 Proben. Hierbei stammten 68 von Hunden, 15 von Katzen und acht von Pferden. Dreiundfünfzig dieser 91 Proben waren Haut, Mukosa oder Milchdrüse, 28 stammten vom Urogenitaltrakt, drei Proben enthielten Skelettmuskulatur und sieben Proben Darmgewebe. Mittels einer Kombination verschiedener pathohistologischer Färbungen konnten die Bestandteile eines Biofilms, also die Bakterien, eine Grenzfläche sowie eine Matrix, im Lichtmikroskop veranschaulicht werden. Eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) wurde angewendet, um die Grenzfläche zwischen dem Nahtmaterial und dem Gewebe darzustellen. Mittels einer Gram- bzw. einer Giemsa-Färbung konnten Bakterien bzw. ihre Desoxyribonukleinsäure (DNA) gezeigt werden. Eine Periodic-Acid-Schiff-Reaktion (PAS) zeigte die von den Bakterien gebildete EPM.

Die Auswertung zeigte eine Biofilmbildung in zwei von 91 Proben. Die beiden Proben mit den detektierten Biofilmen enthielten jeweils polyfile Nahtmaterialien und stammten von Hunden. Eine dieser Proben stammte aus einer Hautwunde und zeigte eine hochgradige, chronisch-aktive, eitrige und granulomatöse Entzündung. Die zweite Probe, ein Uterusstumpf aus einer Ovariohysterektomie, wies eine hochgradige, chronisch-aktive, lymphoplasmazelluläre und granulomatöse Entzündung auf.

Die Literatur zu Biofilmen, die weitgehend aus der Humanmedizin stammt, beschreibt eine meist weit höhere Inzidenz von Biofilmen. Diese Unterschiede der Inzidenz von Biofilmen können verschiedene Ursachen haben. Zum einen gibt es in der Literatur Hinweise darauf, dass das Potential zur Biofilmbildung von animalen Bakterien geringer ist als das von hu-

manen Keimen. Zum anderen fehlen die Daten zu prä- und postoperativer Antibiotikatherapie, zu Operationsverfahren und zum Hygienemanagement bei den Eingriffen. Da diese Faktoren nachweislich einen Einfluss auf die Infektionsrate bei dem Einsetzen von Fremdmaterial haben, erschwert das Fehlen der Daten die Interpretation der Ergebnisse der Studie. Ein weiteres Problem ist das Fehlen eines Goldstandards zum Nachweis von Biofilmen. Dies führt dazu, dass die Studien untereinander schlecht vergleichbar sind.

Der zweite Teil dieser Studie diente der Identifizierung der Bakterien in Biofilmen mittels Next Generation Genome Sequencing (NGGS). Im Anschluss an die Auswahl der Proben und die DNA-Isolierung wurde das Verfahren freundlicherweise von Herrn Dr. Dirk Höper des Friedrich-Loeffler-Institut auf der Insel Riems durchgeführt. Zwei der drei Proben hierfür waren die biofilmpositiven Proben der ersten Studie, eine weitere konnte aus einer Kooperationsstudie gewonnen werden. Diese stammte ebenfalls von einem Hund und enthielt polyfiles Nahtmaterial einer Operationswunde der Haut.

Die Auswertung identifizierte teils in der Literatur als typische Krankheitserreger beschriebene Bakterien wie Enterobacteriaceae, aber auch Bakterien, deren Auftreten in Wundinfektionen bisher noch nicht beschrieben wurden, wie die Deinococcaceae. Die Proben untereinander überschneiden sich teilweise bei bakteriellen Familien, zeigten aber auch unterschiedliche Familien auf. Die überlappenden Familien aller drei Biofilme waren Fusobacteriaceae und Porphyromonadaceae. Die drei häufigsten Familien des ersten untersuchten Biofilms waren Porphyromonadaceae, Fusobacteriaceae und Peptostreptococcaceae, des zweiten Biofilms Deinococcaceae, Methylobacteriaceae und Nocardiaceae und des dritten Biofilms Porphyromonadaceae, Alteromonadaceae und Fusobacteriaceae.

Das NGGS-Verfahren bietet Vorteile gegenüber anderen Methoden für eine retrospektive Studie. So können Proben aus formalinfixiertem und paraffineingebettetem Material eingesetzt werden und es ist nur ein sehr geringes Probenvolumen nötig. Ein weiterer Vorteil ist die vollständige Zuordnung von DNA-Sequenzen zu bakteriellen Familien bzw. Spezies durch den Abgleich mit einer Datenbank. Allerdings handelt es sich um ein methodisch aufwändiges Verfahren, welches hohe Spezialkompetenzen für die Auswertung voraussetzt. Außerdem liefert das Verfahren keine Informationen über die Vitalität der detektierten Bakterien und der Kausalität zwischen diesen Bakterien und der Biofilmentstehung.

Um eine Vergleichbarkeit von Studien zu erhalten, sollten zukünftig einheitliche Verfahren zum Nachweis von Biofilmen und zur Identifikation darin enthaltener Bakterien eingeführt werden. Zusammengefasst zeigt diese Studie, dass (1.) Biofilme tatsächlich bei Wundinfektionen mit Nahtmaterial bei Tieren vorkommen, (2.) die Inzidenz von Biofilmen geringer sein könnte als für den Menschen beschrieben und (3.) die detektierten Bakterienfamilien überraschend zahlreich und abweichend zwischen den Proben und zu den Ergebnissen früherer Studien beim Menschen waren.

5 Summary

First studies on the incidence and composition of biofilms in dogs, cats, and horses with postoperative surgical site infections

Lydia König

Resistant bacteria are an increasing problem for the medical treatment of chronically infected wounds. This is caused by resistance mechanisms bacteria developed for their protection. Living as a community, bacteria are able to develop biofilms which are composed of bacteria and an extracellular polymeric matrix (EMP). Those biofilms work as a barrier against antimicrobial factors including traditional antibiotic therapy of bacterial infections. Especially suture material and medical devices such as implants constitute an interface for bacterial colonization and the development of biofilms.

The first part of the study was a retrospective investigation of archive material from the Department of Veterinary Pathology, Freie Universität Berlin, to assess the incidence of biofilms. Ninety-one samples were analyzed. Sixty-eight of them originated from dogs, 15 from cats, and eight from horses. Fifty-three tissue samples were collected from skin, mucosa, or mammary gland. Three originated from skeletal muscle, seven from intestine and 28 from urogenital tract. By using a combination of different histopathological stains, the components of a biofilm could be visualized so that bacteria, interface and matrix could be detected under the light microscope. A hematoxylin and eosin staining (HE) was used to identify the interface between the suture material and the tissue. A periodic-acid-Schiff reaction (PAS) was used to visualize the EMP. Giemsa and Gram stains identified nucleic acid or Gram-positive bacterial organisms, respectively, in the EPM.

The investigation identified biofilms in two of 91 samples. Both positive samples included polyfilic suture material from dog tissue. The first one was a biopsy from a skin wound and showed a severe chronic-active suppurative and granulomatous inflammation. The second one was a fragment of an ovariohysterectomized uterus stump associated with a severe chronic-active lymphoplasmacytic and granulomatous inflammation.

The literature on the subject of biofilms is dominated by human medicine studies and describes a much higher incidence than shown in this investigation. These differences might be caused by the following reasons: First, there are hints in the literature that the potential for biofilm-building of animal bacterial is lower than of human bacteria; second, the data regarding pre- and postoperative antimicrobial treatment, surgical methods and hygienic management during the surgeries are incomplete. Because these factors have probably influenced the infection rate during the implantation of foreign body material, it is difficult to compare

these results with recent investigations of human tissues. A further problem is the lack of a gold standard for biofilm detection which makes it even more difficult to compare the results. The second part of the study consisted of the identification of bacterial in the biofilms by means of Next Generation Genome Sequencing (NGGS). Subsequent to the selection of samples and the DNA isolation this was realized by Dr. Dirk Höper, Friedrich-Loeffler-Institute, Island Riems. In total, three samples underwent NGGS. Two of them were taken from the first part of the study while the third one was included from a different project. The third sample was also dog tissue and it also contained polyfilic suture in a surgical wound of the skin.

The genetic analysis identified typical biofilm-associated bacteria like Enterobacteriaceae as well as bacteria like Deinococcaceae which have not been identified in infected wounds so far. The three samples showed overlapping results of bacterial families but they also had differences in their composition. Overlapping bacterial families in all of the three samples were Fusobacteriaceae and Porphyromonadaceae. The three most prominent families in the first analysed biofilm were Porphyromonadaceae, Fusobacteriaceae and Peptostreptococcaceae, in the second biofilm Deinococcaceae, Methylobacteriaceae and Nocardiaceae and in the third sample Porphyromonadaceae, Alteromonadaceae and Fusobacteriaceae.

The NGGS-analysis has advantages over other methods used for retrospective studies. In this method it is possible to use formalin fixed and paraffin embedded material and a small sample quantity is sufficient. A further advantage is the clear assignment of DNA sequences to bacterial families and species based on a database matching. However, it is a sophisticated method with complicated procedures and special knowledge to evaluate the data is necessary. Furthermore, the method provides no information about the vitality of the detected bacteria and the causality among these bacteria and the biofilm formation.

Summarizing the results of this study, it could be shown that (1.) biofilms occur in infected wounds associated with suture material in animals, (2.) the incidence of biofilms seems to be lower than reported in human medicine, and (3.) the number of detected bacterial families was surprisingly high and there were differences among the samples and to the results generated in previous studies.

6 Referenzen

- Aboltins C, Daffy J, Choong P, Stanley P (2014) Current concepts in the management of prosthetic joint infection. *Internal Medicine Journal* 44:834-840
- Allison DG, Sutherland IW (1987) The role of exopolysaccharides in adhesion of fresh-water bacteria. *Journal of General Microbiology* 133:1319-1327
- Anderl JN, Zahller J, Roe F, Stewart PS (2003) Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47:1251-1256
- Anwar H, Strap JL, Chen K, Costerton JW (1992) Dynamic interactions of biofilms of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with tobramycin and piperacillin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36:1208-1214
- Benveniste K, Thut P (1981) The effect of chronic alcoholism on wound healing. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine* 166:568-575
- Bertl K, Zijngé V, Zatorska B, Leonhard M, Schneider-Stickler B, Harmsen HJM (2014) Oral cavity anaerobic pathogens in biofilm formation on voice prostheses. *Head and Neck* Onlineveröffentlichung: 09. April 2014
- Bisno AL (1984) Cutaneous infections: Microbiologic and epidemiologic considerations. *The American Journal of Medicine* 76:172-179
- Blomstedt B, Osterberg B, Bergstrand A (1977) Suture material and bacterial transport. An experimental study. *Acta Chirurgica Scandinavica* 143:71-73
- Bowden GHW, Li YH (1997) Nutritional influences on biofilm development. *Advances in Dental Research* 11:81-99
- Cai W, De La Fuente L, Arias CR (2013) Biofilm formation by the fish pathogen *Flavobacterium columnare*: Development and parameters affecting surface attachment. *Applied and Environmental Microbiology* 79:5633-5642
- Carson L, Gorman SP, Gilmore BF (2010) The use of lytic bacteriophages in the prevention and eradication of biofilms of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 59:447-455
- Chauhan A, Bernardin A, Mussard W, Kriegel I, Esteve M, Ghigo JM, Beloin C, Semetey V (2014) Preventing biofilm formation and associated occlusion by biomimetic glyco-calyx-like polymer in central venous catheters. *The Journal of Infectious Diseases* 210:1347-1356

- Cho HJ, Jonsson H, Campbell K, Melke P, Williams JW, Jedynak B, Stevens AM, Groisman A, Levchenko A (2007) Self-organization in high-density bacterial colonies: Efficient crowd control. *PLoS Biology* 5:2614-2623
- Chotikanatis K, Backer M, Rosas-Garcia G, Hammerschlag MR (2011) Recurrent intravascular-catheter-related bacteremia caused by *Delftia acidovorans* in a hemodialysis patient. *Journal of Clinical Microbiology* 49:3418-3421
- Chu CC, Williams DF (1984) Effects of physical configuration and chemical structure of suture materials on bacterial adhesion. A possible link to wound infection. *American Journal of Surgery* 147:197-204
- Clutterbuck AL, Woods EJ, Knottenbelt DC, Clegg PD, Cochrane CA, Percival SL (2007) Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary Microbiology* 121:1-17
- Costerton JW (1999) Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents* 11:217-221
- Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ (1987) Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology* 41:435-464
- Costerton JW, Irvin RT, Cheng KJ (1981) The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annual Review of Microbiology* 35:299-324
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin Scott HM (1995) Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology* 49:711-745
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 284:1318-1322
- D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WWL, Schwarz C, Froese D, Zazula G, Calmels F, Debruyne R, Golding GB, Poinar HN, Wright GD (2011) Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 477:457-461
- Da Silva ESC, Feres M, Figueiredo LC, Shibli JA, Ramiro FS, Faveri M (2014) Microbiological diversity of peri-implantitis biofilm by Sanger sequencing. *Clinical Oral Implants Research* 25:1192-1199
- Darouiche RO, Wall MJ, Jr., Itani KM, Otterson MF, Webb AL, Carrick MM, Miller HJ, Awad SS, Crosby CT, Mosier MC, Alsharif A, Berger DH (2010) Chlorhexidine-alcohol versus povidone-iodine for surgical-site antisepsis. *The New England Journal of Medicine* 362:18-26
- Davey ME, O'Toole GA (2000) Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 64:847-867
- Davis SC, Ricotti C, Cazzaniga A, Welsh E, Eaglstein WH, Mertz PM (2008) Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization *in vivo*. *Wound Repair and Regeneration* 16:23-29

REFERENZEN

- De Carvalho CC, Wick LY, Heipieper HJ (2009) Cell wall adaptations of planktonic and biofilm *Rhodococcus erythropolis* cells to growth on C5 to C16 n-alkane hydrocarbons. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82:311-320
- Dewanti R, Wong ACL (1995) Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia-Coli* O157-H7. *International Journal of Food Microbiology* 26:147-164
- Do T, Devine D, Marsh PD (2013) Oral biofilms: Molecular analysis, challenges, and future prospects in dental diagnostics. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry* 5:11-19
- Domenech M, Ramos-Sevillano E, Garica E, Moscoso M, Yuste J (2013) Biofilm formation avoids complement immunity and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity* 81:2606-2615
- Dworniczek E, Piwowarczyk J, Seniuk A, Gościński G (2014) Enterococcus - virulence and susceptibility to photodynamic therapy of clinical isolates from Lower Silesia, Poland. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 0:1-8
- Edmiston CE, Krepel JC, Marks RM, Rossi PJ, Sanger J, Goldblatt M, Graham MB, Rothenburger S, Collier J, Seabrook GR (2013) Microbiology of explanted suture segments from infected and noninfected surgical patients. *Journal of Clinical Microbiology* 51:417-421
- Elgalai I, Foster HA (2003) Comparison of adhesion of wound isolates of *Staphylococcus aureus* to immobilized proteins. *Journal of Applied Microbiology* 94:413-420
- Fazli M, Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K, Jørgensen B, Andersen AS, Kroghfelt KA, Givskov M, Tolker-Nielsen T (2009) Nonrandom distribution of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in chronic wounds. *Journal of Clinical Microbiology* 47:4084-4089
- Fernandes JBC, Zanardo LG, Galvão NN, Carvalho IA, Nero LA, Moreira MAS (2011) *Escherichia coli* from clinical mastitis: Serotypes and virulence factors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23:1146-1152
- Flemming HC (1995) Sorption sites in biofilms. *Water Science and Technology* 32:27-33
- Foreman A, Wormald PJ (2010) Different biofilms, different disease? A clinical outcomes study. *Laryngoscope* 120:1701-1706
- Francolini I, Donelli G (2010) Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 59:227-238
- Fraunhofer IGB Mikrobiologische Charakterisierung antimikrobieller und photokatalytischer Oberflächen. Internetseite: http://www.igb.fraunhofer.de/content/dam/igb/de/documents/broschueren/Mikrobiologische_Charakterisierung_antimikrobieller_und_photokatalytisch_aktiver_oberflaechen.pdf (aufgerufen: 05.März 2015)

- Freedman LR (1987) The pathogenesis of infective endocarditis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 20:1-6
- Freiman A, Bird G, Metelitsa AI, Barankin B, Lauzon GJ (2004) Cutaneous effects of smoking. *Journal of Cutaneous Medicine Surgery* 8:415-423
- Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P (2005) Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology* 13:34-40
- Golovlev EL (2002) The mechanism of formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, a type of structured population. *Microbiology* 71:249-254
- Goodrich LR (2006) Osteomyelitis in horses. *The Veterinary Clinics of North America Equine Practice* 22:389-417, viii-ix
- Govan JR, Deretic V (1996) Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiological Reviews* 60:539-574
- Gristina AG (1987) Biomaterial-centered infection: Microbial adhesion versus tissue integration. *Science* 237:1588-1595
- Gristina AG, Costerton JW (1985a) Bacterial adherence to biomaterials and tissue - the significance of its role in clinical sepsis. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 67A:264-273
- Gristina AG, Oga M, Webb LX, Hobgood CD (1985b) Adherent bacterial colonization in the pathogenesis of osteomyelitis. *Science* 228:990-993
- Gristina AG, Price JL, Hobgood CD, Webb LX, Costerton JW (1985c) Bacterial colonization of percutaneous sutures. *Surgery* 98:12-19
- Guo DW, Wang LP, Lu CP (2012) *In vitro* biofilm forming potential of *Streptococcus suis* isolated from human and swine in China. *Brazilian Journal of Microbiology* 43:993-1004
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P (2004) Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* 2:95-108
- Henrici AT (1933) Studies of freshwater bacteria: 1. A direct microscopic technique. *Journal of Bacteriology* 25:277-287
- Hochstim CJ, Choi J, Lowe D, Masood R, Rice DH (2010) Biofilm detection with hematoxylin-eosin staining. *JAMA Otolaryngology - Head and Neck Surgery* 136:453-456
- Holm A, Vikström E (2014) Quorum sensing communication between bacteria and human cells: Signals, targets and functions. *Frontiers in Plant Science* 5: 309
- Hoyle BD, Alcantara J, Costerton JW (1992) *Pseudomonas aeruginosa* biofilm as a diffusion barrier to piperacillin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36:2054-2056
- Inglis TJ, Lim TM, Ng ML, Tang EK, Hui KP (1995) Structural features of tracheal tube biofilm formed during prolonged mechanical ventilation. *Chest* 108:1049-1052

- Jacques M, Marrie TJ, Costerton JW (1987) Review: Microbial colonization of prosthetic devices. *Microbial Ecology* 13:173-191
- Jensen ET, Kharazmi A, Garred P, Kronborg G, Fomsgaard A, Mollnes TE, Hoiby N (1993) Complement activation by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbial Pathogenesis* 15:377-388
- Kalishwaralal K, BarathManiKanth S, Pandian SR, Deepak V, Gurunathan S (2010) Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Colloids and Surfaces B:Biointerfaces* 79:340-344
- Kaplan JB, Mulks MH (2005) Biofilm formation is prevalent among field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 108:89-94
- Karatan E, Watnick P (2009) Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 73:310-347
- Kathju S, Nistico L, Lasko L-A, Stoodley P (2010) Bacterial biofilm on monofilament suture and porcine xenograft after inguinal herniorrhaphy. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 59:405-409
- Katz S, Izhar M, Mirelman D (1981) Bacterial adherence to surgical sutures. A possible factor in suture induced infection. *Annals of Surgery* 194:35-41
- Khan S, Sistla S, Dhodapkar R, Parija SC (2012) Fatal *Delftia acidovorans* infection in an immunocompetent patient with empyema. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2:923-924
- Klein B, Grossi V, Bouriat P, Goulas P, Grimaud R (2008) Cytoplasmic wax ester accumulation during biofilm-driven substrate assimilation at the alkane-water interface by *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17. *Research in Microbiology* 159:137-144
- Kolenbrander PE, London J (1993) Adhere today, here tomorrow - oral bacterial adherence. *Journal of Bacteriology* 175:3247-3252
- Lamont RJ, Jenkinson HF (1998) Life below the gum line: Pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 62:1244-1263
- Lebeaux D, Chauhan A, Letoffe S, Fischer F, de Reuse H, Beloin C, Ghigo JM (2014) pH-mediated potentiation of aminoglycosides kills bacterial persisters and eradicates *in vivo* biofilms. *The Journal of Infectious Diseases* 210:1357-1366
- Leid JG, Shirliff ME, Costerton JW, Stoodley P (2002) Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infection and Immunity* 70:6339-6345
- Leknes KN, Selvig KA, Bøe OE, Wikesjö UME (2005) Tissue reactions to sutures in the presence and absence of anti-infective therapy. *Journal of Clinical Periodontology* 32:130-138

- Lewis K (2001) Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45:999-1007
- Li YH, Tian XL (2012) Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors* 12:2519-2538
- Littleton NW, McCabe RM, Carter CH (1967) Studies of oral health in persons nourished by stomach tube. 2. Acidogenic properties and selected bacterial components of plaque material. *Archives of Oral Biology* 12:601-609
- Lourenço TGB, Heller D, Silva-Boghossian CM, Cotton SL, Paster BJ, Colombo APV (2014) Microbial signature profiles of periodontally healthy and diseased patients. *Journal of Clinical Periodontology* 41:1027-1036
- Markowska K, Grudniak AM, Wolska KI (2013) Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms. *Acta Biochimica Polonica* 60:523-530
- Marrie TJ, Costerton JW (1983) A scanning and transmission electron microscopic study of the surfaces of intrauterine contraceptive devices. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 146:384-394
- Marrie TJ, Costerton JW (1984a) Morphology of bacterial attachment to cardiac pacemaker leads and power packs. *Journal of Clinical Microbiology* 19:911-914
- Marrie TJ, Costerton JW (1984b) Scanning and transmission electron microscopy of *in situ* bacterial colonization of intravenous and intraarterial catheters. *Journal of Clinical Microbiology* 19:687-693
- Marrie TJ, Nelligan J, Costerton JW (1982) A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. *Circulation* 66:1339-1341
- Martin JM, Zenilman JM, Lazarus GS (2009) Molecular microbiology: New dimensions for cutaneous biology and wound healing. *Journal of Investigative Dermatology* 130:38-48
- Mayer C, Moritz R, Kirschner C, Borchard W, Maibaum R, Wingender J, Flemming H-C (1999) The role of intermolecular interactions: Studies on model systems for bacterial biofilms. *International Journal of Biological Macromolecules* 26:3-16
- Mulcahy JJ (2010) Penile prosthesis infection: Progress in prevention and treatment. *Current Urology Reports* 11:400-404
- Nickel JC, Downey JA, Costerton JW (1989) Ultrastructural study of microbiologic colonization of urinary catheters. *Urology* 34:284-291
- Nickel JC, Gristina AG, Costerton JW (1985) Electron microscopic study of an infected Foley catheter. *Canadian Journal of Surgery/Journal Canadien de Chirurgie* 28:50-51
- Nickel JC, Reid G, Bruce AW, Costerton JW (1986) Ultrastructural microbiology of infected urinary stone. *Urology* 28:512-515
- Novick RP (2003) Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Molecular Microbiology* 48:1429-1449

- Nyvad B, Crielaard W, Mira A, Takahashi N, Beighton D (2013) Dental caries from a molecular microbiological perspective. *Caries Research* 47:89-102
- O'Toole GA, Kolter R (1998a) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology* 30:295-304
- O'Toole GA, Kolter R (1998b) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: A genetic analysis. *Molecular Microbiology* 28:449-461
- Palestrant D, Holzknicht ZE, Collins BH, Parker W, Miller SE, Bollinger RR (2004) Microbial biofilms in the gut: Visualization by electron microscopy and by acridine orange staining. *Ultrastructural Pathology* 28:23-27
- Parsek MR, Singh PK (2003) Bacterial biofilms: An emerging link to disease pathogenesis. *Annual Review of Microbiology* 57:677-701
- Peltola M, Kanto Öqvist C, Ekman J, Kosonen M, Jokela S, Kolari M, Korhonen P, Salkinoja-Salonen M (2008) Quantitative contributions of bacteria and of *Deinococcus geothermali*s to deposits and slimes in paper industry. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35:1651-1657
- Peltola M, Kuosmanen T, Sinkko H, Vesalainen N, Pulliainen M, Korhonen P, Partti-Pellinen K, Rasanen JP, Rintala J, Kolari M, Rita H, Salkinoja-Salonen M (2011) Effects of polarization in the presence and absence of biocides on biofilms in a simulated paper machine water. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 38:1719-1727
- Picioreanu C, van Loosdrecht MC, Heijnen JJ (2001) Two-dimensional model of biofilm detachment caused by internal stress from liquid flow. *Biotechnology and Bioengineering* 72:205-218
- Portillo ME, Corvec S, Borens O, Trampuz A (2013) *Propionibacterium acnes*: An underestimated pathogen in implant-associated infections. Artikel *Biomed Research International* Artikel ID 804391A
- Purevdorj B, Costerton JW, Stoodley P (2002) Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 68:4457-4464
- Pye CC, Yu AA, Weese JS (2013) Evaluation of biofilm production by *Pseudomonas aeruginosa* from canine ears and the impact of biofilm on antimicrobial susceptibility *in vitro*. *Veterinary Dermatology* 24:446-449
- Rasko DA, Sperandio V (2010) Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nature Reviews Drug Discovery* 9:117-128
- Remuzgo-Martinez S, Pílares-Ortega L, Alvarez-Rodríguez L, Aranzamendi-Zaldunbide M, Padilla D, Icardo JM, Ramos-Vivas J (2013) Induction of proinflammatory cytokines in

- human lung epithelial cells during *Rhodococcus equi* infection. *Journal of Medical Microbiology* 62:1144-1152
- Romero R, Schaudinn C, Kusanovic JP, Gorur A, Gotsch F, Webster P, Nhan-Chang CL, Erez O, Kim CJ, Espinoza J, Goncalves LF, Vaisbuch E, Mazaki-Tovi S, Hassan SS, Costerton JW (2008) Detection of a microbial biofilm in intraamniotic infection. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 198:135.e1-135.e5
- Ruellan K, Frijns JHM, Bloemberg GV, Hautefort C, van den Abbeele T, Lamers GEM, Herman P, Ba Huy PT, Kania RE (2010) Detection of bacterial biofilm on cochlear implants removed because of device failure, without evidence of infection. *Otology and Neurology* 31:1320-1324
- Schlafer S, Nordhoff M, Wyss C, Strub S, Hubner J, Gescher DM, Petrich A, Gobel UB, Moter A (2008) Involvement of *Guggenheimella bovis* in digital dermatitis lesions of dairy cows. *Veterinary Microbiology* 128:118-125
- Schneider J, Hapfelmeier A, Fremd J, Schenk P, Obermeier A, Burgkart R, Forkl S, Feihl S, Wantia N, Neu B, Bajbouj M, von Delius S, Schmid RM, Algul H, Weber A (2014) Biliary endoprosthesis: A prospective analysis of bacterial colonization and risk factors for sludge formation. *PLOS ONE* 9:e110112
- Segev G, Bankirer T, Steinberg D, Duvdevani M, Shapur NK, Friedman M, Lavy E (2013) Evaluation of urinary catheters coated with sustained-release varnish of chlorhexidine in mitigating biofilm formation on urinary catheters in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 27:39-46
- Senhorinho GNA, Nakano V, Liu C, Song Y, Finegold SM, Avila-Campos MJ (2011) Detection of *Porphyromonas gulae* from subgingival biofilms of dogs with and without periodontitis. *Anaerobe* 17:257-258
- Seo YS, Lee DY, Rayamahji N, Kang ML, Yoo HS (2008) Biofilm-forming associated genotypic and phenotypic characteristics of *Staphylococcus* spp. isolated from animals and air. *Research in Veterinary Science* 85:433-438
- Sharma A, Inagaki S, Sigurdson W, Kuramitsu HK (2005) Synergy between *Tannerella forsythia* and *Fusobacterium nucleatum* in biofilm formation. *Oral Microbiology and Immunology* 20:39-42
- Siegrist TC, Kwon E.O., Fracchia J.A., Eid JF The "no-touch" technique: A novel technique for reducing post-operative infections in patients receiving multi-component inflatable penile prostheses. Internetseite: <http://www.urologicalcare.com/pdf/AUA-Poster-No-Touch-Technique-2008.pdf> (aufgerufen: 05. März 2015)
- Siggins A, Gunnigle E, Abram F (2012) Exploring mixed microbial community functioning: Recent advances in metaproteomics. *FEMS Microbiology Ecology* 80:265-280

- Stoodley P, Wilson S, Hall-Stoodley L, Boyle JD, Lappin-Scott HM, Costerton JW (2001) Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 67:5608-5613
- Sugarman B, Musher D (1981) Adherence of bacteria to suture materials. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine* 167:156-160
- Sundell K, Wiklund T (2011) Effect of biofilm formation on antimicrobial tolerance of *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Fish Diseases* 34:373-383
- Sutherland IW (2001) The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology* 9:222-227
- Swanson EA, Freeman LJ, Seleem MN, Snyder PW (2014) Biofilm-infected wounds in a dog. *Journal of the American Veterinary Association* 244:699-707
- Tay SB, Yew WS (2013) Development of quorum-based anti-virulence therapeutics targeting gram-negative bacterial pathogens. *International Journal of Molecular Sciences* 14:16570-16599
- Teughels W, van Assche N, Sliepen I, Quirynen M (2006) Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clinical Oral Implants Research* 17:68-81
- Thewes N, Loskill P, Jung P, Peisker H, Bischoff M, Herrmann M, Jacobs K (2014) Hydrophobic interaction governs unspecific adhesion of staphylococci: A single cell force spectroscopy study. *Beilstein Journal of Nanotechnology* 5:1501-1512
- Thornton RB, Rigby PJ, Wiertsema SP, Fillion P, Langlands J, Coates HL, Vijayasekaran S, Keil AD, Richmond PC (2011) Multi-species bacterial biofilm and intracellular infection in otitis media. *BMC Pediatrics* 11:94
- Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, Mandrekar JN, Cockerill FR, Steckelberg JM, Greenleaf JF, Patel R (2007) Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *The New England Journal of Medicine* 357:654-663
- Trebše R (2012) Infected total joint arthroplasty: The algorithmic approach. London, Springer-Verlag
- Trevors JT (2011) Viable but non-culturable (VBNC) bacteria: Gene expression in planktonic and biofilm cells. *Journal of Microbiological Methods* 86:266-273
- Tsikrikonis G, Maniatis AN, Labrou M, Ntokou E, Michail G, Daponte A, Stathopoulos C, Tsakris A, Pournaras S (2012) Differences in biofilm formation and virulence factors between clinical and fecal enterococcal isolates of human and animal origin. *Microbial Pathogenesis* 52:336-343

- Tsukayama DT, Estrada R, Gustilo RB (1996) Infection after total hip arthroplasty - a study of the treatment of one hundred and six infections. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 78A:512-523
- Tunney MM, Patrick S, Curran MD, Ramage G, Hanna D, Nixon JR, Gorman SP, Davis RI, Anderson N (1999) Detection of prosthetic hip infection at revision arthroplasty by immunofluorescence microscopy and PCR amplification of the bacterial 16S rRNA gene. *Journal of Clinical Microbiology* 37:3281-3290
- Universität Wien Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM). Internetseite: http://www.univie.ac.at/mikroskopie/3_fluoreszenz/clsm/1_einleitung.htm (aufgerufen 05.März 2015)
- van Heerden J, Turner M, Hoffmann D, Moolman J (2009) Antimicrobial coating agents: Can biofilm formation on a breast implant be prevented? *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery* 62:610-617
- Ward KH, Olson ME, Lam K, Costerton JW (1992) Mechanism of persistent infection associated with peritoneal implants. *Journal of Medical Microbiology* 36:406-413
- Waters CM, Bassler BL (2005) Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21:319-346
- Westgate SJ, Percival SL, Knottenbelt DC, Clegg PD, Cochrane CA (2011) Microbiology of equine wounds and evidence of bacterial biofilms. *Veterinary Microbiology* 150:152-159
- Whiteley M, Banger MG, Bumgarner RE, Parsek MR, Teitzel GM, Lory S, Greenberg EP (2001) Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 413:860-864
- Wilkins M, Hall-Stoodley L, Allan RN, Faust SN (2014) New approaches to the treatment of biofilm-related infections. *Journal of Infection* 1:47-52
- Wilkinson DA, Chacko SJ, Venien-Bryan C, Wadhams GH, Armitage JP (2011) Regulation of flagellum number by FliA and FlgM and role in biofilm formation by *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology* 193:4010-4014
- Winn M, Casey E, Habimana O, Murphy CD (2014) Characteristics of *Streptomyces griseus* biofilms in continuous flow tubular reactors. *FEMS Microbiology Letters* 352:157-164
- Wolcott RD, Kennedy JP, Dowd SE (2009) Regular debridement is the main tool for maintaining a healthy wound bed in most chronic wounds. *Journal of Wound Care* 18:54-56
- Wolcott RD, Rhoads DD, Bennett ME, Wolcott BM, Gogokhia L, Costerton JW, Dowd SE (2010a) Chronic wounds and the medical biofilm paradigm. *Journal of Wound Care* 19:45-53
- Wolcott RD, Rhoads DD, Dowd SE (2008) Biofilms and chronic wound inflammation. *Journal of Wound Care* 17:333-341

REFERENZEN

- Wolcott RD, Rumbaugh KP, James G, Schultz G, Phillips P, Yang Q, Watters C, Stewart PS, Dowd SE (2010b) Biofilm maturity studies indicate sharp debridement opens a time-dependent therapeutic window. *Journal of Wound Care* 19:320-328
- Yano T, Kubota H, Hanai J, Hitomi J, Tokuda H (2013) Stress tolerance of *Methylobacterium* biofilms in bathrooms. *Microbes and Environments* 28:87-95
- Ymele-Leki P, Ross JM (2007) Erosion from *Staphylococcus aureus* biofilms grown under physiologically relevant fluid shear forces yields bacterial cells with reduced avidity to collagen. *Applied and Environmental Microbiology* 73:1834-1841
- Zhang P, Lapara TM, Goslan EH, Xie Y, Parsons SA, Hozalski RM (2009) Biodegradation of haloacetic acids by bacterial isolates and enrichment cultures from drinking water systems. *Environmental Science and Technology* 43:3169-3175
- Zhao G, Hochwalt PC, Usui ML, Underwood RA, Singh PK, James GA, Stewart PS, Fleckman P, Olerud JE (2010) Delayed wound healing in diabetic (db/db) mice with *Pseudomonas aeruginosa* biofilm challenge: A model for the study of chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration* 18:467-477
- Zhuo C, Zhao QY, Xiao SN (2014) The impact of spgM, rpfF, rmlA gene distribution on biofilm formation in *Stenotrophomonas maltophilia*. *PLOS ONE* 9:e108409

7 Publikationsliste

Veröffentlichungen in wissenschaftlichen Zeitschriften:

König L, Klopfleisch R, Kershaw O, Gruber AD (2015) Prevalence of Biofilms on Surgical Suture Segments in Wounds of Dogs, Cat and Horses. *Veterinary Pathology* 52:295-297

König L, Klopfleisch R, Höper D, Gruber AD (2014) Next Generation Sequencing Analysis of Biofilms from Three Dogs with Postoperative Surgical Site Infection. *International Scholarly Research Notices* Artikel ID 282971

Vorträge:

König L, Kershaw O, Klopfleisch R, Gruber AD (2013) Häufigkeit von Biofilmen bei Fremdkörper-assoziierten Entzündungen bei Tieren. 56. Jahrestagung der Fachgruppe Pathologie in der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Fulda, Deutschland, 09.03.-10.03.2013, Abstract veröffentlicht in: *Tierärztliche Praxis / Ausgabe K, Kleintiere, Heimtiere*; 2013, 41, S. A34

König L, Kershaw O, Höper D, Klopfleisch R, Gruber AD (2014) Identifikation von bakteriellen DNA-Sequenzen in Biofilmen bei Fremdkörper-assoziierten Entzündungen mittels Next Generation Genome Sequencing. 57. Jahrestagung der Fachgruppe Pathologie in der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Fulda, Deutschland, 08.03.-09.03.2014, Abstract veröffentlicht in: *Tierärztliche Praxis / Ausgabe K, Kleintiere, Heimtiere*; 2014, 42, S. A16

Poster:

König L, Klopfleisch R, Kershaw O, Gruber AD (2013) Histological Detection and Prevalence of Biofilms in Foreign Body- Associated Inflammatory Reaction in Dogs, Cats and Horses. 31st Meeting of the European Society of Veterinary Pathology, London, Großbritannien, 04.09.-07.09.2013, Abstract veröffentlicht in: *Journal of Comparative Pathology*, 2014, 150:1, S. 103

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Achim D. Gruber, Ph.D., Leiter des Instituts für Tierpathologie der Freien Universität Berlin, gilt mein ganz besonderer Dank für die Idee zu diesem Projekt, für seine Initiative sowie für die finanzielle Verwirklichung.

Robert Klopffleisch danke ich für seinen unendlichen Optimismus, für seinen erfrischenden Pragmatismus und seinen ernsthaften Glauben an dieses Projekt.

Allen **Autoren** danke ich für die Unterstützung mit Rat und Tat. Besonders **Herrn Dr. Höper** vom Friedrich-Loeffler-Institut gebührt mein Dank für die geduldige Hilfe bei der Interpretation der komplizierten Daten der Sequenzierung.

Frau **Dr. Schwibbert** von der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung danke ich für das Überlassen einer Biofilmprobe für die Sequenzierung.

Vielen Dank **allen technischen Mitarbeiterinnen** im Labor, insbesondere **Frau Harder** und **Frau Nehrig** für die Anfertigung von Spezialfärbungen.

Anja Ostrowski, Marie-Charlotte von Deetzen, Aleksandra Zuraw und **Kristina Dietert** danke ich für die Freundschaft über das Institut hinaus.

Vielen Dank an **Sylke Giese** für ihre ansteckende gute Laune und ihren Rat bei den wirklich wichtigen Themen!

Vielen Dank an das gesamte **Team der Tierpathologie** für den Zusammenhalt, die gegenseitige Unterstützung und die schönen Mittagspausen.

Jasmina Neuber danke ich für den Zuspruch, das Studium überhaupt erst anzufangen, das jahrelange Mitfiebern und Daumendrücken, für die wunderbare Ablenkung mit Ausritten, Frühstücken, Ausflügen und vielen anderen Projekten und für diese ganz besondere Freundschaft!

Kristina Fritz und Sabine Düpre danke ich für die langjährige Freundschaft, den humorvollen wissenschaftlichen Austausch, die Hilfestellung und die Motivation.

Katharina Stork danke ich für die großartigen Praktika von Wüste bis Wendland, für die rückblickend schöne Zeit der Rotation und den Zusammenhalt in dem schier nicht enden wollenden Prüfungsmarathon!

Meiner **Familie** danke ich für das Vertrauen, den Zuspruch in den richtigen Momenten und für die finanzielle Unterstützung.

9 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, 2015

Lydia Marie König