

Aus dem Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Einsatz von Bakteriophagen gegen *E. faecalis*-Biofilme als
potentielle Therapie bei persistierender apikaler Parodontitis in
einem In-vitro-Modell

The use of bacteriophages against *E. faecalis* biofilms as a po-
tential therapy for persistent apical periodontitis in an in vitro
model

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Marie Luise Voit

Datum der Promotion: 30.11.2023

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
Zusammenfassung	1
Abstract	3
1 Einleitung.....	5
1.1 Einführung	5
1.2 Wurzelkanalbehandlung	5
1.3 <i>Enterococcus faecalis</i>	6
1.4 Bakteriophagen	7
1.5 Fragestellung	8
2. Material und Methodik.....	9
2.1 Bakterienstämme und Antibiotika.....	9
2.2 Isolation, Produktion und Titration von Bakteriophagen.....	9
2.3 Visualisierung der Bakteriophagen mit Transmissionselektronenmikroskopie	11
2.4 Host Range Assay	11
2.5 Evaluation der antimikrobiellen Phagenaktivität mit Hilfe der isothermalen Mikrokalorimetrie (IMC) gegen planktonische <i>E. faecalis</i> -Stämme	12
2.6 Biofilm Time-Killing Assay.....	12
2.7 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MIC).....	14
2.8 Evaluation der antimikrobiellen Aktivität von Phagen-Antibiotika Kombinationen gegen <i>E. faecalis</i> -Biofilm.....	14
2.9 Evaluation von bakterieller Resistenzentwicklung gegen Bakteriophagen.....	15
2.10 Visualisierung und Statistik	15
3. Ergebnisse	16
3.1 Isolation und Produktion von Bakteriophagen.....	16

3.2 Visualisierung der Bakteriophagen mit Transmissionselektronenmikroskopie	17
3.3 Host Range Assay	19
3.4 Evaluation der antimikrobiellen Phagenaktivität mit Hilfe der isothermalen Mikrokolorimetrie (IMC) gegen planktonische <i>E. faecalis</i> -Stämme	20
3.5 Time-Killing Assay.....	21
3.6 Evaluation der antimikrobiellen Aktivität von Phagen-Antibiotika Kombinationen gegen <i>E. faecalis</i> -Biofilm.....	23
3.7 Evaluation der antimikrobiellen Aktivität von Phagen-Antibiotika Kombinationen gegen einen Vancomycin und Gentamicin High-Level resistenten <i>E. faecalis</i> -Biofilm	26
3.8 Evaluation von bakterieller Resistenzentwicklung gegen Bakteriophagen.....	28
4. Diskussion	30
4.1 Beurteilung der Methodik	30
4.2 Ergebnisse der Host Range Analyse	32
4.3 Ergebnisse des Time-Killing Assays	33
4.4 Ergebnisse der isothermalen Mikrokolorimetrie	33
4.5 Beurteilung der bakteriellen Resistenzbildung gegen Bakteriophagen	34
4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	35
4.7 Implikation für Praxis und Forschung.....	36
5. Schlussfolgerungen	37
Literaturverzeichnis	38
Eidesstattliche Versicherung	42
Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen.....	43
Auszug aus der Journal Summary List.....	44
Druckexemplar der Publikation.....	46
Lebenslauf.....	60
Publikationsliste.....	63
Danksagung	64

Tabellenverzeichnis

Bezeichnung	Seite
Tab. 1: Ausgewählte Bakteriophagen	12
Tab. 2: Zusammenfassung MIC	14
Tab. 3: Unterschiedliche Bakteriophagen mit Fundort	16
Tab. 4: Morphologische Charakteristika	18

Abbildungsverzeichnis

Bezeichnung	Seite
Abb. 1: TEM Visualisierung	17
Abb. 2: Host Range	19
Abb. 3: IMC planktonischer <i>E. faecalis</i> -Zellen	21
Abb. 4: Time-Killing Assay	22
Abb. 5: IMC Gentamicin und Vancomycin	24
Abb. 6: IMC Daptomycin und Fosfomycin	27
Abb. 7: Heat Map der Resistenzentwicklung	29

Abkürzungsverzeichnis

ATCC	American Type Culture Collection
CUB	Charité - Universitätsmedizin Berlin
CV	Colony Variant
CFU	Colony Forming Unit
CVK	Charité Campus Virchow - Klinikum
°C	Grad Celsius
D	Daptomycin
EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EPS	Extracellular Polymeric Substances
Epa	Enterococcal polysaccharide antigen
F	Fosfomycin
GC	Growth Control
G	Gentamicin
h	Hour
IMC	Isothermal microcalorimetry
J	Joule
kV	Kilo Volt
L	Liter
MHB	Müller Hinton Broth
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
mL	Milliliter
mG	Milligram
mM	Millimol
MgSO ₄	Magnesium sulfate

nM	Nanometer
NaOCl	Sodium hypochlorite
NC	Negative Control
Ni	Nickel
PS	Parental Strain
PJI	Prosthetic Joint Infection
PFU	Plaque Forming Unit
PIP	Phage Infection Protein
PBS	Phosphate Buffered Saline
Rpm	Revolutions per minute
SM-Buffer	Sodium Chloride and Magnesium Sulphate Buffer
SD	Standard Deviation
SE	Standard Error
TEM	Transmission electron microscopy
TSB	Tryptic Soy Broth
TSA	Tryptic Soy Agar
Tris HCL	Tris (hydroxymethyl) aminomethan Hydrochlorid
V	Vancomycin
VRE	Vancomycin-Resistant Enterococci
μ W	Microwatt
ϕ	Bacteriophage

Zusammenfassung

Ziel:

Ziel dieser Studie war es, Bakteriophagen (Phagen) gegen *Enterococcus faecalis* zu finden und ihre antimikrobiellen Eigenschaften gegen Biofilm zu testen. Aus den Ergebnissen sollte ein potentieller therapeutischer Einsatz gegen apikale Parodontitis bei sekundären und persistierenden Wurzelkanalinfektionen durch *E. faecalis* abgeleitet werden. Dafür wurden fünf lytische Phagen auf ihre antimikrobielle Aktivität gegen den von *E. faecalis* gebildeten Biofilm untersucht und als Monotherapie entweder mit Phagen oder einem Antibiotikum oder als Kombinationstherapie durchgeführt.

Methoden:

Unterschiedliche Abwasserproben aus Berlin wurden mithilfe von 16 klinischen *E. faecalis* Stämmen (14 klinische Isolate, darunter ein Vancomycin und Gentamicin High-Level resistenter Stamm, und zwei ATCC-Stämme) auf die Anwesenheit von lytischen Phagen untersucht. Anschließend wurden 5 Phagen ausgewählt, die sich durch besonders klare Lyse-Plaques auszeichneten. In einem Host Range Assay wurde die Wirksamkeit der ausgewählten Phagen auf ihre Stammspezifität untersucht. Die ausgewählten Phagen wurden dann mit einem Time-Killing Assay auf ihre Wirksamkeit gegen Biofilmformation getestet. Alle Phagen, die einen Anti-Biofilm Effekt erzielten, wurden in einem weiteren Versuch mit verschiedenen Antibiotika kombiniert, um eine komplette Auflösung des Biofilms zu erzielen. Dafür wurde erneut *E. faecalis* Biofilm auf porösen Glaskugeln für 24 Stunden (h) gezüchtet. Anschließend erfolgte die Anwendung von Phagen oder Antibiotikum als Einzelbehandlung oder eine kombinierte Behandlung. Dafür wurde für die verwendeten Antibiotika ein Antibiogramm erstellt, um die für jeden ausgewählten *E. faecalis*-Stamm zu testenden Antibiotikakonzentrationen zu bestimmen. Gentamicin und Vancomycin wurden zur Behandlung aller *E. faecalis*-Stämme verwendet, mit Ausnahme des Vancomycin- und Gentamicin-resistenten Stammes (VRE), für den Daptomycin und Fosfomycin eingesetzt wurden. Um die antimikrobielle Aktivität nach der Behandlung zu evaluieren, wurde das Verfahren der isothermalen Mikrokolorimetrie angewandt und die Wärmeproduktion der eventuell verbleibenden Bakterien in Joule (J) über 48 h gemessen.

Ergebnisse:

Alle getesteten Phagen waren aktiv gegen *E. faecalis*-Biofilm. Die effektivste Biofilmreduktion wurde mit einer kombinierten Behandlung aus Phagen und Antibiotikum erzielt, wobei die Kombination mit Gentamicin die beste antimikrobielle Wirksamkeit aufwies. Im Fall des Stammes EF 10 konnte eine vollständige Zerstörung des Biofilms erreicht werden, wenn die Phagenbehandlung gestaffelt mit Antibiotika erfolgte. In allen anderen Fällen wurde nach einer gewissen Zeit der Unterdrückung ein erneutes Wachstum der Bakterien beobachtet. Für den resistenten Stamm VRE EF 04 erzielte die Kombination von Phagen mit Daptomycin die besten antimikrobiellen Ergebnisse.

Abstract

Aim:

Five lytic bacteriophages (phages) were evaluated for their antimicrobial activity against biofilm formed by *E. faecalis* to investigate their potential use in the treatment of post-treatment apical periodontitis caused by *E. faecalis*. Therefore, treatment of the biofilm was carried out as monotherapy with either phage or antibiotic or as combination therapy applying first phage and subsequently antibiotic.

Materials and Methods:

Various collected wastewater samples from different sources in Berlin and 16 *E. faecalis* strains (14 clinical isolates and 2 ATCC strains) were used to screen for the presence of lytic phages. Five phages were selected and evaluated for their ability to form plaques and their virion morphology. To evaluate strain specificity, a host range test was performed for each phage using all 16 *E. faecalis* strains. In addition, the killing kinetics of the phages against biofilm were determined using a time-killing assay. To investigate antibiofilm efficacy, 24 hours (h) biofilms grown on porous glass beads were treated for 24 h either as monotherapy with phage or antibiotics or as a staggered combination therapy with phage followed by administration of one or two antibiotics at increasing concentrations. Therefore, an antibiogram was performed with the antibiotics under study to determine the antibiotic concentrations to be tested for each selected *E. faecalis* strain. Gentamicin and vancomycin were used to treat all *E. faecalis* strains except for the vancomycin- and gentamicin-resistant strain (VRE), for which daptomycin and fosfomycin were evaluated. Antimicrobial activity was determined by measuring heat production over 48 h by using isothermal microcalorimetry.

Results:

All phages tested showed antibiofilm activity. Staggered treatment with phage and antibiotic achieved the strongest biofilm reduction, where the combination with gentamicin presented the best antimicrobial efficacy. Only in the case of strain EF 10 a complete

eradication of the biofilm was achieved when phage treatment was combined with antibiotics. In all other cases, bacterial regrowth was observed after a period of suppression. In the case of strain VRE EF 04, a combination treatment with phage followed by daptomycin showed the best antimicrobial outcome.

1 Einleitung

1.1 Einführung

Die Wurzelkanalbehandlung ist ein wichtiger Bestandteil der zahnärztlichen Praxis und dient dem Zahnerhalt bei irreversiblen Erkrankungen des Endodonts. Trotz unterschiedlicher Methoden der Dekontamination des Kanalsystems können Mikroorganismen verbleiben, die auch nach der Wurzelkanalbehandlung eine Entzündung an der Wurzelspitze auslösen können. Außerdem ist es möglich, dass sich Wurzelfüllungen bei insuffizienten koronalen Restaurationen erneut infizieren. *Enterococcus faecalis* ist bei persistierenden Entzündungen mit hoher Prävalenz nachweisbar. Deswegen sind neuartige Methoden für die Beseitigung von Biofilm im Wurzelkanal von großem Interesse. Bakteriophagen (Phagen) stellen hier eine vielversprechende Alternative dar.

1.2 Wurzelkanalbehandlung

Die Wurzelkanalbehandlung dient dem Zahnerhalt, wenn sich die Pulpa durch eindringende Keime irreversibel entzündet hat. Dies geschieht durch die in der Mundhöhle vorhandenen Bakterien. Kommt es zur Kariesbildung mit Dentinbeteiligung, können Pathogene bis zum Endodont vordringen und die Pulpa infizieren. Wird die Karies nicht rechtzeitig entfernt, können sich die Bakterien im Pulpengewebe verbreiten und es kommt zu einer Pulpanekrose. Etabliert sich der Biofilm im Kanalsystem und dringt bis apikal vor, kann sich im späten Stadium der bakteriellen Kontamination eine apikale Parodontitis entwickeln. Es kommt dabei, infolge entzündlicher Prozesse, zu einem Abbau des periapikalen Gewebes. Auch über Zahntraumata, Schmelzrisse und parodontale Taschen können Bakterien aus der Mundhöhle das Kanalsystem infizieren (1-4). Um das infizierte Gewebe zu entfernen, wird das Kanalsystem chemo-mechanisch aufbereitet und desinfiziert. Dies beinhaltet die Kanalinstrumentierung mittels endodontischer Feilen und der chemischen Reinigung mit herkömmlichen endodontischen Spüllösungen wie Natriumhypochlorid (NaOCl) und Ethylendiamintetraacetat (EDTA). Anschließend wird der entstandene Hohlraum luft- und bakteriendicht mit Guttapercha und Sealer verschlossen und der Zahn mit einer koronalen Restauration versorgt (5). Trotz dieser klinisch etablierten Methode können Bakterien im Wurzelkanal verbleiben. Ramifikationen, Seitenkanäle und Dentintubuli bieten Bakterien Nischen, die von den Kanalinstrumenten und den Spüllösungen kaum oder gar nicht erreicht werden. Weiterhin kann es zu einer Reinfektion

des Kanalsystems aufgrund eines erneuten Eindringens von Mikroorganismen bei insuffizienten Restaurationen und Sekundärkaries kommen. Die apikale Parodontitis nach Primärbehandlung zählt als Hauptgrund für das Versagen von Wurzelkanalbehandlungen (6-9).

1.3 *Enterococcus faecalis*

E. faecalis zählt zu den grampositiven Bakterien und ist fakultativ anaerob. Es kommt beim Menschen in der normalen Darmflora vor, kann aber als Pathogen auftreten, welches lebensbedrohliche Infektionen verursachen kann. Dazu zählen Meningitis, Endokarditis und Harnwegsinfektionen. Außerdem wird es mit Protheseninfektionen (PJI) in Verbindung gebracht (10-12). Weiterhin zählt er zu den relevantesten Erregern von nosokomialen Infektionen (13). In der Endodontie spielt *E. faecalis* eine wichtige Rolle, da er mit einer Prävalenz von bis zu 77 Prozent (%) mit sekundären und persistierenden Infektionen assoziiert wird (14, 15). *E. faecalis* besitzt multiple Resistenzmechanismen, die eine suffiziente Entfernung aus dem Wurzelkanalsystem erschweren. Dazu gehört die Fähigkeit Biofilm zu bilden und tief in die Dentintubuli einzudringen und sich somit den desinfizierenden Spüllösungen während der Wurzelkanalbehandlung zu entziehen (16, 17). Weiterhin ist *E. faecalis* in der Lage, längere Zeit ohne Substratzufuhr zu überleben. Hierbei wird die Proteinbiosynthese reduziert und die Zellen gehen in die sogenannte stationäre Phase über, in der sie bis zu 900-fach resistenter gegenüber Natriumhypochlorit sind (18). Zusätzlich ist *E. faecalis* in der Lage, hohen pH-Werten zu widerstehen. Kommt es zu einem pH-Wertanstieg, pumpt eine membranständige H⁺-K⁺-ATPase Protonen und Kationen in das Innere der Zelle, um so den pH-Wert des Zytoplasmas zu stabilisieren. Erst ein pH-Wert ab 11,5 erzielt einen bakteriziden Effekt (19-21). Dieser wird im Wurzelkanal selbst durch medikamentöse Einlagen mit Calciumhydroxid nicht erreicht, was auf die Pufferkapazität des Dentins zurückzuführen ist. Darüber hinaus ist *E. faecalis* fähig, Resistenzen gegen Antibiotika zu bilden. Der intensive Gebrauch und Missbrauch von Antibiotika hat dazu geführt, dass bereits vermehrt *E. faecalis* Stämme existieren, die Resistenzen gegen Reserveantibiotika wie Vancomycin (VRE) gebildet haben (22).

1.4 Bakteriophagen

Phagen sind Viren, die hochspezifisch Bakterien infizieren, um sich in ihnen zu replizieren. Die infizierten Wirtszellen werden bei diesem Prozess lysiert. Mit einer geschätzten Anzahl von 10^{31} Virionen zählen sie zu den am häufigsten vorkommenden Spezies dieses Planeten. Phagen werden anhand ihres viralen Genoms charakterisiert, welches als DNA oder RNA in einem Kapsidkopf enthalten ist, der mit einem Schwanzteil verbunden sein kann, dessen Ende oft mit Spikeproteinen bestückt ist (23, 24).

Der erste klinische Einsatz von Phagen wird Félix d'Hérelle Anfang des 20. Jahrhunderts in Paris am Institut Pasteur zugeschrieben. D'Hérelle isolierte Phagen aus Stuhlproben von Patienten, die an Shigellose litten und verabreichte diese Lösung einem erkrankten Patienten, der sich daraufhin vollständig erholte. Mit dem Bakteriologen George Eliava gründete Félix d'Hérelle 1938 das „Eliava Institute of Bacteriophages, Microbiology and Virology“ in Tbilissi, Georgien, welches bis heute besteht (25, 26).

Bei der therapeutischen Anwendung ist es wichtig, dass nur lytische Phagen verwendet werden. Das virale Genom kann sich auf zwei Wegen in der Wirtszelle vermehren. Beim lytischen Zyklus wird nur die virale DNA oder RNA repliziert. Durch Freisetzung der neu entstandenen Virionen wird die Zelle lysiert und somit zerstört. Dieser Vorgang kann in verschiedene Teilschritte untergliedert werden. Bei der Adsorption bindet der Phage an spezifische Rezeptoren auf der Zellmembran der Wirtszelle und injiziert bei der Penetration die DNA oder RNA in die Zelle. Bei der Transkription wird so in den Metabolismus der Wirtszelle eingegriffen, sodass nur noch das virale Genom repliziert wird und bei der Biosynthese virale Proteine synthetisiert werden. Während der Phase der Reifung entstehen aus den viralen Proteinen neue Phagen, die beim Prozess der Lyse freigesetzt werden und die Wirtszelle zerstören. Im Vergleich dazu wird beim lysogenen Zyklus das virale Genom in die Wirts-DNA integriert und mit ihr zusammen repliziert, es entsteht ein sogenannter Prophage. Unter bestimmten Bedingungen können auch Prophagen dem lytischen Zyklus folgen und es kommt ebenfalls zu einer Zerstörung der Wirtszelle. Trotzdem sind sie nicht für einen therapeutischen Einsatz geeignet, weil es innerhalb der Wirtszelle zu einem Gentransfer zwischen Phagen und Bakterienzelle kommen kann, die zu Antibiotikaresistenzen führen können (27-29).

1.5 Fragestellung

In der Zahnmedizin ist die Phagentherapie nahezu unerforscht. In der Literatur lassen sich bereits Ansätze finden, *E. faecalis* in verschiedenen Wurzelkanalmodellen mittels Phagen zu eliminieren. Darunter auch ein Tierversuch, der in einem Rattenmodell nachwies, dass mit *E. faecalis* infizierte Rattenzähne, die anschließend mit Phagen behandelt wurden, eine höhere Desinfektionsrate aufwiesen, als Zähne, welche mit Calciumhydroxid, Kampferphenol oder Formaldehydkresol desinfiziert wurden. Alle Studien kommen zu dem Ergebnis, dass *E. faecalis* reduziert, aber nicht vollständig eliminiert werden kann (30-32).

In dieser Studie soll geklärt werden, ob es möglich ist, schnell und effizient gegen mehrere *E. faecalis* Stämme Phagen zu finden und in hohen Titern zu produzieren, darunter auch ein Stamm, der gegen Vancomycin und Gentamicin High-Level resistent ist. Anschließend sollen ausgewählte Phagen im Hinblick auf ihre antimikrobielle Wirkung gegen Biofilm mittels unterschiedlicher Methoden (Time-Killing Assay, isothermale Mikrokalorimetric) qualitativ und quantitativ untersucht werden. Weiterhin soll die Frage geklärt werden, ob eine Kombination der Phagen mit Antibiotika bessere antimikrobielle Effekte gegen *E. faecalis* aufweist, als die alleinige Dekontamination mittels Phagen. Sollte es in den Versuchen zu keiner kompletten Beseitigung des Biofilms kommen, muss exemplarisch untersucht werden, ob die verbliebenen Bakterien Resistenzen gegen die Phagen entwickelt haben. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag für die Grundlagenforschung der potenziellen Anwendung von Phagen in der Endodontie leisten.

2. Material und Methodik

2.1 Bakterienstämme und Antibiotika

Insgesamt wurden für diese Studie 16 *E. faecalis* Stämme verwendet. Davon waren 14 aus klinischen Isolaten, darunter ein Vancomycin und Gentamicin resistenter Stamm und zwei ATCC-Stämme (19433, 29212). Jeder Stamm wurde auf einer Tryptic Soy Agar (TSA, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) Agarplatte ausplattiert und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde mit jeweils einer Bakterienkolonie eine Kultur in 2 mL Tryptic Soy Broth (TSB, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) angelegt und ebenfalls für 24 h bei 37 °C inkubiert. Mit dieser Kultur wurde von jedem Stamm ein 25 prozentiger Glycerolstock angelegt und bei -20 °C gelagert.

Antibiotika wurden beim jeweiligen Hersteller erworben: Gentamicin (Ratiopharm, Ulm, Deutschland), Vancomycin (Hexal, Holzkirchen, Deutschland), Daptomycin (Novartis, Basel, Schweiz) und Fosfomycin (InfectoPharm, Heppenheim, Deutschland). Für die Versuche mit Antibiotika wurde Müller Hinton Broth (MHB, Roth, Karlsruhe, Deutschland) verwendet und für die Verwendung von Daptomycin und Fosfomycin mit 50 mg/L Calciumchlorid ggf. 25 mg/L Glucose-6-Phosphat angereichert.

2.2 Isolation, Produktion und Titration von Bakteriophagen

In Berliner Klärwerken wurden unterschiedliche Abwasserproben gesammelt und auf Anwesenheit von Phagen untersucht. Dafür wurden 50 mL von jeder Abwasserprobe in einen sterilen 250 mL Erlenmeyerkolben gegeben und mit 50 µL Bakteriensuspension von allen 16 Stämmen angereichert. Die jeweilige Suspension wurde aus dem Glycerolstocks gewonnen. Dazu wurden 20 µL der Bakterienkultur mit 2 mL TSB vermengt und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die angereicherten Abwasserproben wurden anschließend für 24 h inkubiert (37 °C, 150 rpm). Im nächsten Schritt wurde die Probe mit 0,22 µm Filtern (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gefiltert.

Um Phagen in der Abwasserprobe nachzuweisen, wurde ein Top-Agar Overlay Spot Assay (33) mit jedem der 16 Stämme durchgeführt. Dazu wurden 100 µL der über Nacht inkubierten Bakterienlösung mit 5 mL Top-Agar (TSB + 6 g/L Agar) vermengt. Anschließend wurden 10 µL jeder gefilterten Abwasserprobe auf die 16 Agarplatten mit den 16 unterschiedlichen *E. faecalis* Kulturen getropft und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach der

Inkubationszeit wurden alle Platten auf Lyse-Zonen untersucht und bei negativen Resultaten verworfen. Bei Vorhandensein eines klaren Lyse-Hofes wurde mit einer sterilen Pasteurpipette eine Probe des lysierten Top Agars entnommen, um die Phagen weiter zu isolieren. Für diesen Schritt wurde, wie bereits beschrieben, eine Top-Agar Platte mit dem jeweils korrespondierenden Wirtsstamm hergestellt und mit der Pasteurpipette bis zu 20-mal horizontal im Top-Agar vorsichtig eingestochen. Die Einstichstellen wurden anschließend mit einem sterilen Papierstreifen von oben nach unten über die ganze Platte verstrichen, um die Phagen über die ganze Platte zu verteilen und um eine maximale Replikation zu gewährleisten. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 37 °C konnten die einzelnen Phageplaques nach morphologischen Kriterien (Größe, Lyse, Vorhandensein einer Halo-Struktur) bewertet werden. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt, um homogene Plaques zu erhalten. Danach erfolgte die Produktion der jeweiligen Phagen. Hierzu wurde bei der letzten Wiederholung der Isolation 5 mL SM-Phage-Puffer (Saline Magnesium Buffer, 10 mM Tris-HCL, pH 7.8, 1 mM MgSO₄) hinzugegeben, mit Verschlussfolie (Parafilm M, Bemis, Neenah, Wisconsin, USA) isoliert und für 24 h bei -4 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der SM-Buffer in einen 50 mL Falcon überführt, bei 4 °C, 20 Minuten und 7830 rpm zentrifugiert und anschließend mit sterilen 0,22 µm Filtern gefiltert. Um den Phagentiter zu bestimmen, wurde eine zehnfache Verdünnungsreihe der produzierten Phagenlösung erstellt und 10 µL der jeweiligen Verdünnung auf eine Agarplatte mit Top-Agar von dem entsprechenden Wirtsstamm aufgetragen, für 24 h inkubiert und nach Formel 1 ausgewertet.

Formel 1.

$$\text{Bacteriophage titer (PFU/mL)} = \frac{\text{No. of bacteriophage plaques formed} \times \text{Dilution factor}}{\text{Volume of bacteriophage sample (mL)}}$$

Anhand der Plaquemorphologie und der Produzierbarkeit, wurden vier Phagen für die weiteren Experimente ausgewählt. Außerdem konnte ein Phage gegen den multiresistenten Stamm EF 04 gefunden werden, der ebenfalls bei weiteren Versuchen untersucht wurde.

2.3 Visualisierung der Bakteriophagen mit Transmissionselektronenmikroskopie

Um die Phagen visuell darzustellen, wurde die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) verwendet. Hierfür wurden eine Probe von 15 μL des Phagenpräparats auf Parafilm gegeben, bevor es auf ein Ni-Gitter (G2430N; Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland), das mit Kohlenstoff beschichtet und glühend entladen wurde (Leica MED 020, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland), übertragen und für 10-15 Minuten bei Raumtemperatur adsorbiert wurde. Die Gitter wurden dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und dann 20 Sekunden lang mit 1 prozentigem wässrigen Uranylacetat (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) behandelt, um eine Negativfärbung zu erzielen. Die überschüssige Färbung wurde mittels Filterpapier entfernt, an der Luft getrocknet und dann mit einem Zeiss EM 906 Mikroskop (Carl Zeiss Mikroskopie Deutschland, Oberkochen, Deutschland) bei einer Spannung von 80 kV im TEM abgebildet. Die Größe der Phagen wurde mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ ausgewertet.

2.4 Host Range Assay

Alle fünf isolierten Phagen wurden auf allen 16 *E. faecalis* Stämmen getestet, um ihr Wirkspektrum zu bestimmen. Mit der Top-Agar Overlay Spot Assay Methode wurde die Lyse-Aktivität aller Phagen bestimmt. Dazu wurde von jedem Stamm eine Kultur angelegt (20 μL des jeweiligen Glycerolstocks vermengt mit 2 mL TSB-Medium, inkubiert bei 37 °C für 24 h). Anschließend wurden 100 μL dieser Kultur zu 4 mL Top-Agar hinzugegeben und auf eine TSA-Platte gegossen (runde Petri Schalen 100 mm \times 15 mm) und bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurden von jeder Phagenlösung zehnfache Serienverdünnungen in PBS hergestellt und davon jeweils 10 μL auf die vorbereiteten Agarplatten gegeben, getrocknet und bei 37 °C für 24 h inkubiert. Bei der darauffolgenden Analyse wurden klare Kreisformationen und Plaque-Bildung mit gegebenenfalls vorhandener Halo-Struktur auf den gewachsenen Bakterienrasen also Indikator für die Lyse-Aktivität der Phagen gewertet. Trübe Veränderungen wurden als eventuelle Aktivität von lysogenen Phagen interpretiert und nicht in die Auswertung als positives Ergebnis mit einbezogen.

2.5 Evaluation der antimikrobiellen Phagen-Aktivität mit Hilfe der isothermalen Mikrokalorimetrie (IMC) gegen planktonische *E. faecalis* Stämme

Zusätzlich zum Time-Killing Assay wurde die Wirksamkeit gegen *E. faecalis* Biofilm aller ausgewählten Phagen mithilfe des Kalorimeters TAM III (TA Instruments, New Castle, DE, USA) untersucht. Wie bereits beschrieben, wurde zunächst von jedem *E. faecalis* Stamm ein 24 h alter Biofilm auf sterilen porösen Glaskugeln (ROBU®, Hattert, Deutschland) gezüchtet. Anschließend wurden die Glaskugeln dreimal in steriler Kochsalzlösung gewaschen, um planktonische Bakterienzellen zu entfernen und in sterile Glasampullen mit 500 µL frischer Nährlösung (TSB) überführt. Waren auf der Glaskugel noch überlebende Biofilm-Zellen vorhanden, konnte in dem Fall eine Wärmeentwicklung (in µW) gemessen werden. Die Messung erfolgte über 48 h. Dieser Versuch erfolgte in zwei unabhängigen Experimenten in Duplikaten.

2.6 Biofilm Time-Killing Assay

Vier Phagen mit unterschiedlichen Kriterien wurden ausgewählt (Tabelle 1) und in einem ersten Schritt auf ihre antimikrobielle Aktivität gegen *E. faecalis* Biofilm mit Hilfe eines Time-Killing Assays quantifiziert. Die bakterizide Aktivität wurde hier als eine Reduktion der Bakterien in CFU/mL um das mehr als 3 log₁₀-fache, was einer Abnahme des Biofilms um 99,9% entspricht (34).

Tabelle 1. Ausgewählte Bakteriophagen mit unterschiedlichen Charakteristika (*eigene Darstellung*).

Bakteriophage	Auswahlkriterium
CUB_EF03	Kleine, klare Phage Plaques
CUB_EF06	Große, klare Phage Plaques
CUB_EF10	Stark ausgeprägter Halo
CUB_EF14	Größtes Wirkspektrum

Zunächst wurde von jedem *E. faecalis* Wirtsstamm eine Kultur angelegt. Dafür wurden 2 mL TSB mit 20 µL aus dem Glycerolstock vermengt und bei 37 °C für 24 h inkubiert und

anschließend mit frischem TSB in einem Verhältnis von 1:100 verdünnt. Um *E. faecalis*-Biofilm zu züchten, wurden sterile Glaskugeln in einer 24-Well-Plate (Corning Inc., Corning, USA) mit jeweils 1 mL der Bakterienlösung bedeckt und für 24 h inkubiert (37 °C, 150 rpm). Nach der angegebenen Inkubationszeit wurden alle Glaskugeln in 0,9% steriler Kochsalzlösung gewaschen, um planktonische Bakterienzellen zu entfernen und anschließend in Eppendorf Zentrifugenröhrchen mit 1 mL frischem TSB überführt. Diese wurden dann mit der korrespondierenden Phagenlösung mit einem Titer von 10⁸ PFU/mL versetzt und für verschiedene Zeiträume von 0 h, 2 h, 4 h, 6 h und 24 h bei 37 °C inkubiert. Um die verbliebenen Zellen des Biofilms von der Glaskugel zu lösen, wurden die Glaskugeln nach jedem Zeitpunkt für 10 Minuten bei 40 kHz und 0.2 W/cm² in den Sonikator gegeben (BANDELIN electronic, Berlin, Deutschland). Anschließend wurde die Glaskugel entfernt und das Sonikat zentrifugiert (1 min, 16000 x g, 4 °C). Das hierbei entstandene Bakterienpellet wurde von der überstehenden Flüssigkeit getrennt und erneut mit 1 mL PBS versetzt. Dieser Schritt wurde insgesamt viermal wiederholt. Ziel war es hierbei, noch vorhandene Phagen aus der Probe zu entfernen. Nach viermaligem Waschen wurde das Bakterienpellet ein letztes Mal mit 1 mL PBS resuspendiert und anschließend eine zehnfache Serienverdünnung hergestellt, die auf eine Agarplatte mit 10 µL Tropfen aufgetragen wurde und im letzten Schritt für 24 h bei 37 °C inkubiert wurde. Zur Auswertung wurden die gewachsenen Kolonien ausgezählt und die bakterielle Konzentration nach Formel 2 berechnet:

Formel 2.

$$\text{Bacterial Count (CFU/mL)} = \frac{\text{No. of colonies counted} \times \text{Dilution factor}}{\text{Volume in mL spread on culture plate}}$$

Insgesamt wurde dieses Experiment in zwei unabhängigen Versuchen in Duplikaten durchgeführt und die Ergebnisse als Mittelwert ± der Standardabweichung (SD) dargestellt und graphisch als Bakterienanzahl (CFU/mL) über die Zeit (in h) dargestellt. Hierfür wurde die Software GraphPad Prism verwendet (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

2.7 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Für jedes Antibiotikum wurde die Konzentration bestimmt, die ein sichtbares Wachstum von *E. faecalis* Bakterien in einer Suspension verhindert (MIC). Zunächst wurden Serienverdünnungen der in Frage kommenden Antibiotika in MHB hergestellt. Weitergehend wurde von jedem betreffenden *E. faecalis* Stamm ein Inokulum mit einer ungefähren Konzentration von 10^6 CFU/mL mithilfe einer McFarland 0.5 Standardlösung hergestellt und anschließend mit MHB in einem Verhältnis von 1:100 verdünnt. Anschließend wurden 100 µL der Bakterienlösung in 24-Well-Plates gegeben und mit 100 µL der korrespondierenden Antibiotikaverdünnung vermischt (bakterielle Endkonzentration von 5×10^5 CFU/mL) und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die minimale Hemmkonzentration des jeweiligen Antibiotikums wurde als die Antibiotikakonzentration definiert, die gerade noch sichtbares Bakterienwachstum verhindert. Die Trübung der Well-Plates wurde mit einem Spektrophotometer ermittelt. Tabelle 2 fasst die unterschiedlichen Hemmkonzentrationen zusammen.

Tabelle 2. Zusammenfassung der minimalen Hemmkonzentration (MIC) verschiedener Antibiotika gegen planktonische *E. faecalis* Stämme (*modifiziert nach Voit M, Trampuz A, Gonzalez Moreno M, 2022*).

Antibiotika	MIC EF 03	MIC EF 06	MIC EF 10	MIC EF 14	MIC EF 04
Vancomycin	2 µg/mL	2 µg/mL	2 µg/mL	2 µg/mL	-
Gentamicin	64 µg/mL	64 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	-
Fosfomycin	-	-	-	-	32 µg/mL
Daptomycin	-	-	-	-	8 µg/mL

2.8 Evaluation der antimikrobiellen Aktivität von Phagen-Antibiotika Kombinationen gegen *E. faecalis* Biofilm

Für diesen Versuch wurde erneut *E. faecalis* Biofilm auf porösen Glaskugeln für 24 h gezüchtet und anschließend mit dem korrespondierenden Phagen mit einem Titer von 10^8 PFU/mL behandelt. Nach vier Stunden wurde für die Stämme EF 03, EF 06, EF 10 und EF 14 die Antibiotika Vancomycin und Gentamicin allein oder in Kombination mit

unterschiedlicher MHK dazugegeben und die Glaskugel für 24 h bei 37 °C inkubiert. Für den Vancomycin und Gentamicin High-Level resistenten Stamm EF 04 wurden Fosfomycin und Daptomycin verwendet. Nach der Inkubationszeit wurden die Glaskugeln dreimal in steriler Kochsalzlösung gewaschen und in Glasampullen mit 500 µL TSB überführt und anschließend ins Kalorimeter inseriert. Wie bereits beschrieben, wurde hier der Wärmeentwicklung (in J) von noch vorhandenen Bakterienzellen über 48 h gemessen und anschließend ausgewertet.

2.9 Evaluation von bakterieller Resistenzentwicklungen gegen Bakteriophagen

Um zu bestimmen, ob es sich nach der Behandlung noch vorhandenen Bakterien um mutierte Zellen handelt, wurden in dem Fall von EF 10 und EF 14 nach 48 h Messung mit dem Mikrokalorimeter die Überstände auf TSB Agarplatten ausplattiert und für 24 h inkubiert (37 °C). Anschließend wurde eine Kolonie entnommen und damit eine Kultur in TSB angelegt und ebenfalls für 24 h inkubiert. Mit der Top-Agar Overlay Methode wurden dann die Ausgangsphagen CUB_EF10 und CUB_EF14 auf die Bakterien mit Verdacht auf Mutation gespottet (EF 10 CV, EF 10 CV). Um zu beurteilen, ob durch die potentielle Mutation Phagen, die vorher keine Lyse-Aktivität gegen den EF 10 und EF 14 aufwiesen, nun Lyse-Aktivität zeigten, wurden ebenfalls CUB_EF03 und CUB_EF 06 auf EF 10 CV und EF 14 CV gespottet und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Waren nach 24 h keine Lyse-Zonen sichtbar, wurden die mutierten Stämme EF 10 CV und EF 14 CV als resistent gegen die Ausgangsphagen beurteilt.

2.10 Visualisierung und Statistik

Die Visualisierung der Daten aus den Abbildungen 2, 3, 4 und 7 erfolgte mit GraphPad Prism 6 für Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA). Die Daten aus den Abbildungen 5 und 6 wurden mit Hilfe von R Studio (RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston) und Microsoft Excel 2016 bearbeitet und visualisiert.

Für die Erstellung der Graphen von Abbildung 5 und 6 wurde der Mittelwert \pm SE verwendet. Für die statistische Analyse von Abbildung 4 wurde ein Two-Sided Student's Test durchgeführt (GraphPad Prism 6) und P-Werte <0.05 wurden als signifikant bewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Isolation und Produktion von Bakteriophagen

Als gute Quelle für Phagen gegen *E. faecalis* erwiesen sich Abwässer (Zulaufwasser und Klärschlamm) aus dem Klärwerk Ruhleben und Rudow (Berliner Wasserbetriebe). Weitere Quellen, wie das Abwasser des Virchow Klinikums Berlins, Abwässer aus privaten Klärgruben von Einfamilienhäusern, Schweinedung und die Untersuchung von alten Spülschwämmen zeigten keine positiven Resultate.

Die erfolgreiche Produktion (Vermehrung) mit korrespondierenden Titern der Phagen CUB_EF03, CUB_EF04, CUB_EF10, CUB_EF14 fasst Tabelle 3 zusammen.

Tabelle 3. Unterschiedliche Bakteriophagen (CUB_EF) mit dazugehörigem *E. faecalis* Wirtsstamm (EF), Fundort KW R (Klärwerk Ruhleben, Berlin) und KWR RD (Klärwerk Rudow, Berlin) und korrespondierender Titer der Phagen-Produktion in PFU/mL (*eigene Darstellung*).

Bakteriophage	Wirtsstamm	Fundort	Titer (PFU/mL)
CUB_EF03	EF03	KW R	3×10^{10}
CUB_EF04	EF04	KW RD	3×10^8
CUB_EF06	EF06	KW R	9×10^9
CUB_EF10	EF10	KW R	2×10^9
CUB_EF14	EF14	KW R	2×10^7

3.2 Visualisierung der Bakteriophagen mit Transmissionselektronenmikroskopie

Die Morphologie der isolierten Phagen CUB_EF03, CUB_EF04, CUB_EF06, CUB_EF10 und CUB_EF14 wurde mittels TEM untersucht (Abbildung 1). Daraus ergab sich, dass vier Phagen (CUB_EF03, CUB_EF06, CUB_EF10, CUB_EF14) eine Siphovirus-Morphologie aufwiesen. Sie bestanden aus einem ikosaedrischen Kapsidkopf und einem non-kontraktilen Schwanz ohne Schwanzfasern. CUB_EF 04 konnte der Podovirus-Morphologie zugeordnet werden, mit den dafür typischen Charakteristika eines ikosaedrischen Kapsidkopf und einem kurzen, non-kontraktilen Schwanz. Tabelle 4 fasst die Größenverhältnisse der oben genannten Phagen zusammen.

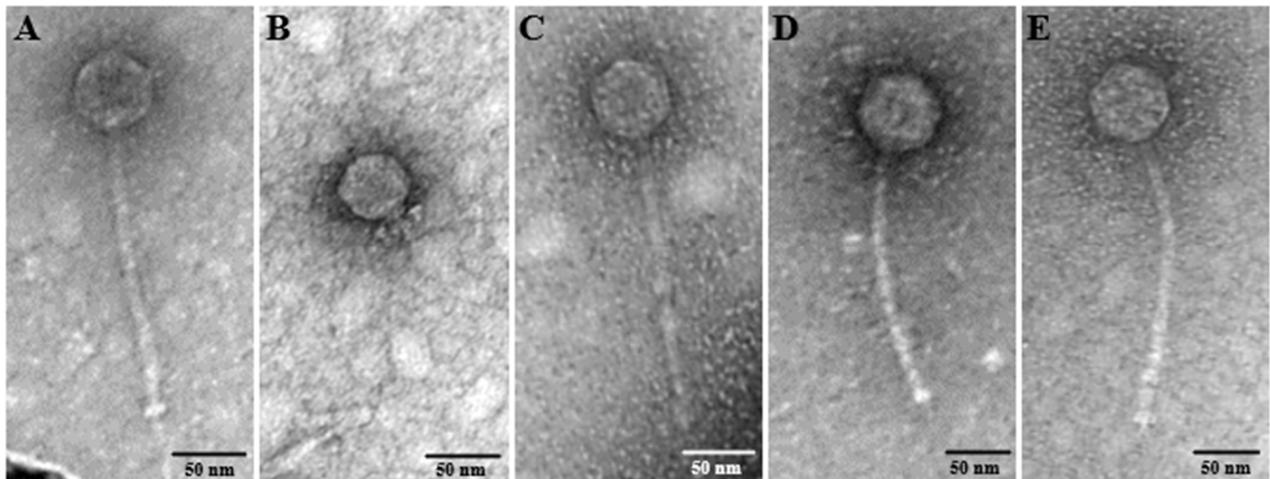


Abbildung 1. TEM-Visualisierung der Bakteriophagen (A) CUB_EF03, (B) CUB_EF04, (C) CUB_EF06, (D) CUB_EF10, (E) CUB_EF14 (aus Voit M, Trampuz A, Gonzalez Moreno M, 2022).

Tabelle 4. Zusammenfassung der Vermessung unterschiedlicher morphologischer Charakteristika (Durchmesser (d) des Kapsidkopfes, Schwanzlänge- und Breite in nm, Länge der Schwanzspitze) verschiedener Bakteriophagen mit ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) (eigene Darstellung).

Bakteriophage	Kopf (d in nm)	Schwanzlänge (in nm)	Schwanzbreite (in nm)	Schwanzspitze (in nm)
CUB_EF03	54,83	188,15	8,91	31,81
CUB_EF04	45,18	21,73	-	-
CUB_EF06	54,48	195,76	7,79	-
CUB_EF10	64,12	189,72	11	22,6
CUB_EF14	59,45	200,56	9,73	16,31

3.3 Host Range Assay

Die Analyse der Host Range ergab, dass alle getesteten Phagen ein unterschiedliches Wirtsspektrum besaßen, wobei der Phage CUB_EF14 die meisten Stämme infizieren konnte (44%). CUB_EF 10 hingegen zeigte nur lytische Aktivität gegen den eigenen Wirtstamm EF 10. Von 16 *E. faecalis* Stämmen zeigten sich insgesamt fünf davon (31%) resistent gegen alle getesteten Phagen.

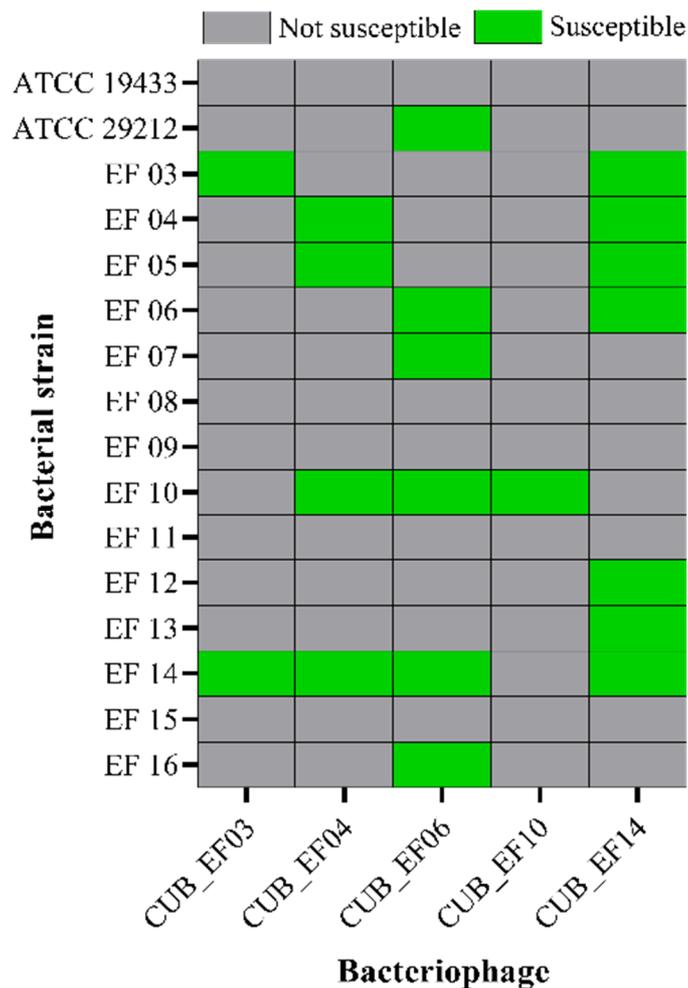


Abbildung 2. Host Range von fünf Bakteriophagen gegen 16 unterschiedliche *E. faecalis* Stämme. Grüne Felder markieren die Anfälligkeit des *E. faecalis* Stammes gegenüber dem jeweiligen Bakteriophagen an. Graue Felder zeigen die Nicht-Anfälligkeit der Bakterien gegenüber den getesteten Bakteriophagen (aus Voit M, Trampuz A, Gonzalez Moreno M, 2022).

3.4 Evaluation der antimikrobiellen Phagen-Aktivität mit Hilfe der isothermalen Mikrokalorimetrie (IMC) gegen planktonische *E. faecalis* Stämme

In diesem Versuch wurde die antimikrobielle Aktivität der Phagen in unterschiedlichen Titern (10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 PFU/mL) von CUB_EF03, CUB_EF06, CUB_EF10 und CUB_EF14 gegen planktonische *E. faecalis* Bakterien getestet. Es handelte sich hierbei um eine Echtzeitmessung. Auffällig war, dass bei allen Phagen ab dem Zeitpunkt 1 h bis 2 h eine ausgeprägte Reduktion der Wärmeentwicklung und somit eine Verringerung des Bakterienwachstums zu beobachten war, vor allem bei höheren Titern ab 10^7 und 10^8 PFU/mL. Nach ca. 5 h kam es bei EF 03, EF 10 und EF 14 zu einem erneuten Anstieg der Wärmeentwicklung. Bei EF 06 konnte für die Titer 10^6 und 10^8 PFU/mL eine komplette Einstellung der Wärmeproduktion vermerkt und somit von einer vollständigen Beseitigung der planktonischen Zellen ausgegangen werden. Demnach scheinen höhere Titer bei der Applikation von Phagen einen besseren antimikrobiellen Effekt zu erzielen. Weiterhin lassen die anderen Ergebnisse vermuten, dass auch planktonische *E. faecalis*-Zellen in der Lage sind, gegen Phagen Resistenzen zu bilden, was den erneuten Anstieg der Wachstumskurven erklärt.

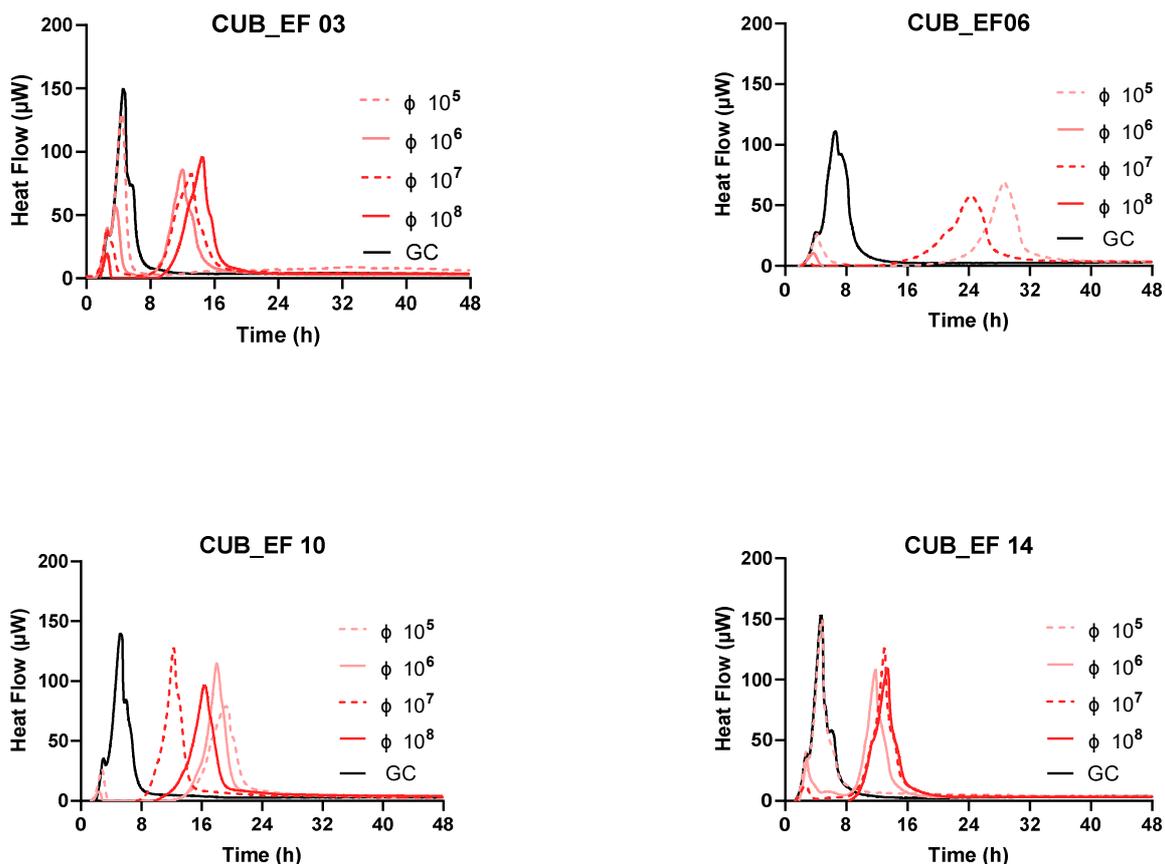


Abbildung 3. Heat Flow (in μW) von unterschiedlichen *E. faecalis*-Wirtsstämmen (A) EF 03, (B) EF 06, (C) EF 10, (D) EF 14 unbehandelt (GC) oder in Kombination mit korrespondierenden Bakteriophagen (ϕ) CUB_EF03, CUB_EF06, CUB_EF10, CUB_EF14 in unterschiedlichen Titern (10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 PFU/mL) über 48 h gemessen (*eigene Darstellung*).

3.5 Time-Killing Assay

Alle getesteten Phagen waren in der Lage, den Biofilm zu reduzieren, wobei bei CUB_EF03 und CUB_EF14 eine signifikante Reduktion beobachtet werden konnte. Die größte antimikrobielle Aktivität konnte bei CUB_EF10 verzeichnet werden. Hier erfolgte eine Abnahme der Bakterien um bis zu $3 \log_{10}$ (99,9%) nach ca. 4 h. Bei allen getesteten Phagen zeigte sich, dass der Zeitpunkt der größten bakteriellen Reduktion bei 4 bis 6 h lag und anschließend das Bakterienwachstum wieder anstieg, bis es nahezu nach 24 h dem Wert der Wachstumskontrolle entsprach. Dies wurde als Hinweis auf eine mögliche Resistenzentwicklung der Bakterien gegen den entsprechenden Phagen gewertet.

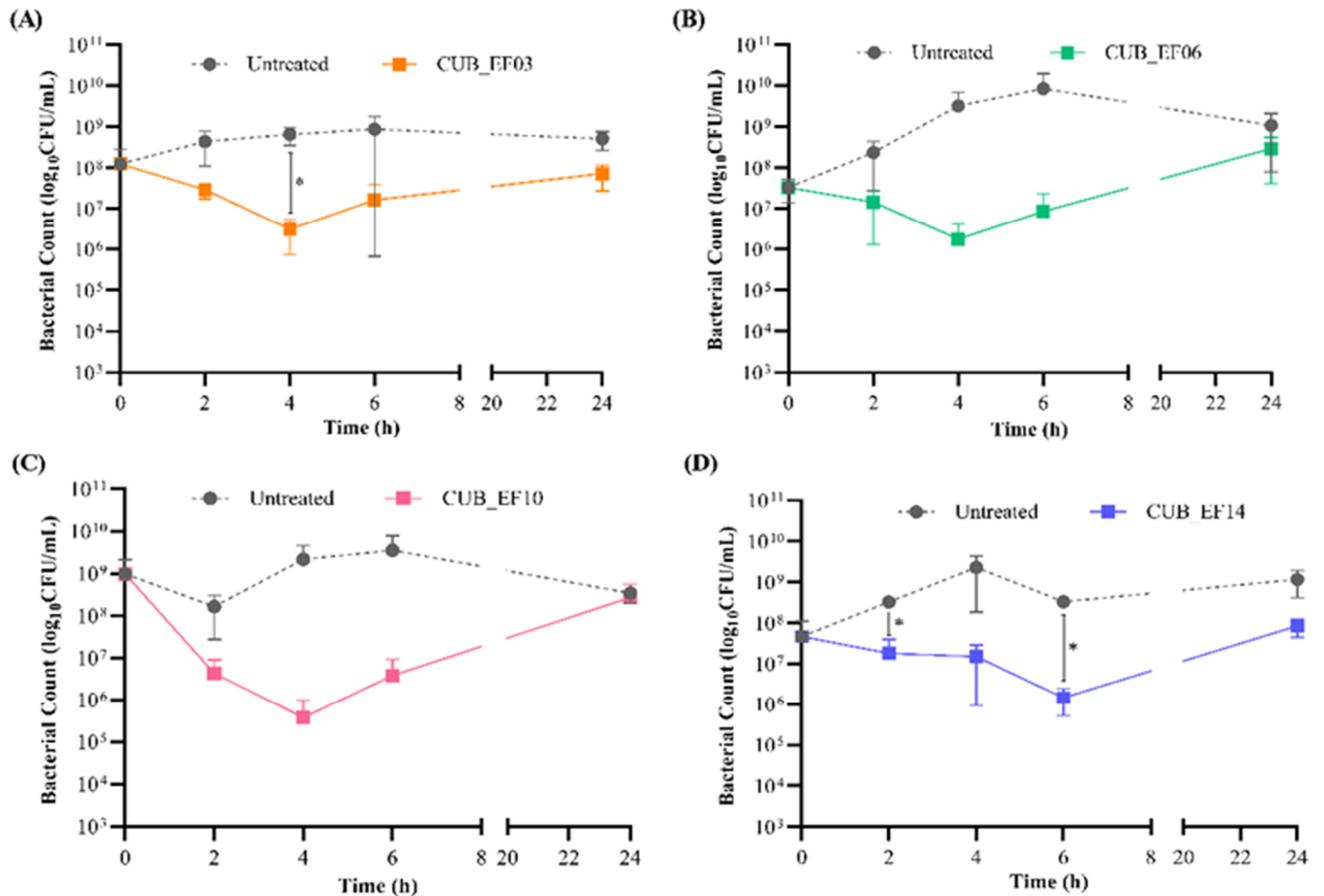


Abbildung 4. Time-Killing Assay unterschiedlicher *E. faecalis* Wirtsstämmen (A) EF 03, (B) EF 06, (C) EF 10, (D) EF 14 nach Behandlung mit dem jeweils korrespondierenden Bakteriophagen (Titer 10⁸ PFU/mL) (A) CUB_EF03, (B) CUB_EF06, (C) CUB_EF10, (D) CUB_EF14 im Vergleich zur unbehandelten Wachstumskontrolle (Untreated) mit Messungen der verbliebenen Bakterien in CFU/mL nach 2 h, 4 h, 6 h und 24 h. Mit (*) gekennzeichneten Bereiche weisen die Bereiche mit einer signifikanten Abnahme des Biofilms aus (aus Voit M, Trampuz A, Gonzalez Moreno M, 2022).

3.6 Evaluation der antimikrobiellen Aktivität von Phagen-Antibiotika Kombinationen gegen *E. faecalis* Biofilm

Die Bestimmung der MIC ergab, dass Gentamicin und Vancomycin wirksam gegen EF 03, EF 06, EF 10 und EF 14 waren und der gegen Gentamicin High-Level und Vancomycin resistente Stamm EF 04 Sensibilität gegen Fosfomycin und Daptomycin aufwies. Die antimikrobielle Wirkung von Phagen, Antibiotika und Phagen-Antibiotika-Kombinationen wurde anhand der Wärmeentwicklung der nach der Behandlung noch vorhandenen Bakterienzellen auf den Glaskugeln gemessen, die nach 24 h mit frischem Medium in das Mikrokalorimeter inseriert wurden. Die akkumulierte Wärmeentwicklung wurde über 48 h detektiert. Die Ergebnisse fasst Abbildung 5 zusammen.

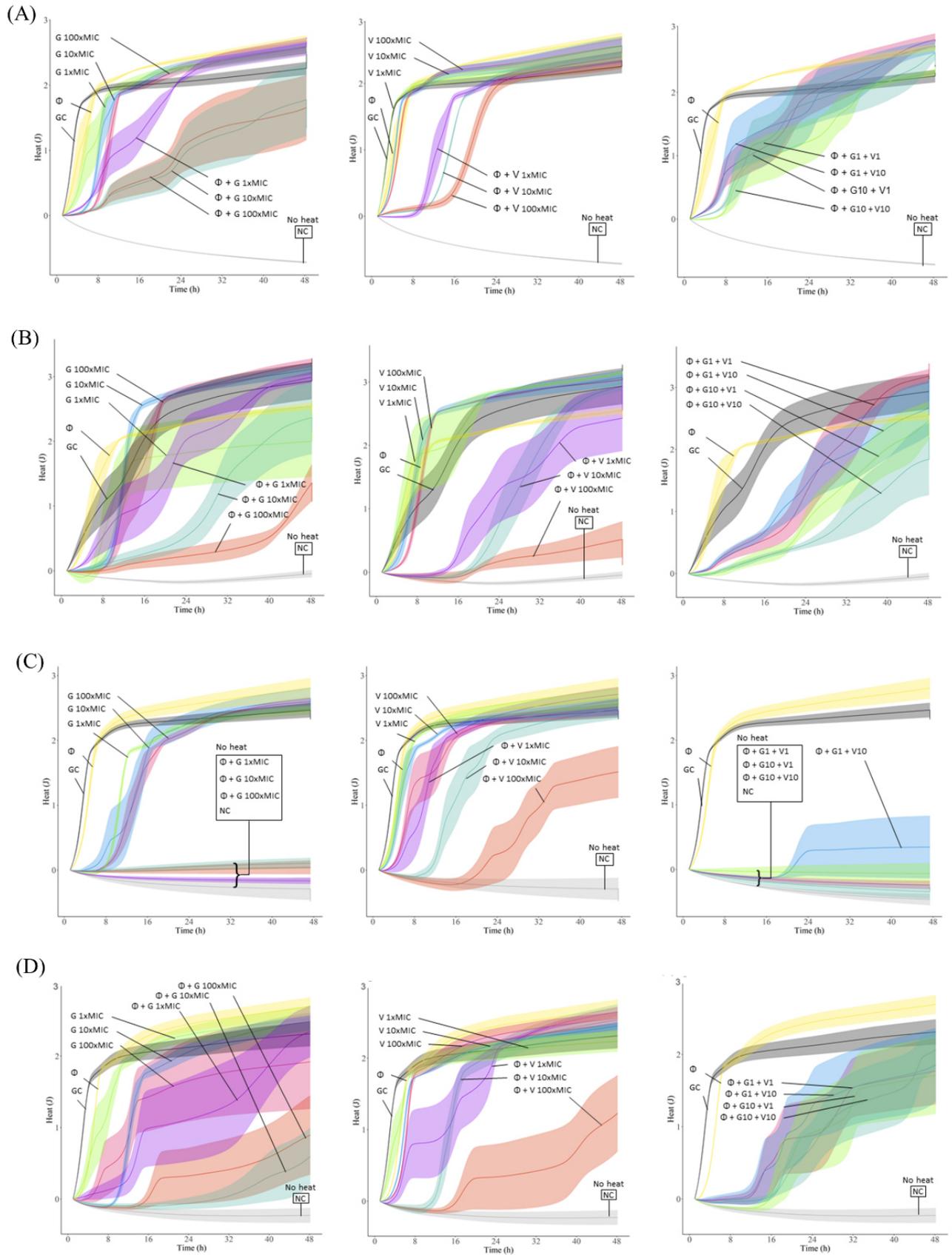


Abbildung 5. Darstellung der Wärmeentwicklung (J) von *E. faecalis* Biofilmen (A) EF 03, (B) EF 06, (C) EF 10 und (D) EF 14 nach der Behandlung mit dem jeweiligen Phagen (ϕ)

mit Titer von 10^8 PFU/mL), Gentamicin (G), Vancomycin (V) in unterschiedlichen Konzentrationen (1x MIC, 10x MIC, 100x MIC) oder nach der zeitlich gestaffelten Exposition mit Phagen-Antibiotika-Kombinationen (ϕ + Antibiotika). Jede Kurve verbildlicht, die von den nach der 24 h-Behandlung noch lebensfähigen Bakterienzellen im Biofilm produzierte, akkumulierte Wärme. GC bezeichnet die Wachstumskontrolle des jeweiligen *E. faecalis* Stamm ohne Zugabe von Phage oder Antibiotikum. NC steht für die Negativkontrolle als Nachweis für die Sterilität der Nährmedien. Die Graphen wurden mit RStudio erstellt und zeigen den Mittelwert (durchgehende Linien) \pm SE (transparente Bänder) (aus Voit M, Trampuz A, Gonzalez Moreno M, 2022).

Betrachtet man zunächst die Auswirkung auf die Wärmeentwicklung bei alleiniger Behandlung des Biofilms mit Antibiotika, zeigte sich eine anfängliche Verzögerung der Wärmekurve von bis zu 8 h bei der höchsten Konzentration (100x MIC) von Vancomycin und Gentamicin die sich aber nach 48 h dem Wert der Wachstumskontrolle (GC) ähnelte. Vergleicht man hierzu die Kurven, bei denen der Biofilm nur mit Phagen behandelt wurde, unterschieden diese sich kaum von der Wachstumskontrolle. Dies bestätigt die Ergebnisse des Time-Killing-Assays, dass die Bakterien nach einer gewissen Zeit wieder anfangen zu wachsen, was in Verbindung mit Resistenzentwicklung der Bakterien gegen die Phagen stehen könnte.

Basierend auf den Ergebnissen des Time-Killing Assays, wurden bei der Behandlung mit Phagen-Antibiotika-Kombinationen zuerst die Phagen und nach 4 h das jeweilige Antibiotikum in unterschiedlichen Konzentrationen (1x MIC, 10x MIC, 100x MIC) hinzugegeben und für weitere 20 h inkubiert.

Allgemein zeigte sich, dass alle Phagen-Antibiotika-Kombinationen ein besseres Ergebnis erzielten, als die einzelne Testung von Phagen oder Antibiotikum. Die kombinierte Exposition zeigte längere Unterdrückung der Wärmeentwicklung, eine geringere Wärmeproduktion oder sogar ein völliges Fehlen von Wärme während der gesamten Messdauer von 48 h. Vergleicht man die Wirkung von Gentamicin und Phagen mit der von Vancomycin und Phagen, zeigt sich, dass die Kombination mit Gentamicin bei allen *E. faecalis* Stämmen einen höheren antimikrobiellen Effekt erzielte, mit Ausnahme von EF 06, wo ein ähnliches Ergebnis mit beiden Antibiotika in Kombination mit Phagen erzielt werden konnte. Außerdem zeigte sich, dass vor allem bei höheren Konzentrationen von Gentamicin (10x MIC, 100x MIC) die Wärmeentwicklung für längere Zeit unterdrückt werden konnte. Im Falle von EF 10 führten alle Konzentrationen in Kombination mit den Phagen

zu einer kompletten Inhibition der Wärmeentwicklung. Dies korreliert mit dem Fehlen bakterieller Proliferation über einen Zeitraum von bis zu 48 h, was auf eine signifikante Verringerung der Biofilm-Zellzahl oder eine vollständige Ausrottung des Biofilms hindeutet. Ein weiterer experimenteller Ansatz war die Kombination von Phagen mit beiden Antibiotika in unterschiedlichen Konzentrationen, um potenziell positive oder negative Wechselwirkungen zwischen den Antibiotika und den Phagen zu ermitteln. Im Ergebnis wurden meist negative oder keine Wechselwirkungen für die kombinierte antibiotische Aktivität nachgewiesen. Für die Stämme EF 03, EF 10 und EF 14 zeigte sich beispielsweise, dass die Kombination ausschließlich Phage und Gentamicin eine stärkere Unterdrückung der Wärmeentwicklung erzielte, als wenn Phagen und Gentamicin zusätzlich mit Vancomycin kombiniert wurden. Nur im Fall von EF 06 zeigte sich die Kombination Phage und beider Antibiotika mit einem Titer von 10x MIC überlegen gegenüber der Einzelkombination Phage und Gentamicin bei gleicher Konzentration (10x MIC).

3.7 Evaluation der antimikrobiellen Aktivität von Phagen-Antibiotika Kombinationen gegen einen Vancomycin und Gentamicin High-Level resistenten *E. faecalis* Biofilm

Ähnlich wie bei den im Abschnitt 3.6 beschriebenen Versuchen wurden verschiedene Antibiotika in Kombination mit Phagen gegen *E. faecalis* Biofilm getestet. Da es sich bei dem Stamm EF 04 um einen gegen Vancomycin und Gentamicin resistenten Stamm handelte, wurden hier die Antibiotika Daptomycin und Fosfomycin verwendet, die sich bei der Bestimmung der MIC als wirksam erwiesen. In Abbildung 6 werden die Resultate zusammengefasst dargestellt.

Bei der alleinigen Gabe von Daptomycin konnte eine dosisabhängige Wirkung verzeichnet werden. Je höher die Konzentration von Daptomycin, desto länger wurde die Wärmeentwicklung unterdrückt, bei der Konzentration von 100x MIC bis zu 16 h. Im Vergleich dazu, wurde bei Fosfomycin, unabhängig von der verabreichten Dosis, eine ähnliche Aktivität beobachtet, die der Wachstumskontrolle (GC) glich. Wurden die Proben nur mit Phagen behandelt, konnte eine leichte Verzögerung um bis zu drei Stunden beobachtet werden. Betrachtet man nun die Ergebnisse der kombinierten Anwendung von CUB_EF04 und Daptomycin, zeigt sich bei allen Konzentrationen eine erhöhte antimikrobielle Wirkung. Das beste Ergebnis erzielte die Kombination CUB_EF04 mit Daptomycin 100x MIC. Hierbei konnte eine Unterdrückung der Wärmeproduktion von bis zu 34 h

erreicht werden. Zusätzlich wurde eine insgesamt geringere Hitzeentwicklung während der gesamten Überwachungszeit (48 h) im Vergleich zur Wachstumskontrolle vermerkt werden. Bei der alleinigen Gabe von Vancomycin wurde bei der höchsten Konzentration von 100x MIC als einziges eine Unterdrückung der Wärmeproduktion von bis zu drei Stunden beobachtet. Geringere Konzentrationen (1x MIC, 10x MIC) waren nahezu identisch mit der Wachstumskontrolle (GC). Auch die alleinige Behandlung mit den Phagen erzielte eine Wärmesuppression von ungefähr 3 h. Auch hier gab es eine Verbesserung der antimikrobiellen Aktivität, wenn Phagen mit Antibiotika kombiniert wurden. Der Einsatz von Phagen in Kombination mit Fosfomycin in der Konzentration 100x MIC erzielte eine Verzögerung der Wärmeentwicklung von bis zu 6 h.

Auch in diesem Versuch wurden anschließend beide Antibiotika mit den Phagen kombiniert, um eventuelle Wechselwirkungen zwischen Phagen und Antibiotikum zu ermitteln. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass bei der Kombination beider Antibiotika mit Phagen keine wesentlichen Änderungen der antimikrobiellen Wirksamkeit festgestellt werden konnte. Allein bei der Kombination beider Antibiotika mit einer Konzentration von der 10-fachen MIC mit den Phagen, wurde eine geringfügig längere Wärmesuppression von ca. 12 h und eine insgesamt verringerte Wärmeproduktion beobachtet.

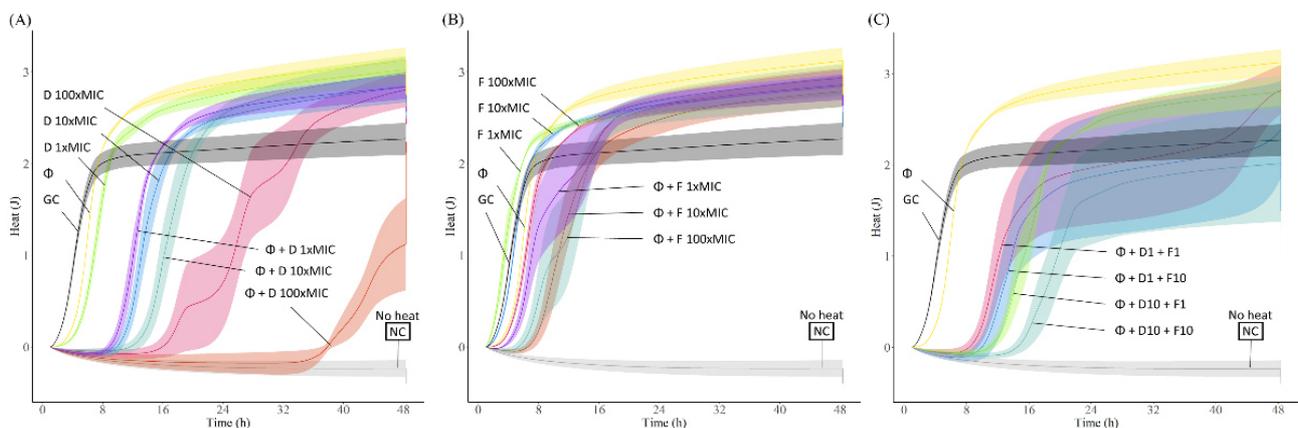


Abbildung 6. Darstellung der Wärmeentwicklung (J) von *E. faecalis* Biofilmen EF 04 nach Behandlung mit Phagen CUB_EF04 (mit Titer 10^8 PFU/mL), Daptomycin (D), Fosfomycin (F) in unterschiedlichen Konzentrationen (1x MIC, 10x MIC, 100x MIC) oder nach der zeitlich gestaffelten Exposition mit Phagen-Antibiotika-Kombinationen (ϕ + Antibiotika). Jede Kurve verbildlicht, die von den nach der 24 h- Behandlung noch lebensfähigen Bakterienzellen im Biofilm produzierte akkumulierte Wärme. GC bezeichnet die Wachs-

tumskontrolle des jeweiligen *E. faecalis* Stamm ohne Zugabe von Phage oder Antibiotikum. NC steht für die Negativkontrolle als Nachweis für die Sterilität der Nährmedien. Die Graphen wurden mit RStudio erstellt und zeigen den Mittelwert (durchgehende Linien) \pm SE (transparente Bänder) (aus Voit M, Trampuz A, Gonzalez Moreno M, 2022).

3.8 Evaluation von bakterieller Resistenzentwicklungen gegen Bakteriophagen

Zur Überprüfung der Annahme, dass der Anstieg der Wärmeentwicklung in den im Abschnitt 3.6 dargestellten Ergebnissen durch bakterielle Resistenzentwicklung gegen die Phagen verursacht sein könnte, wurden von den Stämmen EF 10 und EF 14 (PS) nach 48 h Co-Inkubation mit den Phagen CUB_EF10 und CUB_EF14, einzelne Kolonien (CV) gewonnen und erneut in einem Top-Agar Overlay Spot Assay die Empfindlichkeit der Ausgangsphagen (CUB_EF10 und CUB_EF14) gegen die Kolonievarianten (EF 10 CV und EF14 CV) überprüft. In einem weiteren Schritt wurden auch CUB_EF03 und CUB_EF06 mit den Kolonievarianten getestet, um festzustellen, ob hier ebenfalls Veränderung der Phagen-Sensibilität zu beobachten waren. Es wurden in diesem Versuchsaufbau nur Phagen mit Siphovirus-Morphologie mit einbezogen, um mögliche Veränderungen in der Anfälligkeit von Bakterienstämmen zu bewerten, die mit einem Phagen mit Siphovirus-Morphologie behandelt wurden, um mögliche Kreuzresistenzen zwischen Phagen mit verwandten Taxonomien zu ermitteln.

Die Auswertung des Top-Agar Overlay Spot Assays (Abbildung 7) zeigt eindeutig, dass die Phagen CUB_EF10 und CUB_EF14 eine Lyse bei ihren Wirtsstämmen EF 10 und EF 14 (EF 10 PS und EF 14 PS) auslösen. Im Vergleich dazu, bleibt die Agarplatte bei der jeweiligen Kolonievariante EF 10 CV und EF 14 CV trüb, woraus sich schließen lässt, dass die Bakterien innerhalb von 48 h eine Resistenz gegen die Phagen entwickelt haben. Weiterhin fiel auf, dass bei der Kombination von CUB_EF10 mit EF 14 PS eine trübe Zone sichtbar war, die auf eine sehr geringe Phagen-Aktivität schließen ließ, jedoch bei der Kombination mit der Kolonievariante EF 14 CV eine deutliche und klare Lyse-Aktivität zu verzeichnen war. Offenbar führte die Entwicklung einer Resistenz von EF 14 PS gegenüber dem Phagen CUB_EF14 zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber dem Phagen CUB_EF10. Im Gegensatz dazu konnte bei keinem der getesteten Stämme (PS und CV) Veränderungen in der Anfälligkeit gegenüber CUB_EF03 und CUB_EF06 vermerkt werden.

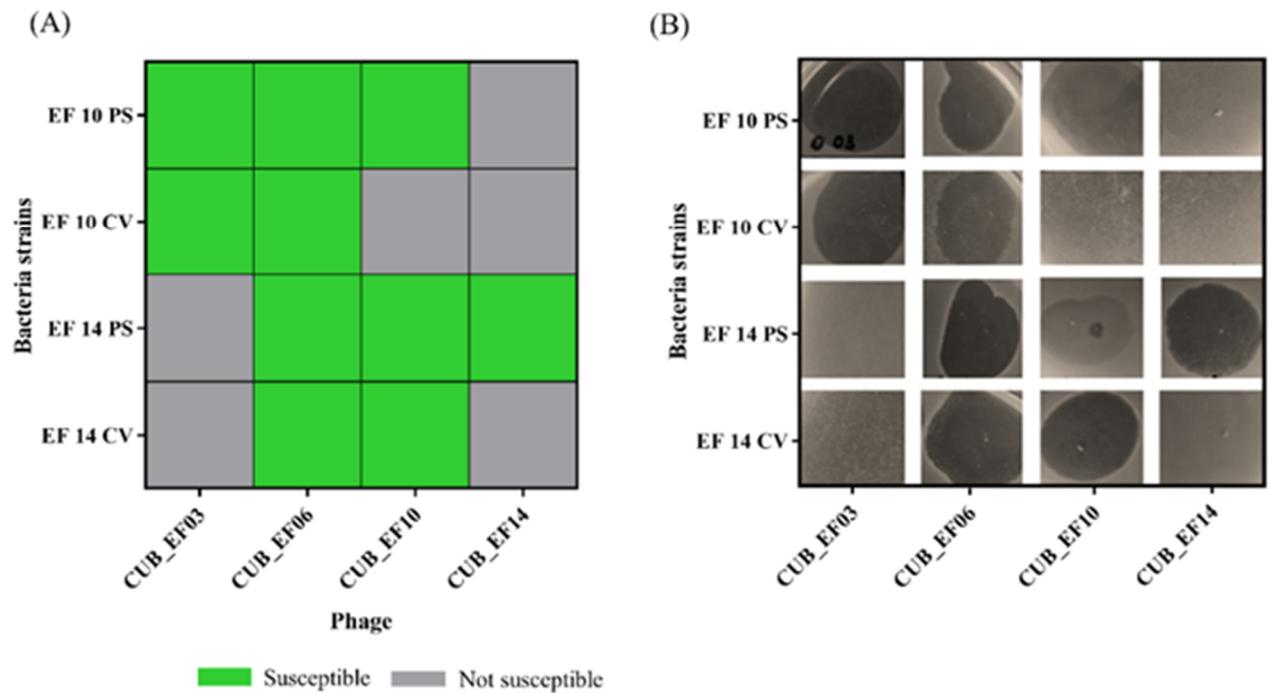


Abbildung 7. (A) Heat-Map der Anfälligkeit der *E. faecalis* Ausgangsstämme (PS- Parental Strain) und der nach 48 h Mikrokalorimetrie isolierten Kolonievarianten (CV- Colony Variants) EF 10 und EF 14 gegenüber den Bakteriophagen CUB_EF03, CUB_EF06, CUB_EF10 und CUB_EF14. (B) Repräsentative Bilder von Top-Agar-Overlay-Spot-Tests (aus Voit M, Trampuz A, Gonzalez Moreno M, 2022).

4. Diskussion

4.1 Beurteilung der Methodik

In der vorgelegten Arbeit wurden insgesamt 16 *E. faecalis* Stämme verwendet, um verschiedene Abwasserproben auf Phagen zu screenen. Die ausgewählten Stämme setzten sich aus 14 klinischen *E. faecalis* Stämmen, darunter auch zwei resistente Stämme (VRE), und zwei ATCC Stämmen zusammen. In vergleichbaren Studien war die Anzahl und Diversität der getesteten Phagen und der verwendeten *E. faecalis*-Stämme stets geringer (30, 31, 35). Bei der Isolation, Produktion und Titration der Phagen handelte es sich um eine bereits etablierte Methodik, die es ermöglichte, viele Abwasserproben in kurzer Zeit auf Phagen gegen *E. faecalis* zu untersuchen (36, 37). Anfängliche Versuche, Phagen aus dem CVK Abwasser, Flusswasser (Entnahmestelle Spree, Behala Westhafen, Berlin), aus Schweinedung oder Resten von Küchenschwämmen scheiterten (38). Nach dem Vorbild Félix d'Hérelles, der einen an Ruhr erkrankten Patienten 1917 erfolgreich mit Phagen therapierte und dem damit die erste erfolgreiche klinische Anwendung von Phagen zugeschrieben wird (25), wurden auch Abwasserproben aus dem Klärwerk Ruhleben (Berlin) und Rudow (Berlin) untersucht. Bei den Proben wurden die Abwässer gesammelt, die noch nicht im Klärbecken aufbereitet worden waren und menschlichen Stuhl enthielten. Aus diesen Abwasserproben konnten insgesamt 11 Phagen isoliert werden, die sich in der Plaque-Morphologie und ihrer Host Range unterschieden. Für die vorliegende Studie wurden fünf Phagen mit unterschiedlichen Charakteristika ausgewählt, die sich in hohen Titern von bis zu 10^{10} PFU/mL produzieren ließen und die durch klare und große Plaque-Bildung auffielen. Außerdem war es von hoher Priorität, einen Phagen gegen die Vancomycin und High-Level Gentamicin resistenten Stämme EF 04 und EF 05 zu finden, was in unserem Fall nur für EF 04 gelang.

Um die ausgewählten Phagen (CUB_EF03, CUB_EF04, CUB_EF06, CUB_EF10, CUB_EF14) weiter zu charakterisieren und visualisieren, wurde TEM verwendet, die bereits in vorhandenen Publikationen (39, 40) gute Ergebnisse erzielte. ImageJ erwies sich hier als nützliches Open Access Tool, um die Phagen zu vermessen und um die Unterschiede von CUB_EF03, CUB_EF06, CUB_EF10 und CUB_EF14 unter den Phagen mit Siphovirus-Morphologie weiter zu qualifizieren. Um erste Aussagen über die Anti-Biofilmaktivität treffen zu können, wurde ein Time-Killing Assay erstellt. Es handelt sich bei diesem, in der Pharmazie gängigen Versuch (34), um ein ebenfalls etabliertes Verfahren,

mit dem die Kinetik von antimikrobiellen Phagen gegen unterschiedliche Bakterienstämme getestet wurde. Hierbei ist eine bakterizide Wirkung der getesteten antimikrobiellen Substanz als eine Reduktion von vorhandenen Bakterienzellen (in CFU/mL) um 3 \log_{10} definiert, die gleichgesetzt wird mit einer Reduktion des Inokulums um 99,9% (34). Außerdem lieferte dieser Versuch erste Hinweise auf eine mögliche Resistenzbildung der Bakterien gegen die Phagen, die uns veranlassten, Phagen mit weiteren antimikrobiellen Substanzen zu kombinieren. Die verbesserte Anti-Biofilmaktivität der Phagen in Kombination mit Antibiotika geht bereits aus der Literatur hervor (41) und zum Zeitpunkt dieser Arbeit lagen keinerlei Daten über die antimikrobielle Wirksamkeit von Phagen in Kombination mit Vancomycin, Gentamicin, Daptomycin und Fosfomycin gegen *E. faecalis*-Biofilme vor. Die Quantifizierung dieser Wirksamkeit konnte mit der isothermalen Mikrokolorimetrie aufgezeigt werden. Auch diese Methodik ist in der Pharmazie vertreten und wird unter anderem für Kompatibilitäts- und Stabilitätstests neuer Medikamente verwendet. Mithilfe der Mikrokolorimetrie können kleinste Mengen von Wärme gemessen werden (μ W-Bereich). Außerdem besitzt sie den Vorteil, dass sie eine hohe Sensitivität aufweist und die Messungen über lange Zeiträume verlässlich möglich sind. Zusätzlich handelt es sich, im Gegenteil zu vielen Staining- und Mikroskopietechniken, um keine destruktive Methode, metabolische Prozesse von Biofilmen zu visualisieren. Die Literatur zeigt, dass sich die isothermale Mikrokolorimetrie bereits auf dem Gebiet der Phagenforschung etabliert hat. Poröse Glaskugeln erwiesen sich als einfache und kostengünstige Möglichkeit, um Biofilm zu züchten und *in vitro* mit antimikrobiellen Substanzen zu behandeln und anschließend das Wachstum in frischem Nährmedium in Ampullen von den überlebenden Bakterienzellen anhand der Wärmeentwicklung mit dem Mikrokolorimeter zu messen. Daraus ließ sich der Erfolg der jeweiligen antimikrobiellen Behandlung ableiten (42, 43). Man muss allerdings bedenken, dass es sich hier um eine indirekte Messung handelte, da nur die Wärmeentwicklung der überlebenden Bakterienzellen detektiert werden konnte, unabhängig davon, ob es sich bei den überlebenden Zellen um planktonische Zellen oder Biofilm handelte, was als großer Nachteil dieser Methodik gewertet werden muss. Hier lässt sich diskutieren, ob es für weitere Versuche sinnvoll ist, ein sogenanntes „Flow-Through-System“ (44) zu verwenden. Bei diesen Systemen ist es möglich, Nährmedien oder Pufferlösungen in das Kalorimeter zu schleusen, um zum Beispiel planktonische Bakterienzellen aus der Versuchskammer auszuspülen. Ein weiterer Vorteil wäre hier, dass eine Echtzeitmessung der gestaffelten Behandlung von Phagen mit Antibiotika möglich wäre. Um eventuelle Resistenzbildung der Wirtsstämme gegen die verwendeten

Phagen zu untersuchen, wurde erneut die Technik des Top-Agar Overlay Spot Assays verwendet. Die Phagen CUB_EF10 und CUB_EF14 wurden auf eine Agarplatte mit dem korrespondierenden Wirtsstamm vor der Mikrokalorimetrie (EF 10 und EF 14) und auf den veränderten Wirtsstamm (CV EF 10 und CV EF 14), der sich nach 48 h Mikrokalorimetrie gebildet hatte, gespottet. Dies war in unserem Fall eine schnelle und einfache Methode, um ausgewählte Stämme nach der Mikrokalorimetrie auf Resistenzbildung zu überprüfen. Jedoch gibt sie keinen Aufschluss darüber, welcher Resistenzmechanismus sich dahinter verbirgt. Eine Genanalyse könnte wertvolle Informationen liefern, ob es sich hierbei um die Mutation von Rezeptoren handelt, die es dem Phagen nicht mehr ermöglichen, an den Wirtsstamm anzudocken, um die eigene Geninformation zu injizieren.

4.2 Ergebnisse der Host-Range Analyse

Die Ergebnisse der Host-Range Analyse gaben ersten Aufschluss über das antimikrobielle Profil der isolierten Phagen. Insgesamt konnten 11 Phagen aus unterschiedlichen Abwasserproben isoliert werden. Um sicherzustellen, dass es sich hierbei um unterschiedliche lytische Phagen handelte, wurden jene ausgewählt, welche sich in ihrer Host Range unterschieden und bei denen eine ausgeprägte, klare Lyse beim Top-Agar Overlay Spot Test Assay zu sehen war. Ein weiteres wichtiges Auswahlkriterium war bei CUB_EF10, dass eine stark ausgeprägte Halo-Struktur erkennbar war. Wie in der Literatur beschrieben steht (45, 46), ist die Bildung eines Halos der Hinweis auf Enzyme, die die extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) der Biofilmmatrix zerstören können. Die EPS bilden eine schützende Zone, die von den Bakterien des Biofilms produziert wird und aus unterschiedlichen Anteilen, wie beispielsweise Proteinen, Lipopolysacchariden und extrazellulärer DNA besteht (47). Um nähere Informationen über das Genom und die darin verschlüsselten Proteine zu erhalten, wäre eine Sequenzierung der ausgewählten Phagen eine sinnvolle Ergänzung zu der Host-Range gewesen.

4.3 Ergebnisse des Time-Killing Assays

Für das Time-Killing Assay wurde Biofilm für 24 h auf porösen Glaskugeln gezüchtet. Im Vergleich zum Wurzelkanal, stellte dies einen stark vereinfachten Versuchsaufbau dar, der aber die Möglichkeit bot, mit normierten Materialien zu arbeiten, die reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse erzielten. Auch die Verwendung eines Monobiofilms, der über 24 h gewachsen war, muss kritisch betrachtet werden. Intraradikuläre Biofilme sind polymikrobieller Natur (48) und entwickeln sich bei asymptomatischem Krankheitsbild über längere Zeiträume, da sie meist Zufallsbefunde beim Zahnarzt sind. Trotzdem ließen die Ergebnisse der Time-Killing Analyse Rückschlüsse auf Resistenzbildung zu. Bei allen getesteten Phagen zeigte sich, dass es nach ca. 4 h zu einem erneuten Anstieg des Bakterienwachstums kam. Dies lieferte die Grundlage für die zeitabhängige Exposition von Phagen für 4 h und der anschließenden Behandlung mit Antibiotika. Weiterhin muss beachtet werden, dass alle Biofilme eine hohe Konzentration von ca. 10^8 CFU/mL hatten, die nicht vergleichbar mit Biofilmen im Wurzelkanal sind, da durch die maschinelle Aufbereitung und chemische Desinfektion bereits eine Reduktion erfolgt. Die vorgelegte Arbeit schafft somit eine Grundlage für weitere Studien, um die Ergebnisse auf ein In-vitro-Modell zu übertragen, welches eher der Komplexität eines Wurzelkanals entspricht. Hierfür könnten bereits in der Literatur erwähnte Modelle (49) Anwendung finden.

4.4 Ergebnisse der isothermalen Mikrokolorimetrie

Um die Ergebnisse des Time-Killing Assays zu quantifizieren, wurde die isothermale Mikrokolorimetrie verwendet. Darüber hinaus wurden in diesem Versuch Phagen mit verschiedenen Antibiotika kombiniert, um einen besseren antimikrobiellen Effekt zu erzielen und zu evaluieren, ob es bei der Kombination von antimikrobiellen Substanzen (Phage + Antibiotikum) ebenfalls zu Resistenzbildung der Bakterien kommen kann. Für diesen Versuch wurden wieder normierte poröse Glaskugeln verwendet, die eine standardisierte und reproduzierbare Messung ermöglichten, wie bereits im Abschnitt 4.3 beschrieben wurde. Trotzdem zeigt die Auswertung der Messkurven teilweise große Abweichungen bei dem Standardfehler. Der Versuch wurde für jeden Stamm (EF 03, EF 04, EF 06, EF 10, EF 14) in zwei unabhängigen Versuchen in Duplikaten durchgeführt. Um eine höhere statistische Aussagekraft zu erhalten, müsste man die Versuche öfter wiederholen. Auch wurde nur über einen Zeitraum von 48 h gemessen. Eine längere Messzeit von 72 h hätte noch mehr Aufschluss über den erneuten Anstieg von bakteriellem Wachstum geben

können. Dennoch lassen sich grundsätzliche Aussagen treffen, die durch die Probenanzahl der 5 unterschiedlichen *E. faecalis*-Stämme Relevanz haben. Die Mikrokalorimetrie zeigt ebenfalls, dass es zu Resistenzbildungen gegen Phagen kommen kann, allein oder in Kombination mit Antibiotika. Sie zeigt aber auch, dass die Kombination von Phagen mit Antibiotika bei allen 5 Stämmen zu einer verbesserten antimikrobiellen Aktivität führte, die sich in einer Reduktion oder Verzögerung der Wärmeentwicklung zeigte. Dieser verbesserte antimikrobielle Effekt wurde ebenfalls durch weitere Studien bestätigt (39, 41). Bei einem Stamm (EF 10) wurde eine komplette Suppression der Wärmeproduktion bei der Kombination CUB_EF10 und Gentamicin bei allen Konzentrationen (1xMIC, 10xMIC, 100xMIC) beobachtet, die mit einer Abtötung des Biofilms interpretiert wurde.

4.5 Beurteilung der bakteriellen Resistenzbildung gegen Bakteriophagen

Bei nahezu allen Versuchen kam es nach einer gewissen Zeit zu einem erneuten Anstieg des bakteriellen Wachstums. Eine Ausnahme stellte EF 10 in Kombination mit Phagen und Gentamicin, selbst bei der niedrigsten Konzentration (1x MIC), in Versuch 3.7 dar. Dieser erneute Anstieg des Wachstums wurde als Resistenzbildung der Bakterien gegen die Phagen interpretiert. Auch in der Literatur lassen sich diverse Hinweise auf Resistenzbildung gegen Phagen finden (50-52). Um diesen Verdacht zu bestätigen, wurden die Stämme EF 10 und EF 14 (die für 48 h den Phagen CUB_EF10 und CUB_EF14 ausgesetzt waren) nach der Mikrokalorimetrie aus den Glasampullen isoliert und erneut plattiert, kultiviert und in einem Top-Agar Overlay Spot Test mit den Phagen CUB_EF03, CUB_EF06, CUB_EF10 und CUB_EF14 kombiniert. Die Ergebnisse bestätigten, dass Phage CUB_EF10 und CUB_EF14 keine Lyse mehr bei den mutierten Stämmen CV EF 10 und CV EF 14 erzeugten. Dafür konnte aber eine deutlich gesteigerte Lyse-Aktivität mit CUB_EF10 bei CV EF 14 beobachtet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Versuch nur mit zwei Stämmen durchgeführt und lässt daher keine validierte Aussage zu, ob die Resistenzbildung gegen einen Phagen immer zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber einem anderen Phagen führt. Weiterhin haben wir nur Phagen mit Siphovirus-Morphologie getestet, um eventuelle Kreuzresistenzen zu ermitteln. Es lassen sich also keine Aussagen darüber treffen, ob eine Kombination von Phagen mit Podovirus-Morphologie (CUB_EF04) und Phagen mit Siphovirus-Morphologie (CUB_EF03, CUB_EF06, CUB_EF10, CUB_EF14) sich positiv auf den antimikrobiellen Effekt ausgewirkt hätte. Vergleicht man unsere Ergebnisse mit der Literatur

(53, 54), zeigt sich, dass die Kombination verschiedener Phagen (sogenannte Phagen-Cocktails) einer Resistenzbildung entgegenwirken können. Ein wichtiger Faktor der Resistenzbildung gegen Phagen scheint die Mutation von Rezeptoren zu sein, an denen die Phagen an den Wirtstamm binden. Untersuchungen zeigen, dass bei *E. faecalis* die Mutation des Membranproteins PIP und das Polysaccharid Antigen Epa eine wichtige Rolle spielen (55, 56). Die geeignete Kombination von unterschiedlichen Phagen stellt also eine Herausforderung für weiterführende Studien gegen *E. faecalis*-Biofilme dar.

4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Phagen gegen *E. faecalis* können einfach und kostengünstig isoliert und in hohen Titern hergestellt werden. Bei insgesamt 11 von 16 Stämmen war es möglich, Phagen zu finden, bei denen beim Top-Agar Overlay Spot Test Lyse-Aktivität zu beobachten war. Darunter auch ein Vancomycin und Gentamicin High-Level resistenter *E. faecalis*-Stamm. Bei vier ausgewählten Phagen mit Siphovirus-Morphologie wurde in einem Time-Killing Assay die Anti-Biofilmaktivität überprüft. Es zeigt sich bei allen Stämmen eine ausgeprägte Biofilmreduktion, die im Fall von zwei Stämmen signifikant war. Jedoch konnte in allen Fällen ab ca. 4 h ein erneuter Anstieg der bakteriellen Konzentration nachgewiesen werden, der nach 24 h fast der Konzentration der Wachstumskontrolle glich. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde mit der isothermalen Mikrokalorimetrie der Biofilm nun mit einer Kombination von Phagen und Antibiotika behandelt, wobei die Applikation gestaffelt stattfand. Zuerst erfolgte die Exposition des Biofilms mit Phagen und nach 4 h wurde das jeweilige Antibiotikum hinzugefügt. Die Resultate zeigten, dass die Kombination Phage mit Antibiotika immer einen besseren antimikrobiellen Effekt erzielte, es aber auch hier nach einer gewissen Zeit zu einem erneuten Wachstum der Bakterien kam. Nur in einem Fall gelang es, den Biofilm komplett zu zerstören. Das erneute Wachstum von Bakterien wurde als Resistenzbildung gewertet. Die Ergebnisse der Evaluation der Resistenzbildung gegen die verwendeten Phagen bestätigten den Verdacht, zeigten aber auch, dass die Resistenzbildung gegen einen Phagen die Empfindlichkeit gegenüber einem anderen Phagen fördern kann (57).

4.7 Implikation für Praxis und Forschung

Bevor es zu einer praktischen Anwendung in der Endodontie kommen kann, muss geklärt werden, welche Rolle die Resistenzbildung gegen Phagen in der Behandlung spielt. Es liegen Studien vor, in denen die Anwendung von Phagen in einem Wurzelkanalmodell unter anderem in Kombination mit verschiedenen endodontischen Spüllösungen (NaOCl, EDTA) untersucht wird. Beide Studien kommen zu dem Ergebnis, dass durch die Phagentherapie *E. faecalis* im Wurzelkanal signifikant reduziert wird (30, 31). Jedoch steht derzeit noch der Beweis aus, ob diese Resistenzbildung eine apikale Ausheilung beeinflusst, obwohl der Biofilm ausreichend reduziert wurde und durch eine hermetische Versiegelung des Kanals das Eindringen von neuem Substrat verhindert werden kann. Ebenfalls fehlen Untersuchungen, die den zeitabhängigen Aspekt der Phagenresistenz untersuchen. Die Ergebnisse des Time-Killing Assays haben gezeigt, dass nach ca. 4 h die bakterielle Konzentration erneut ansteigt. Daraus ließe sich eine Einwirkzeit im Wurzelkanal ableiten, die der konservativen endodontischen Behandlung vorausgeht. Obwohl Phagen als eine lohnende Ergänzung zu dem bereits bestehenden endodontischen Behandlungsspektrum erscheinen, ist eine Behandlung derzeit noch sehr aufwendig.

E. faecalis-Stämme müssen aus dem Zahn isoliert und kultiviert werden. Sollte keine Phagenbank bestehen, ist es notwendig, Wasserproben auf passende Phagen zu screenen, die dann im Labor produziert werden müssen, bevor es zu einer Anwendung im Wurzelkanal kommen kann. Es handelt sich also um eine aufwendige Individualtherapie, die vorerst nicht für den alltäglichen Gebrauch in der Zahnarztpraxis passend erscheint. Dennoch gibt es Patienten, bei denen eine Extraktion kontraindiziert oder mit Risiken behaftet ist, wie zum Beispiel Patienten mit akuter Leukämie, schwerer Herzinsuffizienz, nach Radiatio und Chemotherapie oder Patienten mit Bisphosphonat-Therapie (58-60). Diese Patienten könnten von einem Einsatz der Phagentherapie in der Endodontie profitieren. Gelingt es, einen Phagen-Cocktail zu konzipieren, der ein weites Wirkspektrum aufweist, könnte dies als prophylaktische Maßnahme bei persistierenden Entzündungen in der Zahnarztpraxis zum Einsatz kommen.

5. Schlussfolgerungen

Phagen stellen zur Bekämpfung von Biofilmen eine nennenswerte Alternative zu anderen antimikrobiellen Substanzen, wie zum Beispiel Antibiotika, dar. Im Gegensatz zu systemischen Anwendungen in der Medizin, ist die lokale Anwendung von Phagen in der Endodontie nahezu unerforscht. Studien über einen klinischen Einsatz am Patienten gibt es keine. In unseren Experimenten hat sich gezeigt, dass es möglich ist, eine große Bandbreite an neuen Phagen gegen diverse *E. faecalis*-Stämme zu isolieren und sie ebenfalls für die Eliminierung gegen *E. faecalis*-Biofilme zu verwenden. Jedoch zeigte sich auch, dass es bei dem Einsatz von Phagen, wie bei der Verwendung von Antibiotika, zu Resistenzentwicklungen der Bakterien kommen kann. Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.8 legen jedoch nahe, dass ein Einsatz von Phagen-Cocktails sinnvoll sein kann, um Resistenzentwicklungen entgegenzuwirken. Weiterhin haben wir mittels der isothermalen Mikrokalorimetrie bewiesen, dass es bei einer Kombination von Phagen mit Antibiotika zu einer verbesserten antimikrobiellen Wirkung gegen *E. faecalis*-Biofilmen kommen kann, die in manchen Fällen den Biofilm sogar komplett zerstörte. Betrachtet man den alarmierenden Anstieg von antibiotikaresistenten Bakterien, ist es im Falle des vancomycinresistenten (VRE) Stamm EF04 ein vielversprechender Ansatz, Phagen mit Antibiotika zu kombinieren, um bei einem klinischen Einsatz die Dosis des Antibiotikums zu reduzieren und multiresistenten Keimen entgegenzuwirken. Bevor es zu einer praktischen Anwendung in der Endodontie kommen kann, sind weitere Grundlagenstudien notwendig. Dennoch haben Phagen hier großes Potential, nicht erhaltungswürdige Zähne mit persistierenden intraradikulären Entzündungen zu therapieren.

Literaturverzeichnis

1. Möller AJ, Fabricius L, Dahlén G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res.* 1981;89(6):475-84.
2. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germfree and conventional laboratory rats. *J South Calif Dent Assoc.* 1966;34(9):449-51.
3. Love RM. Bacterial penetration of the root canal of intact incisor teeth after a simulated traumatic injury. *Endod Dent Traumatol.* 1996;12(6):289-93.
4. Gomes BP, Berber VB, Kokaras AS, Chen T, Paster BJ. Microbiomes of Endodontic-Periodontal Lesions before and after Chemomechanical Preparation. *J Endod.* 2015;41(12):1975-84.
5. De Moor R, Hülsmann M, Kirkevang L-L, Tanalp J, Whitworth J. Undergraduate Curriculum Guidelines for Endodontology. *International Endodontic Journal.* 2013;46(12):1105-14.
6. Ricucci D, Loghin S, Siqueira JF, Jr. Exuberant Biofilm infection in a lateral canal as the cause of short-term endodontic treatment failure: report of a case. *J Endod.* 2013;39(5):712-8.
7. Vieira AR, Siqueira JF, Jr., Ricucci D, Lopes WS. Dentinal tubule infection as the cause of recurrent disease and late endodontic treatment failure: a case report. *J Endod.* 2012;38(2):250-4.
8. Vire DE. Failure of endodontically treated teeth: classification and evaluation. *J Endod.* 1991;17(7):338-42.
9. Hülsmann M. Epidemiology of post-treatment disease. *Endodontic Topics.* 2016;34(1):42-63.
10. Nehme F, Gitau J, Liu J. Purulent pericarditis as a complication of bacteraemic *Enterococcus faecalis* urinary tract infection. *BMJ Case Rep.* 2017;2017.
11. Lin DP, Wada S, Jimenez-Lucho VE. *Enterococcus faecalis* endocarditis presenting as meningitis. *Infection.* 1998;26(5):304-5.
12. Ehrlich GD, Hu FZ, Sotereanos N, Sewicke J, Parvizi J, Nara PL, Arciola CR. What role do periodontal pathogens play in osteoarthritis and periprosthetic joint infections of the knee? *J Appl Biomater Funct Mater.* 2014;12(1):13-20.
13. Werner G, Coque TM, Hammerum AM, Hope R, Hryniewicz W, Johnson A, Klare I, Kristinsson KG, Leclercq R, Lester CH, Lillie M, Novais C, Olsson-Liljequist B, Peixe LV, Sadowy E, Simonsen GS, Top J, Vuopio-Varkila J, Willems RJ, Witte W, Woodford N. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveill.* 2008;13(47).
14. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.* 2006;32(2):93-8.
15. Rôças IN, Siqueira JF, Jr., Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod.* 2004;30(5):315-20.
16. Chivatxaranukul P, Dashper SG, Messer HH. Dentinal tubule invasion and adherence by *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 2008;41(10):873-82.
17. Kirsch J, Basche S, Neunzehn J, Dede M, Dannemann M, Hannig C, Weber MT. Is it really penetration? Locomotion of devitalized *Enterococcus faecalis* cells within dentinal tubules of bovine teeth. *Arch Oral Biol.* 2017;83:289-96.

18. Portenier I, Waltimo TMT, Haapasalo M. Enterococcus faecalis– the root canal survivor and ‘star’ in post-treatment disease. *Endodontic Topics*. 2003;6(1):135-59.
19. Flahaut S, Hartke A, Giard JC, Auffray Y. Alkaline stress response in Enterococcus faecalis: adaptation, cross-protection, and changes in protein synthesis. *Appl Environ Microbiol*. 1997;63(2):812-4.
20. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of Enterococcus faecalis to calcium hydroxide. *Int Endod J*. 2002;35(3):221-8.
21. Laplace JM, Thuault M, Hartke A, Boutibonnes P, Auffray Y. Sodium hypochlorite stress in Enterococcus faecalis: influence of antecedent growth conditions and induced proteins. *Curr Microbiol*. 1997;34(5):284-9.
22. Fujita N. [Vancomycin-resistant enterococci (VRE)]. *Rinsho Byori*. 2000;48(11):1036-43.
23. Dion MB, Oechslin F, Moineau S. Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nat Rev Microbiol*. 2020;18(3):125-38.
24. Nobrega FL, Vlot M, de Jonge PA, Dreesens LL, Beaumont HJE, Lavigne R, Dutilh BE, Brouns SJJ. Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(12):760-73.
25. D'Herelle F. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. 1917. *Res Microbiol*. 2007;158(7):553-4.
26. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG, Jr. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(3):649-59.
27. Morrisette T, Kebriaei R, Lev KL, Morales S, Rybak MJ. Bacteriophage Therapeutics: A Primer for Clinicians on Phage-Antibiotic Combinations. *Pharmacotherapy*. 2020;40(2):153-68.
28. Howard-Varona C, Hargreaves KR, Abedon ST, Sullivan MB. Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. *Isme j*. 2017;11(7):1511-20.
29. Kasman LM, Porter LD. Bacteriophages. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.
30. Khalifa L, Shlezinger M, Beyth S, Hourri-Haddad Y, Copenhagen-Glazer S, Beyth N, Hazan R. Phage therapy against Enterococcus faecalis in dental root canals. *J Oral Microbiol*. 2016;8:32157.
31. El-Telbany M, El-Didamony G, Askora A, Ariny E, Abdallah D, Connerton IF, El-Shibiny A. Bacteriophages to Control Multi-Drug Resistant Enterococcus faecalis Infection of Dental Root Canals. *Microorganisms*. 2021;9(3).
32. Xiang Y, Ma C, Yin S, Song F, Qin K, Ding Y, Yang X, Song P, Ji X, Wei Y. Phage therapy for refractory periapical periodontitis caused by Enterococcus faecalis in vitro and in vivo. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2022;106(5-6):2121-31.
33. Hockett KL, Baltrus DA. Use of the Soft-agar Overlay Technique to Screen for Bacterially Produced Inhibitory Compounds. *J Vis Exp*. 2017(119).
34. Institute CaLS. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline [PDF]. 1999 [Available from: https://clsi.org/media/1462/m26a_sample.pdf].
35. Xiang Y, Ma C, Yin S, Song F, Qin K, Ding Y, Yang X, Song P, Ji X, Wei Y. Phage therapy for refractory periapical periodontitis caused by Enterococcus faecalis in vitro and in vivo. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2022.
36. Jones D, Krueger AP. A rapid slide plaque technic for bacteriophage assay. *J Gen Physiol*. 1951;34(3):347-57.

37. Carlson K, editor Working with bacteriophages: common techniques and methodological approaches 2005.
38. Brandau L, Jacksch S, Weis S, Schnell S, Egert M. Minority report: small-scale metagenomic analysis of the non-bacterial kitchen sponge microbiota. *Arch Microbiol.* 2022;204(7):363.
39. Wang L, Tkhilaishvili T, Bernal Andres B, Trampuz A, Gonzalez Moreno M. Bacteriophage-antibiotic combinations against ciprofloxacin/ceftriaxone-resistant *Escherichia coli* in vitro and in an experimental *Galleria mellonella* model. *Int J Antimicrob Agents.* 2020;56(6):106200.
40. Fanaei Pirlar R, Wagemans J, Ponce Benavente L, Lavigne R, Trampuz A, Gonzalez Moreno M. Novel Bacteriophage Specific against *Staphylococcus epidermidis* and with Antibiofilm Activity. *Viruses.* 2022;14(6).
41. Wang L, Tkhilaishvili T, Trampuz A. Adjunctive Use of Phage Sb-1 in Antibiotics Enhances Inhibitory Biofilm Growth Activity versus Rifampin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *Antibiotics (Basel).* 2020;9(11).
42. Furustrand Tabin U, Corvec S, Betrisey B, Zimmerli W, Trampuz A. Role of rifampin against *Propionibacterium acnes* biofilm in vitro and in an experimental foreign-body infection model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(4):1885-91.
43. Maiolo EM, Furustrand Tabin U, Borens O, Trampuz A. Activities of fluconazole, caspofungin, anidulafungin, and amphotericin B on planktonic and biofilm *Candida* species determined by microcalorimetry. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(5):2709-17.
44. Said J, Walker M, Parsons D, Stapleton P, Beezer AE, Gaisford S. Development of a flow system for studying biofilm formation on medical devices with microcalorimetry. *Methods.* 2015;76:35-40.
45. Gutiérrez D, Martínez B, Rodríguez A, García P. Genomic characterization of two *Staphylococcus epidermidis* bacteriophages with anti-biofilm potential. *BMC Genomics.* 2012;13:228.
46. Glonti T, Chanishvili N, Taylor PW. Bacteriophage-derived enzyme that depolymerizes the alginic acid capsule associated with cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol.* 2010;108(2):695-702.
47. Karygianni L, Ren Z, Koo H, Thurnheer T. Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends Microbiol.* 2020;28(8):668-81.
48. Neelakantan P, Romero M, Vera J, Daood U, Khan AU, Yan A, Cheung GSP. Biofilms in Endodontics-Current Status and Future Directions. *Int J Mol Sci.* 2017;18(8).
49. Swimberghe RCD, Coenye T, De Moor RJG, Meire MA. Biofilm model systems for root canal disinfection: a literature review. *Int Endod J.* 2019;52(5):604-28.
50. Rehman S, Ali Z, Khan M, Bostan N, Naseem S. The dawn of phage therapy. *Rev Med Virol.* 2019;29(4):e2041.
51. Hesse S, Rajaure M, Wall E, Johnson J, Bliskovsky V, Gottesman S, Adhya S. Phage Resistance in Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* ST258 Evolves via Diverse Mutations That Culminate in Impaired Adsorption. *mBio.* 2020;11(1).
52. El Haddad L, Harb CP, Gebara MA, Stibich MA, Chemaly RF. A Systematic and Critical Review of Bacteriophage Therapy Against Multidrug-resistant ESKAPE Organisms in Humans. *Clin Infect Dis.* 2019;69(1):167-78.
53. Chan BK, Abedon ST, Loc-Carrillo C. Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiol.* 2013;8(6):769-83.
54. McLean S, Dunn L, Palombo E. Bacteriophage biocontrol has the potential to reduce enterococci on hospital fabrics, plastic and glass. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2011;27(7):1713-7.

55. Duerkop BA, Huo W, Bhardwaj P, Palmer KL, Hooper LV. Molecular Basis for Lytic Bacteriophage Resistance in Enterococci. *mBio*. 2016;7(4).
56. Chatterjee A, Johnson CN, Luong P, Hullahalli K, McBride SW, Schubert AM, Palmer KL, Carlson PE, Jr., Duerkop BA. Bacteriophage Resistance Alters Antibiotic-Mediated Intestinal Expansion of Enterococci. *Infect Immun*. 2019;87(6).
57. Voit M, Trampuz A, Gonzalez Moreno M. In Vitro Evaluation of Five Newly Isolated Bacteriophages against *E. faecalis* Biofilm for Their Potential Use against Post-Treatment Apical Periodontitis. *Pharmaceutics*. 2022;14(9).
58. Lodi G, Sardella A, Salis A, Demarosi F, Tarozzi M, Carrassi A. Tooth extraction in patients taking intravenous bisphosphonates: a preventive protocol and case series. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010;68(1):107-10.
59. Nabil S, Samman N. Incidence and prevention of osteoradionecrosis after dental extraction in irradiated patients: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2011;40(3):229-43.
60. Kunkel PDDM. S2k-Leitlinie (Langversion)
Operative Entfernung von
Weisheitszähnen. DGZMK; 2019.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Marie Luise Voit, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Der Einsatz von Bakteriophagen gegen *E. faecalis*-Biofilme als potentielle Therapie bei persistierender apikaler Parodontitis in einem In-vitro-Modell - The use of bacteriophages against *E. faecalis* biofilms as a potential therapy for persistent apical periodontitis in an in vitro model“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Ich, Marie Luise Voit, hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation 1:

Marie Voit, Andrej Trampuz, Mercedes González Moreno

“In Vitro Evaluation of Five Newly Isolated Bacteriophages against *E. faecalis* Biofilm for Their Potential Use against Post-Treatment Apical Periodontitis.” *Pharmaceutics* vol. 14,9 1779. 25 Aug. 2022, doi:10.3390/pharmaceutics14091779

Beitrag im Einzelnen:

Der geleistete Beitrag für diese Publikation umfasst die Literaturrecherche, Ideenentwicklung und die Konzeptualisierung in Zusammenarbeit mit Mercedes González Moreno und Andrej Trampuz, sowie das Verfassen der Publikation.

Die Versuchsplanung erfolgte in Zusammenarbeit mit Mercedes González Moreno. Alle vorliegenden Versuche wurden von mir eigenständig durchgeführt. Datenerfassung und Visualisierung erfolgte bei den Abbildungen 5 und 6 eigenständig mit RStudio, in dem ich ein eigenes Skript programmierte. Die Darstellungen von den Abbildungen 2, 3 und 7 erstellte ich eigenständig mit GraphPad Prism. Abbildungen 1 und 4 entstanden in Zusammenarbeit mit Mercedes González Moreno. Die Auswertung und Interpretation der Ergebnisse erfolgte ebenfalls in Zusammenarbeit mit Mercedes González Moreno.

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuen/den Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2021** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"PHARMACOLOGY and PHARMACY"** Selected Category
 Scheme: WoS

Gesamtanzahl: 279 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfaktor
1	NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY	47,615	112.288	0.04911
2	DRUG RESISTANCE UPDATES	4,905	22.841	0.00358
3	PHARMACOLOGICAL REVIEWS	15,259	18.923	0.00720
4	ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS	47,828	17.873	0.02501
5	TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES	16,714	17.638	0.01363
6	Annual Review of Pharmacology and Toxicology	9,807	16.459	0.00557
7	INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS	21,098	15.441	0.02309
8	Acta Pharmaceutica Sinica B	9,420	14.903	0.00922
9	Journal of Pharmaceutical Analysis	3,869	14.026	0.00404
10	PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS	23,869	13.400	0.01921
11	MEDICINAL RESEARCH REVIEWS	7,973	12.388	0.00665
12	JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE	67,680	11.467	0.03824
13	DRUGS	18,328	11.431	0.01713
14	European Heart Journal- Cardiovascular Pharmacotherapy	1,529	11.177	0.00282
15	PHARMACOLOGICAL RESEARCH	26,468	10.334	0.02692
16	ANTIVIRAL RESEARCH	17,486	10.103	0.01806
17	ALIMENTARY PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS	27,559	9.524	0.03078
18	BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY	46,366	9.473	0.02492
19	Asian Journal of Pharmaceutical Sciences	3,744	9.273	0.00288
20	DRUG DISCOVERY TODAY	21,224	8.369	0.01633
21	NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY	34,562	8.294	0.03279

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfaktor
22	Expert Opinion on Drug Delivery	10,532	8.129	0.00604
23	BIODRUGS	3,113	7.744	0.00409
24	Current Neuropharmacology	7,580	7.708	0.00713
25	Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology	920	7.500	0.00043
26	BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY	52,615	7.419	0.05905
27	Journal of Neuroimmune Pharmacology	4,036	7.285	0.00302
28	ACTA PHARMACOLOGICA SINICA	14,909	7.169	0.01116
29	Expert Opinion on Drug Discovery	5,789	7.050	0.00575
30	CNS Neuroscience & Therapeutics	6,186	7.035	0.00600
31	International Journal of Nanomedicine	39,405	7.033	0.02657
32	DRUG METABOLISM REVIEWS	3,548	6.984	0.00162
33	CLINICAL PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS	21,749	6.903	0.01987
34	DRUG DELIVERY	10,117	6.819	0.00867
35	EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC TARGETS	6,787	6.797	0.00562
36	LIFE SCIENCES	42,960	6.780	0.03206
37	EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC PATENTS	4,626	6.714	0.00389
38	PHYTOMEDICINE	18,290	6.656	0.00959
39	Pharmaceutics	19,762	6.525	0.01881
40	INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS	67,742	6.510	0.03053
41	EXPERT OPINION ON INVESTIGATIONAL DRUGS	6,588	6.498	0.00566
42	CNS DRUGS	6,627	6.497	0.00642
43	PHYTOTHERAPY RESEARCH	22,172	6.388	0.00999
44	PHARMACOTHERAPY	8,339	6.251	0.00772

Druckexemplar der Publikation



pharmaceutics



Article

In Vitro Evaluation of Five Newly Isolated Bacteriophages against *E. faecalis* Biofilm for Their Potential Use against Post-Treatment Apical PeriodontitisMarie Voit ^{1,2}, Andrej Trampuz ^{1,2} and Mercedes Gonzalez Moreno ^{1,2,*}

- ¹ Charité-Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, Centre for Musculoskeletal Surgery, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany
- ² Berlin Institute of Health at Charité-Universitätsmedizin Berlin, BIH Center for Regenerative Therapies (BCRT), Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany
- * Correspondence: mercedes.gonzalez-moreno@charite.de

Abstract: State-of-the-art treatment of root canal infection includes the use of mechanical debridement and chemical agents. This disinfection method is limited, and microorganisms can remain in the canal system. *Enterococcus faecalis* appears with a high prevalence in secondary and persistent root canal infections and can be linked to endodontic treatment failure due to its various resistance mechanisms. Here, we evaluated the activity of newly isolated bacteriophages against clinical isolates of *E. faecalis* (including one vancomycin- and gentamicin-resistant strain) as a single treatment or in combination with gentamicin and vancomycin. For the resistant strain, daptomycin and fosfomycin were tested. Sixteen *E. faecalis* strains were used to screen for the presence of bacteriophages in sewage. Five different bacteriophages were characterized in terms of virion morphology, host range and killing-kinetics against each *E. faecalis* host strain. To investigate the antibiofilm effect of antibiotic and phages, *E. faecalis* biofilm was grown on porous glass beads and treated with different antibiotic concentrations and with isolated bacteriophages alone or in staggered combinations. A strong biofilm reduction was observed when phages were combined with antibiotic, where combinations with gentamicin showed a better outcome compared to vancomycin. Regarding the resistant strain, daptomycin had a superior antibiofilm effect than fosfomycin.

Keywords: *Enterococcus faecalis*; biofilm; persistent root canal infection; bacteriophage isolation; bacteriophage-antibiotic combination; isothermal microcalorimetry; apical periodontitis



Citation: Voit, M.; Trampuz, A.; Gonzalez Moreno, M. In Vitro Evaluation of Five Newly Isolated Bacteriophages against *E. faecalis* Biofilm for Their Potential Use against Post-Treatment Apical Periodontitis. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1779. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091779>

Academic Editors: Aline Maria da Silva and Victor Manuel Balção

Received: 26 July 2022

Accepted: 22 August 2022

Published: 25 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Apical periodontitis is a biofilm-related infectious disease, which leads to an inflammatory reaction of the periapical tissue followed by destruction of the bone [1,2]. Post-treatment apical periodontitis counts as the main reason for endodontic treatment failure [3] and is categorized either as reinfection (acquired or emergent), persistent, or recurrent infection in teeth with a previous root canal treatment [4]. The prevalence of this disease varies widely and differs globally [5]. Previous studies in Austria and Germany have shown a prevalence of up to 61% [6,7].

The common method of root canal treatment includes a combination of mechanical debridement with nickel-titanium files and chemical disinfection with irrigants such as sodium hypochlorite and EDTA with the purpose to remove microorganisms, debris, and necrotic pulp tissue, followed by root canal obturation and a coronal restoration [8,9]. Nevertheless, this treatment approach is often linked to certain deficiencies. Due to lateral canals, apical ramifications, dentinal tubules and isthmuses, pathogens remain in the canal system and can cause a remnant inflammation [10–12]. Moreover, the shape of root canals

plays an important role when it comes to mechanical debridement. For instance, in oval canals, 20–40% of the canal wall stays untouched [13,14].

Enterococcus faecalis is linked to post treatment root canal infections with a high prevalence up to 77% [15,16] due to its resistance against high pH and common endodontic irrigants. Additionally, *E. faecalis* can form a biofilm formation in the root canal, being also able to penetrate dentin and adhere to collagen [17,18]. Inability to eradicate *E. faecalis* in the canal system may lead to persistent infection and loss of tooth structure.

E. faecalis is a Gram-positive facultative anaerobe bacterium that occurs in the human gastrointestinal tract but can also become an opportunistic pathogen that can lead to life threatening systemic infections such as endocarditis, meningitis, urinary tract infections, and can be linked to periprosthetic joint infections [19–21]. Due to the acquisition of antibiotic resistance, resulting in multidrug-resistant strains such as vancomycin-resistant enterococci [22,23], persistent root canal infections of *E. faecalis* origin become clinically relevant.

As previously shown [24,25], bacteriophage therapy appears as a promising alternative to target *E. faecalis* and has barely been explored in dentistry. Bacteriophages (also referred as phages) are viruses that specifically infect bacteria. The emergence of multidrug-resistant bacterial infections has led to recent efforts to investigate and promote phage therapy to treat a multitude of infections [26]. Thus, in this study, we evaluated the antimicrobial and antibiofilm activity of five newly isolated phages targeting clinical *E. faecalis* isolates alone and in combination with antibiotics in view of their potential local application in the control of intraradicular root canal infections.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial Strains and Antimicrobial Agents

Two *E. faecalis* ATCC strains (19,433, 29,212) and 14 clinical isolates (EF 03 to EF 16) from patients with biofilm-related infections, including one vancomycin- and gentamicin-resistant strain (EF 04), were used in this study. Bacteria were stored in 25% glycerol solution at -20°C . All bacterial strains were cultured on Tryptic Soy Broth (TSB) (US Biological, Eching, Germany) or Müller Hinton Broth (MHB) (Roth, Karlsruhe, Germany) for liquid cultures or in TSB with addition of 15 g/L (TSA) or 6 g/L (Top-Agar) agar (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).

Gentamicin injectable solution (Ratiopharm, Ulm, Germany), vancomycin powder (Hexal, Holzkirchen, Germany), daptomycin powder (Novartis, Basel, Switzerland), and fosfomycin powder (InfectoPharm, Heppenheim, Germany) were purchased from the respective manufacturers. Powdered antibiotics were reconstituted using sterile pyrogen-free water. MHB media for testing daptomycin and fosfomycin was supplemented with 50 mg/L Calcium chloride and 25 mg/L Glucose 6-phosphate, respectively.

2.2. Bacteriophage Isolation

Sewage samples from wastewater purification plants and cesspools in Berlin were used to screen for the presence of lytic phages. All samples were enriched with the 16 *E. faecalis* strains from the collection. After incubation for 24 h at 37°C and 150 rpm, all samples were centrifuged (20 min, 7830 rpm, 4°C) and filter-sterilized using a $0.22\ \mu\text{m}$ filter. The enriched wastewater was then spotted on the bacterial lawn of each *E. faecalis* strain and incubated overnight at 37°C . Afterwards, each plate was screened for the presence of clear lysis zones and single plaques were further isolated. Then, single phage solutions were produced via propagation from a single plaque in solid culture. Briefly, a single phage plaque was picked with a sterile toothpick and was then stuck up to 20 times into an agar plate with a bacterial lawn of the host strain. Afterwards, a sterile paper stripe was used to swipe over the punctures to spread the phages all over the agar plate and was incubated overnight at 37°C . After incubation, 5 mL of saline magnesium (SM) buffer (10 mM Tris-HCL, pH 7.8, 1 mM MgSO_4) were added to the agar plate and incubated at 4°C for 24 h. Then, the SM buffer with the eluted phages was collected, centrifuged (20 min, 7830 rpm, 4°C) and filter-sterilized by using a $0.22\ \mu\text{m}$ filter. Titration was

performed to determine the phage titer on the host strain and the phage stocks were stored at 4 °C. Isolated phages were named as “CUB” followed by a number corresponding to the *E. faecalis* host strain where they were isolated and propagated (e.g., phage CUB_EF03 was isolated and propagated using the *E. faecalis* strain EF 03). Each phage was tested using its own host bacterial strain (which generally corresponded to the strain where a larger and clearer plaque morphology and/or the presence of a halo (data not shown) was observed) for the analysis of antibiofilm activity.

2.3. Morphological Analysis by Transmission Electron Microscopy

The virion morphology characteristics were visualized by transmission electron microscopy (TEM) using the negative staining technique. A volume of 15 µL of phage solution was dropped onto parafilm prior transfer onto a Ni-mesh grid (G2430N; Plano GmbH, Wetzlar, Germany) that has previously been carbon-coated and glow discharged (Leica MED 020, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). The grid is then let to adsorb for 10–15 min at room temperature and then washed three times with Aquadest and treated with 1% aqueous uranyl acetate (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) for 20 s for negative staining. Afterwards, excess staining was removed with filter paper. Grids were air dried and then imaged by TEM using a Zeiss EM 906 microscope (Carl Zeiss Microscopy Deutschland, Oberkochen, Germany) at a voltage of 80 kV. The image processing program ImageJ [27] was used for phage size measurements.

2.4. Host Range Analysis

To evaluate the spectrum of *E. faecalis* strains that can be infected by the newly isolated phages, a host range was determined by Top-Agar overlay spot assays. Bacterial overnight cultures (14 clinical strains and 2 ATCC strains) were prepared in TSB. One hundred microliters of the bacterial culture was added to 4 mL Top-Agar and the mixture was poured onto a TSA plate and allowed to dry for a few minutes at room temperature. Ten-fold serial dilutions of each phage were prepared in SM buffer and 10 µL of each dilution were spotted on the bacterial lawn and incubated at 37 °C overnight. After incubation, the plates were checked for phage plaque formation, indicative of the antimicrobial activity.

2.5. Biofilm Time-Killing Assay

A time-killing curve assay to quantify the antibiofilm effect of the siphovirus-like phages (CUB_EF03, CUB_EF06, CUB_EF10, CUB_EF14) was performed as previously described [28]. Shortly, bacterial biofilms were formed on sterile 4 mm sintered porous glass beads (ROBU, Hattert, Germany) for each *E. faecalis* host strain. To this end, beads were placed into a 24-well-plate (Corning Inc., Corning, NY, USA) and covered with 1 mL TSB inoculated with 1:100 dilution of an overnight culture. Beads were then incubated at 37 °C and 150 rpm for 24 h in humid conditions. Thereafter, beads were dip-washed with sterile 0.9% saline to remove non-adhered planktonic cells and transferred into microcentrifuge tubes containing 1 mL of fresh TSB broth inoculated with 10⁸ PFU/mL phage. Samples were incubated at 37 °C for 0 h, 2 h, 4 h, 6 h and 24 h. Then, biofilm-embedded cells were recovered by sonicating the tubes for 10 min in a BactoSonic ultrasound bath at 40 kHz and 0.2 W/cm² (BANDELIN electronic, Berlin, Germany). The bead was removed from the tube and the sonication fluid was centrifuged for 1 min at 16,000× g and 4 °C. The supernatant was discarded and the bacterial pellet resuspended in 1 mL phosphate-buffered saline. The centrifugation and resuspension step was carried out four times to wash out remaining phage particles from the samples. Finally, ten-fold serial dilutions of the resuspended fluid were plated on TSA and after 18–24 h incubation at 37 °C, recovered biofilm cells were quantified by colony counting. The bacterial concentration was calculated with the Equation (1):

$$\text{Bacterial Count (CFU/mL)} = \frac{\text{No. of colonies counted} \times \text{dilution factor}}{\text{volume in mL spread on culture plate}} \quad (1)$$

Two biological replicates were carried out with technical duplicates. Data was expressed as mean \pm standard deviation (SD) and plotted as bacterial count (CFU/mL) over time (h) using GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

2.6. Phage Antimicrobial Activity Evaluated by Isothermal Microcalorimetry

The antimicrobial effect of the selected phages against biofilms was also monitored by isothermal microcalorimetry (IMC) as in a previous study [29] with some modifications. *E. faecalis* biofilm was grown on porous glass beads as previously described and single glass beads were introduced into sterile glass ampoules containing 500 μ L of TSB and 500 μ L of phage solution (10^8 PFU/mL). Ampoules were then inserted into the isothermal calorimeter TAM III (TA Instruments, New Castle, DE, USA) and the heat production was measured over 48 h. This experiment was performed with biological triplicates. Plots of heat (J) over time (h) were prepared using RStudio [30].

2.7. Antibiotic Susceptibility Determination

The broth microdilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) for each antibiotic in MHB. An approximately 5×10^5 CFU/mL bacterial inoculum was prepared and exposed to two-fold serial dilutions of each antibiotic during 24 h at 37 °C. The lowest concentration of antibiotic that completely inhibited visible growth (clear wells) was defined as the MIC. The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines [31] were followed for the interpretation of susceptibilities. Consequently, *E. faecalis* strains were considered susceptible to vancomycin when MIC ≤ 4 μ g/mL, to fosfomycin when MIC ≤ 64 μ g/mL and to daptomycin when MIC ≤ 2 μ g/mL. Susceptibility testing on *E. faecalis* strains is not usually recommended for gentamicin, although it can be used to screen for high-level aminoglycoside resistance (MIC > 128 μ g/mL) [32].

2.8. Phage-Antibiotic Combinations against Biofilm

First, 24 hour-old-biofilms were formed on porous glass beads as described above, deep washed with 0.9% NaCl and exposed to either phage (10^8 PFU/mL), antibiotic at 1 \times MIC, 10 \times MIC and 100 \times MIC concentrations, or the combination of both phage and antibiotic, in a final volume of 1 mL and incubated at 37 °C for 24 h. In addition, a paired combination of two antibiotics (at 1 \times MIC and 10 \times MIC) and the phage was also included to evaluate potential antibiotic interactions. For all phage/antibiotic combinations, biofilms were exposed first to phages for 4 h at 37 °C after which the antibiotic was added and incubated for further 20 h at 37 °C. After a total incubation of 24 h, treated biofilm-beads were rinsed three times with 0.9% NaCl, placed in sterile glass ampoules with 1 mL fresh TSB and inserted in the calorimeter, where heat produced by viable bacteria present in the bead after 24 h of treatment or no treatment (growth control) was monitored for 48 h. Experiments with each *E. faecalis* strain were conducted using two biological replicates, each with technical duplicates.

2.9. Assessment of Bacterial Resistance Development to Phage

The development of resistance of *E. faecalis* strains EF 10 and EF 14 to phage was assessed by Top-Agar overlay spot assays. To this end, the supernatant of EF 10 and EF 14 biofilm samples co-incubated with phage CUB_EF10 or CUB_EF14, respectively, were collected after the 48-hour calorimetric assay and plated on an agar plate. After 24 h incubation of the agar plates at 37 °C, a single bacterial colony (referred as colony-variant) was collected for the resistance analysis. The susceptibility of each retrieved bacterial colony-variant to all siphovirus-like phages (CUB_EF03, CUB_EF06, CUB_EF10 and CUB_EF14) was assessed by Top-Agar overlay spot assay. Bacterial colony-variants were considered resistant to the phage when no lysis zone could be observed on the plate.

3. Results

3.1. Phage Isolation and TEM Visualization

Five distinct phages were isolated on clinical *E. faecalis* strains from sewage and the phage morphologies were examined by TEM (Figure 1). Four phages (CUB_EF03, CUB_EF06, CUB_EF10 and CUB_EF14) displayed an icosahedral head and a non-contractile tail, with no visible tail fibers, but a tail tip, corresponding to a siphovirus morphology, whereas phage CUB_EF04 displayed a podovirus morphology with an icosahedral head (45.18 nm in diameter) and a short, noncontractile tail (21.73 nm in length).

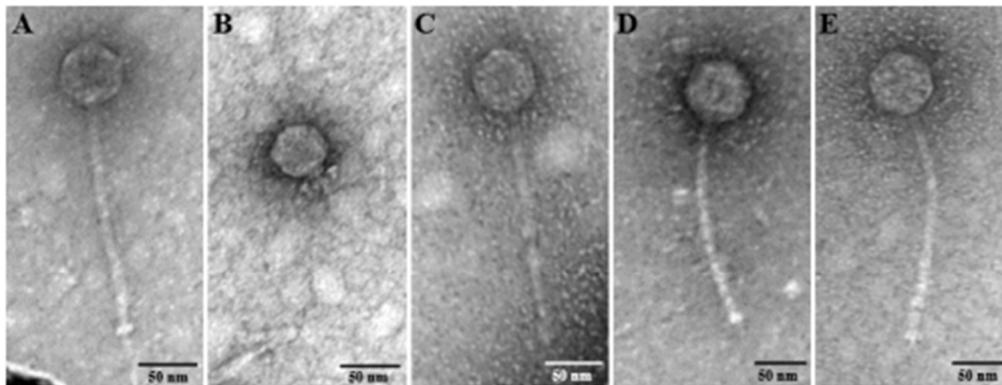


Figure 1. TEM image of the bacteriophage's virions (A) CUB_EF03, (B) CUB_EF04, (C) CUB_EF06, (D) CUB_EF10, and (E) CUB_EF14.

CUB_EF03 had a head diameter of 54.83 nm, a tail tube of 188.15 nm in length and 8.91 nm in width and a visible tail tip of 32.81 nm long. Similarly, CUB_EF06 presented a head size of 54.48 nm in diameter and a tail tube of 195.76 nm in length and 7.79 nm in width. CUB_EF10 displayed the biggest head size with a diameter of 64.12 nm, a tail tube 189.72 nm long and 11 nm wide and a visible tail pin of 22.6 nm. Finally, CUB_EF14 had a head size of 59.45 nm in diameter, a long tail tube of 200.56 nm and 9.37 nm wide, and a tail tip of 16.31 nm.

3.2. Host Range

According to Figure 2, phage CUB_EF14 showed the broadest host range, active against 7 out of 16 (44%) tested *E. faecalis* strains, whereas phage CUB_EF10 displayed the narrowest host range, only active against the host strain (EF 10) used during the isolation step. Five bacterial strains (31%) did not show susceptibility to any of the tested phages.

3.3. Time-Killing Assay

The killing kinetics revealed a significant reduction of *E. faecalis* biofilm cells after 4 to 6 h of co-incubation with phage (Figure 3). The strongest antibiofilm activity was observed with CUB_EF10, which showed a CFU reduction of more than 3-log (99.9%) against EF 10 after 4 h co-incubation (Figure 3C). Nevertheless, the treated biofilm of all four tested strains showed an increase in CFU counts at 24 h, with values comparable to those observed for the untreated samples, possibly indicative of the emergence of bacterial resistance to phage.

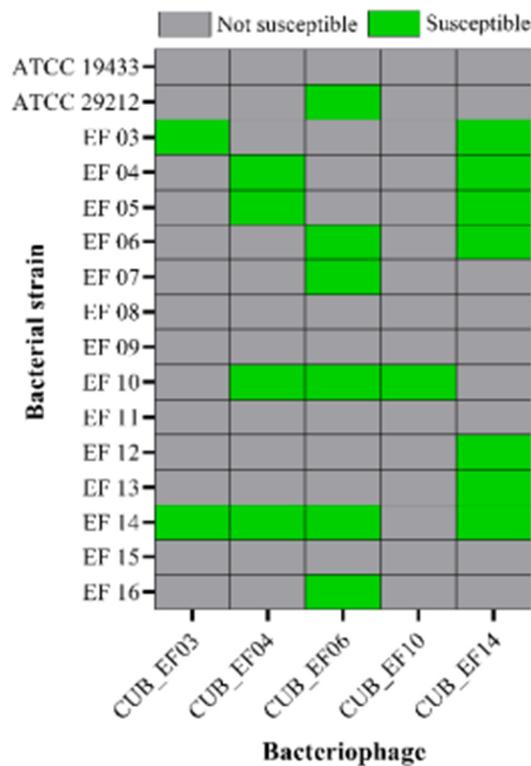


Figure 2. Host range of isolated bacteriophages among *E. faecalis* strains.

3.4. Phage-Antibiotic Combinations against *E. faecalis* Biofilms

Prior determination of the combined effect of phage and antibiotic against biofilm, the MIC values for the selected antibiotics were determined on each *E. faecalis* strains (Table 1).

Table 1. Minimal inhibitory concentration (MIC) values of planktonic *E. faecalis* (EF) strains determined by broth microdilution.

Antibiotic	MIC EF 03	MIC EF 06	MIC EF 10	MIC EF 14	MIC EF 04
Vancomycin	2 µg/mL	2 µg/mL	2 µg/mL	2 µg/mL	-
Gentamicin	64 µg/mL	64 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	-
Fosfomicin	-	-	-	-	32 µg/mL
Daptomycin	-	-	-	-	8 µg/mL

All four tested *E. faecalis* strains were susceptible to vancomycin and showed an absence of high-level of aminoglycoside resistance when tested with gentamicin. As for the vancomycin and gentamicin resistant strain EF 04, it was susceptible to fosfomicin and daptomycin.

The antibiofilm activity of the different antibiotics was evaluated by monitoring for 48 h the heat produced by biofilm bacteria still viable on the beads (after treatment) re-inoculated in fresh medium. The obtained heat curves for each tested strain are displayed in Figure 4.

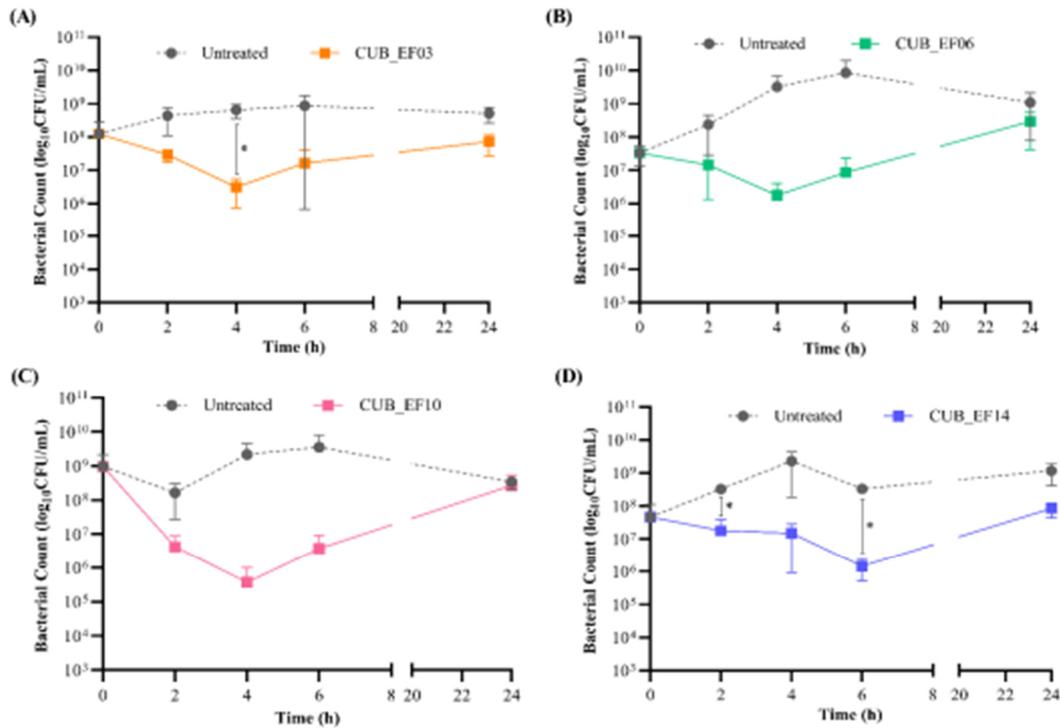


Figure 3. Time-killing curve of *E. faecalis* biofilms from host strains (A) EF 03, (B) EF 06, (C) EF 10, and (D) EF 14 treated with the respective phage (10^8 PFU/mL) and untreated monitored at 2 h intervals for the first 6 h and after 24 h. Data are expressed as mean \pm SD. Results were statistically analyzed using a multiple *t* test analysis integrated in GraphPad Prism 6; *p*-values < 0.05 were considered significant (*).

On the one hand, treatment with antibiotics alone showed a slight initial delay (up to 8 h) in heat production compared to the untreated sample (growth control), but overall, no remarkable antimicrobial effect against all tested EF strains, even at the highest antibiotic concentration tested ($100\times$ MIC), showing heat measurements after 48 h comparable to those of the growth control. Regarding the phage treatment, similarly to the effect observed with the antibiotics, the heat curves were alike to the curves from the growth control samples, confirming the outcomes observed with the time-killing assay, where biofilm re-growth could be seen after 24 h co-incubation.

To assess the antimicrobial effect of combining phage and antibiotic, a staggered exposure of *E. faecalis* biofilm, first to phages for 4 h followed by a 20-hour-exposure to different concentrations of antibiotic, was carried out. The incubation time with phage prior addition of antibiotics was based on the time-killing results (Figure 3).

In general, the combination of phage with vancomycin or gentamicin showed higher antibiofilm effects compared to the effect of each antimicrobial agent tested alone. Phage-antibiotic combinations revealed longer heat-suppression-times, lower heat production or even a complete absence of heat production during the whole monitoring time (48 h). Combining phage and gentamicin had a stronger antimicrobial effect than phage-vancomycin combinations against most *E. faecalis* strains, with the exception of EF 06, where we observed a similar outcome with both antibiotics in combination with phage. In case of EF 10, the combination of phage and any tested concentration of gentamicin, including the lowest $1\times$ MIC, revealed a complete absence of heat production, correlating with an absence of

bacterial regrowth for up to 48 h, mostly indicative of a significant reduction in the biofilm cell count or a complete biofilm eradication.

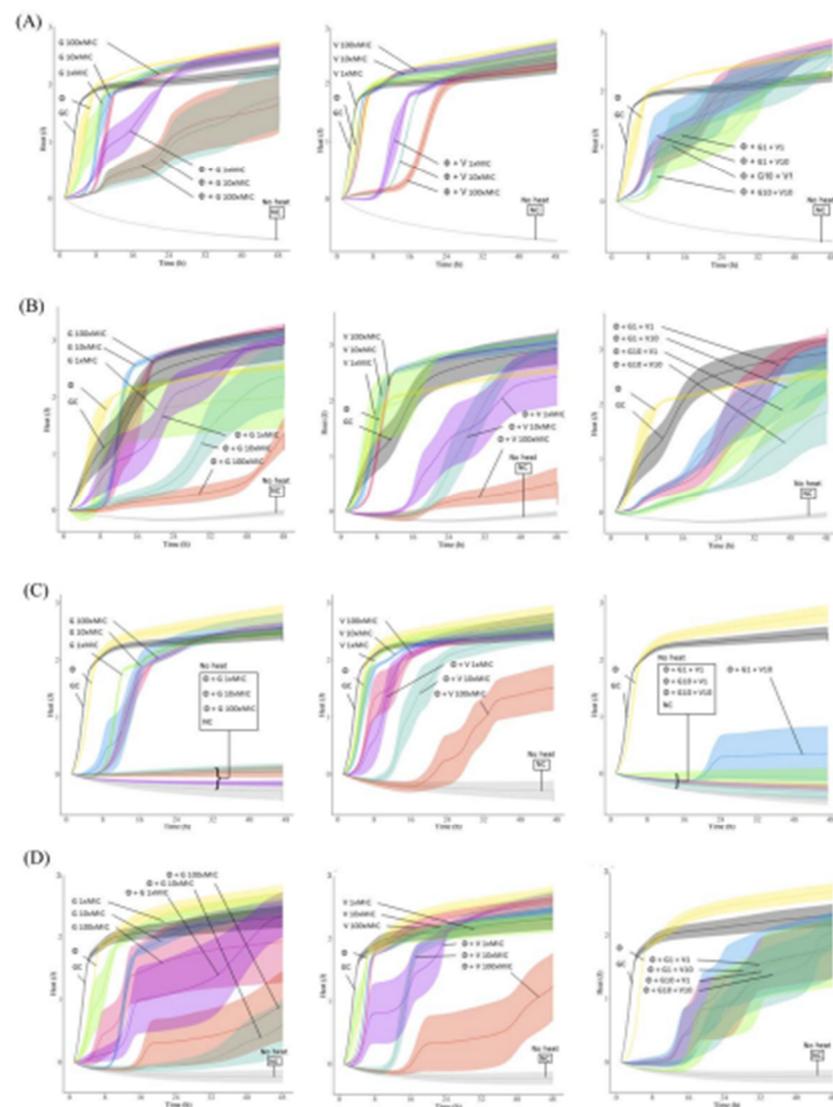


Figure 4. Heat (J) curves of *E. faecalis* (A) EF 03, (B) EF 06, (C) EF 10 and (D) EF 14 biofilms exposed to phage (Φ at 10^8 PFU/mL), gentamicin (G), or vancomycin (V) at different concentrations (1 \times , 10 \times or 100 \times MIC), or with staggered phage-antibiotic combinations (Φ + antibiotic). Each curve shows the heat produced over time by viable bacteria in the biofilm after 24 h of treatment. GC represents the growth control sample not exposed to any antimicrobials. NC represents de negative control for media sterility. Data are expressed as mean \pm SE. Plots were prepared using RStudio [30]. Solid lines represent the mean and corresponding shaded regions the standard error.

Another treatment approach investigated was the combination of phage with both antibiotics at different concentrations to assess potential positive or negative antibiotic

interactions. Results mostly showed negative or no interaction for the combined antibiotic activity. We could observe, for EF 03, EF 10, and EF 14, that the combination of phage and gentamicin had a better outcome than when vancomycin was also included in the treatment. The addition of 10× MIC of vancomycin to phage-gentamicin (at 10× MIC) combination in the treatment against EF 06 had a better outcome than the single effect of phage-gentamicin or phage-vancomycin at the same concentrations.

3.5. Phage-Antibiotic Combinations against Vancomycin and Gentamicin High Level Resistant *E. faecalis* Biofilm

Daptomycin and fosfomycin were used to evaluate the antimicrobial activity of phage-antibiotic combinations against the biofilm of the vancomycin and high-level gentamicin resistant *E. faecalis* strain EF 04 by IMC.

A dose-dependent activity was observed when daptomycin was tested at different concentrations against EF 04, whereas fosfomycin showed a similar activity independently of the administered dose. Treatment with the phage resulted in a slight initial delay in heat production compared to the growth control (Figure 5).

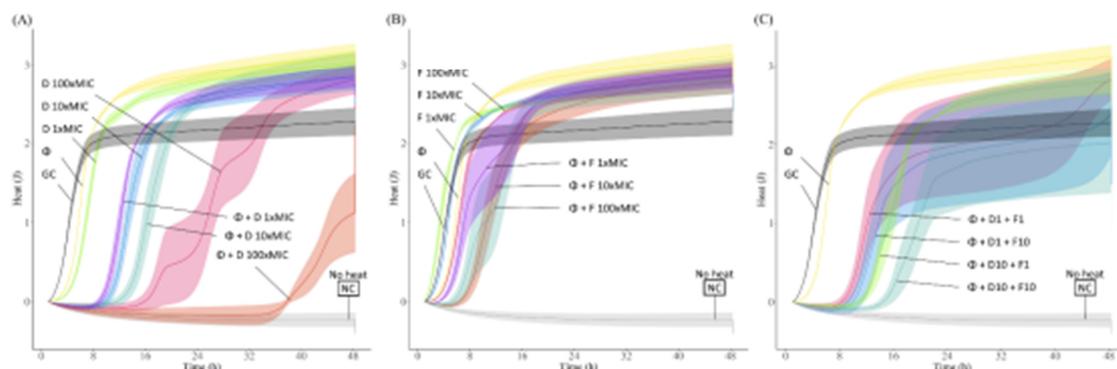


Figure 5. Heat (J) curves of EF 04 biofilm exposed to (A) phage CUB_EF04 (Φ at 10^8 PFU/mL) plus daptomycin (D) at different concentrations (1×, 10× or 100× MIC), (B) phage CUB_EF04 (Φ at 10^8 PFU/mL) plus fosfomycin (F) at different concentrations (1×, 10× or 100× MIC), or (C) phage CUB_EF04 (Φ at 10^8 PFU/mL) plus both antibiotics at different concentrations (1×, 10× MIC). Each curve shows the heat produced by viable bacteria in the biofilm after 24 h of treatment. GC represents the growth control sample not exposed to any antimicrobials. NC represents the negative control for media sterility. Data are expressed as mean \pm SE. Plots were prepared using RStudio [30]. Solid lines represent the mean and corresponding shaded regions the standard error.

The combination of phage CUB_EF04 and daptomycin revealed a considerable higher antimicrobial effect compared to the effect of phage or daptomycin alone. Daptomycin at 100× MIC combined with phage achieved the longest heat suppression (up to 34 h) and an overall lower heat production during the whole monitoring time (48 h) compared to the growth control. On the other hand, phage-fosfomycin combination showed a minor improvement in the antimicrobial effect relative to each antimicrobial alone, having an initial heat suppression time of up to 6 h compared to the growth control, but a higher overall heat production after 48 h.

When both antibiotics were combined with phage, no substantial changes in antimicrobial efficacy were observed. A slight longer suppression time and a lower overall heat production could be observed when combining phage with both antibiotics at 10× MIC compared to the combination of the phage and each antibiotic at the same concentration.

3.6. Assessment of Bacterial Resistance Development to Phage

After 48 h of co-incubation of bacterial strains EF 10 and EF 14 (parental strains) with phages CUB_EF10 and CUB_EF14 respectively, a bacterial colony (colony-variant) was recovered from each culture to evaluate the susceptibility to the exposed phage (CUB_EF10 in the case of EF 10 and CUB_EF14 in the case of EF 14) as well as to phages CUB_EF03, CUB_EF06 and CUB_EF10 or CUB_EF14, to which the parental strain had not been previously exposed. Top-Agar overlay spot assays revealed the development of resistance of the two tested *E. faecalis* strains (EF 10 and EF 14) to the phage to which they were exposed for 48 h (CUB_EF10 or CUB_EF14). A lysis zone could be observed on the agar plate when phage CUB_EF10 and CUB_EF14 were spotted on the parental strains (PS), indicating susceptibility to the phage, whereas no lysis was observed when spotting both phages on the colony-variants (CV), indicating emergence of resistance to the phage (Figure 6). We also observed that when CUB_EF10 phage was tested on the EF 14 PS, a turbid zone was visible, indicative of an absence or a low phage activity on this strain. In contrast to that, a clear lytic zone could be observed when the phage was spotted on the EF 14 CV. Apparently, the development of resistance in EF 14 to phage CUB_EF14 led to an increased susceptibility to the phage CUB_EF10.

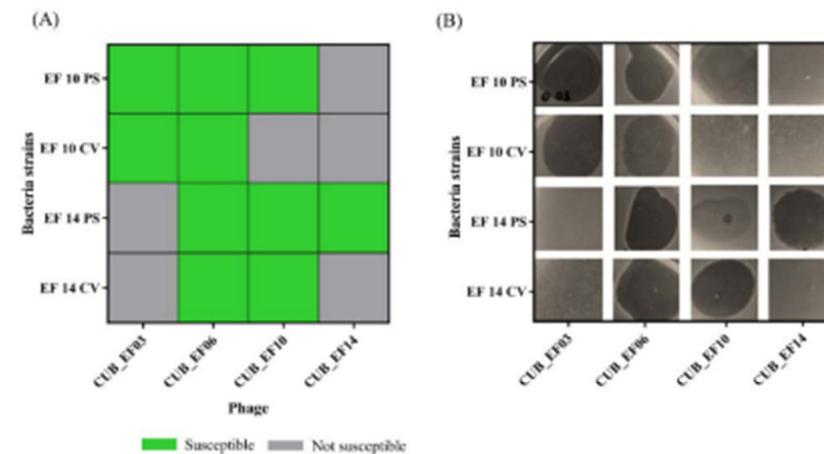


Figure 6. (A) Heat-map showing susceptibility of the parental (PS) and the colony-variant (CV) *E. faecalis* strains EF 10 and EF 14 to phages CUB_EF03, CUB_EF06, CUB_EF10 and CUB_EF14. (B) Representative images of Top-Agar overlay spot tests.

No variations in susceptibility of all tested PS and CV strains to phages CUB_EF03 and CUB_EF06 were observed.

4. Discussion

The treatment of intraradicular infections is an important component of dental therapy. The reason for an irreversible pulpal inflammation is the excessive invasion of bacteria into the root canal system and the inability of the pulp to combat the invaders. The objective of a root canal treatment is to remove the pathogens (chemo-mechanical cleaning), shaping of the canal system, obturation, followed by coronal restoration. The outcome of this treatment depends directly on the pre-treatment status of the pulp and the periapical tissue. As previous studies have shown, teeth with a periapical radiolucency had the worst outcome with an apical healing up to 86% [33,34] and radiographic lesions were linked to biofilm formation in the root canal [35]. Hence, the presence of intraradicular biofilm and the bacterial persistence highly affects the treatment outcome. This fact reveals certain

deficiencies of the gold standard of endodontic treatment and raises the question of whether new forms of biofilm eradication are necessary.

Bacteriophages seem to be a promising and innovative way in dentistry to fight resistant intraradicular pathogens, such as *E. faecalis*. As several studies have shown, phages reduce *E. faecalis* biofilm in dental ex vivo models and can be combined with common endodontic irrigants such as sodium hypochlorite and EDTA [24,36]. Furthermore, phage treatment against *E. faecalis* in an intraperitoneal and periapical rat infection model exhibited better outcomes (higher survival rate and normal anatomical diagnostic) compared to antibiotic treatment, as shown by Xiang et al. in a recent study [37]. These results represent a very promising alternative to conventional root canal treatment, especially for retreatments or teeth with an apical radiolucency.

As shown in our study, sewage water from cesspools is an effective and inexpensive source to isolate bacteriophages against *E. faecalis* to target antibiotic resistant strains and biofilm formation. Despite the high specificity that phages often exhibit, infecting individual bacterial species or even individual bacterial strains, our host range analysis revealed a broad coverage of the number of *E. faecalis* strains susceptible to at least one of the isolated phages, with 5 strains out of 16 not susceptible to any phage.

For our study, we focused on investigating the antibiofilm activity of five different phages towards the host-bacterial strain used during the isolation step. To this end, we used an optimized in vitro biofilm model using porous glass beads as a surface to grow biofilm [38], with an obtained cell count of 10^8 CFU/mL on average, indicative of a strong mature biofilm. Time-killing assays showed a significant biofilm reduction in all tested strains during the initial incubation time (up to 6 h) before bacterial re-growth could be observed after 24 h co-incubation, possibly due to the development of bacterial resistance to phage leading to a repopulation of the biofilm.

Indeed, phage resistance has also been reported in phage therapy in humans [39] representing a potential barrier to the implementation of phage therapy. In that sense, our study also provides valuable data on the susceptibility of phage-resistant mutants to different phages. For instance, we observed that emergence of bacterial resistant after co-incubation with one phage could lead to a higher susceptibility of the resistant strain to another phage for which the original strain showed weak susceptibility. Further research could provide more insights into the mechanisms involved in the observed correlation between resistance to one phage and increased susceptibility to another. Some studies have found that *E. faecalis* phage resistance involves the mutation of phage receptors, including membrane protein PIP [40] or the enterococcal polysaccharide antigen (Epa) [41].

Combination of phages and antibiotics is a promising strategy to reduce the dose of antibiotics and the development of antibiotic resistance during treatment. As shown in previous studies [42–44] a staggered administration, adding first the phage and then the antibiotic, resulted in better outcomes than a simultaneous exposure to both antimicrobials. Thus, we used a staggered approach in our study. By the use of isothermal microcalorimetry, we were able to systematically assess the antimicrobial activity of different treatment conditions against biofilms. The combined effect of phages and antibiotics in the treatment of *E. faecalis* biofilms proved to be more efficient than each antimicrobial alone. In particular, the combination of phage and gentamicin revealed a higher efficacy compared to the combination with vancomycin. This may be due to the higher antibiofilm activity shown by gentamicin compared to vancomycin against *E. faecalis*, also seen in other in vitro and in vivo studies [45,46].

The spread of vancomycin-resistant enterococci (VRE) is increasing, becoming a major clinical problem due to the intrinsic resistance of these strains to most commonly used antibiotics and thus limiting therapeutic options [47,48]. Our study showed the successful application of phage in combination with daptomycin against the VRE strain, achieving a complete inhibition of the biofilm at an antibiotic concentration of 0.8 g/L, an achievable dose by local antibiotic administration in clinical practice.

Despite our efforts to bring further insights in the use of phage therapy as potential treatment approach for post-treatment apical periodontitis, when trying to draw conclusions or make clinical extrapolations, it is important to consider some limitations of our study. Compared to the complexity and individuality of intraradicular biofilms in post-treatment apical periodontitis, mainly of polymicrobial nature [49]. Our study investigated mono-species biofilms using individual *E. faecalis* strains, where only combinations of one phage with its host bacterial strain were tested. Additional studies on the activity of single or combined phages across different bacterial isolates might bring further insights on the therapeutic potential of phages. Furthermore, it is a matter of debate whether *E. faecalis* is the main pathogen associated with endodontic treatment failure. Recent studies reveal that *Parvimonas micra* and *Fusobacterium nucleatum* are more prevalent in previously treated teeth with a persistent infection and may play a more important role in the process of apical inflammation. Nevertheless, in most cases *E. faecalis* appears to be present in root canal treated teeth with an apical lesion, being able to withstand common endodontic treatment options [50–52]. Regarding the potential use of phages in endodontics, in any case an individual treatment approach will be necessary, in which phages active against the pathogenic strain causing the infection should be used.

In summary, phage therapy holds a very high potential to eradicate persistent intraradicular *E. faecalis* biofilm and may present a rewarding addition to the common endodontic treatment.

Author Contributions: Conceptualization, M.V., A.T. and M.G.M.; Formal analysis, M.V. and M.G.M.; Funding acquisition, A.T.; Investigation, M.V. and M.G.M.; Methodology, M.V. and M.G.M.; Supervision, A.T. and M.G.M.; Validation, M.V. and M.G.M.; Visualization, M.V. and M.G.M.; Writing—original draft, M.V. and M.G.M.; Writing—review & editing, M.V., A.T. and M.G.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by PRO-IMPLANT Foundation (<https://www.pro-implant.org> accessed on 1 July 2022), a non-profit organization supporting research, education, global networking, and care of patients with bone, joint or implant-associated infection. We acknowledge financial support from the Open Access Publication Fund of Charité – Universitätsmedizin Berlin and the German Research Foundation (DFG).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors would like to thank Christian Hannig of the Universitätsklinikum Dresden for reviewing and providing critical feedback on the content of this article. We thank the Berliner Wasserbetriebe for the support in the collection of hospital sewage. The authors also thank the Core Facility for Electron Microscopy at the Charité-Universitätsmedizin Berlin for the help in the collection of transmission electron microscopy images.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Möller, A.J.; Fabricius, L.; Dahlén, G.; Ohman, A.E.; Heyden, G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand. J. Dent. Res.* **1981**, *89*, 475–484. [[CrossRef](#)]
- Azuma, M.M.; Samuel, R.O.; Gomes-Filho, J.E.; Dezan-Junior, E.; Cintra, L.T. The role of IL-6 on apical periodontitis: A systematic review. *Int. Endod. J.* **2014**, *47*, 615–621. [[CrossRef](#)]
- Vire, D.E. Failure of endodontically treated teeth: Classification and evaluation. *J. Endod.* **1991**, *17*, 338–342. [[CrossRef](#)]
- Siqueira, J.F., Jr.; Rôças, I.N.; Ricucci, D.; Hülsmann, M. Causes and management of post-treatment apical periodontitis. *Br. Dent. J.* **2014**, *216*, 305–312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hülsmann, M. Epidemiology of post-treatment disease. *Endod. Top.* **2016**, *34*, 42–63. [[CrossRef](#)]
- Sperr, W.R. A critical view of root canal therapy. *Osterr. Z. Stomatol.* **1970**, *67*, 249–254. [[PubMed](#)]
- Weiger, R.; Hitzler, S.; Hermle, G.; Löst, C. Periapical status, quality of root canal fillings and estimated endodontic treatment needs in an urban German population. *Endod. Dent. Traumatol.* **1997**, *13*, 69–74. [[CrossRef](#)]

8. Bryce, G.; Ready, D.; Donnell, D.O.; Ng, P.; Pratten, J.; Gulabivala, K. Biofilm disruption by root canal irrigants and potential irrigants. *Int. Endod. J.* **2008**, *41*, 814–815. [\[CrossRef\]](#)
9. De Moor, R.; Hülsmann, M.; Kirkevang, L.L.; Tanalp, J.; Whitworth, J. Undergraduate Curriculum Guidelines for Endodontology. *Int. Endod. J.* **2013**, *46*, 1105–1114. [\[CrossRef\]](#)
10. Vieira, A.R.; Siqueira, J.F., Jr.; Ricucci, D.; Lopes, W.S. Dentinal tubule infection as the cause of recurrent disease and late endodontic treatment failure: A case report. *J. Endod.* **2012**, *38*, 250–254. [\[CrossRef\]](#)
11. Ricucci, D.; Loghin, S.; Siqueira, J.F., Jr. Exuberant Biofilm infection in a lateral canal as the cause of short-term endodontic treatment failure: Report of a case. *J. Endod.* **2013**, *39*, 712–718. [\[CrossRef\]](#)
12. Laplace, J.M.; Thuault, M.; Hartke, A.; Boutibonnes, P.; Auffray, Y. Sodium hypochlorite stress in *Enterococcus faecalis*: Influence of antecedent growth conditions and induced proteins. *Curr. Microbiol.* **1997**, *34*, 284–289. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Peters, O.A. Current challenges and concepts in the preparation of root canal systems: A review. *J. Endod.* **2004**, *30*, 559–567. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Wu, M.K.; Wesselink, P.R. A primary observation on the preparation and obturation of oval canals. *Int. Endod. J.* **2001**, *34*, 137–141. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Rôças, I.N.; Siqueira, J.F., Jr.; Santos, K.R. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J. Endod.* **2004**, *30*, 315–320. [\[CrossRef\]](#)
16. Stuart, C.H.; Schwartz, S.A.; Beeson, T.J.; Owatz, C.B. *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J. Endod.* **2006**, *32*, 93–98. [\[CrossRef\]](#)
17. Narayanan, L.L.; Vaishnavi, C. Endodontic microbiology. *J. Conserv. Dent.* **2010**, *13*, 233–239. [\[CrossRef\]](#)
18. Ran, S.; Liu, B.; Jiang, W.; Sun, Z.; Liang, J. Transcriptome analysis of *Enterococcus faecalis* in response to alkaline stress. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 795. [\[CrossRef\]](#)
19. Nehme, F.; Gitau, J.; Liu, J. Purulent pericarditis as a complication of bacteraemic *Enterococcus faecalis* urinary tract infection. *BMJ Case Rep.* **2017**, *2017*, bcr2017219498. [\[CrossRef\]](#)
20. Lin, D.P.; Wada, S.; Jimenez-Lucho, V.E. *Enterococcus faecalis* endocarditis presenting as meningitis. *Infection* **1998**, *26*, 304–305. [\[CrossRef\]](#)
21. Ehrlich, G.D.; Hu, F.Z.; Sotereanos, N.; Sewicke, J.; Parvizi, J.; Nara, P.L.; Arciola, C.R. What role do periodontal pathogens play in osteoarthritis and periprosthetic joint infections of the knee? *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* **2014**, *12*, 13–20. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Fujita, N. Vancomycin-resistant enterococci (VRE). *Rinsho Byori* **2000**, *48*, 1036–1043.
23. Hollenbeck, B.L.; Rice, L.B. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence* **2012**, *3*, 421–433. [\[CrossRef\]](#)
24. Khalifa, L.; Shlezinger, M.; Beyth, S.; Hourri-Haddad, Y.; Coppenhagen-Glazer, S.; Beyth, N.; Hazan, R. Phage therapy against *Enterococcus faecalis* in dental root canals. *J. Oral. Microbiol.* **2016**, *8*, 32157. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Bolcan, A.S.; Upadrashta, A.; Bettio, P.H.A.; Clooney, A.G.; Draper, L.A.; Ross, R.P.; Hill, C. Evaluation of Phage Therapy in the Context of *Enterococcus faecalis* and Its Associated Diseases. *Viruses* **2019**, *11*, 366. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. González-Moreno, M.P.; Morovic, P.; Tkhilashvili, T.; Trampuz, A. Bacteriophages for Treatment of Biofilm Infections. In *Bone and Joint Infections: From Microbiology to Diagnostics and Treatment*; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2021.
27. Rasband, W.S. *ImageJ*; U.S. National Institutes of Health: Bethesda, MD, USA, 1997–2018. Available online: <https://imagej.nih.gov/ij/> (accessed on 6 June 2022).
28. Wang, L.; Tkhilashvili, T.; Bernal Andres, B.; Trampuz, A.; Gonzalez Moreno, M. Bacteriophage-antibiotic combinations against ciprofloxacin/ceftriaxone-resistant *Escherichia coli* in vitro and in an experimental *Galleria mellonella* model. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2020**, *56*, 106200. [\[CrossRef\]](#)
29. Tkhilashvili, T.; Di Luca, M.; Abbandonato, G.; Maiolo, E.M.; Klatt, A.B.; Reuter, M.; Möncke-Buchner, E.; Trampuz, A. Real-time assessment of bacteriophage T3-derived antimicrobial activity against planktonic and biofilm-embedded *Escherichia coli* by isothermal microcalorimetry. *Res. Microbiol.* **2018**, *169*, 515–521. [\[CrossRef\]](#)
30. RStudio-Team. *RStudio: Integrated Development for R*; RStudio, PBC: Boston, MA, USA, 2020; Available online: <http://www.rstudio.com/> (accessed on 5 April 2022).
31. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th Edition. CLSI Document M100, Table 2D. 2020. Available online: <https://www.nih.org.pk/wp-content/uploads/2021/02/CLSI-2020.pdf> (accessed on 29 March 2022).
32. EUCAST. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 12.0. 2022. Available online: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (accessed on 29 March 2022).
33. Sjogren, U.; Hagglund, B.; Sundqvist, G.; Wing, K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J. Endod.* **1990**, *16*, 498–504. [\[CrossRef\]](#)
34. Ricucci, D.; Russo, J.; Rutberg, M.; Burleson, J.A.; Spångberg, L.S. A prospective cohort study of endodontic treatments of 1369 root canals: Results after 5 years. *Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.* **2011**, *112*, 825–842. [\[CrossRef\]](#)
35. Ricucci, D.; Siqueira, J.F., Jr. Biofilms and apical periodontitis: Study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J. Endod.* **2010**, *36*, 1277–1288. [\[CrossRef\]](#)
36. El-Telbany, M.; El-Didamony, G.; Askora, A.; Ariny, E.; Abdallah, D.; Connerton, I.F.; El-Shibiny, A. Bacteriophages to Control Multi-Drug Resistant *Enterococcus faecalis* Infection of Dental Root Canals. *Microorganisms* **2021**, *9*, 517. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Xiang, Y.; Ma, C.; Yin, S.; Song, F.; Qin, K.; Ding, Y.; Yang, X.; Song, P.; Ji, X.; Wei, Y. Phage therapy for refractory periapical periodontitis caused by *Enterococcus faecalis* in vitro and in vivo. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2022**, *106*, 2121–2131. [\[CrossRef\]](#)

38. Oliva, A.; Furustrand Tabin, U.; Maiolo, E.M.; Jeddari, S.; Bétrisey, B.; Trampuz, A. Activities of Fosfomycin and Rifampin on Planktonic and Adherent *Enterococcus faecalis* Strains in an Experimental Foreign-Body Infection Model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 1284–1293. [\[CrossRef\]](#)
39. El Haddad, L.; Harb, C.P.; Gebara, M.A.; Stibich, M.A.; Chemaly, R.F. A Systematic and Critical Review of Bacteriophage Therapy Against Multidrug-resistant ESKAPE Organisms in Humans. *Clin. Infect. Dis.* **2018**, *69*, 167–178. [\[CrossRef\]](#)
40. Duerkop, B.A.; Huo, W.; Bhardwaj, P.; Palmer, K.L.; Hooper, L.V. Molecular Basis for Lytic Bacteriophage Resistance in *Enterococci*. *mBio* **2016**, *7*, e01304-16. [\[CrossRef\]](#)
41. Chatterjee, A.; Johnson, C.N.; Luong, P.; Hullahalli, K.; McBride, S.W.; Schubert, A.M.; Palmer, K.L.; Carlson, P.E., Jr.; Duerkop, B.A. Bacteriophage Resistance Alters Antibiotic-Mediated Intestinal Expansion of *Enterococci*. *Infect. Immun.* **2019**, *87*, e00085-00019. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Tkhalishvili, T.; Wang, L.; Perka, C.; Trampuz, A.; Moreno, M.G. Using Bacteriophages as a Trojan Horse to the Killing of Dual-Species Biofilm Formed by *Pseudomonas aeruginosa* and Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 695. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Kumaran, D.; Taha, M.; Yi, Q.; Ramirez-Arcos, S.; Diallo, J.S.; Carli, A.; Abdelbary, H. Does Treatment Order Matter? Investigating the Ability of Bacteriophage to Augment Antibiotic Activity against *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 127. [\[CrossRef\]](#)
44. Chaudhry, W.N.; Concepción-Acevedo, J.; Park, T.; Andleeb, S.; Bull, J.J.; Levin, B.R. Synergy and Order Effects of Antibiotics and Phages in Killing *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0168615. [\[CrossRef\]](#)
45. Lebeaux, D.; Leflon-Guibout, V.; Ghigo, J.-M.; Beloin, C. In vitro activity of gentamicin, vancomycin or amikacin combined with EDTA or L-arginine as lock therapy against a wide spectrum of biofilm-forming clinical strains isolated from catheter-related infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **2015**, *70*, 1704–1712. [\[CrossRef\]](#)
46. Tabin, U.F.; Majic, I.; Belkhdja, C.Z.; Bétrisey, B.; Corvec, S.; Zimmerli, W.; Trampuz, A. Gentamicin Improves the Activities of Daptomycin and Vancomycin against *Enterococcus faecalis* In Vitro and in an Experimental Foreign-Body Infection Model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 4821–4827. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Cetinkaya, Y.; Falk, P.; Mayhall, C.G. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **2000**, *13*, 686–707. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Markwart, R.; Willrich, N.; Haller, S.; Noll, I.; Koppe, U.; Werner, G.; Eckmanns, T.; Reuss, A. The rise in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Germany: Data from the German Antimicrobial Resistance Surveillance (ARS). *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* **2019**, *8*, 147. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
49. Machado, F.P.; Khoury, R.D.; Toia, C.C.; Orozco, E.L.F.; de Oliveira, F.E.; de Oliveira, L.D.; da Rosa Cardoso, F.G.; Valera, M.C. Primary versus post-treatment apical periodontitis: Microbial composition, lipopolysaccharides and lipoteichoic acid levels, signs and symptoms. *Clin. Oral Investig.* **2020**, *24*, 3169–3179. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Endo, M.S.; Ferraz, C.C.R.; Zaia, A.A.; Almeida, J.F.A.; Gomes, B. Quantitative and qualitative analysis of microorganisms in root-filled teeth with persistent infection: Monitoring of the endodontic retreatment. *Eur. J. Dent.* **2013**, *7*, 302–309. [\[CrossRef\]](#)
51. Schirmer, J.F.; Liebenow, A.L.; Pelz, K.; Wittmer, A.; Serr, A.; Hellwig, E.; Al-Ahmad, A. New bacterial compositions in root-filled teeth with periradicular lesions. *J. Endod.* **2009**, *35*, 169–174. [\[CrossRef\]](#)
52. Rôças, I.N.; Siqueira, J.F., Jr. Characterization of microbiota of root canal-treated teeth with posttreatment disease. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 1721–1724. [\[CrossRef\]](#)

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Marie Voit hatte Anteil an folgender Publikation:

Voit, M.; Trampuz, A.; Gonzalez Moreno, M. In Vitro Evaluation of Five Newly Isolated Bacteriophages against *E. faecalis* Biofilm for Their Potential Use against Post-Treatment Apical Periodontitis. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1779. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091779>

Impact Factor 2021: 6.525

Der geleistete Beitrag für diese Publikation umfasst die Literaturrecherche, die Konzeptualisierung, die Versuchsplanung und Durchführung, die Datenerfassung, -visualisierung und Interpretation der Ergebnisse, sowie das Verfassen der Publikation. Aufgeführte Tabellen, Formeln und Abbildungen der Publikation fanden im vorliegenden Manteltext Verwendung: Tabelle 1, Formel 1, Abbildungen 1, 2, 3, 4, 5, 6,7.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Mercedes González-Moreno, die mich während meiner Arbeit im Labor intensiv und kontinuierlich betreut hat und mir während des Schreibprozesses stets mit Ratschlägen und Ideen zur Seite stand. Ein großer Dank gilt ebenfalls Andrej Trampuz und der PRO IMPLANT Foundation, die diese Arbeit erst ermöglicht haben. Mit ihrer Hilfe wurde aus einer Idee ein konkretes Forschungsprojekt.

Ich danke ganz herzlich Christian Hannig, der sich die Zeit genommen hat, meine Arbeiten zu begutachten und Ideen zur Verbesserung beigesteuert hat. Weiterhin bedanke ich mich bei den Teams der Berliner Wasserbetriebe der Klärwerke Rudow und Ruhleben für die sehr gute Zusammenarbeit. Der Einrichtung der Elektronenmikroskopie der Charité – Universitätsmedizin Berlin danke ich für die Sammlung der TEM Bilder. Ich danke Martin Schmidt für den steten wissenschaftlichen Austausch und die Motivation für wissenschaftliches Arbeiten. Außerdem danke ich Paul Voit und Konstantin Schildknecht für die Einführung in RStudio. Zuletzt danke ich meiner Familie und meinem Freund für ihre Unterstützung und Rückhalt.