

Aus dem Institut
für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. W. Solbach

Resistenz-Testung von *S. epidermidis* unter Biofilm-Bedingungen:
Ein neues Testverfahren und seine Anwendung

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Heimke von Osten
aus Hamburg

Lübeck 2012

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Johannes Knobloch
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Christoph Härtel

Tag der mündlichen Prüfung: 13.05.2013

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 13.05.2013

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Koagulase-negative Staphylokokken	5
1.1.1	Klassifikation.....	5
1.1.2	Durch Koagulase-negative Staphylokokken hervorgerufene Erkrankungen	6
1.1.3	Pathogenese Fremdkörper-assoziiertes Infektionen durch S. epidermidis.....	6
1.1.4	Antibiotika-Wirkung am Biofilm.....	8
1.1.5	Antibiotika-Resistenz biofilm-ständiger Bakterien – die Persister- Theorie	9
1.2	Voraussetzungen für diese Arbeit.....	10
1.3	Zielsetzung der Arbeit.....	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Material.....	11
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	11
2.1.2	Chemikalien	11
2.1.3	Antibiotika und antibiotisch wirksame Substanzen	12
2.1.4	Medien.....	13
2.1.5	Stämme	14
2.2	Methoden	14
2.2.1	Beurteilung der Biofilm-Bildung.....	14
2.2.2	Resistenz-Testung mittels Agardiffusionstest.....	15
2.2.3	Anheftung an den Zapfen des Transferable Solid Phase (TSP)- Aufsatzes	15
2.2.4	Zellzahlbestimmung von den Zapfen der TSP-Platte	16
2.2.5	Gramfärbung	16
2.2.6	Zellzahlbestimmung planktonischer Zellen	17
2.2.7	Bestimmung der Minimalen-Hemm-Konzentration (MHK).....	17
2.2.8	Bestimmung der Minimalen-Bakteriziden-Konzentration (MBK).....	18
2.2.9	Bestimmung der Minimalen-Anheftungstötenden-Konzentration (MAK)..	18
3	Ergebnisse.....	20

3.1	Charakterisierung der verwendeten <i>S. epidermidis</i> -Stämme.....	20
3.1.1	Beurteilung der Biofilm-Bildung.....	20
3.1.2	Resistenztestung mittels Agardiffusionstest.....	20
3.2	Etablierung der Kultur an den Zapfen der TSP- Polysorp-Platte.....	22
3.3	Zellzahlbestimmung angehefteter und planktonischer Zellen.....	23
3.3.1	Zellzahlbestimmung der angehefteten Zellen an den Zapfen.....	23
3.3.2	Zellzahlbestimmung planktonischer Zellen.....	24
3.3.3	Zellzahlbestimmung der McFarland-0,5-Suspension.....	24
3.3.4	Zellzahlbestimmung der Suspension mit OD ₆₀₀ 1,5.....	25
3.4	Resistenzbestimmung mit verschiedenen Inokula.....	25
3.4.1	Minimale-Hemm-Konzentration (MHK) mit McFarland 0,5.....	25
3.4.2	Minimale-Bakterizide-Konzentration (MBK) mit McFarland 0,5.....	26
3.4.3	MHK und MBK der Gyrasehemmer mit Reserpin (McFarland 0,5).....	27
3.4.4	MHK mit erhöhtem Inokulum.....	28
3.4.5	KBK mit hohem Inokulum.....	30
3.5	Bestimmung der Minimalen-Anheftungstötenden-Konzentration (MAK).....	32
3.5.1	MAK _{homo} und MAK _{hetero} der Standard-Antibiotika.....	33
3.5.2	MAK _{homo} und MAK _{hetero} der Lantibiotika.....	36
3.5.3	MAK _{homo} und MAK _{hetero} der Gyrasehemmer.....	36
3.5.4	MAK _{homo} und MAK _{hetero} der Gyrasehemmer kombiniert mit 0,0072µg/ml Rifampicin.....	38
3.5.5	MAK _{homo} und MAK _{hetero} der Gyrasehemmer kombiniert mit 1µg/ml Rifampicin.....	41
4	Diskussion.....	45
5	Zusammenfassung.....	53
6	Literaturverzeichnis.....	54
7	Danksagungen.....	63
8	Lebenslauf.....	64

1 Einleitung

1.1 Koagulase-negative Staphylokokken

1.1.1 Klassifikation

Staphylokokken sind 0,5 bis 1,5 µm große, grampositive, haufenförmig wachsende, fakultativ anaerobe, nicht sporenbildende, unbewegliche Kokkenbakterien, die zur Katalase-Bildung befähigt sind. Der Name Staphylokokken ist ein eingedeutschter Plural aus dem latinisierten Singular *Staphylococcus*, der sich vom griechischen σταφυλόκοκκος, wörtlich „die Traubenkugel“ ableitet. Dieses wiederum lässt sich vom Alt-Griechischen σταφυλή, staphylé, „die Weintraube“ und κόκκος, kókkos, „das Kügelchen“ ableiten. Der Name bezieht sich auf die für Staphylokokken typische, traubenförmig zusammengelagerte Anordnung in mikroskopischen Präparaten.

Sie wurden ehemals zur Familie *Micrococcaceae* gerechnet, aktuell werden sie in die Familie der *Staphylococcaceae* eingeordnet, die fast ausschließlich fakultativ anaerob wachsen. Ausnahmen bilden wenige obligat anaerobe Subspezies wie der schafadaptierte *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* und der fakultativ pathogene koagulase-negative *Staphylococcus saccharolyticus*.

Eine Differenzierung der einzelnen Spezies innerhalb der Gattung *Staphylococcus* lässt sich mit unterschiedlichen Methoden erreichen. In der medizinischen Routinediagnostik werden aber hauptsächlich diejenigen eingesetzt, die einfach und kostengünstig durchzuführen sind und schnell zu einem Ergebnis führen.

Eine Einteilung der Staphylokokken unter medizinischen Gesichtspunkten ergibt sich aus der positiven bzw. negativen Koagulase-Reaktion, das heißt in Koagulase-positive und Koagulase-negative Spezies. Aus der Gruppe der Koagulase-positiven Staphylokokken ist hier als klinisch bedeutsamster *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* zu nennen. Er zeichnet sich durch zahlreiche Pathogenitätsfaktoren aus und ist einer der häufigsten Infektionserreger beim Menschen. In Form des Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA) ist er zudem ein häufiger Problemkeim in Krankenhäusern.

Koagulase-negative Staphylokokken sind in der Regel Kommensalen der Haut und Schleimhäute und ohne Krankheitsbedeutung. Ausnahme sind immunsupprimierte Patienten und fremdkörperassoziierte Infektionen. Hier besitzen Koagulase-negative Staphylokokken medizinische Bedeutung. Beim Menschen können insbesondere folgende Spezies klinisch in Erscheinung treten:

- *Staphylococcus epidermidis*
- *Staphylococcus haemolyticus*
- *Staphylococcus lugdunensis*

- *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus*

1.1.2 Durch Koagulase-negative Staphylokokken hervorgerufene Erkrankungen

Koagulase-negative Staphylokokken sind fakultativ-pathogene Erreger, die zur normalen Haut- und Schleimhautflora gehören und unter normalen Bedingungen nicht zu einer Erkrankung führen. Zu einer Infektionskrankheit kommt es nur opportunistisch im Falle einer systemischen oder lokalisierten Immunsuppression oder durch die Besiedlung von Polymeroberflächen, wie sie bei implantierten Fremdkörpern vorkommen. Es handelt sich dann in den meisten Fällen um Infektionen mit Erregern der eigenen Hautflora.

Vor allem *Staphylococcus epidermidis* wurde bereits vor mehr als einem Vierteljahrhundert als ein häufiger Erreger chronischer, Fremdkörper-assoziiierter Infektionen identifiziert (Christensen et al., 1982; Marrie et al., 1982; Peters et al., 1981). Bis heute konnten viele der therapeutischen Probleme, vor die eine Fremdkörper-assoziierte Infektion den Kliniker stellt, nicht gelöst werden (Götz and Peters, 2000).

1.1.3 Pathogenese Fremdkörper-assoziiierter Infektionen durch *S. epidermidis*

In verschiedenen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass *S. epidermidis*-induzierte Infektionen darauf zurückzuführen sind, dass *S. epidermidis* auf Polymeroberflächen anheften und dort mehrschichtige Biofilme bilden kann (Montanaro et al., 2007; Rupp et al., 1999b; Rupp et al., 1999a; Rupp et al., 2001). Dafür ist die Expression eines Polysaccharid-interzellulären-Adhäsins (PIA) notwendig, welches Zell-zu-Zell Adhäsion der *S. epidermidis* ermöglicht und durch die Genprodukte des *icaADBC*-Genlocus synthetisiert wird (Heilmann et al., 1996; Mack et al., 1996b; Mack et al., 1996a). Die Biofilm-Formation läuft in zwei Phasen ab, einer Phase der primären Bindung und einer Phase der Akkumulation (Mack et al., 2006; Mack et al., 2007).

Für die Phase der primären Bindung an die Polymeroberflächen spielen verschiedene Faktoren eine Rolle. Dazu zählen hydrophobe Interaktionen und die Existenz wirtseigener Proteine auf der Polymeroberfläche, aber auch spezifische staphylokokkale Faktoren, wie das kapsuläre Polysaccharid-Adhäsins PS/A, das Autolysin AtlE und weitere Oberflächen-Proteine der Staphylokokken (Heilmann et al., 1997; Herrmann et al., 1988; Nilsson et al., 1998; Pascual et al., 1986; Rohde et al., 2007; Tojo et al., 1988; Veenstra et al., 1996).

Nach der ersten Phase der Anheftung folgt eine zweite Phase, in der die Bakterienzellen in einem mehrschichtigen Biofilm akkumulieren, der in eine amorphe Glykokalyx eingebettet ist. Da die Mehrzahl der in diesem Biofilm befindlichen Zellen nicht die Oberfläche des Fremdkörpers berührt, ist die Synthese des Polysaccharid-interzellulären-Adhäsins (PIA) als

Mediator von Zell-zu-Zell-Kontakten der proliferierenden Bakterienzellen essentiell für die Zell-Akkumulation. PIA ist ein lineares poly- β 1-6-*N*-Acetylglucosamin mit partiell *N*-deacetylierten Aminogruppen. Damit unterscheidet sich dieses *N*-Acetylglucosamin deutlich von Chitin, dem häufigsten natürlich vorkommenden Poly-Glukosamin, dieses verfügt über β 1-4-Bindungen (Mack et al., 1996a; Otto et al., 2012).

PIA wird durch die Genprodukte des *icaADBC*-Genlocus synthetisiert (Heilmann et al., 1996; Mack et al., 2000a). *Ica* besteht aus den vier Genen *icaA*, *icaD*, *icaB* und *icaC*, welche in einer Operon-artigen Struktur organisiert sind. Angrenzend an das *ica*-Operon liegt ein regulatorisches Gen, *icaR*, welches an der Regulation der *ica* Gen-Expression beteiligt ist (Conlon et al., 2002; Jefferson et al., 2004; Pintens et al., 2008). Dabei umfasst das Genprodukt *icaA* eine transmembranöse Glukosaminyltransferase von 412 Aminosäuren, welche Glukosamin-Reste von UDP-Glukosamin auf die wachsende Pre-PIA-Kette überträgt (Gerke et al., 1998). *IcaD* liegt zwischen *icaA* und *icaB* und überlappt partiell mit beiden. *IcaA* benötigt zu seiner vollen Funktionsfähigkeit die Anwesenheit von *IcaD*, dessen genaue Rolle allerdings noch unbekannt ist. Auch *IcaD* ist ein Transmembran-Protein. *IcaC* ist ein hydrophobes integrales Membranprotein mit einer Größe von 355 Aminosäuren, welches vermutlich die wachsende Pre-PIA-Kette aus der Zelle exportiert. Dieses kann man aufgrund der Membranständigkeit des Proteins und aufgrund der Tatsache, dass bei *icaC* Mutanten die PIA-Synthese bei einer Kettenlänge von 15 Kohlenhydrat-Resten zum Stillstand kommt, vermuten. So wird ebenfalls angenommen, dass Kettenverlängerung und Export gekoppelt sind und *IcaA*, *IcaD* und *IcaC* einen Komplex bilden (Gerke et al., 1998). Die exportierte Pre-PIA-Kette wird *N*-deacetyliert durch die an der Zelloberfläche lokalisierte PIA *N*-Deacetylase *IcaB*. (Vuong et al., 2004a). Insgesamt sind also alle Genprodukte des *ica*-Operons zur PIA-Synthese notwendig.

Nachdem lange vermutet wurde, dass ohne die Anwesenheit von PIA eine Biofilm-Formation nicht möglich ist, wurden unlängst *S. epidermidis*-Stämme identifiziert, welche zu einer PIA-unabhängigen Biofilm-Bildung befähigt sind. Bei diesen Stämmen wird die Rolle des PIA von verschiedenen Proteinen übernommen (Kogan et al., 2006). Die größte Rolle spielt in diesem Zusammenhang das Akkumulations-assoziierte Protein (Aap) (Hussain et al., 1997). Interessanterweise scheinen aber PIA-abhängige Biofilme robuster und widerstandsfähiger zu sein als PIA-unabhängige (Rohde et al., 2007). Zusätzlich scheint PIA noch weitere, vom Biofilm unabhängige Funktionen in der Immunabwehr der Bakterienzelle zu übernehmen, zum Beispiel wurde es als das Haupt-Hämagglutinin von *S. epidermidis* beschrieben (Mack et al., 1999).

PIA-Produktion und Biofilm-Bildung werden über verschiedene regulatorische Gene wie den alternativen Sigma Faktor δ^B reguliert und durch verschiedene Umweltfaktoren wie Desinfektionsmittel und andere antimikrobielle Substanzen beeinflusst (Baldassarri et al.,

2001; Cramton et al., 2001; Knobloch et al., 2001; Knobloch et al., 2002; Knobloch et al., 2003; Knobloch et al., 2004; Mack et al., 2002; Mack et al., 2007; Pintens et al., 2008; Rachid et al., 2000; Rohde et al., 2001).

1.1.4 Antibiotika-Wirkung am Biofilm

Die in einen Biofilm eingebetteten Zellen scheinen gegen die meisten Antibiotika resistenter zu sein als planktonische Zellen. Dieses Phänomen führt immer wieder zu einem Versagen der antibiotischen Therapie und macht letztendlich eine Entfernung des infizierten Fremdkörpers zur Sanierung der Infektion notwendig. Viele Studien konzentrierten sich deswegen darauf, neue therapeutische Regime zu erstellen. Dabei wird das Ziel verfolgt, das klinische Outcome fremdkörperassoziierter Infektionen zu optimieren und nach Möglichkeit die Entfernung komplexer medizinischer Implantate wie synthetischer Herzklappen oder Gelenk-Prothesen zu vermeiden (Czekaj et al., 2011; König et al., 2001; Roveta et al., 2008; Schierholz et al., 1999; Stein et al., 2000; Zimmerli et al., 1998). In einigen dieser Studien konnte beobachtet werden, dass Gyrasehemmer in Kombination mit Rifampicin erfolgversprechend sind (Barberan et al., 2008; Zimmerli et al., 1998).

Standard Empfindlichkeits-Tests wie die Bestimmung der Minimalen-Hemm-Konzentration (MHK) und der Minimalen-Bakteriziden-Konzentration (MBK) werden in der Regel an planktonischen Zellen oder an Zellen unter optimierten Wachstumsbedingungen auf einem festen Medium durchgeführt. Diese Resistenz-Testungen stellen eine wertvolle diagnostische Hilfe für die Therapie vieler akuter Infektionskrankheiten dar. Im Gegensatz dazu korrelieren bei fremdkörperassozierten Infektionen die unter diesen Bedingungen erhobenen Resistenzprofile für *S. epidermidis* oft nicht mit dem klinischen Ergebnis der antibiotischen Therapie. Dieses Phänomen konnte auch in verschiedenen Tiermodellen beobachtet werden (Cagni et al., 1995; Espersen et al., 1993; Götz and Peters, 2000; Mulcahy et al., 2011; Lucet et al., 1990; Schaad et al., 1994a; Schaad et al., 1994b; Williams et al., 2012).

Es hat zahlreiche Versuche gegeben, mit unterschiedlichen Techniken einen Biofilm zu erzeugen, um die Antibiotika-Resistenz von biofilm-ständigen Bakterien zu untersuchen. Hierbei traten aber verschiedene Probleme auf, wie die praktische Durchführbarkeit und Anwendbarkeit, sowie die Reproduzierbarkeit und Standardisierung im Vergleich zu Untersuchungen an etablierten *in vivo*-Biofilmen (Amorena et al., 1999; Anwar et al., 1992; Berthaud and Desnottes, 1997; Cerca et al., 2005; Duguid et al., 1992; Hamilton-Miller and Shah, 1997; König et al., 2001; Schwank et al., 1998; Yasuda et al., 1994; Zelter et al., 1999). Die Hauptunterschiede der einzelnen Verfahren liegen in den Bedingungen, unter denen die Zellen einen Biofilm ausbilden. Es können Flusskammer- und vergleichbare

Methoden, in denen durch Scherkräfte eine Biofilmbildung erzwungen wird, von sogenannten „steady-state“ Verfahren unterschieden werden, bei denen die Biofilmbildung statisch, das heißt ohne die Einwirkung von Scherkräften, durch Adhäsionsfaktoren der Zellen erfolgt. Viele dieser Systeme sind effektive Modelle zur Demonstration der Biofilm-Bildung, sind aber nicht geeignet zur schnellen Resistenz-Testung in einem klinischen Labor.

1.1.5 Antibiotika-Resistenz biofilm-ständiger Bakterien – die Persister-Theorie

Die Antibiotika-Resistenz von biofilm-ständigen Zellen entzieht sich bislang einer vollständigen Aufklärung. Selbst durch hoch dosierte Antibiotika, die *in vitro* wirksam sind, lässt sich ein Biofilm in aller Regel nicht eradizieren. Zumindest einige der biofilm-ständigen Zellen überleben und führen nach Beendigung der Antibiotika-Exposition zu einer erneuten Besiedlung der Oberfläche. Für dieses Phänomen gibt es verschiedene Erklärungsansätze. Es wurde vermutet, dass die langsame Vermehrung der Bakterien in einem Biofilm Ursache der schlechteren Wirkung vor allem solcher Antibiotika ist, deren Wirksamkeit auf einem schnellen Bakterien-Wachstum beruht (Tuomanen et al., 1986). Ebenso wurde eine reduzierte Diffusion der Antibiotika in die Biofilme und die Existenz einer physikalischen Barriere, die eine Wirkung der Antibiotika verhindert, vermutet (Gilbert et al., 1990; Gordon et al., 1988; Hoyle et al., 1990; Ishida et al., 1998; Nichols et al., 1988; Shigeta et al., 1997). Dem entgegen steht die Tatsache, dass auch Antibiotika wie Fluorchinolone einen Biofilm nicht zu eradizieren vermögen, obwohl diese nicht nur frei in den Biofilm diffundieren (Hassett et al., 1999), sondern auch eine bakterizide Wirkung an ruhenden Zellen entfalten. Eine weitere mögliche Erklärung sind die bereits sehr früh in der Entwicklung der Antibiotika-Therapie beobachteten und beschriebenen sogenannten Persister (Bigger, 1944; Balaban, 2011; Lewis, 2001). Es handelt sich hierbei um einzelne Bakterien eines prinzipiell sensiblen Stammes, die auch unter hohen Antibiotika-Dosen überleben. Diese treten in umso größerer Zahl auf, je langsamer die Bakterien-Population wächst. In *in vitro*-Modellen ist dabei die größte Anzahl an Persistern in ruhenden, planktonischen Kulturen zu beobachten. Die Anzahl von Persistern in Biofilm-Kulturen ist etwas geringer, so dass sich in diesem Fall sogar die planktonische Kultur als resistenter darstellt. Überträgt man diese Situation aber auf ein *in vivo*-Modell, so tritt als neue Komponente das körpereigene Immunsystem hinzu. Während dieses die Persister planktonischer Zellen mühelos bekämpfen kann, so gelangt es nicht zu den Persistern in einem Biofilm, die durch die Matrix des Biofilms vor dem Zugriff immunkompetenter Zellen geschützt sind (Jesaitis et al., 2003; Leid et al., 2002; Vuong et al., 2004b). In dieser Situation gewinnen Persister eine klinische Bedeutung und verhindern die effektive Sanierung besiedelter Fremdkörper selbst durch *in vitro* und auch *in vivo* ansonsten gut wirksame Antibiotika.

Der genaue Mechanismus, der es Persistern erlaubt zu überleben, ist noch nicht vollständig verstanden. Es steht jedoch fest, dass es sich nicht um mutierte Zellen mit neu entstandenen Antibiotika-Resistenzen handelt. Rekultiviert man Persistier, so erhält man eine Kultur mit dem Resistenzprofil des Ausgangsstammes. Die wahrscheinlichste Hypothese zum Resistenzmechanismus der Persistier ist die Toleranzentwicklung gegenüber den eingesetzten Antibiotika, indem eben jener Stoffwechselweg, an dem die Wirkung des Antibiotikums ansetzt, eingestellt wird (Lewis, 2005). Dabei entstehen einzelne, ruhende Zellen, gegen die auch hoch-bakterizide Antibiotika keine Wirkung zeigen. Untersucht man die Genexpression überlebender Persistier nach Antibiotika-Exposition, so stößt man auf zahlreiche Gene der Stress-Antwort sowie auf Gene sogenannter Toxin-Antitoxin-Module (Kim and Wodd, 2010; Leung and Levesque, 2012; Li and Zhang, 2007; Wang and Wood, 2011). Die entstehenden Toxine liegen unter normalen Bedingungen in inaktivem Zustand vor, können aber bei Degradation des schützenden Antitoxins entweder zum Zelltod oder zum vollständigen Stillstand des Zellwachstums führen. Letztgenannter Mechanismus könnte die Antibiotika-Toleranz der Persistier erklären.

1.2 Voraussetzungen für diese Arbeit

Voraussetzungen für diese Arbeit waren die bisherigen Erkenntnisse über die Pathophysiologie von *S. epidermidis*-Infektionen und Biofilm-Bildung, zuletzt die Isolierung des Polysaccharid interzellulären Adhäsins durch Mack et al. (Mack et al., 1996a) sowie die Identifizierung des *icaADBC*-Genlocus als genetisches Korrelat (Mack et al., 2000b).

Voraussetzung war ebenfalls die Bereitstellung der drei verwendeten Wildtypen mit ihren isogenen biofilmbildungsnegativen Tn917-Transposon-Mutanten (Mack et al., 1992; Mack et al., 1996b; Mack et al., 1999; Mack et al., 2002; Nedelmann et al., 1998).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Eines der Ziele dieser Arbeit war die Erstellung eines Systems zur Etablierung von nativen Biofilmen und Resistenz-Testung von biofilm-positiven und biofilm-negativen angehefteten Zellen an einer transferierbaren Oberfläche. Dieses Modell dient sowohl zur Resistenz-Testung angehefteter biofilm-positiver und biofilm-negativer *S. epidermidis*-Stämme, als auch zum Vergleich zwischen biofilm-positiven und biofilm-negativen *S. epidermidis* bezüglich der Resistenz gegen Antibiotika.

Ein weiteres Ziel war die Erprobung dieses neuen Modells anhand einiger gut charakterisierter *S. epidermidis*-Stämme und ihrer biofilm-negativen Mutanten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Brutschrank Kühlzentrifuge Megafuge 1.0 R Sicherheitswerkbank Lamin Air HB 2448	Heraeus-Christ, Osterode
Schüttelinkubator Lab-Shaker	B. Braun, Melsungen
Digital pH-Meter HI 9024	HANNA Instruments, USA
Digital pH-Meter 646	Knick, Berlin
Waage Delta Range PC 4400	Mettler Waagen GmbH, Gießen
Feinwaage 2432	Sartorius, Göttingen
Digital Sonifier Modell 250 D Sonifier Microtip	Branson, Danbury, USA
Spectrophotometer DU 530	Beckmann, München
Lötpistole	Meister, Wuppertal
TSP Polysorp Microwell-Platten 96-well Microwell-Platten 96-well Nunclon Delta	Nunc, Roskilde

2.1.2 Chemikalien

Poly-l-Lysin Poly-l-Glutamat Reserpin	Sigma-Aldrich Chemicals, St. Louis, USA
---	---

D(+)-Glucose Methanol Ethanol absolut 1M HCl K ₂ HPO ₄ 87% Glycerin Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
NaCl	J.T.Baker, Deventer, Holland
NaOH	Roth, Karlsruhe
Fibronectin (pure)	Boehringer, Mannheim

2.1.3 Antibiotika und antibiotisch wirksame Substanzen

Es wurden für jeden Versuch frische Stammlösungen mit einer Konzentration von 10 mg/ml hergestellt. Dabei wurden die Antibiotika nach Herstellerangaben in geeigneten Lösungsmitteln gelöst (Tabelle 1). Alle Antibiotika-Lösungen wurden dann gegebenenfalls mit Aqua dest. verdünnt.

Tabelle 1: Antibiotika und Lösungsmittel

Antibiotikum	Lösungsmittel
Penicillin G Natriumsalz Oxacillin Natriumsalz Vancomycin HCl Gentamicin Sulfat (Sigma-Aldrich Chemicals, St. Louis, USA)	Aqua dest.
Rifampicin Gramicidin D (Sigma-Aldrich Chemicals, St. Louis, USA)	Methanol
Linezolid (Pharmacia & Upjohn, Erlangen)	Ethanol absolut
Ciprofloxacin Moxifloxacin (BayerAG, Leverkusen)	Hälfte des Volumens in Aqua dest., Rest in 0,1 M NaOH tropfenweise

Gemifloxacin (Smith Kline Beecham, Worthing, West Sussex, U.K.)	
Nisin (Sigma-Aldrich Chemicals, St. Louis, USA)	1M HCl, danach steril filtrieren (Thomas and Wimpenny, 1996)
Gatifloxacin (Bristol-Myers Squibb Company, Princeton, USA)	Bereits als Injektionslösung mit einer Konzentration von 10 mg/ml vorliegend

Für die Agardiffusionsmethode verwendete Testblättchen:

BD Sensi-Disc (Becton Dickinson, Cockeysville, Ma, USA) enthaltend Penicillin G, Flucloxacillin, Ampicillin, Ampicillin/Sulbactam, Cefuroxim, Gentamicin, Netilmicin, Clindamycin, Erythromycin, Tetrazyklin, Cotrimoxazol (Trimethoprim und Sulfamethoxazol) sowie Ciprofloxacin.

2.1.4 Medien

Alle Medien wurden in VE-Wasser angesetzt und danach autoklaviert.

TSB (Tryptic Soy Broth):

Becton Dickinson, Cockeysville, Ma. (USA) 30 g TSB (17 g Casein-Hydrolysat, 3 g Sojabohnen-Extrakt, 5 g NaCl, 2,5 g K₂PO₄, 2,5 g Dextrose), ad 1000 ml H₂O.

TSB (Tryptic Soy Broth) ohne Glucose:

17 g Trypton (Oxoid, Basingstoke/England); 3 g neutralisiertes Soja Pepton (Oxoid, Basingstoke/England); 5 g NaCl; 2,5 g K₂HPO₄, ad 1000 ml H₂O.

MH (Müller-Hinton)-Brühe:

Becton Dickinson, Cockeysville, Ma. (USA) 22 g MH (17,5 g Casein-Hydrolysat, 3 g Rindfleisch-Extrakt, 1,5 g Stärke), ad 1000 ml H₂O.

LSLB (Low Salt Luria Bertani)-Brühe:

10 g Trypton (Difco, Detroit/ USA); 5 g Hefe-Extract (Difco, Detroit/ USA); 5 g NaCl, ad 1000 ml H₂O

Einfriermedium:

1,5 g Bacto Pepton (Difco, Detroit/ USA), ad 100 ml H₂O und 60 ml 87% Glycerin wurden getrennt autoklaviert und anschließend vermischt.

2.1.5 Stämme

Tabelle 2: In der Arbeit verwendete *S. epidermidis*-Stämme

Stämme	Referenz	Biofilm	Beschreibung	Resistenz-Profil
1457c	(Mack et al., 1992) (Mack et al., 1996b)	+++	Wildtyp (Isolat infizierter zentraler Venenkatheter)	-
1457-M10	(Mack et al., 1999)	-	Isogene biofilm-negative <i>icaA</i> -Tn917 Mutante	ery
1057	(Nedelmann et al., 1998)	+	Wildtyp (Isolat infizierter zentraler Venenkatheter)	oxa, gm, cot, tet
1057-M10	(Mack et al., 2002)	-	Isogene biofilm-negative <i>icaA</i> -Tn917 Mutante	s.o., ery
9142	(Mack et al., 1999)	++	Wildtyp (Isolat Blutkultur)	pen, cip, cot
9142-M10	(Mack et al., 1999)	-	Isogene biofilm-negative <i>icaA</i> -Tn917 Mutante	s.o., ery

2.2 Methoden

2.2.1 Beurteilung der Biofilm-Bildung

Der Biofilm-Test wurde nach der modifizierten Christensen-Methode (Christensen et al., 1982; Mack et al., 2001) durchgeführt. Von frischen Übernachtskulturen des jeweiligen Stammes auf Columbia-Blutagar wurde in TSB ohne Glucose beimpft und bei 90 - 110 rpm und 37°C über 4 – 8 h eine Schüttelkultur angezüchtet. Diese Vorkultur wurde 1:100 in TSB verdünnt und zu je 200 µl/well in eine Nunclon-Delta-Microwell-Platte pipettiert, wobei für jeden Stamm vier Wells gefüllt wurden. Die Platte wurde anschließend über Nacht (18 – 24 h) bei 37°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Platte viermal mit je 200 µl/well PBS gewaschen und durch Ausschlagen geleert. Der Biofilm bzw. die angehefteten Bakterien am Boden der wells wurden an der Luft getrocknet und schließlich mit je 150 µl/well Gentianaviolett fünf Minuten gefärbt. Nach dem Ausspülen unter fließendem Leitungswasser wurde die Absorption des

gefärbten Bakterienfilms auf dem Boden der Platte bei 570nm Wellenlänge in einem BEPII-Photometer gemessen. Es wurde mit einer Referenzwellenlänge von 405 nm im *evaluation mode* 3 gemessen. Aus den vier Einzelwerten wurde ein Mittelwert gebildet. Ab einer OD₅₇₀ von 0,1 wurde ein Stamm als biofilm-positiv bewertet.

2.2.2 Resistenz-Testung mittels Agardiffusionstest

Die Charakterisierung der verwendeten Stämme anhand des Resistenzprofils wurde mittels einer Standard-Resistenz-Testung durch Agardiffusionsmethode vorgenommen. Vom jeweiligen Stamm wurde eine Suspension mit einer Trübung von McFarland 0,5 hergestellt (McFarland, 1907). Diese wurde mit einem Abstrichtupfer deckend in drei Schichten auf je zwei MH-Agar-Platten aufgetragen. Auf die beimpften Platten wurden je sechs Antibiotikatestblättchen gestempelt. Die Platten wurden über Nacht (18 – 24 h) bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag entsprechend der Grenzwerte der DIN ausgewertet.

Auf die erste Platte kamen Blättchen, die Penicillin G, Flucloxacillin, Ampicillin, Ampicillin in Kombination mit Sulbactam, Cefuroxim und Gentamicin enthielten. Auf die zweite Platte kamen Blättchen, welche Netilmicin, Clindamycin, Erythromycin, Tetrazyklin, Cotrimoxazol (Trimethoprim und Sulfamethoxazol) und Ciprofloxacin enthielten.

2.2.3 Anheftung an den Zapfen des Transferable Solid Phase (TSP)-Aufsatzes

Wir wählten für die Resistenztestung eine Transferable-Solid-Phase (TSP)-Platte mit 96 Zapfen und einer Polysorp-Oberfläche. Es wurden unbeschichtete Platten sowie mit Fibronectin, Poly-L-Lysin und Poly-L-Glutamat beschichtete Platten eingesetzt. Die jeweiligen Beschichtungen erfolgten wie nachfolgend beschrieben.

Das Fibronectin wurde nach Herstellerangaben in Aqua dest. gelöst und als Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml bei -20°C gelagert. Zur Beschichtung wurde die Stammlösung mit PBS auf eine Konzentration von 5 µg/ml verdünnt und zu je 200µl/well in eine Microwell-Platte gegeben. Diese wurde dann mit der TSP-Platte über 18 – 24 h im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die TSP-Platte einmal in 200µl/well PBS gewaschen und ohne Trocknen sofort beimpft. Poly-L-Lysin und Poly-L-Glutamat wurden in PBS in einer Konzentration von 25 mg/ml bzw. 12,5 mg/ml gelöst und bei -20°C gelagert. Die Beschichtung wurde entsprechend der Methode von Budd *et al.* (Budd et al., 1989) durchgeführt. Hierbei wurde Poly-L-Lysin bzw. Poly-L-Glutamat mit PBS auf eine Endkonzentration von 20 µg/ml verdünnt und zu je 200 µl/well in eine Microwell-Platte pipettiert. Die TSP-Platte wurde in dieser Verdünnung 2 Stunden bei 37°C inkubiert, vorsichtig entfernt und 0,5–3 Stunden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank getrocknet.

Der Aufsatz wurde mit den verwendeten *S. epidermidis*-Stämmen unter den verschiedenen Bedingungen beimpft. Es wurde eine Vorkultur von einer frischen Übernachtkultur auf Columbia-Blutagar in 5 ml TSB angesetzt und über 4 – 8 Stunden bei 90 – 110 rpm bei 37°C inkubiert. Diese Vorkultur wurde dann zu je 150 µl/well in eine Mikrotiter-Platte pipettiert und mit der TSP-Platte 1,5 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die TSP-Platte direkt in eine Mikrotiter-Platte mit frischem TSB (150 µl/well) transferiert und über Nacht (18 – 24h) bei 37°C inkubiert. Die Biofilm-Bildung an den Zapfen wurde kontrolliert, indem die TSP-Platte viermal in PBS gewaschen, fünf Minuten mit Gentianaviolett gefärbt und die Biofilm-Bildung dann makroskopisch beurteilt wurde. Hierbei wurde die Einstufung der jeweiligen Stämme im Biofilm-Test als Vergleichsmaßstab herangezogen. Im Folgenden wurden die Versuche nach Beschichtung mit Poly-L-Lysin durchgeführt.

2.2.4 Zellzahlbestimmung von den Zapfen der TSP-Platte

Zur Zellzahlbestimmung an den Zapfen wurden von der TSP-Platte nach Inkubation die bewachsenen Zapfen mittels einer Lötpistole getrennt und mit einer sterilen Pinzette in 2 ml PBS überführt. Es wurden von jedem der verwendeten *S. epidermidis*-Stämme pro Versuch fünf Zapfen untersucht.

Die an den Zapfen angehefteten Zellen wurden durch Ultraschall mobilisiert. Neben einer 5 min Behandlung im Ultraschallbad erfolgte alternativ die Beschallung mit der Microtip-Spitze des Digital Sonifiers über 30s, 60s oder 2mal 30s, mit Amplituden von 40, 50, 60 und 70%. Es wurde jeweils die Anzahl Koloniebildender Einheiten (KBE) auf MH-Agar bestimmt. Das Ausmaß der noch vorhandenen Konglomerate wurde lichtmikroskopisch nach Gram-Färbung eingeschätzt.

Die Zapfen wurden schließlich mit dem Microtip des Digital Sonifiers insgesamt eine Minute in einem Eiswasserbad beschallt. Die Beschallung erfolgte über 2mal 30s mit einer dazwischenliegenden Pause von 30s bei einer Amplitude von 50%.

Die entstandene Suspension wurde in 10er Schritten verdünnt, von jeder Verdünnungsstufe wurden jeweils 100µl deckend auf je drei MH-Agar-Platten ausgeimpft und nach Bebrüten (37°C) über 18 – 24h ausgezählt. Die Verdünnungsstufe mit der optimal auszählbaren Kolonienzahl (150 – 400 Kolonien/Platte) wurde ausgewertet und die Gesamtzahl der KBE/Zapfen berechnet.

2.2.5 Gramfärbung

Sollte nach der Ultraschallbehandlung die Zahl der vorhandenen Konglomerate eingeschätzt werden, so geschah das lichtmikroskopisch nach Gramfärbung. Zunächst erfolgte der Ausstrich von 20 µl Bakterien-Suspension auf einem Objektträger, Lufttrocknen in der

Sicherheitswerkbank und Flammenfixierung. Im ersten Färbeschritt Übersichtung des Präparates mit Gentianaviolett für 1min, im Anschluss folgte die Übersichtung mit Lugol'scher Lösung für 1 min und danach mehrfache Übersichtung mit 96 % Ethanol bis kein Auswaschen der Farbe mehr sichtbar war. Zuletzt wurde das gefärbte Präparat gewaschen, getrocknet und am Lichtmikroskop beurteilt.

2.2.6 Zellzahlbestimmung planktonischer Zellen

Es wurden Zellzahlbestimmungen planktonischer Zellen in Bakterien-Suspensionen verschiedener optischer Dichte durchgeführt. Es wurde zunächst eine standardisierte Suspension mit einer Trübung von McFarland 0,5 hergestellt. Dazu wurden frische Übernachtskolonien von Columbia-Blutagar verwendet und in 0,9% NaCl suspendiert. Die Suspension wurde dann optisch mit einem McFarland 0,5-Standard verglichen, um eine Zellzahl von etwa 10^8 Kolonie-Bildenden-Einheiten (KBE)/ml zu erhalten (McFarland, 1907). Zusätzlich wurde eine Suspension verwendet, die bei 600nm Wellenlänge im Spectrophotometer eine optische Dichte von 1,5 aufwies.

Zur Zellzahlbestimmung wurden beide Suspensionen in 10er Schritten verdünnt und von jeder Verdünnung wurden jeweils 100µl deckend auf drei MH-Agar-Platten ausgeimpft. Die Platten wurden für 18 bis 24h bei 37°C bebrütet und ausgezählt. Dabei wurde jeweils die Verdünnungsstufe gewertet, bei der Koloniezahlen zwischen 150 und 400 Kolonien pro Platte vorlagen. Die erhaltenen drei Werte wurden gemittelt und auf 1 ml hochgerechnet.

2.2.7 Bestimmung der Minimalen-Hemm-Konzentration (MHK)

Wir führten für jeden verwendeten Stamm und jedes verwendete Antibiotikum eine Bestimmung der Minimalen-Hemm-Konzentration (MHK) durch. Die Bestimmung der MHK wurde leicht modifiziert nach dem NCCLS-Standard durchgeführt (Jorgensen et al., 1999). Zunächst wurde eine fortlaufende 1:2 Verdünnungsreihe des Antibiotikums in Müller-Hinton(MH)-Medium hergestellt. Für die Lantibiotika Nisin und Gramicidin D wurden die Versuche in Low Salt Luria Bertani Broth (LSLB) durchgeführt. Für die Versuche wurde die Antibiotika-Lösung jeweils direkt in das Medium gegeben, um eine größere Genauigkeit zu erreichen. Die Verdünnungsreihe wurde zu je 150 µl/well in eine Microwell-Platte gegeben und mit je 2µl McFarland-0,5-Suspension (entsprechend einem Inokulum von 2×10^4 KBE/well bis 3×10^5 KBE/ml) oder 10µl einer OD_{600} 1,5 Suspension (entsprechend einem Inokulum von 6×10^6 KBE/well bis 4×10^7 KBE/ml) inokuliert.

Die Platte wurde für 18 – 24h bei 37°C inkubiert und anschließend ausgewertet. Zur Auswertung wurde die Trübung der Vertiefungen beurteilt und als MHK-Wert die Konzentration angenommen, deren Vertiefung als erste ungetrübt war.

Für Gyrasehemmer-resistente Stämme wurden die Gyrasehemmer zusätzlich in Kombination mit Reserpin getestet. Für diese Versuche wurde das Reserpin in DMSO gelöst und in einer Konzentration von 10µg/ml dem Medium zugesetzt (Roychoudhury et al., 2001).

2.2.8 Bestimmung der Minimalen-Bakteriziden-Konzentration (MBK)

Im Rahmen der Resistenztestung planktonischer Zellen wurde zusätzlich zur MHK auch die Minimale-Bakterizide-Konzentration MBK bestimmt. Dazu wurden aus einer MHK-Platte je 10µl aus allen nicht bewachsenen Vertiefungen ab dem MHK-Wert auf geviertelte Columbia-Blutagar-Platten ausgeimpft und nach Inkubation über 18 bis 24h bei 37°C ausgewertet. Dabei wurde als MBK-Wert die Konzentration angenommen, bei der als erster kein Wachstum mehr auftrat. Da der Begriff MBK für eine MHK mit einem Inokulum von McFarland 0,5 definiert ist, verwendeten wir für die Versuche mit dem Inokulum von OD₆₀₀ 1,5 stattdessen den Begriff Komplet-bakterizide-Konzentration (KBK).

2.2.9 Bestimmung der Minimalen-Anheftungstötenden-Konzentration (MAK)

Wir führten Versuche mit der neuentwickelten Methode der Resistenztestung unter Anheftungsbedingungen mit allen verwendeten Stämmen und allen verwendeten Antibiotika durch. Es wurden für alle Versuche Negativ-Kontrollen durchgeführt. Kontaminierte Versuche wurden nicht gewertet.

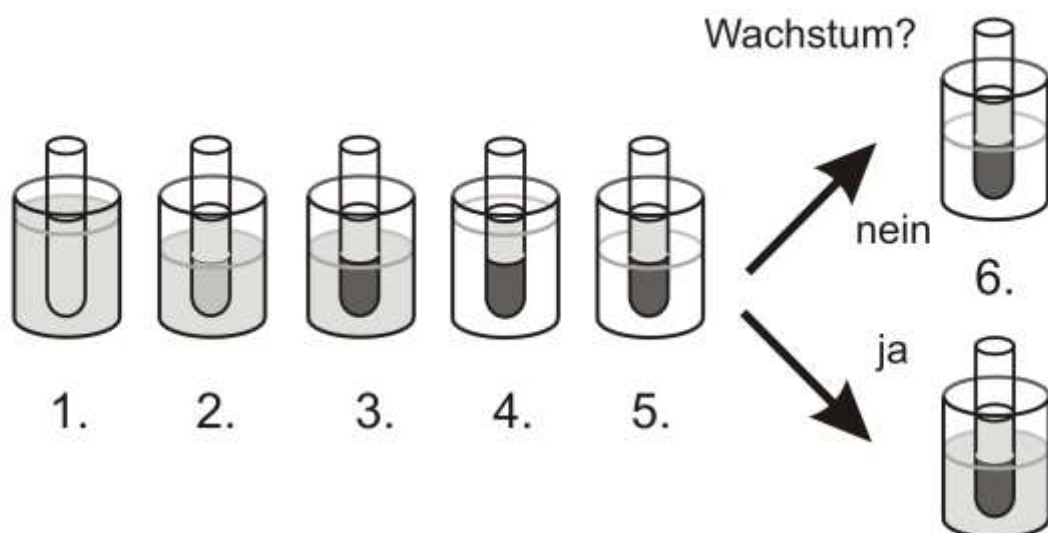


Abb. 1: MAK Bestimmung

Ablauf: **1.** Beschichtung der Zapfen mit Poly-L-Lysin; **2.** Anheftung der Stämme aus frischer Übernachtkultur; **3.** Etablierung von Biofilmen der Wildtypstämme in frischem Medium; **4.**

Inkubation in antibiotikahaltigem Medium; **5.** Anzucht persistierender Zellen in frischem Medium; **6.** Auswertung der MAK

Tag 1:

Als erster Schritt erfolgte die Beschichtung mit Poly-L-Lysin mit 200 µl/well über 2 h bei 37°C (1.). Nach Trocknen der beschichteten TSP-Platte über 0,5 – 3 h erfolgte die Beimpfung mit frischen Vorkulturen mit 150 µl/well über 1,5 h bei 37°C (2.). Nach der Anheftungsphase wurde die TSP-Platte ohne Waschzyklus in eine neue Platte mit frischem TSB (150 µl/well) gegeben und für 18 bis 24h bei 37°C inkubiert (3.).

Tag 2:

Die Antibiotika-Verdünnung wurde in Müller-Hinton(MH)-Medium wie für eine MHK-Bestimmung angesetzt und mit 200 µl/well in eine Platte gegeben. Der hierbei abgedeckte Verdünnungsbereich wurde an die zuvor bestimmten MHK- und MBK-Werte des jeweiligen Stammes angepasst. Die TSP-Platte wurde direkt von der Anzucht-Platte in die Antibiotika-Verdünnung gegeben und wiederum für 18 bis 24 h bei 37°C inkubiert (4.).

Tag 3:

Es erfolgte das Waschen der TSP-Platte in PBS (200 µl/well) für 30s zur Entfernung überschüssigen Antibiotikums und die Überführung in eine frische Wiederanzucht-Platte (TSB mit 150 µl/well) (5.). Erneute Inkubation für 18 bis 24h bei 37°C.

Tag 4:

Zur Auswertung der MAK wurde die Trübung der Vertiefungen in der Wiederanzucht-Platte beurteilt. Als Minimale-Anheftungstötende-Konzentration (MAK) wurde diejenige Antibiotika-Konzentration gewertet, die eine Konzentrationsstufe über dem jeweils letzten getrübbten Well lag. Es wurde eine MAK bei Ende des homogenen Wachstums bestimmt und als MAK_{homo} bezeichnet, sowie eine MAK nach dem allerletzten bewachsenen Well. Letztere wurde als MAK_{hetero} bezeichnet. Alle jenseits der MAK_{homo} bewachsenen Wells wurden erneut ausplattiert. Es wurde die Identität der jeweiligen Stämme mit dem Agardiffusionstest sichergestellt, um eine Kontamination auszuschließen.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der verwendeten *S. epidermidis*-Stämme

Zunächst wurden die verwendeten Wildtypstämme mit ihren korrespondierenden biofilm-negativen Mutanten charakterisiert. Dazu wurde das Biofilmverhalten geprüft, um einen Vergleichsmaßstab für die Stärke der makroskopisch an den Zapfen zu erwartenden Biofilmbildung zur Verfügung zu haben. Weiterhin wurde eine Resistenztestung mittels Agardiffusionstest durchgeführt, um ein reproduzierbares Resistenzprofil zu erhalten, das eine einfache Identifizierung der Stämme ermöglichen sollte.

3.1.1 Beurteilung der Biofilm-Bildung

Das Biofilmverhalten der verschiedenen Stämme wurde mittels eines semiquantitativen Biofilm-Test geprüft (Mack et al., 2001). Als biofilm-positiver Phänotyp wurde eine OD_{570} von $> 0,1$ definiert. Alle getesteten Stämme zeigten ein eindeutiges Ergebnis (Tabelle 3). Der Test wurde jeweils 3-mal durchgeführt und ein Mittelwert für die OD_{570} gebildet.

Tabelle 3: AD_{570} und Biofilmverhalten der getesteten Stämme

Stämme	OD_{570}	Biofilmverhalten
1457c	1,27	positiv
1457-M10	0,01	negativ
1057	0,66	positiv
1057-M10	0,01	negativ
9142	0,96	positiv
9142-M10	0,01	negativ

Erwartungsgemäß zeigten alle Wildtypstämme einen biofilm-positiven Phänotyp, während alle PIA-negativen Mutanten gleichermaßen biofilm-negativ waren.

3.1.2 Resistenztestung mittels Agardiffusionstest

Für alle eingesetzten Stämme wurde die Resistenztestung für die initiale Charakterisierung mit dem Agardiffusionstest durchgeführt. Es zeigte sich, dass alle Stämme ein charakteristisches und reproduzierbares Resistenzprofil aufwiesen, so dass in späteren Experimenten eine schnelle und zuverlässige Identifikation möglich war (Tabelle 4).

Tabelle 4: Resistogramme der verwendeten Stämme und ihrer Mutanten

Antibiotikum	1457c/1457-10	1057/1057-M10	9142/9142-M10
Penicillin G	40/40 ¹ sensibel ²	21/11 resistent	21/20 resistent
Flucloxacillin	40/40 sensibel	24/18 sensibel	34/32 sensibel
Ampicillin	40/40 sensibel	19/15 resistent	24/22 intermediär
Unacid	40/40 sensibel	29/27 sensibel	34/33 sensibel
Cefuroxim	40/40 sensibel	32/31 sensibel	37/35 sensibel
Gentamicin	28/30 sensibel	15/16 sensibel	29/27 sensibel
Netilmicin	30/32 sensibel	29/28 sensibel	31/29 sensibel
Clindamycin	29/0 sens./res.	29/0 sens./res.	26/0 sens./res.
Erythromycin	32/0 sens./res.	31/0 sens./res.	30/0 sens./res.
Tetrazyklin	32/32 sensibel	12/11 resistent	32/32 sensibel
Cotrimoxazol	29/29 sensibel	0/0 resistent	10/2 resistent
Ciprofloxacin	34/32 sensibel	32/32 sensibel	18/16 intermediär

¹Hemmhofdurchmesser in mm

²Resistenzverhalten nach NCCLS

Die Wildtypstämme unterschieden sich von den korrespondierenden Mutanten jeweils durch die auf dem Transposon Tn917 kodierte Resistenz gegenüber Erythromycin und Clindamycin (*erm*). Der Stamm *S. epidermidis* 1057 trägt das Gen *mecA* und ist somit genetisch als Methicillin-resistenter *S. epidermidis* (MRSE) einzuordnen. Diese Eigenschaft

kann jedoch in der Resistenztestung mittels Agardiffusion nicht nachgewiesen werden, da die Expression des Proteins PBP2a nur nach einer spezifischen Induktion erfolgt, welche in diesem Standardtest nicht ausreichend ist.

3.2 Etablierung der Kultur an den Zapfen der TSP- Polysorp-Platte

Nach ausreichender Charakterisierung der *S. epidermidis*-Stämme galt es eine Oberflächenkultur zu etablieren, die sich leicht von einem Medium in ein anderes transferieren lässt, um eine schnelle Resistenztestung zu ermöglichen. In Anlehnung an das MBECTM-Device von Ceri et al. (Ceri et al., 1999) wählten wir dafür die Zapfen einer Transferable-Solid-Phase (TSP)-Platte, welche sich zwischen Mikrotiter-Platten transferieren lässt.

Die für die Biofilmtestung eingesetzte NunclonDelta-Oberfläche ist eine für die Kultivierung adhärerender Zellen optimierte Polymeroberfläche. Die für die geplanten Untersuchungen eingesetzten Deckelplatten mit 96 Zapfen (TSP-Platten) sind nicht mit dieser Oberfläche erhältlich, sondern werden vom Hersteller (Nunc) für die Adhäsion von Proteinen für die ELISA-Testung optimiert (Polysorpoberfläche).

Zunächst sollte überprüft werden, ob die zu untersuchenden Stämme auf der nativen Polysorpoberfläche adhäreren und einen Biofilm ausbilden können. Dabei wurden die unbehandelten TSP-Platten über eine Mikrotiter-Platte mit frischen Vorkulturen beimpft und in eine Wachstumsplatte transferiert. Nach Inkubation für 18 bis 24h und Anfärbung mit Gentianaviolett war selbst für den stark biofilm-positiven *S. epidermidis*-Stamm 1457c makroskopisch keinerlei Biofilm-Bildung erkennbar.

Daher musste die Oberfläche der Zapfen also vorbehandelt bzw. beschichtet werden, um eine stabile Anheftung und Kultur etablieren zu können. Da es im Körper schnell zu einer Sättigung von Polymeroberflächen mit Plasma-Proteinen kommt und an derartigen Oberflächen *S. epidermidis* gut anheften kann, führten wir in Anlehnung an diesen Vorgang zunächst eine Beschichtung mit Fibronectin durch. Damit ließ sich zwar beim stark biofilm-positiven Stamm *S. epidermidis* 1457c eine geringe Biofilm-Bildung erreichen, aber kein reproduzierbarer, homogener Biofilm etablieren. Der Biofilm war bei jedem Versuch unterschiedlich stark ausgeprägt und inhomogen, die schwächer biofilm-positiven Stämme 1057 und 9142 bildeten gar keinen sichtbaren Biofilm aus, so dass dieser Weg nicht weiter verfolgt wurde.

Unter der Annahme, dass durch polare Wechselwirkungen eine bessere Bindung und dadurch Biofilm-Bildung möglich ist, führten wir eine Beschichtung mit Poly-L-Lysin bzw. Poly-L-Glutamat durch. Nach Beschichtung mit beiden Substanzen ließ sich ein gut

sichtbarer Biofilm etablieren, aufgrund der allgemein größeren Erfahrung mit dieser Substanz wurde im weiteren Verlauf Poly-L-Lysin verwendet (s. Abb. 2).



Abb. 2: Anheftung an den Zapfen einer TSP-Platte nach Poly-L-Lysin-Beschichtung. Dargestellt sind der stark biofilm-positive Wildtypstamm *S. epidermidis* 1457c und der schwach biofilmbildende Stamm 9142, sowie ihre korrespondierenden Biofilm-negativen Mutanten nach Färbung mit Gentianaviolett.

3.3 Zellzahlbestimmung angehefteter und planktonischer Zellen

3.3.1 Zellzahlbestimmung der angehefteten Zellen an den Zapfen

Nachdem es gelungen war, einen makroskopisch gut sichtbaren, homogenen Biofilm zu etablieren, bestimmten wir die Zahl angehefteter Zellen an den Zapfen, um Informationen über die Inokula der folgenden Resistenztestung zu erhalten.

Um die Zellzahl an den Zapfen zuverlässig und reproduzierbar bestimmen zu können, musste eine Methode zur Mobilisierung der Zellen von der Oberfläche und aus dem Biofilm etabliert werden. Um jeden Zapfen einzeln untersuchen zu können, wurden diese mit der Lötpistole von der TSP-Platte abgetrennt und mit einer sterilen Pinzette in PBS überführt. Die am Zapfen anheftenden Zellkonglomerate im Biofilm wurden mit Ultraschall aufgebrochen, um die Bakterien von der Oberfläche der Zapfen zu mobilisieren und bei den biofilm-positiven Stämmen zusätzlich die Zell-Zell-Verbindungen zu lösen. Durch die zunächst durchgeführte Behandlung der Zapfen im Ultraschallbad konnte keine ausreichende Mobilisierung der Zellen erreicht werden, so dass die gezielte Behandlung mit dem Microtip des Digital Sonifiers erfolgte. Dieser erlaubt eine intensivere, lokalisierte Ultraschallbehandlung.

Es galt hier einen Mittelweg zwischen intensiver Ultraschallbehandlung zur Lösung der Zell-Zell-Bindungen und dem Absterben der Zellen bei zu intensiver Behandlung zu finden. Das

optimierte Protokoll bestand aus einer Behandlung von zweimal 30s bei einer Amplitude von 50%. Im Intervall von 30s wurde das Probengefäß in Eiswasser gekühlt, um ein Absterben der Zellen durch zu große Hitzeentwicklung auf ein Minimum zu beschränken. Durch diese Behandlung konnte die höchste Zahl an kolonie-bildenden Einheiten (KBE) mobilisiert werden, gleichzeitig konnten mikroskopisch im Gram-Präparat nur noch wenige intakte Zellkonglomerate identifiziert werden. Die in Tabelle 5 aufgeführten Daten sind mit dieser Methode erhoben worden.

Tabelle 5: Zellzahlen an den Zapfen

Stämme	KBE/ml	KBE/Zapfen	KBE/Zapfen-Range
1457c	3×10^6	6×10^6	$4 \times 10^6 - 8 \times 10^6$
1457-M10	1×10^4	2×10^4	$1 \times 10^4 - 4 \times 10^4$
1057	2×10^4	4×10^4	$8 \times 10^3 - 1 \times 10^5$
1057-M10	8×10^3	2×10^4	$2 \times 10^3 - 4 \times 10^4$
9142	2×10^4	4×10^4	$2 \times 10^4 - 8 \times 10^4$
9142-M10	7×10^3	1×10^4	$8 \times 10^2 - 4 \times 10^4$

Aufgrund der relativ großen Schwankungsbreite der Zellzahlen vor allem bei den biofilm-negativen *S. epidermidis*-Stämmen ist zusätzlich zum Mittelwert jeweils die Schwankungsbreite der Zellzahlen pro Zapfen angegeben (KBE/Zapfen-Range) (Tabelle 5). Für jeden Stamm wurden bei jedem Versuch fünf Zapfen untersucht und die Werte gemittelt, der Versuch wurde jeweils 3mal durchgeführt.

Bei den Stämmen 1057 und 9142 betragen die Mittelwerte der biofilm-positiven Wildtypen das Doppelte bzw. das Vierfache der Werte für die biofilm-negativen Mutanten. Beim Stamm 1457c und seiner Mutante wies der Wildtyp einen 300fach höheren Mittelwert auf als seine biofilm-negative Mutante.

3.3.2 Zellzahlbestimmung planktonischer Zellen

3.3.3 Zellzahlbestimmung der McFarland-0,5-Suspension

Um zu untersuchen, inwieweit das Inokulum bei eventuell auftretenden Resistenzunterschieden eine Rolle spielte, war es notwendig, Zellzahlbestimmungen des planktonischen Inokulums der Standard-MHK durchzuführen.

Wir bestimmten zunächst die Zellzahlen des McFarland 0,5-Inokulums, dabei führten wir die Versuche 3mal durch und bildeten einen Mittelwert (Tabelle 6). Es ist zunächst die Zellzahl pro Milliliter angegeben, dann die daraus berechneten Zellzahlen für das standardmäßig gewählte Inokulum von 2µl. Auch hier ist die Schwankungsbreite in KBE/2µl abgegeben. Fettgedruckt sind in Tabelle 6 die KBE, die gut mit den KBE an den Zapfen für den jeweiligen Stamm korrespondieren.

Tabelle 6: Zellzahlen des McFarland 0,5 Standard Inokulums

Stämme	KBE/ml	KBE/2µl	KBE/2µl-Range
1457c	1x10 ⁷	2x10 ⁴	8x10 ³ -4x10 ⁴
1457-M10	1x10 ⁷	2x10⁴	8x10 ³ -4x10 ⁴
1057	2x10 ⁷	4x10⁴	1x10 ⁴ -8x10 ⁴
1057-M10	2x10 ⁷	5x10⁴	2x10 ⁴ -8x10 ⁴
9142	1x10 ⁷	2x10⁴	1x10 ⁴ -4x10 ⁴
9142-M10	2x10 ⁷	4x10⁴	2x10 ⁴ -6x10 ⁴

3.3.4 Zellzahlbestimmung der Suspension mit OD₆₀₀ 1,5

Um auch für den Stamm 1457c eine planktonische MHK mit einem Inokulum, das den KBE an den Zapfen vergleichbar war, zu erhalten, wurde zusätzlich noch ein höheres Inokulum gewählt. Nach dem Testen verschieden konzentrierter Suspensionen wurden 10µl einer Suspension mit einer OD₆₀₀ von 1,5 als hohes Inokulum gewählt. Auch für alle anderen *S. epidermidis*-Stämme wurde eine solche Suspension hergestellt (Tabelle 7). Die Versuche wurden 3mal durchgeführt und daraus jeweils der Mittelwert gebildet. Es sind die Zellzahl pro Milliliter angegeben, die Zellzahl pro 10µl als gewähltes hohes Inokulum sowie auch hier die Schwankungsbreite der Werte in KBE/10µl. Fett gedruckt ist in diesem Fall die Zellzahl pro 10µl für den Stamm 1457c, weil sie sehr gut mit der Zellzahl an den Zapfen für diesen Stamm korrespondiert.

Tabelle 7: Zellzahlen der OD₆₀₀ 1,5 Suspension

Stämme	KBE/ml	KBE/10µl	KBE/10µl-Range
1457c	3x10 ⁸	3x10⁶	3x10 ⁶ -4x10 ⁶
1457-M10	5x10 ⁸	5x10 ⁶	4x10 ⁶ -6x10 ⁶
1057	7x10 ⁸	7x10 ⁶	5x10 ⁶ -9x10 ⁶
1057-M10	6x10 ⁸	6x10 ⁶	4x10 ⁶ -8x10 ⁶
9142	6x10 ⁸	6x10 ⁶	3x10 ⁶ -1x10 ⁷
9142-M10	6x10 ⁸	6x10 ⁶	3x10 ⁶ -7x10 ⁶

3.4 Resistenzbestimmung mit verschiedenen Inokula

3.4.1 Minimale-Hemm-Konzentration (MHK) mit McFarland 0,5

Die MHK diente als Standard-Methode zur Einordnung der Stämme in Resistenzmuster und als Vergleichsmaßstab für die neue Methode MAK. MHKs wurden mit den Antibiotika Vancomycin, Penicillin G, Oxacillin, Gentamicin, Rifampicin und Linezolid, vier verschiedenen Gyrasehemmern und den Lantibiotika Nisin und Gramacidin D durchgeführt. Die verwendeten Gyrasehemmer waren: Ciprofloxacin, Moxifloxacin, Gemifloxacin und

Gatifloxacin. Diese wurden auch in einer Kombination mit Reserpin getestet. Die Lantibiotika wurden exemplarisch nur für den Stamm 1457c und seine Mutante 1457-M10 getestet. In den Tabellen 8 bis 10 sind die nach NCCLS resistenten MHK-Werte jeweils fett gedruckt.

Tabelle 8: MHK-Werte der Standard-Antibiotika und Linezolid

Stämme	Vancomycin	Penicillin	Oxacillin	Gentamicin	Rifampicin	Linezolid
1457c	2 ¹	0,03	0,25	0,25	0,015	1
1457-M10	2	0,03	0,25	0,25	0,015	1
1057	2	16	16	32	0,0072	1
1057-M10	2	32	8	32	0,0072	1
9142	2	32	0,25	0,125	0,0072	2
9142-M10	2	32	0,25	0,125	0,0072	2

¹alle Antibiotika-Konzentrationen sind jeweils in µg/ml angegeben

Tabelle 9: MHK-Werte der Gyrasehemmer

Stämme	Ciprofloxacin	Moxifloxacin	Gemifloxacin	Gatifloxacin
1457c	0,25 ¹	0,06	0,03	0,125
1457-M10	0,25	0,06	0,03	0,125
1057	0,25	0,125	0,03	0,125
1057-M10	0,25	0,06	0,03	0,125
9142	4	1	0,5	2
9142-M10	8	1	0,5	1

¹alle Antibiotika-Konzentrationen sind jeweils in µg/ml angegeben

Tabelle 10: MHK-Werte der Lantibiotika

Stämme	Nisin	Gramicidin D
1457c	4 ¹	1
1457-M10	4	1

¹alle Antibiotika-Konzentrationen sind jeweils in µg/ml angegeben

3.4.2 Minimale-Bakterizide-Konzentration (MBK) mit McFarland 0,5

Für alle MHK-Testungen wurden auch die korrespondierenden MBK-Werte erhoben, um das bakterizide Potential der einzelnen Antibiotika zu bestimmen (Tabelle 11-13). Auch diese Werte dienen als Vergleichsmaßstab für die folgende Resistenz-Testung der Bakterien in angeheftetem Zustand.

Tabelle 11: MBK-Werte der Standard-Antibiotika und Linezolid

Stämme	Vancomycin	Penicillin	Oxacillin	Gentamicin	Rifampicin	Linezolid
1457c	4 ¹	4	16	0,5	2	64
1457-M10	8	4	16	0,25	2	128
1057	16	64	256	>512	0,06	128
1057-M10	8	128	256	>512	0,25	128
9142	2	128	32	2	0,06	128
9142-M10	4	128	32	16	0,06	128

¹ alle Antibiotika-Konzentrationen sind jeweils in µg/ml angegeben

Tabelle 12: MBK-Werte der Gyrasehemmer

Stämme	Ciprofloxacin	Moxifloxacin	Gemifloxacin	Gatifloxacin
1457c	2 ¹	0,5	0,25	0,125
1457-M10	1	0,5	0,5	0,125
1057	0,5	0,25	0,06	0,25
1057-M10	0,5	0,125	0,06	0,125
9142	16	8	128	4
9142-M10	16	4	128	2

¹ alle Antibiotika-Konzentrationen sind jeweils in µg/ml angegeben

Tabelle 13: MBK-Werte der Lantibiotika

Stämme	Nisin	Gramicidin D
1457c	8 ¹	8
1457-M10	16	8

¹ alle Antibiotika-Konzentrationen sind jeweils in µg/ml angegeben

3.4.3 MHK und MBK der Gyrasehemmer mit Reserpin (McFarland 0,5)

Für den Stamm 9142 und seine Mutante 9142-M10, die beide als Gyrasehemmer-resistent einzustufen sind, wurde für alle Gyrasehemmer eine MHK unter Zusatz von 10 µg/ml Reserpin durchgeführt. Da Reserpin bei Staphylokokken die NorA-Effluxpumpe hemmt, ging es darum, diesen Resistenzmechanismus entweder zu beweisen oder auszuschließen. Zur besseren Beurteilbarkeit dieses Resistenzmechanismus sind in Tabelle 14 und 15 die Vergleiche der MHK-Werte und MBK-Werte mit und ohne Reserpin aufgeführt.

Tabelle 14: Vergleich der Gyrasehemmer MHK mit und ohne Reserpin

Stämme	Ciprofloxacin		Moxifloxacin		Gemifloxacin		Gatifloxacin	
	+	-	+	-	+	-	+	-
9142	4 ¹	4	1	1	0,25	0,5	1	2
9142-M10	8	8	1	1	0,5	0,5	2	1

¹ alle Antibiotika-Konzentrationen sind jeweils in µg/ml angegeben

Tabelle 15: Vergleich der Gyrasehemmer MBK mit und ohne Reserpin

Stämme	Ciprofloxacin		Moxifloxacin		Gemifloxacin		Gatifloxacin	
	+	-	+	-	+	-	+	-
9142	512 ¹	16	2	8	2	128	4	4
9142-M10	512	16	2	4	1	128	4	2

¹ alle Antibiotika-Konzentrationen sind jeweils in µg/ml angegeben

Da die Ergebnisse mit und ohne Zusatz von Reserpin nicht signifikant unterschiedlich waren, konnte dieser Resistenzmechanismus ausgeschlossen werden.

3.4.4 MHK mit erhöhtem Inokulum

Die MHK wurde nach Standardbedingungen ermittelt und lediglich als Inokulum 10µl der Bakterien-Suspension mit einer OD₆₀₀ von 1,5 gewählt. Deren KBE lagen zurückgreifend auf die obigen Zellzahlbestimmungen etwa 300fach oberhalb des Standard-Inokulums und korrespondierten damit mit den KBE des Stammes 1457c im Biofilm. Um die Werte richtig einschätzen zu können und etwaige Inokulum-Effekte besser beurteilen zu können, folgt in Tabelle 16 ein direkter Vergleich zwischen der MHK mit dem Standard-Inokulum McFarland 0,5 und der MHK mit dem höheren Inokulum. Fettgedruckt sind in dieser Tabelle alle Werte, die einen Inokulum-Effekt zeigen.

Tabelle 16: Inokulum-Effekte auf die MHK der Standard-Antibiotika und Linezolid

Stämme	Vancomycin		Penicillin		Oxacillin		Gentamicin		Rifampicin		Linezolid	
	0,5 ²	1,5 ³	0,5	1,5	0,5	1,5	0,5	1,5	0,5	1,5	0,5	1,5
1457c	2 ⁴	8 ¹	0,03	0,03	0,25	0,25	0,25	0,25	0,015	0,015	1	2
1457-M10	2	8	0,03	0,03	0,25	0,25	0,25	0,25	0,015	0,015	1	8
1057	2	8	16	256	16	512	32	128	0,0072	0,015	1	4
1057-M10	2	8	32	256	8	512	32	128	0,0072	0,015	1	4
9142	2	8	32	512	0,25	1	0,125	0,25	0,0072	0,015	2	8
9142-M10	2	8	32	512	0,25	1	0,125	0,25	0,0072	0,015	2	4

¹ Fettgedruckt sind alle Werte, die einen Inokulum-Effekt zeigen.

² 2µl McFarland 0,5 Suspension

³ 10 µl OD₆₀₀ 1,5 Suspension

⁴ alle Antibiotika-Konzentrationen sind jeweils in µg/ml angegeben

Für Vancomycin war für alle Stämme ein Anstieg der MHK auf das Vierfache nachzuweisen. Penicillin zeigte für den Stamm 1457c und seine Mutante keinen Unterschied, für den Stamm 1057 und seine Mutante war ein Anstieg auf das 16fache, bzw. das 32fache zu sehen, für den Stamm 9142 und seine Mutante ein 16facher Anstieg. Für Oxacillin waren für das Stammpaar 1457c keine Unterschiede zu beobachten, für 1057 ein Anstieg auf das 32fache bzw. das 64fache, für 9142 ein Anstieg auf Vierfache. Für Gentamicin war für 1457c kein Unterschied zu sehen, für 1057 ein Anstieg auf das Vierfache, für 9142 ein Anstieg auf das

Doppelte. Für Rifampicin war für 1457c kein Unterschied zu sehen, für 1057 und 9142 jeweils ein Anstieg auf das Doppelte. Für Linezolid war für 1457c ein Anstieg auf das Doppelte bzw. das Achtfache zu beobachten, für 1057 ein Anstieg auf das Vierfache, für 9142 ein Anstieg auf das Vierfache bzw. das Doppelte.

Die MHK-Bestimmung unter diesen Bedingungen wurde auch für die Gyrasehemmer durchgeführt und in Tabelle 17 ist der Vergleich zwischen dem McFarland 0,5 und dem hohem Inokulum aufgeführt.

Tabelle 17: Inokulum-Effekte auf die MHK der Gyrasehemmer

Stämme	Ciprofloxacin		Moxifloxacin		Gemifloxacin		Gatifloxacin	
	0,5 ²	1,5 ³	0,5	1,5	0,5	1,5	0,5	1,5
1457c	0,25 ⁴	32 ¹	0,06	8	0,03	0,06	0,125	0,25
1457-M10	0,25	64	0,06	8	0,03	0,06	0,125	0,25
1057	0,25	64	0,125	4	0,03	0,125	0,125	0,5
1057-M10	0,25	64	0,06	4	0,03	0,125	0,125	0,5
9142	4	32	1	2	0,5	1	2	4
9142-M10	8	32	1	2	0,5	1	1	4

¹ Fettgedruckt sind alle Werte, die einen Inokulum-Effekt zeigen.

² 2µl McFarland 0,5 Suspension

³ 10 µl OD₆₀₀ 1,5 Suspension

⁴ alle Antibiotika-Konzentrationen sind jeweils in µg/ml angegeben

Für Ciprofloxacin war für das Stammpaar 1457c ein Anstieg auf das 128fache bzw. das 256fache zu beobachten, für 1057 ein Anstieg auf das 256fache, für 9142 ein Anstieg auf das Achtfache bzw. das Vierfache. Für Moxifloxacin war für das Stammpaar 1457c ein Anstieg auf das 128fache zu beobachten, für 1057 ein Anstieg auf das 32fache bzw. das 64fache, für 9142 ein Anstieg auf das Doppelte. Für Gemifloxacin war für den Stamm 1457c ein Anstieg auf das Doppelte zu beobachten, für 1057 ein Anstieg auf das Vierfache, für 9142 ein Anstieg auf das Doppelte. Für Gatifloxacin war für den Stamm 1457c ein Anstieg auf das Doppelte zu sehen, für 1057 ein Anstieg auf das Vierfache, für 9142 ein Anstieg auf das Doppelte bzw. das Vierfache.

Auch von den Lantibiotika wurde für den Stamm 1457c und seine Mutante unter diesen Bedingungen die MHK bestimmt und auch hier erfolgte ein Direktvergleich der MHK-Werte und ist in Tabelle 18 aufgeführt.

Tabelle 18: Inokulum-Effekte auf die MHK der Lantibiotika

Stämme	Nisin		Gramicidin D	
	0,5 ²	1,5 ³	0,5	1,5
1457c	4 ⁴	8¹	1	4
1457-M10	4	8	1	4

¹ Fettgedruckt sind alle Werte, die einen Inokulum-Effekt zeigen.

² 2µl McFarland 0,5 Suspension

³ 10 µl OD₆₀₀ 1,5 Suspension

⁴ alle Antibiotika-Konzentrationen sind jeweils in µg/ml angegeben

Für Nisin war ein Anstieg auf das Doppelte zu beobachten, für Gramicidin D ein Anstieg auf das Vierfache.

3.4.5 KBK mit hohem Inokulum

Es erfolgte zur Bestimmung der Bakterizidie auch mit dem hohen Inokulum eine Messung der Minimalen-Bakteriziden-Konzentration, bzw. eine Bestimmung der kompletten Bakteriziden Konzentration (KBK).

Tabelle 19 ist eine Aufstellung der dabei erhobenen Werte für die Standard-Antibiotika und Linezolid im Vergleich der verschiedenen Inokula.

Tabelle 19: Inokulum-Effekte auf die MBK/KBK der Standard-Antibiotika und Linezolid

Stämme	Vancomycin		Penicillin		Oxacillin		Gentamicin		Rifampicin		Linezolid	
	0,5 ²	1,5 ³	0,5	1,5	0,5	1,5	0,5	1,5	0,5	1,5	0,5	1,5
1457c	4 ⁴	256¹	4	16	16	64	0,5	4	2	4	64	256
1457-M10	8	512	4	16	16	128	0,25	8	2	4	128	256
1057	16	>512	64	>512	256	>512	>512	>512	0,06	4	128	256
1057-M10	8	>512	128	512	256	>512	>512	>512	0,25	8	128	256
9142	2	256	128	512	32	64	2	2	0,06	4	128	256
9142-M10	4	256	128	512	32	128	16	16	0,06	8	128	512

¹ Fett gedruckt sind alle Werte, die einen Inokulum-Effekt zeigen

² 2µl McFarland 0,5 Suspension

³ 10 µl OD₆₀₀ 1,5 Suspension

⁴ alle Antibiotika-Konzentrationen sind jeweils in µg/ml angegeben

Für Vancomycin war für das Stammpaar 1457c ein Anstieg auf das 32fache zu beobachten, für 1057 ein Anstieg auf das >32fache bzw. das >64fache, für 9142 ein Anstieg auf das 128fache bzw. das 64fache. Für Penicillin war für das Stammpaar 1457c ein Anstieg auf das Vierfache zu sehen, für 1057 ein Anstieg auf das >8fache bzw. das Vierfache, für 9142 ein Anstieg auf das Vierfache. Für Oxacillin war für das Stammpaar 1457c ein Anstieg auf das Vierfache bzw. das Achtfache zu beobachten, für 1057 ein Anstieg auf über das Doppelte, für 9142 ein Anstieg auf das Doppelte bzw. Vierfache. Für Gentamicin war für das

Stammpaar 1457c ein Anstieg auf das Achtfache bzw. 32fache zu sehen, für 1057 war kein Unterschied zu sehen, für 9142 war ebenfalls kein Unterschied zu sehen. Für Rifampicin war für das Stammpaar 1457c ein Anstieg auf das Doppelte zu beobachten, für 1057 ein Anstieg auf das 64fache bzw. das 32fache, für 9142 ein Anstieg auf das 64fache bzw. das 128fache. Für Linezolid war für das Stammpaar 1457c ein Anstieg auf das Vierfache bzw. Doppelte zu beobachten, für 1057 ein Anstieg auf das Doppelte, für 9142 ein Anstieg auf das Doppelte bzw. das Vierfache.

In Tabelle 20 sind die erhobenen KBK-Werte für die Gyrasehemmer im Direktvergleich aufgeführt.

Tabelle 20: Inokulum-Effekte auf die MBK/KBK der Gyrasehemmer

Stämme	Ciprofloxacin		Moxifloxacin		Gemifloxacin		Gatifloxacin	
	0,5 ²	1,5 ³	0,5	1,5	0,5	1,5	0,5	1,5
1457c	2 ⁴	128¹	0,5	16	0,25	32	0,125	64
1457-M10	1	256	0,5	32	0,5	32	0,125	64
1057	0,5	512	0,25	32	0,06	32	0,25	64
1057-M10	0,5	512	0,125	64	0,06	16	0,125	32
9142	16	>512	8	>512	128	512	4	>512
9142-M10	16	>512	4	>512	128	512	2	>512

¹ Fett gedruckt sind alle Werte, die einen Inokulum-Effekt zeigen

² 2µl McFarland 0,5 Suspension

³ 10 µl OD₆₀₀ 1,5 Suspension

⁴ alle Antibiotika-Konzentrationen sind jeweils in µg/ml angegeben

Für Ciprofloxacin war für das Stammpaar 1457c ein Anstieg auf das 64fache bzw. das 256fache, für 1057 ein Anstieg auf das 1024fache, für 9142 ein Anstieg auf das >32fache. Für Moxifloxacin war für das Stammpaar 1457c ein Anstieg auf das 32fache bzw. das 64fache zu beobachten, für 1057 ein Anstieg auf das 128fache bzw. das 512fache, für 9142 ein Anstieg auf das >64fache bzw. das >128fache. Für Gemifloxacin war für das Stammpaar 1457c ein Anstieg auf das 128fache bzw. das 64fache zu sehen, für 1057 ein Anstieg auf das 256fache bzw. das 128fache, für 9142 ein Anstieg auf das Vierfache. Für Gatifloxacin war für das Stammpaar 1457c ein Anstieg auf das 512fache zu beobachten, für 1057 ein Anstieg auf das 256fache, für 9142 ein Anstieg auf das >128fache bzw. auf das >256fache. Auch für die Lantibiotika wurde für jede MHK die korrespondierende KBK bestimmt (Tabelle 21).

Tabelle 21: Inokulum-Effekte auf die MBK/KBK der Lantibiotika:

Stämme	Nisin		Gramicidin D	
	0,5 ²	1,5 ³	0,5	1,5
1457c	8 ⁴	128¹	8	>512
1457-M10	16	128	8	>512

¹ Fett gedruckt sind alle Werte, die einen Inokulum-Effekt zeigen

² 2µl McFarland 0,5 Suspension

³ 10 µl OD₆₀₀ 1,5 Suspension

⁴ alle Antibiotika-Konzentrationen sind jeweils in µg/ml angegeben

Für Nisin war ein Anstieg auf das 16fache bzw. das Achtfache zu beobachten, für Gramicidin D ein Anstieg auf über das 64fache.

3.5 Bestimmung der Minimalen-Anheftungstötenden-Konzentration (MAK)

Wir verwendeten die neu etablierte Methode zur Untersuchung des Resistenzverhaltens von angehefteten *S. epidermidis*. Dabei testeten wir sowohl die Biofilm-positiven Wildtyp-Stämme als auch die Biofilm-negativen Mutanten, welche lediglich an der Oberfläche anhefteten. Die Konzentration, ab der die angehefteten Bakterien abgetötet wurden und nicht mehr wiederanzüchtbar waren, bezeichneten wir als Minimale-Anheftungstötende-Konzentration (MAK).

Bei der Bestimmung der MAK fiel bei der Auswertung auf, dass eine Wiederanzucht der Bakterien nach Inkubation mit höheren Antibiotika-Konzentrationen häufig nur in zufällig verteilten Wells beobachtet werden konnte. Gleichzeitig fiel auf, dass die niedrigste Antibiotika-Konzentration, welche die Wiederanzucht der Bakterien von den Zapfen der TSP erstmals verhindern konnte, einem reproduzierbaren Wert entsprach. Somit gab es eine Antibiotika-Konzentration, bei der das homogene Wachstum der Bakterien abbrach. Sie konnte dort abgelesen werden, wo das erste nicht-bewachsene Well zu beobachten war. Der nächste abzulesende Wert war die ursprünglich als MAK definierte vollständige Hemmung des bakteriellen Wachstums. Es wurde also zusätzlich die Antibiotika-Konzentration dokumentiert, die eine Verdünnungsstufe oberhalb des letzten bewachsenen Wells lag.

Um beide Werte erfassen zu können, wurden für jeden Versuch beide Antibiotika-Konzentrationen dokumentiert und unter den Namen MAK_{homo} und MAK_{hetero} erfasst. Als MAK_{homo} wurde der niedrigere Wert des ersten nicht-bewachsenen Wells bezeichnet, als MAK_{hetero} der ursprünglich als MAK definierte Wert jenseits des letzten bewachsenen Wells (Abb. 3). Beide Werte waren für alle Stämme reproduzierbar zu erheben.

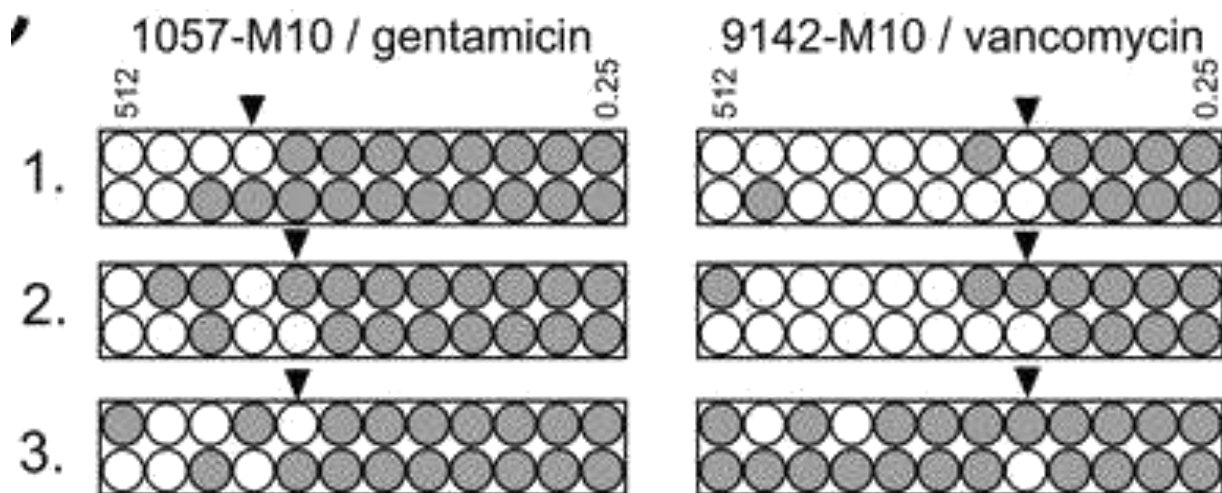


Abb. 3: Darstellung eines repräsentativen Experiments. Die grauen Felder stehen für bewachsene, die weißen für nicht bewachsene Wells. Der Pfeil zeigt die Ablesung der MAK_{homo} an, die MAK_{hetero} wäre jeweils nach dem letzten bewachsenen Well abzulesen.

3.5.1 MAK_{homo} und MAK_{hetero} der Standard-Antibiotika

Zunächst wurden serielle MAK-Bestimmungen für alle standardmäßig eingesetzten Antibiotika durchgeführt und jeweils MAK_{homo} (Tabelle 22) und MAK_{hetero} dokumentiert. Es wurden Mittelwerte aus jeweils fünf Versuchen gebildet. Für das bakteriostatische Antibiotikum Linezolid ergaben sich bereits bei einer Messung für alle Stämme für die MAK_{homo} Werte $>512\mu\text{g/ml}$, so dass auf eine weitere Testung verzichtet wurde.

Tabelle 22: MAK_{homo} der Standard-Antibiotika

Stämme	Vancomycin	Penicillin	Oxacillin	Gentamicin	Rifampicin
1457c	32 [†]	16	64	8	8
1457-M10	>512	0,25	16	0,5	8
1057	4	>512	16	>512	$<0,06$
1057-M10	4	64	8	32	$<0,06$
9142	8	>512	0,5	$<0,25$	0,25
9142-M10	4	256	$<0,25$	$<0,25$	0,125

[†] alle Antibiotika-Konzentrationen sind jeweils in $\mu\text{g/ml}$ angegeben

Für Vancomycin beobachteten wir für den Stamm 1457c, dass die MAK_{homo} der Mutante um das über 16fache höher lag als für den Wildtyp. Für das Stammpaar 1057 ergab sich kein Unterschied, für 9142 lag der Wildtyp beim Doppelten der Mutante. Für Penicillin lagen für das Stammpaar 1457c die Werte des Wildtyps beim 64fachen der Mutante, für 1057 lagen die Werte des Wildtyps oberhalb des Achtfachen der Mutante, für 9142 lagen die Werte für den Wildtyp oberhalb des Doppelten der Mutante. Für Oxacillin lagen für 1457c die Werte

des Wildtyps beim Vierfachen der Mutante, für das Stammpaar 1057 lagen die Werte des Wildtyps beim Doppelten der Mutante, für 9142 lagen die Werte für den Wildtyp ebenfalls beim Doppelten der Mutante. Für Gentamicin beobachteten wir für den Stamm 1457c für den Wildtyp Werte beim 16fachen der Werte für die Mutante. Für den Stamm 1057 lagen die Werte des Wildtyps beim über 16fachen der Werte der Mutante, für das Stammpaar 9142 ergab sich in den Werten zwischen Wildtyp und Mutante kein Unterschied. Für Rifampicin bestand für das Stammpaar 1457c kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante, für 1057 ergab sich ebenfalls kein Unterschied. Für das Stammpaar 9142 lagen die Werte für den Wildtyp beim Doppelten der Werte der Mutante. Wir erhoben für diese Versuchsreihe auch die Werte für die MAK_{hetero} (Tabelle 23).

Tabelle 23: MAK_{hetero} der Standard-Antibiotika

Stämme	Vancomycin	Penicillin	Oxacillin	Gentamicin	Rifampicin
1457c	32 [†]	32	256	16	>128
1457-M10	>512	128	>512	1	8
1057	>512	>512	512	>512	<0,06
1057-M10	>512	128	256	512	0,25
9142	512	>512	128	0,5	2
9142-M10	>512	512	<0,25	0,5	0,5

[†]alle Antibiotika-Konzentrationen sind jeweils in µg/ml angegeben

Für Vancomycin lagen für das Stammpaar 1457c die Werte für die Mutante oberhalb des 16fachen der Werte für den Wildtyp. Für 1057 ergab sich kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante, für 9142 ergab sich ebenfalls kein Unterschied. Für Penicillin ergaben sich für den Stamm 1457c für die Mutante Werte beim Vierfachen des Wildtyps. Für 1057 ergaben sich für den Wildtyp Werte, welche oberhalb des Vierfachen der Mutante lagen. Für 9142 bestand kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante. Für Oxacillin lag für den Stamm 1457c die Mutante oberhalb des Doppelten des Wildtyps. Für 1057 lagen die Werte des Wildtyps beim Doppelten der Werte der Mutante. Für das Stammpaar 9142 lagen die Werte für den Wildtyp beim 512fachen der Mutante. Für Gentamicin ergaben sich für 1457c für den Wildtyp Werte beim 16fachen der Mutante, für 1057 und 9142 ergab sich zwischen Wildtyp und Mutante kein Unterschied. Für Rifampicin beobachteten wir für den Stamm 1457c für den Wildtyp Werte die oberhalb des 16fachen der Mutante lagen. Für 1057 lag die Mutante beim Vierfachen des Wildtyps, für 9142 der Wildtyp beim Vierfachen der Mutante. Zu erwähnen ist dabei bezüglich der Werte für den Stamm 1457c, dass alle oberhalb der MAK_{homo} liegenden bewachsenen Wells erneut subkultiviert wurden und durch eine Standard-MHK überprüft wurde, ob eine neue Resistenz gegen Rifampicin entstanden war. Wir konnten dabei lediglich in einem Fall eine neu entstandene Resistenz mit einer MHK >8µg/ml beobachten, obgleich es sich bei der Resistenz gegen Rifampicin um eine Ein-

Schritt-Resistenz handelt. Vergleich man (Tabelle 24), MAK_{homo} und MAK_{hetero} direkt miteinander, so sah man für Vancomycin für das Stammpaar 1457c weder für Wildtyp noch für Mutante einen Unterschied der Werte.

Tabelle 24: Vergleich MAK_{homo} und MAK_{hetero} der Standard-Antibiotika

	1457c		1457-M10		1057		1057-M10		9142		9142-M10	
	homo	hetero	homo	hetero	homo	hetero	homo	hetero	homo	hetero	homo	hetero
Vancomycin	32 ¹	32	>512	>512	4	>512	4	>512	8	512	4	>512
Penicillin	16	32	0,25	128	>512	>512	64	128	>512	>512	256	512
Oxacillin	64	256	16	>512	16	512	8	256	0,5	128	<0,25	<0,25
Gentamicin	8	16	0,5	1	>512	>512	32	512	<0,25	0,5	<0,25	0,5
Rifampicin	8	>128	8	8	<0,06	<0,06	<0,06	0,25	0,25	2	0,125	0,5

¹ alle Antibiotika-Konzentrationen sind jeweils in $\mu\text{g/ml}$ angegeben

Für 1057 lagen sowohl für Wildtyp als auch für Mutante die Werte der MAK_{hetero} oberhalb des 64fachen der Werte der MAK_{homo} . Für den Stamm 9142 lagen die Werte der MAK_{hetero} beim 32fachen bzw. beim 64fachen der MAK_{homo} . Für Penicillin lagen für das Stammpaar 1457c die Werte für die MAK_{hetero} beim Wildtyp beim Doppelten der MAK_{homo} , bei der Mutante allerdings beim 512fachen der MAK_{homo} . Für den Stamm 1057 gab es beim Wildtyp keinen Unterschied, bei der Mutante lagen die Werte der MAK_{hetero} beim Doppelten der MAK_{homo} . Für den Stamm 9142 ergab sich beim Wildtyp ebenfalls kein Unterschied, bei der Mutante lagen die Werte der MAK_{hetero} beim Doppelten der MAK_{homo} . Für Oxacillin lagen für den Stamm 1457c die Werte der MAK_{hetero} für den Wildtyp beim Vierfachen, für die Mutante beim 32fachen der MAK_{homo} . Für den Stamm 1057 lagen beim Wildtyp die Werte der MAK_{hetero} beim 32fachen der MAK_{homo} , bei der Mutante ebenfalls. Für das Stammpaar 9142 lagen die Werte der MAK_{hetero} für den Wildtyp beim 256fachen der MAK_{homo} , bei der Mutante ergab sich kein Unterschied. Für Gentamicin beobachteten wir für das Stammpaar 1457c bei Wildtyp und Mutante für die MAK_{hetero} jeweils doppelt so hohe Werte wie für die MAK_{homo} . Für den Stamm 1057 ergab sich beim Wildtyp kein Unterschied, bei der Mutante lagen die Werte der MAK_{hetero} 16fach höher als die der MAK_{homo} . Für das Stammpaar 9142 lagen für Wildtyp und Mutante die Werte der MAK_{hetero} jeweils beim Doppelten der MAK_{homo} . Für Rifampicin sahen wir für den Stamm 1457c für den Wildtyp für die MAK_{hetero} Werte, die mehr als 16fach oberhalb denen der MAK_{homo} lagen, für die Mutante bestand kein Unterschied. Für das Stammpaar 1057 ergaben sich für den Wildtyp keine Unterschiede, für die Mutante lag die MAK_{hetero} beim Vierfachen der MAK_{homo} . Für den Stamm 9142 lagen für den Wildtyp die Werte der MAK_{hetero} beim Achtfachen der MAK_{homo} , für die Mutante beim Vierfachen.

3.5.2 MAK_{homo} und MAK_{hetero} der Lantibiotika

MAK-Bestimmungen der Lantibiotika wurden nur exemplarisch mit dem Stamm 1457c und seiner Mutante M10 durchgeführt, da bereits die MHK und MBK jeweils hoch waren. Die Werte der MAK lagen noch höher und damit weit jenseits des therapeutischen Bereiches (Tabelle 25 und 26).

Tabelle 25: MAK_{homo} der Lantibiotika

Stämme	Nisin	Gramicidin D
1457c	>256 ¹	>512
1457-M10	256	>512

¹alle Antibiotika-Konzentrationen sind jeweils in µg/ml angegeben

Tabelle 26: MAK_{hetero} der Lantibiotika

Stämme	Nisin	Gramicidin D
1457c	>256 ¹	>512
1457-M10	256	>512

¹alle Antibiotika-Konzentrationen sind jeweils in µg/ml angegeben

3.5.3 MAK_{homo} und MAK_{hetero} der Gyrasehemmer

Für die vier verwendeten Gyrasehemmer wurden für alle sechs Stämme Werte für MAK_{homo} (Tabelle 27) und MAK_{hetero} erhoben.

Tabelle 27: MAK_{homo} der Gyrasehemmer

Stämme	Ciprofloxacin	Moxifloxacin	Gemifloxacin	Gatifloxacin
1457c	128 ¹	64	8	32
1457-M10	128	1	0,5	16
1057	<0,25	<0,25	<0,06	0,25
1057-M10	<0,25	<0,25	<0,06	0,125
9142	>512	2	2	8
9142-M10	8	1	0,5	4

¹alle Antibiotika-Konzentrationen sind jeweils in µg/ml angegeben

Bei den Gyrasehemmern ließ sich für den Stamm 1457c für Ciprofloxacin eine hohe MAK_{homo} ohne Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante beobachten, für den Stamm 1057 gab es ebenfalls keinen Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante. Für den Stamm 9142 lagen die Werte des Wildtyps oberhalb des 64fachen der Mutante. Für Moxifloxacin konnten wir für den Stamm 1457c für den Wildtyp Werte erheben, die beim 64fachen der Mutante lagen. Für den Stamm 1057 bestand kein Unterschied. Beim Stamm 9142 ergaben sich für den Wildtyp doppelt so hohe Werte wie für die Mutante. Für Gemifloxacin beobachteten wir für den Stamm 1457c für den Wildtyp 16fach so hohe Werte wie für die Mutante. Beim Stamm 1057

ergab sich erneut kein Unterschied. Für den Stamm 9142 lagen die Werte des Wildtyps beim Vierfachen der Mutante. Für Gatifloxacin ergaben sich für den Stamm 1457c für den Wildtyp doppelt so hohe Werte wie für die Mutante. Für den Stamm 1057 lagen die Werte für den Wildtyp ebenfalls doppelt so hoch wie für die Mutante. Für das Stammpaar 9142 ergaben sich ebenfalls doppelt so hohe Werte für den Wildtyp. Es wurde in dieser Versuchsreihe auch die MAK_{hetero} bestimmt (Tabelle 28).

Tabelle 28: MAK_{hetero} mit den Gyrasehemmern

Stämme	Ciprofloxacin	Moxifloxacin	Gemifloxacin	Gatifloxacin
1457c	128 ¹	64	8	>128
1457-M10	512	16	8	128
1057	512	1	0,25	128
1057-M10	512	0,5	0,25	8
9142	>512	>512	256	>512
9142-M10	>512	>512	512	>512

¹alle Antibiotika-Konzentrationen sind jeweils in µg/ml angegeben

Bei der MAK_{hetero} konnten wir für Ciprofloxacin für den Stamm *S. epidermidis* 1457c und seine Mutante 1457-M10 für die Mutante viermal so hohe Werte beobachten wie für den Wildtyp. Für den Stamm 1057 und 9142 ergab sich jeweils kein Unterschied. Für Moxifloxacin lagen für den Stamm 1457c die Werte des Wildtyps vierfach über denen der Mutante. Für 1057 lagen die Werte des Wildtyps doppelt so hoch, für 9142 ergab sich kein Unterschied. Für Gemifloxacin konnten wir für die Stämme 1457c und 1057 jeweils keinen Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante beobachten. Für den Stamm 9142 lagen die Werte für die Mutante beim Doppelten der Werte des Wildtyps. Für Gatifloxacin sahen wir für das Stammpaar 1457c keinen Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante. Für den Stamm 1057 lagen die Werte des Wildtyps 16fach über denen der Mutante. Für den Stamm 9142 ergab sich kein Unterschied. Auch hier erfolgte ein Direktvergleich zwischen MAK_{homo} und MAK_{hetero} (Tabelle 29).

Tabelle 29: Vergleich MAK_{homo} und MAK_{hetero} der Gyrasehemmer

	1457c		1457-M10		1057		1057-M10		9142		9142-M10	
	homo	hetero	homo	hetero	homo	hetero	homo	hetero	homo	hetero	homo	hetero
Ciprofloxacin	128 ¹	128	128	512	<0,25	512	<0,25	512	>512	>512	8	>512
Moxifloxacin	64	64	1	16	<0,25	1	<0,25	0,5	2	>512	1	>512
Gemifloxacin	8	8	0,5	8	<0,06	0,25	<0,06	0,25	2	256	0,5	512
Gatifloxacin	32	>128	16	128	0,25	128	0,125	8	8	>512	4	>512

¹alle Antibiotika-Konzentrationen sind jeweils in µg/ml angegeben

Für Ciprofloxacin konnten wir für den Stamm 1457c für den Wildtyp keinen Unterschied zwischen MAK_{homo} und MAK_{hetero} beobachten, für die Mutante ergaben sich für die MAK_{hetero} vierfach erhöhte Werte. Für den Stamm 1057 ergaben sich für Wildtyp und Mutante jeweils um das 2048fach höhere Werten für die MAK_{hetero} . Für den Stamm 9142 ergab sich für den Wildtyp kein Unterschied, für die Mutante lagen die Werte der MAK_{hetero} 64fach über denen der MAK_{homo} . Für Moxifloxacin beobachteten wir für das Stammpaar 1457c für den Wildtyp keinen Unterschied, für die Mutante lagen die Werte der MAK_{hetero} 16fach über denen der MAK_{homo} . Für den Stamm 1057 lagen für den Wildtyp die Werte der MAK_{hetero} beim Vierfachen, für die Mutante beim Doppelten der MAK_{homo} . Für den Stamm 9142 lagen für den Wildtyp die Werte der MAK_{hetero} bei mehr als dem 256fachen, für die Mutante bei mehr als dem 512fachen der MAK_{homo} . Für Gemifloxacin ergaben sich für den Stamm 1457c für den Wildtyp keine Unterschiede zwischen MAK_{homo} und MAK_{hetero} , für die Mutante lagen die Werte der MAK_{hetero} 16fach höher. Für das Stammpaar 1057 lagen die Werte der MAK_{hetero} für Wildtyp und Mutante jeweils beim Vierfachen über denen der MAK_{homo} . Für den Stamm 9142 lagen die Werte der MAK_{hetero} für den Wildtyp beim 128fachen der MAK_{homo} , für die Mutante beim 1024fachen. Für Gatifloxacin lagen für den Stamm 1457c die Werte der MAK_{hetero} für den Wildtyp bei über dem Vierfachen, für die Mutante beim Achtfachen der MAK_{homo} . Für den Stamm 1057 lagen die Werte der MAK_{hetero} für den Wildtyp beim 512fachen, für die Mutante beim 64fachen der MAK_{homo} . Für das Stammpaar 9142 lagen die Werte der MAK_{hetero} für den Wildtyp oberhalb des 64fachen, für die Mutante oberhalb des 128fachen der MAK_{homo} .

3.5.4 MAK_{homo} und MAK_{hetero} der Gyrasehemmer kombiniert mit 0,0072µg/ml Rifampicin

Zu der Verdünnungsreihe für die Gyrasehemmer wurde Rifampicin in einer fixen Konzentration hinzugesetzt. Zunächst wählten wir dafür eine Konzentration, die im Bereich der erwarteten Standard-MHK für alle untersuchten Stämme lag, nämlich eine Konzentration von 0,0072µg/ml. Es wurden jeweils wieder MAK_{homo} (Tabelle 30) und MAK_{hetero} bestimmt.

Tabelle 30: MAK_{homo} der Gyrasehemmer kombiniert mit 0,0072µg/ml Rifampicin

Stämme	Ciprofloxacin	Moxifloxacin	Gemifloxacin	Gatifloxacin
1457c	128 [†]	64	8	32
1457-M10	256	32	16	32
1057	1	1	0,5	2
1057-M10	0,5	<0,25	<0,06	0,125
9142	>512	256	256	>512
9142-M10	>512	64	256	256

[†]alle Antibiotika-Konzentrationen sind jeweils in µg/ml angegeben

Für Ciprofloxacin beobachteten wir für den Stamm 1457c für die Mutante doppelt so hohe Werte wie für den Wildtyp. Für das Stammpaar 1057 lagen die Werte des Wildtyps beim Doppelten der Mutante, für 9142 beobachteten wir keinen Unterschied. Für Moxifloxacin sahen wir für den Stamm 1457c für den Wildtyp Werte die beim Doppelten der Mutante lagen. Für den Stamm 1057 lagen die Werte für den Wildtyp beim Achtfachen der Mutante. Für das Stammpaar 9142 sahen wir für den Wildtyp Werte, welche beim Vierfachen der Werte der Mutante lagen. Für Gemifloxacin beobachteten wir für den Stamm 1457 für die Mutante doppelt so hohe Werte wie für den Wildtyp. Für den Stamm 1057 lagen die Werte des Wildtyps beim Achtfachen der Mutante, für den Stamm 9142 ergab sich kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante. Für Gatifloxacin ergab sich beim Stamm 1457c kein Unterscheid zwischen Wildtyp und Mutante. Für das Stammpaar 1057 lagen die Werte des Wildtyps beim 16fachen der Mutante. Für den Stamm 9142 beobachteten wir für den Wildtyp Werte, welche oberhalb des Doppelten der Mutante lagen. Wir bestimmten für diese Versuchsreihe auch die MAK_{hetero} (Tabelle 31).

Tabelle 31: MAK_{hetero} der Gyrasehemmer kombiniert mit 0,0072µg/ml Rifampicin

Stämme	Ciprofloxacin	Moxifloxacin	Gemifloxacin	Gatifloxacin
1457c	128 ¹	128	16	32
1457-M10	256	128	16	128
1057	256	16	16	128
1057-M10	512	32	2	32
9142	>512	>512	512	>512
9142-M10	>512	>512	512	>512

¹alle Antibiotika-Konzentrationen sind jeweils in µg/ml angegeben

Für Ciprofloxacin beobachteten wir für die MAK_{hetero} für den Stamm 1457c für die Mutante doppelt so hohe Werte wie für den Wildtyp. Für das Stammpaar 1057 lagen die Werte der Mutante ebenfalls beim Doppelten des Wildtyps. Für den Stamm 9142 ergab sich kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante. Für Moxifloxacin ergab sich für den Stamm 1457c kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante. Für das Stammpaar 1057 lagen die Werte für die Mutante doppelt so hoch wie für den Wildtyp. Für den Stamm 9142 ergab sich kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante. Für Gemifloxacin ergab sich für den Stamm 1457c kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante. Für das Stammpaar 1057 lagen die Werte des Wildtyps beim Achtfachen der Mutante. Für den Stamm 9142 ergab sich kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante. Für Gatifloxacin lagen für den Stamm 1457c die Werte der Mutante beim Vierfachen des Wildtyps. Für das Stammpaar 1057 lagen die Werte des Wildtyps beim Vierfachen der Werte der Mutante. Beim Stamm 9142 ergab sich kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante. Auch in diesem Fall erfolgte ein direkter Vergleich zwischen MAK_{homo} und MAK_{hetero} (Tabelle 32).

Tabelle 32: Vergleich MAK_{homo} und MAK_{hetero} der Gyrasehemmer kombiniert mit 0,0072 $\mu\text{g/ml}$ Rifampicin

	1457c		1457-M10		1057		1057-M10		9142		9142-M10	
	homo	hetero	homo	hetero	homo	hetero	homo	hetero	homo	hetero	homo	hetero
Ciprofloxacin	128 ¹	128	256	256	1	256	0,5	512	>512	>512	>512	>512
Moxifloxacin	64	128	32	128	1	16	<0,25	32	256	>512	64	>512
Gemifloxacin	8	16	16	16	0,5	16	<0,06	2	256	512	256	512
Gatifloxacin	32	32	32	128	2	128	0,125	32	>512	>512	256	>512

¹ alle Antibiotika-Konzentrationen sind jeweils in $\mu\text{g/ml}$ angegeben

Im direkten Vergleich zwischen MAK_{homo} und MAK_{hetero} sahen wir für Ciprofloxacin für den Stamm 1457c bei Wildtyp und Mutante keinen Unterschied der Werte. Für das Stammpaar 1057 lagen die Werte der MAK_{hetero} für den Wildtyp beim 256fachen, für die Mutante beim 1024fachen der MAK_{homo} . Für den Stamm 9142 ergab sich für Wildtyp und Mutante kein Unterschied zwischen MAK_{homo} und MAK_{hetero} . Für Moxifloxacin ergab sich für den Stamm 1457c für den Wildtyp Werte für die MAK_{hetero} , welche beim Doppelten der MAK_{homo} lagen, für die Mutante lagen die Werte beim Vierfachen. Für den Stamm 1057 lagen die Werte des Wildtyps für die MAK_{hetero} beim 16fachen, für Mutante beim 128fachen der MAK_{homo} . Für das Stammpaar 9142 lagen für den Wildtyp die Werte der MAK_{hetero} bei mehr als dem Doppelten der MAK_{homo} , bei der Mutante beim mehr als Achtfachen. Für Gemifloxacin lagen für den Stamm 1457c die Werte der MAK_{hetero} für den Wildtyp beim Doppelten der MAK_{homo} , für die Mutante ergaben sich keine Unterschiede. Für das Stammpaar 1057 lagen für den Wildtyp die Werte der MAK_{hetero} beim 32fachen, für die Mutante ebenfalls beim 32fachen der MAK_{homo} . Für den Stamm 9142 lagen für Wildtyp und Mutante die Werte der MAK_{hetero} beim Doppelten der MAK_{homo} . Für Gatifloxacin ergab sich für das Stammpaar 1457c für den Wildtyp kein Unterschied zwischen MAK_{hetero} und MAK_{homo} , für die Mutante lagen die Werte der MAK_{hetero} vierfach höher. Für den Stamm 1057 lagen für den Wildtyp die Werte der MAK_{hetero} beim 64fachen, für die Mutante beim 256fachen der MAK_{homo} . Für 9142 ergab sich beim Wildtyp kein Unterschied, bei der Mutante lagen die Werte der MAK_{hetero} oberhalb des Doppelten der MAK_{homo} .

Im Vergleich zwischen der MAK_{homo} und MAK_{hetero} mit und ohne Rifampicin in dieser Dosierung konnte kein relevanter Unterschied beobachtet werden. Es ergaben sich keine positiven Effekte auf die MAK durch Rifampicin in einer Dosis von 0,0072 $\mu\text{g/ml}$.

3.5.5 MAK_{homo} und MAK_{hetero} der Gyrasehemmer kombiniert mit 1µg/ml Rifampicin

Da die Kombination von Gyrasehemmer und Rifampicin in niedriger Konzentration keine positiven Effekte gezeigt hatte, wurde als nächstes Rifampicin in einer Konzentration von 1µg/ml verwendet. Auch in dieser Versuchsreihe wurden MAK_{homo} (Tabelle 33) und MAK_{hetero} bestimmt.

Tabelle 33: MAK_{homo} der Gyrasehemmer kombiniert mit Rifampicin 1µg/ml

Stämme	Ciprofloxacin	Moxifloxacin	Gemifloxacin	Gatifloxacin
1457c	64 [†]	4	4	4
1457-M10	64	16	16	16
1057	0,5	0,5	<0,25	<0,25
1057-M10	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
9142	0,5	2	1	32
9142-M10	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25

[†]alle Antibiotika-Konzentrationen sind jeweils in µg/ml angegeben

Für Ciprofloxacin beobachteten wir für den Stamm 1457c keinen Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante. Für das Stammpaar 1057 lagen die Werte des Wildtyps beim Doppelten der Mutante, für den Stamm 9142 ergaben sich ebenfalls für den Wildtyp doppelt so hohe Werte wie für die Mutante. Für Moxifloxacin lagen für den Stamm 1457c die Werte der Mutante beim Vierfachen des Wildtyps. Für den Stamm 1057 lagen die Werte des Wildtyps beim Doppelten der Mutante, für das Stammpaar 9142 lagen die Werte des Wildtyps beim Achtfachen der Mutante. Für Gemifloxacin lagen für den Stamm 1457c die Werte der Mutante beim Vierfachen des Wildtyps. Für das Stammpaar 1057 ergab sich kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante, für den Stamm 9142 lagen die Werte des Wildtyps beim Vierfachen der Mutante. Für Gemifloxacin lagen für den Stamm 1457c die Werte der Mutante beim Vierfachen des Wildtyps. Für den Stamm 1057 ergab sich kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante. Für den Stamm 9142 ergaben sich für den Wildtyp Werte, welche beim 128fachen der Werte der Mutante lagen. Auch für diese Versuchsreihe wurde die MAK_{hetero} bestimmt (Tabelle 34).

Tabelle 34: MAK_{hetero} der Gyrasehemmer kombiniert mit 1µg/ml Rifampicin

Stämme	Ciprofloxacin	Moxifloxacin	Gemifloxacin	Gatifloxacin
1457c	128 [†]	8	8	16
1457-M10	256	32	32	64
1057	0,5	1	8	2
1057-M10	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
9142	512	4	64	256
9142-M10	512	<0,25	4	8

[†]alle Antibiotika-Konzentrationen sind jeweils in µg/ml angegeben

Für Ciprofloxacin konnten wir für die MAK_{hetero} für den Stamm 1457c für die Mutante Werte beim Doppelten des Wildtyps beobachten. Für das Stammpaar 1057 lagen die Werte für den Wildtyp beim Doppelten der Mutante, für den Stamm 9142 beobachteten wir keinen Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante. Für Moxifloxacin lagen für das Stammpaar 1457c die Werte für die Mutante beim Vierfachen des Wildtyps. Für den Stamm 1057 ergaben sich für den Wildtyp Werte beim Vierfachen der Mutante. Für den Stamm 9142 ergaben sich für den Wildtyp Werte, welche beim 16fachen der Werte der Mutante lagen. Für Gemifloxacin ergaben sich für den Stamm 1457c für die Mutante Werte beim Vierfachen des Wildtyps. Für das Stammpaar 1057 ergaben sich für den Wildtyp Werte beim 16fachen der Mutante. Für den Stamm 9142 lagen die Werte des Wildtyps beim 16fachen der Mutante. Für Gatifloxacin ergaben sich für den Stamm 1457c für die Mutante Werte beim Vierfachen des Wildtyps. Für das Stammpaar 1057 lagen die Werte des Wildtyps bei Achtfachen der Mutante. Für den Stamm 9142 lagen die Werte für den Wildtyp beim 32fachen der Werte der Mutante. Auch für diese Versuche verglichen wir MAK_{homo} und MAK_{hetero} direkt miteinander (Tabelle 35).

Tabelle 35: Vergleich MAK_{homo} und MAK_{hetero} der Gyrasehemmer kombiniert mit 1 µg/ml Rifampicin

	1457c		1457-M10		1057		1057-M10		9142		9142-M10	
	homo	hetero	homo	hetero	homo	hetero	homo	hetero	homo	hetero	homo	hetero
Ciprofloxacin	64 ¹	128	64	256	0,5	0,5	<0,25	<0,25	0,5	512	<0,25	512
Moxifloxacin	4	8	16	32	0,5	1	<0,25	<0,25	2	4	<0,25	<0,25
Gemifloxacin	4	8	16	32	<0,25	8	<0,25	<0,25	1	64	<0,25	4
Gatifloxacin	4	16	16	64	<0,25	2	<0,25	<0,25	32	256	<0,25	8

¹ alle Antibiotika-Konzentrationen sind jeweils in µg/ml angegeben

Für Ciprofloxacin beobachteten wir für den Stamm 1457c für den Wildtyp bei der MAK_{hetero} Werte beim Doppelten der MAK_{homo} , für die Mutante lagen die Werte für die MAK_{hetero} beim Vierfachen. Für den Stamm 1057 bestand für Wildtyp und Mutante kein Unterschied zwischen MAK_{homo} und MAK_{hetero} . Für das Stammpaar 9142 lagen für den Wildtyp die Werte der MAK_{hetero} beim 1024fachen, bei der Mutante beim 2048fachen der MAK_{homo} . Für Moxifloxacin ergaben sich für den Stamm 1457c für den Wildtyp und die Mutante für die MAK_{hetero} jeweils Werte beim Doppelten der MAK_{homo} . Für das Stammpaar 1057 beobachteten wir beim Wildtyp für die MAK_{hetero} doppelt so hohe Werte wie für die MAK_{homo} , für die Mutante bestand kein Unterschied. Für den Stamm 9142 sahen wir für den Wildtyp ebenfalls doppelt so hohe Werte der MAK_{hetero} , auch hier bestand für die Mutante kein

Unterschied. Für Gemifloxacin ergaben sich für den Stamm 1457c für Wildtyp und Mutante jeweils doppelt so hohe Werte für die MAK_{hetero} wie für die MAK_{homo} . Für das Stammpaar 1057 ergaben sich Werte der MAK_{hetero} , welche beim Wildtyp beim 32fachen der MAK_{homo} lagen, für die Mutante bestand kein Unterschied. Für den Stamm 9142 ergaben sich für die MAK_{hetero} beim Wildtyp Werte beim 64fachen, bei der Mutante beim 16fachen der MAK_{homo} lagen. Für Gatifloxacin lagen die Werte der MAK_{hetero} für den Stamm 1457c für den Wildtyp und die Mutante beim Vierfachen der MAK_{homo} . Für das Stammpaar 1057 ergaben sich für den Wildtyp für die MAK_{hetero} Werte beim Achtfachen der MAK_{homo} , bei der Mutante bestand kein Unterschied. Für den Stamm 9142 lagen für den Wildtyp die Werte der MAK_{hetero} beim Achtfachen, für die Mutante beim 32fachen der MAK_{homo} .

Zur Einschätzung der Effektivität einer Kombination aus Gyrasehemmer und Rifampicin zur Beeinflussung der MAK verglichen wir die Werte der MAK_{hetero} für die Gyrasehemmer mit und ohne Rifampicin direkt miteinander (Tabelle 36).

Tabelle 36: Vergleich MAK_{hetero} der Gyrasehemmer mit (+) und ohne (-) 1µg/ml Rifampicin, fettgedruckt sind alle Werte, die einen positiven Einfluss des Rifampicin zeigen.

	1457c		1457-M10		1057		1057-M10		9142		9142-M10	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Ciprofloxacin	128 ¹	128	512	256	512	0,5	512	<0,25	>512	512	>512	512
Moxifloxacin	64	8	16	32	1	1	0,5	<0,25	>512	4	>512	<0,25
Gemifloxacin	8	8	8	32	0,25	8	0,25	<0,25	256	64	512	4
Gatifloxacin	>128	16	128	64	128	2	8	<0,25	>512	256	>512	8

¹ alle Antibiotika-Konzentrationen sind jeweils in µg/ml angegeben

Im direkten Vergleich sahen wir für Ciprofloxacin für den Stamm 1457c für den Wildtyp keine Unterschiede in der MAK_{hetero} , für die Mutante lagen die Werte mit Rifampicin halb so hoch wie ohne Rifampicin. Für den Stamm 1057 war für den Wildtyp die MAK_{hetero} um das 1024fache reduziert, für die Mutante waren die Werte um das 2048fache reduziert. Für den Stamm 9142 waren die MAK_{hetero} -Werte mit Rifampicin nicht verändert. Für Moxifloxacin waren für den Stamm 1457c die Werte für den Wildtyp mit Rifampicin um den Faktor acht reduziert, für die Mutante um den Faktor zwei verdoppelt. Für den Stamm 1057 konnten wir für den Wildtyp keinen Unterschied nachweisen, für die Mutante waren die Werte mit Rifampicin halbiert. Für den Stamm 9142 waren für den Wildtyp die Werte mit Rifampicin um mehr als den Faktor 128 reduziert, für die Mutante um mehr als den Faktor 2048. Für Gemifloxacin war für den Wildtyp des Stammes 1457c kein Unterschied nachzuweisen, für die Mutante lagen die Werte mit Rifampicin beim Vierfachen der Werte ohne Rifampicin. Für den Stamm 1057 lagen für den Wildtyp die Werte mit Rifampicin beim 32fachen der Werte

ohne Rifampicin, für die Mutante war die MAK_{hetero} mit Rifampicin um den Faktor zwei reduziert. Für den Stamm 9142 waren die Werte für den Wildtyp mit Rifampicin um den Faktor vier reduziert, für die Mutante um den Faktor 128. Für Gatifloxacin konnten wir für den Stamm 1457c für den Wildtyp mit Rifampicin eine Reduktion der MAK_{hetero} um mehr als den Faktor 8, für die Mutante um den Faktor zwei. Für das Stammpaar 1057 konnten wir für den Wildtyp mit Rifampicin eine Reduktion der MAK_{hetero} um den Faktor 64 nachweisen, für die Mutante um den Faktor 32. Für den Stamm 9142 war für den Wildtyp die MAK_{hetero} mit Rifampicin halbiert, für die Mutante um mehr als den Faktor 64 reduziert.

4 Diskussion

S. epidermidis wurde bereits vor drei Jahrzehnten als einer der Haupterreger fremdkörperassoziierter Infektionen identifiziert (Christensen et al., 1982; Marrie et al., 1982; Peters et al., 1981). Dennoch sind viele der Probleme, die eine fremdkörperassoziierte Infektion im klinischen Alltag aufwirft, noch immer nicht gelöst (Götz and Peters, 2000). Der wichtigste Pathogenitäts-Faktor von *S. epidermidis* ist seine Fähigkeit, an Polymeroberflächen anzuheften und mehrschichtige Biofilme zu bilden. Dieser Pathomechanismus wurde in verschiedenen Tiermodellen bestätigt (Rupp et al., 1999b; Rupp et al., 1999a; Rupp et al., 2001; Zimmerli and Moser, 2012). Die in einen solchen Biofilm eingebetteten Zellen scheinen *in vivo* gegen gängige Antibiotika bedeutend resistenter als planktonische Zellen zu sein, so dass eine Vorhersage über den klinischen Erfolg einer Antibiotika-Therapie anhand eines Standard-Resistenz-Testes nicht möglich ist. Ein Versagen der antibiotischen Therapie führt im klinischen Alltag in der Regel dazu, dass eine Entfernung des infizierten Fremdkörpers zur Sanierung der Infektion unumgänglich ist. Viele Studien haben sich auf die Erstellung eines neuen therapeutischen Regimes konzentriert, um das klinische Ergebnis zu verbessern und eine Entfernung komplexer medizinischer Implantate wie synthetischer Herzklappen und Gelenk-Prothesen zu umgehen (Dominguez-Herrera et al., 2012; König et al., 2001; Schierholz et al., 1999; Stein et al., 2000; Zimmerli et al., 1998).

Eine Voraussetzung für die Optimierung der Therapie fremdkörperassoziierter Infektionen ist die Existenz eines Testverfahrens, anhand dessen sich das klinische Outcome einer solchen Infektion mit einer größeren Genauigkeit vorhersagen lässt (Cagni et al., 1995; Espersen et al., 1993; Götz and Peters, 2000; Lucet et al., 1990; Schaad et al., 1994a; Schaad et al., 1994b). Eine solche Vorhersage ist durch Standard-Testverfahren, die mit planktonischen Zellen oder Zellen unter optimierten Wachstumsbedingungen auf einem festen Medium arbeiten, nicht gewährleistet. Daher wurden verschiedene Techniken entwickelt, um die Antibiotika-Resistenz von Biofilm-Populationen zu testen. Allerdings sind alle diese Techniken mit multiplen Problemen und Schwierigkeiten im Hinblick auf Praktikabilität und Vergleichbarkeit behaftet (Amorena et al., 1999; Anwar et al., 1992; Berthaud and Desnottes, 1997; Ceri et al., 1999; Ceri et al., 2001; Duguid et al., 1992; Hamilton-Miller and Shah, 1997; König et al., 2001; Schwank et al., 1998; Yasuda et al., 1994; Zilver et al., 1999). Daher wurde in dieser Arbeit ein alternatives Testverfahren entwickelt, welches im Vergleich zu den anderen veröffentlichten Modellen zum Verhalten von bakteriellen Biofilmen *in vitro* einfach und schnell durchführbar ist und zusätzlich das natürliche Verhalten des jeweiligen Isolates berücksichtigt. So ist das von Robinson et al. entwickelte Verfahren zur Erzeugung von Biofilmen der Mundflora technisch sehr aufwendig durchzuführen (Robinson et al.,

1997). Dahingegen ist das von Ceri et al. entwickelte MBECTM-Device zwar gut handhabbar, hat aber den Nachteil, dass in diesem Verfahren die zu testenden Stämme unabhängig von der Biofilmbildung unter physiologischen Bedingungen durch den Einsatz von Scherkräften zur Erzeugung eines Biofilms gezwungen werden. Unsere Methode ermöglicht hingegen auch die Resistenz-Testung von biofilm-negativen *S. epidermidis*-Stämmen in angeheftetem Zustand, abhängig eben vom natürlichen Verhalten des jeweiligen Isolates. Da zum Zeitpunkt unserer Studie das MBECTM-Device von Ceri et al. kommerziell nicht erhältlich war, entschlossen wir uns zur Entwicklung eines eigenen Testverfahrens.

Wir entwickelten eine vielseitige Methode zur schnellen Resistenz-Testung angehefteter *S. epidermidis* innerhalb oder außerhalb eines Biofilms. Es war notwendig, eine Testung biofilm-integrierter Zellen zu ermöglichen, da viele klinische *S. epidermidis*-Isolate *icaADBC*- und biofilm-positiv sind, obwohl die kommensal isolierten *S. epidermidis*-Stämme größtenteils *icaADBC*- und biofilm-negativ sind (Arciola et al., 2001; Baddour et al., 1988; Christensen et al., 1994; Galdbart et al., 2000; Ziebuhr et al., 1997). Aber auch unter den infektiösen *S. epidermidis*-Stämmen sind bis zu 50% *icaADBC*- und biofilm-negativ (Arciola et al., 2001).

Wir konzentrierten uns auf die Etablierung eines Testverfahrens, mit welchem man in Abhängigkeit von der physiologischen Fähigkeit der einzelnen Stämme zur Biofilm-Bildung sowohl biofilm-positive als auch biofilm-negative Stämme testen konnte. Um dieses System zu evaluieren, verwendeten wir drei gut charakterisierte biofilm-positive klinische Isolate und ihre jeweiligen biofilm-negativen Mutanten, deren Fähigkeit zur Anheftung nicht eingeschränkt war. Die verwendeten Stämme wiesen gut bekannte und charakteristische Resistenz-Muster auf.

Anheftung und Biofilm-Bildung wurden an den Zapfen eines Transferable-Solid-Phase-Aufsatzes etabliert, um Transfer und Waschen der Zellen sowie die Bildung von Biofilmen einfach zu ermöglichen. Die Polysorboberfläche der verwendeten TSP-Aufsätze ist für die Adsorption von Proteinen sowie von verschiedensten polymeren Substanzen konzipiert. Daher könnten die TSP leicht für die Anheftung anderer Organismen optimiert werden und auf diese Weise ein geeignetes *in vitro* Modell für verschiedene fremdkörperassoziierte Infektionen darstellen. Analog zur schnellen Sättigung von Fremdkörperoberflächen mit wirtseigenen Matrix-Proteinen *in vivo* lassen sich die Oberflächen der TSP ebenfalls leicht beladen (Francois et al., 1998; Vaudaux et al., 1990; Vaudaux et al., 1995). Zusätzlich können die TSP-Platten schnell in frisches Medium transferiert werden und erlauben dadurch die Anzüchtung replizierter gealterter Biofilme unter aseptischen Bedingungen. Da die verwendeten Oberflächen leicht zu modifizieren sind, ist das Verfahren außerordentlich vielseitig. Da auch TSPs mit anderer Oberflächenbeschaffenheit kommerziell erhältlich sind, lässt sich das Verfahren sogar noch variabler für verschiedene Bakterien einsetzen.

Auf der nativen Oberfläche des TSP Polysorp war keine ausreichende Anheftung der *S. epidermidis*-Stämme für eine Biofilm-Bildung möglich. Aus diesem Grunde wurden die TSP-Platten mit verschiedenen Substanzen beschichtet, um die Anheftung zu optimieren. Unter Verwendung von Poly-L-Lysin und Poly-L-Glutamat konnte für den Stamm 1457c eine kräftige Biofilm-Bildung beobachtet werden (s. Abb. 2), während mit Fibronectin nur schwache, inhomogene Biofilme ausgebildet wurden. Da aber eine Anheftung von *S. epidermidis* an Fibronectin nachgewiesen werden konnte (Mack et al., 2001; Rupp et al., 1999a), ist zu erwarten, dass unsere Bedingungen für die Fibronectin-Beschichtung nicht optimal waren. Die gute Anheftung bei Beschichtung mit Poly-L-Lysin bzw. Poly-L-Glutamat, weist auf polare Interaktionen zwischen Bakterium und Oberfläche hin. Aufgrund der größeren Erfahrung mit Poly-L-Lysin haben wir dieses in den weiteren Untersuchungen für die Oberflächenmodifikation eingesetzt.

Wir führten nach Etablierung des Biofilmes an den Zapfen Zellzahlbestimmungen durch, um die Zahl der pro Zapfen vorhandenen Bakterien realistisch einzuschätzen. Zum einen war diese Bestimmung notwendig, um die Anheftung der biofilm-negativen, makroskopisch nicht einzuschätzenden *S. epidermidis*-Stämme zu kontrollieren. Andererseits beeinflusst die Zahl der angehefteten Zellen, also das Inokulum bei zukünftigen Resistenz-Testungen, natürlich auch das Ergebnis. Um möglichst vergleichbare Resistenz-Bestimmungen mit planktonischen Zellen durchführen zu können, musste dieses Inokulum für jeden Stamm genau bekannt sein.

Zur Mobilisierung der angehefteten Zellen von den Zapfen verwendeten wir Ultraschall. Dabei galt es, einen Mittelweg zu finden, der möglichst viele Zellen mobilisierte und voneinander trennte, ohne zu viele dabei abzutöten.

Zur Optimierung der Vergleichbarkeit von Tests planktonischer und angehefteter Zellen berücksichtigten wir vor allem zwei Vermutungen bezüglich fremdkörperassoziierter Infektionen. Erstens kommt es bei fremdkörperassozierten Infektionen häufig zur Akkumulation sehr hoher Zellzahlen im Biofilm. Zweitens ist das Immunsystem nicht fähig, angeheftete und biofilm-ständige Zellen zu entfernen, weil es in der unmittelbaren Umgebung eines Fremdkörpers zu lokalen Granulozyten-Defekten kommt (Vaudaux et al., 1985; Zimmerli et al., 1984). Zusätzlich sind Phagozyten nicht in der Lage, intakte Biofilme abzutragen (Costerton et al., 1999). Aus den genannten Gründen ist bei einer fremdkörperassozierten Infektion die komplette antibiotische Eradikation der angehefteten Bakterien notwendig, um zur Heilung zu führen.

Zur Untersuchung möglicher Inokulum-Effekte führten wir MHK- und MBK-Bestimmungen von allen Stämmen mit planktonischen Zellen mit zwei verschiedenen Inokula durch. Als hohes Inokulum wählten wir dabei eine Zellzahl, die der Zahl der angehefteten Zellen an den Zapfen für den Wildtyp 1457c entsprach, der bei dieser Untersuchung Zellzahlen bis 6×10^6

erreichte. Das standardisierte McFarland 0,5 Inokulum entsprach der Zellzahl der biofilm-negativen Mutanten an den Zapfen, sowie der der anderen Wildtypen, deren Zellzahlen nur etwa um das Doppelte über denen der Mutanten lagen zwischen $1 - 4 \times 10^4$ (vergleiche Tabellen 5, 6 und 7). Die verschiedenen untersuchten *S. epidermidis*-Stämme zeigten dabei unterschiedlich starke Inokulum-Effekte für die getesteten Antibiotika (vergleiche Tabellen 17 - 21), so dass man nicht generell Inokulum-Effekte für *S. epidermidis* voraussetzen oder ausschließen kann. Klinische Isolate müssen also jeweils individuell untersucht werden. Für die getesteten Chinolone zeigten sich für Ciprofloxacin und Moxifloxacin gut erkennbare, für die neueren Gyrasehemmer Gatifloxacin und Gemifloxacin aber nur milde Inokulum-Effekte für die MHK, während für alle Chinolone deutliche Inokulum-Effekte im Bereich der MBK zu beobachten waren (vergleiche Tabellen 17 und 20). Die MBK-Werte mit hohem Inokulum lagen dabei in vielen Fällen weit jenseits des therapeutischen Bereiches. Diese Daten weisen darauf hin, dass Inokulum-Effekte auf die MBK unabhängig von den erhobenen MHK-Werten sein können. Daraus lässt sich schließen, dass zumindest für Chinolone die MHK alleine keinen prädiktiven Wert für das klinische Outcome einer fremdkörperassoziierten Infektion mit hoher Bakterien-Dichte hat.

Die Minimale-Anheftungstötende-Konzentration (MAK) wurde wie oben beschrieben für die Antibiotika Penicillin, Oxacillin, Vancomycin, Gentamicin und Rifampicin, für die Gyrasehemmer Ciprofloxacin, Moxifloxacin, Gemifloxacin und Gatifloxacin und für die Lantibiotika Nisin und Gramicidin D bestimmt.

Bei der Auswertung der MAK konnten zwei eindeutig abgrenzbare Resistenz-Muster für die einzelnen Stämme beobachtet werden. Eine MAK_{homo} , die homogene Resistenz mit einem reproduzierbaren Abbruch-Punkt, konnte für alle Stämme und alle getesteten Antibiotika erfasst werden. Zusätzlich konnte man für viele Stämme und Antibiotika ein davon differentes heterogenes Resistenz-Muster (MAK_{hetero}) beobachten, mit Werten, die bis zum 4096fachen der MAK_{homo} reichten (vergleiche Tabellen 24 und 29, Abb. 3). Für die biofilm-negativen Mutanten konnten für viele Antibiotika und Stämme niedrigere Werte für die MAK_{homo} beobachtet werden als für die biofilm-positiven Wildtypen. Dieses Phänomen könnte auf Inokulum-Effekte zurückzuführen sein. Eindrücklich war dieser Effekt zum Beispiel für den Stamm 1457c für Penicillin und Gentamicin mit bis zu 64fach höheren Werten für den Wildtyp (vgl. Tabelle 22). Bei diesem Stamm lag beim Wildtyp ein wesentlich höheres Inokulum vor als bei der Mutante (2×10^4 versus 6×10^6). In vielen Fällen ergaben sich solche Unterschiede aber auch für die anderen Stämme, deren Inokulum beim Wildtyp maximal doppelt so hoch lag wie bei der Mutante. Solche Werte konnten wir zum Beispiel beim Stamm 9142 für Ciprofloxacin (vgl. Tabelle 27) beobachten oder für den Stamm 1057 für Gentamicin (vgl. Tabelle 22). Die Tatsache, dass sich auch bei diesen Stämmen Unterschiede bis zum 64fachen zwischen Wildtyp und Mutante ergaben, obwohl hier kein

relevanter Unterschied im Inokulum besteht, spricht gegen einen reinen Inokulum-Effekt als Erklärung.

Die Werte für die MAK_{hetero} dagegen waren für die meisten Antibiotika und Stämme vergleichbar ohne einen Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante (vergleiche Tabellen 25 und 30). Diese Daten korrelieren gut zu dem für gram-negative Bakterien und Enterokokken evaluierten Modell der Persistenz einzelner Zellen (Persister) im Biofilm unter Antibiotika-Therapie (Keren et al., 2004; Lewis, 2000; Lewis, 2007; Spoering and Lewis, 2001; Wiederhold et al., 2005).

Sowohl die MAK_{hetero} als auch die MAK_{homo} waren höher als die entsprechenden MHKs der jeweiligen Stämme. Dieser Effekt wurde bereits für die MBEC für *E. coli*, *P. aeruginosa* und *S. aureus* beschrieben (Ceri et al., 1999). Wenn man allerdings die MAK_{homo} und MAK_{hetero} mit der MBK mit verschiedenen Inokula für den jeweiligen Stamm und das getestete Antibiotikum verglich, so ergab sich ein individuell unterschiedliches Verhalten der verschiedenen Stämme angehefteter *S. epidermidis* (Tabelle 37 und 38).

Tabelle 37: Vergleich der MBK mit entsprechendem Inokulum mit der MAK_{hetero} für die Standard-Antibiotika

Stämme	Vancomycin		Penicillin		Gentamicin		Oxacillin		Rifampicin	
	MBK	MAK	MBK	MAK	MBK	MAK	MBK	MAK	MBK	MAK
1457c	256 ¹	32	16	32	4	16	64	256	4	>128
1457-M10	8	>512	4	128	0,25	1	16	>512	2	8
1057	16	>512	64	>512	>512	>512	256	512	0,06	<0,06
1057-M10	8	>512	128	128	>512	512	256	256	0,25	0,25
9142	2	512	128	>512	2	0,5	32	128	0,06	2
9142-M10	4	>512	128	512	16	0,5	32	<0,25	0,06	0,5

¹ alle Antibiotika-Konzentrationen sind jeweils in µg/ml angegeben

Tabelle 38: Vergleich der MBK mit entsprechendem Inokulum mit der MAK_{hetero} für die Gyrasehemmer

Stämme	Ciprofloxacin		Moxifloxacin		Gemifloxacin		Gatifloxacin	
	MBK	MAK	MBK	MAK	MBK	MAK	MBK	MBK
1457c	128 ¹	128	16	64	32	8	64	>128
1457-M10	1	512	0,5	16	0,5	8	0,125	128
1057	0,5	512	0,25	1	0,06	0,25	0,25	128
1057-M10	0,5	512	0,125	0,5	0,06	0,25	0,125	8
9142	16	>512	8	>512	128	256	4	>512
9142-M10	16	>512	4	>512	128	512	2	>512

¹ alle Antibiotika-Konzentrationen sind jeweils in µg/ml angegeben

Für einige Stämme und Antibiotika lag die MAK_{hetero} bis zum 1024fachen über der MBK unter Einsatz des adäquaten Inokulums, so zum Beispiel für Vancomycin für alle Stämme außer 1457c oder für Ciprofloxacin für ebenfalls alle Stämme außer 1457c. Andererseits gab es

auch Stämme und Antibiotika, für die MBK und MAK_{hetero} nur um das maximal vierfache differierten, wie zum Beispiel für den Stamm 1057 und seine Mutante für Rifampicin.

Unsere Ergebnisse unterstützen zuvor bereits publizierte Ergebnisse, die aussagen, dass die Bestimmung von MHK und MBK mit unterschiedlichen Inokula nicht ausreicht, um den klinischen Erfolg der Therapie einer fremdkörperassoziierten Infektion vorherzusagen (König et al., 2001).

Interessanterweise konnten bei weitgehend deutlich oberhalb des therapeutischen Bereichs liegenden MAK_{hetero} -Werten für die meisten Antibiotika und Stämme einzelne Stämme für bestimmte Antibiotika im therapeutischen Bereich getestet werden, sogar im Bereich der für MHKs nach NCCLS definierten Sensibilität. So fand sich zum Beispiel für den Stamm 1057 und seine Mutante eine MAK_{hetero} im therapeutischen Bereich für Gemifloxacin und im nach NCCLS grenzwertig sensiblen Bereich für Moxifloxacin, gleiches konnte man für den Stamm 9142 und seine Mutante für Gentamicin beobachten. Diese Ergebnisse weisen auf therapeutische Optionen für Stämme mit ähnlichem Resistenz-Profil hin, betonen aber auch die Notwendigkeit der individuellen Testung einzelner Isolate. Die Bestimmung der MAK für das bakteriostatische Linezolid, sowie für die Lantibiotika Nisin und Gramicidin D ergab bereits für die MAK_{homo} Werte weit jenseits des therapeutischen Bereichs, so dass diese Substanzen keine Therapie-Optionen für die Therapie fremdkörperassoziiierter Infektionen darstellen.

Nach den ersten Versuchen mit der Minimalen-Anheftungstötenden-Konzentration konnten wir beobachten, dass sowohl für biofilm-positive als auch biofilm-negative Stämme zumindest die MAK_{hetero} fast aller Antibiotika weit oberhalb des *in vivo* erreichbaren Konzentrationsbereiches lag. Effektiv waren unter den Standard-Antibiotika lediglich Gentamicin und Rifampicin sowie die Gyrasehemmer der neueren Generation, vor allem Moxifloxacin und Gemifloxacin. Da es vor unserer Arbeit schon klinische Ansätze einer Kombination aus Gyrasehemmer und Rifampicin gegeben hatte (Zimmerli et al., 1998), entschieden wir uns für eine solche Kombination, in der Hoffnung, dadurch eine größere Wirksamkeit zu erzielen und zugleich einer Resistenz-Entwicklung gegen Rifampicin entgegenzuwirken.

Die Kombinationstherapie der Gyrasehemmer mit Rifampicin erscheint allerdings nur bei hohen Rifampicin-Konzentrationen von 1µg/ml erfolgsversprechend zu sein, bei niedriger Dosis ergab sich kein Unterschied zur MAK ohne Rifampicin (vgl. Tabelle 30 - 32). Bei Verwendung der hohen Dosis beobachteten wir aber für einige Stämme und Antibiotika eine bedeutend erniedrigte MAK_{hetero} , so zum Beispiel für den Stamm 1057 bei Ciprofloxacin oder den Stamm 9142 bei Moxifloxacin (vgl. Tabelle 36). In Einzelfällen scheint also diese Kombination eine Möglichkeit zu sein, angeheftete oder im Biofilm befindliche *S. epidermidis* vollständig zu eradizieren.

Es konnte kein konsistenter Unterschied nachgewiesen werden zwischen der MAK_{hetero} der biofilm-positiven *S. epidermidis*-Wildtyp-Stämme und der der biofilm-negativen Mutanten. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass bei angehefteten biofilm-negativen *S. epidermidis* Persister ebenso entstehen wie bei biofilm-positiven Isolaten. Das könnte das Versagen der Antibiotika-Therapie bei fremdkörperassoziierten Infektionen selbst bei biofilm-negativem Erreger erklären. Diese Persister haben eine besondere Bedeutung bei fremdkörperassoziierten Infektionen unter Berücksichtigung des durch den Fremdkörper ausgelösten lokalen Granulozyten-Defektes (Vaudaux et al., 1985; Zimmerli et al., 1984), während Persister im Gewebe von den vorhandenen Phagozyten schnell beseitigt werden. Diese Daten unterstützen die Notwendigkeit eines Testverfahrens, um die Antibiotika-Resistenz angehefteter *S. epidermidis*-Stämme nicht nur für biofilm-positive Isolate zu bestimmen.

Verschiedene Mechanismen der Resistenz biofilm-ständiger Zellen werden in der Literatur diskutiert. Eine Hypothese vermutet, dass die Glykokalyx des Biofilms eine Diffusion der Antibiotika zu den Ziel-Zellen verhindert. Für *S. epidermidis* waren die Ergebnisse allerdings kontrovers (Dunne, Jr. et al., 1993; Farber et al., 1990; Zheng and Stewart, 2002). Für gram-negative Bakterien konnte gezeigt werden, dass Chinolone leicht in den Biofilm eindringen können (Anderl et al., 2000; Ishida et al., 1998; Shigeta et al., 1997; Vraný et al., 1997). Unsere Daten lassen vermuten, dass die These einer reduzierten Perfusion von *S. epidermidis*-Biofilmen kritisch überdacht werden muss, insbesondere unter Berücksichtigung der Tatsache, dass bakterielle Exopolysaccharide zu bis zu 97% aus Wasser bestehen in das Antibiotika leicht diffundieren können (Zhang et al., 1998). Dieses wird zusätzlich unterstützt durch die Beobachtung, dass die Resistenz angehefteter biofilm-negativer *S. epidermidis*, erfasst in Form der MAK_{hetero} , ähnlich der Resistenz biofilm-positiver Stämme ist, unabhängig von den relativ höheren Inokula der biofilm-positiven Stämme.

Aus diesem Grund ist das Modell einzelner Persister-Zellen unter Antibiotika-Therapie biofilm-ständiger Bakterien (Lewis, 2000; Lewis, 2001) wahrscheinlicher als Erklärung der beobachteten Resistenz-Profile angehefteter *S. epidermidis*. Für diese These spricht ebenfalls die Tatsache, dass wir bei unseren rekultivierten Persistern ein unverändertes Resistenz-Profil zum Ausgangsstamm beobachten konnten, analog zu den beschriebenen Persistern gram-negativer Bakterien, bei denen es sich ebenfalls nicht um resistente Mutanten handelt (Lewis, 2005).

Interessanterweise scheint die Akkumulation von Zellen in einem mehrschichtigen Biofilm nach der primären Anheftung die Zahl der Persister gegen die untersuchten Antibiotika nicht zu erhöhen. Diese Daten weisen darauf hin, dass die initiale Anheftung von Zellen an Polymer-Oberflächen ausreicht, um Signale zu induzieren, die die Zahl der Persister

erhöhen. Dies entspricht der Beobachtung, dass sich die Zahl der Persister in einer Bakterien-Population erhöht, je langsamer diese Population proliferiert (Spoering and Lewis, 2001). Dem entgegengesetzt scheint die folgende Zell-Akkumulation während der Biofilm-Bildung mit der entsprechend erhöhten Zellzahl keinen zusätzlichen Effekt zu haben. Will man die Persister-Hypothese weiter verfolgen, so wäre als Zukunftsperspektive eine Aufarbeitung der isolierten Persister in unserem Modell denkbar, mit der Suche nach Expression von Genen, die spezifisch für Toxin-Antitoxin-Module sind, wie dies bereits für *E. coli* untersucht wurde (Lewis, 2005; Shapiro et al., 2011).

Die beobachteten Inokulum-Effekte vor allem auf die MBK/KBK planktonischer Zellen könnten auch durch einzelne Persister erklärbar sein, welche imstande sind, die hohe Antibiotika-Konzentration zu überleben. Allerdings weisen unsere Daten darauf hin, dass die MBK-Bestimmung mit verschiedenen Inokula nicht geeignet ist, um die Resistenz angehefteter Zellen zuverlässig vorherzusagen. Aus diesem Grunde könnte das MAK-Verfahren in der Zukunft helfen, das therapeutische Outcome fremdkörperassoziierter Infektionen vorherzusagen und bei der Auswahl entsprechender Antibiotika zur Therapie dieser Infektionen helfen.

5 Zusammenfassung

Fremdkörperassoziierte Infektionen sind häufige und oft schwere Komplikationen bei hospitalisierten Patienten, insbesondere koagulase-negative Staphylokokken bereiten aufgrund ihrer Fähigkeit zur Biofilm-Bildung klinisch immer wieder therapeutische Schwierigkeiten. Resistenzprofile unter Standard-Bedingungen haben nur einen geringen Vorhersagewert für den Erfolg einer antibiotischen Therapie.

Wir entwickelten eine Methode, um *S. epidermidis* unter Biofilm-Bedingungen auf Antibiotika-Resistenzen zu testen, mit dem Ziel, zuverlässige Aussagen über die Erfolgsaussichten einer Therapie zu treffen. Wir führten Testreihen mit verschiedenen Antibiotika sowie mit einigen Gyrasehemmern als Monotherapie und in Kombination mit Rifampicin durch. Die verwendeten Stämme von *S. epidermidis* exprimieren alle das interzelluläre Polysaccharidadhäsion und sind biofilm-positiv, die zusätzlich untersuchten Knock-out-Mutanten sind biofilm-negativ. Wir konnten reproduzierbare Resistenz-Profile unter Bedingungen im Biofilm bzw. in angeheftetem Zustand erstellen. Den erhobenen Wert bezeichneten wir als Minimale-Anheftungstötende-Konzentration (MAK). Dabei konnten wir eine MAK_{homo} beobachten, bei der es zu einem Abbruch des homogenen Bakterien-Wachstums kam sowie eine meist bedeutend höhere Konzentration (MAK_{hetero}) ab der kein Wachstum mehr auftrat. Dies galt sowohl für biofilm-positive als auch biofilm-negative Stämme. Wir konnten bis auf Inokulum-Effekte keinen signifikanten Unterschied zwischen der MAK der Wildtypen und der MAK der biofilm-negativen Mutanten feststellen.

Unsere Daten bestätigten den Verdacht, dass angeheftete Bakterien resistenter gegen Antibiotika sind als planktonische und erklären auch das immer wieder beobachtete Therapie-Versagen trotz gegen die eingesetzten Antibiotika sensiblem Erreger. Für die Resistenz gegen Antibiotika scheint der Biofilm selbst aber eine geringere Rolle zu spielen als bislang angenommen. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Antibiotika-Resistenz eher auf eine inaktive Stoffwechsellage zurückzuführen ist, als auf die physikalische Barriere des Biofilms. Diese scheint aber die Akkumulation höherer Zellzahlen zu ermöglichen, was wiederum zu einer erhöhten Antibiotika-Resistenz führt.

Ein Erklärungsansatz für das Phänomen der MAK_{hetero} ist ein Modell weniger Persister auch oberhalb der eigentlichen Minimalen-Anheftungstötenden-Konzentration. Diese ermöglichen auch bei hohen Konzentrationen noch ein Überleben, ohne dass es sich dabei um eine echte Resistenzentwicklung handelt. Diese einzelnen Persister verringern zusätzlich die Chancen einer antibiotischen Therapie auf die wirkliche Sanierung eines infizierten Fremdkörpers. Die eingesetzten Antibiotika überzeugten zur Eradikation des Biofilms nicht, eine Kombination von Gyrasehemmern mit Rifampicin scheint aber in Einzelfällen erfolgsversprechend zu sein.

6 Literaturverzeichnis

- Amorena, B., Gracia, E., Monzon, M., Leiva, J., Oteiza, C., Perez, M., Alabart, J.L., and Hernandez-Yago, J., 1999. Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.* 44, 43-55.
- Anderl, J.N., Franklin, M.J., and Stewart, P.S., 2000. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1818-1824.
- Anwar, H., Strap, J.L., and Costerton, J.W., 1992. Eradication of biofilm cells of *Staphylococcus aureus* with tobramycin and cephalexin. *Can. J. Microbiol.* 38, 618-625.
- Arciola, C.R., Baldassarri, L., and Montanaro, L., 2001. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2151-2156.
- Baddour, L.M., Smalley, D.L., Hill, M.M., and Christensen, G.D., 1988. Proposed virulence factors among coagulase-negative staphylococci isolated from two healthy populations. *Can. J. Microbiol.* 34, 901-905.
- Balaban, N.Q., 2011. Persistence: mechanisms for triggering and enhancing phenotypic variability. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21, 768-775.
- Baldassarri, L., Bertuccini, L., Ammendolia, M.G., Arciola, C.R., and Montanaro, L., 2001. Effect of iron limitation on slime production by *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20, 343-345.
- Barberan, J., Aguilar, L., Gimenez, M.J., Carroquino, G., Granizo, J.J., and Prieto, J., 2008. Levofloxacin plus rifampicin conservative treatment of 25 early staphylococcal infections of osteosynthetic devices for rigid internal fixation. *Int. J. Antimicrob. Agents* 32, 154-157.
- Berthaud, N. and Desnottes, J.F., 1997. In-vitro bactericidal activity of quinupristin/dalfopristin against adherent *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 39 Suppl A, 99-102.
- Bigger, J., 1944. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilization. *The Lancet.* 244, 497-500.
- Budd, J.S., Bell, P.R., and James, R.F., 1989. Attachment of indium-111 labelled endothelial cells to pretreated polytetrafluoroethylene vascular grafts. *Br. J. Surg.* 76, 1259-1261.
- Cagni, A., Chuard, C., Vaudaux, P.E., Schrenzel, J., and Lew, D.P., 1995. Comparison of sparfloxacin, temafloxacin, and ciprofloxacin for prophylaxis and treatment of experimental foreign-body infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1655-1660.
- Cerca, N., Martins, S., Cerca, F., Jefferson, K.K., Pier, G.B., Oliveira, R., and Azeredo, J., 2005. Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci in biofilm versus planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid XTT colorimetry. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 331-336.

- Ceri, H., Olson, M., Morck, D., Storey, D., Read, R., Buret, A., and Olson, B., 2001. The MBEC Assay System: multiple equivalent biofilms for antibiotic and biocide susceptibility testing. *Methods Enzymol.* 337, 377-385.
- Ceri, H., Olson, M.E., Stremick, C., Read, R.R., Morck, D., and Buret, A., 1999. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1771-1776.
- Christensen, G.D., Baldassari, L., and Simpson, W.A., Colonisation of medical devices by coagulase-negative staphylococci. In: Waldvogel, F.A. and Bisno, A.L. (Eds.), *Infection associated with indwelling medical devices*, American Society of Microbiology, Washington DC, 1994, pp. 45-78.
- Christensen, G.D., Simpson, W.A., Bisno, A.L., and Beachey, E.H., 1982. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect. Immun.* 37, 318-326.
- Conlon, K.M., Humphreys, H., and O'Gara, J.P., 2002. Regulation of *icaR* gene expression in *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 216, 171-177.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Greenberg, E.P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318-1322.
- Cramton, S.E., Ulrich, M., Götz, F., and Döring, G., 2001. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* 69, 4079-4085.
- Czekaj, J., Dinh, A., Moldovan, A., Vaudaux, P., Gras, G., Hoffmeyer, P., Lew, D., Bernard, L., and Uckay, I., 2011. Efficacy of a combined oral clindamycin&rifampicin regimen for therapy of staphylococcal osteoarticular infections. *Scand. J. Infect. Dis.* 43, 962-967.
- Dominguez-Herrera, J., Docobo-Perez, F., Lopez-Rojas, R., Pichardo, C., Ruiz-Valderas, R., Lepe, J.A., and Pachon, J., 2012. Efficacy of daptomycin versus vancomycin in an experimental model of foreign-body and systemic infection caused by biofilm producers and methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 613-617.
- Duguid, I.G., Evans, E., Brown, M.R., and Gilbert, P., 1992. Effect of biofilm culture upon the susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* to tobramycin. *J. Antimicrob. Chemother.* 30, 803-810.
- Dunne, W.M., Jr., Mason, E.O., Jr., and Kaplan, S.L., 1993. Diffusion of rifampin and vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 2522-2526.
- Espersen, F., Frimodt-Moller, N., Corneliussen, L., Thamdrup, R., V, and Skinhoj, P., 1993. Experimental foreign body infection in mice. *J. Antimicrob. Chemother.* 31 Suppl D, 103-111.
- Farber, B.F., Kaplan, M.H., and Clogston, A.G., 1990. *Staphylococcus epidermidis* extracted slime inhibits the antimicrobial action of glycopeptide antibiotics. *J. Infect. Dis.* 161, 37-40.
- Francois, P., Vaudaux, P., and Lew, P.D., 1998. Role of plasma and extracellular matrix proteins in the physiopathology of foreign body infections. *Ann. Vasc. Surg.* 12, 34-40.

- Galdbart, J.O., Allignet, J., Tung, H.S., Ryden, C., and El Solh, N., 2000. Screening for *Staphylococcus epidermidis* markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses. *J. Infect. Dis.* 182, 351-355.
- Gerke, C., Kraft, A., Süßmuth, R., Schweitzer, O., and Götz, F., 1998. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J. Biol. Chem.* 273, 18586-18593.
- Gilbert, P., Collier, P.J., and Brown, M.R., 1990. Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 1865-1868.
- Gordon, C.A., Hodges, N.A., and Marriott, C., 1988. Antibiotic interaction and diffusion through alginate and exopolysaccharide of cystic fibrosis-derived *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 22, 667-674.
- Götz, F. and Peters, G., Colonization of Medical Devices by Coagulase-Negative Staphylococci. In: Waldvogel, F.A. and Bisno, A.L. (Eds.), *Infections Associated with Indwelling Medical Devices*, ASM Press, Washington DC, 2000, pp. 55-88.
- Hamilton-Miller, J.M. and Shah, S., 1997. Activity of quinupristin/dalfopristin against *Staphylococcus epidermidis* in biofilms: a comparison with ciprofloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* 39 Suppl A, 103-108.
- Hassett, D.J., Ma, J.F., Elkins, J.G., McDermott, T.R., Ochsner, U.A., West, S.E., Huang, C.T., Fredericks, J., Burnett, S., Stewart, P.S., McFeters, G., Passador, L., and Iglewski, B.H., 1999. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. *Mol. Microbiol.* 34, 1082-1093.
- Heilmann, C., Hussain, M., Peters, G., and Götz, F., 1997. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol. Microbiol.* 24, 1013-1024.
- Heilmann, C., Schweitzer, O., Gerke, C., Vanittanakom, N., Mack, D., and Götz, F., 1996. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol. Microbiol.* 20, 1083-1091.
- Herrmann, M., Vaudaux, P.E., Pittet, D., Auckenthaler, R., Lew, P.D., Schumacher-Perdreau, F., Peters, G., and Waldvogel, F.A., 1988. Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *J. Infect. Dis.* 158, 693-701.
- Hoyle, B.D., Jass, J., and Costerton, J.W., 1990. The biofilm glycocalyx as a resistance factor. *J. Antimicrob. Chemother.* 26, 1-5.
- Hussain, M., Herrmann, M., von Eiff, C., Perdreau-Remington, F., and Peters, G., 1997. A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect. Immun.* 65, 519-524.
- Ishida, H., Ishida, Y., Kurosaka, Y., Otani, T., Sato, K., and Kobayashi, H., 1998. In vitro and in vivo activities of levofloxacin against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 1641-1645.
- Jefferson, K.K., Pier, D.B., Goldmann, D.A., and Pier, G.B., 2004. The Teicoplanin-Associated Locus Regulator (TcaR) and the Intercellular Adhesin Locus Regulator (IcaR) Are

Transcriptional Inhibitors of the *ica* Locus in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 186, 2449-2456.

Jesaitis, A.J., Franklin, M.J., Berglund, D., Sasaki, M., Lord, C.I., Bleazard, J.B., Duffy, J.E., Beyenal, H., and Lewandowski, Z., 2003. Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: characterization of neutrophil and biofilm interactions. J. Immunol. 171, 4329-4339.

Jorgensen, J.H., Turnidge, J.D., and Washington, J.A., Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: Murray, P.R. (Ed.), Manual of Clinical Microbiology, ASM Press, Washington, D.C., 1999, pp. 1526-1543.

Keren, I., Kaldalu, N., Spoering, A., Wang, Y., and Lewis, K., 2004. Persister cells and tolerance to antimicrobials. FEMS Microbiol. Lett. 230, 13-18.

Kim, Y. and Wood, T., 2010. Toxins Hha and CspD and small RNA regulator Hfq are involved in persister cell formation through MqsR in *Escherichia coli*. Biochem Biophys Res Commun. 391, 209-213.

Knobloch, J.K.M., Bartscht, K., Sabottke, A., Rohde, H., Feucht, H.H., and Mack, D., 2001. Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the *sigB* operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. J. Bacteriol. 183, 2624-2633.

Knobloch, J.K.M., Horstkotte, M.A., Rohde, H., Kaulfers, P.M., and Mack, D., 2002. Alcoholic ingredients in skin disinfectants increase biofilm expression of *Staphylococcus epidermidis*. J. Antimicrob. Chemother. 49, 683-687.

Knobloch, J.K.M., Jäger, S., Horstkotte, M.A., Rohde, H., and Mack, D., 2004. RsbU-dependent regulation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation is mediated via the alternative sigma factor σ^B by repression of the negative regulator gene *icaR*. Infect. Immun. 72, 3838-3848.

Knobloch, J.K.M., Nedelmann, M., Kiel, K., Bartscht, K., Horstkotte, M.A., Dobinsky, S., Rohde, H., and Mack, D., 2003. Establishment of an arbitrary PCR for rapid identification of Tn917 insertion sites in *Staphylococcus epidermidis*: characterization of biofilm-negative and nonmucoid mutants. Appl. Environ. Microbiol. 69, 5812-5818.

Kogan, G., Sadovskaya, I., Chaignon, P., Chokr, A., and Jabbouri, S., 2006. Biofilms of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellular adhesin. FEMS Microbiol. Lett. 255, 11-16.

König, C., Schwank, S., and Blaser, J., 2001. Factors compromising antibiotic activity against biofilms of *Staphylococcus epidermidis*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 20, 20-26.

Leid, J.G., Shirtliff, M.E., Costerton, J.W., and Stoodley, A.P., 2002. Human Leukocytes Adhere to, Penetrate, and Respond to *Staphylococcus aureus* Biofilms. Infect. Immun. 70, 6339-6345.

Leung, V. and Levesque, C.M., 2012. A stress-inducible quorum-sensing peptide mediates the formation of persister cells with noninherited multidrug tolerance. J. Bacteriol. 194, 2265-2274.

Lewis, K., 2000. Programmed death in bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64, 503-514.

Lewis, K., 2001. Riddle of biofilm resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 999-1007.

- Lewis, K., 2005. Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Mosc.)* 70, 267-274.
- Lewis, K., 2007. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 48-56.
- Li, Y. and Zhang, Y., 2007. PhoU is a persistence switch involved in persister formation and tolerance to multiple antibiotics and stresses in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 52, 2092-2099.
- Lucet, J.C., Herrmann, M., Rohner, P., Auckenthaler, R., Waldvogel, F.A., and Lew, D.P., 1990. Treatment of experimental foreign body infection caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 2312-2317.
- Mack, D., Bartscht, K., Fischer, C., Rohde, H., de Grahl, C., Dobinsky, S., Horstkotte, M.A., Kiel, K., and Knobloch, J.K.M., 2001. Genetic and biochemical analysis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm accumulation. *Methods Enzymol.* 336, 215-239.
- Mack, D., Davies, A.P., Harris, L.G., Rohde, H., Horstkotte, M.A., and Knobloch, J.K., 2007. Microbial interactions in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 399-408.
- Mack, D., Fischer, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H., and Laufs, R., 1996a. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J. Bacteriol.* 178, 175-183.
- Mack, D., Haeder, M., Siemssen, N., and Laufs, R., 1996b. Association of biofilm production of coagulase-negative staphylococci with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesin. *J. Infect. Dis.* 174, 881-884.
- Mack, D., Riedewald, J., Rohde, H., Magnus, T., Feucht, H.H., Elsner, H.A., Laufs, R., and Rupp, M.E., 1999. Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesin of *Staphylococcus epidermidis* in hemagglutination. *Infect. Immun.* 67, 1004-1008.
- Mack, D., Rohde, H., Dobinsky, S., Riedewald, J., Nedelmann, M., Knobloch, J.K., Elsner, H.A., and Feucht, H.H., 2000a. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. *Infect. Immun.* 68, 3799-3807.
- Mack, D., Rohde, H., Dobinsky, S., Riedewald, J., Nedelmann, M., Knobloch, J.K., Elsner, H.A., and Feucht, H.H., 2000b. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. *Infect. Immun.* 68, 3799-3807.
- Mack, D., Rohde, H., Harris, L.G., Davies, A.P., Horstkotte, M.A., and Knobloch, J.K., 2006. Biofilm formation in medical device-related infection. *Int. J. Artif. Organs* 29, 343-359.
- Mack, D., Sabottke, A., Dobinsky, S., Rohde, H., Horstkotte, M.A., and Knobloch, J.K.M., 2002. Differential expression of methicillin resistance by different biofilm-negative *Staphylococcus epidermidis* transposon mutant classes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 178-183.
- Mack, D., Siemssen, N., and Laufs, R., 1992. Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion. *Infect. Immun.* 60, 2048-2057.

- Marrie, T.J., Nelligan, J., and Costerton, J.W., 1982. A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. *Circulation* 66, 1339-1341.
- McFarland, J., 1907. The Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *JAMA*. XLIX (14): 1176-1178.
- Montanaro, L., Campoccia, D., Pirini, V., Ravaioli, S., Otto, M., and Arciola, C.R., 2007. Antibiotic multiresistance strictly associated with IS256 and *ica* genes in *Staphylococcus epidermidis* strains from implant orthopedic infections. *J. Biomed. Mater. Res. A* 83, 813-818.
- Mulcahy, H., Sibley, C., Surette, M. and Lewenza, S., 2011. *Drosophila melanogaster* as an animal model for the study of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections in vivo. *PLoS Pathog.* 7(10): e1002299
- Nedelmann, M., Sabottke, A., Laufs, R., and Mack, D., 1998. Generalized transduction for genetic linkage analysis and transfer of transposon insertions in different *Staphylococcus epidermidis* strains. *Zentralbl. Bakteriologie*. 287, 85-92.
- Nichols, W.W., Dorrington, S.M., Slack, M.P., and Walmsley, H.L., 1988. Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32, 518-523.
- Nilsson, M., Frykberg, L., Flock, J.I., Pei, L., Lindberg, M., and Guss, B., 1998. A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* 66, 2666-2673.
- Otto, M., 2012. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Semin Immunopathol.* 34 (2): 201 – 14.
- Pascual, A., Fler, A., Westerdaal, N.A., and Verhoef, J., 1986. Modulation of adherence of coagulase-negative staphylococci to Teflon catheters in vitro. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 5, 518-522.
- Peters, G., Locci, R., and Pulverer, G., 1981. Microbial colonization of prosthetic devices. II. Scanning electron microscopy of naturally infected intravenous catheters. *Zentralbl. Bakteriologie. Mikrobiol. Hyg. [B]* 173, 293-299.
- Pintens, V., Massonet, C., Merckx, R., Vandecasteele, S., Peetermans, W.E., Knobloch, J.K., and Van, E.J., 2008. The role of sigmaB in persistence of *Staphylococcus epidermidis* foreign body infection. *Microbiology* 154, 2827-2836.
- Rachid, S., Cho, S., Ohlsen, K., Hacker, J., and Ziebuhr, W., 2000. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by environmental factors: the possible involvement of the alternative transcription factor sigB. *Adv. Exp. Med. Biol.* 485, 159-166.
- Robinson, C., Kirkham, J., Percival, R., Shore, R.C., Bonass, W.A., Brookes, S.J., Kusa, L., Nakagaki, H., Kato, K., and Nattress, B., 1997. A method for the quantitative site-specific study of the biochemistry within dental plaque biofilms formed in vivo. *Caries Res.* 31, 194-200.
- Rohde, H., Burandt, E.C., Siemssen, N., Frommelt, L., Burdelski, C., Wurster, S., Scherpe, S., Davies, A.P., Harris, L.G., Horstkotte, M.A., Knobloch, J.K., Ragnath, C., Kaplan, J.B., and Mack, D., 2007. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials* 28, 1711-1720.

- Rohde, H., Knobloch, J.K.M., Horstkotte, M.A., and Mack, D., 2001. Correlation of biofilm expression types of *Staphylococcus epidermidis* with polysaccharide intercellular adhesin synthesis: evidence for involvement of *icaADBC* genotype-independent factors. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)* 190, 105-112.
- Roveta, S., Marchese, A., and Schito, G.C., 2008. Activity of daptomycin on biofilms produced on a plastic support by *Staphylococcus* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents* 31, 321-328.
- Roychoudhury, S., Twinem, T.L., Makin, K.M., Nienaber, M.A., Li, C., Morris, T.W., Ledoussal, B., and Catrenich, C.E., 2001. *Staphylococcus aureus* mutants isolated via exposure to nonfluorinated quinolones: detection of known and unique mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 3422-3426.
- Rupp, M.E., Fey, P.D., Heilmann, C., and Götz, F., 2001. Characterization of the importance of *Staphylococcus epidermidis* autolysin and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *J. Infect. Dis.* 183, 1038-1042.
- Rupp, M.E., Ulphani, J.S., Fey, P.D., Bartscht, K., and Mack, D., 1999a. Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model. *Infect. Immun.* 67, 2627-2632.
- Rupp, M.E., Ulphani, J.S., Fey, P.D., and Mack, D., 1999b. Characterization of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *Infect. Immun.* 67, 2656-2659.
- Schaad, H.J., Chuard, C., Vaudaux, P., Rohner, P., Waldvogel, F.A., and Lew, D.P., 1994a. Comparative efficacies of imipenem, oxacillin and vancomycin for therapy of chronic foreign body infection due to methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 33, 1191-1200.
- Schaad, H.J., Chuard, C., Vaudaux, P., Waldvogel, F.A., and Lew, D.P., 1994b. Teicoplanin alone or combined with rifampin compared with vancomycin for prophylaxis and treatment of experimental foreign body infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 1703-1710.
- Schierholz, J.M., Beuth, J., König, D., Nürnberger, A., and Pulverer, G., 1999. Antimicrobial substances and effects on sessile bacteria. *Zentralbl. Bakteriologie* 289, 165-177.
- Schwank, S., Rajacic, Z., Zimmerli, W., and Blaser, J., 1998. Impact of bacterial biofilm formation on in vitro and in vivo activities of antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 895-898.
- Shapiro, J.A., Nguyen, V.L., and Chamberlain, N.R., 2011. Evidence for persisters in *Staphylococcus epidermidis* RP62a planktonic cultures and biofilms. *J. Med. Microbiol.* 60, 950-960.
- Shigeta, M., Tanaka, G., Komatsuzawa, H., Sugai, M., Suginaka, H., and Usui, T., 1997. Permeation of antimicrobial agents through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a simple method. *Chemotherapy* 43, 340-345.
- Spoering, A.L. and Lewis, K., 2001. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J. Bacteriol.* 183, 6746-6751.

Stein, A., Drancourt, M., and Raoult, D., Ambulatory Management of Infected Orthopedic Implants. In: Waldvogel, F.A. and Bisno, A.L. (Eds.), *Infections Associated with Indwelling Medical Devices*, ASM Press, Washington DC, 2000, pp. 211-230.

Thomas, L.V. and Wimpenny, J.W., 1996. Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH, and NaCl concentration on nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2006-2012.

Tojo, M., Yamashita, N., Goldmann, D.A., and Pier, G.B., 1988. Isolation and characterization of a capsular polysaccharide adhesin from *Staphylococcus epidermidis*. *J. Infect. Dis.* 157, 713-722.

Tuomanen, E., Cozens, R., Tosch, W., Zak, O., and Tomasz, A., 1986. The rate of killing of *Escherichia coli* by beta-lactam antibiotics is strictly proportional to the rate of bacterial growth. *J. Gen. Microbiol.* 132, 1297-1304.

Vaudaux, P., Yasuda, H., Velazco, M.I., Huggler, E., Ratti, I., Waldvogel, F.A., Lew, D.P., and Proctor, R.A., 1990. Role of host and bacterial factors in modulating staphylococcal adhesion to implanted polymer surfaces. *J. Biomater. Appl.* 5, 134-153.

Vaudaux, P.E., Francois, P., Proctor, R.A., McDevitt, D., Foster, T.J., Albrecht, R.M., Lew, D.P., Wabers, H., and Cooper, S.L., 1995. Use of adhesion-defective mutants of *Staphylococcus aureus* to define the role of specific plasma proteins in promoting bacterial adhesion to canine arteriovenous shunts. *Infect. Immun.* 63, 585-590.

Vaudaux, P.E., Zulian, G., Huggler, E., and Waldvogel, F.A., 1985. Attachment of *Staphylococcus aureus* to polymethylmethacrylate increases its resistance to phagocytosis in foreign body infection. *Infect. Immun.* 50, 472-477.

Veenstra, G.J., Cremers, F.F., van Dijk, H., and Flier, A., 1996. Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Bacteriol.* 178, 537-541.

Vrany, J.D., Stewart, P.S., and Suci, P.A., 1997. Comparison of recalcitrance to ciprofloxacin and levofloxacin exhibited by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms displaying rapid-transport characteristics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 1352-1358.

Vuong, C., Kocianova, S., Voyich, J.M., Yao, Y., Fischer, E.R., DeLeo, F.R., and Otto, M., 2004a. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J. Biol. Chem.* 279, 54881-54886.

Vuong, C., Voyich, J.M., Fischer, E.R., Braughton, K.R., Whitney, A.R., DeLeo, F.R., and Otto, M., 2004b. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol.* 6, 269-275.

Wang, X. and Wood, T.K., 2011. Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5577-5583.

Wiederhold, N.P., Coyle, E.A., Raad, I.I., Prince, R.A., and Lewis, R.E., 2005. Antibacterial activity of linezolid and vancomycin in an in vitro pharmacodynamic model of gram-positive catheter-related bacteraemia. *J. Antimicrob. Chemother.* 55, 792-795.

Williams, D.L., Haymond, B.S., Woodbury, K.L., Beck, J.P., Moore, D.E., Epperson, R.T., and Bloebaum, R.D., 2012. Experimental model of biofilm implant-related osteomyelitis to

test combination biomaterials using biofilms as initial inocula. *J. Biomed. Mater. Res. A* 100, 1888-1900.

Yasuda, H., Ajiki, Y., Koga, T., and Yokota, T., 1994. Interaction between clarithromycin and biofilms formed by *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 138-141.

Zelver, N., Hamilton, M., Pitts, B., Goeres, D., Walker, D., Sturman, P., and Heersink, J., 1999. Measuring antimicrobial effects on biofilm bacteria: from laboratory to field. *Methods Enzymol.* 310, 608-628.

Zhang, S., Splendiani, A., dos Santos, L.M., and Livingston, A.G., 1998. Determination of pollutant diffusion coefficients in naturally formed biofilms using a single tube extractive membrane bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 59, 80-89.

Zheng, Z. and Stewart, P.S., 2002. Penetration of rifampin through *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 900-903.

Ziebuhr, W., Heilmann, C., Götz, F., Meyer, P., Wilms, K., Straube, E., and Hacker, J., 1997. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect. Immun.* 65, 890-896.

Zimmerli, W. and Moser, C., 2012. Pathogenesis and treatment concepts of orthopaedic biofilm infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 65, 158-168.

Zimmerli, W., Lew, P.D., and Waldvogel, F.A., 1984. Pathogenesis of foreign body infection. Evidence for a local granulocyte defect. *J. Clin. Invest* 73, 1191-1200.

Zimmerli, W., Widmer, A.F., Blatter, M., Frei, R., and Ochsner, P.E., 1998. Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections: a randomized controlled trial. Foreign-Body Infection (FBI) Study Group. *JAMA* 279, 1537-1541.

7 Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. J. Knobloch, für seine kontinuierliche Unterstützung und seine außerordentliche Geduld. Ohne seine beständige Hilfe und ausgezeichnete Betreuung wäre diese Arbeit nie zustande gekommen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. D. Mack für die initiale Überlassung des Themas.

Ein grundsätzlicher Dank geht natürlich an meine Familie und meine Freunde für Alles.

8 Lebenslauf



Persönliche Daten	
Name	Heimke von Osten
Geburtsdatum	11. 07. 77
Geburtsort	Hamburg
Schulbildung	
08/1983 – 07/1987	Grundschule, Hamburg
08/1987 – 07/1996	Gymnasium, Hamburg
Hochschulstudium	
01. 10. 1996 – 31. 03. 1997	Studium der Anglistik an der Universität Hamburg; Medizinerntest
04. 1997 – 31. 03. 1999	Vorklinisches Studium an der Universität Hamburg
01. 04. 1999 – 29. 09. 2002	Klinisches Studium an der Universität Hamburg
30. 09. 2002 – 28. 09. 2003	Praktisches Jahr in Kent, Manchester, Glasgow und Hamburg
Dezember 2003	Abschluss des Studiums
Praxis	
15. 01. 2004 – 30. 09. 2004	AiP Neuropädiatrie und Stoffwechselerkrankungen; Univ.-Kinderklinik Greifswald
01. 10. 2004 – 31. 03. 2009	Assistenzzeit Pädiatrie; Univ.-Kinderklinik Greifswald
10. 06. 2009	Facharzt für Kinder- und Jugendmedizin
01. 04. 2009 – 31. 03. 2010	Facharztzeit Pädiatrie/Neonatologie; Univ.-Kinderklinik Greifswald
Seit 01. 04. 2010	Weiterbildung pädiatrische Nephrologie; Univ.-Kinderklinik Rostock

Publikationen

Knobloch J, von Osten H, Horstkotte M, Rohde H, Mack D (2002)
Minimal attachment killing (MAK): a versatile method for
susceptibility testing of attached biofilm-positive and –negative
Staphylococcus epidermidis. Med Microbiol Immunol 191:107-114

Knobloch JK, von Osten H, Horstkotte MA, Rohde H, Mack D (2008)
Biofilm formation is not necessary for development of quinolone-
resistant "persister" cells in an attached *Staphylococcus epidermidis*
population. Int J Artif Organs. 31(9):752-60.