

Abschlussbericht

„Untersuchung von Phagen für eine innovative Minimierung des Antibiotikaeinsatzes in der Milchviehhaltung“

Projektbeteiligte:**Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover**

Prof. Dr. Martina Hoedemaker, PhD (Klinik für Rinder, Rikli)

Prof. Dr. Madeleine Plötz (Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit, LMQS)

Dr. Sophie Kittler (MSc) (Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit, LMQS)

Dr. habil. Nadja Jeßberger (Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit, LMQS)

Dr. Elisa Peh (Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit, LMQS)

PD Dr. med. vet. Jessica Meißner (Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, Pharma)

Janek Brinkmann (Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, Pharma)

Berichtszeitraum:

10.05.2022 bis 30.04.2024

Arbeitspaket 1: Erstellung eines Testpanels aktueller Mastitis-Erreger (LMQS, Rikli)

In dem Projekt wurden jeweils 60 Mastitiserreger der Bakterienspezies *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus uberis* (*S. uberis*) und *Escherichia coli* (*E. coli*) gesammelt. Die Bakterien stammten aus Milchproben von an **Mastitis** erkrankten Kühen. Die Milchproben wurden zur Untersuchung in das Diagnostiklabor der Abteilung Milch des LMQS eingeschickt oder von der Rinderklinik der Tierärztlichen Hochschule eingereicht. Die insgesamt 180 Bakterienisolate wurden auf Resistenzen gegenüber verschiedenen Antibiotikaklassen untersucht. Die Ergebnisse der Resistenzuntersuchungen sind in Tabelle 1 dargestellt.

Von den insgesamt 180 Bakterienisolaten wurden 44 *E. coli*-, 54 *S. aureus*- und 60 *S. uberis*-Isolate in die Phagenisolierung einbezogen. Durch Testung des großen Bakterienpanels sollte die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, Phagen mit Wirksamkeit gegenüber möglichst unterschiedlichen Bakterienisolaten zu isolieren.

Tabelle 1. Ergebnisse der Empfindlichkeitsuntersuchungen von jeweils 60 *E. coli*-, *S. aureus*- und *S. uberis*-Isolaten gegenüber 11 Antibiotika.

Bakterien- spezies	Anzahl Isolate mit Resistenz gegenüber										
	PEN ¹	AMP ²	OxA ³	MAF ⁴	K/C ⁵	CPZ ⁶	CEQ ⁷	AMC ⁸	PIR ⁹	ERY ¹⁰	CEZ ¹¹
<i>E. coli</i>		9		4	13	17	5	3		59	14
<i>S. aureus</i>	17	17	4	1	1	6	3	3	16	12	3
<i>S. uberis</i>	0			1	0	0	0	0	13	2	0

¹Penicillin G; ²Ampicillin; ³Oxacillin; ⁴Marbofloxacin; ⁵Kanamycin/Cephalexin; ⁶Cefoperazon; ⁷Cefquinom; ⁸Amoxicillin/Clavulansäure; ⁹Pirlimycin; ¹⁰Erythromycin; ¹¹Cefazolin

Arbeitspaket 2: Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirksamkeit und Bereitstellung antimikrobieller Phagen (LMQS, Rikli)

Im Projektzeitraum wurden **insgesamt 34 Proben** in die Phagenisolierung einbezogen (Abbildung 1).

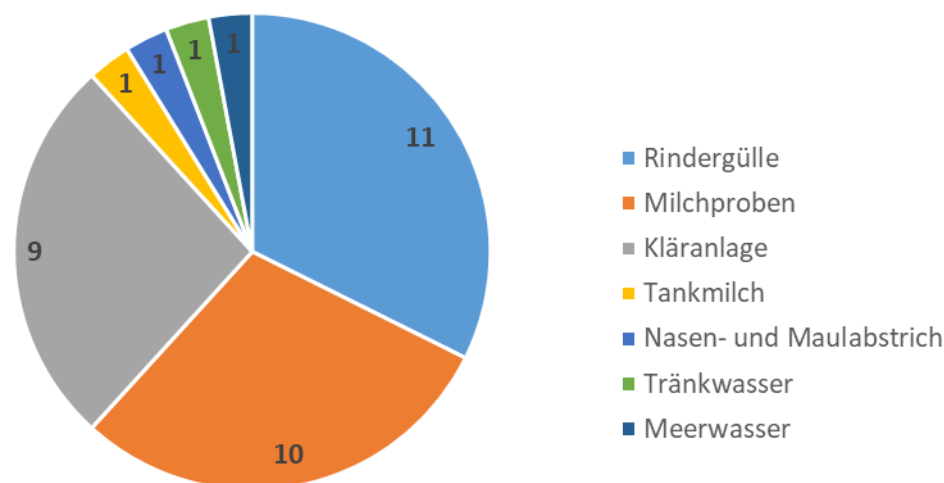


Abbildung 1. Für die Phagenisolierung verwendetes Probenmaterial.

Alle isolierten Phagen stammten aus Rindergülle. Es konnten keine Phagen aus Milchproben, Kläranlagen, Tankmilch, Nasen- und Maulabstrichen, Tränkwasser oder Meerwasser isoliert werden.

Die im Projekt untersuchten **Rindergülleproben** stammten von unterschiedlichen Rinderbetrieben, die im Rahmen der Bestandsbetreuung von der Klinik für Rinder gesammelt wurden. Darüber hinaus nahm die Bestandsbetreuung der Rinderklinik auf einem Betrieb eine Probe aus dem **Tränkwasser** im Abkalbestall und eine **Tankmilch**-Probe, die für die Phagenisolierung genutzt wurden. Die **Milchproben** stammten von Kühen mit diagnostizierter

Mastitis. In drei der Milchproben war *S. aureus*, in sechs der Proben *E. coli* und in zwei der Proben *S. uberis* nachweisbar. Für die Phagenisolierung wurden die Milchproben filtriert, um die vorhandenen Bakterien zu entfernen. Die **Abwasserproben** wurden in Kläranlagen im Raum Osnabrück und Neustadt am Rübenberge gewonnen und die **Meerwasserprobe** stammte aus der Nordsee, sie diente einer allgemeinen Erweiterung des Probenspektrums auf bisher nicht untersuchte bakterielle Lebensräume. Zudem wurden **Nasen- und Maultupfer von Rindern** einbezogen, die auf dem Gelände der Tierärztlichen Hochschule Hannover gehalten werden.

Alle Proben wurden mittels der Soft-Agar-Overlay-Technik auf das Vorhandensein von Phagen untersucht. Dazu wurde eine definierte Menge des jeweiligen **Wirtsbakteriums** sowie eine definierte Menge der filtrierten **Probe** in ein Röhrchen mit verflüssigtem **Nähragar** gegeben, gemischt und in eine Petrischale gegossen, in der der Boden bereits mit einer Schicht Nähragar bedeckt war. Für die Ausbildung eines Bakterienrasens wurden die in Arbeitspaket 1 ausgewählten Isolate der drei Wirtsbakterienspezies verwendet. Nach Bebrütung des Nähragars wurde der gewachsene Bakterienrasen auf Bildung von **Plaques** (kleine Stellen ohne Rasen) untersucht, welche auf die Anwesenheit von **Phagen** mit einer Bakterienlyse hindeuten.

In dem Projekt wurden **12 neue E. coli-Phagen** und **vier neue S. aureus-Phage isoliert** (Tabelle 2). Es konnten keine *S. uberis*-Phagen isoliert werden.

Nach der Isolierung wurden die Phagen aufgereinigt um sicherzustellen, dass Phagenlösungen nur einen einzelnen Phagentyp beinhalten und sich nicht aus mehreren Phagen zusammensetzen. Dazu werden die Plaques mehrere Male durch Ausstechen und erneutes Ausplattieren vereinzelt. Dieser Schritt der **Aufreinigung** ist für alle neu isolierten Phagen abgeschlossen.

Nach **Vermehrung** aller aufgereinigten Phagen auf Konzentrationen von mindestens 10^7 plaque forming units (PFU)/mL wurden die Phagen als Flüssigkultur in einem alarmgeschützten Kühlschrank **eingelagert**.

Tabelle 2. Übersicht über die im Projekt isolierten Phagen. Aufgeführt sind zudem die jeweiligen Bakterienisolate, mit denen die Phagen isoliert wurden und die Probenart, aus der die Phagen stammen.

Bakterienisolat	Phagenname	Probenart	Sequenz ¹	EM ²
<i>E. coli</i>				
A1349/20	vB_Eco_LmqsRi2-3	Rindergülle	ja	ja
A602/21	vB_Eco_LmqsRi2-6	Rindergülle	ja	ja
A1500/21	vB_Eco_LmqsRi2-8	Rindergülle	ja	ja
A1349/20	vB_Eco_LmqsRi4-3	Rindergülle	ja	ja
A1349/20	vB_Eco_LmqsRi6-1	Rindergülle	ja	ja
B71/20	vB_Eco_LmqsRi69-2	Rindergülle	in Bearb.	in Bearb.
A604/20	vB_Eco_LmqsRi69-5	Rindergülle	in Bearb.	in Bearb.
A615/20	vB_Eco_LmqsRi69-8	Rindergülle	in Bearb.	in Bearb.
A1009/20	vB_Eco_LmqsRi69-17	Rindergülle	in Bearb.	in Bearb.
A1067/20	vB_Eco_LmqsRi69-19	Rindergülle	in Bearb.	in Bearb.
A1096/20	vB_Eco_LmqsRi69-22	Rindergülle	in Bearb.	in Bearb.
A1/21	vB_Eco_LmqsRi69-29	Rindergülle	in Bearb.	in Bearb.
<i>S. aureus</i>				
A1081/20	vB_Sau_LmqsRi2-11	Rindergülle	ja	ja
A1259/21	vB_Sau_LmqsRi4-1	Rindergülle	in Bearb.	ja
A1081/20	vB_Sau_LmqsRi5-1	Rindergülle	in Bearb.	ja
M205/20	vB_Sau_LmqsRi69-1	Rindergülle	in Bearb.	in Bearb.

¹Sequenz= Genomsequenz aus Next generation sequencing oder Nanopore sequencing (Gesamtgenomsequenzierung) abgeschlossen

²EM=Elektronenmikroskopische Aufnahmen liegen vor

Arbeitspaket 3: Charakterisierung der Phagen (LMQS)

Die Phagen wurden im Projekt weitergehend charakterisiert, um ihre Eignung für die praktische Anwendung zu überprüfen.

Dazu wurden im ersten Schritt die **Phagengenome sequenziert**, um Ähnlichkeiten zu bekannten Phagen zu erkennen, zu denen eventuell schon therapeutische Erkenntnisse vorliegen und um sicherzustellen, dass sich keine unerwünschten Merkmale wie Gene für Antibiotikaresistenzen, Virulenz oder für einen lysogenen Lebenszyklus auf ihren Genomen befinden. Die Eigenschaften von Phagen, die mit den neu isolierten Phagen verwandt sind, sind in Tabelle 3 dargestellt. In keinem der bisher untersuchten Phagen wurden Gene gefunden, die für Antibiotikaresistenzen oder Virulenzfaktoren codieren oder auf einen lysogenen Lebenszyklus hinweisen.

Tabelle 3. Daten aus der Sequenzanalyse der Phagengenome.

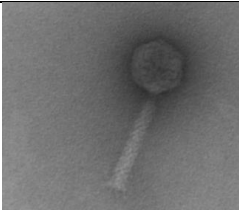
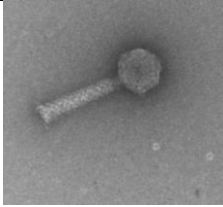
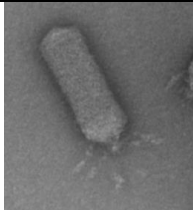
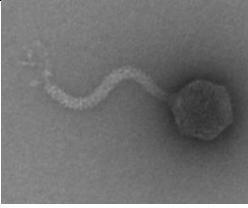
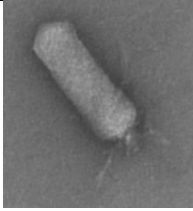
Phagen ID	Genomgröße	Nächstverwandter Phage	Bisherige Erkenntnisse zu verwandtem Phagen
vB_Eco_LmqsRi2-3	39.565 bp	Ecolv39_Milel	Unclassifizierter Kayfunavirus (Myovirus)
vB_Eco_LmqsRi2-6	74.539 bp	Escherichia phage Paul	<i>Kuravirus</i> (länglicher Podovirus)
vB_Eco_LmqsRi2-8	75.308 bp	Escherichia phage vB_EcoP_IMEP8	<i>Kuravirus</i> (länglicher Podovirus) lysieren z.T. O157 H7
vB_Eco_LmqsRi4-3	39.597 bp	Escherichia phage HC12	<i>Kayfunavirus</i> (Myovirus) wurde humanmedizinisch genutzt, Sepsistherapie mit Ertapenem
vB_Eco_LmqsRi6-1	47.720 bp	Escherichia phage BF9	<i>Dhillonvirus</i> (Siphovirus) mit hoher lytischer Aktivität gegenüber ESBL
vB_Sau_LmqsRi2-11	141.410 bp	Pseudomonas phage BSwM KMM1	<i>Caudoviricetes</i> Beachtlicher Host-range umfasst <i>Pseudomonas</i> spp. (gram negativ) bis <i>Staphylococcus</i> spp. (gram positiv); Tail Protein mit Lysin-Aktivität

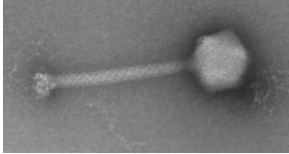
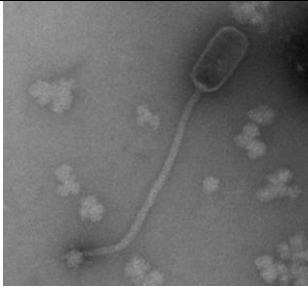
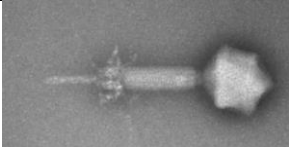
Darüber hinaus wurden die **Wirtsspektren** der im Projekt neu isolierten Phagen gegenüber den jeweils 60 Isolaten pro Bakterienart untersucht. Die Bestimmung des Wirtsspektrums erfolgte mittels „Spot Test“. Hierbei wurden zehnfache Verdünnungsreihen der Phagen auf einen Bakterienrasen aufgetropft und nach einer Bebrütung die Anzahl der Plaques in den einzelnen Verdünnungsstufen abgelesen. Die Untersuchungen wurden zwei Mal wiederholt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Die Wirksamkeit der Phagen umfasste für *E. coli* 3 bis 28 % und für *S. aureus* 2 bis 58 % der untersuchten Isolate. Der *E. coli*-Phage vB_Eco_LmqsRi69-19 und der *S. aureus*-Phage vB_Sau_LmqsRi69-1 zeigten mit 28 % bzw. 58 % Wirtsabdeckung die breitesten Wirtsspektren für die jeweilige Bakterienart. Von den jeweils 60 untersuchten Bakterienisolaten waren 25 *E. coli*- und 23 *S. aureus*-Isolate gegenüber keinem der getesteten Phagen empfänglich. Fünf *S. aureus*- und neun *E. coli*-Isolate zeigten im Verlauf der zwei Wiederholungsuntersuchungen sowohl positive als auch negative Ergebnisse und damit eine nicht zuverlässig reproduzierbare Empfänglichkeit.

Zudem wurden **elektronenmikroskopische Aufnahmen** von einem Teil der Phagen erstellt. So konnte eine zusätzliche Kontrolle der Taxonomie aufgrund der Morphologie erfolgen. Insgesamt konnte durch die Aufnahmen bestätigt werden, dass im Rahmen des Projektes eine diverse Phagensammlung entstanden ist, die Phagen der drei wichtigsten Morphologien umfasst: Myoviren (vB_Eco_LmqsRi2-3, vB_Eco_LmqsRi4-3, vB_Sau_LmqsRi5-1), Siphoviren (vB_Eco_LmqsRi6-1, vB_Sau_LmqsRi4-1) und Podoviren (vB_Eco_LmqsRi2-6, vB_Eco_LmqsRi2-8). Alle untersuchten Phagen stammen aus der therapeutisch wichtigsten Phagengruppe der *Caudoviricetes* (Tabelle 5).

Tabelle 5. Übersicht über die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Phagen.

Bakterium	Phage	EM-Aufnahme*
<i>E. coli</i>	vB_Eco_LmqsRi2-3	
	vB_Eco_LmqsRi4-3	
	vB_Eco_LmqsRi2-6	
	vB_Eco_LmqsRi6-1	
	vB_Eco_LmqsRi2-8	

S. aureus	vB_Sau_LmqsRi2-11	
	vB_Sau_LmqsRi4-1	
	vB_Sau_LmqsRi5-1	

*Elektronenmikroskopische Aufnahme

Vorbereitung zur Untersuchung der Phagenwirkung in infiziertem Gewebe (LMQS, Pharma):

Zur Wirkung der Bakteriophagen im Zellverband (Zellen und Gewebe) soll im Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie zunächst die Wirkungen der Bakteriophagen auf isolierte Epithelzellen des Rindereuters untersucht werden. Dafür wurde bereits eine Primärkultur von Euterepithelzellen aus Milch gewonnen. Zu diesem Zweck wurden aus verschiedenen Rohmilchproben Euterepithelzellen isoliert und angezchtet (Abbildung 3a), um ausreichend viele Isolate für die Untersuchungen zu haben. Die gewonnenen Zellen wurden durch immunhistologische Untersuchung untersucht, um ihren Zelltyp gegenüber anderen in der Milch befindlichen Zellen zu verifizieren. Hierfür wurden die Zellen mittels Cytokeratin- und Vimentin-Antikörper gefärbt (Abbildung 3b). Die gewonnenen Zellen waren Vimentin negativ und Cytokeratin positiv, was für das Vorhandensein von Epithelzellen spricht.

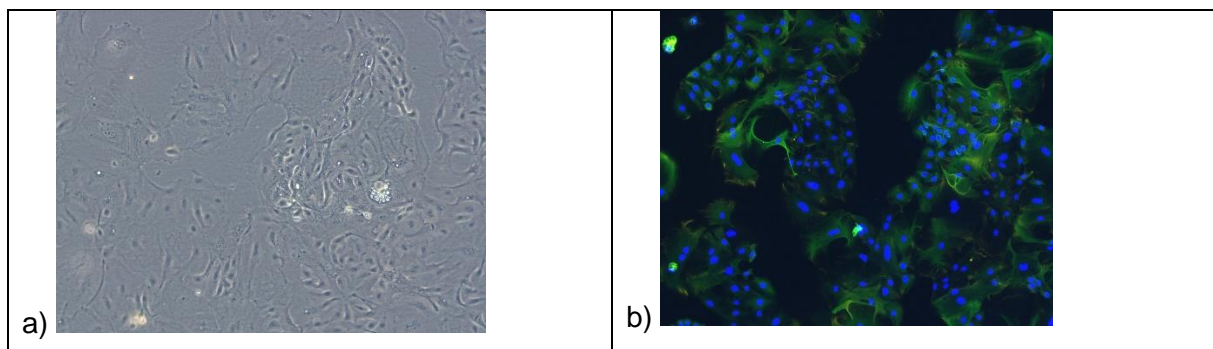
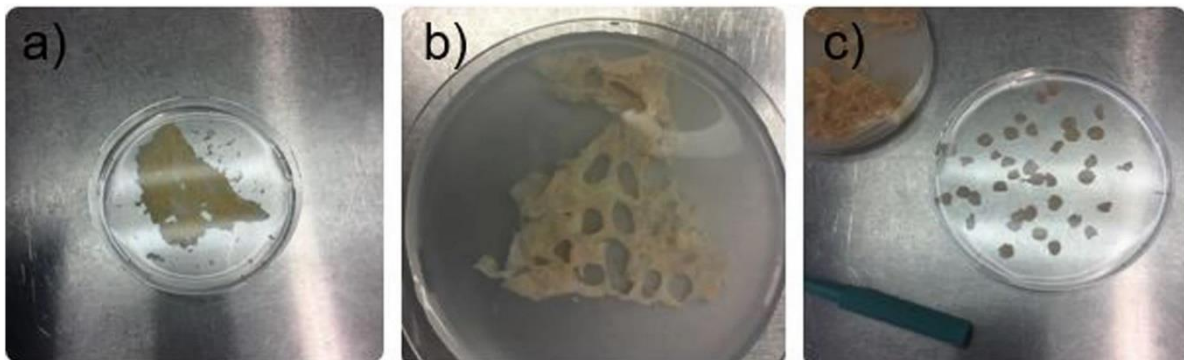


Abbildung 3. Isolierte Euterepithelzellen im a) Lichtmikroskop und nach b) immunhistochemischer Färbung (blau DAPI-gefärbter Zellkern, grün Cytokeratinskelett)

Für die zweite *In-vitro*-Methode erfolgte die Gewinnung von Euterpräzisionsschnitten (Abbildung 4). Dazu wurden Euter vom Schlachthof bezogen und im Institut so weiterverarbeitet, dass standardisierte Präzisionsschnitte (Precision cut bovine udder slices, PCBUS) gewonnen wurden.

Die erzeugten Schnitte wurden im Folgenden regelmäßig auf Vitalität überprüft und sollen später als ein Modell für die frühe Infektion mit Mastitis-Erregern dienen.

From: [Precision-cut bovine udder slices \(PCBUS\) as an in-vitro-model of an early phase of infection of bovine mastitis](#)



a glandular tissue of the udder after using a dermatome with a layer thickness of 250 μm in a petri dish with sterile PBS; b glandular tissue after punching; c obtained PCBUS with a diameter of 6 mm

Abbildung 4. Präzisionsgeschnittene Rindereuter-Schnitte als Modell, künstlich infiziert

Da die Bakteriophagen für die spätere Verwendung mit einem Antibiotikum (Ampicillin) und einem weiteren antibiotisch wirkenden Wirkstoff (N-Acetylcystein, NAC) kombiniert werden sollen, wurde darüber hinaus in der Mikrobiologie mit *E. coli* die minimale Hemmkonzentration (MIC) bestimmt. Die MIC betrug 4 $\mu\text{g/ml}$ für Ampicillin und 2-2,5 mg/ml für NAC. Zudem erfolgten die ersten Kombinationsversuche mit Bakteriophagen, deren Auswertung noch aussteht.

Stand des Vorhabens:

Finanzplan: Der Finanzplan wurde eingehalten.

Der Arbeitsplan wurde entsprechend des Zeitplans im Projektantrag eingehalten.