



universität
wien

Diplomarbeit

Titel der Diplomarbeit

**Auswirkung von antimikrobiellen Substanzen (Antibiotika) auf
Biofilme von Staphylococcus aureus und Koagulase –negative
Staphylokokken unter differentiellen Umweltbedingungen**

Verfasser

Jollmas Halimi

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 441

Studienrichtung (lt. Studienblatt):

Diplomstudium Genetik-Mikrobiologie

Betreuer:

Univ. Doz. Dr. Hans-Jürgen Busse

1.	Einleitung	4
1.1	Bakterien	4
1.1.1	Klassifikation der Bakterien	5
1.1.2	Gattung Staphylococcus	6
<i>1.1.2.1</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	6
<i>1.1.2.2</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	8
1.1.3	Biofilmbildung bei Staphylokokken	10
1.2	Antibiotika	13
1.2.1	Antibiotika – Einteilung	13
1.2.1.1	Wirksamkeit (bakterizid oder bakteriostatisch)	13
1.2.1.2	Angriffsziel oder Angriffsort	14
1.2.2	Vancomycin	15
1.2.2.1	Wirkmechanismus	16
1.2.2.2	Pharmakokinetik	16
1.2.2.3	Anwendungen	16
1.2.2.4	Nebenwirkungen	17
1.2.3	Daptomycin	17
1.2.3.1	Wirkmechanismus	17
1.2.3.2	Pharmakokinetik	18
1.2.3.3	Anwendungen	19
1.2.3.4	Nebenwirkungen	19
1.2.4	Linezolid	19
1.2.4.1	Wirkmechanismus	19
1.2.4.2	Pharmakokinetik	20
1.2.4.3	Anwendungen	20
1.2.4.4	Nebenwirkungen	21
1.2.5	Tigecyclin	21
1.2.5.1	Wirkungsmechanismus	22
1.2.5.2	Pharmakokinetik	22
1.2.5.3	Anwendungen	22
1.2.5.4	Nebenwirkungen	22
1.2.6	Telavancin	23
1.2.6.1	Wirkmechanismus	24
1.2.6.2	Pharmakokinetik	25
1.2.6.3	Anwendungen	25
1.2.6.4	Nebenwirkungen	25
2.	Materialien und Methoden	27
2.1	Materialien	27
2.1.1	Bakterienstämme	27
2.1.2	Antibiotika	28
2.1.3	Chemikalien	29
2.1.4	Geräte und sonstiges Material	30
2.2	Methoden	32
2.2.1	Mikrodilutionsverfahren – Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) 32	
2.2.1.1	Praktische Durchführung	33
2.2.2	Sensititre susceptibility system (TREK Diagnostic system)	35
2.2.2.1	Praktische Durchführung	36

2.2.3	Quantifizierung der Biofilmbildung	37
2.2.3.1	Praktische Durchführung	38
2.2.4	Bestimmung der Optische Dichte (OD)	40
2.2.4.1	Praktische Durchführung	41
2.2.5	Wachstumskontrolle – Lebendkeimzahlbestimmung	42
2.2.5.1	Praktische Durchführung	43
2.2.6	Software	45
3.	Ergebnisse und Diskussion	46
3.1	Ergebnisse	46
3.1.1	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)	46
3.1.2	Biofilmreduktion als Folge der Behandlung mit Telavancin und Vancomycin	51
3.1.3	Ergebnisse der Wachstumskontrolle	59
3.2	Diskussion	67
4.	Literaturverzeichnis	71
5.	Abkürzungen	80
6.	Tabellenverzeichnis	83
7.	Abbildungsverzeichnis	84
8.	Zusammenfassung	86
9.	Anhang:	88

1. Einleitung

1.1 Bakterien

Bakterien sind einzellige Mikroorganismen mit einem für Prokaryonten typischen Zellaufbau (2). Sie unterscheiden sich grundsätzlich von den anderen Organismen (Algen, Protozoen, Pilze, Tiere und Pflanzen) dadurch, dass sie einfacher aufgebaut sind (1). So fehlt bei Bakterien im Vergleich zu den eukaryonten Zellen die Kernmembran, Nukleolus, endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat, Lysosomen, Chloroplasten, Mitochondrien und Mikrotubuli. Bakterien besitzen aber eine komplexe Zellhülle, die den Eukaryonten fehlt (1,2).

Die Zellwand der Bakterien enthält als wesentlichen Baustein ein netzwerkartig angelegtes und als Sack ausgebildetes Riesenmolekül (Sacculus), das als Peptidoglykan oder Murein bezeichnet wird (6). Das Peptidoglykan ist ein Heteropolymer, das aus einer Polysaccharidkomponente und einem Peptidanteil besteht (4). Die Zusammensetzung der Zellwand ist für das unterschiedliche Verhalten der Zelle bei der Gramfärbung verantwortlich, die ein wichtiges taxonomisches Merkmal ist (1). Durch die Gramfärbung lassen sich Bakterien in drei Gruppen einteilen (siehe Abb.1):

- **Gram-negative Bakterien**
- **Gram-positive Bakterien**
- **Gram-variable Bakterien**

Gram-negative Bakterien haben eine dünne Zellwand mit einer einschichtigen Peptidoglykanschicht, die 5-10% des Trockengewichts der Zellwand ausmacht (4).

Gram-positive Bakterien haben eine dickere, homogen aufgebaute Zellwand mit mehrschichtiger Peptidoglykanschicht. Die Zellwand stellt in diesem Falle bis zu 70% des Trockengewichts dar (6).

In **Gram-variable Bakterien** fällt die Gram-Färbung unterschiedlich aus, das bedeutet, dass solche Bakterien je nach Alter eine unterschiedliche Gram-Färbung zeigen (4,6).

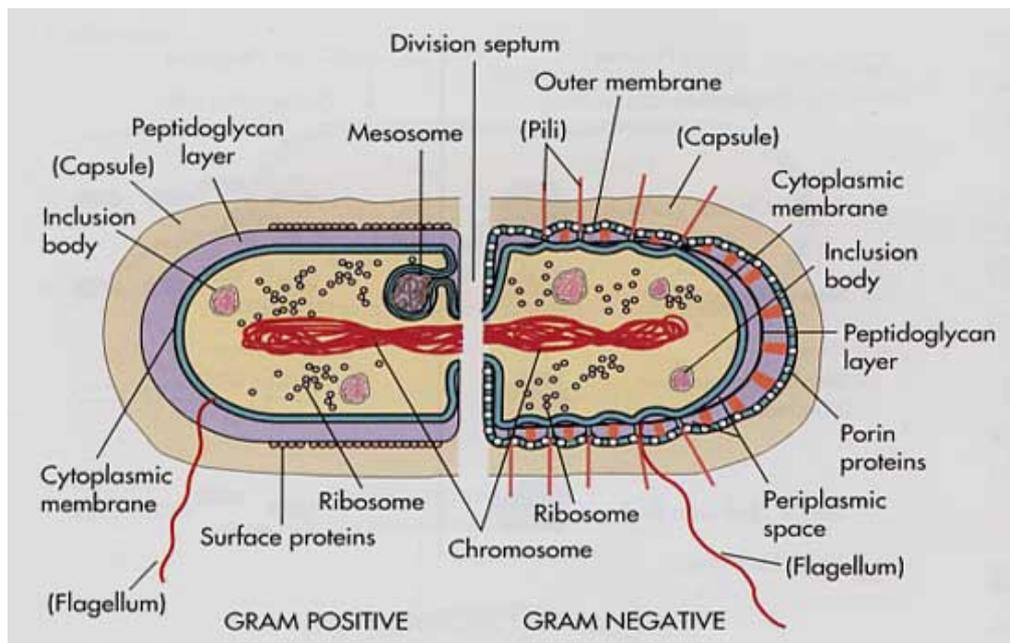


Abb.1: Gram-positive und Gram-negative Bakterien. Ein Gram-positive Bakterium hat eine dickere Peptidoglykanschicht (links). Ein Gram-negative Bakterium hat eine dünne Peptidoglykanschicht und einer äußeren Membran (rechts) (5).

1.1.1 Klassifikation der Bakterien

Die Klassifizierung der Bakterien basiert auf den phylogenetischer Marker, und die nachfolgenden Gruppen sind ausschließlich auf der Basis der Phylogenie definiert (86):

1. Acidobacteria; 2. Actinobacteria; 3. Aquificae; 4. Armatimonadetes; 5. Bacteroidetes;
 6. Caldiseptica; 7. Chlamydiae; 8. Chlorobi; 9. Chloroflexi; 10. Chrysiogenetes;
 11. Cyanobacteria; 12. Deferribacteres; 13. Deinococcus-Thermus; 14. Dictyoglomi;
 15. Elusimicrobia; 16. Fibrobacteres; 17. Firmicutes; 18. Fusobacteria;
 19. Gemmatimonadetes; 20. Lentisphaerae; 21. Nitrospira; 22. Planctomycetes;
 23. Proteobacteria; 24. Spirochaetes; 25. Synergistetes; 26. Tenericutes;
 27. Thermodesulfobacteria; 28. Thermomicrobia; 29. Thermotogae; 30. Verrucomicrobia
- (3).

1.1.2 Gattung *Staphylococcus*

Domäne: *Bacteria*

Phylum: *Firmicutes*

Klasse: *Bacilli*

Ordnung: *Bacillales*

Familie: *Staphylococcaceae*

Gattung: *Staphylococcus* (3)

Die Gattung *Staphylococcus* (griech: staphyle = Traube, kokkos = Kern bzw. Kugel) enthält Gram-positive kugelförmige Bakterien, die in Haufen, Tetraden oder in Paaren auftreten (9). Sie umfasst 39 beschriebene Spezies, die fakultativ anaerob sind und die Haut und Schleimhäute von Menschen und Tieren besiedeln (7). Staphylokokken sind nicht sporenbildend, aber resistent gegen Austrocknung und werden leicht mit Staubteilchen durch die Luft und über Oberflächen übertragen. Sie besitzen das Enzym Katalase (im Gegensatz zu Streptokokken) (8). Staphylokokken werden aufgrund der Eigenschaft zur Bildung von freier Koagulase in Koagulase-positive (*S. aureus*) und Koagulase - negative Staphylokokken (*S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. lugdunensis*, *S. saprophyticus*, *S. xylosus*, *S. cohnii*) unterteilt (9). Aus medizinischer Sicht sind beim Menschen zwei Arten von Bedeutung: *Staphylococcus aureus* – ein gelb pigmentiertes Bakterium und *Staphylococcus epidermidis* – ein nicht pigmentiertes Bakterium, das sich auf der Haut und den Schleimhäuten findet (8). Staphylokokken gehören zu den häufigsten Verursachern von im Krankenhaus erworbenen Infektionen, deren Häufigkeit stetig zugenommen hat. Vor allem *S. aureus* und *S. epidermidis* verursachen Erkrankungen, die von leichten Haut- und Wundinfektionen bis hin zu lebensbedrohlichen Infektionen wie Pneumonien, Sepsis oder Endokarditis reichen (10, 11).

1.1.2.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus sind gram-positive, kugelförmige Bakterien, die sehr oft in Haufen angeordnet sind. Sie können keine Sporen bilden und sind unbeweglich (9, 15). Medizinisch gesehen ist *S. aureus* die wichtigste (Koagulase-positive) *Staphylococcus*-Art und gehört zu den häufigsten Verursachern nosokomial erworbener Infektionen (7, 12). *S. aureus* verursacht oberflächliche und tief-invasive eitrige Infektionen, Sepsis und Endokarditis sowie Intoxikationen (13, 14). Studien zeigen, dass bei bis zu 70%

aller Menschen die Haut durch diesen Keim besiedelt ist ohne dass eine Erkrankung vorliegt. Es sieht aber ganz anders aus in Krankenhäusern (wegen nosokomialer Infektionen), weil es bei Patienten mit einer offenen Wunde und geschwächtem Immunsystem schwere Infektionen hervorrufen kann. Zu seiner klinischen Bedeutung tragen auch die zahlreichen von *S. aureus* gebildeten Pathogenitätsfaktoren bei (9, 15, 16):

- **Zelluläre Pathogenitätsfaktoren**
- **Extrazelluläre Pathogenitätsfaktoren**

1. Zelluläre Pathogenitätsfaktoren:

S. aureus bildet eine **Schleimkapsel**, die die Phagozytose behindert. **Protein A** führt zum Ausfall von Antikörpern (insb. von IgA). Auch dies schützt die Staphylokokken vor der Phagozytose (17).

Clumping Factor (C. F.) vermittelt die Bindung von Staphylokokken an Fibrinogen (Fibrinogen – Rezeptor) in verletztem Gewebe, auf medizinischen Implantaten sowie Kathetern, an die sich zuvor Fibrinogen angelagert hat (9).

2. Extrazelluläre Pathogenitätsfaktoren

Koagulase bindet und aktiviert Prothrombin, das wiederum die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen katalysiert und so zur Koagulation führt (17).

Staphylokinase. Unter Einwirkung dieses Enzyms entsteht aus Plasminogen Plasmin (Synonym: Fibrinolytin). Sie ermöglicht als Virulenzfaktor die weitere Ausbreitung der Erreger im infizierten Gewebe.

DNase ist eine thermostabile Nuklease, die DNA spaltet und die Ausbreitung der Erreger im Gewebe erleichtert.

Lipasen tragen ebenfalls zur Ausbreitung der Erreger im Gewebe bei (9).

Hyaluronidase baut die interzelluläre Hyaluronsäure ab und trägt so auch zur Ausbreitung der Staphylokokkeninfektion bei.

Hämolsine (α , β , γ , δ , ϵ) zerstören Erythrozyten, Thrombozyten aber auch andere Säugertierzellen, und schädigen so das Gewebe. Das α -Hämolysin zerstört Phagozyten und behindert damit die Phagozytose (9).

Leukozidin zerstört Granulozyten und Makrophagen und beeinträchtigt auf diese Weise ebenfalls Phagozytose (9, 17).

Enterotoxine verursachen durch übermäßig vorhandene Zytokine Durchfälle und Erbrechen. Zu dieser massiven Ausschüttung von Zytokinen kommt es, weil die Enterotoxine als Superantigene wirken. Sie sind relativ hitzeresistent (17).

Toxic-Shock-Syndrom-Toxin-1 (TSST-1) besitzt auch eine Superantigenwirkung, d.h. es bewirkt eine polyklonale CD4-T-Zell-Aktivierung mit unkoordinierter Freisetzung von TNF- α und IL-2, und es resultiert das Toxic-Shock-Syndrom (TSS) (9, 17).

Exfoliatine A und B verursachen das Staphylococcal-Scalded-Skin-Syndrom (SSSS). Diese Serinproteasen binden sich an Zytoskelettproteine und lockern die Desmosomen (9).

1.1.2.2 *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis gehören zu den Gram – positiven, saprophagen Koagulase – negative Staphylokokken. *S. epidermidis* unterscheiden sich von *S. aureus* dadurch, dass er keine Koagulase bilden kann und auch eine Reihe von Virulenzfaktoren fehlen, die bei *S. aureus* vorkommen können (9). Sie stellen einen wesentlichen Bestandteil der kommensalen Haut- und Schleimhautflora des Menschen dar (19). *Staphylococcus epidermidis* ist für 70-80% der Infektionen durch Koagulase – negative Staphylokokken (KNS) verantwortlich (21). *S. epidermidis* besitzt ein Protein, das zur Anheftung an Kunststoffmaterialien befähigt (17). Das Bakterium sezerniert nach der Adhärenz an Kunststoffmaterialien Polysaccharide, die eine Schleimschicht im Sinne eines Biofilms bilden. In diesem bildet das Bakterium Kolonien die hier vor Phagozyten und Antibiotika geschützt sind.



Abb.2 Staphylokokken – Ausstrich auf Columbia – Blutagarplatte. Oben und links: *Staphylococcus epidermidis*, unten: *Staphylococcus aureus* (07.05.2011).

Trotz ihrer geringen Pathogenität gehören diese Bakterien zu den häufigsten Erregern von Infektionen bei Patienten mit Venenkathetern, künstlichen Herzklappen, Liquorshunts, intraokulären Linsen, Herzschrittmachern, Gelenkprothesen und anderen implantierten Polymeren (18). Biofilmbildung bei *S. epidermidis* wird von mehreren Regulationsmechanismen beeinflusst. Zum Beispiel das Quorum-Sensing-System agr (accessory gene regulator) reguliert die Adhäsionsfaktoren in der frühen Phase der Bildung von Biofilmen. Das icaADBC locus, kodiert für die Proteine, die für die Synthese und Deacetylierung von PIA (Polysaccharide intercellular adhesin) verantwortlich sind und wird durch den globalen Regulator Sigma-Faktor hoch reguliert. Das Produkt von icaR Gen (befindet sich neben dem ica-Operon) ist ein negativer Regulator von icaADBC Operon. Doch die gesamten Signalisierungsnetzwerke, die die Biofilmbildung von *S. epidermidis* kontrollieren, sind noch nicht vollständig verstanden (57). Biofilm-Synthese ist ein primärer Virulenzfaktor, weil durch den Biofilm *S. epidermidis* eine Resistenz gegen antibiotische Behandlung entwickelt. Viele Virulenzfaktoren, die von *S. epidermidis* produziert werden, darunter auch PSM-Peptide (the phenol-soluble modulins), vermitteln die Resistenz gegen das angeborene Immunsystem. *Staphylococcus*

epidermidis besitzt einen Virulenzfaktor namens Poly- γ -DL-Glutaminsäure (PGA). Dieser Virulenzfaktor, der bei *Staphylococcus aureus* nicht gefunden wurde, schützt *S. epidermidis* vor hohen Salzkonzentrationen und zusätzlich vermittelt er Resistenz gegen antibakterielle Substanzen und Phagozytose (56).

S. epidermidis gilt weltweit als häufiger Erreger von Endokarditiden, septischen Infektionen, Wund- und Harnwegsinfektionen, Meningitiden, sowie Erkrankungen des Auges, insbesondere Blepharitiden, Keratitiden und Konjunktivitiden. Laut einer publizierten Studie, sind weltweit ca. 5% aller Haut- und Weichgewebeanfektionen durch Koagulase-negative Staphylokokken bedingt. Nach *Staphylococcus aureus*, stellen Koagulase-negative Staphylokokken zusammen mit den Beta-hämolyisierenden Streptokokken die häufigste Erregergruppe derartiger Infektionen (20).

1.1.3 Biofilmbildung bei Staphylokokken

Biofilme werden definiert als eine Lebensgemeinschaft mikrobieller Zellen, die sich durch Bildung einer extrazellulären, meist aus Polysacchariden und Proteinen bestehenden Matrix in einem engen Kontakt zueinander und zu diversen Oberflächenstrukturen befinden (20, 23, 24). Die Bildung eines Biofilms auf einer Polymer-Oberfläche verläuft in zwei Phasen (19, 22, 25):

- die erste Phase beginnt mit der Anheftung (Bindung) einzelner Bakterienzellen an der Polymer-Oberfläche
- in der zweiten Phase folgt die Proliferation und Akumulation der Bakterienzellen in vielen Zellschichten, und außerdem kommt es zur Bildung der *Glycocalyx*, die die Bakterienzellen umhüllt.

Eine entscheidende Rolle am Beginn der Biofilmbildung spielen die sog. MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules). MSCRAMMs sind Oberflächenadhäsine (wie z.B. Fibrinogen oder Fibronectin), die die Bindung an die Wirtsproteine vermitteln (22).

Die Moleküle, die Zellen in einem Staphylokokkus-Biofilm verbinden sind die Exopolysaccharide PIA (Polysaccharid-interzelluläre-Adhäsine), Teichonsäuren und einige Proteine wie Aap (accumulation-associated protein) (27).

Später, (wie in Abb.3) Bakterienzellen können aus dem Biofilm ablösen, und das ist ein Prozess, der anscheinend sehr wichtig für die Verbreitung eines Biofilm-assoziierten

Infektion ist (28). Eine Schlüsselrolle für den Verlauf einer Biofilm-assoziierten Infektion haben die PSM – Peptide (the phenol – soluble modulins). PSMs sind eine Familie von Alpha-Helix, amphipathische Peptide, die von vielen *Staphylococcus* – Arten ausgeschieden werden. Studien haben gezeigt, dass die Expression der PSM - Peptide zu Zellablösung, Verbreitung der Infektion und Anlockung und Aktivierung von Immunzellen führt (25, 28, 29).

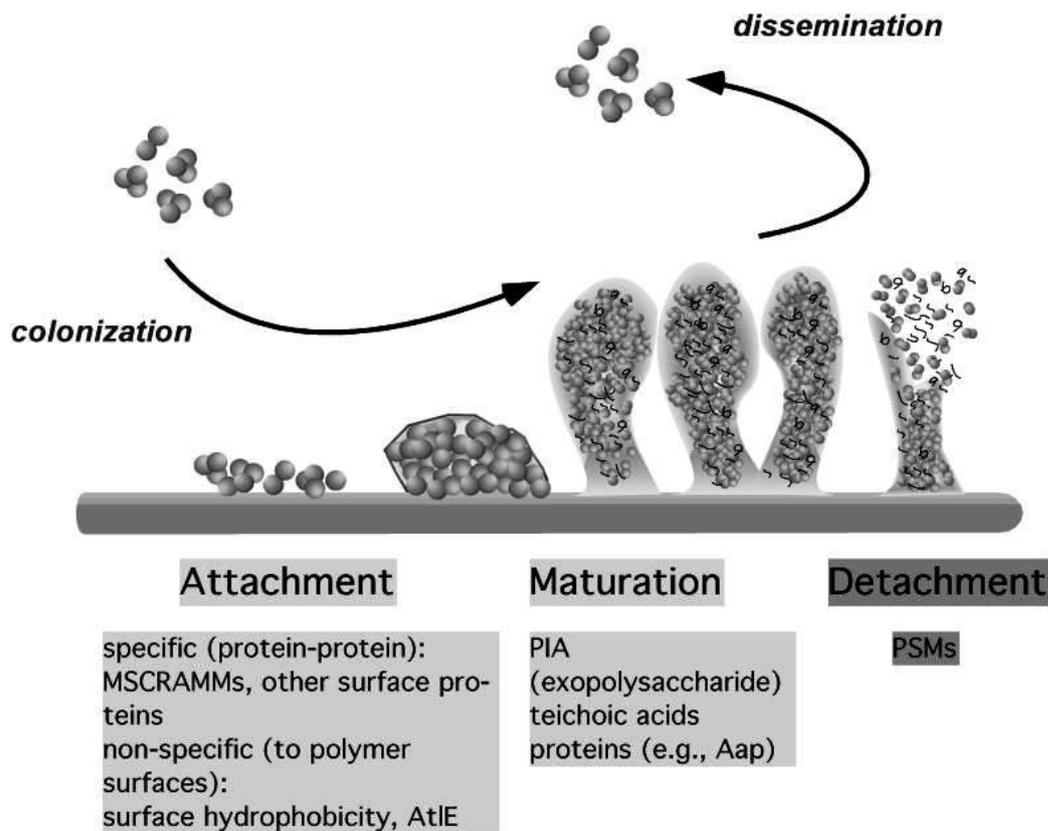


Abb.3 Phasen der Biofilm-Entwicklung in Staphylokokken (28)

Biofilmbildung von *Staphylococcus epidermidis* und *S. aureus* wird durch das vom *ica*-Operon kodierte Polysaccharid-interzelluläre-Adhäsion (PIA) vermittelt. PIA, welches auch als PNAG (Poly-N-acetylglukosamin) genannt wird, ist ein Homopolymer, das aus linearen β -1,6-verknüpften N-Acetylglukosamin (GlcNAc) zusammensetzt.

Die Biosynthese von PIA bei Staphylokokken folgt in 3 Schritten (Abb.3) (26, 27):

- Das IcaA fügt GlcNAc (N-Acetylglukosamin)-Reste vom UDP-GlcNAc auf die wachsende PIA-Kette an. Für eine vollständige Aktivität benötigt die IcaA – Transferase die Präsenz von IcaD.
- Man vermutet, dass die entstehende PIA-Kette dann vom IcaC exportiert wird.
- Nach dem Export wird PIA von IcaB de-acetyliert, um positive Oberflächenladung des Polymers, die entscheidend für seine Lokation und biologische Funktion sind, zu erhöhen.

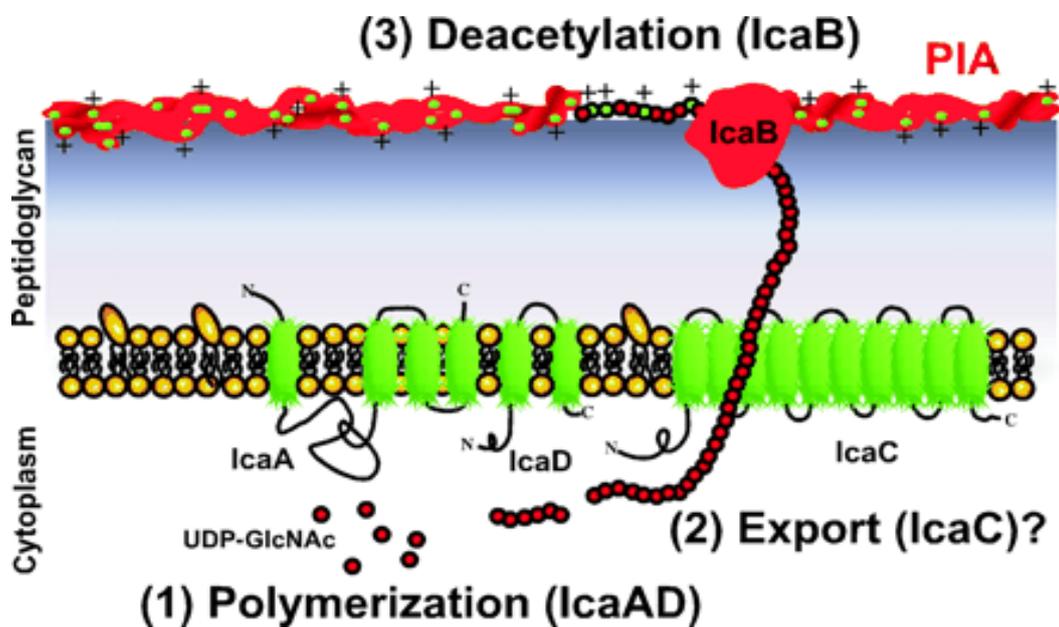


Abb.4 Modell der Biosynthese von PIA (27)

Der *ica*- Locus besteht aus einem *icaR* (Regulator) Gen und *icaADBC* (Biosynthese) Genen.

icaR hat eine Repressorfunktion (Deletion in *icaR* führt zu vermehrter PIA-Expression).

icaA hat eine N-acetylglucosaminyl-Transferase Aktivität und bildet zusammen mit *icaD* kurze Oligomere aus N-acetylglucosaminen.

icaD unterstützt *icaA* bei der Transferase Aktivität und dient vermutlich als Verbindungsglied von *icaA* und *icaC*.

icaC ist zuständig für die Produktion längerer Oligomere bei Ko-Expression mit *icaA* und *icaD*.

icaB ist ein entscheidender Faktor für Oberflächenkolonisierung und Biofilmbildung. PIA wird von *icaB* de-acetyliert wodurch die positive Oberflächenladung erhöht wird (27, 28).

1.2 Antibiotika

Die Antibiotikaherstellung ist eine weltweite Industrie, in der viele wichtige Grundlagen der Anzucht mikrobieller Kulturen im großen Maßstab erstmals entwickelt wurden.

Antibiotika sind antimikrobielle Verbindungen, und werden von einer Vielzahl von Pilzen und Bakterien gebildet, um andere Mikroorganismen am Wachstum zu hemmen oder abzutöten. Medizinisch gesehen die Antibiotika haben einen immensen Einfluss auf die Behandlung von Infektionskrankheiten (8).

1.2.1 Antibiotika – Einteilung

Antibakterielle Substanzen können nach

- Wirksamkeit (bakterizid oder bakteriostatisch)
- Angriffsziel oder Angriffsort

klassifiziert werden (30).

1.2.1.1 Wirksamkeit (bakterizid oder bakteriostatisch)

Antibakteriell wirkende Substanzen können an verschiedenen Strukturen oder Enzymsystemen der Bakterienzelle angreifen und sie in ihrer Funktion bzw. in Wachstums-, Vermehrungs- oder Lebensfähigkeit schädigen. Nach den Wirkungstypen werden unterschieden:

Bakteriostase. Hierunter versteht man die Wirkungsweise einer antibakteriellen Substanz, als deren Folge die Bakterien an der Vermehrung gehindert, aber nicht abgetötet werden. Wird das Antibiotikum von den Bakterien getrennt, können diese sich wieder vermehren, d.h. eine reversible Hemmung (6).

Bakterizidie ist eine irreversible Hemmung, da hierbei eine Abtötung von Bakterien erfolgt, sodass diese sich nach entfernen der antibakteriellen Substanz nicht erneut vermehren können. Definitionsgemäß liegt eine klinisch relevante Bakterizidie vor, wenn innerhalb von 6 Stunden nach Einwirkungsbeginn mindestens 99% der Bakterien in der Kultur abgetötet sind.

Substanzen, die nur in Vermehrung befindliche Bakterien abtöten, heißen sekundär bakterizid; als primär bakterizid bezeichnete Antibiotika töten dagegen auch ruhende Bakterien ab (9, 31).

1.2.1.2 **Angriffsziel oder Angriffsort**

Die Wirkungsmechanismus antimikrobieller Substanzen lassen sich in Bezug auf ihren Angriffsort oder ihren Angriffsziel in 5 Gruppen einteilen (9, 31):

- **Störung der Zellwandsynthese**
- **Störung der Proteinbiosynthese**
- **Störung der Nukleinsäuresynthese**
- **Schädigung der Zytoplasmamembran**
- **Störung der Stoffwechselwege**

Störung der Zellwandsynthese. Die Neusynthese des Mureinsacculus kann auf verschiedenen Stufen gestört werden. Dadurch fehlt den sich vermehrenden Bakterien das starre Stützkorsett: die Zelle platzt auf Grund des in ihr herrschenden hohen osmotischen Drucks und stirbt ab. Zellwandsynthesehemmer wirken also sekundär bakterizid (9).

Störung der Proteinbiosynthese. Die Störung der Proteinbiosynthese erfolgt am Ribosom. Hier können die Anlagerung der tRNA, die Transpeptidierung, die Translokation oder die Ablösung der tRNA gestört sein. Um wirken zu können, muss ein Proteinbiosynthesehemmer das intrazelluläre Ribosom erreichen, d.h. die gesamte Zellhülle durchdringen (9).

Störung der Nukleinsäuresynthese. Die Nukleinsäuresynthese kann auf dreierlei Weise gestört werden (9):

- Folsäureantagonisten verhindern die Bereitstellung von Purinnukleotiden
- Hemmung der Transkription
- Chinolone hemmen die Gyrase (**Gyrasehemmer**), sodass das Supercoilling der DNA gestört wird.

Schädigung der Zytoplasmamembran. Einige Antibiotika schädigen die Zytoplasmamembran. Diese Substanzen, wirken dadurch primär bakterizid (9).

Störung der Stoffwechselwege. Das sind die Antibiotika (wie z.B. Sulfonamide, Trimethoprim, Tetroxoprim), die die Synthese essentielle Metabolite stören (31).

In dieser Diplomarbeit geht es darum, vor allem die antibakterielle-Wirkungsstärke von Vancomycin (als Reserveantibiotikum) und Telavancin (als neues Antibiotikum) auf Biofilme von *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* unter differentiellen Umweltbedingungen zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden folgende Antibiotika verwendet:

- Vancomycin
- Daptomycin
- Linezolid
- Tigecyclin
- Telavancin

1.2.2 Vancomycin

Vancomycin ist ein trizyklisches Glykopeptid, das aus *Streptomyces orientalis* gewonnen wurde und in Form seines Hydrochlorids gut wasserlöslich und stabil ist (31). Vancomycin ist ein makrolytische Glykopeptid mit einem Molekulargewicht von 1449,22 g/mol (9).

Dieses Glykopeptidantibiotikum, wirkt gegen fast alle Gram-positiven, nicht aber gegen Gram-negative Bakterien. Vancomycin ist ein Reserveantibiotikum zur Behandlung von Infektionen durch Oxacillin-resistente Staphylokokken und Mezlocillin-resistente Enterokokken sowie bei antibiotika-assoziierten schweren *Clostridium difficile* – Kolitiden (9).

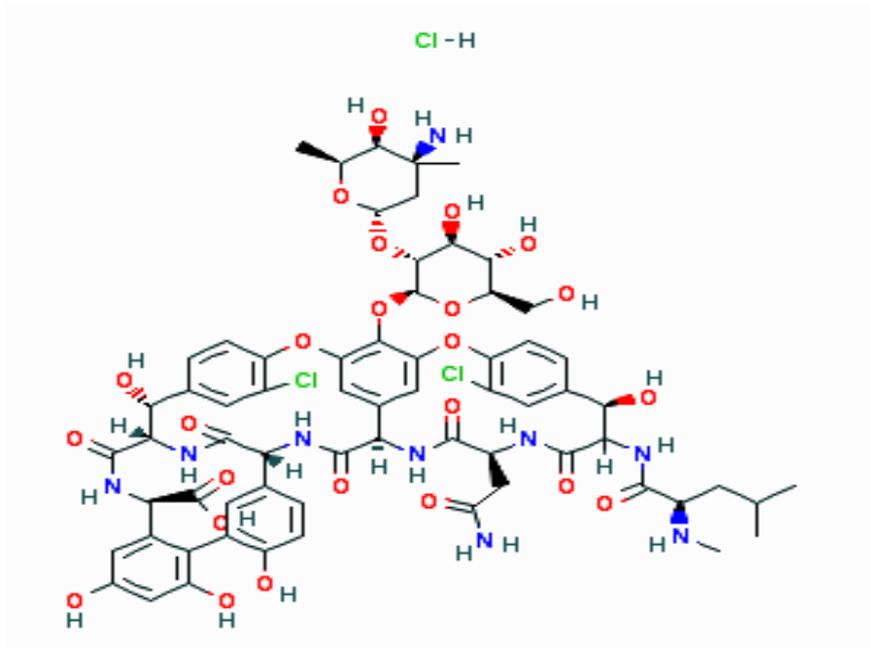


Abb.5: Chemische Struktur von Vancomycin (32).

1.2.2.1 Wirkmechanismus

Vancomycin greift hemmend in die Synthese des Mureins in der Bakterienzellwand ein. Es bindet an die terminalen D-Alaninreste des N-Acetylmuraminsäurepentapeptids und verhindert so die Übertragung des Moleküls auf die wachsenden Peptidoglykanstränge. Obwohl eine eigentliche Lysis nicht eintritt, da Vancomycin die Autolysine hemmt, sterben die Zellen ab (degenerativ bakterizider Effekt) (31).

1.2.2.2 Pharmakokinetik

Nach oraler Gabe wird Vancomycin aus dem Gastrointestinaltrakt praktisch nicht resorbiert. Es hat eine Halbwertszeit von 6 h und eine Plasmaeiweißbindung von 55%. Während Vancomycin nur sehr schlecht in Gehirn und Knochen gelangt, ist die Penetration in innere Organe, Körperhöhlen und Abszesse gut. Die Ausscheidung erfolgt zu 80-90% über die Nieren. Bei Niereninsuffizienz können rasch toxische Serumkonzentrationen erreicht werden (9).

1.2.2.3 Anwendungen

Vancomycin wird parenteral verabreicht. Bei der Therapie einer Endokarditis wird es entweder mit Rifampicin (Staphylokokken) oder Gentamicin (Enterokokken) kombiniert. Bei Enterokolitis, hervorgerufen durch *C.difficile*, wird Vancomycin allerdings oral verabreicht (9).

1.2.2.4 Nebenwirkungen

Vancomycin kann zu allergischen Reaktionen und Schwerhörigkeit (besonders bei Niereninsuffizienz) führen (9).

1.2.3 Daptomycin

Daptomycin wurde bereits in den frühen 1980er-Jahren entdeckt, aber erst im Jahr 2003 in den USA und im Jahr 2006 in Deutschland in die Therapie eingeführt (37). Das Antibiotikum ist ein Fermentationsprodukt von *Streptomyces roseosporus* und wird halbsynthetisch hergestellt. Daptomycin ist ein zyklisches Lipopeptid-Antibiotikum, das aus 13 Aminosäuren und einer lipophilen Seitenkette mit einer Decansäure besteht (33, 34).

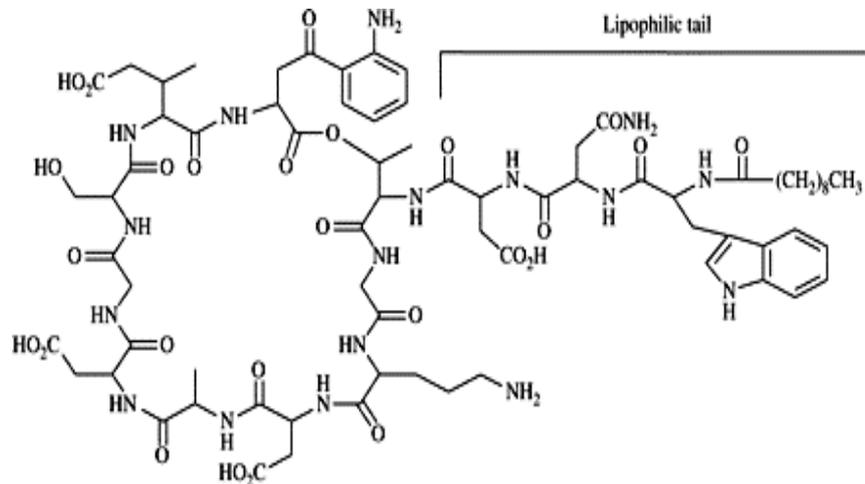


Abb.6: Chemische Struktur von Daptomycin (33).

Das Antibiotikum unterscheidet sich von allen bisher verfügbaren Antibiotika, sowohl im Wirkungsmechanismus als auch aufgrund seiner chemischen Struktur (33, 36). Es wirkt gegen ein sehr breites Spektrum grampositiver Erreger wie MRSA (Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*), VRSA (Vancomycin-resistente *Staphylococcus aureus*), VISA (Vancomycin-intermediär empfindliche *Staphylococcus aureus*) und VRE (Vancomycin – resistente Enterokokken) (33, 34, 35).

1.2.3.1 Wirkmechanismus

Daptomycin bindet sich an die bakterielle Zellmembran und führt dort eine rasche Depolarisierung des normalen Membranpotenzials herbei (8). Die Bindung an die Zellmembran ist Calciumionen-abhängig und es werden Transmembranporen gebildet.

Die depolarisierte Zelle verliert die Fähigkeit, Makromoleküle wie Nucleinsäuren (DNA, RNA) und Proteine herzustellen, was zum baldigen Zelltod führt, ohne jedoch eine Zellyse zu verursachen (8, 42). Es gibt Hinweise, dass Daptomycin auch in die menschlichen Neutrophilen eindringt, was darauf hindeutet, dass es vielleicht die Abtötung von intrazellulären Bakterien verursacht (39).

Daptomycin zerstört die bakterielle Zellmembran irreversibel, im Gegensatz zu Vancomycin, das den Aufbau und die Synthese der bakteriellen Zellwand hemmt (40).

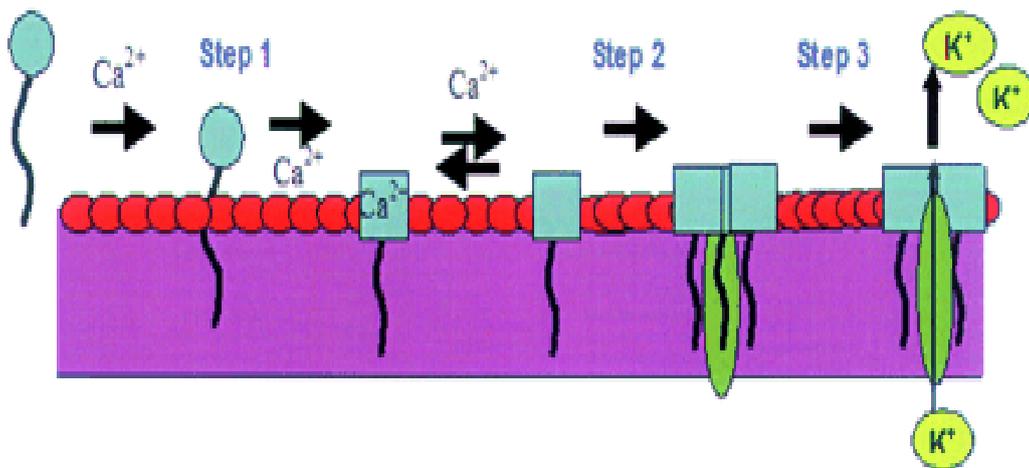


Abb.7: Wirkungsmechanismus von Daptomycin.

Hypothetischen Schritten: 1. Daptomycin bindet mit Hilfe von Calciumionen an die Cytoplasmamembran; 2. Daptomycin zerstört die Membran; 3. Freisetzung von intrazellulären Ionen und Zelltod (33).

1.2.3.2 Pharmakokinetik

Daptomycin ist eine auf Bakterien bakterizid wirkende Substanz mit einer Halbwertszeit von 8 bis 9 Stunden, so dass eine einmalige tägliche Dosierung ausreichend ist (41). Die pharmakokinetischen Parameter von Daptomycin sind dosisabhängig (42). Das Antibiotikum muss intravenös verabreicht werden, weil eine orale Anwendung aufgrund der unzureichenden Resorption nicht zielführend ist (41). Die Proteinbindung liegt bei ungefähr 92% und ist schwach und reversibel. Daptomycin wird über die Nieren ausgeschieden: etwa 78% über den Urin, etwa 5% über die Fäzes. Bei Patienten mit Niereninsuffizienz ist eine Dosisreduktion erforderlich orientiert am Ausmaß der Funktionsstörung (40, 42).

1.2.3.3 Anwendungen

Daptomycin wird intravenös verabreicht und ist sehr wichtig bei der Therapie von (35, 36, 40):

- Komplizierten Haut- und Weichgewebeinfektionen (cSSTI)
- Rechtsseitige infektiöse Endokarditis (RIE) durch *Staphylococcus aureus*
- Bakteriämie durch *Staphylococcus aureus* (SAB) assoziiert mit cSSTI oder RIE

1.2.3.4 Nebenwirkungen

In den Daptomycin – Zulassungsstudien wurde am häufigsten über unerwünschte gastrointestinale Ereignisse berichtet. Am häufigsten kam es zu Obstipation (6,2%), Übelkeit (5,8%), Reaktionen an der Injektionsstelle (5,8%) und Kopfschmerzen (5,4%) (41). Daneben können auch erhöhte Transaminase–Werte bei den Patienten auftreten, die ebenfalls im Zusammenhang mit den Wirkungen auf die Skelettmuskulatur gesehen werden. Die Zahl nephrotoxischer Nebenwirkungen unter der Daptomycin-Therapie ist signifikant niedriger als bei Vancomycin (40, 41).

1.2.4 Linezolid

Linezolid ist ein synthetisches Antibiotikum und gehört zu der neue Klasse der Oxazolidinone (44). Das Antibiotikum wurde zur Therapie bakterieller Infektionen erstmalig von der FDA im April 2000 in den USA zugelassen (46). Linezolid wird in erster Linie im Kampf gegen Gram-positive Kokken, gegen bestimmte Antibiotika resistente sind, wie Vancomycin-resistente Enterokokken, Methicillin-resistente *S. aureus*, und Penicillin-resistente Pneumokokken angewandt (44, 47).

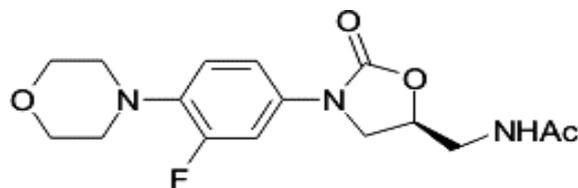


Abb.8 Chemische Struktur von Linezolid (45)

1.2.4.1 Wirkmechanismus

Linezolid entfaltet seine antibakterielle Wirkung durch Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese (46). Ähnlich wie bei Chloramphenicol, ist auch bei Linezolid die Bindestelle die 50S-Untereinheit des Ribosoms, wo die Bildung des Initiationskomplexes für die Proteinsynthese verhindert wird (43, 48).

Das Antibiotikum Linezolid blockiert einen Teil der Stelle A im katalytischen Zentrum (**Abb.9**), so dass die tRNA dort nicht mehr richtig andocken kann. Die Folge: es kann keine weitere Aminosäure an die bereits bestehende Kette angehängt werden, die Proteinsynthese ist unterbrochen. Linezolid schafft es gleichzeitig, das gesamte Ribosom quasi abzuschalten - es hält also nicht nur das ‚Fließband‘ an, sondern schließt gleich die ganze ‚Fabrik‘ (43, 45).

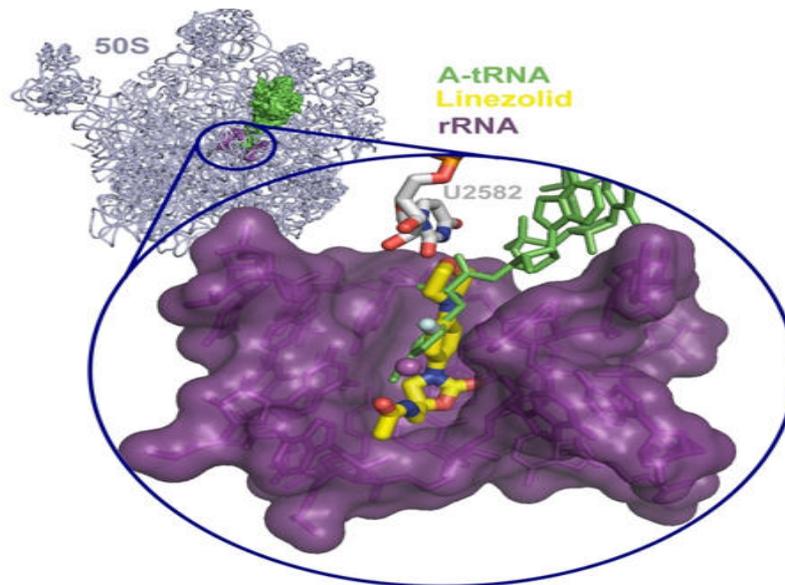


Abb.9 Das Antibiotikum Linezolid (gelb) blockiert die Proteinbiosynthese im Ribosom (lila) pathogener Bakterien, so dass diese absterben (45)

1.2.4.2 Pharmakokinetik

Linezolid ist eine auf Bakterien meistens bakteriostatisch (gegen Enterokokken und Staphylokokken) und bakterizid (gegen die Mehrheit von Streptokokken) wirkende Substanz mit einer Halbwertszeit von 5 bis 7 Stunden (44). Linezolid wird nach oraler Gabe vollständig resorbiert. Linezolid wird durch oxidative Öffnung des Morpholinrings zu zwei Hauptmetaboliten abgebaut, die dann neben der unveränderten Substanz über den Urin eliminiert werden (ca. 30% unverändert, ca. 50% in Form der Hauptmetaboliten). Das Dosierungsintervall für Linezolid ist alle 12 Stunden, und bei Patienten mit Niereninsuffizienz ist keine Dosisreduktion erforderlich (44, 46,).

1.2.4.3 Anwendungen

Das Linezolid wird sowohl für die ambulant als auch für die im Krankenhaus erworbene Pneumonie durch Gram-positive Erreger, darunter auch multiresistente

Keime, sowie schwere Haut- und Weichteilinfektionen durch Staphylokokken oder Streptokokken angewendet (44, 46).

1.2.4.4 Nebenwirkungen

In den klinischen Studien von Linezolid wurden einige unerwünschte Wirkungen berichtet. Bei mehr als 2% der Patienten wird von Kopfschmerzen, Durchfall, Übelkeit, Erbrechen, Verstopfung, Fieber, Gastrointestinale Störungen und leichte Zentralnervensystem (ZNS) Störungen berichtet. Ebenfalls wird auch von Thrombocytopenie, Anämie und Neutropenie berichtet (44, 46).

1.2.5 Tigecyclin

Tigecyclin ist das erste Antibiotikum aus der Klasse von Glycylcycline. Das Antibiotikum ist ein chemisch verändertes Tetracyclinderivat, das auch gegen Tetracyclin-resistente Bakterien wirksam ist (50). Strukturell gesehen ist das Antibiotikum verwandt mit Minocyclin, und der tetrazyklische Kohlenstoffring spielt eine entscheidende Rolle für die antibakterielle Aktivität (49). Tigecyclin trägt eine 9-t-butylglycylamido-Gruppe an Position 9 des D Ringes, und das ist der Grund für die Unempfindlichkeit der Substanz gegenüber häufigen, bei Tetracyclinen auftretenden Resistenzmechanismen (51). Tigecyclin ist ein Breitspektrumantibiotikum, das gegen Gram-positive und Gram-negative Erreger sehr wirksam ist. Das sehr breite Wirkungsspektrum umfasst auch Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA), Vancomycin-resistenter Enterococcus (VRE), *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* und ESBL (Extended Spectrum Beta-Lactamasen)-bildende Erreger (52, 53).



Abb.10 Chemische Struktur von Tigecyclin (50). Blau: charakteristischer Substituent der Glycylcycline, Unterschied zu Minocyclin.

1.2.5.1 Wirkungsmechanismus

Tigecyclin wurde aus chemisch modifizierter Tetracyclin hergestellt, um zwei bedeutende Resistenzmechanismen zu umgehen, welche die Wirkung von vielen Antibiotika bisher eingeschränkt haben (54):

- Schutz vor Effluxpumpen und
- ribosomale Schutzmechanismen

Das bedeutet, dass Bakterien Tigecyclin nicht mittels Effluxpumpen aus der Zelle heraustransportieren können, und auch ribosomale Schutzmechanismen nicht greifen (52). Ähnlich wie die klassische Tetracycline hemmt auch Tigecyclin die bakterielle Proteinbiosynthese, indem es an die ribosomale 30S-Untereinheit der Bakterien bindet. Dadurch wird die Anlagerung der Aminoacyl-t-RNA Moleküle an die A-Seite des Ribosomes blockiert und die Verlängerung der Peptidkette verhindert (49, 50).

1.2.5.2 Pharmakokinetik

Tigecyclin ist eine auf Bakterien meistens bakteriostatisch wirkende Substanz mit einer Halbwertszeit von 42 Stunden, und es wird als Infusion verabreicht (100% Bioverfügbarkeit) mit einer Dosierung von 50 mg alle 12 Stunden (50). Die Ausscheidung erfolgt 60% im Stuhl und 33% im Harn. Bei Patienten mit einer eingeschränkten Leberfunktion wird die Halbwertszeit um ca. 45% verlängert (55). Tigecyclin ist stark an Proteine gebunden und hat ein großes Verteilungsvolumen von 7 bis 9 L/kg. Die Konzentrationen von Tigecyclin in der Gallenblase, Lunge und Dickdarm sind höher als im Serum, während die Konzentrationen von Tigecyclin in den Knochen und Gelenkflüssigkeit niedriger als im Serum sind (49).

1.2.5.3 Anwendungen

Tigecyclin wird intravenös bei komplizierten Haut- und Weichteilinfektionen und komplizierten intraabdominellen Infektionen angewendet, einschließlich gegen solcher Stämme, die gegen Tetracycline oder andere Antibiotika resistent sind (u.a. MRSA, VRE und ESBL-produzierende Bakterien) (49, 50).

1.2.5.4 Nebenwirkungen

In den klinischen Studien von Tigecyclin wurde von einigen unerwünschten Wirkungen berichtet (50, 55):

- **signifikant häufig** wurden gastrointestinale Nebenwirkungen (wie Übelkeit, Erbrechen und Durchfall) festgestellt.
- **gelegentlich** wurden Abszess, Kopfschmerzen, Schwindel, Anstieg der Leberenzyme, Bilirubinämie, Hautausschlag, Blutgerinnungsstörungen, lokale venöse Irritationen festgestellt.
- **selten** wurde über Pankreatitis, Sepsis und Hypoproteinämie berichtet.

1.2.6 Telavancin

In den letzten Jahren hat die Entwicklung von bakterieller Resistenz, vor allem bei Gram-positiven Mikroorganismen eskaliert. Krankheitserreger wie Staphylococcus Arten und Enterokokken (insbesondere Vancomycin-resistenter Stämme) sind äußerst schwierig mit Antibiotika-Behandlung zu beseitigen. Ein neuartiges Lipoglykopeptid-Antibiotikum namens Telavancin wurde im September 2009 von der FDA (Food and Drug Administration) in den USA für die Behandlung von Erwachsenen mit komplizierten Haut- und Weichteilinfektionen zugelassen (60).

Telavancin ist ein Vancomycin-Derivat, und wird halbsynthetisch aus Vancomycin hergestellt (59). Das Antibiotikum hat eine rasche, konzentrationsabhängige, bakterizide Aktivität gegen ein breites Spektrum Gram-positiver Bakterien inklusive MRSA, VRSA sowie Daptomycin- und Linezolid-unempfindliche Staphylokokken (65, 67).

Telavancin enthält die gleiche Kernstruktur wie Vancomycin, aber mit zwei signifikanten Unterschieden (wie in Abb.11).

1.) eine lipophile Seitenkette am Vancosamin Zucker verlängert die Serums-Halbwertszeit und erhöht die antimikrobielle Aktivität gegen resistente *S. aureus* und *Enterococcus* Spezies.

2.) eine polare Phosphonomethyl-Aminomethylgruppe erhöht die Gewebepenetration, und das Ergebnis ist eine verlängerte Halbwertszeit im Vergleich zu Vancomycin (62).

Durch verschiedene Analyse wie die *fluorescence microscopy und ratio imaging analysis* wurde nachgewiesen dass Telavancin im Vergleich zu Vancomycin eine stärkere Bindungsaffinität zu Lipid II hat. Das ist wahrscheinlich auch der Grund warum Telavancin im Vergleich zu Vancomycin eine stärkere antibakterielle Wirkung zeigt (63).

Lipid II spielt eine essenzielle Rolle bei der bakteriellen Zellwand-Biosynthese. Die Lipopolysaccharid Element hemmt die Transglycosylase, die direkt verantwortlich für die Produktion von unreifen Peptidoglykan sind (58). Die Aktivität von Telavancin und anderen antimikrobiellen Substanzen wurde gegen eine globale Sammlung von 10.000 Isolaten von *Staphylococcus aureus* Stämmen untersucht. Das Ergebnis zeigte dass Telavancin sehr aktiv gegen MSSA und MRSA war. (MHK_{50/90} für beide war 0.12/0.25 µg/ml; 100,0% empfindlich). Die Wirkung von Telavancin war 2-, 4- und 8-fach stärker als die von Daptomycin (MHK₉₀, 0,5 µg/ml), Vancomycin oder Quinupristin-Dalfopristin (MHK₉₀, 1 µg/ml) und Linezolid (MHK₉₀, 2 µg/ml) gegen MRSA (66).

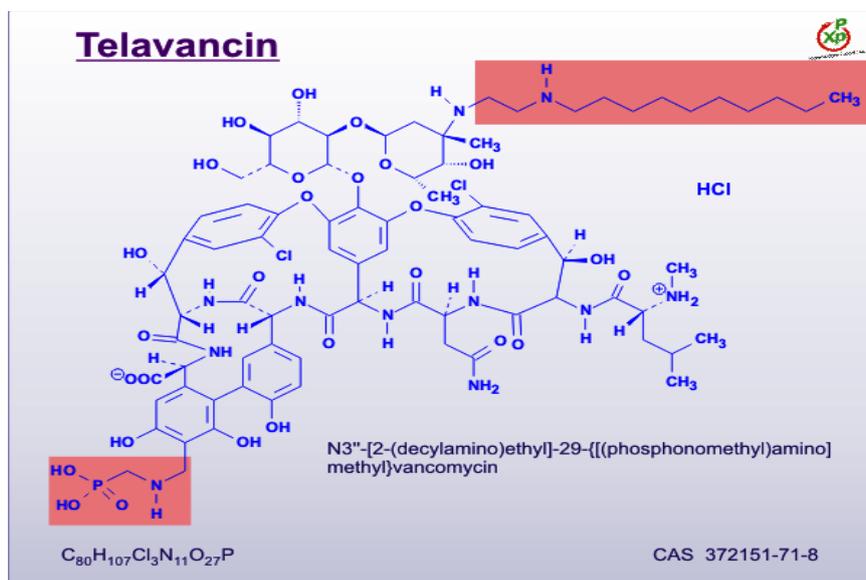


Abb.11 Chemische Struktur von Telavancin (59). Die Unterschiede zum Vancomycin sind rot markiert.

1.2.6.1 Wirkmechanismus

Die antibakterielle Aktivität von Telavancin gegen die in Biofilm eingebetteten Bakterien, kann durch seine chemische Zusammensetzung als Lipoglykopeptid erklärt werden (61). Telavancin besitzt einen ungewöhnlichen dualen Wirkungsmechanismus (59). Telavancin besitzt eine lipophile Decylkette und eine hydrophile Phosphonomethylaminogruppe. Das Antibiotikum bindet an die D-Ala-D-Ala-Sequenz als primäre Bindungsstelle. Diese Wechselwirkung führt zu einer Blockierung der Peptidoglykan-Polymerisierung (Transglycosylierungsreaktion). Telavancin ist ein starker Inhibitor des Transglycosylase Schrittes bei der Peptidoglykansynthese. Es hat eine 10-mal höhere Aktivität bei der Hemmung der Peptidoglykansynthese als Vancomycin. Die Decylaminoethyl Seitenkette fördert die Interaktion mit der

Zellmembran, und diese Interaktion vermittelt eine verbesserte Bindungsaffinität zu den Peptidoglykan Zwischenprodukten (64). Dies führt zu einer Störung der funktionellen Integrität der bakteriellen Membran, wodurch eine schnelle konzentrationsabhängige Depolarisation der bakteriellen Plasmamembran die Permeabilität erhöht und das Austreten von zellulärem ATP und K^+ -Ionen (61). Der Unterschied in der Wirkeffizienz zwischen Telavancin und anderen Glykopeptidantibiotika ist deshalb erhöht, weil Telavancin im Gegensatz zu anderen Glykopeptidantibiotika nicht nur die bakterielle Zellwandsynthese hemmt sondern führt zusätzlich noch eine Depolarisation der bakteriellen Plasmamembran herbei, was deren Permeabilität erhöht bzw. deren Integrität zerstört (59).

1.2.6.2 Pharmakokinetik

Telavancin ist eine auf Bakterien konzentrationsabhängig bakterizid wirkende Substanz mit einer Halbwertszeit von 7 bis 9 Stunden, und es wird als Infusion intravenös verabreicht (59, 62). Das Antibiotikum zeigt einen postantibiotischen Effekt von 4 bis 6 Stunden. Diese Eigenschaften ermöglichen eine einmalige tägliche Dosierung (62). Telavancin hat eine hohe reversible Proteinbindung (ca. 93%), und ein kleines Verteilungsvolumen von ca. 115 ml/kg (60, 64). Die empfohlene Dosis von Telavancin bei Patienten mit normaler Leber- und Nierenfunktion beträgt 10 mg/kg intravenös alle 24 Stunden (62). Etwa zwei Drittel der Telavancin Dosis wird im Urin unverändert ausgeschieden (60, 62).

1.2.6.3 Anwendungen

Telavancin wird bei komplizierten Haut- und Weichteilinfektionen gegen Multiresistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA), Vancomycinresistenter *Staphylococcus aureus* (VRSA) sowie Daptomycin- und Linezolid-unempfindliche Staphylokokken (60, 64, 67).

1.2.6.4 Nebenwirkungen

Wie bei anderen Antibiotika wurde auch für Telavancin über unerwünschte Nebenwirkungen berichtet wie Erbrechen, Übelkeit, Geschmacksstörungen, schaumiger Urin (durch Zusatz von Cyclodextrinen, die die Löslichkeit erhöhen) und Schmerzen an der Einstichstelle, die häufiger auftraten als bei Vancomycin. Es wurde auch über

andere Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen, Verstopfung, Schlaflosigkeit und Juckreiz berichtet, die aber im tolerierbaren Bereich lagen (59, 62, 64, 67).

1.3 Aufgabestellung der Diplomarbeit

Das erste Ziel dieser Arbeit war die *in-Vitro*-Antibiotikaempfindlichkeit von *Staphylococcus aureus* und- *Staphylococcus epidermidis*-Isolaten gegenüber Vancomycin, Daptomycin, Linezolid, Tigecyclin, und Telavancin, mittels Minimale Hemmkonzentrationen (MHKs) zu testen.

Das zweite Ziel dieser Arbeit war die Auswirkung von Vancomycin und Telavancin auf Biofilme von *Staphylococcus aureus* und- *Staphylococcus epidermidis*-Isolaten bei 35°C bzw. 45°C, mittels Bestimmung der Optische Dichte (OD) zu testen (zu vergleichen).

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Bakterienstämme

Um die antimikrobielle Wirkung von Antibiotika (Vancomycin, Daptomycin, Linezolid, Tigecyclin, und Telavancin) zu testen, wurden insgesamt 40 klinische Isolate von *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* aus verschiedenen Ambulanzen und Stationen der AKH Wien verwendet. Die klinischen Isolate waren im Zeitraum von 2007 bis 2010 meistens von PatientInnen mit Implantat-assoziierten Infektionen gewonnen worden.

Für die Qualitätskontrolle wurden zwei Referenzstämme (Kontrollstämme) eingesetzt:

- **ATCC_29213** *Staphylococcus aureus*
- **DSM_3269** *Staphylococcus epidermidis*

Alle Isolate waren mittels Routinelabormethoden als *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* identifiziert und bei minus 80°C gelagert worden. Die Empfindlichkeitstest gegenüber Antibiotika waren mit Standardlabormethoden durchgeführt worden, bezogen auf die Empfehlungen des *National Committee on Clinical and Laboratory Standards (CLSI-Clinical and Laboratory Institute) (M02-A6)*. Üblicherweise wurden alle klinischen Isolate auf Columbia-Blutagarplatten für 18 – 24 Stunden bei 35°C inkubiert.

Tabelle 1: Die verwendeten klinische Isolate: Step=*S.epidermidis* und Stau=*S.aureus*.

Probe Nr.	Klin. Isolate	Abnahmedatum	Keim
1	1339	02.05.2008	Step
2	1879	25.06.2008	Step
3	2977	16.10.2008	Step
4	3558	10.12.2008	Step
5	913	29.03.2009	Stau
6	1824	17.06.2009	Step
7	1787	15.06.2009	Step
8	3697	17.12.2009	Stau
9	3698	17.12.2009	Stau
10	90	09.01.2010	Stau

11	6568	16.05.2007	Stau
12	7947	14.06.2007	Stau
13	9628	18.07.2007	Stau
14	10241	2007	Stau
15	10303	01.08.2007	Stau
16	10863	2007	Stau
17	10937	16.08.2007	Stau
18	10958	16.08.2007	Stau
19	11100	20.08.2007	Stau
20	11431	27.08.2007	Stau
21	7272	01.06.2007	Step
22	8160	19.06.2007	Step
23	10226	31.07.2007	Step
24	11969	07.09.2007	Step
25	13758	15.10.2007	Step
26	13231	04.10.2007	Step
27	14198	24.10.2007	Stau
28	14728	06.11.2007	Step
29	15054	12.11.2007	Step
30	15437	19.11.2007	Step
31	203	06.01.2010	Stau
32	856	19.01.2010	Stau
33	1134	25.01.2010	Stau
34	1773	05.02.2010	Step
35	4422	29.03.2010	Stau
36	4498	30.03.2010	Step
37	6908	12.05.2010	Step
38	7649	26.05.2010	Step
39	15538	04.11.2010	Step
40	15873	11.11.2010	Step

2.1.2 Antibiotika

Um die Empfindlichkeit von *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* gegenüber Antibiotika zu testen, wurden folgende antimikrobielle Substanzen verwendet:

- Vancomycin
- Daptomycin
- Linezolid
- Tigecyclin
- Telavancin

Alle Antibiotika (ausgenommen Linezolid) wurden nach Vorschrift des Herstellers in Aqua destilata gelöst und bei minus 80°C gelagert. Linezolid stand als Infusion zur Verfügung und in flüssigen Stickstoff gehalten. Alle Antibiotika-Stammlösungen (ausgenommen Tigecyclin) hatten eine Konzentration von 10000 µg/ml. Tigecyclin hatte eine Konzentration von 1000 µg/ml (mg/l). Für den Einsatz im Experiment wurden die Antibiotika-Stammlösungen mit destilliertem Wasser entsprechend verdünnt.

2.1.3 Chemikalien

Für die Durchführung verschiedene Experimente wurden folgende chemische und biochemische Materialien (Tabelle 2) verwendet.

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien für diese Diplomarbeit.

Chemikalie	Hersteller
Brain Heart Infusion Agar	Oxoid
Mueller – Hinton – Bouillon	Merck
Magnesium Chloride, Hexahydrate, Molecular Biology Grade	EMD Chemicals
Calcium Chloride dihydrate	Sigma
Aqua bidestilata	Fresenius
Aqua destilata	Braun
Physiologische Kochsalzlösung	Fresenius
Grams Kristallviolettlösung	Merck
Glutaraldehyde Solution Grade III, 25%	Sigma – Aldrich
Cation Adjusted Mueller – Hinton Broth with TES	TREK Diagnostic Systems Ltd.
Demineralised water Sensititre	TREK Diagnostic Systems Ltd

2.1.4 Geräte und sonstiges Material

Für die praktische Durchführung dieser Arbeit wurden die in Tabelle 3 verwendeten Geräte eingesetzt.

Tabelle 3: Verwendete Geräten für dieser Diplomarbeit.

Geräte	Hersteller
McFarland Densitometer DEN-1	Grant Instruments Ltd
Certoclav – Tisch – Autoclav CV – EL 12L/18L	Certoclav Sterilizer GmbH
Vortex Genie 2	Scientific Industries
PS – Microplate, 96 well	Greiner bio – one
Cellstar tubes (50ml)	Greiner bio – one
Cellstar tubes (15ml)	Greiner bio – one
T.C. Tube 17x100mm (Bibby sterilin)	Tilling Drive, Stone, Staffordshire
Injekt 2ml	Braun
Injekt 10ml	Braun
Einmal Kanüle 18Gx1 ½	Medicor Neomed
96 Well Platten Nunclon TM PS Flachboden	Nunc Dänemark
Elektronische Feinwaage Mettler AT 250	Mettler
Brutschrank klein Typ B34	WTE binder
Sensititre CMP2STA 100µl	TREK Diagnostic Systems Ltd
50ml Reagent reservoir 5/Bag Sterile	Corning Incorporated
Tiefkühlschrank MDF – U54V	Sanyo
Kühlschrank UKS	Liebherr

Halbmikrowaage Sartorius	Sartorius Mechatronics Austria GmbH
Stieltupfer, kleiner Wattekopf	Lohmann & Rauscher International GmbH
Untersuchungshandschuhe aus Latex – Puderfrei	Ansell
Pipetboy acu	IBS Integra Biosciences
Glasröhrchen 10ml	Assistent
Pipetten Spitze 10-100µl	Greiner bio – one
Pipetten Spitze 100-1000µl	Greiner bio – one
Eppendorf Pipette 2-20µ	Eppendorf
Eppendorf Pipette 10-100µl	Eppendorf
Eppendorf Pipette 100-1000µl	Eppendorf
Mueller Hinton 2 Agar Platten MH2 90mm	bioMerieux SA
Columbia Agar +5% Hammelblut Platten COS 90mm	bioMerieux SA
Spectrophotometer Zenyth 340s	Anthos Zenyth 340 st
Monitor	Samsung
Rechner (PC)	HP Compaq
Drucker E342n	Lexmark
Magnetrührer Typ KMO 2	Janke und Kunkel GmbH
Digital Camera 3.7V Model NO.FE – 5020	Olympus
Lamina ET 130 V	Ehret GmbH

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrodilutionsverfahren – Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Als Mikrodilution wird eine Technik bezeichnet, bei der die Vertiefungen (Probenkammern) von Mikrotiterplatten mit 100 µl eines Bouillonmediums mit definierten Antibiotikakonzentrationen (gewöhnlich geometrisch von 1 µg/ml auf- und absteigend) und einem definierten Inokulum des Erregers über Nacht inkubiert werden (7). Dabei wird die antimikrobiell wirksame Konzentration eines Hemmstoffes gegenüber einem Teststamm ermittelt.

Quantitative Aussagen zur Antibiotikaempfindlichkeit von Keimen liefern Untersuchungen zur MHK (minimale Hemmkonzentration, engl. MIC, minimal inhibitory concentration) (30). Dabei wird die antimikrobielle Aktivität einer chemischen Verbindung gemessen, indem man die niedrigste Konzentration des Antibiotikums ermittelt, die das Wachstum eines Testorganismus hemmt.

Das MHK-Verfahren für die Testung der Antibiotikaempfindlichkeit beinhaltet einen Antibiotikaverdünnungstest in den Vertiefungen (Probenkammern) einer Mikrotiterplatte. Vertiefungen, in denen eine Verdünnungsreihe des Antibiotikums vorgelegt ist, werden mit einer gleich bleibenden Menge des Testorganismus beimpft (8). Die inokulierten Mikrotiterplatten sind mit einem Deckel zu verschließen und bei 34 – 37°C für 18 – 24 Stunden in normaler Atmosphäre zu inkubieren. Danach sind die Ergebnisse abzulesen, sofern in der Wachstumskontrolle eine deutliche Trübung bzw. ein entsprechendes Sediment vorhanden ist. Die Antibiotikaempfindlichkeit wird zumeist als die höchste Verdünnung (niedrigste Konzentration) des Antibiotikums angegeben, die Wachstum vollständig unterdrückt.

Bei antimikrobiellen Substanzen mit einer bakteriostatischen Wirkung ist die Hemmung des Wachstums reversibel.

MHK-Tests können wichtige Informationen für die Behandlung schwieriger Infektionen oder bei Therapieversagen (wenn Patient trotz geeigneter Antibiotika nicht ansprechen) liefern (7, 30).

Von Vorteil der MHK – Bestimmung ist, dass sie erweitert werden kann, um auch die MBK (minimale bakterizide Konzentration) zu bestimmen, d.h. die niedrigste Antibiotikakonzentration zur Abtötung der Keime. Um festzustellen, ob ein Mittel wirklich bakterizid wirkt und nicht nur das Bakterienwachstum hemmt, werden

Testverdünnungen noch auf ein frisches, wirkstofffreies Medium aufgebracht und für weitere 18 – 24 Stunden inkubiert. Ein Antibiotikum gilt als bakterizid, wenn seine MBK gleich der MHK bzw. nicht mehr als viermal höher als die MHK ist.

Ein Nachteil von MHK- und MBK-Tests besteht darin, dass ihr Befund nur punktuell (zu einem bestimmten Zeitpunkt) abgelesen werden kann (7, 8).

2.2.1.1 Praktische Durchführung

Wie man schon erwähnt wurde, die MHK wurde mittels geometrisch verdünnter Antibiotikallösung in einer Mikrotiterplatte bestimmt. Die praktische Durchführung der MHK – Bestimmung erfolgte nach der Mikrodilutionsmethode in Bouillon basierend auf den Vorgaben von CLSI (M02 – A6) bzw. dort, wo angegeben, nach den Angaben des Herstellers der verwendeten Mikrotiterplatten.

Herstellung der Bakteriensuspension:

- Übernachtskulturen (18 – 24 Stunden bei 35°C) der klinische Isolate auf Columbia – Blutagarplatten züchten
- Bakterienmaterial von einzeln liegende Kolonien (jeweils eines Isolats) mit einem sterilen Wattetupfer entnehmen und in 3 ml 0,9%-igen physiologische NaCl – Lösung überführen
- Herstellen einer Suspension (mittels Densitometer) mit einer optischen Dichte von 0,5 McFarland
- Diese Suspension 1:100 mit dem Kationen – korrigierter Müller – Hinton Bouillon – Medium (MHB) verdünnen

Herstellung der Kationen – korrigierten Müller – Hinton Bouillon (MHB)

- 21 Gramm des Müller – Hinton Bouillon – Konzentrats in einem Liter Aqua destilata auflösen.
- 30 Minuten lang autoklavieren
- Kationenlösungen: $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ entspricht 8,36g in 100 ml Wasser und $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ entspricht 3,68g in 100 ml Wasser.
- Nach dem Herstellen, Kationenlösungen steril filtrieren und 2,5 ml Magnesiumchloridlösung, sowie 5 ml Kalziumchloridlösung der autoklavierten Müller-Hinton Bouillon zusetzen

- pH – Wert der fertigen Lösung 7,2 – 7,4 einstellen

Erstellung der geometrischen Verdünnungsreihe

Die geometrische Verdünnungsreihe von antimikrobiellen Substanzen auf Mikrotiterplatten wurde, wie in Tabelle 4 gezeigt, erstellt:

- Vertiefung A2 bis A12 jeweils mit 50 µl MHB - Lösung befüllen
- Vertiefung A1 mit 100 µl Antibiotikallösung (Konzentration: 512 µg/ml) befüllen
- 50 µl aus der Vertiefung A1 entnehmen und in A2 pipettieren und vermischen
- 50 µl aus dem jeweils vorigen Vertiefung in das nächstfolgende pipettieren
- 50 µl der Antibiotikallösung, die aus der Vertiefung A11 abgehoben wird, verwerfen, weil A12 als Wachstumskontrolle dient
- Vertiefung A1 bis A12 mit 50 µl Bakteriensuspension befüllen
- Vertiefung B2 bis B12 jeweils mit 50 µl MHB - Lösung befüllen
- Vertiefung B1 mit 100 µl Antibiotikallösung (Konzentration: 32 µg/ml) befüllen
- Dieselben Schritte wie zuvor für Reiche A beschrieben, in Reiche B durchführen
- Die inokulierten Mikrotiterplatten für 18 – 24 Stunden bei 35°C inkubieren und mit einem Deckel verschließen

Wie in Tabelle 4 ersichtlich ist befindet sich in Vertiefung A1 die höchste Antibiotikakonzentration mit 512 µg/ml, und in Vertiefung B11 die niedrigste Antibiotikakonzentration mit 0,0156 µg/ml.

Tabelle 4: Schematische Darstellung der geometrischen Verdünnungsreihe von Antibiotika auf Mikrotiterplatten (Angaben in μl). AB=Antibiotika; AB Konz.=Antibiotikakonzentration; AB Endkonz.=Antibiotikaendkonzentration.

	Vertiefung	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Medium		50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	AB 512 $\mu\text{g/ml}$	100 50 →	50 →	50 →	50 →	50 →	50 →	50 →	50 →	50 →	50 →	50 →	
	AB Konz. $\mu\text{g/ml}$	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	
	Keim	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
A	AB Endkonz.	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	
B	Medium		50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	AB 32 $\mu\text{g/ml}$	100 50 →	50 →	50 →	50 →	50 →	50 →	50 →	50 →	50 →	50 →	50 →	
	AB Konz. $\mu\text{g/ml}$	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062 5	0,031 2	
	Keim	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
B	AB Endkonz.	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12 5	0,062 5	0,031 2	0,015 6	

Nach der Inkubation wurde das Wachstum in den Kavitäten unter Zuhilfenahme eines optisch nicht vergrößernden Ablesespiegels beurteilt und der MHK – Wert bestimmt. Zur Kontrolle wurde bei den MHK Bestimmungen auf jeder Mikrotiterplatte zusätzlich der entsprechende Referenzstamm (ATCC_29213 oder DSM_3269) sowie eine positive Kontrolle mitgeführt.

2.2.2 Sensititre susceptibility system (TREK Diagnostic system)

Zur Absicherung der MHK-Ergebnisse wurde eine zusätzliche Methode zur MHK-Bestimmung verwendet, das **Sensititre susceptibility system**. Das “**Sensititre susceptibility system**“ ist eine Mikrobouillondilutionsmethode, der eine qualitative (sensitiv oder resistent) und quantitative minimale Hemmkonzentration (MHK) ermittelt wird. Bei dieser Methode, jede Mikrotiterplatte war mit Antibiotika in verschiedene Konzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) wie in Tabelle 5 vorbeschichtet.

Tabelle 5: Die vorbeschichtete Mikrotiterplatte für das Sensititre susceptibility system

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TLV 0,015	TLV 0,03	TLV 0,06	TLV 0,12	TLV 0,25	TLV 0,5	TLV 1	TLV 2	TLV 4	TLV 8	VAN 0,25	VAN 0,5
B	VAN 1	VAN 2	VAN 4	VAN 8	VAN 16	VAN 32	TEI 0,12	TEI 0,25	TEI 0,5	TEI 1	TEI 2	TEI 4
C	TEI 8	TEI 16	TEI 32	OXA+ 0,06	OXA+ 0,12	OXA+ 0,25	OXA+ 0,5	OXA+ 1	OXA+ 2	OXA+ 4	DAP 0,03	DAP 0,06
D	DAP 0,12	DAP 0,25	DAP 0,5	DAP 1	DAP 2	DAP 4	LZD 0,5	LZD 1	LZD 2	LZD 4	SYN 0,12	SYN 0,25
E	SYN 0,5	SYN 1	SYN 2	SYN 4	CLI 0,5	CLI 1	CLI 2	CLI 4	CIP 0,06	CIP 0,12	CIP 0,25	CIP 0,5
F	CIP 1	CIP 2	CIP 4	CIP 8	TGC 0,03	TGC 0,06	TGC 0,12	TGC 0,25	TGC 0,5	TGC 1	TGC 2	TGC 4
G	TGC 8	ERY 0,12	ERY 0,25	ERY 0,5	ERY 1	ERY 2	ERY 4	ERY 8	ERY 16	GEN 0,06	GEN 0,12	GEN 0,25
H	GEN 0,5	GEN 1	GEN 2	GEN 4	GEN 8	GEN 16	SXT 0,5/9,5	SXT 1/19	SXT 2/38	SXT 4/76	NACL	POS

Antimikrobielle Substanzen in der Mikrotiterplatte:

TLV=Telavancin; *VAN*=Vancomycin; *TEI*=Teicoplanin; *OXA+*=Oxacillin+2%NaCl;
DAP=Daptomycin; *LZD*=Linezolid; *SYN*=Quinupristin/Dalfopristin;
CLI=Clindamycin; *CIP*=Ciprofloxacin); *TGC*=Tigecycline; *ERY*=Erythromycin;
GEN=Gentamicin; *SXT*=Trimethoprim/Sulfamethoxazole; *NACL*=Salzkontrolle;
POS=Positive Kontrolle.

Die Ergebnisse (Bakterienwachstum) innerhalb der einzelnen Vertiefungen werden visuell) abgelesen und so die MHK für die einzelnen Antibiotika bestimmt. Die Mikrotiterplatten werden bei Raumtemperatur (15 – 25°C) unter Lichtschutz gelagert (68).

2.2.2.1 Praktische Durchführung

Herstellung der Bakteriensuspension:

- Bakterienmaterial (3 bis 5 Kolonien) von einzeln liegende Kolonien (jeweils eines Isolats) mit einem sterilen Wattetupfer entnehmen und in 5 ml entmineralisiertem Wasser überführen
- Herstellen einer Suspension (mittels Densitometer) mit einer optischen Dichte von 0,5 McFarland

- 50 µl der Suspension in ein Röhrchen von Kationen-korrigierten-Mueller-Hinton-Bouillon mit TES-Puffer überführen, so dass sich ein Inokulum mit der Konzentration von 5×10^5 CFU / ml ergibt.

Inokulierung einer Mikrotiterplatte

- 100 µl Bouillon in jeder Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettieren
- Herstellung der Bakteriensuspension und Inokulierung einer Mikrotiterplatte sollen dabei nicht länger als 30 Minuten dauern.
- Die inokulierten Mikrotiterplatten mit einem Deckel (Folie) verschließen und für 18 – 24 Stunden bei 35°C inkubieren

2.2.3 Quantifizierung der Biofilmbildung

Biofilm ist eine Ansammlung von Mikroorganismen (die in einer sogenannten Matrix eingebettet sind und untereinander kommunizieren können) und deren extrazellulären Produkte bilden eine strukturierte Gemeinde auf einer Fläche. Es ist bekannt, dass bakterielle Biofilme immer eine Quelle vieler chronischer Infektionskrankheiten sind, weil die bakteriellen Zellen in diesen Biofilmen sehr resistent gegenüber antimikrobieller Therapie sind (70).

Biofilmbildung von *Staphylococcus epidermidis* und *S. aureus* wird durch das von der *ica*-Operon kodierte Polysaccharid-interzelluläre-Adhäsion (PIA) vermittelt. PIA, welches auch als PNAG (Poly-N-acetylglukosamin) genannt wird ist ein Homopolymer das aus linearen β -1,6-verknüpften N-Acetylglukosamin (GlcNAc) zusammensetzt (26).

Ziel dieser Diplomarbeit war die Untersuchung der Wirksamkeit von Vancomycin und Telavancin auf Biofilmen von *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* bei zwei unterschiedlichen Temperaturen:

- Bei 35°C und
- Bei 45°C

Um die Biofilmuntersuchung durchführen zu können war es nötig eine standardisierte Form der Biofilmzüchtung zu verwenden. Die Biofilme wurden mit Hilfe eines statischen Flachboden-Mikrotiterplatten Modell, das von Christensen et al. 1985 (69) etabliert wurde, untersucht. Zuerst wurden die klinischen Isolate (*S. aureus* und *S.*

epidermidis) auf Columbia-Blutagarplatten über 18 – 24 Stunden gezüchtet. Das Bakterienmaterial von einzeln liegende Kolonien (jeweils eines Isolats) wurde mit einem sterilen Wattetupfer entnommen, in Brain-Heart Infusion Bouillon suspendiert und davon jeweils 100µl in die 60 von 96 Näpfchen (wie in Tabelle 6) einer Flachboden-Mikrotiterplatte transferiert.

Um die Auswirkung von Vancomycin und Telavancin auf die etablierten Biofilme der klinischen Isolate zu testen, wurden die Biofilme mit vier verschiedenen Antibiotikakonzentrationen (**0,5µg/ml, 1µg/ml, 5µg/ml und 20µg/ml**) inkubiert. Dann, nach 18 – 24 Stunden Inkubationszeit wurden Biofilme am Boden der Näpfchen gebildet.

Um ausschließen zu können dass es keine Kontamination mit anderen Keimen gibt, wurden entsprechende Leerwerte mitgeführt. Nach der Inkubation wurde das Antibiotikum abgehoben und der Biofilm mit Glutaraldehyd fixiert. Als wesentlicher Parameter des antimikrobiellen Effekts von Vancomycin und Telavancin, wurde die Dichtereduktion der unterschiedlich behandelten Biofilme gegenüber einem unbehandelten Biofilm herangezogen. Bevor die Biofilmdichte photometrisch gemessen wurde, mussten Biofilme zuvor mittels Kristallviolett 1% gefärbt werden.

2.2.3.1 Praktische Durchführung

Herstellung der Brain – Heart Infusion (BHI), Fixierlösung und Färbelösung

- 37 g des Brain-Heart Infusion Konzentrats in einem Liter Aqua destillata lösen, und 20 Minuten autoklavieren
- 25%-iges Glutaraldehyd mit Aqua destillata auf 2%-iges Glutaraldehyd verdünnen
- Grams Kristallviolettlösung mit Wasser 1 zu 100 verdünnen

Züchtung der Biofilme von *S. aureus* und *S. epidermidis*

- Anzucht der klinischen Isolate (*S. aureus* und *S. epidermidis*) auf Columbia-Blutagarplatten für 18 – 24 Stunden bei 35°C und 50 prozentiger Luftfeuchtigkeit.
- Bakterienmaterial von einzeln liegende Kolonien (jeweils eines Isolats) mit einem sterilen Wattetupfer entnehmen und in 3 ml 0,9%-igen physiologische NaCl – Lösung überführen

- Herstellen einer Bakteriensuspension (mittels Densitometer) mit einer Dichte von 0,5 McFarland
- Bakteriensuspension in einem Verhältnis 1:10 mit Brain-Heart Infusion (BHI) verdünnen, wodurch eine Keimkonzentration von $1,5 \times 10^7$ /ml in der Verdünnung entsteht
- Eine Flachbodenmikrotiterplatte wird für zwei Keime aufgeteilt, und pro Keim jeweils Nöpfchen 2 bis 6 bzw. 7 bis 11 in den Reihen B bis G mit 100 µl der verdünnten Bakteriensuspension befüllen
- Spalte 1, Spalte 12, Reihe A und Reihe H werden mit nur 100 µl Medium (BHI) befüllt und dienen als Leerwert (siehe Tabelle 5)
- Flachbodenmikrotiterplatten im Anschluss für 18 – 24 Stunden bei 35 bzw. 45°C und 50 prozentiger Luftfeuchtigkeit bebrüten
- Nach der Inkubationszeit Überstand vorsichtig abpipettieren

Tabelle 6: Schema der Plattenbelegung.

	K1						K2					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray
B	Gray	Yellow	Green	Red	Blue	White	Yellow	Green	Red	Blue	White	Gray
C	Gray	Yellow	Green	Red	Blue	White	Yellow	Green	Red	Blue	White	Gray
D	Gray	Yellow	Green	Red	Blue	White	Yellow	Green	Red	Blue	White	Gray
E	Gray	Yellow	Green	Red	Blue	White	Yellow	Green	Red	Blue	White	Gray
F	Gray	Yellow	Green	Red	Blue	White	Yellow	Green	Red	Blue	White	Gray
G	Gray	Yellow	Green	Red	Blue	White	Yellow	Green	Red	Blue	White	Gray
H	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray

Graue Farbe=Leerwert; Weiße Farbe=Biofilm pur (ohne Antibiotika); Gelbe Farbe=Antibiotikakonzentration von 0,5µg/ml; Grüne Farbe=Antibiotikakonzentration von 1µg/ml; Rote Farbe=Antibiotikakonzentration von 5µg/ml; Blaue Farbe=Antibiotikakonzentration von 20µg/ml; Rosa Farbe (K1)=Eine Hälfte der Platte für einen Keim in Verwendung; Orange Farbe (K2)=Zweite Hälfte der Platte für den anderen Keim in Verwendung.

Inkubation der Biofilme mit Vancomycin bzw. Telavancin

- Antibiotika mit den entsprechenden Konzentrationen (0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, und 20 µg/ml im BHI-Medium herstellen
- Spalte 2 bzw. 7: Näpfchen B bis G mit 100 µl einer Antibiotikallösung (Vancomycin bzw. Telavancin) mit einer Konzentration von 0,5 µg/ml befüllen
- Spalte 3 bzw. 8: Näpfchen B bis G mit 100 µl einer Antibiotikallösung (Vancomycin bzw. Telavancin) mit einer Konzentration von 1 µg/ml befüllen
- Spalte 4 bzw. 9: Näpfchen B bis G mit 100 µl einer Antibiotikallösung (Vancomycin bzw. Telavancin) mit einer Konzentration von 5 µg/ml befüllen
- Spalte 5 bzw. 10: Näpfchen B bis G mit 100 µl einer Antibiotikallösung (Vancomycin bzw. Telavancin) mit einer Konzentration von 20 µg/ml befüllen
- Spalte 6 bzw. 11: Näpfchen B bis G nur mit Biofilm pur (ohne Antibiotikallösung) befüllen
- Reihe G: Näpfchen 2 bis 6 bzw. 7 bis 11 werden für die Erstellung der Wachstumskontrolle auf die Mueller-Hinton-2-Agarplatten verwendet
- Platten werden für 18 – 24 Stunden bei 35°C bzw. 45°C und 50 prozentiger Luftfeuchtigkeit inkubiert
- Überstand wird vorsichtig abpipettiert, um weitere Untersuchungen (Quantifizierung der Biofilmdichte) führen zu können

2.2.4 Bestimmung der Optische Dichte (OD)

Eine schnelle und recht sinnvolle Methode, um die Biofilmdichte zu messen, ist die photometrische Methode (8). Bei einzelligen Organismen sind die OD-Werte (innerhalb bestimmter Grenzwerte) proportional zur Zellzahl. Daher kann man die Trübungsmessungen als Ersatz für das Direktzählverfahren heranziehen. OD-Messungen kann man im Allgemeinen vornehmen, ohne das Präparat zu zerstören oder entscheidend zu beschädigen. Aus diesen Gründen wird diese Methode häufig angewendet, um das Wachstum einer mikrobiellen Kultur zu beobachten (8).

In dieser Arbeit wurden Biofilmdichten mittels eines Mikrotiterplatten-Reader (Anthos Zenyth 340 S) bei einer Wellenlänge von 550 nm quantifiziert (Extinktion gemessen). Zwischen Biofilmdichten die mit Vancomycin bzw. Telavancin behandelt worden sind,

wurden Vergleiche gemacht, und der Unterschied zwischen Biofilmdichten in Gegenwart der beiden Antibiotika bei 35°C bzw. 45°C ausgewertet.



Abb.12 Zenyth 340S Mikrotiterplatten – Reader

2.2.4.1 Praktische Durchführung

Vorbereitung (Fixierung und Färbung) für die photometrische Extinktionsmessung

- Alle Näpfchen (ausgenommen Näpfchen 2 bis 11 der Reihe G) mit 150 µl 2-prozentigem Glutaraldehyd befüllen
- Mikrotiterplatte 20 Minuten inkubieren lassen
- Überstand vorsichtig mittels Eppendorf Pipette abpipettieren
- Alle Näpfchen (ausgenommen Näpfchen 2 bis 11 der Reihe G) mit 100 µl einprozentigem Kristallviolett ca. 3 Minuten färben lassen
- Wieder Überstand vorsichtig mittels Eppendorf Pipette entfernen
- Dann alle Näpfchen (ausgenommen Näpfchen 2 bis 11 der Reihe G) zweimal mit 200 µl Leitungswasser waschen und Überstände wieder mittels Eppendorf Pipette entfernen

- Im Anschluss photometrische Extinktion bei einer Wellenlänge von 550 nm messen

2.2.5 Wachstumskontrolle – Lebendkeimzahlbestimmung

Bakterielles Wachstum wird als Zunahme der Zellzahlen in einer Population definiert. Unter dem Begriff „**Keimzahl**“ versteht man die Gesamte Bakterienzahl (sowohl lebende als auch abgestorbene Bakterienzellen) in einer Probe (8). Unter Lebendkeimzahl versteht man die Anzahl der Keime die vermehrungsfähig sind.

Es wird häufig anstelle von Keimzahl auch den Ausdruck *Koloniebildende Einheiten (KBE)* oder auch *colony forming units (CFU)* verwendet.

Es gibt zwei Verfahren um die bakterielle Wachstum zu messen:

- **Direkte mikroskopische Zählung** (es werden sowohl lebende als auch abgestorbene Zellen gezählt), und
- **Indirekte Zählung mittels eines Kulturverfahrens** (es werden das keimhaltige Substrat oder eine Verdünnung auf einen Nährboden kultiviert und die entstehenden Kolonien ausgezählt.) (74).

Die standardmäßige Methode der **Lebendkeimzahlzählung** besteht darin, die Anzahl von Zellen in der Probe zu bestimmen, die in der Lage sind, auf einem geeigneten Nährboden Kolonien zu bilden. Aus diesem Grund bezeichnet man die Lebendkeimzahlzählung oft als Plattenzählung oder Kolonienzählung. Man geht bei diesem Zählverfahren von der Annahme aus, dass jede lebende Zelle sich teilen und letztendlich eine Kolonie hervorbringen kann. Es ist wichtig, dass die Zahl der sich in den Schalen entwickelten Kolonien nicht zu groß wird. Der Grund ist der, dass einige Zellen in Überfüllten Schalen keine Kolonien bilden können und einige Kolonien verschmelzen können, was zu falschen Messergebnissen führen kann.

Es ist aber auch unbedingt erforderlich, dass die Zahl der Kolonien nicht zu klein ist, da dann das Zählergebnis von geringer statistischer Bedeutung ist.

Um die geeignete Anzahl von Kolonien zu erzielen, muss das Präparat, das man zählen möchte, fast immer in verdünnter Form vorliegen. Da man selten die ungefähre Lebendkeimzahl im Voraus kennt, ist es im Allgemeinen notwendig, mehr als eine

Verdünnung herzustellen. Man verwendet am häufigsten mehrere Zehnfachverdünnungen eines Präparats (8).

In dieser Arbeit wurden auch Lebendkeimzahlzählungen (Wachstumskontrollen) durchgeführt, um den Unterschied der antibakteriellen Wirkungsstärke zwischen Vancomycin und Telavancin (bei 35°C bzw. 45°C) zu untersuchen. Bevor die behandelten Biofilme fixiert wurden, wurden mittels physiologischer Kochsalzlösung von den Böden der Nöpfchen gelöst und darin resuspendiert. Von diesen Bakteriensuspensionen wurden dann Proben auf Mueller-Hinton-2-Agarplatten aufgetropft. Als Referenz für die Wachstumskontrolle dienten jeweils eine Bakteriensuspension eines unbehandelten Bakteriums und ein Leerwert, die auch auf den Platten mitgeführt wurden. Die Platten wurden für 44 – 48 Stunden (bei 35°C bzw. 45°C) inkubiert. Nach 44 – 48 Stunden Inkubationszeit im Brutschrank wurde die Lebendkeimzahlbestimmung von allen Kolonien bestimmt und die Ergebnisse protokolliert.

2.2.5.1 Praktische Durchführung

Herstellung der Verdünnungsreihen

Die Lebendkeimzahlbestimmung wurde mittels Verdünnungsreihen in den Mikrotiterplatten durchgeführt.

- 180 µl physiologische Kochsalzlösung (0,9%) in 9 aufeinanderfolgende Mikrotiterröhrchen pipettieren
- In das 1. Mikrotiterröhrchen werden 20 µl Bakteriensuspension (aus der Reihe G, Nöpfchen 2 bis 6 bzw. Nöpfchen 7 bis 11) hinzugefügt und gut durchgemischt
- Danach 20 µl aus dem 1. in das 2. Mikrotiterröhrchen pipettiert, gut durchmischt usw. bis in das 9. Mikrotiterröhrchen
- Aus dem 9. Mikrotiterröhrchen wurden zur Volumenanpassung 20 µl herauspipettiert und verworfen.
- Anschließend wurden jeweils 20 µl (1x20µl) aus den einzelnen Verdünnungsstufen 10^{-4} , 10^{-5} , und 10^{-6} und jeweils 50 µl (5x10µl) aus der Verdünnungen 10^{-7} , 10^{-8} , und 10^{-9} entnommen und auf die beschriftete (markierte) MH2 – Platte (siehe Abb. 13) aufgetropft

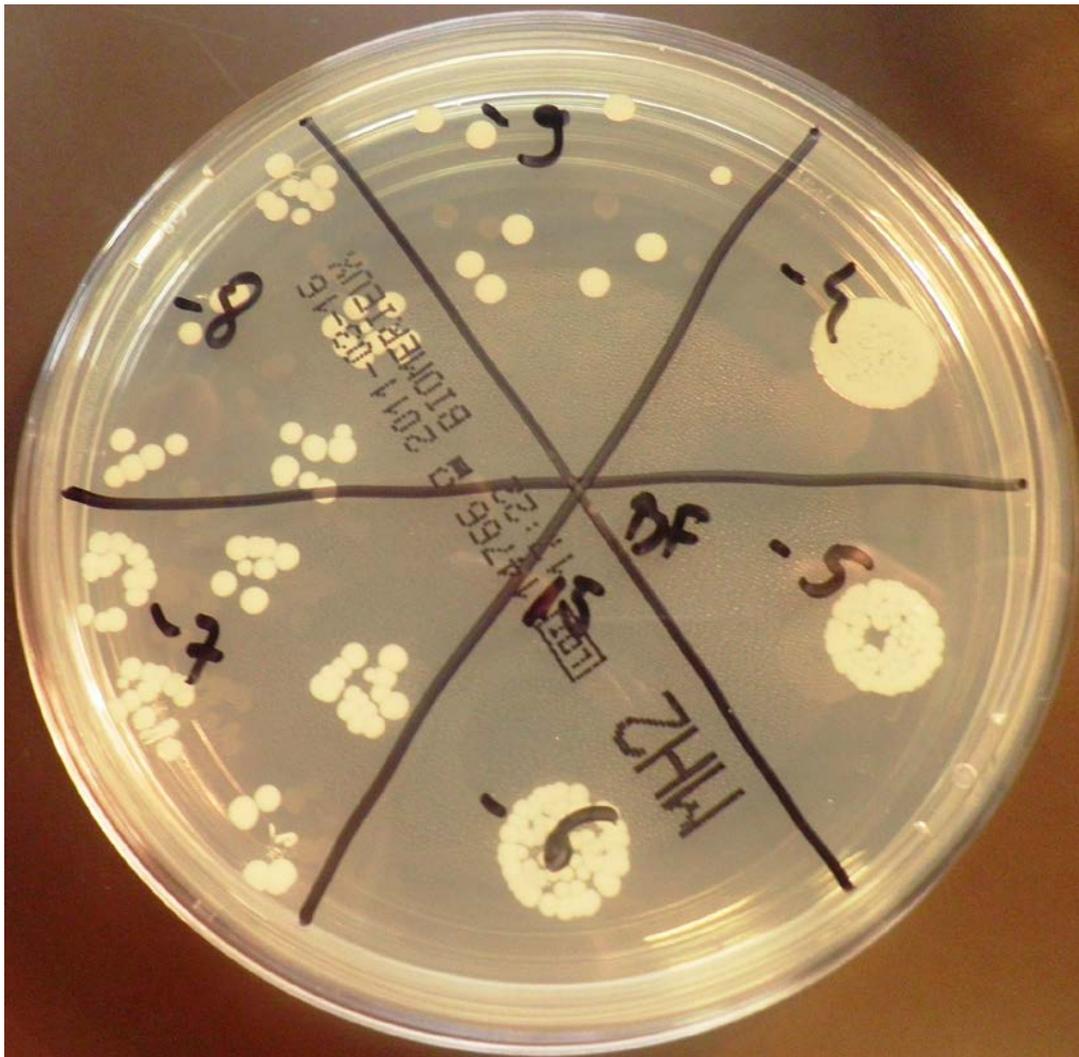


Abb.13 *S. epidermidis* – Kolonien auf Mueller – Hinton – 2 – Agarplatte am (23.01.2011). Die beschriftete Zahlen -4, -5, -6, -7, -8, und -9 entsprechen die Verdünnungsreihe von 10^{-4} bis 10^{-9} .

Erstellung der Wachstumskontrollen (Lebendkeimzahlzählungen)

- Zuerst wurden die Mueller-Hinton-2-Agarplatten (MH2-Platten) gut getrocknet
- Auf der Unterseite der MH2-Platte wurden mit einem Filzstift 6 Segmente markiert und mit den Verdünnungsstufen beschriftet (siehe Abb. 13)
- In die Felder mit den Verdünnungsstufen 10^{-4} , 10^{-5} , und 10^{-6} wurden 20 μ l der jeweiligen Verdünnung aufgetropft
- In die Felder der Verdünnungsstufen 10^{-7} , 10^{-8} , und 10^{-9} wurden 50 μ l ($5 \times 10 \mu$ l) der jeweiligen Verdünnung aufgetropft

- Nachdem die Suspension in den Nährboden eingezogen war (bis zu keine Flüssigkeitstropfen mehr zu sehen sind) wurden die Platten im Brutschrank bei 35°C bzw. 45°C bebrühten.

2.2.6 Software

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde folgende Software verwendet:

- Microsoft Office Word 2003 für die Erstellung von Texten
- Microsoft Office Excel 2003 für die Erstellung von Tabellen und Grafiken
- ADAP Expert Software für die Extinktionsmessungen der Biofilmdichte (OD-Werten)
- IBM SPSS Statistics für die Erstellung von Boxplot-Diagrammen

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Ergebnisse

3.1.1 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Als erstes wurden die minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) der vier Teststämme (Se91, Se99, K8, und ATCC_29213) gegenüber Vancomycin, Daptomycin und Tigecyclin bestimmt. Die Bestimmung der MHK wurde sowohl mittels Mikrodilutionsverfahren als auch mittels „Sensititre susceptibility system“ (TREK Diagnostic system) durchgeführt.

In Tab.7 sind die Ergebnisse der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration der getesteten Stämme (Se91, Se99, K8, und ATCC_29213) gegenüber Vancomycin (VAN), Daptomycin (DAP) und Tigecyclin (TGC) mittels Mikrodilutionsverfahren angegeben. Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit wurden die MHK-Bestimmungen achtmal durchgeführt. Wie in Tab.7 ersichtlich waren die Ergebnisse der MHKs nur im Fall von Vancomycin beim Stamm K8 reproduzierbar. Bei allen anderen Messungen gab es Abweichungen mit dem Faktor 2, im Fall von Stamm ATCC_29213 sogar um den Faktor 4. Aus den Werten in Tab.7 ergibt sich, dass Daptomycin bei allen vier Teststämmen in den niedrigsten Konzentration antibakteriell wirksam ist, und Tigecyclin in nur wenig höheren Konzentrationen. Von den vier getesteten Stämmen zeigte Stamm K8 die höchste Empfindlichkeit gegenüber Vancomycin mit einer mittleren MHK von 0,5 µg/ml während Stamm Se99 am wenigsten empfindlich gegen dieses Antibiotikum war mit einer mittleren MHK von 2,25 µg/ml.

***Tabelle 7:** MHK – Werte (µg/ml), Stämme Se91, Se99, K8, und ATCC_29213, für die Antibiotika Vancomycin, Daptomycin und Tigecyclin ermittelt mittels Mikrodilutionsverfahren. MW= Mittelwert aus 8 unabhängigen Messungen; VAN= Vancomycin; DAP= Daptomycin; TGC= Tigecyclin.*

	Se91		Se99		K8		ATCC_29213	
	MHK-Werte (µg/ml)	MW	MHK-Werte (µg/ml)	MW	MHK-Werte (µg/ml)	MW	MHK-Werte (µg/ml)	MW
VAN	1/1/2/2/1/1/ 2/1	1,38	2/4/2/2/2/2/ 2/2	2,25	0,5/0,5/0,5 /0,5/0,5/0,5 /0,5/0,5	0,5	2/1/1/1/1/ 0,5/1/0,5	1,0
DAP	0,25/0,25/ 0,125/0,25 /0,125/0,25 /0,125/0,25	0,20	0,5/0,5/0,25/ 0,25/0,25/0, 25/0,25/0,25	0,31	0,25/0,125/ 0,25/0,125/ 0,25/0,25/ 0,25/0,125	0,20	0,25/0,125 /0,25/0,125 /0,25/0,25 /0,25/0,125	0,20
TGC	0,5/0,5/ 0,25/0,5/ 0,25/0,25 /0,5/0,5	0,41	0,5/0,25/0,5/ 0,5/0,25/0,5 /0,25/0,5	0,41	0,25/0,5/ 0,25/0,5/ 0,25/0,25 /0,25/0,25	0,31	0,25/0,5/ 0,25/0,5/ 0,25/0,25 /0,25/0,25	0,31

In Tab.8 sind die die Ergebnisse der minimalen Hemmkonzentration der Teststämme (Se91, Se99, K8, und ATCC_29213) gegenüber Vancomycin (VAN), Daptomycin (DAP) und Tigecyclin (TGC) ermittelt unter Verwendung des „Sensititre susceptibility system“ (TREK Diagnostic system) aufgeführt. Die Bestimmung der MHK mittels dieser Methode wurde zusätzlich durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der mittels Mikrodilutionsverfahren erhalten Daten zu untersuchen und eine Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen auszuschließen. Die hierbei ermittelten MHK-Werte stehen in ausgezeichneter Übereinstimmung mit den MHK-Werten, die mittels Mikrodilutionsverfahren bestimmt wurden. Auch hier (wie in Tab.7) zeigte Daptomycin die niedrigsten MHK-Werte und somit die stärkste antibakterielle Wirkung im Vergleich zu Tigecyclin als nächst wirksames Antibiotikum und Vancomycin. Diesen Unterschied zwischen Vancomycin und Daptomycin sieht man auch in der Dosierung bei schweren Staphylokokkeninfektionen. Als tägliche Dosis von Daptomycin wird 6 mg/kg (34) im Vergleich zu Vancomycin mit 30 mg/kg (9) angegeben.

Tabelle 8: MHK – Werte (µg/ml) Stämme Se91, Se99, K8, und ATCC_29213, für die Antibiotika Vancomycin, Daptomycin und Tigecyclin ermittelt mittels Sensititre susceptibility system (TREK Diagnostic System). Abkürzungen s. Legende zu Tabelle 7.

	Se91	Se99	K8	ATCC 29213
VAN	1; 1	2; 2	0,5; 0,5	1; 1
DAP	0,25; 0,25	0,5; 0,5	0,25; 0,25	0,25; 0,25
TGC	0,5; 0,5	0,5; 0,5	0,25; 0,25	0,25; 0,25

In Tab.9 sind die MHK-Werte gegenüber Telavancin, Vancomycin, Daptomycin, Linezolid und Tigecyclin aufgeführt, die unter Verwendung des „Sensititre susceptibility system“ für die einzelnen klinischen Isolate sowie die Referenzkeime ATCC_29213 und DSM_3269 ermittelt wurden. Besonders interessant und auch Ziel dieser Diplomarbeit war der Vergleich der antibakterielle Wirkung zwischen Vancomycin und Telavancin, das ein Derivat von Vancomycin ist und im September 2009 von der FDA (Food and Drug Administration) in U.S.A zugelassen (60). Eine Reihe von Studien (Literatur) zeigen, dass dieses Antibiotikum eine Alternative in der Behandlung von Infektionen im Kampf gegen ein breites Spektrum Gram-positiver Bakterien sein kann, unter anderem Methicillin resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), Vancomycin resistente *Staphylococcus aureus* (VRSA), sowie Daptomycin- und Linezolid-resistente Staphylokokken (65, 67).

Table 9: MHK-Werte ($\mu\text{g/ml}$) der klinischen Isolate sowie der Referenzstämme gegenüber Telavancin (TLV), Vancomycin (VAN), Daptomycin (DAP), Linezolid (LZD), und Tigecyclin (TGC).

Isolat Nr.	TLV	VAN	DAP	LZD	TGC	Isolat Nr.	TLV	VAN	DAP	LZD	TGC
1	0,5	1	0,5	1	0,12	22	0,5	2	0,25	1	0,25
2	0,5	1	0,25	2	0,12	23	0,25	4	0,5	1	0,25
3	0,5	1	0,5	2	0,12	24	0,25	2	0,5	0,5	0,25
4	0,5	1	0,25	2	0,12	25	0,25	1	0,25	1	0,5
5	0,5	1	0,5	4	0,5	26	0,25	1	0,25	0,5	0,25
6	0,25	1	0,25	4	0,25	27	0,12	2	0,25	0,5	0,12

7	0,25	1	0,5	2	0,25	28	0,25	1	0,25	2	0,25
8	0,25	1	0,25	2	0,25	29	0,5	1	0,25	2	0,12
9	0,25	1	0,5	2	0,25	30	0,12	0,5	0,25	2	0,25
10	0,25	1	0,25	4	0,25	31	0,25	2	0,25	1	0,25
11	0,5	2	0,5	1	0,12	32	0,25	2	0,5	1	0,25
12	0,5	1	0,25	1	0,12	33	0,25	1	0,25	1	0,12
13	0,5	2	0,5	1	0,12	34	0,25	0,5	0,25	1	0,5
14	0,5	2	1	1	0,25	35	0,25	4	0,5	2	0,12
15	0,25	2	0,5	1	0,25	36	0,25	1	0,25	0,5	0,12
16	0,25	2	0,25	1	0,12	37	0,25	2	0,5	1	0,25
17	0,25	1	0,5	4	0,5	38	0,5	2	0,5	1	0,12
18	0,25	2	0,5	1	0,25	39	0,25	0,5	0,12	1	0,12
19	0,12	2	0,5	0,5	0,25	40	0,12	2	0,25	1	0,25
20	0,25	2	0,25	1	0,12	ATCC 29213	0,5	1	0,5	4	0,25
21	0,25	2	0,5	1	0,25	DSM 3269	0,25	2	0,25	2	0,5

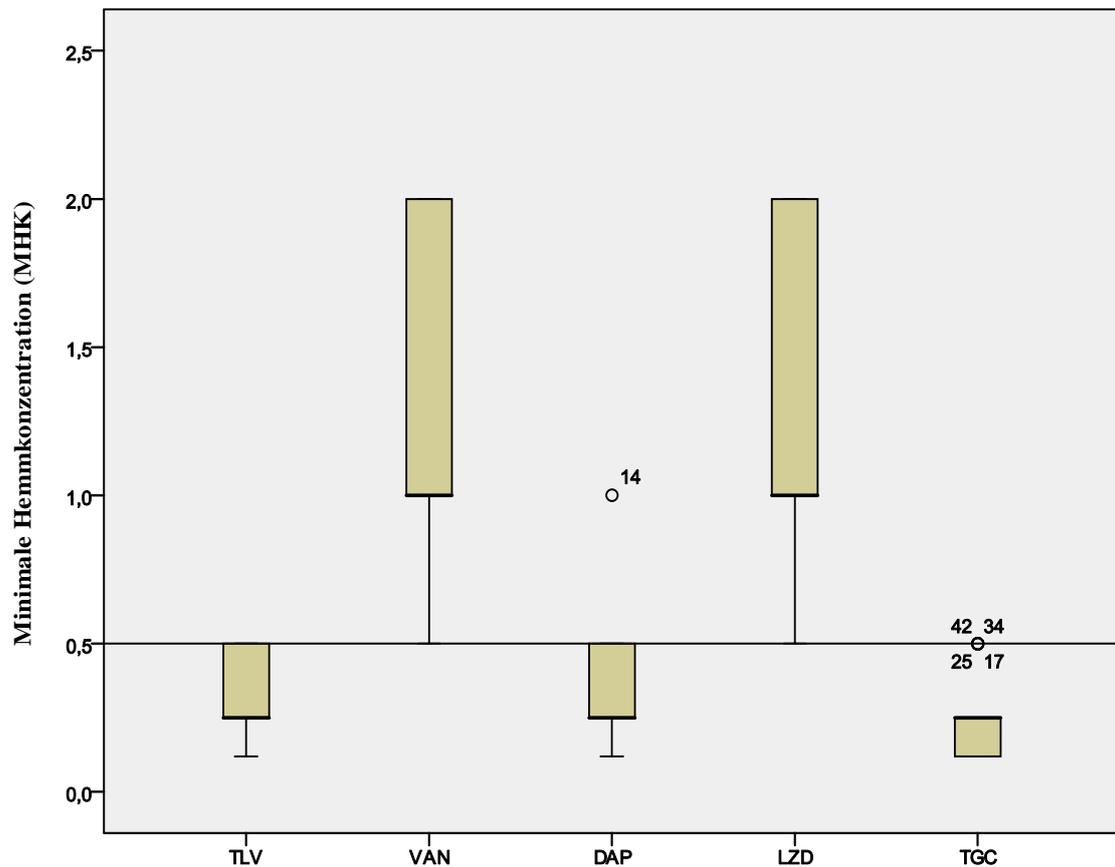


Abb.14 MHK – Ergebnisse der klinischen Isolate gegenüber Telavancin (TLV), Vancomycin (VAN), Daptomycin (DAP), Linezolid (LZD) und Tigecyclin (TGC) mittels Boxplot Diagramme grafisch dargestellt. Die Zahlen (14, 17, 25, 34, 42) geben die Stämme und den Messwert ($\mu\text{g/ml}$) an, die außerhalb der mehrheitlichen Messwerte lagen.

In Abb. 14 sind die MHK-Werte der klinischen Isolate und die Unterschiede in der Wirkungsstärke zwischen den getesteten Antibiotika grafisch zusammengefasst. Der Gesamtbereich dieses Diagramms zeigt den jeweils höchsten und den niedrigsten Wert der MHK, der abgelesen wurde. Dieses Diagramm zeigt, dass Tigecyclin die höchste antibakterielle Wirksamkeit besitzt, angezeigt durch die niedrigsten MHK-Werte von ca. $0,15\mu\text{g/ml}$ – $0,25\mu\text{g/ml}$. An zweiter Stelle standen Telavancin und Daptomycin, beide mit einem MHK von $0,25\mu\text{g/ml}$ – $0,50\mu\text{g/ml}$.

An dritter Stelle standen Vancomycin und Linezolid. Die MHK für diese zwei Antibiotika lag bei $1,0\mu\text{g/ml}$ – $2,0\mu\text{g/ml}$ und lagen damit um den Faktor 2 bis 8 höher als die von Tigecyclin, Telavancin und Daptomycin.

Wenn man die antibakterielle Aktivität des neuen Antibiotikums Telavancin im Vergleich zu den anderen verwendeten Antibiotika betrachtet, kann man sagen, dass Telavancin eine sehr gute Alternative für die Behandlung von Patienten mit komplizierten Haut- und Weichteilinfektionen sein könnte. Diese sind typische Erkrankungen die durch den Erreger *S. aureus* oder *S. epidermidis* hervorgerufen werden. Telavancin (ein Vancomycin-Derivat) zeigt im Vergleich zu Vancomycin und Linezolid eine sehr geringe minimale Hemmkonzentration und somit auch eine starke bakterizide Aktivität.

Im Vergleich zu Daptomycin zeigt Telavancin einen gleichen MHK-Wert. Das lässt darauf schließen, dass beide Antibiotika ungefähr die gleiche antibakterielle Wirkungsstärke besitzen.

Nur Tigecyclin zeigt im Vergleich zu Telavancin eine niedrigere MHK. Das bedeutet, dass Tigecyclin eine stärkere antibakterielle Wirkung besitzt als Telavancin.

3.1.2 Biofilmreduktion als Folge der Behandlung mit Telavancin und Vancomycin

Um die individuelle Biofilmbildung jedes klinischen Isolates zu beurteilen wurde das Verhältnis der optischen Dichte (OD) des gebildeten Biofilms in Gegenwart des einzelnen Antibiotikums und der optische Dichte (OD) des Biofilms desselben Isolates ohne Antibiotika (Kontrolle) berechnet. Dieses OD-Verhältnis wurde benutzt, um die Veränderungen in der optischen Dichte der Biofilme mit steigender Konzentration der Antibiotika aufzuzeigen. Darüber hinaus wurde Telavancin und Vancomycin bei verschiedenen Konzentrationen (0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml und 20 µg/ml) auf Biofilme in klinischen Isolaten getestet.

Im Rahmen dieser Versuche sollte die antibakterielle Wirkungsstärke zwischen Telavancin und Vancomycin auf Biofilme von *S. aureus* und *S. epidermidis* bei 35°C bzw. 45°C (nach den Kriterien von Christensen et al.1985) untersucht werden. Als Referenzwert für die Bestimmung der Biofilmreduktion wird die optische Dichte von unbehandelten Biofilmen herangezogen.

Um die Qualität der Ergebnisse zu sichern, wurde immer eine Kontrollreihe mit unbeimpftem Medium (Brain-Heart Infusion) mitgeführt. In den Kontrollen, wurde eine durchschnittliche optische Dichte von 0,035 gemessen. Dieser Wert ist kleiner als 0,120 (nach den Kriterien von Christensen et al.1985, wenn $<0,120$ das bedeutet, dass kein

Biofilm gebildet wurde) (69), und wie zu erwarten war, konnte hier keine Biofilmbildung nachgewiesen werden.

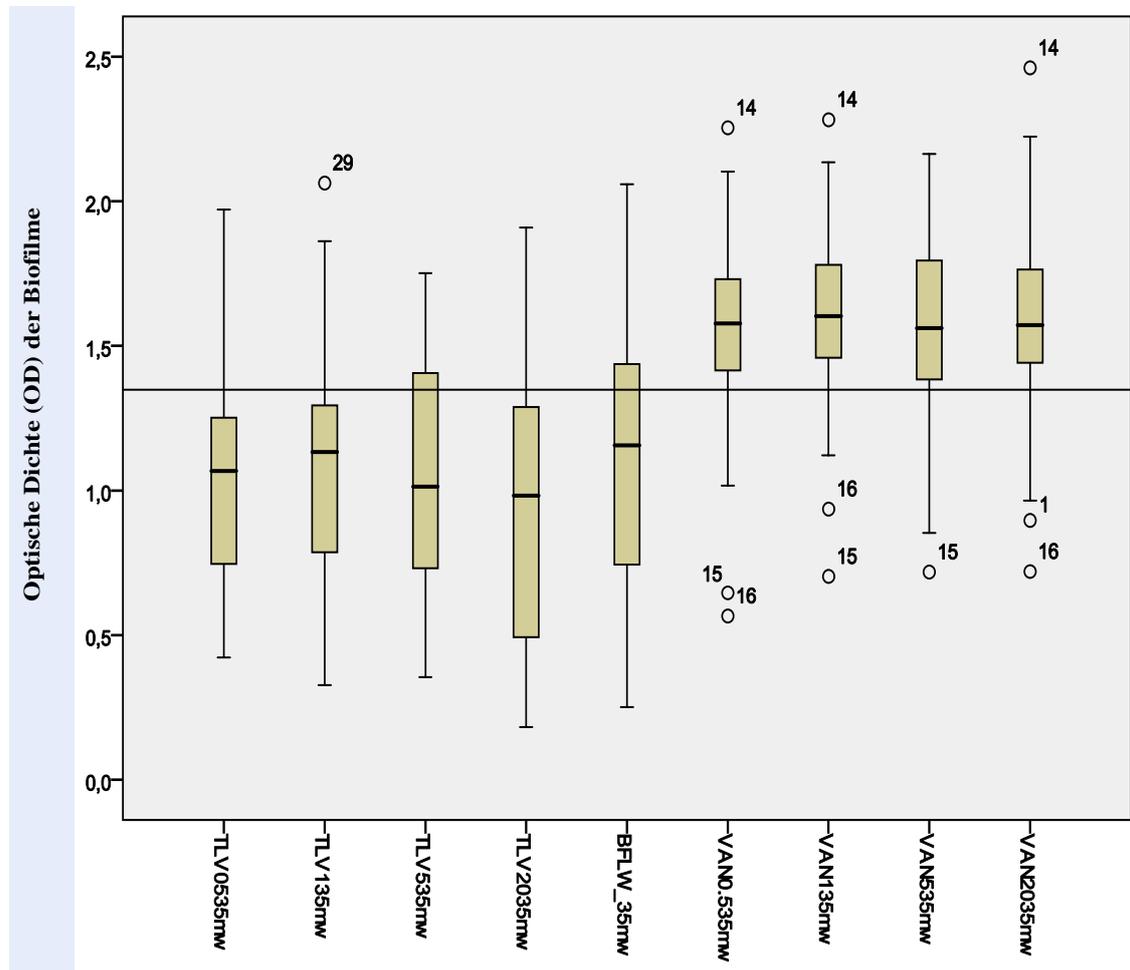


Abb.15 Boxplot Diagramme zur Darstellung der Wirkung von Telavancin und Vancomycin (0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, und 20 µg/ml) auf Biofilme der klinischen Isolate bei 35°C. Die Zahlen 1, 14, 15, 16, und 29 geben die Stämme an, deren Werte (OD) außerhalb der mehrheitlichen Werte der jeweiligen Meßreihe lagen.

- **TLV0535mw:** OD-Mittelwert der Telavancinkonzentration von 0,5µg/ml bei 35°C
- **TLV135mw:** OD-Mittelwert der Telavancinkonzentration von 1µg/ml bei 35°C
- **TLV535mw:** OD-Mittelwert der Telavancinkonzentration von 5µg/ml bei 35°C
- **TLV2035mw:** OD-Mittelwert der Telavancinkonzentration von 20µg/ml bei 35°C
- **BFLW_35mw:** OD-Mittelwert des Biofilms pur (ohne Antibiotika) bei 35 °C
- **VAN0535mw:** OD-Mittelwert der Vancomycinkonzentration von 0,5µg/ml bei 35°C
- **VAN135mw:** OD-Mittelwert der Vancomycinkonzentration von 1µg/ml bei 35°C
- **VAN535mw:** OD-Mittelwert der Vancomycinkonzentration von 5µg/ml bei 35°C
- **VAN2035mw:** OD-Mittelwert der Vancomycinkonzentration von 20µg/ml bei 35°C

In Abb.15 sind die OD-Werte des Biofilmwachstums grafisch dargestellt. Sie zeigen den Unterschied in der Wirkungsstärke zwischen Vancomycin und Telavancin unter

Verwendung von bestimmten Konzentrationen (0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml und 20 µg/ml) auf die Biofilmbildung bei 35°C.

Zuerst wurde die unterschiedliche Wirkung der verschiedenen Antibiotikakonzentrationen (sowohl bei Telavancin als auch bei Vancomycin) auf Biofilme untersucht. Bei Telavancin sieht man, dass der Unterschied der OD-Werte zwischen allen vier Konzentrationen nicht sehr signifikant ist.

Bei der Konzentration 0,5µg/ml lagen die OD-Werte mehrheitlich zwischen 0,75 und 1,20 und der Median bei 1,08. Bei der Konzentration 1µg/ml lagen die OD-Werte zwischen 0,78 und 1,30 und der Median bei 1,15. Bei der Konzentration 5µg/ml lagen die OD-Werte mehrheitlich zwischen 0,74 und 1,40 und der Median lag bei 1,02. Bei der Konzentration 20µg/ml lagen die OD-Werte mehrheitlich zwischen 0,50 und 1,25 und der Median lag bei 1,00. Diese Ergebnisse zeigen, dass die OD-Werte der meisten klinischen Isolate bei fast allen vier Telavancinkonzentrationen sehr ähnlich waren.

Auch bei der Behandlung mit Vancomycin zeigten die OD-Werte zwischen allen vier Konzentrationen nur sehr geringe Unterschiede, allerdings eindeutig höher als bei Telavancin.

Bei der Konzentration 0,5µg/ml lagen die OD-Werte mehrheitlich zwischen 1,40 und 1,75 und der Median lag bei 1,58. Bei der Konzentration 1µg/ml lagen die OD-Werte mehrheitlich zwischen 1,45 und 1,80 und der Median lag bei 1,63. Bei der Konzentration 5µg/ml lagen die OD-Werte mehrheitlich zwischen 1,35 und 1,80 und der Median lag bei 1,57. Bei der Konzentration 20µg/ml lagen die OD-Werte mehrheitlich zwischen 1,42 und 1,76 und der Median lag bei 1,60. Auch hier zeigen die Ergebnisse wie bei Telavancin, dass bei allen vier Konzentrationen von Vancomycin sehr ähnliche OD-Werte für die meisten klinischen Isolate zu finden waren. In Abb.15 sind auch die OD-Werte des Biofilms pur in Abwesenheit beider Antibiotika dargestellt. Beim Biofilm pur lagen die OD-Werte mehrheitlich zwischen 0,75 und 1,45 und der Median lag bei 1,16, der nur unbedeutend höher ist als die, die für mit Telavancin behandelten Biofilme gemessen wurde.

Diese Grafik zeigt aber auch ganz klar den Wirkungsunterschied auf Biofilme zwischen Telavancin und Vancomycin. Laut OD-Werten zeigen alle Telavancinkonzentrationen (ausgenommen der höchsten Konzentration) fast keine Wirkung auf das Biofilmwachstum bei 35°C. Nur die höchste Telavancinkonzentration (20µg/ml) deutete eine geringe antibakterielle (antibiofilmbildende) Wirkung bei einigen klinischen Isolate. Ganz anders ist der Fall bei Vancomycin. OD-Werte in dieser

Grafik zeigen dass Vancomycin im Gegensatz zu Telavancin nicht nur keine antibiofilmbildende Wirkung hat, sondern sogar die Biofilmbildung bei allen verwendeten Konzentrationen fördert.

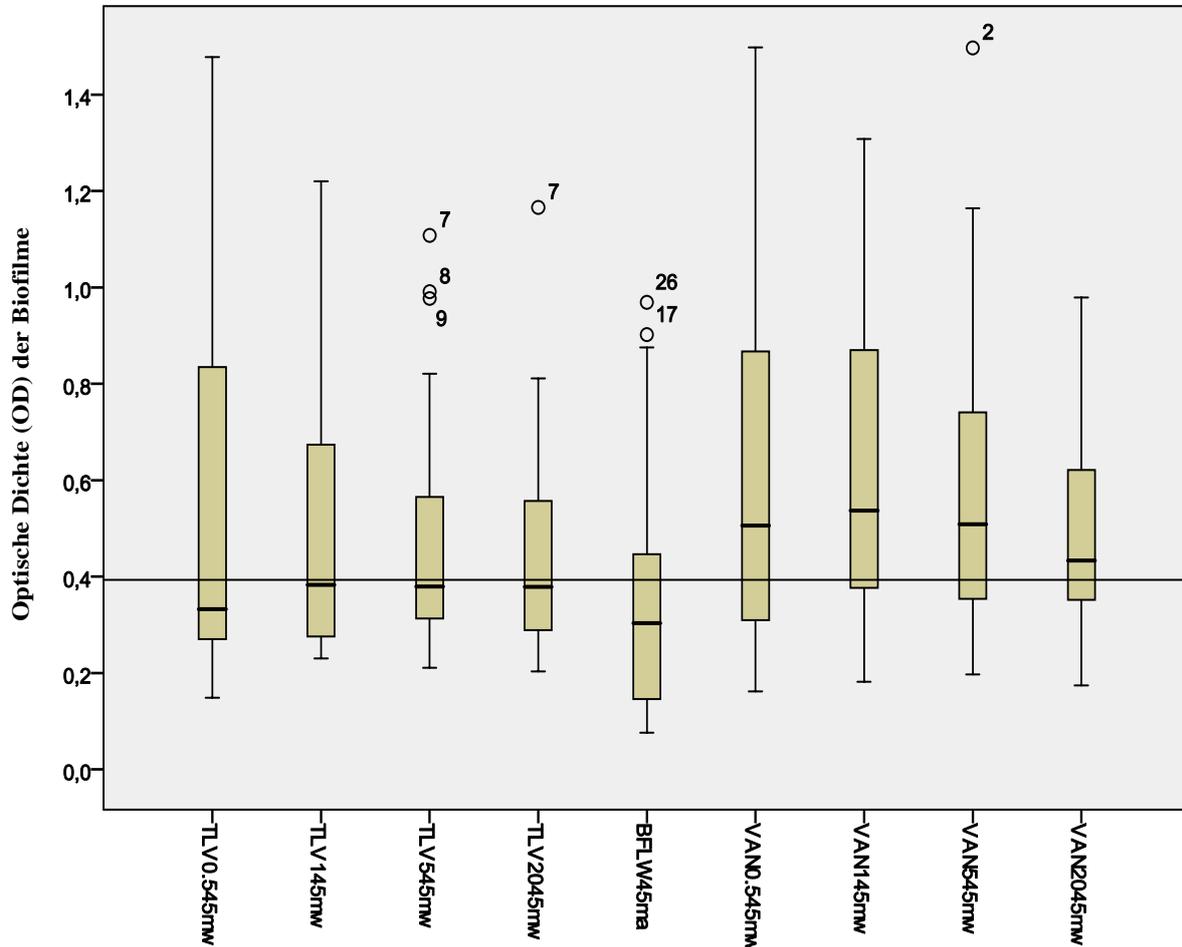


Abb.16 Boxplot Diagramme zur Darstellung der Wirksamkeit von Telavancin und Vancomycin (0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, und 20 µg/ml) auf Biofilme der klinische Isolate bei 45°C. Die Zahlen 2, 7, 8, 9, 17, und 26 geben die Stämme an, deren Werte (OD) außerhalb der mehrheitlichen Werte der jeweiligen Meßreihe lagen.

- **TLV0545mw:** OD-Mittelwert der Telavancinkonzentration von 0,5µg/ml bei 45°C
- **TLV145mw:** OD-Mittelwert der Telavancinkonzentration von 1µg/ml bei 45°C
- **TLV545mw:** OD-Mittelwert der Telavancinkonzentration von 5µg/ml bei 45°C
- **TLV2045mw:** OD-Mittelwert der Telavancinkonzentration von 20µg/ml bei 45°C
- **BFLW45ma:** OD-Mittelwert des Biofilms pur (ohne Antibiotika) bei 45 °C
- **VAN0,545mw:** OD-Mittelwert der Vancomycinkonzentration von 0,5µg/ml bei 45°C
- **VANI45mw:** OD-Mittelwert der Vancomycinkonzentration von 1µg/ml bei 45°C
- **VAN545mw:** OD-Mittelwert der Vancomycinkonzentration von 5µg/ml bei 45°C
- **VAN2045mw:** OD-Mittelwert der Vancomycinkonzentration von 20µg/ml bei 45°C

In Abb.16 sind die OD-Werte des Biofilmwachstums grafisch dargestellt. Diese zeigen den Unterschied in der Wirkungsstärke zwischen Vancomycin und Telavancin (0,5

$\mu\text{g/ml}$, $1 \mu\text{g/ml}$, $5 \mu\text{g/ml}$ und $20 \mu\text{g/ml}$) auf die Biofilmbildung bei 45°C . Auch hier (wie bereits in Abb.15 ersichtlich war) sieht man wie unterschiedlich die Antibiotikakonzentrationen (sowohl bei Telavancin als auch bei Vancomycin) auf Biofilme wirken können.

Bei Telavancin sieht man, dass der Unterschied der OD-Werte zwischen den vier Konzentrationen sehr gering ist. Bei der niedrigsten Konzentration ($0,5\mu\text{g/ml}$) lagen die OD-Werte mehrheitlich zwischen 0,30 und 0,80 und der Median lag bei 0,33. Bei der Konzentration $1\mu\text{g/ml}$ lagen die OD-Werte mehrheitlich zwischen 0,30 und 0,65 und der Median lag bei 0,39. Bei der Konzentration $5\mu\text{g/ml}$ lagen die OD-Werte mehrheitlich zwischen 0,30 und 0,55 und der Median lag bei 0,39. Bei der höchsten Konzentration ($20\mu\text{g/ml}$) lagen die OD-Werte mehrheitlich zwischen 0,28 und 0,55 und der Median lag bei 0,38.

Auch bei der Behandlung mit Vancomycin, zeigen die OD-Werte der vier eingesetzten Antibiotikakonzentrationen nur sehr geringe Unterschiede. Bei der niedrigsten Konzentration ($0,5\mu\text{g/ml}$) lagen die OD-Werte mehrheitlich zwischen 0,30 und 0,88 und der Median lag bei 0,51. Bei der Konzentration $1\mu\text{g/ml}$ lagen die meisten OD-Werte zwischen 0,35 und 0,90 und der Median lag bei 0,55. Bei der Konzentration $5\mu\text{g/ml}$ lagen die OD-Werte mehrheitlich zwischen 0,33 und 0,73 und der Median lag bei 0,53. Bei der höchsten Konzentration ($20\mu\text{g/ml}$) lagen die OD-Werte mehrheitlich zwischen 0,35 und 0,63 und der Median lag bei 0,45.

Die OD-Werte des Biofilms pur (ohne Antibiotika-Behandlung) lagen mehrheitlich zwischen 0,17 und 0,46 und der Median lag bei 0,31.

Diese Werte zeigen, dass beide Antibiotika (Telavancin und Vancomycin) bei einer Inkubationstemperatur von 45°C keine antibiofilmbildende Aktivität zeigen, sondern eher die Bildung von Biofilm unterstützen. Während die OD-Werte bei Behandlung mit Telavancin bei 45°C eher Biofilm-fördernd wirkten, während bei 35°C die Daten eher eine neutrale oder bei den höheren Konzentrationen ein leicht inhibierende Rolle des Antibiotikums andeuten.

Die Wirkung der Vancomycinkonzentrationen bei 45°C im Vergleich zu denen bei 35°C zeigt fast keinen Unterschied. Wenn man die Median-Werte zwischen allen Konzentrationen der Vancomycin (lagen ca. bei 0,5) und der Biofilme pur (lagen ca. bei 0,3) vergleicht, ist eindeutig ersichtlich, dass die Aktivität von Vancomycin die Biofilmbildung unterstützt.

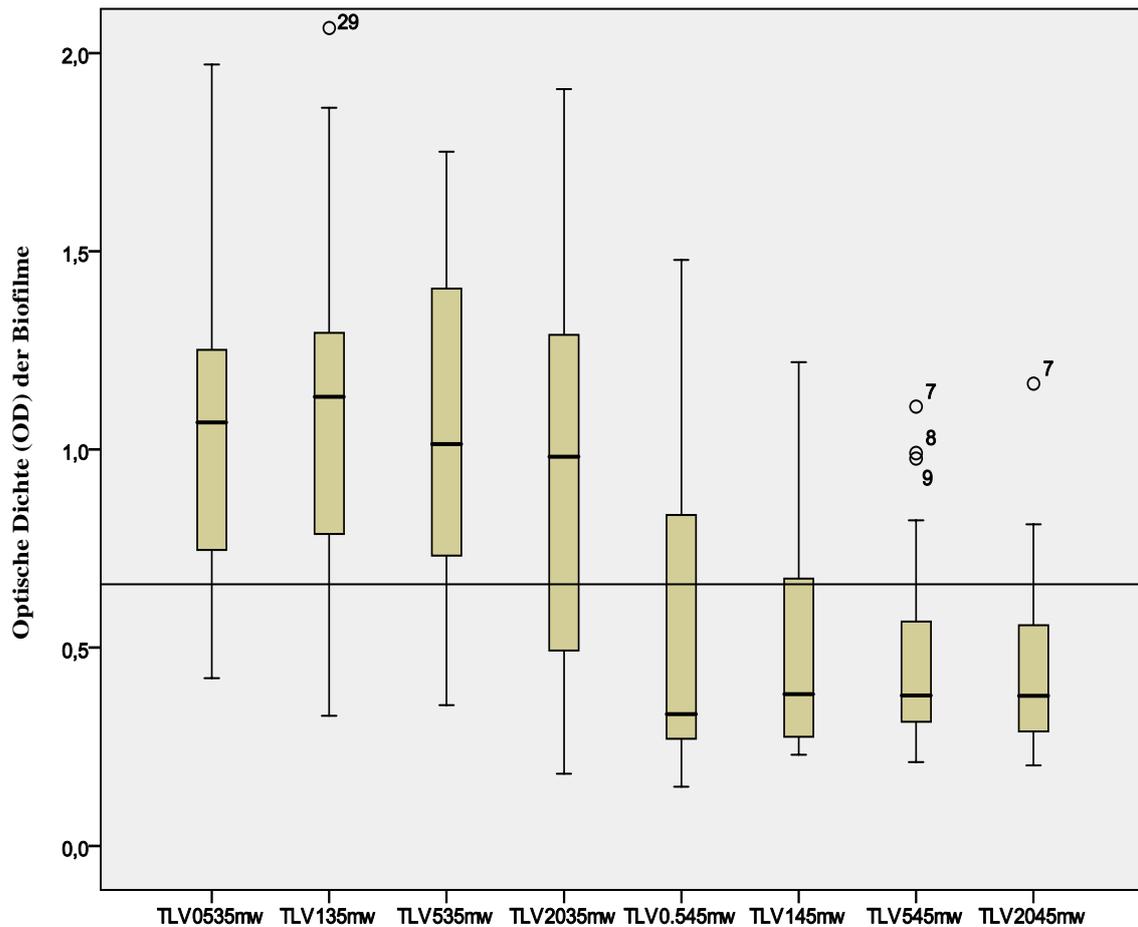


Abb.17 Boxplot Diagramme zur Darstellung der Wirksamkeit von Telavancin (0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, und 20 µg/ml) auf Biofilme der klinische Isolate bei 35°C und 45°C. Die Zahlen 7, 8, 9, und 29 geben die Stämme an, deren Werte (OD) außerhalb der mehrheitlichen Werte der jeweiligen Meßreihe lagen.

- **TLV0535mw:** OD-Mittelwert der Telavancinkonzentration von 0,5µg/ml bei 35°C
- **TLV135mw:** OD-Mittelwert der Telavancinkonzentration von 1µg/ml bei 35°C
- **TLV535mw:** OD-Mittelwert der Telavancinkonzentration von 5µg/ml bei 35°C
- **TLV2035mw:** OD-Mittelwert der Telavancinkonzentration von 20µg/ml bei 35°C
- **TLV0545mw:** OD-Mittelwert der Telavancinkonzentration von 0,5µg/ml bei 45°C
- **TLV145mw:** OD-Mittelwert der Telavancinkonzentration von 1µg/ml bei 45°C
- **TLV545mw:** OD-Mittelwert der Telavancinkonzentration von 5µg/ml bei 45°C
- **TLV2045mw:** OD-Mittelwert der Telavancinkonzentration von 20µg/ml bei 45°C

In Abb.17 sind die OD-Werte der Biofilme der klinischen Isolate unter Wirkung von Telavancin bei 35°C und bei 45°C grafisch dargestellt. Hier sieht man ganz klar den Einfluss der Temperatur auf das Biofilmwachstum. Der Unterschied der OD-Werte zwischen Telavancinkonzentrationen bei 35°C und bei 45°C. ist eindeutig ersichtlich. Die Median-OD-Werte bei 35°C lagen ungefähr bei 1,1 und bei 45°C lagen ungefähr

bei 0,4. Das zeigt, dass bei 35°C der Biofilm ein starkes Wachstum hat, während bei 45°C ein deutlich schwächeres Wachstum bei allen Konzentrationen ersichtlich ist.

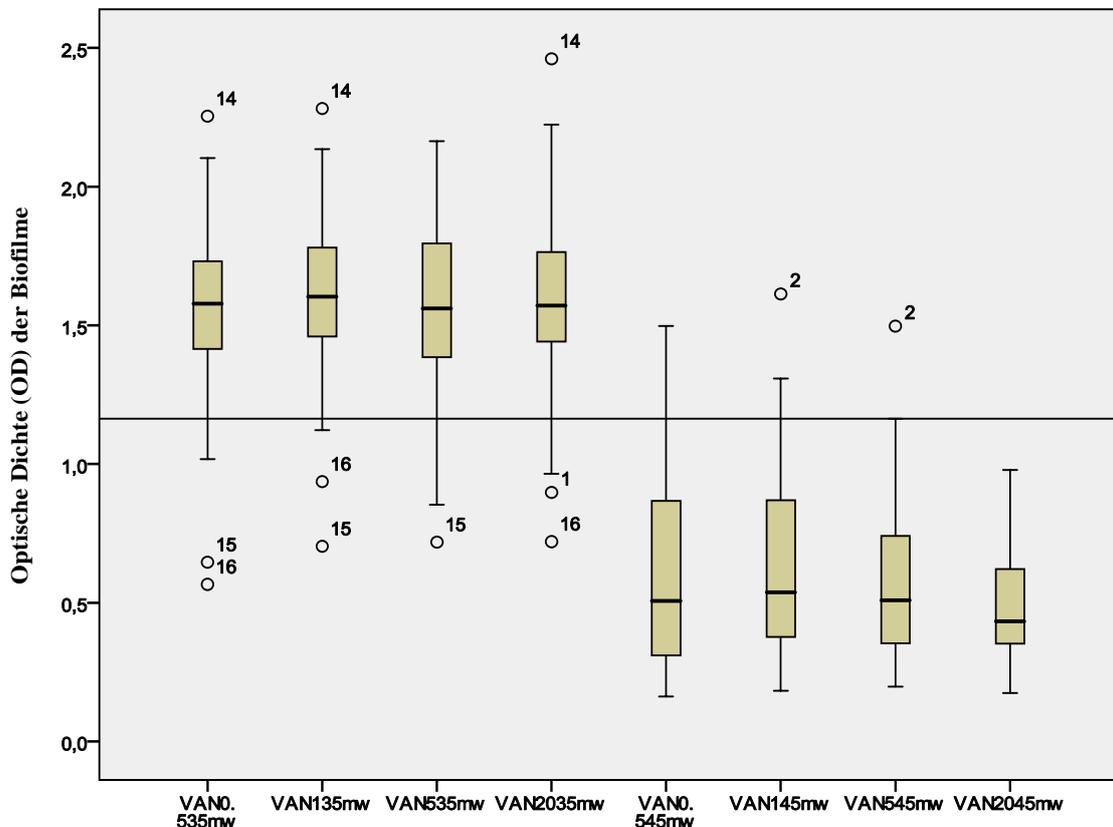


Abb.18 Boxplot Diagramme zur Darstellung der Wirksamkeit von Vancomycin (0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, und 20 µg/ml) auf Biofilme der klinische Isolate bei 35°C und 45°C. Die Zahlen 1, 2, 14, 15, und 16 geben die Stämme an, deren Werte (OD) außerhalb der mehrheitlichen Werte der jeweiligen Meßreihe lagen.

- **VAN0535mw**: OD-Mittelwert der Vancomycinkonzentration von 0,5µg/ml bei 35°C
- **VAN135mw**: OD-Mittelwert der Vancomycinkonzentration von 1µg/ml bei 35°C
- **VAN535mw**: OD-Mittelwert der Vancomycinkonzentration von 5µg/ml bei 35°C
- **VAN2035mw**: OD-Mittelwert der Vancomycinkonzentration von 20µg/ml bei 35°C
- **VAN0.545mw**: OD-Mittelwert der Vancomycinkonzentration von 0,5µg/ml bei 45°C
- **VAN145mw**: OD-Mittelwert der Vancomycinkonzentration von 1µg/ml bei 45°C
- **VAN545mw**: OD-Mittelwert der Vancomycinkonzentration von 5µg/ml bei 45°C
- **VAN2045mw**: OD-Mittelwert der Vancomycinkonzentration von 20µg/ml bei 45°C

In Abb.18 sind die OD-Werte der Biofilme der klinischen Isolate unter Wirkung von Vancomycin bei 35°C und bei 45°C grafisch dargestellt. Auch hier, die OD-Werte zeigen eindeutig die Rolle die Temperatur in Bezug auf das Biofilmwachstum spielt. Die Median-OD-Werte der allen vier Konzentrationen von Vancomycin bei 35°C lagen ungefähr bei 1,6 und die Median-OD-Werte der allen vier Konzentrationen von

Vancomycin bei 45°C lagen ungefähr bei 0,5. Das bedeutet, dass der Biofilm bei 35°C ein enorm stärkeres Wachstum im Vergleich zum Biofilm bei 45°C zeigt, wo ein eindeutig schwächeres Wachstum erkennbar ist.

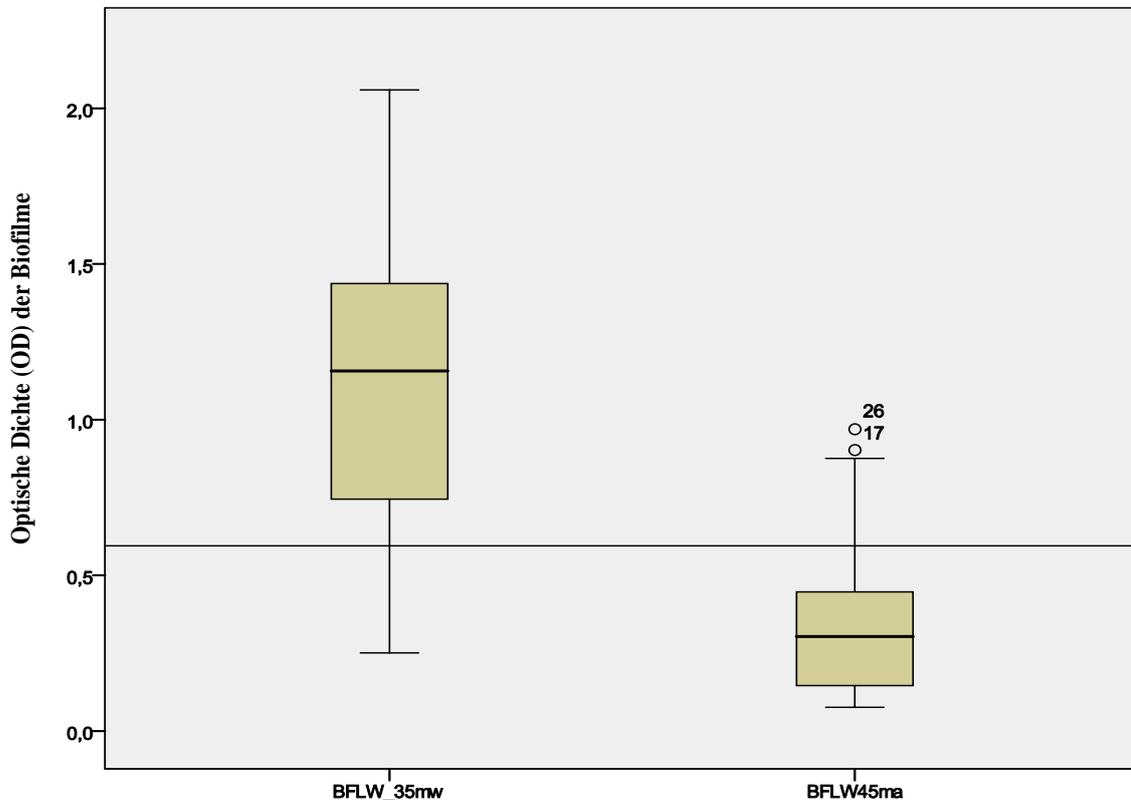


Abb.19 Boxplot Diagramme zur Darstellung der Ergebnisse des Biofilms pur (ohne Antibiotika-Behandlung) bei 35°C und 45°C. Die Zahlen 17 und 26 geben die Stämme an, deren Werte (OD) außerhalb der mehrheitlichen Werte der jeweiligen Meßreihe lagen.

- **BFLW_35mw:** OD-Mittelwert des Biofilms pur (ohne Antibiotika) bei 35 ° C
- **BFLW45ma:** OD-Mittelwert des Biofilms pur (ohne Antibiotika) bei 45 ° C

In Abb.19 sind die OD-Werte des Biofilms pur (ohne Antibiotika – Behandlung), bei 35°C und bei 45°C grafisch dargestellt. Auch hier sieht man eindeutig die Wirkung des Temperaturunterschiedes auf das Wachstum des Biofilms. Die Median-OD-Werte des Biofilms pur bei 35°C lagen ungefähr bei 1,16 und die Median-OD-Werte des Biofilms pur bei 45°C lagen ungefähr bei 0,31. Das bedeutet, dass die optischen Dichten der bei 35°C inkubierten Biofilme sind ca. viermal höher als die der bei 45°C inkubierten Biofilme.

3.1.3 Ergebnisse der Wachstumskontrolle

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden auch die Wachstumskontrollen durchgeführt, um die antimikrobielle Wirkungsstärke von Telavancin und Vancomycin auf in Biofilmen organisierten klinischen Isolaten (*S. aureus* und *S. epidermidis*) bei 35°C bzw. 45°C auf zuzeigen.

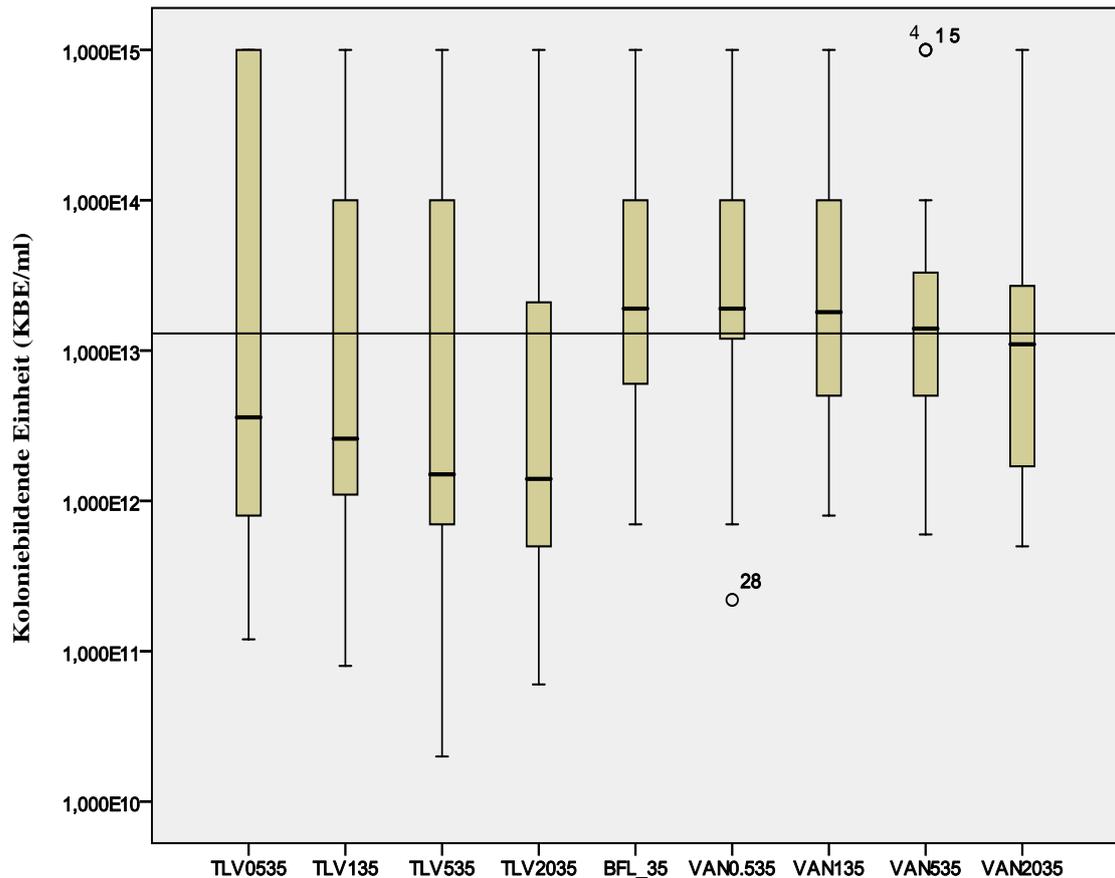


Abb.20 Boxplot Diagramme zur Darstellung der Ergebnisse der Wachstumskontrollen der Keime pur (ohne Antibiotika-Behandlung) und mit allen vier Konzentrationen (0,5µg/ml, 1µg/ml, 5µg/ml, und 20µg/ml) von Telavancin und Vancomycin bei 35°C. Die Zahlen 4, 15, und 28 geben die Stämme und den Messwert (KBE/ml) an, die außerhalb der mehrheitlichen Messwerte lagen.

- **TLV0535:** Der Median der Lebendkeimzahl, behandelt durch Telavancinkonzentration von 0,5µg/ml bei 35°C
- **TLV135:** Der Median der Lebendkeimzahl, behandelt durch Telavancinkonzentration von 1µg/ml bei 35°C
- **TLV535:** Der Median der Lebendkeimzahl, behandelt durch Telavancinkonzentration von 5µg/ml bei 35°C
- **TLV2035:** Der Median der Lebendkeimzahl, behandelt durch Telavancinkonzentration von 20µg/ml bei 35°C
- **BFL_35:** Der Median der Lebendkeimzahl, pur (ohne Antibiotika) bei 35 ° C

- *VAN053: Der Median der Lebendkeimzahl, behandelt durch Vancomycinkonzentration von 0,5µg/ml bei 35°C*
- *VAN135: Der Median der Lebendkeimzahl, behandelt durch Vancomycinkonzentration von 1µg/ml bei 35°C*
- *VAN535: Der Median der Lebendkeimzahl, behandelt durch Vancomycinkonzentration von 5µg/ml bei 35°C*
- *VAN2035: Der Median der Lebendkeimzahl, behandelt durch Vancomycinkonzentration von 20µg/ml bei 35°C*

In der Abbildung 20 sind die Lebendkeimzahl pur (ohne Antibiotika Behandlung) und die mit Telavancin bzw. Vancomycin (0,5µg/ml, 1µg/ml, 5µg/ml, und 20µg/ml) inokulierten klinischen Isolate bei 35°C grafisch dargestellt. Auch hier ist es eindeutig ersichtlich, dass es einen Unterschied in der Wirkungsstärke bei den Konzentrationen (0,5µg/ml, 1µg/ml, 5µg/ml, und 20µg/ml) zwischen Telavancin und Vancomycin bei 35°C gibt.

Der Median der Lebendkeimzahl unter Wirkung von Telavancin bei 35°C betrug:

- Konzentration (0,5 µg/ml) lag bei $3,6 \times 10^{12}$ KBE/ml (CFU/ml)
- Konzentration (1 µg/ml) lag bei $2,6 \times 10^{12}$ KBE/ml (CFU/ml)
- Konzentration (5 µg/ml) lag bei $1,5 \times 10^{12}$ KBE/ml (CFU/ml)
- Konzentration (20 µg/ml) lag bei $1,4 \times 10^{12}$ KBE/ml (CFU/ml)

Der Median der Lebendkeimzahl unter Wirkung von Vancomycin bei 35°C betrug:

- Konzentration (0,5 µg/ml) lag bei $1,9 \times 10^{13}$ KBE/ml (CFU/ml)
- Konzentration (1 µg/ml) lag bei $1,8 \times 10^{13}$ KBE/ml (CFU/ml)
- Konzentration (5 µg/ml) lag bei $1,4 \times 10^{13}$ KBE/ml (CFU/ml)
- Konzentration (20 µg/ml) lag bei $1,1 \times 10^{13}$ KBE/ml (CFU/ml)

Der Median der Lebendkeimzahl ohne Antibiotika-Behandlung lag bei $1,9 \times 10^{13}$ KBE/ml (CFU/ml).

Laut diesen Auswertungen der Median der Lebendkeimzahl unter Wirkung von Telavancin (0,5µg/ml, 1µg/ml, 5µg/ml, und 20µg/ml) lag bei 10^{12} KBE/ml (CFU/ml). Dieser ist niedriger als der Median der Lebendkeimzahl unter Wirkung von Vancomycin (0,5µg/ml, 1µg/ml, 5µg/ml, und 20µg/ml), der bei 10^{13} KBE/ml lag. Der Median der Lebendkeimzahl pur (ohne Antibiotika-Behandlung) lag bei 10^{13} KBE/ml (CFU/ml). Das bedeutet, dass bei den Keimen, die mit Telavancin behandelt worden sind, weniger Wachstum ersichtlich war als bei denen, die mit Vancomycin bzw. nicht

mit Antibiotika behandelt worden sind. Das zeigt die stärkere antibakterielle Aktivität von Telavancin auf das Keimwachstum im Vergleich zu Vancomycin.

Die Wachstumsergebnisse präsentieren fast das idente Bild, wie es bereits die Biofilmergebnisse in Abb.15 zeigten.

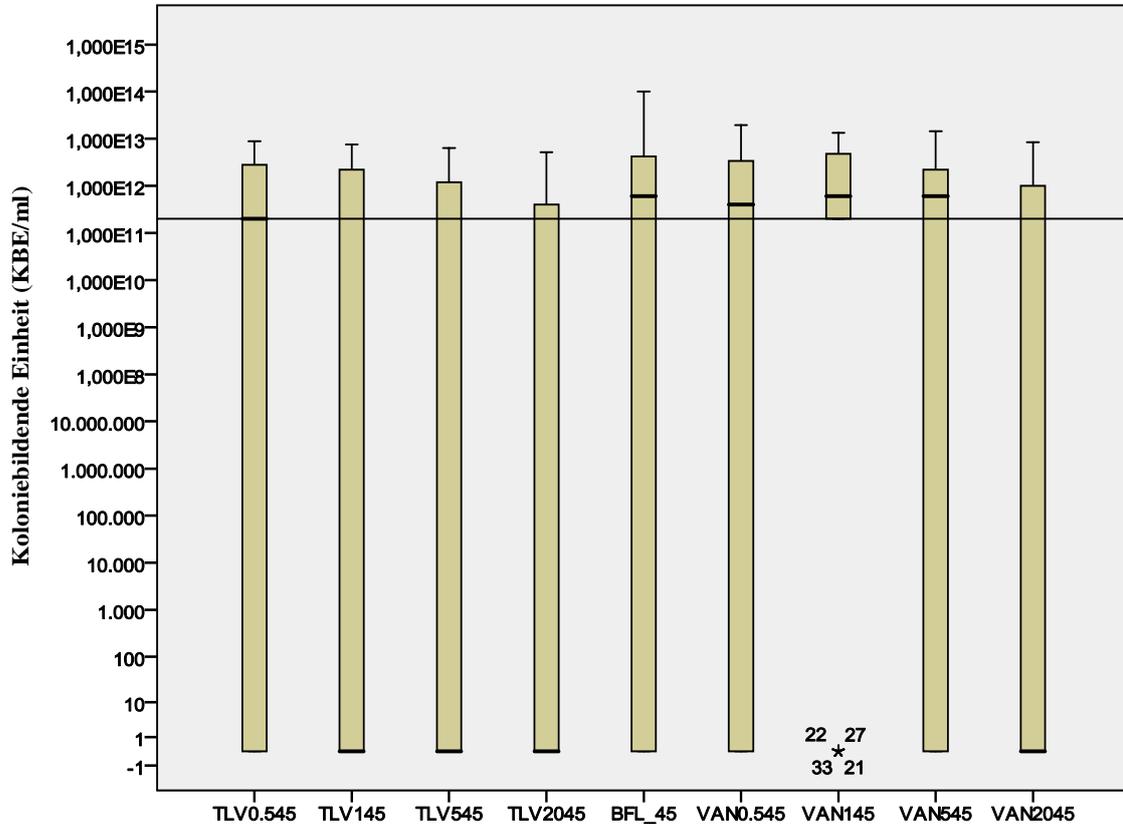


Abb.21 Boxplot Diagramme zur Darstellung der Ergebnisse der Wachstumskontrollen der Keime pur (ohne Antibiotika-Behandlung) und mit allen vier Konzentrationen (0,5µg/ml, 1µg/ml, 5µg/ml, und 20µg/ml) von Telavancin und Vancomycin bei 45°C. Die Zahlen 21, 22, 27, und 33 geben die Stämme und den Messwert (KBE/ml) an, die außerhalb der mehrheitlichen Messwerte lagen.

- **TLV0545:** Der Median der Lebendkeimzahl, behandelt durch Telavancinkonzentration von 0,5µg/ml bei 45°C
- **TLV145:** Der Median der Lebendkeimzahl, behandelt durch Telavancinkonzentration von 1µg/ml bei 45°C
- **TLV545:** Der Median der Lebendkeimzahl, behandelt durch Telavancinkonzentration von 5µg/ml bei 45°C
- **TLV2045:** Der Median der Lebendkeimzahl, behandelt durch Telavancinkonzentration von 20µg/ml bei 45°C
- **BFL_45:** Der Median der Lebendkeimzahl, pur (ohne Antibiotika) bei 45 ° C
- **VAN0545:** Der Median der Lebendkeimzahl, behandelt durch Vancomycinkonzentration von 0,5µg/ml bei 45°C
- **VAN145:** Der Median der Lebendkeimzahl, behandelt durch Vancomycinkonzentration von 1µg/ml bei 45°C
- **VAN545:** Der Median der Lebendkeimzahl, behandelt durch Vancomycinkonzentration von 5µg/ml bei 45°C

- *VAN2045: Der Median der Lebendkeimzahl, behandelt durch Vancomycinkonzentration von 20µg/ml bei 45°C*

In Abb.21 sind die Lebendkeimzahl pur (ohne Antibiotika – Behandlung) und die mit Telavancin bzw. Vancomycin (0,5µg/ml, 1µg/ml, 5µg/ml, und 20µg/ml) inokulierten klinische Isolate bei 45°C mittels grafisch zusammengefasst.

Der Median der Lebendkeimzahl unter Wirkung von Telavancin bei 45°C betrug:

- Konzentration (0,5 µg/ml) lag bei $2,0 \times 10^{11}$ KBE/ml (CFU/ml)
- Konzentration (1 µg/ml) lag bei null KBE/ml (CFU/ml)
- Konzentration (5 µg/ml) lag bei null KBE/ml (CFU/ml)
- Konzentration (20 µg/ml) lag bei null KBE/ml (CFU/ml)

Der Median der Lebendkeimzahl unter Wirkung von Vancomycin bei 45°C betrug:

- Konzentration (0,5 µg/ml) lag bei $4,0 \times 10^{11}$ KBE/ml (CFU/ml)
- Konzentration (1 µg/ml) lag bei $6,0 \times 10^{11}$ KBE/ml (CFU/ml)
- Konzentration (5 µg/ml) lag bei $6,0 \times 10^{11}$ KBE/ml (CFU/ml)
- Konzentration (20 µg/ml) lag bei null KBE/ml (CFU/ml)

Der Median der Lebendkeimzahl ohne Antibiotika – Behandlung lag bei $6,0 \times 10^{11}$ KBE/ml (CFU/ml).

In Abb.21 sieht man die Wirkung des Antibiotika – Konzentrationsunterschiedes auf das Wachstum der klinischen Isolate. Der Median bei einer Telavancinkonzentration von 0,5 µg/ml lag ungefähr in dem gleichen Bereich wie der Median bei Vancomycinkonzentrationen von 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, und 5 µg/ml, und der Median der Lebendkeimzahl pur (ohne Antibiotika-Behandlung). Der Median bei Telavancinkonzentrationen 1 µg/ml, 5 µg/ml und 20 µg/ml, und der Median bei Vancomycinkonzentration 20 µg/ml lagen bei null. Daraus folgt, dass bei über 50% der klinischen Isolate bei 45°C kein Wachstum ersichtlich war. In diesem Temperaturbereich (wie bei Telavancin) ist auch die antibakterielle Wirkung von Vancomycin (20 µg/ml) auf das Wachstum der klinischen Isolate ersichtlich.

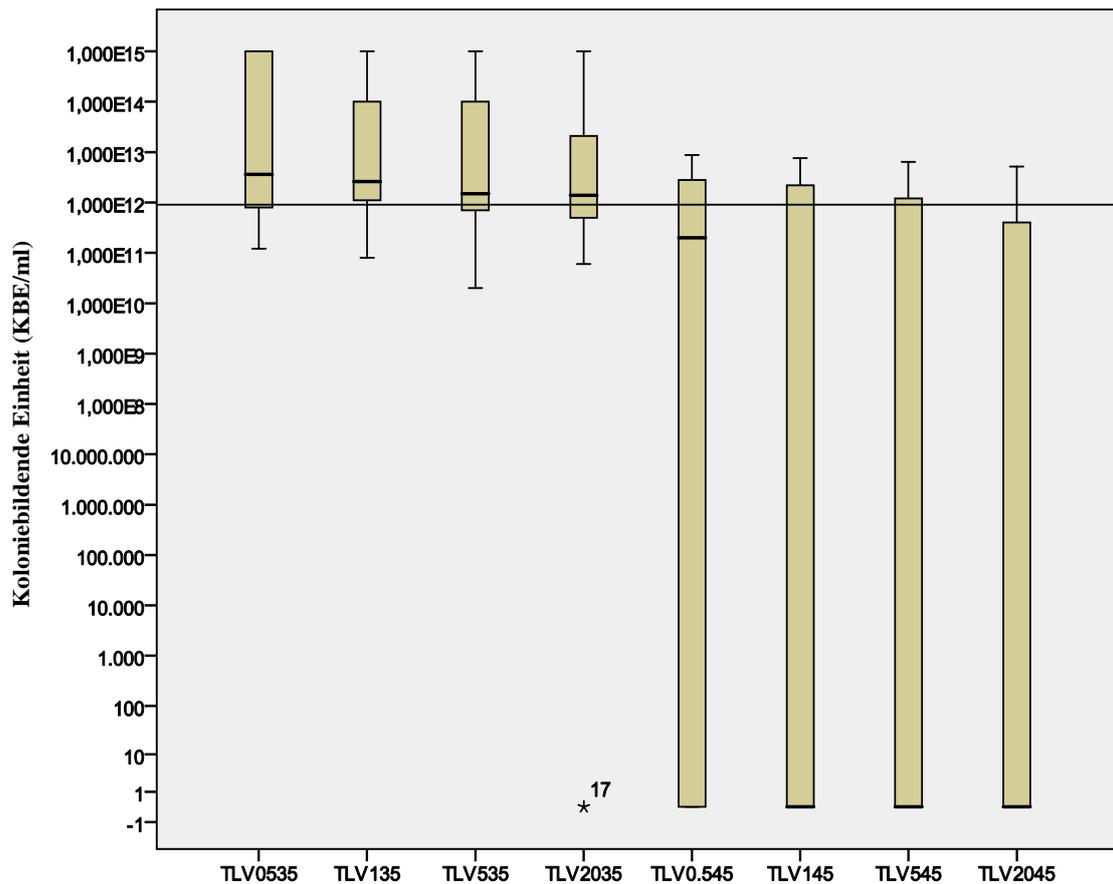


Abb.22 Boxplot Diagramme zur Darstellung der Ergebnisse der Wachstumskontrollen der Keime, inokuliert mit allen vier Konzentrationen (0,5µg/ml, 1µg/ml, 5µg/ml, und 20µg/ml) von Telavancin bei 35°C bzw. 45°C. Die Zahl 17 gibt den Stamm und den Messwert (KBE/ml) an, der außerhalb der mehrheitlichen Messwerte lag.

- **TLV0535:** Der Median der Lebendkeimzahl, behandelt durch Telavancinkonzentration von 0,5µg/ml bei 35°C
- **TLV135:** Der Median der Lebendkeimzahl, behandelt durch Telavancinkonzentration von 1µg/ml bei 35°C
- **TLV535:** Der Median der Lebendkeimzahl, behandelt durch Telavancinkonzentration von 5µg/ml bei 35°C
- **TLV2035:** Der Median der Lebendkeimzahl, behandelt durch Telavancinkonzentration von 20µg/ml bei 35°C
- **TLV0545:** Der Median der Lebendkeimzahl, behandelt durch Telavancinkonzentration von 0,5µg/ml bei 45°C
- **TLV145:** Der Median der Lebendkeimzahl, behandelt durch Telavancinkonzentration von 1µg/ml bei 45°C
- **TLV545:** Der Median der Lebendkeimzahl, behandelt durch Telavancinkonzentration von 5µg/ml bei 45°C
- **TLV2045:** Der Median der Lebendkeimzahl, behandelt durch Telavancinkonzentration von 20µg/ml bei 45°C

In Abb.22 sind die Ergebnisse der Lebendkeimzahl bei zwei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen (35°C und 45°C) grafisch dargestellt. Hier ist ganz eindeutig die Wirksamkeit des Temperaturunterschiedes bei allen vier Telavancinkonzentrationen

(0,5µg/ml, 1µg/ml, 5µg/ml, und 20µg/ml) ersichtlich. Der Median der Lebendkeimzahl bei allen vier Telavancinkonzentrationen bei 35°C lag bei 10^{12} KBE/ml, und war eindeutig höher als der Median der Lebendkeimzahl bei allen vier Telavancinkonzentrationen bei 45°C. Nur bei einer Telavancinkonzentration von 0,5 µg/ml lag der Median bei $2,0 \times 10^{11}$ KBE/ml, bei allen anderen Telavancinkonzentrationen (1 µg/ml, 5µg/ml, 20µg/ml) bei 45°C lag der Median bei null KBE/ml. Das bedeutet, dass bei über 50% der klinischen Isolate die mit Telavancin (1µg/ml, 5µg/ml und 20µg/ml) bei 45°C inokuliert worden sind, kein Wachstum ersichtlich war, im Vergleich zu denen, die bei 35°C mit Telavancin (0,5µg/ml, 1µg/ml, 5µg/ml, und 20µg/ml) inokuliert worden sind, und ein Wachstum überall ersichtlich war.

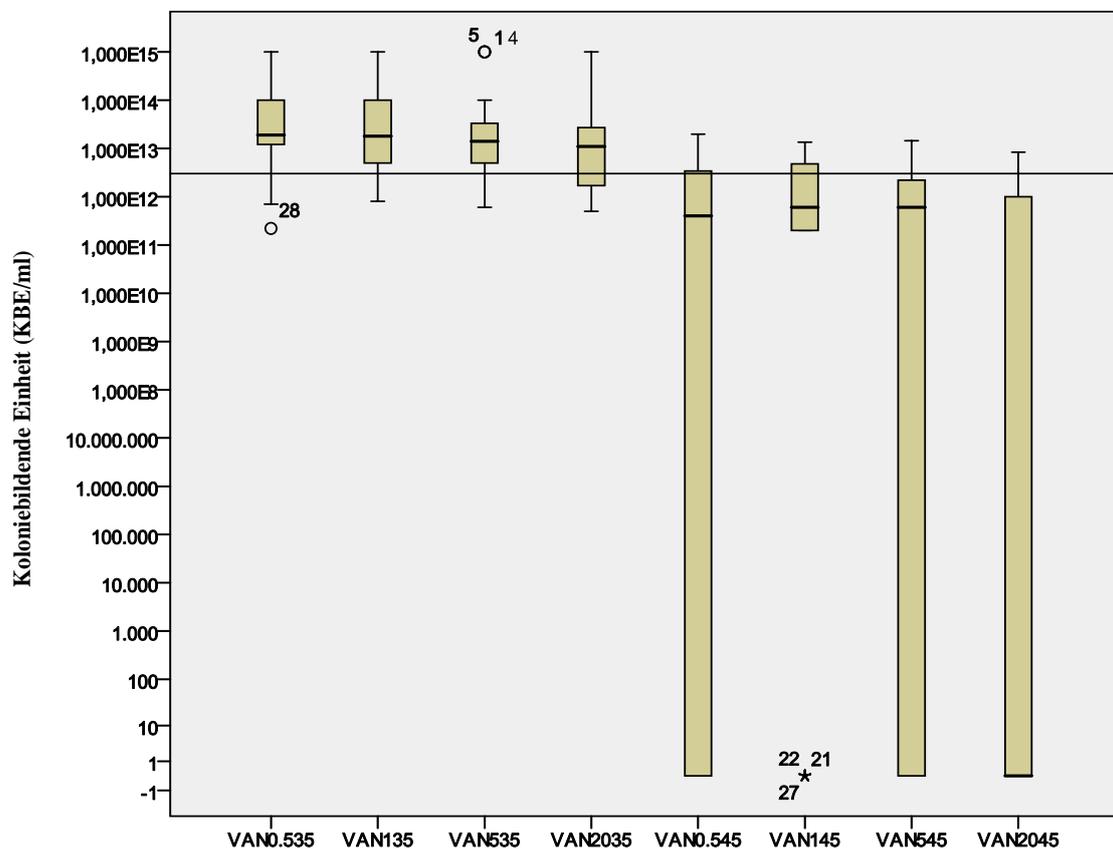


Abb.23 Boxplot Diagramme zur Darstellung der Ergebnisse der Wachstumskontrollen der Keime, inokuliert mit allen vier Konzentrationen (0,5µg/ml, 1µg/ml, 5µg/ml, und 20µg/ml) von Vancomycin bei 35°C bzw. 45°C. Die Zahlen 5, 14, 21, 22, 27, und 28 geben die Stämme und den Messwert (KBE/ml) an, die außerhalb der mehrheitlichen Messwerte lagen.

- **VAN053:** Der Median der Lebendkeimzahl, behandelt durch Vancomycinkonzentration von 0,5µg/ml bei 35°C

- *VAN135: Der Median der Lebendkeimzahl, behandelt durch Vancomycinkonzentration von 1µg/ml bei 35°C*
- *VAN535: Der Median der Lebendkeimzahl, behandelt durch Vancomycinkonzentration von 5µg/ml bei 35°C*
- *VAN2035: Der Median der Lebendkeimzahl, behandelt durch Vancomycinkonzentration von 20µg/ml bei 35°C*
- *VAN0545: Der Median der Lebendkeimzahl, behandelt durch Vancomycinkonzentration von 0,5µg/ml bei 45°C*
- *VAN145: Der Median der Lebendkeimzahl, behandelt durch Vancomycinkonzentration von 1µg/ml bei 45°C*
- *VAN545: Der Median der Lebendkeimzahl, behandelt durch Vancomycinkonzentration von 5µg/ml bei 45°C*
- *VAN2045: Der Median der Lebendkeimzahl, behandelt durch Vancomycinkonzentration von 20µg/ml bei 45°C*

In Abb.23 sind die Ergebnisse der Lebendkeimzahl bei zwei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen (35°C und 45°C) grafisch dargestellt. Auch hier ist ganz eindeutig die Wirksamkeit des Temperaturunterschiedes bei allen vier Vancomycinkonzentrationen (0,5µg/ml, 1µg/ml, 5µg/ml, und 20µg/ml) ersichtlich. Der Median der Lebendkeimzahl bei allen vier Vancomycinkonzentrationen bei 35°C lag bei 10^{13} KBE/ml, und war eindeutig höher als der Median der Lebendkeimzahl bei allen vier Vancomycinkonzentrationen bei 45°C. Der Median der Lebendkeimzahl bei 45°C bei Vancomycinkonzentrationen von 0,5µg/ml, 1µg/ml und 5µg/ml lag bei 10^{11} KBE/ml, der Median der Lebendkeimzahl bei einer Vancomycinkonzentration von 20µg/ml lag bei null KBE/ml. Hier sieht man nicht nur die Wirksamkeit des Temperaturunterschieds, sondern auch die Wirksamkeit des Konzentrationsunterschiedes auf das Wachstum der klinischen Isolate. Das ist eindeutig bei der höchsten Vancomycinkonzentration (20µg/ml) ersichtlich, weil bei dieser Konzentration bei 45°C über 50% der klinischen Isolate nicht gewachsen sind.

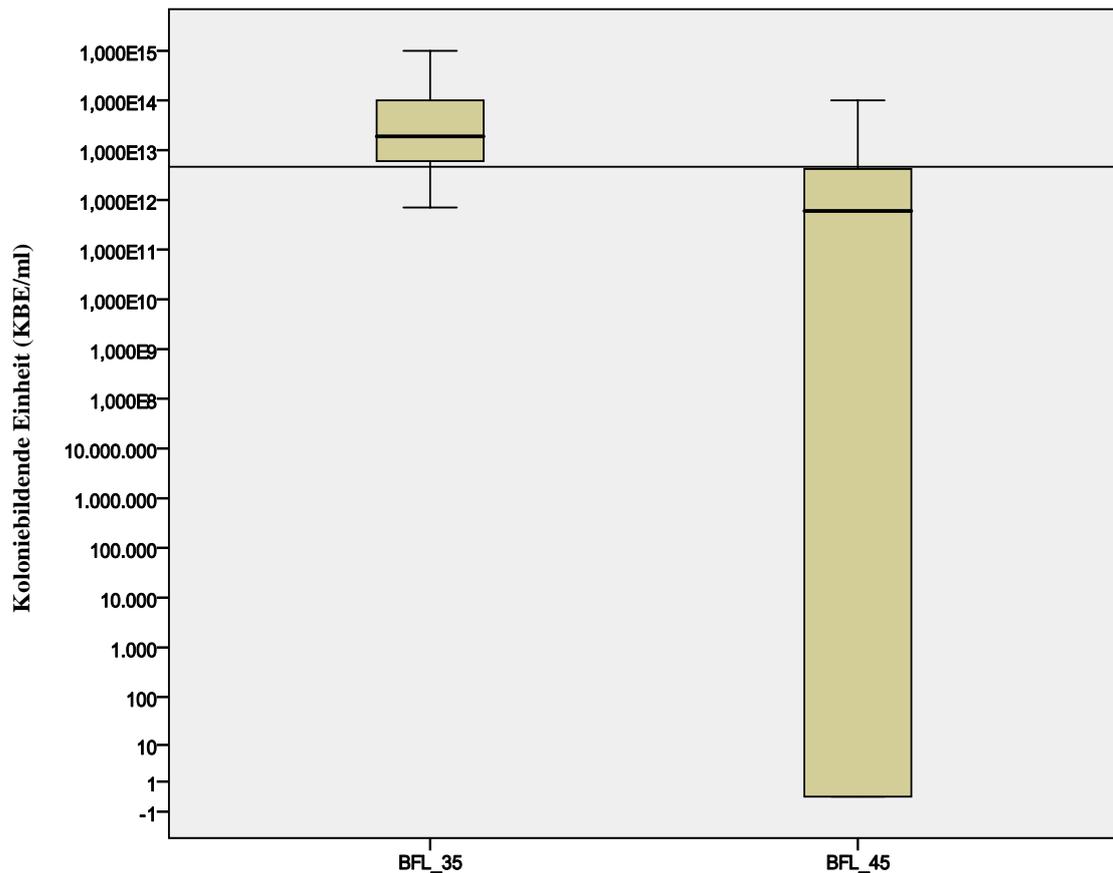


Abb.24 Boxplot Diagramme zur Darstellung der Ergebnisse der Wachstumskontrolle der Keime pur (ohne Antibiotika – Behandlung) bei 35°C bzw. 45°C.

- **BFL_35:** Der Median der Lebendkeimzahl, pur (ohne Antibiotika) bei 35 ° C
- **BFL_45:** Der Median der Lebendkeimzahl, pur (ohne Antibiotika) bei 45 ° C

In Abb.24 sind die Ergebnisse der Lebendkeimzahl der klinischen Isolate pur (ohne Antibiotika – Behandlung) bei zwei verschiedene Inkubationstemperaturen (35°C bzw. 45°C) grafisch dargestellt. Auch hier sieht man eindeutig die Wirkung des Temperaturunterschiedes auf das Wachstum der Keime. Es ist klar zu sehen, dass der Median der Lebendkeimzahl bei 35°C höher ist als der Median der Lebendkeimzahl bei 45°C. Der Median der Lebendkeimzahl bei 35°C lag bei $1,9 \times 10^{13}$ KBE/ml, und der Median bei 45°C lag bei $6,0 \times 10^{11}$ KBE/ml. Darüber hinaus, war bei 36% der klinischen Isolate bei 45°C kein Wachstum ersichtlich. Im Vergleich dazu konnte es bei 35°C überall Wachstum festgestellt werden.

3.2 Diskussion

Das Ziel dieser Diplomarbeit war, den Unterschied in der Wirkungsstärke zwischen Vancomycin und Telavancin in Bezug auf Biofilme von *Staphylococcus aureus* und Koagulase –negative Staphylokokken (*S. epidermidis*) aufzuzeigen.

Ein Biofilm wurde als eine von bakteriellen Zellen strukturierte Gemeinschaft definiert, die in einer extrazellulären Matrix eingebettet sind, und durch das „Quorum Sensing“ miteinander kommunizieren können (75, 78, 79). Diese extrazelluläre Matrix sorgt für Stabilität der Biofilm-Struktur und spielt auch eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Biofilm-assoziierten-Infektionen, und in der Resistenzentwicklung gegen antimikrobielle Substanzen (80).

Biofilm Kulturen der Mikroorganismen erwiesen sich als wesentlich resistenter gegen inhibierende- und bakterizide Wirkung von Antibiotika, als planktonische Kulturen (75). Studien haben nachgewiesen, dass Biofilm-assoziierten-Bakterien 100 bis 1000-fach weniger empfindlich gegenüber Antibiotika sind als planktonische Bakterien (75). Das Scheitern des Antibiotikums in bakteriziden Konzentrationen über den gesamten Umfang des Biofilms einzudringen, ist möglicherweise der Grund für die Reduzierung der antibakteriellen Wirkung des Antibiotikums (83).

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die Sensitivität klinischer Isolate gegenüber den Antibiotika Vancomycin, Telavancin, Daptomycin, Linezolid und Tigecyclin mittels Mikrodilutionsverfahren getestet. In Tabelle 9 sind die Ergebnisse der MHK-Bestimmung dargestellt. Hier sieht man, dass die MHK-Werte von Vancomycin (0,5 µg/ml-4 µg/ml) um den Faktor 2 bis 16 höher liegen als die MHK-Werte von Telavancin (0,125 µg/ml-0,5 µg/ml). Das bedeutet, dass Telavancin eine stärkere antibakterielle Wirkung, besitzt als Vancomycin.

Auch in anderen Studien, wurden ähnliche Beobachtungen gemacht. Eine davon ist die von Hegde et al (76). Das Ziel dieser Studie war es, die Wirksamkeit von Telavancin und Vancomycin gegen Glykopeptid-intermediär-resistenter *Staphylococcus aureus* (GISA) und heterogene Vancomycin-intermediäre-resistenter *Staphylococcus aureus* (hVISA) in einem neutropenischen Maus Bakteriämie-Modell zu vergleichen. Die Ergebnisse waren eindeutig: Telavancin war 8-fach stärker als Vancomycin gegen GISA-Stamm HIP-5836 (MHK 1µg/ml vs. 8µg/ml), 16-fach stärker gegen GISA-Stamm Mu50 (MHK 0,5µg/ml vs. 8µg/ml), und 8-fach stärker gegen hVISA-Stamm Mu3 (MHK 0,25µg/ml vs. 2µg/ml). Laut dieser Studie war Telavancin gegen alle

getesteten Stämme bakterizid. Im Gegensatz dazu war Vancomycin leicht bakterizid gegen HIP-5836 und bakteriostatisch gegen Mu50 und Mu3 (76).

Bei einer Studie von Andres G. Madrigal et al (77) wurde die antibakterielle Wirkung von Telavancin und Vancomycin in Vitro in einem Kaninchen-Modell, der Aortenklappe Endokarditis gegen Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*-Stamm COL und Vancomycin-intermediäre *S. aureus* (VISA-Stamm) HIP 5836 verglichen. Telavancin wurde bei einer Konzentration von 5 µg / ml, sowohl gegen COL als auch gegen HIP5836 bakterizid. Vancomycin wirkte bakteriostatisch bei 5 µg / ml und bakterizid bei 10 µg / ml gegen COL und wurde bei 10 µg / ml gegen VISA – Stamm HIP 5836 bakteriostatisch (77).

Wie in Tabelle 9, die Überlegenheit von Telavancin zu Vancomycin wurde auch in einer Studie von Darouiche et al (87) gezeigt. Sie haben die Empfindlichkeitstests von P1-Stamm (ein methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA)), gegenüber Telavancin und Vancomycin durchgeführt, und die MHK-Werte von Telavancin lagen bei 0,25 µg/ml, im Vergleich zu MHK-Werte von Vancomycin die bei 1 µg/ml lagen. Das bedeutet, die MHK-Werte von Vancomycin um den Faktor 4 höher lagen als die MHK-Werte von Telavancin (87).

Ähnliche Ergebnisse haben auch Barcia-Macay et al (85) von den Empfindlichkeitstests von ATCC_25923 und ATCC_29213 (MSSA-Stämme), ATCC_33591 und ATCC_43300 (MRSA-Stämme), und NRS23 und NRS52 (VISA-Stämme) gegenüber Vancomycin und Telavancin bekommen. Die MHK-Werte (µg/ml) von Vancomycin waren 1 und 1 für MSSA-Stämme, 2 und 2 für MRSA-Stämme, und 4 und 4 für VISA-Stämme. Die MHK-Werte (µg/ml) von Telavancin waren 0,5 und 0,5 für MSSA-Stämme, 0,5 und 0,5 für MRSA-Stämme, und 0,5 und 0,5 für VISA-Stämme. Auch hier sieht man, dass die antibakterielle Wirkung von Telavancin ist 2- bis 8-fach stärker als die von Vancomycin (85).

Teil dieser Diplomarbeit war auch die Bestimmung der Biofilmreduktion, als Folge der Behandlung mit Telavancin und Vancomycin bei zwei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen (35°C und 45°C). In Abbildung 15 sieht man die antibakterielle Wirkungsstärke von Telavancin und Vancomycin auf Biofilme, die von klinischen Isolaten bei 35°C gebildet wurden. Die Median-OD-Werte (1,08/1,15/1,02 und 1,00) der Biofilme unter Wirkung von Telavancin (0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml und 20 µg/ml) zeigen, dass Telavancin (auch wenn nur gering ist) die antibakterielle Wirkungsstärke auch gegen Staphylokokken, die in einem Biofilm eingebettet sind,

demonstriert. Ganz anders sieht es bei Vancomycin aus. Die Median-OD-Werte (1,58/1,63/1,57 und 1,60) der Biofilme, die mit Vancomycin (0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml und 20 µg/ml) behandelt wurden, zeigen, dass Vancomycin nicht nur keine anti-Biofilm-bildende Wirkung besitzt, sondern sogar die Biofilmbildung bei allen vier Konzentrationen fördert. Das zeigt uns, dass Telavancin zu einem wichtigen Mittel im Kampf gegen Infektionen von Staphylokokken werden kann.

In Abbildung 16 sieht man einen Unterschied, bezüglich der OD-Werte der Biofilme (bei 45°C) bei Behandlung mit Telavancin. Die Median-OD-Werte (0,33/0,39/0,39 und 0,38) der Biofilme in Gegenwart von Telavancin (0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml und 20 µg/ml) zeigen, dass Telavancin bei dieser Inkubationstemperatur nicht nur keine anti-Biofilm-bildende Wirkung hat, sondern geringfügig die Biofilmbildung bei allen vier Konzentrationen fördert. Die Median-OD-Werte (0,51/0,55/0,53 und 0,45) der Biofilme unter Wirkung von Vancomycin (0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml und 20 µg/ml) zeigen, dass Vancomycin im Vergleich zu Telavancin, bei der Inkubationstemperatur von 45°C die Biofilmbildung stärker fördert. Auch andere Studien (88, 89, 90) zeigten, dass Vancomycin keine antibakterielle Aktivität gegen Staphylokokken besitzt, die in einem Biofilm eingebettet sind, und Telavancin immer (bei 35°C und 37°C) eine anti-Biofilm-bildende Wirkung hat.

Die Abbildungen 17, 18 und 19 zeigen die Bedeutung der Temperatur auf die Biofilmbildung. Sowohl die OD-Werte der Biofilme unter Wirkung von Telavancin und Vancomycin, als auch die OD-Werte der Biofilme ohne Antibiotika-Behandlung, zeigen, dass die Biofilmbildung bei der Inkubationstemperatur von 35°C im Vergleich zu Biofilmbildung bei 45°C relativ stark war.

Es wurden auch Wachstumskontrollen durchgeführt, um den Unterschied in der Wirkungsstärke zwischen Telavancin und Vancomycin auf in Biofilmen organisierte klinische Isolate bei Inkubationstemperaturen von 35°C und 45°C aufzuzeigen. In Abbildung 20 sieht man, dass der Median der Lebendkeimzahl unter Wirkung von Telavancin (0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml und 20 µg/ml) bei 35°C, bei 10^{12} KBE/ml lag. Der Median der Lebendkeimzahl pur (ohne Antibiotika-Behandlung), und unter Wirkung von Vancomycin (0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml und 20 µg/ml) bei 35°C, lag bei 10^{13} KBE/ml. Das bedeutet, dass Telavancin bei allen vier Konzentrationen eine antibakterielle Wirkung zeigte, im Vergleich zu Vancomycin die nur bei Konzentrationen von 5 µg/ml und 20 µg/ml eine sehr geringe antibakterielle Wirkung zeigte. Der Median der Lebendkeimzahl unter Wirkung von Vancomycin bei

Konzentrationen von 0,5 µg/ml und 1 µg/ml ist gleich dem des Medians der Lebendkeimzahl pur (ohne Antibiotika-Behandlung). Das bedeutet, dass Vancomycin bei Konzentrationen von 0,5 µg/ml und 1 µg/ml wirkungslos war.

Die Abbildung 21 zeigt, dass der Median der Lebendkeimzahl unter Wirkung von Telavancin bei 45°C bei einer Konzentration von 0,5 µg/ml 10^{11} KBE/ml betrug und damit insgesamt gleich den Medianen der Lebendkeimzahl pur (ohne Antibiotika-Behandlung) und unter Wirkung von Vancomycin bei Konzentrationen von 0,5 µg/ml, 1 µg/ml und 5 µg/ml. Das bedeutet, dass Telavancin bei einer Konzentration von 0,5 µg/ml, und Vancomycin bei Konzentrationen bis zu 5 µg/ml keine Wirkung zeigt. Ein ganz anderes Bild zeigten die Mediane der Lebendkeimzahlen unter Wirkung von Telavancin bei den Konzentrationen von 1 µg/ml, 5 µg/ml und 20 µg/ml sowie unter Wirkung von Vancomycin bei einer Konzentration von 20 µg/ml die bei 0 KBE/ml lagen. Diese Ergebnisse zeigten eine starke antibakterielle Wirkung von Telavancin und Vancomycin bei den genannten Konzentrationen an.

In den Abbildungen 22, 23 und 24 sieht man die Bedeutung des Temperaturunterschiedes auf die Lebendkeimzahl. Auch hier ist eindeutig ersichtlich, dass bei der Inkubationstemperatur von 35°C die Lebendkeimzahl bei allen Antibiotikakonzentrationen signifikant höher als bei 45°C war. Bei einer Inkubationstemperatur von 45°C und bestimmten Antibiotikakonzentrationen (Telavancin: 1 µg/ml, 5 µg/ml und 20 µg/ml; Vancomycin: 20 µg/ml) war gar keine Wachstum mehr nachweisbar.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Diplomarbeit und den vielen klinischen Berichten, kann Telavancin aufgrund seines breiten Wirkspektrums gegen Gram-positive Bakterien und seiner relativ guten Verträglichkeit zu einem unverzichtbaren Bestandteil des antimikrobiellen Arsenalen werden und damit eine neue Alternative in der chemotherapeutischen Behandlung.

4. Literaturverzeichnis

1. **Georg Schön.** Bakterien: Die Welt der kleinsten Lebewesen. C.H.Beck'sche Verlagsbuchhandlung, München 1999.
2. **Christine Josenhans, Helmut Hahn und Rolf E. Streeck.** Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer-Lehrbuch 2009.
3. **J.P. Euzéby: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature.** Classification of domains and phyla – Hierarchical classification of prokaryotes (Bacteria). <http://www.bacterio.cict.fr/classifphyla.html#Bacteria>
4. **Katharina Munk.** Mikrobiologie, Grundstudium Biologie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg – Berlin 2001.
5. **Medical Microbiology.** <http://micro.digitalproteus.com/morphology2.php>
6. **Hahn. Falke. Kaufmann. Ullman.** Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer – Verlag Berlin Heidelberg 2001.
7. **Birgit Neumeister, Heinrich K. Geiss, Rüdiger W. Braun, Peter Kimmig.** Mikrobiologische Diagnostik, Bakteriologie – Mykologie – Virologie – Parasitologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. New York; 2.Auflage 2009.
8. **Michael T. Madigan, John M. Martinko.** Brock Mikrobiologie. Pearson Studium Verlag. 11.Auflage 2009.
9. **Hahn. Kaufmann. Schultz. Suerbaum.** Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer Verlag. 6.Auflage 2009.
10. **Sarah Gander, Andrew Kinnaird and Roger Finch.** Telavancin: in vitro activity against staphylococci in a biofilm model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2005; 56, 337 – 343.
11. **Ethan Rubinstein et al.** Telavancin versus Vancomycin for Hospital-Acquired Pneumonia due to Gram-positive Pathogens. *Oxford Journals, Clin Infect Dis.* 2011; 52 (1), 31 – 40.
12. **Dechen C Tsering, Ranabir Pal, and Sumit Kar.** Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus: Prevalence and Current Susceptibility Pattern in Sikkim. *Journal of Global Infectious Diseases* 2011 Jan-Mar; 3(1), 9 – 13.
13. **M. A. Jabra-Rizk, T. F. Meiller, C. E. James and M. E. Shirtliff.** Effect of Farnesol on Staphylococcus aureus Biofilm Formation and Antimicrobial Susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, April 2006, p. 1463-1469, Vol. 50, No. 4

- 14. Aldona L. Baltch, William J. Ritz, Lawrence H. Bopp, Phyllis B. Michelsen, and Raymond P. Smith.** Antimicrobial Activities of Daptomycin, Vancomycin, and Oxacillin in Human Monocytes and of Daptomycin in Combination with Gentamicin and/or Rifampin in Human Monocytes and in Broth against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, April 2007, p. 1559-1562, Vol. 51, No. 4.
- 15. Smitha Neerukonda and Dr. Kimberly Jefferson.** Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* biofilms. June 13, 2008.
- 16. Lorena Tuchscher et al.** *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO Molecular Medicine*, DOI 10.1002/emmm.201000115; 2011.
- 17. Henrik Holtmann, Monika Bobkowski.** Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene. Elsevier GmbH, München. 1.Auflage 2008.
- 18. Joseph F John and Alexander M Harvin.** History and evolution of antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci: Susceptibility profiles of new anti-staphylococcal agents. *Dove Medical Press Limited, Ther Clin Risk Manag.* 2007 December; 3(6): 1143–1152.
- 19. Dietrich Mack.** Molekulare Mechanismen der Biofilm – Entstehung von *Staphylococcus epidermidis*. *Chemotherapie Journal* 199, 8.Jahrgang, Heft 5.
- 20. Ingo Stock.** Erkrankungen durch Koagulase – negative Staphylokokken. *Chemotherapie Journal* 2008;17:10 – 24.
- 21. Zeitschrift für Chemotherapie (ZCT 2 – 2004).** *Staphylococcus epidermidis*. <http://www.zct-berlin.de/klinik.praxis/staphylococcusepidermidis.html>
- 22. A. Simon Lynch and Gregory T. Robertson.** Bacterial and Fungal Biofilm Infections. *Annu. Rev. Med.* 2008. 59:415–28.
- 23. Ozlem Kandemir, Volkan Oztuna, Abtullah Milcan, Alp Bayramoğlu, H Hamdi Celik, Cemil Bayarslan, Ali Kaya.** Clarithromycin destroys biofilms and enhances bactericidal agents in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res.* 2005 Jan;(430):171-5.
- 24. Kerry L. LaPlante and Leonard A. Mermel.** In vitro activity of daptomycin and vancomycin lock solutions on staphylococcal biofilms in a central venous catheter model. *Nephrology Dialysis Transplantation* (2007) 22: 2239-2246.
- 25. Rong Wang, Burhan A. Khan, Gordon Y. C. Cheung, Thanh-Huy L. Bach, Max Jameson-Lee, Kok-Fai Kong, Shu Y. Queck, and Michael Otto.** *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and

dissemination of biofilm-associated infection in mice. *J Clin Invest.* 2011;121(1):238–248. doi:10.1172/JCI42520.

26. Fluckiger U, Ulrich M, Steinhuber A, Döring G, Mack D, Landmann R, Goerke C, Wolz C. Biofilm formation, icaADBC transcription, and polysaccharide intercellular adhesin synthesis by staphylococci in a device-related infection model. *Infect Immun.* 2005 Mar; 73(3):1811-9.

27. Vuong C, Kocianova S, Voyich JM, Yao Y, Fischer ER, DeLeo FR, Otto M. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem.* 2005 Mar 25; 280(12):12064.

28. Michael Otto. Staphylococcal Biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008; 322: 207–228.

29. Michael Otto. Basis of Virulence in Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Rev Microbiol* 64:143-62, 2010.

30. Cedric Mims, Hazel M. Dockrell, Richard V. Goering, Ivan Roitt, Derek Wakelin, Mark Zuckerman. Medizinische Mikrobiologie - Infektiologie mit Virologie und Immunologie. Elsevier Verlag, 2.Auflage.

31. M. Alexander, C.J. Estler, F. Legler. Antibiotika und Chemotherapeutika. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1995, 2.Auflage.

32. AC1L9B3A - Compound Summary (CID 441396). Pubchem compound. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=441396>.

33. Judith N. Steenbergen, Jeff Alder, Grace M. Thorne and Francis P. Tally. Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2005) 55, 283–288.

34. Sanchez-Porto A, Casanova-Roman M, Casas-Ciria J, Santaella MJ, Sanchez-Morenilla I, Eiros-Bouza JM. In vitro activity of daptomycin and comparator agents against *Staphylococcus aureus* isolates from intravenous drug users with right endocarditis. *Infez Med.* 2010 Jun; 18(2):108-12.

35. Jason A. Crompton, Donald S. North, MinJung Yoon, Judith N. Steenbergen, Kenneth C. Lamp, and Graeme N. Forrest. Outcomes with daptomycin in the treatment of *Staphylococcus aureus* infections with a range of vancomycin MICs. *J Antimicrob Chemother.* 2010 August; 65(8): 1784–1791.

36. Twele L, Moyen E, Zhang K, Dalton B, Church D, Conly J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis and de novo development of daptomycin resistance during therapy. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2010 summer; 21(2):89-93.

- 37. Rose WE, Rybak MJ, Kaatz GW.** Evaluation of daptomycin treatment of *Staphylococcus aureus* bacterial endocarditis: an in vitro and in vivo simulation using historical and current dosing strategies. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Aug; 60(2):334-40.
- 38. Popov AF, Schmitto JD, Tirilomis T, Bireta C, Coskun KO, Mokashi SA, Emmert A, Friedrich M, Wiese CH, Schoendube FA.** Daptomycin as a possible new treatment option for surgical management of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* sternal wound infection after cardiac surgery. *J Cardiothorac Surg.* 2010 Aug 6; 5:57.
- 39. Aldona L. Baltch, William J. Ritz, Lawrence H. Bopp, Phyllis B. Michelsen, and Raymond P. Smith.** Antimicrobial Activities of Daptomycin, Vancomycin, and Oxacillin in Human Monocytes and of Daptomycin in Combination with Gentamicin and/or Rifampin in Human Monocytes and in Broth against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, April 2007, p. 1559-1562, Vol. 51, No. 4.
- 40. Franz-Josef Schmitz, Minden, und Michael Winkler, Hannover.** Therapieoptionen bei schweren Infektionen durch grampositive Erreger. *Chemother J* 2009;18:149-59.
- 41. Daptomycin eine neue Therapieoption bei Infektionen mit grampositiven (Problem-) Keimen.** *Zeitschrift für Chemotherapie Heft 4, 2006*
<http://www.zct-berlin.de/neueinfuehrungen/daptomycin.html>.
- 42. Neue Antibiotika** Bericht vom zweiten internationalen Symposium „Resistant grampositive Infections“ Berlin, 10 bis 12 Dezember 2004; Bericht von Susanne Heinzl, Stuttgart, *Chemotherapie Journal 14.Jahrgang Heft 2/2005*.
- 43. Daniel N. Wilson, Frank Schluenzen, Joerg M. Harms, Agata L. Starosta, Sean R. Connell, and Paola Fucini.** The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 September 9; 105(36): 13339–13344. *PMCID: PMC2533191*.
- 44. PAUL W. AMENT, PHARM.D., NAMIRAH JAMSHED, M.D., and JOHN P. HORNE, M.D., Latrobe Area Hospital, Latrobe, Pennsylvania.** Linezolid: Its Role in the Treatment of Gram-Positive, Drug-Resistant Bacterial Infections. *Am Fam Physician.* 2002 Feb 15;65(4):663-671.
- 45. Portal für organische Chemie.** 20.08.08 Wirkprinzip von Linezolid aufgeklärt.
<http://www.organische-chemie.ch/chemie/2008aug/antibiotika.shtm>

46. Linezolid – erstes Antiinfektivum aus der Klasse der Oxazolidinone. *Zeitschrift für Chemotherapie Heft 6, 2001.*

<http://www.zct-berlin.de/neueinfuehrungen/linezolid.html>

47. Ji-Woong Jeong, Sung-Ji Jung, Hyun-Hee Lee, Yong-Zu Kim, Tae-Kyo Park, Young-Lag Cho, Sang-Eun Chae, Sung-Yoon Baek, Sung-Ho Woo, Hyang-Sook Lee and Jin-Hwan Kwak. In Vitro and In Vivo Activities of LCB01-0371, a New Oxazolidinone. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 December; 54(12): 5359–5362. *PMCID: PMC2981296.*

48. Boubakar B. Ba, Corinne Arpin, Branly Bikie Bi Nso, Véronique Dubois, Marie-Claude Saux and Claudine Quentin. Activity of Linezolid in an In Vitro Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Model Using Different Dosages and *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* Strains with and without a Hypermutator Phenotype. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 April; 54(4): 1443–1452. *PMCID: PMC2849367.*

49. Nickie D. Greer, PharmD, BCPS. Tigecycline (Tygacil): the first in the glycyclin class of antibiotics. *Proc (Bayl Univ Med Cent).* 2006 April; 19(2): 155–161. *PMCID: PMC1426172.*

50. Tigecyclin – ein neues Antibiotikum zur parenteralen Therapie. *Zeitschrift für Chemotherapie Heft 3, 2006.*

<http://www.zct-berlin.de/neueinfuehrungen/tigecyclin.html>

51. Vaida Šepūtienė, Justas Povilonis, Julija Armalytė, Kęstutis Sužiedėlis, Alvydas Pavilionis, Edita Sužiedėlienė. Tigecycline – how powerful is it in the fight against antibiotic-resistant bacteria? *Medicina (Kaunas)* 2010; 46(4):240-8.

52. Deutsches Ärzteblatt Jg. 107/Heft 40; 08.10.2010. Tigecyclingabe mit erhöhtem Sterberisiko assoziiert.

<http://www.aerzteblatt.de/v4/news/news.asp?id=42580> .

53. Matteo Bassetti, Laura Nicolini, Ernestina Repetto, Elda Righi, Valerio Del Bono and Claudio Viscoli. Tigecycline use in serious nosocomial infections: a drug use evaluation. *BMC Infectious Diseases* 2010, 10:287doi.

54. Neue Medikamente in Pipeline 2005. Tygacil® (Tigecyclin), neue Antibiotika.

<http://www.medknowledge.de/neu/2005/II-2005-20-tigecyclin.htm#nachtrag>.

55. Österreichische Gesellschaft für Antimikrobielle Chemotherapie. *Antiinfektiva – Tigecyclin.* <http://www.infektionsnetz.at/view.php?datID=2494>

- 56. Paul D Fey and Michael E Olson.** Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiol.* 2010 June; 5(6): 917-933.
- 57. Qian Liu, Jiajia Fan, Chen Niu, Decheng Wang, Jianping Wang, Xing Wang, Amer E. Villaruz, Min Li, Michael Otto, and Qian Gao.** The Eukaryotic-Type Serine/Threonine Protein Kinase Stk Is Required for Biofilm Formation and Virulence in *Staphylococcus epidermidis*. *PLoS One.* 2011; 6(9): e25380.
- 58. Lida Jafari Saraf and Samuel Eric Wilson.** Telavancin, a new lipoglycopeptide antimicrobial, in complicated skin and soft tissue infections. *Infect Drug Resist.* 2011; 4: 87–95.
- 59. Ao. Univ.-Prof., Dr. rer. nat., Mag. pharm. Helmut Spreitzer.** Telavancin (Arbelic®)– Hoffnung auf ein neues Reserveantibiotikum.
<http://focus-blog.pharmxplorer.at/2009/03/telavancin-arbelic%C2%AE%E2%80%93hoffnung-auf-ein-neues-reserveantibiotikum>.
- 60. Polina Plotkin, PharmD, Khusbu Patel, PharmD, Amy Uminski, PharmD, and Nino Marzella, BS, MS, PharmD.** Telavancin (Vibativ), a New Option for the Treatment of Gram-Positive Infections. *P T.* 2011 March; 36(3): 127-128, 133-138. *PMCID: PMC3086107*.
- 61. Kerry L. LaPlante and Leonard A. Mermel.** In Vitro Activities of Telavancin and Vancomycin against Biofilm-Producing *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, and *Enterococcus faecalis* Strains. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, July 2009, p. 3166–3169.
- 62. Joseph Bonkowski, Anne R Daniels and William J Peppard.** Role of telavancin in treatment of skin and skin structure infections. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2010; 3: 127–133. *PMCID: PMC3047943*.
- 63. Christopher S. Lunde, Charles H. Rexer, Stephanie R. Hartouni, Sabine Axt and Bret M. Benton.** Fluorescence Microscopy Demonstrates Enhanced Targeting of Telavancin to the Division Septum of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 May; 54(5): 2198–2200.
- 64. Louis D. Saravolatz, Gary E. Stein, and Leonard B. Johnson.** Telavancin: A Novel Lipoglycopeptide. *Clin Infect Dis.* (2009) 49 (12): 1908-1914.
- 65. Deborah L. Higgins, Ray Chang, Dmitri V. Debabov, Joey Leung, Terry Wu, Kevin M. Krause, Erik Sandvik, Jeffrey M. Hubbard, Koné Kaniga, Donald E. Schmidt, Jr., Qiufeng Gao, Robert T. Cass, Dane E. Karr, Bret M. Benton, and Patrick P. Humphrey.** Telavancin, a Multifunctional Lipoglycopeptide, Disrupts both

Cell Wall Synthesis and Cell Membrane Integrity in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 March; 49(3): 1127–1134.

66. Rodrigo E. Mendes, Gary J. Moet, Mike J. Janecek, and Ronald N. Jones. In Vitro Activity of Telavancin against a Contemporary Worldwide Collection of *Staphylococcus aureus* isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 June; 54(6): 2704–2706.

67. Professor Dr. Ulrike Holzgrabe und Dr. Jens Schmitz. Pharmazeutische Zeitung – Neue Antibiotika.

<http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=31957>.

68. TREK Diagnostic systems. Sensititre Susceptibility plates for clinical fastidious and non-fastidious organisms.

http://www.trekds.com/products/sensititre/sen_pharmaceutical.asp .

69. G D Christensen, W A Simpson, J J Younger, L M Baddour, F F Barrett, D M Melton, and E H Beachey. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.* 1985 December; 22(6): 996–1006.

70. Paul Y. Kim, Yoon-Sun Kim, Il Gyo Koo, Jae Chul Jung, Gon Jun Kim, Myeong Yeol Choi, Zengqi Yu, and George J. Collins. Bacterial Inactivation of Wound Infection in a Human Skin Model by Liquid-Phase Discharge Plasma. *PLoS One.* 2011; 6(8): e24104.

71. Kraft und Dürr. Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. *Schattauer Verlag; 6.Auflage.*

72. Institut für Analytische Chemie und Lebensmittelchemie. Grundlagen der Photometrie. http://orgchem.univie.ac.at/fileadmin/user_upload/inst_orgchem/Lehre/GP_II/ANC/Photometrie_Proteinbestimmung_2010.pdf.

73. U. Dettmer, M. Folkerts, E.Kächler, A. Sönnichsen. Intensivkurs Biochemie. Elsevier GmbH, 1.Auflage 2005.

74. Prof. Dr. S. Scherer. Praktikumsskript, Mikrobiologische Übungen. Technische Universität in München.

<http://www.wzw.tum.de/micbio/infos/Script%20Mikrobio%20Praktikum%20WS0506.pdf>

75. Raphael Saginur, Melissa St. Denis, Wendy Ferris, Shawn D. Aaron, Francis Chan, Craig Lee and Karam Ramotar¹. *Multiple Combination Bactericidal Testing of Staphylococcal Biofilms from Implant-Associated Infections. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Jan. 2006, p. 55–61.*

- 76. Hegde SS, Difuntorum S, Skinner R, Trumbull J, Krause KM.** *Efficacy of telavancin against glycopeptide-intermediate Staphylococcus aureus in the neutropenic mouse bacteraemia model. J Antimicrob Chemother.* 2009 Apr; 63(4):763-6.
- 77. Andres G. Madrigal, Li Basuino, and Henry F. Chambers.** *Efficacy of Telavancin in a Rabbit Model of Aortic Valve Endocarditis Due to Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY,* Aug. 2005, p. 3163–3165.
- 78. Jeremy M. Yarwood, Douglas J. Bartels, Esther M. Volper and E. Peter Greenberg.** *Quorum Sensing in Staphylococcus aureus Biofilms. JOURNAL OF BACTERIOLOGY,* Mar. 2004, p. 1838–1850.
- 79. Merle E. Olson, Howard Ceri, Douglas W. Morck, Andre G. Buret, Ronald R. Read.** *Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. The Canadian Journal of Veterinary Research* 2002;66:86-92.
- 80. Rachna Singh, Pallab Ray, Anindita Das and Meera Sharma.** *Penetration of antibiotics through Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms. J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 1955–1958.
- 81. Raphael Saginur, Melissa St. Denis, Wendy Ferris, Shawn D. Aaron, Francis Chan, Craig Lee and Karam Ramotar¹.** *Multiple Combination Bactericidal Testing of Staphylococcal Biofilms from Implant-Associated Infections. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY,* Jan. 2006, p. 55–61.
- 82. Hegde SS, Difuntorum S, Skinner R, Trumbull J, Krause KM.** *Efficacy of telavancin against glycopeptide-intermediate Staphylococcus aureus in the neutropenic mouse bacteraemia model. J Antimicrob Chemother.* 2009 Apr; 63(4):763-6.
- 83. Zhilan Zheng and Philip S. Stewart.** *Penetration of Rifampin through Staphylococcus epidermidis Biofilms. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY,* Mar. 2002, p. 900–903.
- 84. Andres G. Madrigal, Li Basuino, and Henry F. Chambers.** *Efficacy of Telavancin in a Rabbit Model of Aortic Valve Endocarditis Due to Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY,* Aug. 2005, p. 3163–3165.
- 85. Maritza Barcia-Macay, Sandrine Lemaire, Marie-Paule Mingeot-Leclercq, Paul M. Tulkens and Françoise Van Bambeke.** *Evaluation of the extracellular and intracellular activities (human THP-1 macrophages) of telavancin versus vancomycin against methicillin-susceptible, methicillin-resistant, vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant Staphylococcus aureus. Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2006) 58, 1177–1184.
- 86. Wu D, Hugenholtz P, Mavromatis K, Pukall R, Dalin E, Ivanova NN, Kunin V, Goodwin L, Wu M, Tindall BJ, Hooper SD, Pati A, Lykidis A, Spring S, Anderson IJ, D'haeseleer P, Zemla A, Singer M, Lapidus A, Nolan M, Copeland A, Han C, Chen F, Cheng JF, Lucas S, Kerfeld C, Lang E, Gronow S, Chain P, Bruce D, Rubin EM,**

Kyrpides NC, Klenk HP, Eisen JA. *A phylogeny-driven genomic encyclopaedia of Bacteria and Archaea.* *Nature.* 2009 Dec 24;462(7276):1056-60.

87. Rabih O. Darouiche, Mohammad D. Mansouri, and Marlowe J. Schneidkraut. *Comparative Efficacies of Telavancin and Vancomycin in Preventing Device-Associated Colonization and Infection by Staphylococcus aureus in Rabbits.* *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY,* June 2009, p. 2626–2628.

88. Roy E. Polonio, Leonard A. Mermel, Gregory E. Paquette and Jay F. Sperry. *Eradication of Biofilm-Forming Staphylococcus epidermidis (RP62A) by a Combination of Sodium Salicylate and Vancomycin.* *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY,* Nov. 2001, p. 3262–3266.

89. Issam Raad, Hend Hanna, Ying Jiang, Tanya Dvorak, Ruth Reitzel, Gassan Chaiban, Robert Sherertz, and Ray Hachem. *Comparative Activities of Daptomycin, Linezolid, and Tigecycline against Catheter-Related Methicillin-Resistant Staphylococcus Bacteremic Isolates Embedded in Biofilm.* *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY,* May 2007, p. 1656–1660.

90. Kerry L. LaPlante¹, and Leonard A. Mermel. *In Vitro Activities of Telavancin and Vancomycin against Biofilm-Producing Staphylococcus aureus, S. epidermidis, and Enterococcus faecalis Strains.* *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY,* July 2009, p. 3166–3169.

Enterococcus faecalis Strains. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY,* July 2009, p. 3166–3169.

„Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.“

5. Abkürzungen

RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	messenger RNA
rRNA	ribosomale RNA
tRNA	transfer RNA
IgA	Immunglobulin A
TSST-1	Toxic-Shock-Syndrom-Toxin-1
TSS	Toxic-Shock-Syndrom
CD4-T-Zell	Cluster of Differentiation 4
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor Alpha
IL-2	Interleukin-2
SSSS	Staphylococcal-Scalded-Skin-Syndrom
KNS	Koagulase – negative Staphylokokken
μ g	Mikrogramm
agr	accessory gene regulator
PIA	Polysaccharide intercellular adhesin
CC2	klonale Komplex 2
PSM	the phenol – soluble modulins
PGA	Poly – γ – DL – Glutaminsäure
MSCRAMM	microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
Aap	accumulation – associated protein
PNAG	Poly-N-acetylglukosamin
GlcNAc	β -1,6-verknüpften N-Acetylglukosamin
UDP	Uridindiphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
C.difficile	Clostridium difficile
MRSA	Methicillin – resistente Staphylococcus aureus
VRSA	Vancomycin – resistente Staphylococcus aureus
VISA	Vancomycin – intermediär empfindliche Staphylococcus aureus
VRE	Vancomycin – resistente Enterokokken

cSSTI	Complicated Skin and Soft Tissue Infections
RIE	Rechtsseitige infektiöse Endokarditis
SAB	Bakteriämie durch Staphylococcus aureus
CPK	Creatin – Phosphokinase
FDA	Food and Drug Administration
ZNS	Zentralnervensystem
ESBL	Extended Spectrum Beta-Lactamasen
MSSA	Methicillin-sensitive Staphylococcus aureus
ATP	Adenosintriphosphat
CLSI	Clinical and Laboratory Institute
Step	Staphylococcus epidermidis
Stau	Staphylococcus aureus
MHK	minimale Hemmkonzentration
MIC	minimal inhibitory concentration
MBK	minimale bakterizide Konzentration
TES – Puffer	N-Tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethanesulfonic Acid
BHI	Brain – Heart Infusion
KBE	Koloniebildende Einheiten
CFU	colony forming units
MH2 – Platte	Mueller – Hinton – 2 – Agarplatte
OD	Optische Dichte
MW	Mittelwert
TLV0535mw	Mittelwert der Telavancinkonzentration von 0,5µg/ml bei 35°C
TLV135mw	Mittelwert der Telavancinkonzentration von 1µg/ml bei 35°C
TLV535mw	Mittelwert der Telavancinkonzentration von 5µg/ml bei 35°C
TLV2035mw	Mittelwert der Telavancinkonzentration von 20µg/ml bei 35°C
BFLW_35mw	Mittelwert des Biofilms pur (ohne Antibiotika) bei 35 ° C
VAN0535mw	Mittelwert der Vancomycinkonzentration von 0,5µg/ml bei 35°C
VAN135mw	Mittelwert der Vancomycinkonzentration von 1µg/ml bei 35°C
VAN535mw	Mittelwert der Vancomycinkonzentration von 5µg/ml bei 35°C
VAN2035mw	Mittelwert der Vancomycinkonzentration von 20µg/ml bei 35°C
TLV0545mw	Mittelwert der Telavancinkonzentration von 0,5µg/ml bei 45°C
TLV145mw	Mittelwert der Telavancinkonzentration von 1µg/ml bei 45°C
TLV545mw	Mittelwert der Telavancinkonzentration von 5µg/ml bei 45°C

TLV2045mw	Mittelwert der Telavancinkonzentration von 20µg/ml bei 45°C
BFLW45ma	Mittelwert des Biofilms pur (ohne Antibiotika) bei 45 ° C
VAN0.545mw	Mittelwert der Vancomycinkonzentration von 0,5µg/ml bei 45°C
VAN145mw	Mittelwert der Vancomycinkonzentration von 1µg/ml bei 45°C
VAN545mw	Mittelwert der Vancomycinkonzentration von 5µg/ml bei 45°C
VAN2045mw	Mittelwert der Vancomycinkonzentration von 20µg/ml bei 45°C
G3CREC	dritte Generation Cephalosporin resistente Escherichia coli
EARSS	European Antimicrobial Resistance Surveillance System
hVISA	Heterogeneously Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus
GISA	glycopeptide – intermediate – resistant Staphylococcus aureus
cSSSI	Complicated skin and skin structure infections
MRSP	Methicillin resistente Staphylococcus pseudintermedius

6. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die verwendeten klinische Isolate. Seite 27-28

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien für diese Diplomarbeit. Seite 29

Tabelle 3: Verwendete Geräten für dieser Diplomarbeit. Seite 30-31

Tabelle 4: Schematische Darstellung der geometrischen Verdünnungsreihe von Antibiotika auf Mikrotiterplatten (Angaben in μl). Seite 35

Tabelle 5: Die vorbeschichtete Mikrotiterplatte für das Sensititre susceptibility system Seite 36

Tabelle 6: Schema der Plattenbelegung. Seite 39

Tabelle 7: MHK – Ergebnisse ($\mu\text{g/ml}$) in Bezug auf die vier Teststämme (Se91, Se99, K8, und ATCC 29213) Ermittlung mittels Mikrodilutionsverfahren. Seite 46-47

Tabelle 8: MHK – Ergebnisse ($\mu\text{g/ml}$) nach Behandlung der vier Teststämme (Se91, Se99, K8, und ATCC 29213), ermittelt mittels Sensititre susceptibility system (TREK Diagnostic System). Seite 47-48

Tabelle 9: MHK – Ergebnisse der klinischen Isolate gegenüber Telavancin, Vancomycin, Daptomycin, Linezolid und Tigecyclin. Seite 48-49

7. Abbildungsverzeichnis

Abb.1. Grampositive und Gramnegative bakterien. Ein Grampositive Bakterium hat eine dickere Peptidoglykanschicht (links). Ein Gram-negative Bakterium hat eine dünne Peptidoglykanschicht und einer äußeren Membran (rechts) (5). **Seite 5**

Abb.2. Staphylokokken – Ausstrich auf Columbia – Blutagarplatten. Oben und links: *Staphylococcus epidermidis*, unten: *Staphylococcus aureus* (07.05.2011). **Seite 9**

Abb.3. Phasen der Biofilm-Entwicklung in Staphylokokken (28). **Seite 11**

Abb.4. Modell der Biosynthese von PIA (27). **Seite 12**

Abb.5. Chemische Struktur von Vancomycin (32). **Seite 16**

Abb.6. Chemische Struktur von Daptomycin (33). **Seite 17**

Abb.7. Wirkungsmechanismus von Daptomycin. Hypothetischen Schritten: 1. Daptomycin bindet mit Hilfe Calciumionen an die Cytoplasmamembran; 2. Daptomycin zerstört die Membran; 3. Freisetzung von intrazellulären Ionen und Zelltod (33). **Seite 18**

Abb.8. Chemische Struktur von Linezolid (45). **Seite 19**

Abb.9. Das Antibiotikum Linezolid (gelb) blockiert die Eiweißproduktion im Ribosom (lila) unerwünschter, krankmachender Bakterien, so dass diese absterben (45). **Seite 20**

Abb.10. Chemische Struktur von Tigecyclin (50). Blau: charakteristischer Substituent der Glycylcycline, Unterschied zu Minocyclin. **Seite 21**

Abb.11. Chemische Struktur von Telavancin (59). Die Unterschiede zum Vancomycin sind rot markiert. **Seite 24**

Abb.12. Zenyth 340S Mikrotiterplatten – Reader. **Seite 41**

Abb.13. *S. epidermidis* – Kolonien auf Mueller – Hinton – 2 – Agarplatte am (23.01.2011). Die beschriftete Zahlen -4, -5, -6, -7, -8, und -9 entsprechen die Verdünnungsreihe von 10^{-4} bis 10^{-9} . **Seite 44**

Abb.14. MHK – Ergebnisse der klinischen Isolate gegenüber Telavancin, Vancomycin, Daptomycin, Linezolid und Tigecyclin grafisch dargestellt. **Seite 50**

Abb.15. Wirkung von Telavancin und Vancomycin (0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, und 20 µg/ml) auf Biofilme der klinischen Isolaten bei 35°C. **Seite 52**

Abb.16. *Wirksamkeit von Telavancin und Vancomycin (0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, und 20 µg/ml) auf Biofilme der klinische Isolate bei 45°C. Seite 54*

Abb.17. *Wirksamkeit von Telavancin (0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, und 20 µg/ml) auf Biofilme der klinische Isolate bei 35°C und 45°C. Seite 56*

Abb.18. *Wirksamkeit von Vancomycin (0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, und 20 µg/ml) auf Biofilme der klinischen Isolate bei 35°C und 45°C. Seite 57*

Abb.19. *Ergebnisse des Biofilms pur (ohne Antibiotika) bei 35°C und 45°C. Seite 58*

Abb.20. *Ergebnisse der Wachstumskontrollen der Keime pur und mit allen verwendeten Konzentrationen von Telavancin und Vancomycin bei 35°C. Seite 59*

Abb.21. *Ergebnisse der Wachstumskontrollen der Keime pur und mit allen verwendeten Konzentrationen von Telavancin und Vancomycin bei 45°C. Seite 61*

Abb.22. *Ergebnisse der Wachstumskontrollen der Keime, inokuliert mit allen verwendeten Konzentrationen von Telavancin bei 35°C bzw. 45°C. Seite 63*

Abb.23. *Ergebnisse der Wachstumskontrollen der Keime, inokuliert mit allen verwendeten Konzentrationen von Vancomycin bei 35°C bzw. 45°C. Seite 64*

Abb.24. *Ergebnisse der Wachstumskontrolle der Keime pur (ohne Antibiotika – Behandlung) bei 35°C bzw. 45°C. Seite 66*

8. Zusammenfassung

Studien haben gezeigt, dass Staphylokokken (*S. aureus* und *S. epidermidis*) in den letzten drei Jahrzehnten zu den häufigsten Verursachern von verschiedenen Infektionen zählten, und ein weltweites Problem bei der Therapie während der Behandlung der Patienten, ist die zunehmende Resistenzhäufigkeit gegenüber Antibiotika.

Ziel dieser Studie war den Unterschied in der Wirkungsstärke zwischen Vancomycin und Telavancin auf Biofilme von *S.aureus* und *S.epidermidis* zu untersuchen. In der vorliegenden Studie wurden die Keime (klinische Isolate) der Gattung *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* untersucht, wobei die Zahl der Keime gleich waren, 50 Prozent der verwendeten Isolate waren *Staphylococcus aureus* und 50 Prozent waren *Staphylococcus epidermidis*.

Um die Empfindlichkeit von *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* gegenüber Antibiotika zu testen, wurden fünf Antibiotika (Vancomycin, Daptomycin, Linezolid, Tigecyclin, und Telavancin) verwendet.

Es wurden die Empfindlichkeitstests gegenüber Antibiotika mit Standardlabormethoden durchgeführt, bezogen auf die Empfehlungen des *National Committee on Clinical and Laboratory Standards (CLSI – Clinical and Laboratory Institute) (M02 – A6)*.

Quantitative Aussagen zur Antibiotikaempfindlichkeit von klinischen Isolaten lieferten Untersuchungen zur minimale Hemmkonzentration (MHK). Dabei wurde die antimikrobielle Aktivität der verwendeten Antibiotika gemessen, indem man die niedrigste Konzentration des Antibiotikums ermittelt, die das Wachstum eines klinischen Isolates hemmt.

Für die Untersuchung der Biofilme wurde eine standardisierte Form der Biofilmzucht verwendet. Die Biofilme wurden mit Hilfe eines statischen Flachboden – Mikrotiterplatten Modell, das von Christensen et al. 1985 (70) etabliert wurde, untersucht. Für die Auswirkung von Vancomycin und Telavancin auf die etablierten Biofilme der klinischen Isolate zu testen, wurden die Biofilme mit vier verschiedenen Antibiotikakonzentrationen (**0,5µg/ml, 1µg/ml, 5µg/ml und 20µg/ml**)

inkubiert, und nach 18 – 24 Stunden Inkubationszeit wurden Biofilme am Boden der Nöpfchen gebildet.

In dieser Studie wurden Biofilmdichten mittels eines Mikrotiterplatten-Reader (Anthos Zenyth 340 S) bei einer Wellenlänge von 550 nm quantifiziert (Extinktion gemessen). Zwischen Biofilmdichten die mit Vancomycin bzw. Telavancin behandelt worden sind, wurden Vergleiche gemacht, und der Unterschied zwischen Biofilmdichten in Gegenwart der beiden Antibiotika bei 35°C bzw. 45°C ausgewertet.

Es wurden auch Lebendkeimzahlzählungen (Wachstumskontrollen) durchgeführt. Bevor die behandelten Biofilme fixiert wurden, wurden mittels physiologischer Kochsalzlösung von den Böden der Nöpfchen gelöst und darin resuspendiert. Von diesen Bakteriensuspensionen wurden dann Proben auf Mueller – Hinton – 2 – Agarplatten aufgetropft. Als Referenz für die Wachstumskontrolle dienten jeweils eine Bakteriensuspension eines unbehandelten Bakteriums und ein Leerwert, die auch auf den Platten mitgeführt wurden. Die Platten wurden für 44 – 48 Stunden (bei 35°C bzw. 45°C) inkubiert. Nach 44 – 48 Stunden Inkubationszeit im Brutschrank wurde die Lebendkeimzahlbestimmung von allen Kolonien bestimmt und die Ergebnisse protokolliert.

9. Anhang:

Tabelle 10: Die OD – Werte der Biofilmdichten bei 35°C

Keim	Jahr	Station	TLV0535 mw	TLV135 mw	TLV535 mw	TLV2035 mw	BFLW35 mw	VAN0535 mw	VAN135 mw	VAN535 mw	VAN2035 mw	BFLW35 mwa	QTLV0535 mw	QTLV135 mw	QTLV535 mw	QTLV2035 mw	QVAN0535 mw	QVAN135 mw	QVAN535 mw	QVAN2035 mw
6568	2007	18E	0,493	0,553	0,63	1,002	0,579	1,340	1,122	1,486	0,897	0,766	0,851	0,955	1,088	1,731	1,750	1,465	1,940	1,171
7947	2007	18B	1,081	0,328	0,659	1,239	0,984	1,684	1,648	1,755	1,478	0,534	1,099	0,333	0,670	1,259	3,157	3,089	3,289	2,770
9628	2007	OrthoAmb	1,181	1,589	1,448	1,188	1,227	1,636	1,576	1,887	1,721	0,787	0,963	1,295	1,180	0,968	2,080	2,004	2,399	2,189
10241	2007		0,654	1,04	1,381	0,962	0,684	1,617	1,629	1,725	1,749	0,507	0,956	1,520	2,019	1,406	3,190	3,214	3,402	3,450
10303	2007	OrthoAmb	0,423	1,344	1,07	1,095	0,927	1,451	1,69	1,381	1,486	1,299	0,456	1,450	1,154	1,181	1,117	1,301	1,063	1,144
10863	2007		1,23	1,258	0,997	0,55	0,538	1,463	1,768	1,296	1,502	1,155	2,286	2,338	1,853	1,022	1,267	1,530	1,122	1,300
10937	2007	19B	1,347	1,261	1,431	1,342	1,347	1,683	1,798	1,890	1,763	1,002	1,000	0,936	1,062	0,996	1,679	1,794	1,886	1,759
10958	2007	OrthoAmb	0,76	1,116	1,023	1,228	0,592	1,486	1,188	1,327	1,441	1,259	1,284	1,885	1,727	2,074	1,180	0,943	1,054	1,145
11100	2007	18E	0,83	1,327	1,451	1,339	1,522	1,711	1,793	1,829	1,769	1,349	0,545	0,872	0,953	0,880	1,269	1,330	1,356	1,312
11431	2007	OrthoAmb	0,937	1,037	1,005	0,929	0,738	1,607	1,267	1,555	1,519	1,330	1,270	1,405	1,362	1,259	1,208	0,953	1,169	1,142
7272	2007	18C	1,246	1,234	1,336	1,234	0,571	2,103	2,086	1,907	1,797	1,991	2,184	2,163	2,342	2,163	1,056	1,048	0,958	0,903
8160	2007	OrthoAmb	1,257	0,917	0,614	0,427	0,487	1,582	1,488	1,473	1,778	1,646	2,583	1,884	1,261	0,877	0,962	0,904	0,895	1,081
10226	2007	18B	0,893	0,815	0,877	0,507	0,512	1,017	1,322	1,492	1,442	0,572	1,743	1,591	1,712	0,990	1,777	2,310	2,607	2,519
11969	2007	OrthoAmb	0,519	0,515	0,732	0,728	0,723	2,254	2,282	2,164	2,461	0,251	0,717	0,712	1,012	1,007	8,995	9,107	8,635	9,821
13758	2007	18E	0,625	0,758	0,695	0,404	0,264	0,646	0,703	0,718	0,965	0,357	2,367	2,873	2,633	1,530	1,810	1,970	2,012	2,706
13231	2007	18E	0,65	0,623	0,359	0,251	0,446	0,566	0,936	0,853	0,720	0,595	1,459	1,399	0,807	0,563	0,951	1,572	1,433	1,209
14198	2007	18C	1,222	1,053	0,496	0,462	0,458	1,751	1,666	1,655	1,733	1,162	2,668	2,300	1,084	1,008	1,507	1,434	1,424	1,492
14728	2007	UCH 19D	0,779	0,691	0,806	0,503	0,358	1,540	1,540	1,388	1,538	0,722	2,174	1,930	2,249	1,405	2,132	2,133	1,923	2,130
15054	2007	OrthoAmb	0,733	0,595	0,841	0,383	0,456	1,375	1,578	1,351	1,384	1,082	1,606	1,304	1,844	0,840	1,271	1,458	1,248	1,278
15437	2007	Ortho T.O.	1,055	0,724	0,355	0,182	0,45	1,332	1,541	1,534	1,359	0,980	2,344	1,608	0,789	0,404	1,359	1,571	1,564	1,387
ATCC 29213			1,862	1,759	1,356	1,798	1,211	1,852	1,96	1,761	1,739	1,732	1,537	1,452	1,120	1,485	1,069	1,132	1,017	1,004
203	2010	IM I, Hämat. 18I	0,984	1,001	1,164	1,406	1,107	1,434	1,842	1,296	2,095	1,659	0,889	0,905	1,052	1,271	0,864	1,110	0,781	1,263
856	2010	Ortho Allg.Amb.	1,804	1,682	1,751	1,78	1,660	2,037	1,699	1,995	2,058	2,059	1,087	1,014	1,055	1,072	0,989	0,825	0,969	0,999
1134	2010	UCH 19B	1,831	1,652	1,595	1,004	1,502	1,866	1,468	1,620	1,310	1,568	1,219	1,100	1,062	0,668	1,190	0,936	1,033	0,836
1773	2010	Ortho 18B	0,867	1,150	1,039	0,743	1,201	1,920	1,875	1,934	2,224	1,525	0,722	0,958	0,865	0,619	1,259	1,230	1,269	1,459
4422	2010	Derma Amb	1,367	1,862	1,637	1,606	1,522	1,416	1,759	1,761	1,765	1,631	0,899	1,223	1,076	1,055	0,868	1,078	1,079	1,082
4498	2010	OrthoAmb	1,174	1,225	0,899	0,777	0,952	1,602	1,645	1,568	1,605	1,158	1,233	1,286	0,944	0,816	1,384	1,420	1,354	1,386
6908	2010	Ortho 18E	1,107	1,201	1,097	1,909	1,635	1,810	1,487	1,751	1,511	1,342	0,677	0,734	0,671	1,167	1,349	1,108	1,305	1,126
7649	2010	Ortho 18C	1,712	2,063	1,671	1,452	1,266	1,573	2,135	2,013	1,616	1,203	1,352	1,630	1,320	1,147	1,307	1,775	1,674	1,343
15538	2010	Ortho Allg.Amb.	0,728	1,152	0,891	0,473	0,654	1,405	1,466	1,461	1,470	0,723	1,114	1,762	1,362	0,723	1,943	2,027	2,020	2,032
15873	2010	Ortho Allg.Amb.	1,168	1,100	0,732	0,483	0,745	1,414	1,424	1,376	1,229	0,842	1,568	1,476	0,982	0,648	1,680	1,693	1,635	1,461
ATCC 29213			1,971	1,210	1,575	1,05	0,788	1,548	1,453	1,418	1,722	0,773	2,502	1,535	1,999	1,332	2,003	1,879	1,834	2,228

Tabella 11: Die OD – Werte der Biofilmdichten bei 45°C.

Keim	Jahr	Station	TLV0,545 mw	TLV145 mw	TLV545 mw	TLV2045 mw	BFLW45 mw	VAN0,545 mw	VAN145 mw	VAN545 mw	VAN2045 mw	BFLW45 mw	QTLV0,545 mw	QTLV145 mw	QTLV545 mw	QTLV2045 mw	QVAN0,545 mw	QVAN145 mw	QVAN545 mw	QVAN2045 mw
6568	2007	18E	0,330	0,250	0,353	0,325	0,319	0,719	0,849	0,693	0,609	0,446	1,035	0,784	1,108	1,020	1,613	1,904	1,554	1,367
7947	2007	18B	0,891	0,760	0,549	0,527	0,218	1,498	1,613	1,497	0,769	0,194	4,082	3,478	2,515	2,414	7,713	8,305	7,706	3,959
9628	2007	OrthoAmb	0,197	0,319	0,237	0,214	0,657	0,317	0,346	0,393	0,330	0,337	0,300	0,486	0,361	0,326	0,940	1,027	1,164	0,977
10241	2007		0,736	0,688	0,529	0,491	0,306	0,927	0,769	0,788	0,726	0,500	2,408	2,251	1,732	1,605	1,853	1,538	1,575	1,451
10303	2007	OrthoAmb	0,498	0,274	0,321	0,514	0,647	0,522	0,659	0,596	0,590	0,567	0,770	0,424	0,496	0,796	0,921	1,164	1,052	1,041
10863	2007		0,792	0,614	0,627	0,587	0,158	0,886	0,959	0,991	0,801	0,149	5,023	3,893	3,981	3,725	5,953	6,448	6,663	5,383
10937	2007	19B	1,164	1,168	1,108	1,166	0,499	0,177	0,381	0,386	0,451	0,447	2,334	2,342	2,222	2,337	0,396	0,853	0,864	1,009
10958	2007	OrthoAmb	0,918	0,708	0,991	0,687	0,344	0,301	0,524	0,347	0,250	0,357	2,668	2,056	2,880	1,995	0,843	1,467	0,971	0,699
11100	2007	18E	1,093	0,999	0,977	0,811	1,078	1,365	1,180	1,164	0,876	0,875	1,013	0,927	0,906	0,752	1,559	1,348	1,330	1,001
11431	2007	OrthoAmb	1,276	1,093	0,593	0,598	0,162	0,848	0,890	0,597	0,633	0,333	7,855	6,728	3,651	3,682	2,549	2,675	1,794	1,901
7272	2007	18C	0,272	0,265	0,306	0,233	0,135	1,056	1,003	0,957	0,538	0,294	2,009	1,957	2,266	1,726	3,590	3,410	3,254	1,829
8160	2007	OrthoAmb	0,237	0,277	0,287	0,282	0,051	0,326	0,182	0,197	0,174	0,161	4,615	5,393	5,588	5,494	2,027	1,133	1,225	1,080
10226	2007	18B	0,216	0,230	0,245	0,234	0,061	0,162	0,591	0,598	0,515	0,207	3,515	3,738	3,990	3,811	0,783	2,849	2,883	2,481
11969	2007	OrthoAmb	0,274	0,251	0,265	0,274	0,048	0,489	0,262	0,540	0,448	0,136	5,680	5,199	5,494	5,689	3,609	1,934	3,982	3,305
13758	2007	18E	0,521	0,331	0,345	0,290	0,276	0,582	0,479	0,564	0,419	0,383	1,889	1,201	1,250	1,051	1,517	1,250	1,471	1,093
13231	2007	18E	0,280	0,277	0,329	0,369	0,065	0,393	0,558	0,384	0,347	0,139	4,324	4,281	5,071	5,701	2,834	4,023	2,765	2,497
14198	2007	18C	0,967	0,950	0,799	0,657	0,661	1,232	1,308	1,148	0,719	0,902	1,462	1,437	1,208	0,993	1,366	1,451	1,273	0,797
14728	2007	UCH 19D	0,210	0,239	0,211	0,203	0,058	0,352	0,325	0,281	0,256	0,111	3,592	4,096	3,616	3,469	3,163	2,921	2,524	2,300
15054	2007	OrthoAmb	0,167	0,247	0,271	0,296	0,087	0,644	0,466	0,529	0,564	0,313	1,922	2,844	3,110	3,398	2,057	1,490	1,691	1,803
15437	2007	Ortho T.O.	0,310	0,278	0,320	0,27	0,056	0,379	0,442	0,337	0,473	0,219	5,523	4,940	5,701	4,804	1,728	2,015	1,536	2,157
ATCC 29213			0,149	0,246	0,247	0,302	0,163	0,210	0,251	0,364	0,283	0,113	0,913	1,510	1,513	1,852	1,863	2,225	3,230	2,507
203	2010	IM I, Hämat.18l	0,318	0,416	0,497	0,482	0,292	0,54	0,399	0,452	0,414	0,368	1,090	1,425	1,700	1,649	1,468	1,086	1,228	1,126
856	2010	Ortho Allg.Amb.	0,877	0,660	0,821	0,709	0,196	1,218	1,191	1,110	0,804	0,665	4,486	3,376	4,196	3,626	1,832	1,792	1,670	1,210
1134	2010	UCH 19B	0,326	0,380	0,328	0,287	0,158	0,352	0,372	0,361	0,365	0,182	2,067	2,414	2,081	1,819	1,935	2,047	1,987	2,008
1773	2010	Ortho 18B	0,581	0,505	0,520	0,485	0,146	0,509	0,746	0,488	0,368	0,616	3,967	3,452	3,551	3,311	0,825	1,210	0,791	0,597
4422	2010	Derma Amb	1,478	1,220	0,582	0,644	0,590	1,256	1,096	0,927	0,979	0,969	2,507	2,069	0,987	1,092	1,297	1,131	0,957	1,011
4498	2010	OrthoAmb	0,382	0,407	0,396	0,384	0,055	0,503	0,55	0,333	0,341	0,163	6,993	7,447	7,260	7,029	3,083	3,374	2,042	2,093
6908	2010	Ortho 18E	0,269	0,385	0,369	0,358	0,382	0,256	0,341	0,340	0,357	0,101	0,704	1,008	0,967	0,938	2,541	3,390	3,380	3,551
7649	2010	Ortho 18C	0,366	0,364	0,365	0,378	0,087	0,302	0,333	0,368	0,414	0,143	4,226	4,201	4,212	4,365	2,116	2,338	2,583	2,902
15538	2010	Ortho Allg.Amb.	0,197	0,338	0,399	0,381	0,118	0,235	0,514	0,319	0,362	0,085	1,677	2,871	3,395	3,240	2,769	6,059	3,759	4,269
15873	2010	Ortho Allg.Amb.	0,333	0,387	0,390	0,321	0,077	0,301	0,515	0,302	0,271	0,076	4,307	5,003	5,041	4,152	3,958	6,771	3,976	3,563
ATCC 29213			0,332	0,386	0,423	0,379	0,194	0,598	0,563	0,569	0,397	0,339	1,713	1,989	2,180	1,955	1,762	1,659	1,676	1,169

Tabelle 11: Ergebnisse der Wachstumskontrollen der Keime, inokuliert mit Telavancinkonzentrationen bei 35°C

Verdünn.	10 ⁻⁸					10 ⁻⁹					10 ⁻¹⁰					
	Keim	TLV0,5	TLV1	TLV5	TLV20	BF	TLV0,5	TLV1	TLV5	TLV20	BF	TLV0,5	TLV1	TLV5	TLV20	BF
6568	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	2,3E+13	2,20E+13	2E+13	2,1E+13	1,00E+15
7947	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15
9628	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,30E+11	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1E+12	1,2E+12	1,00E+15	1,6E+13	1,00E+15	9E+12	1,2E+13	
10241	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	
10303	1,00E+15	1,00E+15	1,70E+11	1,50E+11	1,00E+15	1E+12	1,4E+12	1,10E+12	1E+12	1,00E+15	7E+12	9,00E+12	8,00E+12	7E+12	1,9E+13	
10863	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,40E+13	1,40E+13	1,00E+15	
10937	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	2,20E+13	
10958	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,50E+11	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,50E+11	1,1E+12	1,00E+15	1,9E+13	1,70E+13	1,20E+13	1,00E+13	
11100	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	
11431	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	2,10E+13	1,00E+15
ATCC	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,1E+13	1,00E+15	1,00E+15
7272	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	2,30E+11	3,20E+11	3,6E+12	2,80E+12	2,1E+12	1,6E+12	2,4E+12	
8160	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	1,40E+10	1,00E+14	1,60E+11	1,40E+11	1,30E+11	9,00E+10	1,00E+14	9,00E+11	1,00E+12	8,00E+11	7,00E+11	1,00E+14	
10226	1,00E+14	1,00E+14	1,40E+10	1,20E+10	1,70E+10	1,8E+11	2E+11	1,7E+11	1,3E+11	1,7E+11	8E+11	7E+11	9E+11	6E+11	7E+11	
11969	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	1,40E+10	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	1,9E+11	7,00E+10	1,00E+14	1,00E+14	2,6E+12	1,5E+12	4E+11	2,6E+12	
13758	2,10E+10	1,60E+10	1,00E+10	3,00E+09	9,00E+09	9,00E+10	7,00E+10	5,00E+10	2,00E+10	5,00E+10	3E+11	3,00E+11	1,00E+11	6,00E+10	1,8E+11	
13231	4,00E+09	2,00E+09	8,00E+08	0	2,80E+09	1,80E+10	1,20E+10	4,00E+09	0	2,40E+10	1,2E+11	8,00E+10	2,00E+10	0,00E+00	1,6E+11	

14198	1,30E+10	7,00E+09	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	6,00E+10	4,00E+10	1,2E+11	1,00E+14	1,00E+14	3E+11	2,2E+11	6E+11	1,7E+12	9,00E+11
14728	1E+10	1,1E+10	1,4E+10	8E+09	9,00E+09	6E+10	5E+10	9E+10	5,00E+10	8E+10	4E+11	4E+11	5,00E+11	3,00E+11	5,00E+11
15054	1,00E+14	3,20E+11	3,40E+11	1,10E+11	1,00E+14	2,10E+11	1,90E+11	1,90E+11	9,00E+10	1,00E+14	1,30E+12	1,10E+12	1,00E+12	6,00E+11	2,70E+12
15437	7E+09	1,00E+14	1,3E+10	1,6E+10	1,4E+10	5E+10	2,1E+11	1E+11	2,2E+10	1,2E+11	3E+11	1,1E+12	7E+11	2,20E+11	1E+12
ATCC	1,1E+10	1,00E+14	7E+09	1,00E+14	1,00E+14	7E+10	1,00E+14	5E+10	1,00E+14	1,00E+14	4E+11	1,00E+14	4,2E+11	1,1E+12	1,00E+14
203	1,00E+14	1,7E+12	1,20E+12	1,00E+14	1,5E+12	1,00E+14									
856	1,00E+14	1,40E+12	1,00E+14												
1134	1,00E+14	1,00E+14	8,00E+09	7,00E+09	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	5E+10	5E+10	1,00E+14	1,7E+12	1,1E+12	3E+11	5E+11	1,00E+14
1773	1,00E+14	1,4E+12	1,3E+12	1,00E+14	1,00E+14										
4422	1,00E+14	9E+11	9,00E+11	8,00E+11	1,40E+12	1E+12									
4498	2,00E+10	1,50E+10	2,10E+10	4,2E+09	1,00E+14	1,20E+11	1,10E+11	8,00E+10	3,6E+10	1,00E+14	9E+11	9,00E+11	3,00E+11	2,20E+11	2,4E+12
6908	1,00E+14														
7649	9E+09	1,6E+10	9E+09	1E+10	1,40E+10	2,4E+10	2E+10	2E+10	1,40E+10	1,4E+11	1,2E+11	1,1E+12	6,00E+11	4,00E+11	1,30E+12
15538	1,00E+14	2,1E+11	1,4E+11	1,00E+14	1,3E+12	1,1E+12	8E+11	6E+11	1,6E+12						
15873	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	2E+09	1,00E+14	1,6E+11	1,00E+14	1,00E+14	1,2E+10	1,00E+14	7E+11	2,1E+12	1E+12	1,00E+11	1,4E+12
ATCC	1,00E+14	1,6E+12	1,3E+12	1,00E+14											

Tabelle 12: Ergebnisse der Wachstumskontrollen der Keime, inokuliert mit Vancomycinkonzentrationen bei 35°C.

Verdünn.	10 ⁻⁸					10 ⁻⁹					10 ⁻¹⁰				
	VAN0,5	VAN1	VAN5	VAN20	BF	VAN0,5	VAN1	VAN5	VAN20	BF	VAN0,5	VAN1	VAN5	VAN20	BF
6568	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,60E+11	1,90E+11	1,00E+15	2,30E+12	1,00E+15	1,20E+12	1,40E+12	1,00E+15	1,50E+13	1,00E+15	8E+12	1E+13
7947	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	2,20E+12	1,00E+15	1,00E+15	1,90E+13	1,00E+15	8,00E+12	1,10E+13	2,10E+13
9628	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,1E+12	1,7E+12	1,00E+15	1,00E+15	1,2E+13	5E+12	8E+12	1,2E+13	1,3E+13
10241	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	2,7E+13	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15
10303	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	2,30E+12	1,7E+13	1,00E+15	1,00E+15	1,50E+13	1,6E+13
10863	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,4E+12	1,90E+12	1,00E+15	1,10E+13	1,60E+13	9,00E+12	1,1E+13
10937	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,6E+12	1,00E+15	1,4E+13	1,4E+13	1,2E+13	1E+13	1,10E+13
10958	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,4E+13	1,3E+13	1,60E+13	1,90E+13	1,90E+13
11100	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,4E+13	1,00E+15	1,3E+13
11431	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,6E+12	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,2E+13	1,00E+15	1,3E+13	1,80E+13	1,00E+15
ATCC	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,6E+13	1,00E+15	1,00E+15
7272	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	2,70E+13	2,6E+13	1,00E+15	2,9E+13
8160	3,20E+11	3,30E+11	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	2,80E+12	2,70E+12	1,00E+15	3,30E+12	3,00E+12	1,60E+13	1,80E+13	3,20E+13	2,70E+13	2,40E+13
10226	1,2E+11	9E+10	1,00E+11	2,10E+11	1,00E+11	1,1E+12	1,7E+12	1,1E+12	1,1E+12	8E+11	9E+12	1,2E+13	6E+12	5E+12	6E+12
11969	2,9E+11	2,9E+11	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,9E+12	2,5E+12	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,5E+13	2,1E+13	2,2E+13	2,4E+13	1,00E+15
13758	1,60E+11	7,00E+10	7,00E+10	1,00E+11	1,60E+11	1,40E+12	6,00E+11	5,00E+11	5,00E+11	1,40E+12	1E+13	3,00E+12	3,00E+12	4,00E+12	1,2E+13

13231	2,20E+11	4,00E+10	9,00E+10	3E+10	8,00E+10	1,70E+12	2,00E+11	8,00E+11	2E+11	6,00E+11	1,1E+13	1,00E+12	5,00E+12	1,00E+12	4E+12
14198	1,00E+15	2,30E+11	2,5E+11	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	2,10E+12	2E+12	2,3E+12	1,00E+15	2,4E+13	1,7E+13	1,2E+13	1,4E+13	1,00E+15
14728	1,00E+15	2,60E+12	1,00E+15	1,00E+15	2,5E+13	2,90E+13	1,80E+13	3,20E+13							
15054	1,00E+15	2,2E+11	5E+10	1,5E+10	3E+10	2,3E+12	1,9E+12	3E+11	1E+11	2E+11	1,4E+13	1,3E+13	1,5E+12	5E+11	1E+12
15437	1,00E+15	3E+13	1,00E+15	3,3E+13	2,80E+13	1,00E+15									
ATCC	1,00E+15	1,7E+12	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1,00E+15	1E+13	1,00E+15	1,00E+15						
203	1,00E+14	2,4E+12	1,00E+14												
856	1,00E+14	2,00E+12	1,70E+12	1,00E+14	1,00E+14										
1134	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	1,1E+11	1,1E+11	1,3E+11	1E+11	1,00E+14	9E+11	8E+11	9E+11	7E+11	1,8E+12
1773	1,00E+14	2,60E+11	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	2,2E+12	1,00E+14							
4422	1,00E+14														
4498	2,20E+10	2,00E+10	1,90E+10	1,8E+10	3,20E+10	1,10E+11	1,20E+11	1,50E+11	1E+11	2,30E+11	2,2E+11	8,00E+11	1,10E+12	6,00E+11	1,3E+12
6908	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	1,2E+10	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	7E+10	1,00E+14	2,3E+12	2,2E+12	1,6E+12	5E+11	2,70E+12
7649	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	1,5E+10	1,00E+14	1,6E+11	1,7E+11	1,1E+11	9,00E+10	1,6E+11	7E+11	8E+11	6,00E+11	5,00E+11	7,00E+11
15538	1,00E+14	1,8E+11	1,2E+11	2,1E+11	8E+11	1,1E+12	6E+11	5E+11	1E+12						
15873	1,00E+14	1,70E+12	2,3E+12												
ATCC	1,00E+14	1,4E+12	1,00E+14												

Tabelle 13: Ergebnisse der Wachstumskontrollen der Keime, inokuliert mit Telavancinkonzentrationen bei 45°C.

Verdünn.	10 ⁻⁸					10 ⁻⁹					10 ⁻¹⁰				
	Keim	TLV0,5	TLV1	TLV5	TLV20	BF	TLV0,5	TLV1	TLV5	TLV20	BF	TLV0,5	TLV1	TLV5	TLV20
6568	1,00E+14	6,60E+10	7,80E+10	1,40E+10	1,00E+14	6,60E+11	2,60E+11	4,00E+11	8,00E+10	1,00E+14	4,8E+12	2,20E+12	3,6E+12	2E+11	6,00E+00
7947	1,00E+14	7,20E+10	7,60E+10	6,40E+10	1,00E+14	7,40E+11	5,00E+11	5,40E+11	5,60E+11	1,00E+14	4,80E+12	4,40E+12	4,20E+12	3,20E+12	8,80E+12
9628	8,20E+10	8,00E+10	8,80E+10	3,00E+10	1,00E+14	6,00E+11	7,60E+11	8,00E+11	2,2E+11	1,00E+14	2,40E+12	3,2E+12	6,40E+12	1,8E+12	8,4E+12
10241	9,00E+10	9,80E+10	3,80E+10	6,60E+10	1,00E+14	7,20E+11	8,00E+11	3,20E+11	4,80E+11	1,00E+14	6,00E+12	6,80E+12	2,40E+12	2,80E+12	8,80E+12
10303	2,80E+10	1,00E+10	8,00E+09	6,00E+09	3,00E+10	2,6E+11	6E+10	8,00E+10	4E+10	2,80E+11	2E+12	6,00E+11	4,00E+11	2E+11	1,2E+12
10863	3,60E+10	1,40E+10	6,00E+09	4,00E+09	2,60E+10	3,20E+11	1,20E+11	4,00E+10	2,00E+10	2,20E+11	1,20E+12	8,00E+11	2,00E+11	2,00E+11	1,80E+12
10937	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	8,40E+11	6,20E+11	8,00E+11	7,60E+11	7,20E+11	6,00E+12	2,40E+12	6,00E+12	2,20E+12	4,20E+12
10958	8,00E+09	6,00E+09	1,20E+10	8,00E+09	1,00E+10	6,00E+10	6,00E+10	8,00E+10	4,00E+10	1E+11	2,00E+11	4E+11	4,00E+11	2,00E+11	6,00E+11
11100	7,60E+10	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	9,40E+10	5,20E+11	1,00E+14	9,20E+11	9,60E+11	6,40E+11	2,80E+12	7,60E+12	5,20E+12	5,20E+12	4,80E+12
11431	8,40E+10	7,20E+10	5,80E+10	1,20E+10	8,60E+10	6,20E+11	5,00E+11	3,00E+11	6,00E+10	7,60E+11	3,20E+12	2,00E+12	1,20E+12	2,00E+11	2,60E+12
ATCC	4,40E+10	3,80E+10	2,60E+10	7,20E+10	1,00E+14	4,20E+11	2,60E+11	2,20E+11	4,20E+11	9,20E+11	3,20E+12	1,20E+12	8E+11	4,00E+12	6,80E+12
7272	4,00E+09	1,00E+10	2,00E+09	0	1,38E+11	0	8,00E+10	2,00E+10	0	1,28E+12	0	2,00E+11	0	0	8E+12
8160	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10226	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11969	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

13758	2,00E+10	0	0	0	4,00E+09	0	0	0	0	2,00E+10	0	0	0	0	2E+11
13231	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14198	0	0	2,00E+09	0	3,20E+10	4,00E+10	2,00E+10	0	4,00E+10	1,80E+11	4E+11	0	2E+11	0	1,60E+12
14728	0	0	0	0	2,20E+10	0	0	0	0	1,8E+11	0	0	0	0	1,20E+12
15054	0	0	0	0	0	2,00E+10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15437	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2E+11	0	0	0	0
ATCC	0	0	0	0	1,56E+11	0	0	0	0	1,24E+12	0	0	0	4E+11	8,80E+12
203	0	0	0	0	1,04E+11	0	0	0	0	7,40E+11	0	0	0	0	6,00E+12
856	5,40E+10	5,60E+10	5,40E+10	4,00E+10	1,74E+11	3,60E+11	5,80E+11	6,20E+11	3,40E+11	1,58E+12	5,20E+12	3,60E+12	3,80E+12	2,80E+12	1,36E+13
1134	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1773	8,00E+09	8,00E+09	1,20E+10	0	1,80E+10	2,00E+10	6,00E+10	4,00E+10	0	1,60E+11	2,00E+11	1,00E+12	1,00E+12	0	8,00E+11
4422	1,24E+11	6,80E+10	4,40E+10	2,40E+10	8,60E+10	9,60E+11	3,00E+11	2,60E+11	1,00E+11	5,80E+11	8,80E+12	2,20E+12	2,60E+12	8,00E+11	3,40E+12
4498	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6908	0	0	0	0	1,20E+10	0	0	0	0	1,60E+11	0	0	0	0	2,00E+11
7649	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15538	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15873	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ATCC	2,40E+10	2,60E+10	4,00E+09	0	2,20E+10	2,00E+11	8,00E+10	2,00E+10	0	1,20E+11	1,60E+12	2,20E+12	2,00E+11	0	1,00E+12

Tabelle 14: Ergebnisse der Wachstumskontrollen der Keime, inokuliert mit Vancomycinkonzentrationen bei 45°C.

Verdünn.	10 ⁻⁸					10 ⁻⁹					10 ⁻¹⁰				
	VAN0,5	VAN1	VAN5	VAN20	BF	VAN0,5	VAN1	VAN5	VAN20	BF	VAN0,5	VAN1	VAN5	VAN20	BF
6568	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	1,80E+10	1,00E+14	7,60E+11	1,00E+14	1,00E+14	1,40E+11	1,00E+14	5,40E+12	8,60E+12	6,40E+12	1E+12	1,00E+14
7947	9,80E+10	1,00E+14	1,00E+14	1,60E+10	1,00E+14	8,40E+11	1,00E+14	7,60E+11	1,20E+11	1,00E+14	3,40E+12	1,08E+13	5,80E+12	4,00E+11	8,60E+12
9628	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	3,40E+10	1,00E+14	1,00E+14	9,8E+11	9,20E+11	3,00E+11	1,08E+13	9,6E+12	6,4E+12	6,6E+12	1,6E+12
10241	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	1,22E+12	1,02E+12	1,00E+14	8,60E+12	9,8E+12	1,04E+13	8,40E+12	1,00E+14
10303	6,60E+10	8,00E+09	2,20E+10	1,00E+14	3,40E+10	3,20E+11	8,00E+10	1,60E+11	8,80E+11	2,00E+11	2,8E+12	6,00E+11	1,20E+12	8,40E+12	1,6E+12
10863	7,60E+10	8,40E+10	1,00E+14	3,20E+10	1,00E+14	6,40E+11	6,20E+11	9,40E+11	3E+11	9,20E+11	5,40E+12	4,80E+12	7,80E+12	2,40E+12	8,6E+12
10937	1,80E+10	1,40E+10	1,20E+10	1,40E+10	3,00E+10	1,40E+11	1,00E+11	1,20E+11	8E+10	2,00E+11	4E+11	2E+11	6E+11	2E+11	4,00E+11
10958	8,40E+10	9,20E+10	6,80E+10	1,20E+10	2,60E+10	6,40E+11	8,60E+11	4,20E+11	8,00E+10	1,40E+11	5,6E+12	6,4E+12	2,20E+12	6,00E+11	8,00E+11
11100	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	1,00E+14	1,08E+12	1,12E+12	1,34E+12	7,80E+11	9,40E+11	7,20E+12	7,60E+12	9,8E+12	4,20E+12	4,6E+12
11431	4,20E+10	5,60E+10	6,20E+10	1,80E+10	2,40E+10	2,8E+11	3,60E+11	4,00E+11	1,20E+11	1,80E+11	1,6E+12	3,00E+12	1,6E+12	8,00E+11	1,40E+12
ATCC	5,80E+10	3,00E+10	1,40E+10	1,20E+10	1,00E+10	4,20E+11	2,60E+11	6,00E+10	8,00E+10	1,00E+11	3,00E+12	1,80E+12	4E+11	8,00E+11	6,00E+11
7272	2,20E+10	1,20E+10	1,40E+10	0	4,80E+10	1,80E+11	2,00E+10	8,00E+10	0	3,20E+11	6E+11	4,00E+11	1,4E+12	0	2,2E+12
8160	0	2,00E+09	0	0	0	0	6,00E+10	0	0	0	0	4,00E+11	0	0	0
10226	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11969	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13758	1,20E+10	4,00E+09	3,20E+10	0	6,00E+09	4,00E+10	4,00E+10	3,80E+11	0	4,00E+10	4E+11	2,00E+11	1,00E+12	0	4E+11

13231	0	2,00E+09	0	0	0	0	2,00E+10	0	0	0	0	2,00E+11	0	0	0
14198	6,40E+10	6,80E+10	2,80E+10	1,20E+10	4,20E+10	5,80E+11	4,20E+11	2,4E+11	4,00E+10	2,80E+11	2,6E+12	1,4E+12	2E+12	2E+11	1,00E+12
14728	0	0	0	0	0	2E+10	0	0	0	0	0	2E+11	0	0	0
15054	2,00E+09	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15437	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
203	2,40E+10	1,80E+10	2,60E+10	0	8,60E+10	4,00E+10	1,20E+11	1,00E+11	0	5,20E+11	6,00E+11	1,20E+12	1,80E+12	0	2,80E+12
856	1,00E+14	1,78E+11	1,96E+11	4,40E+10	1,52E+11	2,12E+12	1,66E+12	1,72E+12	5,40E+11	1,06E+12	1,96E+13	1,34E+13	1,44E+13	1,80E+12	8,00E+12
1134	0	1,80E+10	0	0	2,00E+09	0	1,4E+11	0	0	2,00E+10	0	6E+11	0	0	2E+11
1773	0	6,00E+09	8,00E+09	3,80E+10	2,60E+10	0	8,00E+10	2,80E+11	2,40E+11	5,20E+11	0	6,00E+11	2,20E+12	3E+12	4,60E+12
4422	0	0	6,00E+09	0	1,28E+11	0	0	1,00E+11	0	9,80E+11	0	0	2,00E+11	0	6,40E+12
4498	4,20E+10	2,20E+10	0	0	4,00E+09	1,80E+11	1,80E+11	0	0	2,00E+10	0	8,00E+11	0	0	4E+11
6908	0	4,00E+09	0	0	0	0	1,00E+11	0	0	0	0	6E+11	0	0	0
7649	0	3,60E+10	0	0	0	0	4E+11	0	0	0	0	3E+12	0	0	0
15538	1,64E+11	5,40E+10	0	0	0	1,36E+12	3,60E+11	0	0	0	8,4E+12	2E+12	0	0	0
15873	0	3,00E+10	0	0	0	0	3,80E+11	0	0	0	0	4,80E+12	0	0	0
ATCC	0	0	1,60E+10	3,80E+10	8,60E+10	0	0	1,00E+11	3,60E+11	5,20E+11	0	0	1,00E+12	1,8E+12	4,20E+12

Danksagung

Zu Beginn ein großes Dankeschön gilt Herr Univ. Doz. Dr. Hans-Jürgen Busse, der das Zustandekommen meiner Diplomarbeit ermöglichte. Ihm habe ich die korrekte Interpretation meiner Ergebnisse zu verdanken und er stand mir jederzeit mit Rat und Tat zu Seite.

Ein Dankeschön gilt auch Frau Prof. Dr. Elisabeth Presterl für die Möglichkeit die mir gegeben hat, im Labor der Klinischen Abteilung für Infektionen und Tropenmedizin meine Versuche durchzuführen.

Besonderen Dank gilt Frau Sonja Reichmann, die immer bereit war bei den Labortätigkeiten meine Arbeit zu erleichtern. Ohne sie die Durchführung der nötigen Arbeitsschritte im Labor hätte viel länger gedauert.

Weiters bin ich Frau Ao. Univ. Prof. Dr. Angela Witte zu Dank verpflichtet. Ihre Empfehlungen waren sehr Wertvoll für mich, besonders bei administrativen Sachen.

Ich möchte ganz herzlich meine Frau und meinen Kindern bedanken für die Unterstützung und Motivation die sie mir die ganze Zeit gegeben haben.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name Jollmas Halimi
Wohnort Laaerbergstraße 3/9, 1100 Wien
Geburtsdatum 26.09.1976
Geburtsort Blaç, Kosovo
Familienstand verheiratet mit Irena Halimi
3 Söhne: Arian, Gentian und Erjon

Schulbildung

Grundschule 09/1983-06/1991
Gymnasium 09/1991-06/1995
Studium Biochemie, Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Tirana
Beginn: 08/1995; Abschluss: 02/2000
Genetik-Mikrobiologie, Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität
Wien, Beginn; Wintersemester 2006

Sprachen Albanisch, Deutsch, Englisch

Beruflicher Werdegang

12.09.2002 bis 24.09.2004 bei **Wojnar's Wiener Leckerbissen** in der Qualitätskontrolle als
Laborleitungsstellvertreter beschäftigt.

Seit 07.11.2005 bei **Globopharm** in der Qualitätskontrolle (chemische Analyse der
Rohstoffe) beschäftigt.