

FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT

FLI

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

DER LABLOEFFLER NEWS für das LABOR

Heft 2 2022, Nr. 25



10. RIEMSER DIAGNOSTIKTAGE

Bakteriophagen und ihre Wirksamkeit – ein potenzielles Tool gegen die Antibiotikaresistenz bei Haustieren?

Eva Maria Kalbhenn, Katja-Sophia Klein, Wolfgang Beyer und Elisabeth Müller

Phagenzentrum, LABOKLIN GmbH & Co. KG, Steubenstraße 4, 97688 Bad Kissingen



Eva Maria Kalbhenn
(© privat)

Viren sind die häufigste auf unserem Planeten vorkommende biologische Entität. Angaben zur Häufigkeit schwanken zwischen 10^{31} und 10^{32} virusähnlichen Partikeln. Nach heutigem Wissen sind Bakteriophagen – oder kurz Phagen – ausschließlich Bakterien und Archaeen befallende Viren und ihre Vielfalt ist schier unendlich.

Bereits im Jahre 1915 beschrieb der englische Bakteriologe Frederick W. Twort ein „ultramicroscopic virus“,

das als „transparentes Material“ Bakterien zerstören konnte, sich ohne diese aber nicht vermehren ließ und darüber hinaus in Infektionsversuchen mit Labortieren keinerlei Pathogenität aufwies (Frederick W. Twort, 1915). Zwei Jahre später nannte Felix d’Herelle (1873–1949) diese Bakterienkiller Bakteriophagen und erkannte, dass sich diese als Therapeutikum gegen Ruhr auslösende Bakterien einsetzen ließen (Felix d’Herelle, 1917). Später fand und nutzte er weitere Phagen gegen Typhus, Cholera, Pest und andere Infektionskrankheiten.

Die Vorteile der Anwendung von Bakteriophagen gegenüber Antibiotika sind (1) ihre spezies- oder isolatspezifische Wirkung (Normalflora bleibt verschont), (2) ihre Vermehrung solange der Bakterienwirt vorhanden ist und (3) die Möglichkeit der Mischung von Phagen mit verschiedenen Rezeptorspezifitäten zur Vermeidung von Resistenzbildung. Bislang wurden keine negativen Nebenwirkungen beim therapeutischen Einsatz von Phagen beschrieben.

Die zunehmende Verbreitung von pathogenen Bakterien mit multiplen Antibiotikaresistenzen (MREs) stellt ein enormes Problem für die Behandlung von bakteriellen Infektionen in der Human- und Veterinärmedizin dar. Nach Erhebungen des Europäischen Parlaments sterben gegenwärtig 25 000 Bürger pro Jahr in Europa an MREs. Diese Zahl könnte sich auf bis zu 10 Millionen Todesfälle bis 2050 steigern.

Haustiere und im Haus gehaltene Wildtiere können Träger von resistenten Zoonose-Erregern sein. Sie stellen damit ein Risiko für ihre Besitzer dar und sind gleichzeitig ein Reservoir für die Verbreitung der Resistenzen in der Umwelt. Beispiele sind Methicillin-resistente *Staphylococcus pseudintermedius* Stämme (auch bekannt als MRSP) oder Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE), (Loponte et al., 2021).

Ein wichtiger Teil des One-Health-Konzepts ist die Erhaltung der Gesundheit von Mensch, Tier und Umwelt. Das Konzept bedingt einen verantwortungsvollen Einsatz von Antibiotika. Auch für die Veterinärmedizin bedeutet das die Reduktion des Antibiotikaeinsatzes auf ein unbedingt notwendiges Maß und den Einsatz möglicher Alternativen, gemäß den Guidelines der ISCAID (International Society for Companion Animal Infectious Diseases).

Beispiele für den Einsatz von Phagen in der Veterinärmedizin zur Bekämpfung häufiger Infektionen wie z. B. Salmonellose, Campylobacteriose, *E. coli*-Infektionen bei Hühnern sowie *Bordetella*- und *Pasteurella*-Infektionen beim Schwein oder auch zur Mastitis-Behandlung von Milchrindern wurden publiziert, mit teilweise sehr unterschiedlichen Ergebnissen (Han et al., 2013; Zhang et al., 2015; Desiree et al., 2021; Loponte et al., 2021).

Phagen zur Anwendung in der Therapie sollten grundsätzlich

- in der Lage sein, ihren Zielkeim im Patienten zu erreichen,
- auf einem zur Pathophysiologie passenden Weg angewendet werden,
- hoch genug konzentriert sein und sich replizieren können,
- *in vitro* und *in vivo* stabil lytisch aktiv sein,
- ein breites Spektrum des Zielkeims lysieren,
- an möglichst unterschiedliche Rezeptorstrukturen des Zielkeims binden und
- keine „negativen“ Immunreaktionen induzieren.

Ziel unserer Studie am Phagenzentrum Laboklin war es, die *in-vitro*-Wirksamkeit verschiedener Bakteriophagen-Cocktails, welche im internationalen Handel für die Humanmedizin erhältlich sind, gegen Bakterienisolate von Haustieren aus der Routinediagnostik des Labors Laboklin GmbH & Co. KG (Bad Kissingen) zu bestimmen. Die untersuchten Proben stammen von verschiedenen Lokalisationen (Ohr, Harn, Wunde) von Pferden, Katzen und Hunden.

Die Studie konzentrierte sich auf *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Proteus* spp. sowie *Enterococcus* spp. und *Klebsiella* spp. Die Identifizierung der Bakterien-Spezies erfolgte mittels Maldi-ToF MS (Bruker Cooperation, USA), Antibiotikaresistenztests wurden mit dem Micronaut System durchgeführt und nach den Vorgaben des CLSI ausgewertet. Lediglich Stämme, die Resistenzen gegen mehr als 3 Antibiotikagruppen aufwiesen, wurden in die Testung eingeschlossen.

Für die Phagogramme standen sechs kommerziell hergestellte Bakteriophagen-Cocktails (Humanpräparate) von Eliava Biopreparations (Georgien, Tbilisi) zur Verfügung (www.phage.ge/products). Die Anfertigung von Phagogrammen (Abb.) erfolgt nach dem am Eliava-Institut etablierten Verfahren. Lysezonen wurden qualitativ bewertet. Fehlende Lyse wurde als Resistenz gegen die eingesetzten Phagen bewertet.



Abb.: Phagogramm auf *S. aureus* erstellt nach dem am Eliava-Institut etablierten Verfahren. Nummerierung beschreibt die verschiedenen getesteten Bakteriophagen-Cocktails des Eliava-Instituts. (1) Enco Bacteriophage, (2) Fersisi Bacteriophage, (3) Pyo Bacteriophage, (4) Intesti Bacteriophage, (5) Ses Bacteriophage, (6) Staph Bacteriophage. (© Phagenzentrum)

Die aktuellen Chargen der Bakteriophagen-Cocktails zeigten gegen bakterielle Isolate von Haustieren eine sehr unterschiedliche Effektivität. Eine gute Wirksamkeit von etwa 83 Prozent wurde gegen *P. aeruginosa* nachgewiesen. Geringere Wirksamkeiten von 35 Prozent wurden gegen *P. mirabilis* festgestellt. Die niedrige Wirksamkeit der

Bakteriophagen-Cocktails gegen *S. pseudintermedius* (5 Prozent), *S. felis* (30 Prozent), *K. pneumoniae* (10,5 Prozent), *K. oxytoca* (30,8 Prozent) und *K. variicola* (30,8 Prozent) war nicht überraschend, da spezifische Phagen gegen diese Erreger nicht als Bestandteil der Bakteriophagen-Cocktails angeführt waren. Die dennoch gefundenen Wirkungen beruhen wahrscheinlich auf einer spezies- bzw. gattungsübergreifenden Aktivität anderer Bakteriophagen-Bestandteile.

Weitere Arbeiten sind zwingend erforderlich, um spezifische Bakteriophagen-Cocktails mit an die endemisch bei uns vorkommenden Bakterien adaptierten Phagen zu entwickeln. Wünschenswert wären sowohl Präparate gegen aktuell auftretende monospezifische Infektionen als auch „broad spectrum“ Präparate. Diese müssen permanent aktualisierbar sein. Die aufwändige und kostenintensive Herstellung und Lizenzierung als „Medizinprodukt“ gemäß Richtlinie 2001/83/EC bzw. 2003/63/EC ist dafür ungeeignet. Künftig muss die Möglichkeit geschaffen werden, Phagenpräparate zur therapeutischen Anwendung an individuellen Patienten als Formula magistralis, also „Active Pharmaceutical Ingredient“ herzustellen und anzuwenden (Verbeke and Pirnay, 2022).

Literatur

- Desiree K, Mosimann S, Ebner P (2021). Efficacy of phage therapy in pigs: systematic review and meta-analysis. *J Anim Sci* 99. DOI: 10.1093/jas/skab157
- Felix d'Herelle (1917). On an invisible microbe antagonistic to dysentery bacilli
- Frederick W Twort (1915). An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses
- Han J E, Kim J H, Hwang S Y, Choresca C H, Shin S P, Jun J W, et al. (2013). Isolation and characterization of a Myoviridae bacteriophage against *Staphylococcus aureus* isolated from dairy cows with mastitis. *Res Vet Sci* 95, 758–763. DOI: 10.1016/j.rvsc.2013.06.001
- Loponte R, Pagnini U, Iovane G, Pisanelli G (2021). Phage Therapy in Veterinary Medicine. *Antibiotics* (Basel) 10. DOI: 10.3390/antibiotics10040421
- Verbeke G, Pirnay J-P (2022). European regulatory aspects of phage therapy: magistral phage preparations. *Curr Opin Virol* 52, 24–29. DOI: 10.1016/j.coviro.2021.11.005
- Zhang J, Li Z, Cao Z, Wang L, Li X, Li S, et al. (2015). Bacteriophages as antimicrobial agents against major pathogens in swine: a review. *J Anim Sci Biotechnol* 6, 39. DOI: 10.1186/s40104-015-0039-7