

Aus dem  
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene  
der Medizinischen Fakultät der  
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Der Einfluss verschiedener  
Oberflächenbeschichtungen von Gefäßprothesen  
auf die Biofilmbildung durch *Candida albicans***

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor medicinae**

(Dr. med.)

an der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von	Julia Reuner
geboren in	Quedlinburg
Magdeburg	2020

# DOKUMENTATIONSBLATT

## Bibliographische Beschreibung

Reuner, Julia:

Der Einfluss verschiedener Oberflächenbeschichtungen von Gefäßprothesen auf die Biofilmbildung durch *Candida albicans*. - 2020 - 76 Blatt: 21 Abbildungen, 16 Anlagen

## Kurzreferat

Gefäßprothesen finden in der Chirurgie häufig Anwendung als Gefäßersatz. Eine gefürchtete postoperative Komplikation stellt die Infektion dieser dar. Zum möglichen Erregerspektrum zählt auch der dimorphe Pilz *Candida albicans*. Die antimikrobielle Wirkung von Silber ist seit langem bekannt. Es wird deshalb auch als Beschichtung in Gefäßprothesen eingesetzt. Diese Silber-Kollagen-Prothesen werden zur Prävention oder Sanierung einer Infektion als Gefäßersatz implantiert.

Die vorliegende Arbeit erforschte die Wirkung der Silber-beschichteten Prothese auf die Adhäsion und Biofilmbildung von *Candida albicans* in unterschiedlichen Medien *in vitro*. Es kamen dabei verschiedene quantitative und bildgebende Verfahren zum Einsatz.

Es zeigte sich, dass in RPMI-Medium die von der Silber-Prothese freigesetzten Ionen wirksam gegen eine Adhäsion und nachfolgende Biofilmbildung von *Candida albicans* waren. Nach Hinzugabe von fetalem Kälberserum zur Annäherung an physiologische Bedingungen konnte ein paradoxer Effekt der vermehrten Adhäsion und Biofilminduktion im Vergleich zu einer gleichartigen Kollagenprothese ohne Silberbeschichtung beobachtet werden. Wir postulierten anhand unserer weiteren Versuche, dass dies durch subinhibitorische Konzentrationen von Silberionen bedingt war.

## Schlüsselwörter

*Candida albicans*, Kollagengefäßprothese, Silberbeschichtung, Biofilminduktion, Fetales Kälberserum, subinhibitorische Konzentration, CSLM, FUN-1, ConA, XTT

## Publikation

Tammer I, Reuner J, Hartig R, Geginat G: Induction of *Candida albicans* biofilm formation on silver-coated vascular grafts. J. Antimicrob. Chemother. 69(5). 1282–1285 (2014)

Meiner Familie

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>V</b>
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Candida albicans</i> – Morphologie und Pathogenität.....	1
1.2. Epidemiologie und Risikofaktoren von <i>Candida</i> -Infektionen .....	4
1.3. Biofilme .....	7
1.4. Gefäßerkrankungen – Diagnostik und Therapieoptionen .....	10
1.5. Gefäßprotheseninfektion.....	12
1.5.1. Epidemiologie, Klinik und Diagnose .....	12
1.5.2. Infektionswege und Erregerspektrum.....	15
1.5.3. Management von Gefäßprotheseninfektionen .....	15
1.6. Gefäßprotheseninfektionen – Möglichkeiten der Prävention .....	17
1.7. Silber und sein Einsatz als antimikrobielle Substanz .....	21
1.8. Zielsetzung der Arbeit.....	24
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>25</b>
2.1. <b>Materialien .....</b>	<b>25</b>
2.1.1. Prothesen .....	25
2.1.2. Stämme .....	25
2.1.3. Verbrauchsmaterialien.....	26
2.1.4. Geräte .....	27
2.1.5. Nährmedien und Nährplatten .....	28
2.1.6. Lösungen und Pulver .....	28
2.2. <b>Methoden .....</b>	<b>29</b>
2.2.1. Herstellung von Glycerinstocks .....	29
2.2.2. Herstellung von Flüssigkulturen .....	29
2.2.3. Extraktion und Reinigung der Pilzzellen.....	30
2.2.4. Einstellung der Konzentration der Pilzsuspension am Hämozytometer .....	30
2.2.5. Kultivierung von Biofilmen .....	30
2.2.6. Adhäsionsassay .....	31

2.2.7.	XTT- Reduktionsassay .....	32
2.2.8.	Silber-Substitutionsassay .....	33
2.2.9.	Mikrodilution zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Silbernitrat .....	33
2.2.10.	Fluoreszenzfärbungen mit FUN-1 und ConA .....	35
<b>2.3.</b>	<b>Bildgebung .....</b>	<b>36</b>
2.3.1.	Phasenkontrastmikroskopie .....	36
2.3.2.	Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie .....	37
<b>2.4.</b>	<b>Statistik .....</b>	<b>37</b>
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>38</b>
<b>3.1.</b>	<b>Adhäsion und Biofilmbildung von <i>Candida albicans</i> an Kollagengefäßprothesen mit Silberazetat in RPMI-Medium .....</b>	<b>38</b>
3.1.1.	Adhäsion von <i>Candida albicans</i> an Kollagengefäßprothesen mit Silberazetat in RPMI-Medium	38
3.1.2.	Biofilmbildung von <i>Candida albicans</i> an Kollagengefäßprothesen mit Silberazetat in RPMI-Medium.....	40
3.1.3.	Auswirkung der Silberprothese P1 auf die sich im umgebenden RPMI-Medium befindlichen <i>Candida</i> -Zellen .....	41
3.1.4.	Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse in RPMI-Medium.....	45
<b>3.2.</b>	<b>Adhäsion und Biofilmbildung an Kollagenprothesen mit und ohne Silberazetatbeschichtung in RPMI-Medium .....</b>	<b>45</b>
3.2.1.	Adhäsion und Biofilmbildung von <i>Candida albicans</i> in RPMI-Medium.....	45
3.2.2.	Phasenkontrastmikroskopie in RPMI-Medium .....	46
3.2.3.	XTT-Reduktionsassay in RPMI-Medium .....	48
3.2.4.	Zusammenfassende Bewertung des Vergleiches der Kollagenprothesen mit und ohne Silberazetatbeschichtung in RPMI-Medium.....	49
<b>3.3.</b>	<b>Adhäsion und Biofilmbildung an Kollagenprothesen mit und ohne Silberazetatbeschichtung nach Hinzugabe von fetalem Kälberserum.....</b>	<b>50</b>
3.3.1.	Adhäsion und Biofilmbildung von <i>Candida albicans</i> in RPMI-Medium mit 50% FKS.....	50
3.3.2.	XTT-Reduktionsassay in RPMI-Medium mit 50% FKS .....	51
3.3.3.	Phasenkontrastmikroskopie in RPMI-Medium mit 50% FKS .....	52
3.3.4.	Immunfluoreszenz in RPMI-Medium mit 50% FKS .....	53
3.3.5.	Vergleichende Betrachtung der Prothese P1 in RPMI mit und ohne FKS.....	54
3.3.6.	Vergleichende Betrachtung der Prothese P3 in RPMI mit und ohne FKS.....	54
3.3.7.	Zusammenfassende Bewertung der Experimente an Kollagenprothesen mit und ohne Silberazetatbeschichtung in RPMI-Medium mit 50% FKS.....	55

<b>3.4. Einfluss der Silberionen-Konzentration auf die Adhäsion und Biofilmbildung von <i>Candida albicans</i></b> .....	<b>55</b>
3.4.1. Adhäsion und Biofilmbildung von <i>Candida albicans</i> an der Kollagenprothese ohne Silberazetat nach Substitution mit Silbernitrat .....	55
3.4.2. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von <i>Candida albicans</i> gegenüber Silberionen.....	57
3.4.3. Zusammenfassende Bewertung der Adhäsion und Biofilmbildung von <i>Candida albicans</i> in Abhängigkeit von der Silberionen-Konzentration .....	58
<b>4. DISKUSSION</b> .....	<b>59</b>
<b>4.1. Die Reduktion der Adhäsion und Biofilmbildung bei <i>Candida albicans</i> durch Silberionen in serumfreiem Medium</b> .....	<b>59</b>
<b>4.2. Die Induktion der Adhäsion und Biofilmbildung bei <i>Candida albicans</i> durch Silber nach Hinzugabe von FKS</b> .....	<b>64</b>
<b>4.3. Limitationen</b> .....	<b>68</b>
<b>4.4. Klinischer Bezug und Ausblick</b> .....	<b>69</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>74</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>77</b>
<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>106</b>
<b>ERKLÄRUNG</b> .....	<b>107</b>
<b>DARSTELLUNG DES BILDUNGSWEGES</b> .....	<b>108</b>
<b>ANHANG</b> .....	<b>109</b>
Tabelle A 1 .....	109
Tabelle A 2 .....	110
Tabelle A 3 .....	111
Tabelle A 4 .....	112
Tabelle A 5 .....	113
Tabelle A 6 .....	114
Tabelle A 7 .....	115
Tabelle A 8 .....	116

Tabelle A 9 .....	117
Diagramm A 1 .....	118
Tabelle A 10 .....	119
Tabelle A 11.....	120
Tabelle A 12 .....	121
Diagramm A 2 .....	122
Tabelle A 13 .....	123
Diagramm A 3 .....	124

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAA	Abdominelles Aortenaneurysma
Ag	Silber
AHA	American Heart Association
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AMP	Antimikrobielles Peptid
ATCC	American Type Culture Collection
ATPase	Adenosintriphosphatase
Aqua dest.	<i>Aqua destillata, destilliertes Wasser</i>
Ca	Kalzium
CDC	<i>Center for Disease Control</i>
CIVS	cylindrical intravacuolar structures, zylindrische intravacuoläre Strukturen
CLSM	<i>confocal laser scanning microscope, Konfokale Laserrastermikroskopie</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
ConA	Concanavalin A
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomografie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Europa
ECDC	<i>European Center for Disease Control</i>
ESBL	Extended spectrum $\beta$ -lactamase, erweitertes Spektrum gegen Betalaktamasen
ESR	Erythrocytensedimentationsrate
EUCAST	European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing
Exp	Experiment
FDA	Food and Drug Administration
FDG	Fluordesoxyglucose
FITC	Fluorescein Isothiocyanat konjugiert
FKS	Fetales Kälberserum
FUN-1	2-Chloro-4-(2,3-Dihydro-3-Methyl-(Benzo-1,3-Thiazol-2-yl)-Methyliden)-1-Phenylquinolinium-Iodid
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
h	Stunden
HIV	Human immunodeficiency virus, Humanes Immundefizienz-Virus



IL	Interleukin
ITS	Intensivstation
KBE	koloniebildende Einheiten
M	mol/l
MAGIC	Management of Aortic Graft Infection Collaboration
Mg	Magnesium
MHK	minimale Hemmkonzentration
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MR-CNS	Methicilin-resistente Koagulase-negative <i>Staphylokokken</i>
MRSA	Methicilin-resistentem <i>Staphylococcus aureus</i>
MW	Mittelwert
NA	Nordamerika
NRZ	Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen
P1	Kollagengefäßprothese mit Silberazetatbeschichtung
P3	Kollagengefäßprothese ohne Silberazetatbeschichtung
PAMP	Pathogen associated molecular patterns
PAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate buffered saline
PET	Positronen-Emissions-Tomografie
PS	Polystyren
PTFE	Polytetrafluorethylen
ROS	reactive oxygen species
rpm	Rotationen pro Minute
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute-Medium
SAB	Sabouraud-Dextrose
SAP	Secretory aspartic proteinases
SD	Standardabweichung
spp.	Spezies (Mehrzahl)
TNF	Tumornekrosefaktor
ppm	parts per million
PTFE	Polytetrafluorethylen
U	Umdrehungen/Minute
USA	United States of America
VAC	vacuum-assisted closure, Vakuum-assistierter Verschluss
WHO	World Health Organization
XTT	

YPD

Yeast extract Peptone Dextrose

ZVK

Zentralvenöser Katheter

# 1. EINLEITUNG

Entwicklungen und Entdeckungen in der Medizin lassen den Menschen immer älter werden. Viele Erkrankungen, die vor Jahren innerhalb kurzer Zeit zum Tod führten, sind heute entweder behandelbar oder die Progression kann soweit aufgehalten werden, dass ein Leben damit gut möglich ist. Der Lebensstil nimmt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Krankheiten ein. Arteriosklerose wird deshalb gern als Zivilisationskrankheit bezeichnet. Zur Linderung von Beschwerden und zur Verbesserung der Lebensqualität bleibt nach ausgeschöpfter konservativer Therapie meist nur ein operatives Verfahren. Dieses ist mit Risiken für den Patienten verbunden. Besonders gefürchtet sind peri- und postoperative Infektionen. Häufig sind sie mit implantierten Fremdkörpern, wie zum Beispiel Gefäßprothesen, assoziiert. Obwohl der medizinische Fortschritt Antibiotika und Antimykotika verfügbar gemacht hat, ist die Medizin weit davon entfernt, den Kampf gegen Bakterien und Pilze zu gewinnen. Es ist vielmehr so, dass Resistenzen zunehmen und bisher wenig beachtete Mikroorganismen in erhöhtem Maße schwere Infektionen auslösen. *Candida albicans* ist einer davon. Um dieses Gefecht doch noch zu gewinnen, wird weiter intensiv nach Möglichkeiten zur Abwehr von Bakterien und Pilzen geforscht. Man greift dabei auch auf bereits seit Jahrhunderten bekannte Substanzen wie Silber zurück.

## 1.1. *Candida albicans* – Morphologie und Pathogenität

Der eukaryote Mikroorganismus *Candida albicans* gehört dem Reich der Pilze an. Pilze sind saprophytäre oder parasitäre Lebewesen, die sich heterotroph ernähren und das aerobe Milieu bevorzugen. Der Übergang zwischen beiden Lebensweisen ist fließend (Ingold und Hudson 1993). Als besondere strukturelle Merkmale gelten die Zellwand aus Chitin, die Ergosterol enthaltende Plasmamembran, die 80S rRNA und die aus Tubulin aufgebauten Mikrotubuli (McGinnis und Tying 1996). Morphologisch unterscheidet man Sprosspilze (Hefen) und Fadenpilze. Erstere sind einzellige Organismen, die sich durch Ausstülpung (Knospung, Sprossung) an der Zellwand einer rundlichen bis ovalen Mutterzelle vermehren. Letztere hingegen formen multizelluläre teilweise durch Septen getrennte lange Filamente (Hyphen). Einige Pilze, die sogenannten dimorphen Pilze, wachsen nicht nur als Spross- oder als Fadenpilze, sondern kommen alternierend in beiden Formen vor. Der Phasenwechsel ist dabei von außen gesteuert, etwa durch die Nährstoffbedingungen oder die Temperatur. So wird die hefeartige, parasitäre Form erst bei 37 °C – also im Wirt – ausgebildet, während die filamentöse, saprophytäre Variante bei Umgebungstemperatur – also bei Zimmertemperatur –

entsteht (Hof und Dörries 2009).

Die Gattung *Candida* umfasst eine heterogene Gruppe von Mikroorganismen, die zu den Sprosspilzen gehören und auf Grund des typischen Geruchs der Kulturen auch als Hefen bezeichnet werden. Gegenwärtig sind über 300 verschiedene Spezies beschrieben. Zu den humanmedizinisch bedeutsamsten Spezies zählen: *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae*, *Candida parapsilosis* und *Candida tropicalis* (Cooper 2011; Dignani et al. 2009; Lachance et al. 2011; Pfaller et al. 2019; Vazquez und Sobel 2011).

*Candida albicans* ist ein opportunistisches Pathogen. Normalerweise stellt es für den menschlichen Körper eine Kommensale dar und ist Teil der eigenen mikrobiologischen Flora (Spellberg et al. 2012). Der erste Kontakt mit *Candida albicans* erfolgt meist im Vaginalkanal während der Geburt. Dies ermöglicht eine Besiedelung des oberen und unteren Gastrointestinaltraktes, die ein Leben lang andauert (Kobayashi 1996). Daneben kann es die Schleimhaut des weiblichen Genitaltraktes (Barousse et al. 2004; Ross und Needham 1980) und die Haut (Clayton und Noble 1966; Kühbacher et al. 2017) besiedeln. Jedoch kann *Candida albicans* kutane, mukokutane oder systemische Infektionen hervorrufen, die vor allem dann tödlich verlaufen, wenn das Immunsystem des Individuums alteriert ist (Cooper 2011).

*Candida albicans* zeichnet sich durch einen ausgeprägten Polymorphismus aus (Cole 1996). Neben der Hefen- und Hyphenform ist die Ausbildung von Pseudohyphen und Chlamydosporen möglich (Böttcher et al. 2016; Veses und Gow 2009). Die Hefezellen – Blastosporen genannt – sind rund oder länglich, dünnwandig und 4-6 µm groß (Vazquez und Sobel 2011). Längliche ellipsoide Zellen, die an einer verengten Separationsstelle zusammenhängen, werden Pseudohyphen genannt (Veses und Gow 2009). Chlamydosporen besitzen eine dickere Zellwand, sind größer als Blastosporen und bilden sich am Ende sogenannter Suspensorzellen (Böttcher et al. 2016). Hyphen treten als lineare Kette verlängerter, schlauchartiger Zellen auf, die durch Septen getrennt sind und im Gegensatz zu Pseudohyphen keine Einengungen in diesen Bereichen aufweisen (Hazan et al. 2002). Die jeweilige Erscheinungsform ist an bestimmte Umweltfaktoren gebunden. Als solche Faktoren konnten bereits die Temperatur, der Grad an Ernährungsressourcen, der pH-Wert, die Anwesenheit von Serum (Nadeem et al. 2013) und die Kohlenstoffdioxidkonzentration (Daniels et al. 2013) identifiziert werden.

Neben dem reversiblen Übergang (Switch) zwischen Hyphe und Hefe, welcher als grundlegend betrachtet wird und durch viele Zellen einer Kolonie vollzogen werden kann, wurden in den 1980-iger Jahren bei *Candida albicans* weitere sogenannte „Switching-Systeme“ entdeckt (Pomés et al. 1985; Slutsky et al. 1985). Am besten erforscht ist das „white-opaque switching“. Dabei sind zwei Koloniemorphologien vorherrschend – eine glatte, weiße und eine flache, graue (opaque) mit Noppen (Slutsky et al. 1987). Wurde *Candida albicans*

über Jahrzehnte als asexuell klassifiziert, so konnte mit Hilfe des white-opaque-Wechsels gezeigt werden, dass *Candida albicans* die Möglichkeit der geschlechtlichen Fortpflanzung entwickelt und konserviert hat (Lockhart et al. 2002; Miller und Johnson 2002). Die phänotypische Änderung, die die Zellen der Kolonien während eines solchen Switchs erfahren, ereignet sich spontan und mit sehr viel geringerer Häufigkeit als der beschriebene Hefen-Hyphen-Wechsel (Bergen et al. 1990; Rikkerink et al 1988; Slutsky et al. 1985).

Bei Pilzen ist es im Gegensatz zu Bakterien nicht möglich, einen einzigen oder wenige als sicher geltende Virulenzfaktoren, die für die Entwicklung einer Erkrankung verantwortlich sind, auszumachen. Autoren verweisen darauf, dass man im Zusammenhang mit Pilzen besser von Virulenzattributen sprechen sollte (Cramer Jr. und Perfect 2009). Es ist ein schmaler Grat zwischen dem Leben als Kommensale und dem als Pathogen. Einerseits moduliert *Candida albicans* das Immunsystem seines Wirtes dahingehend, dass ein Bestehen mit ihm möglich ist und sie in gegenseitige Wechselwirkung ohne Schaden für den Wirt treten können. Andererseits kann *Candida albicans* Erkrankungen verschiedenster Art zu einem bestimmten Zeitpunkt verursachen (Lowman et al. 2014; Mochon et al. 2010; Wächtler et al. 2011). Wie oben beschrieben, spielt die Plastizität der Morphologie eine große Rolle für den Erfolg als Kommensale und auch als Pathogen. Dabei scheint jede Erscheinungsform ihren Nutzen zu haben. Ging man zum Beispiel vor einiger Zeit noch davon aus, dass die Hyphenform unabdingbar für die Invasion sei, hat sich dies inzwischen relativiert. Die Forschung liefert sowohl für die Hyphenform als auch für die Hefeform Ergebnisse, die den Verdacht zulassen, dass beide Formen einzeln oder in Kooperation unter gewissen Bedingungen pathogen wirken können (Baillie und Douglas 1999; Murad et al. 2001; Pope und Cole 1982; Ray und Payne 1988; Seman et al. 2018).

Weitere Attribute, die *Candida albicans* besitzt und die im Zusammenhang mit der Entwicklung von Krankheiten gesehen und intensiv erforscht werden, sind: lytische Enzyme wie die Proteinasenfamilie SAP – secretory aspartic proteinases, sezernierte Asparaginsäureproteinasen – (De Bernardis et al. 1999; Hube et al. 1997; Magee et al. 1993), verschiedene Lipasen (Paraje et al. 2008), Esterasen (Rudek 1978; Tsuboi et al. 1996) und Phospholipasen (Banno et al. 1985, Hube et al. 2001), die Nutzung verschiedener Quellen zur Kohlenstoffgewinnung (Barelle et al. 2006; Lorenz und Fink 2001), die Biofilmbildung (siehe ausführlich unter 1.3.), die Änderung der Zellwandzusammensetzung (Bensen et al. 2004; Böhm et al. 2016; Ene et al. 2015) und fungale Pathogen-assoziierte Molekülmuster (PAMPs, pathogen associated molecular patterns; Kasperkovitz et al. 2011; Netea et al. 2004; van der Graaf et al. 2005), die Ausbildung von Transportern zur Akquirierung von Spurenelementen, wie Eisen, Zink, Kupfer und Mangan, und deren alternative Nutzung als Cofaktoren (Citiulo et al. 2012; Li et al. 2015; Moors et al. 1992) und die Verhinderung der Phagozytose durch Wirtszellen (Danhof und Lorenz 2015; Miramón et al. 2012).

2016 berichteten Moyes et al. über die Entdeckung eines weiteren Virulenzfaktors. Sie schlugen vor, ihn Candidalysin zu nennen. Es handelt sich um das erste bekannte zytolytische Peptidtoxin eines Pilzes. Candidalysin schädigt direkt epitheliale Membranen, löst eine Signalantwort aus und aktiviert die epitheliale Immunität (Moyes et al. 2016). Es scheint an der Entstehung mukosaler Erkrankungen beteiligt zu sein und hilft *Candida albicans* beim Überwinden der Barriere des Intestinaltraktes (Allert et al. 2018).

Die Ergebnisse der bisherigen Forschungen sprechen für die Annahme, dass erst das Zusammenspiel vieler Attribute eine Infektion möglich macht, und dass je nach Art und Ort dieser sich das Verhältnis des Zusammenwirkens ändert. So können zum Beispiel die SAP vielfältige Funktionen übernehmen. Sie verdauen Moleküle zur Nahrungsaufnahme, sind an der Invasion des Wirtsgewebes und nachfolgend der verbesserten Adhäsion beteiligt und scheinen Zellen und Moleküle des Immunsystems zu zerstören, um diesem zu entgehen (Borgvon Zepelin 1999; Fallon et al. 1997; Hube et al. 1997; Pietrella et al. 2013; Wu et al. 2013; Zawrotniak et al. 2017).

### **1.2. Epidemiologie und Risikofaktoren von *Candida*-Infektionen**

Pilze verursachen selten Infektionen bei immungesunden Menschen. Es existiert eine angeborene Widerstandsfähigkeit gegen das Eintreten der Pilze in den Körper über die Haut und die Mukosa durch: (a) das Vorkommen von langkettigen ungesättigten Fettsäuren auf unbeschädigter Haut, was das Wachstum der Pilzzellen reduziert, (b) den Wettstreit der Pilze mit der vorhandenen normalen bakteriellen Flora, (c) die kurze Lebensdauer humaner epithelialer Zellen und (d) die trockene Beschaffenheit des Stratum corneum. Auf den Schleimhäuten verhindern antimikrobielle Substanzen und teilweise die Zilienzellen regelhaft eine Pilzkolonisierung (Kobayashi 1996). Entzündungsmediatoren (= Zytokine) werden nach Kontakt des Epithels mit *Candida albicans* von dessen Zellen sezerniert. Zu den freigesetzten Zytokinen zählen unter anderem: Interleukin (IL)-1 $\alpha$ , Tumornekrosefaktor (TNF)  $\alpha$  (Steele und Fidel 2002), IL-8 (Dongari-Bagtzoglou und Kashleva 2003), IL-6, Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF, granulocyte macrophage colony-stimulating factor) und TNF  $\beta$ . Sie alarmieren den Körper und lösen eine Immunreaktion aus. Diese wird sowohl zellulär (Dongari-Bagtzoglou et al. 2005) als auch über die Sekretion antimikrobieller Peptide (AMP) vermittelt. AMP sind Wirtsabwehrpeptide, die als Teil des angeborenen Immunsystems ein großes antimikrobielles Spektrum aufweisen. Sie stören die Integrität der Lipidzellmembran der angreifenden Mikroorganismen (Lee et al. 2016). Im Zusammenhang

mit humanen Pilzinfektionen scheinen die AMP der  $\beta$ -Defensin-Familie (Abiko et al. 2002), Cathelicidin LL-37 (Bals et al. 1998) und Histatine (Koshlukova et al. 1999) eine Rolle zu spielen. Wenn Pilze jedoch eingedrungen sind, dann ist das Spektrum an möglichen Infektionen groß. Nach der Art der Übertragung wird zwischen endogen oder exogen übertragener Infektion unterschieden. Exogene Pilzinfektionen entstehen durch Eintritt in den Körper via Luft, zum Beispiel durch Inhalation von Sporen von Schimmelpilzen oder perkutan nach Verletzungen oder Penetration. Endogene Infektionen hingegen entstehen ausgehend von einer Kolonisation oder infolge einer Reaktivierung einer bereits latenten Infektion (Walsh und Dixon 1996). *Candida albicans* kolonisiert als Teil der physiologischen Flora die Haut (Clayton und Noble 1966; Kühbacher et al. 2017) und die Schleimhäute des Gastrointestinaltraktes (Cohen et al. 1969; Miranda et al. 2009) und des weiblichen Genitaltraktes (Barousse et al. 2004; Ross und Needham 1980) und verursacht so vor allem endogene Infektionen. Eine exogene Übertragung durch direkten Kontakt, zum Beispiel durch die Hände des Pflegepersonals bei der Katheterpflege, ist ebenfalls möglich (Reagan et al. 1995).

Invasive Pilzinfektionen stellen ein großes Problem in der Intensivmedizin dar. Allein ihre Diagnose gestaltet sich auf Grund fehlender Spezifität der Symptome und mangelnder diagnostischer Möglichkeiten häufig schwierig und wird meist erst mit zeitlicher Verzögerung gestellt, sodass adäquate Therapiemaßnahmen oftmals verspätet eingeleitet werden (Caggiano et al. 2015). Zwei retrospektive Studien des Universitätsklinikums Frankfurt/Main zum Thema invasiver Pilzinfektionen zeigten, dass bei 3,4% (Zeitraum 1978 bis 1992) und bei 8,2% (Zeitraum 1993 bis 2005) der durchgeführten Obduktionen eine invasive Pilzinfektion bestand (Groll et al. 1996; Lehrnbecher et al. 2010). In der Mehrzahl (78%) der obduzierten Fälle im ersten Beobachtungszeitraum war ante mortem nicht die Diagnose einer invasiven Pilzinfektion gestellt worden war, jedoch wurde sie in 76% der Fälle als unbedingt tödlich oder signifikant zum Tode beitragend bewertet (Groll et al. 1996). Die meisten Infektionen wurden durch *Aspergillus spp.* und *Candida spp.* verursacht (Groll et al. 1996; Lehrnbecher et al. 2010). Darüber hinaus konnte von 1993 bis 2005 ein signifikanter Anstieg von Todesfällen infolge *Candida*-Infektionen verzeichnet werden (Lehrnbecher et al. 2010).

Daten aus dem internationalen Surveillance-Programm zu Blutstrominfektionen (SENTRY) zeigten, dass *Candida spp.* für 3% aller Blutstrominfektionen und für 9% aller nosokomialen Septikämien im Zeitraum zwischen 1997 und 1999 verantwortlich waren. Damit rangieren *Candida spp.* auf Platz 4 hinter *Staphylococcus aureus*, koagulasenegativen Staphylokokken und Enterokokken (Pfaller et al. 2001).

Einer Studie von Meyer et al. zufolge wurden im Zeitraum von 2006 bis 2011 8% aller nosokomiale Blutstrominfektionen auf deutschen Intensivstationen durch Pilze verursacht, 66% davon durch *Candida albicans*. Insgesamt gehörten *Candida spp.* mit 4,8% auch in dieser

Studie zu den vierthäufigsten Verursachern einer Sepsis und führten in über 20% der Fälle zum Tode (Meyer et al. 2013). In der Schweiz rangierte *Candida spp.* an siebter Stelle bei positiven Blutkulturen (2,9% aller Keime). Die Inzidenz war während des 10-jährigen Beobachtungszeitraumes stabil. *Candida albicans* war auch hier mit 66% die vorherrschende Spezies (Marchetti et al. 2004). Weitere Analysen in Europa beschrieben eine Inzidenz von 2,19 bis 8,1 Candidämien pro 100.000 Einwohner pro Jahr (Almirante et al. 2005; Bitar et al. 2014; Odds et al. 2007; Puig-Asensio et al. 2014; Rajendran 2016; Sabino et al. 2017). Eine Studie der European Confederation of Medical Mycology (ECMM) in 14 Ländern zeigte, dass 9 von 1000 Einweisungen eine Candidämie zur Ursache hatte (Klingspor et al. 2015), im Jahr 2004 war das nur bei 0,2-0,38 von 1000 Einweisungen der Fall (Tortorano et al. 2004). In allen genannten Studien über Fungämien war *Candida albicans* in mindestens 40% das auslösende Pathogen.

Das Nationale Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen (NRZ) veröffentlichte 2019 Daten für Deutschland, die mittels des Krankenhaus-Infektions-Surveillance-Systems erfasst worden waren. Zwischen Januar 2017 und Dezember 2018 wurden von 976 Intensivstationen (ITS) 4409 ZVK-assoziierte Infektionen gemeldet. In 312 Fällen (7%) konnten *Candida spp.* als Erreger isoliert werden (NRZ 2019, Modul ITS-KISS, Download 31/05/2019).

Bis in die 1990er Jahre traten Candidämien vor allem bei Patienten mit hämatologischen Malignitäten, AIDS, soliden Tumoren und nach Transplantation auf (Groll et al. 1996). Neuerdings sind auch vermehrt kritisch kranke, nicht-immunsupprimierte Patienten betroffen (Eggimann et al. 2003). Weitere prädisponierende Faktoren für das Auftreten einer Erkrankung sind: kürzlich stattgefundene chirurgische Interventionen, intravenöse und/oder zentralvenöse Katheter, vorausgegangene oder bestehende Therapien mit Breitspektrum-Antibiotika (Chander et al. 2013; Tortorano et al. 2004) und parenterale Ernährung (Odds et al 2007). Viele Patienten haben eine oder mehrere Komorbiditäten wie Diabetes mellitus, Lebererkrankungen und/oder Niereninsuffizienz (Bassetti et al. 2015). Die Mortalitätsrate invasiver *Candida*-Infektionen wird mit ungefähr 40% angegeben (Rajendran et al. 2016; Shahin et al. 2016; Tortorano et al. 2004; Wisplinghoff et al. 2004).

Die genannten Rahmenbedingungen verdeutlichen, warum gerade die Intensivmedizin mit dem Problem der Candidämien konfrontiert ist. In neueren Studien wird jedoch auch auf vermehrt ambulant erworbene *Candida*-Fungämien verwiesen. Hier treten regionale Unterschiede deutlich hervor. Verantwortlich für diese Entwicklung wird der Wandel im Gesundheitssystem hin zu vermehrter außerhospitaler Pflege und Genesung gemacht (Pfaller et al. 2011a, Pfaller et al. 2011b).

Aussagen zu Veränderungen der Häufigkeit des Auftretens innerhalb der letzten Jahre sind kontrovers. Einige erkennen eine Steigerung dieser (Bitar et al. 2014; Wisplinghoff et al. 2004),



andere hingegen beschreiben stabile oder sogar sinkende Inzidenzen (Bassetti et al. 2015; Marchetti et al. 2004; Meyer et al. 2013 Rajendran et al. 2016; Shahin et al. 2016; Teo et al. 2017).

Ungeachtet dessen stellen invasive Pilzkrankungen, insbesondere Fungämien, ein ernstzunehmendes Problem dar. Sie erhöhen die Mortalität und Morbidität des Einzelnen (Barchiesi et al. 2004; García San Miguel et al. 2004). Für das Gesundheitssystem bedeutet eine solche Infektion eine verlängerte Hospitalisierung mit einem erhöhten Verbrauch von Ressourcen wie Personal, Diagnostik und therapeutischen Maßnahmen. So ermittelten Olaechea et al. in ihrer prospektiven, multizentrischen Kohortenstudie, dass allein eine *Candida*-Kolonisierung zu einer Erhöhung der ITS-Verweildauer um 6,2 Tage und zu einer erhöhten Krankenhausverweildauer um 8,6 Tage führte. Liegt gar eine *Candida*-Infektion vor, so blieben Patienten 12,7 Tage länger auf der ITS und 15,5 Tage länger im Krankenhaus. Damit verursachte allein eine *Candida*-Kolonisierung Mehrkosten von ca. 8000 Euro und eine Infektion mit *Candida spp.* erhöhte die Kosten um fast 16 000 Euro (Olaechea et al. 2004).

### 1.3. Biofilme

Anhand der zuvor dargelegten epidemiologischen Daten ist ersichtlich, dass *Candida*-Infektionen ein erhebliches medizinisches Problem darstellen. Eine entscheidende Ursache für die Entstehung Fremdkörper-assoziiertes Blutstrominfektionen durch *Candida spp.* ist ihre Fähigkeit zur Bildung von Biofilmen.

Schon 1978 publizierten Costerton et al., dass Bakterien in der Natur von einer „Glycocalyx“ umgeben sind (Costerton et al. 1978). Die nachfolgenden Forschungen konnten zeigen, dass Keime einen Weg gefunden hatten, sich in Ökosystemen zu ihrem Vorteil zu organisieren. Dies bezeichnet man als Biofilme. Sie dienen dem Schutz vor der Umwelt, machen widerstandsfähiger gegenüber physischen und chemischen Einflüssen (Baillie und Douglas 2000; Derlon et al. 2016), bieten die Möglichkeit der metabolischen Zusammenarbeit einzelner Zellen und der gemeinschaftsorientierten Regulation der Genexpression (Rajendran et al. 2016). Es wird geschätzt, dass bis zu 80% aller Mikroorganismen in der Umwelt in Biofilmen organisiert sind (Ramage et al. 2012).

Zunächst konzentrierten sich die Untersuchungen zur Biofilmbildung vor allem auf Bakterien, da sie die häufigste Ursache für Infektionserkrankungen darstellten. Mit zunehmendem Fortschritt medizinischer Behandlungsmethoden rückten Pilze und die durch sie hervorgerufenen Infektionen vermehrt in den Fokus. Hawser und Douglas beschrieben 1994 ein Modell, mit dem *Candida*-Biofilme auf kleinen ausgestanzten Katheterscheiben untersucht werden konnten. Sie nutzten neben quantitativen Methoden die Bildgebung. So wiesen sie

rasterelektronenmikroskopisch nach, dass innerhalb von 48 Stunden *Candida albicans*-Biofilme mit einem Netzwerk aus Blastosporen, Keimschläuchen, Pseudohyphen und Hyphen entstanden waren und sich extrazelluläres polymerisches Material an einigen Stellen der Oberfläche gebildet hatte (Hawser und Douglas 1994).

Chandra et al. konnten zeigen, dass die Morphologie und das Wachstum von *Candida*-Biofilmen *in vitro* in drei Stadien eingeteilt werden kann. In der frühen Phase (0 bis 11 Stunden Inkubation) begannen die meisten *Candida albicans*-Zellen, zu diesem Zeitpunkt als Blastosporen vorliegend, als Mikrokolonien auf Kunststoffoberflächen anzuhafte. In der intermediären Phase (12 bis 30 Stunden) bildete sich ein Zellverband, der als dicke Anhäufung erschien, hervorgerufen durch Knospung und Aggregation auf unebenen Flächen. Es wurde vermehrt nichtzelluläres Material produziert, welches die gebildeten Kolonien zunehmend bedeckte. Während der Reifungsphase (38 bis 72 Stunden) wurden die Kolonien mit extrazellulärem Matrixmaterial gänzlich umschlossen. Die Architektur von *Candida albicans*-Biofilmen glich der von bakteriellen Biofilmen und konnte je nach Material, an dem die Adhäsion erfolgte, unterschiedlich sein (Chandra et al. 2001a). Die extrazelluläre Matrix bei *Candida albicans*-Biofilmen bestand vornehmlich aus unterschiedlichen Anteilen an Proteinen und Glycoproteinen, Kohlenhydraten, Lipiden und Nukleinsäuren (Zarnowski et al. 2014). Die Dicke der Biofilme variierte von 70 bis mehr als 450 µm (Chandra et al. 2001a, Ramage et al. 2001).

Zu Beginn der Forschung an *Candida*-Biofilmen ging man davon aus, dass der Switch in die Hyphenform eine unbedingte Anforderung für deren Bildung sein müsse. Diese Hypothese konnte mit Hilfe der Experimente durch Baillie und Douglas widerlegt werden. Mittels Hyphen- und Hefe-Mutanten bewiesen sie, dass beide Erscheinungsformen Biofilme bilden konnten, deren Struktur- und Anhaftungseigenschaften sich jedoch deutlich unterschieden (Baillie und Douglas 1999). *Candida albicans* konnte sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen einen Biofilm formen (Thein et al. 2007). Dynamische Veränderungen wie Flüssigkeitsbewegungen wirkten sich positiv darauf aus (Hawser et al. 1998). Die Biofilmbildung war nicht an inertes Fremdmaterial gebunden (Ellepola und Samaranayake 1998), sondern konnte auch an lebenden Organismen stattfinden (Holmes et al. 2002).

Der erste Schritt – die Adhäsion – ist unerlässlich und wird durch eine Reihe von Umweltfaktoren beeinflusst. Dazu zählen: der Fluss des umgebenen Mediums (Urin, Blut, Speichel und Schleim), der pH-Wert, die Temperatur, die Osmolarität, vorhandene Bakterien, antimikrobielle Substanzen und Immunfaktoren des Wirtes (zusammengefasst in: Ramage et al. 2012).

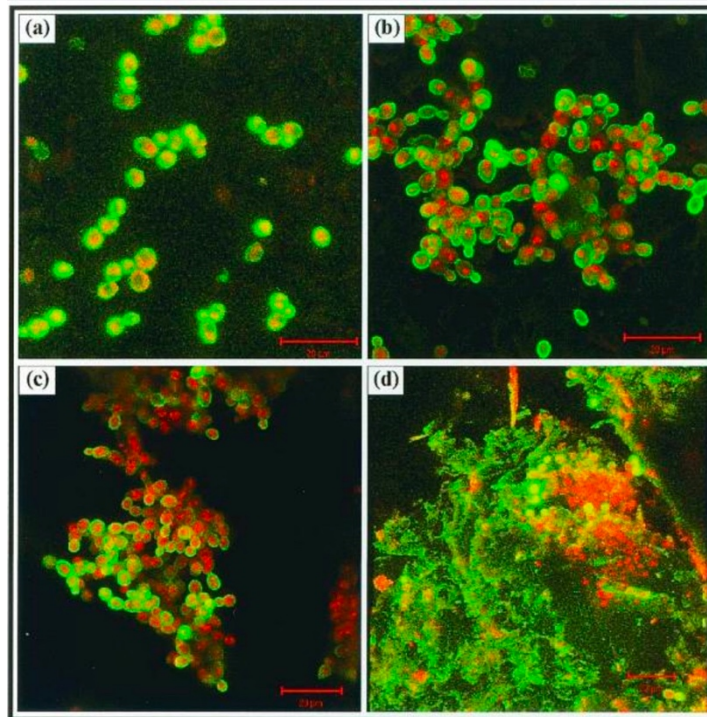
Ein bereits zuvor genannter bemerkenswerter Aspekt von Biofilmen ist ihre Resistenz gegenüber Einflüssen von außen. Diese ist sowohl gegenüber Wirtsabwehrmechanismen als auch antimikrobiellen Substanzen erhöht (Baillie und Douglas 2000). Verantwortlich dafür

wurden unter anderem das Anschalten von Effluxpumpen (Mukherjee et al. 2003; Rocha et al. 2017), die extrazelluläre Matrix (Al-Fattani und Douglas 2006) und die Bildung sogenannter Persistier-Zellen gemacht (LaFleur et al. 2006). Selbst Zellen, die aus Biofilmen herausgelöst waren (Dispersion), hatten eine erhöhte Resistenz und waren in höherem Maße mit Mortalität verknüpft als planktonische Hefezellen (Uppuluri et al. 2010).

Schätzungen besagen, dass mindestens die Hälfte aller nosokomial erworbenen Infektionen mit medizinischen Fremdkörpern assoziiert ist (Richards et al. 1999). Zu diesen gehören: zentral-venöse Katheter (Tacconelli et al. 1997), endotracheale Tuben (Kollef et al. 2008), Urinkatheter (Rupp et al. 2004), künstliche Herzklappen (Grubitzsch et al. 2018), Gelenkersatz (Wang et al. 2018), Gefäß- (siehe ausführlich unter 1.5. und 1.6.) und Zahnprothesen (Ellepolo und Samaranyake 1998). Die Kontamination des Materials mit Mikroorganismen kann durch die Haut des Patienten, das Pflegepersonal, Leitungswasser oder andere Quellen der Umwelt erfolgen (Donlan 2001). Dies stellt Mediziner vor große Herausforderungen. Implantierte Katheter mit Biofilmen stellen ein Reservoir für Mikroorganismen dar, wodurch eine Heilung erschwert oder schlimmstenfalls unmöglich wird. Häufig müssen die betroffenen Fremdkörper operativ wieder entfernt werden (Nobile et al. 2006).

Die Biofilmbildung stellt einen wichtigen Risikofaktor dar, ist aber nicht in jedem Fall eine notwendige Voraussetzung für die Ausbildung einer Infektion. Studien an *Candida*-Stämmen, die von Patienten mit manifester *Candida*-Sepsis isoliert worden waren, machten deutlich, dass viele dieser Stämme Biofilmbildner waren, aber eben nicht alle diese Fähigkeit aufwiesen. Eine indische Candidämie-Studie konnte zeigen, dass 39% der isolierten *Candida albicans*-Stämme die Möglichkeit der Biofilmbildung besaßen (Banerjee et al. 2015). Von allen Stämmen der im Beobachtungszeitraum durch *Candida albicans* ausgelösten Fungämien in Ungarn hatten 30,6% das Potential zur Biofilmproduktion (Pongrácz et al. 2016). Eine italienische Studie bezifferte die Fähigkeit zur Biofilmbildung auf 26,2% (Tumbarello et al. 2012). In Spanien hingegen waren 97% der untersuchten Stämme in der Lage, Biofilme zu bilden (Guembe et al. 2014).

Es scheint also, dass die Biofilmbildung ein weiterer Faktor im großen Pathogenitätsrepertoire von *Candida* ist und genau wie die anderen zuvor dargestellten Eigenschaften zu einer bestimmten Zeit einem determinierten Zweck dient.



**Abbildung 1** CSLM (confocal scanning laser microscope)-Bilder von *Candida albicans*-Biofilmen gewachsen auf Acrylzahnprothesenoberflächen. Horizontale Ansicht (xy) 3D-rekonstruierter Bilder nach 0 (a), 8 (b), 11 (c), und 48 (d) Stunden. Der rote Balken entspricht 20 µm. Entnommen aus: Chandra et al.: Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J. Bacteriol.* (2001). Nutzung mit Genehmigung der American Society of Microbiology

#### 1.4. Gefäßerkrankungen – Diagnostik und Therapieoptionen

Die Gesundheitsberichterstattung des Bundes des Jahres 2015 postulierte, dass Herz-Kreislauf-Erkrankungen an erster Stelle der Todesursachen in Deutschland stehen und jährliche Kosten von rund 37 Milliarden Euro verursachen (Gesundheit in Deutschland 2015, Download 27/10/2017). Ein wesentlicher Faktor für die Entstehung dieser ist der Lebensstil. So ist bekannt, dass Bewegungsmangel, ungesunde Ernährung und Nikotinkonsum Zivilisationskrankheiten wie Diabetes mellitus, Adipositas, Hypertension, Fettstoffwechselstörungen und Arteriosklerose begünstigen und diese sich wiederum gegenseitig beeinflussen (Diehm et al. 2004; GBD Study 2015, Lancet 2016).

Die Arteriosklerose ist laut der Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO, World Health Organization) eine variable Kombination von Veränderungen der arteriellen Intima bestehend aus fokalen Ablagerungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen in der arteriellen Media (WHO 1957, Download 28/06/2019). Es handelt sich um eine chronische Erkrankung mit nachfolgendem Umbau der Ablagerungen und Bildung charakteristischer Plaques. Diese können rupturieren und so das Gefäß verschließen. Hauptsächlich werden

nach Lokalisation der Plaques drei klinische Erscheinungsformen unterschieden: die ischämische Herzerkrankung, der ischämische Schlaganfall und die periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAVK). Der Verlauf ist langsam fortschreitend. So sind die Folgen meist erst nach Jahren ersichtlich und betreffen in der Regel mehr als ein Gefäß (Herrington et al. 2016).

Durchschnittlich jeder fünfte Mensch in der Bundesrepublik über 65 Jahre leidet an einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (Diehm et al. 2004). Die Lebenserwartung mit diesem Krankheitsbild ist um circa zehn Jahre verkürzt (Böckler et al. 2005a). In den USA sind acht bis zehn Millionen Menschen von diesem Krankheitsbild betroffen. Dies entspricht einer Prävalenz von 12% der erwachsenen Bevölkerung. Bei den über 70-jährigen erhöht sich diese – ähnlich den Angaben aus Deutschland – sogar bis auf fast 20%. Die Kosten für das Gesundheitssystem werden auf 10 bis 20 Milliarden Dollar geschätzt (Dua und Lee 2016). Die Global Burden of Disease-Studie 2015 unterstrich trotz zurückgehender Inzidenzen von Myokardinfarkten und ischämischen Schlaganfällen in hochentwickelten Regionen die Wichtigkeit des Kampfes der Gesundheitssysteme gegen kardiovaskuläre Erkrankungen (GBD Study 2015, Lancet 2016).

90% der Stenosen und Verschlüsse im Bereich der Aorta und der iliakalen Arterien sind ursächlich auf eine Arteriosklerose zurückzuführen. Beschwerden äußern die Patienten häufig erst, wenn über 50% des Gefäßlumens eingeengt sind (Kosan et al. 2014). Laut der Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Angiologie/Gesellschaft für Gefäßmedizin werden folgende Behandlungsziele angestrebt: die Hemmung der Progression der PAVK, die Reduktion peripherer vaskulärer Ereignisse, die Reduktion kardiovaskulärer und zerebrovaskulärer Ereignisse, die Reduktion von Schmerzen und die Verbesserung der Belastbarkeit, Gehleistung und Lebensqualität (Deutsche Gesellschaft für Angiologie - Gesellschaft für Gefäßmedizin 2015, Download 26/04/2016). Zu Beginn ist die Therapie häufig konservativ. Sie umfasst neben einer Lebensstiländerung mit Nikotinkarenz (Hirsch et al. 1997) und medikamentöser Kontrolle möglicher Komorbiditäten wie Bluthochdruck (Lane und Lip 2013), Diabetes mellitus (Ryden et al. 2013) und/oder Hyperlipidämie (Heart Protection Study Collaborative Group 2007) auch ein strukturiertes Gehtraining (Murphy et al. 2012). Zur Prävention kardiovaskulärer Ereignisse werden Thrombozytenaggregationshemmer verabreicht (Alonso-Coello et al. 2012). Bei symptomatischer PAVK muss der proximale Verschlussprozess mit operativem/interventionellem Aufwand korrigiert werden. Den Vorzug haben endovaskuläre Techniken (Norgren et al. 2007). Sollte bei Versagen dieser oder nach Abwägen des Risiko-Nutzen-Verhältnisses eine Operation notwendig sein, so sind autologe Bypässe mit der körpereigenen Vena saphena magna alloplastischem (körperfremdem) Bypassmaterial überlegen (Ambler und Twine 2018). Wenn körpereigenes Material als Gefäßersatz nicht infrage kommt, dann müssen jedoch künstliche Gefäßprothesen

Anwendung finden (Deutsche Gesellschaft für Angiologie - Gesellschaft für Gefäßmedizin 2015, Download 26/04/2016).

Eine weitere Krankheitsentität, die einen Gefäßersatz erfordern kann, ist das Aneurysma. Es ist definiert als eine Aussackung der Arterie über 50% des erwarteten normalen Durchmessers hinaus (Johnston et al. 1991), verursacht durch eine über Matrixmetalloproteinasen der Makrophagen vermittelte Zersetzung der lamellaren Elastinstruktur der Media der Arterien (Thompson et al. 1995). Es kann bei einem Aortendiameter von über drei Zentimetern von einem Aneurysma gesprochen werden, auch wenn physiologische Aortendurchmesser mit Alter, Geschlecht und Habitus variieren können. Die häufigste Lokalisation extrakranieller Aneurysmen ist infrarenal (Wilderman und Sicard 2009). Die Therapiemaßnahmen sind bei Aneurysmen abhängig von ihrer Größe und dem damit verbundenen Rupturrisiko (Guirguis und Barber 1991). Die S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Gefäßchirurgie und Gefäßmedizin empfiehlt für asymptomatische abdominelle Aortenaneurysmen (AAA) eine Operation bei Patienten mit einem infrarenalen oder juxtarenalen AAA ab 5,5 cm, bei Frauen ab einem Aortendiameter von 5 cm oder bei einer Größenzunahme von 10 mm/Jahr unabhängig vom Aneurysmadurchmesser. Symptomatische AAA sollen zum nächstmöglichen Zeitpunkt elektiv, nach Möglichkeit endovaskulär operiert werden. Ein rupturiertes AAA stellt einen Notfall dar, der sofortiger Intervention bedarf (Deutsche Gesellschaft für Gefäßchirurgie und Gefäßmedizin - Gesellschaft für operative, endovaskuläre und präventive Gefäßmedizin 2018, Download 28/06/2019).

### **1.5. Gefäßprotheseninfektion**

#### **1.5.1. Epidemiologie, Klinik und Diagnose**

Die Patienten der Gefäßchirurgie werden auf Grund ihres Alters, der generalisierten Arteriosklerose und größtenteils weiterer Komorbiditäten als Risikopatienten eingestuft. Die Rate an möglichen peri- und postoperativen Komplikationen bei diesem Patientengut ist hoch (Böckler et al. 2005b; Conte et al. 2001; Kehlet et al. 2016). Eine gefürchtete Komplikation ist die Entwicklung einer Protheseninfektion.

Gefäßprotheseninfektionen sind eher seltene Komplikationen, die jedoch fatale Folgen für den Einzelnen haben können (Chiesa et al. 2002; Gupta et al. 2016; Legout et al. 2012). Ihre Inzidenz wird je nach Studie mit 1 bis 6% angegeben (Taher 2015). So lag in einer Untersuchung aus den Niederlanden die Inzidenz für Infektionen aortaler Gefäßprothesen bei 4,5% innerhalb der ersten zwei Jahre nach Operation (Berger et al. 2015). Eine Analyse aus den USA präsentierte eine kumulative Rate an Aortenprotheseninfektionen von 0,44% nach

Aortenaneurysmrepair, wobei Dialysepatienten von vorneherein aus dem Studiendesign ausgeschlossen worden waren, was nach Auffassung der Autoren zu einer Verringerung der Inzidenz geführt haben könnte (Vogel et al 2008). Bei Sousa und ihren portugiesischen Kollegen lag die Infektionsrate in ihrem Zentrum bei 3,8% (Sousa et al 2014). Gupta et al. gaben in ihrer 2016 veröffentlichten Studie an, dass von jährlich ca. 450.000 Gefäßprothesen-Implantationen in den USA etwa 16.000 infiziert waren, was einer Rate von 3,6% entspricht. Im Zeitraum von 2002 bis 2008 verzeichneten sie einen signifikanten Rückgang der Anzahl an Patienten, die nach abdomineller Aorten Chirurgie eine Aortenprotheseninfektionen entwickelten. Gleichzeitig kam es zu einem Rückgang an offen durchgeführten Aortenaneurysmrepairs und zu einer Zunahme endovasuklärer Aneurysmtherapien (Gupta et al. 2016). Es existieren wenige neuere epidemiologische Daten für Deutschland. 2019 veröffentliche das NRZ Daten zu postoperativen Wundinfektionen nach gefäßchirurgischen Eingriffen, die im Rahmen der Surveillance nosokomialer Infektionen mit dem OP-KISS (Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System) für den Zeitraum von Januar 2017 bis Dezember 2018 erhoben wurden. Die Angaben beruhten auf drei gefäßchirurgischen Kliniken, an denen insgesamt 201 Operationen an der Aorta abdominalis erfolgt waren. Dabei kam es in zwei Fällen zu Wundinfektionen. Für arterielle Rekonstruktionen an der unteren Extremität meldeten 55 Abteilungen 12.702 Operationen. Es kam in 4,13% (n=525) der Fälle zu einer Wundinfektion, wobei 1,78% (n=226) oberflächliche Infektionen und 2,35% (n=299) tiefe oder Organinfektionen waren (NRZ 2019 Modul OP-KISS, Download 24/06/2019).

Die Diagnose einer Infektion einer implantierten Gefäßprothese gestaltet sich auf Grund fehlender Spezifität der Symptome mehrheitlich sehr schwierig. Randomisierte Studien zur optimalen Diagnosefindung fehlen und so konnte bisher kein „Goldstandard“ etabliert werden (Berger et al. 2015; Lyons et al. 2016). Generell wird zwischen früher und später Infektion unterschieden. Die Grenze wird bei drei bis vier Monaten gesetzt (Goëau-Brissonnière et al. 2011; Legout et al. 2012; Taher et al. 2015). Bei frühen Erkrankungen sind die Symptome meist deutlich hinweisgebend. Üblicherweise sind neben Fieber und Schüttelfrost, lokale Entzündungszeichen im Bereich des Operationsgebietes vorhanden, wie entzündete oder nicht adaptierte Narben oder Austritt von serösem oder purulentem Sekret. Weiterhin wird häufig über Komplikationen, wie Blutungen, infizierte Lymphozelen, lokale Schmerzen mit akuter Ischämie der Extremität durch Thrombose des infizierten Bypasses berichtet. Die Diagnostik mittels Computertomografie (CT) erreicht in diesen Fällen eine Sensitivität und Spezifität von nahezu 100%. Späte Infektionen sind deutlich schwieriger zu diagnostizieren, da Fieber weniger häufig auftritt und die Patienten meist nur intermittierend Beschwerden wie Rückenschmerzen äußern. Fisteln oder Blutungen aus dem Gastrointestinaltrakt sind ebenfalls hinweisgebend. Gegebenenfalls ist auch nur der Allgemeinzustand der Patienten reduziert. Im Fall einer späten Infektion sinken Sensitivität und Spezifität des CT auf 55% (Legout et al.

2012).

Die im Jahr 2013 in Großbritannien gegründete Gruppe „Management of Aortic Graft Infection Collaboration“ (MAGIC), hatte sich zum Ziel gesetzt, präzise Diagnosekriterien für Aortenprotheseninfektionen zu definieren. In ihrem 2016 erschienenen Leitfaden legten sie drei Kategorien fest, die zur Entscheidungsfindung herangezogen werden sollen: klinisch/chirurgisch, radiologisch und laborchemisch. Innerhalb jeder einzelnen Obergruppe können die Patienten Major- oder Minor-Kriterien erfüllen (Abbildung 2).

Danach ist eine Protheseninfektion dann zu vermuten, wenn ein Major- oder Minorkriterien von zwei der drei Kategorien erfüllt sind. Eine Infektion gilt als diagnostiziert, wenn ein Majorkriterium und ein weiteres Major- oder Minorkriterium einer beliebigen Kategorie vorhanden sind (Lyons et al. 2016).

	<b>Klinisch/chirurgisch</b>	<b>radiologisch</b>	<b>laborchemisch</b>
<b>Majorkriterien</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Eiter (bestätigt mittels Mikroskopie) um die Prothese oder im Aneurysmasack während der Operation</li> <li>offene Wunde mit freiliegender Prothese oder kommunizierendem Sinus</li> <li>Fistelentwicklung, zum Beispiel aortoenterisch oder aortobrochial</li> <li>Protheseneinbringung in einen infizierten Bereich, zum Beispiel Fistel, mykotisches Aneurysma oder infiziertes Pseudoaneurysma</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Flüssigkeit um die Prothese im CT <math>\geq</math> 3 Monate nach dem Einbringen</li> <li>Gas um die Prothese im CT <math>\geq</math> 7 Wochen nach dem Einbringen</li> <li>zunehmende Gasbildung in nachfolgender Bildgebung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Nachweis von Erregern auf explantierter Prothese</li> <li>Nachweis von Erregern in intraoperativ gewonnenem Abstrich</li> <li>Nachweis von Erregern mittels perkutan, radiologiegestützt gewonnener Probe der Flüssigkeit um die Prothese</li> </ul>
<b>Minorkriterien</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>lokalisierte klinische Erscheinungen einer Aortenprotheseninfektion wie Erythem, Wärme, Schwellung, eitriger Ausfluss, Schmerz</li> <li>Fieber <math>\geq</math> 38 °C mit Aortenprotheseninfektion als wahrscheinlichster Ursache</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>weitere zum Beispiel verdächtige Gas-/ Flüssigkeit- / Weichteilentzündung; Aneurymavergrößerung; Pseudoaneurysmabildung; fokale Darmwandverdichtung; Diszitis/Osteomyelitis; verdächtige metabolische Aktivität in einem FDG PET/CT; radioaktiv markierte Leukozytenwiederaufnahme</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>positive Blutkulturen und keine offensichtlich andere Quelle als die Protheseninfektion</li> <li>abnormal erhöhte Entzündungsparameter mit Protheseninfektion als wahrscheinlichster Ursache, zum Beispiel ESR, CRP, Leukozyten</li> </ul>

**Abbildung 2** Kriterien zur Diagnose einer Aortenprotheseninfektion. Eine Infektion wird vermutet, wenn ein Majorkriterium oder Minorkriterien von zwei der drei verschiedenen Kategorien (klinisch/chirurgisch, radiologisch oder laborchemisch) erfüllt werden. Eine Infektion wird diagnostiziert bei Erfüllung eines Majorkriteriums und eines weiteren Major- oder Minorkriteriums einer beliebigen Kategorie. FDG = Fluordesoxyglucose, PET = Positronen-Emissions-Tomografie, ESR = Erythrocytensedimentationsrate, CRP = C-reaktives Protein. Entnommen und übersetzt aus: Lyons et al.: Diagnosis of Aortic Graft Infection: A Case Definition by the Management of Aortic Graft Infection Collaboration (MAGIC). Eur. J. Vasc. Endovasc Surg. (2016)



### 1.5.2. Infektionswege und Erregerspektrum

Ursächlich werden endogene von exogenen Infektionen unterschieden. Bei endogenen Infektionen stammen die Erreger vom Patienten selbst. Seine natürliche Hautflora oder eine transiente Besiedlung mit Mikroorganismen bilden das Erregerreservoir. Bei exogenen Infektionen stammen die Keime aus der Umgebung des Operationsfeldes. Exogene Quellen können mannigfaltig sein, es werden jedoch in der Regel zwei große Gruppen unterschieden: Entweder stammen die zur Infektion führenden Mikroorganismen vom medizinischen Personal im Operationssaal, zum Beispiel durch Mikroperforationen der Handschuhe, oder sie werden mit kontaminierten Medizinprodukten oder Arzneimittellösungen in das Operationsfeld eingebracht (Taher et al. 2015). Darüber hinaus können Gefäßprothesen auch auf hämatogenem und/oder lymphatischem Wege infiziert werden (Hodgkiss-Harlow und Bandyk 2011).

Das Erregerspektrum bei Protheseninfektionen ist vielfältig. Staphylokokken machen den Großteil aus, wobei *Staphylococcus aureus* vor allem für frühe Infektionen verantwortlich ist. Koagulase-negative Staphylokokken, wie *Staphylococcus epidermidis* verursachen spätere Infektionen (Kaebnick et al. 1987; O'Hara et al. 1986; Rawson et al. 2015). *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Bacteroides fragilis* und *Escherichia coli* können ebenfalls Protheseninfektionen hervorrufen (Calligaro et al. 1992; Rawson et al. 2015). Auch *Candida spp.* sind als Auslöser von Gefäßprotheseninfektionen bekannt (Doscher et al. 1987; Motloch et al. 2011). Treten Infektionen im Zusammenhang mit aortoenterischen Fisteln auf, so lassen sich häufig Anaerobier und Pilze nachweisen (Lyons et al. 2016). Das Vorhandensein mehrerer Erreger ist möglich (O'Hara et al. 1986; Sharp et al. 1994). Aufgrund multipler Resistenzen sind Infektionen durch Methicilin-resistentem *Staphylococcus aureus* (MRSA) und *Pseudomonas aeruginosa* als besonders hartnäckig und mit einem schlechten Outcome für die Patienten beschrieben (Calligaro et al. 1992; Murphy et al. 2001).

### 1.5.3. Management von Gefäßprotheseninfektionen

2016 veröffentlichte die American Heart Association (AHA) ein Positionspapier zur Diagnostik und Therapie von Gefäßtransplantatinfektionen (Wilson et al. 2016, Download 11/07/2019). Die Therapiemaßnahmen unterscheiden sich je nach der Schwere der Infektion. Sie nutzen die auf Samson et al. zurückgehende Klassifikation. Darin werden 5 Schweregrade unterschieden: Bei I ist die Infektion nur auf die Dermis beschränkt. Infektionen, die die Subkutis betreffen, aber ohne Beteiligung der Prothese, werden als II eingestuft. Schweregrad

III klassifiziert Infektionen, die zwar den Prothesenkörper nicht aber die Anastomose einschließen. IV beschreibt Infektionen mit Einbezug der Anastomose, aber ohne Blutstrominfektion. In der letzten Kategorie V präsentiert sich das Vollbild einer Protheseninfektion mit Einschluss der Anastomose und bestehender Sepsis und/oder Blutung (Samson et al. 1988). Bei extrakavitären (außerhalb des Abdomens und des Thorax gelegenen) Gefäßen, einem Samson-Score von III und einer frühen Infektion (unter zwei Monaten) kann ein Versuch zur Rettung des Transplantats unternommen werden. Bei späten Infektionen (über zwei Monate) empfehlen die Autoren die Entfernung und Rekonstruktion. Wenn bei Schweregrad III oder IV eine Infektion mit MRSA, *Pseudomonas spp.* oder einem multiresistenten Keim vorliegt oder der Transplantaterhalt bzw. die *in-situ*-Rekonstruktion ohne Erfolg verlaufen sind, sollte eine extraanatomische Revaskularisierung – Gefäßrevaskularisierungen, bei denen das orthotope Gefäßbett verlassen und der Bypass ektop, meist subkutan verlegt wird (Zühlke und Zühlke 2019) – durchgeführt werden. Bei der Kategorie V sollte dies generell erfolgen. Intraabdominell muss in jedem Fall eine Entfernung des infizierten Materials stattfinden. Anschließend kann die *in-situ*-Rekonstruktion mittels kryokonserviertem, arteriellem Allotransplantat – durch Organspende gewonnenes arterielles Gewebe mit anschließender Lagerung in der Tiefkühlung (Chiesa et al. 2002) – oder venösem Autotransplantat (vom Patienten selbst gewonnene Vene) oder mit einer antimikrobiell beschichteten Prothese durchgeführt werden.

Bei bestehender aortoenterischer Fistel kann auch neben den zuvor genannten Transplantaten ein frisches, arterielles Allotransplantat – auch kältekonserviertes Allotransplantat genannt, von Spendern gewonnene Arterien, die nachfolgend in bestimmtem Medium bei 4°C gelagert werden (Chiesa et al. 2002) – erwogen werden. Falls eine Operation auf Grund des Allgemeinzustandes des Patienten nicht möglich ist oder man sich für eine synthetische Prothese entscheidet, sollte die antibiotische Abschirmung ein Leben lang fortgeführt werden (Wilson et al. 2016, Download 11/07/2019). Kryokonservierte Allotransplantate spielen in Deutschland wegen der nachfolgend erforderlichen Immunsuppression und transplantationsrechtlicher Probleme keine Rolle (Deutsche Gesellschaft für Angiologie - Gesellschaft für Gefäßmedizin 2015, Download 26/04/2016).

Erhobene Daten zur Prognose zeigen deutlich, warum die Gefäßprotheseninfektion eine gefürchtete Komplikation darstellt. Die in Studien ermittelten Raten für die Einjahresmortalität lagen zwischen 28% und 45% (Berger et al. 2015; Setacci et al. 2010; Vogel et al. 2008). Gupta et al. ermittelten eine Krankenhausmortalität von 19,8% nach Explantation des kontaminierten Materials. Die postoperative Morbiditätsrate wurde mit 68,3% angegeben und inkludierte renales, respiratorisches und kardiales Versagen. Die geschätzten Mehrkosten für das Gesundheitssystem wurden in dieser Arbeit mit 640 Millionen Dollar beziffert (Gupta et al. 2016). In Portugal mussten 55% der Patienten nachfolgend amputiert werden und 16%

verstarben (Sousa et al. 2014). In Ulm erhobene Daten zeigten eine Reinfektionsrate von 4,5%, eine Amputationsrate von 12,9% und eine intrahospitale Mortalitätsrate von 18,1% (Mühling et al. 2014).

Das Vorhandensein einer aortoenterischen Fistel stellte einen negativen prädiktiven Faktor der perioperativen, frühen Mortalität dar (Chiesa et al. 2002). In einer von O'Connor et al. durchgeführten Meta-Analyse aus dem Jahr 2006 zur Therapie von Aortentransplantatinfektionen zeigten autologe Venentransplantate und kryokonservierte Alлотransplantate die geringste Reinfektionsrate und eine geringe späte Mortalitätsrate. Generell zeigte die zusammenfassende Betrachtung der Outcomes, dass der *in situ*-Rekonstruktion der Vorrang gegeben werden sollte. Die Autoren stellten damit den Goldstandard-Status der extraanatomischen Rekonstruktion infrage (O'Connor et al. 2006). Batt et al. schlossen ebenfalls aus ihrer Meta-Analyse zur Behandlung von Aortentransplantatinfektionen, dass die *in situ*-Rekonstruktion vorrangig durchgeführt werden sollte. Die Reinfektionsraten unterschieden sich nicht-signifikant bei kryokonservierten Alлотransplantaten und synthetischen Prothesenmaterialien (Batt et al. 2018).

### **1.6. Gefäßprotheseninfektionen – Möglichkeiten der Prävention**

Wie zuvor dargestellt haben Gefäßprothesen ihren Stellenwert in der Gefäßchirurgie als Rekonstruktionsmaterialien. Für den künstlichen Gefäßersatz stehen industriell hergestellte Prothesen aus Kunststofffasern zur Verfügung. Polyethylenglycolterephthalat (Polyester, Dacron) ist die historisch am längsten verwendete Kunststoff-Faser, daneben wird Polytetrafluorethylen (PTFE) verwendet. Die Beschichtung von Polyesterprothesen mit Gelatine oder Kollagen hat den Vorzug, dass im Operationsaal auf ein Preclotting der Prothese verzichtet werden kann (Deutsche Gesellschaft für Gefäßchirurgie und Gefäßmedizin - Gesellschaft für operative, endovaskuläre und präventive Gefäßmedizin 2018, Download 28/06/2019). Es handelt sich dabei um einen Prozess, die poröse Gefäßprothese undurchlässig zu machen. Gefäßprothesen müssen Poren enthalten, damit sie in den Körper nach der Operation einwachsen können. Intraoperativ bei heparinisierten Patienten stellen diese Poren jedoch ein Problem dar und können zu schwerwiegenden Blutungskomplikationen führen (Yates et al. 1978). Gelatine und Kollagen quellen nach der Implantation auf und dichten die Prothese ab (Quiñones-Baldrich et al. 1988), sodass beschichtete Prothesen in randomisierten Studien zu einem geringeren Blutverlust geführt haben (Quarmby et al. 1998). Auf Grund der für den einzelnen Patienten verheerenden Folgen einer Protheseninfektion ist

die Prävention derselben sehr wichtig. Neben perioperativen Hygienemaßnahmen und der Antibiotikaphylaxe ist die Verhinderung der Adhäsion und der nachfolgenden Biofilmbildung von pathogenen Keimen direkt an der Prothese ein wichtiger Ansatz (Taher et al. 2015). Dazu wurden Prothesen mit verschiedenen Oberflächenbeschichtungen entwickelt.

Erste Experimente zu Prothesenbeschichtungen wurden Ende der 1970-iger Jahre in den USA mit Oxacillin durchgeführt. Diese Prothesen zeigten *in vitro* eine erhöhte antibakterielle Aktivität im Vergleich zu unbeschichteten Prothesen (Jagpal und Greco 1979). Spätere Hundestudien mit Oxacillin, welches mittels Benzalkoniumchlorid an PTFE-Prothesen gebunden worden war, zeigten, dass diese Prothesen gegen eine Kontamination mit *Staphylococcus aureus* wirksam waren und dass sie die Überlebenswahrscheinlichkeit erhöhten (Greco und Harvey 1982).

Chervu et al. verglichen *in vitro* doppelt-Velours Dacron-Prothesen ohne und mit verschiedenen Beschichtungen hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Wirkungen gegen *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis*. Als antibiotische Auftragungen wählten sie Amikacin, Chloramphenicol oder Rifampin (= Rifampicin) und stellten fest, dass die Rifampin-Kollagen-Beschichtung *in vitro* gegen Protheseninfektionen beider Keime schützen konnte (Chervu et al. 1991a). In einem Tierexperiment an Hunden konnten sie die Wirksamkeit der Rifampin-Kollagen-Prothese für *Staphylococcus aureus* bestätigen (Chervu et al. 1991b). Eine deutsche *in vitro*-Studie verglich die Wirksamkeit von Daptomycin-, Rifampin- und Nebacetin (Neomycin-Sulfat)-Prothesenimprägnierungen. Die beste Wirksamkeit gegenüber grampositiven und gramnegativen Bakterien wies Nebacetin auf (Bisdas et al. 2012). Zwei Berichte aus Großbritannien und Deutschland zeigten gute Ergebnisse nach *in situ*-Rekonstruktionen mit Rifampicin-behandelten Prothesen bei Patienten mit infizierten Gefäßprothesen. Das Erregerspektrum umfasste gramnegative und grampositive Bakterien. Alle der insgesamt zehn therapierten Patienten waren auch vier Monate nach Operation symptomfrei und ohne Nachweis einer Infektion. Kein Patient verstarb in der peri- und frühen postoperativen Phase (Naylor et al. 1995; Torsello et al. 1993). Mehrere Studien zur postoperativen Infektionsrate nach einem Monat beziehungsweise nach zwei Jahren sahen jedoch keine signifikant verbesserte Wirkung durch Rifampicin-Imprägnierung (Braithwaite et al. 1998; D'Addato et al. 1996; Earnshaw et al. 2000). Herten et al. bescheinigen Rifampicin sogar eine hohe Zytotoxizität *in vitro* (Herten et al. 2017).

Die von O'Connor et al. durchgeführte Meta-Analyse aus dem Jahr 2006 zur Therapie von Aortentransplantatinfektionen verglich Daten von Patienten, die mit extraanatomischen Bypassen, Rifampicin-beschichteten Prothesen, kryokonservierten Allotransplantaten oder autologen Venentransplantaten therapiert worden waren. Danach wiesen Rifampicin-beschichtete Prothesen die geringste mittlere Rate an Amputationen, Leitungsversagen und früher Mortalität auf. Jedoch waren die Reinfektionsraten am höchsten (O'Connor et al. 2006).

Manouguian berichtete 1996 über zwei Fälle von Patienten, die eine Gefäßprotheseninfektionen hatten und nachfolgend eine *in situ*-Rekonstruktion mittels einer mit Triclosan-beschichteten Prothese bekamen. Kontrollen nach ungefähr einem postoperativen Jahr ergaben keinen Anhalt für eine persistierende Infektion (Manouguian 1996). Bereits 1979 konnte gezeigt werden, dass Triclosan, welches zur Gruppe der polychlorierten Phenoxyphenole gehört, sowohl gegen grampositive als auch gegen gramnegative Bakterien und Pilze wirksam war (Regös et al. 1979). In einer tierexperimentellen Studie an Schweinen wurde deutlich, dass Triclosan-beschichtete Prothesen effektiv Protheseninfektionen verhinderten, jedoch die *in situ*-Rekonstruktion mit dieser im Tierversuch bei bereits vorhandener Infektion keine erfolgreiche Therapie darstellte (Hernández-Richter et al. 2000).

Ab 1986 folgten Experimente, die die Wirkung von Silber zur Abwehr von Gefäßprotheseninfektionen zum Gegenstand der Untersuchungen machten. Benvenisty et al. implantierten Hunden PTFE-Prothesen, welche zuvor mit Silber-Oxacillin oder Silber-Amikacin imprägniert worden waren, und infizierten diese dann mit *Staphylococcus aureus*. Nach einer Woche wurde die Koloniezahl, die an den Prothesen anhaftete, bestimmt. Für beide Silber-Antibiotika-Prothesen ergab sich eine signifikant geringere Anzahl an Bakterienkolonien gegenüber den Vergleichsproben (Benvenisty et al. 1988). In Experimenten an Mäusen von Hernandez-Richter et al. hingegen konnte die Silberimprägnierung von Prothesen eine Infektion nicht abwenden. Verglichen wurden Gel-beschichtete Dacron-Prothesen ohne und mit verschiedenen antimikrobiellen Beschichtungen (Silber-Kollagen-beschichtete, Silber/Gel-versiegelte, Rifampin-gebundenen Gel-versiegelten und Triclosan/Kollagen-beschichteten Dacron-Prothesen). Die Infektion erfolgte mit *Staphylococcus aureus*. Bei den Silber-enthaltenden Prothesen kam es in sechs von sechs Mäusen zu Protheseninfektionen. In der Rifampin-Gruppe infizierte sich nur eine Prothese und in der Triclosan-Gruppe konnte in vier von sechs Fällen *Staphylococcus aureus* angezüchtet werden. Für Rifampin konnte eine signifikant verminderte Infektionsrate ermittelt werden (Hernández-Richter et al. 2003). Eine weitere tierexperimentelle Studie an Hunden attestierte Rifampin-gebundenen Prothesen eine signifikant größere Resistenz gegenüber einer *Staphylococcus aureus*-Infektion als der Silbervergleichsgruppe (Goëau-Brissonniere et al. 2002). Auch bei Versuchen an Schweinen konnte die Silberprothese eine Infektion nicht verhindern (Gao et al. 2010).

*In vitro*-Versuche mit Silber- und Gentamicin- bzw. Amikacin-beschichteten Grafts schrieben den Aminoglykosiden ein größeres Potential zur Vermeidung von Infektionen durch Staphylokokken und *Escherichia coli* zu als der verwendeten Silberprothese zu (Osinska-Jaroszuk et al. 2009).

Andere *in vitro* Studien beschrieben eine bakterizide Wirkung von Silber-Kollagen-Prothesen auch gegen MRSA (Ricco et al. 2012).

In Frankreich wurden im Zeitraum von 17 Monaten 289 Patienten in einer prospektiven multizentrischen Studie mit einer Silber-Kollagen-Prothese als Aortenersatz versorgt. Keiner der Patienten hatte zuvor eine Gefäß- oder Gefäßprotheseninfektion. Niemand entwickelte eine frühe Infektion trotz einer hohen Rate an nosokomialen Infektionen. Nach einem Jahr wurden lediglich zwei späte Protheseninfektionen diagnostiziert. Diese machten einen Gesamtanteil von 0,7% aus (Ricco 2006). In einer weiteren retrospektiven Analyse von implantierten Gefäßprothesen bei Patienten ohne vorherige Infektion unterschieden sich Silber-beschichtete Prothesen nicht von den sonst verwendeten Standardprothesen. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen Silber-beschichteten und Silber-freien Prothesen hinsichtlich der Infektionsraten (Larena-Avellaneda et al. 2009).

Zegelman et al. werteten im Rahmen einer prospektiven, multizentrischen Beobachtungsstudie Daten von Hochrisikopatienten aus, die entweder beeinträchtigende Komorbiditäten aufwiesen (n=220) und/oder eine bestätigte Protheseninfektion oder eine Infektion der nativen Gefäße (n=10) aufwiesen. Bei allen Patienten waren Silber-beschichtete Gefäßprothesen implantiert worden. In der Gruppe der Patienten ohne vorherige Infektion betrug die Mortalitätsrate 18,6% und die Infektionsrate 4,1%. Bei den 10 Patienten mit bestehender Infektion kam es in einem Fall zu einer Reinfektion. Angaben zu den verursachenden Erregern wurden nicht publiziert. Die Autoren bewerteten diese Zahlen positiv, da die Ausprägung des Krankheitsgrades in ihrem Patientenkollektiv hoch gewesen sei und diese zu Verläufen mit Komplikationen neigen würden (Zegelman et al. 2013).

Pupka et al. verglichen die *in situ*-Rekonstruktion bei Patienten mit Aortenprotheseninfektion mittels arterieller Allotransplantate mit oder ohne Immunsuppression mit der einer silberbeschichteten Prothese. Das Erregerspektrum umfasste MRSA als häufigsten Verursacher, *Staphylococcus epidermidis* und *Pseudomonas aeruginosa*. Die Silberprothesenuntergruppe zeigte eine postoperative Sterblichkeitsrate von 11% und die Morbiditätsrate lag bei 7%. Eine Reinfektion trat nur bei einem Patienten auf, kulturell wurde *Staphylococcus epidermidis* nachgewiesen. Insgesamt unterschieden sich diese Ergebnisse nicht signifikant von denen der Vergleichsgruppen. Die Autoren schlossen daraus, dass Silberprothesen im Rahmen der Behandlung bereits infizierter Prothesen die gleiche Effektivität wie das homologe Ersatzverfahren durch arterielle Allotransplantate aufwiesen (Pupka et al. 2011).

Eine weitere prospektive, multizentrische Studie untersuchte 27 Patienten mit mykotischen Aortenaneurysmata (n=3) und mit Gefäßprotheseninfektionen (n=24). Bei 13 Patienten bestanden aortoenterische Fisteln. Das Erregerspektrum umfasste grampositive und gramnegative Bakterien. Bei 5 Patienten wurde *Candida albicans* nachgewiesen. Nachdem das Aneurysma reseziert bzw. die infizierte Prothese explantiert worden war, wurde eine *in situ*-Rekonstruktion mit einer Silber-beschichteten Polyesterprothese durchgeführt. Alle

Patienten erhielten eine supportive antimikrobielle Therapie, die ein breites Spektrum an Erregern abdeckte. Die perioperative Mortalität betrug 16,6%. Es mussten keine Majoramputationen erfolgen. Von einer Reinfektion waren zwei Patienten betroffen. Bei einem Patienten wurde MRSA nachgewiesen, bei dem anderen Patienten *Bacteroides fragilis* im Rahmen einer Septikämie. Eine Reinfektion der Silberprothesen durch *Candida albicans* wurde bei keinem Patienten beobachtet (Batt et al. 2003).

In einer Meta-Analyse aus dem Jahr 2018 wurden antimikrobiell beschichtete Gefäßprothesen (Silber, Rifampicin) mit nicht-antimikrobiell beschichteten Standardprothesen hinsichtlich ihrer Reinfektionsrate bei Patienten mit bakteriellen Gefäßprotheseninfektionen verglichen. Im Vergleich zu Standardprothesen zeigten antimikrobiell beschichtete Prothesen eine signifikant niedrigere Reinfektionsrate (9% versus 20%). Allerdings konnte kein Unterschied zwischen Rifampicin und Silber nachgewiesen werden. Pilze gehörten nicht zum Erregerspektrum (Batt et al. 2018).

### **1.7. Silber und sein Einsatz als antimikrobielle Substanz**

Silber, ein weißes und glänzendes Metall, findet seit Jahrhunderten in verschiedensten Bereichen Anwendung – unter anderem als Schmuck, Währung, Besteck, Zahnfüllungen, in der Elektroindustrie, für Fotografien, für Sprengstoffe und zur Reinigung von Wasser (Haynes 2017). Seit dem 17. Jahrhundert wurde es auch nachweislich medizinisch genutzt zur Bekämpfung der Epilepsie und der Cholera (Edwards-Jones 2009). Ende des 19. Jahrhunderts verwendete Credé Silbernitrat-Augentropfen, um die Erblindung von Neugeborenen durch Gonokokken zu bekämpfen (Russell und Hugo 1994) und bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts gebrauchte der Chirurg Halstead Silberverbände (Silver et al. 2006). In den 1920-iger Jahren erlaubte die American Food and Drug Administration (FDA) die Verwendung von Silber als antibakterielles Agens (Demling und DeSanti 2001). Seit Mitte des 20. Jahrhunderts werden Silberverbindungen großflächig zur Therapie von Verbrennungen angewendet (Barillo und Marx 2014; Wright et al. 1999). Auch gegen chronische Osteomyelitis konnte Silber erfolgreich eingesetzt werden (Becker und Spadaro 1978).

Silber als Metall ist inert. Kommt es jedoch mit wässrigem Milieu in Berührung (wie Wasser, Wundexsudate oder Sekrete), dann wird es mittels Oxidation ionisiert. Das entstandene Ion ist sehr reaktionsfreudig und für die Mehrzahl der antimikrobiellen, aber auch der toxischen Eigenschaften verantwortlich (Sterling 2014). Die Wirkungsrate ist dabei direkt proportional zur Konzentration an vorhandenen Silberionen, das heißt, je mehr Silberionen vorliegen, desto größer ist der antimikrobielle Effekt (Schierholz et al. 1999).

Silber ist kein Spurenelement für den Menschen und ein physiologischer Nutzen ist nicht

bekannt (Gupta et al. 2001; Lansdown 2005). In die Umwelt erfolgt die Freisetzung durch natürliche Verwitterung von Steinen, der Ausspülung des Bodens durch Regen und durch menschliches Zutun wie Zementherstellung und Verbrennung fossiler Stoffe (US Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease 1999, Download 24/06/2019). Der Blutgehalt normaler Individuen wird auf unter 2,3 µg/l geschätzt (Wan et al. 1991). Die täglich oral aufgenommene Menge soll bei 27 bis 88 µg/d liegen (Hamilton und Minski 1973). Die Toxizität von Silber steht in direktem Verhältnis mit der aufgenommenen Menge. Die tatsächliche Aufnahme von Silber nach Exposition ist schwer zu ermitteln. Ergebnisse aus tierexperimentellen Studien lassen sich schwer auf den Menschen übertragen (Lansdown 2010). Man vermutet, dass perkutan weniger als 4% in den Organismus gelangen (Norgaard 1954) und dass die Rate bei Aufnahme über den Gastrointestinaltrakt bei ≤ 10% liegt (Furchner et al. 1968).

Insgesamt werden die Nebeneffekte von Silber und die damit verbundene Gesundheitsgefährdung als gering eingestuft. Allergien auf Silber sind eine Seltenheit (Sterling 2014). Blau-graue Hautverfärbungen durch Silbereinlagerungen werden als Argyrie bezeichnet und Ablagerungen im Bereich des Auges als Argyrosis. Sie sind selten, häufig mit übermäßigem Gebrauch/Konsum von Silberverbindungen assoziiert und die Folgen für die betroffene Person sind vor allem kosmetischer Natur (Bracey et al. 2018; Sarnat-Kucharczyk et al. 2016; Timmins und Morgan 1988). Laut der WHO liegt die oral aufgenommene Lebensdosis, bei der keine toxischen Effekte zu erwarten sind, bei mindestens 10 g Silber (WHO 2017, Download 27/08/2020).

Trotz der jahrhundertelangen Anwendung von Silber und dem Wissen um seine antimikrobiellen Effekte ist der Wirkmechanismus nicht eindeutig geklärt (Feng et al. 2000). Silber als Biozid hat mehrere Angriffspunkte und deshalb weist es im Gegensatz zu Antibiotika, die sehr spezifische Wirkungsorte haben, ein breites Wirkspektrum und eine geringe Resistenzentwicklung auf (Percival et al. 2005). Zum Wirkspektrum gehört auch *Candida albicans*. Die *in vitro* bestimmte minimale Hemmkonzentration (MHK) gegenüber *Candida albicans* betrug 70 mg/l, mehr als doppelt so groß im Vergleich zu *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* (Humphreys et al. 2011). Silber ist neben Osmium das am meisten fungizid wirkende Metall (Berger et al. 1976). Bakterizide Wirkungen gegen die meisten klinisch relevanten Bakterien liegen im Konzentrationsbereich von 5 bis 50 parts per million (ppm) (Hall et al. 1987; Yin et al. 1999), für die MHK<sub>50</sub> gegen MRSA wurde ein Wert von 85 mg/l bestimmt (Maple et al. 1992). Versuchsreihen von Harrison et al. erwiesen, dass Metallionen – unter anderem auch Silber – das Wachstum und die morphologische Zusammensetzung von *Candida albicans*-Biofilmen beeinflussen (Harrison et al. 2007a). Die Aktivität von Silber wird durch Temperatur- und pH-Wert-Veränderungen beeinflusst (Maillard und Hartemann 2013).



Die Möglichkeit der Resistenzbildung von Mikroorganismen gegenüber Silber wird vielfach wegen dessen vielfältigen und unkontrollierten Einsatzes diskutiert. Noch scheinen Resistenzen selten zu sein und vor allem gramnegative Bakterien zu betreffen (Jakobsen et al. 2011). 1975 führte ein widerstandsfähiger *Salmonella typhimurium*-Stamm zu Todesfällen auf einer Verbrennungsstation. Das Plasmid pMG101, welches in dem multiresistenten Stamm identifiziert werden konnte, enthielt neben den für die Silberresistenz verantwortlichen Genen auch die Information für eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegen Quecksilber und mehrere Antibiotika (McHugh et al. 1975). Durch Transkription und Translation entstehen drei Proteine, die den Silberresistenzmechanismus vermitteln: das periplasmatische Ag(I)-Bindungsprotein SilE, ein chemiosmotischer Kationen/Protonen-Antiporter SilCBA und eine Adenosintriphosphatase (ATPase)-Effluxpumpe SilP. Sie sorgen dafür, dass Silber vom Zytoplasma in den periplasmatischen Raum oder nach außen geschleust wird (Gupta et al. 1999). Loh et al. untersuchten MRSA und Methicilin-resistente Koagulase-negative (MR-CNS-) *Staphylokokken* von Menschen und Tieren auf die Prävalenz von Silberresistenzgenen und die Wirksamkeit eines Silber-enthaltenden Wundverbandes. Ihre Teststämme zeigten eine geringe Prävalenz an Silberresistenzgenen Sil und das Vorhandensein dieser in einzelnen Stämmen schützte diese nicht vor der Wirkung des Wundverbandes (Loh et al. 2009). Kremer et al. hingegen konnten in von Patienten gewonnenen *Enterobacter cloacae*-Stämmen ein häufiges Vorhandensein von Silberresistenzgenen bestätigen. Sie wiesen *in vitro* auch eine erhöhte Toleranz dieser gegenüber Silber nach (Kremer und Hoffmann 2012). Für *Candida albicans* wurde inzwischen die ATPase Crd1p entdeckt, die Kupfer transportiert und so für die hauptsächliche Kupferresistenz verantwortlich ist. Sie besitzt *in vitro* auch die Fähigkeit, eine Silberresistenz zu vermitteln (Riggle und Kumamoto 2000).

Auf Grund der weltweit zunehmenden Resistenzentwicklung gegenüber Antibiotika wird intensiv nach Alternativen geforscht. Silber scheint auf Grund der oben genannten Eigenschaften eine solche zu sein. Seine Verbindungen oder neuerdings auch Nanopartikel werden bei Wundheilungsmaterialien und verschiedensten Implantaten eingesetzt. Es ist unter anderem Bestandteil von medizinischen Kathetern, Knochenzement, chirurgischem Nahtmaterial, Verbänden, kardiovaskulären Prothesen und Zahnfüllungen (Lansdown 2010). Gabriel et al. berichteten, dass die Adhäsion von *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* und *Klebsiella pneumoniae* an Silberbehandelten Urinkathetern aus Silikon oder Latex verringert war im Vergleich zu Kathetern ohne Silberimprägnierung (Gabriel et al. 1995). Bei Ogilvie et al. verringerten Urinkatheter mit Silber *in vitro* signifikant das Adhären von *Escherichia coli* (Ogilvie et al. 2015). Silberbeschichtete zentralvenöse Katheter (ZVK) reduzierten die Inzidenz Katheterassoziierter Infektionen bei onkologischen Patienten (Goldschmidt et al. 1995). Signifikant weniger adhärenente Bakterien an der Außenseite konnte bei mit Chlorhexidin-Silbersulfadiazin-

imprägnierten ZVK in einer tierexperimentellen Studie nachgewiesen werden. Elektronenmikroskopisch war keine Biofilmbildung wie bei der Kontrollgruppe zu sehen (Greenfeld et al. 1995). *In vitro*-Studien an chirurgischem Nahtmaterial bescheinigen Nähten mit Silberbehandlung ein geringeres Anhaften von *Staphylococcus epidermidis* (Pratten et al. 2004).

Im Gegensatz dazu fanden Antonelli et al. keinen signifikanten Unterschied zwischen zentralvenösen Kathetern mit und ohne Silberbeschichtung was die Kolonisationsraten, die Katheter-assoziierten Blutstrominfektionen, die infektionsfreie Zeit und die Sterblichkeit auf der Intensivstation betraf (Antonelli et al. 2012). Hagau et al. sahen ebenfalls keine signifikante Differenz der Kolonisationsraten wohl aber bei der Inzidenz der Kolonisation und der Infektion in Anbetracht der Zeit. Standardkatheter waren nach 3 Tagen besiedelt, Katheter mit Silber nach 5 Tagen (Hagau et al. 2009). Untersuchte Silber-Hydrogel-Urinkatheter führten nur zu einer nicht-signifikanten Reduktion der Anzahl der Katheter-assoziierten Infektionen gegenüber normalen Kathetern (Lai und Fontecchio 2002).

### **1.8. Zielsetzung der Arbeit**

Wie oben beschrieben, können Infektionen von Gefäßprothesen für den Einzelnen erhebliche Folgen haben. Pilzinfektionen verlaufen in der Regel besonders dramatisch und sind mit einer hohen Morbidität und Mortalität vergesellschaftet.

Zur Behandlung einer Gefäßprotheseninfektion wird neben der antimikrobiellen Therapie die Entfernung der infizierten Prothese und eine *in situ*-Rekonstruktion durch Implantation einer antimikrobiell beschichteten Prothese, wie zum Beispiel eine Silber-beschichtete Polyesterprothese, empfohlen. Untersuchungen zur Wirksamkeit mit Silber beschichteter Gefäßprothesen beziehen sich vor allem auf bakterielle Infektionen. Bei Patienten mit abdominellen mykotischen Aneurysmen oder mit aortoenterischen Fisteln können Gefäßprotheseninfektionen auch durch *Candida albicans* verursacht werden. Eine Besiedlung auf hämatogenem Weg ist ebenfalls möglich. Der Einfluss der Silberbeschichtung von Gefäßprothesen auf *Candida albicans* wurde bisher jedoch kaum beleuchtet. Ziel der Arbeit war es daher, den Effekt von Silber-Kollagen-beschichteten Prothesen auf das Wachstum und die Biofilmbildung von *Candida albicans in vitro* zu untersuchen. Dabei wurden *Candida albicans*-Stämme mit unterschiedlicher Pathogenität verwendet, um gegebenenfalls Stammspezifische Unterschiede herauszustellen.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Prothesen

Es wurden zwei verschiedene Prothesen für die Versuche verwendet. Die erste Prothese war die InterGard Silver der Firma InterVascular (Datascope Company) aus Frankreich. Es handelte sich um eine Silberazetat-enthaltende, mit quervernetztem Rinderkollagen-beschichtete gestrickte Gefäßprothese aus Polyester. Laut Angaben des Herstellers kann sie nach Implantation bis zu 7 Tage Silber freisetzen und so antibakteriell gegen Biofilm-produzierende Bakterien wie Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* und *Pseudomonas aeruginosa* wirken. Diese Prothese wird im Folgenden als P1 bezeichnet werden.

Die zweite verwendete Prothese war die mit quervernetztem Rinderkollagen-beschichtete, gestrickte Polyester-Prothese InterGard Knitted (ebenfalls gefertigt von InterVascular, Datascope Company). Diese enthielt im Gegensatz zur ersten Prothese kein Silberacetat. Sie wird im Folgenden als P3 bezeichnet werden.

Gestrickte Prothesen werden standardmäßig zum Ersatz großer Gefäße verwendet (Deutsche Gesellschaft für Gefäßchirurgie und Gefäßmedizin - Gesellschaft für operative, endovaskuläre und präventive Gefäßmedizin 2018). Sie sind biegsam, anpassungsfähig und leicht einzunähen. Das Problem der größeren Permeabilität wurde mittels der Kollagenbeschichtung gelöst. Sie macht die Prothese impermeabel und ein Preclotting so unnötig (Quiñones-Baldrich et al. 1988).

Beide Prothesen wurden steril verpackt geliefert. Für die Versuche wurden die Prothesen mit einer handelsüblichen Stanze ausgestanzt, sodass sie jeweils einen Durchmesser von 12 mm aufwiesen. Die Stanze wurde vor jeder Anwendung für 30 Minuten in ein zur Instrumentendesinfektion empfohlenes Desinfektionsmittel (2,5%-ige Secusept® Plus-Lösung) eingelegt und anschließend gründlich mit Aqua dest. abgespült, um Desinfektionsmittelreste zu entfernen.

Als Vergleichsmaterial dienten Polystyrenscheiben mit einem Durchmesser von 13 mm (Thermanox® coverslips, Firma Nunc GmbH und Co. KG, Langenselbold, Deutschland).

#### 2.1.2. Stämme

Es wurden die zwei *Candida albicans*-Stämme – *Candida albicans* SC 5314 und *Candida*

*Candida albicans* American Type Culture Collection (ATCC) 10231 (DSM 1386) – verwendet. *Candida albicans* SC 5314 wurde ursprünglich von einem Patienten mit disseminierter Candidiasis gewonnen (Gillum et al. 1984) und gilt als der am besten charakterisierte Stamm (Fonzi und Irwin 1993). Inzwischen ist sein gesamtes Genom sequenziert (Jones et al. 2004). *Candida albicans* SC 5314 wird als invasiver und virulenter Stamm beschrieben (Kretschmar et al. 1999; Thewes et al. 2007). *Candida albicans* ATCC 10231 hingegen ist nicht-invasiv und besitzt eine stark abgeschwächte Virulenz (Kretschmar et al. 1999; Thewes et al. 2007). Er wurde häufig für pharmakologische Studien verwendet (Corona et al. 2006; Feng et al. 2005). *Candida albicans* ATCC 10231 zeigt *in vitro* eine erhöhte Resistenz gegenüber Itraconazol, Ethanol und 5-Fluororotsäure (Thewes et al. 2008).

### 2.1.3. Verbrauchsmaterialien

Aluminiumfolie	Laborbedarf
Cryobank	Mast Diagnostica
Dichtungsringe	Baumarktfachhandel
Entsorgungsbeutel	Carl Roth
Glaswaren (Spatel, Zentrifugenröhrchen, Erlenmeyerkolben)	Laborbedarf
Latexhandschuhe (Peha-Soft®)	Paul Hartmann
Mikrotiterplatten (6 Vertiefungen)	Greiner Bio-One
Mikrotiterplatten (12 Vertiefungen)	Greiner Bio-One
Mikrotiterplatten (48 Vertiefungen)	Greiner Bio-One
Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen)	Greiner Bio-One
Mullkompressen	Fuhrmann
Nagellack	Drogeriehandel
Nitrilhandschuhe (Nobaglove®)	Noba Verbandmittel Danz
Objektträger und Deckgläser	ThermoScientific
Pinzetten	Laborbedarf
Pipettenspitzen 100 µl (Ultratip)	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen 1000 µl	Sarstedt
Plastikösen (10 µl)	Greiner Bio-One
Sterile Spritzen (10 ml)	BD
Sicherheitsröhrchen (Safe-lock tubes, 1,5 ml / 2 ml)	Eppendorf
Spritzenfilter (Porengröße 0,22 µm)	Carl Roth

Stieltupfer (Raucotupf)	Lohmann-Rauscher
Zellschaber (32cm)	Fischer Scientific
Zentrifugenröhrchen (15 ml / 50 ml)	Greiner Bio-One

#### 2.1.4. Geräte

Autoklavenautomat	Heraeus Instruments
Brutschrank	Heraeus Instruments
Cleanbench (Hera Safe)	Heraeus Instruments
Digitalwaage (MXX-412)	Denver Instruments
Fluoreszenzmikroskop (BX 51)	Olympus
Gefrierschrank (-80 °C)	Heraeus Instruments
Inkubator (Cytoperm 2)	Heraeus Instruments
Kühlschrank (Liebherr Comfort, 8 °C und -20 °C)	Liebherr
Mikroplatten-Reader (Dynatech MR 5000)	Milenia Biotec
Multidetektoren-Mikroplatten-Reader (Synergy HAT)	BioTek
Phasenkontrastmikroskop (IMT-2)	Olympus
Pipetten (verschiedene Zugvolumina)	Eppendorf
Schwenkinkubator – Pilze (Inkubator 1000 und Unimax 1010)	Heidolph
Spektrophotometer	Eppendorf
Tischzentrifuge (Centrifuge 5415 C)	Eppendorf
Trübungsmessgerät (Densi Check)	Biomerieux
Ultraschallgerät (Ultrasonic Cleaner 200T)	VWR
Vortexer (Reax top)	Heidolph
Zellzähler (Cell-Dyn 1800)	Abbott
Zentrifuge (Rotana/TRC)	Hettich

**2.1.5. Nährmedien und Nährplatten**

Columbia 5%-Schafsblut-Agar	BD
Sabouraud -Glucose-Agar (ohne Zusätze)	Merck
Yeast peptone dextrose (YPD)	25 g auf 500 ml A. dest., autoklaviert, Fa. Sigma

**2.1.6. Lösungen und Pulver**

3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	VWR
Aceton	VWR
Aqua dest.	Zentralapotheke
ConA	Invitrogen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) mit Mg und Ca (10mM Phosphat-Puffer, 2,7mM Kaliumchlorid, 137mM Natriumchlorid, pH 7,4)	Lonza
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) ohne Mg und Ca (10mM Phosphat-Puffer, 2,7mM Kaliumchlorid, 137mM Natriumchlorid, pH 7,4)	Lonza
Ethanol (99%)	Zentralapotheke
Fetales Kälberserum (FKS, fetal calf serum; nicht Hitze inaktiviert)	Gibco
FUN-1 Zellfärbung (10 mM Lösung in wasserfreiem Dimethylsulfoxid, DMSO)	Invitrogen
Glucose	Merck
Glycerol gepuffert mit PBS (pH 8,4)	Euroimmun
Menadion	Sigma
Natriumhydroxid	Merck
RPMI-1640 mit L-Glutamin	Gibco

RPMI-1640 mit L-Glutamin (Pulver)	Merck
Secussept Plus Lösung (2,5%)	ECOLAB Helathcare
Silbernitratlösung (2,5%)	Sigma
XTT (Pulver)	Sigma

### 2.2. Methoden

#### 2.2.1. Herstellung von Glycerinstocks

Zur Langzeitkonservierung wurden die beiden verwendeten *Candida albicans*-Stämme bei -80 °C in Cryobank-Röhrchen gelagert.

Aus diesen wurde eine Kugel auf Sabouraud (SAB)-Glucose (2%)-Agar ausgerollt und für 24 Stunden bei 30 °C inkubiert. Von den gewachsenen Kolonien wurden drei bis fünf mit einer sterilen Öse angetippt und erneut auf SAB-Glucose (2%)-Agar ausgestrichen. Diese Platte wurde erneut für 24 Stunden bei 30 °C bebrütet. Nach dem zweiten Überimpfen wurden von den gewachsenen Kolonien wiederum drei bis fünf mindestens 1 mm große Kolonien abgenommen und in 100 ml Hefeextrakt- Pepton- Dextrose-Medium (Yeast extract Peptone Dextrose; YPD) suspendiert. Die Suspension wurde als Übernachtskultur bei 30°C und 170 Rotationen pro Minute (rpm) auf dem Schwenkinkubator belassen.

Für den täglichen Gebrauch wurden Glycerinstocks angelegt. Dazu wurden 300 µl Glycerin und 1200 µl der *Candida*-Bouillon in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Als Kontrolle möglicher Verunreinigungen erfolgte ein Ausstreichen der Suspension und von Material aus den eingefrorenen Glycerinstocks auf Columbia-Agar mit 5% Schafblut (Schafblut-Agar). Die Platten wurden bei 37 °C bebrütet und nach 24 und 48 Stunden visuell auf mögliche Kontaminationen hin untersucht.

#### 2.2.2. Herstellung von Flüssigkulturen

Zur Herstellung der Flüssigkultur wurde Material von den Glycerinstocks mit Hilfe einer sterilen 10 µl-Öse (1 volle Öse) in einen Erlenmeyer-Kolben mit 100 ml YPD-Medium überführt. Die Kultur wurde als Übernachtskultur bei 30°C und 200 rpm auf dem Schwenkinkubator bewegt.

### 2.2.3. Extraktion und Reinigung der Pilzzellen

Von der Übernacht-Flüssigkultur wurden 7 ml entnommen und in einem Reagenzglas mit Schraubverschluss 5 Minuten bei 1500 U zentrifugiert. Das so am Grund entstandene Pellet wurde zweimal gewaschen. Dazu wurde der Überstand dekantiert und das Pellet in 7 ml Phosphatgepufferter Salzlösung (Phosphate buffered saline; PBS) ohne Magnesium (Mg) und Kalzium (Ca) resuspendiert. Es erfolgte erneut ein 5-minütiges Zentrifugieren bei 1500 U. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt. Danach wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 7 ml Zellkulturmedium (RPMI oder RPMI mit 50% FKS) resuspendiert.

### 2.2.4. Einstellung der Konzentration der Pilzsuspension am Hämozytometer

Von der im Arbeitsschritt zuvor gewonnenen Pilzellensuspension wurde 1 ml in ein 15 ml-Falcon-Schraubgefäß gegeben und mit 10 ml Zellkulturmedium (RPMI oder RPMI mit 50% FKS) versetzt (1:10 Verdünnung). Davon wiederum wurde 1 ml in ein 1,5 ml fassendes Eppendorf-Röhrchen pipettiert und dessen Zellzahl am Hämozytometer (Cell-Dyn) bestimmt. Diese wurde dann genutzt, um eine Suspension mit einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  koloniebildende Einheiten (KBE)/ml zu erhalten. Folgende Formeln kamen zur Anwendung:

$$\begin{aligned} & \text{Menge an Zellsuspension [ml]} \\ &= \frac{\text{Gewünschte Zellzahl [ml}^{-1}] \times \text{Gewünschtes Gesamtvolumen [ml]}}{\text{Zellzahl aus der Zählung am Cell – Dyn [ml}^{-1}]} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \text{Menge an Medium [ml]} \\ &= \text{Gewünschtes Gesamtvolumen [ml]} - \text{Menge an Zellsuspension [ml]} \end{aligned}$$

### 2.2.5. Kultivierung von Biofilmen

Zur Kultivierung von *Candida albicans*-Biofilmen an Gefäßprothesenmaterial wurde die Methode von Chandra et al. (Chandra et al. 2001a) verwendet und wie nachfolgend beschrieben angepasst. Die Anzucht erfolgte in Zellkulturplatten mit flachem Boden.

Von der mit einer Konzentration von  $1 \times 10^6$ -KBE/ml eingestellten Suspension aus *Candida*



*albicans* und Zellkulturmedium (RPMI oder RPMI mit 50% FCS) wurden jeweils 3 ml in eine 12-Loch-Platte gegeben. Anschließend wurden ausgestanzten Prothesenstücke der jeweiligen Prothese und die Polystyrenscheiben in verschiedene Vertiefungen der Zellkulturplatte eingelegt und bei 37 °C, 5 % Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) und 90% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Je nach Fragestellung wurden unterschiedlich lange Inkubationszeiten gewählt.

Die anfänglichen Versuche dienten dem Ziel, die Adhäsionszeit zu bestimmen, das heißt die Zeit, bei der die größte Anzahl an *Candida*-Zellen an der jeweiligen Prothese anhaftete. Es wurden Inkubationszeiten von 1, 1,5, 2 und 3 Stunden gewählt.

Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurde die Platte aus dem Inkubator genommen und die einzelnen Vertiefungen unter dem Phasenkontrastmikroskop visuell beurteilt (siehe 2.3.1.).

Für die Experimente zur Untersuchung von Biofilmen an den Gefäßprothesen wurde eine Adhäsionszeit von 1,5 Stunden festgelegt. Nach Ablauf dieser Zeit wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Dazu wurden die Prothesenstücke aus der 12-Loch-Platte mit einer sterilen Pinzette entnommen und in eine 6-Loch-Platte, in der zuvor jeweils 3 ml PBS ohne Mg und Ca vorgelegt worden waren, zweimal in verschiedene Wells eingetaucht und so gewaschen. Dieser Schritt diente dem Entfernen nicht-anhaftender Zellen. Für die mitgeführten Polystyren-Scheiben wurde der Waschschrift modifiziert. Die Slides wurden in der 12-Loch-Platte belassen und das alte Medium mit einer Pipette entfernt. Anschließend wurden 3 ml PBS ohne Mg und Ca vorsichtig in die Vertiefungen gegeben, die Platte kurz geschwenkt und das Medium wieder entfernt. Der Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurden die Prothesen und die Polystyrenscheiben in eine neue 12-Loch-Platte überführt, in der bereits neues Medium vorgelegt war. Die Platten wurden für weitere 24, 48, 72 oder 96 Stunden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Für die Anzucht wurde RPMI-1640 –Medium oder RPMI-1640-Medium mit 50% FKS verwendet.

Nach Ablauf der Inkubationszeit für die Biofilmbildung wurden die Platten erneut unter dem Phasenkontrastmikroskop angesehen. Dabei wurde geprüft, ob Pilzzellen im Medium vorhanden waren und ob morphologische Veränderungen an diesen aufgetreten waren.

### **2.2.6. Adhäsionsassay**

Ziel dieser Untersuchung war es, den Zeitpunkt zu bestimmen, zu dem die höchste Anzahl an Pilzzellen an den jeweiligen Materialien adhärierte. Die Experimente wurden in Zellkulturplatten wie zuvor beschrieben vorbereitet. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit (für Adhäsion oder für Biofilmbildung) wurden die Prothesen zwei Mal gewaschen, um nicht adhärenente Zellen zu entfernen. Von den adhärenenten Zellen sollte die Anzahl der

koloniebildenden Einheiten (KBE) bestimmt werden. Dazu wurden die Prothesen vorsichtig mit einer sterilen Pinzette aus der Platte entnommen und in ein 2 ml Eppendorf-Gefäße mit 1ml steriler Kochsalzlösung gegeben und für 5 Minuten in einem Ultraschallgerät belassen und anschließend kräftig gevortext. Dieser Vorgang diente dem Ablösen der an der Prothese anhaftenden Pilzzellen. Nach dem Vortexen wurde die Prothese entfernt und die Suspension des Eppendorf-Gefäßes 6-mal seriell 1:10 verdünnt. Aus jeder Verdünnung wurden 100 µl auf eine beschriftete Blutagarplatte mit 5% Schafsblut mit einem sterilen Glasspatel ausgespatelt und die Agarplatten für 48 Stunden bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde die Anzahl der KBE durch Auszählung der gewachsenen Kolonien bestimmt. Dazu wurden die Platten ausgezählt, die ein Wachstum von 30 bis 300 Kolonien aufwiesen.

Für die Polystyren-Scheiben unterschied sich das Vorgehen folgendermaßen: Die Slides wurden nach Entfernung der Pilzzellen-Kulturmedium-Suspension in der Vertiefung der Mikrotiterplatte belassen und zweimal vorsichtig mit 3 ml der PBS-Lösung ohne Mg und Ca gewaschen. Anschließend wurden sie in eine neue 12-Loch-Platte überführt und mit 1 ml Natriumchloridlösung überschichtet. Dann wurden die *Candida*-Zellen mit einem sterilen Zellschaber abgelöst und durch Vortexen homogenisiert. Die so gewonnene Zellsuspension wurde ebenfalls seriell verdünnt und auf Blutagarplatten ausgespatelt. Die Bestimmung der KBE erfolgte idem zu den Prothesen.

### 2.2.7. XTT- Reduktionsassay

Diese halb-quantitative *in vitro*-Methode diente der Erfassung der metabolischen Aktivität der einzelnen *Candida albicans*-Biofilme. Es wurde das wie von Peeters et al. beschriebene XTT-basierte *in vitro*-Toxikologie-Assay-Set der Firma Sigma-Aldrich verwendet (Peeters et al. 2008). 2,3-Bis(2-Methoxy-4-Nitro-5 Sulfophenyl)-5-[(Phenylamino)-Carbonyl]-2H-Tetrazolium-Hydroxid (XTT) wird durch Dehydrogenasen zu wasserlöslichem Formazan reduziert. Dieses Produkt kann spektrophotometrisch gemessen werden, wobei die maximale Absorption im Bereich der Wellenlängen zwischen 440 bis 490 nm liegt (Roehm et al. 1991). Die für den Versuch notwendige XTT-Lösung wurde unmittelbar vor dem Versuch frisch hergestellt: Dazu wurden 5 mg XTT-Pulver in 12,5 ml PBS ohne Mg und Ca im Wasserbad bei 37 °C gelöst. Nachfolgend wurde dieser Suspension 100 µl Menadion-Stocklösung hinzugefügt, wobei zur Herstellung der Menadion-Stocklösung 55 mg Menadion in 100 ml Aceton gelöst worden waren. Bis einschließlich zur Vorbereitung der Prothesen entspricht der Versuch den Schritten, die für die Kultivierung von Biofilmen (2.2.1. bis 2.2.5.) beschrieben wurden.

Anschließend wurden die Prothesen durch zweimaliges, vorsichtiges Eintauchen in PBS ohne Mg und Ca gewaschen und in eine neue 48-Loch-Platte überführt, in welche 250 µl der zuvor

hergestellten XTT-Lösung und 250 µl PBS ohne Mg und Ca vorgelegt worden waren. Die Platte wurde für weitere 5 Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die 500 µl der Suspension aus den jeweiligen Vertiefungen in ein 1,5 ml fassendes Eppendorf-Tube pipettiert, für 4 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und anschließend mit Hilfe eines 0,22 µm-Filters steril filtriert, um die enthaltenen *Candida albicans*-Zellen zu entfernen, die das Ergebnis verfälschen würden. Von dem nun zellfreien Überstand wurden je 100 µl in eine 96-Loch-Platte gegeben und die Absorption bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen. Die Messung erfolgte in Dreifachbestimmung.

### **2.2.8. Silber-Substitutionsassay**

Um den Effekt von Silber auf die Biofilmbildung von *Candida albicans* untersuchen zu können, wurde zu der Silber-freien Kollagenprothese P3 Silbernitrat in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Die ausgestanzten Prothesenstücken der Kollagenprothese P3 wurden mit beiden *Candida albicans*-Stämmen ATCC 10231 und SC 5314 infiziert. Dazu wurden die Stämme wie zuvor in den Abschnitten 2.2.1. bis 2.2.4. angezüchtet und auf eine Zellzahl auf  $1 \times 10^6$  Zellen/l im Medium RPMI mit 50% FCS eingestellt. Jeweils 3 ml dieser Pilzsuspension wurden in eine 12-Loch-Platte pipettiert und Silbernitratlösung in absteigenden Konzentrationen (1000 µg, 500 µg, 100 µg, 50 µg, 10 µg, 5 µg, 1 µg, 0,5 µg, 0,1 µg) hinzugefügt. Die Vertiefungen, die zur Wachstumskontrolle dienten, enthielten eine Silbernitrat-freie Pilz-Suspension. Anschließend wurden die Prothesenstücken eingelegt und die Platte geschwenkt, um eine vollständige Benetzung der P3 sicherzustellen. Die Platte wurde bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit für 1,5 Stunden inkubiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die adhärenen *Candida*-Zellen von der Prothese gemäß der unter 2.2.6. beschriebenen Methoden gelöst, auf Schafsblutagarplatten ausgestrichen und nach 48 Stunden ausgezählt. Um den Effekt auf die Biofilmbildung zu sehen, erfolgte ein Medienwechsel nach 1,5 Stunden und eine weitere Inkubation für 24 und 72 Stunden. Nach Ablauf der Inkubationszeiten fanden die gleichen Methoden zur Aufarbeitung der anhaftenden Zellen und zur Bestimmung der KBE Anwendung.

### **2.2.9. Mikrodilution zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Silbernitrat**

In diesem Experiment sollte untersucht werden, ob ionisches Silber das Wachstum von *Candida spp.* hemmt und wenn ja, wie groß die minimale Hemmkonzentration (MHK) ist. Dafür wurde das Mikrodilutionsprotokoll nach EUCAST (European Committee for Antimicrobial

Susceptibility Testing) zur Bestimmung der MHK von antimykotischen Substanzen bei Sprosspilzen (Arendrup et al. 2012, Download 21/07/2020) zugrunde gelegt und für die Verwendung mit Silbernitratlösung modifiziert. In diesem Experiment wurden nur planktonische *Candida*-Zellen untersucht.

Beide Stämme wurden als Übernachtskultur in YPD-Medium angezüchtet, am Folgetag auf SAB- Glucose (2%) Agar ausgeimpft und bei 37 °C für 24 Stunden im Brutraum inkubiert. Zur Vorbereitung der Pilzsuspension für das Mikrodilutionsverfahren wurden jeweils 5 morphologisch gleiche Kolonien in 3 ml Aqua dest. eingerieben, für 15 Sekunden gevortext und mit Hilfe eines Desitometers (Densi check, Biomerieux) auf einen Mc Farland von 0,5 eingestellt. Dies entsprach einer Zellzahl von  $1-5 \times 10^6$  KBE/ml. Das Inokulum wurde wiederum 1:10 mit Aqua dest. verdünnt, sodass nun eine Keimsuspension mit einer Konzentration von  $1-5 \times 10^5$  KBE/ml vorlag.

Der Test wurde mit doppelt-konzentriertem RPMI 1640 + L-Glutamin durchgeführt. Dazu wurden 20,8 g RPMI-Pulver, 36 g Glukose und 69,06 g 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) hinzugefügt und in 900 ml Aqua dest. unter Rühren gelöst. Das Medium wurde durch Hinzugeben von 1 M Natriumhydroxid auf einen pH von 7 eingestellt und anschließend auf ein Endvolumen von 1l mit Aqua dest. aufgefüllt. Die Lösung wurde mittels eines sterilen 0,22 µm-Bakterienfilters filtriert.

Als ionisches Silber diente eine 2,5%-ige Silbernitrat-Lösung. Diese wurde mit Aqua dest., so verdünnt, dass eine Stocklösung mit einer Konzentration von 10 240 mg/l entstand.

Die Stocklösung wurde im Verhältnis von 1:2 mit dem doppeltkonzentrierten RPMI bis zu einer Konzentration von 20 mg/l verdünnt. Anschließend erfolgte eine weitere Verdünnung um den Faktor 10, so dass folgende Konzentrationen der Silbernitrat-RPMI-Lösung in mg/l vorlagen: 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2.

Die MHK-Bestimmung erfolgte in einer 96-Loch-Platte mit flachem Boden. In diese wurden jeweils 100 µl der Pilzsuspension und 100 µl der zuvor genannten Silbernitrat-Verdünnungen gegeben, was zu einer nochmaligen 1:2-Verdünnung führte. Die Endkonzentration im einzelnen Well der Platte war somit eine Titerstufe niedriger als die ursprünglich eingefüllte Konzentration der Silbernitrat-RPMI-Lösung und die der Keimsuspension lag bei  $0,5-2,5 \times 10^5$  KBE/ml. Als Leerwerte und gleichzeitige Sterilkontrolle dienten 100 µl Aqua dest. und 100 µl des doppeltkonzentrierten RPMI. Zur Wachstumskontrolle wurden 100 µl des doppeltkonzentrierten RPMI und 100 µl der Pilzsuspension ohne Silbernitratlösung verwendet. Die Mikrotiterplatte, welche nun insgesamt jeweils 200 µl Suspension (für Leerwerte, Wachstumskontrolle und die *Candida*-Silbernitrat-RPMI-Suspension) enthielt, wurde bei 37 °C für 24 Stunden bei Raumluft abgedunkelt bebrütet. Danach erfolgte die spektrometrische Messung bei 450 nm, wobei von den ermittelten Werten jeweils der Leerwert abgezogen wurde.

Die MHK war dabei die niedrigste Konzentration an Silbernitrat, bei der im Vergleich zur Wachstumskontrolle  $\geq 90\%$  des Wachstums an *Candida albicans* inhibiert wurde.

### 2.2.10. Fluoreszenzfärbungen mit FUN-1 und ConA

Zur Visualisierung der Biofilme an den Gefäßprothesenmaterialien wurden diese mit Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt und anschließend unter dem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop betrachtet.

Diese Färbungen erfolgten in Anlehnung an die Versuche von Chandra et al. (Chandra et al. 2001a) und wurden auf die hier verwendeten Materialien adaptiert. Die Doppelfärbung bot den Vorteil, dass einerseits alle anhaftenden *Candida albicans*-Zellen dargestellt werden konnten, aber auch eine Aussage zur Lebensfähigkeit dieser möglich war.

Als erster Farbstoff diente Concanavalin A (ConA) FITC (Fluoresceinisothiocyanat konjugiert). ConA ist ein aus der Jackbohne gewonnenes Protein – auch als Lektin bezeichnet – welches spezifisch an  $\alpha$ -D-Glucose- und  $\alpha$ -D-Mannose-Reste der Polysaccharide bindet (Edelman et al. 1972). Glucose und Mannose sind beide Bestandteile der Zellwand von *Candida albicans* (Chattaway et al. 1968) und werden im Rahmen der Biofilmbildung auch in die extrazelluläre Matrix sezerniert (Al-Fattani und Douglas 2006; Lal et al. 2010). Die Markierung von ConA mit FITC erlaubt die Detektion mittels Fluoreszenz (Sigma Aldrich, Produktinformation zu Lektin von Concanavalin A FITC markiert, Download 31/07/2020). ConA FITC machte somit eine Darstellung der *Candida albicans*-Zellen und des umgebenden Biofilmes möglich und wurde bereits vielfach von anderen Forschungsgruppen verwendet (Conçalves et al. 2014; Harrison et al. 2007b; Kuhn et al. 2002).

Bei dem zweiten verwendeten Farbstoff handelte es sich um 2-Chloro-4-(2,3-Dihydro-3-Methyl-(Benzo-1,3-Thiazol-2-yl)-Methyliden)-1-Phenylquinolinium-Iodid, kurz FUN-1. Er gehört zur Klasse der halogenierten unsymmetrischen Cyanin-Färbungen, durchdringt Membranen und bindet an Nukleinsäuren in Hefen. Der in Wasser gelöste nicht-fluoreszente Farbstoff, emittiert nach Bindung an DNA oder RNA und Anregung mit Licht einer Wellenlänge zwischen 470 und 500 nm grün bis grün gelbliches Licht (Millard et al. 1997). Metabolisch aktive Zellen bilden innerhalb einer Stunde nach Exposition durch Verstoffwechslung zylindrische intravacuolare Strukturen, sogenannte CIVS, aus. Werden diese Zellen mit einer Wellenlänge zwischen 470 und 590 nm angeregt, so fluoreszieren sie orange-rot. Die Bildung der CIVS verlangt eine Integrität der Zellmembran und die metabolische Kapazität lebender Hefezellen (Henry-Stanley et al. 2004). Die Färbung dient somit der selektiven Darstellung viabler Zellen.

Die Färbelösung FUN-1 wurde gebrauchsfertig in 100  $\mu$ l-Abpackungen einer 10mM

Stocklösung geliefert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C und lichtgeschützt. Vor Verwendung wurde das Färbemittel wie vom Hersteller gefordert auf Raumtemperatur erwärmt und vor dem Öffnen kurz zentrifugiert.

ConA wurde als gefriergetrocknetes Pulver vertrieben, welches bei -20 °C gelagert werden sollte. Für die Färbung wurden 2 mg des Pulvers in 1 ml PBS mit Mg und Ca gelöst, sodass eine Flüssigkeit mit einer Konzentration von 2 mg/ml vorlag.

Die Prothesen und Polystyren-Scheiben wurden wie unter 2.2.1. bis 2.2.4. beschrieben für 1,5, 24 und 72 Stunden unter den zuvor genannten Bedingungen aufbereitet.

Zum Anfärben der Prothesen wurden 10 µl der FUN-1-Stocklösung und 200 µl der ConA-Lösung in 4 ml PBS mit Mg und Ca, gemischt und 3 ml davon in eine 12-Loch-Platte, welche bereits die jeweilige Prothese enthielt, pipettiert. Diese Platte wurde für 45 Minuten bei 37°C unter Lichtabschluss bebrütet. Anschließend wurden die Prothesen entnommen und nach Abfließen der überschüssigen Färbelösung auf beschriftete Objektträger überführt. Diese waren zuvor vorbereitet worden, indem sie mit Ethanol entfettet und Dichtungsringe mit Nagellack auf dem Objektträger fixiert worden waren, um den Prothesen genügend Platz bieten zu können. Als Einbettmedium diente Glycerol. Zur oberen Abdeckung wurde ein Deckgläschen verwendet, welches mit Nagellack auf der Oberseite des Dichtungsringes fixiert wurde.

Die Färbung und Aufbereitung der mitgeführten Polystyren-Scheiben erfolgte analog zu dem Prothesenmaterial. Sowohl die Prothesen als auch die Polystyren-Scheiben wurden nach 24-stündiger Trocknung mit dem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop betrachtet.

### **2.3. Bildgebung**

#### **2.3.1. Phasenkontrastmikroskopie**

Die Phasenkontrastmikroskopie wurde verwendet, um sicherzustellen, dass sich Pilzzellen in der Suspension befanden, und um morphologische Unterschiede dieser nach Inkubation mit den verwendeten Prothesen und Stämmen aufzuzeigen. Es wurde das Mikroskop IMT-2 der Firma Olympus verwendet. Primär wurde eine Wasser-Immersionlinse mit 20-facher Vergrößerung gewählt. Waren die beobachteten Biofilme zu ausgedehnt, so wurde die Vergrößerung auf zehnfach oder sogar vierfach reduziert. Die jeweilige Vergrößerung wurde in der Bildunterschrift aufgetragen. Die Aufnahmesoftware Image-Pro Plus (Version 5.0.1.11) lieferte die Firma Media Cybernetics.

### 2.3.2. Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie

Im Gegensatz zur Phasenkontrastmikroskopie konnten mittels der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM, confocal laser scanning microscope) die Zellen an der Prothese dargestellt werden. Die Aufbereitung und Einfärbung der Prothesenstücke sind unter 2.2.1. bis 2.2.4. und 2.2.10. beschrieben.

Dr. rer. nat. Roland Hartig ermöglichte die Nutzung des konfokalen Laserrastermikroskops im Institut für Molekulare und Klinische Immunologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg. Es handelte sich um das SP2-Mikroskop des Unternehmens Leica. Die Originalsoftware wurde für die Aufnahmen verwendet.

Für FUN-1 wurde mit einer Wellenlänge von 543 nm angeregt und die Emission bei 560nm Langpassfilter (long-pass filter) gemessen. Die dargestellten Strukturen wurden als orange-rot sichtbar. Es fand eine Anregung von ConA bei einer Wellenlänge von 494 nm mittels des Lasers statt. Die Emission wurde bei 518 nm mit Hilfe eines Langpassfilters gemessen. Angefärbte Strukturen fluoreszierten grün.

Die Bearbeitung der Bilder fand im Programm ImageJ statt.

### 2.4. Statistik

Jedes Experiment wurde jeweils mindestens dreimal durchgeführt. Die Ermittlung der Mittelwerte und Standardabweichungen erfolgte in Excel 2019 (Version 16.27). Zur Berechnung der Signifikanzen wurde die Software SigmaStat (Version 2.0) des Unternehmens Systat Software Inc. verwendet, wobei der Zweistichproben-t-Test Anwendung fand. Ein ermittelter p-Wert  $\leq 0,05$  galt als signifikant, ein p-Wert  $\leq 0,01$  als sehr signifikant und als hoch signifikant wurde ein errechneter p-Wert  $\leq 0,001$  betrachtet.

In allen Diagrammen wurden die Mittelwerte mit den Standardabweichungen als Fehlerindikatoren dargestellt. Signifikanzen wurden mit Sternchen in den Graphen markiert.

### 3. ERGEBNISSE

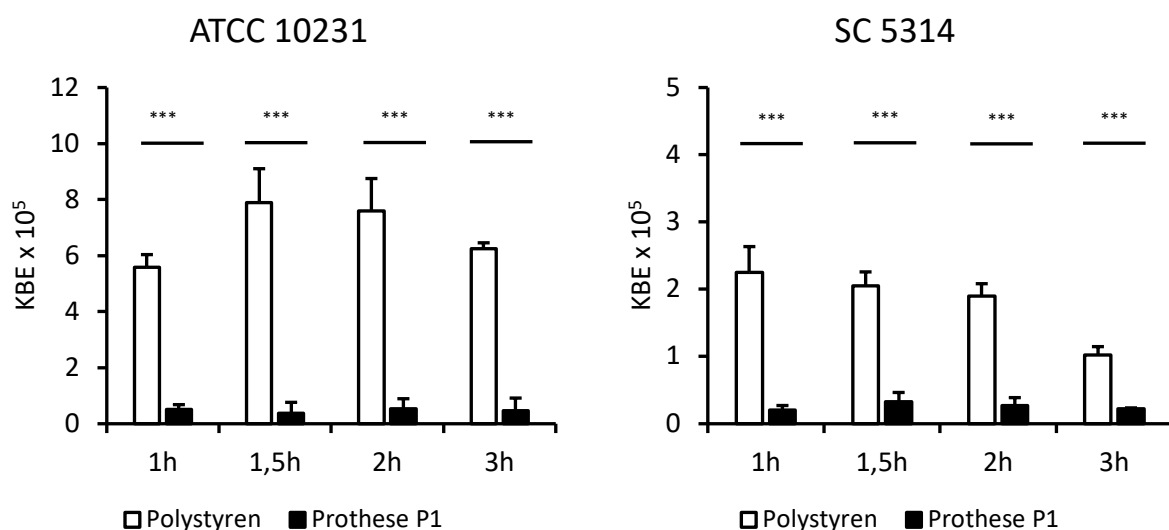
Die Rohdaten zu den erstellten Abbildungen finden sich im Anhang.

#### 3.1. Adhäsion und Biofilmbildung von *Candida albicans* an Kollagengefäßprothesen mit Silberazetat in RPMI-Medium

Um den Einfluss von Silber-beschichteten Gefäßprothesen auf die Adhäsion und die Biofilmbildung von *Candida albicans* untersuchen zu können, wurde zunächst geprüft, ob die ausgewählten *Candida albicans*-Stämme überhaupt in der Lage sind, an diesen Materialien zu adhären und nachfolgend Biofilme zu bilden.

##### 3.1.1. Adhäsion von *Candida albicans* an Kollagengefäßprothesen mit Silberazetat in RPMI-Medium

Als Methode zur Prüfung der Adhäsionsfähigkeit wurde der Adhäsionsassay (siehe 2.2.6.) genutzt. Dazu wurden ausgestanzte Prothesenstücke mit den beiden *Candida albicans*-Stämmen ATCC 10231 und SC 5314 beimpft. Als Kontrolle wurden kommerziell erhältliche Polystyren-Scheiben gleicher Größe verwendet. Als Kulturmedium wurde zunächst RPMI gewählt. Die Materialien wurden über 4 verschiedene Zeiträume (1, 1,5, 2 und 3 Stunden) inkubiert. Nach Ablösen der adhären Zellen wurde die Anzahl der KBE durch Ausplattieren auf Schafsbloodagarplatten bestimmt.



**Abbildung 3** Adhäsionsassay von *Candida albicans* ATCC 10231 und SC 5314 an Polystyren und der Silber-beschichteten Prothese P1 in RPMI-Medium. Aufgetragen sind die Mittelwerte und die errechneten Standardabweichungen der KBE zu den jeweiligen Inkubationszeiten. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Polystyren-Scheiben und der Silber-beschichteten Prothese P1 mit einem p-Wert < 0,001 sind mit drei Sternen gekennzeichnet. KBE=Kolonie-bildende Einheiten, h=Stunde.

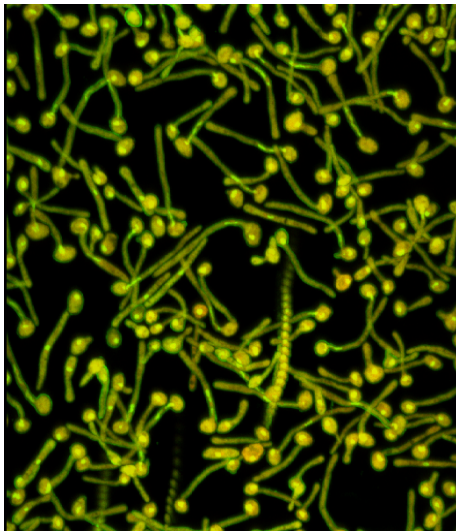


Wie Abbildung 3 (Tabelle A 1 Seite 109 im Anhang) zeigt, konnten zu jedem Zeitpunkt sowohl an Polystyren als auch an der Silber-beschichteten P1-Prothese *Candida albicans*-Zellen adhären. Allerdings zeigten beide Stämme eine statistisch hoch signifikant stärkere Adhärenz an Polystyren als an P1. So hafteten von *Candida albicans* ATCC 10231 11- bis 21-mal mehr KBE an Polystyren als an der Silberprothese. Bei *Candida albicans* SC 5314 waren 5- bis 11-mal mehr KBE adhären als an der Silber-beschichteten Prothese. Im Mittel adhärierte der ATCC 10231-Stamm besser an der P1 als SC 5314. Insgesamt hafteten weniger als 2 % der eingesäten *Candida*-Zellen (Einsaat  $3 \times 10^6$ ) an der Prothese, während an Polystyren zwischen 3 % und 26 % der Zellen adhärierten.

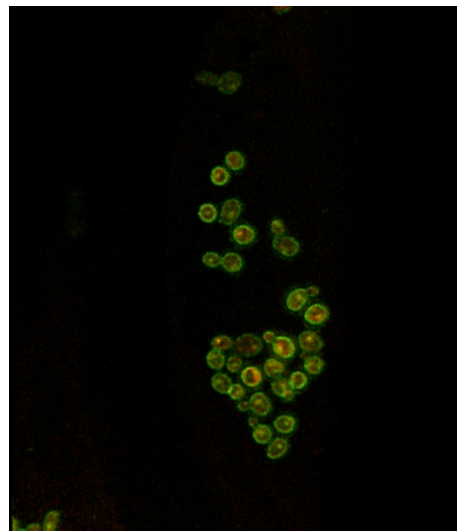
Dieser Versuch diente außerdem zur Bestimmung der optimalen Adhäsionszeit für die nachfolgenden Biofilm-Experimente. *Candida albicans* ATCC 10231 wies nach 2 Stunden an der Silber-beschichteten P1-Prothese das Maximum an Kolonie-bildenden Einheiten auf, der Stamm SC 5314 bereits nach 1,5 Stunden. An Polystyren hafteten die meisten Zellen des ATCC-Stamms nach 1,5 Stunden und die des SC-Stammes nach 1 Stunde. Für die folgenden Biofilm-Experimente wurden 1,5 Stunden als Adhäsionszeit festgelegt.

#### *Candida albicans* SC 5314

Polystyren



Prothese P1



1,5 Stunden Adhäsion

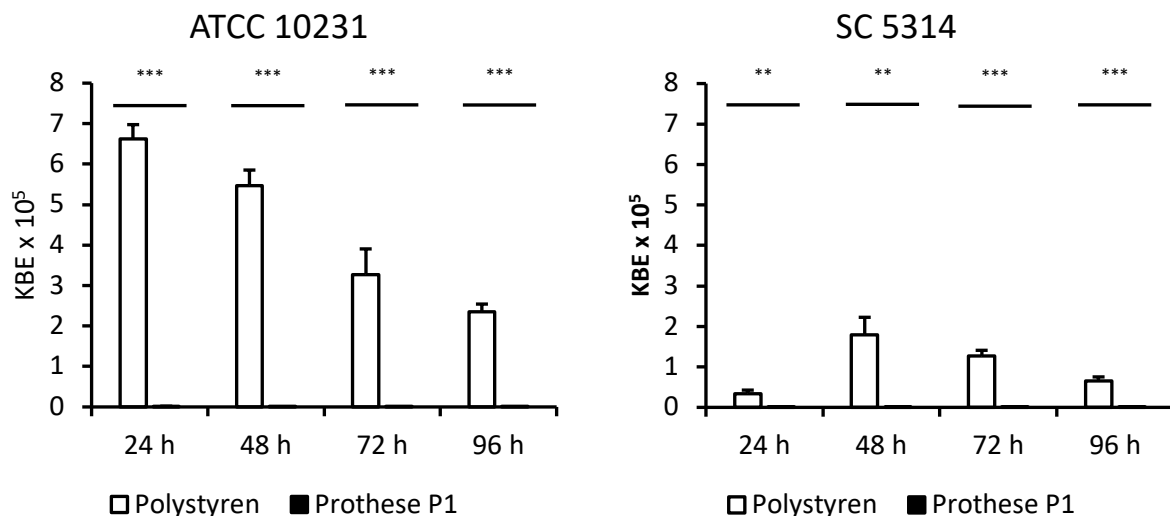
**Abbildung 4** Immunfluoreszenz. Darstellung des Phänotyps von *Candida albicans* SC 5314 nach Inkubation mit Polystyren und der Silber-beschichteten Prothese P1 für die Adhäsionszeit von 1,5 Stunden in RPMI-Medium. Die an der Prothese anhaftenden Pilzzellen wurden mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie nach Färbung mit FUN-1 und ConA dargestellt.

Zur Beurteilung der Zellmorphologie an den Fremdmaterialien wurde die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie verwendet. Dazu wurden die *Candida*-Zellen mit den beiden Fluoreszenz-Farbstoffen ConA und FUN-1 gefärbt (siehe 2.2.10.). Die Färbung erlaubte eine Differenzierung zwischen metabolisch aktiven und metabolisch inaktiven *Candida*-Zellen.

Metabolisch aktive und damit vitale Zellen zeigen kompakte zylindrische, rot gefärbte Strukturen (CIVS) im Zytoplasma. Wie in Abbildung 4 exemplarisch für *Candida albicans* SC 5314 dargestellt, zeigten sich bei Polystyren im Gegensatz zur Prothese P1 nach der Adhäsionszeit bereits Keimschläuche. An der Prothese P1 konnte die Hefeform nachgewiesen werden.

### 3.1.2. Biofilmbildung von *Candida albicans* an Kollagengefäßprothesen mit Silberazetat in RPMI-Medium

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die beiden *Candida albicans*-Stämme nach der Adhäsion in der Lage sind, an der Prothese P1 Biofilme zu bilden und wie sich die Biofilme im zeitlichen Verlauf entwickeln. Dazu wurden die Prothesenstücke zunächst 1,5 Stunden mit den beiden Stämmen in RPMI-Medium inkubiert, anschließend gewaschen und dann für weitere 24 bis 96 Stunden inkubiert. Nach jedem Zeitpunkt wurde die Anzahl der KBE bestimmt. Als Kontrolle dienten wieder Polystyrenscheiben.



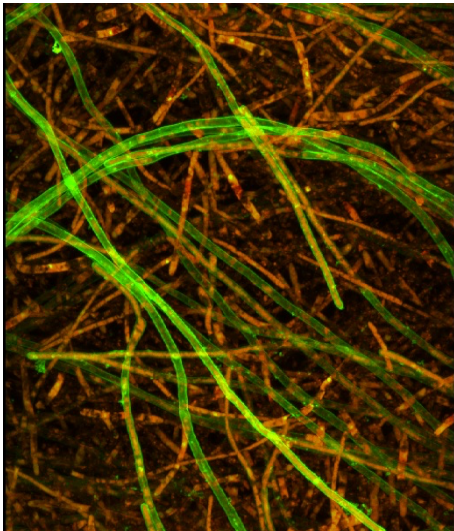
**Abbildung 5** Biofilmbildung von *Candida albicans* ATCC 10231 und SC 5314 an Polystyren und der Silber-beschichteten Prothese P1 in RPMI-Medium. Dargestellt sind die Mittelwerte und die errechneten Standardabweichungen der ausgezählten KBE zu den jeweiligen Inkubationszeiten. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Polystyren-Scheiben und der Silber-beschichteten Prothese P1 mit einem p-Wert < 0,01 sind mit zwei Sternen und mit einem p-Wert < 0,001 mit drei Sternen gekennzeichnet. KBE=Kolonie-bildende Einheiten, h=Stunde

Abbildung 5 (Tabelle A 2 Seite 110 im Anhang) verdeutlicht, dass sowohl von den Polystyren-Scheiben als auch von der Prothese P1 *Candida*-Zellen angezchtet werden konnten. Allerdings war die Menge vitaler Zellen an der P1-Prothese sehr gering. Der Anteil betrug höchstens 0,04% (ATCC 10231) bis 0,006% (SC 5314) der ursprünglich eingesäten Zellen in RPMI-Medium. Demgegenüber standen maximal 22,1% von ATCC 10231 und 6,0% von SC 5314 an Polystyren. An der P1-Prothese, die mit *Candida albicans* ATCC 10231 infiziert

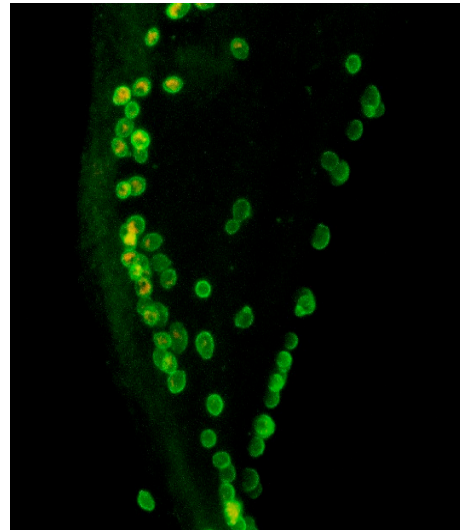
worden war, konnten nach 72 Stunden kaum noch vitale Zellen nachgewiesen werden. Das Maximum an Pilzzellen wurde für ATCC 10231 nach jeweils 24 Stunden und für SC 5314 nach 48 Stunden erreicht.

#### *Candida albicans* SC 5314

Polystyren



Prothese P1



72 Stunden Biofilmbildung

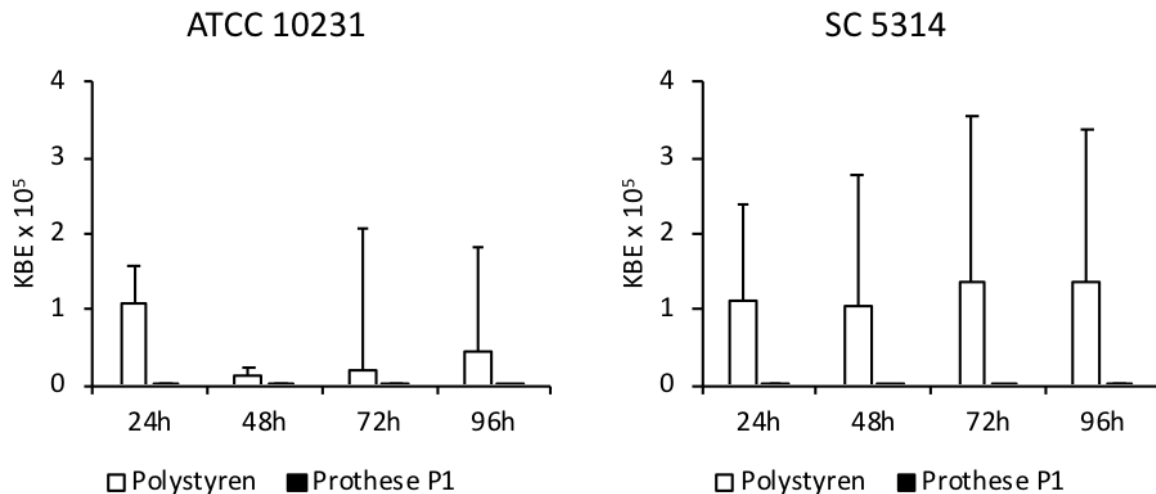
**Abbildung 6** Immunfluoreszenz. Darstellung des Phänotyps von *Candida albicans* SC 5314 nach Inkubation mit Polystyren und der Silberbeschichteten Prothese P1 zur Zeit der späten Biofilmbildung nach 72 Stunden in RPMI-Medium. Die an der Prothese anhaftenden Pilzzellen wurden mittels konfokaler Lasermikroskopie nach Färbung mit FUN-1 und ConA dargestellt.

Die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (Abbildung 6) zeigt auch für 72 Stunden einen deutlichen Unterschied der Zellmorphologie für den beispielhaft dargestellten *Candida albicans* SC 5314-Stamm. Die Keimschlauch- und Hyphenbildung an Polystyren wird nach dieser Zeit noch eindrucksvoller ersichtlich. An der Prothese P1 haften weiterhin nur Hefezellen. Eine Transition hat nicht stattgefunden. Dies lässt vermuten, dass der Wechsel zur Hyphenform inhibiert wurde. Ursächlich verantwortlich könnte das Prothesenmaterial selbst oder das imprägnierte Silber sein.

#### **3.1.3. Auswirkung der Silberprothese P1 auf die sich im umgebenden RPMI-Medium befindlichen *Candida*-Zellen**

Zusätzlich zu den Prothesen und den Polystyrenscheiben wurde der Einfluss dieser Materialien auf die *Candida*-Zellen untersucht, die sich im RPMI-Medium befanden, welches die Prothese umgab. Unter Zuhilfenahme der Phasenkontrastmikroskopie wurde die

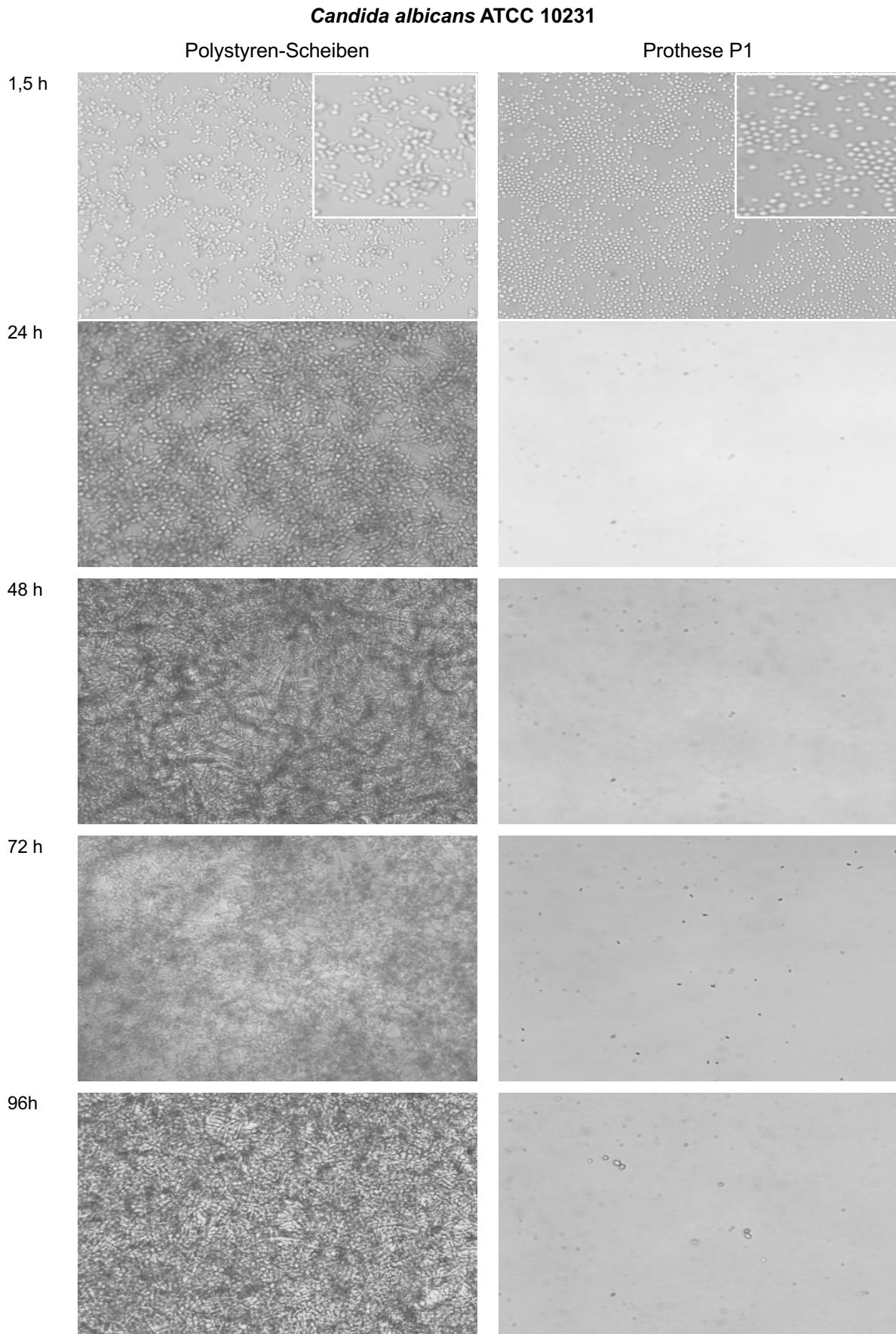
Morphologie der Pilzzellen beurteilt. Außerdem wurde die Zellzahl der im Medium vorhandenen Zellen am Ende des jeweiligen Inkubationsintervalls (1,5, 24, 48, 72 und 96 Stunden) durch serielle Verdünnung auf Blutagarplatten bestimmt.



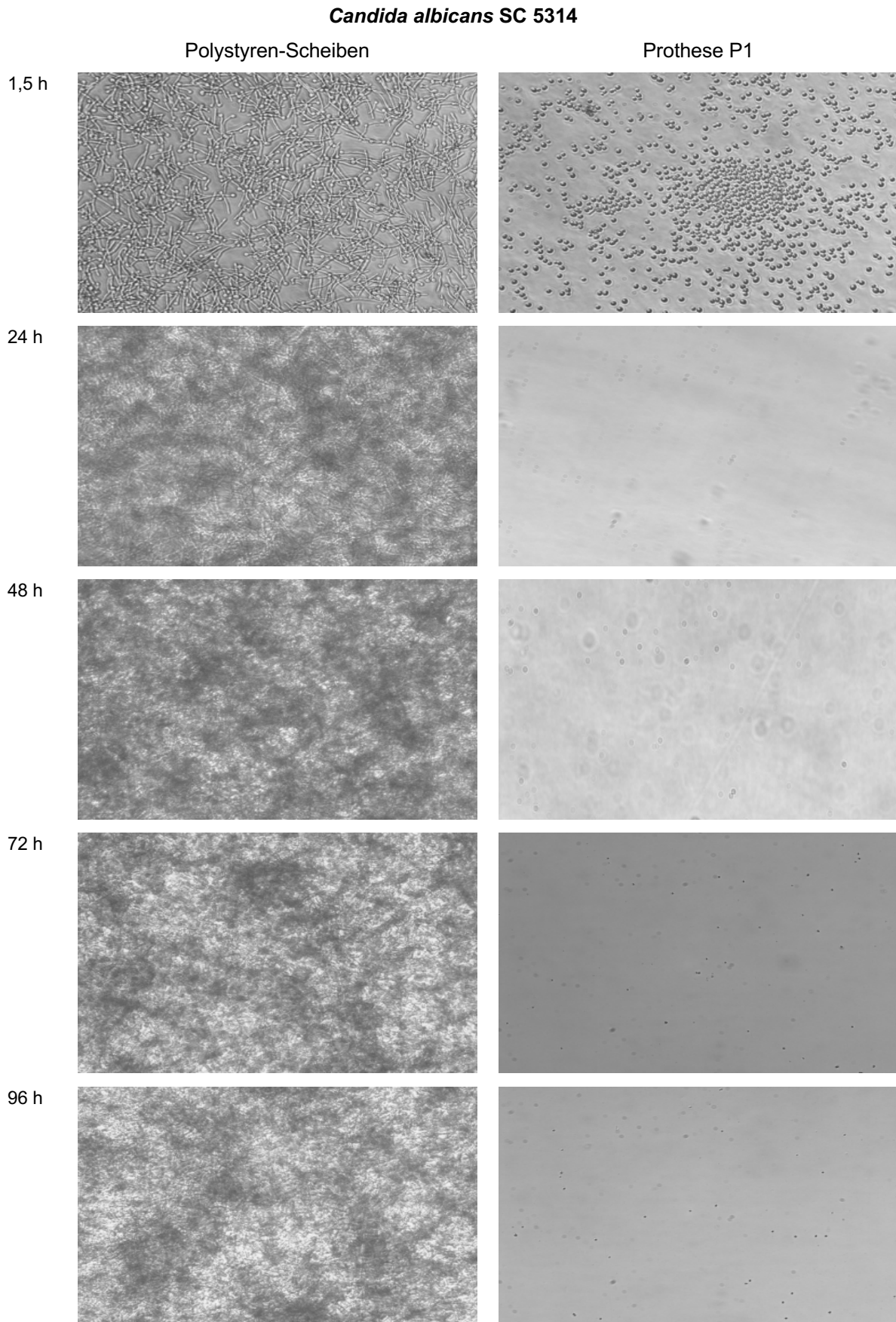
**Abbildung 7** Überprüfung der Überstände auf vitale *Candida albicans*-Zellen. Nach Entfernung der Prothesen bzw. der Polystyren-Scheiben am Ende der jeweiligen Bebrütungszeit wurde das Medium zentrifugiert und die KBE quantifiziert. Aufgetragen sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der ermittelten KBE zu den jeweiligen Inkubationszeiten. KBE=Kolonie-bildende Einheiten, h=Stunden

Die Schwankungsbreite der Absolutzahlen war recht groß (Abbildung 7, Tabelle A 3 Seite 111 im Anhang). Es konnte trotzdem gezeigt werden, dass im Überstand der Prothese P1 von beiden Stämmen nur wenige (zwischen 15 und 299 KBE) vitale Zellen verblieben waren. Da an der Prothese P1 signifikant weniger *Candida*-Zellen adhärirten als an Polystyren, wäre zu erwarten gewesen, dass im umgebenden Medium mehr *Candida*-Zellen vorlägen. Dem war jedoch nicht so. Laut Herstellerangaben setzt die Silberprothese Ionen frei. Diese könnten für den Unterschied verantwortlich gewesen sein.

In der Phasenkontrastmikroskopie (Abbildungen 8 und 9) zeigten sich deutliche morphologische Unterschiede zwischen den *Candida albicans*-Zellen, welche mit Polystyren (linke Spalte) und denen, die in Anwesenheit der Silber-beschichteten Prothese P1 (rechte Spalte) inkubiert worden waren. Im Medium der infizierten Polystyren-Blättchen bildete ein Großteil der *Candida albicans*-Zellen bereits nach 1,5 Stunden kurze Keimschläuche, die mit zunehmender Inkubationszeit immer länger wurden. Nach 48 und 96 Stunden bildeten die *Candida albicans*-Zellen ein dichtes Netz aus Hyphen und Keimschläuchen im Beisein von Polystyren. Im Gegensatz dazu konnte in Anwesenheit der Silber-beschichteten Prothese P1 zu keinem Zeitpunkt eine Keimschlauchbildung beobachtet werden.



**Abbildung 8** Phasenkontrastmikroskopie von *Candida albicans* ATCC 10231 in RPMI-Medium bei zwanzigfacher Vergrößerung. Das Bild inkubiert mit Polystyren über 72 Stunden wurde in zehnfacher Vergrößerung aufgenommen. Gegenübergestellt sind Bilder des Polystyren-Coverslip und der Silber-beschichteten Prothese P1. Die Inkubationszeiten in RPMI-Medium sind in der ersten Spalte genannt. h=Stunden



**Abbildung 9** Phasenkontrastmikroskopie von *Candida albicans* SC 5314 in RPMI-Medium bei zwanzigfacher Vergrößerung. Die Bilder inkubiert mit der Prothese P1 über 48 Stunden sind in vierzigfacher und inkubiert mit Polystyren über 72 Stunden und 96 Stunden in zehnfacher Vergrößerung aufgenommen. Gegenübergestellt sind Bilder des Polystyren-Coverslip und der Silber-beschichteten Prothese P1. Die Inkubationszeiten in RPMI-Medium sind in der ersten Spalte genannt. h=Stunden

#### 3.1.4. Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse in RPMI-Medium

Die Anzahl adhärenter *Candida albicans*-Zellen war bei beiden Stämmen in Anwesenheit der Prothese P1 im RPMI-Medium deutlich reduziert. Primär adhärente Zellen lösten sich im Laufe der Zeit ab. Die Anzahl der Zellen im Überstand war ebenfalls gering und nahm im zeitlichen Verlauf noch weiter ab. Weder an der P1-Prothese noch im Überstand derselben konnte eine Keimschlauch- oder Hyphenbildung nachgewiesen werden. In Anwesenheit der silberbeschichteten P1-Prothese scheinen im RPMI-Medium also die Adhäsion und die Hefe-Hyphen-Transition gestört zu sein.

#### 3.2. Adhäsion und Biofilmbildung an Kollagenprothesen mit und ohne Silberazetatbeschichtung in RPMI-Medium

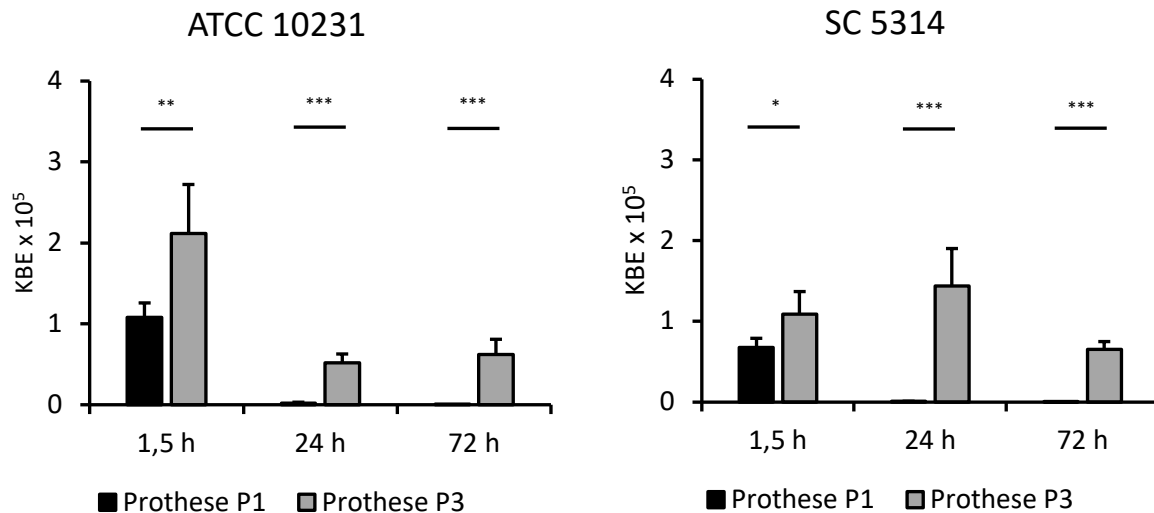
Aus den zuvor beschriebenen Beobachtungen ergab sich die Frage, ob die Veränderungen an der Prothese P1 im Vergleich zu Polystyren durch das in der Prothese enthaltene Silber oder durch die Kollagenbeschichtung der Prothese verursacht worden waren.

Zur Beleuchtung des Zusammenhanges wurde in den folgenden Experimenten die Silberazetat-Kollagen-Prothese P1 einer im Aufbau gleichen Kollagenprothese ohne Silberazetat – P3 genannt – gegenübergestellt. Für die Untersuchungen wurden drei Zeitpunkte ausgewählt: 1,5 Stunden als Adhäsionszeit, 24 Stunden für die frühe Biofilmbildung und 72 Stunden für die späte Biofilmbildung.

##### 3.2.1. Adhäsion und Biofilmbildung von *Candida albicans* in RPMI-Medium

Zu allen Zeitpunkten (Abbildung 10, Tabelle A 4 Seite 112 im Anhang) konnten an der silberfreien Kollagenprothese signifikant mehr vitale Zellen nachgewiesen werden als an der Silber-Kollagen-Prothese. An der P3 hafteten zwischen 1,6- und 1166-mal mehr Zellen als an P1. An der P3-Prothese wurden die höchsten Zellzahlen für *Candida albicans* ATCC 10231 nach 1,5 Stunden beobachtet, für den SC 5314 hingegen nach 24 Stunden. An der Prothese P1 wurde die maximale Anzahl an Zellen für beide Stämme nach 1,5 Stunden erreicht, um danach deutlich abzufallen. Der Unterschied in den Zellzahlen zwischen der Silberbeschichteten Kollagenprothese P1 und der Kollagenprothese ohne Silberbeschichtung P3 für die Adhäsionszeit von 1,5 Stunden bei *Candida albicans* SC 5314 ist signifikant ( $p < 0,05$ ) und

bei *Candida albicans* ATCC 10231 sehr signifikant ( $p < 0,01$ ). Zu allen weiteren Zeitpunkten konnte sogar ein hoch signifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ) für den Vergleich beider Teststämme ermittelt werden.



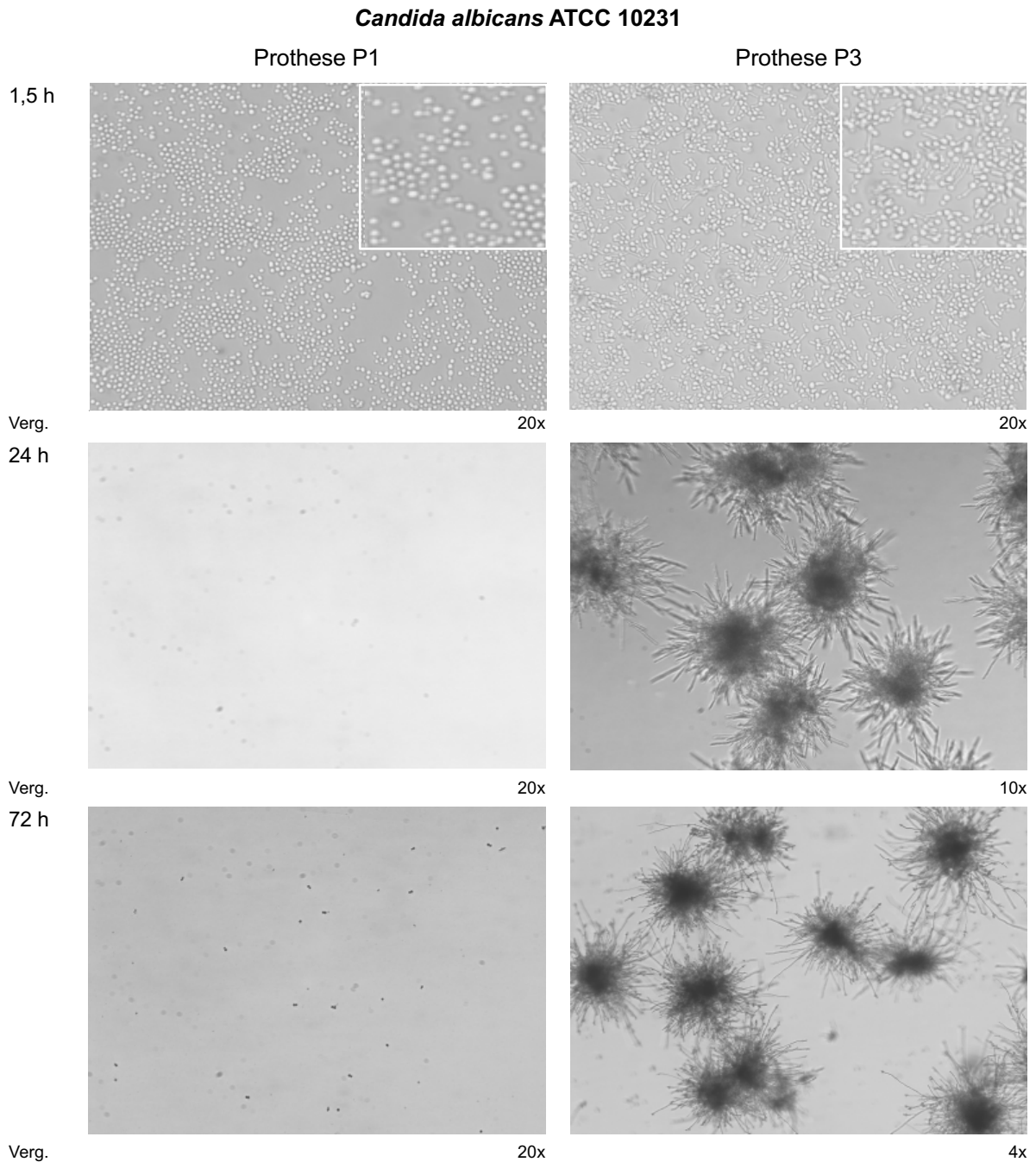
**Abbildung 10** Adhäsion und Biofilmbildung von *Candida albicans* ATCC 10231 und SC 5314 an der Silber-beschichteten Prothese P1 und der Kollagenprothese ohne Silberbeschichtung P3 in RPMI-Medium. Dargestellt sind die Mittelwerte und die errechnete Standardabweichung der ausgezählten KBE zu den jeweiligen Inkubationszeiten. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Silber-beschichteten Prothese P1 und der Kollagenprothese ohne Silberbeschichtung P3 mit einem p-Wert  $< 0,05$  sind mit einem Stern, mit einem p-Wert  $< 0,01$  mit zwei Sternen und mit einem p-Wert  $< 0,001$  mit drei Sternen gekennzeichnet. KBE=Kolonie-bildende Einheiten, h=Stunde

### 3.2.2. Phasenkontrastmikroskopie in RPMI-Medium

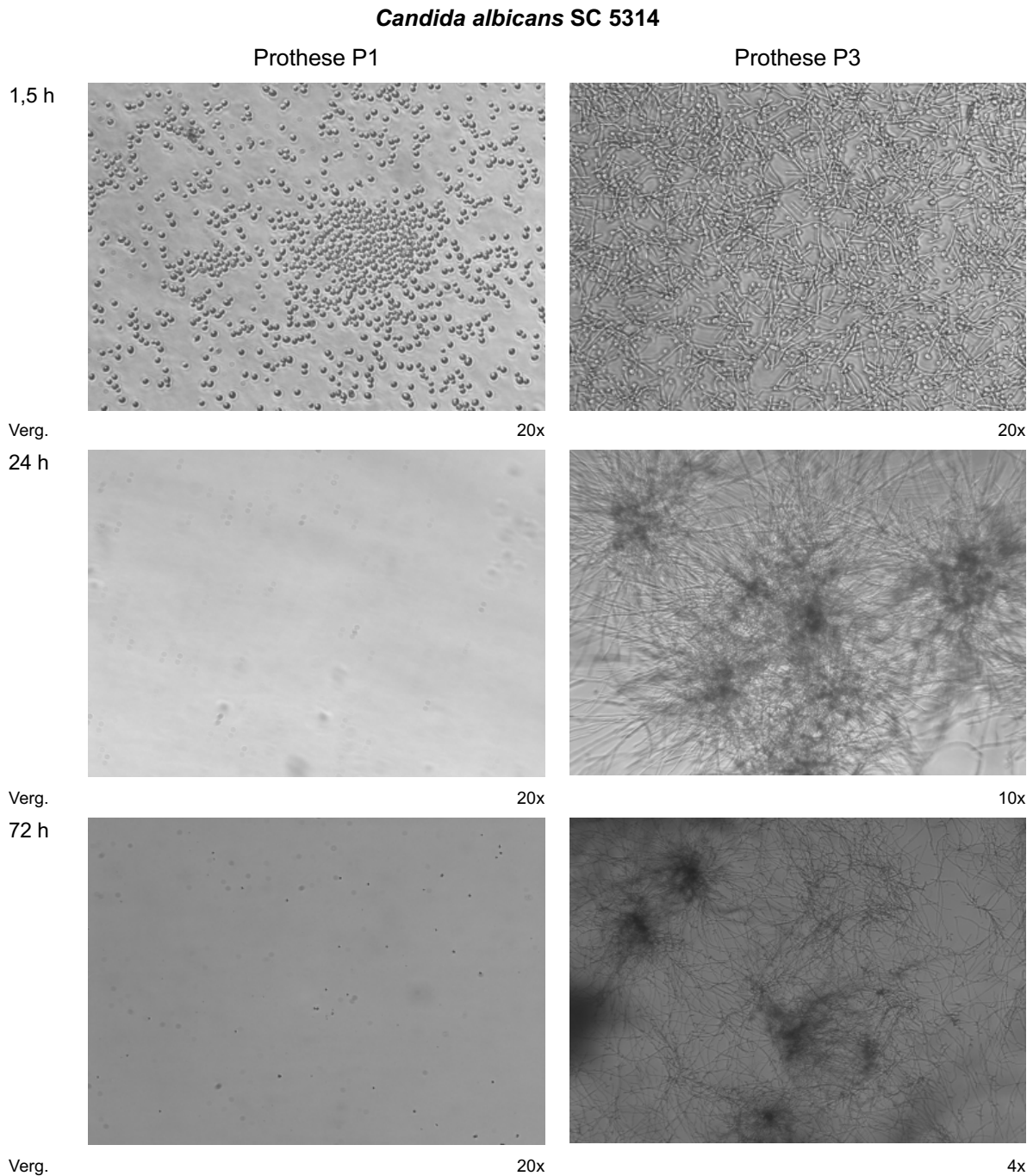
Die Phasenkontrastmikroskopie illustriert sehr gut die Unterschiede nach Inkubation mit den unterschiedlichen Prothesen (Abbildungen 11 und 12). Zuerst die Adhäsion des Stammes ATCC 10231 betrachtend (Abbildung 11, erste Bildzeile), sind bei beiden Prothesen im Medium viele Pilzzellen erkennbar. Im Gegensatz zur Prothese P3 sind in Anwesenheit der Silberprothese zu diesem Zeitpunkt jedoch keine Keimschläuche ausgebildet. Im weiteren zeitlichen Verlauf nehmen die Unterschiede deutlich zu. In Anwesenheit der Prothese P1 findet im umgebenden Medium keine Keimschlauch- oder Hyphenbildung während der verschiedenen Biofilmbildungsphasen (jeweils zweite und dritte Bildzeile) statt. Dem entgegen steht die Entwicklung von Hyphen und verbundenen Zellverbänden in Gegenwart der silberfreien Prothese P3 nach 24 und 72 Stunden.

Bei *Candida albicans* SC 5314 (Abbildung 12) finden sich ähnliche Ergebnisse für die Prothese P1. Bei P3 sind nach 1,5 Stunden (erste Bildzeile) deutlich mehr Keimschläuche vorhanden als bei ATCC 10231 und auch die Hyphenbildung und die Ausbildung des Biofilmes (jeweils zweite und dritte Bildzeile) ist erheblich stärker.





**Abbildung 11** Phasenkontrastmikroskopie von *Candida albicans* ATCC 10231 in RPMI-Medium. Gegenübergestellt sind Bilder der Silberbeschichteten Prothese P1 und der Kollagenprothese ohne Silberbeschichtung P3. Die jeweilige Vergrößerung ist darunter angegeben. Die Inkubationszeiten sind in der ersten Spalte genannt. h=Stunden, Verg.=Vergrößerung



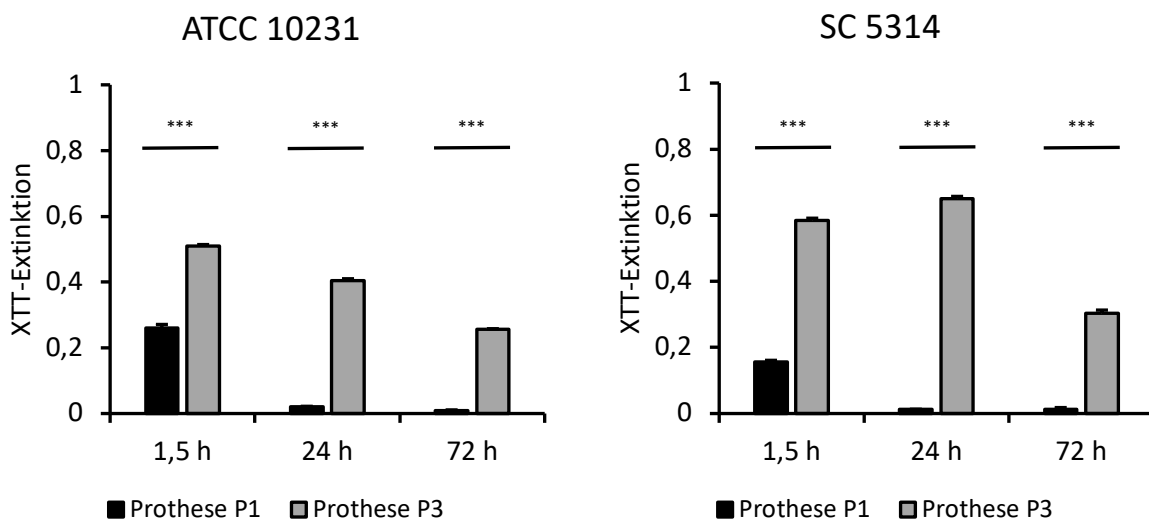
**Abbildung 12** Phasenkontrastmikroskopie von *Candida albicans* SC 5314 in RPMI-Medium. Gegenübergestellt sind Bilder der Silberbeschichteten Prothese P1 und der Kollagenprothese ohne Silberbeschichtung P3. Die jeweilige Vergrößerung ist darunter angegeben. Die Inkubationszeiten sind in der ersten Spalte genannt. h=Stunden, Verg.=Vergrößerung

### 3.2.3. XTT-Reduktionsassay in RPMI-Medium

Zur Bestätigung der zuvor gefundenen Ergebnisse wurde eine zweite Methode zur Quantifizierung genutzt. Der XTT-Reduktionsassay (siehe 2.2.7.) beruht auf der Reduktion von XTT zu wasserlöslichem Formazan durch metabolisch aktive Zellen. Dabei kommt es zu einem Farbumschlag der XTT-Lösung zu gelb-orange. Nach allen drei Inkubationsperioden wurde

die Konzentration des Farbstoffes in der XTT-Lösung photometrisch bestimmt. Die Extinktion ist proportional zur Konzentration und zur Anzahl metabolisch aktiver Zellen.

Die Extinktion war bei beiden Stämmen und zu allen Zeitpunkten (Abbildung 13, Tabelle A 5 Seite 113 im Anhang) an der Prothese P3 deutlich höher als an der P1-Prothese. Die Unterschiede waren zu allen Zeitpunkten hoch signifikant. Die Ergebnisse des XTT-Reduktionstestes bestätigen somit die Ergebnisse aus dem vorherigen Experiment (siehe unter 3.2.1 und 3.2.2.)



**Abbildung 13** XTT-Reduktionsassay in RPMI-Medium von *Candida albicans* ATCC 10231 und SC 5314 an der mit Silberazetat-beschichteten Prothese P1 und der Kollagenprothese P3 ohne Silberazetatbeschichtung. Dargestellt sind die Mittelwerte und die errechneten Standardabweichungen der ermittelten XTT-Extinktion zu den jeweiligen Inkubationszeiten. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Silberbeschichteten Prothese P1 und der Kollagenprothese ohne Silberbeschichtung P3 mit einem p-Wert < 0,001 sind mit drei Sternen gekennzeichnet. h=Stunde

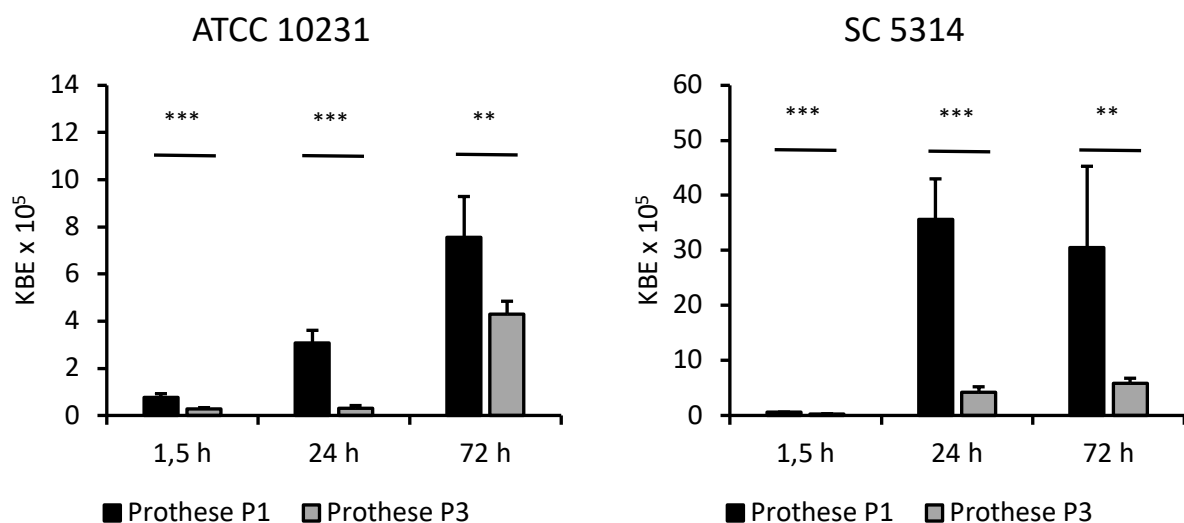
### 3.2.4. Zusammenfassende Bewertung des Vergleiches der Kollagenprothesen mit und ohne Silberazetatbeschichtung in RPMI-Medium

Sowohl der Adhäsionsassay als auch die Experimente zur Biofilmbildung und der XTT-Reduktionsassay brachten die gleichen Ergebnisse hervor: In Anwesenheit der Prothese P1 war die Anzahl lebender Pilzzellen statistisch signifikant verringert im Vergleich zur silberfreien Prothese P3. Die Silberazetatbeschichtung der Prothese P1 hatte also einen negativen Einfluss auf die Lebensfähigkeit und damit auf die Adhäsion und die Biofilmbildung von *Candida albicans* in RPMI-Medium ausgeübt. Die beiden visuellen Verfahren konnten zeigen, dass sowohl im Medium um die Silber-Prothese als an der Prothese selbst der Hefen-Hyphenübergang gestört war. Bei Inkubation mit der Kollagenprothese ohne Silberbeschichtung konnten schon nach der Adhäsionszeit Keimschläuche beobachtet werden.

### 3.3. Adhäsion und Biofilmbildung an Kollagenprothesen mit und ohne Silberazetatbeschichtung nach Hinzugabe von fetalem Kälberserum

Da sich Gefäßprothesen im Blutstrom befinden, sollte in den folgenden Experimenten der Frage nachgegangen werden, ob sich der zuvor beobachtete inhibitorische Effekt der Silberprothese auf *Candida albicans* in RPMI-Medium nach Zugabe von fetalem Kälberserum (FKS) ebenfalls beobachten lässt. Dafür wurde dem RPMI-Medium 50% FKS zugesetzt. Beide Prothesen P1 und P3 wurden mit jeweils beiden *Candida albicans*-Stämmen inkubiert. Es wurden gleichermaßen die drei Phasen der Biofilmbildung betrachtet: Adhäsion nach 1,5 Stunden, die frühe Biofilmbildung nach 24 Stunden und die späte nach 72 Stunden.

#### 3.3.1. Adhäsion und Biofilmbildung von *Candida albicans* in RPMI-Medium mit 50% FKS



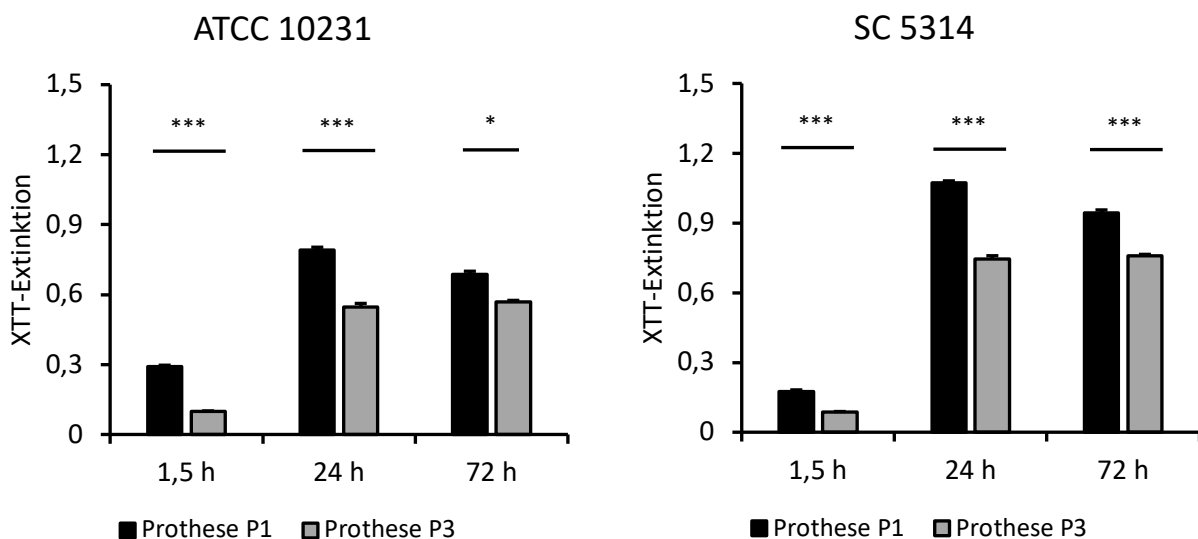
**Abbildung 14** Adhäsion und Biofilmbildung von *Candida albicans* ATCC 10231 und SC 5314 an der Silber-beschichteten Prothese P1 und der Kollagenprothese ohne Silberbeschichtung P3 in RPMI-Medium mit 50% FKS. Dargestellt sind die Mittelwerte und die errechneten Standardabweichungen der ausgezählten KBE zu den jeweiligen Inkubationszeiten. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Silber-beschichteten Prothese P1 und der Kollagenprothese ohne Silberbeschichtung P3 mit einem p-Wert < 0,005 sind mit zwei Sternen und mit einem p-Wert < 0,001 mit drei Sternen gekennzeichnet. KBE =Kolonie-bildende Einheiten, h=Stunde

Abbildung 14 (Tabelle A 6 Seite 114 im Anhang) illustriert, dass in Anwesenheit von 50% FKS zu jedem Zeitpunkt lebende Pilzzellen beider Stämme an beiden Prothesen nachweisbar sind. Für *Candida albicans* ATCC 10231 konnten im Mittel an der Prothese P1 1,8- bis 10,4-mal mehr KBE ausgezählt werden als an der P3. Für den SC 5314-Stamm betrug der Faktor 2,4 bis 8,4. Nach 1,5 Stunden hafteten 2,6% der eingesäten ATCC 10231-Zellen und 1,9% der SC

5314-Zellen an der Prothese P1. Die höchste Zellzahl konnte für *Candida albicans* ATCC 10231 nach 72 Stunden bestimmt werden und für *Candida albicans* SC 5314 nach 24 Stunden. Nach 1,5 Stunden adhärten in FKS-haltigen Medium hoch signifikant mehr *Candida*-Zellen an der silberhaltigen P1 als an der silberfreien P3. Auch die Biofilmbildung nach 24 Stunden war hoch signifikant stärker an der P1 als der P3. Nach 72 Stunden war dieser Effekt sehr signifikant.

### 3.3.2. XTT-Reduktionsassay in RPMI-Medium mit 50% FKS

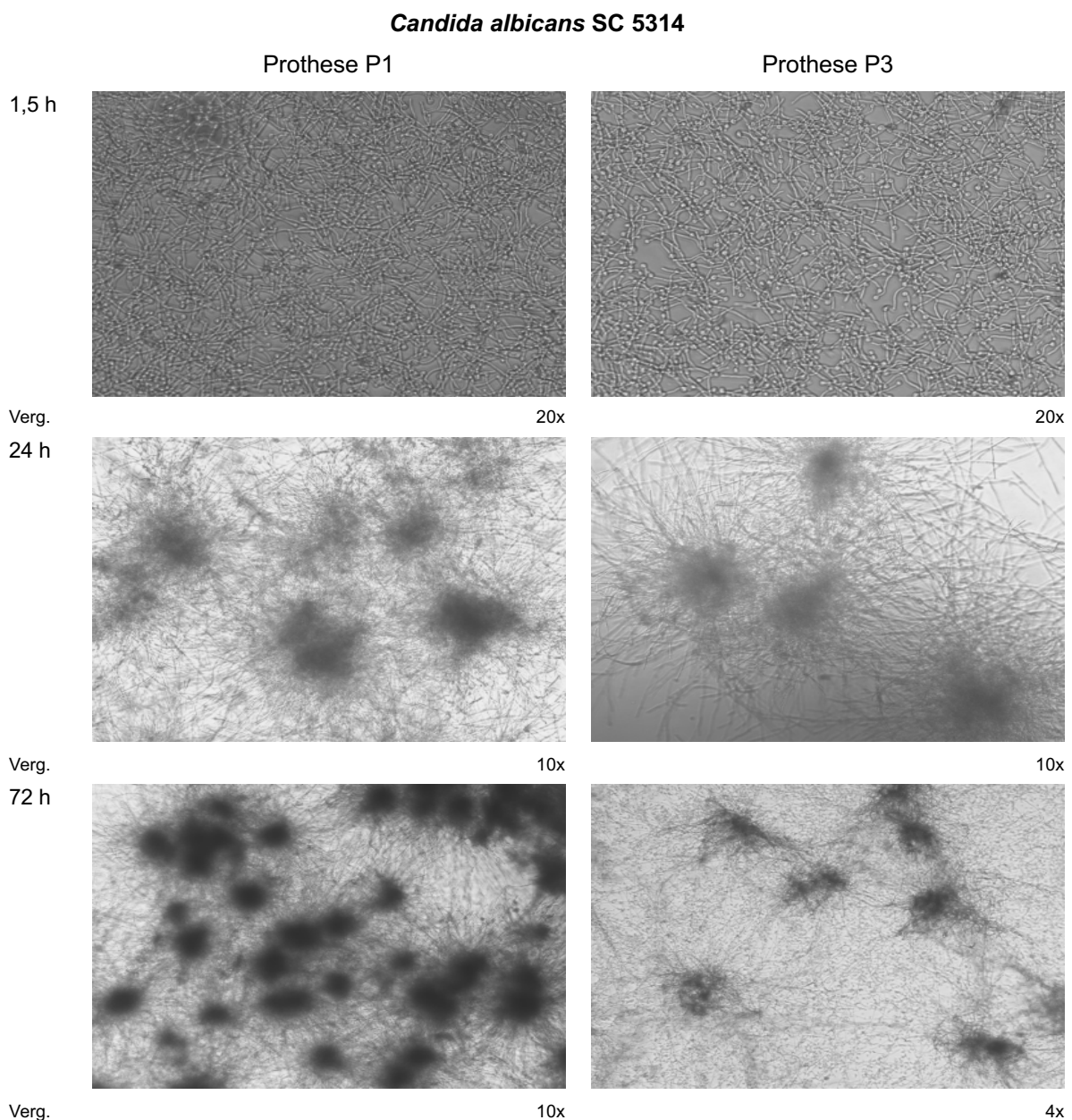
Die gemessenen Extinktionen nach Inkubation der Prothesen mit beiden Stämmen in RPMI mit 50% FKS waren zu allen betrachteten Zeitpunkten höher für die Prothese P1 (Abbildung 15, Tabelle A 7 Seite 115 im Anhang). Es ist also davon auszugehen, dass mehr vitale Zellen an der Prothese P1 anhafteten und damit ein dickerer Biofilm entstanden war als an der P3. Mittels dieser Versuchsreihe konnten die oben beschriebenen Ergebnisse aus dem Adhäsions- und Biofilmassay bestätigt werden. Der Unterschied zwischen der Prothese P1 und der P3 inkubiert mit ATCC 10231 über 72 Stunden war signifikant, alle weiteren gemessenen Unterschiede waren sogar hoch signifikant.



**Abbildung 15** XTT-Reduktionsassay in RPMI-Medium mit 50% FKS von *Candida albicans* ATCC 10231 und SC 5314 an der mit Silberazetatbeschichteten Prothese P1 und der Kollagenprothese P3 ohne Silberazetatbeschichtung. Dargestellt sind die Mittelwerte und die errechneten Standardabweichungen der ermittelten XTT-Extinktion zu den jeweiligen Inkubationszeiten. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Silberbeschichteten Prothese P1 und der Kollagenprothese ohne Silberbeschichtung P3 mit einem p-Wert < 0,05 sind mit einem Stern und mit einem p-Wert < 0,001 sind mit drei Sternen gekennzeichnet. h=Stunde

### 3.3.3. Phasenkontrastmikroskopie in RPMI-Medium mit 50% FKS

Zur phänotypischen Beurteilung der *Candida albicans*-Zellen in FKS-haltigem Medium wurden die Vertiefungen unter dem Phasenkontrastmikroskop angeschaut. In Abbildung 16 erfolgt die exemplarische Darstellung des SC 5314-Stammes. Die Betrachtung des ATCC 10231-Stammes lieferte optisch gleiche Ergebnisse. Es zeigte sich, dass die im Medium vorhandenen *Candida*-Zellen unter dem Einfluss von FKS bereits nach 1,5 Stunden an beiden Prothesen lange Keimschläuche gebildet hatten. Bereits nach 24 Stunden wucherte an beiden Prothesen ein starkes Hyphengeflecht aus, welches nach 72 Stunden noch dichter wurde.

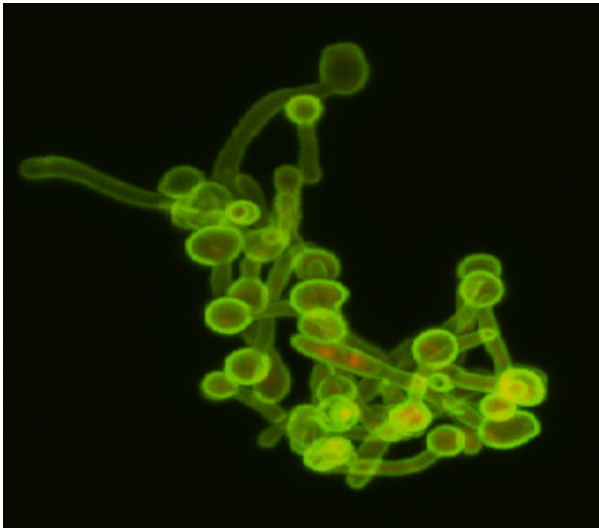


**Abbildung 16** Phasenkontrastmikroskopie von *Candida albicans* SC 5314 in RPMI-Medium mit 50% FKS. Gegenübergestellt sind Bilder der Silber-beschichteten Prothese P1 und der Kollagenprothese ohne Silberbeschichtung P3. Die jeweilige Vergrößerung ist darunter angegeben. Die Inkubationszeiten sind in der ersten Spalte genannt. h=Stunden, Verg.=Vergrößerung

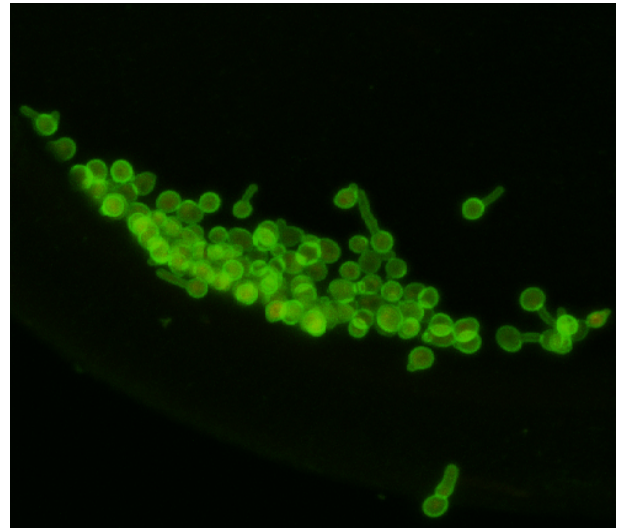
### 3.3.4. Immunfluoreszenz in RPMI-Medium mit 50% FKS

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz konnten die *Candida*-Zellen an der silberhaltigen Prothese P1 betrachtet werden. In Abbildung 17 wurden die beiden Stämme gegenübergestellt. Nach 1,5 Stunden hatten sich unter Inkubation in RPMI mit 50% FKS bereits Keimschläuche gebildet. Die roten CIVS sprechen für die Lebendigkeit der dargestellten Zellen. Nach 72 Stunden in FKS-haltigem Medium bildeten beide Stämme an der Prothese P1 Hyphen aus. Auch mit dieser Methode konnte deutlich der Unterschied zur alleinigen Inkubation der Silberazetat-Prothese mit RPMI herausgearbeitet werden (vergleiche Abbildungen 4 und 6).

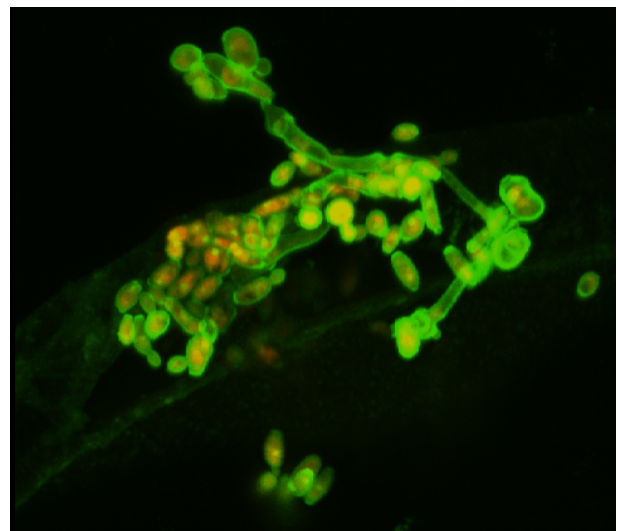
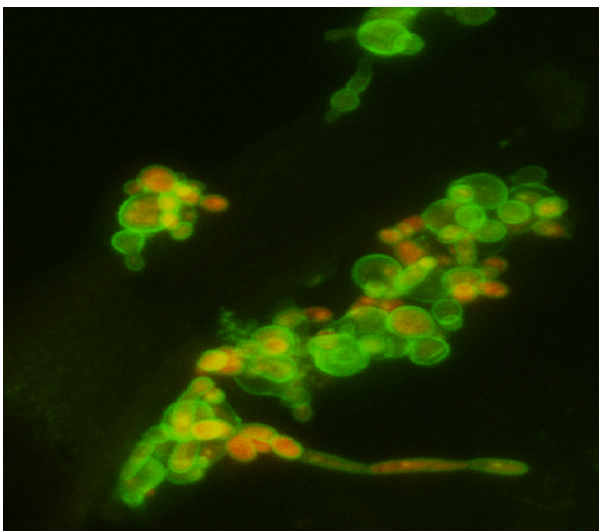
*Candida albicans* ATCC 10231



*Candida albicans* SC 5314



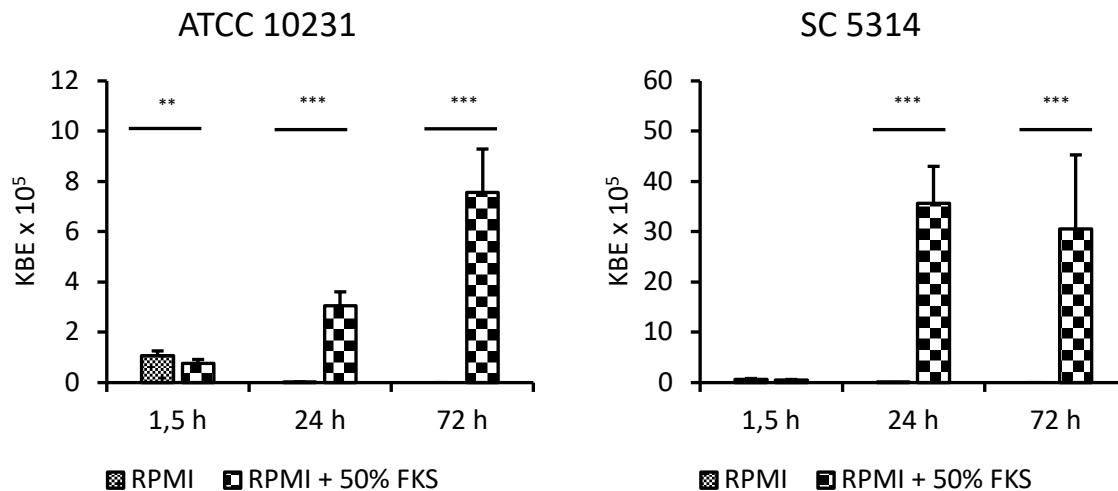
1,5 Stunden Adhäsion



72 Stunden Biofilmbildung

**Abbildung 17** Immunfluoreszenz. Darstellung des Phänotyps von *Candida albicans* ATCC 10231 und SC 5314 nach Inkubation mit der Silberbeschichteten Prothese P1 zu den Inkubationszeiten von 1,5 Stunden und 72 Stunden in RPMI mit 50 % FKS. Die an der Prothese anhaftenden Pilzzellen wurden mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie nach Färbung mit FUN-1 und ConA dargestellt.

### 3.3.5. Vergleichende Betrachtung der Prothese P1 in RPMI mit und ohne FKS



**Abbildung 18** Adhäsion und Biofilmbildung an der Silber-beschichteten Prothese P1 in RPMI-Medium und RPMI mit 50% FKS von *Candida albicans* ATCC 10231 und SC 5314. Dargestellt sind die Mittelwerte und die errechneten Standardabweichungen der ausgezählten KBE zu den jeweiligen Inkubationszeiten. Statistisch signifikante Unterschiede der Silber-Prothese P1 in den beiden Inkubationsmedien RPMI und RPMI mit 50% FKS zu den jeweiligen Inkubationszeiten mit einem p-Wert < 0,01 sind mit zwei Sternen und mit einem p-Wert < 0,001 mit drei Sternen gekennzeichnet. KBE =Kolonie-bildende Einheiten, h=Stunde

Vergleicht man das Wachstum der beiden *Candida*-Stämme an der silberhaltigen Prothese P1 mit und ohne FKS (Abbildung 18, Tabelle A 8 Seite 116 im Anhang), so zeigt sich, dass die Adhäsion (1,5 Stunden) an der Prothese P1 in FKS-freien Medium stärker ist als FKS-haltigen Medium (ATCC 10231: 1,4-mal = sehr signifikant mehr, SC 5314: 1,2-mal = statistisch nicht signifikant mehr). Für die Zeit der frühen und späten Biofilmbildung in RPMI-Medium konnten jedoch an der Prothese P1 nur wenige bis kaum viable Zellen nachgewiesen werden. Wird dem Medium hingegen 50% FKS hinzugesetzt, so fand eine 132-mal (ATCC 10231) bis 4084-mal (SC 5314) vermehrte Biofilmbildung während der ersten 24 Stunden statt. Dieser Effekt verstärkte sich für die späte Phase der Biofilmbildung noch weiter. Bei ATCC 10231 ließen sich in RPMI mit 50% FKS 14261-mal mehr *Candida*-Zellen auszählen als bei Inkubation mit alleinigem RPMI, bei dem SC 5314-Stamm waren es sogar 24413-mal mehr bei serumhaltigem Medium.

### 3.3.6. Vergleichende Betrachtung der Prothese P3 in RPMI mit und ohne FKS

Die Prothese P3 zeigte einen ähnlichen Trend der Ergebnisse. Die Daten und das Diagramm dazu finden sich im Anhang (Tabelle A 9 Seite 117 und Diagramm A 1 Seite 118).



### **3.3.7. Zusammenfassende Bewertung der Experimente an Kollagenprothesen mit und ohne Silberazetatbeschichtung in RPMI-Medium mit 50% FKS**

Die durchgeführten Experimente machten deutlich, dass durch Hinzugabe von 50% FKS zum RPMI-Medium sowohl für *Candida albicans* ATCC 10231 als auch für *Candida albicans* SC 5314 ein deutlich stärkeres Wachstum an der mit Silberazetat-beschichteten Prothese P1 gegenüber der silberfreien Prothese P3 zu verzeichnen war. Die Anzahl adhärenter und Biofilm-bildender Zellen war an der Prothese P1 signifikant höher als an der Prothese P3. Dies konnte sowohl durch Bestimmung der Zellzahlen als auch im XTT-Reduktionsassay gezeigt werden. Die Nachweise der Keimschlauch- und Hyphenbildung in der Fluoreszenzmikroskopie an der Prothese P1 und in der Phasenkontrastmikroskopie im umgebenden Medium unterstützen die Ergebnisse ebenfalls.

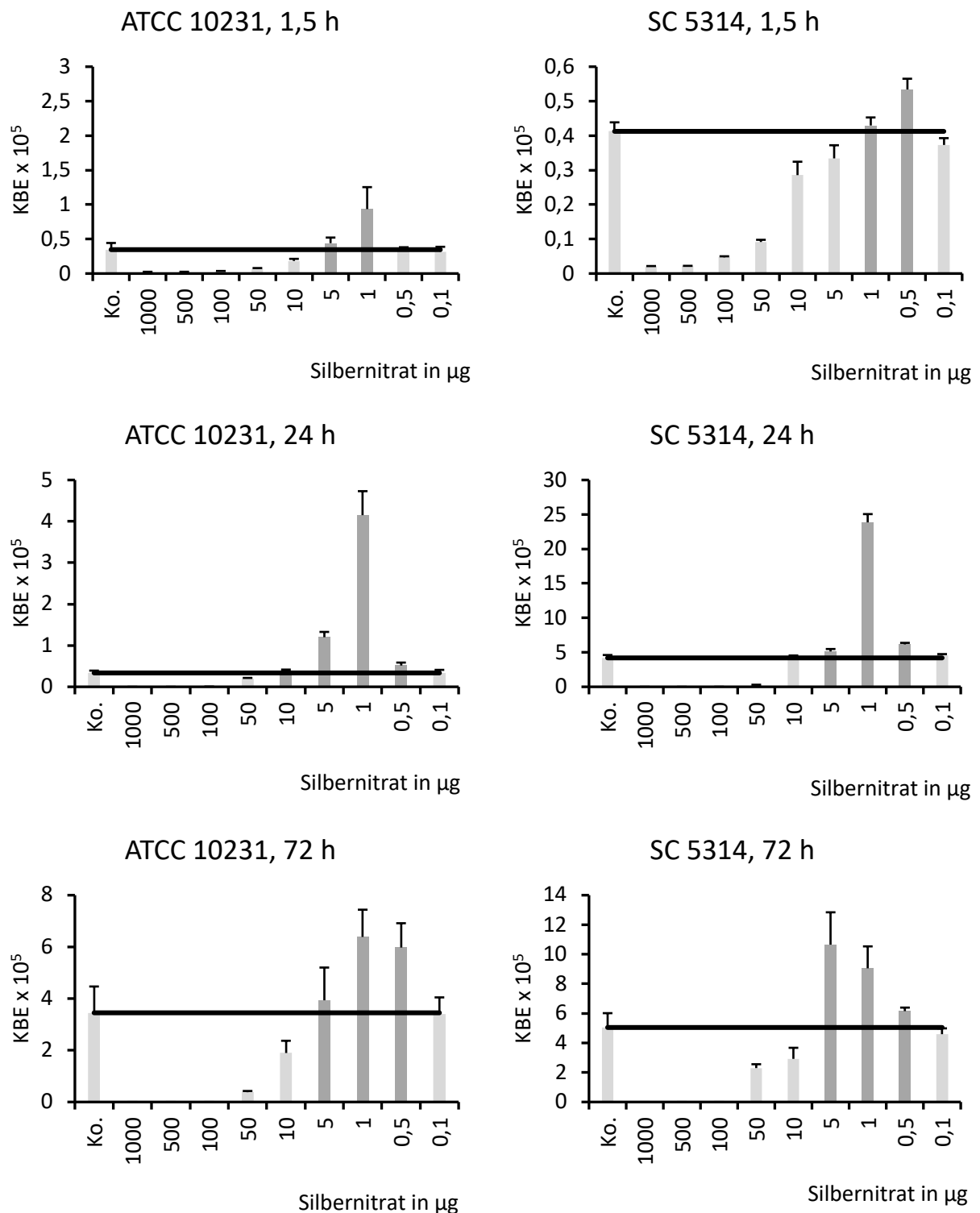
Da das FKS auf die Pilzzellen an beiden Prothesen gleichermaßen wirkt, kann die verstärkte Biofilmbildung beider Stämme an der silberhaltigen Prothese nicht auf das FKS zurückzuführen sein. Das führte zu der Hypothese, dass die Konzentration der Silberionen an der Oberfläche der P1-Prothese für den Unterschied verantwortlich sein könnte.

## **3.4. Einfluss der Silberionen-Konzentration auf die Adhäsion und Biofilmbildung von *Candida albicans***

### **3.4.1. Adhäsion und Biofilmbildung von *Candida albicans* an der Kollagenprothese ohne Silberazetat nach Substitution mit Silbernitrat**

Die Ergebnisse aus den vorherigen Experimenten legten nahe, dass das Silber in Abhängigkeit von der Konzentration möglicherweise entgegengesetzte Wirkungen auf die Adhäsion und die Biofilmbildung von *Candida albicans* haben kann.

Da wir die Silberionen-Konzentration an der Prothese bzw. im Medium nicht direkt messen konnten, nutzten wir ein Substitutionsexperiment, um die Konzentrationen, die für den beobachteten wachstumsstimulierenden Effekt von *Candida albicans* in Anwesenheit von Serum verantwortlich sind, indirekt zu bestimmen. Dazu wurde die silberfreie Kollagenprothese P3 mit den beiden *Candida albicans*-Stämmen infiziert und dem Medium verschiedene Konzentrationen von Silbernitrat zugesetzt (siehe 2.2.8.). Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeiten wurde die Anzahl vitaler Zellen bestimmt. Als cut-off-Wert dienten die mittleren Zellzahlen von den Prothesenstücken, die in Silbernitrat-freiem Medium inkubiert wurden.



**Abbildung 19** Induktion der Adhäsion und der Biofilmbildung der *Candida albicans*-Stämme ATCC 10231 und SC 5314 an der Kollagenprothese P3 (ohne Silberazetatbeschichtung) in RPMI-Medium mit 50% FKS nach Hinzugabe von Silbernitrat. Aufgetragen sind die Kolonie-bildenden Einheiten der einzelnen Silbernitratkonzentrationen. Die horizontale Linie entspricht dem Wert der Wachstumskontrolle. Es ist von einer Induktion der Adhäsion und der Biofilmbildung auszugehen, wenn die Kolonie-bildenden Einheiten den Wert der Wachstumskontrolle übersteigen. KBE=Kolonie-bildende Einheiten, µg=Mikrogramm, Ko.=Kontrolle

Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 (Tabellen A 10 und A 11, Seiten 119 und 120 im Anhang) dargestellt. Nach 1,5 Stunden Inkubation mit *Candida albicans* ATCC 10231 führten

Silbernitrat-Konzentrationen zwischen 0,5 bis 5 µg zur Adhäsion höherer Zellzahlen an der P3-Prothese im Vergleich zur silberfreien Kontrolle (Abbildung 19, links oben). Bei Silbernitrat-Konzentrationen über 5 µg hingegen sank die Anzahl adhärenter Zellen unter den Mittelwert der Kontrolle. Nach 1,5 Stunden Inkubation mit dem Stamm SC 5314 wurde der Grenzwert der silberfreien Kontrolle ebenfalls ab einer Silbernitrat-Konzentration von 0,5 µg überschritten (Abbildung 19, rechts oben). Ein Absinken unter die Wachstumskontrolle war jedoch bereits ab 5 µg sichtbar. Für die weiteren zwei Beobachtungszeiträume von 24 und 72 Stunden verhielten sich beide Stämme gleich. Der proliferative Effekt, der durch Silbernitrat hervorgerufen wurde, ließ sich für Konzentrationen zwischen 0,5 und 5 µg nachweisen.

### 3.4.2. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von *Candida albicans* gegenüber Silberionen

In dieser Versuchsreihe wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK) planktonischer *Candida albicans*-Zellen gegenüber Silberionen bestimmt (siehe 2.2.9.). Dies diente der Größeneinordnung der zuvor mittels der Titration gefundenen Silberkonzentrationen.

Die MHK ist definiert als die geringste Konzentration eines Fungizids, welche das Pilzwachstum hemmt. Zur Ermittlung der MHK von Silber gegenüber *Candida albicans* wurde das Protokoll des European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) verwendet (Arendrup et al. 2012, Download 21/07/2020).

<i>Candida albicans</i> ATCC 10231		Mittelwerte der Optischen Dichte (Spektrometer, 450 nm)									
		Silbernitrat-Konzentration in mg/l									
Wachstums- kontrolle	Wachstums- kontrolle x 0,1	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
0,872	0,087	0,081	0,000	0,016	0,012	0,027	0,553	0,643	0,200	0,253	0,397
0,561	0,056	0,012	-0,011	0,010	0,014	0,018	0,185	0,516	0,403	0,127	0,178
0,537	0,054	-0,039	-0,024	0,011	0,014	0,019	0,237	0,487	0,336	0,148	0,198
0,640	0,064	-0,112	-0,142	-0,035	0,001	0,022	0,117	0,665	0,435	0,139	0,203
0,671	0,067	0,044	0,026	0,021	0,007	0,017	0,108	0,712	0,485	0,146	0,222

**Abbildung 20** Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Silberionen an *Candida albicans* ATCC 10231 mittels spektrometrischer Bestimmung der optischen Dichte bei 450 nm. Die erste Spalte zeigt die Mittelwerte der Wachstumskontrolle an. Die zweite Spalte entspricht dem Wert der Wachstumskontrolle x0,1. Ab der dritten Spalte sind in absteigender Silbernitratkonzentration die ermittelten optischen Dichten aufgeführt. Die MHK entspricht dabei dem Wert, ab dem die gemessene optische Dichte kleiner oder gleich der Wachstumskontrolle x0,1 ist. nm=Nanometer; mg/l=Milligramm pro Liter

In Abbildung 20 sind die Mittelwerte der am Spektrometer bei 450 nm abgelesenen optischen Dichte für *Candida albicans* ATCC 10231 dargestellt. Alle angegebenen Werte sind um den Leerwert korrigiert. In der ersten Spalte sind die Werte der Wachstumskontrolle zu finden.

Dafür wurde die Pilzsuspension in RPMI-Medium ohne Zusatz von Silbernitrat für 24 Stunden bei 37 °C (Raumluft) bebrütet. Ab der dritten Spalte ist die gemessene optische Dichte der jeweiligen Pilz-Suspension in Anwesenheit unterschiedlicher Silbernitratkonzentrationen beginnend mit der höchsten Konzentration aufgelistet. Die MHK entspricht jener Konzentration, ab der die optische Dichte der Pilz-Silbernitrat-Suspension gleich oder kleiner der optischen Dichte der Wachstumskontrolle multipliziert mit dem Faktor 0,1 ist. Anhand der Tabelle ist ersichtlich, dass für *Candida albicans* ATCC 10231 die MHK einer Konzentration von 32 mg/l Silberionen entspricht.

Für *Candida albicans* SC 5314 (Abbildung 21) wurde ebenfalls wie zuvor beschrieben die MHK bestimmt. Diese entspricht wie bei *Candida albicans* ATCC 10231 einer Silberionen-Konzentration von 32 mg/l.

<i>Candida albicans</i> SC 5314		Mittelwerte der Optischen Dichte (Spektrometer, 450 nm)									
		Silbernitrat-Konzentration in mg/l									
Wachstums- kontrolle	Wachstums- kontrolle x 0,1	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
1,024	0,102	-0,047	-0,022	0,036	0,050	0,066	0,191	0,903	1,051	1,051	1,090
0,962	0,096	0,077	0,093	0,037	0,016	0,036	0,566	0,864	0,858	0,924	0,894
0,953	0,095	-0,130	0,044	0,042	0,036	0,042	0,736	0,912	0,907	0,961	0,917
0,964	0,096	-0,066	-0,106	-0,022	0,013	0,044	0,429	0,897	0,934	0,976	0,938
0,973	0,097	0,020	0,031	0,038	0,015	0,032	0,345	0,912	0,924	0,996	0,926

**Abbildung 21** Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Silberionen an *Candida albicans* SC 5314 mittels spektrometrischer Bestimmung der optischen Dichte bei 450 nm. Die erste Spalte zeigt die Mittelwerte der Wachstumskontrolle an. Die zweite Spalte entspricht dem Wert der Wachstumskontrolle x0,1. Ab der dritten Spalte sind in absteigender Silbernitratkonzentration die ermittelten optischen Dichten aufgeführt. Die MHK entspricht dabei dem Wert, ab dem die gemessene optische Dichte kleiner oder gleich der Wachstumskontrolle x0,1 ist. nm=Nanometer, mg/l=Milligramm pro Liter

### 3.4.3. Zusammenfassende Bewertung der Adhäsion und Biofilmbildung von *Candida albicans* in Abhängigkeit von der Silberionen-Konzentration

Es konnte gezeigt werden, dass Konzentrationen im Bereich von 0,5 bis 5 µg Silbernitrat die Adhäsion und die Biofilmbildung der beiden *Candida albicans*-Stämme ATCC 10231 und SC 5314 stimulieren. Umgerechnet entspricht dies einer Konzentration von 0,17 bis 1,7 mg/l an Silberionen. Die bestimmte MHK gegenüber planktonischen *Candida albicans*-Zellen betrug 32 mg/l. Die im Versuch ermittelten Konzentrationen entsprechen ungefähr einem Zweihundertstel bis einem Zwanzigstel der MHK.

## 4. DISKUSSION

Infektionen bestimmen den klinischen Alltag der Medizin. Der Mensch versucht seit jeher, sie zu besiegen. Silber bildet dabei seit Jahrhunderten einen integralen Bestandteil. Früher zur Haltbarmachung von Wasser genutzt, wird es heute diversen Materialien beigefügt, um seinen antimikrobiellen Effekt zu nutzen. Eine mögliche Anwendung sind Silber-beschichtete Gefäßprothesen. Sie werden vor allem genutzt, wenn bereits eine Infektion aufgetreten ist. Gefäßchirurgische Patienten gelten auf Grund der häufig vorbestehenden Multimorbidität und der Tatsache, dass ihnen vielfach Fremdmaterial implantiert wird, als Risikopatienten für postoperative Infektionen. Dabei ist das Spektrum auslösender Keime groß. Pilze spielen eine zunehmend wichtigere Rolle. Antibiotika und Antimykotika helfen in vielen Fällen nur unzureichend und die Prothesen müssen wieder entfernt werden. Dies kann die Morbidität des Einzelnen weiter steigern und zu einer Abnahme der Lebensqualität führen.

Es erschien deshalb sinnvoll, zu untersuchen, wie oft verwendetes Silber-beschichtetes Prothesenmaterial mit *Candida albicans*, dem häufigsten Verursacher von Pilzinfektionen, interagiert. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass unter bestimmten Bedingungen Silber auf *Candida albicans* wachstumsstimulierend wirken kann.

### 4.1. Die Reduktion der Adhäsion und Biofilmbildung bei *Candida albicans* durch Silberionen in serumfreiem Medium

Es ist bekannt, dass Mikroorganismen an inerten Materialien wie zum Beispiel Kunststoffen Biofilme bilden können. Biofilme sind organisierte Strukturen von Mikroorganismen, die sie gegenüber Umwelteinflüssen widerstandsfähiger machen. Die Beobachtung des Wachstums erfolgte in dieser Arbeit mittels des Adhäsionsassays (siehe 2.2.6.) und des XTT-Reduktionsassays (siehe 2.2.7.). Zur Beleuchtung des Aufbaus des Biofilmes und des umgebenden Mediums wurden die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM, siehe 2.3.2.) und die Phasenkontrastmikroskopie (siehe 2.3.1.) genutzt.

Den ersten wichtigen Schritt zur Biofilmbildung stellt die Adhäsion dar – das Anhaften am Material. Je besser Mikroorganismen an Materialien adhären können, desto leichter formen sie dort Biofilme. Dies gilt für Bakterien und Pilze gleichermaßen. In unseren *in vitro*-Experimenten zur Adhäsion in RPMI verwendeten wir Polystyren (ohne Beschichtung) und Polyesterprothesen mit Silber-Rinderkollagen-Beschichtung. Für Polystyren ist bekannt, dass *Candida albicans* daran anhaften kann (Díaz-García et al. 2019; Hawser 1996; Ning et al. 2013). Li et al. untersuchten verschiedene Implantationsmaterialien unter anderem Polyester

und Polystyren. *Candida albicans* konnte an beiden adhären (Li et al. 2012). Unsere Experimente bestätigten ebenfalls das Adhäsionsvermögen von *Candida albicans* an beiden Stoffen. In unseren Versuchen hafteten beide *Candida albicans*-Stämme signifikant besser an Polystyren als am Polyester mit der Silber-Rinderkollagen Typ 1-Beschichtung (Prothese P1). Bei Li et al. war die Adhäsion an Polystyren weniger stark als an Polyester, jedoch war bei ihnen das Polystyren mit Kollagen Typ-1 beschichtet und Polyester unbeschichtet (Li et al. 2012). Studien mit Bakterien (MRSA und *Pseudomonas aeruginosa*) zeigten, dass Kollagenbeschichtungen die Adhäsion und nachfolgend die Biofilmbildung an Polystyren verstärkten (Birkenhauer et al. 2014). Diese widersprüchlichen Ergebnisse verdeutlichen, dass weitere Faktoren eine Bedeutung für die Adhäsion haben. Es ist bekannt, dass viele physikalische, chemische und biologische Interaktionen das Anhaften von Bakterien auf Oberflächen erleichtern (Renner und Weibel 2011). Dies scheint auch *Candida albicans* mit dem in der Einleitung ausführlich beschriebenen Polymorphismus zu nutzen. So gilt die Hefeform von *Candida albicans* als relativ hydrophil im Vergleich zu anderen Spezies (Minagi et al. 1985), die Konversion zur Hyphe erhöhte die Hydrophobizität (Beaussart et al. 2012; Yoshijima et al. 2010). Hydrophobe Wechselwirkungen sind von großer Bedeutung für die Adhärenz von *Candida albicans*, wobei die Adhäsion besonders gut war, wenn Material und Mikroorganismen eine ähnlich große freie Oberflächenenergie aufwiesen (Minagi et al. 1985). Polystyren (Guilbaud et al. 2017) und Polyester (Samu et al. 1999) sind hydrophob. Harnett et al. untersuchten, wie sich Beschichtungen auf die Hydrophobizität von den von ihnen verwendeten Materialien auswirkten. Sie konnten zeigen, dass Kollagen die Hydrophobizität ändert. Jedoch war das Ergebnis bei verschiedenen Materialien unterschiedlich. Für Polystyren verringerte sich die Hydrophobizität. Polyester untersuchten sie nicht (Harnett et al. 2007). Da leider keine Daten für Kollagenbeschichtungen an Polyester und ihren Einfluss auf dessen Hydrophobizität vorliegen, lässt sich anhand unserer Versuche nur vermuten, dass diese sich negativ auf die Anhaftung von *Candida albicans* auswirkt. Generell sollten Gefäßprothesen so geschaffen sein, dass sie Mikroorganismen eine möglichst geringe Gelegenheit zur Verbreitung geben und dies beginnt bereits mit der Adhäsion. In allen unseren Versuchen war die Adhäsion von *Candida albicans* an Polystyren signifikant stärker als an der Prothese.

Elektrostatistische Wechselwirkungen (Klotz 1994) oder die Rauheit der Oberfläche (de Foggi et al. 2016; Mayahara et al. 2014) dagegen spielen nur eine untergeordnete Rolle für die Adhäsion von *Candida albicans*. Die Art und Konzentration von Kohlenhydraten fördert oder hemmt diese (Enache et al. 1996; McCourtie und Douglas 1981). Ebenso üben der pH-Wert (Krom et al. 2007; Sobel et al. 1981) und die Temperatur (Kimura und Pearsall 1978) einen Einfluss aus. Innerhalb der einzelnen Testreihen variierten wir die Versuchsbedingungen nicht, somit war der Einfluss von deren Änderungen auf unsere Ergebnisse grundsätzlich

ausgeschlossen.

Von Bedeutung ist auch die Zeit, die *Candida albicans* hat, um zu adhären. In unseren Experimenten untersuchten wir 1, 1,5, 2 und 3 Stunden als Adhäsionszeit. Für Polystyren fanden wir 1,5 (bei ATCC 10231) und 1 (für SC 5314) Stunde als Inkubationszeiten mit der im Mittel größten Menge an Pilzzellen. Für die Prothese P1 ergaben sich quantitativ maximale Zahlen für 2 (bei ATCC 10231) und 1,5 (für SC 5314) Stunden. Versuche von Ramage et al. hatten gezeigt, dass in der Zeit zwischen 0 und 2 Stunden *Candida* an Polystyren anhaftete und danach bereits der Übergang zur Biofilmbildung mit Mikrokoloniebildung stattfand (Ramage et al. 2001). Auch die Forschergruppe um Chandra und Kuhn experimentierte mit einer Adhäsionszeit von 1,5 Stunden. Sie verwendeten jedoch andere Oberflächenmaterialien – Polymethylmethacrylat und Silikonelastomer (Chandra et al. 2001a; Chandra et al. 2001b; Kuhn et al. 2002). Unter Berücksichtigung unserer Ergebnisse und bereits bekannter Arbeiten wurden die üblichen 1,5 Stunden als Adhäsionszeit für die folgenden Untersuchungen festgelegt.

Danach wurde das Verhalten der Biofilmbildung betrachtet. In den ersten Experimenten wurden die Zeiten von 24, 48, 72 und 96 Stunden untersucht. Es zeigte sich, dass zu allen Zeitpunkten sich signifikant mehr Biofilm an Polystyren bildete als an der Polyesterprothese mit Silber. Für den ATCC 10231-Stamm konnte an beiden Materialien die maximale Anzahl an KBE nach 24 Stunden und bei SC 5314 nach 48 Stunden bestimmt werden. Danach fielen die Zellzahlen kontinuierlich ab. In den Versuchen von Seneviratne et al. erreichten die *Candida albicans*-Biofilm-Zellzahlen an Polystyren ihr Maximum nach 48 Stunden. Nach 72 Stunden waren ebenfalls geringere Zahlen bestimmt worden (Seneviratne et al. 2009). Ramage et al. bezeichneten nach ihren Versuchen die Phasen von 8 bis 24 Stunden als Proliferations- und von 24 bis 48 Stunden als Reifungsphase von *Candida albicans*-Biofilmen (Ramage et al. 2001). Bei Chandra et al. galten 38 bis 72 Stunden als Reifungsphase (Chandra et al. 2001a). In der Arbeit von Nikawa et al. erreichte die Biofilmaktivität für die untersuchten *Candida*-Stämme im Zeitraum von 48 bis 72 Stunden ihr Plateau, weshalb sie 72 Stunden zur Bewertung des reifen Biofilmes auswählten (Nikawa et al. 2000). Eine Erklärung für die beschriebenen Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Biofilmbildung stellt der abweichende Versuchsaufbau dar. Die einzelnen Forschungsgruppen und auch wir nutzten unterschiedliche *Candida albicans*-Stämme. Verwendete Inkubationsmedien und -materialien waren ebenfalls nicht gleich. Für die weiteren Versuche wurden 24 Stunden als frühe und 72 Stunden als späte Biofilmbildungsphase festgelegt.

Zur Visualisierung der Zellmorphologie kamen die Phasenkontrastmikroskopie und die konfokale Raster-Laser-Mikroskopie (CSLM = confocal scanning laser microscopy) zum Einsatz. Mittels der Phasenkontrastmikroskopie wurde das die Prothese umgebende Medium angesehen. Im CSLM wurden die Zellen an der Prothese betrachtet. Die Versuche erfolgten

in Anlehnung an Chandra et al., die die Fluoreszenzfärbungen mit ConA und FUN-1 benutzten. Das Vorgehen wurde in Vorexperimenten an die hier verwendeten Materialien adaptiert. FUN-1 bildet zylindrische intravakuolare Strukturen, die nach Anregung durch den Laser sich als orange-rot darstellen. Es handelt sich dabei um metabolisch aktive Zellen. ConA bindet an Glucose- und Mannose-Reste der Zellwandpolysaccharide und emittiert nach Anregung grün (Chandra et al. 2001a). Als Doppelfärbung lassen sich sowohl Aussagen zur Morphologie der Zellen als auch zur Lebensfähigkeit machen. In den bildgebenden Verfahren wurde schon nach der Adhäsionszeit von 1,5 Stunden ein Unterschied im Aussehen der Zellen deutlich. An Polystyren bildeten sich Keimschläuche, entsprechend den Bildern von Ramage et al. (Ramage et al. 2001). An der Silber-beschichteten Polyesterprothese und im umgebenden Medium zeigten sich nur Hefezellen. Dies änderte sich auch nach 72 Stunden nicht. Die Morphologie nach 72 Stunden an Polystyren ist mit Hyphen und dichtem Zellgeflecht übereinstimmend derer, die Ramage et al. publizierten (Ramage et al. 2009).

In Anbetracht der vorliegenden Ergebnisse stellte sich die Frage, worauf die erfassten Unterschiede beruhten. Waren die unterschiedlichen Kunststoffarten dafür verantwortlich? Beeinflusste das imprägnierte Silber in der Prothese die Biofilmbildung von *Candida albicans*? Um diesen Sachverhalt näher zu beleuchten, wurden die nachfolgenden Versuche mit zwei materialgleichen Polyesterprothesen mit Rinderkollagenbeschichtung durchgeführt. Die Prothese P1 war die aus den Vorversuchen bekannte mit Silber imprägnierte Prothese. Die andere Prothese ohne Silber wurde als P3 bezeichnet.

Im Adhäsionsassay konnte zu jedem Zeitpunkt ein Wachstum an den Prothesen verzeichnet werden. Die Anzahl der KBE von beiden Stämmen war jedoch an der Prothese P3 signifikant größer als an der Prothese P1. Zur Überprüfung des Ergebnisses der Wachstumskinetik kam eine zweite Methode zur Quantifizierung zur Anwendung – der XTT-Reduktionsassay. Dabei reduzieren die Zellen XTT zu einem wasserlöslichen Formazan (Paull et al. 1988), wobei die eigentliche Reaktion in Hefen über die mitochondriale Dehydrogenase erfolgt (Tellier et al. 1992). Der Gehalt an XTT-Formazan wird typischerweise nachfolgend bei 486 bis 492 nm am Spektronenphotometer gemessen (Kuhn et al. 2003; Nett et al. 2011; Peeters et al. 2008). Wir erfassten die Extinktion bei 490 nm. Der XTT-Reduktionsassay dient sowohl bei Bakterien als auch bei Pilzen als Methode zur Einschätzung des Biofilmausmaßes und der Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen (Peeters et al. 2008), denn nur letztere reduzieren mittels ihrer Dehydrogenasen XTT zu Formazan (Roehm et al. 1991). Unsere Versuche demonstrierten, dass an der Prothese P3 zu allen Zeiten signifikant mehr metabolisch aktive Zellen vorhanden waren als an der P1.

Auch optisch waren Unterschiede in der Phasenkontrastmikroskopie erkennbar. So sah man nach der Adhäsionszeit bei beiden Prothesen im Medium noch mengenmäßig viele Pilzzellen, jedoch hatten sich bei der Prothese P3 im Gegensatz zur P1 Keimschläuche gebildet. Im



weiteren Verlauf wurde der Unterschied noch deutlicher sichtbar. Hatten sich bei der Prothese P3 Zellverbände mit Hyphen gebildet, so waren zum gleichen Zeitpunkt bei der Prothese P1 nur wenige Hefezellen zu sehen.

Da in diesen Experimenten in RPMI fertigungsgleiche Prothesen genutzt worden waren, konnte ausgeschlossen werden, dass die Ergebnisse durch unterschiedliche Materialbeschaffenheit zu Stande gekommen waren. Die Prothese P1 interagiert mit *Candida albicans* derart, dass der Hefe-Hyphen-Übergang gestört und Zellen abgetötet wurden. Der einzige Unterschied beider Prothesen war die Beschichtung mit Silber. Bei der verwendeten Silberprothese war in die äußerste Schicht vom Hersteller Silberazetat eingearbeitet worden. Dieses sollte laut Herstellerangaben als Ionen über einen Zeitraum von bis zu 7 Tagen abgegeben werden. Dies deckt sich mit Erkenntnissen von Hooper et al. Sie machten Versuche mit Silberalginat-Wundverbänden und verschiedenen Mikroorganismen, unter anderem *Candida albicans*. Die Verbände setzten Silberionen frei. Diese waren gegen *Candida albicans* wirksam und töteten mehr Zellen ab als die als Kontrolle dienenden Nichtsilberalginat-Wundverbände (Hooper et al. 2012).

Silber ist antibakteriell wirksam und sein Nutzen ist seit langem bekannt (Berger et al. 1976; Fromm 2011). Auch seine Wirkung auf Pilze konnte nachgewiesen werden (Wlodkowski und Rosenkranz 1973; Wright et al. 1999). Silberionen sind reaktionsfreudig (Sterling 2014). Der genaue Wirkmechanismus ist noch nicht bekannt. Der erste wichtige Schritt bei der Interaktion mit Mikroorganismen ist die Aufnahme des Silbers in die Zelle. Bakterien, bei denen Silber wirkte, absorbierten es nachfolgend mit Hilfe von Diffusion, bis eine tödliche Konzentration erreicht war (Lansdown 2006). Silber zerstörte die Integrität der Zellmembran durch Interaktion mit deren anionischen Bestandteilen (Feng et al. 2000). Bereits 1954 bewiesen Versuche, dass Silber in Wechselwirkung mit der mitochondrialen Adenosintriphosphatase trat (Chappel und Greville 1954). Seit den Experimenten von Bragg und Rainnie in den 1970-iger Jahren war bekannt, dass Silberionen mit Proteinen der Atmungskette von *Escherichia coli* interagiert. Silber blockierte bedeutende Enzyme wie Elektronentransporter in der Zelle (Bragg und Rainnie 1974; Rainnie und Bragg 1971) und band an Sulfhydryl-Gruppen (Fuhrmann und Rothstein 1968). Dies führte nachfolgend zur Bildung von Sauerstoffradikalen (ROS, reactive oxygen species), die die Zelle schädigten (Gordon et al. 2010; Park et al. 2009; Rowan et al. 2010). Ein weiterer Angriffspunkt war die Desoxyribonukleinsäure (DNA, deoxyribonucleic acid) (Hidalgo und Domínguez 1998; Modak und Fox 1973; Yakabe et al. 1980). Silber führte eine Kondensation zellulärer DNA mit daraus resultierender Hinderung der Replikation herbei (Feng et al. 2000). Eine besondere Affinität zeigte Silber gegenüber Cytosin-reichen DNA-Molekülen (Fortino et al. 2015; Ono et al. 2008), es nutzte zur Bindung den Stickstoff der Nukleinbase (Jiang und Ran 2018). Beaussart et al. legten dar, dass die Transition von Hefe zur Hyphe bei *Candida albicans* an Veränderungen der Zelloberfläche mit

Heraufregulierung von Als 3-Adhäsinen gebunden war (Beaussart et al. 2012). Möglicherweise könnten Silberionen durch Reaktionen mit der Zelloberfläche diesen Prozess behindern.

Alle die oben genannten Vorgänge könnten zur beobachteten Störung des Hefe-Hyphen-Überganges im Beisein der Prothese P1 und zu morphologischen Veränderungen der Pilzzellen (kleinere Zellen) beigetragen haben.

#### **4.2. Die Induktion der Adhäsion und Biofilmbildung bei *Candida albicans* durch Silber nach Hinzugabe von FKS**

Zur Annäherung der *in vitro*-Bedingungen an physiologische Gegebenheiten wurde der Versuchsaufbau um fetales Kälberserum (FKS) erweitert – ein Vorgehen, welche bereits Kuhn et al. in ihren Versuchen nutzten (Kuhn et al. 2002). Beide Prothesen wurden mit jeweils beiden *Candida*-Stämmen in RPMI mit 50% FKS inkubiert.

Fetales Kälberserum wird häufig als Nährmedium genutzt. Es ist die flüssige Fraktion koagulierten Kälberblutes, welches von Zellen, Fibrin und Gerinnungsfaktoren befreit wurde. Es enthält eine Reihe von Ernährungs- und makromolekularen Faktoren, die wichtig für das Zellwachstum sind. Bestandteile sind unter anderem bovines Serumalbumin, Aminosäuren, Kohlenhydrate, Lipide und Hormone (Labome: Fetal Bovine Serum, letzter Zugriff 31/10/2019). Bereits 1960 wusste man, dass humanes Serum nach 1,5 Stunden Keimschläuche bei *Candida albicans* induzierte und sich nach 24 Stunden Inkubation ein Myzel gebildet hatte (Taschdjian et al. 1960). Es wurde und wird deshalb zur schnellen Identifizierung von *Candida albicans* im Keimschlauchtest genutzt (Adeleigh 1964; Atalay et al. 2017; Warwood und Blazevic 1977). Nadeem et al. untersuchten die Wirkung verschiedener Umwelteinflüsse auf das Wachstum von *Candida albicans*. Sie verwendeten unter anderem Pferdeserum und RPMI. Beide Medien stimulierten die Filamentation. Die Wirkung von Serum war am ausgeprägtesten (Nadeem et al. 2013). Verantwortlich dafür ist vor allem das Muramyl-Dipeptid (Wang und Xu 2008). Virulenzgene von *Candida albicans* wurden in Gegenwart von Serum hochreguliert (Samaranayake et al. 2013). Es war also zu erwarten gewesen, dass die Anwesenheit von FKS den Hefe-Hyphen-Übergang in Richtung der Hyphenbildung fördert. Optisch konnte es gut in der Phasenkontrastmikroskopie und in der CLSM beobachtet werden. Schon nach 1,5 Stunden hatten sich sowohl im Medium als auch an den Prothesen Keimschläuche gebildet. Nach 72 Stunden war ein dichtes Geflecht aus Hyphen entstanden. Es überraschte jedoch, dass dies bei beiden Prothesen stattgefunden hatte. In reinem RPMI hatte die Silberprothese den Übergang zur Hyphenform wirksam unterbinden können. In serumhaltigem Medium gelang dies nicht. Es konnte sogar bei beiden Stämmen ein signifikant stärkeres Wachstum an der Prothese mit der Silberbeschichtung P1 im Vergleich zu der

Prothese ohne Silber P3 im Adhäsionsassay verzeichnet werden. Die zweite quantitative Methode – der XTT-Reduktionsassay – bestätigte dieses Ergebnis.

Es stellte sich die Frage, warum das Silber in der Prothese nicht wie zuvor zur Reduktion der Adhäsion und Biofilmbildung geführt hatte, sondern im Gegenteil das Wachstum an der Prothese P1 signifikant stärker war als an der Vergleichsprothese. Es musste in dieser Versuchsreihe eine Interaktion zwischen den Silberionen und dem FKS stattgefunden haben. Bereits 1940 konnte gezeigt werden, dass die antibakterielle Wirkung des Schwermetalls Quecksilber auf dessen Reaktion mit Thiolgruppen (Sulphydrylgruppen, -SH) beruhte (Fildes 1940). Silber wird ebenfalls zu den Schwermetallen gezählt. Auch Bragg und Rainnie führten die Reaktion von Silber mit der Atmungskette von *Escherichia coli* auf eine Reaktion mit Sulphydrylgruppen zurück (Bragg und Rainnie 1974). Eine wichtige Thiolgruppe stellt die Aminosäure Cystein dar. Sie ist essentiell für die Aktivität vieler Enzyme (Russell und Hugo 1994). Liao et al. zeigten, dass die Hinzugabe von Aminosäuren, wie zum Beispiel Cystein, und anderen Verbindungen mit Sulphydrylgruppen die Wirkung von Silbernitrat gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* neutralisieren konnte (Liao et al. 1997). Diese SH-Gruppe bietet dem reagiblen Silberion also einen Reaktionspartner. Cystein stellt einen Bestandteil im Serum von Säugetieren dar (Brigham et al. 1960). In unseren Versuchen reagierten Silberionen demnach mit der Sulphydrylgruppe des Cysteins und konnten somit nicht ihre antimykotische Wirkung entfalten. Auch dies erklärt noch nicht vollständig, warum das Wachstum an der Prothese P1 im Adhäsionsassay statistisch signifikant erhöht war und nicht nur gleich dem an der Prothese P3.

In weiteren Experimenten wurde überprüft, welchen Einfluss die Konzentration von Silber auf das Wachstum von *Candida albicans* ausübt. Denn wenn Silber durch das FKS inaktiviert wird, ist davon auszugehen, dass zu unterschiedlichen Zeitpunkten verschiedene Konzentrationen an Silber vorliegen. Im ersten Schritt wurde die Kollagenprothese ohne Silber (P3) mit beiden Stämmen und verschiedenen Silbernitratkonzentrationen inkubiert. Als Grenzwerte galten Wachstumsmittelwerte der Kollagenprothese ohne Hinzugabe von Silber. Konzentrationen zwischen 0,5 und 5 µg an Silbernitrat führten zu einer Proliferation der Stämme an der Kollagenprothese, wohingegen höhere Konzentrationen inhibierend auf das Wachstum gewirkt hatten. Es gibt zahlreiche Studien, in denen untersucht wurde, wie sich eine geringe Konzentration von antimikrobiellen Substanzen auf das Wachstum von Erregern auswirkt. Hoffman et al. fanden heraus, dass subinhibitorische Konzentrationen von Aminoglykosiden die Biofilmbildung von *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* induzieren konnten (Hoffman et al. 2005). Verminderte Konzentrationen an Chlorhexidin (Aka und Haji 2015) oder Kanamycin (Jones et al. 2013) konnten ebenso die Biofilmbildung von *Pseudomonas aeruginosa* fördern. Geringe Konzentrationen von Silbernanopartikeln stimulierten die Biofilmentwicklung von *Pseudomonas aeruginosa* (Yang und Alvarez 2015). Das MRSA-

Wachstum wurde durch subinhibitorische MHK-Werte von  $\beta$ -Laktamase-Antibiotika stimuliert (Mlynek et al. 2016). Auch die Biofilmbildung von *Staphylococcus epidermidis* wurde durch Konzentrationen von Antibiotika, die unterhalb der Wirksamkeitsgrenze lagen, erhöht (Wang et al. 2010). Für Pilze gibt es nur vereinzelte Studien zu diesem Thema. Wu et al. demonstrierten, dass *Candida albicans* auf suboptimale Dosen von Fluconazol mit einer erhöhten extrazellulären Bildung von SAP reagierte. Sie warnten davor, dass sich daraus *in vivo* eine erhöhte Virulenz von *Candida albicans* ergeben könnte (Wu et al. 2000). Subletale Konzentrationen von Tetracyklinen hatten einen geringen stimulierenden Wachstumseffekt auf *Candida albicans* mit verstärkter Hyphen- und Biofilmbildung (McCool et al. 2008). Bei Imbert et al. riefen subinhibitorische Antimykotikakonzentrationen verschiedene Effekte hervor. Amphotericin B verringerte die mitochondriale Dehydrogenaseaktivität von *Candida albicans*, Fluconazol und Itraconazol erhöhten sie. Obwohl Amphotericin B generell den Metabolismus verminderte, verstärkte es signifikant die Adhäsion von *Candida albicans* an vier von sieben Materialien (Imbert et al. 2002).

Die wichtigste Kenngröße für die Wirksamkeit einer antimikrobiellen Substanz ist die minimale Hemmkonzentration (MHK). Sie ist definiert als die geringste Konzentration, die die Erregerlebensfähigkeit aufrechterhält oder reduziert. Sie stellt eine semiquantitative Methode dar. Es werden Verdünnungsreihen genutzt, um sie zu bestimmen (Lambert und Pearson 2000). Das EUCAST-Protokoll, welches zur Bestimmung der MHK antimykotischer Agenzien für Hefepilze genutzt wird, versteht darunter: „die geringste Konzentration (in mg/l) eines antimykotischen Mittels, welches das Pilzwachstum inhibiert“ (Arendrup et al. 2012, Download 21/07/2020). Unterhalb dieser Schwelle spricht man von subinhibitorischen Konzentrationen. Die experimentell bestimmte MHK von Silbernitrat für die beiden verwendeten *Candida albicans*-Stämme lag bei 32 mg/l.

Laut Kampf et al. reichten 5% Pferdeserum aus, um Silber zu neutralisieren. In ihren Versuchen tolerierten *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* und *Candida albicans* sehr viel höhere Konzentrationen an Silber, wenn sie gleichzeitig mit Pferdeserum inkubiert worden waren. Die Zahl an lebenden Kolonien von *Candida albicans* und *Staphylococcus aureus* war in ihren Experimenten signifikant erhöht, wenn der silberimprägnierte zentrale Venenkatheter in 5% Säugetierserum zuvor bebrütet worden war (Kampf et al. 1998). In unseren Experimenten verwendeten wir 50% FKS. Es ist demnach davon auszugehen, dass dieses Silberband und somit zu subinhibitorischen Konzentrationen an der Oberfläche der P1-Prothesen führte.

Die von uns durchgeführten Substitutionsexperimente zeigten, dass Silber in Konzentrationen zwischen 1,7 und 0,17 mg/l die Biofilmbildung beider Stämme stimulieren kann. Dies entspricht ungefähr 1/20 bis 1/200 der zuvor bestimmten MHK von Silbernitrat. Es gelang nicht, die genaue Konzentration an Silberionen, die von der Silberprothese abgegeben wurden, zu

bestimmen. Es ist jedoch davon auszugehen, dass sie sich in dem zuvor genannten Rahmen bewegen.

Grundsätzlich verhielten sich die beiden benutzten *Candida albicans*-Stämme gleich und bestätigten damit unsere Ergebnisse. Betrachtet man den Adhäsionsassay genauer, so fallen jedoch Ungleichheiten auf. Sowohl in RPMI (Tabelle A 12 Seite 121 und Diagramm A 2 Seite 122 im Anhang) als auch in RPMI mit 50% FKS (Tabelle A 13 Seite 123 und Diagramm A 3 im Seite 124 im Anhang) waren die Unterschiede der für den jeweiligen Stamm ausgezählten KBE an der Prothese P1 statistisch signifikant. Zur Zeit der Adhäsion und der frühen Biofilmbildung wuchs der ATCC-Stamm in Anwesenheit der Prothese P1 stärker in RPMI, nach 72 Stunden wurden mehr Kolonien des SC-Stammes bestimmt. Nach Hinzugabe von FKS wuchs für die Zeiten der Biofilmbildung (24 und 72 Stunden) der SC-Stamm stärker. Nur zur Zeit der Adhäsion konnten mehr Pilzzellen des ATCC-Stammes gefunden werden. In Gegenwart der Prothese P3 waren die beobachteten Unterschiede nicht zu allen Zeitpunkten signifikant.

Die Experimente wurden mit zwei Stämmen durchgeführt, um ein nur für einen *Candida*-Stamm spezifisches Verhalten auszuschließen. *Candida albicans* SC 5314 ist als invasiver und virulenter Stamm beschrieben (Kretschmar et al. 1999; Thewes et al. 2007). *Candida albicans* ATCC 10231 gilt als nicht-invasiv und seine Virulenz als stark abgeschwächt (Kretschmar et al. 1999; Thewes et al. 2007). Beide Stämme besitzen eine unterschiedliche Fähigkeit zur Hyphenbildung (geringer bei ATCC 10231), weisen *in vitro* jedoch die gleiche metabolische Flexibilität, Stresswiderstandsfähigkeit, Aktivität an Hydrolasen und Adhäsionseigenschaften auf. Es gibt keine substantiellen genomischen Unterschiede, wohl aber große Differenzen in der Genexpression (Thewes et al. 2008).

In der Arbeit von Vandenbosch et al., die mit zehn verschiedenen *Candida albicans*-Stämmen experimentierten, ist grafisch ersichtlich, dass die verschiedenen Stämme auf an sich gleiche Inkubationsbedingungen unterschiedlich stark reagierten. Ob dieses Verhalten statistisch signifikant abweichend war, wurde leider nicht ersichtlich, da der Fokus der Arbeit ein anderer war und ein statistischer Vergleich der einzelnen Stämme dahingehend nicht durchgeführt wurde (Vandenbosch et al. 2010). De Barros et al. demonstrierten, dass verschiedene Stämme unterschiedliche Mengen an Biofilmen bilden konnten. Die Stämme unterschieden sich in *in vivo*-Virulenz und transkribierten Genen. Sie folgerten, dass so Kolonisierung, Proliferation und Überleben in verschiedenen Nischen beeinflusst werden könnte (De Barros et al. 2017). Zuvor hatten schon Junqueira et al. gezeigt, dass vermeintlich invasivere Stämme (isoliert aus Blutkulturen von Patienten) *in vitro* die gleiche Fähigkeit zur Biofilmbildung und die gleiche Pathogenität besitzen können wie orale *Candida albicans*-Stämme, die von HIV-Patienten entnommen worden waren (Junqueira et al. 2011). Für Bakterien beschrieben Kaplan et al. das Verhalten verschiedener Stämme von *Staphylococcus epidermidis* unter dem Einfluss

subinhibitorischer Konzentrationen an Vancomycin, Tigecyclin, Linezolid und Novobiocin. Sie wählten sechs Stämme aus, von denen bekannt war, dass sie unterschiedlich stark Biofilme produzieren. Die drei Stämme mit der größten Biofilmproduktion zeigten keine Änderung ihres Verhaltens oder eine geringere Menge an Biofilm. Demgegenüber bildeten die drei Stämme mit an sich geringerer Fähigkeit zur Biofilmherstellung eine bis zu zehnmal größere Menge an Biofilm in Anwesenheit verminderter Konzentrationen an Antibiotika. Sie schlossen daraus, dass die Antwort auf Mengen an Antibiotika unterhalb der MHK Stammes- und Antibiotika-abhängig ist (Kaplan et al. 2011). Zur vollständigen Beantwortung der Frage, warum unsere Stämme derart reagierten, müssten weiterführende Versuche und gegebenenfalls *in vitro*-Analysen zur Genexpression stattfinden, denn auch hier ist ein multifaktorieller Hintergrund zu vermuten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die von der Prothese freigesetzten Silberionen mit dem Cystein des FKS reagierten und so eine Situation schufen, in der nur noch subinhibitorische Konzentrationen an Silberionen vorlagen. Dies wiederum stimulierte die Biofilmbildung von *Candida albicans*.

### 4.3. Limitationen

Jede Forschungsarbeit sollte den Anspruch haben, von Nutzen zu sein. Es gibt jedoch Beschränkungen, die die direkte Übertragbarkeit dieser Arbeit auf die Gefäßchirurgie und deren Patienten verhindern.

Die hier dargestellten Ergebnisse wurden *in vitro* gewonnen. Durch Hinzugabe von FKS sollten physiologische Bedingungen simuliert werden. Der menschliche Körper ist jedoch ein komplexes Gebilde vieler zusammengreifender physiologischer Vorgänge. Inwieweit sich die gefundenen Ergebnisse wirklich auf *in vivo*-Gegebenheiten anwenden lassen, muss durch klinische Studien gezeigt werden. Es wurden auch nur zwei Stämme von *Candida albicans* betrachtet. Bei der Auswahl wurde auf klinische Relevanz geachtet, es gibt jedoch noch weitere.

Uns war es nicht möglich, die von der Silberprothese freigesetzte Menge an Silberionen an deren Oberfläche noch im umgebenden Medium direkt zu bestimmen. In den Herstellerangaben findet sich ebenfalls keine exakte Konzentration. Sie sagen nur, dass das Silberfreisetzungsprofil derart gestaltet wurde, dass es innerhalb der ersten 24 Stunden nach Implantation am aktivsten ist und dass während 7 Tagen eine kontinuierliche und substantielle Freisetzung stattfindet.

Andere *Candida* Spezies außer *Candida albicans* erlangen zunehmend an Bedeutung (Pfaller et al. 2019). Ihr Verhalten unterscheidet sich durchaus von dem von *Candida albicans*. Zwar

scheint *Candida albicans* komplexere Biofilme zu bilden als *Non-Candida albicans* Spezies (Hawser und Douglas 1994; Kuhn et al. 2002), jedoch hatten diese eine signifikant geringere Empfindlichkeit gegenüber Fluconazol (Ferreira et al. 2013).

Die Nutzung eines anderen Mediums hätte in diesem Versuchsaufbau zu anderen Ergebnissen führen können. Blanco et al. erforschten die Wirkung subinhibitorischer Konzentrationen von Itraconazol auf *Candida albicans* und *Candida dubliniensis* in Anbetracht der Adhäsion an Plastik und humanen Zellen der Mundhöhle und der Hydrophobizität. Sie entdeckten dabei, dass die Ergebnisse sich in Abhängigkeit vom benutzten Inkubationsmedium änderten und warben für eine Standardisierung der Methoden (Blanco et al. 2006).

Die Zusammensetzung des FKS kann variieren. Es wird aus Feten geschlachteter schwangerer Kühe gewonnen. Die einzelnen Bestandteile sind abhängig von Faktoren wie Ernährung, Geografie, Jahreszeit, Antibiotika- und/oder Hormongabe und Gestationsalter des Feten (Baker 2016).

Kuhn et al. verwiesen in ihrer Veröffentlichung auf die Grenzen des XTT-Reduktionsassays. Sie wiesen darauf hin, dass Vergleiche verschiedener Stämme ohne Weiteres nicht einfach möglich sind, da diese das Substrat unterschiedlich verstoffwechseln könnten. Deshalb seien quantitative Aussagen allein mit XTT ohne vorherige Standardisierung für bestimmte Mengen an Tetrazolium schlecht möglich (Kuhn et al. 2003). In dieser Arbeit diente der XTT-Assay als zweite, weitere Methode der Quantifizierung der Wachstumskinetik. Vergleichende Betrachtungen wurden nur innerhalb eines *Candida*-Stammes gemacht. Die genutzte Menge an Tetrazolium war für alle Versuche gleich.

Díaz-García et al. demonstrierten, dass die Wahl der Mikrotiterplatten einen Einfluss auf die Größe des Biofilmes und die metabolische Aktivität haben kann. So wiesen nicht-behandelte Gewebekulturplatten eine höhere Biomasse und einen größeren Stoffwechselumsatz im Vergleich zu behandelten Gewebekulturplatten auf (Díaz-García et al. 2019).

Für die Versuche wurde Silbernitrat verwendet. Sowohl Silberazetat als auch Silbernitrat sind Salze einer Säure. Für beide wurde ein bakterizider Effekt beschrieben (Thurman et al. 1989), jedoch handelt es sich um unterschiedliche chemische Stoffe, die unterschiedlich reagieren können. In beiden Verbindungen ist Silber jedoch einwertig und sollte deshalb annähernd gleich reagieren.

### **4.4. Klinischer Bezug und Ausblick**

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, gibt es keinen Stillstand der Forschung im Bereich der Gefäßprothesen und möglicher Beschichtungen. Für Silberbeschichtungen existieren

Studien, die den Einsatz und das Outcome positiv bewerten (Batt et al. 2003; Pupka et al. 2011; Ricco 2006; Zegelman et al. 2013). Andere zum Teil tierexperimentelle Forschungsarbeiten wiederum sahen keinen signifikanten Unterschied in der Verbesserung der Infektionsrate bei Nutzung Silber-enthaltender Prothesen (Gao et al. 2010; Goëau-Brissonnière et al. 2002; Hernández-Richter et al. 2003; Larena-Avellaneda et al. 2009), weisen jedoch darauf hin, dass sie kostenintensiver sind (Larena-Avellaneda et al. 2009).

Neuere Analysen von Berard et al. verglichen die *in vitro*-Wirksamkeit von Silber-Triclosan-Prothesen gegenüber nur Silber-enthaltender oder Rifampicin-getränkter Prothesen. Zur Kontrolle wurde eine gestrickte Kollagenprothese genutzt. Sowohl die Silberprothese als auch die Silber-Triclosan-Prothese waren gegen *Candida albicans* und *Staphylococcus epidermidis* mikrobizid wirksam. Gegen MRSA und ESBL (*Escherichia coli* mit erweitertem Spektrum gegen Betalaktamasen) war die Silber-Triclosan-Prothese effektiver (Berard et al. 2016). Im Vergleich zu Rifampicin war die Kombination aus Triclosan und Silber gegenüber allen Mikroorganismen wirksamer (Berard et al. 2019).

Auch wenn Silber nach unseren Ergebnissen in subinhibitorischen Konzentrationen stimulierend auf das Wachstum wirkt, so konnten Hazen et al. in *in vitro*-Versuchen aufzeigen, dass Konzentrationen von Fluconazol unterhalb der MHK zu vermehrter Phagozytose von *Candida albicans* führten (Hazen et al. 2000). Nystatin und Micafungin hemmten in subinhibitorischen Mengen signifikant die Biofilmbildung von *Candida albicans* (El-Houssaini et al. 2019). Hoyer et al. führten Versuche mit Neutrophilen und *Candida albicans*-Biofilmen durch. Neutrophile stellen eine Säule des Abwehrmechanismus gegen Pilze dar, wirken jedoch wenig gegen Biofilme von *Candida albicans*. Sie konnten beweisen, dass in Anwesenheit geringer Mengen an Echinocandinen die Bildung von neutrophilen extrazellulären Fallen gesteigert wurde. Es handelt sich dabei um Strukturen von DNA, Histionen und antimikrobiellen Proteinen mit Aktivität gegen Pilze (Hoyer et al. 2018). Es scheint also, dass andere fungizid wirksame Mittel durchaus auch in subinhibitorischen Konzentrationen eine positive Wirkung entfalten können und dies vielleicht Ansätze für weitere Produktentwicklungen darstellen könnten.

Prävention von Infektionen ist wichtig, sollte diese jedoch versagen, so sind Therapiestrategien notwendig. Jede Behandlung stellt einen individuellen Entscheidungsprozess dar, in dem Vor- und Nachteile für den einzelnen Patienten abgeschätzt werden. Generelle Empfehlungen zum Vorgehen finden sich in der Einleitung dieser Arbeit. Eine in zunehmendem Maße genutzte Methode, um den Gefäßersatz bei tiefen perivaskulären postoperativen Infektionen zu erhalten, ist die Vakuumtherapie (Andersson et al. 2018). 1993 erstmals beschrieben (Fleischmann et al. 1993), etablierte sich bald darauf der Begriff VAC (vacuum-assisted closure, Vakuum-assistierter Verschluss)-Therapie (Argenta und Morykwas 1997). Dabei wird in die Wunde ein Schwamm eingelegt, beides mit Klebeband verschlossen und ein



subatmosphärischer Druck von 125 mmHg ausgeübt (Morykwas et al. 1997). Die Vakuumtherapie soll helfen, chronische Ödembildung zu reduzieren, den lokalen Blutfluss zu erhöhen und die Bildung von Granulationsgewebe zu fördern (Argenta und Morykwas 1997; Chen et al. 2005). Spätere Studien konnten zeigen, dass auch geringere Drücke angewendet werden können (Borgquist et al. 2011), und dass die Größe des verwendeten Schwammes Einfluss auf die Kontraktionsstärke der Wunde durch die VAC-Therapie nimmt (Anesäter et al. 2011). Anderson et al. werteten in ihrer retrospektiven Studie Daten von 161 Patienten aus, die eine Vakuumtherapie erhalten hatten. Die Rate an erhaltenem Gefäßersatz lag bei 81%, waren zuvor Gefäßprothesen implantiert worden, so betrug sie 64%. Größere Blutungen traten in 7,1% der Fälle auf und lokale Reinfektionen fanden sich bei 6,4% der Patienten. Ein Versagen der Therapie war assoziiert mit Protheseninfektionen und Blutungen oder Pseudoaneurysmata als Symptom dieser (Anderson et al. 2018). In Italien behandelten Bellosta et al. erfolgreich einen Patienten mit einer postoperativen Infektion nach totalem supraaortalem Debranching-Gefäßersatz bei Aneurysma des Aortenbogens mit einer Vakuumtherapie. Beim Debranching werden die supraaortalen Arterien zur Verlängerung der Ladezone von Stent-Prothesen umgesetzt (Zipfel und Hetzer 2013). Nach Entfernung der retrosternalen Infektion verschlossen Bellosta et al. die Wunde mit einem Vakuumverband und applizierten 80 mmHg Negativdruck. Die gesamte Therapie dauerte 30 Tage. Nach 36 Monaten war der Patient weiterhin symptomfrei (Bellosta et al. 2018). Osada et al. beschrieben einen Fall, bei dem die Vakuumtherapie bei tiefer Sternumwundinfektion mit Osteomyelitis und Mediastinitis nach Bypass-Operation erfolgreich eingesetzt wurde. *Candida albicans* war das auslösende Agens. Nach 13 Debridements in Allgemeinanästhesie konnte bei negativem Wundabstrich die plastische Deckung mittels Pectoralis-lappenplastik erfolgen (Osada et al. 2012).

Zur weiteren Bewertung des Einsatzes von Silber-beschichteten Prothesen stellt sich die Frage, wie gesundheitsschädigend kann der Einsatz von Silber auf den menschlichen Körper wirken. Larena-Avellaneda et al. fanden keinen Hinweis auf ein durch Silberfreisetzung verursachtes gefärbtes Exsudat oder Wundfärbung (Larena-Avellaneda et al. 2009). Silber ist als körperfremd zu betrachten, da es keinen natürlichen Nutzen für den menschlichen Organismus hat (Gupta et al. 2001; Lansdown 2005). Es reagiert mit endogen vorhandenen Anionen und Proteinen (Schierholz et al. 1999; Williams und Williams 1988). In Ratten waren Silberkonzentrationen im Auge nach oraler Aufnahme über 30 Wochen konstant und nach 12 Monaten waren noch immer Silberpartikel nachweisbar (Matuk et al. 1981). In weiteren Tierexperimenten fanden sich dosisabhängige toxikologische Wirkungen wie Tod (Tamimi et al. 1998), Gewichtsverlust (Matuk et al. 1981), veränderte Neurotransmitter (Hadrup et al. 2012a)- und Leberenzym Spiegel (Hadrup et al. 2012b) und Größenzunahme des Herzens (Jensen et al. 1974). Die Wirkung scheint vor allem über Silberionen vermittelt zu sein (Hadrup

et al. 2012b; Vrcek et al. 2016). Nach oraler Aufnahme von Silber konnte dieses in Magen, Dünn- und Dickdarm, Leber, Milz, Hoden; Niere, Gehirn, Lunge, Blut, Blase und Herz nachgewiesen werden (van der Zande et al. 2012). Die dermale Einlagerung bezeichnet man als Argyrie – eine irreversible Krankheit. Es gibt kein bekanntes Antidot für Silber, jegliche Therapien sind nur symptomlindernd (Brandt et al. 2005). Berger et al. berichteten 2013 von zwei Fällen, in denen nach Silberprothesennutzung eine mögliche Argyrie aufgetreten war. Beiden Patienten waren Prothesen implantiert worden, die im Gegensatz zu den in unseren Versuchen verwendeten (Silberazetat in Kollagen an die Prothese gebunden) eine metallische Silberschicht enthielten. Nach einem Jahr sollen so noch fast 98% von dem Silber an die Prothese gebunden sein. Die Patienten wurden mit Schwellungen in der Leiste vorstellig. Eine chirurgische Exploration zeigte aschgraues, nekrotisches Gewebe um die Prothese, welche sich nach Debridement bei einer späteren Revision wieder präsentierte. Daraufhin wurden die Silberprothesen explantiert und Prothesen ohne Silber reimplantiert. Die Autoren werteten ihre Befunde als eine Kombination lokalisierter Silbertoxizität und durch Neutrophile verursachte Gewebszerstörung (Berger et al. 2013). Auch Silber-Kollagen-Prothesen scheinen dauerhaft Neutrophile zu aktivieren und könnten so Gewebszerstörung und verminderte antimikrobielle Effekte hervorrufen (Tautenhahn et al. 2010).

Zur Verbesserung der Wirkung des Silbers wird es vermehrt als Nanopartikel verarbeitet. Man findet es unter anderem in Wundverbänden (Verbelen et al. 2014), Kathetern (Thomas et al. 2015) und Knochenprothesen (Ziabka und Malec 2019). Aber auch in alltäglich genutzten Pflegemitteln wie Shampoo, Deodorant und Zahnpasta wird es eingearbeitet (Woodrow Wilson International Center for Scholars, 2019, Download 26/11/2019). Es handelt sich dabei um Cluster (Haufen) von Silberatomen, deren Größe zwischen 1 und 100 nm liegt (Hwang et al. 2012). Die Wirksamkeit gegen *Candida albicans* ist beschrieben (Hwang et al. 2012; Kim et al. 2009). Aber auch mit Nanopartikeln scheint noch nicht das universelle Heilmittel gegen Mikroorganismen gefunden zu sein. Untersuchungen an Silbrenanopartikeln bescheinigen diesen durchaus Potential zur Genotoxizität und Cytotoxizität (AshaRani et al. 2009; Hackenberg et al. 2011; Vrcek et al. 2016). Außerdem ist der Wirkungsgrad stark abhängig von der Partikelform, so dass generelle Aussagen zum Nutzen nicht möglich sind. Einzelne Partikel müssen genau untersucht werden – *in vitro* und *in vivo* –, damit deren Effekt bestimmt werden kann (Braydich-Stolle et al. 2014; Jebali et al. 2014, Sheehy et al. 2015). Außerdem scheinen sie auf Grund ihrer Größe für den menschlichen Organismus problematisch. Partikel unter 7 µm, die über die Luft aufgenommen werden, können schlechter eliminiert werden als größere Partikel (Scheuch et al. 1996). Tierexperimente zeigten, dass es zu einer Ablagerung in der obersten Gewebeschicht der Lunge kommt und möglicherweise physiologische Prozesse gestört werden (Geiser et al. 2003).

Die Suche nach wirksamen Mitteln gegen *Candida albicans* ist noch nicht erfolgreich

abgeschlossen, da taucht eine weitere Species auf. In den letzten Jahren häuften sich Fallberichte zu *Candida auris*. 2009 erstmalig in Japan beschrieben (Sato et al. 2009), gibt es bereits weltweit weitere Fälle aus Südkorea (Lee et al. 2011), Indien (Chowdhary et al. 2013), Südafrika (Magobo et al. 2014), Kuwait (Emara et al. 2015), Venezuela (Calvo et al. 2016), den USA (Vallabhaneni et al. 2016), Großbritannien (Schelenz et al. 2016) und Deutschland (Hamprecht et al. 2019). Im Jahr 2016 veröffentlichten sowohl das amerikanische (CDC) als auch das europäische Center for Disease Control and Prevention (ECDC) eine Warnung, in der es *Candida auris* als Hefe mit multiplen Resistenzen bezeichnete. Sie machten auf hohe Mortalitätsraten und die Möglichkeit von Ausbrüchen in Gesundheitseinrichtungen aufmerksam. Außerdem wiesen sie darauf hin, dass spezielle Methoden zur Identifizierung notwendig seien, um Fehlbestimmungen zu vermeiden (CDC 2016; ECDC 2016; jeweiliger Download am 21/11/2019). In Routinelaboren wurde die Spezies anfangs in bis zu 90% der Fälle als *Candida haemulonii* fehlidentifiziert (Kathuria et al. 2015). Zwischen 2013 und 2017 gab es 620 Fälle von *Candida auris* in Europa, davon waren 75,2% Kolonisationen, 17,7% Candidämien, 6,5% andere Infektionen und 0,6% mit ungewissem Status. Die Mehrzahl der Fälle ging auf 4 große Ausbrüche zurück (Kohlenberg et al. 2018). In weiteren Berichten sind auch Wundinfektionen (Schelenz et al. 2016), Otitiden (Sato et al. 2009) und positive Testungen von Harn- und Atemwegsproben (Armstrong et al. 2019) beschrieben. *Candida auris* soll ähnlich *Candida parapsilosis* vor allem die Haut kolonisieren (Armstrong et al. 2019). Testungen der Umgebung von kolonisierten Patienten in Großbritannien während eines Ausbruches offenbarten, dass es Kontaminationen des Bodens, der Bettische, der Heizungen, der Fensterbretter, der Monitore und der Tastaturen gab (Schelenz et al. 2016). Anscheinend kann es dort mehrere Wochen überleben (CDC 2017, Download am 21/11/2019). Übertragen von einer Person auf eine andere zum Beispiel durch das Krankenhauspersonal scheinen somit möglich (Armstrong et al. 2019). Vom ECDC empfohlen wird eine Anwendung Chlor- oder Wassertoffperoxid-basierter Desinfektionen oder Nutzung von Desinfektionslösungen, die eine ausdrückliche fungizide Wirkung haben. Normalerweise genutzte Mittel seien nicht ausreichend (ECDC 2018, Download am 21/11/2019). Das amerikanische Pendant riet zu Desinfektionsmitteln, die gegen *Clostridium difficile*-Sporen wirksam sind (CDC 2017, Download am 21/11/2019). Versuche von Cadnum et al. und Sherry et al. konnten die Wirksamkeit von Wasserstoffperoxid-, sporenwirksamen (Cadnum et al. 2017) und von Chlorhexidin- (Sherry et al. 2017) Produkten belegen. Das Alarmierende an dieser Spezies neben dem Übertragungsweg ist die Resistenz gegenüber zum Teil mehreren Antimykotika insbesondere Fluconazol (Calvo et al. 2016; Hamprecht et al. 2019; Schelenz et al. 2016). Resistenzen gegenüber Echinocandinen und Amphotericin B sind ebenfalls beschrieben (Lockhart et al. 2017). Angaben zur Mortalität schwanken zwischen 28% und 59% (Armstrong et al. 2019; Calvo et al. 2016; Lockhart et al. 2017).

### 5. ZUSAMMENFASSUNG

Gefäßprothesen haben einen festen Platz in der Gefäßchirurgie. Patienten mit vorangeschrittener peripherer arterieller Verschlusskrankheit oder einem Aneurysma, bei denen die Indikation für eine Operation gegeben ist, benötigen häufig einen alloplastischen Gefäßersatz. Zum Einsatz kommen verschiedene Prothesen mit oder ohne Beschichtungen. Eine vielfach verwendete Prothesenbeschichtung ist Silberazetat. Dieser künstliche Gefäßersatz wird sowohl primär als auch bei Revisionen auf Grund von Infektionen eingesetzt. Postoperative Gefäßprotheseninfektionen sind selten, aber können folgenschwere Nachwirkungen für den einzelnen Patienten wegen der hohen Morbiditäts- und Mortalitätsraten haben. Zum Erregerreservoir gehören neben Bakterien auch Pilze. *Candida albicans* ist dabei der häufigste Vertreter. Es handelt sich um einen dimorphen Pilz, der zwischen der Hefe- und Hyphenform wechseln kann. Normalerweise ist er bei Immungesunden Teil der endogenen Flora. Alterationen im Immunsystem können jedoch Infektionen begünstigen.

Die Mehrzahl der Mikroorganismen ist in der Natur in Biofilmen organisiert. Es handelt sich dabei um einen Verband an Zellen eingebettet in extrazellulärem Matrixmaterial. Im Biofilm ist unter anderem die Versorgung mit Nährstoffen erleichtert, die einzelnen Zellen können miteinander kommunizieren und sind widerstandsfähiger gegenüber äußeren Einflüssen. Die Biofilmbildung spielt im Entstehen von Infektionen eine zentrale Rolle. Bei *Candida albicans* scheint der Wechsel der Morphologie ein wichtiger Schritt für die Biofilmbildung und eine damit häufig verbundene erfolgreiche Infektion zu sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie sich verschiedene Oberflächenbeschichtungen von Gefäßprothesen auf die Adhäsion und nachfolgende Biofilmbildung von *Candida albicans in vitro* auswirken. Es kamen zwei *Candida albicans*-Stämme zur Anwendung: *Candida albicans* ATCC 10231 und *Candida albicans* SC 5314. Zur quantitativen Untersuchung wurden der Adhäsions- und der XTT-Reduktionsassay genutzt. Optische Unterschiede im umgebenden Medium konnten mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie herausgearbeitet werden. Nach Doppelfärbung mit ConA und FUN-1 wurden die Prothesen und anhaftende *Candida*-Zellen mittels der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie betrachtet.

Die ersten Untersuchungen dienten der Überprüfung und Festlegung von Adhäsions- und Biofilmbildungszeiten. Verglichen wurden ausgestanzte Prothesenstücke einer Rinderkollagen-Silberazetatprothese mit handelsüblichen Polystyrenscheiben im Inkubationsmedium RPMI. Zu jedem Zeitpunkt der Adhäsion und der Biofilmbildung hafteten

signifikant mehr Pilzzellen an Polystyren als an der Silberprothese. Die visuelle Begutachtung zeigte, dass die Silberprothese im Gegensatz zu Polystyren effektiv sowohl im Medium als auch an der Prothese selbst den Übergang zur Hyphe blockierte. Es waren nur Hefezellen zu sehen. Nach diesen Versuchen wurden im Weiteren 1,5 Stunden als Adhäsion, 24 Stunden als frühe Phase und 72 Stunden als späte Phase der Biofilmbildung festgelegt.

Um auszuschließen, dass die zuvor beobachteten Ergebnisse den unterschiedlichen Kunststoffarten geschuldet waren, wurden im nächsten Schritt zwei Rinderkollagenprothesen miteinander in RPMI verglichen. Eine war die bereits bekannte Silberazetatprothese, die zweite war eine im Aufbau gleiche Prothese ohne Silberbeschichtung. An der Prothese ohne Beschichtung konnten signifikant mehr *Candida*-Zellen nachgewiesen werden, auch war eine Ausbildung von Hyphen zu beobachten. Das Silber musste in RPMI also den Hefe-Hyphen-Wechsel unterbinden und so eine Adhäsion und nachfolgende Biofilmbildung reduzieren.

Da sich Gefäßprothesen im Blutstrom befinden, sollten die *in vitro*-Bedingungen an physiologische angenähert werden. Dazu wurde dem RPMI-Medium 50% fetales Kälberserum hinzugesetzt. Es wurden die gleichen Versuche wie zuvor durchgeführt. Es zeigte sich, dass nun an der Silberprothese signifikant mehr Zellen anhafteten verglichen mit der unbeschichteten. Auch war eine deutliche Hyphenbildung nach Hinzugabe von FKS zu verzeichnen. In weiteren Experimenten sollte ergründet werden, warum in Anwesenheit der Silberprothese in RPMI mit 50% FKS nicht nur quantitativ gleich viele Zelle adhärten, sondern signifikant mehr. Laut Herstellerangaben der Silberprothese wurden Silberionen über einen Zeitraum von 7 Tagen freigesetzt, jedoch konnte die genaue Menge experimentell nicht bestimmt werden, noch lieferte der Hersteller Informationen dazu. Silber bildet in wässrigem Milieu reaktionsfreudige Ionen, welche bekanntermaßen unter anderem mit Verbindungen reagieren, die Sulfhydrylgruppen (-SH) enthalten. Cystein – eine Schwefel-haltige Aminosäure – war ein Bestandteil des FKS und stand somit zur Reaktion zur Verfügung. Durch die Bindung der Silberionen mit dem Cystein wurde die Anzahl an reagiblen Silberionen vermindert. Von Versuchen mit Bakterien und auch wenigen mit Pilzen war bekannt, dass subinhibitorische Konzentrationen an antibakteriellen und antimykotischen Substanzen das Wachstum von Biofilmen stimulieren konnten. Im Folgenden wurde deshalb untersucht, wie verschiedene Konzentrationen von Silberionen das Wachstum der *Candida albicans*-Stämme in Anwesenheit der Prothese ohne Silber beeinflussten. Im Konzentrationsbereich von 0,5 bis 5 µg konnte ein proliferativer Effekt nachgewiesen werden, der bei höheren Konzentrationen nicht auftrat. Die in Versuchen bestimmte minimale Hemmkonzentration von Silber gegenüber beiden *Candida*-Stämmen betrug 32 mg/l. Die wachstumsstimulierende Wirkung konnte somit im subinhibitorischen Bereich von 1/200 bis 1/20 der MHK nachgewiesen werden, entsprechend 0,17 bis 1,7 mg/l.

Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit demonstriert werden, dass das freigesetzte Silber

der Silber-beschichteten Prothese *in vitro* in RPMI die Adhäsion und Biofilmbildung von *Candida albicans* signifikant reduziert. Dient als Inkubationsmedium RPMI mit 50% FKS, so kehrt sich dieser Effekt jedoch ins Gegenteil und das Wachstum wird stimuliert. Für diesen paradoxen Effekt ist eine verminderte Konzentration an Silberionen verantwortlich, die durch eine Reaktion des Silbers mit dem Cystein des FKS hervorgerufen wurde. Welche Auswirkungen dies *in vivo* auf Patienten mit implantierten Prothesen und bestehenden bzw. nachfolgenden Infektionen dieser hat, müssen klinische Studien zeigen.

---

**LITERATURVERZEICHNIS**

1. Abiko Y, Jinbu Y, Noguchi T, Nishimura M, et al.: Upregulation of Human Beta-Defensin 2 Peptide Expression in Oral Lichen Planus, Leukoplakia and Candidiasis. An Immunohistochemical Study. *Pathol. Res. Pract.* 198(8). 537–542 (2002)
2. Aka ST, Haji SH: Sub-MIC of antibiotics induced biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of chlorhexidine. *Braz. J. Microbiol.* 46(1). 149–154 (2015)
3. Al-Fattani MA, Douglas LJ: Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: Chemical composition and role in drug resistance. *J. Med. Microbiol.* 55(8). 999–1008 (2006)
4. Allert S, Forster TM, Svensson CM, et al.: *Candida albicans*-Induced Epithelial Damage Mediates Translocation through Intestinal Barriers. *MBio.* 9(3) (2018)
5. Almirante B, Rodríguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, et al.: Epidemiology and Predictors of Mortality in Cases of *Candida* Bloodstream Infection: Results from Population-Based Surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003 Epidemiology and Predictors of Mortality in Cases of *Candida* Bloodstream Infection. *J. Clin. Microbiol.* 43(4). 1829–1835 (2005)
6. Alonso-Coello P, Bellmunt S, McGorrian C, Anand, et al.: Antithrombotic therapy in peripheral artery disease: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest.* 141(2 Suppl), e669S-e690S (2012)
7. Ambler GK, Twine CP: Graft type for femoro-popliteal bypass surgery. *The Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2. CD001487 (2018)
8. Andersson S, Monsen C, Acosta S: Outcome and Complications Using Negative Pressure Wound Therapy in the Groin for Perivascular Surgical Site Infections after Vascular Surgery. *Ann. Vasc. Surg.* 48. 104–110 (2018)
9. Andleigh HS: Rapid identification of *Candida albicans*. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 23(2), 81–84 (1964)
10. Anesäter E, Borgquist O, Hedstrom E, Waga J, Ingemansson R, Malmsjo M: The influence of different sizes and types of wound fillers on wound contraction and tissue pressure during negative pressure wound therapy. *Int. Wound. J.* 8(4). 336–342 (2011)
11. Antonelli M, De Pascale G, Ranieri VM, et al: Comparison of triple-lumen central venous catheters impregnated with silver nanoparticles (AgTive®) vs conventional catheters in intensive care unit patients. *J. Hosp. Infect.* 82(2). 101–107 (2012)
12. Arendrup M, Cuenc-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope W, Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT EDef 7.2 Revision. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts 2012 Heruntergeladen von: [https://eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/AFST/EUCAST\\_EDef\\_7\\_2\\_revision.pdf](https://eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/EUCAST_EDef_7_2_revision.pdf). Heruntergeladen am 21/07/2020 (2012)
13. Argenta LC, Morykwas MJ: Vacuum-assisted closure: a new method for wound

- control and treatment: clinical experience. *Ann. Plast. Surg*, 38(6). 563–576. discussion 577 (1997)
14. Armstrong PA, Rivera SM, Escandon P et al.: Hospital-Associated Multicenter Outbreak of Emerging Fungus *Candida auris*, Colombia, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* 25(7) (2019)
  15. AshaRani PV, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveetil S: Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano.* 3(2). 279–290 (2009)
  16. Atalay MA, Koc AN, Parkan OM, Aydemir G, Elmali F, Sav H: Can serums be replaced by Mueller-Hinton agar in germ tube test? *Niger. J. Clin. Pract.* 20(1). 61–63 (2017)
  17. Baillie GS, Douglas LJ: Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J. Antimicrob. Chemother.* 46(3). 397–403 (2000)
  18. Baillie GS, Douglas LJ: Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J. Med. Microbiol.* 48(7). 671–679 (1999)
  19. Baker M: Reproducibility: Respect your cells! *Nature.* 537(7620). 433–435 (2016)
  20. Bals R, Wang X, Zasloff M, Wilson JM: The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95(16). 9541–9546 (1998)
  21. Banerjee, R M SD, Baliga S: Clinico-microbiological study of candidemia in a tertiary care hospital of southern part of India. *Iran. J. Microbiol.* 7(1). 55–61 (2015)
  22. Banno Y, Yamada T, Nozawa Y: Secreted phospholipases of the dimorphic fungus, *Candida albicans*; separation of three enzymes and some biological properties. *Sabouraudia.* 23(1). 47–54 (1985)
  23. Barchiesi F, Caggiano G, Falconi Di Francesco L, et al.: Outbreak of fungemia due to *Candida parapsilosis* in a pediatric oncology unit. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 49(4). 269–271 (2004)
  24. Barelle CJ, Priest CL, Maccallum DM, Gow NAR, Odds FC, Brown AJP: Niche-specific regulation of central metabolic pathways in a fungal pathogen. *Cell. Microbiol.* 8(6). 961–971 (2006)
  25. Barillo DJ, Marx DE: Silver in medicine: a brief history BC 335 to present. *Burns.* 40 Suppl 1. S3-S8 (2014)
  26. Barousse MM, Van Der Pol BJ, Fortenberry D, Orr D, Fidel PL: Vaginal yeast colonisation, prevalence of vaginitis, and associated local immunity in adolescents. *Sex. Transm. Infect.* 80(1). 48 LP – 53 (2004)
  27. Bassetti M, Merelli M, Ansaldi F, et al: Clinical and therapeutic aspects of candidemia: a five year single centre study. *PLoS One.* 10(5). e0127534 (2015)
  28. Batt M, Feugier P, Camou F, et al: A Meta-Analysis of Outcomes After In Situ Reconstructions for Aortic Graft Infection. *Angiology.* 69(5).x 370-379 (2018)



29. Batt M, Magne JL, Alric, P, et al.: In situ revascularization with silver-coated polyester grafts to treat aortic infection: early and midterm results. *J. Vasc. Surg.* 38(5). 983–989 (2003)
30. Beaussart A, Alsteens D, El-Kirat-Chatel S, Lipke PN, Kucharikova S, Van Dijck P, Dufrene YF: Single-molecule imaging and functional analysis of Als adhesins and mannans during *Candida albicans* morphogenesis. *ACS Nano.* 6(12). 10950–10964 (2012)
31. Becker RO, Spadaro JA: Treatment of orthopaedic infections with electrically generated silver ions. A preliminary report. *J. Bone Joint Surg. Am.* 60(7). 871–881 (1978)
32. Bellosta R, Luzzani L, Bontempi F, Vescovi M, Sarcina A: Negative pressure wound therapy (NPWT) treatment of total supra-aortic debranching graft infection. *Arch. Med. Sci.* 14(2). 466–469 (2018)
33. Bensen ES, Martin SJ, Li M, Berman J, Davis DA: Transcriptional profiling in *Candida albicans* reveals new adaptive responses to extracellular pH and functions for Rim101p. *Mol. Microbiol.* 54(5). 1335–1351 (2004)
34. Benvenisty AI, Tannenbaum G, Ahlborn TN, et al.: Control of prosthetic bacterial infection: evaluation of an easily incorporated, tightly bound, silver antibiotic PTFE graft. *J. Surg. Res.* 44(1). 1–7 (1988)
35. Berard X, Stecken L, Pinaquy JB, et al.: Comparison of the Antimicrobial Properties of Silver Impregnated Vascular Grafts with and without Triclosan. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 51(2), 285–292 (2016)
36. Berard X, Puges M, Pinaquy JB, et al.: In vitro Evidence of Improved Antimicrobial Efficacy of Silver and Triclosan Containing Vascular Grafts Compared with Rifampicin Soaked Grafts. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 57(3). 424–432 (2019)
37. Bergen MS, Voss E, Soll DR: Switching at the cellular level in the white-opaque transition of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* 136(10). 1925–1936 (1990)
38. Berger P, Ricco JB, Liqui Lung P, Moll FL: Localized argyria caused by metallic silver aortic grafts: a unique adverse effect. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 46(5). 565-568 (2013)
39. Berger P, Vaartjes I, Moll FL, De Borst GJ, Blankensteijn JD, Bots ML: Cumulative incidence of graft infection after primary prosthetic aortic reconstruction in the endovascular era. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 49(5). 581–585 (2015)
40. Berger TJ, Spadaro JA, Chapin SE, Becker RO: Electrically generated silver ions: quantitative effects on bacterial and mammalian cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 9(2). 357–358 (1976)
41. Birkenhauer E, Neethirajan S, Weese JS: Collagen and hyaluronan at wound sites influence early polymicrobial biofilm adhesive events. *BMC Microbiol.* 14. 191 (2014)
42. Bisdas T, Beckmann E, Marsch G, et al: Prevention of vascular graft infections with antibiotic graft impregnation prior to implantation: in vitro comparison between daptomycin, rifampin and nebacetin. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 43(4). 448-456 (2012)

43. Bitar D, Lortholary O, Le Strat Y, et al.: Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001-2010. *Emerg. Infect. Dis.* 20(7). 1149–1155 (2014)
44. Blanco MT, Morales JJ, Lucio L, Perez-Giraldo C, Hurtado C, Gomez-Garcia AC: Modification of adherence to plastic and to human buccal cells of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by a subinhibitory concentration of itraconazole. *Oral Microbiol. Immunol.* 21(1). 69–72 (2006)
45. Böckler D, Schumacher H, Allenberg JR: Gefäßchirurgie im Alter. *Der Chir.* 76(2). 113–125 (2005a)
46. Böckler D, Blaurock P, Mansmann U, Schwarzbach M, Seelos R, Schumacher H, Allenberg JR: Early surgical outcome after failed primary stenting for lower limb occlusive disease. *J. Endovasc. Ther.* 12(1) 13–21 (2005b)
47. Böhm L, Muralidhara P, Perez JC: A *Candida albicans* regulator of disseminated infection operates primarily as a repressor and governs cell surface remodeling. *Mol. Microbiol.* 100(2). 328–344 (2016)
48. Borg-von Zepelin M, Meyer I, Thomssen R, Wurzner R, Sanglard D, Telenti A, Monod, M: HIV-Protease inhibitors reduce cell adherence of *Candida albicans* strains by inhibition of yeast secreted aspartic proteases. *J. Invest. Dermatol.* 113(5). 747–751 (1999)
49. Borgquist O, Ingemansson R, Malmsjo M: The influence of low and high pressure levels during negative-pressure wound therapy on wound contraction and fluid evacuation. *Plast. Reconstr. Surg.* 127(2). 551–559 (2011)
50. Böttcher B, Pollath C, Staib P, Hube B, Brunke S: *Candida* species Rewired Hyphae Developmental Programs for Chlamydospore Formation. *Front. Microbiol.* 7. 1697 (2016)
51. Bracey NA, Zipursky JS, Juurlink DN: Argyria caused by chronic ingestion of silver. *CMAJ.* 190(5). E139 (2018)
52. Bragg PD, Rainnie DJ: The effect of silver ions on the respiratory chain of *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* 20(6). 883–889 (1974)
53. Braithwaite BD, Davies B, Heather BP, Earnshaw JJ: Early results of a randomized trial of rifampicin-bonded Dacron grafts for extra-anatomic vascular reconstruction. Joint Vascular Research Group. *Br. J. Surg.* 85(10). 1378–1381 (1998)
54. Brandt D, Park B, Hoang M, Jacobe HT: Argyria secondary to ingestion of homemade silver solution. *J. Am. Acad. Dermatol.* 53(2 Suppl 1). S105-7 (2005)
55. Braydich-Stolle LK, Breitner EK, Comfort KK, Schlager JJ, Hussain SM: Dynamic characteristics of silver nanoparticles in physiological fluids: toxicological implications. *Langmuir.* 30(50). 15309–15316 (2014)
56. Brigham MP, Stein WH, Moore S: the Concentrations of Cysteine and Cystine in Human Blood Plasma. *J. Clin. Invest.* 39(11). 1633–1638 (1960)
57. Cadnum JL, Shaikh AA, Piedrahita CT, et al: Effectiveness of Disinfectants Against *Candida auris* and Other *Candida* Species. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 38(10). 1240–1243 (2017)

58. Caggiano G, Coretti C, Bartolomeo N, Lovero G, De Giglio O, Montagna MT: Candida Bloodstream Infections in Italy: Changing Epidemiology during 16 Years of Surveillance. *Biomed Res. Int.* 2015. 256580 (2015)
59. Calligaro KD, Veith FJ, Schwartz ML, Savarese RP, DeLaurentis DA: Are gram-negative bacteria a contraindication to selective preservation of infected prosthetic arterial grafts? *J. Vasc. Surg.* 16(3). 336–337 (1992)
60. Calvo B, Melo ASA, Perozo-Mena A, et al.: First report of *Candida auris* in America: Clinical and microbiological aspects of 18 episodes of candidemia. *J. Infect.* 73(4). 369–374 (2016)
61. CDC - Center for Disease Control and Prevention: Clinical Alert to U.S. Healthcare Facilities - June 2016 - Global Emergence of Invasive Infections Caused by the Multidrug-Resistant Yeast *Candida auris* (2016), Heruntergeladen von: <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/candida-auris-alert.html>. Heruntergeladen am: 21/11/2019 (2016)
62. CDC - Center for Disease Control and Prevention: *Candida auris* Clinical Update - September 2017. Heruntergeladen von: <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/c-auris-alert-09-17.html>. Heruntergeladen am: 21/11/2019 (2017)
63. Chander J, Singla N, Sidhu S K, Gombar S Epidemiology of *Candida* blood stream infections: Experience of a tertiary care centre in North India. *J. Infect. Dev. Ctries.* 7(9). 670–675 (2013)
64. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA: Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J. Bacteriol.* 183(18). 5385–5394 (2001a)
65. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, Ghannoum, MA: Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J. Dent. Res.* 80(3). 903–908 (2001b)
66. Chappell JB, Greville GD: Effect of silver ions on mitochondrial adenosine triphosphatase. *Nature.* 174(4437). 930–931 (1954)
67. Chattaway FW, Holmes MR, Barlow AJ: Cell wall composition of the mycelial and blastospore forms of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* 51(3). 367–376 (1968)
68. Chen SZ, Li J, Li XY, Xu LS: Effects of vacuum-assisted closure on wound microcirculation: an experimental study. *Asian J. Surg.* 28(3). 211–217 (2005)
69. Chervu A, Moore WS, Chvapil M, Henderson T: Efficacy and duration of antistaphylococcal activity comparing three antibiotics bonded to Dacron vascular grafts with a collagen release system. *J. Vasc. Surg.* 13(6). 897–901 (1991a)
70. Chervu A, Moore WS, Gelabert HA, Colburn MD, Chvapil M: Prevention of graft infection by use of prostheses bonded with a rifampin/collagen release system. *J. Vasc. Surg.* 14(4). 521–525 (1991b)
71. Chiesa R, Astore D, Frigerio S, et al.: Vascular prosthetic graft infection: epidemiology, bacteriology, pathogenesis and treatment. *Acta Chir. Belg.* 102(4). 238–247 (2002)

72. Chowdhary A, Sharma C, Duggal S, et al.: New clonal strain of *Candida auris*, Delhi, India. *Emerg. Infect. Dis.* 19(10). 1670–1673 (2013)
73. Citiulo F, Jacobsen ID, Miramon P, et al.: *Candida albicans* scavenges host zinc via Pra1 during endothelial invasion. *PLoS Pathog.* 8(6). e1002777 (2012)
74. Clayton YM, Noble WC: Observations on the epidemiology of *Candida albicans*. *J. Clin. Pathol.* 19(1). 76–78 (1966)
75. Cohen R, Roth FJ, Delgado E, Ahearn DG, Kalsner MH: Fungal flora of the normal human small and large intestine. *N Engl J Med.* 280(12).638-641 (1969)
76. Cole GT: Basic Biology of Fungi. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston (p. Chapter 73) (1996)
77. Conte MS, Belkin M, Upchurch GR, Mannick JA, Whittemore AD, Donaldson MC: Impact of increasing comorbidity on infrainguinal reconstruction: a 20-year perspective. *Ann. Surg.* 233(3). 445–452 (2001)
78. Cooper Jr. CR: (2011). Yeasts Pathogenic to Humans. In Fell JW & TB TT Y (Fifth E. Boekhout (Eds.), *The Yeasts* (Fifth Edition) (pp. 9–19). London: Elsevier 2011
79. Corona P, Vitale G, Loriga M, et al.: 4-Substituted anilino imidazo[1,2-a] and triazolo[4,3-a]quinoxalines. Synthesis and evaluation of in vitro biological activity. *Eur. J. Med. Chem.* 41(9). 1102–1107 (2006)
80. Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ: How bacteria stick. *Sci. Am.* 238(1). 86–95 (1978)
81. Cramer Jr. RA, Perfect JR: Recent advances in understanding human opportunistic fungal pathogenesis mechanisms. In: McGinnis MR, MAB TC M (SECOND Pfaller E. (Eds.), *Clinical Mycology* (SECOND EDITION) (pp. 15–31). Edinburgh: Churchill Livingstone (2009)
82. D’Addato M, Curti T, Freyrie A: Prophylaxis of graft infection with rifampicin-bonded Gelseal graft: 2-year follow-up of a prospective clinical trial. Italian Investigators Group. *Cardiovascular Surgery* (London, England). 4(2). 200–204 (1996)
83. Danhof HA, Lorenz MC: The *Candida albicans* ATO Gene Family Promotes Neutralization of the Macrophage Phagolysosome. *Infect. Immun.* 83(11). 4416–4426 (2015)
84. Daniels KJ, Park YN, Srikantha T, Pujol C, Soll DR: Impact of environmental conditions on the form and function of *Candida albicans* biofilms. *Eukaryot. Cell.* 12(10). 1389–1402 (2013)
85. De Barros PP, Rossoni RD, De Camargo Ribeiro F, Junqueira JC, Jorge AOC: Temporal Profile of Biofilm Formation, Gene Expression and Virulence Analysis in *Candida albicans* Strains. *Mycopathologia.* 182(3). 285–295 (2017)
86. De Bernardis F, Arancia S, Morelli L, Hube B, Sanglard D, Schafer W, Cassone A: Evidence that members of the secretory aspartyl proteinase gene family, in particular SAP2, are virulence factors for *Candida vaginitis*. *J. Infect. Dis.* 179(1). 201–208 (1999)

87. De Foggi CC, Machado AL, Zamperini CA, Fernandes D, Wady AF, Vergani CE: Effect of surface roughness on the hydrophobicity of a denture-base acrylic resin and *Candida albicans* colonization. *J. Investig. Clin. Dent.* 7(2). 141–148 (2016)
88. Demling RH, Desanti L: Effects of silver on wound management. *Wounds.* 13(1). 4–15 (2001)
89. Derlon N, Grütter A, Brandenberger F, et al.: The composition and compression of biofilms developed on ultrafiltration membranes determine hydraulic biofilm resistance. *Water Res.* 102. 63-72 (2016)
90. Deutsche Gesellschaft für Angiologie - Gesellschaft für Gefäßmedizin: S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (2015). Heruntergeladen von: <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/065-003.html>. Heruntergeladen am 26/04/2016
91. Deutsche Gesellschaft für Gefäßchirurgie und Gefäßmedizin - Gesellschaft für operative, endovaskuläre und präventive Gefäßmedizin e. V. (DGG): S3-Leitlinie zu Screening, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Bauchaortenaneurysmas (2018). Heruntergeladen von: <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/004-014.html>. Heruntergeladen am 19/07/2018
92. Díaz-García J, Marcos-Zambrano LJ, Munoz P, Guinea J, Escribano P: Does the composition of polystyrene trays affect *Candida* spp. biofilm formation? *Med. Mycol.* 57(4). 504–509 (2019)
93. Diehm C, Schuster A, Allenberg JR, et al.: High prevalence of peripheral arterial disease and co-morbidity in 6880 primary care patients: cross-sectional study. *Atherosclerosis.* 172(1). 95–105 (2004)
94. Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie EJ *Candida*. In: *Clinical Mycology (SECOND EDITION)*. pp. 197–229. Edinburgh: Churchill Livingstone (2009)
95. Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H: *Candida albicans* triggers interleukin-8 secretion by oral epithelial cells. *Microb. Pathog.* 34(4). 169–177 (2003)
96. Dongari-Bagtzoglou A, Villar CC, Kashleva H: *Candida albicans*-infected oral epithelial cells augment the anti-fungal activity of human neutrophils in vitro. *Med. Mycol.* 43(6). 545–549 (2005)
97. Donlan RM: Biofilms and device-associated infections. *Emerg. Infect. Dis.* 7(2). 277–281 (2001)
98. Doscher W, Krishnasastri KV, Deckoff SL: Fungal graft infections: case report and review of the literature. *J. Vasc. Surg.* 6(4). 398–402 (1987)
99. Dua A, Lee CJ: Epidemiology of Peripheral Arterial Disease and Critical Limb Ischemia. *Tech. Vasc. Interv. Radiol.* 19(2). 91–95 (2016)
100. Earnshaw JJ, Whitman B, Heather, BP: Two-year results of a randomized controlled trial of rifampicin-bonded extra-anatomic dacron grafts. *Br. J. Surg.* 87(6). 758–759 (2000)
101. ECDC - European Center for Disease Prevention and Control: *Candida auris* in healthcare settings - Europe - 19 December 2016. Stockholm. Heruntergeladen von:

- [https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/Candida-in-healthcare-settings\\_19-Dec-2016.pdf](https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/Candida-in-healthcare-settings_19-Dec-2016.pdf). Heruntergeladen am 21/11/2019 (2016)
102. ECDC - European Center for Disease Prevention and Control: *Candida auris* in healthcare settings - Europe - first update, 23 April 2018. Stockholm. Heruntergeladen von: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/RRA-Candida-auris-European-Union-countries-first-update.pdf>. Heruntergeladen am 21/11/2019 (2018)
  103. Edelman GM, Cunningham BA, Reeke GNJ, Becker JW, Waxdal MJ, Wang JL : The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69(9). 2580–2584 (1972)
  104. Edwards-Jones V: The benefits of silver in hygiene, personal care and healthcare. *Lett. Appl. Microbiol.* 49(2). 147–152 (2009)
  105. Eggimann P, Garbino J, Pittet D: Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect. Dis.* 3(11). 685–702 (2003)
  106. El-Houssaini HH, Elnabawy OM, Nasser HA, Elkhatib WF: Influence of subinhibitory antifungal concentrations on extracellular hydrolases and biofilm production by *Candida albicans* recovered from Egyptian patients. *BMC Infect. Dis.* 19(1). 54 (2019)
  107. Ellepola AN, Samaranayake LP: Adhesion of oral *Candida albicans* isolates to denture acrylic following limited exposure to antifungal agents. *Arch. Oral Biol.* 43(12). 999–1007 (1998)
  108. Emara M, Ahmad S, Khan Z, Joseph L, Al-Obaid I, Purohit P, Bafna R: *Candida auris* candidemia in Kuwait, 2014. *Emerg. Infect. Dis. United States.* (2015)
  109. Enache E, Eskandari T, Borja L, Wadsworth E, Hoxter B, Calderone R: *Candida albicans* adherence to a human oesophageal cell line. *Microbiology (Reading, England)*. 142. Pt 1. 2741–2746 (1996)
  110. Ene IV, Walker LA, Schiavone M, et al.: Cell Wall Remodeling Enzymes Modulate Fungal Cell Wall Elasticity and Osmotic Stress Resistance. *MBio.* 6(4). e00986 (2015)
  111. Fallon K, Bausch K, Noonan J, Huguenel E, Tamburini P: Role of aspartic proteases in disseminated *Candida albicans* infection in mice. *Infect. Immun.* 65(2). 551–556 (1997)
  112. Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO: A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res.* 52(4). 662-668 (2000)
  113. Feng Y, Huang N, Wu Q, Wang B: HMG2: a novel antimicrobial effector molecule of human mononuclear leukocytes? *J. Leukoc. Biol.* 78(5). 1136–1141 (2005)
  114. Ferreira AV, Prado CG, Carvalho RR, Dias KST, Dias ALT *Candida albicans* and non-*C. albicans* *Candida* species: comparison of biofilm production and metabolic activity in biofilms, and putative virulence properties of isolates from hospital environments and infections. *Mycopathologia.* 175(3–4). 265–272 (2013)
  115. Fildes P: The Mechanism of the Anti-bacterial Action of Mercury. *Br. J. Exp. Pathol.*

- 21(2). 67–73 (1940)
116. Fleischmann W, Strecker W, Bombelli M, Kinzl L: Vacuum sealing as treatment of soft tissue damage in open fractures. *Unfallchirurg.* 96(9). 488–492 (1993)
117. Fonzi WA, Irwin, MY: Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics.* 134(3). 717–728 (1993)
118. Fortino M, Marino T, Russo N: Theoretical study of silver-ion-mediated base pairs: the case of C-Ag-C and C-Ag-A systems. *J. Phys. Chem. A.* 119(21). 5153–5157 (2015)
119. Fromm KM: Give silver a shine. *Nat. Chem.* 3(2). 178 (2011)
120. Fuhrmann GF, Rothstein A: The mechanism of the partial inhibition of fermentation in yeast by nickel ions. *Biochim. Biophys. Acta.* 163(3). 331–338 (1968)
121. Furchner JE, Richmond CR, Drake GA: Comparative metabolism of radionuclides in mammals-IV. Retention of silver-110m in the mouse, rat, monkey, and dog. *Health Phys.* 15(6). 505–514 (1968)
122. Gabriel MM, Sawant, AD, Simmons, RB, Ahearn DG: Effects of silver on adherence of bacteria to urinary catheters: in vitro studies. *Curr. Microbiol.* 30(1). 17–22 (1995)
123. Gao H, Sandermann J, Prag J, Lund L, Lindholt JS: Prevention of primary vascular graft infection with silver-coated polyester graft in a porcine model. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 39(4). 472–477 (2010)
124. García San Miguel L, Pla J, Cobo J, et al.: Morphotypic and genotypic characterization of sequential *Candida parapsilosis* isolates from an outbreak in a pediatric intensive care unit. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 49(3). 189–196 (2004)
125. GBD Study 2015: Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 388(10053). 1545–1602 (2016)
126. Geiser M, Schurch S, Gehr P: Influence of surface chemistry and topography of particles on their immersion into the lung's surface-lining layer. *J. Appl. Microbiol.* 94(5). 1793–1801 (2003)
127. Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes gemeinsam getragen von RKI und Destatis (2015). Heruntergeladen von: [https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GesInDtld/gesundheit\\_in\\_deutschland\\_2015.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GesInDtld/gesundheit_in_deutschland_2015.pdf?__blob=publicationFile). Heruntergeladen am 27/10/2017
128. Gillum AM, Tsay EY, Kirsch DR (1984). Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol. Gen. Genet.* 198(2). 179–182 (1984)
129. Glynn MF, Williams WG: A technique for preclotting vascular grafts. *Ann. Thorac. Surg.* 29(2). 182–183 (1980)
130. Goëau-Brissonnière OA, Fabre D, Leflon-Guibout V, Di Centa I, Nicolas-Chanoine MH, Coggia M: Comparison of the resistance to infection of rifampin-bonded gelatin-

- sealed and silver/collagen-coated polyester prostheses. *J. Vasc. Surg.* 35(6). 1260–1263 (2002)
131. Goëau-Brissonnière O, Javerliat I, Koskas F, Coggia M, Pechère JC: Rifampin-bonded vascular grafts and postoperative infections. *Ann. Vasc. Surg.* 25(1). 134–142 (2011)
132. Goldschmidt H, Hahn U, Salwender HJ, et al.: Prevention of catheter-related infections by silver coated central venous catheters in oncological patients. *Int. J. Med. Microbiol.* 283(2). 215–223 (1995)
133. Gonçalves LM, Del Bel Cury AA, de Vasconcellos AA, Cury JA, da Silva WJ: Confocal analysis of the exopolysaccharide matrix of *Candida albicans* biofilms. *J. Investig. Clin. Dent.* 6(3). 179–185 (2015)
134. Gordon O, Vig Slenters T, Brunetto PS, et al.: Silver coordination polymers for prevention of implant infection: thiol interaction, impact on respiratory chain enzymes, and hydroxyl radical induction. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54(10). 4208–4218 (2010)
135. Greco RS, Harvey RA: The role of antibiotic bonding in the prevention of vascular prosthetic infections. *Ann. Surg.* 195(2). 168–171 (1982)
136. Greenfeld JI, Sampath L, Popilskis SJ, Brunnert SR, Stylianos S, Modak S: Decreased bacterial adherence and biofilm formation on chlorhexidine and silver sulfadiazine-impregnated central venous catheters implanted in swine. *Crit Care Med.* 23(5). 894-900 (1995)
137. Groll AH, Shah PM, Mentzel C, Schneider M, Just-Nuebling G, Huebner K: Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *J. Infect.* 33(1). 23–32 (1996)
138. Grubitzsch H, Tarar W, Claus B, Gabbieri D, Falk V, Christ T: Risks and Challenges of Surgery for Aortic Prosthetic Valve Endocarditis. *Heart. Lung Circ.* 27(3). (2018)
139. Guembe M, Guinea J, Marcos-Zambrano L, Fernandez-Cruz A, Pelaez T, Munoz P, Bouza E: Is biofilm production a predictor of catheter-related candidemia? *Med. Mycol.* 52(4). 407–410 (2014)
140. Guilbaud M, Bruzard J, Bouffartigues E, et al.: Proteomic Response of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Adhering to Solid Surfaces. *Front. Microbiol.* 8. 1465 (2017)
141. Guirguis EM, Barber GG: The natural history of abdominal aortic aneurysms. *Am. J. Surg.* 162(5). 481–483 (1991)
142. Gupta A, Matsui K, Lo JF, Silver S: Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*. *Nat. Med.* 5(2). 183–188 (1999)
143. Gupta A, Phung LT, Taylor DE, Silver S: Diversity of silver resistance genes in IncH incompatibility group plasmids. *Microbiology (Reading, England)*. 147(Pt 12). 3393–3402 (2001)
144. Gupta PK, Ramanan B, Grossman L, et al: Outcomes of Aortic Surgery for Abdominal Aortic Graft Infections. *Vasc. Endovascular Surg.* 50(4). 256–260 (2016)



145. Hackenberg S, Scherzed A, Kessler M, et al.: Silver nanoparticles: Evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. *Toxicol. Lett.* 201(1). 27–33 (2011)
146. Hadrup N, Loeschner K, Mortensen A, Sharma AK, Qvortrup K, Larsen EH, Lam HR; The similar neurotoxic effects of nanoparticulate and ionic silver in vivo and in vitro. *Neurotoxicology.* 33(3). 416–423 (2012a)
147. Hadrup N, Loeschner K, Bergstrom A, et al.: Subacute oral toxicity investigation of nanoparticulate and ionic silver in rats. *Arch. Toxicol.* 86(4). 543–551 (2012b)
148. Hagau N, Studnicska D, Gavrus RL, Csipak G, Hagau R, Slavcovič AVC: (2009). Central venous catheter colonization and catheter-related bloodstream infections in critically ill patients: a comparison between standard and silver-integrated catheters. *Eur. J. Anaesthesiol.* 26(9). 752–758 (2009)
149. Hall RE, Bender G, Marquis RE: Inhibitory and cidal antimicrobial actions of electrically generated silver ions. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 45(9). 779–784 (1987)
150. Hamilton EI, Minski MJ: Abundance of the chemical elements in man's diet and possible relations with environmental factors. *Sci. Total Environ.* 1(4). 375–394 (1973)
151. Hamprecht A, Barber AE, Mellinghoff SC, et al.: *Candida auris* in Germany and Previous Exposure to Foreign Healthcare. *Emerg. Infect. Dis.* 25(9). 1763–1765 (2019)
152. Harnett EM, Alderman J, Wood T: The surface energy of various biomaterials coated with adhesion molecules used in cell culture. *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* 55(1). 90-97 (2007)
153. Harrison JJ, Ceri H, Yerly J, Rabiei M, Hu Y, Martinuzzi R, Turner RJ: Metal ions may suppress or enhance cellular differentiation in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 73(15). 4940–4949 (2007a)
154. Harrison JJ, Turner RJ, Ceri H: A subpopulation of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* biofilm cells are highly tolerant to chelating agents. *FEMS Microbiol. Lett.* 272(2). 172–181 (2007b)
155. Hawser S: Adhesion of different *Candida* spp. to plastic: XTT formazan determinations. *J. Med. Vet. Mycol.* 34(6). 407–410 (1996)
156. Hawser SP, Baillie GS, Douglas LJ: Production of extracellular matrix by *Candida albicans* biofilms. *J. Med. Microbiol.* 47(3). 253–256 (1998)
157. Hawser SP, Douglas LJ: Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect. Immun.* 62(3). 915–921 (1994)
158. Haynes WM, Lide DR, Bruno TJ (Eds.). *Handbook of Chemistry and Physics* (97th ed.). CRC Press (2017)
159. Hazan I, Sepulveda-Becerra M, Liu H: Hyphal elongation is regulated independently of cell cycle in *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell.* 13(1). 134–145 (2002)
160. Hazen KC, Mandell G, Coleman E, Wu G: Influence of fluconazole at subinhibitory concentrations on cell surface hydrophobicity and phagocytosis of *Candida albicans*.

- FEMS Microbiol. Lett. 183(1). 89–94 (2000)
161. Heart Protection Study Collaborative Group: Randomized trial of the effects of cholesterol-lowering with simvastatin on peripheral vascular and other major vascular outcomes in 20,536 people with peripheral arterial disease and other high-risk conditions. *J. Vasc. Surg.* 45(4) 644–645 (2007)
  162. Henry-Stanley MJ, Garni RM, Wells CL: Adaptation of FUN-1 and Calcofluor white stains to assess the ability of viable and nonviable yeast to adhere to and be internalized by cultured mammalian cells. *J. Microbiol. Methods.* 59(2). 289–292 (2004)
  163. Hernández-Richter T, Schardey HM, Lohlein F, Heiss MM, Redondo-Muller M, Hammer C, Schildberg FW: The prevention and treatment of vascular graft infection with a Triclosan (Irgasan)-bonded Dacron graft: an experimental study in the pig. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 20(5). 413–418 (2000)
  164. Hernández-Richter T, Schardey HM, Wittmann F, Mayr S, et al: Rifampin and triclosan but not silver is effective in preventing bacterial infection of vascular dacron graft material. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 20(5). 413–418 (2003)
  165. Herrington W, Lacey B, Sherliker P, Armitage J, Lewington S: Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circ. Res.* 118(4). 535 LP – 546 (2016)
  166. Herten M, Idelevich EA, Sielker S, Becker K, Scherzinger AS, et al.: Vascular Graft Impregnation with Antibiotics: The Influence of High Concentrations of Rifampin, Vancomycin, Daptomycin, and Bacteriophage Endolysin HY-133 on Viability of Vascular Cells. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* 23. 250–257 (2017)
  167. Hidalgo E, Domínguez C : Study of cytotoxicity mechanisms of silver nitrate in human dermal fibroblasts. *Toxicol. Lett.* 98(3). 169–179 (1998)
  168. Hirsch AT, Treat-Jacobson D, Lando HA, Hatsukami DK: The role of tobacco cessation, antiplatelet and lipid-lowering therapies in the treatment of peripheral arterial disease. *Vasc. Med.* 2(3). 243–251 (1997)
  169. Hodgkiss-Harlow KD, Bandyk DF: Antibiotic therapy of aortic graft infection: treatment and prevention recommendations. *Semin. Vasc. Surg.* 24(4). 191–198 (2011)
  170. Hof H, Dörries R: Allgemeine Mykologie. In: Duale Reihe – Medizinische Mikrobiologie. 4. Auflage. p. 462. Thieme Verlag (2009)
  171. Hoffman LR, D’Argenio DA, MacCoss MJ, Zhang Z, Jones RA, Miller SI: Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature.* 436(7054). 1171–1175 (2005)
  172. Holmes AR, Bandara BMK, Cannon RD: Saliva promotes *Candida albicans* adherence to human epithelial cells. *J. Dent. Res.* 81(1). 28–32 (2002)
  173. Hooper SJ, Percival SL, Hill KE, Thomas DE, Hayes AJ, Williams DW: The visualisation and speed of kill of wound isolates on a silver alginate dressing. *Int. Wound J.* 9(6). 633–642 (2012)
  174. Hoyer AR, Johnson CJ, Hoyer MR, Kernien JF, Nett JE: Echinocandin Treatment of

- Candida albicans* Biofilms Enhances Neutrophil Extracellular Trap Formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62(9) (2018)
175. Hube B, Naglik J: *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology.* 147(Pt 8). 1997–2005 (2001)
176. Hube B, Sanglard D, Odds FC, Hess D, et al: Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes SAP1, SAP2, and SAP3 of *Candida albicans* attenuates virulence. *Infect. Immun.* 65(9). 3529–3538 (1997)
177. Humphreys G, Lee GL, Percival SL, McBain AJ: Combinatorial activities of ionic silver and sodium hexametaphosphate against microorganisms associated with chronic wounds. *J. Antimicrob. Chemother.* 66(11). 2556–2561 (2011)
178. Hwang, I, Lee J, Hwang JH, Kim KJ, Lee DG: Silver nanoparticles induce apoptotic cell death in *Candida albicans* through the increase of hydroxyl radicals. *FEBS J.* 279(7). 1327–1338 (2012)
179. Imbert C, Rodier MH, Daniault G, Jacquemin JL: of *Candida albicans* and on its adherence to polystyrene and extracellular matrix proteins. *Med. Mycol.* 40(2). 123–129 (2002)
180. Ingold CT, Hudson HJ: Growth and nutrition BT - *The Biology of Fungi.* pp. 7–24. Dordrecht: Springer Netherlands (1993)
181. Jagpal R, Greco RS: Studies of a graphite-benzalkonium-oxacillin surface. *Am. Surg.* 45(12). 774-779 (1979)
182. Jakobsen L, Andersen AS, Friis-Møller A, Jørgensen B, Kroghfelt KA, Frimodt-Møller N: Silver resistance: an alarming public health concern? *Int. J. Med. Microbiol.* 38(5). 454–455 (2011)
183. Jebali A, Hajjar FHE, Pourdanesh F, Hekmatimoghaddam Set al.: Silver and gold nanostructures: antifungal property of different shapes of these nanostructures on *Candida* species. *Med. Mycol.* 52(1). 65–72 (2014)
184. Jensen LS, Peterson RP, Falen L: Inducement of enlarged hearts and muscular dystrophy in turkey poults with dietary silver. *Poult. Sci.* 53(1). 57–64 (1974)
185. Jiang WY, Ran SY: Two-stage DNA compaction induced by silver ions suggests a cooperative binding mechanism. *J. Chem. Phys.* 148(20). 205102 (2018)
186. Johnston KW, Rutherford RB, Tilson MD, Shah DM, Hollier L, Stanley JC: Suggested standards for reporting on arterial aneurysms. Subcommittee on Reporting Standards for Arterial Aneurysms, Ad Hoc Committee on Reporting Standards, Society for Vascular Surgery and North American Chapter, International Society for Cardiovascular. *J. Vasc. Surg.* 13(3). 452–458 (1991)
187. Jones C, Allsopp L, Horlick J, Kulasekara H, Filloux A: Subinhibitory concentration of kanamycin induces the *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion system. *PLoS One.* 8(11). e81132 (2013)
188. Jones T, Federspiel NA, Chibana H, Dungan J, et al.: The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101(19). 7329–7334 (2004)

189. Junqueira JC, Fuchs BB, Muhammed M, et al.: Oral *Candida albicans* isolates from HIV-positive individuals have similar in vitro biofilm-forming ability and pathogenicity as invasive *Candida* isolates. *BMC Microbiol.* 11. 247 (2011)
190. Kaebnick HW, Bandyk DF, Bergamini TW, Towne JB: The microbiology of explanted vascular prostheses. *Surgery.* 102(4). 756–762 (1987)
191. Kampf G, Dietze B, Große-Siestrup C, Wendt C, Martiny H: Microbicidal activity of a new silver-containing polymer, SPI-ARGENT II. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42(9). 2440–2442 (1998)
192. Kaplan JB, Jabbouri S, Sadovskaya I: Extracellular DNA-dependent biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* RP62A in response to subminimal inhibitory concentrations of antibiotics. *Res. Microbiol.* 162(5). 535–541 (2011)
193. Kasperkovitz PV, Khan NS, Tam JM, Mansour MK, Davids PJ, Vyas JM: Toll-like receptor 9 modulates macrophage antifungal effector function during innate recognition of *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Infect. Immun.* 79(12). 4858–4867 (2011)
194. Kathuria S, Singh PK, Sharma C, Prakash A, et al.: Multidrug-Resistant *Candida auris* Misidentified as *Candida haemulonii*: Characterization by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry and DNA Sequencing and Its Antifungal Susceptibility Profile Variability by Vitek 2, CL. *J. Clin. Microbiol.* 53(6). 1823–1830 (2015)
195. Kehlet M, Jensen LP, Schroeder TV: Risk Factors for Complications after Peripheral Vascular Surgery in 3,202 Patient Procedures. *Ann. Surg.* 36. 13–21 (2016)
196. Kim KJ, Sung WS, Suh BK, Moon SK, Choi JS, Kim JG, Lee, DG: Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. *Biometals.* 22(2). 235–242 (2009)
197. Kimura LH, Pearsall NN: Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells *Infect. Immun.* 21(1). 64–68 (1978)
198. Klingspor L, Tortorano AM, Peman J, Willinger B, et al.: Invasive *Candida* infections in surgical patients in intensive care units: a prospective, multicentre survey initiated by the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) (2006-2008). *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21(1). 87.e1-87.e10 (2015)
199. Klotz SA: The contribution of electrostatic forces to the process of adherence of *Candida albicans* yeast cells to substrates. *FEMS Microbiol. Lett.* 120(3). 257–262 (1994)
200. Kobayashi, G: Disease of Mechanisms of Fungi. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology.* 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston. Chapter 74 (1996)
201. Kohlenberg A, Struelens MJ, Monnet DL, Plachouras D: *Candida auris*: epidemiological situation, laboratory capacity and preparedness in European Union and European Economic Area countries, 2013 to 2017. *Euro Surveill.* 23(13) (2018)
202. Kollef MH, Afessa B, Anzueto A, Veremakis C, et al.: Silver-coated endotracheal

- tubes and incidence of ventilator-associated pneumonia: the NASCENT randomized trial. *JAMA*. 300(7). 805–813 (2008)
203. Kosan J, Riess H, Atlihan G, Diener H, Kölbel T, Debus ES: Verschlüsse der Aorta und der Beckenarterien. *Der Chir.* 85(9). 791–799 (2014)
204. Koshlukova SE, Lloyd TL, Araujo MW, Edgerton M: Salivary histatin 5 induces non-lytic release of ATP from *Candida albicans* leading to cell death. *J. Biol. Chem.* 274(27). 18872–18879 (1999)
205. Kremer AN, Hoffmann H: Subtractive hybridization yields a silver resistance determinant unique to nosocomial pathogens in the *Enterobacter cloacae* complex. *J. Clin. Microbiol.* 50(10). 3249–3257 (2012)
206. Kretschmar M, Hube B, Bertsch T, Sanglard D, et al.: Germ tubes and proteinase activity contribute to virulence of *Candida albicans* in murine peritonitis. *Infect. Immun.* 67(12). 6637–6642 (1999)
207. Krom BP, Cohen JB, McElhaney Feser GE, Cihlar RL: (2007). Optimized candidal biofilm microtiter assay. *J. Microbiol. Methods.* 68(2). 421–423 (2007)
208. Kühbacher A, Henkel H, Stevens P, Grumaz C, et al.: Central Role for Dermal Fibroblasts in Skin Model Protection against *Candida albicans*. *J. Infect. Dis.* 215(11). 1742–1752 (2017)
209. Kuhn DM, Balkis M, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA: Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. *J. Clin. Microbiol.* 41(1). 506–508 (2003)
210. Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA: Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect. Immun.* 70(2). 878–888 (2002)
211. Labome: Fetal Bovine Serum. *Mater Methods.* 2. 117. Heruntergeladen von: <https://www.labome.com/method/Fetal-Bovine-Serum.html>. Heruntergeladen am: 31/10/2019 (2012)
212. Lachance MA, Boekhout T, Scorzetti G, Fell JW, Kurtzman CP: (2011). *Candida Berkhout* (1923). In: *The Yeasts* (Fifth Edition) (Fifth Edit, pp. 987–1278). London: Elsevier (2011)
213. LaFleur MD, Kumamoto CA, Lewis K: *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(11). 3839–3846 (2006)
214. Lai KK, Fontecchio SA: Use of silver-hydrogel urinary catheters on the incidence of catheter-associated urinary tract infections in hospitalized patients. *Am. J. Infect. Control.* 30(4). 221–225 (2002)
215. Lal P, Sharma D, Pruthi P, Pruthi V: Exopolysaccharide analysis of biofilm-forming *Candida albicans*. *J. Appl. Microbiol.* 109(1). 128–136 (2010)
216. Lambert RJ, Pearson J: (2000). Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *J. Appl. Microbiol.* 88(5). 784–790 (2000)

217. Lane DA, Lip GYH: (2013). Treatment of hypertension in peripheral arterial disease. *Cochrane database Syst. Rev.* (12). CD003075 (2013)
218. Lansdown ABG: (2002). Silver. I: Its antibacterial properties and mechanism of action. *J. Wound Care.* 11(4). 125–130 (2002)
219. Lansdown ABG, Williams A, Chandler S, Benfield S: Silver absorption and antibacterial efficacy of silver dressings. *J. Wound Care.* 14(4). 155–160 (2005)
220. Lansdown ABG: Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. *Curr. Probl. Dermatol.* 33. 17–34 (2006)
221. Lansdown, ABG: A pharmacological and toxicological profile of silver as an antimicrobial agent in medical devices. *Adv. Pharmacol. Sci.* 910686 (2010)
222. Larena-Avellaneda A, Russmann S, Fein M, Debus ES: Prophylactic use of the silver-acetate-coated graft in arterial occlusive disease: a retrospective, comparative study. *J. Vasc. Surg.* 50(4). 790–798 (2009)
223. Lee J, Jung SW, Cho AE: Molecular Insights into the Adsorption Mechanism of Human beta-Defensin-3 on Bacterial Membranes. *Langmuir.* 32(7). 1782–1790 (2016)
224. Lee WG, Shin JH, Uh Y, Kang MG, Kim SH, Park KH, Jang HC: First three reported cases of nosocomial fungemia caused by *Candida auris*. *J. Clin. Microbiol.* 49(9). 3139–3142 (2011)
225. Legout L, D'Elia PV, Sarraz-Bournet B, Haulon S, Meybeck A, Senneville E, Leroy O: Diagnosis and management of prosthetic vascular graft infections. *Med. Mal. Infect.* 42(3). 102–109 (2012)
226. Lehrnbecher T, Frank C, Engels K, Kriener S, Groll AH, Schwabe D: Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *J. Infect.* 61(3). 259–265 (2010)
227. Li CX, Gleason JE, Zhang SX, Bruno VM, Cormack BP, Culotta VC: *Candida albicans* adapts to host copper during infection by swapping metal cofactors for superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112(38). E5336-42 (2015)
228. Li J, Hirota K, Goto T, Yumoto H, Miyake Y, Ichikawa T: Biofilm formation of *Candida albicans* on implant overdenture materials and its removal. *J. Dent.* 40(8). 686–692 (2012)
229. Liau SY, Read D, Pugh WJ, Furr JR, Russell AD: Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. *Lett. Appl. Microbiol.* 25(4). 279–283 (1997)
230. Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S, Farooqi J, et al.: Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. *Clin. Infect. Dis.* 64(2). 134–140 (2017)
231. Lockhart SR, Pujol C, Daniels KJ, Miller MG, Johnson AD, Pfaller MA, Soll DR: In *Candida albicans*, white-opaque switchers are homozygous for mating type. *Genetics.* 162(2). 737–745 (2002)

232. Loh JV, Percival SL, Woods EJ, Williams NJ, Cochrane, CA: (2009). Silver resistance in MRSA isolated from wound and nasal sources in humans and animals. *Int. Wound J.* 6(1). 32–38 (2009)
233. Lorenz MC, Fink GR: The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature.* 412(6842). 83–86 (2001)
234. Lowman DW, Greene RR, Bearden DW, Kruppa MD, et al.: Novel structural features in *Candida albicans* hyphal glucan provide a basis for differential innate immune recognition of hyphae versus yeast. *J. Biol. Chem.* 289(6). 3432–3443 (2014)
235. Lyons OTA, Baguneid M, Barwick TD, Bell RE, et al.: Diagnosis of Aortic Graft Infection: A Case Definition by the Management of Aortic Graft Infection Collaboration (MAGIC). *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 52(6). 758–763 (2016)
236. Magee BB, Hube B, Wright RJ, Sullivan PJ, Magee PT (1993). The genes encoding the secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* constitute a family with at least three members. *Infect. Immun.* 61(8). 3240–3243 (1993)
237. Magobo RE, Corcoran C, Seetharam S, Govender NP: *Candida auris*-associated candidemia, South Africa. *Emerg. Infect. Dis. United States* (2014)
238. Maillard JY, Hartemann P: Silver as an antimicrobial: facts and gaps in knowledge. *Crit. Rev. Microbiol.* 39(4). 373–383 (2013)
239. Manouguian S: Clinical experience with a new antimicrobially coated InterGard-IgK/AM vascular prosthesis in surgical treatment of deep wound infection with involvement of the synthetic bypass: report of 2 cases. *Zentralbl. Chir.* 121(9). 763–768 (1996)
240. Maple PA, Hamilton-Miller JM, Brumfitt W: Comparison of the in-vitro activities of the topical antimicrobials azelaic acid, nitrofurazone, silver sulphadiazine and mupirocin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 29(6). 661–668 (1992)
241. Marchetti O, Bille J, Fluckiger U, Eggimann P, et al.: Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. *Clin. Infect. Dis.* 38(3). 311–320 (2004)
242. Matuk Y, Ghosh M, McCulloch C: Distribution of silver in the eyes and plasma proteins of the albino rat. *Canadian Can. J. Ophthalmol.* 16(3). 145–150 (1981)
243. Mayahara M, Kataoka R, Arimoto T, Tamaki Y, et al.: Effects of surface roughness and dimorphism on the adhesion of *Candida albicans* to the surface of resins: scanning electron microscope analyses of mode and number of adhesions. *J. Investig. Clin. Dent.* 5(4). 307–312 (2014)
244. McCool L, Mai H, Essmann M, Larsen B: Tetracycline effects on *Candida albicans* virulence factors. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 493508 (2008)
245. McCourtie J, Douglas LJ: Relationship between cell surface composition of *Candida albicans* and adherence to acrylic after growth on different carbon sources. *Infect. Immun.* 32(3). 1234–1241 (1981)
246. McGinnis M, Tyring S: Introduction to Mycology. In: Baron S. (Ed.), *Medical*

- Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston (1996)
247. McHugh GL, Moellering RC, Hopkins CC, Swartz MN: Salmonella typhimurium resistant to silver nitrate, chloramphenicol, and ampicillin. *Lancet*. 1(7901). 235–240 (1975)
248. Meyer E, Geffers C, Gastmeier P, Schwab F: No increase in primary nosocomial candidemia in 682 German intensive care units during 2006 to 2011. *Eurosurveillance*. 18(24). 1–8 (2013)
249. Millard PJ, Roth BL, Thi HP, Yue ST, Haugland RP: Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(7). 2897–2905 (1997)
250. Miller MG, Johnson AD: White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell*. 110(3). 293–302 (2002)
251. Minagi S, Miyake Y, Inagaki K, Tsuru H, Suginaka H: Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. *Infect. Immun.* 47(1). 11–14 (1985)
252. Miramón P, Dunker C, Windecker H, Bohovych IM, Brown AJP, Kurzai O, Hube B: Cellular responses of *Candida albicans* to phagocytosis and the extracellular activities of neutrophils are critical to counteract carbohydrate starvation, oxidative and nitrosative stress. *PLoS One*. 7(12). e52850 (2012)
253. Miranda LN, van der Heijden IM, Costa SF, Sousa API, et al.: *Candida* colonisation as a source for candidaemia. *J. Hosp. Infect.* 72(1). 9–16 (2009)
254. Mlynek KD, Callahan MT, Shimkevitch AV, Farmer JT, et al.: Effects of Low-Dose Amoxicillin on *Staphylococcus aureus* USA300 Biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60(5). 2639–2651 (2016)
255. Mochon AB, Jin Y, Kayala MA, Wingard JR, et al.: Serological profiling of a *Candida albicans* protein microarray reveals permanent host-pathogen interplay and stage-specific responses during candidemia. *PLoS Pathog.* 6(3). e1000827 (2010)
256. Modak SM, Fox CLJ: (1973). Binding of silver sulfadiazine to the cellular components of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. Pharmacol.* 22(19). 2391–2404 (1973)
257. Moors MA, Stull TL, Blank KJ, Buckley HR, Mosser DM: A role for complement receptor-like molecules in iron acquisition by *Candida albicans*. *J. Exp. Med.* 175(6). 1643–1651 (1992)
258. Morykwas MJ, Argenta LC, Shelton-Brown EI, McGuirt W: Vacuum-assisted closure: a new method for wound control and treatment: animal studies and basic foundation. *Annals of Plastic Surgery*, 38(6), 553–562 (1997)
259. Motloch LJ, Rottlaender D, Darabi T, Joost I, Erdmann E, Hoppe UC: Conservative management of *Candida* infection of prosthetic aortic graft by means of caspofungin and fluconazole alone. *Texas Hear. Inst. J.* 38(2). 197–200 (2011)
260. Moyes DL, Wilson D, Richardson JP, Mogavero S, et al.: Candidalysin is a fungal



- peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature*. 532(7597). 64–68 (2016)
261. Mühling B, Fischer K, Thieme M, Orend KH: Chirurgisches Management von infizierten Prothesen der aortoiliakalen Strombahn. *Gefäßchirurgie*. 19(2). 141–146 (2014)
262. Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM, Ghannoum MA: Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infect. and Immun.* 71(8). 4333–4340 (2003)
263. Murad AM, Leng P, Straffon M, Wishart J, et al.: NRG1 represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *EMBO J.* 20(17). 4742–4752 (2001)
264. Murphy GJ, Pararajasingam R, Nasim A, Dennis MJ, Sayers RD: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in vascular surgical patients. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* 83(3). 158–163 (2001)
265. Murphy TP, Cutlip DE, Regensteiner JG, Mohler ER, et al.: Supervised exercise versus primary stenting for claudication resulting from aortoiliac peripheral artery disease: six-month outcomes from the claudication: exercise versus endoluminal revascularization (CLEVER) study. *Circulation*. 125(1). 130–139 (2012)
266. Nadeem SG, Shafiq A, Hakim ST, Anjum Y, Kazm SU: Effect of Growth Media, pH and Temperature on Yeast to Hyphal Transition in *Candida albicans*. *Open J. Med. Microbiol.* 3 (2013)
267. Naylor AR, Clark S, London NJ, Sayers RD, Macpherson DS, Barrie WW: Treatment of major aortic graft infection: preliminary experience with total graft excision and in situ replacement with a rifampicin bonded prosthesis. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 9(2). 252–256 (1995)
268. Netea MG, Suttmüller R, Hermann C, Van der Graaf CAA, et al.: Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J. Immunol.* 172(6). 3712–3718 (2004)
269. Nett JE, Cain MT, Crawford K, Andes DR: Optimizing a *Candida* biofilm microtiter plate model for measurement of antifungal susceptibility by tetrazolium salt assay. *J. Clin. Microbiol.* 49(4). 1426–1433 (2011)
270. Nikawa H, Nishimura H, Makihiro S, Hamada T, Sadamori S, Samaranayake LP: (2000). Effect of serum concentration on *Candida* biofilm formation on acrylic surfaces. *Mycoses*. 43(3–4). 139–143 (2000)
271. Ning Y, Hu X, Ling J, Du Y, Liu J, Liu H, Peng Z *Candida albicans* survival and biofilm formation under starvation conditions. *Int. Endod. J.* 46(1). 62–70 (2013)
272. Nobile CJ, Mitchell AP: Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell. Microbiol.* 8(9). 1382–1391 (2006)
273. Norgaard O: Investigations with radioactive AG 111 into the resorption of silver through human skin. *Acta Derm. Venereol.* 34(5). 415–419 (1954)
274. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FGR: Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J. Vas. Surg.* 45 Suppl S. S5-67 (2007)

275. NRZ - Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen. KISS Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System im Modul OP-KISS Referenzdaten 2017-2018 (2019). Heruntergeladen von: [https://www.nrz-hygiene.de/fileadmin/nrz/module/op/201701\\_201812\\_OPRef.pdf](https://www.nrz-hygiene.de/fileadmin/nrz/module/op/201701_201812_OPRef.pdf). Heruntergeladen am 24/06/2019
276. NRZ - Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen. KISS Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System im Modul ITS-KISS Referenzdaten 2018 (2019) Heruntergeladen von: [https://www.nrz-hygiene.de/fileadmin/nrz/module/its/201701\\_201912\\_ALLE\\_ITSTRef.pdf](https://www.nrz-hygiene.de/fileadmin/nrz/module/its/201701_201912_ALLE_ITSTRef.pdf). Heruntergeladen am 31/05/2019
277. O'Hara PJ, Hertzner NR, Beven EG, Krajewski LP: Surgical management of infected abdominal aortic grafts: review of a 25-year experience. *J. Vasc. Surg.* 3(5). 725–731 (1986)
278. O'Connor S, Andrew P, Batt M, Becquemin JP: A systematic review and meta-analysis of treatments for aortic graft infection. *J. Vasc. Surg.* 44(1). 38-45.e8 (2006)
279. Odds FC, Hanson MF, Davidson AD, Jacobsen MD, et al.: One year prospective survey of Candida bloodstream infections in Scotland. *J. Med. Microbiol.* 56(8). 1066–1075 (2007)
280. Ogilvie AT, Brisson BA, Singh A, Weese JS: In vitro evaluation of the impact of silver coating on Escherichia coli adherence to urinary catheters. *Can. Vet. J.* 56(5), 490–494 (2015)
281. Olaechea PM, Palomar M, León-Gil C, et al: Economic impact of Candida colonization and Candida infection in the critically ill patient. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 23(4). 323-330 (2004)
282. Ono A, Cao S, Togashi H, Tashiro M, et al.: Specific interactions between silver(I) ions and cytosine-cytosine pairs in DNA duplexes. *Chem. Commun. (Camb).* (39). 4825–4827 (2008)
283. Osada H, Nakajima H, Morishima M, Su T: Candidal mediastinitis successfully treated using vacuum-assisted closure following open-heart surgery. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 14(6). 872–874 (2012)
284. Osińska-Jaroszuk M, Ginalska G, Belcarz A, Uryniak A: Vascular Prostheses with Covalently Bound Gentamicin and Amikacin Reveal Superior Antibacterial Properties than Silver-impregnated Ones - An In Vitro Study. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 38(6). 697–706 (2009)
285. Paraje MG, Correa SG, Renna MS, Theumer M, Sotomayor CE: Candida albicans-secreted lipase induces injury and steatosis in immune and parenchymal cells. *Can. J. Microbiol.* 54(8). 647–659 (2008)
286. Park HJ, Kim JY, Kim J, Lee JH, Hahn JS, Gu MB, Yoon J: Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity. *Water Res.* 43(4). 1027–1032 (2009)
287. Paull KD, Shoemaker RH, Boyd MR, Parsons JL, et al.: The synthesis of XTT: A new tetrazolium reagent that is bioreducible to a water-soluble formazan. *J. Heterocycl. Chem.* 25(3). 911–914 (1988)

288. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T: Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J. Microbiol. Methods.* 72(2). 157–165 (2008)
289. Percival SL, Bowler PG, Russell D: Bacterial resistance to silver in wound care. *J. Hosp. Infect.* 60(1). 1–7 (2005)
290. Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Sader HS, Fluit AC, Hollis RJ, Messer SA: International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surv. *J. Clin. Microbiol.* 39(9). 3254–3259 (2001)
291. Pfaller MA, Diekema DJ, Turnidge JD, Castanheira M, Jones RN: Twenty Years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for *Candida* Species From 1997-2016. *Open forum Infect. Dis.* 6(Suppl 1). S79–S94 (2019)
292. Pfaller MA, Messer SA, Moet GJ, Jones RN, Castanheira M: *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). *Int. J. Antimicrob. Agents* 38(1). 65–69 (2011a)
293. Pfaller MA, Moet GJ, Messer SA, Jones RN, Castanheira M: *Candida* bloodstream infections: comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008-2009. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55(2). 561–566 (2011b)
294. Pietrella D, Pandey N, Gabrielli E, Pericolini E, et al.: Secreted aspartic proteases of *Candida albicans* activate the NLRP3 inflammasome. *Eur. J. Immun.* 43(3). 679–692 (2013)
295. Pomés R, Gil C, Nombela C: Genetic analysis of *Candida albicans* morphological mutants. *J. Gen. Microbiol.* 131(8). 2107–2113 (1985)
296. Pongrácz J, Benedek K, Juhász E, Iván M, Kristóf K: In vitro biofilm production of *Candida* bloodstream isolates: any association with clinical characteristics?. *J. Med. Microbiol.* 65(4). 272-277 (2016)
297. Pope LM, Cole GT: Comparative studies of gastrointestinal colonization and systemic spread by *Candida albicans* and nonlethal yeast in the infant mouse. *Scan. Electron Microsc.* (Pt 4). 1667–1676 (1982)
298. Pratten J, Nazhat SN, Blaker JJ, Boccaccini AR: In vitro attachment of *Staphylococcus epidermidis* to surgical sutures with and without Ag-containing bioactive glass coating. *J. Biomater. Appl.* 19(1). 47–57 (2004)
299. Puig-Asensio M, Padilla B, Garnacho-Montero J, Zaragoza O, et al.: Epidemiology and predictive factors for early and late mortality in *Candida* bloodstream infections: A population-based surveillance in Spain. *Clin. Microbiol. Infect.* 20(4) (2014)
300. Pupka A, Skora J, Janczak D, Plonek T, Marczak J, Szydelko T: In situ revascularisation with silver-coated polyester prostheses and arterial homografts in patients with aortic graft infection - A prospective, comparative, single-centre study. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 41(1). 61–67 (2011)

301. Quarmby JW, Burnand KG, Lockhart SJM, Donald AE, Sommerville KM, Jamieson CW, Browse NL: Prospective randomized trial of woven versus collagen-impregnated knitted prosthetic Dacron grafts in aortoiliac surgery. *BJS (British J. Surgery)*. 85(6), 775–777 (1998)
302. Quinones-Baldrich WJ, Moore WS, Ziomek S, Chvapil M: Development of a “leak-proof,” knitted Dacron vascular prosthesis. *J. Vasc. Surg.* 3(6). 895–903 (1986)
303. Rainnie DJ, Bragg PD: Loss of silver ions from oxygen electrode. *Anal. Biochem.* 44(2). 392–396 (1971)
304. Rajendran R, Sherry L, Nile CJ, Sherriff A, et al.: Biofilm formation is a risk factor for mortality in patients with *Candida albicans* bloodstream infection-Scotland, 2012–2013. *Clin. Microbiol. Infect.* 22(1). 87–93 (2016)
305. Ramage G, Vandewalle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL: Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev. Iberoam. Micol.* 18(4). 163–170 (2001)
306. Ramage G, Mowat E, Jones B, Williams C, Lopez-Ribot J: Our current understanding of fungal biofilms. *Crit. Rev. Microbiol.* 35(4). 340–355 (2009)
307. Ramage G, Rajendran R, Sherry L, Williams C: Fungal biofilm resistance. *Int. J. Microbiol.* 528521 (2012)
308. Rawson TM, Lee MJ, Khanna P, Gopal Rao G, Renton S, Buckley J: Microbiological characterisation of prosthetic vascular graft infection. *J. Infect.* September (2015)
309. Ray TL, Payne CD: Scanning electron microscopy of epidermal adherence and cavitation in murine candidiasis: a role for *Candida* acid proteinase. *Infect. Immun.* 56(8). 1942–1949 (1988)
310. Reagan DR, Pfaller MA, Hollis RJ, Wenzel RP: Evidence of nosocomial spread of *Candida albicans* causing bloodstream infection in a neonatal intensive care unit. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 21(4). 191–194 (1995)
311. Regös J, Zak O, Solf R, Vischer WA, Weirich EG: Antimicrobial spectrum of triclosan, a broad-spectrum antimicrobial agent for topical application. II. Comparison with some other antimicrobial agents. *Dermatologica.* 158(1). 72–79 (1979)
312. Renner LD, Weibel DB: Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bull.* 36(5). 347–355 (2011)
313. Ricco JB: InterGard silver bifurcated graft: features and results of a multicenter clinical study. *J. Vasc. Surg.* 44(2). 339–346 (2006)
314. Ricco JB, Assadian A, Schneider F, Assadian O: In vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of a new silver-triclosan vs a silver collagen-coated polyester vascular graft against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Vasc. Surg.* 55(3). 823–829 (2012)
315. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP: Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Crit. Care Med.* 27(5). 887–892 (1999)
316. Riggle PJ, Kumamoto CA: Role of a *Candida albicans* P1-type ATPase in resistance

- to copper and silver ion toxicity. *J. Bacteriol.* 182(17). 4899–4905 (2000)
317. Rikkerink EH, Magee BB, Magee PT: Opaque-white phenotype transition: a programmed morphological transition in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 170(2). 895–899 (1998)
318. Rocha MFG, Bandeira SP, de Alencar LP, Melo LM, et al.: Azole resistance in *Candida albicans* from animals: Highlights on efflux pump activity and gene overexpression. *Mycoses.* 60(7). 462–468 (2017)
319. Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL: An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J. Immunol. Methods.* 142(2). 257–265 (1991)
320. Ross JM, Needham JR: Genital flora during pregnancy and colonization of the newborn. *J. R. Soc. Med.* 73(2). 105–110 (1980)
321. Rowan R, McCann M, Kavanagh K: Analysis of the response of *Candida albicans* cells to Silver(I). *Med. Mycol.* 48(3). 498–505 (2010)
322. Rudek W: Esterase activity in *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 8(6):756-759 (1978)
323. Rupp ME, Fitzgerald T, Marion N, Helget V, Puumala S, Anderson JR, Fey PD: Effect of silver-coated urinary catheters: efficacy, cost-effectiveness, and antimicrobial resistance. *Am. J. Infect. Control.* 32(8). 445–450 (2004)
324. Russell AD, Hugo WB: Antimicrobial activity and action of silver. *Prog. Med. Chem.* 31. 351–370 (1994)
325. Ryden L, Grant PJ, Anker SD, Berne C, et al: ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: the Task Force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboratio. *Eur. Heart J.* 34(39). 3035–3087 (2013)
326. Sabino R, Verissimo C, Brandao J, Martins C, Alves D, Pais C, Denning DW: Serious fungal infections in Portugal. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 36(7). 1345–1352 (2017)
327. Samaranayake YH, Cheung BPK, Yau JYY, Yeung SKW, Samaranayake LP: Human serum promotes *Candida albicans* biofilm growth and virulence gene expression on silicone biomaterial. *PloS One.* 8(5). e62902 (2013)
328. Samson RH, Veith FJ, Janko GS, Gupta SK, Scher LA: A modified classification and approach to the management of infections involving peripheral arterial prosthetic grafts. *J. Vasc. Surg.* 8(2). 147-153 (1988)
329. Samu R, Moulee A, Kumar VG: Effect of Charge and Hydrophobicity on Adsorption of Modified Starches on Polyester. *J. Colloid Interface Sci.* 220(2). 260-268 (1999)
330. Sarnat-Kucharczyk M, Pojda-Wilczek D, Mrukwa-Kominek E: Diagnostic methods in ocular argyrosis: case report. *Doc. Ophthalmol.* 133(2). 129-138 (2016)
331. Satoh K, Makimura K, Hasumi Y, Nishiyama Y, Uchida K, Yamaguchi H: *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an

- inpatient in a Japanese hospital. *Microbiol. Immun.* 53(1). 41–44 (2009)
332. Schelenz S, Hagen F, Rhodes JL, Abdolrasouli A et al.: First hospital outbreak of the globally emerging *Candida auris* in a European hospital. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 5. 35 (2016)
333. Scheuch G, Stahlhofen W, Heyder J: An approach to deposition and clearance measurements in human airways. *J. Aerosol Med.* 9(1). 35–41 (1996)
334. Schierholz JM, Beuth J, Pulverer G, König DP: Silver-containing polymers. *Antimicrob. Agents Chemother.* United States. November (1999)
335. Seman BG, Moore JL, Scherer AK, Blair BA, Manandhar S, Jones JM, Wheeler RT: Yeast and Filaments Have Specialized, Independent Activities in a Zebrafish Model of *Candida albicans* Infection. *Infect. Immun.* 86(10) (2018)
336. Seneviratne CJ, Silva WJ, Jin LJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP: Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Arch. Oral Biol.* 54(11). 1052–1060 (2009)
337. Setacci C, De Donato G, Setacci F, Chisci E, Perulli A, Galzerano G, Sirignano P: Management of abdominal endograft infection. *J. Cardiovasc. Surg.* 51(1). 33–41 (2010)
338. Shahin J, Allen EJ, Patel K, Muskett H et al.: Predicting invasive fungal disease due to *Candida* species in non-neutropenic, critically ill, adult patients in United Kingdom critical care units. *BMC Infect. Dis.* 16. 480 (2016)
339. Sharp WJ, Hoballah JJ, Mohan CR, Kresowik TF, Martinasevic M, Chalmers RT, Corson JD: The management of the infected aortic prosthesis: a current decade of experience. *J. Vasc. Surg.* 19(5). 844–850 (1994)
340. Sheehy K, Casey A, Murphy A, Chambers G: Antimicrobial properties of nano-silver: a cautionary approach to ionic interference. *J. Colloid Interface Sci.* 443. 56–64 (2015)
341. Sherry L, Ramage G, Kean R, Borman A, Johnson EM, Richardson MD, Rautemaa-Richardson R: Biofilm-Forming Capability of Highly Virulent, Multidrug-Resistant *Candida auris*. *Emerg. Infect. Dis.* 23(2). 328–331 (2017)
342. Sigma Aldrich. Produktinformation zu Lektin von Concanavalin A FITC markiert. Heruntergeladen von [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/c7642pis.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/c7642pis.pdf). Heruntergeladen am 31/072020
343. Silver S, Phung LT, Silver G: Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33(7). 627–634 (2006)
344. Slutsky B, Buffo J, Soll DR: High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. *Science.* 230(4726). 666–669 (1985)
345. Slutsky B, Staebell M, Anderson J, Risen L, Pfaller M, Soll DR: “White-opaque transition”: a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 169(1). 189–197 (1987)

346. Sobel JD, Myers PG, Kaye D, Levison ME: Adherence of *Candida albicans* to human vaginal and buccal epithelial cells. *J. Infect. Dis.* 143(1). 76–82 (1981)
347. Sousa JV, Antunes L, Mendes C, Marinho A, Gonçalves A, Gonçalves Ó, Matos A: Prosthetic vascular graft infections: A center experience. *Angiol. e Cir. Vasc.* 10(2). 52–57 (2014)
348. Spellberg B, Marr KA, Filler SG: *Candida*: What Should Clinicians and Scientists Be Talking About? In: Calderone RA & Clancy CJ (Eds.), *Candida and candidiasis* (pp. 1–8). Washington, DC: ASM Press (2012)
349. Steele C, Fidel PLJ: Cytokine and chemokine production by human oral and vaginal epithelial cells in response to *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 70(2). 577–583 (2002)
350. Sterling JP: Silver-resistance, allergy, and blue skin: truth or urban legend? *Burns* . 40 Suppl 1. S19-23 (2014)
351. Tacconelli E, Tumbarello M, Pittiruti M, Leone F, Lucia MB, Cauda R, Ortona L: Central venous catheter-related sepsis in a cohort of 366 hospitalised patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16(3). 203–209 (1997)
352. Taher F, Assadian O, Hirsch K, Falkensammer J, Senekowitsch C, Assadian A: Protheseninfektionen im aortofemorale Bereich und ihre Vermeidung. *Der Chir.* 86(3). 293–302 (2015)
353. Tamimi SO, Zmeili SM, Gharaibeh MN, Shubair MS, Salhab AS: Toxicity of a new antismoking mouthwash 881010 in rats and rabbits. *J. Toxicol. Environ. Health. Part A.* 53(1) 47–60 (1998)
354. Tachdjian CL, Burchall JJ, Kozinn PJ: Rapid identification of *Candida albicans* by filamentation on serum and serum substitutes. *AMA. J. Dis. Child.* 99. 212–215 (1960)
355. Tautenhahn J, Meyer F, Buerger T, Schmidt U, Lippert H, Koenig W, Koenig B: Interactions of neutrophils with silver-coated vascular polyester grafts. *Langenbecks Arch Surg.* 395(2). 143-9 (2010)
356. Tellier R, Krajden M, Grigoriew GA, Campbell I: Innovative endpoint determination system for antifungal susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36(8). 1619–1625 (1992)
357. Teo JQ, Candra SR, Lee SJ, et al: Candidemia in a major regional tertiary referral hospital - epidemiology, practice patterns and outcomes. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 6. 27 (2017)
358. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP: In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. *Arch. Oral Biol.* 52(8). 761–767 (2007)
359. Thewes S, Moran GP, Magee BB, Schaller M, Sullivan DJ, Hube B: Phenotypic screening, transcriptional profiling, and comparative genomic analysis of an invasive and non-invasive strain of *Candida albicans*. *BMC Microbiol.* 8. 187 (2008)
360. Thewes S, Reed HK, Grosse-Siestrup C, Groneberg DA, Meissler M, Schaller M, Hube B: Haemoperfused liver as an ex vivo model for organ invasion of *Candida albicans*. *J. Med. Microbiol.* 56(Pt 2). 266–270 (2007)

361. Thomas R, Soumya KR, Mathew J, Radhakrishnan EK: Inhibitory effect of silver nanoparticle fabricated urinary catheter on colonization efficiency of Coagulase Negative Staphylococci. *J. Photochem. Photobiol. B.* 149. 68–77 (2015)
362. Thompson RW, Holmes DR, Mertens RA, Liao S, et al.: Production and localization of 92-kilodalton gelatinase in abdominal aortic aneurysms. An elastolytic metalloproteinase expressed by aneurysm-infiltrating macrophages. *J. Clin. Invest.* 96(1). 318–326 (1995)
363. Thurman RB, Gerba CP, Bitton G: The molecular mechanisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses. *Crit. Rev. Environ. Control.* 18(4). 295–315 (1989)
364. Timmins AC, Morgan GAR: Argyria or cyanosis. *Anaesthesia.* 43(9). 755–756 (1988)
365. Torsello G, Sandmann W, Gehrt A, Jungblut RM: In situ replacement of infected vascular prostheses with rifampin-soaked vascular grafts: early results. *J. Vasc. Surg.* 17(4). 768–773 (1993)
366. Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, et al.: Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 23(4). 317–322 (2004)
367. Tsuboi R, Komatsuzaki H, Ogawa H: Induction of an extracellular esterase from *Candida albicans* and some of its properties. *Infect. Immun.* 64(8). 2936–2940 (1996)
368. Tumbarello M, Fiori B, Trecarichi EM, Posteraro P, et al.: Risk factors and outcomes of candidemia caused by biofilm-forming isolates in a tertiary care hospital. *PLoS One.* 7(3). e33705 (2012)
369. Uppuluri P, Chaturvedi AK, Srinivasan A, Banerjee M, et al: Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. *PLoS Pathog.* 6(3). e1000828 (2010)
370. US Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease: ToxFAQs - silver CAS # 7440-22-4 (1999). Heruntergeladen von: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxfaqs/tfacts146.pdf>. Heruntergeladen am 24/06/2019
371. Vallabhaneni S, Kallen A, Tsay S, Chow N, et al: Investigation of the First Seven Reported Cases of *Candida auris*, a Globally Emerging Invasive, Multidrug-Resistant Fungus - United States, May 2013-August 2016. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 65(44). 1234–1237 (2016)
372. Vandenbosch D, Braeckmans K, Nelis HJ, Coenye T: Fungicidal activity of miconazole against *Candida* spp. biofilms. *J Antimicrob Chemother.* Apr. 65(4). 694–700 (2010)
373. van der Graaf CAA, Netea MG, Verschueren I, van der Meer JWM, Kullberg BJ: Differential cytokine production and Toll-like receptor signaling pathways by *Candida albicans* blastoconidia and hyphae. *Infect. Immun.* 73(11). 7458–7464 (2005)
374. van der Zande M, Vandebriel RJ, Van Doren E, Kramer E, et al.: Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. *ACS Nano.* 6(8). 7427–7442 (2012)



375. Vazquez JA, Sobel, JD: Candidiasis. In: Kauffman CA, Pappas PG, Sobel JD, Dismukes WE (Eds.), *Essentials of Clinical Mycology* (pp. 167–206). Springer New York (2011)
376. Verbelen J, Hoeksema H, Heyneman A, Pirayesh A, Monstrey S: Aquacel® Ag dressing versus Acticoat™ dressing in partial thickness burns: a prospective, randomized, controlled study in 100 patients. Part 1: burn wound healing. *Burns*. 40(3). 416-427 (2014)
377. Veses V, Gow NAR: Pseudohypha budding patterns of *Candida albicans*. *Med. Mycol.* 47(3). 268–275 (2009)
378. Vogel TR, Symons R, Flum DR: The incidence and factors associated with graft infection after aortic aneurysm repair. *J. Vasc. Surg.* 47(2). 264–269 (2008)
379. Vrcek IV, Zuntar I, Petlevski R, Pavicic I, Dutour Sikiric M, Curlin M, Goessler W: Comparison of in vitro toxicity of silver ions and silver nanoparticles on human hepatoma cells. *Environ. Toxicol.* 31(6). 679–692 (2016)
380. Wächtler B, Wilson D, Haedicke K, Dalle F, Hube B: From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. *PLoS One*. 6(2). e17046 (2011)
381. Walsh TJ, Dixon DM: Spectrum of Mycoses. In Baron S (Ed.), *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas (1996)
382. Wan AT, Conyers RA, Coombs CJ, Masterton JP: Determination of silver in blood, urine, and tissues of volunteers and burn patients. *Clin. Chem.* 37(10 Pt 1). 1683–1687 (1991)
383. Wang FD, Wang YP, Chen CF, Chen HP: The incidence rate, trend and microbiological aetiology of prosthetic joint infection after total knee arthroplasty: A 13 years' experience from a tertiary medical center in Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 51(6). 717–722 (2018)
384. Wang Q, Sun FJ, Liu Y, Xiong LR, Xie LL, Xia PY: Enhancement of biofilm formation by subinhibitory concentrations of macrolides in *icaADBC*-positive and -negative clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54(6). 2707–2711 (2010)
385. Wang Y, Xu XL: Bacterial peptidoglycan-derived molecules activate *Candida albicans* hyphal growth. *Commun. Integr. Biol.* 1(2). 137–139 (2008)
386. Warwood NM, Blazevic DJ: Comparison of cream of rice agar and horse serum for differentiating germ tubes of *Candida albicans* from filaments of *Candida tropicalis*. *J. Clin. Microbiol.* 5(4). 501–502 (1977)
387. WHO: WHO Study Group on Atherosclerosis and Ischaemic Heart Disease & World Health Organization (1957). Study Group on Atherosclerosis and Ischaemic Heart Disease [meeting held in Geneva from 7 to 11 November 1955]: report. Heruntergeladen von: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/40372>. Heruntergeladen am 28/06/2019
388. WHO: Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first addendum (2017). Heruntergeladen von:

<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254637/9789241549950-eng.pdf;jsessionid=F81268EACA8385AC98F21AB2A961D124?sequence=1>  
Heruntergeladen am 27/08/2020

389. Wilderman M, Sicard G: Chapter 5 – Surgical Treatment of Nonruptured Infrarenal Abdominal Aortic Aneurysms. In: Upchurch G & Criado E (Eds.), *Aortic Aneurysms, Contemporary Cardiology* (pp. 71–72). Humana Press, a part of Springer Science + Business Media (2009)
390. Williams RL, Williams DF: Albumin adsorption on metal surfaces. *Biomaterials*. 9(3). 206–212 (1988)
391. Wilson RW, Bower TC, Creager MA, et al.: *Vascular Graft Infections, Mycotic Aneurysms, and Endovascular Infections: A Scientific Statement From the American Heart Association*. *Circulation*. 134(20). e412-e460 (2016)
392. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB: Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis.* 39(3). 309–317 (2004)
393. Wlodkowski TJ, Rosenkranz HS: Antifungal activity of silver sulphadiazine. *Lancet*. 2(7831). 739–740 (1973)
394. Woodrow Wilson International Center for Scholars: *The Project on Emerging Nanotechnologies. Consumer Products. An Inventory of Nanotechnology-based Consumer Products Currently on the Market*. Heruntergeladen von: <https://www.nanotechproject.org/cpi/browse/nanomaterials/silver-nanoparticle/>. Heruntergeladen am 26/11/2019 (2019)
395. Wright JB, Lam K, Hansen D, Burrell RE: Efficacy of topical silver against fungal burn wound pathogens. *Am. J. Infect. Control*. 27(4). 344–350 (1999)
396. Wu H, Downs D, Ghosh K, Ghosh AK, Staib P, Monod M, Tang J: *Candida albicans* secreted aspartic proteases 4-6 induce apoptosis of epithelial cells by a novel Trojan horse mechanism. *FASEB J*. 27(6) (2013)
397. Wu T, Wright K, Hurst SF, Morrison CJ: Enhanced extracellular production of aspartyl proteinase, a virulence factor, by *Candida albicans* isolates following growth in subinhibitory concentrations of fluconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44(5). 1200–1208 (2000)
398. Yakabe Y, Sano T, Ushio H, Yasunaga T: Kinetic studies of the interaction between silver ion and desoxyribonucleic acid. *Chem. Lett.* 9(4). 373–376 (1980)
399. Yang Y, Alvarez PJJ: Sublethal Concentrations of Silver Nanoparticles Stimulate Biofilm Development. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 2(8). 221–226 (2015)
400. Yates SG, Barros D'Sa AA, Berger K, Fernandez LG, et al.: The preclotting of porous arterial prostheses. *Ann. Surg.* 188(5). 611–622 (1978)
401. Yin HQ, Langford R, Burrell RE: Comparative Evaluation of the Antimicrobial Activity of ACTICOAT Antimicrobial Barrier Dressing. *J. Burn Care Res.* 20(3). 195–200 (1999)

- 
402. Yoshijima Y, Murakami K, Kayama S, et al.: Effect of substrate surface hydrophobicity on the adherence of yeast and hyphal *Candida*. *Mycoses*. 53(3). 221-226 (2010)
403. Zarnowski R, Westler WM, Lacmbouh GA, Marita JM, et al.: Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *MBio*. 5(4). e01333-14 (2014)
404. Zawrotniak M, Bochenska O, Karkowska-Kuleta J, Seweryn-Ozog K, et al.: Aspartic Proteases and Major Cell Wall Components in *Candida albicans* Trigger the Release of Neutrophil Extracellular Traps. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7. 414 (2017)
405. Zegelman M, Guenther G, Waliszewski M, Pukacki F, et al.: Results from the International Silver Graft Registry for high-risk patients treated with a metallic-silver impregnated vascular graft. *Vascular*. 21(3). 137–147 (2013)
406. Zhang S, Crow SAJ: Toxic effects of Ag(I) and Hg(II) on *Candida albicans* and *C. maltosa*: a flow cytometric evaluation. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(9). 4030–4035 (2001)
407. Ziabka M, Malec K: Polymeric middle ear prosthesis enriched with silver nanoparticles - first clinical results. *Expert Rev. Med. Devices*16(4). 325–331 (2019)
408. Zipfel B, Hetzer R: “Aortenbogen-Debranching” mit Implantation von Stent-Prothesen. *Herz-Thorax- und Gefäßchirurgie*, 27, 308–314 (2013)
409. Zühlke HV, Zühlke L: Spezielle Therapien in der Infektion. In: *Septische Gefäßmedizin* (p. 163) (2019)

## **DANKSAGUNG**

Die Danksagung ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

## ERKLÄRUNG

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

**Der Einfluss verschiedener Oberflächenbeschichtungen von Gefäßprothesen auf die Biofilmbildung durch *Candida albicans***

am Institut für **Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene** mit Unterstützung durch **Oberärztin PD Dr. med. Ina Tammer**

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, 19/10/2020

Julia Reuner

## **DARSTELLUNG DES BILDUNGSWEGES**

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

## ANHANG

**Im Anhang verwendete Abkürzungen:** Exp = Experiment, FKS = Fetales Kälberserum, h = Stunden, KBE = Koloniebildende Einheiten, MW = errechneter Mittelwert, P1 = Kollagengefäßprothese mit Silberazetatbeschichtung, P3 = Kollagengefäßprothese ohne Silberazetatbeschichtung, PS = Polystyren, RPMI-Medium = Roswell Park Memorial Institute-Medium, SD = errechnete Standardabweichung, XTT = 2,3-Bis(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-5-[(Phenylamino)-Carbonyl]-2H-Tetrazolium-Hydroxid

### Tabelle A 1

Rohdaten für: 3.1.1. Adhäsion von *Candida albicans* an Kollagengefäßprothesen mit Silberazetat in RPMI-Medium

visualisiert durch: Abbildung 3

Stämme: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* SC 5314

Materialien: PS (d=13mm), P1

Medium: RPMI

Methode: Adhäsionsassay

Bestimmung von: KBE

ATCC 10231				
PS	1 h	1,5 h	2 h	3 h
Exp 1	513.000	940.000	780.000	600.000
Exp 2	560.000	720.000	640.000	650.000
Exp 3	620.000	670.000	710.000	620.000
Exp 4	540.000	830.000	910.000	630.000
<b>MW</b>	558.250	790.000	760.000	625.000
<b>SD</b>	45.449	120.277	115.181	20.817
P1				
P1	1 h	1,5 h	2 h	3 h
Exp 1	46.300	60.600	44.500	12.000
Exp 2	70.000	32.700	23.100	79.800
Exp 3	36.400	21.300	93.000	45.700
<b>MW</b>	50.900	38.200	53.533	45.833
<b>SD</b>	17.266	20.219	35.815	33.900
<b>p-Wert PS/P1</b>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

SC 5314				
PS	1 h	1,5 h	2 h	3 h
Exp 1	182.000	200.000	200.000	98.000
Exp 2	240.000	210.000	180.000	120.000
Exp 3	210.000	180.000	210.000	100.000
Exp 4	270.000	230.000	170.000	91.000
<b>MW</b>	225.500	205.000	190.000	102.250
<b>SD</b>	37.961	20.817	18.257	12.447
P1				
P1	1 h	1,5 h	2 h	3 h
Exp 1	26.700	39.600	13.400	23.100
Exp 2	13.800	17.000	31.900	22.500
Exp 3	21.400	41.800	35.600	19.800
<b>MW</b>	20.633	32.800	26.967	21.800
<b>SD</b>	6.484	13.727	11.894	1.758
<b>p-Wert PS/P1</b>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Tabelle A 1

**Tabelle A 2**

Rohdaten für: 3.1.2. Biofilmbildung von *Candida albicans* an Kollagengefäßprothesen mit Silberazetat in RPMI-Medium

visualisiert durch: Abbildung 5

Stämme: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* SC 5314

Materialien: PS (d=13mm), P1

Medium: RPMI

Methode: Adhäsionsassay/Biofilmbildung

Bestimmung von: KBE

<b>ATCC 10231</b>				
<b>PS</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h</b>	<b>96 h</b>
Exp 1	650.000	540.000	280.000	220.000
Exp 2	700.000	590.000	310.000	260.000
Exp 3	620.000	500.000	300.000	220.000
Exp 4	680.000	560.000	420.000	240.000
<b>MW</b>	662.500	547.500	327.500	235.000
<b>SD</b>	35.000	37.749	62.915	19.149
<b>P1</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h</b>	<b>96 h</b>
Exp 1	1.400	100	60	20
Exp 2	1.800	180	20	10
Exp 3	620	300	30	60
<b>MW</b>	1.273	193	37	30
<b>SD</b>	600	101	21	26
<b>p-Wert PS/P1</b>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

<b>SC 5314</b>				
<b>PS</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h</b>	<b>96 h</b>
Exp 1	31.000	219.000	124.000	73.000
Exp 2	43.800	134.000	113.000	68.700
Exp 3	28.500	186.000	142.000	53.800
<b>MW</b>	34.433	179.667	126.333	65.167
<b>SD</b>	8.208	42.852	14.640	10.076
<b>P1</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h</b>	<b>96 h</b>
Exp 1	130	240	120	100
Exp 2	100	190	90	110
Exp 3	90	150	140	120
<b>MW</b>	107	193	117	110
<b>SD</b>	21	45	25	10
<b>p-Wert PS/P1</b>	=0,002	=0,002	<0,001	<0,001

Tabelle A 2



**Tabelle A 3**

Rohdaten für: 3.1.3. Auswirkung der Silberprothese P1 auf die sich im umgebenden RPMI-Medium befindlichen *Candida*-Zellen

visualisiert durch: Abbildung 7

Stämme: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* SC 5314

Materialien: PS (d=13mm), P1

Medium: RPMI

Methode: Adhäsionsassay aus den Überständen

Bestimmung von: KBE

ATCC 10231				
PS	24 h	48 h	72 h	96 h
Exp 1	22.000	32.600	340.000	279.000
Exp 2	10.250	16.400	15.600	39.800
Exp 3	106.500	13.300	20.000	44.500
<b>MW</b>	106.500	13.300	20.000	44.500
<b>SD</b>	52.508	10.365	186.035	136.766
P1	24 h	48 h	72 h	96 h
Exp 1	670	730	480	31
Exp 2	56	23	11	24
Exp 3	170	112	209	152
<b>MW</b>	299	288	233	69
<b>SD</b>	327	385	235	72

**Tabelle A 3**

SC 5314				
PS	24 h	48 h	72 h	96 h
Exp 1	257.000	303.000	389.000	369.000
Exp 2	58.100	11.200	14.950	24.300
Exp 3	23.000	780	6.990	10.200
<b>MW</b>	112.700	104.993	136.980	134.500
<b>SD</b>	126.194	171.558	218.292	203.205
P1	24 h	48 h	72 h	96 h
Exp 1	330	11	50	3
Exp 2	23	30	11	3
Exp 3	11	5	2	231
<b>MW</b>	121	15	21	79
<b>SD</b>	181	13	26	132

Tabelle A 4

Rohdaten für: 3.2.1. Adhäsion und Biofilmbildung von *Candida albicans* in RPMI-Medium

visualisiert durch: Abbildung 10

Stämme: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* SC 5314

Materialien: P1, P3

Medium: RPMI

Methode: Adhäsionsassay/Biofilmbildung

Bestimmung von: KBE

ATCC 10231				SC 5314			
P1	1,5 h	24 h	72 h	P1	1,5 h	24 h	72 h
Exp 1/1	96.000	3.140	40	Exp 1/1	67.500	740	210
Exp 1/2	99.000	3.510	10	Exp 1/2	54.900	700	150
Exp 2/1	91.000	2.180	70	Exp 2/1	86.000	610	180
Exp 2/2	102.000	1.580	90	Exp 2/2	61.800	1.040	110
Exp 3/1	124.000	2.030	60	Exp 3/1	-	910	30
Exp 3/2	136.000	1.450	50	Exp 3/2	-	1.230	70
<b>MW</b>	108.000	2.315	53	<b>MW</b>	67.550	872	125
<b>SD</b>	17.833	836	27	<b>SD</b>	13.335	234	68
P3	1,5 h	24 h	72 h	P3	1,5 h	24 h	72 h
Exp 1/1	291.000	41.800	78.900	Exp 1/1	94.000	212.000	65.100
Exp 1/2	218.000	38.500	81.800	Exp 1/2	147.000	142.000	52.700
Exp 2/1	274.000	54.400	76.400	Exp 2/1	112.000	185.000	56.100
Exp 2/2	182.000	69.100	41.800	Exp 2/2	83.000	107.000	67.300
Exp 3/1	142.000	56.800	43.200	Exp 3/1	-	126.000	71.800
Exp 3/2	163.000	49.300	48.600	Exp 3/2	-	91.000	78.900
<b>MW</b>	211.667	51.650	61.783	<b>MW</b>	109.000	143.833	65.317
<b>SD</b>	60.533	11.082	19.109	<b>SD</b>	28.012	46.499	9.743
<b>p-Wert P1/P3</b>	=0,002	<0,001	<0,001	<b>p-Wert P1/P3</b>	=0,037	<0,001	<0,001

Tabelle A 4

Tabelle A 5

Rohdaten für: 3.2.3. XTT-Reduktionsassay in RPMI-Medium  
 visualisiert durch: Abbildung 13  
 Stämme: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* SC 5314  
 Materialien: P1, P3  
 Medium: RPMI  
 Methode: XTT-Reduktionsassay  
 Bestimmung von: XTT-Extinktion

ATCC 10231			
abgelöst von P1	1,5 h	24 h	72 h
Exp 1/1	0,258	0,018	0,010
Exp 1/2	0,254	0,021	0,004
Exp 2/1	0,255	0,019	0,010
Exp 2/2	0,275	0,023	0,010
<b>MW</b>	0,261	0,020	0,008
<b>SD</b>	0,010	0,002	0,003
abgelöst von P3	1,5 h	24 h	72 h
Exp 1/1	0,508	0,395	0,254
Exp 1/2	0,510	0,410	0,258
Exp 2/1	0,515	0,406	0,254
Exp 2/2	0,505	0,406	0,257
<b>MW</b>	0,510	0,404	0,256
<b>SD</b>	0,004	0,006	0,002
<b>p-Wert P1/P3</b>	<0,001	<0,001	<0,001

Tabelle A 5

SC 5314			
abgelöst von P1	1,5 h	24 h	72 h
Exp 1/1	0,156	0,011	0,010
Exp 1/2	0,163	0,012	0,020
Exp 2/1	0,152	0,013	0,012
Exp 2/2	0,151	0,010	0,010
<b>MW</b>	0,156	0,012	0,013
<b>SD</b>	0,005	0,001	0,005
abgelöst von P3	1,5 h	24 h	72 h
Exp 1/1	0,594	0,645	0,315
Exp 1/2	0,584	0,647	0,294
Exp 2/1	0,581	0,655	0,300
Exp 2/2	0,582	0,658	0,306
<b>MW</b>	0,585	0,651	0,304
<b>SD</b>	0,006	0,006	0,009
<b>p-Wert P1/P3</b>	<0,001	<0,001	<0,001

**Tabelle A 6**

Rohdaten für: 3.3.1. Adhäsion und Biofilmbildung von *Candida albicans* in RPMI-Medium mit 50% FKS

visualisiert durch: Abbildung 14

Stämme: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* SC 5314

Materialien: P1, P3

Medium: RPMI mit 50% FKS

Methode: Adhäsionsassay/Biofilmbildung

Bestimmung von: KBE

<b>ATCC 10231</b>			
<b>P1</b>	<b>1,5 h</b>	<b>24 h</b>	<b>72 h</b>
Exp 1/1	98.000	364.000	695.000
Exp 1/2	78.000	291.000	512.000
Exp 2/1	79.500	256.000	714.000
Exp 2/2	53.600	241.000	1.030.000
Exp 3/1	86.000	312.000	735.000
Exp 3/2	66.500	374.000	849.000
<b>MW</b>	76.933	306.333	755.833
<b>SD</b>	15.408	54.724	172.735
<b>P3</b>			
<b>P3</b>	<b>1,5 h</b>	<b>24 h</b>	<b>72 h</b>
Exp 1/1	23.700	19.800	384.000
Exp 1/2	29.300	13.800	443.000
Exp 2/1	21.200	22.800	449.000
Exp 2/2	28.700	37.800	496.000
Exp 3/1	30.400	46.200	461.000
Exp 3/2	35.200	36.300	348.000
<b>MW</b>	28.083	29.450	430.167
<b>SD</b>	4.989	12.486	54.197
<b>p-Wert P1/P3</b>	<0,001	<0,001	=0,0013

<b>SC 5314</b>			
<b>P1</b>	<b>1,5 h</b>	<b>24 h</b>	<b>72 h</b>
Exp 1/1	47.100	3.120.000	1.760.000
Exp 1/2	50.300	2.730.000	1.970.000
Exp 2/1	58.800	2.940.000	1.520.000
Exp 2/2	59.300	4.130.000	4.980.000
Exp 3/1	62.600	3.870.000	3.870.000
Exp 3/2	57.300	4.580.000	4.210.000
<b>MW</b>	55.900	3.561.667	3.051.667
<b>SD</b>	5.927	738.686	1.477.449
<b>P3</b>			
<b>P3</b>	<b>1,5 h</b>	<b>24 h</b>	<b>72 h</b>
Exp 1/1	15.200	317.000	621.000
Exp 1/2	17.900	356.000	665.000
Exp 2/1	16.800	367.000	698.000
Exp 2/2	27.100	421.000	518.000
Exp 3/1	30.400	563.000	472.000
Exp 3/2	33.500	518.000	558.000
<b>MW</b>	23.483	423.667	588.667
<b>SD</b>	7.819	97.455	87.603
<b>p-Wert P1/P3</b>	<0,001	<0,001	=0,002

Tabelle A 6

Tabelle A 7

Rohdaten für: 3.3.2. XTT-Reduktionsassay in RPMI-Medium mit 50% FKS  
 visualisiert durch: Abbildung 15  
 Stämme: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* SC 5314  
 Materialien: P1, P3  
 Medium: RPMI mit 50% FKS  
 Methode: XTT-Reduktionsassay  
 Bestimmung von: XTT-Extinktion

ATCC 10231			
abgelöst von P1	1,5 h	24 h	72 h
Exp 1/1	0,286	0,799	0,668
Exp 1/2	0,287	0,778	0,694
Exp 2/1	0,289	0,784	0,689
Exp 2/2	0,300	0,803	0,695
<b>MW</b>	0,291	0,791	0,687
<b>SD</b>	0,006	0,012	0,013
abgelöst von P3	1,5 h	24 h	72 h
Exp 1/1	0,100	0,527	0,663
Exp 1/2	0,099	0,560	0,662
Exp 2/1	0,101	0,558	0,658
Exp 2/2	0,097	0,542	0,647
<b>MW</b>	0,099	0,547	0,658
<b>SD</b>	0,002	0,015	0,007
<b>p-Wert P1/P3</b>	<0,001	<0,001	=0,007

Tabelle A 7

SC 5314			
abgelöst von P1	1,5 h	24 h	72 h
Exp 1/1	0,172	1,064	0,937
Exp 1/2	0,164	1,081	0,945
Exp 2/1	0,179	1,078	0,961
Exp 2/2	0,182	1,065	0,933
<b>MW</b>	0,174	1,072	0,944
<b>SD</b>	0,008	0,009	0,012
abgelöst von P3	1,5 h	24 h	72 h
Exp 1/1	0,088	0,765	0,759
Exp 1/2	0,087	0,740	0,759
Exp 2/1	0,089	0,746	0,767
Exp 2/2	0,087	0,734	0,754
<b>MW</b>	0,088	0,746	0,760
<b>SD</b>	0,001	0,013	0,005
<b>p-Wert P1/P3</b>	<0,001	<0,001	<0,001

**Tabelle A 8**

Rohdaten für: 3.3.5. Vergleichende Betrachtung der Prothese P1 in RPMI mit und ohne FKS  
 visualisiert durch: Abbildung 18  
 Stämme: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* SC 5314  
 Materialien: P1  
 Medium: RPMI, RPMI mit 50% FKS  
 Methode: Adhäsionsassay/Biofilmbildung  
 Bestimmung von: KBE

<b>ATCC 10231</b>			
<b>P1 in RPMI</b>	<b>1,5 h</b>	<b>24 h</b>	<b>72 h</b>
Exp 1/1	96.000	3.140	40
Exp 1/2	99.000	3.510	10
Exp 2/1	91.000	2.180	70
Exp 2/2	102.000	1.580	90
Exp 3/1	124.000	2.030	60
Exp 3/2	136.000	1.450	50
<b>MW</b>	108.000	2.315	53
<b>SD</b>	17.833	836	27
<b>P1 in RPMI+ 50% FKS</b>	<b>1,5 h</b>	<b>24 h</b>	<b>72 h</b>
Exp 1/1	98.000	364.000	695.000
Exp 1/2	78.000	291.000	512.000
Exp 2/1	79.500	256.000	714.000
Exp 2/2	53.600	241.000	1.030.000
Exp 3/1	86.000	312.000	735.000
Exp 3/2	66.500	374.000	849.000
<b>MW</b>	76.933	306.333	755.833
<b>SD</b>	15.408	54.724	172.735
<b>p-Wert RPMI/ RPMI + 50% FCS</b>	=0,009	<0,001	<0,001

<b>SC 5314</b>			
<b>P1 in RPMI</b>	<b>1,5 h</b>	<b>24 h</b>	<b>72 h</b>
Exp 1/1	67.500	740	210
Exp 1/2	54.900	700	150
Exp 2/1	86.000	610	180
Exp 2/2	61.800	1.040	110
Exp 3/1	-	910	30
Exp 3/2	-	1.230	70
<b>MW</b>	67.550	872	125
<b>SD</b>	13.335	234	68
<b>P1 in RPMI+ 50% FKS</b>	<b>1,5 h</b>	<b>24 h</b>	<b>72 h</b>
Exp 1/1	47.100	3.120.000	1.760.000
Exp 1/2	50.300	2.730.000	1.970.000
Exp 2/1	58.800	2.940.000	1.520.000
Exp 2/2	59.300	4.130.000	4.980.000
Exp 3/1	62.600	3.870.000	3.870.000
Exp 3/2	57.300	4.580.000	4.210.000
<b>MW</b>	55.900	3.561.667	3.051.667
<b>SD</b>	5.927	738.686	1.477.449
<b>p-Wert RPMI/ RPMI + 50% FCS</b>	(=0,09)	<0,001	<0,001

Tabelle A 8

**Tabelle A 9**

Rohdaten für: 3.3.6. Vergleichende Betrachtung der Prothese P3 in RPMI mit und ohne FKS  
 visualisiert durch: Diagramm A 1  
 Stämme: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* SC 5314  
 Materialien: P3  
 Medium: RPMI, RPMI mit 50% FKS  
 Methode: Adhäsionsassay/Biofilmbildung  
 Bestimmung von: KBE

<b>ATCC 10231</b>			
<b>P3 in RPMI</b>	<b>1,5 h</b>	<b>24 h</b>	<b>72 h</b>
Exp 1/1	291.000	41.800	78.900
Exp 1/2	218.000	38.500	81.800
Exp 2/1	274.000	54.400	76.400
Exp 2/2	182.000	69.100	41.800
Exp 3/1	142.000	56.800	43.200
Exp 3/2	163.000	49.300	48.600
<b>MW</b>	211.667	51.650	61.783
<b>SD</b>	60.533	11.082	19.109
<b>P3 in RPMI+ 50% FKS</b>	<b>1,5 h</b>	<b>24 h</b>	<b>72 h</b>
Exp 1/1	23.700	19.800	384.000
Exp 1/2	29.300	13.800	443.000
Exp 2/1	21.200	22.800	449.000
Exp 2/2	28.700	37.800	496.000
Exp 3/1	30.400	46.200	461.000
Exp 3/2	35.200	36.300	348.000
<b>MW</b>	28.083	29.450	430.167
<b>SD</b>	4.989	12.486	54.197
<b>p-Wert RPMI/ RPMI + 50% FCS</b>	<0,001	=0,008	<0,001

<b>SC 5314</b>			
<b>P3 in RPMI</b>	<b>1,5 h</b>	<b>24 h</b>	<b>72 h</b>
Exp 1/1	94.000	212.000	65.100
Exp 1/2	147.000	142.000	52.700
Exp 2/1	112.000	185.000	56.100
Exp 2/2	83.000	107.000	67.300
Exp 3/1	-	126.000	71.800
Exp 3/2	-	91.000	78.900
<b>MW</b>	109.000	143.833	65.317
<b>SD</b>	28.012	46.499	9.743
<b>P3 in RPMI+ 50% FKS</b>	<b>1,5 h</b>	<b>24 h</b>	<b>72 h</b>
Exp 1/1	15.200	317.000	621.000
Exp 1/2	17.900	356.000	665.000
Exp 2/1	16.800	367.000	698.000
Exp 2/2	27.100	421.000	518.000
Exp 3/1	30.400	563.000	472.000
Exp 3/2	33.500	518.000	558.000
<b>MW</b>	23.483	423.667	588.667
<b>SD</b>	7.819	97.455	87.603
<b>p-Wert RPMI/ RPMI + 50% FCS</b>	<0,001	<0,001	<0,001

Tabelle A 9

## Diagramm A 1

Visualisierung für: 3.3.6. Vergleichende Betrachtung der Prothese P3 in RPMI mit und ohne FKS

Rohdaten in: Tabelle A 9

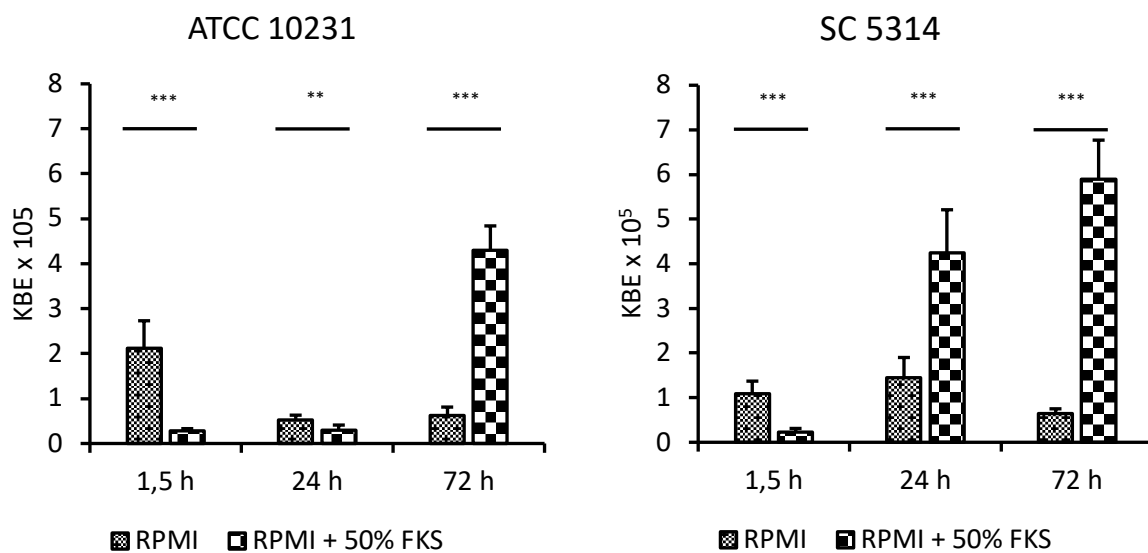
Stämme: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* SC 5314

Materialien: P3

Medium: RPMI, RPMI mit 50% FKS

Methode: Adhäsionsassay/Biofilmbildung

Bestimmung von: KBE



**Diagramm A 1** Adhäsion und Biofilmbildung an der Kollagen-Prothese ohne Silberbeschichtung P3 in RPMI-Medium und RPMI mit 50% FKS von *Candida albicans* ATCC 10231 und SC 5314. Dargestellt sind die Mittelwerte und die errechneten Standardabweichungen der ausgezählten KBE zu den jeweiligen Inkubationszeiten. Statistisch signifikante Unterschiede der Silber-Prothese P1 in den beiden Inkubationsmedien RPMI und RPMI mit 50% FKS zu den jeweiligen Inkubationszeiten mit einem p-Wert < 0,01 sind mit zwei Sternen und mit einem p-Wert < 0,001 mit drei Sternen gekennzeichnet. KBE =Kolonie-bildende Einheiten, h=Stunde



**Tabelle A 10**

Rohdaten für: 3.4.1. Adhäsion von *Candida albicans* an der Kollagenprothese ohne Silberazetat nach Hinzugabe von Silbernitrat in Abhängigkeit von der Silberionen-Konzentration

visualisiert durch: Abbildung 19

Stämme: *Candida albicans* ATCC 10231

Materialien: P3

Medium: RPMI mit 50% FKS

Methode: Kollagenprothesen werden mit *Candida albicans* infiziert. Zum Überstand wird Silbernitrat in 1:5 Verdünnung gegeben. Zellen werden nach 1,5h, 24h und 72h von den Prothesen entfernt und ausgespatelt (serielle Verdünnung 1:10).

Bestimmung von: KBE

ATCC 10231										
	Kontrolle	1000 µg	500 µg	100 µg	50 µg	10 µg	5 µg	1 µg	0,5 µg	0,1 µg
<b>1,5 h</b>										
Exp 1	41.500	2.450	2.470	3.580	7.700	16.100	49.800	71.000	36.500	36.700
Exp 2	27.800	1.980	2.010	3.000	6.540	20.400	38.300	116.000	28.600	26.700
<b>MW</b>	<b>34.650</b>	<b>2.215</b>	<b>2.240</b>	<b>3.290</b>	<b>7.120</b>	<b>18.250</b>	<b>44.050</b>	<b>93.500</b>	<b>32.550</b>	<b>31.700</b>
<b>SD</b>	<b>9.687</b>	<b>332</b>	<b>325</b>	<b>410</b>	<b>820</b>	<b>3.041</b>	<b>8.132</b>	<b>31.820</b>	<b>5.586</b>	<b>7.071</b>
<b>24 h</b>										
Exp 1	37.500	0	0	530	21.100	39.700	111.000	456.000	56.500	38.900
Exp 2	29.600	0	0	480	18.900	30.400	129.000	374.000	46.400	28.900
<b>MW</b>	<b>33.550</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>505</b>	<b>20.000</b>	<b>35.050</b>	<b>120.000</b>	<b>415.000</b>	<b>51.450</b>	<b>33.900</b>
<b>SD</b>	<b>5.586</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>35</b>	<b>1.556</b>	<b>6.576</b>	<b>12.728</b>	<b>57.983</b>	<b>7.142</b>	<b>7.071</b>
<b>72 h</b>										
Exp 1	273.000	0	0	0	34.400	156.000	304.000	564.000	531.000	296.000
Exp 2	417.000	0	0	0	41.200	223.000	483.000	713.000	664.000	386.000
<b>MW</b>	<b>345.000</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>37.800</b>	<b>189.500</b>	<b>393.500</b>	<b>638.500</b>	<b>597.500</b>	<b>341.000</b>
<b>SD</b>	<b>101.823</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>4.808</b>	<b>47.376</b>	<b>126.572</b>	<b>105.359</b>	<b>94.045</b>	<b>63.640</b>

Tabelle A 10

**Tabelle A 11**

Rohdaten für: 3.4.1. Adhäsion von *Candida albicans* an der Kollagenprothese ohne Silberazetat nach Hinzugabe von Silbernitrat in Abhängigkeit von der Silberionen-Konzentration

visualisiert durch: Abbildung 19

Stämme: *Candida albicans* SC 5314

Materialien: P3

Medium: RPMI mit 50% FKS

Methode: Kollagenprothesen werden mit *Candida albicans* infiziert. Zum Überstand wird Silbernitrat in 1:5 Verdünnung gegeben. Zellen werden nach 1,5h, 24h und 72h von den Prothesen entfernt und ausgespatelt (serielle Verdünnung 1:10).

Bestimmung von: KBE

SC 5314										
	Kontrolle	1000 µg	500 µg	100 µg	50 µg	10 µg	5 µg	1 µg	0,5 µg	0,1 µg
<b>1,5 h</b>										
Exp 1	43.100	2.160	2.230	4.920	9.600	25.800	30.700	44.600	55.600	38.700
Exp 2	39.400	2.100	2.200	4.520	8.700	31.300	36.100	41.300	51.200	35.900
<b>MW</b>	<b>41.250</b>	<b>2.130</b>	<b>2.215</b>	<b>4.720</b>	<b>9.150</b>	<b>28.550</b>	<b>33.400</b>	<b>42.950</b>	<b>53.400</b>	<b>37.300</b>
<b>SD</b>	<b>2.616</b>	<b>42</b>	<b>21</b>	<b>283</b>	<b>636</b>	<b>3.889</b>	<b>3.818</b>	<b>2.333</b>	<b>3.111</b>	<b>1.980</b>
<b>24 h</b>										
Exp 1	449.000	0	0	370	29.700	437.000	488.000	2.470.000	645.000	388.000
Exp 2	390.000	0	0	340	27.600	354.000	538.000	2.300.000	613.000	366.000
<b>MW</b>	<b>419.500</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>355</b>	<b>28.650</b>	<b>395.500</b>	<b>513.000</b>	<b>2.385.000</b>	<b>629.000</b>	<b>377.000</b>
<b>SD</b>	<b>41.719</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>21</b>	<b>1.485</b>	<b>58.690</b>	<b>35.355</b>	<b>120.208</b>	<b>22.627</b>	<b>15.556</b>
<b>72 h</b>										
Exp 1	573.000	0	0	0	248.000	239.000	1.220.000	1.010.000	632.000	487.000
Exp 2	436.000	0	0	0	211.000	345.000	910.000	800.000	598.000	431.000
<b>MW</b>	<b>504.500</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>229.500</b>	<b>292.000</b>	<b>1.065.000</b>	<b>905.000</b>	<b>615.000</b>	<b>459.000</b>
<b>SD</b>	<b>96.874</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>26.163</b>	<b>74.953</b>	<b>219.203</b>	<b>148.492</b>	<b>24.042</b>	<b>39.598</b>

Tabelle A 11

**Tabelle A 12**

Rohdaten für: 4.2. Die Induktion der Adhäsion und Biofilmbildung bei *Candida albicans* durch Silber nach Hinzugabe von FKS

visualisiert durch: Diagramm A 2

Stämme: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* SC 5314

Materialien: P1, P3

Medium: RPMI

Methode: Adhäsionsassay/Biofilmbildung

Bestimmung von: KBE

<b>Prothese P1</b>			
<b>ATCC 10231</b>	<b>1,5 h</b>	<b>24 h</b>	<b>72 h</b>
Exp 1/1	96.000	3.140	40
Exp 1/2	99.000	3.510	10
Exp 2/1	91.000	2.180	70
Exp 2/2	102.000	1.580	90
Exp 3/1	124.000	2.030	60
Exp 3/2	136.000	1.450	50
<b>MW</b>	108.000	2.315	53
<b>SD</b>	17.833	836	27
<b>SC 5314</b>	<b>1,5 h</b>	<b>24 h</b>	<b>72 h</b>
Exp 1/1	67.500	740	210
Exp 1/2	54.900	700	150
Exp 2/1	86.000	610	180
Exp 2/2	61.800	1.040	110
Exp 3/1	-	910	30
Exp 3/2	-	1.230	70
<b>MW</b>	67.550	872	125
<b>SD</b>	13.335	234	68
<b>p-Wert ATCC 10231/SC 5314</b>	=0,005	=0,012	=0,04

Tabelle A 12

<b>Prothese P3</b>			
<b>ATCC 10231</b>	<b>1,5 h</b>	<b>24 h</b>	<b>72 h</b>
Exp 1/1	291.000	41.800	78.900
Exp 1/2	218.000	38.500	81.800
Exp 2/1	274.000	54.400	76.400
Exp 2/2	182.000	69.100	41.800
Exp 3/1	142.000	56.800	43.200
Exp 3/2	163.000	49.300	48.600
<b>MW</b>	211.667	51.650	61.783
<b>SD</b>	60.533	11.082	19.109
<b>SC 5314</b>	<b>1,5 h</b>	<b>24 h</b>	<b>72 h</b>
Exp 1/1	94.000	212.000	65.100
Exp 1/2	147.000	142.000	52.700
Exp 2/1	112.000	185.000	56.100
Exp 2/2	83.000	107.000	67.300
Exp 3/1	-	126.000	71.800
Exp 3/2	-	91.000	78.900
<b>MW</b>	109.000	143.833	65.317
<b>SD</b>	28.012	46.499	9.743
<b>p-Wert ATCC 10231/SC 5314</b>	=0,014	<0,001	(=0,7)

## Diagramm A 2

Visualisierung für: 4.2. Die Induktion der Adhäsion und Biofilmbildung bei *Candida albicans* durch Silber nach Hinzugabe von FKS

Rohdaten in: Tabelle A 12

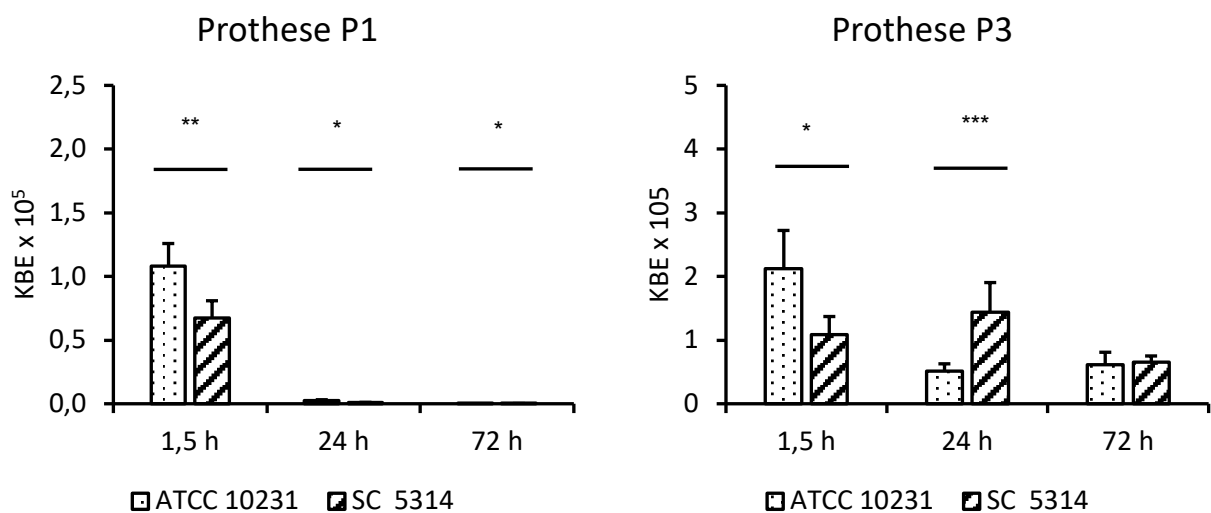
Stämme: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* SC 5314

Materialien: P1, P3

Medium: RPMI

Methode: Adhäsionsassay/Biofilmbildung

Bestimmung von: KBE



**Diagramm A 2** Adhäsion und Biofilmbildung an der Silber-beschichteten Prothese P1 und der Kollagenprothese ohne Silberbeschichtung P3 in RPMI-Medium von *Candida albicans* ATCC 10231 und SC 5314. Dargestellt sind die Mittelwerte und die errechnete Standardabweichung der ausgezählten KBE zu den jeweiligen Inkubationszeiten. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den *Candida albicans*-Stämmen ATCC 10231 und SC 5314 mit einem p-Wert < 0,05 sind mit einem Stern, mit einem p-Wert < 0,01 mit zwei Sternen und mit einem p-Wert < 0,001 mit drei Sternen gekennzeichnet. KBE = Kolonie-bildende Einheiten, h=Stunde

**Tabelle A 13**

Rohdaten für: 4.2. Die Induktion der Adhäsion und Biofilmbildung bei *Candida albicans* durch Silber nach Hinzugabe von FKS

visualisiert durch: Diagramm A 3

Stämme: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* SC 5314

Materialien: P1, P3

Medium: RPMI mit 50% FKS

Methode: Adhäsionsassay/Biofilmbildung

Bestimmung von: KBE

<b>P1</b>			
<b>ATCC 10231</b>	<b>1,5 h</b>	<b>24 h</b>	<b>72 h</b>
Exp 1/1	98.000	364.000	695.000
Exp 1/2	78.000	291.000	512.000
Exp 2/1	79.500	256.000	714.000
Exp 2/2	53.600	241.000	1.030.000
Exp 3/1	86.000	312.000	735.000
Exp 3/2	66.500	374.000	849.000
<b>MW</b>	76.933	306.333	755.833
<b>SD</b>	15.408	54.724	172.735
<b>SC 5314</b>			
<b>SC 5314</b>	<b>1,5 h</b>	<b>24 h</b>	<b>72 h</b>
Exp 1/1	47.100	3.120.000	1.760.000
Exp 1/2	50.300	2.730.000	1.970.000
Exp 2/1	58.800	2.940.000	1.520.000
Exp 2/2	59.300	4.130.000	4.980.000
Exp 3/1	62.600	3.870.000	3.870.000
Exp 3/2	57.300	4.580.000	4.210.000
<b>MW</b>	55.900	3.561.667	3.051.667
<b>SD</b>	5.927	738.686	1.477.449
<b>p-Wert ATCC 10231/ SC 5314</b>			
	=0,011	<0,001	=0,004

<b>P3</b>			
<b>ATCC 10231</b>	<b>1,5 h</b>	<b>24 h</b>	<b>72 h</b>
Exp 1/1	23.700	19.800	384.000
Exp 1/2	29.300	13.800	443.000
Exp 2/1	21.200	22.800	449.000
Exp 2/2	28.700	37.800	496.000
Exp 3/1	30.400	46.200	461.000
Exp 3/2	35.200	36.300	348.000
<b>MW</b>	28.083	29.450	430.167
<b>SD</b>	4.989	12.486	54.197
<b>SC 5314</b>			
<b>SC 5314</b>	<b>1,5 h</b>	<b>24 h</b>	<b>72 h</b>
Exp 1/1	15.200	317.000	621.000
Exp 1/2	17.900	356.000	665.000
Exp 2/1	16.800	367.000	698.000
Exp 2/2	27.100	421.000	518.000
Exp 3/1	30.400	563.000	472.000
Exp 3/2	33.500	518.000	558.000
<b>MW</b>	23.483	423.667	588.667
<b>SD</b>	7.819	97.455	87.603
<b>p-Wert ATCC 10231/ SC 5314</b>			
	(= 0,25)	<0,001	(=0,06)

Tabelle A 13

### Diagramm A 3

Visualisierung für: 4.2. Die Induktion der Adhäsion und Biofilmbildung bei *Candida albicans* durch Silber nach Hinzugabe von FKS

Rohdaten in: Tabelle A 13

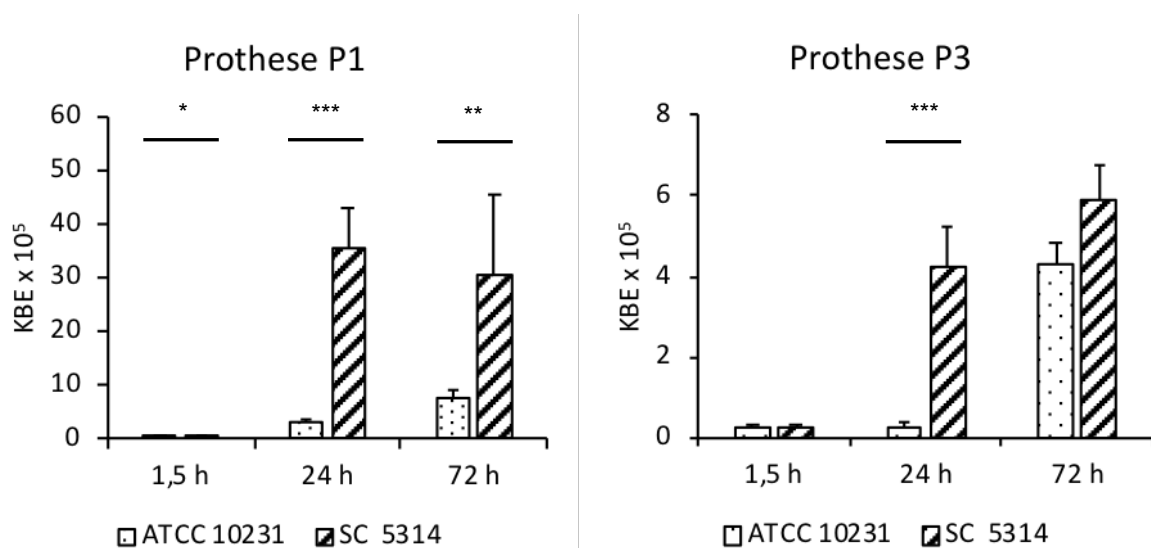
Stämme: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* SC 5314

Materialien: P1, P3

Medium: RPMI mit 50% FKS

Methode: Adhäsionsassay/Biofilmbildung

Bestimmung von: KBE



**Diagramm A 3** Adhäsion und Biofilmbildung an der Silber-beschichteten Prothese P1 und der Kollagenprothese ohne Silberbeschichtung P3 in RPMI-Medium mit 50% FKS von *Candida albicans* ATCC 10231 und SC 5314. Dargestellt sind die Mittelwerte und die errechnete Standardabweichung der ausgezählten KBE zu den jeweiligen Inkubationszeiten. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den *Candida albicans*-Stämmen ATCC 10231 und SC 5314 mit einem p-Wert < 0,05 sind mit einem Stern, mit einem p-Wert < 0,01 mit zwei Sternen und mit einem p-Wert < 0,001 mit drei Sternen gekennzeichnet. KBE =Kolonie-bildende Einheiten, h=Stunde